

**Aus der Neurochirurgischen Klinik
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Manfred Westphal**

**Molekulargenetische Veränderungen
auf Chromosom 22
in Ependymomen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

**Uta Heinemann
aus Leipzig**

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am :

13.06.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/ der Vorsitzende:

PD Dr. K. Lamszus

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. C. Hagel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Ependymome.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Lokalisation	2
1.1.3. Histologie	3
1.1.4. Klinik	7
1.1.5. Therapie.....	8
1.1.6. Prognose	9
1.2. Genomische Veränderungen bei Ependymomen	11
1.2.1. Zytogenetische Veränderungen bei Ependymomen.....	11
1.2.2. Molekulargenetische Veränderungen bei Ependymomen....	13
1.2.2.1. Veränderungen des <i>NF2</i> -Gens	13
1.2.2.2. Sonstige molekulargenetische Veränderungen.....	15
1.3. Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Material: Tumor- und Blutproben	19
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. DNA-Extraktion	19
2.2.2. Mikrosatellitenanalyse für LOH 22q.....	20
2.2.2.1. Oligonucleotid-Primer für die Mikrosatellitenanalyse	20
2.2.2.2. Amplifikation und Auftrennung	21

2.2.2.3. Fragmentanalyse.....	23
2.2.3. Mutationsanalyse des <i>NF2</i> -Gens.....	24
2.2.3.1. Oligonucleotid-Primer für TGGE.....	24
2.2.3.2. TGGE-Analyse.....	25
2.3. Statistische Analyse	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Klinisch-pathologische Befunde	28
3.2. Allelverluste auf dem Chromosomenarm 22q	34
3.3. Mutationen des <i>NF2</i> -Gens	39
3.4. Fallanalyse.....	40
4. Diskussion	47
4.1. Mutationen des <i>NF2</i> -Gens bei Ependymomen	48
4.2. LOH 22q bei Ependymomen	51
4.3. Weitere potentielle Tumorsuppressorgene auf 22q.....	52
4.4. Veränderungen auf Chromosomenarm 11q – inverse Assoziation zu LOH 22q	55
4.5. Weitere Kandidatenregionen für tumorrelevante Gene bei Ependymomen	57
4.6. Schlussfolgerung	60
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis.....	64
7. Danksagung	81
8. Lebenslauf.....	82
9. Erklärung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ATRT	atypischer teratoider rhabdoidaler Tumor
Bp	Basenpaare
CD44	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
CGH	comparative genomische Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERM-Proteine	Ezrin-Radixin-Moesin-Proteine
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
LOH	loss of heterozygosity
LWK	Lendenwirbelkörper
MEN1/2	multiple endokrine Neoplasie 1/2 (Erkrankung oder Gen)
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NF1/2	Neurofibromatose 1/2 (Erkrankung oder Gen)
NIH	National Institute of Health
N-Terminus	Aminoterminus
PCR	polymerase chain reaction
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
SSCP	single strand conformation polymorphism
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 -	myxopapilläres Ependymom WHO I°.....	4
Abbildung 2 -	Subependymom WHO I°	5
Abbildung 3 -	Ependymom WHO II°	6
Abbildung 4 -	anaplastisches Ependymom WHO III°	7
Abbildung 5 -	Tumorhäufigkeit nach Lokalisationsverteilung und Alter.....	29
Abbildung 6 -	Assoziation zwischen WHO-Grad und Lokalisation.....	30
Abbildung 7 -	Assoziation zwischen Lokalisation und Sterberate, bezogen auf Patientenzahl.....	33
Abbildung 8a -	Mikrosatellitenanalyse im Tumorgewebe	34
Abbildung 8b -	Mikrosatellitenanalyse im Blut.....	34
Abbildung 9 -	Verteilung Allelverlust auf 22q abhängig von der Lokalisation	35
Abbildung 10 -	Verteilung Allelverlust abhängig vom WHO-Grad bezogen auf n = 52 Tumoren	36
Abbildung 11 -	Histologie Tumor 37.1.....	41
Abbildung 12a -	Mikrosatellitenanalyse für Tumor 37.1, Primer CA3	42
Abbildung 12b -	Mikrosatellitenanalyse für Tumor 37.1, Primer D11S956 und D11S987	42
Abbildung 13 -	Mutationsanalyse MEN1 im Tumor 37.1	43
Abbildung 14 -	Histologie Tumor 37.2	44
Abbildung 15a -	Mikrosatellitenanalyse von Tumor 37.2, Primer CA3	45
Abbildung 15b -	Mikrosatellitenanalyse von Tumor 37.2, Primer D11S956 und D11S987	45
Abbildung 15c -	Mutationsanalyse von Tumor 37.2	46

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 -	Diagnosekriterien für NF2	14
Tabelle 2 -	Oligonucleotid-Primer für Mikrosatellitenanalyse	21
Tabelle 3 -	PCR-Ansatz für die Mikrosatellitenanalyse	22
Tabelle 4 -	PCR-Programm für die Mikrosatellitenanalyse.....	22
Tabelle 5 -	Oligonucleotidprimer für TGGE	25
Tabelle 6 -	PCR-Programm für die Mutationsanalyse.....	26
Tabelle 7 -	Patientendaten.....	31
Tabelle 8 -	Loss of Heterozygosity (LOH)	37
Tabelle 9 -	<i>NF 2</i> -Genmutationen bei intramedullär spinalen Ependymomen ...	39

1. Einleitung

1.1. Ependymome

Ependymale Tumoren umfassen ein weites klinisches und histologisches Spektrum an intrakraniellen und spinalen Neoplasien. Diese Tumorentität wurde das erste Mal von Virchow (1863) beschrieben. Muthmann und Sauerbeck (1903) konnten später den Nachweis erbringen, dass das Ependym das Ursprungsgewebe dieser Raumforderungen darstellt. Das Ependym bildet die innere Auskleidung der Ventrikelräume sowie des Zentralkanals des Zentralnervensystems (ZNS). Ependymome sind primäre Hirntumoren aus neoplastischen ependymalen Zellen. Sie werden zur Gruppe der Gliome gerechnet, die den größten Teil der neuroepithelialen Tumoren bilden. Hierzu gehören neben den in der vorliegenden Studie untersuchten Ependymomen außerdem astrocytäre und oligodendrogliale Hirntumoren (Kleihues et al. 1993).

1.1.1. Epidemiologie

Ependymale Neoplasien gehören zu den seltenen Hirntumoren. Sie bilden mit 3-5% nur einen kleinen Teil aller ZNS-Tumoren. Dabei ist der Anteil von Ependymomen in spinaler Lokalisation mit 10-15% aller spinalen Tumoren jedoch wesentlich höher. Noch deutlicher wird die besondere Bedeutung von Ependymomen insbesondere unter Tumoren des Rückenmarks, wenn man nur die Gliome betrachtet: Unter den intraspinal lokalisierten glialen Tumoren stellen die Ependymome mit 60% die größte Gruppe dar. Innerhalb der intrakraniell lokalisierten Gliome haben sie dagegen nur einen Anteil von 5-6% (Sutton et al. 1991).

Grundsätzlich sind Ependymome in allen Altersgruppen anzutreffen (Duncan et al. 1995). Unter den Hirntumoren im Kindesalter nehmen sie dabei einen vergleichsweise hohen Anteil von 9% ein (Hamilton et al. 1997) und sind damit nach Astrocytomen und Medulloblastomen die dritthäufigste ZNS-Neoplasie bei Kindern (Hamilton et al. 1997, Kleihues et al. 1993, Russell et al. 1989). Dabei ist das Risiko für das Auftreten eines Ependymoms mit zunehmendem Alter geringer, da etwa ein Drittel der kindlichen Ependymome bereits vor dem dritten Lebensjahr auftritt, und nur noch 40% nach Erreichen des fünften Lebensjahres (Heideman et al. 1997). Da 90% der pädiatrischen Ependymome intrakraniell lokalisiert sind, hat insbesondere diese Untergruppe als

häufigstes Gliom der Großhirnhemisphären bei Kindern eine große Bedeutung (Nazar et al. 1990, Pollack et al. 1994, Gilles et al. 1995). Diese Bedeutung wird auch durch eine relativ niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von 34-45% (Ward et al. 2001) unterstrichen. Denn obwohl 70% der kindlichen Ependymome benigne sind, gelten sie insgesamt doch als aggressiver als Ependymome bei Erwachsenen. Bei Erwachsenen nimmt die Inzidenz von Ependymomen mit zunehmendem Alter ab. Bei Greisen treten diese Tumoren nur noch in Einzelfällen auf.

1.1.2. Lokalisation

Da Ependymome Neoplasien des ependymalen Gewebes sind, richtet sich auch die Lokalisation der Tumoren weitgehend nach der Verteilung des ependymalen Gewebes und seiner Abkömmlinge im zentralen Nervensystem (ZNS). Diesbezüglich differenziert man zwischen cerebraler und spinaler Lokalisation.

Innerhalb der cerebralen Ependymome ist eine bevorzugte Lokalisation infratentoriell am Boden des vierten Ventrikels. Supratentoriell dagegen finden sie sich in der Regel entlang der Auskleidung der Seitenventrikel. Supratentorielle Ependymome können aber auch weiter oberflächlich lokalisiert sein, so dass eine kontinuierliche Verbindung zum ependymalen Gewebe nicht unbedingt erkennbar wird. Diese seltenen intracerebralen Ependymome stammen vermutlich von ependymalen Geweberesten ab, die im Rahmen der embryonalen Ausbildung des Gehirns nicht in der vorgesehenen Lokalisation verblieben sind.

Intrakranielle ependymale Neoplasien sind insbesondere bei Kindern von Bedeutung, wo sie 90% aller Ependymome ausmachen. Bei Erwachsenen dagegen befindet sich der Großteil von 60% der Tumoren entlang des Spinalkanals im Rückenmark und Filum terminale (Hamilton et al. 1997, Mork et al. 1977, West et al. 1985, Read 1984, Schiffer et al. 1991). Spinale Ependymome finden sich am häufigsten in der lumbosacralen Region des Konus und Filum terminale (Prayson et al. 1999). Laut Literatur sind Ependymome nach niedriggradigen Astrocytomen die zweithäufigste Neoplasie unter den intramedullär spinalen Tumoren (Brotchi et al. 1991). Im Kollektiv der Neurochirurgischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf zwischen 1984 und 1998 bildeten Ependymome sogar die häufigste Tumorentität mit 44% unter 203

intramedullär spinalen Tumoren, gefolgt von benignen Astrocytomen mit 16% sowie Hämangioblastomen mit 11%.

1.1.3. Histologie

Die World Health Organisation (WHO) differenziert histologisch vier Haupttypen ependymaler Tumoren: Das myxopapilläre Ependymom (WHO Grad I), das Subependymom (WHO Grad I), das Ependymom (WHO Grad II) sowie das anaplastische Ependymom (WHO Grad III) (Wiestler et al. 2000, Hamilton et al. 1997, Kleihues et al. 1993).

Myxopapilläre Ependymome werden dem WHO Grad I zugeordnet und sind durch kubische bis längliche Tumorzellen charakterisiert, die strahlenförmig um vaskularisiertes Bindegewebe angeordnet sind. Zwischen den Tumorzellen ist muzinöses Material eingelagert. Daneben finden sich Mikrozysten. Eine Mitoseaktivität fehlt entweder völlig oder ist nur in geringem Maße vorhanden. Makroskopisch sind myxopapilläre Ependymome gut begrenzt. Sie sind vorwiegend im Filum terminale lokalisiert. Bei Kindern treten sie sehr selten auf (Abbildung 1).

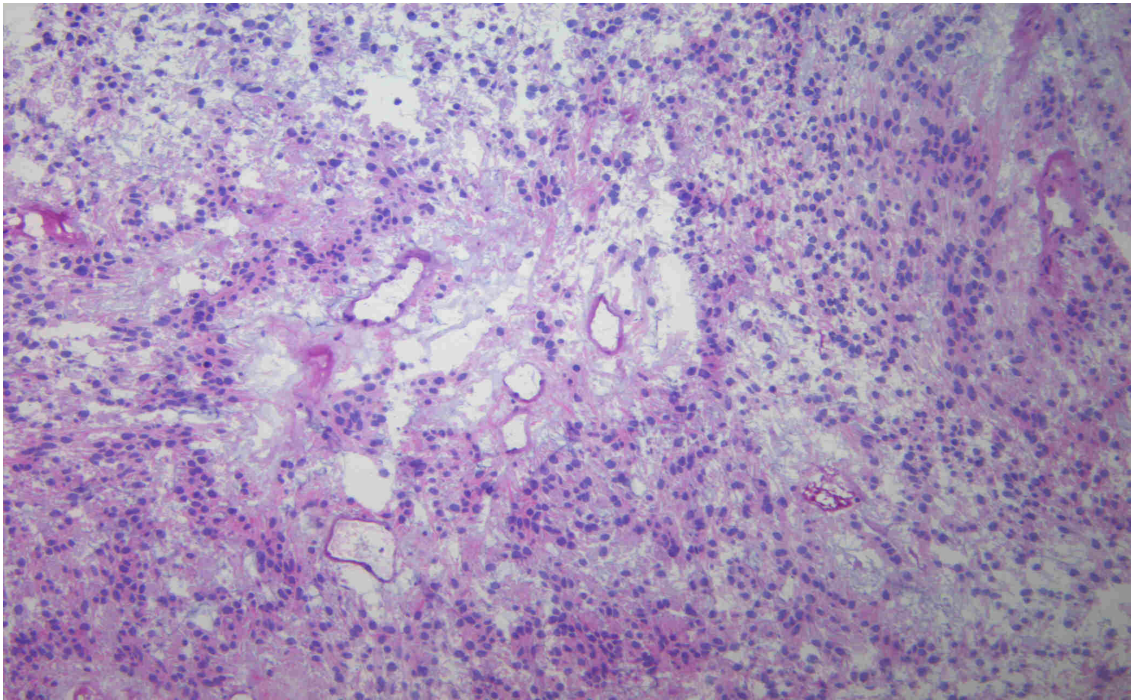


Abbildung 1 – Myxopapilläres Ependymom WHO I°
Gliale Zellen in myxoider Matrix, Pseudorosetten

Subependymome werden dem WHO Grad I zugeordnet und wachsen meist intra- oder periventriculär, nur gelegentlich im Rückenmark. Histologisch fällt eine niedrige Zelldichte auf. Die Zellkerne liegen gruppiert in einer dichten fibrillären Matrix aus Gliazellfortsätzen. Es finden sich isomorphe Perikaryen, die denen gesunder Ependymzellen ähneln. Weiterhin finden sich auch kleine, teils konfluierende Zysten. Gelegentlich treten Kalzifikationen und Hämorrhagien sowie mikrovaskuläre Proliferationen auf. Makroskopisch ist auch dieser Tumortyp gut begrenzt. Häufig werden Subependymome inzidentiell bei Autopsien entdeckt, bei entsprechendem Größenwachstum können sie allerdings auch symptomatisch werden (Abbildung 2).

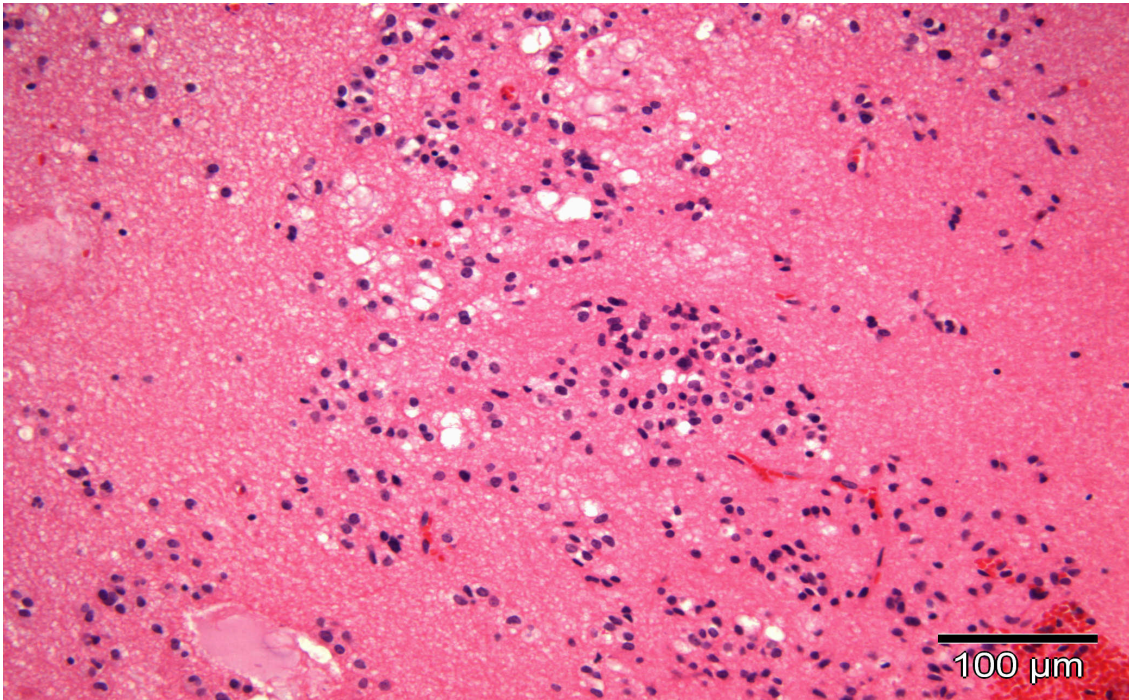


Abbildung 2 – Subependymom WHO I°
Zellularer Tumor, Tumorzellen in Gruppen gelagert

Das eigentliche Ependymom wird dem WHO Grad II zugeordnet. Es ist makroskopisch gut begrenzt. Histologisch ist es mittelgradig zellreich mit monomorphen Zellkernen und nur geringer Mitoseaktivität. Charakteristisch sind perivaskuläre Pseudorosetten. Daneben findet man auch echte ependymale Rosetten und ependymale Kanäle bzw. Tubuli, größere epitheliale Strukturen. Dazwischen liegen zelldichtere Areale, innerhalb derer sphärische bzw. ovoide Zellkerne mit feinem Chromatin liegen. Selten findet man nicht-palisadenförmige Nekroseherde. Histologische Varianten sind zelluläre, epitheliale, papilläre, tanycytische und Klarzellependymome (Burger et al. 1994). Spinale Ependymome sind typischerweise diskrete intramedulläre Massen, häufig assoziiert mit einer Zyste oder Syrinx. Gut differenzierte Ependymome wurden in der Vergangenheit auch als Grad I Neoplasien klassifiziert (Rubinstein et al. 1972), aufgrund der bekannten Neigung zu Rezidiven zählt die WHO sie aber heute zu Grad II Tumoren (Kleihues et al. 2000) (Abbildung 3).

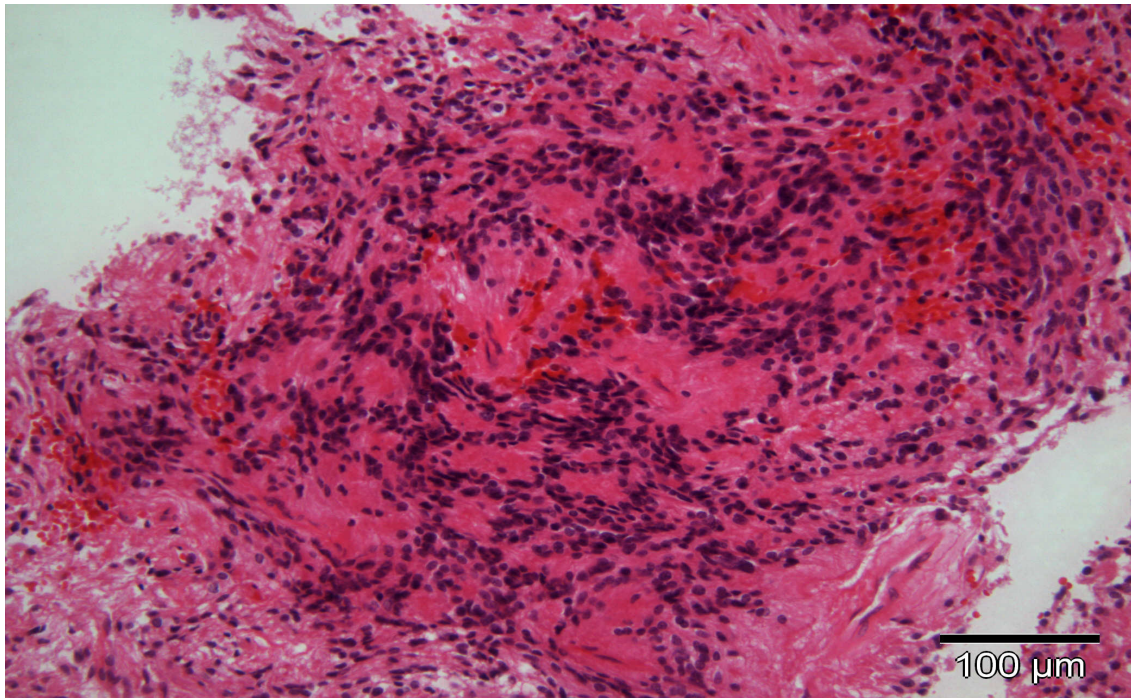


Abbildung 3 – Ependymom WHO II°

Pseudorosetten und echte Rosetten, zelldichte Areale

Die aktuelle WHO-Klassifikation beschreibt anaplastische, d. h. maligne Ependymome als Grad III-Tumoren. Sie zeigen eine erhöhte Zellteilungsaktivität. So findet man häufig Mitosefiguren, mikrovaskuläre Proliferationen und pseudopalisadenförmige Nekrosen. Auch hier treten perivaskuläre Pseudorosetten auf, dagegen kaum ependymale Rosetten. Daneben finden sich die histologischen Zeichen der Malignität wie erhöhte Zelldichte, Kernpolymorphie und Entdifferenzierung. Die Tumoren zeigen zelldichte homogene Areale mit vergrößerten Zellen, Verlust der Zytoplasmfortsätze und einer vergrößerten Kern-Plasma-Relation, teilweise auch Nucleoli (Ross et al. 1989). Invasives Wachstum tritt bei anaplastischen Ependymomen nicht regelhaft, aber gehäuft auf (Wiestler et al. 2000). Allgemein sind Ependymome langsam wachsende Tumoren, allerdings können anaplastische Formen auch ein rapides Wachstum aufweisen (Abbildung 4).

