

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Untersuchungen zur Expression von Nestin und Glykoprotein nmb in kindlichen Ependymomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anna von Pein
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.08.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Hagel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Maura Dandri-Petersen

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Ependymale Tumoren	2
2.1.1	Symptome.....	3
2.1.2	Makroskopie.....	3
2.1.3	Mikroskopie	4
2.1.4	Einteilung	4
2.1.5	Molekularpathologie	10
2.1.6	Immunhistologie.....	15
2.1.7	Genetik	15
2.1.8	Therapie.....	16
2.1.9	Prognose	17
2.1.10	Prognostische Faktoren	18
2.2	Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B	23
2.3	Nestin	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Patientenkollektiv der immunhistochemischen Untersuchungen.....	27
3.2	Patientenkollektiv der elektronenmikroskopischen Untersuchungen	27
3.3	Reagenzien und Antikörper.....	28
3.4	Lösungen	30
3.5	Verbrauchsmaterialien	32
3.6	Laborgeräte.....	32
3.7	Immunhistochemie	33
3.7.1	GPNMB Protokoll für manuelle Immunmarkierung	33
3.7.2	Immunmarkierung im Ventana LT Färbeautomat	34

3.7.3	Nestin Färbung im Ventana LT Färbeautomat.....	34
3.7.4	GPNMB Färbung im Ventana LT Färbeautomat	34
3.8	Elektronenmikroskopie	34
3.8.1	Pre-embedding	34
3.8.2	Post-embedding.....	36
3.9	Auswertung	38
3.9.1	Auswertung der Elektronenmikroskopie.....	38
3.9.2	Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Markierungen... 38	
3.9.3	Statistik.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Elektronenmikroskopie	40
4.2	Immunhistochemie	41
4.2.1	Immunhistochemie GPNMB.....	41
4.2.2	Immunhistochemie Nestin.....	43
4.3	Statistische Auswertung der Nestin-Färbung.....	44
4.3.1	Korrelation von Nestin-Expression und Lokalisation der Ependymome.....	44
4.3.2	Korrelation von Nestin-Expression und Patientenalter	45
4.3.3	Korrelation von Nestin-Expression und Ependymom-Grad	45
4.3.4	Korrelation von Nestin-Expression und Überlebenszeit.....	45
4.3.5	Korrelation von Patientenalter und Lokalisation der Ependymome	45
4.3.6	Korrelation von Patientenalter und Ependymome-Grad.....	45
5	Diskussion	46
5.1	Methodik	46
5.1.1	Elektronenmikroskopie Immunogold-Methode	46
5.1.2	Elektronenmikroskopie DAB-Methode	51
5.2	Expression von Antigenen in kindlichen Ependymomen	51
5.2.1	GPNMB.....	51
5.2.2	Nestin	51

5.3	Korrelation der Ergebnisse mit denen einer vorausgegangenen Studie	54
5.3.1	Zusammenschau der prognostischen Faktoren	56
6	Zusammenfassung und Ausblick	58
7	Tabellenverzeichnis.....	60
8	Abbildungsverzeichnis	60
9	Abkürzungsverzeichnis	61
10	Literaturverzeichnis.....	63
11	Danksagung.....	75
12	Lebenslauf	76
13	Eidesstattliche Versicherung	77
15	Anhang	78
15.1	DAB-Pre-embedding an Vibratomschnitten	80
15.2	DAB-Post-embedding-Protokoll.....	81

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Bei Ependymomen zeigt das derzeitige histologische Grading im Vergleich zu anderen Gliomen keine zufriedenstellende Korrelation mit der Prognose, sodass neue Faktoren und Kriterien gesucht werden, die eine bessere Beurteilung der Prognose von Patienten mit Ependymomen ermöglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die vorbestehenden immunhistochemischen Daten eines bereits untersuchten Kollektivs kindlicher Ependymome zu erweitern. In der vorbestehenden Studie wurde an diesem Kollektiv u.a. der Stammzellmarker CD44 untersucht. In dieser Studie sollen die Daten um den Stammzellmarker Nestin sowie das membranständige Glykoprotein nmb (GPNMB) ergänzt werden um zu überprüfen, ob den Markern in kindlichen Ependymomen eine prognostische Relevanz zukommt. Hierbei wird Bezug genommen auf eine Studie von Milde et al., in der sich bei Ependymomen eine negative Korrelation zwischen dem Grad der Nestin-Expression und der Prognose zeigte (Milde et al., 2012).

GPNMB wird in malignen Gliomen, Melanomen und anderen Tumoren vermehrt exprimiert (Qian et al., 2008). In Glioblastomen besteht eine negative Korrelation zwischen dem Expressionslevel von GPNMB und der Überlebenszeit (Kuan et al., 2006). Es existieren mehrere Studien, die GPNMB immunhistochemisch in unterschiedlichen Geweben nachweisen. Ein elektronenmikroskopischer Nachweis wurde in der Literatur bislang nicht berichtet. Um die Expression von GPNMB an Gehirntumoren genauer zu untersuchen und insbesondere die subzelluläre Lokalisation des Moleküls zu spezifizieren, soll GPNMB zusätzlich zu dem immunhistochemischen Nachweis, elektronenmikroskopisch an Gliomen untersucht werden.

2 Einleitung

In der Einleitung werden die Klinik und Pathologie der ependymalen Tumoren sowie die untersuchten Proteine GPNMB und Nestin vorgestellt.

2.1 Ependymale Tumoren

Ependymome sind Tumoren glialen Ursprungs. Sie treten vor allem bei Kindern, insbesondere in der ersten Lebensdekade auf. Ependymome machen rund 10% aller primär intrakraniellen Tumoren bei Kindern aus und haben eine Inzidenz von ca. 0,2/100.000 Kindern. Mehr als die Hälfte der betroffenen Kinder sind unter fünf Jahre alt (Kilday et al., 2009; Timmermann, 2018). Ependymome können zwar grundsätzlich überall im zentralen Nervensystem entstehen, finden sich aber gehäuft im Ventrikelsystem und im Spinalkanal. Die meisten Ependymome entwickeln sich im vierten Ventrikel, teils mit Ausbreitung in den Kleinhirnbrückenwinkel und den Hirnstamm. Seltener sind Ependymome im Spinalkanal, den Seitenventrikeln und dem dritten Ventrikel lokalisiert. Bei Kindern sind 90% der Ependymome intrakraniell zu finden, wobei ein Drittel der Ependymome supratentoriell und bis zu zwei Drittel in der hinteren Schädelgrube auftreten (Kilday et al., 2009; Timmermann, 2018). Die Lokalisation der Ependymome ist bedeutend, da sich die spinalen Ependymome klinisch und auf molekularer Ebene von den intrakraniellen Ependymomen unterscheiden. Dies zeigt sich beispielsweise in der Altersverteilung. Die Patienten mit spinalen Ependymomen sind bei Diagnosestellung deutlich älter als die mit intrakraniellen Ependymomen. Bei den spinalen Ependymomen besteht außerdem eine Assoziation zur Neurofibromatose Typ 2 (Plotkin et al., 2011; Hagel et al., 2012; Timmermann, 2018).

Derzeit wird angenommen, dass Ependymome aus radialen Gliazellen hervorgehen (Taylor et al., 2005; Poppleton & Gilbertson, 2007). Weitere Studien gehen von unterschiedlichen Ursprungszellen, je nach Lokalisation der Ependymome, aus. So sind neuronale Stammzellen des Gehirns potentielle Ursprungszellen der intrakraniellen Ependymome und neuronale spinale Stammzellen die potentiellen Ursprungszellen der Ependymome im Spinalkanal (Johnson et al., 2010; Parker et al., 2014). Ependymome weisen in ihrem zellulären Erscheinungsbild eine deutliche Ähnlichkeit zu Ependymzellen auf (Del Bigio, 2010). Ependymzellen sind postmitotisch (Spassky et al., 2005) und können somit nicht die Ursprungszellen der Ependymome sein. Während der embryonalen Entwicklung zeigt die Besiedelung der Ventrikel mit Ependymzellen einen zeitlichen und lokalisationspezifischen Verlauf (Bruni, 1998). Zeitpunkt und Ablauf der Ausdifferenzierung der Ependymzellen sowie die Expression von sekretorischen Proteinen (S100 β) und solchen des Zytoskeletts

(saures Gliafaserprotein [GFAP], Vimentin, Cytokeratine) sind genau festgelegt. Einige dieser Proteine können als immunhistochemische Marker genutzt werden, um reife und unreife Ependymzellen zu unterscheiden und von anderen Zellen des Nervensystems zu differenzieren (Kasper et al., 1991; Sarnat, 1992, 1998).

Das klinische Verhalten von Ependymomen ist variabel (Pajtler et al., 2015). Sie wachsen meist verdrängend, selten auch lokal invasiv. Bei einer entsprechenden Primärlokalisierung bieten die Liquorwege einen Weg für eine mögliche Ausbreitung der Tumoren innerhalb des zentralen Nervensystems. Über die Häufigkeit einer primären Metastasierung der Ependymome gibt es unterschiedliche Angaben, die von 5 % bis 20 % reichen. Dabei kommt der Lokalisation und dem Malignitätsgrad des Tumors eine entscheidende Bedeutung zu. So wurde bei infratentoriellen Läsionen und bei Anaplasie in ca. 5 % bis 10 % der pädiatrischen Fälle eine ZNS-Metastasierung nachgewiesen. Ependymomrezidive metastasieren in bis zu 45 % der Fälle. Das Vorkommen von Metastasen ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Sehr selten kommen Ependymome auch außerhalb des Nervensystems vor. Beobachtet wurden solche zum Beispiel in den Ovarien, den Weichteilgeweben und dem Mediastinum (Louis et al., 2007, S. 106-110; Timmermann, 2018).

2.1.1 Symptome

Die klinischen Symptome sind abhängig von der Lokalisation und der Größe des Tumors. Bei infratentoriellen Ependymomen treten Zeichen des erhöhten intrakraniellen Drucks wie Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen auf. Bei einer Lokalisation in der hinteren Schädelgrube können, durch die Involvierung der hier liegenden Strukturen, eine Ataxie, Sehstörungen, Schwindel und Lähmungen entstehen. Bei supratentoriellen Ependymomen zeigen sich fokale neurologische Defizite, epileptische Anfälle und ebenfalls Zeichen erhöhten intrakraniellen Drucks. Bei spinalen Ependymomen entstehen, je nach Höhe des Tumors im Rückenmarkskanal, sensible und motorische Defizite in den zugeordneten Körperregionen (Ellison et al., 2016, S. 107).

2.1.2 Makroskopie

Makroskopisch erscheinen Ependymome als braun-gräuliche, weiche, relativ gut abgrenzbare Tumoren. Zysten, Nekrosen, Verkalkungen und Einblutungen können vorkommen (Ellison et al., 2016, S. 107).

2.1.3 Mikroskopie

Histopathologisch werden verschiedene Varianten von Ependymomen unterschieden. Dabei zeigen niedriggradige Ependymome (WHO-Grad I und II) eine geringere mitotische Aktivität als die anaplastischen Ependymome (WHO-Grad III) (Timmermann, 2018).

Die Tumorzellen der Ependymome zeigen unscharfe Zellgrenzen und feine Zytoplasmaausläufer. Die Kerne sind kreisrund bis oval und weisen ein variables Kern-Plasma-Verhältnis auf. Dieses ist stellenweise sehr gering, jedoch treten in paucicellulären Arealen Inseln mit dicht gepackten Zellen mit höherer Kern-Plasma-Relation auf. In diesen Gebieten weisen die Kerne eine größere morphologische Vielfalt und eine erhöhte Mitoserate auf. In manchen Ependymomen werden größere Gebiete kleiner und dicht gepackter Zellen von Pseudorosetten unterbrochen. Pseudorosetten werden aus Tumorzellen gebildet, die sich um ein zentrales Blutgefäß herum lagern. Die Zellkerne liegen auf der vom Gefäß abgewandten Seite der Zelle. Die fibrillären Ausläufer der Zelle reichen bis an das Blutgefäß heran. Solche Pseudorosetten finden sich zwar häufig in Ependymomen, sie sind jedoch nicht spezifisch, da sie auch in anderen Geweben vorkommen. Etwas spezifischer, aber auch seltener, sind echte ependymale Rosetten mit einem zentralen Lumen. Die typischen Anaplasie-Kriterien sind bei Ependymomen schlecht definiert. Grundsätzlich weisen niedriggradige Ependymome selten Mitosen auf. Mikrovaskuläre Proliferationen kommen kaum vor und auch Mikronekrosen sind eher selten und treten ohne nukleäre Palisadenbildung auf. Ultrastrukturell zeigen die Tumorzellen, die ein Lumen begrenzen, auf der luminalen Zellseite Mikrovilli und Zilien und zwischen den Zellen lassen sich Zonulae adhaerentes darstellen (Ellison et al., 2004, S. 645-646).

