Universität Ulm
Medizinische Fakultät
Institut für Pathologie und Rechtsmedizin,
Abteilung Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

MONOSOMIE 22 IN EPENDYMOMEN

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Monika Eicker
aus Neuss

Ulm 2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Pof. Dr. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eckhard Rickels

Tag der Promotion: 08. Februar 2007

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN IV

1 EINLEITUNG 1

1.1 Hirntumoren 1

1.2 Ependymale Hirntumoren 1

1.3 Molekulare Interphasezytogenetik 7

2 ZIELSETZUNG 10

3 MATERIALIEN 11

3.1 Ependymale Hirntumoren 11

3.2 Geräte 14

3.3 Chemikalien und Medien 15

3.4 Lösungen 16

3.5 Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe 19

4 METHODEN 21

4.1 Nicktranslation 21

4.2 Entparaffinieren und Zellkernisolierung 22

4.3 Herstellung von Zytospinpräparaten 22

4.4 Fluoreszenz-i*n situ*-Hybridisierung 23

4.5 Mikroskopische Auswertung 27

4.6 Cut-off - level 28

4.7 Statistische Auswertung 28

5 ERGEBNISSE 29

5.1 cut-off – level 29

5.2 Deletion 22q 33

5.3 Deletion 22q in Subpopulationen 36

5.4 Zugewinn von Chromosom 22q 40

6 DISKUSSION 45

6.1 Deletion 22q 47

6.2 Deletion 22q in Subpopulationen 54

6.3 Zugewinn von Chromosom 22q 57

6.4 Bedeutung von Deletion 22q 59

7 ZUSAMMENFASSUNG 63

8 LITERATURVERZEICHNIS 65

IV

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
aE	anaplastisches Ependymom
Aqua dest, a.d.	Aqua destillata
BCR	Breakpoint cluster region
Bio	Biotin
Biotin-16-dUTP	mit Biotin markiertes Desoxyuridintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CEPH	Centre d`Ètude du Polymorphisme Humain
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
Cl_2	Chlorid
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
Dig-11-dUTP	mit Digoxigenin markiertes Desoxyuridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Ependymom
Ebl	Ependymoblastom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gramm
H	Stunde

HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
IgG	Immunglobulin G
IPZG	Interphasezytogenetik
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LOH	Loss of heterozygosity
µ	mikro
M	molar (mol/l)
(M)bp	(Mega-)Basenpaare
Mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Min	Minute
Ml	Milliliter
myE	myxopapilläres Ependymom
Na	Natrium
NF	Neurofibromatose
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Formaldehyd
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
Rpm	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	Subependymom
Sec	Sekunde
SSC	Saline sodium citrat buffer
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
Unbek.	unbekannt
YAC	yeast artificial chromosome
ZNS	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 HIRNTUMOREN

Die häufigsten soliden Tumoren des Kindesalters sind Hirntumoren. Ihre Gesamtinzidenz von 390 pro Jahr (Deutschland) ist ähnlich hoch wie die der akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Trotz dieser ähnlich hohen Inzidenz haben Hirntumoren eine wesentlich schlechtere Prognose [86]. Unser Verständnis der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen hat alleine in der letzten Dekade deutlich zugenommen. Während insbesondere bei der ALL im Kindesalter enorme Therapieerfolge erzielt wurden, konnten ähnliche Fortschritte weder im pathogenetischen Verständnis von Hirntumoren noch in ihrer Therapie rekapituliert werden. Molekulargenetische Untersuchungen von Hirntumoren, insbesondere seit der Entdeckung der PCR haben entscheidende Fortschritte gemacht, die dazu beigetragen haben, die Pathogenese dieser Erkrankungen besser zu verstehen. So hofft man eines Tages spezifische prognostische Faktoren zu definieren, die therapierelevant umgesetzt werden können.

Bei zunehmender Malignität einer Reihe von Hirntumoren wurden mittels zytogenetischer Untersuchung vermehrt komplexe Karyotypen gefunden. Manche Tumoren zeigen darüber hinaus auch einen hohen Mitoseindex. Diese Veränderungen könnten mit einer schlechten Prognose einhergehen, jedoch ist die Beziehung zwischen Histologie und Prognose nicht konstant. Daher liegt es nahe, nach verbesserten prognostischen Markern zu suchen [85].

1.2 EPENDYMALE HIRNTUMOREN

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE

Die Hirnventrikel und der Zentralkanal des Rückenmarks werden von Ependym ausgekleidet. Die Ependymzellen sind neuroektodermalem Ursprungs und zählen zu den glialen Zellen des Zentralnervensystems (ZNS).

Ependymome sind seltene Tumoren die aus dem Ependym hervorgehen. Ihre Inzidenz liegt bei etwa 5% der primären Hirntumoren und 60% der spinalen Tumoren. Im Kindesalter ist die Inzidenz deutlich höher und liegt bei über 30% der primären Hirntumoren sowie rund 10 Prozent aller Hirntumoren. Sie werden vor allem in der ersten Dekade diagnostiziert [33]. Ependymome des Kindesalters können an jeder Stelle des Ventrikelsystems entstehen, jedoch treten 90% intrakraniell auf. Zwei Drittel liegen in der hinteren Schädelgrube bzw. im Bereich des 4. Ventrikels und wachsen verdrängend meist in das Ventrikellumen vor [31,54,55,64]. Seltene Varianten ohne Bezug zum Ventrikelsystem sind prä- und postsakrale extraspinale Ependymome sowie intrakranielle Ependymome ohne Bezug zu den Ventrikeln. Es wird angenommen dass diese Ependymome von versprengten Ependymzellen ausgehend entstehen [25,75].

Ein zweiter Inzidenzpeak liegt zwischen der dritten und fünften Dekade [45]. Ependymome des Erwachsenen treten meist spinal auf, wobei die lumbosakralen Segmente am häufigsten betroffen sind [25,41]. Diese spinalen Läsionen befinden sich gewöhnlich intramedullär. Sie haben Stift- oder Spindelform und können eine Länge von über 20 cm erreichen.

Spinale Ependymome sind oft mit der zentralen Form der Neurofibromatose assoziiert.

Während unabhängig von Tumorsitz und Lebensalter in der Vergangenheit Ependymome nur eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts aufwies [42,74], zeigen jüngere Untersuchungen ein deutliche Prädominanz für das männliche Geschlecht ein Verhältnis von 1,7 bzw. 2,0 zu 1 [12,22,29,61].

1.2.2. Klinische Präsentation und Therapie

Ependymome verursachen je nach Lokalisation unterschiedliche Symptome. Intrakranielle Tumoren verursachen durch ihre Größe eine Massenverschiebung oder verlegen den Liquorabfluss, wodurch es zu erhöhten intrakraniellen Druck mit den klassischen Symptomen wie Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen kommt [41]. Selten treten Hirnnervensymptome hinzu. Spinale Ependymome können zu entsprechenden motorischen und/oder sensorischen Ausfällen führen, wobei bei

Filumependymomen zusätzlich Sphinkterdysfunktion imponieren [33,70]. Symptomatische spinale Ependymome sind in der Regel sehr viel kleiner als intrakranielle Tumoren.
Unklarheit herrscht über geeignete Therapiemöglichkeiten bei Ependymomen [33]. Heute ist die komplette operative Resektion (R0) die Therapie der Wahl und ist von prognostischer Bedeutung [1,49,69]. Adjuvante oder auch neo-adjuvante Therapieansätze werden kontrovers diskutiert. So gibt es nur wenige Studien, die eine verbesserte Prognose für Patienten nach Chemo- oder Radiotherapie nachwiesen [26,49]. Andere Studien beschreiben sogar eine bessere Prognose für Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten [20].
Ependymome haben eine starke Rezidivneigung (bis zu 12 Jahren postoperativ). Der histologische Malignitätsgrad, die Lokalisation und Größe des Tumors scheinen hierbei keine Rolle zu spielen.

1.2.3. PATHOLOGIE UND ZYTOGENETIK

Einzelne Studien beschreiben für Ependymome unabhängig von ihrem WHO-Grad eine geringe Neigung zur cerebrospinalen Aussaat (bis zu 18%), wobei diese bis zu 11 Jahre nach der Operation beschrieben wurde [51,73]. Fernmetastasen kommen bei Ependymomen nur in extrem seltenen Fällen vor, wobei die Lunge am häufigsten betroffen ist [40,70]. Ein Zusammenhang mit vorangegangenen Operationen wird diskutiert.
Makroskopisch imponieren Ependymome als kleine, solide Tumoren mit einer graurötlichen Schnittfläche. Sie sind oftmals zystisch und können kalzifizierte Areale enthalten [25,73].
Histologisch sind Ependymome niedriger Malignitätsgrade gekennzeichnet durch ein ruhiges Zellbild mit mittelgroßen, rundlichen, isomorphen Zellkernen. Wegweisend für die Diagnose sind Rosetten bzw. Pseudorosetten. Bei echten Rosetten handelt es sich um eine ringförmige Aneinanderlagerung von Tumorzellen um ein zentrales Lumen. Die Tumorzellen sind elongiert, oft zeigen sie an der lumenzugewandten Seite Zilien. Pseudorosetten werden von radiär um ein Blutgefäß angeordneten, GFAP-positiven Tumorzellausläufern gebildet, haben also kein echtes Lumen. Die länglichen Zellen inserieren direkt an der Gefäßwand, die Zellkerne sind an der

gefäßfernen Seite lokalisiert, so dass der Eindruck eines kernfreien GFAP-positiven Hofes entsteht [25] (Abbildung 1).

Bei ependymalen Tumoren werden anhand der WHO-Klassifikation für Hirntumoren verschiedene Malignitätsgrade unterschieden. Das Subependymom (WHO-Grad I) wächst sehr langsam und ist daher meist asymptomatisch. Das myxopapilläre Ependymom wird ebenfalls dem WHO-Grad I zugeordnet, da es sehr langsam wächst und nur in Einzelfällen entartet. Das Ependymom wird als WHO-Grad II-Tumor eingestuft, die Übergänge zum anaplastischen Ependymom (WHO-Grad III) sind fließend. Schließlich gibt es noch das Ependymoblastom, WHO-Grad IV, das außerordentlich bösartig ist. Dieser Tumor zählt zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren. Es gelang bislang nicht, valide morphologische prognostische Parameter für Ependymome bei WHO-Grad II- und III-Tumoren zu etablieren [25,40].

Für die zytogenetische Untersuchung von Ependymomen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Dazu gehören die konventionelle Zytogenetik, CGH (comparative genomic hybridization), FISH (fluorescence-*in situ*-hybridization) sowie LOH (loss of heterozygocity)-Untersuchungen.
Bislang war es jedoch nicht möglich, mittels dieser verschiedenen Untersuchungen zu einheitlichen Ergebnissen zu gelangen. Infolgedessen konnten keine genomischen Veränderungen identifiziert werden, die es erlaubten Rückschlüsse auf die Tumorigenese eines ependymalen Tumors zu ziehen. Dadurch war auch eine therapierelevante Konsequenz nicht möglich.
Die in der Literatur am häufigsten beschriebene chromosomale Veränderung ist eine Monosomie 22 bzw. strukturelle Veränderungen von 22q. Diese Veränderungen wurden in etwa einem Drittel der Fälle mit abnormalem Karyotyp in der Giemsa-Bandenfärbung nachgewiesen.
Für den Verlust von Chromosom 22q in ependymalen Tumoren wird eine entscheidende Rolle in der Tumorigenese angenommen, insbesondere wird von einigen Autoren ein Tumorsuppressorgen auf 22q11 vermutet.

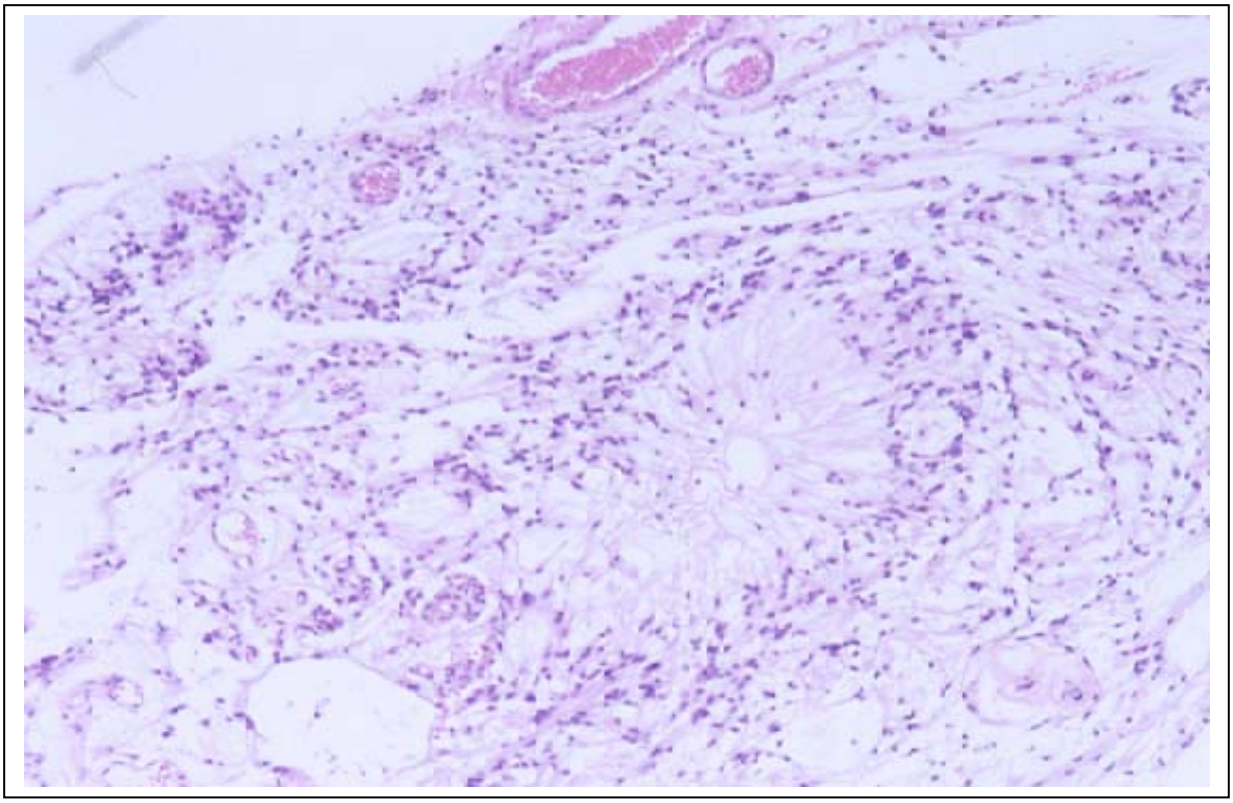


Abb.1a: Myxopapilläres Ependymom. Es findet sich eine niedrige Zelldichte, die Zellen zeigen die Tendenz zur Elongation. Durch intrazellulär und perivaskulär abgelagertes Muzin entsteht ein vakuoläres Schnittbild

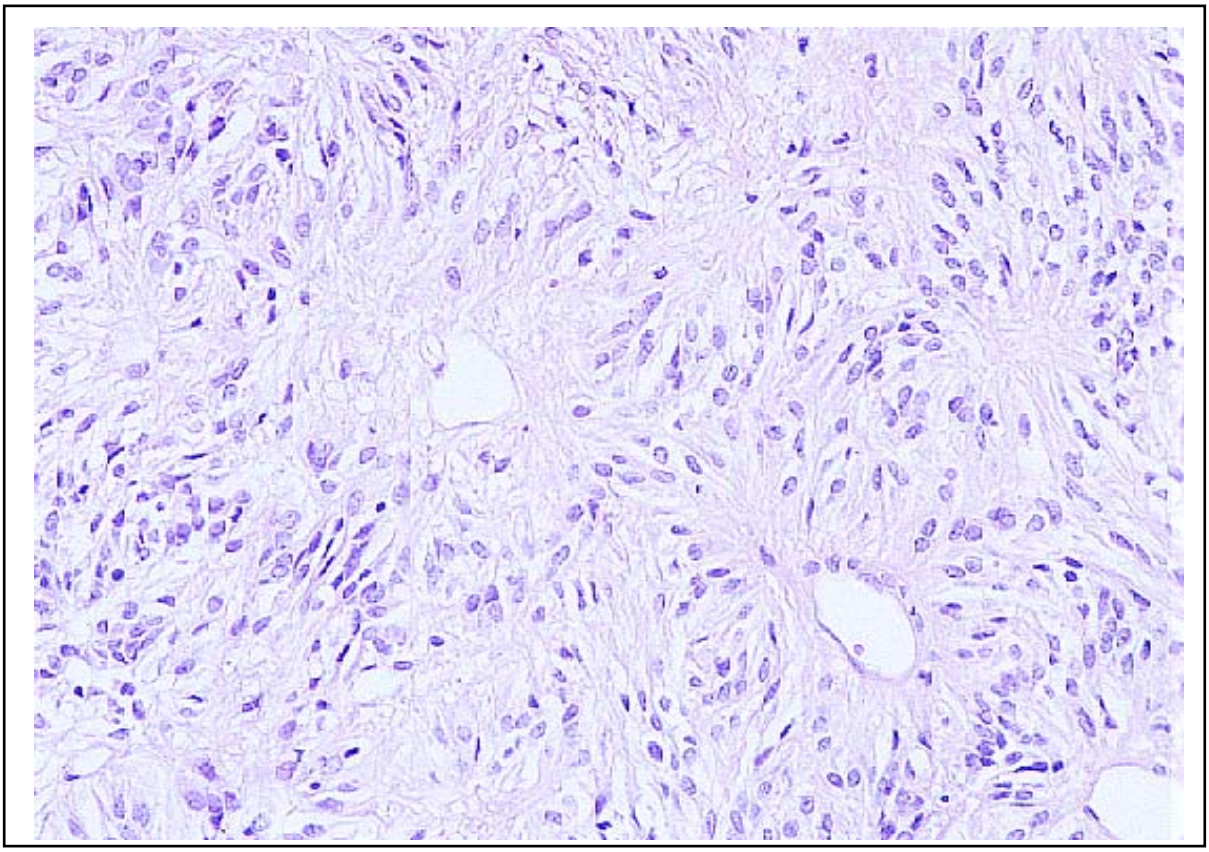


Abb.1b: Ependymom. In der großen Vergrößerung wird der beträchtliche fibrilläre Hintergrund um die Pseudorosetten deutlich.

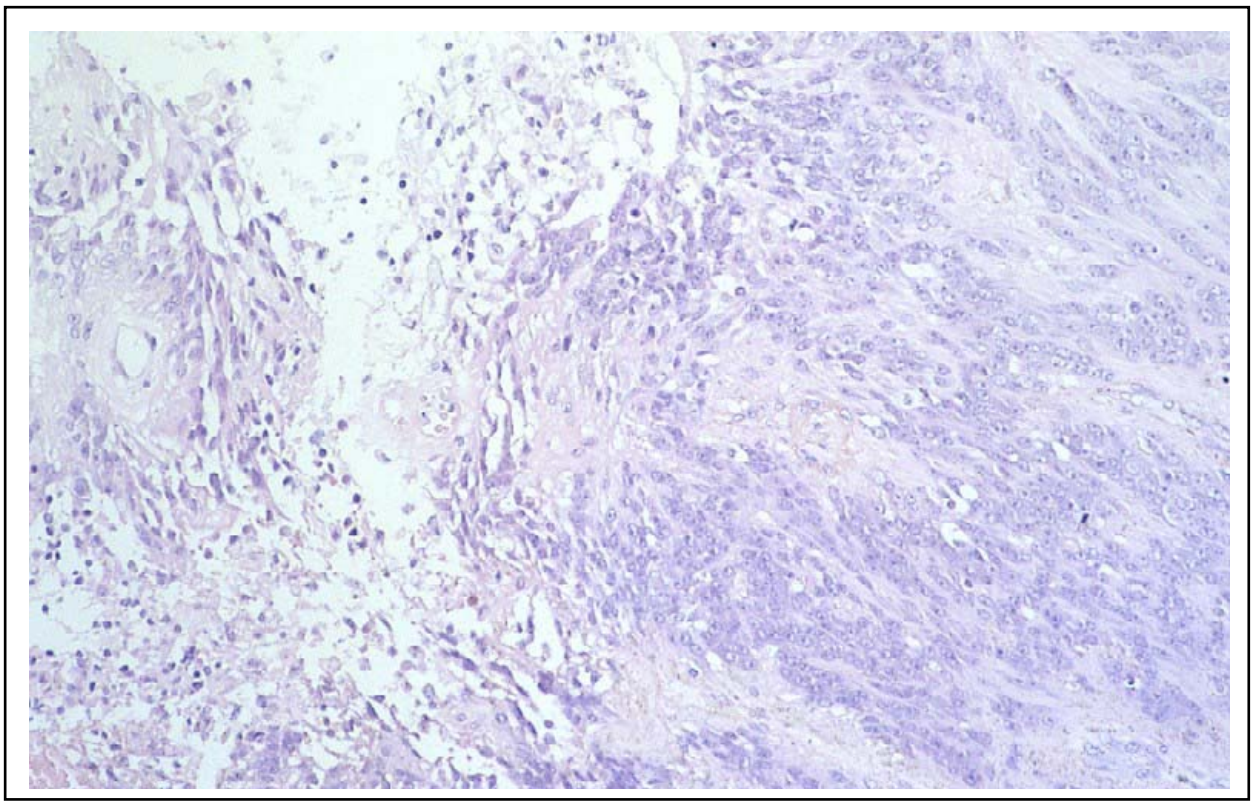


Abb.1c: Beim anaplastischen Ependymom verschwinden die charakteristischen ependymalen Rosetten. Es finden sich multiple Kernatypien und eine erhöhte Mitoserate sowie ausgedehnte nekrotische Areale.