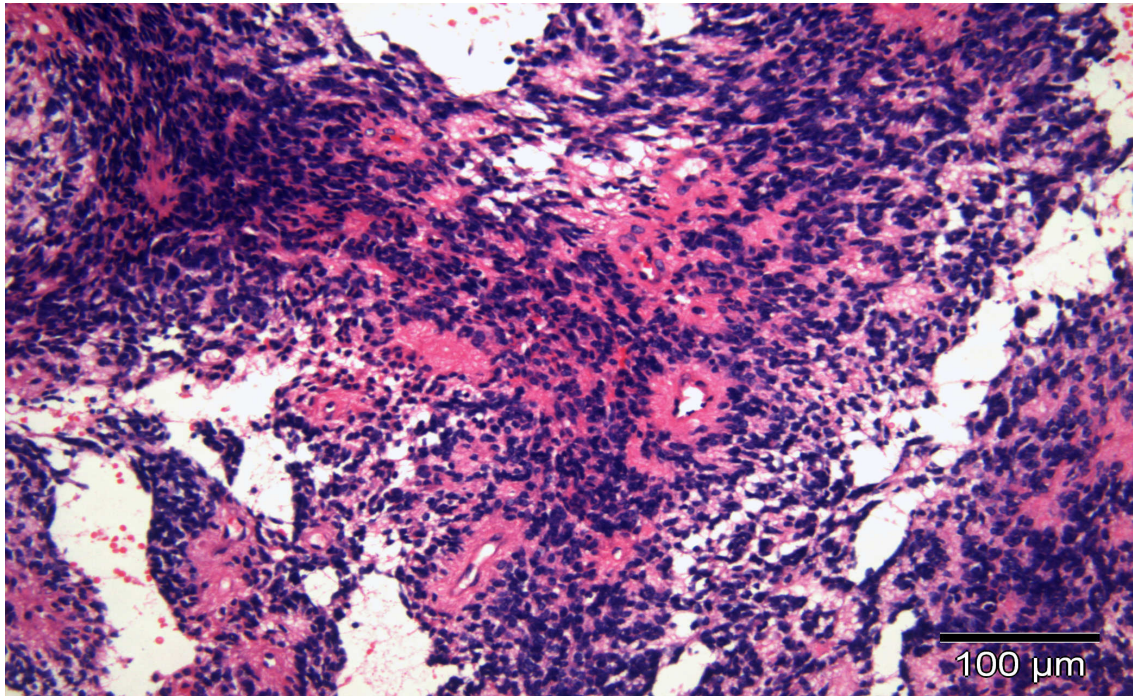


Abbildung 4 – Anaplastisches Ependymom WHO III°
Erhöhte Zelldichte, Pseudorosetten, Zellatypien.

Rubinstein prägte 1972 den Begriff des Ependymoblastoms als Synonym für maligne Ependymome (Rubinstein et al. 1972). Heute werden Ependymoblastome jedoch als Unterform der primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) klassifiziert und einer Grad IV Neoplasie zugeordnet. Sie sind eine sehr seltene Tumorentität, die fast ausschließlich supratentoriell bei Säuglingen auftritt (Rorke et al. 1985, Kleihues et al. 1993, Burger et al. 1994).

1.1.4. Klinik

Die klinische Symptomatik der Ependymome richtet sich vorwiegend nach der Tumorlokalisierung. So sind für intrakranielle Ependymome vor allem Zeichen der intrakraniellen Druckerhöhung beschrieben, die eher durch die Behinderung des Liquorflusses bedingt sind, als durch die eigentliche raumfordernde Wirkung der Tumoren. Dazu gehören Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Somnolenz bis hin zur Stauungspapille bei Ausbildung eines Hydrocephalus. Infratentorielle Tumoren

beeinträchtigen zusätzlich die Funktion des Cerebellums, so dass häufig auch Ataxien, Gangstörungen oder ein Nystagmus beschrieben sind (Lyons et al. 1991). Supratentoriell gelegene Tumoren dagegen treten eher assoziiert mit Pyramidenbahnzeichen, Krampfanfällen und Sehstörungen auf. Etwa ein Drittel aller Patienten mit intrakraniellen Ependymomen leidet unter Krampfanfällen (Healey et al. 1991), die auch bei anderen intrakraniellen Gliomen ein häufiges Erstsymptom sind. Bei Kindern kann es weiterhin zur Verzögerung der Entwicklung kommen, insbesondere der motorischen Fähigkeiten. Makroskopisch können sich Schwellungen am Schädel bzw. eine Zunahme des Kopfumfanges oder Knochendefekte bemerkbar machen (Russell et al. 1989, Sutton et al. 1990, de Vita et al. 1982).

Spinale Tumoren machen sich vorwiegend durch Schmerzen bemerkbar, weiterhin durch Paresen, Sensibilitätsstörungen und Miktionsbeschwerden entsprechend den betroffenen Segmenten (Lonjon et al. 1998).

1.1.5. Therapie

Die Therapie der Wahl bei Ependymomen ist zunächst die operative Entfernung, soweit Größe und Lokalisation dies zulassen. Das weitere Vorgehen unterscheidet sich deutlich zwischen intrakraniellen und spinalen Tumoren.

Bei intrakraniellen Tumoren spielt die histologische Klassifikation für die Therapieentscheidung eine grundlegende Rolle. Bei Ependymomen WHO Grad I wird nicht zu einer postoperativen Bestrahlung geraten. Bei anaplastischen Tumoren WHO Grad III dagegen folgt auf die operative Entfernung des Tumors eine Strahlentherapie. Weniger eindeutig fallen die Empfehlungen für Ependymome WHO Grad II aus. Es wird hier nicht generell zu einer adjuvanten Strahlentherapie geraten. Für diese Subgruppe gelten von Klinik zu Klinik unterschiedliche Vorgehensweisen. Zusätzliche Unsicherheit birgt hierbei auch die Frage nach dem idealen Bestrahlungsfeld. Obwohl mehrere Studien den Erfolg einer postoperativen Bestrahlung allgemein postulieren (Pollack et al. 1995, Goldwein et al. 1990, Ernestus et al. 1989), gibt es keine eindeutigen Studien, die eine Aussage über das wirkungsvollste und dabei schonendste Bestrahlungsfeld erlauben. Diskutiert wird eine Bestrahlung lokal im Gebiet des Tumors, cerebral oder sogar cerebrospinal, um eine weitere Ausbreitung entlang des

Liquorkanals zu verhindern. Bei Kindern unter drei Jahren gelten die kognitiven und neuroendokrinen Nebenwirkungen einer Bestrahlung jedoch als so gravierend, dass von einer postoperativen Bestrahlung generell abgeraten wird. Auch bei adulten Patienten wird in den meisten Zentren bei Ependymomen WHO Grad II von einer Bestrahlung abgesehen.

Bei spinalen Tumoren ist ein Rezidiv selten, so dass meistens nach einer totalen Resektion des Tumors keine weitere adjuvante Therapie notwendig ist (McLaughlin et al. 1998, Asazuma et al. 1999). Auch hier unterscheidet man zwischen benignen und malignen Ependymomen. Histologisch gutartige Ependymome werden nicht bestrahlt, bei WHO Grad III Tumoren dagegen ist das Vorgehen umstritten. Die klinische Praxis zeigt eine Tendenz hin zur postoperativen Bestrahlung.

Studien über den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie bei Ependymomen konnten bislang keinen Erfolg nachweisen (Duffner et al. 1993, Evans et al. 1996), so dass diese Therapieform noch nicht in das Behandlungskonzept bei Ependymomen Eingang gefunden hat.

1.1.6. Prognose

Das Ausmaß der Resektion gilt als wichtigster prognostischer Faktor für Ependymompatienten, da bei unvollständiger Resektion ein lokales Rezidiv zu erwarten ist. Nach operativer Entfernung ist die Prognose von Subependymomen und myxopapillären Ependymomen sehr gut, da sie sehr selten rezidivieren. Eine Ausnahme davon bilden die extrem seltenen, außerhalb des ZNS im perisakralen Weichteilgewebe lokalisierten myxopapillären Ependymome. Bei dieser Untergruppe treten signifikant gehäuft Fernmetastasen auf (King et al. 1993).

Verschiedene Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Aussagekraft standardisierter histologischer Parameter für die Prognose (Robertson et al. 1998, Pollack et al. 1995). In einigen Studien hatte der histologische Grad des Tumors prognostische Signifikanz (Afra et al. 1983, Nazar et al. 1990, Ernestus et al. 1996), während andere Studien keine prognostische Relevanz für anaplastische Eigenschaften feststellen konnten (Pollack et al. 1997, Lyons et al. 1991, Mork et al. 1977). Die

meisten Studien konnten bei anaplastischen Tumoren zwar eine Tendenz für einen schlechteren Krankheitsverlauf erkennen, waren jedoch nicht in der Lage, statistische Signifikanz zu erreichen (Gerszten et al. 1996, Rousseau et al. 1994, Dohrmann et al. 1976). Die gleichen Probleme traten auf, wenn die Studien auf einzelne histologische Kriterien fokussiert wurden wie z. B. Nekrosen (Gerszten et al. 1996) oder Mitosen (Schiffer et al. 1991, Healey et al. 1991). Ross und Rubinstein untersuchten 15 Fälle anaplastischer Ependymome (Ross et al. 1989) und fanden eine 5-Jahres-Überlebensrate von 58%, die sich nicht signifikant von der Prognose differenzierter Ependymome unterschied. Daraus schlossen sie, dass histologische Kriterien kein Anhalt für klinisch malignes Verhalten des Tumors sind.

Neben dem WHO-Grad prägen noch weitere Faktoren den klinischen Verlauf von Patienten mit Ependymomen, wie das Patientenalter bei Diagnosestellung und die Tumorlokalisation (Lyons et al. 1991, Robertson et al. 1998, Pollack et al. 1995, Sala et al. 1998). Erwachsene Patienten mit Ependymomen haben in der Regel eine bessere Prognose als Kinder unter 16 Jahren mit histopathologisch vergleichbaren Tumoren (Afra et al. 1983, Read et al. 1984, Ferrante et al. 1994), insbesondere ist die Prognose bei Kindern unter vier Jahren schlechter (Lyons et al. 1991, Pollack et al. 1995, Sala et al. 1998, Healey et al. 1991). Patienten, bei denen der Tumor vor dem vierten Lebensjahr diagnostiziert wird, haben eine sehr hohe Rezidivneigung, so dass nur 0-12% in den folgenden fünf Jahren tumorfrei bleiben. Bei Erwachsenen liegt dieser Prozentsatz dagegen bei ca. 60% (Healey et al. 1991). Ependymomrezidive treten vorwiegend in der Lokalisation des Primärtumors auf, nur selten kommt es zur cerebrospinalen Streuung entsprechend des Liquorabflusses. Letzteres sieht man gehäuft bei Kleinkindern, die Ursachen dafür sind bislang noch unklar (Pollack et al. 1995). Die schlechtere Prognose bei Kindern mag in Zusammenhang stehen mit der höheren Inzidenz von Tumoren in der Fossa posterior, einer höheren Operationsmortalität und weniger aggressiven Bestrahlungsbehandlungen der ganz jungen Patienten. Doch auch unabhängig von diesen Faktoren scheinen pädiatrische Tumoren aggressiver zu sein.

Die Lokalisation des Tumors ist prognostisch ebenfalls von großer Bedeutung. So haben spinale Tumoren eine bessere Prognose als intrakranielle Ependymome des gleichen WHO-Grades (Mork et al. 1977, Rawlings et al. 1988). Auch innerhalb der

Gruppe der intrakraniellen Ependymome lassen sich Unterschiede in der Prognose finden. So weisen supratentorielle Tumoren tendenziell eine bessere Überlebensrate als infratentorielle Tumoren auf (Dohrmann et al. 1976, Ernestus et al. 1996, Shuman et al. 1975). Weiterhin wurde beobachtet, dass infratentorielle Tumoren, besonders anaplastische, öfter eine Streuung in der Leptomeninx über den Liquor aufweisen (Lyons et al. 1991).

Da die Wertung des histologischen Grades eines Ependymoms für Aussagen über die Prognose umstritten ist, versucht man, neue Vorhersagefaktoren zu bestimmen. So wurde in neueren Studien die Proliferationsaktivität untersucht. Der monoklonale Antikörper MIB-1 reagiert spezifisch mit dem Proliferationsantigen Ki-67. Dieses Antigen wird in allen Phasen des Zellzyklus außer der G₀-Phase exprimiert. Somit kann eine Immunreaktivität für Ki-67 als Indikator für die proliferative Aktivität der Tumorzellen betrachtet werden. Schroder et al. fanden 1993 einen signifikanten Unterschied der MIB-1-Indices bei anaplastischen versus niedriggradigen spinalen Ependymomen. Jedoch konnte hierbei kein signifikanter Einfluss auf die Prognose gefunden werden (Schröder et al. 1993).

1998 postulierten Ritter et al. eine Kombination verschiedener Faktoren als prognostisch ungünstig (Ritter et al. 1998). Hierzu gehörte ein junges Alter bei Diagnosestellung, ein MIB-1-Proliferationsindex >20% und das Auftreten mindestens dreier histologisch anaplastischer Merkmale (Nekrose, Mitose, vaskuläre Proliferation, zelluläre Pleomorphie, gelappte Zellkerne). Möglicherweise werden auch in Zukunft solche Kombinationen von Merkmalen am ehesten eine genaue Aussage über die zu erwartende Prognose erlauben, nachdem sich Einzelmerkmale in der Vergangenheit nicht als prädiktiv erwiesen haben.

1.2. Genomische Veränderungen bei Ependymomen

1.2.1. Zytogenetische Veränderungen bei Ependymomen

Hirntumoren treten sehr selten in familiärer Häufung auf. Einige familiäre Syndrome sind mit cerebralen Tumoren assoziiert, so z.B. die Neurofibromatose Typ 2 (Gliome, Meningeome, Hirnnerventumoren), die tuberöse Sklerose (Gliome) oder die familiäre Polyposis coli. Daneben treten Hirntumoren selten aber auch in familiärer Häufung auf,

ohne dass eine erkennbare Assoziation zu einem bekannten Syndrom besteht. Ein Risiko für familiäres Auftreten konnten Hemminki et al. 2004 in einer großen schwedischen Studie besonders für Meningeome, Astrocytome und Hämangioblastome nachweisen (Hemminki 2004). Daher werden genetische Faktoren diskutiert, die für ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Hirntumoren innerhalb von Familien verantwortlich sind. Bis 1988 wurde allerdings nur von neun Familien mit gehäuft aufgetretenen Ependymomen berichtet (Russell et al. 1989).

Bei den meisten Ependymomen lassen sich zytogenetische Veränderungen nachweisen. Lediglich 34-45% der Ependymome bleiben bei zytogenetischen Untersuchungen unauffällig und weisen einen normalen Karyotyp auf (Mazewski et al. 1999, Kramer et al. 1998, Ward et al. 2001). Die bislang nachgewiesenen zytogenetischen Veränderungen sind sehr komplex und betreffen zahlreiche chromosomale Lokalisationen. Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Komplexität des Karyotyps und einer schlechteren Überlebensrate hergestellt werden. So scheint der Karyotyp weder eine Assoziation mit dem klinischen Auftreten (Alter, Lokalisation, Malignitätsgrad) noch mit dem progressionsfreien Intervall zu haben (Reardon et al. 1999). Wenn karyotypische Veränderungen jedoch gemeinsam mit histologisch anaplastischen Eigenschaften des Tumors auftreten, ergibt sich eine verstärkte Neigung zur Entstehung von Rezidiven (Mazewski et al. 1999).

Bei etwa 50–60% aller ependymalen Tumoren wurden Veränderungen des Chromosoms 22 gefunden, darunter vorwiegend Monosomien in bis zu 40% der untersuchten Fälle (Jenkins et al. 1989, Stratton et al. 1989, Bigner et al. 1990, Ransom et al. 1992, Sainati et al. 1992, Bijlsma et al. 1995, von Haken et al. 1996, Weremowicz et al. 1992, Mazewski et al. 1999, James et al. 1990, Reardon et al. 1999, Wernicke et al. 1995). Die Monosomie des Chromosoms 22 zählt damit zu den häufigsten Veränderungen bei Ependymomen. Veränderungen des Chromosoms 22 wurden aber auch bei anderen Hirntumoren wie sporadischen Schwannomen des N. acusticus, bilateralen Schwannomen des N. acusticus, Meningeomen (Dumanski et al. 1990) und atypischen teratoiden rhabdoidalen Tumoren (ATRT) (Biegel et al. 1990, Douglass 1989, Karnes et al. 1991) nachgewiesen. Daneben fanden sich diese Veränderungen auch bei Tumoren anderer Organsysteme, wie z. B. Retinoblastomen und Wilms-Tumoren (Seizinger et al. 1986).

Die übrigen bislang bekannten chromosomalen Veränderungen sind heterogen. Zu den bereits häufiger nachgewiesenen Veränderungen zählen Alterationen der Chromosomen 10, 6 und 17, seltener dagegen der Chromosomen 11, 7, 13 und 16. In Einzelfällen ließen sich auch Veränderungen auf den Chromosomen 5, 9, 12, 19, 20 nachweisen. Ob diese chromosomalen Veränderungen nur zufällige Veränderungen sind oder eine kausale Rolle in der Pathogenese von Ependymomen spielen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

1.2.2. Molekulargenetische Veränderungen bei Ependymomen

1.2.2.1. Veränderungen des *NF2*-Gens

Mutationen des *NF2*-Gens sind der typische Gendefekt bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 (NF 2). Diese Patienten haben eine Prädisposition für ependymale Tumoren, und zwar insbesondere für intramedullär spinal lokalisierte Ependymome (Ruttledge et al. 1994, Martuza et al. 1988). Die NF 2 ist eine neurokutane Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 1:37000 auftritt. Sie ist vor allem durch uni- und bilaterale Akustikusschwannome charakterisiert, es finden sich daneben aber auch Schwannome anderer Hirnnerven sowie Meningeome und Astrocytome (Martuza et al. 1988). Neben dem Auftreten typischer Tumoren werden auch juvenile posteriore subkapsuläre Katarakte relativ häufig beobachtet. Seltener dagegen findet man die für die Neurofibromatose Typ 1 (NF 1) typischen Neurofibrome, die dann bevorzugt an den paraspinalen dorsalen Nervenwurzeln auftreten (Riccardi 1989). Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die aktuell geltenden Kriterien zur Stellung der Diagnose einer NF 2:

Die Diagnose einer NF 2 kann gestellt werden, wenn bei dem Patienten eine der drei folgenden Konstellationen vorliegt:

1. Bilaterale vestibuläre Schwannome; **oder**
2. ein Verwandter ersten Grades mit NF 2 und bei dem Patienten entweder
 - a. ein unilaterales vestibuläres Schwannom **oder**
 - b. zwei der folgenden Veränderungen:
 - Schwannom
 - Meningeom
 - Neurofibrom
 - Gliom (darunter besonders spinale Ependymome)
 - cerebrale Verkalkungen
 - Juveniler posteriorer subkapsulärer Katarakt **oder**
3. zwei der folgenden Veränderungen
 - a. unilaterales vestibuläres Schwannom
 - b. multiple Meningeome
 - c. Schwannom, Gliom, Neurofibrom, juveniler posteriorer subkapsulärer Katarakt, cerebrale Verkalkungen

Tabelle 1 – Diagnosekriterien für NF 2

Das *NF2*-Gen ist auf dem Chromosom 22 in der Region 22q12 lokalisiert (Trofatter et al. 1993, Rouleau et al. 1993). Das durch das *NF2*-Gen codierte Genprodukt Merlin (Trofatter et al. 1993), das auch als Schwannomin (Rouleau et al. 1993) bezeichnet wird, ist strukturell mit den Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) - Proteinen verwandt (Rouleau et al. 1993, Trofatter et al. 1993). Diese Proteine verbinden das Zytoskelett mit Membranproteinen (Luna et al. 1992, Sato et al. 1992). Daneben interagieren sie mit Signalmolekülen des Zytoplasmas (Bretscher et al. 2002). Diese gemeinsame Funktion schlägt sich auch in der sehr ähnlichen Struktur aller Proteine dieser Gruppe nieder. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie enthalten eine homologe Domäne von ~200 Aminosäuren nahe dem N-Terminus, gefolgt von einem Segment mit vorwiegend α -helicaler Struktur, das bei Merlin eine Länge von ungefähr 160–170 Aminosäuren hat. Dabei bindet der N-Terminus an Integrine und die α -Helix an Komponenten des Zytoskeletts (Gould et al. 1989, Yang et al. 1991, Rees et al. 1990). Die strukturelle

Ähnlichkeit von Merlin mit den anderen Proteinen dieser Gruppe deutet auch auf eine ähnliche Funktion hin. Normalerweise hat Merlin eine vergleichbare Funktion wie Protein 4.1, das als Verbindung zwischen transmembranösen Glykoproteinen und dem Spectrin-Actin-Komplex dient. Innerhalb der Zelle ist Merlin in der Umgebung der Actin-Komplexe lokalisiert. Durch verschiedene Moleküle wie den Transmembran-Rezeptor CD44, Signalmoleküle wie HRS (Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate) und zytoskelettale Proteine wie Actin und beta-II-Spectrin werden die Interaktionen von Merlin reguliert (Bretscher et al. 2002, Gronholm et al. 1999, Gonzalez-Agosti et al. 1999). Wenn beide codierenden Allele für Merlin ausfallen, kommt es zur Bildung von Schwannomen und Meningeomen im Rahmen der NF 2. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden bereits in verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen und gelten als sehr konserviert. Genmutationen dieser Proteine können verschiedene Effekte auf Formgebung, Zellteilung, Bewegung und Zellkommunikation haben, die insgesamt zu gestörtem Zellwachstum und damit zur Tumorbildung führen können (Trafatter et al. 1993).

1.2.2.2. Sonstige molekulargenetische Veränderungen

Ependymome unterscheiden sich von anderen Gliomen vergleichbarer histologischer WHO-Grade insbesondere hinsichtlich der deutlich besseren Prognose. Erhebliche Unterschiede ergeben sich auch auf molekulargenetischer Ebene.

Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* auf Chromosom 17 gehören zu den am häufigsten untersuchten Veränderungen bei der Entstehung von Tumoren unterschiedlichster Genese. Auch bei einer Untergruppe der glialen Tumoren, den Astrocytomen, lassen sich in 65% der untersuchten Tumoren Mutationen dieses Gens nachweisen (Kleihues et al. 1999). Dagegen konnte man diese Veränderungen nur extrem selten bei Ependymomen nachweisen, so dass man nicht davon ausgeht, dass *p53* in die Tumorigenese von Ependymomen entscheidend involviert ist (Bijlsma et al. 1995, Fink et al. 1996, von Haken et al. 1996, Metzger et al. 1991, Ohgaki et al. 1991, Rutledge et al. 1994, Tominaga et al. 1995). Zytogenetische Untersuchungen des Chromosoms 17 fanden dagegen Hinweise auf eine Rolle in der Tumorentstehung von Ependymomen. Zehn Fälle mit Monosomie 17 wurden beschrieben, fünf dieser Tumoren traten bei Kindern auf (Griffin et al. 1992, Ransom et al. 1992, Rogatto et al.

1993, Stratton et al. 1989, Wernicke et al. 1995). Die Hälfte der zehn Tumoren war anaplastisch, davon fanden sich wiederum drei Tumoren bei Kindern. Von Haken et al. konnten in einer Studie 1996 an 18 pädiatrischen Ependymomen in 50% der Fälle eine Monosomie des Chromosoms 17 nachweisen (von Haken et al. 1996). Zheng et al. konnten diese Frequenz 2000 in einer Studie an 28 Ependymomen mittels CGH-Analyse mit annähernd 46% bestätigen (Zheng et al. 2000). Somit werden auf Chromosom 17 andere Loci als möglicherweise ursächlich beteiligt an der Entstehung von Ependymomen vermutet.