2.1.4 Einteilung

Die Einteilung der Ependymome gemäß der revidierten Klassifikation der WHO von 2016 unterscheidet Subependymome (Grad I), myxopapilläre Ependymome (Grad I), Ependymome (Grad II), Ependymome mit RELA-Fusions-Gen und anaplastische Ependymome (Grad III). Bei den Grad-II-Ependymomen wird je nach vorherrschendem Zellbild weiter differenziert zwischen papillären, klarzelligen und tanyzytischen Ependymomen. Diese Einteilung basiert auf dem histologischen Erscheinungsbild, das innerhalb eines Tumors erheblich variieren kann (Louis et al., 2016, S. 102-114).

Subependymome

Subependymome sind langsam, exophytisch wachsende Neubildungen glialen Ursprungs, die hauptsächlich intraventrikulär und seltener auch spinal lokalisiert sind. Sie sind charakterisiert durch Anhäufungen von unauffälligen bis leicht pleomorphen, mitotisch inaktiven Zellen, die in reichlich fibrillärer Matrix eingebettet sind (McLendon et al., 2016a). Die Zellen liegen, wie in Abbildung 1 exemplarisch zu sehen, in kleinen Grüppchen, die durch dicht gepackte fibrilläre Stränge separiert werden. Sie präsentieren sich einheitlich mit runden oder ovalen Kernen und einem eher spärlichen Zytoplasmasaum (Ellison et al., 2004, S. 647). Es finden sich häufig Pseudorosetten, mikrozystische Degenerationen und Verkalkungen (Klöppel et al., 2012, S. 510). Subependymome sind meist asymptomatisch und werden häufig als Zufallsbefund festgestellt. Sie werden den WHO-Grad-I-Tumoren zugeordnet und haben eine sehr günstige Prognose.

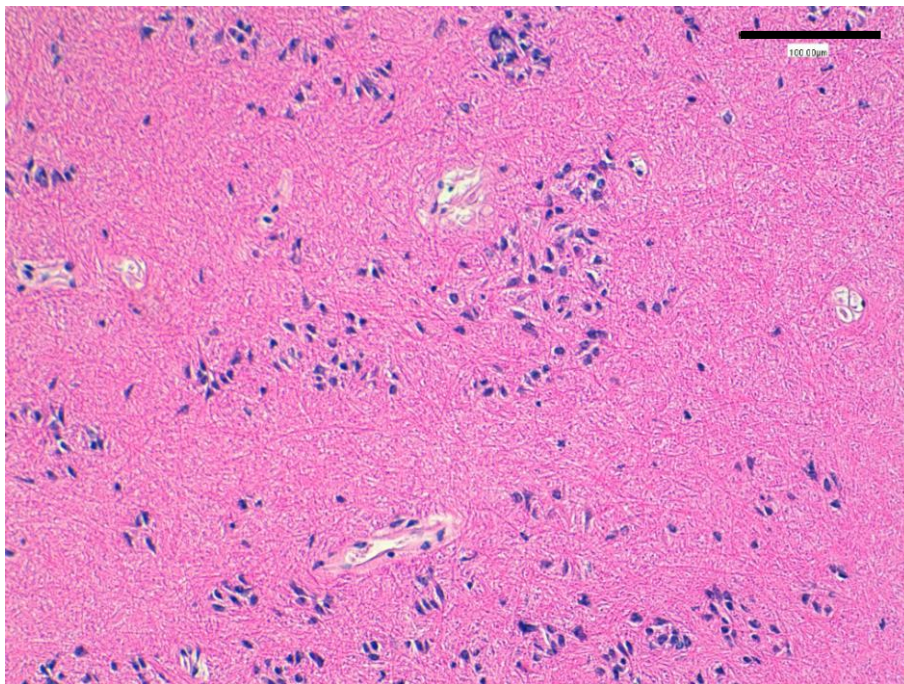


Abbildung 1: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines Subependymoms (Balken entspricht 100 μm)

Myxopapilläre Ependymome

Myxopapilläre Ependymome sind gliale Tumoren, die vor allem bei jungen Erwachsenen vorkommen und nahezu ausschließlich spinal im Conus medullaris, der Cauda equina und dem Filum terminale auftreten. Aufgrund ihrer Lokalisation verursachen myxopapilläre Ependymome häufig Rückenschmerzen. Sie imponieren makroskopisch als rautenförmige, gut begrenzte, in Läppchen gegliederte, braune oder graue Tumoren und sind histologisch

charakterisiert durch längliche fibrilläre Fortsätze, die sternförmig um ein vaskularisiertes, mucoides Zentrum angeordnet sind. Diese Art der Ependymome ist durch eine reichliche Mucinbildung gekennzeichnet. Die Kerne der Tumorzellen sind einheitlich rund. Die Zellen zeigen verschiedene Differenzierungen. In Regionen mit epitheloider Differenzierung formen die Zellen um kleine Gefäße herum papilläre Strukturen. Die Regionen mit glialer Differenzierung sind durch Zellen mit fibrillären Fortsätzen gekennzeichnet. Die Blutgefäße der Tumoren zeigen häufig dicke hyalinisierte Wände. Gelegentlich kommen alte Blutungen vor, die durch Hämosiderin beladene Makrophagen kenntlich sind. Mitosen und Nekrosen sind selten. Myxopapilläre Ependymome entsprechen WHO-Grad-I-Tumoren und weisen grundsätzlich eine gute Prognose auf. Es kann jedoch zu einem Umwachsen der Cauda equina kommen, wodurch eine chirurgische Resektion stark erschwert wird. Ist eine komplette Resektion nicht möglich, verschlechtert sich die Prognose. Der Residualtumor kann in diesem Fall mehrfach rezidivieren. Bei Kindern kann das biologische Verhalten aggressiver ausfallen, wodurch sich die Prognose ebenfalls verschlechtern kann (Ellison et al., 2004, S. 645; McLendon et al., 2016). Rezidive treten meist lokal und häufiger bei jüngeren Patienten auf. Das Alter scheint der bedeutsamste prädiktive Marker für ein Rezidiv zu sein, aber auch die Expression von EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) kann als prädiktiver Faktor für ein Rezidiv herangezogen werden (Verma et al., 2012; McLendon et al., 2016). Ein Beispiel für ein myxopapilläres Ependymom findet sich in Abbildung 2.

Ependymome

Ependymome sind umschriebene Gliome, die hauptsächlich intrakraniell, innerhalb des Ventrikelsystems, in der Nähe des Ventrikelsystems oder selten auch im Spinalkanal auftreten. Sie kommen bei Patienten aller Altersgruppen vor. Die Inzidenz variiert je nach histologischer Variante, der molekularen Gruppe und der Lokalisation des Tumors. Das Auftreten in der hinteren Schädelgrube wird hauptsächlich bei Kindern beobachtet, spinale Tumoren treten eher um das 30. bis 40. Lebensjahr auf. Supratentorielle Ependymome betreffen Kinder wie Erwachsene gleichermaßen (Purdy et al., 2014; Pajtler et al., 2015; Ellison et al., 2016). Das Wachstum der Ependymome ist verdrängend, selten auch infiltrativ (Ellison et al., 2016, S. 108).

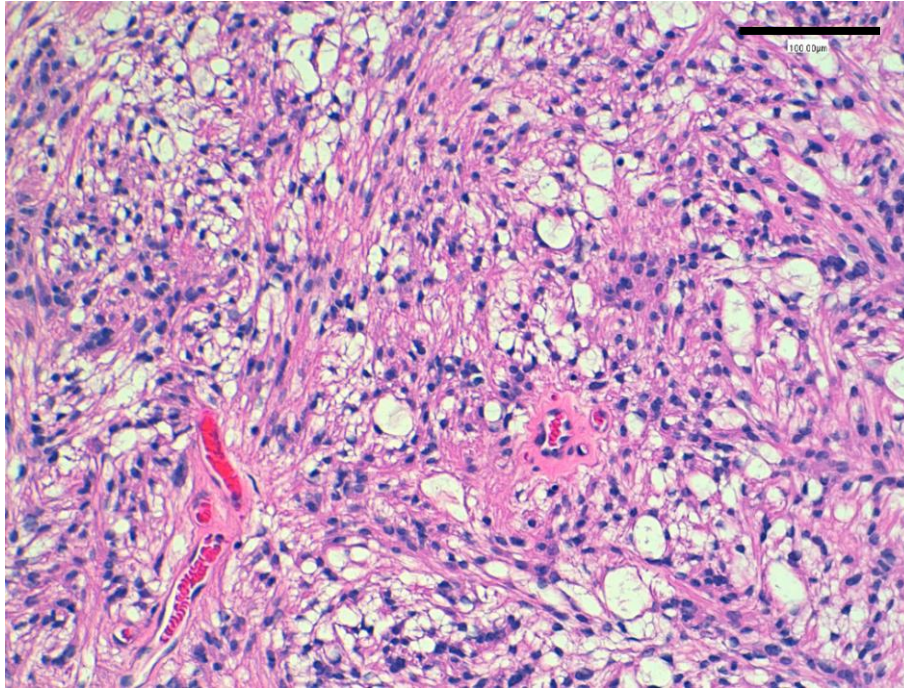


Abbildung 2: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines Myxopapillären Ependymoms (Balken entspricht 100 µm)

Ependymome weisen kleine, einheitliche Tumorzellen auf, die in eine fibrilläre Matrix eingebettet sind. Die Zellkerne sind monomorph, rundoval und chromatinreich mit einer gut sichtbaren Kernmembran (Klöppel et al., 2012, S. 507-508; Ellison et al., 2016, S. 107). Die Zelldichte kann stark variieren. Außerdem kann eine hohe Kern-Plasma-Relation vorkommen, die aber nicht notwendigerweise mit anderen Malignitätskriterien, wie z. B. einer hohen mitotischen Aktivität, korreliert. Ein histologisches Charakteristikum der Ependymome sind die Pseudorosetten. Diese sind in der beispielhaften mikroskopischen Aufnahme eines WHO-Grad-II-Ependymoms in Abbildung 3 zu sehen. Die Pseudorosetten werden von den echten ependymalen Rosetten unterschieden. Diese kommen bei Ependymomen nur in ca. 25% der Fälle vor. Des Weiteren können Nekrosen, Einblutungen, Regionen mit myxoider Degeneration oder Kalzifikationen auftreten (Ellison et al., 2016, S. 107-108).

Bei den Ependymomen werden, je nach dem vorherrschenden Zellbild, papilläre, klarzellige und tanzytische Ependymome unterschieden. Diese sind im Folgenden beschrieben:

Papilläre Ependymome sind eine eher seltene Unterart der Ependymome. Sie zeigen ein papilläres Wachstum, das dem der Plexuspapillome ähnelt. Papilläre Ependymome bilden jedoch, anders als die Plexuspapillome, keine subepitheliale Basalmembran aus und weisen Pseudorosetten mit GFAP-positiven Ausläufern auf (Ellison et al., 2004, 2016b).