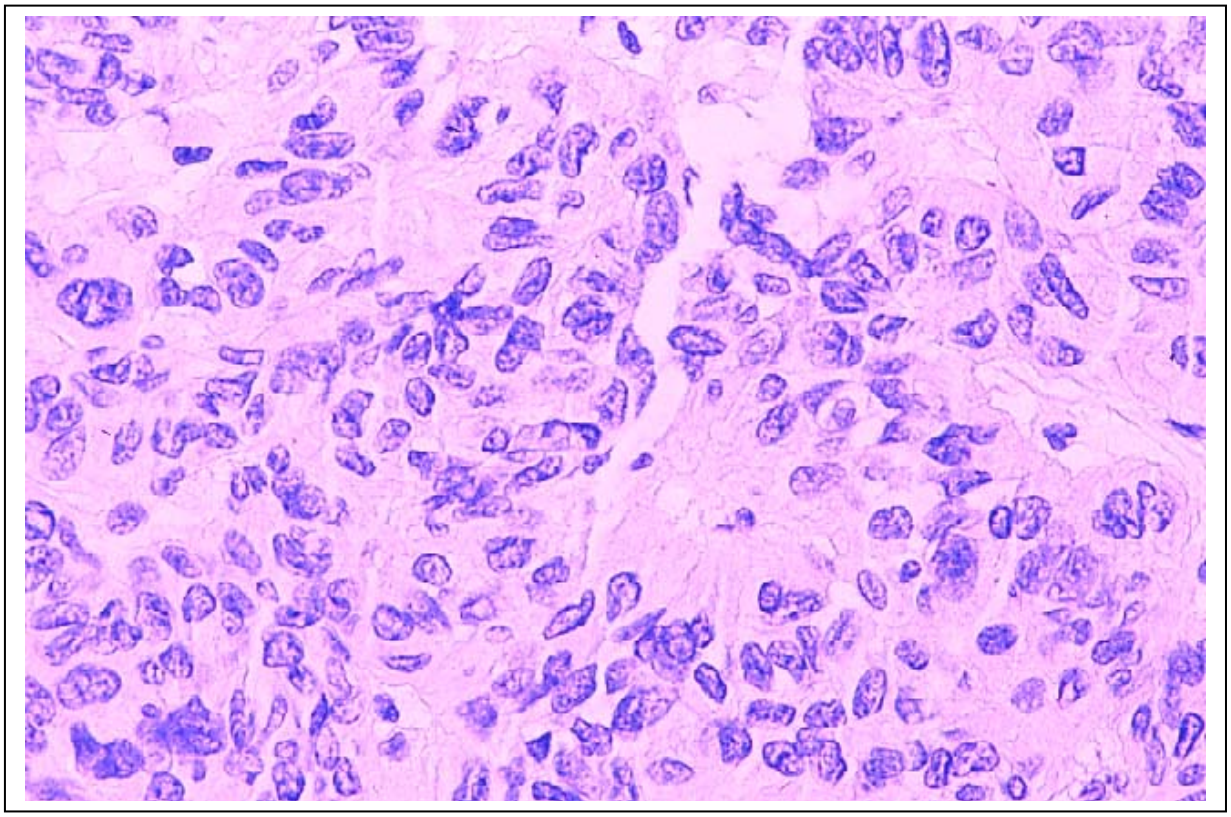


Abb.1d: Das Ependymoblastom zeigt ependymoblastische Rosetten oder Hohlräume. Von den anaplastischen Ependymomen ist es abzugrenzen durch die relativ isomorphen Zellen und das Fehlen von Riesenzellen, Gefäßwandproliferationen und ausgedehnten Nekrosen.

1.3 Molekulare Interphasezytogenetik

Die Hauptmethode, FISH, die hier angewandt wurde, ist eine Methode der Interphasezytogenetik (IPZG). Zu diesen Methoden zählt auch die CGH. Diese zytogenetischen Methoden erlauben eine Untersuchung an archiviertem paraffinfixiertem Material um so auch an seltenen Tumoren einen integrierten Ansatz zur Tumor-Genomanalyse durchzuführen [69]. Mit Hilfe der Interphasezytogenetik ist es möglich, auch Zellen, die nicht in der Teilung begriffen sind, zu untersuchen. Zum einen vereinfacht und beschleunigt dies die Untersuchungen, da keine Inkulturnahme des zu untersuchenden Materials nötig ist. Zum anderen sind in der IPZG mehr Zellen der Untersuchung zugänglich, weil jede normal gestaltige Zelle verwendet werden kann [5]. Zur Veranschaulichung der IPZG dient Abbildung 2.

1.3.1 VERGLEICHENDE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG – (CGH)

Bei der CGH wird die gesamte genomische DNA verwendet, die aus dem zu untersuchenden Material gewonnen werden kann. Diese DNA wird auf Metaphasen gesunder Spender hybridisiert. Die Metaphasen können aus Blutlymphozyten gesunder Probanden gewonnen werden. Gleichzeitig wird Referenzmaterial (z.B. nicht tumoröses humanes Tonsillengewebe) auf dieselben Metaphasen hybridisiert. Auf diese Weise erhält man ein Bild, das die verschiedenen örtlichen DNA – Konzentrationen miteinander zu vergleichen erlaubt. Verluste (Deletionen), Zugewinne und ev. auch vorhandene Amplifikationen können so entdeckt und lokalisiert werden. Der Vorteil der CGH liegt damit in der Möglichkeit, relativ schnell das komplette Genom eines Tumors auf Imbalancen zu untersuchen. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie kleine Veränderungen wie z.B. Deletionen oder Zugewinne bis 10-20 Mbp bzw. Punktmutationen nicht erfasst [31]. Ferner sind bestimmte Chromosomen als kritisch anzusehen, da z.B. GC-reiche Regionen, insbesondere auf 1p, 16p und 19 häufig falsch positive Ergebnisse zeigen [37].

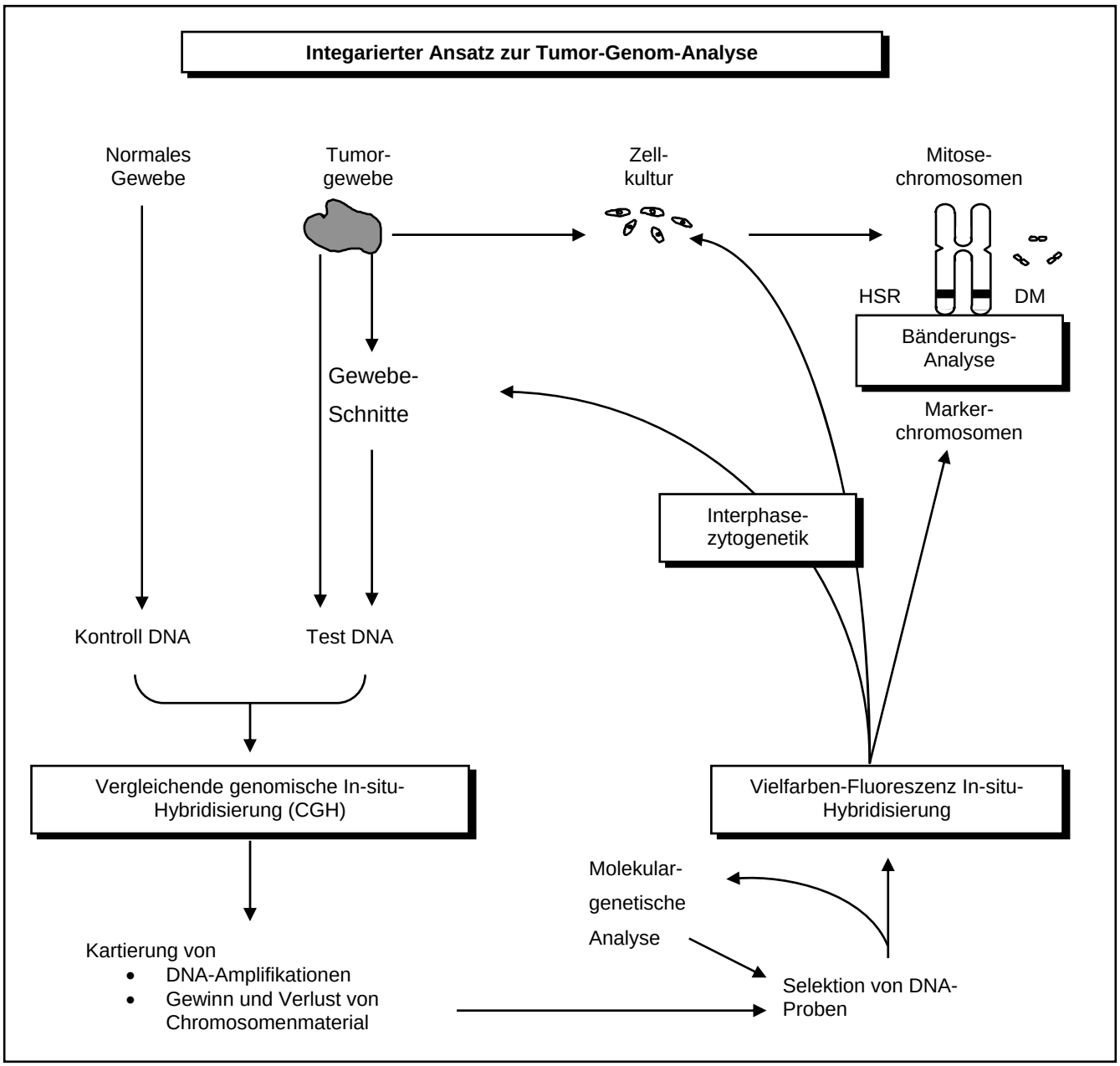


Abb. 2: Integrierter Ansatz zur Tumor-Genom-Analyse mit zytogenetischen und molekular-zytogenetischen Verfahren. DM (Double minute-Chromosomen) , HSR - homogeneously stained regions (homogen gefärbte Chromosomenregionen), DNA – desoxyribonucleine acid, CGH – comparative genomic hybridization [nach Cremer T, Deutsches Ärzteblatt 22: 92 (1995)]

1.3.2 FLUORESZENZ-*IN SITU*-HYBRIDISIERUNG, FISH

Mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung können gezielt definierte Chromosomenabschnitte untersucht werden. Hierzu benötigt man z.B. isolierte Zellkerne des zu untersuchenden Tumors. Alternativ können Schnittpräparate angefertigt werden, so dass die Untersuchung am Gewebeverband erfolgen kann. Das Anzüchten einer Zellkultur aus der Tumormasse entfällt bei dieser Methode und daher auch die damit verbundenen Risiken der Transformation in Kultur. Mit Hilfe der FISH sind viele Zellen der Auswertung zugänglich, und der Zeitaufwand pro auszuwertender Zelle ist vergleichsweise niedrig.

Die interessierenden Chromosomenabschnitte werden mit spezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Dies ermöglicht die selektive Anfärbung auch kleiner ausgewählter Chromosomenabschnitte im Interphasekern. Der Nachteil der FISH liegt darin, dass die durchgeführten Untersuchungen sehr punktuell sind, also keinen genomweiten Überblick ergeben [37].

2 ZIELSETZUNG

Die Molekularbiologie und Zytogenetik von Ependymomen ist noch weitgehend unverstanden. Aufgrund der Seltenheit des Tumors verfügen viele Studien über sehr kleine Fallzahlen.

In meiner Arbeit wurden 67 Ependymome mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) daraufhin untersucht, ob ein Verlust auf Chromosom 22q11-12 nachzuweisen ist. In einer Subpopulation von 26 ependymalen Tumoren lagen CGH-Daten vor [68].

Es wurden drei Sonden (YAC und kommerziell) in der Region 22q11-q12 und zwei Sonden für 9q34 (abl) bzw. 8p (YAC) angewandt. 8p wurde insbesondere gewählt, da Chromosom 8p in Ependymomen in der CGH keine Imbalancen zeigte [68].

Ziel dieser Arbeit war, eine Aussage darüber zu treffen, in wieviel Prozent der Ependymome tatsächlich Verluste von Chromosom 22q auftreten, ob bestimmte Subtypen oder Lokalisationen besonders betroffen sind und ob ein Unterschied zwischen kindlichen Tumoren und denen des Erwachsenenalters besteht.

3 MATERIAL

3.1 EPENDYMALE HIRNTUMOREN

In dieser Arbeit wurden 67 Ependymome untersucht. Das Geschlechterverhältnis war etwa gleich (m:w = 35:32). In 33 Fällen handelte es sich um Tumoren des Kindesalters (medianes Lebensalter 3 Jahre), in 34 Fällen um solche des Erwachsenen (medianes Lebensalter 40,5 Jahre). In dieser multizentrischen Studie wurden die Daten der archivierten Tumoren vollständig anonymisiert (sogenannter „Verblindeter Pathologe“).

Bei 17 Ependymomen handelte es sich um Rezidive (2 myE, 4 E, 10 aE, 1 Ebl). 11 der Rezidive waren kindliche Tumoren, in 6 Fällen handelte es sich um Rezidive erwachsener Patienten. 5 der Rezidivtumoren waren männlichen, 12 weiblichen Ursprungs. 2 Rezidive waren supratentoriellen Ursprungs, 10 entstammten der hinteren Schädelgrube und 5 wurden spinal diagnostiziert (Tabelle 1).

Die Tumoren lagen in 61 Fällen formalinfixiert und in Paraffin eingebettet vor; in 14 Fällen war Frischmaterial erhältlich. In acht Fällen lag sowohl Frisch- als auch Paraffinmaterial vor.

Die histologische Untersuchung der Tumoren mittels Stufen-HE-Schnitten ergab einen geschätzten Tumorzellgehalt von mehr als 90%.

Tabelle 1: Untersuchte Tumoren

Nummer	Lokalisation	Diagnose	Alter	Geschlecht	Primärtumor
1	supra	SE	40	M	ja
2	supra	SE	63	M	ja
3	supra	SE	30	W	ja
4	spinal	myE	25	M	ja
5	spinal	myE	26	M	nein
6	spinal	myE	50	W	ja
7	spinal	myE	40	M	ja
8	spinal	myE	39	M	ja
9	spinal	myE	47	M	ja
10	spinal	myE	14	M	ja
11	spinal	myE	27	M	ja
12	spinal	myE	16	M	nein
13	spinal	myE	35	M	ja
14	spinal	myE	22	M	ja
15	spinal	myE	41	M	ja
16	unbekannt	E	4	M	ja
17	HSG	E	2	W	ja
18	HSG	E	2	W	ja
19	HSG	E	8	W	ja
20	HSG	E	2	M	ja
21	HSG	E	3	W	nein
22	HSG	E	70	W	ja
23	HSG	E	9	W	nein
24	spinal	E	46	M	ja
25	spinal	E	13	M	ja
26	spinal	E	36	M	ja
27	spinal	E	61	M	ja
28	spinal	E	62	W	ja
29	spinal	E	39	M	ja
30	spinal	E	73	W	ja
31	spinal	E	40	W	nein
32	spinal	E	33	W	ja
33	spinal	E	76	M	ja
34	spinal	E	66	M	ja
35	supra	E	27	M	ja
36	supra	E	17	W	ja
37	supra	E	18	W	nein
38	supra	E	13	M	ja
39	HSG	aE	4	M	nein
40	HSG	aE	8	M	ja
41	HSG	aE	6	M	ja
42	HSG	aE	3	M	ja
43	HSG	aE	0,75	W	ja
44	HSG	aE	0,50	M	ja
45	HSG	aE	2	W	nein
46	HSG	aE	31	W	ja

47	HSG	aE	1	W	nein
48	HSG	aE	5	M	nein
49	HSG	aE	59	M	ja
50	HSG	aE	9	W	nein
51	HSG	aE	30	W	nein
52	HSG	aE	4	M	nein
53	sakrale WT	aE	2	W	ja
54	spinal	aE	55	W	nein
55	spinal	aE	41	W	nein
56	supra	aE	1	W	ja
57	supra	aE	3	M	ja
58	supra	aE	42	W	ja
59	supra	aE	41	W	ja
60	supra	aE	51	W	ja
61	supra	aE	6	W	ja
62	supra	aE	1	W	nein
63	HSG	Ebl	3	M	ja
64	HSG	Ebl	3	W	ja
65	HSG	Ebl	0,90	M	ja
66	HSG	Ebl	7	W	nein
67	supra	Ebl	3	W	ja

HSG – hintere Schädelgrube; WT – Weichteile, supra – supratentoriell, SE – Subependymom, myE – myxopapilläres Ependymom, E – Ependymom, aE – anaplastisches Ependymom, Ebl – Ependymoblastom, m- männlich, w – weiblich.

3.2 GERÄTE

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Geräte und Materialien sind im Folgenden alphabetisch aufgelistet.

Analysenwaage „type 1574“ (Sartorius, Göttingen), Autoklav (H+P, München), **B**echergläser 10, 100, 500, 1000 ml (Schott, Zwiesel), Blockthermostat BT 200 (Kleinfeld Labortechnik), Brutschrank Cytoperm (Heraeus, Osterode), **C**omputer Optiplex GX 22 (Dell), Cytoclip Seitenklemmen (Shandon, Pittsburgh, USA), Cytofunnel Probenkammer (Shandon, Pittsburgh, USA), Cytospinzentrifuge Cytospin 3 (Shandon, Cheshire), **D**eckgläser 15x15, 18x40 mm (Menzel), Diaboxen (Kodak), **E**ismaschine (Ziegra, Isernhagen), Erlenmeyerkolben 50, 100, 500, 1000 ml (Schott, Zwiesel), **F**ärbekästen nach Hellendahl (Merck, Darmstadt), Falcons 15ml (NUNC, Wiesbaden), Filter Cards (Shandon, Pittsburgh, USA), Filtereinheiten (Millipore, Bedford), Filterpapier Nylon Net Filter NY41 (Millipore, Bedford), Fixogum Rubber Cement (Maraby Taum), Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 49395“ mit 100 W Mercury Lampe (Zeiss, Jena), **G**efriertruhe –20°C, -80°C (Liebherr, Biberach), Gelkammer (AGS, Heidelberg), Glasflaschen 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ml (Schott, Zwiesel), Glaswolle (Roth, Karlsruhe), **H**eizplatte „Medax“ (Nagel, Kiel), **I**mage Master VDA (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), IMVDS software (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), **K**anülen 0,7x30, 0,5x25 mm (BD Microlance), Kühlschrank +4°C (Liebherr, Biberach), Kühlzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg), Küvettenschüttler (Köttermann), **L**ichtmikroskop „Axiovert 25“ (Zeiss, Jena), **M**agnetrührer (Heidolph, Kehlheim), **O**bjektträger „Super Frost Plus“ (Menzel), **P**arafilm „M“ (American National Can, Chicago), pH-Meter (WtW, Weilheim), Pinzetten (Merck, Darmstadt), Pipetten “Eppendorf Reference” 100-1000µl, 10-100µl, 0,5-10µl (Eppendorf, Hamburg), Pipettenspitzen „Standardtips“ 20µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg), Pipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt), pp-test tubes “Cellstar” 50ml (Greiner bio-one), **R**eagenzglasschüttelgerät „Vortex“ (Heidolph, Kehlheim), Reaktionsgefässe „safe lock tubes“ 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf, Hamburg), Reaktionsgefässständer (Eppendorf, Hamburg), **S**oftware „ISIS“ (Metasystems, Altlussheim), Spritzen (steril) 1, 10 ml (Becton Dickinson,

Heidelberg), Standzylinder 100, 500, 1000 ml (Brand, Wertheim), **T**esttubes „Cellstar“ 50ml (Greiner bio-one), Thermometer „AA Präzision“, Thermorührer „IKA Combimag Ret“, Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge “mini centrifuge“ (National Labnet Co., Woodbridge), **W**asserbad 37-43°C, 60°C, 70°C (Köttermann / New Brunswick Scientific, Edison/ Bachhofer, Degerschlacht), **Z**ählmaschine „Leucodiff 800 plus“ (Instrumentation Laboratory), Zytofuge „Cytospin 3“ (Shandon, Cheshire, Grossbritannien)

3.3 CHEMIKALIEN UND MEDIEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medien sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt:

Agarose Type I (Sigma, Steinheim), Antifade H-1000 (Vectashield), **B**io –16-dUTP (Roche, Mannheim), Bromphenolblau (US Biochenical Corp., Cleveland, USA), **D**eoxynucleotide Triphosphate Set (Roche, Mannheim), Dextran sulphate (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 4’,6 Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid (DAPI) (Sigma, Steinheim), Dig-11-dUTP (Roche, Mannheim), DNA from herring sperm (Roche, Mannheim), DNA-ladder 1kb (Life Technologies, Gaithersburg, USA), DNA-Polymerase I (E. coli) (Biolabs Inc., New England), DNAse I (Boehringer, Mannheim), **E**coPol Buffer (BioLabs), EDTA disodium salt (Pharmacia Biotech), Essigsäure (Roth, Karlsruhe), Ethanol absolut (Rieder de Haen, Seelze), Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt), **F**ormaldehydlösung 36,5% (Rieder de Haen, Seelze), Formamid zur Analyse (Merck, Darmstadt), **G**lycerin (Roth, Karlsruhe), Glycin (Merck, Darmstadt), **H**uman Cot-1-DNA: 1mg/ml (Life Technologies), **M**agnesiumchlorid (Merck, Darmstadt), ß-Mercaptoethanol (ß-ME) (Merck, Darmstadt), Methanol (Merck, Darmstadt), Mixed bed Resin (Bio rad Labs, Richmond), **N**atriumacetat (Merck, Darmstadt), Natriumchlorid (Fluka, München), Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt), Natriumlauge (Merck, Darmstadt),

Natriumphosphat (Merck, Darmstadt), Natrium-3-Citrat, n-Dodecylsulfat Natriumsalt (Merck, Darmstadt), **P**epsin: 4g / ml unitslung solid (Sigma, Steinheim), Proteinase K (Roth, Karlsruhe), **R**inderalbumin, RNAse A from bovine pancreas (Roche, Mannheim), **S**alzsäure, 1mol/l (J.T.Baker, Deventer), Sephadex G-50 (Sigma, Steinheim), **T**ris ultrapure (USB Corporation, Cleveland, USA),Triton X-100 (Merck, Darmstadt), Tween 20 (Merck, Darmstadt), **X**ylol (Merck, Darmstadt)

3.4 LÖSUNGEN

Biotin-Mix-Ansatz

50µl Bio-16 dUTP (50nmol), 1,2µl 1µM dTTP, 5µl 1µM dATP, 5µl 1µM dCTP, 5µl 1µM dGTP, 33,8µl a.d.