In insgesamt 133 untersuchten Ependymomen konnten verschiedene zytogenetische Studien bei nur 23 Tumoren Veränderungen von Chromosom 10 detektieren (James et al. 1990, Venter et al. 1991, Karlbom et al. 1993, Rasheed et al. 1994). Karyotypische Untersuchungen an diesen 133 Ependymomen fanden fünf Tumoren mit einem Verlust des Chromosoms 10 (Griffin et al. 1992, Ransom et al. 1992, Wernicke et al. 1995, Sawyer et al. 1994). Mehr als zwei Kopien des Chromosoms 10 wurden bei lediglich drei Ependymomen in 133 Tumoren beobachtet (Rogatto et al. 1993, Sawyer et al. 1994). Insgesamt wurde ein LOH eines Chromosomenarms bei 10 von 85 untersuchten Tumoren gesehen, wovon der überwiegende Anteil einen LOH 10q mit sieben dargestellten Fällen aufwies (Ransom et al. 1992, Bijlsma et al. 1995, Ebert et al. 1999). Somit ist eine Involvierung des Chromosoms 10 in die Pathogenese von Ependymomen durchaus wahrscheinlich, wobei die oben genannten Untersuchungen ein Tumorsuppressorgen auf dem Chromosomenarm 10q nahe legten. Bei allen Mutationsanalysen an 67 Ependymomen konnten bislang jedoch nur fünf Mutationen nachgewiesen werden. Vier davon betrafen den Chromosomenarm 10p mit jeweils zwei Deletionen im Bereich 10p13 sowie Translokationen im Bereich 10p12 (Rogatto et al. 1993, Sawyer et al. 1994, DalCin et al. 1988). Die einzige nachgewiesene Alteration auf dem Chromosomenarm 10q war eine Addition im Bereich 10q24 (Rogatto et al. 1993). Eine gezielte Untersuchung von 62 Ependymomen auf Mutationen des auf 10q23 lokalisierten *PTEN*-Gens konnte keine Mutation nachweisen. Somit scheinen eventuell andere, bislang unbekannte Tumorsuppressorgene auf Chromosom 10 bei der Pathogenese von Ependymomen beteiligt zu sein.

Bei Glioblastomen lassen sich in 40% der Fälle Veränderungen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGFR nachweisen. EGFR wird durch das Protoonkogen

c-erbB1 auf Chromosom 7 codiert. Die bei Glioblastomen nachgewiesenen Veränderungen von *c-erbB1* sind vorwiegend Amplifikationen. Eine Untersuchung von 17 Ependymomen konnte jedoch keinen Nachweis einer entsprechenden Veränderung bei dieser Tumorentität erbringen (Bijlsma et al. 1995). Außerdem sind bei Astrocytomen und Oligodendrogliomen gehäuft Gene von Alterationen betroffen, die für die Zellzykluskontrolle relevant sind. Hierzu gehören Faktoren des Regelkreises der cyclinabhängigen Kinase (CDK) 4. Die CDK 4 ist ebenso wie Cyclin D1 an der Inaktivierung des RB-Tumorsuppressorfaktors beteiligt. Es ließen sich bislang jedoch weder Amplifikationen des *CDK4*-Gens, das in der chromosomalen Region 12q13 lokalisiert ist, noch Amplifikationen des *CyclinD1*-Gens auf Chromosom 11q13 nachweisen. Daneben scheinen auch die Gene *p15* und *p16* auf dem Chromosomenarm 9p nicht in die Pathogenese von Ependymomen involviert zu sein, da sich keine entsprechenden Mutationen nachweisen ließen. Beide Gene codieren Inhibitoren der CDK 4. Veränderungen dieser Gene wurden ebenfalls gehäuft in nicht-ependymalen Gliomen nachgewiesen. Insgesamt scheint keine Komponente dieses Regelkreises bei Ependymomen eine entscheidende Rolle zu spielen (Sato et al. 1996).

Im Gegensatz zu anderen glialen Tumoren wie Glioblastomen oder oligodendroglialen Tumoren existiert für Ependymome noch keine genetische Gruppierung. Darunter versteht man eine Subeinteilung innerhalb einer Tumorentität aufgrund gleichartiger genetischer Veränderungen. Für die so entstandenen Untergruppierungen lassen sich differenzierte Aussagen hinsichtlich der zu erwartenden Prognose oder in Bezug auf das Ansprechen auf verschiedene Therapiemodelle treffen (Ruttledge et al. 1994, von Deimling et al. 1993, Kleihues et al. 2000). So spricht z. B. ein Allelverlust auf dem Chromosomenarm 1p bei Oligodendrogliomen für Chemosensitivität, und ein gemeinsames Vorliegen von Allelverlusten auf den Chromosomenarmen 1p und 19q ist neben Chemosensitivität auch mit längerem Überleben assoziiert. Deletionen des *CDKN2A*-Gens sind dagegen ein Faktor für eine schlechtere Prognose dieser Tumoren (Cairncross et al. 1998).

Offenbar bestehen also grundlegende genetische Unterschiede zwischen Ependymomen und anderen glialen Tumoren, insbesondere den Glioblastomen, trotz zum Teil gemeinsamer glialer Differenzierungsmerkmale. Möglicherweise bietet diese Erkenntnis einen Erklärungsansatz für den unterschiedlichen klinischen Verlauf

hinsichtlich Prognose, Lokalisation und Altersverteilung innerhalb der Gruppe der Gliome.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziele molekulargenetischer Untersuchungen an Tumoren sind die Identifikation prognostisch relevanter Subgruppen sowie die Aufklärung pathogenetischer Mechanismen. Bisherige Arbeiten zeigten Verluste des Chromosoms 22 oder von Teilabschnitten dieses Chromosoms als häufigstes zytogenetisches Ereignis bei Ependymomen. Als relevanter Genlocus wurde das *NF2*-Gen identifiziert. Einen klinischen Hinweis auf einen Zusammenhang zeigt das gehäufte Auftreten von Ependymomen bei Patienten mit Neurofibromatose-2. Mutationsanalysen des *NF2*-Gens erbrachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Eine mögliche Erklärung dafür bietet das unterschiedliche Patientenkollektiv dieser Studien. Denn die gefundenen Mutationen betrafen ausschließlich spinal lokalisierte Ependymome, und diese waren im Gegensatz zu intrakraniellen Ependymomen in den meisten Studien kaum enthalten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, an einem großen Patientenkollektiv mit Ependymomen unterschiedlicher Lokalisation Mutationen des *NF2*-Gens zu detektieren. Parallel wurde eine Mikrosatellitenanalyse des Chromosoms 22 durchgeführt. Auf diese Weise sollten molekulargenetische Subgruppen bei Ependymomen identifiziert werden.

Daneben wiesen jüngere Studien Veränderungen des Chromosoms 11 in Ependymomen nach. Als potentiell pathogenetisch relevantes Gen wurde das *MEN1*-Gen vermutet. Daher wurde im Rahmen eines gemeinsamen Projekts parallel zu dieser Studie an den gleichen Tumorproben eine Mutations- und Mikrosatelliten-Analyse für *MEN1* bzw. das Chromosom 11 durchgeführt (vgl. Dissertationsarbeit Dr. med. Lenard Lachenmeyer am Fachbereich Medizin der Universität Hamburg). Die Ergebnisse beider Teilstudien des Projekts werden in der vorliegenden Arbeit zum Teil miteinander korreliert und vergleichend diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material: Tumor- und Blutproben

Tumorgewebe und die entsprechenden Blutproben wurden an der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gesammelt. Die dort behandelten Patienten mit Ependymomen wurden im Zeitraum von 1991 bis 1999 operiert. Unmittelbar nach der Operation wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei -80 °C im Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik gelagert, ebenso wie auch die entsprechenden Blutproben.

Alle Tumoren wurden anhand der geltenden WHO-Kriterien für Hirntumoren (Wiestler et al. 2000) im Neuropathologischen Institut der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (UKE) klassifiziert.

Weiterhin wurden die Tumorproben daraufhin histologisch untersucht, ob eine genügende Menge Tumorzellen für die molekulargenetischen Untersuchungen in den Gewebstücken enthalten waren. Für diese Studie wurden nur Proben verwendet, die einen Anteil von über 80% Tumorzellen enthielten.

In einzelnen Fällen, in denen keine entsprechenden Blutproben zur Verfügung standen, wurden normale Zellen aus tumorfreiem Gewebe, das sich in den gefrorenen Proben oder zum Teil in den Paraffinblöcken fand, isoliert und anstelle des Blutes als Kontrolle verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion

Die Extraktion der genomischen Tumor-DNA erfolgte mit dem „QIAamp Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus tiefgefrorenen Tumorproben oder aus in Paraffin eingebettetem Gewebe.

Bei den in Paraffin gelagerten Proben war ein zusätzlicher Aufbereitungsschritt notwendig. Dazu wurden ca. 25 mg des Gewebes aus dem Paraffinblock entnommen. Durch Zugabe von 1200 μL Xylol sowie anschließendem Schütteln, Zentrifugieren und

Abpipettieren des Überstandes wurde das Paraffin entfernt. Nach nochmaligem Waschen mit Ethanol und Verdampfen der Ethanolreste bei 37 °C war das Gewebe zur weiteren Verarbeitung nach dem folgenden Protokoll vorbereitet.

Das Protokoll wurde auf 25 mg Gewebe angewendet, das entweder direkt vom tiefgefrorenen Tumorblock entnommen wurde oder entsprechend der oben beschriebenen Aufbereitung aus einem Paraffinblock. Dazu wurden der Gewebeprobe 180 µl ATL-Puffer (Qiagen) und 20 µl Proteinase K (Qiagen) in einem 2 ml Eppendorfgefäß zugegeben und der Ansatz bei 55 °C über Nacht inkubiert, bis das Gewebe vollständig aufgelöst war. Anschließend wurden der Lösung 200 µl AL-Puffer (Qiagen) zugegeben und zusammen für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurden schließlich 210 µl Ethanol 96-100% zugegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend zur Bindung der DNA an die Säulenmembran über eine in diesem Kit enthaltene Filtersäule bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Zum Reinigen der DNA wurde die Filtersäule mehrmals mit 500 µl Puffer AW (Qiagen) aufgefüllt und zentrifugiert. Die nun im Filter isolierte DNA wurde mit 200 µl auf 70 °C vorgewärmtem 10 mM TRIS pH 8 inkubiert und durch erneute Zentrifugation eluiert.

Die DNA-Isolierung aus den gesammelten Blutproben wurde analog mit dem „QIAamp Blood Kit“ (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde aus 10 ml EDTA-Vollblut zunächst durch Zentrifugation des Vollbluts für 10 min bei 3300 x g bei Raumtemperatur der buffy coat, also das koagulierte Plasma nach Abzentrifugation der Erythrozyten, isoliert. Zu 200 µl des buffy coats wurden 25 µl Qiagen Protease und 200 µl AL-Puffer (Qiagen) zugefügt. Damit wurde die Lösung für 10 min bei 70 °C inkubiert. Dieses Gemisch wurde mit 210 µl Ethanol (96-100 %) versetzt und anschließend wiederum mehrfach über einen Filter zentrifugiert. Die im Filter isolierte DNA wurde mit 200 µl des auf 70 °C erwärmten AE-Puffers (Qiagen) schließlich eluiert.

2.2.2. Mikrosatellitenanalyse für LOH 22q

2.2.2.1. Oligonucleotid-Primer für die Mikrosatellitenanalyse

Zum Nachweis von Allelverlusten wurden Mikrosatellitenanalysen durchgeführt. Hierzu wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Dinucleotid-repeat Primer verwendet. Sie wurden mit 6-FAM, ROX oder JOE markiert und von Biometra (Göttingen,

Deutschland) und MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Lokalisationen der Mikrosatelliten sind den Angaben der Datenbank des National Institutes of Health (NIH), der Genome Data Base sowie entsprechender Literatur entnommen (Lekanne Deprez et al. 1991, Marineau et al. 1993, Sainz et al. 1993, Pylkkanen et al. 2002).

Name	Lokalisation	Sequenz	Max. Heterozygotie	Markierung	Fragmentlänge (bp)
D22S193	22q12	5GATCGCCGGCATCTATATATG	NA	JOE	110-136
		5CCCAAATTCATCCTTTCCTTG			
NF2CA3	22q12	5CTGCAGATCACAAACTCCTTG	0.833	ROX	130-146
		5GCATTTATGGAGTATCCACAG			
D22S268	22q12	5TACGTCCTCACAATCCAGCGT	0.7050	FAM	244-254
		5CTGAGGTGGGAGGATTAC			
D22S430	22q12	5GGACTCACCTGTGCATGCGT	0.6832	FAM	84-98
		5GATCTTGGCTTTTCTCCCG			

Tabelle 2 – Oligonucleotid – Primer für die Mikrosatellitenanalyse

NA = nicht angegeben

bp = Basenpaare

Maximale Heterozygotie bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der die Mikrosatellitenlänge mütterlicherseits und väterlicherseits unterschiedlich und somit informativ ist. Je höher die maximale Heterozygotie ist, desto wahrscheinlicher ist der Marker informativ.

2.2.2.2. Amplifikation und Auftrennung

Die PCR-Amplifikation wurde mit ca. 20 ng isolierter DNA in einem Gesamtvolumen von 10.05 µl durchgeführt. In einem solchen Ansatz waren weiterhin 0.25 U Taq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), 2.5 µM fluoreszenzmarkierte und -unmarkierte Oligonucleotid-Primer, 1 µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001 % w/v Gelatine) und dNTP's (je 200 µM) enthalten (Tabelle 3).

Aqua dest.	4 µl
DNA	2 µl
Puffer	1 µl
DNTP`s	1 µl
Primer vorwärts	1 µl
Primer rückwärts	1 µl
Polymerase	0,05 µl
Gesamtvolumen	10,05 µl

Tabelle 3 – PCR-Ansatz für die Mikrosatelliten-Analyse.

Ein PCR-Ansatz wurde initial für 16 min bei 94 °C in einem DNA-Thermocycler (Biometra/Perkin Elmer) erhitzt, um die Taq-Gold Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 40 der nachfolgend beschriebenen Zyklen durchgeführt: 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Primeranlagerung (Annealing) bei 55 °C und 1 min DNA-Synthese (Extension) bei 72 °C im selben Gerät (Tabelle 4).

Aktivierung	16 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	1 min	94 °C	40 Zyklen
Annealing	1 min	55 °C	
Extension	1 min	72 °C	

Tabelle 4 – PCR-Programm für die Mikrosatellitenanalyse

Regelmäßig wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, in der für den PCR-Ansatz statt DNA eine entsprechende Menge destilliertes Wasser verwendet wurde. Damit wurde Kontaminationsfreiheit gesichert.

2 µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl DNA-Probenpuffer vermischt und anschließend auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 100

V in einer Elektrophoresekammer (Mini Gel Migration Trough, Cosmo Bio Co, LTD, USA). Parallel wurden 2,5 µg DNA eines Längenstandards aufgetrennt (Marker VI, Böhringer, Mannheim, Deutschland). Zum Färben wurde das Gel für 30 min in eine nukleinsäure-färbende Lösung (SYBR GOLD, Molecular Probes, Oregon, USA) gegeben und anschließend unter UV-Licht auf einen Polaroidfilm (Polapan 663, Polaroid Company, Cambridge, MA, USA) abgelichtet.

Sofern das Gel DNA-Banden der erwarteten Größe aufwies, wurden die entsprechenden Proben für die Fragmentanalyse vorbereitet.

2.2.2.3. Fragmentanalyse

Je 1 µl von 4 PCR-Produkten unterschiedlicher Größe oder Markierung einer Gewebs- oder Blutprobe wurden auf einen Dialysefilter (Millipore, Millipore Cooperation, Bedford, MA, USA) aufgetragen und für 1 h gegen Wasser dialysiert. Das entstandene Dialysat wurde mit 12 µl Formamid, 4 µl destilliertem Wasser und 0,4 µl Genescan-500 ROX Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vermischt und bei 95 °C für 2 min denaturiert.

Die fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden im automatisierten ABI Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ausgewertet. Die Kriterien für die Annahme eines Allelverlusts waren:

- eine Signalreduktion des längeren Mikrosatelliten-Allels um mehr als 50% verglichen mit dem kürzeren Allel

oder

- eine Reduktion der Signalintensität des kürzeren Mikrosatelliten-Allels unter die des längeren Allels (Lamszus et al. 1999)

2.2.3. Mutationsanalyse des *NF2*-Gens

Zur Mutationsanalyse wurde eine Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, um Makromoleküle anhand ihres Denaturierungsverhaltens zu unterscheiden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass ab einer bestimmten Temperatur Basenpaarungen aufschmelzen, so dass sich das Laufverhalten ändert. Je höher die Temperatur ist, umso mehr Basenpaarungen brechen auf, und umso langsamer laufen die Moleküle. Ab einer bestimmten Temperatur liegen zwei Einzelstränge vor, die aufgrund eines verminderten Reibungswiderstandes wieder schneller laufen. Diese Temperaturen sind für jede DNA spezifisch, da sie unter anderem vom GC-Gehalt abhängig sind. Auch kleinste Veränderungen der DNA durch Mutationen lassen sich so trotz gleicher Länge der Abschnitte voneinander trennen und analysieren.

Die Mutationsanalyse wurde mit einem TGGE-Analysesystem (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Exons 1–15 des *NF2*-Gens (GenBank accession NM 000268) wurden mittels PCR amplifiziert (Lamszus et al. 2000).

2.2.3.1. Oligonucleotid-Primer für TGGE

Für die TGGE-Analyse wurden bereits in der Literatur beschriebene Primer verwendet (Jacoby et al. 1994, Kluwe et al. 1998) (vgl. Tabelle 5).

Exon	Primer / sense strand (3' - 5')	Primer / antisense strand (5' - 3')	Fragmentgröße (bp)
1	GCTAAAGGGCTCAGAGTGCAG	Ps ³ -M13rev- TCGACTGTCACCGCAG	232
2	GTCCTTCCCATTGGTTTGT	Gcclamp ¹ -M13rev ² - CGTCAGCCCCACCAAGTTT	248
3	Gcclamp ¹ -M13rev ² - GCTTCTTTGAGGGTAGCACA	GGTCAACTCTGAGGCCAACT	332
4	Gcclamp ¹ -M13rev ² - CCTCACTTCCCCTCACAGAG	CCCATGACCCAAATTAACGC	245
5	TGGCAGTTATCTTAGAATCTC	Gcclamp ¹ -M13rev ² - TCCTTCAAGTCCTTTGGTTAGC	257
6	CATGTGTAGGTTTTTTATTTTGC	Gcclamp ¹ - CATAAAGGAATGTAAACC	197
7	Gcclamp ¹ -M13rev ² - CCATCTCACTTAGCTCCAATG	CTCACTCAGTCTCTGTCTAC	231
8	GAAGGTTGAATAAAAATTTTGAGCCTC	Gcclamp ¹ -M13rev ² - GACAGGGAAAGATCTGCTGGACC	305
9	Gcclamp ¹ -M13rev ² - GACTTGGTGTCCCTAATTCCC	CCATTATCAGTAATGAAAACCAG	357
10	TGCTACCTGCAAGAGCTCAA	Gcclamp ¹ -M13rev ² - CTGACCACACAGTGACATC	317
11	Ps ³ -M13rev- TCTTTGGCCCTTGTGGCAC	CAGGAGACCAAGCTCCAGAA	286
12	TTCAGCTAAGAGCACTGTGC	Ps ³ -M13rev- CTTGAGGACAACCTGCTGTAG	369
13	Ps ³ -M13rev- GGTGTCTTTTCCTGCTACCT	GGGAGGAAAGAGAACATCAC	245
14	Gcclamp ¹ -M13rev ² - TGTGCCATTGCCTCTGTG	AGGGCACAGGGGGCTACA	310
15	Gcclamp ¹ - TCTGCCCAAGCCCTGATGC	TGGTCCTGATCAGCAAATAC	283

Tabelle 5 – Oligonucleotidprimer für TGGE.

¹ Gcclamp = 5' -CCC CGC CCC CGC CCC CCC CGC CGC CCC CGC -3'

² M13rev = 5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3'

³ Ps = Psoralengruppe am 5'-Terminus

2.2.3.2. TGGE-Analyse

Die Amplifikation der Fragmente fand in einem DNA-Thermocycler (Biometra, Göttingen) statt. Vor der eigentlichen DNA-Amplifikation fand ein 4 Minuten langer

Inkubationsschritt zur Denaturierung und Aktivierung der Taq-Gold Polymerase bei 94 °C statt. Anschließend folgten 35 bis 40 Amplifikationszyklen, wie die folgende Tabelle 6 zeigt:

Aktivierung	4 min	94 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94 °C	35 - 40 Zyklen
Annealing	30 sec	55 °C	
Extension	1 min	72 °C	

Tabelle 6 – PCR-Programm für die Mutationsanalyse.

Die Komponenten und Volumina entsprachen denen der Fragmentanalyse, lediglich andere Primer wurden verwendet. Von diesen Primern wurden je 2.5 pmol zugegeben.

Die PCR-Produkte wurden zur Denaturierung mit einem Puffer (8 M Harnstoff, 40 mM MOPS, 2 mM EDTA, pH 8.0, 0.01% Bromphenolblau und Xylol Cyanol FF) vermischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für 15 min bei 50 °C inkubiert. Die Proben wurden nun auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (8% Polyacrylamid, 8M Urea, 20mM MOPS pH 8.0, 1mM EDTA und 2% Glycerol) und in einer TGGE aufgetrennt. Für jedes analysierte Exon wurde mindestens eine Probe mit einer bekannten Probe als Positivkontrolle sowie eine Probe ohne Mutation als Negativkontrolle mit aufgetragen.

Fanden sich, verglichen mit der Negativ-Kontrolle, veränderte Banden in einem Exon eines Tumors, so wurde die entsprechende PCR in größerem Maßstab wiederholt, um ein Volumen von 50 µl PCR-Produkt zur Aufreinigung (QIAquick spin PCR purification kit, Qiagen) zur Verfügung zu haben.

2 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden dann in 10 µl Volumen für die Sequenzierreaktion eingesetzt. Weiterhin enthielt der Ansatz 1 µl Primer (10 µM) sowie 1 µl eines Fertigansatzes für die Sequenzierreaktion (Big Dye Sequencing Kit, Perkin Elmer) und 6 µl Wasser. Die Sequenzierreaktion fand in einem DNA-Thermocycler (Biometra) statt. Zunächst wurden 25 Zyklen mit 10 Sekunden bei 96 °C, 5 Sekunden bei 55 °C und 4 Minuten bei 60 °C durchgeführt. Nach einer erneuten Reinigung der

Proben durch Fällung mit zunächst 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl eines Ethanol-Dextranblau-Gemisches und Waschen mit 70%igem Ethanol wurden die Proben zentrifugiert und das Ethanol wie oben beschrieben entfernt. Anschließend wurden die Proben mit dem automatisierten Sequenzer ABI 373 (Applied Biosystems) analysiert.

2. 3. Statistische Analyse

Assoziationen zwischen Tumorlokalisierung und LOH 22q sowie zwischen LOH 22q und *NF2*-Mutationen wurden mit dem Fisher Exact Test analysiert. Altersdifferenzen zwischen Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorlokalisationen wurden mit dem 1-way ANOVA und dem ungepaarten t-Test verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Klinisch-pathologische Befunde

Insgesamt wurden 52 Tumoren von 45 Patienten untersucht. Von fünf Patienten lagen mehrere Tumoren vor, wobei vier Patienten jeweils einen Rezidivtumor aufwiesen und von einer Patientin neben dem Primärtumor zwei Rezidive und eine Metastase untersucht wurden.