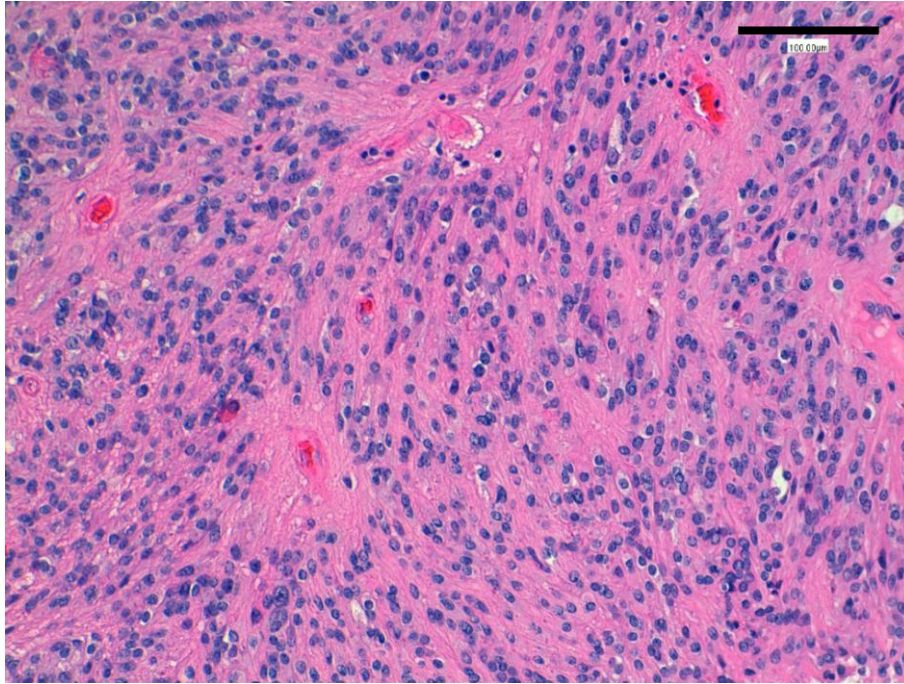


Abbildung 3: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines WHO-Grad-II-Ependymoms (Balken entspricht 100 μm)

Klarzellige Ependymome treten am häufigsten supratentoriell bei Kindern auf. Die Zellen der klarzelligen Ependymome erinnern von der Morphologie an Oligodendrozyten. Es finden sich helle Höfe um den Kern der Tumorzellen herum. Bei der Differenzierung zwischen Ependymomen und Oligodendrogliomen hilft das Vorliegen von Pseudorosetten in den Ependymomen sowie eine positive Immunreaktivität für GFAP und das epitheliale Membranantigen (EMA) (Ellison et al., 2004, S. 646; Ellison et al., 2016, S. 111).

Tanyzytische Ependymome sind durch lang gestreckte Tumorzellen mit spindelförmigen Kernen charakterisiert, die in irregulären Faszikeln unterschiedlicher Breite und mit variabler Zelldichte angeordnet sind (Ellison et al., 2016, S.111).

Die Prognose der WHO-Grad-II-Ependymome ist unterschiedlich und hauptsächlich abhängig vom Resektionsgrad, einer adjuvanten Strahlentherapie und den Eigenschaften der unterschiedlichen molekularen Tumorgruppen (Godfraind et al., 2012; Pajtler et al., 2015).

Ependymom mit RELA-Fusionsgen

Ependymome mit dem RELA-Fusionsgen werden seit der revidierten WHO-Klassifikation von 2016 als eigene Unterart beschrieben. In diesen Fällen liegt eine Fusion des RELA-Gens mit dem bislang wenig charakterisierten C11orf95-Gen vor. Das RELA-Gen codiert für einen Bestandteil des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*). Durch die Bildung eines Fusionsproteins kommt es so zu einer Aktivierung

des NFκB-Signalweges (Parker et al., 2014; Ellison et al., 2016, S. 112). NFκB ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der in neoplastischen Zellen an der Regulation bedeutsamer zellulärer Prozesse, wie Entzündungsmediation, Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung, beteiligt ist (Chaturvedi et al., 2011).

Die RELA-Fusion wurde bislang ausschließlich bei supratentoriellen Ependymomen nachgewiesen, die dem WHO-Grad II oder III zugeschrieben werden. Ungefähr 70% der supratentoriellen Ependymome bei Kindern sind RELA-Fusion-positiv, wohingegen der Anteil bei Erwachsenen niedriger ist (Parker et al., 2014; Pajtler et al., 2015).

Morphologisch gibt es kein spezielles Merkmal, das sich den RELA-Fusion-positiven Ependymomen zuordnen lässt. Wie auch bei anderen Ependymomen kann in der Immunhistochemie eine Positivität für GFAP und EMA nachgewiesen werden. Bei den supratentoriellen Ependymomen korreliert ein Nachweis von L1CAM (*L1 Cell Adhesion Molecule*) positiv mit dem Vorkommen des RELA-Fusionsgens (Parker et al., 2014).

Gemäß Pajtler et al. zeigte sich für die RELA-Fusion-positiven Ependymome unter den supratentoriellen Ependymomen die schlechteste Prognose (Pajtler et al., 2015).

Anaplastische Ependymome

Bei den anaplastischen Ependymomen handelt es sich um meist gut umschriebene Gliome, die nur selten ein invasives Wachstum zeigen. Mikroskopisch ähneln sie den klassischen Ependymomen, zeichnen sich aber durch eine hohe Zelldichte und einen deutlich erhöhten Mitoseindex aus. Mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen können ebenfalls auftreten. Wie bei den niedriggradigen Ependymomen können sich Merkmale einer klarzelligen, tanzzytischen oder papillären Differenzierung zeigen. Teilweise ist die Zelldichte so hoch, dass eine Abgrenzung zu embryonalen Tumoren schwer fällt. Anaplastische Ependymome treten bei Erwachsenen und Kinder auf. Die große Mehrheit der Tumoren manifestiert sich intrakraniell. Anaplastische Ependymome sind im Allgemeinen die Ependymome mit der schlechtesten Prognose (Ellison et al., 2016a). Abbildung 4 zeigt das Bild eines anaplastischen Ependymoms mit Mitosen und nekrotischen Arealen.

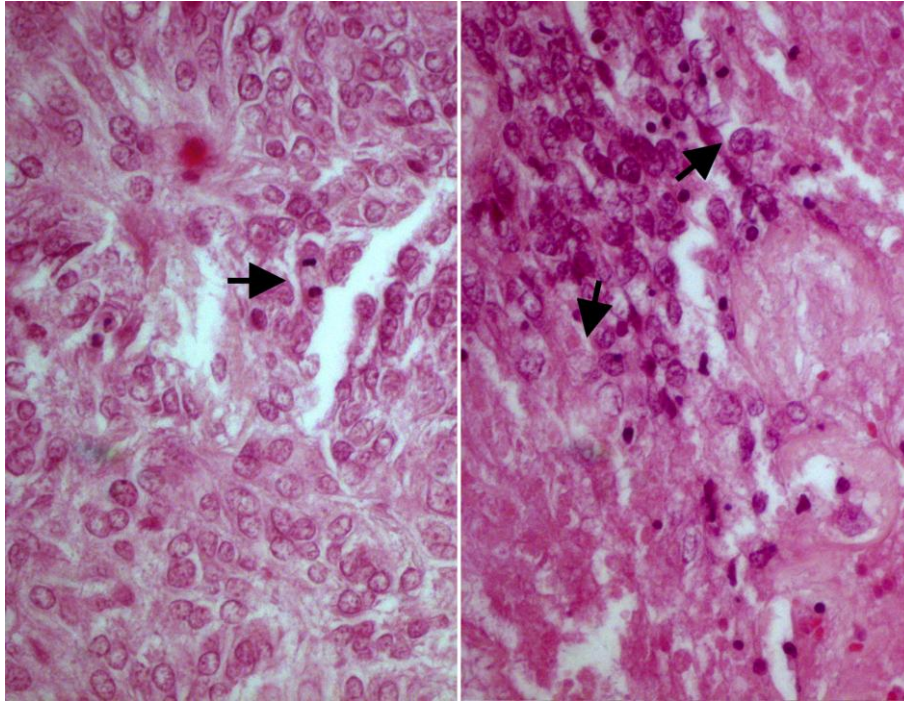


Abbildung 4: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines anaplastischen Ependymoms (Pfeil im linken Bild deutet auf eine Mitosefigur, Pfeile im rechten Bild deuten auf nekrotische Areale)

Anaplastische Ependymome werden dem WHO-Grad III zugeordnet. Ein relevanter Zusammenhang zwischen dem WHO-Grad, dem Tumorverhalten und der Prognose konnte entgegen anderer Tumorentitäten nicht einheitlich gezeigt werden (Bouffet et al., 1998; Figarella-Branger et al., 2000; Tihan et al., 2008; Ellison et al., 2011, 2016a, S. 113). Die histologische Gradeinteilung wird dadurch erschwert, dass viele Ependymome isolierte Areale mit unterschiedlich ausgeprägten Malignitätskriterien aufweisen (Pajtler et al., 2015).

2.1.5 Molekularpathologie

Zusätzlich zu dieser Einteilung nach histopathologischen Kriterien gewinnt die biologische Charakterisierung der Tumoren durch die Molekularpathologie zunehmend an Bedeutung. Trotz der histopathologischen Ähnlichkeiten der Ependymomvarianten in den unterschiedlichen Lokalisationen, existiert eine große Heterogenität im klinische Verhalten und den molekularen Eigenschaften mit deutlichen genetischen und epigenetischen Unterschieden (Pajtler et al., 2015; Timmermann, 2018). Verschiedene Studien liefern Hinweise darauf, dass diese molekularen Unterschiede darauf zurückzuführen sind, dass, je nach Lokalisation des Tumors, unterschiedliche Ursprungszellen existieren (Taylor et al., 2005; Johnson et al., 2010; Parker et al., 2014; Pajtler et al., 2015).

Parker et al. fanden 2014 in einer großen Studie in der Fusion des RELA- und des C11orf95-Gens die ersten *driver genes* in supratentoriellen Ependymomen. Verursacht wird diese Fusion durch Chromothripsis (einmalige Umlagerung von Chromosomenabschnitten) auf Chromosom 11. Durch die Bildung eines Fusionsproteins kommt es zu einer Aktivierung des NFκB-Signalweges. Das Fusions-Gen ist in über 70 % der supratentoriellen Ependymome bei Kindern zu finden und mutmaßlich ursächlich für die Karzinogenese (Parker et al., 2014).

In einer viel zitierten Studie von Pajtler et al. konnten per DNA-Methylierungsanalyse neun molekulare Subgruppen von Ependymomen unterschieden werden, die einen deutlichen Zusammenhang zu den unterschiedlichen Manifestationsorten der Ependymome zeigen (Pajtler et al., 2015). Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um ein epigenetisches Phänomen, bei dem durch DNA-Methyltransferasen Methylgruppen an bestimmte Cytosin-Moleküle angehängt werden und auf diese Weise eine Modifizierung der DNA erfolgt. Durch diese Modifizierung kommt es zu einer epigenetischen Genregulation, da unter anderem die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA durch die Methylierung unterbunden wird (Moore et al., 2013). Da die DNA-Methylierung gewebespezifisch erfolgt, kann eine Analyse des DNA-Methylierungsmusters auch für diagnostische Zwecke genutzt werden (Tsou et al., 2002; Moore et al., 2013). Durch diese Methode gelang es beispielsweise Sturm et al. neue Tumorentitäten unter den primitiven neuroektodermalen Tumoren des zentralen Nervensystems (CNS-PNETs) zu identifizieren (Sturm et al., 2016).

Pajtler et al. identifizierten in einer großen Kohorte, per DNA-Methylierungsanalyse, drei unterschiedliche Subgruppen von Ependymomen in jedem ZNS-Kompartiment (supratentoriell, infratentoriell, spinal) (Pajtler et al., 2015). Eine Übersicht über die Subgruppen ist in Abbildung 5 dargestellt. Tumoren, die morphologisch den Subependymomen zuzuordnen sind, wurden entsprechend in die Gruppen SP-SE (*spinal subependymoma*), PF-SE (*posterior fossa subependymoma*) und ST-SE (*supratentorial subependymoma*) eingeteilt. Ein hoher Anteil der supratentoriellen Ependymome weist entweder das Fusionsgen RELA oder YAP1 auf (Parker et al., 2014), woraus sich die anderen zwei supratentoriellen Gruppen ergeben: ST-EPN-RELA und ST-EPN-YAP1. Neben dem bereits beschriebenen RELA-Fusionsgen wiesen Pajtler et al. das bereits von Parker et al. identifizierte YAP1-MAMLD1-Fusionsgen in sechs von sieben RELA-Fusion-negativen supratentoriellen Ependymomen nach. In dem verbleibenden Tumor wurde ein Fusionsgen aus YAP1 und dem bislang uncharakterisierten Gen FAM118B detektiert. In keinem der Tumoren der anderen Subgruppen konnte eine YAP1-Fusion nachgewiesen werden, weshalb die Kategorisierung in eine eigene Subgruppe