Blocking (5% BSA)

4g Rinderalbumin, 80ml 4x SSC mit Tween (m.T.), filtrieren

DAPI - Puffer

70µl (2mg/10ml) DAPI in 70ml 4x SSC m.T.

Deionisiertes Formamid

50g Mixed red Resin in 100ml Formamid 60min. rühren, bis Leitfähigkeit <100 µSkm, filtrieren

Denaturierungsmix – m-bcr / abl

47ml deionisiertes Formamid, 1ml 20x SSC, mit a.d. auf 67ml, pH 7-7,07

Denaturierungsmix – YAC-Sonden

49ml deionisiertes Formamid, 7ml Natriumphosphat, 7ml 20x SSC, mit a.d. auf 70ml, pH 7-7,07

Detect (1% BSA)

100µl 5% BSA, 400µl 4x SSC m.T.

Digoxigenin-Mix-Ansatz

17µl Dig-11 dUTP (17nmol), 3,3µl 1µM dTTP, 5µl 1µM dATP, 5µl 1µM dCTP, 5µl 1µM dGTP, 64,7µl a.d.

DNAse I-Ansatz

15mg DNAse I (2000 U/ g), 2ml a.d., 50µl 5M NaCl, 2,9ml 87% Glycerol, mit a.d. auf 5ml auffüllen

Formamid (50%)

100ml Formamid, 20ml 20x SSC mit a.d. auf 200ml auffüllen, pH 7-7,07

Hybridisierungsmix

400µl 50% Dextransulfat, 400µl a.d., 200µl 20x SSC

Methanol/Essigsäure

50ml Methanol, 50ml Essigsäure, bei –20°C gekühlt

PBS

8g Natriumchlorid, 0,2g Kaliumchlorid, 0,76g Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat, mit a. d. auf 1 l auffüllen, pH 7,3

PBS/Glycin

6g Glycin, 300 ml PBS

PBS/$MgCl_2$

10ml 1M Magnesiumchlorid, 90ml PBS

PBS/PFA

2ml Formaldehyd 37%, 68ml PBS/$MgCl_2$

PBS/Triton

10µl Triton 100, 100ml PBS

Pepsin-Puffer (Entparaffinieren)

80µl Pepsin (4mg/20ml), 10µl 1M Salzsäure, 910ml a. dest.

Pepsin-Puffer (FISH)

100µl Pepsin (4mg/20ml), 1ml 1M Salzsäure, 99ml a.d.

Proteinase K-Puffer

20ml 1M TrisHCl pH 7,5, 4ml 0,5M EDTA, 2,34g Natriumchlorid (58,44g/ mol) mit a.d. auf 400ml

RNAse A - Puffer

1µl RNAse A, 100µl 2x SSC

Säulenpuffer

5ml 1M Tris HCl (pH 8), 1ml 0,5M EDTA (pH 8), 5ml 10% SDS, mit a.d. ad 500ml

SSC (20x)

175,3g Natriumchlorid, 88,2g Natrium-3--Citrat mit a.d. auf 1l, pH 7

SSC (4x) **mit Tween (m.T.)**

300ml 20x SSC, 1,5ml Tween 20 mit a.d. auf 1,5l auffüllen, pH 7-7,07

TAE-Puffer

48,4g Tris, 11,4ml Essigsäure, 20ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

Tris-Puffer

124g Tris mit a.d. auf 1l auffüllen, pH 8

3.5 SONDEN UND FLUORESZENZFARBSTOFFE

3.5.1 SONDEN

Alle untersuchten ependymalen Tumoren wurden mit folgender Sonde hybridisiert:

m-*bcr/abl* (Minor Breakpoint) Translocation DNA Probe
Human Chromosome Assignment: m-*bcr*: 22q11; *abl*: 9q34
Diese Sonde wurde für die Hämato-Onkologie entwickelt um dort indirekt die t(9;22) bei CML darzustellen.
Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus Digoxigenin-markierter DNA-Sonde (spezifisch für die minor breakpoint Region des bcr-Lokus auf Chromosom 22) und Biotin-markierter DNA-Sonde (spezifisch für den abl-Lokus auf Chromosom 9).
In ausgewählten Fällen wurden zusätzlich zwei überlappende YAC-Sonden für die Region 22q12 eingesetzt. Diese Sonden wurde von der YAC-Bibliothek des Centre d`Ètude du Polymorphisme Humain (CEPH) bezogen *(www.cephb.fr/ceph-genethon-map.html)*.

Nachstehend sind die verwendeten Sonden aufgeführt :

Sondennummer	Größe	chromosomale Region	Markierung
744_F_6	860 kb	22q12	Biotin
763_A_3	1230 kb	22q12	Biotin
771_D_12	1240 kb	8p22	Digoxigenin

3.5.2 FLUORESZENZFARBSTOFFE

Diejenigen Sonden, die mit **Digoxigenin** markiert vorlagen, wurden mit folgenden Farbstoffen sichtbar gemacht:

- Cy™3-conjugated* IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Digoxin 1,7 mg/ml (dianova, Hamburg)
- Cy™3-conjugated* AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (dianova, Hamburg)

Die **Biotin**-markierten Sonden wurden wie folgt sichtbar gemacht :

- FLUORESCEIN AVIDIN DCS (Vector Laboratories, Burlingame)
- BIOTINYLATED ANTI-AVIDIN D (Vector Laboratories, Burlingame)

4 METHODEN

4.1 NICK – TRANSLATION (YAC - SONDEN)

Für die Untersuchungen wurden 1,3%ige Agarosegele mit TAE-Puffer hergestellt. Die aus Hefen gewonnene, isolierte und mittels PCR vervielfältigte Sonden-DNA wurde wie folgt markiert: In 3 verschiedene Reaktionsgefäße wurde jeweils 20µl E. coli–Puffer, 20ml ß-ME, 2µl DNAse (1:20.000), 8µl DNA-Polymerase und 90µl a.d. pipettiert. Anschließend wurden 40µl der Sonden–DNA (Nr. 744_F_6, 763_A_3, 771_D_12) in jeweils eines der Gefäße gegeben. Denjenigen Ansätzen mit den Sondennummern 744_F_6 und 763_A_3 wurde daraufhin je 20µl Biotin-Mix zugefügt, während dem Ansatz mit der Sondennummer 771_D_12 20µl Digoxigenin-Mix hinzugegeben wurden. Danach wurden die Ansätze für 45min. bei 15°C belassen. Von den Ansätzen wurden jeweils 7µl in ein separates Reaktionsgefäß überführt, der Rest blieb auf Eis gekühlt. Den abgemessenen 7µl wurden je 2µl Bromphenolblau zugegeben. Diese Mischung wurde zentrifugiert, für 2min. bei 100°C inaktiviert und für 2min. auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden jeweils die Proben, 9µl der Standard–DNA und 7µl DNA-ladder in einem Elektrophorese-Gel mit einer Spannung von 150V separiert. Nach Färbung der Proben mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) wurde mittels Image Master ausgewertet. Bis zum Erhalt des gewünschten Ergebnisses wurde einmalig Polymerase und bei Bedarf mehrfach DNAse nachgegeben und jeweils mittels Gel-Elektrophorese überprüft. Waren die YAC-Sonden auf die gewünschte Länge geschnitten, so wurde die Reaktion bei 68°C gestoppt.

Die Aufreinigungssäulen wurden erstellt, indem 1ml–Spritzen bis zur 0,1ml-Marke mit Glaswolle gestopft, mit Sephadex aufgefüllt und für 6min. bei 3000 U/min. abzentrifugiert wurden. Anschließend wurde so lange mit Sephadex befüllt und abzentrifugiert, bis die Säule bis zur 1ml-Marke reichte. Auf die so entstandenen Säulen wurden jeweils 100µl der geschnittenen Sonden gegeben und 3x mit 150µl Säulenpuffer ausgewaschen und abzentrifugiert. Hiernach wurde je 1µl SDS 10% und 2µl 0,5M EDTA pro 100µl zugegeben, nochmals auf Säulen aufgetragen und letztmals für 6min. bei 3000 U/min. zentrifugiert. Die so erhaltenen Sondenmischungen wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei –20°C gelagert.

4.2 ENTPARAFFINIEREN UND ZELLKERNISOLIERUNG

Zu Anfang wurde jeweils ein 40µm-Schnitt in ein Reaktionsgefäß überführt, 1ml Xylol zugegeben und 30min. bei 37°C inkubiert. Überstände wurden jeweils nach Zugabe von Xylol dreimal 3 Minuten bei 13000 U/min. abzentrifugiert und abgenommen. Daraufhin wird 1ml 100%iger Alkohol zugeben und 5min. bei 37°C inkubiert. Überstände wurden wieder zentrifugiert und abgenommen. Diese Arbeitsgänge sind einmal wiederholt worden. Nach zweimaliger Zugabe von 1ml a. d., 5-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Überstände jeweils abzentrifugiert. Danach ist Pepsin-Puffer zugeben worden; die Reaktion fand bei 37°C auf dem Schüttler statt. Nach zweistündiger Inkubation wurde 3 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1ml PBS aufgenommen, gut suspendiert und anschließend filtriert. Daraufhin wurde 2x 10min. bei 5000 U/min. zentrifugiert, dazwischen der Überstand abgenommen und das Pellet in 1ml PBS aufgenommen. Nach dem zweiten Zentrifugationsvorgang wurde das Pellet 100µl PBS aufgenommen, um weiterhin 500µl Methanol/Eisessig (1:1) zur Fixation tropfenweise zuzugeben und erneut gut suspendiert.

4.3 HERSTELLUNG VON ZYTOSPINPRÄPARATEN

Die entparaffinierten und isolierten Ependymom-Zellen wurden mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge 3min. bei 1000 U/min. auf einen Objektträger zentrifugiert, luftgetrocknet und mit Methanol/Essigsäure fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen wurden die Objektträger bei –20°C gelagert.

4.4 FLUORESZENZ - *IN SITU* – HYBRIDISIERUNG (FISH)

4.4.1 VORBEREITEN DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

Aufgetaute Präparate (30min. bei 4°C, 30min. bei Raumtemperatur) wurden mit PBS/Triton 2 min. vorbehandelt, 3x 3min. in PBS gewaschen, mit RNAse A 60min. bei 37°C inkubiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden anschließend 50min. bei 52°C im Proteinase K–Puffer verdaut, kurz mit PBS/Glycin gewaschen und mit Pepsin-Puffer für 10min. bei 37°C erneut verdaut, 3x 5min. in PBS/Glycin und anschließend kurz in PBS gewaschen. Darauf folgten 5min. in PBS/$MgCl_2$ und als nächstes 15min. in PBS/PFA. Danach wurde noch 3x 5min. in PBS geschüttelt, bevor die Objektträger durch die bei 4°C gekühlte aufsteigende Alkoholreihe (je 3min. in 70%, 90%, 100% Ethanol) gezogen wurden und für ca. 20min. lufttrockneten. Die Denaturierung wurde mit deionisiertem Formamid 6min. bei 70°C durchgeführt, bevor die Präparate kurz in bei –20°C gekühlten, 70%igen Alkohol getaucht und erneut durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen (je 3min. 70%, 90%, 100% Ethanol, auf Eis). Darauf folgte wieder 20min. Lufttrocknen.

4.4.2 VORBEREITEN DER SONDEN

4.4.2.1 m-*bcr/abl* (MINOR BREAKPOINT) TRANSLOKATION DNA – SONDE

Nach Erwärmung der Sonde für ca. 5 min. bei 37°C wurden jeweils 2µl der Sonde, 2µl deionisiertes Formamid und 2µl Hybridisierungsmix in einem Reaktionsgefäß suspendiert, 0,6µl Human Cot-1 DNA zugegeben und bis zum Gebrauch bei 37°C gewärmt.

4.4.2.2 YAC – SONDEN

Die Sonden wurden bei 4°C aufgetaut. Je 5µl der YAC-Sonden Nr. 744_F_6 und Nr. 763_A_3 und 7µl der YAC-Sonde Nr. 771_D_12 wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, 10µl Human-Cot 1-DNA, 0,8µl Lachssperma, sowie 1,24µl NaAc und 65,1µl Ethanol 100% (beides bei 4°C gekühlt) wurden hinzugefügt. Diese Ansätze wurden für jeweils 2min. gevortext, zentrifugiert, 30 min. bei –80°C gekühlt und 30 min. bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend abgenommen. Die Sonden wurden daraufhin mit 150µl Ethanol 100% (bei 4°C gekühlt) gewaschen, indem erneut 10min. bei 13 000 U/min zentrifugiert und der Überstand im Folgenden abgenommen wurde. Als nächstes wurden die Sonden im geöffneten Reaktionsgefäß bei 37°C getrocknet, bevor sie mit Hilfe von jeweils 5µl deionisiertem Formamid in 30 min. auf dem Thermoschüttler (37°C) wieder in Lösung gebracht wurden. Hierauf folgte die Zugabe von je 5µl Hybridisierungsmix und wiederum 30minütiges Schütteln bei 37°C. Weiterhin wurden die Reaktionsgefäße 6min. bei 75°C und im Anschluss daran 10min. bei 37°C inkubiert und bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt.

4.4.3 HYBRIDISIERUNG

Die vorbehandelten Zytospinpräparate wurden mit jeweils 7ml Sonden-Mischung inkubiert, mit einem Deckglas (15x 15mm) abgedeckt und mit Fixogum verschlossen. Es folgten eine Erwärmung der Objektträger für 5min. bei 37°C und für 5min. bei 70°C, bevor die Hybridisierung bei 37°C in der feuchten Kammer über Nacht stattfand.

Um die Hybridisierung zu beenden wurde das Fixogum entfernt und die Deckgläser in 2x SSC (10 min. bei 43°C) abgespült. Die Präparate wurden in 50% Formamid 3x 10min. bei 43°C, 1x kurz und 3x 5min. in 2x SSC bei Raumtemperatur geschüttelt. Daraufhin wurde bei 60°C 1x kurz und 1x 5min. in 0,2x SSC geschüttelt und schließlich noch 5min. bei 60°C in 0,1x SSC. Hinterher wurden die Objektträger mit 4x SSC m.T. abgespült.

4.4.4 DETEKTION

Die Hybridome wurden mit jeweils 100µl Blocking inkubiert, mit Parafilm abgedeckt und 30min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Parafilms wurden die Objektträger kurz in 4x SSC m.T. gewaschen. Anschließend wurde jeweils 0,5µl FITC und 1µl Cy3 in 100µl Detect aufgetragen und mit Parafilm abgedeckt, bevor erneut für 30min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Nach Entfernen des Parafilms wurde 1x kurz gewaschen und 3x 5 min. in 4x SSC m.T. bei 43°C im Schüttler inkubiert. Je 1µl Bio-anti-Avidin und 1µl Anti-Cy3 in 100µl Detect wurden aufgetragen, mit Parafilm bedeckt und wiederum 30min. in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach Beseitigen des Parafilms wurde erneut in 4x SSC m.T. 1x kurz und 3x 5min. bei 43°C im Schüttler gewaschen, bevor sich ein letzter Detektionsschritt mit 0,5µl FITC in 100µl Detect für 30 min. bei 37°C in der feuchten Kammer anschloss. Nach dem letzten Waschen (1x kurz und 3x 5min. in 4x SSC m.T. bei 43°C im Schüttler) folgte die Gegenfärbung mit DAPI für 5min. bei Raumtemperatur. Nach etwa 20min. Lufttrocknen wurden die Objektträger mithilfe von Antifade mit 18x 40mm Deckgläsern eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.4.5 MODIFIKATIONEN

Bei denjenigen Tumoren, die als Frischmaterial vorlagen, konnte die Vorbereitung des Untersuchungsmaterials in verkürzter Form durchgeführt werden. Es entfielen die Schritte mit Triton und Proteinase K, das PBS wurde ohne den Glycin-Zusatz verwendet und der Pepsin-Verdau wurde auf 7,5min. reduziert.

Für die Hybridisierung mittels YAC-Sonden wurde die Konzentration der Proteinase K im Puffer auf das 40fache, die des Pepsins auf das 200fache erhöht.

Bei der Verwendung von Frischmaterial ebenso wie bei der Hybridisierung mittels YAC-Sonden wurden die Präparate bereits nach dem ersten Detektionsschritt mit DAPI gegengefärbt und wie gewohnt fortgefahren. Dies geschah, weil sich das Frischmaterial sowie die Hybridisierungen mit YAC-Sonden in der Verstärkung der Signale als störanfällig erwiesen hatten. Zudem zeigten diese Materialien bereits nach der ersten Detektion auswertbare Signale.

Bei ungenügenden Resultaten wurden die Zeiten für den Proteinase K-Verdau und den Pepsin-Verdau verlängert.

4.5 MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und Bildverarbeitungsprogramm. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellkerne ausgewertet. Die Zählung wurde gemäß Vysis-Protokoll zur Auswertung durchgeführt (Abb. 3).

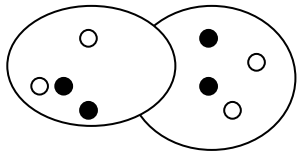
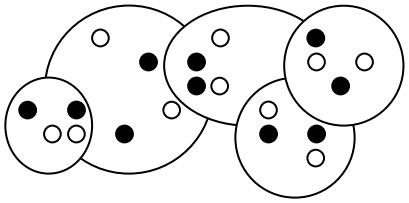
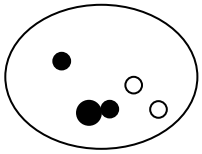
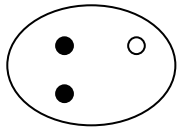
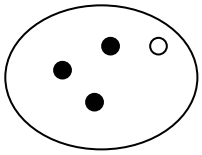
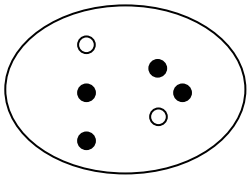
1		Die Zellkerne überlappen sich und es sind deshalb nicht alle Areale sichtbar. Die Signale sind jedoch nicht in der überlappenden Region. Als zwei schwarze und zwei weiße Signale zu zählen.
2		Nicht zählen. Die Zellkerne überlappen sich, deshalb sind nicht alle Areale sichtbar, und einige Signale befinden sich in überlappenden Bereichen.
3		Als zwei schwarze und zwei weiße Signale zu zählen. Ein schwarzes Signal ist gesplittet.
4		Als zwei schwarze und ein weißes Signal zu zählen.
5		Als drei schwarze und ein weißes Signal zu zählen.
6		Als vier schwarze und zwei weiße Signale zu zählen.

Abb. 3: Beispiel zur Auswertung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.
Nach Path Vysion™ HER-2 DNA Probe Kit Package Insert (Vysis)

4.6 CUT-OFF-LEVEL

Die cut-off-level der verwendeten Sonden wurden mittels Hybridisierung von je 3-5 verschiedenen Kontrollen (humane Tonsillen) ermittelt. Die cut-off-level errechneten sich durch den Mittelwert plus der dreifachen Sandardabweichung.

4.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für einfache Vergleiche zweier Gruppen wurde der chi-square-Test durchgeführt.
Außerdem wurde eine einfache logistische Regression durchgeführt, in der der gemeinsame Einfluss der Variablen auf das Vorliegen einer Deletion 22q11 untersucht wurde. Dafür wurde gleichzeitig der Einfluss von Alter, Geschlecht (jeweils 1 Freiheitsgrad), Rezidiv (Unterscheidung Primärtumor oder Rezidiv), Lokalisation (2 Freiheitsgrade) und WHO-Grad (3 Freiheitsgrade) ermittelt. Hierbei wurde der Einfluss der Variablen jeweils bezüglich des Einflusses der anderen adjustiert.