Von den 45 Patienten waren 30 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Tumoroperation betrug 34 Jahre mit einer Spannweite von 3 Monaten bis 67 Jahren. In diese Berechnung gingen einige Patienten mehrmals - in jeweils verschiedenen Altersstufen - ein, da sie aufgrund von Rezidiven und/ oder Metastasen mehrfach operiert wurden.

Den größten Anteil der 52 Tumoren bildeten intramedullär spinal lokalisierte Ependyome mit insgesamt 21 Fällen (41%). 14 weitere Tumoren lagen im 4. Ventrikel (einschließlich des Trigonums), 11 im Filum terminale. Die übrigen sechs Tumoren befanden sich intracerebral. Dabei fiel auf, dass Patienten mit Tumoren des 4. Ventrikels signifikant jünger waren ($\bar{x} = 25$ Jahre) als Patienten mit intramedullär spinal lokalisierten Tumoren ($\bar{x} = 42$ Jahre) ($p < 0,05$). Ependyome in rein intracerebraler Lokalisation waren durchschnittlich im 31. Lebensjahr manifest geworden ($\bar{x} = 30,5$ Jahre) und Tumore des Filum terminale im 34. Lebensjahr ($\bar{x} = 34$ Jahre).

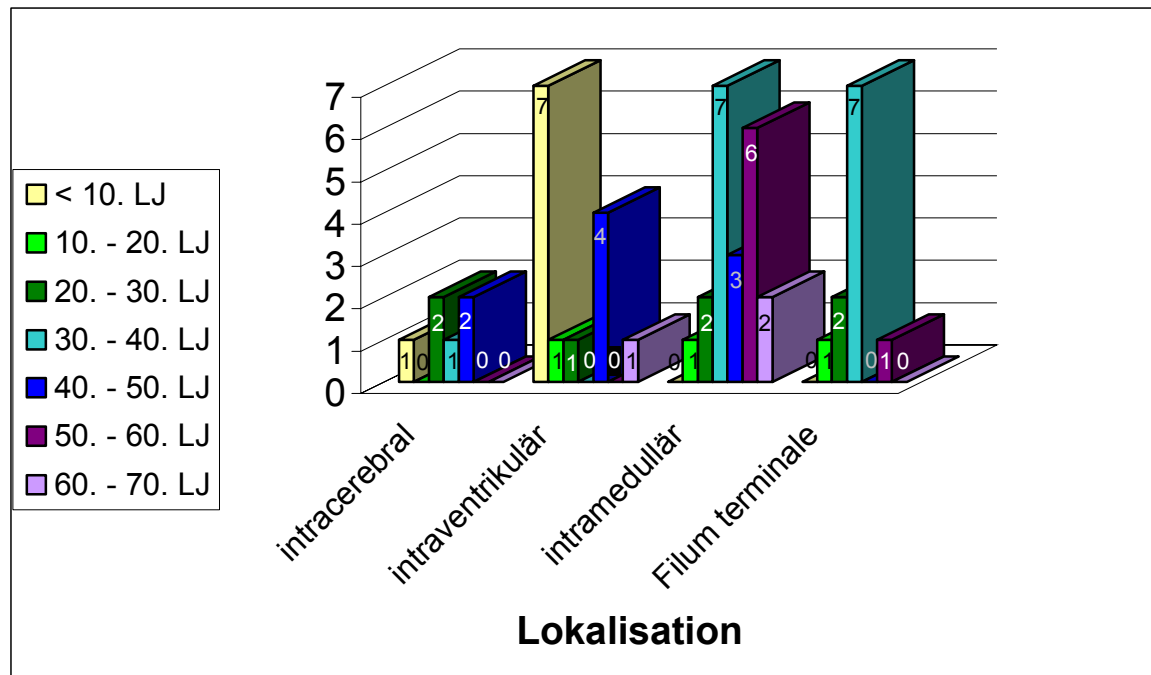


Abbildung 5 – Tumorfrequenz nach Lokalisationsverteilung und Alter bezogen auf die Anzahl der Tumoren

Von den 52 untersuchten Tumoren entsprachen vier Tumoren (8%) dem WHO Grad I. Jeder dieser Tumoren war im Filum terminale lokalisiert. Es handelte sich hierbei ausschließlich um myxopapilläre Ependymome. Der Altersdurchschnitt dieser Patienten betrug 31 Jahre (Altersspanne 26 – 35 Jahre) und unterschied sich damit nicht signifikant vom Altersdurchschnitt aller untersuchten Tumoren ($\bar{x} = 34,5$) ($p = 0,6$).

Der überwiegende Teil der in dieser Studie untersuchten Tumoren entsprach WHO Grad II ($n = 28$, Anteil an allen untersuchten Tumoren 54%). Diese Patienten waren zwischen 2 und 67 Jahren alt ($\bar{x} = 40$ Jahre) und damit im Mittel tendenziell etwas älter als der Altersdurchschnitt der Gesamtpopulation ($\bar{x} = 35$ Jahre) ($p = 0,1$).

20 Tumoren entsprachen WHO Grad III (Anteil an allen Tumoren 38,5%). Diese fanden sich im 4. Ventrikel sowie intracerebral. Insgesamt waren diese Patienten tendenziell etwas jünger ($\bar{x} = 27,5$ Jahre; Altersspanne 0,25 – 54 Jahre) als der Durchschnitt aller untersuchten Tumoren ($\bar{x} = 34,5$ Jahre), ohne jedoch diesbezüglich statistische

Signifikanz zu erreichen ($p = 0,1$). Patienten mit Tumoren des WHO-Grad III dagegen waren signifikant jünger als Patienten mit Tumoren des WHO-Grad II ($p < 0,05$).

Während mit 84% die Mehrheit der spinal und im Filum terminale gelegenen Tumoren histologisch als WHO Grad I - II eingestuft wurden, waren 75% der ventrikulären und intracerebralen Tumoren anaplastisch, WHO III. In der folgenden Graphik wird der Zusammenhang zwischen Lokalisation und WHO-Grad dargestellt (Abbildung 6):

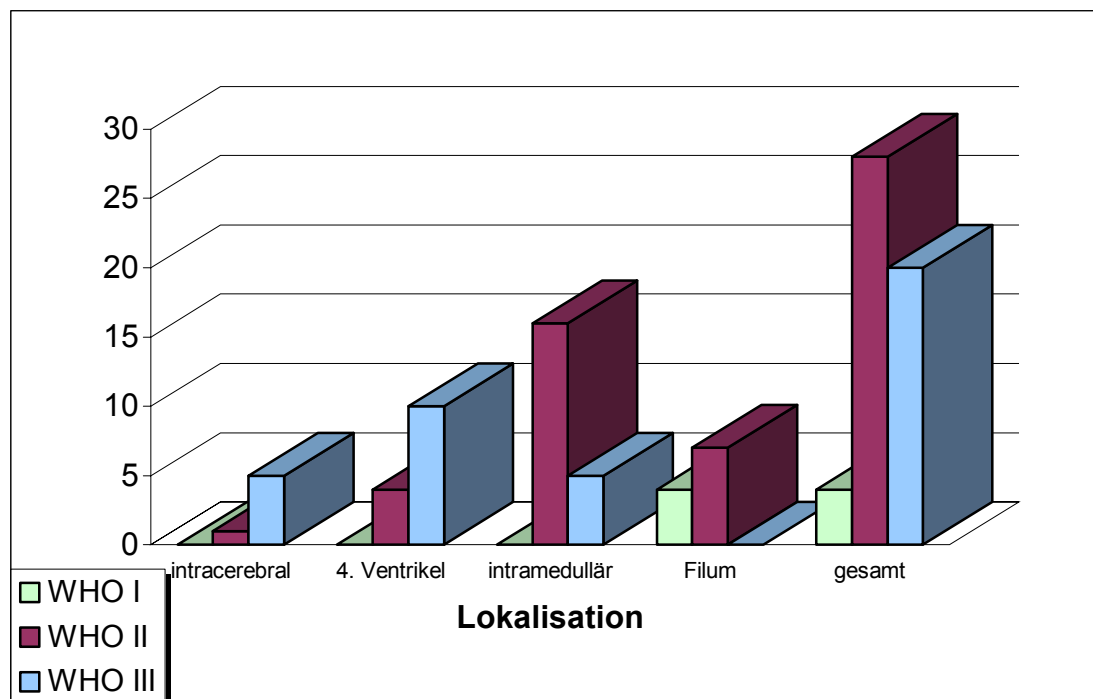


Abbildung 6 – Assoziation zwischen WHO-Grad und Lokalisation bezogen auf die Anzahl der Tumoren

Weiterhin fiel auf, dass die untersuchten kindlichen Tumoren im Alter zwischen drei Monaten und neun Jahren ($n = 8$) vorwiegend maligne waren, d.h. als Ependymome WHO III klassifiziert worden waren (sechs von acht Tumoren dieser Altersspanne entspricht 75%).

Die klinischen und histologischen Daten aller untersuchten Tumoren sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

¹	Tumor ²	Alter ³	Geschlecht ⁴	OP-Jahr ⁵	Lokalisation ⁶	WHO-Grad ⁷	Status ⁸
	1	44	m	1998	intramed C2-3	2	lebend
	2	47	w	1994	intramed C2-4	2	lebend
Rez	3	27	m	1999	intramed Th2-3	2	lebend
	4	64	w	1996	intramed C2-7	2	lebend
	5	57	w	1997	intramed C4-7	2	lebend
	6	33	w	1997	intramed C2-Th2	2	lebend
	7	55	w	1999	intramed Th6-8	2	lebend
	8	63	m	1997	intramed Th10-L1	2	lebend
	9.1	36	m	1998	intramed C6-7	3	verstorben
Rez	9.2	37	m	1999	intramed C6-7	3	verstorben
	10	50	w	1999	intramed C1-3	2	lebend
	11	35	m	1996	intramed C2-6	2	lebend
	12	21	w	1993	intramed Medulla - C5	3	lebend
	13	53	m	1999	intramed Th2-3	2	lebend
	14	31	w	1995	intramed C4-7	2	lebend
	15	44	w	1997	intramed C6	2	lebend
	16	29	m	1999	intramed Th2-5	2	lebend
	17	30	m	1995	intramed C6-7	2	lebend
	18	19	m	1992	intramed C4-Th3	3	lebend
	19	56	m	1995	intramed C2-3	2	lebend
	20	49	m	1993	intramed C2-3	3	lebend
	21	59	m	1999	Filum, L1	2	lebend
	22	37	w	1997	Filum, L2	2	lebend
	23	34	m	1996	Filum, L1	2	lebend
	24	38	w	1994	Filum, Th11-L5	2	lebend
	25	18	m	1998	Filum, L1-2	2	lebend
	26	28	m	1994	Filum, L1	1	lebend
	27	26	m	1998	Filum, L5-S3	1	lebend
	28	34	w	1996	Filum, L2-4	1	lebend
	29	35	m	1995	Filum, Th12-S2	1	lebend
	30	38	w	1997	Filum, L1-2	2	lebend
	31	30	m	1998	Filum, L4	2	lebend
	32	27	w	1993	4. Ventrikel	3	lebend
	33	17	m	1991	Trigonum	3	verstorben
Rez	34	4	m	1992	Rautenhirn	3	verstorben
	35	3	m	1996	4. Ventrikel	2	lebend
	36	66	m	1997	4. Ventrikel, KHBW	2	verstorben
	37.1	50	w	1995	4. Ventrikel	2	verstorben
Rez	37.2	51	w	1997	4. Ventrikel	3	verstorben
Rez	37.3	53	w	1998	4. Ventrikel	3	verstorben
Met	37.4	53	w	1999	intradural, L4-5	3	verstorben
Rez	38.1	9	m	1995	KHBW	3	verstorben

Fortsetzung von Seite 31, Tabelle 7							
1	Tumor ²	Alter ³	Geschlecht ⁴	OP-Jahr ⁵	Lokalisation ⁶	WHO-Grad ⁷	Status ⁸
Rez	38.2	9	m	1995	KHBW	3	verstorben
	39	2	m	1995	4. Ventrikel	2	lebend
Rez	40	9	m	1995	4. Ventrikel, KHBW	3	lebend
	41	0,25	m	1997	4. Ventrikel	3	verstorben
	42	27	m	1992	temporal	3	lebend
	43.1	27	m	1992	parietal	2	lebend
Rez	43.2	32	m	1998	zentral	3	lebend
	44	4	m	1993	frontal	3	verstorben
	45.1	46	m	1995	temporal	3	verstorben
Rez	45.2	47	m	1997	temporal	3	verstorben

Tabelle 7 -

- 1 – multiple Tumoren, Rez = Rezidiv, Met = Metastase
- 2 – Die Zahlen 1 - 45 wurden einzelnen Patienten zugeordnet, multiple Tumoren eines Patienten sind in zeitlicher Reihenfolge nacheinander angeordnet und mit x.1 bis x.4 bezeichnet
- 3 – Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Tumoroperation
- 4 – Geschlecht des Patienten, m = männlich, w = weiblich
- 5 – Jahr der Tumoroperation
- 6 – Lokalisation des Tumors, intramed = intramedullär spinal, Filum = Filum terminale, C = cervikal, Th = thorakal, L = lumbal, S = sakral
- 7 – WHO-Grad, alle Grad I-Tumoren sind myxopapillären Subtyps
- 8 – Überleben zum Zeitpunkt der Datenerhebung 1999

Bei einer Patientin traten zwei Rezidive und eine Metastase innerhalb von vier Jahren auf (Tumor Nr. 37). Der Primärtumor entsprach WHO Grad II, wohingegen alle weiteren Tumoren WHO Grad III entsprachen, so dass eine histologische Tumorprogression zu verzeichnen war. Ebenso wies ein cerebraler Tumor (Tumor Nr. 43) vier Jahre nach der ersten Operation ein Rezidiv auf, wobei ebenfalls eine histologische Tumorprogression von WHO Grad II zu WHO Grad III zu beobachten war.

Entsprechend der relativen Gutartigkeit von Ependymomen verglichen mit anderen Gliomen, z. B. Astrocytomen, waren bis zum Studienende lediglich neun Patienten verstorben. Auch hier bestätigt sich die Assoziation zwischen Lokalisation und Prognose, denn alle Todesfälle wiesen intracerebrale Tumoren bzw. Tumoren des 4. Ventrikels auf, die Regionen, in denen vorwiegend anaplastische Ependymome auftreten. Über 50% der Patienten mit intraventrikulärem oder intracerebralem Tumor waren bis Studienende verstorben, wohingegen lediglich ein Patient mit intramedullär spinalem Tumor verstorben war. Alle Patienten mit Tumoren des Filum terminale waren am Ende der Untersuchung noch am Leben (vgl. Abbildung 7).

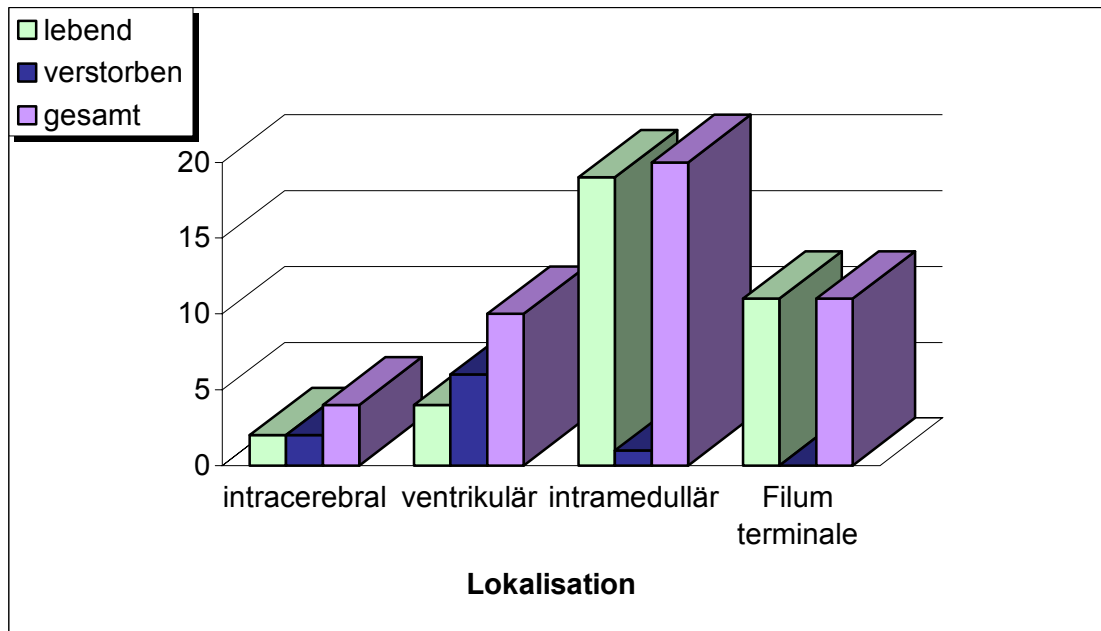


Abbildung 7 – Assoziation zwischen Lokalisation und Sterberate, bezogen auf Patientenanzahl

3.2. Allelverluste auf dem Chromosomenarm 22q

Um Allelverluste auf dem Chromosomenarm 22q zu detektieren, wurde Tumor- und Blut-DNA mit spezifischen Mikrosatellitenprimern amplifiziert und mit Hilfe eines automatisierten ABI Genetic Analyzer ausgewertet. Die folgenden Abbildungen zeigen ein Beispiel für die Detektion eines LOHs. Man erkennt, dass beim Vergleich der Darstellungen aus Blut- und Tumorgewebe eine deutliche Reduktion des ersten Signals unter die Größe des zweiten stattfindet. Entsprechend den genannten Kriterien zur Auswertung (vgl. Kapitel 2.2.2.2.) kann somit in diesem Beispiel ein LOH angenommen werden.

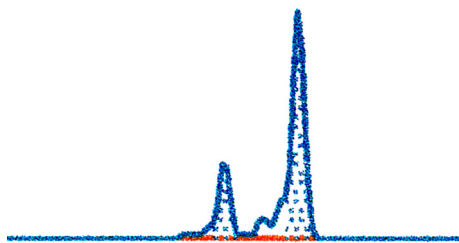


Abbildung 8a - Tumorgewebe

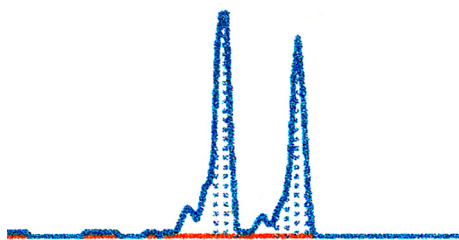


Abbildung 8b - Blutprobe

Insgesamt fand sich bei 24 der 52 untersuchten Tumoren (47 %) ein Allelverlust auf Chromosomenarm 22q. Diese 24 Tumoren stammten von 20 verschiedenen Patienten. In allen Fällen, in denen ein LOH nachgewiesen, waren jeweils alle der informativen Mikrosatellitenmarker (D22S430, D22S193, CA3 und D22S268) von einem Allelverlust betroffen, es gab also für diese Allele keine partiellen Heterozygotieverluste.

Die Mehrzahl der intramedullären spinalen Tumoren, nämlich 15 von 21 Tumoren (71%), wiesen einen LOH 22q auf. Damit war ein LOH 22q bei intramedullär spinalen

Tumoren signifikant häufiger als bei Tumoren in anderen Lokalisationen ($p < 0,05$). Bei den intracerebral lokalisierten Tumoren konnte hingegen in keinem einzigen Fall ein Allelverlust nachgewiesen werden (keiner von sechs untersuchten Tumoren). Auch die im Filum terminale gelegenen Ependymome zeigten nur selten einen LOH 22q, nämlich in zwei von elf untersuchten Tumoren (18%). Allerdings wies die Hälfte der im 4. Ventrikel lokalisierten Ependymome einen LOH 22q auf (sieben von 14 untersuchten Tumoren, 50%).

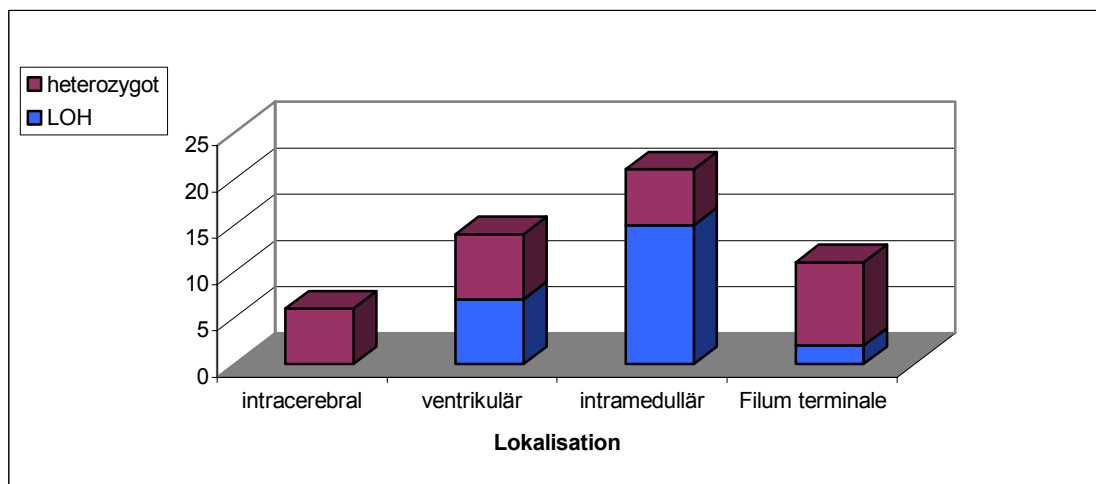


Abbildung 9 – Verteilung des LOH 22q abhängig von der Lokalisation bezogen auf die Anzahl der Tumoren

Bei den vier WHO Grad I Ependymomen fand sich lediglich in einem Fall ein Allelverlust (25%). Dagegen ließen sich bei 14 von 25 untersuchten Tumoren (56%) WHO Grad II sowie 10 von 16 untersuchten Tumoren WHO-Grad III (62.5%) Allelverluste auf dem Chromosomenarm 22q nachweisen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass in diese Berechnungen zum Teil mehrere Tumoren von den gleichen Patienten einbezogen wurden. Das erklärt insbesondere die hohe Zahl von LOHs bei Tumoren des WHO-Grades III. Eine signifikante Korrelation zwischen LOH und Malignitätsgrad der Tumoren kann daraus nicht abgeleitet werden. Von den acht untersuchten kindlichen Tumoren wiesen lediglich zwei einen LOH 22q auf (25%).