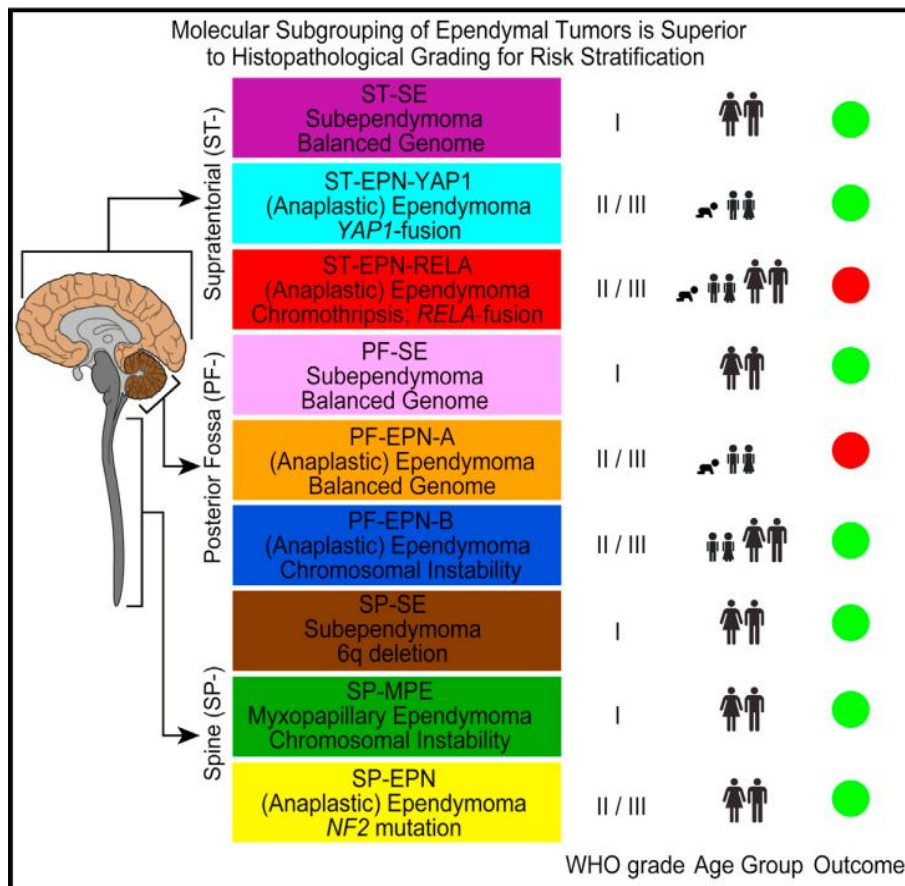


Abbildung 5: Grafische Darstellung der 9 molekularen Subgruppen aus Pajtler et al. (Pajtler et al., 2015)

erfolgte (Parker et al., 2014; Pajtler et al., 2015). Die beiden anderen Gruppen des Spinalkanals umfassen myxopapilläre und klassische Ependymome und werden dementsprechend mit SP-MPE und SP-EPN abgekürzt. Die zwei weiteren infratentoriellen Gruppen werden in eine Gruppe A und eine Gruppe B unterteilt. Diese Einteilung wurde bereits in früheren molekularen Studien herausgearbeitet. Die Gruppen werden daher als PF-EPN-A und PF-EPN-B bezeichnet (Witt et al., 2011; Wani et al., 2012; Hoffman et al., 2014; Mack et al., 2014; Ellison et al., 2016b, S. 109).

Die neun Subgruppen zeigen eine klare Assoziation zu den verschiedenen Altersgruppen. So kamen alle drei Gruppen der Subependymome ausschließlich bei Erwachsenen vor (Altersspanne 22-76 Jahre) mit einem mittleren Alter von 49 Jahren (SP-SE), 59 Jahren (PF-SE) und 40 Jahren (ST-SE). Die beiden anderen spinalen Subgruppen traten ebenfalls hauptsächlich bei Erwachsenen auf, mit wenigen Ausnahmen im Kindesalter. So war das mittlere Alter der SP-MPE 32 Jahre (Altersspanne 9-66 Jahre) und das der SP-EPN 41 Jahre (Altersspanne 11-59 Jahre). Die Ependymome der PF-EPN-B Subgruppe wurden hauptsächlich bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen nachgewiesen und zeigten ein

mittleres Alter von 30 Jahren (Altersspanne 10-65 Jahre), wohingegen die der Subgruppe PF-EPN-A fast ausschließlich bei kleinen Kindern vorkamen und ein mittleres Alter von 3 Jahren zeigten (Altersspanne 0-51 Jahre). Die Subgruppe ST-EPN-YAP1 trat ebenfalls hauptsächlich bei Kindern auf. Das mittlere Alter lag hier bei 1,4 Jahren (Altersspanne 0-51 Jahre). In der Gruppe ST-EPN-RELA spiegelt das mittlere Alter von 8 Jahren ebenfalls das häufige Vorkommen bei Kindern wieder, allerdings treten fast ein Viertel der Tumore dieser Gruppe bei Erwachsenen auf (Altersspanne 0-69 Jahre) (Pajtler et al., 2015).

Deutliche Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich auch in der Anzahl und den Mustern der DNA *copy number alterations* (CNAs). Die meisten CNAs betreffen Zugewinne oder Verluste von ganzen Chromosomen. Veränderungen von einzelnen Chromosomenarmen sind deutlich seltener. Insbesondere die Subgruppe ST-EPN-RELA zeigte eine dramatische Anzahl von Kopienzahlvariationen. Diese betreffen insbesondere das Chromosom 11, auf dem auch das RELA- sowie das C11orf95-Gen lokalisiert sind. Da die Entstehung des Fusionsgens der ST-EPN-RELA-Gruppe auf dem Phänomen der Chromothripsis beruht und die Veränderungen des Chromosoms 11 in ihrem Muster ebenfalls deutlich an dieses Phänomen erinnern, schließen die Autoren der Studie, dass dies ebenfalls Ursache der beobachteten Fragmentationen des Chromosoms 11 ist (Parker et al., 2014; Pajtler et al., 2015).

In den ST-EPN-YAP1-Tumoren wurden keine Veränderungen durch Chromothripsis gefunden, obgleich auch YAP1 auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Neben einigen CNAs in der Nähe des YAP1-Gens ist der Rest des Genoms dieser Subgruppe, im Gegensatz zu dem der ST-EPN-RELA-Tumoren, recht stabil. Außer den ST-EPN-RELA-Tumoren zeigten die PF-EPN-B-Subgruppe die höchste Instabilität im Genom mit vielen Verlusten oder Zugewinnen ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme in jedem einzelnen Tumor (Pajtler et al., 2015).

Survival-Analysen ergaben einen erheblichen Unterschied zwischen den Subgruppen bezüglich *overall survival* (OS) und *progression free survival* (PFS). Dabei hatten die Gruppen PF-EPN-A und ST-EPN-RELA, die überwiegend pädiatrische Patienten betreffen, die schlechteste Prognose mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 50% und einem PFS von ca. 20%. In allen anderen Subgruppen zeigten sich 5-Jahres-Überlebensraten von 100% und 10-Jahres-Überlebensraten von 88% bis 100% (Pajtler et al., 2015). Hierbei ist die Tatsache hervorzuheben, dass die Gruppen PF-SE und ST-SE gute Überlebensraten aufwiesen, obwohl ein wesentlicher Anteil der zugehörigen Tumoren histopathologisch dem WHO-Grad II und sogar Grad III zugeordnet wurden. Dies zeigt den größeren klinischen

Nutzen der Einordnung in molekulare Subgruppen gegenüber der klassischen Gradeinteilung der Ependymome (Pajtler et al., 2015). Abbildung 6 bietet eine Übersicht über die wichtigsten molekularen und klinischen Unterschiede der Subgruppen.

Anatomic Compartment	SPINE (SP-)			Posterior Fossa (PF-)			Supratentorial (ST-)		
Molecular Subgroup	SE	MPE	EPN	SE	EPN-A	EPN-B	SE	EPN-YAP1	EPN-RELA
Histopathology	sub-ependymoma (WHO I)	myxopapillary ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)
Genetics	6q del.	CIN	CIN	balanced	balanced	CIN	balanced	aberr. 11q	aberr. 11q
Oncogenic Driver	?	?	NF2	?	?	?	?	YAP1-fusion	RELA-fusion
Tumor Location									
Age Distribution (years)									
Gender Distribution									
Patient Survival (OS; months)									

Abbildung 6: Grafische Darstellung der wichtigsten molekularen und biologischen Charakteristika der unterschiedlichen Subgruppen aus Pajtler et al. (Pajtler et al., 2015)

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse von Pajtler et al., dass die neun Subgruppen genetisch eigene Entitäten darstellen (Pajtler et al., 2015). Diese These wird durch die Identifizierung deutlich unterschiedlicher biologischer Prozesse und Signalwege der unterschiedlichen Subgruppen unterstützt. Die Erkenntnisse könnten die Möglichkeit einer zukünftigen, subgruppenspezifischen, zielgerichteten Therapie eröffnen. Dies wäre insbesondere für die Subgruppen PF-EPN-A und ST-EPN-RELA entscheidend, da die Prognose unter den bisherigen therapeutischen Optionen ungünstig ist (Pajtler et al., 2015). Eine weitere Erkenntnis der Studie ist zudem, dass auch bei einem Rezidiv-Tumor die Zuordnung zur jeweiligen Subgruppe bestehen bleibt. Dies lässt darauf schließen, dass das DNA-Methylierungsprofil nicht nur bei der initialen Diagnose ein zuverlässiges Instrument der Diagnostik darstellt, sondern auch im Falle eines Wiederauftretens des Tumors (Pajtler et al., 2015). Die Ergebnisse von Pajtler et al. werden durch weitere Studien mit DNA-Methylierungsanalysen an Ependymomen, Medulloblastomen, pilozytischen Astrozytomen

und CNS-PNETs untermauert (Hovestadt et al., 2013; Lambert et al., 2013; Mack et al., 2014; Sturm et al., 2016).

2.1.6 Immunhistologie

Ein Großteil der Ependymome exprimiert GFAP. Die Expression erfolgt vor allem in den Zellen der Pseudorosetten. Dabei zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Expression und der Lokalisation. So ist die Expression von GFAP in infratentoriellen Ependymomen signifikant höher als die in supratentoriellen Ependymomen. In den supratentoriellen Ependymomen zeigt sich eine deutlich höhere Expression von p75 und NeuN (Hagel et al., 2013). In Subependymomen sowie in myxopapillären Ependymomen wird der unspezifische neuronale Marker NCAM1 (*Neural Cell Adhesion Molecule 1*) exprimiert. Anders als in Ependymomen, RELA-Fusion-positiven Ependymomen sowie anaplastischen Ependymomen, wird EMA in den Subependymomen kaum exprimiert (Louis et al., 2016, S. 103-114). Kong et al. zeigten in einer Studie an Subependymomen zu möglichen therapeutischen Angriffspunkten eine häufige Expression von TOP2B (*DNA Topoisomerase II Beta*), MDM2 (*murine double minute 2*), Nucleolin, HIF1-alpha (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) und phosphoryliertem STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Kong et al., 2014). Des Weiteren exprimieren die myxopapillären Ependymome, die klassischen Ependymome sowie die anaplastischen Ependymome das Protein S-100 und Vimentin (Louis et al., 2016, S. 104-114). Zudem wurde eine hohe Expressionsrate von Nestin beschrieben (Almqvist et al., 2002). Die Expression von L1CAM korreliert in supratentoriellen Ependymomen mit dem Vorkommen des RELA-Fusionsgens. L1CAM wird auch in anderen Gehirntumoren exprimiert und ist somit nicht spezifisch für Ependymome (Parker et al., 2014; Ellison et al., 2016b, S. 108).

2.1.7 Genetik

Die genetischen Veränderungen der Ependymome unterscheiden sich je nach Lokalisation und Unterart der Tumoren. Intrakranielle Subependymome zeigen Veränderungen der Kopienzahl von Chromosom 6, wohingegen diese bei den spinalen Subependymomen nicht auftreten. Die myxopapillären Ependymome des Spinalkanals (SP-MPE) sind gekennzeichnet durch Zugewinne vieler Chromosomen und eine gute Prognose (McLendon et al., 2016). Die Grad-II-Ependymome zeigen ein großes Spektrum an genetischen Veränderungen. Hierzu gehören am häufigsten Zugewinne der Chromosomen 1q, 5, 7, 9, 11, 18 und 20 sowie Verluste der Chromosomen 1q, 3, 6, 6q, 9p, 13q, 17 und 22 (Kilday et al., 2009;

Korshunov et al., 2010). Für Ependymome der Gruppe ST-EPN werden in verschiedenen Publikationen Verluste des Chromosoms 9 beschrieben (Carter et al., 2002; Grill et al., 2002; Jeuken et al., 2002; Johnson et al., 2010; Witt et al., 2011; Ellison et al., 2016b, S. 109). In spinalen Ependymomen zeigen sich häufig Veränderungen des Chromosoms 22 sowie eine Mutation des NF2-Gens (Birch et al., 1996; Ebert et al., 1999). In ca. 70 % der supratentoriellen Ependymome bei Kindern tritt die Fusion der Gene C11orf95 und RELA auf (Pajtler et al., 2015; Ellison et al., 2016).