5 ERGEBNISSE

5.1 CUT-OFF-LEVEL

Als Voraussetzung für die Studie wurden zunächst die cut-off-level der verwendeten Sonden bestimmt. Als Kontrollgewebe wurde nichtneoplastisches humanes Tonsillengewebe verwendet. Isolierte Zellkerne aus 40µm Paraffinschnitten bzw. 4µm Frischmaterialschnitte wurden analysiert. Die Hybridisierungen erfolgten gemäß der in dieser Arbeit verwendeten Protokolle. Es wurden pro Kontrolle mindestens 100 Zellkerne ausgezählt. Der cut-off-level errechnete sich anschließend aus dem Mittelwert für Verluste bzw. Zugewinne plus der dreifachen Standardabweichung.
Der cut-off-level für einen Verlust von 22q11 (bcr-Lokus) betrug bei Frischmaterial 4,7%, bei isolierten Zellkernen aus formalinfixiertem Gewebe 5,1%. Der cut-off-level für die Kontrollen mit YAC-Sonden (hier wurden nur Tumoren hybridisiert, die paraffinfixiert vorlagen) für den Verlust von 22q12 lag bei 2,9%.
Tabelle 2 stellt die Ergebnisse dar.

Der cut-off-level für einen Zugewinn von 22q11 (bcr-Lokus) lag für Frischmaterial bei 7%, für isolierte Zellkerne aus Paraffinmaterial bei 15% (jeweils humanes Tonsillengewebe).

Die cut-off-level für einen Verlust von 9q34 lagen für Frischmaterial und Paraffinmaterial bei 8,2% bzw. 6,7%, für einen Zugewinn von 9q34 bei 7% bzw. 10,8%.

Tabelle 2 – Ergebnisse an Kontrollgewebe

Fall	Gezählte Zellkerne (n)	Paraffin-fixierte humane Tonsillen (Isolierte Zellkerne) Cut-off 22q11 - Anzahl der Signale pro Zelle (%) -											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
1	208	0	1,44	92,79	3,37	2,40	0	0	0	0	0	0	0
2	195	0	0	90,77	6,15	3,08	0	0	0	0	0	0	0
3	208	0	2,88	92,31	2,88	1,92	0	0	0	0	0	0	0
4	103	0,97	0,97	87,38	7,77	0,97	1,94	0	0	0	0	0	0
5	120	0,82	1,64	92,62	4,92	0	0	0	0	0	0	0	0
Ges.	834	MW +/- SD 1,73+/-1,12			MW +/- SD 7,02+/-2,75			0	0	0	0	0	0

Tabelle 2a: Ergebnisse (Hybridisierung mit m-bcr/abl) am Beispiel isolierter Zellkerne aus humanem Tonsillengewebe. MW- Mittelwert, SD- Standarddeviation

Fall	Gezählte Zellkerne (n)	4µm-Schnitte humane Tonsillen (Frischmaterial) Cut-off 22q11 - Anzahl der Signale pro Zelle (%) -											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
1	100	1	2	92	3	2	0	0	0	0	0	0	0
2	100	1	1	93	2	2	1	0	0	0	0	0	0
3	100	1	1	93	4	1	0	0	0	0	0	0	0
4	100	0	1	93	3	3	0	0	0	0	0	0	0
5	100	1	2	91	3	3	0	0	0	0	0	0	0
Ges.	500	MW +/- SD 2,20+/-0,84			MW +/- SD 5,4 +/- 0,55			0	0	0	0	0	0

Tabelle 2b: Ergebnisse (Hybridisierung mit m-bcr/abl) am Beispiel von Frischmaterial (humanes Tonsillengewebe). MW- Mittelwert, SD- Standarddeviation

Fall	Gezählte Zellkerne (n)	Paraffin-fixierte humane Tonsillen (Isolierte Zellkerne) Cut-off 22q12 (YAC 763_A_3) - Anzahl der Signale pro Zelle (%)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
8	200	0	0	76	17	7	0	0	0	0	0	0	0
9	100	0	0	94	4	2	0	0	0	0	0	0	0
10	100	0	0	92	6	2	0	0	0	0	0	0	0
Ges.	400	MW +/- SD 0+/-0			MW +/- SD 6,3+/-5,61			0	0	0	0	0	0

Tabelle 2c: Ergebnisse (Hybridisierung mit YAC 763_A_3) an isolierten Zellkernen aus paraffinfixiertem humanem Tonsillengewebe. MW- Mittelwert, SD- Standarddeviation

Fall	Gezählte Zellkerne (n)	Paraffin-fixierte humane Tonsillen (Isolierte Zellkerne) Cut-off 22q12 (YAC 744_F_6) - Anzahl der Signale pro Zelle (%)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
8	148	0	1,35	10,81	13,51	0	0	0	0	0	0	0	0
9	100	0	2	92	6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	100	0	2	94	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Ges.	348	MW +/- SD 1,78+/-0,38			MW +/- SD 7,84+/-5,01			0	0	0	0	0	0

Tabelle 2d: Ergebnisse (Hybridisierung mit YAC 744_F_6) an isolierten Zellkernen aus paraffinfixiertem humanem Tonsillengewebe. MW- Mittelwert, SD- Standarddeviation

Als interne Kontrolle für die FISH-Methode wurden zunächst diejenigen Tumoren hybridisiert, die sowohl als Frischmaterial als auch als Paraffinmaterial vorlagen. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen waren jeweils identisch. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit verschiedenen Sonden am Beispiel eines Tumors ohne Deletion 22q.

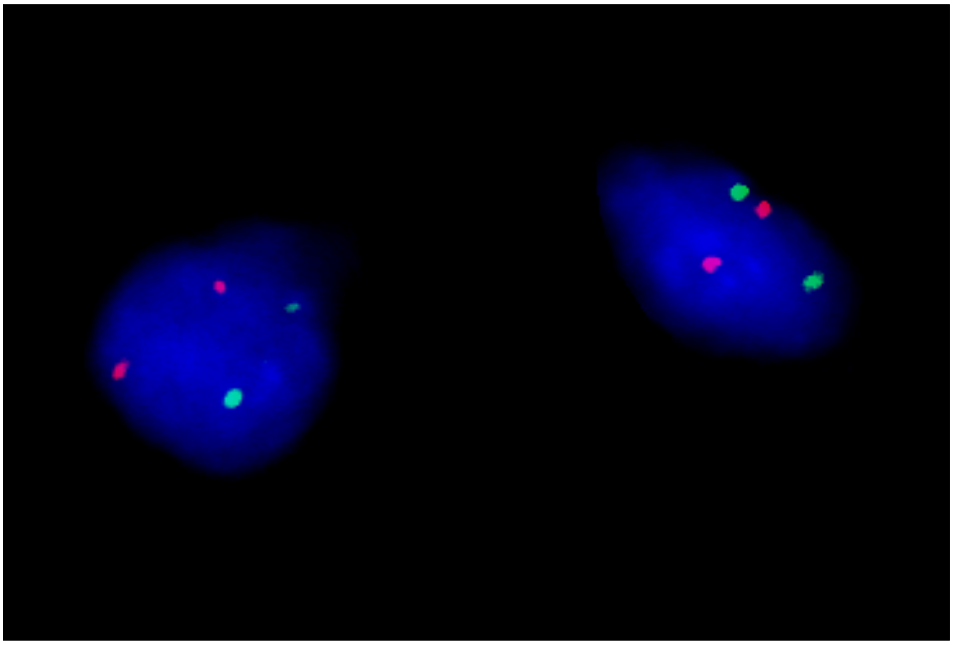


Abb. 4a: Hybridisierung mit der DNA-Sonde m-bcr/abl. Die Zellkerne zeigen jeweils 2 Signale für den abl–Lokus auf Chromosom 9 (grün) sowie für den bcr-Lokus auf Chromosom 22q11 (rot).

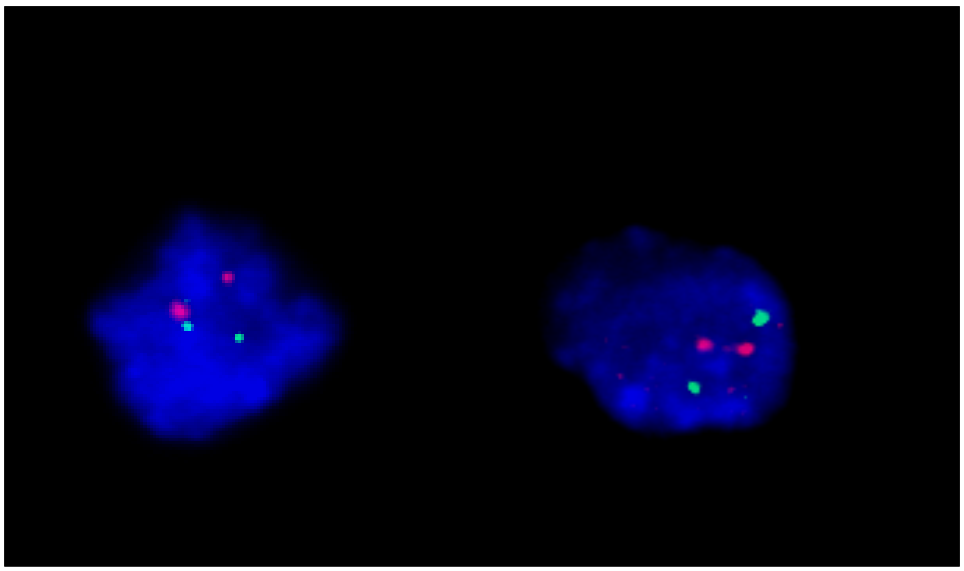


Abb. 4b: FISH mit YAC-Sonden. Die Zellkerne zeigen jeweils 2 Signale für 8p22 (rot) sowie für 22q12 (grün).

Im Folgenden wird insbesondere auf drei Gruppen,

- die Deletion 22q11 bzw. 22q12,
- den Verlust chromosomalem Material auf 22q11 bzw. 22q12 in einer Subpopulation von Tumorzellen,
- sowie den Zugewinn von genomischem Material von Chromosom 22q

eingegangen werden.

5.2 DELETION 22q

Entsprechend der vorher erstellten cut-off level wurden diejenigen Tumoren als Deletion 22q gewertet, die einen Anteil von mindestens 4,7% bzw. 5,1% der ausgewerteten Zellen besaßen, welche nur ein Signal für Chromosom 22q aufwiesen. Insgesamt zeigten 28 der 67 (42%) untersuchten Tumoren eine Deletion 22q in bis zu 78% der Zellkerne (Abb. 5). Kein Tumor zeigte einen Verlust von 22q11 bzw. 22q12 (im Folgenden kurz Deletion 22q genannt) in allen Tumorzellkernen.

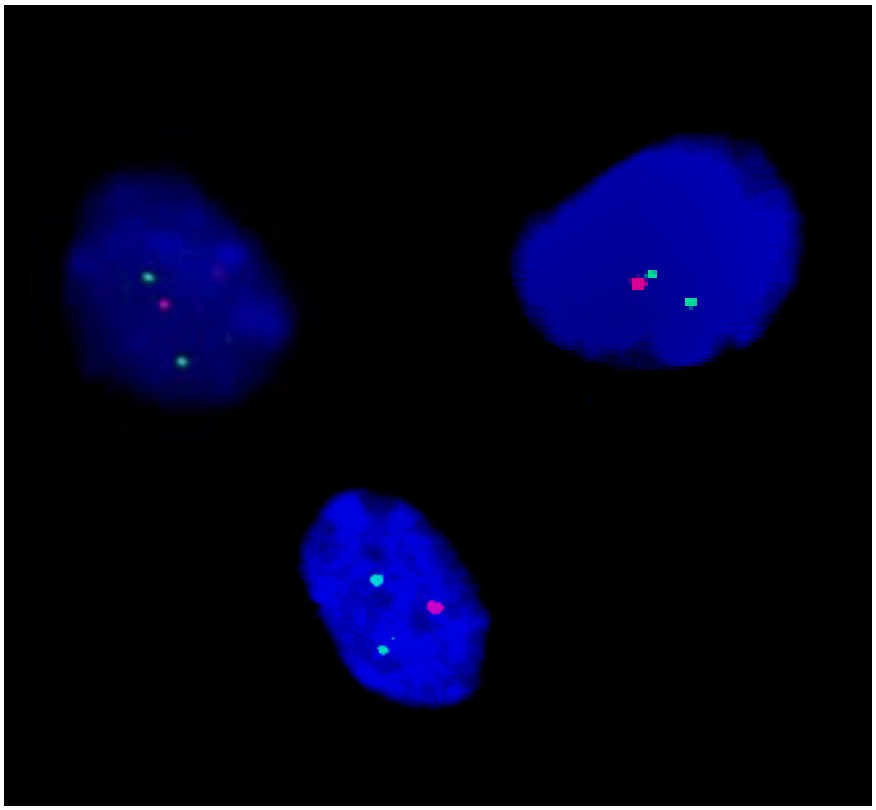


Abb. 5: Hybridisierung mit DNA-Sonde m-bcr/abl. Die Zellkerne zeigen jeweils 2 grüne Signale für denn abl-Lokus auf Chromosom 9 (grün), jedoch nur jeweils 1 Signal für den bcr-Lokus auf Chromosom 22q11 (rot).

ALTERSABHÄNGIGE INZIDENZ

44% der Tumoren des Erwachsenen (15 / 34) zeigten im Vergleich zu 39% der Tumoren (13 / 33) kindlicher Patienten eine Deletion 22q.

GESCHLECHTSABHÄNGIGE INZIDENZ

Die Geschlechtsverteilung ergab eine leichte Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. So zeigten 50% (16 / 32) der Tumoren weiblicher Patienten und 34% (12 / 35) der Tumoren männlicher Patienten eine eindeutige Deletion 22q. Das Ergebnis erreichte mit $p = 0,765$ keine statistische Signifikanz. Jedoch zeigte eine logistische Regressionsanalyse bei Berücksichtigung aller Parameter (Alter, Geschlecht, Lokalisation, WHO-Grad, Rezidiv) einen grenzwertigen Einfluss des Alters auf das Vorliegen einer Deletion 22q ($p = 0,084$).

INZIDENZ NACH LOKALISATION

52% der Tumoren des Spinalkanals (13 / 25), 36% der Tumoren der hinteren Schädelgrube (9 / 25) und 33% der supratentoriellen Tumoren (5 / 15) zeigten eine Deletion 22q. Der extraspinal lokalisierte Tumor zeigte ebenfalls eine Deletion 22q. Bei einem Tumor war der Ursprungsort unbekannt, in diesem Fall zeigte sich keine Deletion 22q. Für die Lokalisation ergab die logistische Regression (unter Berücksichtigung aller Parameter) mit $p = 0,112$ einen grenzwertigen Einfluss.

INZIDENZ NACH WHO – GRAD

Keines der drei untersuchten Subependymome (WHO – Grad I) zeigte eine Deletion 22q. Unter den 12 untersuchten myxopapillären Ependymomen (WHO - Grad I) zeigten 6 eine Deletion 22q (50%). Alle 12 untersuchten myxopapillären Ependymome entstammten dem Spinalkanal. Unter den 23 Ependymomen (WHO – Grad II) wiesen 9 (39%) eine Deletion 22q auf. Die anaplastischen Ependymome (WHO – Grad III) waren in 10 von 24 Fällen (42%) von einer Deletion 22q betroffen und 3 von 5 Ependymoblastomen (WHO – Grad IV) hatten eine Deletion 22q. Keines dieser Ergebnisse erreichte statistische Signifikanz.

INZIDENZ IN PRIMÄRTUMOREN UND REZIDIVEN

Die Tumoren in unserem Kollektiv, bei denen es sich um Primärtumoren handelte, zeigten eine Deletion 22q in 44% der Fälle (22 / 50). Im Vergleich dazu ließ sich bei den Rezidiven in 35% der Fälle (6 / 17) eine Deletion 22q nachweisen. Im chi-square-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied für das Vorliegen einer Deletion 22q für Primärtumoren oder Rezidive.

5.3 DELETION 22q IN SUBPOPULATIONEN

Tumoren mit einem Verlust von 22q in 4,7% bzw. 5,1% der ausgewerteten Zellkerne wurden protokollgemäß als Deletion 22q gewertet. Auffällig erschien in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass von den insgesamt 28 Fällen mit Deletion 22q bei nur 5 Tumoren mehr als 20% des untersuchten Tumorzellmaterials von dieser Veränderung betroffen war. Bei 9 der 28 ependymalen Tumoren mit Deletion 22q war der Verlust von genomischem Material von Chromosom 22q in weniger als 10% der ausgewerteten Zellkerne nachweisbar.

ALTERSABHÄNGIGE INZIDENZ

Bei den Tumoren des Kindesalters wiesen 11 der 13 Tumoren (85%) mit Deletion 22q diese in weniger als 20% der Tumorzellkerne auf. In 5 der Tumoren waren sogar weniger als 10% der ausgewerteten Zellkerne betroffen. Bei den Tumoren des Erwachsenen wiesen 12 / 15 der Tumoren (80%) mit Deletion 22q diese in weniger als 20% der Zellkerne auf, in 4 Fällen waren weniger als 10% der Zellen betroffen (Abb. 6). In keinem der genannten Fälle ließ sich ein signifikanter Unterschied nachweisen.

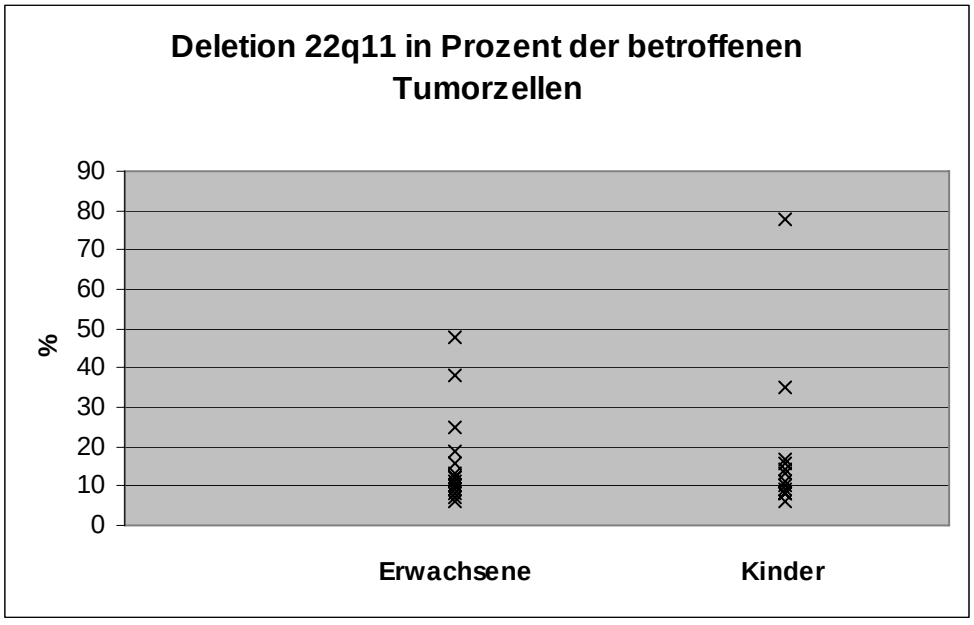


Abb. 6: Ausprägung der Deletion 22q im Altersvergleich

GESCHLECHTSABHÄNGIGE INZIDENZ

Es zeigte sich bei den Fällen mit kleiner Anzahl von Deletion 22q ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. 81% (13 / 16 Fällen) der Tumoren weiblicher Patienten mit Deletion 22q waren von dieser Veränderung in weniger als 20% der Zellen betroffen. In 6 der 16 Fälle (38%) beschränkte sich der Verlust von genomischem Material auf weniger als 10% der Tumorzellkerne.

Im Vergleich dazu zeigten 83% (10 / 12 Fällen) der Tumoren von männlichen Patienten mit Deletion 22q weniger als 20% betroffener Zellen und 3 / 12 Tumoren (25%) weniger als 10% Zellkerne mit Deletion 22q (Abb. 7). Der Unterschied bei weniger als 10% betroffener Tumorzellkerne war mit p = 0,564 nicht signifikant.