Analysiert nach Malignitätsgraden ergibt sich für die Allelverluste folgendes Ergebnis (vgl. Abbildung 10):

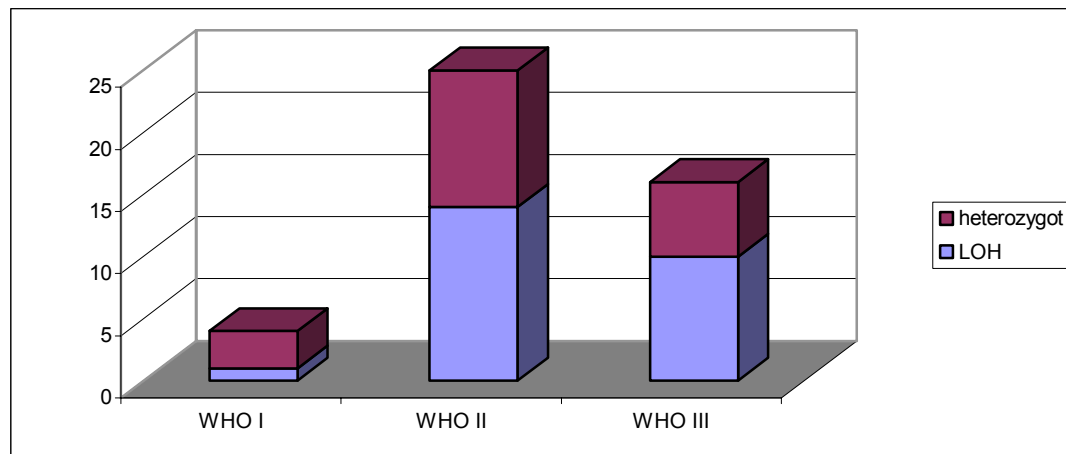


Abbildung 10 – Verteilung LOH 22q abhängig vom WHO-Grad bezogen auf n = 52 Tumoren

In der nachfolgenden Tabelle 8 werden die Daten zu Alter, Lokalisation und WHO-Grad in Zusammenhang mit dem Auftreten eines LOHs dargestellt. Daneben sind auch die Daten über nachgewiesene Mutationen des *NF2*-Gens bereits mit aufgenommen, die im nächsten Kapitel näher erläutert werden sollen.

Tumornummer¹	Lokalisation²	WHO	LOH³	Mutation⁴
1	Intramed	2	LOH	Mut
2	Intramed	2	H	Wt
3 (Rez)	Intramed	2	LOH	Wt
4	Intramed	2	LOH	Mut
5	Intramed	2	LOH	Wt
6	Intramed	2	LOH	Mut
7	Intramed	2	H	Wt
8	Intramed	2	LOH	Wt
9.1	Intramed	3	LOH	Mut
9.2 (Rez)	Intramed	3	LOH	Mut
10	Intramed	2	H	Wt
11	Intramed	2	LOH	Wt
12	Intramed	3	LOH	Wt
13	Intramed	2	LOH	Wt
14	Intramed	2	H	Wt
15	Intramed	2	LOH	Wt
16	Intramed	2	H	Wt
17	Intramed	2	LOH	Wt
18	Intramed	3	H	Wt
19	Intramed	2	LOH	Wt
20	Intramed	3	LOH	Mut
21	Filum	2	H	Wt
22	Filum	2	H	Wt
23	Filum	2	H	Wt
24	Filum	2	H	Wt
25	Filum	2	H	Wt
26	Filum	1	H	Wt
27	Filum	1	H	Wt
28	Filum	1	H	Wt
29	Filum	1	H	Wt
30	Filum	2	LOH	Wt
31	Filum	2	LOH	Wt

Fortsetzung von Seite 37, Tabelle 8

Tumornummer ¹	Lokalisation ²	WHO	LOH ³	Mutation ⁴
32	4. Ventrikel	3	LOH	Wt
33	Trigonum	3	H	Wt
34 (Rez)	4. Ventrikel	3	LOH	Wt
35	4. Ventrikel	2	H	Wt
36	4. Ventrikel	2	H	Wt
37.1	4. Ventrikel	2	LOH	Wt
37.2 (Rez)	4. Ventrikel	3	LOH	Wt
37.3 (Rez)	4. Ventrikel	3	LOH	Wt
37.4 (Met)	Intradural	3	LOH	Wt
38.1 (Rez)	4. Ventrikel	3	LOH	Wt
38.2 (Rez)	KHBW	3	H	Wt
39	4. Ventrikel	2	H	Wt
40	4. Ventrikel	3	H	Wt
41	4. Ventrikel	3	H	Wt
42	Temporal	3	H	Wt
43.1	Parietal	2	H	Wt
43.2	Zentral	3	H	Wt
44	Frontal	3	H	Wt
45.1	Temporal	3	H	Wt
45.2	Temporal	3	H	Wt

Tabelle 8 – LOH 22q und Mutationen des *NF2*-Gens

1 - Rez = Rezidiv, Met = Metastase

2 - intramed = intramedullär, KHBW = Kleinhirnbrückenwinkel

3 – LOH = Loss of Heterozygosity, H = Heterozygosity

4 – Mut = Mutation, Wt = Wildtyp

Wie bereits unter 1.3. erwähnt, befasst sich eine parallel an demselben Tumormaterial durchgeführte Studie mit der Analyse von *MEN1*-Mutationen und LOH 11q (Dissertationsarbeit von Dr. med. Lenard Lachenmeyer am Fachbereich Medizin der Universität Hamburg). Interessanterweise ergab die vergleichende Analyse der LOH-Daten beider Studien eine hochsignifikante inverse Assoziation zwischen Tumoren mit

LOH 22q und 11q ($p < 0,001$, Fisher Exact Test). Dies könnte auf alternative molekulargenetische Entstehungswege bei Ependymomen hindeuten.

3.3. Mutationen des *NF 2*-Gens

Es wurden insgesamt 52 Tumoren mittels TGGE-Analyse und Sequenzierung von Proben mit auffälligem Bandenmuster auf Mutationen im *NF2*-Gen untersucht.

In sechs der 52 untersuchten Tumoren ließen sich Mutationen nachweisen. Diese Tumoren stammten von insgesamt fünf verschiedenen Patienten (Tabelle 9).

Bei zwei Tumoren führte die Mutation zu einem Stopcodon im Exon 4 bzw. Exon 6 (Tumor-Nr. 1 und 4). Zwei weitere Tumoren zeigten Frameshift-Mutationen, wobei eine durch eine Duplikation von 13bp im Exon 6 (Tumor-Nr. 6), die andere durch eine 10bp Deletion im Exon 8 bedingt war (Tumor-Nr. 20). Ein anderer Tumor (Tumor-Nr. 9.1), ebenso wie sein Rezidiv (Tumor-Nr. 9.2), wies eine Deletion von 16bp im Intron 9, 19bp 3'-wärts von Exon 9 auf. In einem weiteren Tumor, der ein verändertes Bandmuster in der TGGE-Analyse aufwies, fand sich eine Transition G>A, die einen synonymen Polymorphismus verursachte.

Tumornummer	Exon	Veränderung	Konsequenz	Aminosäure
1	4	432C>G	Stopcodon	Y144X
4	6	592C>T	Stopcodon	R198X
5	3	363G>A	Transition	Polymorphismus Q121Q
6	6	584_596dup	Frameshift	A199fsX206
9.1		IVS9+19_+34del	Deletion	Unbekannt
9.2		IVS9+19_+34del	Deletion	Unbekannt
20	8	681_690del	Frameshift	K227fsX247

Tabelle 9 - *NF 2*-Genmutationen bei intramedullär spinalen Ependymomen

Del = Deletion, C = Cytosin, T = Thymin, G = Guanin, A = Adenin

Interessanterweise waren alle Tumoren mit nachgewiesener *NF2*-Mutation intramedullär spinal lokalisiert. Keiner der Tumoren in anderen Lokalisationen zeigte eine Mutation oder ein auffälliges Bandenmuster in der TGGE-Analyse. Es konnte auch keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Mutation des *NF2*-Gens und dem WHO-Grad nachgewiesen werden: drei der Tumoren mit *NF2*-Mutation entsprachen WHO Grad II, die anderen drei Tumoren waren anaplastische Ependymome WHO-Grad III. Zwei der anaplastischen Tumoren stammten vom selben Patienten (Fall-Nr. 9.1 und 9.2), wobei sowohl der Primärtumor als auch das Rezidiv einen LOH aufwies, und auch in beiden Tumoren bereits die identische Mutation (Deletion) nachweisbar war. Von den Patienten mit *NF2*-Mutation war lediglich der Patient Nr. 9 zum Zeitpunkt der Studie verstorben. Alle anderen Patienten mit detektierter Mutation waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch am Leben, mit einer Überlebenszeit nach der Tumoroperation von bis zu sechs Jahren. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen *NF2*-Mutationen und Überleben bzw. Versterben der Patienten. Der Altersdurchschnitt der Patienten mit *NF2*-Mutationen ($\bar{x} = 46$ Jahre) wies eine geringe Tendenz zu eher einem höheren Erkrankungsalter verglichen mit dem Altersdurchschnitt aller untersuchten Tumoren ($\bar{x} = 34,5$) auf ($p = 0,09$).

Alle Tumoren, die Mutationen aufwiesen, hatten auch einen LOH 22q, so dass in allen diesen Fällen ein kompletter Verlust des Wildtyp *NF2*-Gens vorlag. Statistisch fand sich eine signifikante Assoziation zwischen einer *NF2*-Mutation und LOH 22q ($p < 0,05$, $n = 45$ Patienten).

3.4. Fallanalyse

Anhand der Tumoren der Patientin Nr. 37 wurde eine Einzelfallanalyse durchgeführt. Da von dieser Patientin mit vier Tumoren eine relativ große Anzahl an Material vorlag und histologisch ein Progress von WHO Grad II zu WHO Grad III im Verlauf zu verzeichnen war, stellte sie klinisch und histologisch den interessantesten Fall der Studie dar. In diesem Fall wurden auch die Daten der parallel durchgeführten Studie (vgl. Dissertation Dr. Lenard Lachenmeyer, Fachbereich Medizin der Universität Hamburg) für den Chromosomenarm 11q und das *MEN1*-Gen mit einbezogen.

Der Primärtumor wurde bei der Patientin 1995 im Alter von 50 Jahren diagnostiziert. Dieser Tumor war im 4. Ventrikel lokalisiert und entsprach histologisch einem gut differenzierten, zellarmen Ependymom WHO-Grad II (vgl. Abbildung 11).

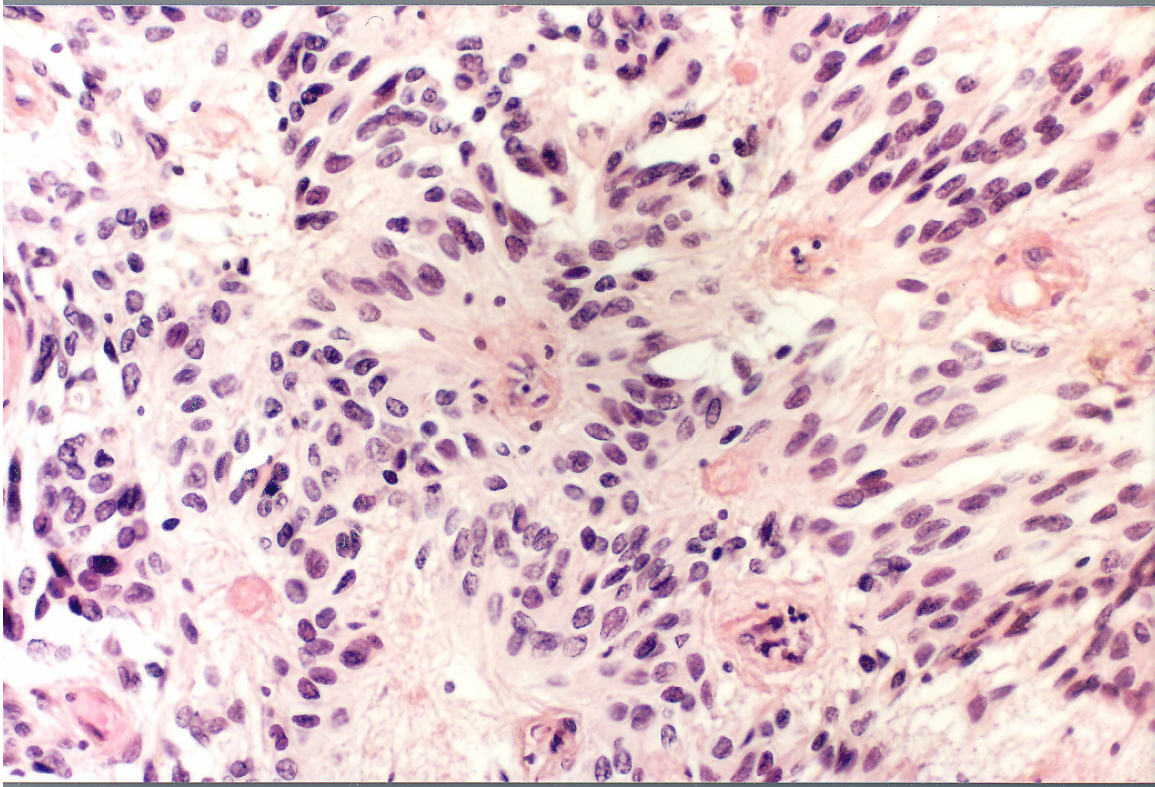


Abbildung 11 – Histologie Tumor 37.1

zellarmes Ependymom mit monomorphen Zellkernen und
perivaskulären Pseudorosetten WHO II°

Die Mikrosatellitenanalyse konnte einen Allelverlust auf dem Chromosomenarm 22q detektieren (Abbildung 12a). Auf dem Chromosomenarm 11q stellte sich dagegen ein LOH dar, der vermutlich nur einen Teil der Tumorzellen betraf, denn das Signal des kleineren Mikrosatellitenallels war nicht komplett, sondern nur zum Teil reduziert (siehe Abbildung 12b).

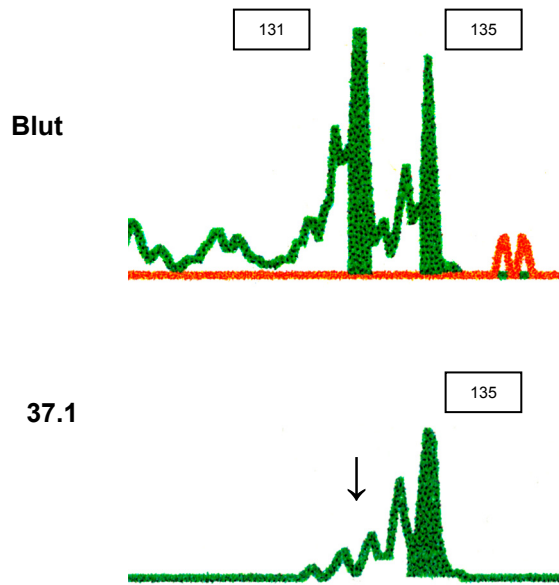


Abbildung 12a – Mikrosatellitenanalyse für Tumor 37.1, Primer CA3 mit LOH

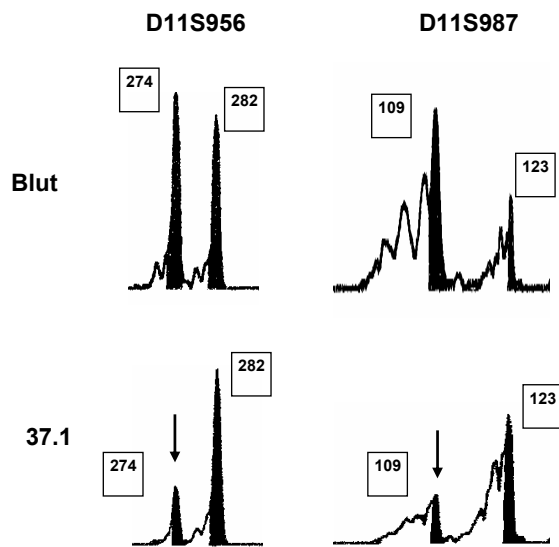


Abbildung 12b – Mikrosatellitenanalyse für Tumor 37.1, Primer D11S956 und D11S987 mit LOH

Die Mutationsanalyse für das *NF2*-Gen und das *MEN1*-Gen konnte weder im Blut noch im Ersttumor der Patientin eine Mutation erfassen (Abbildung 13).

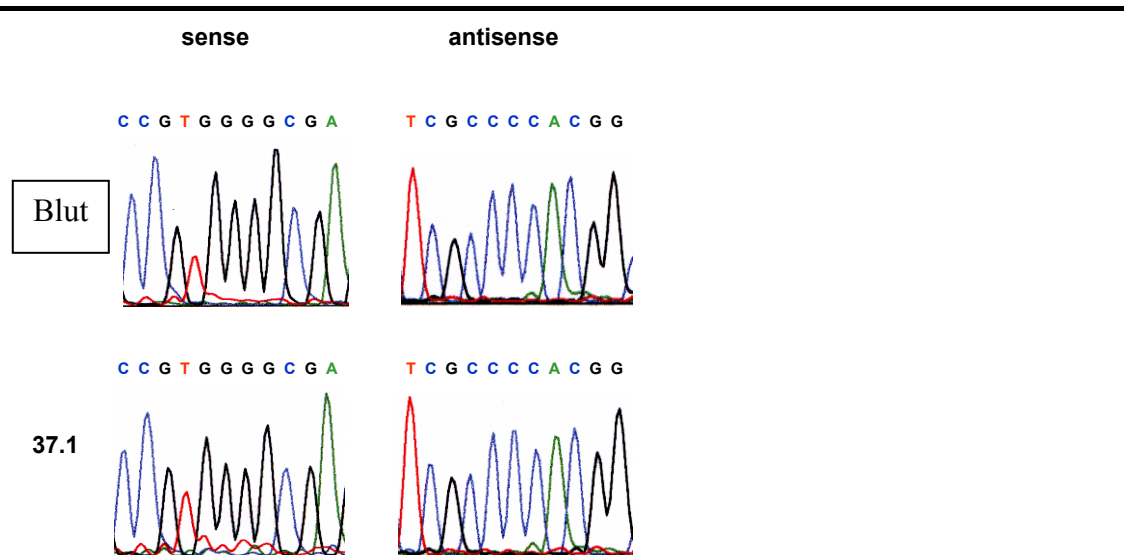


Abbildung 13 - Mutationsanalyse *MEN1* im Tumor 37.1

Kein Nachweis einer Mutation im *MEN1*-Gen

1997 wurde bei der Patientin ein Rezidivtumor in derselben Tumorlokalisation entdeckt. Die histologische Aufarbeitung des operativ entnommenen Tumorgewebes zeigte eine Progression: es fanden sich zunehmend anaplastische Veränderungen mit einer verstärkten Kernpolymorphie, einer gesteigerten Zelldichte und einer erhöhten Mitoserate. Dementsprechend erfolgte die Klassifikation dieses Tumors als anaplastisches Ependyomom WHO-Grad III (vgl. Abbildung 14).

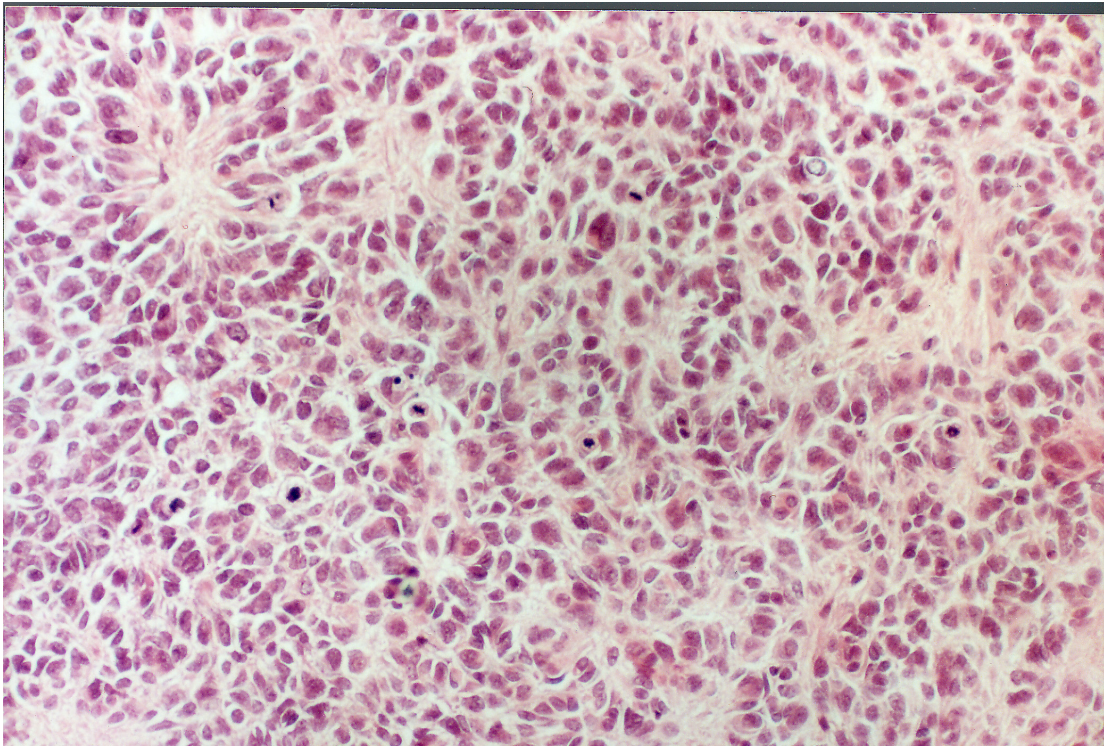


Abbildung 14 – Histologie Tumor 37.2
Anaplastisches Ependymom WHO III°

In der molekulargenetischen Untersuchung ließ sich weiterhin keine Mutation des *NF2*-Gens nachweisen, die diesem histologischen Progress entsprochen hätte. Allerdings konnte erneut ein LOH 22q detektiert werden, der dem in Abbildung 12 gezeigten entsprach. Dagegen zeigte die Mikrosatellitenanalyse des Chromosomenarms 11q nun einen vollständigen LOH 11q. Während sich im Primärtumor in der Mutationsanalyse des *MEN1*-Gens noch der Wildtyp zeigte, kam nun eine Mutation des *MEN1*-Gens im Exon 10 zur Darstellung. Bei dieser Mutation kam es durch einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin zu einem Stopcodon. Somit ließ sich der histologische Progress auch auf molekulargenetischer Ebene nachvollziehen mit einem zunächst nur inkompletten und später dann kompletten LOH 11q sowie einem Nachweis einer *MEN1*-Mutation im Rezidivtumor.