Kindliche Ependymome und solche des Erwachsenenalters unterscheiden sich auf molekularer Ebene. So wiesen Kilday et al. in einer Metaanalyse mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung (*comparative genomic hybridization, CGH*) nach, dass sich die Strukturveränderungen der Chromosomen von Kindern und Erwachsenen deutlich unterscheiden. Die größten Unterschiede zeigten sich in Veränderungen des Chromosoms 1q, bei dem in mehr als 20% der kindlichen Fälle und in nur 8 % der Ependymome des Erwachsenenalters ein Zuwachs detektiert wurde. Ein Zugewinn des Chromosoms 1q wird in vielen Studien mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (Kilday et al., 2009, 2012; Witt et al., 2011; Ellison et al., 2016b, S. 109). In den Ependymomen der Erwachsenen kam hingegen häufiger ein Zuwachs auf den Chromosomen 7, 9 und 12 vor. In rezidivierenden kindlichen Ependymomen finden sich ebenfalls häufig eine Zunahme des Chromosoms 1q sowie ein Verlust an Material der Chromosomen 6q und 22. Dies deutet darauf hin, dass es sich dabei um Merkmale handeln könnte, die spezifisch für aggressive Tumoren sind. Eine weitere Unterscheidung auf molekularer Ebene zwischen den Ependymomen des Kindes- und Erwachsenenalters ist die Anzahl der Veränderungen. So sind es bei Erwachsenen im Mittel 7,5 genetische Anomalien pro Tumor und bei Kindern 3,8 (Kilday et al., 2009). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren bei Ependymomen eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der Mutationen und der Prognose der Patienten existiert (Dyer et al., 2002; Gilhuis et al., 2004). Dies wird auch in der oben genannten Studie von Kilday et al. deutlich. Die wenigen, oft partiellen chromosomalen Veränderungen treten zudem gehäuft bei Kindern auf. Die Ursache hierfür ist bislang nicht geklärt (Kilday et al., 2009).

2.1.8 Therapie

In der Behandlung von Ependymomen ist die primäre Tumorchirurgie die Therapie der Wahl. Eine komplette chirurgische Tumoresektion ist jedoch, abhängig von der Lokalisation der Tumoren, nicht immer möglich (Timmermann, 2018).

In verschiedenen klinischen Studien zeigte sich, dass ein postoperativ verbleibender Tumorrest einen hochsignifikant negativ prädiktiven Faktor darstellt. Aus diesem Grund kommt der lokalen Tumorkontrolle eine außerordentliche Bedeutung zu (Timmermann, 2018). Postoperativ sollte eine frühe MRT-Kontrolle erfolgen und bei einem Resttumor ggf. eine Nachresektion noch vor dem Beginn der adjuvanten Therapie in Betracht gezogen werden.

Tumorrezidive treten in den meisten Fällen an dem Ort des Primärtumors auf und die Lokalrezidivrate ist bei WHO-Grad-II und Grad-III-Tumoren unabhängig vom Resektionsgrad sehr hoch. Daher gehört bei der adjuvanten Therapie von intrakraniellen Ependymomen im Kindes- und Jugendalter eine postoperative Lokalbestrahlung zum Therapiestandard (Schild et al., 1998; Timmermann, 2018). Die PFS-Raten nach kompletter chirurgischer Resektion und Nachbestrahlung liegen zwischen 60% und 85% nach fünf Jahren und 50% und 70% nach zehn Jahren (Timmermann, 2018).

Inwieweit die Applikation einer Erhaltungskemotherapie bei Kindern mit anaplastischen Ependymomen oder einem Resttumor die Prognose der Patienten verbessert, ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Bei sehr jungen Patienten kann eine Chemotherapie eingesetzt werden, um den Beginn einer Radiotherapie hinauszuzögern (Grundy et al., 2007; Timmermann, 2018).

Bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 und symptomlosen spinalen Ependymomen wird, aufgrund des extrem langsamen Wachstums dieser Ependymome, ein beobachtendes Abwarten empfohlen (Aguilera et al., 2011; Plotkin et al., 2011).

2.1.9 Prognose

Das klinische Verhalten von Ependymomen und somit auch die Prognose ist heterogen. Grundsätzlich haben Kinder mit Ependymomen eine ungünstigere Prognose als Erwachsene. Eine sehr ungünstige Prognose haben Säuglinge und Kleinkinder (Sala et al., 1998). Die 5-Jahres-Überlebensrate reicht hier nur von 42% bis 55% (Gatta et al., 2014). Bei größeren Kindern liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei etwa 64% und reicht bei Erwachsenen von etwa 70% bis 89% (Ostrom et al., 2014).

Eine Erklärung für diese altersabhängigen Unterschiede besteht darin, dass bei Kindern die Ependymome hauptsächlich in der hinteren Schädelgrube auftreten, wohingegen bei erwachsenen Patienten die Tumoren vorwiegend spinal lokalisiert sind. Eine spinale Lokalisation ist mit einem besseren Outcome assoziiert (Ellison et al., 2016b, S. 109-110).

2.1.10 Prognostische Faktoren

Da bei Ependymomen ein Rückschluss von den individuellen histopathologischen Merkmalen und dem Tumorgrad auf die Prognose kontroverse Ergebnisse liefert (Korshunov et al., 2004, 2010; Ellison et al., 2011; Godfraind et al., 2012), ist die Identifikation von anderen prognostischen Faktoren weiterhin ein bedeutendes Thema. In den vergangenen Jahrzehnten gab es eine Reihe von Studien zu möglichen prognostischen Faktoren und ihrer Bedeutung in der Ependymomdiagnostik. In diesem Unterkapitel soll ein Überblick über die wichtigsten diagnostischen und prognostischen Faktoren gegeben werden.

Klinische Faktoren

Ein klinischer, prognostisch bedeutsamer Faktor ist die Tumorlokalisation. Sayegh et al. beschreiben einen signifikanten Unterschied hinsichtlich PFS und OS zwischen infratentoriellen und supratentoriellen Ependymomen bei Erwachsenen zugunsten der infratentoriellen Ependymome. Dies gilt obwohl die supratentoriellen Tumoren chirurgisch besser zugänglich sind und der Grad der Resektion positiv mit der Prognose erwachsener Ependymompatienten korreliert. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen Lokalisation und Tumorverhalten (Sayegh et al., 2014). Bei pädiatrischen Patienten verhält es sich umgekehrt. Hier zeigen die supratentoriellen Ependymome ein signifikant besseres OS als die infratentoriellen (Sala et al., 1998; Virág et al., 2017). Eine derartige Korrelation fanden auch Sala et al. in einer Studie an 35 pädiatrischen Patienten mit intrakraniellen Ependymomen. Die Autoren dieser Studie wiesen in multivariaten Analysen nach, dass der einzige unabhängige klinische prognostischer Faktor (untersucht wurden Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, Tumorgröße, Histologie, Morphologie, Resektionsgrad und adjuvante Therapien) das Alter der Patienten darstellt. Kinder unter 4 Jahren hatten ein signifikant schlechteres OS als Kinder über 4 Jahren. Die Autoren interpretieren die prognostische Relevanz der Lokalisation als nur indirekt und dadurch begründet, dass bei kleinen Kindern die Ependymome am häufigsten infratentoriell auftreten (Sala et al., 1998).

Pajtler et al. zeigten mit dem Nachweis von lokalisationsabhängigen unterschiedlichen molekularen Gruppen, dass große prognostische Unterschiede zwischen diesen Gruppen und somit auch zwischen den Lokalisationen bestehen (Pajtler et al., 2015).

Als ein weiterer prognostischer Faktor gilt das Alter der Patienten bei Diagnosestellung. Korshunov et al. wiesen in einer großen Studie bei Kindern eine schlechtere Prognose im Vergleich zu erwachsenen Patienten nach, konnten allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen Kleinkindern und älteren Kindern feststellen (Korshunov et al., 2004). Dieser

konnte aber in mehreren anderen Studien gezeigt werden (Sala et al., 1998; Jaing et al., 2004; Tihan et al., 2008). In einer großen Übersichtsarbeit von Kilday et al. konnte anhand einer Metaanalyse, die Daten von über 300 pädiatrische Patienten einbezog, ebenfalls eine Assoziation zwischen einem höheren Patientenalter bei Diagnosestellung und einer positiven Prognose gezeigt werden (Kilday et al., 2009). Van Veelen-Vincent et al. hingegen zeigten in ihrer Untersuchung, dass das Alter keinen statistisch unabhängigen prognostischen Faktor darstellt (van Veelen-Vincent et al., 2002).

Kurt et al. untersuchten an einem Kollektiv von 69 Ependymomen, aus dem Subependymome und Myxopapilläre Ependymome ausgeschlossen wurden, die prognostische Relevanz von verschiedenen histopathologischen und klinischen Merkmalen. Sie konnten keinen prognostischen Unterschied zwischen den vier Ependymosubtypen (zelluläre, papilläre, klarzellige und tanizytische Ependymome) feststellen. In den multivariaten Analysen zeigten lediglich der Mitoseindex sowie ein positiver *MIB-1-Labeling-Index* eine prognostische Signifikanz. Die klinischen Merkmale Alter der Patienten, Tumorlokalisation und Geschlecht erwiesen sich in dieser Studie als prognostisch nicht relevant. Als klinisches Merkmal war einzig der Resektionsgrad entscheidend für die Prognose der Patienten (Kurt et al., 2006).

Die prognostische Bedeutung des Resektionsgrades zeigt sich auch in anderen Studien. Eine unvollständige Resektion der Ependymome war einheitlich mit einem schlechteren Outcome assoziiert verglichen mit einer vollständigen Resektion (Sala et al., 1998; Zamecnik et al., 2003; Jaing et al., 2004; Tihan et al., 2008; Godfraind et al., 2012; Kilday et al., 2012; Chai et al., 2017). Der Resektionsumfang ist insbesondere für High-grade-Tumoren ein signifikanter prognostischer Faktor für das PFS (Korshunov et al., 2002). In der bereits erwähnten Studie von Sala et al. zeigte sich beim Faktor Resektionsgrad nur in den univariaten Analysen eine prognostische Relevanz, wohingegen in den multivariaten Analysen diese nicht nachgewiesen werden konnte. Die Autoren verglichen daraufhin Daten von 9 Studien mit pädiatrischen Ependymompatienten in denen sich der chirurgische Resektionsgrad im Gegensatz zur Histologie als klar prognosebeeinflussend herausstellte (Sala et al., 1998). Ein kausaler Zusammenhang wird darin vermutet, dass Patienten, bei denen eine unvollständige Resektion erfolgte mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleiden (Tomita et al., 1988). Rezidive treten in der Regel in der Lokalisation des Primärtumors auf, gehen häufig in der Ausdehnung noch darüber hinaus und mit jedem weiteren Rezidiv verschlechtert sich die Prognose der Patienten (Goldwein et al., 1990). Eine komplette Resektion schützt allerdings keineswegs vor einem Rezidiv. In bis zu 50 % der Fälle mit einer kompletten Resektion

erlitten die Patienten einen Rezidivtumor (Sowar et al., 2006). Auch der Zusammenhang zwischen Prognose und einer kompletten Resektion ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. So existieren auch Studien, die eine Korrelation zwischen Prognose und Resektion nicht nachweisen können (Goldwein et al., 1990a; Akyuz et al., 2000)

Standardhistologische Faktoren

Von den gewöhnlichen Anaplasiekriterien (Nekrosen, hohe Zelldichte, Zell- und Kernpleomorphien, hohe Mitoserate, Gefäßproliferationen, Differenzierungsverlust) scheinen bei Ependymomen lediglich der Mitoseindex, einige andere Proliferationsindizes sowie Tumorzellen mit niedriger Differenzierung relativ konstant mit dem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert zu sein (Ellison et al., 2016b, S. 110).

Zusätzlich konnte in weiteren Studien eine Assoziation zwischen der Tumorzelldichte und dem Outcome gezeigt werden (Zamecnik et al., 2003; Godfraind et al., 2012).