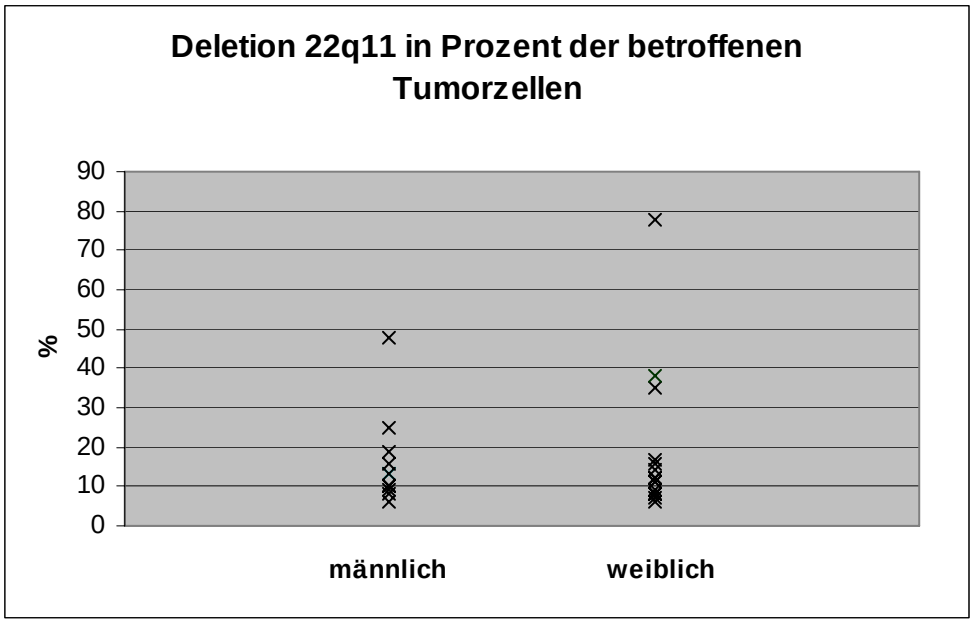


Abb. 7: Ausprägung der Deletion 22q im Vergleich männlich - weiblich

INZIDENZ NACH LOKALISATION

Die spinalen Tumoren zeigten in 10 der 13 Fälle (77%) mit Deletion 22q weniger als 20% veränderter Zellkerne, 8 dieser 10 Tumoren zeigten die Deletion 22q in einem Anteil von 10-19% der Tumorzellmenge. Die ependymalen Tumoren der hinteren Schädelgrube zeigten in 5 / 9 Fällen (56%) mit Deletion 22q weniger als 10% Zellkerne mit Verlust von genomischem Material von Chromosom 22q. Die supratentoriellen Tumoren waren alle in weniger als 20% der Zellkerne betroffen (Abb. 8).

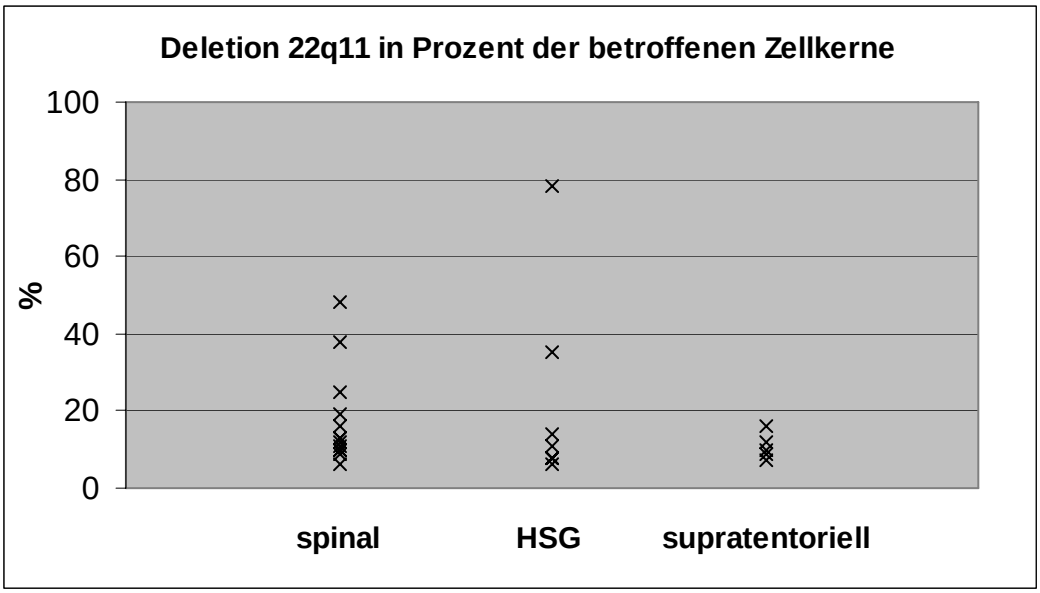


Abb. 8: Ausprägung der Deletion 22q bei verschiedenen Lokalisationen. HSG – hintere Schädelgrube

INZIDENZ NACH WHO – GRAD

Wie bereits beschrieben, zeigte keines der Subependymome (WHO – Grad I) eine klare Deletion 22q. Ebenso wenig ließ sich eine Deletion 22q in Subpopulationen der Tumoren nachweisen, sie zeigten in der FISH stets zwei Signale für die untersuchten Chromosomen. Bei den myxopapillären Ependymomen (WHO – Grad I) fand sich in allen 6 Fällen der Tumoren mit Deletion 22q ein Verlust in weniger als 15% der Tumorzellen.

Die Ependymome (WHO – Grad II) waren mit 6 / 9 Fällen (67%) von partiellen Verlusten (< 20%) von Chromosom 22q betroffen, 3 der 6 Tumoren zeigten weniger als 10% betroffener Zellkerne.

Die anaplastischen Ependymome (WHO – Grad III) wiesen ausschließlich einen Verlust von Chromosom 22q in weniger als 20% der ausgewerteten Zellkerne auf. In der Hälfte (n = 5) der diagnostizierten Deletionen waren weniger als 10% der Kerne verändert.

Eins von 3 Ependymoblastomen (WHO – Grad IV) hatte veränderte Kerne in weniger als 20%, bei den übrigen 2 Ependymoblastomen mit Deletion 22q waren mehr als 20% der Tumorzellen verändert (Abb. 9).

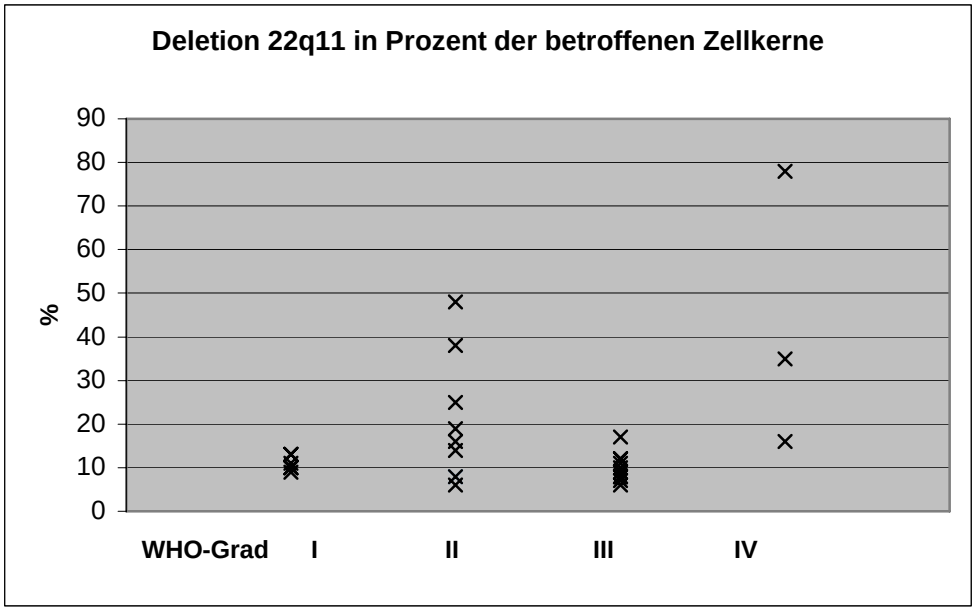


Abb. 9: Ausprägung der Deletion 22q bei verschiedenen WHO-Graden

INZIDENZ BEI PRIMÄRTUMOREN UND REZIDIVEN

Während die Primärtumoren in 18 / 22 (82%) mit Deletion 22q einen Anteil von weniger als 20% auffälliger Tumorzellkerne zeigten, wies ein vergleichbarer Anteil der Rezidive (5 / 6 entsprechend 83%) eine Deletion 22q in weniger als 20% der Tumorzellen auf (Abb. 10).

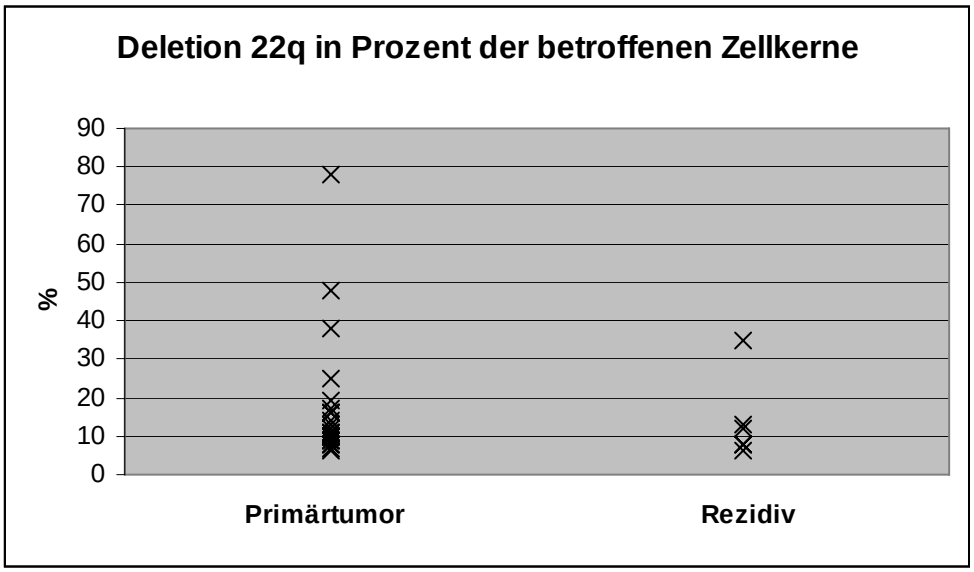


Abb. 10: Ausprägung der Deletion 22q bei Primärtumoren und Rezidiven

5.4 ZUGEWINN VON CHROMOSOM 22q

Einige Tumoren wiesen vermehrt Signale für Chromosom 22q auf, dies war jedoch auf Subpopulationen beschränkt. Die entdeckten Zugewinne von genomischem Material von Chromosom 22q bewegten sich in ihrer Ausprägung zwischen 21% und 62% betroffener Zellkerne. Für die Hybridisierung mit den YAC-Sonden auf 22q12 stand nicht mehr genügend Tumormaterial zur Verfügung. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse zusammen.

ALTERSABHÄNGIGE INZIDENZ

Die Altersverteilung war in etwa ausgeglichen. Fünf von 33 Fällen (15%) kindlicher Tumoren und 4 / 34 Fällen (12%) der Tumoren von erwachsenen Patienten zeigten einen Zugewinn von Chromosom 22q. Sechs der 9 (67%) Tumoren mit mehr als zwei Signalen für Chromosom 22q11 in der FISH zeigten ebenfalls zusätzliche Signale für Chromosom 9q34 und gaben somit einen Hinweis auf das Vorliegen einer Triploidie. Allerdings war der Zugewinn von genomischem Material von Chromosom 9q34 nur in zwei Fällen genauso stark ausgeprägt wie der Zugewinn von genomischem Material von Chromosom 22q11. In einem Fall eines kindlichen Tumors mit Zugewinn von Chromosom 22q11 zeigte sich ein Verlust von genomischem Material von Chromosom 9q34 (Abb. 11).

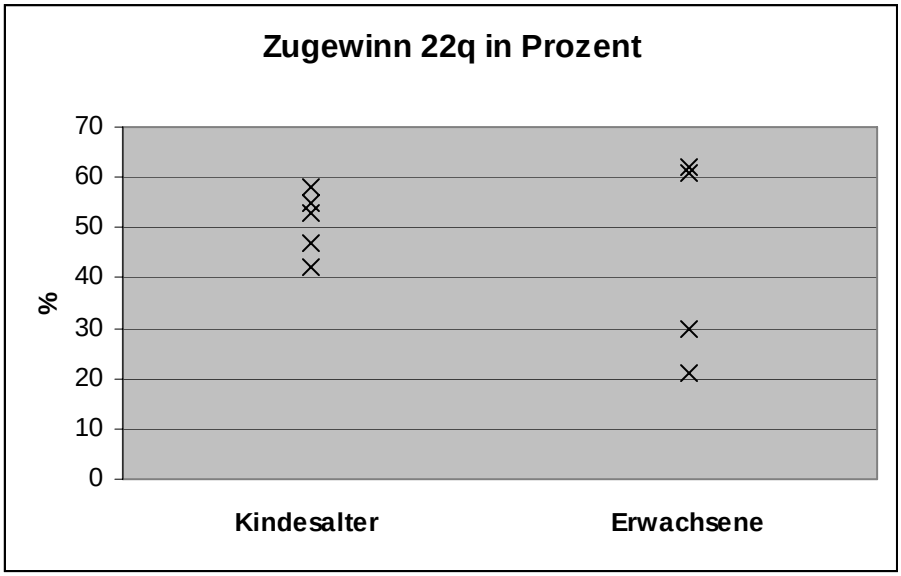


Abb. 11: Ausprägung des Zugewinns von Chromosom 22q11 im Altersvergleich

GESCHLECHTSABHÄNGIGE INZIDENZ

Bezüglich des Geschlechts zeigte sich ein deutlicher Unterschied: nur 1 der 32 (3%) Tumoren von weiblichen Patienten war von einem Zugewinn betroffen, hier zeigte die Sonde für Chromosom 9q34 weniger Signale als die Sonde für Chromosom 22q11. Im Gegensatz dazu hatten 8 / 35 (23%) der Tumoren männlicher Patienten einen Zugewinn von Chromosom 22q (Abb. 12). Dieser Unterschied war im chi-square-Test signifikant (p = 0,028).

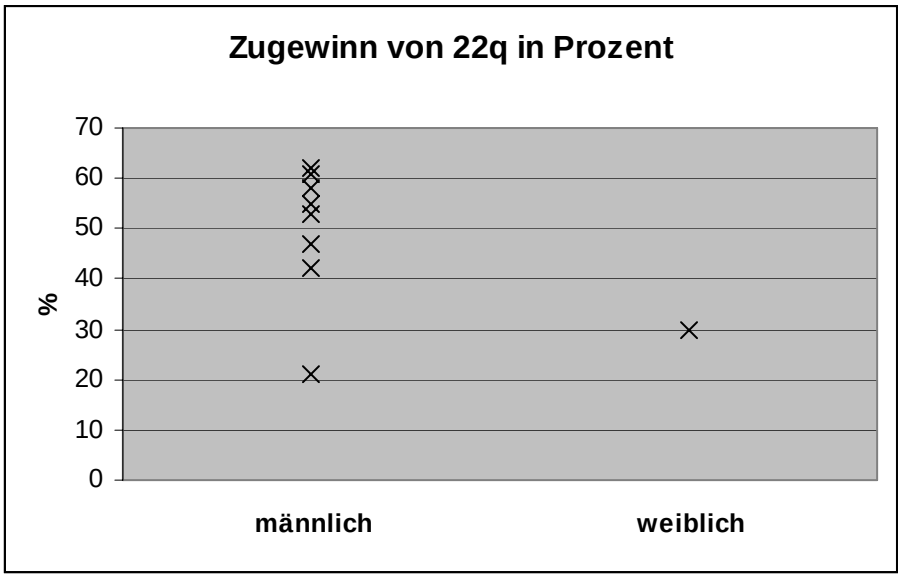


Abb. 12: Ausprägung des Zugewinns von Chromosom 22q11 im Geschlechtervergleich

INZIDENZ NACH LOKALISATION

Es waren fünf der 25 spinalen Ependymome (20%) von einem Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q betroffen. Damit machten die spinalen Tumoren den größten Anteil aus. In allen Fällen zeigten sich für Chromosom 9q34 ebenfalls vermehrt Signale in der FISH. Nur in zwei Fällen entsprach dieser Zugewinn jedoch dem von Chromosom 22q11.

Bei Tumoren der hinteren Schädelgrube und bei supratentoriellen Tumoren fand sich seltener ein Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q; dies ließ sich in 2 / 25 (8%) bzw. 1 / 15 (7%) Fällen darstellen. Ein Tumor unbekannter Lokalisation zeigte ebenfalls einen Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q (Abb. 13). In diesem Fall zeigte Chromosom 9q34 einen Verlust von genomischem Material in 33% der Tumorzellkerne.

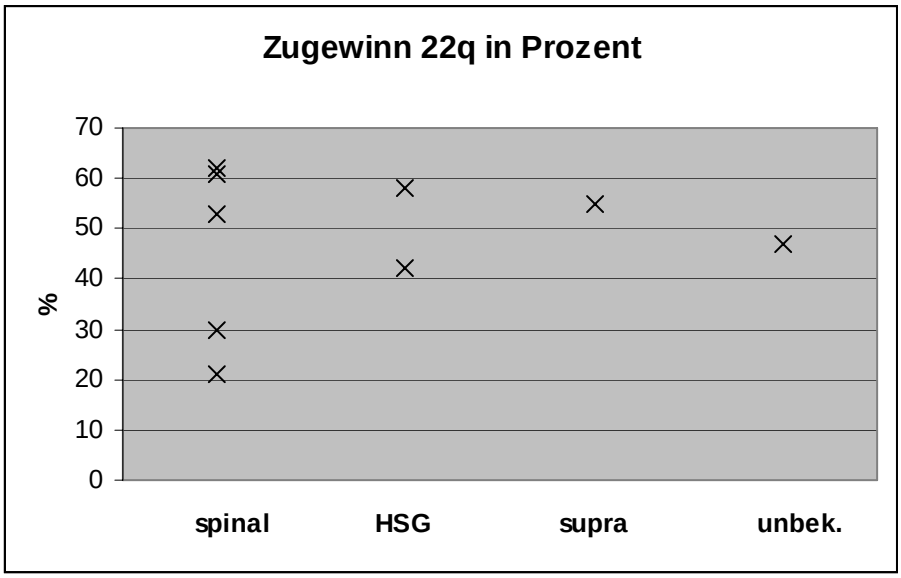


Abb. 13: Ausprägung des Zugewinns von Chromosom 22q11 bei verschiedenen Lokalisationen. HSG – hintere Schädelgrube, supra – supratentoriell, unbek. – unbekannt

INZIDENZ NACH WHO – GRAD

Auch bezüglich eines Zugewinns blieben die Untersuchungen an den drei Subependymomen (WHO – Grad I) ergebnislos. Die myxopapillären Ependymome (WHO – Grad I) bildeten die Gruppe mit denjenigen Tumoren, die am häufigsten von einem Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q betroffen waren. 4 der 12 Fälle (33%) zeigten dieses Ergebnis. In allen Fällen konnten auch für Chromosom 9q34 vermehrt Signale in der FISH gefunden werden, in zwei Fällen erreichten diese einen vergleichbaren Zugewinn wie Chromosom 22q11. Die klassischen Ependymome (WHO – Grad II) waren in 3 / 23 Fällen (13%) von einem Zugewinn betroffen (hierunter auch der Tumor mit der Deletion 9q34), die anaplastischen Ependymome (WHO – Grad III) zeigten mit 2 / 24 Fällen (8%) ein ähnliches Ergebnis. Bei den Ependymoblastomen konnte in keinem Fall ein Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q nachgewiesen werden (Abb. 14).

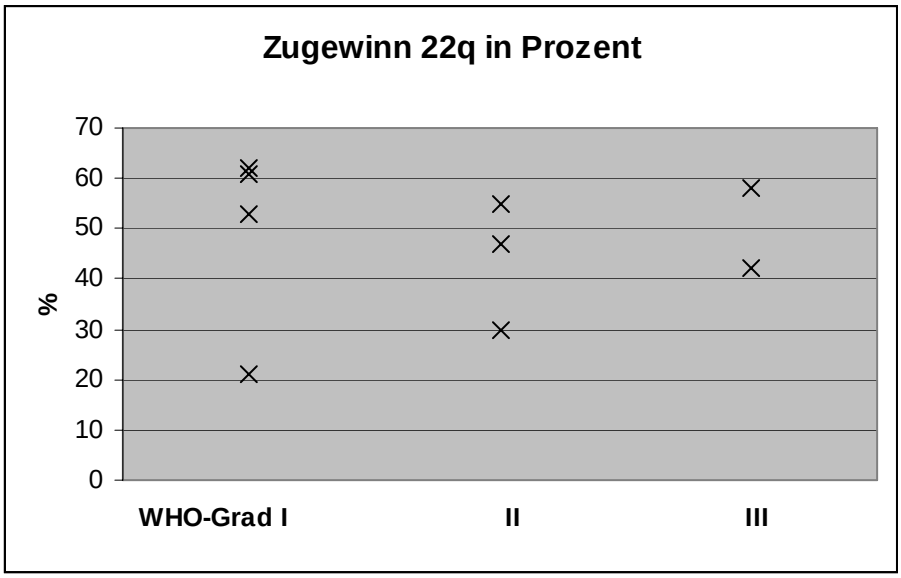


Abb. 14: Ausprägung des Zugewinns von Chromosom 22q11 nach WHO-Grad

INZIDENZ BEI PRIMÄRTUMOREN UND REZIDIVEN

Bezüglich eines Zugewinnes von genomischem Material auf Chromosom 22q ergaben sich annähernd gleiche Ergebnisse in den Gruppen der Primärtumoren und der Rezidive. Von den Primärtumoren waren 7 / 49 Fällen (14%), und von den rezidivierten Ependymomen 2 / 17 Fällen (12%) betroffen (Abb. 15). Es zeigte sich kein Unterschied im Hinblick auf das gleichzeitige Vorliegen eines Zugewinns von Chromosom 9q34.