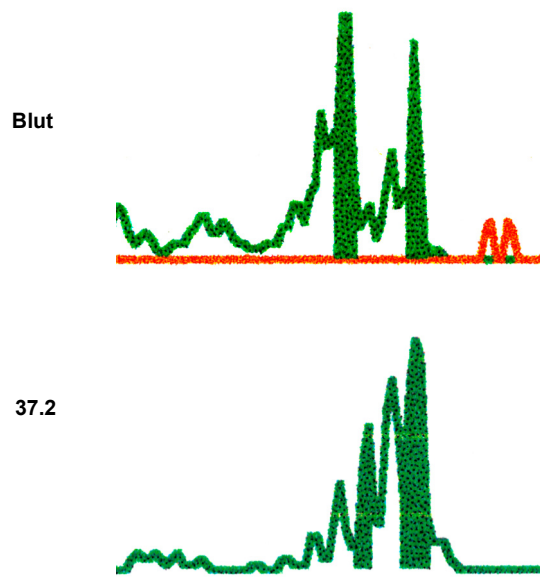


Abbildung 15a – Mikrosatellitenanalyse von Tumor 37.2, Primer CA3

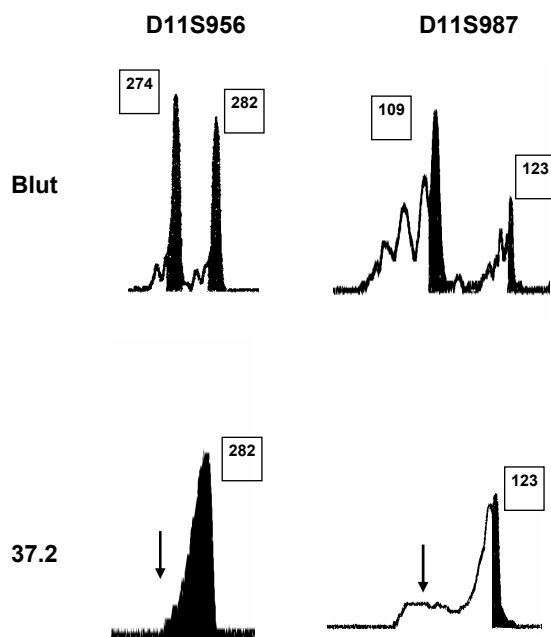


Abbildung 15b – Mikrosatellitenanalyse von Tumor 37.2, Primer D11S956 und D11S987

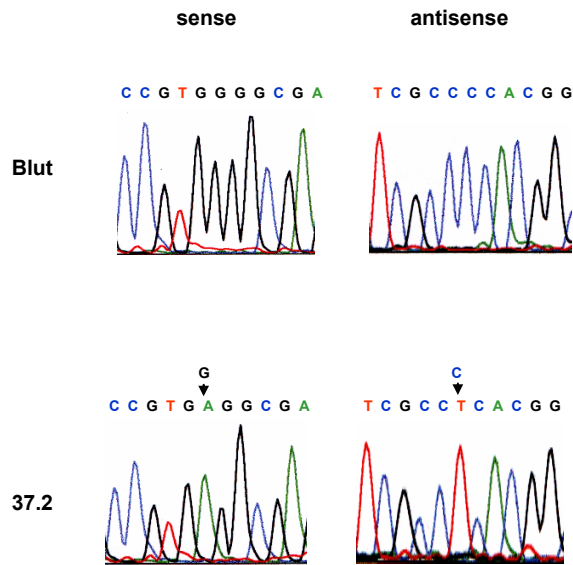


Abbildung 15c – Mutationsanalyse *MEN1* von Tumor 37.2

In den darauf folgenden Jahren 1998 und 1999 wurden weitere Tumoren bei der Patientin diagnostiziert. Zunächst kam es zu einem erneuten Rezidiv im 4. Ventrikel. Auch dieser Tumor war ein anaplastisches Ependymom ohne *NF2*-Mutation, jedoch weiterhin mit LOH 22q. Auch in Bezug auf den Chromosomenarm 11q und das *MEN1*-Gen zeigte sich ein konstanter Befund mit LOH 11q und der identischen Mutation im *MEN1*-Gen. Schließlich trat 1999 eine intradurale Fernmetastase in Höhe LWK 4-5 auf. Auch dieser Tumor wurde histologisch als anaplastisches Ependymom WHO Grad III klassifiziert. Und auch in diesem Fall ließ sich neben einem LOH 22q keine Mutation des *NF2*-Gens detektieren. Die Untersuchungen in Bezug auf Chromosom 11 zeigten weiterhin die bereits in den vorherigen Tumoren gezeigten Veränderungen. Schließlich verstarb die Patientin an ihrem Tumorleiden.

4. Diskussion

Molekulargenetische Untersuchungen an Tumoren haben unter anderem das Ziel, Modelle für die Entstehung der Tumorentität zu entwickeln sowie prognostisch unterschiedliche Tumorsubgruppen zu definieren. Für Gliome und auch Meningeome ist die Entwicklung molekulargenetisch basierter Einteilungsschemata im Gegensatz zu Ependymomen bereits relativ weit fortgeschritten (Ware et al. 2003, Osborne et al. 2001, Maruno et al. 1998, Ozaki et al. 1999).

Meningeome treten ebenso wie Ependymome gehäuft bei Patienten mit NF2 auf, und sowohl bei NF2-assoziierten als auch bei sporadischen Meningeomen wurden gehäuft Monosomien des Chromosoms 22 und Allelverluste auf dem Chromosomenarm 22q beobachtet (Sawyer et al. 2000, Lamszus et al. 1999). Molekulargenetische Untersuchungen engten die häufigste minimal deletierte Region bei Meningeomen auf 22q12 ein und zeigten, dass das hier lokalisierte *NF2*-Tumorsuppressorgen bei ca. 60 % aller Meningeome mutiert ist (Kleihues et al. 2000, Szijan et al. 2003, Kros et al. 2001). Darüber hinaus ließen sich bei Meningeomen mehrere weitere chromosomale Regionen definieren, die gehäuft von Allelverlusten betroffen sind. Diese befinden sich vor allem auf den Chromosomenarmen 1p, 6q, 10q, 14q und 18q. Während Mutationen des *NF2*-Gens und LOH 22q in annähernd gleicher Häufigkeit bereits bei benignen Meningeomen des WHO Grades I vorliegen, fanden sich die genannten weiteren Deletionen signifikant häufiger in atypischen Meningeomen (WHO Grad II). In anaplastischen Meningeomen kommen darüber hinaus LOH 9q und 17q gehäuft hinzu. Basierend auf der Häufigkeit dieser Veränderungen wurde ein Progressionsmodell entwickelt, bei dem davon ausgegangen wird, dass ein Verlust der Funktion des *NF2*-Gens ein frühes genetisches Ereignis darstellt, das bereits für die Entstehung der Meningeome von Bedeutung ist, wohingegen die zusätzlichen genannten Veränderungen offenbar für die Progression der Tumore zur Atypie (1p, 6q, 10q, 14q, 18q) bzw. Malignität (9q, 17q) relevant sind.

Für Ependymome existiert dagegen noch kein Entstehungs- oder Progressionsmodell wie für Meningeome.

4. 1. Mutationen des *NF2*-Gens bei Ependymomen

Zytogenetische Untersuchungen ergaben für Ependymome ein breites Spektrum komplexer chromosomaler Veränderungen. Die häufigsten zytogenetischen Veränderungen betreffen den Chromosomenarm 22q. Zu Beginn des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit waren lediglich fünf Publikationen zu Ependymomen veröffentlicht, die eine Mutationsanalyse des *NF2*-Gens beinhalteten. Diese präsentierten scheinbar widersprüchliche Ergebnisse. Während in vier Arbeiten, in denen insgesamt 38 Ependymome untersucht worden waren, nur eine einzige *NF2*-Mutation gefunden worden war (von Haken et al. 1996, Rubio et al. 1994, Slavc et al. 1995, de Vitis et al. 1996), was gegen eine Involvierung dieses Gens in die Pathogenese der Ependymome sprach, fand eine andere Untersuchung bei fünf von sieben untersuchten Ependymomen *NF2*-Mutationen (Birch et al. 1996). Der entscheidende Unterschied der letztgenannten Studie bestand darin, dass ausschließlich intramedullär spinal lokalisierte Ependymome einbezogen worden waren. In den anderen vier Studien waren dagegen fast ausschließlich Ependymome anderer Lokalisationen untersucht worden, wobei auch dabei die einzige gefundene *NF2*-Mutation eines von insgesamt vier untersuchten intramedullär spinal gelegenen Ependymomen betraf. Diese Arbeiten legen nahe, dass möglicherweise ein entscheidender lokalisationsabhängiger Unterschied in der molekularen Pathogenese der Ependymome bestehen könnte.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um an einer repräsentativen Anzahl von Ependymomen verschiedener Herkunft zu untersuchen, ob *NF2*-Mutationen mit einer bestimmten Tumorlokalisierung assoziiert sind. Das Hauptergebnis der Arbeit ist, dass dies tatsächlich der Fall ist. Von 52 untersuchten Tumoren wiesen sechs Tumoren, die von insgesamt fünf verschiedenen Patienten stammten, eine *NF2*-Mutation auf. Alle diese Tumoren waren intramedullär spinal lokalisiert. Keines der Ependymome im Bereich des Ventrikelsystems, keines der Ependymome im Filum terminale und keines der intracerebral gelegenen Ependymome wies dagegen eine *NF2*-Mutation auf.

Noch während der Durchführung des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die eine Analyse von *NF2*-Mutationen bei Ependymomen zum Inhalt hatte (Ebert et al. 1999). In dieser Arbeit an insgesamt 62 Ependymomen bestätigte sich das gleiche Phänomen, dass nämlich alle der insgesamt

sechs gefundenen *NF2*-Mutationen intramedullär spinal lokalisierte Tumoren betrafen und keinen einzigen Tumor anderer Lokalisation. Das Ergebnis der Studie von Ebert et al. deutet zusammen mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit und den Untersuchungen von Birch et al. darauf hin, dass sich innerhalb der intramedullär spinal gelegenen Ependymome eine genetisch distinkte Subgruppe definieren lässt, die durch Mutationen des *NF2*-Gens gekennzeichnet ist (Birch et al. 1996). Interessanterweise entwickeln auch Patienten mit *NF2* nahezu ausschließlich intramedullär spinale Ependymome und nicht etwa intracerebrale, ventrikellosoziierte oder im Filum terminale gelegene Tumoren, so dass die Veränderung des *NF2*-Gens sowohl für die hereditär assoziierten als auch für die sporadischen intramedullären Ependymome relativ typisch zu sein scheint.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 21 intramedullär spinal gelegene Ependymome von 20 verschiedenen Patienten untersucht. Der Anteil von Patienten mit intratumoralen *NF2*-Mutationen beträgt somit 25% (fünf von 20). In der Untersuchung von Ebert et al. lag dieser Anteil mit 35% (sechs von 17 untersuchten intramedullär spinalen Ependymomen) etwas höher (Ebert et al. 1999). In der Studie von Birch et al. 1996 lag der Anteil mit 71% (fünf von sieben) sogar noch deutlich höher. Sowohl in der Studie von Ebert et al. als auch von Birch et al. war zur Detektion von *NF2*-Mutationen eine Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse verwendet worden. Im Gegensatz dazu verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit die TGGE-Analyse, eine Methode, die im Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik auch zum routinemäßigen Screening von *NF2*-Patienten von Frau Dr. Lan Kluwe etabliert wurde (Kluwe et al. 1998). In früheren Jahren wurden im Labor ebenfalls SSCP-Analysen für das *NF2*-Gen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mutationsdetektionsrate der TGGE-Analyse nicht unter der von SSCP-Analysen lag. Die etwas geringere Detektionsrate von *NF2*-Mutationen in der vorliegenden Studie verglichen mit anderen scheint demnach allein methodisch nicht erklärbar zu sein, und die Ursache hierfür mag zufällig sein. Zusammenfassend deuten die derzeit vorliegenden Studien zu *NF2*-Mutationen in Ependymomen darauf hin, dass etwa ein Drittel aller intramedullär spinal lokalisierten Ependymome von Mutationen betroffen ist.

In der Arbeit von Ebert et al. 1999 waren sechs von 14 untersuchten intramedullär spinal gelegenen Ependymomen WHO Grad II von Mutationen betroffen, jedoch keines

von drei untersuchten anaplastischen Ependymomen WHO Grad III. In der vorliegenden Studie waren jedoch auch zwei anaplastische Ependymome von *NF2*-Mutationen betroffen, davon ein Rezidiv, sodass offenbar *NF2*-Mutationen nicht ausschließlich auf benigne Ependymome beschränkt sind. Das häufige Vorkommen von *NF2*-Mutationen in benignen intramedullär spinalen Ependymomen deutet allerdings darauf hin, dass die *NF2*-Mutation – ähnlich wie bei Meningeomen auch – tendenziell ein frühes Ereignis in der Tumorphogenese ist und nicht erst im Verlauf der Tumorprogression zur Anaplasie auftritt. Eine prognostische Bedeutung der *NF2*-Mutation für Patienten mit intramedullär spinal gelegenem Ependymom lässt sich dabei aus den vorliegenden Daten nicht ableiten, da mit einer Ausnahme alle Patienten, in deren Ependymom sich eine *NF2*-Mutation fand, zum Ende der Studie noch am Leben waren.

Prognostisch entscheidend für das Überleben der Patienten in der vorliegenden Studie scheint vor allem die Tumorlokalisation zu sein: während nur ein Patient mit einem intramedullär spinalem Ependymom und keiner der Patienten mit einem Filum terminale Ependymom bis zum Zeitpunkt der Studie verstorben war, waren über 50% der Patienten mit ventrikellokalisierten oder intracerebralen Ependymomen verstorben. Dieses Ergebnis bestätigt die aus der Literatur bekannte Assoziation zwischen einer besseren Prognose und einer spinalen Tumorlokalisation im Vergleich zu einer intracerebralen Lokalisation (Schiffer et al. 1998, McLaughlin et al. 1998). Auch bestätigt sich in der vorliegenden Studie, dass Patienten mit intrakraniellen Ependymomen durchschnittlich jünger sind als Patienten mit spinalen Ependymomen (30,5 vs. 42 Jahre). Ähnlich wie in der Studie von Ebert et al. 1999 zeigte sich zudem, dass eine Mehrzahl der spinalen Ependymome benigne waren, d. h. WHO Grad II entsprachen, wohingegen die Mehrzahl der intrakraniellen Ependymome maligne, d. h. dem WHO Grad III zuzuordnen war. In der Regel sind spinale Ependymome komplett resezierbar und somit durch die Operation heilbar. Demgegenüber wachsen intrakranielle Ependymome meist wesentlich infiltrativer und sind daher oft nicht vollständig resezierbar. Diese Unterschiede hinsichtlich Lokalisation, Malignitätsgrad, Patientenalter und Prognose finden sich in der vorliegenden Studie partiell auf genetischer Ebene reflektiert, und zwar insofern, als die prognostisch günstigen intramedullär spinalen Ependymome sowohl *NF2*-Mutationen als auch den höchsten

Prozentsatz an LOH 22q aufweisen, worauf im folgenden Abschnitt noch näher eingegangen wird.

4.2. LOH 22q bei Ependymomen

Alle Tumore, in denen sich *NF2*-Mutationen fanden, wiesen gleichzeitig einen LOH 22q auf, und statistisch waren *NF2*-Mutationen signifikant mit einem LOH 22q assoziiert. Dies bedeutet, dass in diesen Fällen ein kompletter Verlust der *NF2*-Wildtyp-Genfunktion vorliegt, was entsprechend der sogenannten Knudson-Hypothese für die Tumorphathogenese entscheidend ist. Die Knudson-Hypothese besagt, dass der Verlust eines Allels eines Tumorsuppressorgens kausal noch nicht ausreichend ist für die Entstehung eines Tumors; erst nach dem Verlust beider Allele kommt es zur Tumorentstehung (Knudson et al. 1971). Im Falle hereditärer Erkrankungen wie der *NF2* ist der Verlust des ersten Allels – nach Knudson als erster „hit“ bezeichnet – bereits angeboren, während der zweite „hit“ erst später im Verlauf des Lebens erfolgt. Typischerweise ist dabei der erste „hit“ zumeist eine kleine Mutation, wohingegen der zweite „hit“ häufig eine größere Deletion ist oder ein Verlust eines kompletten Chromosomenarms oder Chromosoms. Da bei hereditären Erkrankungen, für die Tumorsuppressorgene verantwortlich sind, der erste „hit“ bereits bei der Geburt vorliegt, treten die typischen Tumoren in der Regel in jüngerem Alter auf als die entsprechenden sporadischen Tumoren bei nicht hereditär betroffenen Patienten.

In der vorliegenden Studie fand sich bei 14 von 20 (70%) untersuchten Patienten mit intramedullär spinalen Ependymomen ein LOH 22q. Damit war ein LOH 22q signifikant häufiger bei intramedullär spinal lokalisierten Tumoren als bei Tumoren in anderen Lokalisationen. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit dem ausschließlichen Auftreten von Mutationen des bei 22q12 lokalisierten *NF2*-Gens bei intramedullär spinalen Ependymomen. Allerdings fanden sich innerhalb der Gruppe der intramedullär spinalen Ependymome auch neun Tumoren, die zwar einen LOH 22q, jedoch keine *NF2*-Mutation aufwiesen. Möglicherweise wurden in einigen dieser Fälle mit der TGGE-Analyse *NF2*-Mutationen nicht detektiert. Beispielsweise sind Deletionen ganzer Exons mit der TGGE-Methode nicht detektierbar. In einem solchen Fall würde bei gleichzeitigem Vorliegen eines LOH vermutlich lediglich die DNA aus dem – immer auch z. B. in Tumorblutgefäßen enthaltenen – Normalgewebe amplifiziert

werden, wodurch sich keine aberrante Bande in der TGGE-Analyse fände. Darüber hinaus ist bekannt, dass auch für kleinere Mutationen wie Punktmutationen die Aufdeckungsrate der TGGE nicht 100% ist, da diese Mutationen nicht notwendigerweise immer zu erkennbaren Schmelzpunktdifferenzen führen. Bei direktem Sequenzieren läge diese Aufdeckungsrate höher.

Neben methodologischen Erklärungsansätzen für die Tatsache, dass nicht alle Tumoren mit LOH 22q eine *NF2*-Mutation aufwiesen, bieten sich auch verschiedene biologische Erklärungen an. Denkbar wäre zum einen, dass die Deletionen auf dem Chromosomenarm 22q rein zufällig bzw. durch eine unspezifische chromosomale Instabilität erfolgt sind. Dagegen spricht jedoch die überproportionale Häufung in den intramedullär spinalen Tumoren. Eine weitere und von vielen Autoren zu diesem Thema favorisierte Möglichkeit besteht darin, dass auf dem Chromosomenarm 22q noch ein oder mehrere andere, für die Ependymompathogenese relevante Tumorsuppressorgene lokalisiert sein könnten. In der vorliegenden Studie waren in allen Fällen mit LOH 22q sämtliche untersuchte und informative Mikrosatellitenallele von einer allelischen Imbalance betroffen, so dass sich hieraus keine Hinweise auf weitere potentielle Tumorsuppressorgenregionen auf 22q ergeben. Andere zyto- und molekulargenetische Studien bieten jedoch diesbezüglich vielfältige Hinweise, wie im folgenden Abschnitt dargestellt wird.

4.3. Weitere potentielle Tumorsuppressorgene auf 22q

Für ein weiteres Tumorsuppressorgen auf 22q spricht vor allem eine Studie von Hulsebos et al. an einer Familie, die nicht von *NF2* betroffen ist, in der jedoch vier Cousins ein Ependymom entwickelten (Hulsebos et al. 1999). Eine komparative genomische Hybridisierung, die am Tumor eines dieser Patienten durchgeführt wurde, ergab, dass eine Monosomie des Chromosoms 22 die einzige detektierbare genetische Veränderung war. Eine Segregationsanalyse der Familie zeigte, dass der wahrscheinliche chromosomale Ort für ein ependymomrelevantes Gen die Region 22pter-22q11.2 war. Alle Ependymome in der Familie waren ventrikellosoziierte Tumoren. Interessanterweise fand sich auch in der vorliegenden Studie ein LOH 22q nicht selten in ventrikellosoziierten Ependymomen. Und zwar wiesen vier von zehn Patienten (40%) mit zum Teil rezidierten oder metastasierten ventrikellosoziierten

Ependymomen einen LOH 22q auf. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise ein weiteres Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22, das sich auf dem langen Arm proximal von 22q11.2 oder auf dem kurzen Arm finden könnte, insbesondere bei ventrikellokalisierten intracerebralen Ependymomen von Bedeutung sein könnte.

Zytogenetische Studien an Ependymomen ergeben Hinweise auf mehrere verschiedene Regionen auf dem Chromosom 22, in denen sich ependymomrelevante Gene finden könnten. Park et al. untersuchten den Tumor eines Kindes, das im Alter von fünf Jahren ein Ependymom entwickelte. Darin fand sich eine Translokation $t(1;22)(p22;q11.2)$ zwischen dem *DiGeorge*-Locus (22q11.21) und dem *BCR*-Locus (22q11.22) (Park et al. 1996). In einer Anschlussstudie (Rhodes et al. 1997) engte die Arbeitsgruppe den Bruchpunkt in dieser Region auf 22q11.21 ein und lokalisierte ihn zwischen die Marker ARVCF und D22S264. Diese Region liegt distal der von Hulsebos et al. 1999 definierten Region auf 22q, was für das Vorliegen eines weiteren Tumorsuppressorgens sprechen könnte. Andererseits ist die von Rhodes et al. 1997 beobachtete Translokation möglicherweise gar nicht für eine Inaktivierung oder Überaktivierung eines Tumorsuppressor- bzw. Onkogens auf Chromosom 22 von Bedeutung, sondern könnte auch zu einer tumorrelevanten Veränderung des Expressionsstatus eines Gens auf Chromosom 1 geführt haben.

Eine andere zytogenetische Studie weist auf eine noch weiter distal gelegene Region auf 22q hin. Weremowicz et al. (1992) identifizierten eine balancierte Translokation in einem anaplastischen Ependymom, welche die Region 22q13.3 betraf. Einen Tumorsuppressorgenort in dieser Region legt auch eine Mikrosatellitenanalyse von Huang et al. nahe (Huang et al. 2002). Dabei ließ sich die betroffene Region auf 22q13.1-13.3 zwischen die Marker D22S274 und D22S1149 eingrenzen. Die gleiche Studie fand zusätzlich eine häufig deletierte Region zwischen 22q11.21-12.2 zwischen den Markern D22S420 und D22S300. Letztere Region ist relativ groß und schließt sowohl die von Rhodes et al. 1997 definierte Region ein als auch einen großen Teil der von Hulsebos et al. 1999 definierten Region. Ebenfalls eingeschlossen ist ein in einer Studie von Kraus et al. als minimal deletierte Region identifizierter chromosomaler Abschnitt bei 22q11 zwischen den Markern D22S257 und D22S310 (Kraus et al. 2001). Zusammengefasst sprechen diese Analysen theoretisch für das Vorhandensein von bis zu vier verschiedenen potentiellen Tumorsuppressorgenregionen

auf dem langen Arm von Chromosom 22 zusätzlich zu dem *NF2*-Gen. Denkbar ist jedoch auch, dass es sich bei einigen der Studien um zufällige und nicht spezifische Deletionen gehandelt hat; und außerdem sind Artefakte bei Mikrosatellitenanalysen prinzipiell nie vollständig auszuschließen.

Neben dem *NF2*-Gen wurden vereinzelt auch andere Kandidaten-Tumorsuppressorgene auf 22q gezielt auf Veränderungen in Ependymomen untersucht. Das *hSNF5/INI1 (SMARCB1)*-Gen ist in der Region 22q23 lokalisiert. In einer Studie an 126 Meningeomen fanden sich insgesamt vier identische Mutationen in vier verschiedenen Tumoren, woraus auf eine Bedeutung dieses Gens für die Pathogenese einer Subgruppe der Meningeome mit LOH 22q geschlossen wurde (Schmitz et al. 2001). In der bereits erwähnten Studie von Kraus et al. wurde das *hSNF5/INI1*-Gen in insgesamt 53 Ependymomen von 48 verschiedenen Patienten untersucht (Kraus et al. 2001). Dabei fand sich jedoch keine einzige Mutation, so dass das *hSNF5/INI1*-Gen demnach offenbar nicht in die Pathogenese von Ependymomen involviert ist. Das gleiche Ergebnis fand sich auch in einer Studie an 229 Tumoren verschiedener Herkunft, in der neben primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs), Medulloblastomen, Mammakarzinomen etc. unter anderem auch 25 Ependymome untersucht worden waren (Sevenet et al. 1999).