Immunhistochemische Faktoren

Für die Abschätzung der Prognose von kindlichen Ependymomen der hinteren Schädelgrube ist eine routinemäßige Unterscheidung der molekularen Subgruppen PF-EPN-A und PF-EPN-B sehr wichtig. Panwalkar et al. zeigten in einer großen Studie an pädiatrischen Ependymomen, dass der immunhistochemische Nachweis einer reduzierten H3K27me3-Expression (*Histone H3 lysine 27 trimethylation*) eine (gegenüber der Methylomanalyse) sehr günstige und einfache Methode darstellt, um die prognostisch deutlich ungünstigere Gruppe PF-EPN-A von den PF-EPN-B-Tumoren zu unterscheiden (Panwalkar et al., 2017).

Araki et al. beschreiben die Expression von TNC als einen negativ prädiktiven Faktor bei kindlichen Ependymomen der hinteren Schädelgrube. So wird TNC vor allem in anaplastischen Ependymomen exprimiert und zeigt eine negative Korrelation mit dem PFS und dem OS sowie eine Korrelation zu einem jungen Patientenalter (Araki et al., 2016). Andreiuolu et al. untersuchten TNC an intrakraniellen Ependymomen und fanden heraus, dass die Korrelation zum OS nur für die Tumoren der hinteren Schädelgrube besteht. Dahingegen ist die Korrelation von einem Zugewinn von Chromosom 1q25 und einer ungünstigen Prognose lokalisationsunabhängig. Auch diese Autoren kamen zu dem Schluss, dass anhand der genannte Faktoren eine Risikostratifikation für intrakranielle Ependymome möglich ist (Andriuolo et al., 2017).

Für Patienten mit intrakraniellen Grad-II-Ependymomen wird EGFR als hilfreicher Marker für die Risikostratifikation beschrieben. Eine Untersuchung des EGFR-Status könnte helfen,

die Tumoren mit einer schlechten Prognose unter den intrakraniellen Grad-II-Ependymomen herauszufiltern (Mendrzyk et al., 2006).

Korshunov et al. untersuchten 2002 verschiedene immunhistochemische Marker auf einen Zusammenhang zwischen der Expression und verschiedenen prognostischen Variablen wie Grading, PFS und Rezidivierung. Für Low-grade-Ependymome empfehlen die Autoren einen Markierungsindex für Ki-S1 (zelluläres Enzym für die Segregation und Kondensation von Chromosomen), Tenascin, EGFR sowie VEGF durchzuführen. Hierdurch können die prognostisch ungünstigen Tumoren innerhalb dieser Gruppe herausgefiltert werden. Für die High-grade-Ependymome sind die Expression von p53 sowie die Anzahl an p27, p14 und ISEL-positiven Kernen wertvoll, um das PFS zu bestimmen. Bei der ISEL-Methode (*in situ end labeling*) handelt es sich um ein Verfahren, anhand dessen apoptotische Zellen aufgedeckt werden können (Korshunov et al., 1999, 2002). Nambirajan et al. zeigten in einer Studie eine erhöhte Expression von VEGF und Nestin in supratentoriellen Ependymomen und eine Assoziation zu einem schlechteren PFS (Nambirajan et al., 2014).

Virág et al. wiesen in einer immunhistochemischen Untersuchung an 54 pädiatrischen intrakraniellen Ependymomen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression des Tight-junctions-Bestandteils Claudin-5 und dem OS der Patienten nach. Eine Expression von Claudin-5 zeigte sich dabei nur bei supratentoriellen Ependymomen und war mit einem signifikant besseren OS assoziiert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Claudin-5 als Bestandteil von Tight-junctions durch eine gesteigerte Zell-Zell-Verbindung das Invasivitäts-Potential von Ependymomen verringert. Weiterhin sehen die Autoren hierin einen Hinweis darauf, dass die Ependymome manche der regionsabhängigen Unterschiede von den radialen Gliazellen beibehalten die von Taylor et al. beschrieben wurden (Taylor et al., 2005; Virág et al., 2017).

Das Protein EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) wurde in einer Studie an pädiatrischen intrakraniellen Ependymomen, insbesondere der hinteren Schädelgrube, als unabhängiger prognostischer Marker für ein ungünstiges Outcome gefunden (Li et al., 2015).

Ridley et al. untersuchten immunhistochemisch die möglichen prognostischen Faktoren Nucleolin, Survivin, Ki-67, den katalytischen Subkomplex der Telomerase hTERT und Mitglieder der Rezeptortyrosinkinase I (RTK-I) Familie. Einzig eine geringe Nucleolin-Expression war in multivariaten Analysen unabhängig mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Ki67 und Survivin korrelierten mit dem histologischen Grad, nicht aber mit dem Outcome (Ridley et al., 2008).

Genetische Faktoren

In einer Metaanalyse mit Daten von 303 Ependymompatienten konnten Kilday et al. zwischen Ependymomen von Erwachsenen und Kindern einen klaren Unterschied in den genetischen Aberrationen darstellen. Kindliche Ependymome wiesen am häufigsten Zugewinne der Chromosomen 1q, 7 und 9 sowie Verluste der Chromosomen 22, 3, 9q, 1q, 6q, 1p, 17 und 6 auf. Bei Erwachsenen waren die häufigsten Veränderungen Zugewinne der Chromosomen 7, 9, 12, 5, 18, X und 2 sowie Verluste der Chromosomen 22/22q, 10, 13q, 6 und 14q. Der auffälligste Unterschied zeigte sich beim Zugewinn von Chromosom 1q. Diesen wiesen 20 % der pädiatrischen, aber nur 8 % der erwachsenen Patienten auf. In Ependymomrezidiven von Kindern stellten die Autoren vermehrt Zugewinne von Chromosom 1q, zusammen mit Verlusten der Chromosomen 6q und 22 fest. In diesen Veränderungen vermuten die Autoren potentielle Marker für ein aggressives Tumorverhalten (Kilday et al., 2009; Araki et al., 2016).

Ein Zugewinn des Chromosoms 1q wird in vielen Studien als ein negativer prognostischer Marker beschrieben. Die Veränderung tritt insbesondere bei kindlichen Tumoren mit anaplastischen Merkmalen auf, die in der hinteren Schädelgrube lokalisiert sind. Zudem zeigt sich eine Assoziation zu einem aggressiven biologischen Verhalten (Carter et al., 2002; Dyer et al., 2002; Mendrzyk et al., 2006; Godfraind et al., 2012; Araki et al., 2016). Durch die Untersuchung von Chromosom 1q zusammen mit dem immunhistochemischen Status von TNC ist es möglich, die infratentoriellen Ependymome in Risikogruppen einzuteilen (Araki et al., 2016).

Korshunov et al. entwickelten im Rahmen einer Studie mit insgesamt 292 Patienten ein verbessertes System zum Staging von intrakraniellen Ependymomen, welches die ursprünglichen Klassifikationskriterien durch die Identifikation von genetischen Aberrationen ergänzt. Nach diesem System werden die Tumoren in drei zytogenetische Subgruppen unterteilt. Ependymome mit einem Zugewinn von Chromosom 1q und/oder einer homozygoten Deletion von CDKN2A (*cyclin dependend kinase inhibitor 2A*) bilden eine Subgruppe, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist und vorwiegend anaplastische Merkmale in der Histologie zeigt. Tumoren, die Zugewinne auf den Chromosomen 9, 15q oder 18 oder Verluste von Chromosom 6 beherbergen, weisen eine sehr gute Prognose auf und werden in eine weitere Subgruppe eingeordnet. Die dritte Gruppe zeigt ein intermediäres Risiko und besteht aus Patienten mit Tumoren, die ein weitgehend balanciertes zytogenetisches Profil aufweisen. Die Autoren gehen davon aus, dass die genetischen Aberrationen in Ependymomen unabhängige

Marker für den Krankheitsverlauf und das Überleben der Patienten sind. Diese können eine Ergänzung der etablierten klinischen und histopathologischen Variablen darstellen, durch die eine Vorhersage der Prognose potentiell verbessert werden kann (Korshunov et al., 2010).

Einen wichtigen Beitrag von großer diagnostischer und prognostischer Relevanz lieferten Pajtler et al. mit der, in Kapitel 2.1.5 bereits erwähnten, Identifizierung unterschiedlicher molekularer Gruppen von Ependymomen. Survival-Analysen zeigten einen erheblichen Unterschied zwischen den Subgruppen bezüglich OS und PFS. Dabei hatten die Gruppen PF-EPN-A und ST-EPN-RELA, die hauptsächlich pädiatrische Patienten betreffen, die schlechteste Prognose mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 50 % und einem PFS von ca. 20 %. In allen anderen Subgruppen zeigten sich 5-Jahres-Überlebensraten von 100 % und 10-Jahres-Überlebensraten von 88 % bis 100 % (Pajtler et al., 2015).

Eine weitere mögliche Option für die Risikostratifikation bietet die Untersuchung von MicroRNAs (miRNA). Bei den miRNAs handelt es sich um kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die als Regulatoren der Genexpression fungieren. Hierdurch werden sie mit onkogenetischen Prozessen in Verbindung gebracht (Barbarotto et al., 2008).

Zakrzewska et al. zeigten an einer Studie mit kindlichen Ependymomen, dass durch die Untersuchung von veränderter miRNA-Expression eine Unterscheidung zwischen Grad-II und Grad-III-Tumoren möglich ist. In multivariaten Analysen ist eine erhöhte Expression der miRNA miR-17-5p signifikant mit dem PFS und auf der Schwelle zum Signifikanzniveau mit dem OS assoziiert. Des Weiteren beobachteten die Autoren eine signifikante Assoziation zwischen den Expressionsleveln von miR-19a, miR-17-5p und miR-106b mit der Expression von EZH2, einem Protein, das als Marker für ein ungünstiges Outcome bei Tumoren der hinteren Schädelgrube gilt. Eine derartige molekulare Unterscheidung zwischen Grad-II und Grad-III-Tumoren könnte in der Ependymomdiagnostik sehr hilfreich sein (Li et al., 2015; Zakrzewska et al., 2016).

2.2 Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B

GPNMB ist ein Typ-1-Transmembranprotein (Weterman et al., 1995), welches in verschiedenen Zellarten nachgewiesen wurde. Es finden sich Nachweise in Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und Fibroblasten (Ripoll et al., 2007), in Melanozyten (Hoashi et al., 2010), in Osteoblasten und Osteoklasten (Bächner et al., 2002; Sheng et al., 2008), in osteoklastenartigen Zellen (Nomiya et al., 2005), im Retina-Pigmentepithel sowie in der Iris (Bächner et al., 2002).

GPNMB wird in unterschiedlicher Intensität in gesunden menschlichen Geweben exprimiert. So konnten Ghilardi et al. in einer Studie an einem *Multiple Tissue Expression array* hohe Expressionslevel in der Plazenta und den Geweben des Herzens nachweisen. Mäßige Expressionslevel zeigten sich im Uterus, in der Blase und der Lunge und geringe Expressionslevel in den Ovarien, Lymphknoten, Thymus, Nieren sowie im Gastrointestinaltrakt (Ghilardi et al., 2008).

Über die Funktion von GPNMB ist bislang wenig bekannt. Es existieren verschiedene Studien, die die Rolle von GPNMB in Malignomen untersuchen und zu erstaunlich unterschiedlichen Ergebnissen kommen. So scheint GPNMB in manchen Tumoren eine inhibierende Rolle zu spielen, während es in anderen Tumoren die Metastasierung fördert (Siegel et al., 2013). GPNMB wurde ursprünglich in einer Studie an Melanom-Zelllinien nachgewiesen, in der es überwiegend in den Zelllinien mit geringer Metastasierungstendenz nachgewiesen wurde (Weterman et al., 1995). Hierdurch entstand die Bezeichnung *Glycoprotein nonmetastatic melanome protein B*. Eine wachstumshemmende Wirkung von GPNMB wurde auch in Zellen von Mammakarzinomen beschrieben (Metz et al., 2007). In nachfolgenden Studien wurde dann allerdings für die gleichen Tumoren ein Zusammenhang zwischen GPNMB und einem aggressiveren Tumorverhalten sowie einer erhöhten Metastasierungstendenz beschrieben (Tse et al., 2006; Rose et al., 2007; Qian et al., 2008). Rose et al. zeigten, dass eine GPNMB-Expression in Mammakarzinomen mit einem kürzeren metastasenfreien Intervall sowie einem kürzeren Gesamtüberleben korreliert und das Osteoactivin, welches deutliche Homologien zu GPNMB zeigt, die Motilität, Invasivität und Metastasierungstendenz von Mammakarzinomzellen erhöht (Rose et al., 2007, 2010).