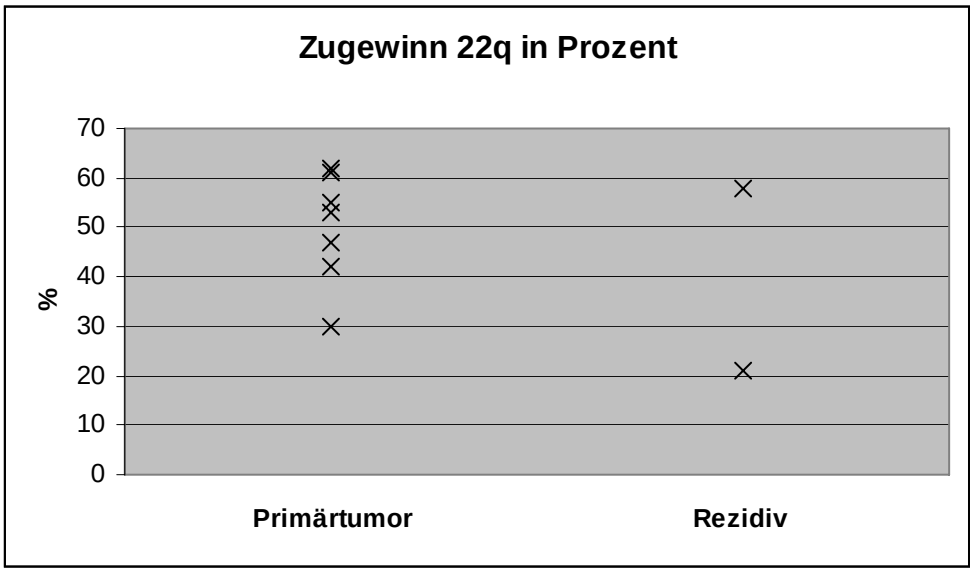


Abb. 15: Zugewinn von Chromosom 22q11 bei Primärtumor und Rezidiv

Tabelle 3 - Übersicht der Tumoren mit Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q

Fallnummer	WHO-Grad	Lokalisation	Alter (Jahre)	Geschlecht	Primärtumor	Zugewinn 22q in %	Zugewinn 9q in %	Verlust 9q in %
10	I	spinal	14	männlich	ja	53	56	
5	I	spinal	26	männlich	nein	21	12	
8	I	spinal	39	männlich	ja	62	64	
9	I	spinal	47	männlich	ja	61	25	
16	II	unbekannt	4	männlich	ja	47		33
38	II	supra	13	männlich	ja	55		
32	II	spinal	33	weiblich	ja	30	22	
44	III	HSG	0,5	männlich	ja	42	19	
48	III	HSG	5	männlich	nein	58		

supra – supratentoriell, HSG – hintere Schädelgrube

6 DISKUSSION

Histologisch einheitliche Malignitätskriterien des Ependymoms Grad II und III konnten bislang nicht eindeutig definiert werden. Klassische histologische Parameter für Malignität wie Nekrosen, endotheliale Proliferation sowie Mitosen erlauben keine ausreichenden Rückschlüsse auf die Prognose eines Patienten mit Ependymom Grad II oder III. Inwieweit die molekulare Pathologie sich in einem histologischen Korrelat widerspiegelt, das das therapeutische Vorgehen beeinflusst und dadurch letztlich für die Prognose relevant ist, bleibt zu diesem Zeitpunkt offen

Eine Reihe zytogenetischer Aberrationen bei Ependymomen wurden bereits identifiziert, die meisten konnten jedoch nicht regelmäßig nachgewiesen werden.
Eine der häufig beschriebenen zytogenetischen Veränderungen ist ein „loss of heterozygosity“ (LOH) von Chromosom 22q [23,34,35,56,57,60,67,76,83].
Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 sind mit die häufigsten onkologischen Veränderungen, sind aber interessanterweise bei Ependymomen selten. Ebenso treten Ependymome in Familien mit p53 Stammzellmutationen nicht in gehäuftem Maße auf [25,50].

Ebenso wurde eine Infektion mit Simian Virus 40 (SV 40) in kausalen Zusammenhang mit der Entstehung von Ependymomen gebracht. SV 40 ist ein Polyomavirus, mit dem Rhesusaffen häufig infiziert sind. Im Tiermodell (SV 40-infizierte Hamster) konnte eine erhöhte Inzidenz für ependymale Tumoren nachgewiesen werden. SV 40 ist für Nagetiere kanzerogen und kann viele Zellarten in Kultur transformieren. 1960 wurde SV 40 als Kontamination in Polio-Impfstoff identifiziert, welchen zwischen 1955 bis 1963 in den USA Millionen Kinder erhalten hatten. Als Ursache wurde die Präparation in Primärkulturen aus Nierenzellen von Rhesusaffen identifiziert. In prospektiven Studien konnte nach 20 Jahren keine erhöhte Inzidenz für bösartige Tumoren bei den betroffenen Impflingen nachgewiesen werden [13]. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte bei Ependymomen, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, keine gehäufte Inzidenz von SV40-ähnlichen Sequenzen nachweisen [58].

Die häufigste chromosomale Veränderung bei Ependymomen, die bislang publiziert wurde, ist die Monosomie 22. Diese wurde in etwa einem Drittel der untersuchten Tumoren mittels konventioneller Zytogenetik nachgewiesen. Spinale Ependymome treten im Rahmen der zentralen Neurofibromatose gehäuft auf. Aus diesem Grund wurde von einigen Autoren ein Zusammenhang zwischen der bei dieser Erkrankung obligaten Mutation des NF2-Lokus auf Chromosom 22q12 und der Entstehung von Ependymomen vermutet.
Bei anderen Gliomen ist die Monosomie 22 ebenso eine häufige Veränderung, die für Tumoren aller WHO-Grade beschrieben ist. So ist der Verlust von Chromosom 22 bei Astrozytomen vermutlich ein frühes Ereignis in der Tumorigenese [25]

Die Koinzidenz von NF2 mit einer Häufung von Ependymomen führte zu der Vermutung eines Tumorsuppressorgens im Bereich des NF2-Gens auf Chromosom 22 [2,53,71,83], das sowohl bei sporadischen als auch bei familiären anaplastischen Ependymomen eine Rolle spielen soll. Diese Vermutung konnte aber nicht bestätigt werden [10,19,30,32,36,46,72,80]. Yokota et al. (2003) [87] berichteten von einer japanischen Familie, bei der bei 2 von 4 Geschwistern im Erwachsenenalter ein spinales anaplastisches Ependymom diagnostiziert wurde. Ein weiteres Geschwisterkind erkrankte im Erwachsenenalter an einem Schwannom. Keiner der betroffenen Patienten zeigte eine Mutation im NF2-Lokus, einer der Patienten mit Ependymom sowie die Patientin mit Schwannom zeigten jedoch LOH im Bereich von 22q11.2-qtel.

6.1 DELETION 22q

Insgesamt zeigten 28 (42%) der untersuchten Tumoren eine Deletion 22q. Ein ähnliches Ergebnis erbrachten die meisten bislang durchgeführten Studien [11,19,24,28,30,44,78,81]. Es gibt jedoch Studien, die sowohl in deutlich geringerem Ausmaß [43,57] als auch deutlich häufiger [36,46,88] eine Monosomie 22 bzw. Deletion 22q beschreiben. Dies Unterschiede sind zum Teil in den geringen Fallzahlen der einzelnen Studien begründet, und vermutlich spielt auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Tumorkollektive eine Rolle.

6.1.1 VERGLEICH KINDER – ERWACHSENE

In unserem Kollektiv konnte eine Deletion 22q bei 15 von 34 Tumoren im Erwachsenenalter (44%) und bei 13 von 33 Tumoren (39%) im Kindesalter nachgewiesen werden.
In der Literatur wird die Häufigkeit einer Monosomie 22 bzw. Deletion 22q bei Ependymomen im Kindesalter kontrovers diskutiert. In einigen Publikationen wird von einer deutlich niedrigeren Frequenz als bei Erwachsenen berichtet. So konnten in mehreren pädiatrischen Tumorkollektiven im Durchschnitt in nur 12% der Fälle eine Monosomie 22 bzw. Deletion 22q nachgewiesen werden [9,24,43,57].
Dagegen beschreiben einige Autoren ein deutlich häufigeres Vorkommen bei kindlichen Tumoren. In 2 Studien mit Fallzahlen von 20 bzw. 40 Ependymomen des Kindesalters lag die Häufigkeit von Deletionen von 22q bei 25% [81,88].

In 3 größeren Studien mit insgesamt 77 Tumoren des Erwachsenen liegt die Häufigkeit einer Monosomie 22 bzw. Deletion 22q bei 51-78% [36,46,88].
Diese unterschiedlichen Ergebnisse für ependymale Tumoren des Kindes- und Erwachsenenalters legen den Verdacht nahe, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Entitäten mit unterschiedlicher Ätiologie handeln könnte. Für die Entstehung eines Ependymoms beim Erwachsenen scheint ein Verlust von Chromosom 22 bzw. seines langen Armes relevanter zu sein als bei kindlichen Tumoren.

Huang et al. (2002) [30] und Vagner-Capodano et al. (1999) [78] zeigten bei 39 bzw. 47 Ependymomen eine altersunabhängige Inzidenz für den Verlust von Chromosom 22 bzw. eine Deletion 22q.

6.1.2 VERGLEICH WEIBLICH – MÄNNLICH

Bezüglich einer Deletion 22q ergab sich in dieser Studie eine leichte Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. So zeigten 50% (16 von 32) der Tumoren weiblicher Patienten und 34% (12 von 35) der Tumoren männlicher Patienten eine Deletion 22q. Die logistische Regression ergab (bei Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Lokalisation, WHO-Grad und Rezidiv) einen grenzwertigen Einfluss des Geschlechts ($p = 0,084$).
Ähnlich waren die Ergebnisse einer FISH-Studie [78], mit 8 / 17 (47%) weiblichen Patienten, jedoch nur 3 / 20 (15%) männlichen Patienten. Zwei weitere Studien [84,88] stellten ebenfalls eine leichte Bevorzugung des weiblichen Geschlechts dar.

In einigen Studien wird ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis beschieben [36], und in vielen Studien kann wegen zu geringer Fallzahl keine Aussage darüber getroffen werden.
Einige Publikationen waren wiederum kontrovers, so fanden Blaeker et al. (1996) [11] bei der Untersuchung 14 kindlicher ependymaler Tumoren mittels LOH einen Unterschied von 4 / 8 betroffenen Tumoren des männlichen gegenüber 0 / 6 des weiblichen Geschlechts. Bei Huang et al. (2002) [30] zeigte sich unter den betroffenen kindlichen Ependymomen eine Geschlechtsverteilung von 4/10 männlichen zu 1/5 weiblichen, ebenso fanden Ward et al. (2001) [81] in einer Studie mit kindlichen Ependymomen mehr Tumoren von männlichen Patienten mit einer Deletion 22q.

Da die Studien, die ausschließlich kindliche Ependymome untersuchten, oftmals von einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts berichten, wurde das Geschlechterverhältnis auch unter Berücksichtigung des Alters betrachtet. Dabei zeigte sich jedoch keine Umkehrung des Verhältnisses. Im Gegenteil war das

Verhältnis mit 65% zu 19% betroffener Tumoren weiblicher bzw. männlicher Patienten noch deutlicher ausgeprägt. Betrachtet man ausschließlich die Ependymome vom Erwachsenen, so kehrt sich das Verhältnis, mit 47% betroffener Tumoren männlicher zu 33% Tumoren weiblicher Patienten, um. Anders verhält es sich bei Zheng et al. (2000) [88], in deren Kollektiv sich eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes unabhängig vom Alter des Patienten ergibt.
Insgesamt scheint damit das Geschlecht der Patienten mit Ependymom eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

6.1.3 VERGLEICH VERSCHIEDENER LOKALISATIONEN

Mit 13 von 25 Tumoren (52%) waren die spinalen Ependymome am häufigsten von einer Deletion 22q betroffen. Im Vergleich von supratentoriellen zu sonstigen Lokalisationen zeigte sich keine Signifikanz für das gehäufte Vorliegen einer Deletion 22q ($p = 0,319$). Mittels logistischer Regression konnte für die Lokalisation nur ein grenzwertiger Einfluss gezeigt werden ($p = 0,112$).

Weitere Studien konnten mittels CGH in 11 / 20 spinalen Tumoren eine Deletion 22q nachweisen, jedoch in keinem der 9 supratentoriellen und keinem der 14 Tumoren der hinteren Schädelgrube [28]. Einige LOH-Studien gehen mit ihren Ergebnissen dahingehend konform, dass auch hier vor allem spinale Tumoren von einer Deletion 22q betroffen sind (37-55%) [19,44,46]. Huang et al. (2002) erreichten Signifikanz für das gehäufte Vorkommen von Deletion 22q bei spinalen Tumoren des Erwachsenen. Mittels chi-square-Test zeigte sich in dieser Studie eine signifikante Assoziation zwischen Kindesalter und Tumor der hinteren Schädelgrube ($p = 0,001$) sowie Erwachsenenalter und spinaler Tumor ($p < 0,001$). Mahler-Araujo et al. (2003) [47] konnten eine Deletion 22q lediglich in 2 von 17 spinalen Ependymomen nachweisen. Diese niedrige Inzidenz könnte darin begründet sein, dass in der letztgenannten Studie nur myxopapilläre Ependymome untersucht worden waren, diese Veränderung jedoch gehäuft für Ependymome (WHO Grad II) beschrieben wird. In zwei weiteren Studien konnte in 6 von 10 bzw. in 8 von 8 Ependymomen (WHO Grad II) eine Deletion 22q gefunden werden [36,88].

In dieser Studie wurde bei 9 von 25 (36%) Tumoren der hinteren Schädelgrube eine Deletion 22q dargestellt. Der Zusammenhang zwischen dieser Lokalisation und dem Kindesalter war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Bezüglich der Deletion 22q differiert die Literatur: In den Studien von Jeuken et al. (2002) sowie von Zheng et al. (2000) konnte bei fast allen Tumoren eine Deletion 22q nachgewiesen werden. In anderen Studien dagegen [14,19,28,44,46,81] war eine Deletion 22q in bis zu einem Drittel der untersuchten Tumoren zu finden. Eine mögliche Erklärung könnte auch hier darin bestehen, dass in den erstgenannten Studien vor allem Ependymome (WHO Grad II) untersucht wurden.

Für die ependymalen Tumoren supratentoriellen Ursprungs existieren einheitlichere Ergebnisse. In unserer Studie lag die Inzidenz der Deletion 22q mit 5 von 15 Fällen bei 33%, dagegen sind in der Literatur meist nur einzelne Tumoren beschrieben [19,28,36,44,46]. Eine Ausnahme bildet auch hier die Fallbeschreibung von Zheng et al. (2000) mit 5 von 7 betroffenen Ependymomen.

Zwei Studien zeigten ein gehäuftes Auftreten von LOH 22 bei malignen intrakraniellen Tumoren des Kindes [30,46].

Der einzige Tumor, der dem sakralen Weichteilgewebe entstammte, zeigte ebenfalls eine Deletion 22q. Bei zwei in der Literatur beschriebenen Fällen eines subkutanen sakrokokzygealen myxopapillären Ependymoms [39,65] werden jeweils viele chromosomale Veränderungen beschrieben, jedoch keine von Chromosom 22.

6.1.4 Vergleich verschiedener WHO – Grade

In dieser Studie zeigte keines der untersuchten Subependymome eine Deletion 22q, gleiches gilt für die vorliegenden Berichte über insgesamt zehn Subependymome [9,15,16,19,44,81]. Sie stellen häufig einen Zufallsbefund dar. Bei sehr langsamer Progredienz werden sie nur selten reseziert und sind entsprechend wenig

untersucht. In verschiedenen Studien wurden keine oder nur wenige chromosomale Veränderungen gezeigt.

Unter den 12 in dieser Studie untersuchten myxopapillären Ependymomen zeigten 6 (50%) eine Deletion 22q. Alle 12 untersuchten myxopapillären Ependymome entstammten dem Spinalkanal. In der Literatur wird die Deletion 22q bei myxopapillären Ependymomen eher selten beschrieben [11,19,46,47], insbesondere wenn die Tumoren dem Spinalkanal entstammen. Aufgrund dessen wurde von einigen Autoren der Verdacht geäußert, bei dieser Untergruppe könne es sich um eine eigene Tumorentität handeln [28,36]. Einige Autoren beschreiben eine Deletion 22q auch für myxopapilläre spinale Ependymome, jedoch handelt es sich hier meist um geringe Fallzahlen mit höchstens fünf Tumoren [36,44,56].

Die in dieser Studie untersuchten Ependymome (WHO-Grad II) zeigten in 9 von 23 Fällen (39%) eine Deletion 22q. Darunter befanden sich 3 von 7 Tumoren der hinteren Schädelgrube sowie 6 von 11 Tumoren des Spinalkanals, jedoch keines der vier supratentoriellen Ependymome. Verschiedene Studien zeigten für Ependymome (WHO-Grad II) eine unterschiedliche Häufigkeit für das Auftreten einer Deletion 22q je nach Lokalisation des Tumors. So fertigten Hirose et al. (2001) eine getrennte Auswertung an für intrakranielle Ependymome und solche des Spinalkanals. Sie konnten in 11 von 14 (79%) spinalen Ependymomen (WHO-Grad II) eine Deletion 22q nachweisen, jedoch in keinem von 10 intrakraniellen Ependymomen (WHO-Grad II). Hieraus folgerten die Autoren, dass es sich um verschiedene Tumorentitäten handeln müsse. Diese These wurde durch die Tatsache gestützt, dass in keinem der spinalen myxopapillären Ependymome in dieser Studie der Verlust von genomischem Material von Chromosom 22q gefunden werden konnte.
In einigen Studien konnte eine Deletion 22q ebenfalls gehäuft bei spinalen Ependymomen (WHO-Grad II) nachgewiesen werden [19,44,46]. Bei Huang et al. (2002) war das Vorliegen einer Deletion 22q bei spinalen Ependymomen (WHO-Grad II) im Erwachsenenalter statistisch signifikant. In diesem Zusammenhang wurde auch für Ependymome (WHO-Grad II) das Vorliegen lokalisationsspezifischer genetischer Varianten diskutiert [36]. Die Fallzahlen dieser Studie sind zu klein um derartige Aussagen treffen zu können, passen aber zu den in der Literatur beschriebenen Zahlen.

Da Ependymome (WHO-Grad II) eine Progression zu anaplastischen Ependymomen (WHO-Grad III) zeigen können, würde man bei der letztgenannten Gruppe einen gleich hohen bis höheren Anteil von Deletion 22q erwarten. In dem Kollektiv dieser Studie konnte eine Deletion 22q mit 10 von 24 (42%) anaplastischen Ependymomen in einem ähnlichen Prozentsatz wie bei den Ependymomen (WHO-Grad II) gefunden werden.

In den vorliegenden Studien wurden meist nur geringe Fallzahlen anaplastischer Ependymome untersucht [9,11,36,43,48,81], die eher selten von einer Deletion 22q betroffen zu sein schienen. Eine Korrelation zu Lokalisation der Tumoren sowie Geschlecht oder Alter des Patienten, wie dies für Ependymome anderer WHO-Grade gezeigt wurde, wurde nicht beschrieben.

In Studien mit größeren Tumorkollektiven zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Lamszus et al. (2001) und Vagner-Capodano et al. (1999) [78] konnten den Verlust von Chromosom 22q in 10 von 20 (50%) bzw. 8 von 24 (33%) anaplastischen Ependymomen darstellen. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Ebert et al. (1999) [19] und Kraus et al. (2001), die diese Veränderung in 2 von 19 (11%) bzw. 3 von 13 (23%) der Fälle aufzeigten. Es konnte in keiner dieser Studien eine Korrelation zu Alter, Geschlecht oder Lokalisation der Tumoren entdeckt werden.

In unserer Studie konnten fünf Ependymoblastome untersucht werden, in drei dieser Tumoren konnte eine Deletion 22q gezeigt werden. Ependymoblastome (WHO-Grad IV) sind sehr selten und dementsprechend nur wenig untersucht. In weiteren Studien mit einzelnen Ependymoblastomen wurde zusammengefasst in 3 von insgesamt 7 Tumoren eine Deletion 22q identifiziert [11,19,36,44,48]. Ependymoblastome treten meist bei Kindern unter 3 Jahren auf und sind mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Um eine Aussage bezüglich der Relevanz einer Deletion 22q bei diesen Tumoren treffen zu können reicht diese Fallzahl sicher nicht aus.

6.1.5 VERGLEICH PRIMÄRTUMOREN – REZIDIVE

Die Tumoren in dieser Studie, bei denen es sich um Rezidive handelte, zeigten eine Deletion 22q in 35% der Fälle (6 / 17). Im Vergleich dazu ließ sich bei den Primärtumoren in 42% der Fälle (22 / 53) eine Deletion 22q nachweisen. Demnach scheint der nachgewiesene Verlust des langen Armes von Chromosom 22 kein signifikanter Marker für die Rezidivgefahr zu sein.

Die bisherigen Forschungsergebnisse erbrachten keinen Hinweis darauf, ob eine etwaige Deletion 22q Indiz für eine drohende Entartung eines Ependymoms ist bzw. ob Ependymome mit einem Verlust von Chromosom 22q gehäuft Rezidive zeigen.