Weitere Kandidatengene auf 22q wurden bislang lediglich in Zusammenhang mit Meningeomen gebracht, und Untersuchungen an Ependymomen stehen dabei noch aus. Diese Gene wurden vor allem in der Arbeitsgruppe von J.P. Dumanski charakterisiert. Das *CLTCL1/CLH-22*-Gen ist in der Region 22q11.2 lokalisiert. Northern Blot Analysen ergaben, dass sich eine Expression dieses Gens nur in neun von 46 sporadischen Meningeomen nachweisen ließ, so dass 80% der Tumore keine Expression zeigten (Kedra et al. 1996). Ein anderes interessantes Gen, das bei 22q12 lokalisiert ist, ist das *ADTBI/BAM22*-Gen. In 110 untersuchten Meningeomen fanden sich allerdings lediglich Polymorphismen dieses Gens und keine Mutationen (Peyrard et al. 1996). Ein drittes Gen ist das *LARGE*-Gen, das bei 22q12.3-q13.1 lokalisiert ist. Dieses Gen ist mit >664 kb extrem groß, was die Mutationssuche erschwert, und bislang sind weder für Meningeome noch für Ependymome diesbezüglich Ergebnisse bekannt (Peyrard et al. 1999).

Tumorsuppressorgene können nicht nur durch Mutationen bzw. chromosomale Verluste in ihrer Funktion inaktiviert werden, sondern auch durch epigenetische Veränderungen. Der häufigste Mechanismus hierbei ist die Methylierung von Promotersequenzen, die zur transkriptionellen Inaktivierung des Gens führt (Oakeley et al. 1999, Mills et al. 2002). In Kombination mit einem LOH führt die Inaktivierung eines Allels durch Methylierung zum kompletten Verlust der Funktion dieses Gens, was einen alternativen Mechanismus zu dem von Knudson angenommenen Mechanismus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen darstellt (Knudson et al. 1971). Für das *NF2*-Gen ist beschrieben, dass bestimmte Promoterabschnitte in Schwannomen häufig methyliert sind (Kino et al. 2001). Es ist bislang jedoch weder an Ependymomen noch an Meningeomen untersucht, ob dieser Mechanismus für die Tumorentstehung eine Bedeutung hat. Um zu klären, ob in Tumoren mit LOH 22q, in denen sich keine *NF2*-Mutation nachweisen lässt, dennoch ein Verlust des *NF2*-Genprodukts vorliegt, wären Untersuchungen auf Proteinebene hilfreich. Diese könnten einen Verlust des Merlin Proteins in den Tumoren detektieren. Es existieren auch verschiedene immunhistochemische Studien zum Nachweis von Merlin in Hirntumoren, darunter auch Ependymomen. In einer Studie fand sich in drei von acht Ependymomen ein hochgradiger Verlust des Merlin-Proteins (Gutmann et al. 1997) und in einer anderen Studie fand sich ein Verlust des Merlin-Proteins in zwei von sieben Ependymomen (Huynh et al. 1997). Leider differenzieren beide Studien nicht zwischen verschiedenen Tumorlokalisationen, so dass nicht bekannt ist, ob Verluste des Merlin-Proteins ausschließlich spinale intramedulläre Ependymome oder auch solche in anderen Lokalisationen betreffen.

4.4. Veränderungen auf Chromosomenarm 11q – inverse Assoziation zu LOH 22q

Parallel zu der hier dargestellten Analyse des Chromosomenarms 22q und des *NF2*-Gens wurde an denselben Tumorproben im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit eine Mikrosatellitenanalyse des Chromosomenarms 11q und des bei 11q13 lokalisierten *MEN1*-Gens durchgeführt (Dissertation Lenard Lachenmayer, Universität Hamburg). Das *MEN1*-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, das bei dem Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 Syndrom (MEN1) von Mutationen betroffen ist. MEN1-Patienten entwickeln überwiegend Tumore der Nebenschilddrüse, des Pankreas und der Adenohypophyse.

Mehrere Veröffentlichungen berichten darüber hinaus von Ependymomen bei MEN1-Patienten (Shepherd et al. 1991, Kato et al. 1996, Giraud et al. 1997). Darunter ist auch eine Publikation, in der ein LOH des *MEN1*-Gens, der zum Verlust auch des Wildtyp Allels geführt hatte, in einem thorakal gelegenen Ependymom nachgewiesen wurde (Kato et al. 1996). Darüber hinaus wurden sechs sporadische Ependymome, davon drei pädiatrische Ependymome, mit Veränderungen des Chromosoms 11 beschrieben (Arnoldus et al. 1992, Jenkins et al. 1989, Ransom et al. 1992, Sawyer et al. 1994, Weremowicz et al. 1992, Wernicke et al. 1995). Weitere vier pädiatrische Ependymome mit Veränderungen der chromosomalen Region 11q13 sind beschrieben, davon drei Translokationen (Dal Cin et al. 1988, Neumann et al. 1993, Sainati et al. 1992) und eine Inversion (Jenkins et al. 1989).

Die Assoziation einiger Ependymome mit dem MEN1-Syndrom sowie die Involvierung der Region 11q13 in chromosomale Aberrationen bei sporadischen Ependymomen legen nahe, dass das *MEN1*-Gen möglicherweise für die Ependymompathogenese relevant sein könnte. Die Mutationsanalyse der gesamten kodierenden Region des *MEN1*-Gens an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorproben detektierte eine Mutation bei einer Patientin mit einem Ependymom des 4. Ventrikels (Patient Nr. 37). Die Mutation trat erst in dem ersten Rezidiv auf und noch nicht in dem Ersttumor, der allerdings bereits einen partiellen LOH 11q aufwies. Das erste Rezidiv sowie ein zweites Rezidiv und eine liquogene Metastase zeigten alle sowohl die Mutation als auch einen LOH 11q. Auf die Darstellung der Ergebnisdetails der Mutationsanalyse wird hier verzichtet und auf die Arbeit von Lenard Lachenmayer verwiesen, da diese Gegenstand der Dissertationsarbeit von Lenard Lachenmayer sind. Festzuhalten ist jedoch, dass dieses Ergebnis darauf hindeutet, dass ein Verlust der *MEN1*-Genfunktion mit der Tumorprogression bei einer Subgruppe der Ependymome assoziiert sein könnte.

Interessanterweise fand sich bei der LOH Analyse des Chromosomenarms 11q eine hochsignifikante inverse Assoziation zwischen LOH 11q und LOH 22q ($p < 0.001$, Fisher Exact Test). Mit einer Ausnahme waren bei allen Ependymompatienten, in deren Tumor sich auf dem Chromosomenarm 11q ein Allelverlust fand, alle untersuchten Mikrosatellitenmarker für die Region 22q12 heterozygot. Die Ausnahme stellt der Fall mit der *MEN1*-Mutation dar (Patient Nr. 37), bei dem bereits in dem Ersttumor sowie in beiden darauffolgenden Tumorrezidiven und der Metastase sowohl ein LOH 11q als

auch ein LOH 22q bestand. Die inverse Assoziation zwischen LOH 22q und LOH 11q könnte darauf hindeuten, dass Verluste genetischer Informationen entweder auf dem Chromosomenarm 11q oder 22q voneinander unabhängige und alternative Mechanismen repräsentieren, die für die Ependymompathogenese von Bedeutung sind.

Ein LOH 11q fand sich außer bei Patient 37 noch in sieben weiteren Tumoren von sechs verschiedenen Patienten. Dabei war jeweils keine *MEN1*-Mutation detektierbar, so dass, ähnlich wie für den LOH 22q diskutiert, auch hier entweder eine unspezifische chromosomale Instabilität oder das Vorhandensein eines oder mehrerer weiterer Tumorsuppressorgenloci auf 11q diskutiert werden muss. Für die detaillierte Diskussion potentieller Kandidatengene und -regionen wird auf die Arbeit von Lenard Lachenmayer verwiesen.

4.5. Weitere Kandidatenregionen für tumorrelevante Gene bei Ependymomen

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, weisen auch die Gene *PTEN*, *p53*, *p16* und *EGFR*, die bei Astrocytomen häufig von Mutationen bzw. Amplifikationen betroffen sind, bei Ependymomen nur in allenfalls einem minimal geringen Prozentsatz Aberrationen auf. Die einzige wirklich konsistente Veränderung, die allerdings auch nur eine Subgruppe der Ependymome betrifft, ist daher die Mutation des *NF2*-Gens bei intramedullär spinalen Tumoren. Es ist demnach zu vermuten, dass andere bekannte oder unbekannte Gene für die Ependymompathogenese eine Rolle spielen könnten.

Um chromosomale Regionen zu identifizieren, die gehäuft von Aberrationen betroffen sind, wurden früher zytogenetische Untersuchungen durchgeführt. In den vergangenen Jahren wurde zunehmend die Methode der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) eingesetzt. Während die klassische Zytogenetik eine relativ grobe Methode ist, ermöglicht die CGH-Analyse mit einer Auflösung im Bereich einiger Megabasen eine Untersuchung des gesamten Genoms auf allelische Imbalancen (van Dekken et al. 2000, Jeuken et al. 2002). Das übereinstimmende Ergebnis zytogenetischer und CGH-Analysen ist, dass die genomischen Veränderungen bei Ependymomen deutlich heterogener sind als bei Gliomen und Meningeomen.

Konsistent wurden in den meisten Studien bei etwa 30% der untersuchten ependymalen Tumoren eine Monosomie 22 oder strukturelle Aberrationen des Chromosomenarms 22q gefunden (Huang et al. 2002, Ebert et al. 1999, Mazewski et al. 1999). Hinsichtlich der Frage nach der zweithäufigsten chromosomalen Aberration unterscheiden sich die Ergebnisse verschiedener Studien jedoch bereits erheblich.

Sehr unterschiedliche Häufigkeiten fanden sich bei der Untersuchung von Veränderungen von Chromosom 6 in Ependymomen. In verschiedenen CGH-Studien schwanken die Zahlen für einen Verlust genomischen Materials zwischen 6 und 39% Prozent der untersuchten adulten und pädiatrischen Tumoren, die einen Verlust des genomischen Materials aufweisen (Mazewski et al. 1999, Reardon et al. 1999, Zheng et al. 2000, Hirose et al. 2001, Scheil et al. 2001, Carter et al. 2002). Damit stellten diese Verluste teilweise sogar die zweithäufigste detektierte Veränderung in Ependymomen innerhalb der jeweiligen Studie dar (nach Veränderungen von Chromosom 22). Dagegen konnte Ward 2001 bei keinem der 40 von ihm untersuchten pädiatrischen Ependymome Verluste von Chromosom 6 finden. Dieses Ergebnis wurde durch die unterschiedliche untersuchte Population begründet: Ward konzentrierte sich auch pädiatrische Tumoren, während alle anderen Studien Tumoren aller Altersgruppen verwandten. Dieser mögliche Hinweis auf eine genetisch distinkte Untergruppe, nämlich die der pädiatrischen Ependymome, wird durch die oben erwähnten CGH-Studien allerdings nicht bestätigt. Und auch zytogenetische Untersuchungen fanden Translokationen und Deletionen von Chromosom 6, insbesondere des langen Armes 6q, in unterschiedlicher Häufigkeit bei allen Altersgruppen (Jenkins et al. 1989, Arnoldus et al. 1992, Griffin et al. 1992, Neumann et al. 1993, Rogatto et al. 1993, Slavic et al. 1995, Wernicke et al. 1995).

Neben Alterationen von Chromosom 6 wurden auch Veränderungen der Chromosomen 10 und 17 bei Ependymomen besonders häufig berichtet, wie in der Einleitung bereits ausführlicher dargestellt wurde.

Weiterhin wurden zahlreiche Veränderungen auf weiteren Chromosomen beschrieben. Diese Berichte zeigen jedoch vorwiegend sehr selten beobachtete Veränderungen, so dass an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden soll. Hinweise auf typische, mit Ependymomen assoziierte Veränderungen lassen sich dabei nicht finden, lediglich

die besondere Heterogenität molekulargenetischer Veränderungen bei Ependymomen wird unterstrichen.

Durch die Einführung der CGH bei der Untersuchung genetischer Veränderungen lassen sich nicht nur Verluste genetischen Materials durch Translokationen oder Deletionen nachweisen, sondern auch lokale Zugewinne. Diese können Hinweis auf amplifizierte proto-Onkogene sein. Amplifizierung oder Überexpression eines Onkogens können entscheidend beitragen zur Tumorentstehung. Verschiedene Studien konnten einheitlich den Nachweis genomischer Zugewinne auf dem Chromosomenarm 1q bei 17 bis 22% der untersuchten Ependymome belegen (Reardon et al. 1999, Hirose et al. 2001, Scheil et al. 2001, Ward et al. 2001, Carter et al. 2002). Einige dieser Studien geben Hinweise auf eigene Subgruppen, die mit dieser genetischen Veränderung assoziiert sind. So fanden Scheil et al. 2001 diese Zugewinne lediglich in pädiatrischen Tumoren, und auch Carter et al. 2002 konnte diesen Trend bestätigen. Die Untersuchung von Carter legt sogar einen möglichen Zusammenhang zwischen Zugewinnen auf Chromosom 1q und histologischem Progress nahe, da besonders aggressive Ependymome diese Veränderung aufwiesen. Allerdings gelang bislang noch nicht der Nachweis eines proto-Onkogens auf Chromosomenarm 1q, das im Zusammenhang zur Pathogenese von Ependymomen steht.

Daneben konnten CGH-Studien weitere Zugewinne auf vielen Chromosomen detektieren, darunter 4q, 5q, 7q, 8q, 9q, 12q, 17, 20q (Ransom et al. 1992, Zheng et al. 2000, Granzow et al. 2001, Hirose et al. 2001, Ward et al. 2001, Carter et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nicht näher auf diese Zugewinne eingegangen werden, da im Mittelpunkt dieser Untersuchung die Detektion und Diskussion relevanter Tumorsuppressorgene bei Ependymomen stehen soll. Daneben fanden sich in den bislang durchgeführten Studien über Zugewinne bei Ependymomen weitgehend widersprüchliche Ergebnisse, so dass eine Diskussion dieser Problematik im Rahmen weiterer Untersuchungen erfolgen sollte, die diese Unklarheiten aufklären.

Die bislang bei Ependymomen gefundenen genetischen Veränderungen stellen sich also sehr heterogen dar, ohne einen erkennbaren Schwerpunkt außer den beschriebenen Veränderungen auf dem Chromosomenarm 22q. Weitere Untersuchungen müssen zeigen,

ob sich aus diesem bunten Muster genetischer Veränderungen ein Schema erstellen lässt, das klinisch relevante Vorhersagen erlaubt.

4.6. Schlussfolgerung

Die molekular- und zytogenetischen Veränderungen bei Ependymomen sind heterogen. Diese – verglichen mit anderen neuroektodermalen Tumoren – nach bisherigen Kenntnissen deutlich ausgeprägtere Heterogenität weist darauf hin, dass der Entstehung und Progression von Ependymomen komplexe pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen. Bislang sind Mutationen des *NF2*-Gens, die sich bei etwa einem Drittel aller intramedullär spinalen Ependymome finden, die einzige identifizierte konsistente Genveränderung bei einer Subgruppe der Ependymome. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie in allen Tumoren, die eine *NF2*-Mutation aufwiesen, gleichzeitig ein LOH 22q bestand, deutet auf einen kompletten Verlust der *NF2*-Genfunktion in diesen Tumoren hin, was für eine Relevanz dieses Verlustes für die Tumorphagenese im Sinne der Knudson'schen „Two-hit“ Hypothese für Tumorsuppressorgene spricht.

Zusätzlich zu den mit *NF2*-Mutationen kombinierten LOHs fanden sich zahlreiche Tumore, in denen lediglich ein LOH 22q bestand, jedoch keine *NF2*-Mutation. Für diese Tumore ist das Vorliegen eines weiteren relevanten Tumorsuppressorgens auf 22q in Betracht zu ziehen, wobei bisherige publizierte Studien noch keine konkreten Anhaltspunkte für ein solches Gen liefern konnten und insbesondere die Involvierung des bei 22q23 lokalisierten *hSNF5/IN11*-Gens offenbar auszuschließen ist (Kraus et al. 2001). Verschiedene molekulargenetische Studien sprechen zusammengenommen dafür, dass theoretisch bis zu vier weitere – mehr oder weniger gut eingegrenzte – Regionen auf 22q als Lokalisationsort potentieller Tumorsuppressorgene in Betracht kommen.

Neben Veränderungen auf dem Chromosomenarm 22q kommen zahlreiche weitere Regionen auf anderen Chromosomen in Betracht, in denen sich ependymomrelevante Tumorsuppressor- oder Onkogene finden könnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang das im Rahmen der vorliegenden Studie – unter Einbeziehung der von Lenard Lachenmayer erhobenen Daten – gewonnene Ergebnis einer inversen Assoziation von LOH 22q mit LOH 11q. Dieses könnte auf unterschiedliche

Pathomechanismen hindeuten, die alternativ zur Ependymomentstehung und/ oder –progression beitragen könnten.

Die Ergebnisse der in den vergangenen Jahren publizierten CGH-Analysen sind vor allem hinsichtlich der gefundenen Verluste chromosomalen Materials äußerst heterogen und zum Teil widersprüchlich. Eine vergleichsweise höhere Übereinstimmung herrscht hinsichtlich der Detektion von Zugewinnen genomischen Materials auf dem Chromosomenarm 1q. Dieser recht konsistente Befund vor allem bei kindlichen Ependymomen lässt vermuten, dass hier ein relevantes Onkogen zu finden sein könnte. Ansonsten deutet die ausgeprägte Heterogenität der CGH-Analysen darauf hin, dass möglicherweise bei Ependymomen generell eine hohe chromosomale Instabilität besteht, so dass ein großer Teil dieser Verluste auch durch Zufall bedingt sein könnte. Diese Vielfalt gefundener Veränderungen gestaltet die Suche nach relevanten Tumorsuppressor- und Onkogenen bei Ependymomen deutlich schwieriger als bei Astrocytomen und Oligodendrogliomen, wo bekanntlich bereits zahlreiche konsistente Veränderungen einzelner Gene identifiziert werden konnten.

5. Zusammenfassung

Ependymome sind gliale Tumoren, die sich von den ventrikelauskleidenden Ependymzellen herleiten. Sie können sowohl intrakraniell als auch intraspinal auftreten. Intraspinale Ependymome haben eine deutlich bessere Prognose als intrakranielle und treten tendenziell in höherem Lebensalter auf, wohingegen intrakranielle Ependymome bei Kindern häufiger sind. Patienten mit dem Krankheitsbild der Neurofibromatose 2 (NF2) entwickeln häufig Ependymome neben Schwannomen und Meningeomen. Bei sporadischen Ependymomen zeigten einzelne Publikationen, die bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlicht waren, scheinbar widersprüchliche Ergebnisse. In den meisten Studien waren keine Mutationen des *NF2*-Gens gefunden worden, und einige, die in einer anderen Studie gefunden wurden, betrafen lediglich intramedullär spinal lokalisierte Ependymome. In der vorliegenden Studie wurden 52 Ependymome von 45 verschiedenen Patienten auf Mutationen des in der chromosomalen Region 22q12 lokalisierten *NF2*-Gens sowie auf Mikrosatellitenverluste in dieser Region untersucht. Von den 52 untersuchten Tumoren waren 21 spinal intramedullär, 14 intraventrikulär, 11 im Filum terminale und 6 intracerebral lokalisiert. Vier Tumore waren myxopapilläre Ependymome, WHO Grad I; 28 waren Ependymome, WHO Grad II; und 20 waren anaplastische Ependymome, WHO Grad III. In sechs der intramedullär spinal lokalisierten Ependymomen, die insgesamt von fünf verschiedenen Patienten stammten, fanden sich Mutationen des *NF2*-Gens. Dagegen fand sich bei keinem der Ependymome aus anderen Lokalisationen eine *NF2*-Mutation. In allen sechs der von *NF2*-Mutationen betroffenen Tumoren lag gleichzeitig ein Heterozygotieverlust (LOH) für die auf dem Chromosomenarm 22q untersuchten Mikrosatellitenmarker vor, so dass in allen diesen Fällen von einer kompletten Inaktivierung des *NF2*-Gens auszugehen ist. Damit lässt sich eine Subgruppe intramedullär spinaler Ependymome definieren, die durch spezifische genetische Veränderungen charakterisiert ist. Eine prognostische Bedeutung dieser Veränderungen intramedullär spinaler Ependymome lässt sich derzeit nicht herleiten, da nahezu alle dieser Patienten zum Zeitpunkt der Studie noch lebten. Allerdings hatten generell Patienten mit spinalen Ependymomen häufiger benigne Tumore als Patienten mit intrakraniellen Ependymomen und dementsprechend auch eine bessere Prognose; darüber hinaus waren sie tendenziell bei Tumormanifestation älter als Patienten mit intrakraniellen Ependymomen. Ein LOH 22q fand sich signifikant häufiger bei intramedullär spinal lokalisierten Tumoren (~70%) als bei

Ependymomen in anderen Lokalisationen ($p = 0.003$). Obwohl statistisch ein LOH 22q signifikant mit Mutationen des *NF2*-Gens assoziiert war ($p = 0.013$), fanden sich innerhalb der Gruppe der intramedullär spinalen Ependymome auch neun Tumore, die zwar einen LOH 22q, jedoch keine *NF2*-Mutation aufwiesen. Ebenfalls war in der Gruppe der ventrikellokalisierten Ependymome die Frequenz von LOH 22q mit 40% relativ hoch. Dies deutet darauf hin, dass auf dem Chromosomenarm 22q möglicherweise noch andere ependymomrelevante Tumorsuppressorgene lokalisiert sein könnten. Bislang ergibt sich jedoch aus publizierten Studien kein konkreter Hinweis auf ein bestimmtes Gen, und molekulargenetische Analysen deuten auf mehrere weitere potentielle Tumorsuppressorgenregionen auf 22q hin. Interessanterweise fand sich eine hochsignifikante inverse Assoziation zwischen LOH 22q und Heterozygotieverlusten in der Region 11q13, die im Rahmen einer parallel durchgeführten Studie untersucht wurde. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Verluste genetischer Informationen entweder auf dem Chromosomenarm 22q oder auf 11q voneinander unabhängige und alternative pathogenetische Mechanismen bei Ependymomen darstellen könnten. Als Hauptergebnis der vorliegenden Studie ist festzuhalten, dass ein Verlust der *NF2*-Genfunktion ausschließlich bei einer Subgruppe intramedullär spinal lokalisierter Ependymome zu finden ist, was für einen spezifischen pathogenetischen Entstehungsmechanismus dieser Gruppe von Tumoren spricht.