In verschiedenen vorliegenden Studien wurden insgesamt 42 Rezidive ependymaler Tumoren untersucht. 19 dieser Tumoren (45%) zeigten eine Deletion 22q [8,9,23,24,46,62,74,78,79,81]. Es fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen Tumoren weiblicher Patienten und solchen männlicher mit 63% (10 von 16) bzw. 36% (9 von 25) Deletion 22q. Bezüglich des Alters war der Unterschied nicht relevant. Ependymome waren mit 50% (8 von 16) etwas häufiger betroffen als anaplastische Ependymome (39%, 9 von 23). Im Hinblick auf die Lokalisation waren spinale Ependymome in 3 von 4 Fällen betroffen, wohingegen supratentorielle Ependymome in nur 1 von 6 Fällen betroffen waren. Die Tumoren der hinteren Schädelgrube waren in 11 von 21 Fällen (52%) betroffen.

In der Literatur sind Fälle beschreiben, in denen eine Deletion 22q erst beim Rezidivtumor nachzuweisen war [9,24]. Es wird jedoch auch über Primärtumoren mit Deletion 22q berichtet, deren Rezidive diese Veränderung nicht mehr aufwiesen [78].

6.2 DELETION 22q IN SUBPOPULATIONEN

Der cut-off level für eine Deletion 22q lag für die verwendeten Sonden bei 5% der ausgewerteten Zellkerne. Der ausgeprägteste Verlust von genomischem Material lag bei 78% der Zellkerne eines Ependymoms, die in der FISH nur ein Signal für Chromosom 22q aufwiesen. Jedoch zeigten 9 der insgesamt 28 Tumoren mit Deletion 22q diese Veränderung in weniger als 10% der ausgewerteten Zellkerne. Nur bei 5 der Ependymome, bei denen eine Deletion 22q nachgewiesen wurde waren mehr als 20% der ausgewerteten Zellkerne betroffen. Das Vorkommen eines höheren oder niedrigeren Prozentsatzes an Zellkernen mit Deletion 22q zeigte keine signifikante Korrelation zu den erhältlichen klinischen Daten wie Alter, Geschlecht, Lokalisation und WHO-Grad sowie Rezidivstatus.
Bezüglich der Altersverteilung hinsichtlich der betroffenen Subpopulationen zeigt sich ein Anteil von 33% (11 / 33 Fälle) bei den Tumoren des Kindesalters, sowie ein Anteil von 35% (12 / 34) bei den Tumoren des Erwachsenenalters. Dies entspricht dem bereits beschriebenen Verhältnis.
Im Hinblick auf das Geschlecht zeigte sich bei den Fällen mit kleiner Anzahl von Verlusten von Chromosom 22q, ähnlich wie bei den ausgeprägten Deletionen von 22q eine leichte Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. Der Unterschied könnte bei 41% (13 von 32 Fällen) bei den Tumoren weiblicher Patienten im Vergleich zu 29% (10 von 35 Fällen) bei den Tumoren von männlichen Patienten jedoch durchaus zufällig entstanden sein.

Die spinalen Tumoren waren mit 10 von 25 Fällen (40%) auch von der Deletion 22q in Subpopulationen am häufigsten betroffen. Die supratentoriellen Tumoren und solche der hinteren Schädelgrube zeigten mit 5 von 15 Fällen (33%9 und 7 von 25 Fällen (28%) einen etwas geringeren Prozentsatz.

Wie bereits beschrieben zeigte keines der Subependymome (WHO – Grad I) eine klare Deletion 22q. Ebenso wenig ließ sich eine Deletion 22q in Subpopulationen der Tumoren nachweisen; sie zeigten in der FISH stets zwei Signale für die untersuchten Chromosomen.
Bei den myxopapillären Ependymomen fand sich in 40% der Fälle (6 von 15) ein Verlust in Subpopulationen der Tumoren.

Die Ependymome (WHO – Grad II) verhielten sich in bezug auf die partiellen Verluste von Chromosom 22q ähnlich wie bei den deutlichen Deletionen von 22q; dies ließ sich in 6 von 15 Tumoren (40%) nachweisen.
Die anaplastischen Ependymome (WHO – Grad III) wiesen in keinem Fall eine Deletion 22q mit Verlust von genomischem Material in mehr als 20% der Zellkerne auf. In 5 der 10 Fälle (50%) mit Deletion 22q lag der Verlust sogar bei weniger als 10% der Zellkerne. 2 der 5 (40%) Ependymoblastome (WHO – Grad IV) zeigten eine deutliche Deletion 22q. Zusätzlich war bei einem weiteren Ependymoblastom eine Deletion 22q in 16% der ausgewerteten Zellkerne nachweisbar.
Ammerlaan et al. (2005) [4] zeigte bei 7 von 37 (21%) untersuchten Ependymomen Fluoreszenzmuster in der Microarray-CGH, die für einen teilweisen Verlust von genomischem Material von Chromosom 22 sprachen. Eine Kontamination durch Stromazellen konnte ausgeschlossen werden. Gleichzeitig konnten Fluoreszenzmuster passend zu einer Monosomie 22 in einem anderen Teil der Tumoren gezeigt werden.
Bei den Rezidivtumoren wiesen 29% (5 von 17) einen Verlust von Chromosom 22q bzw. eine Deletion 22q in Subpopulationen auf. Bei den Primärtumoren waren 18 von 53 (34%) Tumoren von einem Verlust von Chromosom 22q in Subpopulationen betroffen, während nur 4 von 53 (8%) eine deutliche Deletion 22q gezeigt hatten.

Doch wie ist der Verlust von genomischem Material zu werten, wenn er nur einen kleinen Teil des Tumors betrifft? Und warum wird die Deletion 22q mit anderen Methoden wie CGH und Mikrosatellitenanalyse so häufig gesehen? Denkbar wäre ein Selektionsvorteil für diejenigen Zellen mit Deletion 22q. Bei Methoden, die sich Metaphasen bedienen und deshalb eine Inkulturnahme des Tumors erfordern, wäre so eine Verfälschung des Ergebnisses denkbar, weil es zu einer relativen Zunahme der Zellen mit Deletion 22q kommt. In vivo scheint kein solcher Selektionsvorteil zu bestehen, denn in diesem Fall würde man in der FISH einen erhöhten Anteil von Zellkernen mit Deletion 22q erwarten. Darüber hinaus halten einige Autoren die CGH für kleinere Chromosomen wie Chromosom 22 für zu ungenau [24]. Andere Autoren dagegen sehen dies nach Verbesserung der Methodik nicht als Problem [36].

Für eine erhöhte Rezidiv-Neigung bei ependymalen Tumoren mit Deletion 22q konnte in dieser Studie ebenfalls kein Anhalt gefunden werden. Auch in den in

anderen Studien untersuchten Ependymom-Rezidiven konnte kein signifikant gehäuftes Vorkommen einer Deletion 22q bewiesen werden. In einigen Fällen war der Rezidivtumor sogar diploid für das genomische Material von Chromosom 22, obwohl der Primärtumor dies nicht gewesen war. Desweiteren zeigten Ependymome mit Deletion 22q nach Resektion nicht häufiger Rezidive als Tumoren ohne Deletion 22q.

Fasst man die Ependymome mit einer ausgeprägten Deletion 22q mit denjenigen zusammen, die eine Deletion 22q in Subpopulationen von Tumorzellen aufweisen, so ergibt sich ein Anteil von 42% (28 von 67) der untersuchten Ependymome, die zumindest partiell einen Verlust von Chromosom 22 oder eine Deletion 22q aufwiesen. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Zahlen, die Angaben bewegen sich meist um 30%.

6.3 ZUGEWINN VON CHROMOSOM 22q

In einigen Tumoren konnte überraschenderweise ein Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q nachgewiesen werden. Von diesem Zugewinn waren insgesamt 9 (13%) der ependymalen Tumoren betroffen.

Die Zugewinne betrafen zwischen 21% und 62% der Zellkerne. Die Altersverteilung war hier in etwa ausgeglichen, so zeigten 5 von 33 Fällen kindlicher Tumoren (15%) und 4 von 34 Fällen (12%) der Tumoren von erwachsenen Patienten einen Zugewinn von Chromosom 22q. In einer weiteren Studie, die FISH Analysen durchführte, zeigten 5 von 8 informativen Tumoren einen Zugewinn von genomischem Material im Bereich des NF2-Lokus [21]. Eine CGH-Studie [88] konnte einen Zugewinn von genomischem Material auf Chromosom 22q in 2/28 Fällen nachweisen. Eine weitere CGH-Studie zeigte an einem Tumor gleichzeitig einen Zugewinn von genomischem Material von 22q11.2-q12 wie auch einen Verlust von 22q12-qter [18].

Bezüglich des Geschlechts zeigte sich ein überraschend großer Unterschied: war nur einer der 32 Tumoren von weiblichen Patienten von einem Zugewinn betroffen, so zeigten demgegenüber 23% der Tumoren (8 von 35) männlicher Patienten einen Zugewinn von Chromosom 22q. Der Zusammenhang zwischen männlichem Geschlecht und Zugewinn war statistisch signifikant ($p = 0,028$), die Geschlechterverteilung bei den Verlusten war nicht signifikant. Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zum Trend des Geschlechterverhältnisses bezüglich der Deletion 22q sowie der Deletion 22q in Subpopulationen von Tumorzellen.

Bei den Tumoren der hinteren Schädelgrube und bei den supratentoriellen Tumoren fand sich diese Veränderung vergleichsweise selten, nur in 2 von 25 (8%), bzw. 1 von 15 (7%) Fällen. Der Tumor, dessen Lokalisation nicht bekannt war, zeigte ebenfalls einen Zugewinn von Chromosom 22q. Den größten Anteil im Hinblick auf die Lokalisation machten die spinalen Tumoren aus, dort waren 5 der 25 spinalen Ependymome (20%) involviert. In allen Fällen zeigte sich ebenfalls ein Zugewinn von 9q34. In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe konnten mittels CGH und FISH bereits Zugewinne von genomischem Material von Chromosom 9q gezeigt werden [68]. Verschiedene Studien beschrieben mittel konventioneller Zytogenetik Zugewinne oder Translokationen von Chromosom 9 bei etwa 15% der untersuchten Ependymome [6,8,17,23,52,56,60,63,66,67,76,79,83,84]. In der Studie unserer Arbeitsgruppe zeigten fast ausschließlich Tumoren der WHO-Grade I und II

Zugewinne auf 9q. Das terminale Ende von Chromosom 9 enthält das Onkogen ABL1 (9q34.1) das bei der Translokation t(9;22) involviert ist. In der FISH konnten jedoch keine Amplifikationen oder Translokationen von 9q gefunden werden. Weitere Studien konnten keine erhöhte Genexpression in anderen Gliomen nachweisen, eine Glioblastom-Zellinie zeigte jedoch eine vermehrte Genexpression für ABL1.

Bezüglich eines Zugewinns blieben die Untersuchungen an den 3 Subependymomen (WHO – Grad I) ergebnislos. Die myxopapillären Ependymome (WHO – Grad I) hingegen bildeten die Gruppe mit denjenigen Tumoren, die am häufigsten von einem Zugewinn von Chromosom 22q betroffen waren. 4 der 12 Fälle (33%) zeigten dieses Ergebnis. In allen 4 Fällen fand sich auch ein Zugewinn von Chromosom 9q34 der jedoch nur in zwei Fällen so ausgeprägt war wie der Zugewinn von 22q11. Die klassischen Ependymome (WHO – Grad II) waren in 3 von 23 Fällen (13%) betroffen, die anaplastischen Ependymome (WHO – Grad III) zeigten mit 2 von 24 Fällen (8%) ein ähnliches Ergebnis. Bei den Ependymoblastomen konnte in keinem Fall ein Zugewinn von Chromosom 22q nachgewiesen werden.

Es konnte kein großer Unterschied zwischen Primärtumoren und Rezidiven gefunden werden. Von den Primärtumoren waren 7 von 49 Fällen (14%) und bei den rezidivierten Ependymomen 2 von 17 Fällen (12%) betroffen. Interessanterweise zeigten weder die vorliegenden Primärtumoren mit bekanntem Rezidiv noch die vorliegenden Rezidive einen Zugewinn von chromosomalem Material von Chromosom 22q11 oder 9q34.

6.4 BEDEUTUNG VON DELETION 22q

Ein Verlust des langen Armes von Chromosom 22 wird bei Ependymomen häufig beschrieben. Die pathogenetische Relevanz dieser zytogenetischen Beobachtung ist dagegen noch weitgehend unklar. Betrachtet man eine Liste der alleine auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q) lokalisierten Gene könnten einige Kandidaten genannt werden, die als potentielle Proto-onkogene, Gene von Zellzyklus regulierende Proteinen, Tumorsuppressorgene und andere onkogenetisch relevante Gene in der Pathogenese von Ependymomen eine Rolle spielen. Einige dieser Favoriten sollen in diesem Abschnitt näher beleuchtet werden. Auf Chromosom 22q ist wenigstens ein Tumorsuppressorgen und eine Breakpoint cluster region bekannt, ebenso ist der lange Arm des Chromosoms bei verschiedenen Tumorsyndromen involviert.

Bei der zentralen Form der Neurofibromatose (NF2) treten neben multiplen Neurofibromen ependymale Tumoren in gehäuftem Maße auf. Daher war zunächst das bei dieser Krankheit mutierte Tumorsuppressorgen auf 22q12.2 Gegenstand einiger Untersuchungen. Jedoch konnte bei sporadischen Ependymomen eine Mutation des NF2-Lokus nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden. Neumann et al. (1993) [52] berichteten in diesem Zusammenhang von zwei Schwestern mit Ependymom, von denen nur bei einer ein Verlust von genomischem Material von Chromosom 22 zu zeigen war.

Rhodes et al. (1997) [59] beschrieben eine de novo konstitutionelle Translokation (1;22)(p22;q11.2), der Bruchpunkt auf Chromosom 22 wurde zwischen ARVCF und D22S264 lokalisiert, ein Intervall von ca 400kb. Den Autoren erschien eine Onkogenaktivierung oder Produktion eines onkogenen Fusionsproteins wahrscheinlicher als das Vorliegen eines Tumorsupressorgens, zumal der beschriebene Bruchpunkt weit von NF2 entfernt lag.

Lamszus et al. (2001) [46] zeigten in einer LOH-Sudie an 2 Ependymomen eine inverse Assoziation zwischen LOH im Bereich von Chromosom 22 und 11. Daraus folgerten sie, dass hier verschiedene voneinander unabhängige Mechanismen ursächlich in der Pathogenese von Ependymomen sein könnten. Weiter wurde in dieser Studie LOH 22 in fast der Hälfte der Tumoren gezeigt, aber nur teilweise war gleichzeitig eine Mutation des NF2-Lokus vorhanden. Eine mögliche Erklärung wäre ein nicht systematischer Verlust von genomischem Material. Eine weitere Möglichkeit

wäre dass in Folge von Deletionen von ganzen Exonen der Nachweis von NF2 fehlgeschlagen wäre. Darüberhinaus könnten ein oder mehrere weitere Tumorsuppressorgene im Bereich von 22q lokalisiert sein.

In der Region 22q11.2 liegt das Tumorsupressorgen INI1/hSNF5. Es kodiert ein Mitglied des Chromatin-remodeling-Komplexes. Bei homozygoter Deletion oder truncating mutation dieses Gens kommt es gehäuft zum Auftreten atypischer teratoider Tumoren und Rhabdoidtumoren [7]. Auch bei Ependymomen wurde gelegentlich eine Mutation in der entsprechenden Genregion gefunden [77], jedoch konnte kein Zusammenhang zu Klinik, histologischen Merkmalen oder Prognose gezeigt werden.

Mutationen im Bereich von 22q12.1 sind ursächlich für das LiFraumeni-Syndrom. Hierbei handelt es sich um ein familiäres Krebssyndrom mit Auftreten solider Tumoren (auch im ZNS, z.B. Astrozytom) im Kindesalter in Familien, in denen auch bei anderen Familienmitgliedern unter 45 Jahren gehäuft Tumoren vorkommen; dies ist meist mit einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 verbunden.
Hemminki et al. (2000) [27] untersuchten die Häufigkeiten von Tumoren bei erstgradig Verwandten von Kindern mit Hirntumoren. Dabei zeigte sich ein gehäuftes Vorkommen von ependymalen Tumoren bei Kindern, wenn die Eltern an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren. Die Assoziation von Tumoren des ZNS und des Darmes ist unter anderem für das Turcot Syndrom und für das familiäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) bekannt, jedoch wurde in beiden Fällen nur über wenige Patienten mit Ependymom berichtet. Das HNPCC ist ebenfalls mit einem hohen Risiko für ein endometriales Karzinom verbunden. In dieser Studie waren 2 Mütter von pädiatrischen Patienten mit Ependymom an einem endometrialen Karzinom erkrankt.

Vagner-Capodano et al. (1992) [79] beschrieben ein Ependymom bei dem zwei Klone innerhalb desselben Tumors existierten. Beide Klone wiesen eine Translokation t(2;22)(p12;q13) auf, zusätzlich zeigte der zweite Klon eine Monosomie 10. Der Rezidivtumor wies nur noch Zellen des zweiten Klons auf. In diesem Zusammenhang scheint der Verlust von genomischem Material von Chromosom 22 einen eher früher Schritt in der Pathogenese von Ependymomen darzustellen.

Kürzlich beschrieben Ammerlaan et al. (2005) [4] interstitielle Deletionen auf 22q in zwei Familien. Die betroffene Region liegt zwischen D22S257 und D22S310. Diese Region fiel bereits in anderen Studien auf [30,44]. Die von Ammerlaan et al. (2005) [4] beschriebenen Deletionen konnten sowohl in der konstitutionellen DNA der Patienten als auch bei einem Teil ihrer gesunden Familienmitglieder nachgewiesen werden. Daraus folgerten die Autoren, dass falls diese Gene pathogenetisch relevant wären, sie eine niedrige Penetranz haben müssen.
Mikrosatellit-Instabilität wurde in hereditären Syndromen mit gehäuftem Auftreten kolorektaler Karzinome und bei verschiedenen sporadischen Tumoren berichtet, zum Teil auch bei Hirntumoren. Deshalb untersuchten Alvino et al. (2000) [3] 20 primäre Hirntumoren einschließlich einem Ependymom. Im gesamten Kollektiv zeigte sich nur sporadische Instabilität. Damit scheinen Alterationen im DNA-Reparatur-Mechanismus keine bedeutende Rolle in der Onkogenese primärer Hirntumoren zu spielen.

In verschiedenen CGH-Studien zeigten Ependymome niedriger Malignitätsgrade die höchste Anzahl chromosomaler Veränderungen [9,48,68]. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen Tumoren, bei denen zunehmende genomische Aberrationen ein Zeichen zunehmender Malignität darstellen. Gleichzeitig konnten in dieser Studie an keinem der untersuchten Subependymome (WHO-Grad I) Veränderungen auf Chromosom 22q dargestellt werden. Dies zeigt noch einmal, wie wenig bislang über die molekulare Pathogenese dieser ungewöhnlichen Tumoren bekannt ist [71].

Abgesehen von den bekannten, mit Hirntumoren im weiteren Sinne assoziierten Genloci befinden sich auf dem Chromosomabschnitt 22q weitere pathogenetisch interessante Gene. In zunehmenden Maße fokussiert sich die gegenwärtige onkologische Forschung auf die Identifikation von Signaltransduktionsmolekülen, die Zytokinrezeptoren untergeordnet sind und neben anderen onkogenetisch wichtigen Funktionen, wie Apoptoseresistenz vor allem proliferationsinduzierenden Signale übermitteln. Dazu gehört unter anderen die auf 22q11.21 lokalisierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1), sowie die sogenannte breakpoint cluster region (bcr) auf 22q11.23, die bei Fusion mit dem Genlocus der abl-Kinase zu einer konstitutiven Hochregulation und einer nukleären Translokationsinhibition dieser Kinase führt. Als sogenannte Klasse 1 Mutation [38] ist diese Translokation

maßgeblich an der Entstehung einer chronisch myeloischen Leukämie beteiligt. Ein weiterer Kandidat ist die Phosphatidylinositol 4-Kinase auf 22q11.21 [82], die unter konstitutiver Aktivierung mit verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht wird.

Inwieweit oben genannte Genloci bei den in Ependymomen beobachteten Mutationen von Chromosom 22 eine Rolle spielen könnten wird kontrovers diskutiert.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden ependymale Tumoren sowohl aus kryokonserviertem Frischmaterial als auch paraffinfixiert und archiviert vorliegend mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode geeignet ist, um archiviertes Material seltener Tumoren zu untersuchen. Dieses interphasezytogenetische Verfahren eröffnet zusammen mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung neue Wege in einem integrierten Ansatz zur Tumor-Genom-Analyse an archiviertem Gewebe. Bislang konnte für Ependymome aus den vorliegenden zytogenetischen Veränderungen keine Aussage hinsichtlich des Primärereignisses und der Relevanz einzelner Veränderungen und dem Fortschreiten getroffen werden.
Es wurden bislang vergleichsweise wenige Ependymome molekularzytogenetisch untersucht. Hierbei wurden verschiedene Methoden angewandt wie konventionelle Zytogenetik, CGH (comparative genomic hybridization), FISH sowie LOH (loss of heterozygocity). Die Fallzahlen dieser Studien waren oftmals sehr klein. In dieser Studie lag mit 67 ependymalen Tumoren eine höhere Fallzahl als in vielen anderen Studien vor. Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Parameter der untersuchten Ependymome war die statistische Auswertung dennoch schwierig.
In dieser Studie konnten in 28 von 67 Tumoren (42%) in der FISH eine Deletion 22q identifiziert werden. Dabei zeigte sich keine eindeutige Zuordnung zu Alter, Geschlecht, Lokalisation, WHO (world health organization) -Grad sowie Primärtumor oder Rezidiv. Mittels logistischer Regression unter Berücksichtigung aller Variablen war ein grenzwertiger Einfluss von Geschlecht und Lokalisation nachweisbar, dabei zeigten sich Tumoren weiblicher Patienten und spinale Tumoren häufiger betroffen.

Einen neuen Aspekt ergibt sich in dieser Studie aus der Besonderheit der FISH, die es erlaubt viele Zellkerne eines hybridisierten Tumors zu beurteilen. Dabei waren in dieser Studie Tumorzellen der meisten Ependymome mit Deletion 22q nur in einem begrenzten Prozentsatz betroffen. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Ausprägung der Deletion 22q und klinischen Parametern wie Alter, WHO-Grad, Geschlecht und Lokalisation gezeigt werden.

Ein überraschendes Ergebnis stellte der Zugewinn von genomischem Material von Chromosom 22q dar, der bei 9 der 67 Tumoren (entsprechend 13%) dargestellt werden konnte. Hier ergab sich eine statistische Signifikanz für das Vorliegen eines chromosomalen Zugewinns für Tumoren männlicher Patienten.

Letztlich bleibt unklar inwieweit die beschriebenen Verluste und Zugewinne von genomischem Material auf Chromosom 22q Relevanz für die klinische Präsentation ependymaler Tumoren haben und es bedarf weiterer Studien um prognostische Aussagen treffen zu können und die jeweilige Therapie entsprechend zu optimieren.

8 LITERATUR

1. Akyuz C, Emir S, Akalan N, Soylemezoglu F, Kutluk T, Buyukpamukcu M. Intracranial ependymomas in childhood--a retrospective review of sixty-two children. Acta Oncol. 39: 97-100 (2000)

2. Alonso ME, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Lomas J, de Campos JM, Kusak ME, Isla A, Rey JA. Analysis of the NF2 gene in oligodendrogliomas and ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.134: 1-5 (2002)

3. Alvino E, Fernandez E, Pallini R. Microsatellite instability in primary brain tumors. Neurol Res.22: 571-575 (2000)

4. Ammerlaan AdB, C; Ararou, A; Buckley, PG; Mantripragada, KK; Verstegen, MJ; Hulsebos, TJM; Dumnski, JP. Localization of a Putative Low-Penetrance Ependymoma Susceptibility Locus to 22q11 Using a Chromosome 22 Tiling-Patch Genomic Microarray. Genes, Chromosomes & Cancer.43: 329-338 (2005)

5. Arnoldus EP, Wolters LB, Voormolen JH, van Duinen SG, Raap AK, van der Ploeg M, Peters AC. Interphase cytogenetics: a new tool for the study of genetic changes in brain tumors. J Neurosurg.76: 997-1003 (1992)

6. Bhattacharjee MB, Armstrong DD, Vogel H, Cooley LD. Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. Cancer Genet Cytogenet.97: 39-53 (1997)

7. Biegel JA. Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors. Neuro-oncol.1: 139-151 (1999)

8. Bigner SH, McLendon RE, Fuchs H, McKeever PE, Friedman HS. Chromosomal characteristics of childhood brain tumors. Cancer Genet Cytogenet.97: 125-134 (1997)

9. Bijlsma EK, Voesten AM, Bijleveld EH, Troost D, Westerveld A, Merel P, Thomas G, Hulsebos TJ. Molecular analysis of genetic changes in ependymomas. Genes Chromosomes Cancer.13: 272-277 (1995)

10. Birch BD, Johnson JP, Parsa A, Desai RD, Yoon JT, Lycette CA, Li YM, Bruce JN. Frequent type 2 neurofibromatosis gene transcript mutations in sporadic intramedullary spinal cord ependymomas. Neurosurgery.39: 135-140 (1996)

11. Blaeker H, Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Batra SK, Fuchs HE, Bigner SH. Microsatellite analysis of childhood brain tumors. Genes Chromosomes Cancer.15: 54-63 (1996)
12. Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M. Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. Med Pediatr Oncol.30: 319-329; discussion 329-331 (1998)
13. Butel JS, Lednicky JA. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. J Natl Cancer Inst.91: 119-134 (1999)
14. Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J, Allibone R, Balaji V, Perry R, Walker D, Gilbertson R, Ellison DW. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. Br J Cancer.86: 929-939 (2002)
15. Dal Cin P, Van den Berghe H, Buonamici L, Losi L, Roncaroli F, Calbucci F. Cytogenetic investigation in subependymoma. Cancer Genet Cytogenet.108: 84 (1999)
16. Debiec-Rychter M, Hagemeijer A, Sciot R. Cytogenetic analysis in three cerebral subependymomas: further evidence for a hamartomatous nature? Cancer Genet Cytogenet.122: 63-64 (2000)
17. Debiec-Rychter M, Lasota J, Alwasiak J, Liberski PP. Recurrent anaplastic ependymoma with an abnormal karyotype and c-myc proto-oncogene overexpression. Acta Neuropathol (Berl).89: 270-274 (1995)
18. Dyer S, Prebble E, Davison V, Davies P, Ramani P, Ellison D, Grundy R. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. Am J Pathol.161: 2133-2141 (2002)
19. Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A. Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. Am J Pathol.155: 627-632 (1999)
20. Figarella-Branger D, Civatte M, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Gambarelli D, Gentet JC, Lena G, Choux M, Pellissier JF. Prognostic factors in intracranial ependymomas in children. J Neurosurg.93: 605-613 (2000)
21. Fouladi M, Helton K, Dalton J, Gilger E, Gajjar A, Merchant T, Kun L, Newsham I, Burger P, Fuller C. Clear cell ependymoma: a clinicopathologic and radiographic analysis of 10 patients. Cancer.98: 2232-2244 (2003)

22. Goldwein JW, Leahy JM, Packer RJ, Sutton LN, Curran WJ, Rorke LB, Schut L, Littman PS, D'Angio GJ. Intracranial ependymomas in children. Int J Radiat Oncol Biol Phys.19: 1497-1502 (1990)
23. Griffin CA, Long PP, Carson BS, Brem H. Chromosome abnormalities in low-grade central nervous system tumors. Cancer Genet Cytogenet.60: 67-73 (1992)
24. Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, Sevenet N, Terrier-Lacombe MJ, Venuat AM, Doz F, Sainte-Rose C, Kalifa C, Vassal G. Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. Cancer Genet Cytogenet.136: 121-125 (2002)
25. Hamilton RL, Pollack IF. The molecular biology of ependymomas. Brain Pathol.7: 807-822 (1997)
26. Helseth E, Due-Tonnessen B, Lote K, Skullerud K, Storm-Mathisen I, Wesenberg F, Lundar T. Ependymoma in children and young adults (0-19 years): report of 25 consecutive cases. Childs Nerv Syst.17: 24-30 (2001)
27. Hemminki K, Li X, Vaittinen P, Dong C. Cancers in the first-degree relatives of children with brain tumours. Br J Cancer.83: 407-411 (2000)
28. Hirose Y, Aldape K, Bollen A, James CD, Brat D, Lamborn K, Berger M, Feuerstein BG. Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. Am J Pathol.158: 1137-1143 (2001)
29. Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, Tomita T, Schomberg P, Ater J, Luchtman-Jones L, Rivlin K, Lamborn K, Prados M, Bollen A, Berger M, Dahl G, McNeil E, Patterson K, Shaw D, Kubalik M, Russo C. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. J Pediatr Hematol Oncol.21: 203-211 (1999)
30. Huang B, Starostik P, Kuhl J, Tonn JC, Roggendorf W. Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. Acta Neuropathol (Berl).103: 415-420 (2002)
31. Huang B, Starostik P, Schraut H, Krauss J, Sorensen N, Roggendorf W. Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9. Acta Neuropathol (Berl).106: 357-362 (2003)
32. Hulsebos TJ, Oskam NT, Bijleveld EH, Westerveld A, Hermsen MA, van den Ouweland AM, Hamel BC, Tijssen CC. Evidence for an ependymoma tumour suppressor gene in chromosome region 22pter-22q11.2. Br J Cancer.81: 1150-1154 (1999)

33. Humpl T, Neuser H, Bruhl K, Bartels U, Schwarz M, Gutjahr P. Clinical aspects and prognosis of ependymoma in infants and children. A single institution experience. Childs Nerv Syst.17: 246-251 (2001)
34. James CD, He J, Carlbom E, Mikkelsen T, Ridderheim PA, Cavenee WK, Collins VP. Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. Genes Chromosomes Cancer.2: 94-102 (1990)
35. Jenkins RB, Kimmel DW, Moertel CA, Schultz CG, Scheithauer BW, Kelly PJ, Dewald GW. A cytogenetic study of 53 human gliomas. Cancer Genet Cytogenet.39: 253-279 (1989)
36. Jeuken JW, Sprenger SH, Gilhuis J, Teepen HL, Grotenhuis AJ, Wesseling P. Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH. J Pathol.197: 238-244 (2002)
37. Kallioniemi AV, T.; Karhu, R.; Pinkel, D.; Kallioniemi O.-P. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence *in Situ* Hybridization and Comparative Genomic Hybdridization. Methods: A Companion to Methods in Enzymology.9: 113-121 (1996)
38. Kelly LM GD. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet.3: 179-198 (2002)
39. Kindblom LG, Lodding P, Hagmar B, Stenman G. Metastasizing myxopapillary ependymoma of the sacrococcygeal region. A clinico-pathologic, light- and electronmicroscopic, immunohistochemical, tissue culture, and cytogenetic analysis of a case. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A].94: 79-90 (1986)
40. Kleihues P. Ependymal tumours. 71-80, in: Kleihues P, Cavenee WK. World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2nd edition, IARC press, Lyon (2000)
41. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification, and grading of gliomas. Glia.15: 211-221 (1995)
42. Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. Cancer Genet Cytogenet.135: 147-159 (2002)
43. Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, Sutton LN, Biegel JA. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. J Neurooncol.37: 25-33 (1998)

44. Kraus JA, de Millas W, Sorensen N, Herbold C, Schichor C, Tonn JC, Wiestler OD, von Deimling A, Pietsch T. Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1. Acta Neuropathol (Berl).102: 69-74 (2001)
45. Kun LE, Kovnar EH, Sanford RA. Ependymomas in children. Pediatr Neurosci.14: 57-63 (1988)
46. Lamszus K, Lachenmayer L, Heinemann U, Kluwe L, Finckh U, Hoppner W, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M. Molecular genetic alterations on chromosomes 11 and 22 in ependymomas. Int J Cancer.91: 803-808 (2001)
47. Mahler-Araujo MB, Sanoudou D, Tingby O, Liu L, Coleman N, Ichimura K, Collins VP. Structural genomic abnormalities of chromosomes 9 and 18 in myxopapillary ependymomas. J Neuropathol Exp Neurol.62: 927-935 (2003)
48. Mazewski C, Soukup S, Ballard E, Gotwals B, Lampkin B. Karyotype studies in 18 ependymomas with literature review of 107 cases. Cancer Genet Cytogenet.113: 1-8 (1999)
49. McLaughlin MP, Marcus RB, Jr., Buatti JM, McCollough WM, Mickle JP, Kedar A, Maria BL, Million RR. Ependymoma: results, prognostic factors and treatment recommendations. Int J Radiat Oncol Biol Phys.40: 845-850 (1998)
50. Metzger AK, Sheffield VC, Duyk G, Daneshvar L, Edwards MS, Cogen PH. Identification of a germ-line mutation in the p53 gene in a patient with an intracranial ependymoma. Proc Natl Acad Sci U S A.88: 7825-7829 (1991)
51. Murakami M, Kuratsu J, Takeshima H, Soyama N, Shinojima N, Ushio Y. Spinal seeding of anaplastic ependymoma mimicking fungal meningitis. A case report and review of the literature. J Neurosurg Sci.44: 46-51; discussion 51-42 (2000)
52. Neumann E, Kalousek DK, Norman MG, Steinbok P, Cochrane DD, Goddard K. Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors. Cancer Genet Cytogenet.71: 40-49 (1993)
53. Nijssen PC, Deprez RH, Tijssen CC, Hagemeijer A, Arnoldus EP, Teepen JL, Holl R, Niermeyer MF. Familial anaplastic ependymoma: evidence of loss of chromosome 22 in tumour cells. J Neurol Neurosurg Psychiatry.57: 1245-1248 (1994)

54. Perilongo G, Massimino M, Sotti G, Belfontali T, Masiero L, Rigobello L, Garre L, Carli M, Lombardi F, Solero C, Sainati L, Canale V, del Prever AB, Giangaspero F, Andreussi L, Mazza C, Madon E. Analyses of prognostic factors in a retrospective review of 92 children with ependymoma: Italian Pediatric Neuro-oncology Group. Med Pediatr Oncol.29: 79-85 (1997)
55. Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, Janosky J, Deutsch M. Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. Neurosurgery.37: 655-666; discussion 666-657 (1995)
56. Ransom DT, Ritland SR, Kimmel DW, Moertel CA, Dahl RJ, Scheithauer BW, Kelly PJ, Jenkins RB. Cytogenetic and loss of heterozygosity studies in ependymomas, pilocytic astrocytomas, and oligodendrogliomas. Genes Chromosomes Cancer.5: 348-356 (1992)
57. Reardon DA, Entrekin RE, Sublett J, Ragsdale S, Li H, Boyett J, Kepner JL, Look AT. Chromosome arm 6q loss is the most common recurrent autosomal alteration detected in primary pediatric ependymoma. Genes Chromosomes Cancer.24: 230-237 (1999)
58. Reuther FJ, Lohler J, Herms J, Hugo HH, Schindler C, Leithauser F, Melzner I, Moller P, Scheil S. Low incidence of SV40-like sequences in ependymal tumours. J Pathol.195: 580-585 (2001)
59. Rhodes CH, Call KM, Budarf ML, Barnoski BL, Bell CJ, Emanuel BS, Bigner SH, Park JP, Mohandas TK. Molecular studies of an ependymoma-associated constitutional t(1;22)(p22;q11.2). Cytogenet Cell Genet.78: 247-252 (1997)
60. Rogatto SR, Casartelli C, Rainho CA, Barbieri-Neto J. Chromosomes in the genesis and progression of ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.69: 146-152 (1993)
61. Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekacewicz C, Rey A. Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys.28: 381-386 (1994)
62. Rousseau-Merck M, Versteege I, Zattara-Cannoni H, Figarella D, Lena G, Aurias A, Vagner-Capodano AM. Fluorescence in situ hybridization determination of 22q12-q13 deletion in two intracerebral ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.121: 223-227 (2000)

63. Sainati L, Montaldi A, Putti MC, Giangaspero F, Rigobello L, Stella M, Zanesco L, Basso G. Cytogenetic t(11;17)(q13;q21) in a pediatric ependymoma. Is 11q13 a recurring breakpoint in ependymomas? Cancer Genet Cytogenet.59: 213-216 (1992)
64. Sala F, Talacchi A, Mazza C, Prisco R, Ghimenton C, Bricolo A. Prognostic factors in childhood intracranial ependymomas: the role of age and tumor location. Pediatr Neurosurg.28: 135-142 (1998)
65. Sawyer JR, Miller JP, Ellison DA. Clonal telomeric fusions and chromosome instability in a subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. Cancer Genet Cytogenet.100: 169-175 (1998)
66. Sawyer JR, Crowson ML, Roloson GJ, Chadduck WM. Involvement of the short arm of chromosome 1 in a myxopapillary ependymoma. Cancer Genet Cytogenet.54: 55-60 (1991)
67. Sawyer JR, Sammartino G, Husain M, Boop FA, Chadduck WM. Chromosome aberrations in four ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.74: 132-138 (1994)
68. Scheil S, Bruderlein S, Eicker M, Herms J, Herold-Mende C, Steiner HH, Barth TF, Moller P. Low frequency of chromosomal imbalances in anaplastic ependymomas as detected by comparative genomic hybridization. Brain Pathol.11: 133-143 (2001)
69. Schiffer D, Giordana MT. Prognosis of ependymoma. Childs Nerv Syst.14: 357-361 (1998)
70. Schwartz TH, McCormick PC. Intramedullary ependymomas: clinical presentation, surgical treatment strategies and prognosis. J Neurooncol.47: 211-218 (2000)
71. Singh PK, Gutmann DH, Fuller CE, Newsham IF, Perry A. Differential involvement of protein 4.1 family members DAL-1 and NF2 in intracranial and intraspinal ependymomas. Mod Pathol.15: 526-531 (2002)
72. Slavc I, MacCollin MM, Dunn M, Jones S, Sutton L, Gusella JF, Biegel JA. Exon scanning for mutations of the NF2 gene in pediatric ependymomas, rhabdoid tumors and meningiomas. Int J Cancer.64: 243-247 (1995)
73. Smyth MD, Horn BN, Russo C, Berger MS. Intracranial ependymomas of childhood: current management strategies. Pediatr Neurosurg.33: 138-150 (2000)
74. Stratton MR, Darling J, Lantos PL, Cooper CS, Reeves BR. Cytogenetic abnormalities in human ependymomas. Int J Cancer.44: 579-581 (1989)

75. Teo C, Nakaji P, Symons P, Tobias V, Cohn R, Smee R. Ependymoma. Childs Nerv Syst.19: 270-285 (2003)
76. Thiel G, Losanowa T, Kintzel D, Nisch G, Martin H, Vorpahl K, Witkowski R. Karyotypes in 90 human gliomas. Cancer Genet Cytogenet.58: 109-120 (1992)
77. Tong CY, Zheng PP, Pang JC, Poon WS, Chang AR, Ng HK. Identification of novel regions of allelic loss in ependymomas by high-resolution allelotyping with 384 microsatellite markers. J Neurosurg.95: 9-14 (2001)
78. Vagner-Capodano AM, Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Figarella-Branger D, Lena G, Dufour H, Grisoli F, Choux M. Cytogenetic study of 33 ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.115: 96-99 (1999)
79. Vagner-Capodano AM, Gentet JC, Gambarelli D, Pellissier JF, Gouzien M, Lena G, Genitori L, Choux M, Raybaud C. Cytogenetic studies in 45 pediatric brain tumors. Pediatr Hematol Oncol.9: 223-235 (1992)
80. von Haken MS, White EC, Daneshvar-Shyesther L, Sih S, Choi E, Kalra R, Cogen PH. Molecular genetic analysis of chromosome arm 17p and chromosome arm 22q DNA sequences in sporadic pediatric ependymomas. Genes Chromosomes Cancer.17: 37-44 (1996)
81. Ward S, Harding B, Wilkins P, Harkness W, Hayward R, Darling JL, Thomas DG, Warr T. Gain of 1q and loss of 22 are the most common changes detected by comparative genomic hybridisation in paediatric ependymoma. Genes Chromosomes Cancer.32: 59-66 (2001)
82. Weber G SF, Yang H, Prajda N, Li W. Regulation of signal transduction activity in normal and cancer cells. Anticancer Res.19: 3703-3709 (1999)
83. Weremowicz S, Kupsky WJ, Morton CC, Fletcher JA. Cytogenetic evidence for a chromosome 22 tumor suppressor gene in ependymoma. Cancer Genet Cytogenet.61: 193-196 (1992)
84. Wernicke C, Thiel G, Lozanova T, Vogel S, Kintzel D, Janisch W, Lehmann K, Witkowski R. Involvement of chromosome 22 in ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.79: 173-176 (1995)
85. Willis JS, C; Ironside,JW; Erridge,S; Whittle,IR; Everington,D. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. Neuropathology and Applied Neurobiology.31: 141-149 (2005)
86. www.kinderkrebsregister.de//sasmakros/jbznsz5.html.

87. Yokota T, Tachizawa T, Fukino K, Teramoto A, Kouno J, Matsumoto K, Emi M. A family with spinal anaplastic ependymoma: evidence of loss of chromosome 22q in tumor. J Hum Genet.48: 598-602 (2003)
88. Zheng PP, Pang JC, Hui AB, Ng HK. Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas. Cancer Genet Cytogenet.122: 18-25 (2000)

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Dies gilt ganz besonders für

Herrn Prof. Dr. P. Möller für die Förderung der Arbeit durch sein stetes Interesse und für die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten,

Frau PD Dr. S. Scheil-Bertram für die hervorragende Betreuung, für die Ermunterung meine Ergebnisse öffentlich vorzutragen und dafür, dass sie stets verstand mich zu motivieren,

Frau Yvonne Sauter für Rat und tatkräftige Unterstützung wann immer es ihrer bedufte,

allen Mitarbeitern der Abteilung Pathologie der Universität Ulm für das angenehme Arbeitsklima

dem Graduiertenkolleg „Diagnostische und therapeutische Konzepte in der molekularen Medizin“, das mich mit einem Stipendium unterstützte und mir in zahlreichen Kursen das Erlernen neuer Methoden ermöglichte,

und insbesondere meinen Eltern für die langjährige moralische und finanzielle Unterstützung meines Studiums.