5. Literaturverzeichnis

- * Afra D, Müller W, Slowik F, Wilcke O, Budka H, Turoczy L. Supratentorial lobar ependymomas: report on the grading and survival periods in 80 cases, including 46 recurrences. *Acta Neurochir* 1983; 69(3-4): 243-251
- * Arnoldus EP, Raap AK, Peters AC, van der Ploeg M. Interphase cytogenetic analysis of gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* 1992; 94 Suppl S 34-35
- * Asazuma T, Toyama Y, Suzuki N, Fujimura Y, Hirabayashi K. Ependymomas of the spinal cord and cauda equina. An analysis of 26 cases and a review of the literature. *Spinal Cord* 1999; 37(11): 753-759
- * Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Emanuel BS. Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain. *J Neurosurg* 1990; 73(5): 710-714
- * Bigner SH, Mark J, Bigner DD. Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 47(2): 141-154
- * Bijlsma EK, Voesten AM, Bijleveld EH, Troost D, Westerveld A, Merel P, Thomas G, Hulsebos TJ. Molecular analysis of genetic changes in ependymomas. *Genes Chromosom Cancer* 1995; 13(4): 272-277
- * 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* 1996; 39(1): 135-140
- * Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, Griffiths M, Larkins S, Hibbert S, Middleton H, Kelsey A, Tritton D, Mitchell C. Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol.* 2002 Jan;38(1):11-21
- * Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 586-599

- * Brotchi J, Dewitte O, Levivier M, Baleriaux D, Vandesteene A, Raftopoulos C, Flament-Durand J, Noterman J. A survey of 65 tumors within the spinal cord: surgical results and the importance of preoperative magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 1991; 29: 651-656
- * Burger P, Scheithauer B. Tumors of the central nervous system. Atlas of tumor pathology 3rd series, Fascicle 10. Armed Forces Institute of Pathology 1994, Washington DC
- * Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1473-1479
- * 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* 2002; 86: 929-939
- * Dal Cin P, Sandberg AA. Cytogenetic findings in a supratentorial ependymoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 30: 289-293
- * von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 1993; 3(1): 19-26
- * van Dekken H, Krijtenburg PJ, Alers JC. DNA in situ hybridization (interphase cytogenetics) versus comparative genomic hybridization (CGH) in human cancer: detection of numerical and structural chromosome aberrations. *Acta Histochem* 2000; 102: 85-94
- * Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Ependymomas and ependymoblastomas in children. *J Neurosurg* 1976; 45(3): 273-283

- * Douglass EC, Valentine M, Rowe ST. Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotype changes. *Genes Chromosom Cancer* 1990; 2: 210-216
- * Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP, Friedman HS, Burger PC, Cohen ME, Sanford RA, Mulhern RK, James HE, Freeman CR et al. Postoperative chemotherapie and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Eng J Med* 1993; 328: 1725-1731
- * Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 1990; 50(18): 5863-5867
- * Duncan JA, Hoffmann HJ. Intracranial ependymomas. *Brain Tumors*, Kaye AH, Lows ER, Jr (eds.) Churchill Livingstone: Edinburgh, 493-504, 1995
- * 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* 1999; 155(2): 627-632
- * Ernestus RI, Wilcke O, Schroder R. Intracranial ependymomas: prognostic aspects. *Neurosurg Rev* 1989; 12: 157-163
- * Ernestus RI, Schroder R, Stutzer H, Klug N. Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs Nerv Syst* 1996; 12(9): 522-526
- * Evans AE, Anderson JR, Lefkowitz-Boudreaux IB, Finlay JL. Adjuvant chemotherapy of childhood posterior fossa ependymoma: cranio-spinal irradiation with or without adjuvant CCNU, vincristine, and prednisone: a Childrens Cancer Group Study. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27: 8-14

- * Ferrante L, Mastronardi L, Schettini G, Lunardi P, Fortina A. Fourth ventricle ependymoma. A study of 20 cases with survival analysis. *Acta Neurochir* 1994; 131: 67-74
- * Fink KL, Rushing EJ, Schold SC Jr, Nisen PD. Infrequency of *p53* gene mutations in ependymomas. *J Neurooncol* 1996; 27(2): 111-115
- * Gerszten PC, Pollack IF, Martinez AJ, Lo KH, Janosky J, Albright AL. Intracranial ependymomas of childhood – lack of correlation of histopathology and clinical outcome. *Pathol Res Prac* 1996; 192: 515-522
- * Gilles FH, Sobel EL, Tavare CJ, Leviton A, Hedley-Whyte ET. Age-related changes in diagnosis, histological features, and survival in children with brain tumors 1930-1979. The Childhood Brain Tumor Consortium. *Neurosurg* 1995; 37(6): 1056-1068
- * Giraud S, Choplin H, Teh BT, Lespinasse J, Jouvét A, Labat-Moleur F, Lenoir G, Hamon B, Hamon P, Calender A. A large multiple endocrine neoplasia type 1 family with clinical expression suggestive of anticipation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3487-3492
- * Goldwein JW, Glauser TA, Packer RJ, Finlay JL, Sutton LN, Curran WJ, Laehy JM, Rorke LB, Schut L, D'Angio GJ. Recurrent intracranial ependymomas in children. Survival, patterns of failure, and prognostic factors. *Cancer* 1990; 66: 557-563
- * Gonzalez-Agosti C, Wiederhold T, Herndon ME, Gusella J, Ramesh V. Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem* 1999; 274: 34438-34442
- * Gould KL, Bretscher A, Esch FS, Hunter T. cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *EMBO J* 1989; 8(13): 4133-4142

- * Granzow M, Popp S, Weber S, Schoell B, Holtgreve-Grez H, Senf L, Hager D, Boschert J, Scheurlen W, Jauch A. Isochromosome 1q as an early genetic event in a child with intracranial ependymoma characterized by molecular cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 130: 79-83
- * Griffin CA, Long PP, Carson BS, Brem H. Chromosome abnormalities in low-grade central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 60: 67-73
- * Gronholm M, Sainio M, Zhao F, Heiska L, Vaheri A, Carpen O. Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* 1999; 112: 895-904
- * Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 1997; 49: 267-270
- * 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 Chromosom Cancer* 1996; 17(1):37-44
- * Hamilton RL, Pollack IF. The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol* 1997; 7(2); 807-822
- * Healey EA, Barnes PD, Kupsky WJ, Scott RM, Sallan RE, Black PM, Trabello NJ. The prognostic significance of postoperative residual tumor in ependymoma. *Neurosurg* 1991; 28(5): 666-672
- * Heideman R, Packer RJ, Albright LA, Freeman CR, Rorke LB. Tumors of the CNS. In: *Principle and practice of pediatric oncology*, 3rd Ed, Pizzo PA, Poplack DG eds. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1997, pp. 633-698
- * Hemminki K, Li X. Association of brain tumors with other neoplasms in families. *Eur J Cancer* 2004; 40: 253-259

- * 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* 2001; 158(3): 1137-1143
- * Huang B, Starostik P, Kuhl J, Tonn JC, Roggendorf W. Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathol* 2002; 103: 415-420
- * 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* 1999; 81(7): 1150-1154
- * Huynh DP, Mautner V, Baser ME, Stavrou D, Pulst SM. Immunohistochemical detection of schwannomin and neurofibromin in vestibular schwannomas, ependymomas and meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 382-390
- * Jacoby LB, MacCollin M, Louis DN, Mohnney T, Rubio MP, Pulaski K, Trofatter JA, Kley N, Seizinger B, Ramesh V et al. Exon scanning for mutation of the *NF2* gene in schwannomas. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 413-419
- * 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 Chromosom Cancer* 1990; 2(2): 94-102
- * Jenkins RB, Kimmel DW, Moertel CA, Schultz CG, Scheithauer BW, Kelly PJ, Dewald GW. A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 39(2): 253-279
- * Jeuken JW, Sprenger SH, Gilhuis J, Teepe HL, Grotenhuis AJ, Wesseling P. Correlation between localization, age, and chromosomal imbalance in ependymal tumours as detected by CGH. *J Pathol* 2002; 197: 238-244

- * Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, Larsson C. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet.* 1993; 92(2):169-174
- * Karnes PS, Tran TN, Cui MY, Bogenmann E, Shimada H, Ying KL. Establishment of a rhabdoid tumor cell line with a specific chromosomal abnormality, 46 XY, t(11;22). *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 56(1): 31-38
- * Kato H, Uchimura I, Morohoshi M, Fujisawa K, Kobayashi Y, Numano F, Goseki N, Endo M, Tamura A, Nagashima C. Multiple endocrine neoplasia type 1 associated with spinal ependymoma. *Intern Med* 1996; 35: 285-289
- * Kedra D, Peyrard M, Fransson I, Collins JE, Dunham I, Roe BA, Dumanski JP. Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 625-631
- * King P, Cooper PN, Malcolm AJ. Soft tissue ependymoma: a report of three cases. *Histopathology* 1993; 22: 394-396
- * Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. Identification of the cis-acting region in the *NF2* gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 2001; 6: 441-454
- * Kleihues P, Burger P, Scheithauer B (eds.) *Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System.* 1993, Berlin: Springer Verlag
- * Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology* 1999; 1: 44-51
- * Kleihues P, Cavenee WK, eds. *World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system.* Lyon: IARC Press, 2000: 71-82

- * Kluwe L, MacCollin M, Tatagiba M, Thomas S, Hazim W, Haase W, Mautner VF. Phenotypic variability associated with 14 splice-site mutations in the *NF2* gene. *Am J Med Genet* 1998; 77: 228-233
- * Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823
- * Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, Sutton LN, Biegel JA. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. *J Neurooncol* 1998; 37(1): 25-33
- * Kraus JA, deMillas W, Sörensen N, Herbold C, von Deimling A. Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from *hSNF5/INI1*. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 69-74
- * Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, Lekanne Dit Deprez R, Zwarthoff E. *NF2* status of meningiomas is associated with tumor localization and histology. *J Pathol* 2001; 194: 367-372
- * Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M. Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 110(2): 103-110
- * Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stravrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Kluwe L. Allelic losses in Neurofibromatosis 2-associated meningeomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 504-512
- * Lekanne Deprez RH, van Biezen NA, Heutink P, Boejharat KR, de Klein A, Geurts van Kessel AH, Zwarthoff EC. A new polymorphic probe on chromosome 22q: NB129 (D22S193). *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 687
- * Lindgren V, Waggoner S, Rotmensch J. Monosomy 22 in two ovarian granulosa cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996 Jul 15; 89(2):93-7.

- * Lonjon M, Goh KY, Epstein FJ. Intramedullary spinal cord ependymomas in children: treatment, results and follow-up. *Pediatr Neurosurg* 1998; 29(4): 178-183
- * Luna EJ, Hitt AL. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 1992 ; 258(5084): 955-964
- * Lyons MK, Kelly PJ. Posterior fossa ependymomas: report of 30 cases and review of the literature. *Neurosurgery* 1991; 28(5): 659-665
- * Marineau C, Baron C, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Rouleau GA. Dinucleotide repeat polymorphism at the D22S268 locus. *Hum Mol Genet* 1993; 2 : 336
- * Martuza RL, Eldridge R. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *N Engl J Med* 1988; 318(11): 684-688
- * Maruno M, Yoshimine T, Muhammad AK, Ninomiya H, Hayakawa T. Chromosomal losses and gains in meningiomas: comparative genomic hybridization (CGH) study of the whole genome. *Neurol Res* 1998; 20: 612-616
- * Mazewski C, Soukup S, Ballard E, Gotwals B, Lampkin B. Karyotype studies in 18 ependymomas with literature review of 107 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 113(1): 1-8
- * McLaughlin MP, Marcus Jr RB, 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* 1998; 40(4): 845-850
- * Metzger AK, Sheffield VC, Duyk G, Daneshvar L, Edwards MS, Cogen PH. Identification of a germline mutation in the *p53* gene in a patient with an intracranial ependymoma. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 7825-7829

- * Mills KI, Ramsahoye BH. DNA methylation protocols. Overview. *Methods Mol Biol.* 2002; 200: 1-7.
- * Mork SJ, Loken AC. Ependymoma: a follow-up study of 101 cases. *Cancer* 1977; 40(2): 907-915
- * Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE, Jenkin D, Humphreys RP, Hendrick EB. Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment. *J Neurosurg* 1990; 72(3): 408-417
- * Neumann E, Kalousek DK, Norman MG et al. Cytogenetic analysis of 109 pediatric central nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 71: 40-49
- * Oakeley EJ. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 389-400
- * Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P. *P53* mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 6202-6205
- * Osborne RH, Houben MP, Tijssen CC, Coebergh JW, van Duijn CM. The genetic epidemiology of glioma. *Neurology* 2001; 57: 1751-1755
- * Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol* 1999; 41: 167-174
- * Park JP, Chaffee S, Noll WW, Rhodes CH. Constitutional de novo t(1;22)(p22;q11.2) and ependymoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1996 ; 86(2): 150-152
- * Peyrard M, Pan HQ, Kedra D, Fransson I, Swahn S, Hartman K, Clifton SW, Roe BA, Dumanski JP. Structure of the promoter and genomic organization of the human beta-adaptin gene (*BAM22*) from chromosome 22q12. *Genomics* 1996; 36: 112-117

- * Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, Collins J, Dunham I, Kost-Alimova M, Imreh S, Dumanski JP. The human *LARGE* gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 598-603
- * Pollack IF, Pang D, Albright AL. The long-term outcome in children with late-onset aqueductal stenosis resulting from benign intrinsic tectal tumors. *J Neurosurg* 1994; 80(4): 681-688
- * 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* 1995; 37(4): 655-667
- * Pollack IF, Campbell JW, Hamilton RL, Martinez AJ, Bozik ME. Proliferation index as a predictor of prognosis in malignant gliomas of childhood. *Cancer* 1997; 79: 849-856
- * Prayson RA. Clinocopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol* 1999; 3: 11-18
- * Pylkkanen L, Sainio M, Ollikainen T, Mattson K, Nordling S, Carpen O, Linnainmaa K, Husgafvel-Pursiainen K. Concurrent LOH at multiple loci in human malignant mesothelioma with preferential loss of *NF2* gene region. *Oncol Rep* 2002; 9: 955-959
- * 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 Chromosom Cancer* 1992; 5(4): 348-356
- * Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH. Alterations of the *TP53* gene in human gliomas. *Cancer Res* 1994; 54(5):1324-1330.

- * Rawlings CE, Giangaspero F, Burger PC, Bullard DE. Ependymomas: a clinicopathologic study. *Surg Neurol* 1988; 29(4): 271-281
- * Read G. The treatment of ependymoma of the brain or spinal canal by radiotherapy: a report of 79 cases. *Clin Radiol* 1984; 35(2): 163-166
- * Reardon DA, Entrekina 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 Chromos Cancer* 1999; 24(3): 230-237
- * Rees DJ, Ades SE, Singer SJ, Hynes RO. Sequence and domain structure of talin. *Nature* 1990; 347(6294): 685-689
- * Rhodes CH, Call KM, Budarf ML, Barnoski BL, Bell CJ, Emanuel BS, Bigner SH, Park JP. Molecular studies of an ependymoma-associated constitutional t(1;22)(p22;q11.2). *Cytogenet Cell Genet* 1997; 78(3-4): 247-252
- * Riccardi VM. Neurofibromatosis update. *Neurofibromatosis* 1989; 2(5-6): 284-291
- * Ritter AM, Hess KR, McLendon RE, Langford LA. Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. *J Neurooncol* 1998; 40(1): 51-57
- * Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, Stanley P, Li H, Albright AL, McGuire-Cullen P, Finlay JL, Stevens KR, Milstein JM, Packer RJ, Wisoff J. Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: A report of the children's cancer group. *J Neurosurg* 1998; 88(4): 695-703
- * Rogatto SR, Casartelli C, Rainho CA, Barbieri-Neto J. Chromosomes in the genesis and progression of ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 69: 146-152

- * Rorke LB, Gilles FH, Davis RL, Becker LE. Revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood brain tumors. *Cancer* 1985; 56: 1869-1886
- * Ross GW, Rubinstein LJ. Lack of histopathological correlation of malignant ependymomas with postoperative survival. *J Neurosurg* 1989; 70(1): 31-36
- * Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst SM, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, deJong P, Parry D, Eldrige R, Aurias A, Delattre O, Thomas G. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363(6429): 515-521
- * Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekecewicz C, Rey A. Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15 year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28: 381-386
- * Rubinstein L. Tumors of the central nervous system. Atlas of tumor pathology, 2nd series, Fascicle 6. Armed Forces Institute of Pathology 1972, Washington DC
- * Rubio MP, Correa KM, Ramesh V, MacCollin MM, Jacoby LB, von Deimling A, Gusella JF, Louis DN. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 1994; 54(1): 45-47
- * Russell DR, Rubinstein LJ (eds.) *Pathology of Tumors of the Nervous System*. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; E. Arnold, London, 1989
- * Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA. Evidence for the complete inactivation of the *NF2* gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 1994; 6(2): 180-184

- * 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. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 59(2): 213-216
- * Sainz J, Nechiporuk A, Kim UJ, Simon MI, Pulst SM. CA-repeat polymorphism at the D22S430 locus adjacent to NF2. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2203
- * 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* 1998; 28(3): 135-142
- * Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 1992; 103: 131-143
- * Sato K, Schauble B, Kleihues P, Ohgaki H. Infrequent alterations of the *p15*, *p16*, *CDK4* und *cyclin D1* genes in non-astrocytic human brain tumors. *Int J Cancer* 1996; 66: 305-308
- * Sawyer JR, Sammartino G, Husain M et al. Chromosome aberrations in four ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 74: 132-138
- * Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O. A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* 2000; 88: 440-453
- * 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* 2001; 11: 133-143

- * Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffiatti R, Tribolo A. Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst* 1991; 7(4): 177-182
- * Schiffer D, Giordana MT. Prognosis of ependymoma. *Childs Nerv Syst* 1998; 14: 357-361
- * Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sevenet N, Delattre O, von Deimling A. *INI1* mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 2001; 84: 199-201
- * Schröder R, Ploner C, Ernestus RI. The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 labelling index and mitotic index. *Neurosurg Rev* 1993; 16(2): 145-150
- * Sevenet N, Lellouch-Tubiana A, Schofield D, Hoang-Xuan K, Gessler M, Birnbaum D, Jeanpierre C, Jouvet A, Delattre O. Spectrum of *hSNF5/INI1* somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 1999; 8(13): 2359-2368
- * Shepherd JJ. The natural history of multiple endocrine neoplasia type 1. Highly uncommon or highly unrecognized? *Arch Surg* 1991; 126: 935-952
- * Shuman RM, Alvord EC Jr, Leech RW. The biology of childhood ependymomas. *Arch Neurol* 1975; 32: 731-739
- * Slavic 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* 1995; 64(4): 243-247
- * Stratton MR, Darling J, Lantos PL, Cooper CS, Reeves BR. Cytogenetic abnormalities in human ependymomas. *Int J Cancer* 1989; 44(4): 579-581

- * Sutton LN, Perilongo G, Goldwein J, Lange B, Schut L, Rorke LB, Packer RJ. Prognostic factors in childhood ependymoma. *Pediatr Neurosurg* 1990-91; 16(2): 57-65
- * Szijan I, Rochefort D, Bruder C, Surace E, Machiavelli G, Dalamon V, Cotignola J, Ferreira V, Campero A, Basso A, Dumanski JP, Rouleau GA. *NF2* tumor suppressor gene: a comprehensive and efficient detection of somatic mutations by denaturing HPLC and microarray-CGH. *Neuromolecular Med* 2003; 3: 41-52
- * Tominaga T, Kayama T, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T. Anaplastic ependymomas: clinical features and tumor suppressor gene *p53* analysis. *Acta Neurochir* 1995; 135: 163-170
- * Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, Munroe D, Bove C, Haines JL, Martuza RL, MacDonald ME, Seizinger BR, Short MP, Buckler AJ, Gusella JF. A novel moesin- ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; 72(5): 791-800
- * Venter DJ, Thomas DG. Multiple sequential molecular abnormalities in the evolution of human gliomas. *Br J Cancer* 1991, 63:753-757.
- * deVita VH, Rosenberg SA (eds.) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: JB Lipincott Co., 1982
- * DeVitis LR, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bono P, Grammatico P, Radice P, Bigozzi U, Montali E, Papi L. Analysis of the neurofibromatosis type 2 gene in different human tumors of neuroectodermal origin. *Hum Genet* 1996; 97(5): 638-641
- * 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 pediatric ependymoma. *Genes Chromos Cancer* 2001; 32(1): 59-66

- * Ware ML, Berger MS, Binder DK. Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2003; 18: 207-216
- * Weremowicz S, Kupsy WJ, Morton CC, Fletcher JA. Cytogenetic evidence for a chromosome 22 tumor suppressor gene in ependymoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 61(2): 193-196
- * Wernicke C, Thiel G, Lozanova T, Vogel S, Kintzel D, Jänisch W, Lehmann K, Witkowski R. Involvement of chromosome 22 in ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 79(2): 173-176
- * West CR, Bruce DA, Duffner PK. Ependymomas: factors in clinical and diagnostic staging. *Cancer* 1985; 56(7): 1812-1816
- * Wiestler OD, Schiffer D, Coons SW, Prayson RA, Rosenblum MK. Ependymal tumours. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. *World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Lyon: IARC Press, 2000: 71-82
- * Yang Q, Tonks NK. Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc natl Acad Sci USA* 1991; 88(14): 5949-5953
- * Zheng P, Pang JC, Hui AB, Ng H. Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 122: 18-25

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Westphal möchte ich mich für die Überlassung des Themas bedanken.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. med. Katrin Lamszus für die engagierte Betreuung dieser Arbeit herzlich bedanken. PD Dr. med. Lamszus beriet mich jederzeit mit viel Geduld bei allen Problemen, die im Laufe dieser Arbeit auftraten.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für Hirntumorbiologie für das gute Arbeitsklima und für die gewährte Unterstützung. Dabei denke ich besonders an Frau R. Fillbrandt, die mir die Grundlagen der praktischen Laborarbeit beigebracht hat und meine zahlreichen Fragen beantwortete.

Dr. med. Lenard Lachenmeyer danke ich für die gute Kooperation bei der Darstellung der Zusammenhänge der inversen Assoziation zwischen Chromosom 22 und Chromosom 11 bei Ependymomen als Teilergebnis seiner Dissertation sowie der vorliegenden Arbeit.

Dr. med. W. Schulz-Schäfer sowie Arne Wrede danke ich für die Überlassung der histologischen Präparate sowie der damit zusammenhängenden wertvollen Informationen.

Uta Heinemann

Göttingen, den 01.11.2005

Lebenslauf

Name: Heinemann

Vorname: Uta

Geboren am: 10.11.1977

Geboren in: Leipzig

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1984 – 1996, Goerdeler-Gymnasium, Leipzig
Juni 1996 Abitur

Studium: 1997 – 2000 Universität Hamburg, Studium der
Humanmedizin
2000 – 2003 Universität Göttingen
April 1999 Ärztliche Vorprüfung
April 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 – Mai 2003 Praktisches Jahr
Universitätsklinikum Göttingen mit Wahlfach Neurologie
Mai 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang: seit Juni 2003 Ärztin an der Klinik für Neurologie der
Georg-August-Universität Göttingen (Prof. Dr. M. Bähr)
mit Schwerpunkt Prionforschung

Uta Heinemann

Göttingen, den 01.11.2005

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht mit einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Uta Heinemann

Göttingen, den 01.11.2005