Kuan et al. wiesen in verschiedenen Studien an Glioblastomen eine erhöhte GPNMB-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in 70% der Tumoren nach. In gesundem Gehirngewebe konnte dagegen keine GPNMB-Expression gezeigt werden. GPNMB kann somit bei Glioblastomen als nützliches tumorassoziiertes Antigen angesehen werden. Neben der reinen Expression von GPNMB in Glioblastomen wurde zusätzlich eine positive Korrelation zwischen dem Expressionslevel von GPNMB, einem zunehmendem Tumorstadium und einer kürzeren Überlebenszeit nachgewiesen. Daher gilt es auch als prognostischer Prädiktor und als vielversprechender Angriffspunkt für die immunbasierte Therapie von Glioblastomen (Kuan et al., 2006, 2011; Rose & Siegel, 2010).

Da GPNMB ein Transmembranprotein ist, bietet es einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt. Dies wurde in einer Studie von Tse et al. im Xenograft-Modell bestätigt (Tse et al., 2006).

In den gesunden Zellen, die eine GPNMB-Expression aufweisen, ist diese überwiegend intrazellulär lokalisiert, wohingegen GPNMB bei Tumorzellen eine erhöhte Expressionsrate auf der Zelloberfläche zeigt (Tse et al., 2006; Ripoll et al., 2007; Tomihari et al., 2009; Rose & Siegel, 2010).

2.3 Nestin

Nestin ist ein Typ-6 Intermediärfilament (Lendahl et al., 1990; Colin et al., 2007). Der Name Nestin leitet sich von der Bezeichnung *neuroepithelial stem cell protein* ab (Yang et al., 2008). Es wird hauptsächlich in neuroepithelialen Stammzellen, insbesondere in radiären Gliazellen, exprimiert. Während der Entwicklung der Zellen verringert sich die Expression von Nestin. Im gesunden Gehirn des Erwachsenen sind nur noch die Endothelzellen Nestin-positiv (Dahlstrand et al., 1992; Malatesta et al., 2000; Ehrmann et al., 2005). Nestin wird des Weiteren in den Progenitorzellen von Geweben exprimiert, die sich in der Entwicklung oder Regeneration befinden. Die Nestin-Expression kann als Reaktion auf Verletzungen oder andere pathologische Vorgänge reaktiviert werden (Yang et al., 2008).

Da Nestin in Stammzellen exprimiert wird, kann es als Stammzellmarker genutzt werden. Daher müsste Nestin, nach der Stammzelltheorie der Tumorentstehung, auch in Tumoren exprimiert werden, die aus Stammzellen entstehen, sogenannten „Stammzelltumoren“ (Clarke et al., 2006). Dies ist z. B. bei den Ependymomen der Fall, deren Vorläuferzellen die radiären Gliazellen sind. So wiesen Malatesta et al. eine Nestin-Expression in radiären Gliazellen nach (Malatesta et al., 2000) und auch in Ependymomen konnte eine Expression von Nestin gezeigt werden (Almqvist et al., 2002; Milde et al., 2012).

Nestin wurde auch in anderen Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen, unter anderem in Gliomen, Schwannomen und primitiven neuroektodermalen Tumoren (Almqvist et al., 2002; Veselska et al., 2006; Arai et al., 2012). Auch in Tumoren anderer Gewebe wie Mammakarzinomen (Li et al., 2007), Angiosarkomen, Adenokarzinomen des Pankreas (Yang et al., 2008), Melanomen (Ackermann et al., 2005), Rhabdomyosarkomen (Kobayashi et al., 1998), Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), Prostatakarzinomen sowie Schilddrüsenkarzinomen (Ishiwata et al., 2011) konnte eine Nestin-Expression nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei vielen dieser Tumoren, dass die Nestin-Expression mit dem Malignitätsgrad sowie einer ungünstigen Prognose korreliert

(Almqvist et al., 2002; Thomas et al., 2004; Ehrmann et al., 2005; Yang et al., 2008; Arai et al., 2012; Milde et al., 2012). Besonders hervorgehoben werden soll hierbei die Untersuchung von Milde et al., bei der ein Zusammenhang zwischen der Nestin-Expression und einer schlechten Prognose bei Patienten mit Ependymomen festgestellt wurde. Die Studie ergab, dass mit Nestin eine Abschätzung der Prognose insbesondere für Grad-II-Ependymome sinnvoll ist. In der Studie konnte gezeigt werden, dass Grad-II-Ependymome, die Nestin exprimieren, eine ähnliche Prognose haben wie die Grad-III-Ependymome (Milde et al., 2012).

Arai et al. fanden heraus, dass die Nestin-Expression in Glioblastomen signifikant höher ist als in anderen High-grade-Gliomen. Zudem haben die Gliome mit einer hohen Nestin-Expression eine schlechtere Prognose als die mit einer geringeren Nestin-Expression. Ob die Prognose kausal mit der Expression von Nestin zusammenhängt bleibt ungeklärt. Weiterhin wurde deutlich, dass Nestin einen nützlichen Marker in der Diagnose von High-grade-Gliomen darstellt (Arai et al., 2012).

Dahlstrand beschrieb neben der niedrigen Nestin-Expression in nichtneoplastischen Geweben auch, dass die Nestin-Expression auf primäre Tumoren des ZNS beschränkt ist. Somit können diese auch in sehr kleinen, stereotaktisch gewonnenen Biopsien, gut von Metastasen abgegrenzt werden (Dahlstrand et al., 1992).

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv der immunhistochemischen Untersuchungen

Das Patientenkollektiv für die immunhistochemischen Untersuchungen an GPNMB und Nestin setzt sich aus pädiatrischen Ependymom-Patienten zusammen, die alle am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) in Behandlung waren und deren Diagnose im Institut für Neuropathologie gestellt wurde. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben dieser Patienten stammen aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die klinischen Daten des Patientenkollektivs. Der gesamte Datensatz findet sich in Tabelle 14 im Anhang. Zusätzlich zu den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden klinische Überlebensdaten sowie die Ergebnisse weiterer immunhistochemischer Marker, die aus einer Parallelstudie stammen, zu Vergleichszwecken herangezogen.

Tabelle 1: Klinische Daten des untersuchten Patientenkollektivs

WHO-Grad		supratentoriell			infratentoriell		
		I	II	III	I	II	III
Patienten-	< 4	-	-	1	-	4	5
alter	≥ 4	1	3	1	-	5	4
Geschlecht	weiblich	-	3	-	-	3	4
	männlich	1	-	2	-	6	5

3.2 Patientenkollektiv der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden, parallel zur Einbettung in Paraffin, über mehrere Monate kleine Aliquots (ca. 1 mm³) von unfixiert eingesandtem Operationsmaterial in Glutardialdehyd fixiert. Die Einsendungen stammten aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des UKE. Nach Abschluss der histologischen Diagnostik im Institut für Neuropathologie wurden die Glutardialdehyd-fixierten Proben für die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die gesammelten Proben mit den dazugehörigen Diagnosen.

Tabelle 2: Frischproben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Proben- nummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Diagnose	WHO- Grad
1	80	W	Gliosarkom	IV
2	38	M	Oligodendrogliom	II
3	26	M	Anaplastisches Oligoastrozytom (Rezidiv)	III
4	67	W	Glioblastoma multiforme	IV
5	60	M	Glioblastoma multiforme	IV
6	23	M	Glioblastoma multiforme	IV
7	34	M	Anaplastisches Astrozytom (Rezidiv)	III
8	20	M	Diffuses Astrozytom	II
9	28	W	Anaplastisches Astrozytom	III
10	71	M	Glioblastoma multiforme	IV
11	20	M	Gangliogliom	I
12	83	M	Glioblastoma multiforme (Rezidiv)	IV
13	53	W	Anaplastisches Astrozytom	III
14	57	M	Glioblastoma multiforme (Rezidiv)	IV
15	60	M	Glioblastoma multiforme (Rezidiv)	IV
16	76	M	Glioblastoma multiforme	IV
17	58	M	Glioblastoma multiforme	IV
18	51	M	Glioblastoma multiforme	IV
19	34	W	Anaplastisches Astrozytom	III

3.3 Reagenzien und Antikörper

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Reagenzien der immunhistochemischen Markierungen.

Die Reagenzien für die Elektronenmikroskopie sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Des Weiteren sind in Tabelle 5 die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 3: Reagenzien für die Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
1 N HCl	Merck	1.09057
1 N NaOH (Natronlauge)	Merck	1.09137
Antibody Diluent Reagent Solution	Zymed	00.3218
Aqua ad iniectabilia	Baxter S.A.	001428
3,3 Diaminobenzidin	Sigma	K3765
Tetrahydrochlorid (DAB)		
Ethanol 30 %, 50 %, 70 %, 80 %	Eigene Verdünnung von 100 % Ethanol mit Aqua dest.	
Ethanol 96 %, 100 %	Apotheke UKE	
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Serva	11280

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Eukitt	Sigma	03989
Formalin 3,5 % gepuffert nach Lillie	Büfa Chemikalien	21108
Histofine Multifine Peroxidase	Medac	414154F
Antimouse Antirabbit		
3 % H ₂ O ₂ (Perhydrol)	Merck	1.07209
Mayer's Hämalun	Merck	1.09249
N-Histofine Simple Stain Max PO	Nichirei Bioscience	414154F
Paraformaldehyd	Merck	1.04005
TBS-Pufferfertigmischung	Dako	S1968
Triton X100	Serva	37238
Xylol	SDS	0750021
Ziegenserum	Dako	X0907

Tabelle 4: Reagenzien für die Elektronenmikroskopie in alphabetischer Reihenfolge

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Bleinitrat	Riedel de Hain	31137
Di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Borax)	Merck	1.06303
Ethanol absolut reinst	Merck	1.00983
Eukitt	Sigma	03989
Glutaraldehyd 25 %	Serva	23114
Glycid Ether (Epon 812)	Serva	21045
Methylnadicanhydride (MNA)	Serva	29452
Natriumborhydrid > 97 %		4051.1
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.06346
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.06580
Natriumhydroxid-Pellets		
NaOH 1 M	Merck	1.09137
Osmium tetroxide, 1 %ige Lösung, 10x1g	Science Services	19110
Paraformaldehyd	Merck	1.04005
Propylenoxid	Serva	33715
Pyronine G	Gurr	34065
Saccharose reinst	Merck	107653
Sodium cacodylate trihydrate	Sigma	C4945
Toluidinblau	Serva	36693
2,4,6 Tri(dimethylaminomethyl)phenol (DMP 30)	Serva	36975
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Riedel de Hain	32320
Uranylacetat	Merck	1.08473

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Mouse monoclonal to GPNMB	abcam	ab56584
CD34 Class II	Dako	M7165
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Dako	M0761
Monoclonal Anti-MAP2	Sigma	M4403
Anti-Nestin, clone rat-401	Millipore	MAB353

3.4 Lösungen

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die Herstellung der verwendeten Lösungen der Immunhistochemie. Die Lösungen für die Elektronenmikroskopie werden in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Lösungen für die Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge

Lösung	Herstellung
Antikörper-Blockierungslösung	1 ml Ziegenserum + 9 ml TRIS/Triton + 10 ml Antibody Diluent Reagent Solution
DAB-Reaktionslösung	1 ml TBS mit 100 µl 30% H ₂ O ₂ mischen, davon 300 µl zu 9 ml TRIS /Triton geben und 1 ml DAB-Stammlösung zusetzen, mischen
DAB-Stammlösung	200 mg DAB in 40 ml TBS/Triton, 2 x filtrieren und in 1 ml Portionen bei -20°C einfrieren
Hemmung der endogenen Peroxidase	180 ml 100% Ethanol + 20 ml 30% H ₂ O ₂
TBS/Triton 50 mM pH 7,6	1 Päckchen TBS (Tis-base, Tris-HCl und NaCl-Mischung) in 5 l Aqua dest. lösen und 5 ml Triton-100-X zugeben, mischen
TBS (Tris buffered saline) 50 mM pH 7,6	42,5 g NaCl und 30,5 g Tris in 4700 ml Aqua dest. geben, mit 1 M HCl auf pH 7,6 einstellen, mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen

Tabelle 7: Lösungen für die Elektronenmikroskopie in alphabetischer Reihenfolge

Lösung	Herstellung
Alkohol 35 %, 50 %, 70 %	Alle Ansätze aus Alkohol 100 % mit Aqua bidest herstellen
Bleilösung	Lösung A: 1,33 g Bleinitrat in 15 ml Aqua bidest lösen Lösung B: 1,76 g Natriumcitrat in 15 ml Aqua bidest lösen A und B zusammengeben, (flockt aus) 8,0 ml 1 M NaOH zu den 30 ml geben, (Lösung klärt sich wieder) auf 50 ml mit Aqua bidest auffüllen, Ansatz mit Alufolie umwickeln,

Lösung	Herstellung
	im Kühlschrank lagern. Unmittelbar vor Gebrauch 5 min zentrifugieren, Überstand abkippen, in ml abmessen und pro ml 1 Tropfen 1 M NaOH zugeben, danach steril filtrieren
Boraxlösung 1 %	1 g Borax in 100 ml Aqua bidest lösen
Cacodylatpuffer 0,1 M	21,4 g Cacodylat auf 1000 ml Aqua dest, auf pH 7,3 einstellen
Carrier	10 Teile Antibody Diluent, 9 Teile Tris ohne Triton, 1 Teil Normalserum (Ziege)
Fixans	120 ml 3 % Glutardialdehyd (14,4 ml 25 % Glutardialdehyd) 125 ml Phosphatpuffer 3 g Saccharose mit Aqua bidest auf 1000 ml, pH 7,0-7,5, Lagerung bei 4°C
Kunststoff	Lösung A: 62 Teile (124 g) Epon 812 100 Teile (200 g) Dodeceny succinic anhydride (DDSA) 30 min rühren und über Nacht stehen lassen Lösung B: 100 Teile (200 g) Epon 812 89 Teile (178 g) MNA 30 min rühren und über Nacht stehen lassen Gebrauchslösung: Lösung A und B 1 + 1 zusammengeben 4 ml (8 ml) DMP30 30 min rühren, in 20 ml Spritzen füllen und einfrieren bei -20°C
Natriumhydroxid- Lösung	Aus EtOH absolut und Natriumhydroxidpallets eine 10%ige Lösung ansetzen. Diese mind. 3 Tage stehen lassen, bis sich die Lösung bräunlich verfärbt. Direkt vor dem Gebrauch wird die Lösung 1:1 mit EtOH absolut gemischt
Osmiumlösung: Phosphatpuffer (PBS)	Fertige 1 %ige Osmiumtetroxidlösung siehe Tabelle 4 10,49 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 57,67 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit Aqua bidest auf 1000 ml, pH 7,4, Lagerung bei 4°C
Toluidinblau	Lösung A: 1 g Toluidinblau in 100 ml 1 %iger Boraxlösung lösen Lösung B: 1 g Pyronine G in 100 ml Aqua bidest lösen Gebrauchslösung: Toluidin 4 + 1 mit Pyronine mischen Lösung vor Gebrauch filtrieren, auf pH 7,4 einstellen
Uranylacetat	Zu 2-4 ml 70%igem Ethanol im Zentrifugenröhrchen eine Spatelspitze Uranylacetat geben. Kräftig schütteln und 5 min zentrifugieren. Überstand abgießen und abfüllen (Lichtempfindlich, ca. 4 – 5 Tage im Kühlschrank haltbar)

3.5 Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge

Objekt	Hersteller
Atemschutzmaske mit Ventil	3M Medica
Dako Pen Markierungsstift S2002	Dako
Deckgläser 24 x 60 ml	Bernhard Schulz & Sohn
Einwegpinzetten Kunststoff steril	Bernhard Schulz & Sohn
Eppendorf Tubes	Eppendorf
Faltenfilter	VWR (311647)
Klingen	Feather R 35
Objektträger Histobond	Paul Marienfeld
Objektträger Superfrost plus	Bernhard Schulz & Sohn
Parafilm (laboratory film)	Bemis
Skalpellklingen	Bernhard Schulz & Sohn

3.6 Laborgeräte

Alle verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Hersteller
Becherglas Boro 100 ml	Carl Roth
EASY MOLDS	Science Services
Heizbad	GFL
Heizplatte	Heidolph
Kescher für die Elektronenmikroskopie	Balzer Union
Kühlplatte	Leica
Küvetten	Carl Roth
Magnetrührer	HANNA instruments
Messbecher 3 l	Hinsche & Glashaus Gastrowelt (211522)
Messzylinder 1000 ml	VWR (612-1538)
Microtom	Jung HN40
Microtomklinge C 35	Feather
Microwellengerät	Intello wave
Pipetten 20µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf
Reiskocher	Gastroback
Shandon Coverplate Immunostaining Chambers	Thermo
Trimmgerät TM 60	Reichert-Austria

Gerät	Hersteller
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung
Vollautomatischer Färbeautomat	Ventana Systems
Wärmeschrank	Heraeus instruments

3.7 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine spezifisch im Gewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt über eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch farbliche Markierung sichtbar gemacht und anschließend unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden kann (Welsch, 2006, S. 6).

Die Markierung erfolgt an 4 µm dicken Gewebeschnitten, die nach der Fixierung des Gewebes und der Einbettung in Paraffin mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellt und auf einen Objektträger aufgezogen werden. Im Folgenden wird das Protokoll zur manuellen Immunmarkierung mit GPNMB sowie die Immunmarkierung im Ventana LT Färbeautomat beschrieben.

3.7.1 GPNMB Protokoll für manuelle Immunmarkierung

20 min	Entparaffinierung in Xylol
05 min	Spülen in EtOH 100%
15 min	Blockierung der Endogenen Peroxidase mit 3% H ₂ O ₂ in EtOH 100%, Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe
60 min	Vorbehandlung im Reiskocher in Citrat-Puffer um Antigenstrukturen freizulegen Puffern in Tris-Puffer Einspannen der Objektträger in „Shandon Coverplate Immunostaining Chambers“ Überprüfung des richtigen Sitzes und der Dichtigkeit durch Spülen mit Tris-Puffer Über Nacht Inkubation mit GPNMB Antikörper 1:100, verdünnt in „Antibody Diluent Reagent Solution“ bei 4°C
3 x 5 min	Spülen mit Tris-Puffer
90 min	Inkubation mit Sekundärantikörper bei 4°C
3 x 5 min	Spülen mit Tris-Puffer
15 min	Inkubation mit DAB-Reaktionslösung bei Raumtemperatur
10 min	Fließend wässern
0,5 min	Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun
10 min	Bläuen unter fließendem Leitungswasser Eindecken mit Eukitt

3.7.2 Immunmarkierung im Ventana LT Färbeautomat

Der vollautomatische Ventana Färbeautomat führt die immunhistochemische Markierung nach einem standardisierten Protokoll durch. Die Vorbehandlung und Einwirkzeiten können antikörperspezifisch verändert werden.

3.7.3 Nestin Färbung im Ventana LT Färbeautomat

Für die Nestin-Färbung wurden die Schnitte 30 Minuten mit einer milden *Cell Conditioning Solution* (CC1) vorbehandelt. Die Inkubationszeit für den Nestin-Antikörper betrug 32 Minuten.

3.7.4 GPNMB Färbung im Ventana LT Färbeautomat

Für die Nestin-Färbung wurden die Schnitte 30 Minuten mit der milden *Cell Conditioning Solution* vorbehandelt. Die Inkubationszeit für den GPNMB-Antikörper betrug 32 Minuten.

3.8 Elektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie ist ein guter Strukturerehalt des Gewebes essentiell. Um diesen zu gewährleisten sind spezielle Fixierungsverfahren notwendig. Die in dieser Arbeit untersuchten Frischproben wurden zeitnah mit Glutaraldehyd fixiert. Zudem erfolgte eine Nachfixierung mit Osmiumtetroxid. Die Einbettung des Gewebes erfolgte abhängig von der nachfolgenden Immunmarkierung in Epoxid-Harz (Epon) oder Lowicryl HM20. Nach der Einbettung wurden von dem Gewebe mit einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte mit einer Stärke von 50 nm angefertigt. Diese wurden auf ein Metallgrid übertragen, kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop beurteilt.

Im Folgenden werden die verschiedenen Arten der immunhistochemischen Markierung für die Elektronenmikroskopie beschrieben.

3.8.1 Pre-embedding

Beim Pre-embedding-Verfahren werden die Gewebeproben vor der Einbettung immunhistochemisch markiert. Der immunhistochemische Nachweis kann an kleinen Gewebestücken durchgeführt werden oder an vorher angefertigten Gewebeschnitten wie zum Beispiel an Kryo- oder Vibratomschnitten. Bei der Immunmarkierung an Kryo- oder Vibratomschnitten wird, bedingt durch die geringe Schnittstärke, nahezu eine Durchfärbung des Gewebes gewährleistet. Bei den Kryoschnitten sind mögliche Kryo-Artefakte zu berücksichtigen. Bei einer Immunmarkierung an Gewebestückchen ist von Vorteil, dass keine weiteren Geräte wie ein Kryostat oder ein Vibratom benötigt werden. Die Eindringtiefe der

Antikörper muss allerdings berücksichtigt werden. Die immunhistochemische Reaktion erfolgt hier häufig nur an den Rändern des Gewebestücks. Dies muss bei einer späteren Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten bedacht werden.

DAB-Pre-embedding an Vibratomschnitten

Für dieses Verfahren wurde das fixierte Gewebe in Agarose eingebettet. Anschließend wurden mit einem Vibratom Schnitte mit einer Dicke von 50-70 µm angefertigt. Die Schnitte wurden in Phosphatpuffer überführt. Da dieses Verfahren lediglich zur Einführung in die Methode am ZMNH (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) durchgeführt wurde, befindet sich das Protokoll für die entsprechende Immunmarkierung im Anhang unter 15.1.

DAB-Pre-embedding an Gewebestücken

Für dieses Verfahren wurden von den fixierten Gewebeproben mit einem Skalpell kleine Würfel von ungefähr 1 mm³ zugeschnitten und anschließend immunhistochemisch markiert.

Protokoll DAB-Pre-embedding an Gewebestücken:

Alkoholpermeabilisierung (alle Alkoholverdünnungen aus EtOH reinst ansetzen):

15 min	inkubieren in PBS
10 min	EtOH 10 %
10 min	EtOH 20 %
10 min	EtOH 40 %
10 min	EtOH 20 %
10 min	EtOH 10 %
3 x 5 min	in PBS waschen

Am nächsten Tag:

3 x 5 min	waschen mit 1xPBS, pH 7,4
10 min	0,5 % Na-borhydrid in 1xPBS (=0,25g/ml)
3 x 5 min	waschen mit 1xPBS, pH 7,4
30 min	in 0,3 % H ₂ O ₂ in 1xPBS, pH 7,4 auf dem Schüttler inkubieren um die endogene Peroxidase zu blockieren
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 - 60 min	blockieren bei Raumtemperatur
24 - 36 h	1. Antikörper in Carrier

Am nächsten Tag:

3 x 5 min	waschen mit 1xPBS, pH 7,4
90-120 min	2. Antikörper in PBS (gekoppelt, Ventana Mouse Kit)
15 min	waschen mit 1xPBS, pH 7,4

Osmieren:

3 x 10 min	waschen in Cacodylatpuffer
20 min	Osmiumtetroxidlösung, auf Eis inkubieren

3 x 10 min waschen in Cacodylatpuffer
mindestens über Nacht bei 4°C in Cacodylatpuffer stehen lassen

Entwässern:

10 min waschen in Cacodylatpuffer
15 min EtOH 30 %
15 min EtOH 50 %
15 min EtOH 70 %
15 min EtOH 80 %
15 min EtOH 90 %
2 x 10 min EtOH 100 %
2 x 15 min Propylenoxid
60 min Propylenoxid / Epon 1:1
Über Nacht reines Epon

Ausgießen und Schneiden

Aurion Immunogold-Pre-embedding

Bei dem folgenden Protokoll handelt es sich um ein Immunogold-labeling-Protokoll nach Herstellerangaben.

Protokoll Immunogold-Pre-embedding:

Alle Schritte werden auf dem Schüttler ausgeführt:

10 min 0,1 % NaBH₄
3 x 5 min waschen in PBS
30 - 60 min blocken in AURION Blocking Solution
3 x 10 min waschen in Incubation Buffer
Über Nacht 1. Antikörper verdünnt in Incubation Buffer, bei 4°C
6 x 10 min waschen in Incubation Buffer
Über Nacht Immunogold: Ultra small gold conjugate reagent verdünnt (1/40-1/100) 1:50
in Incubation Buffer
6 x 10 min waschen in Incubation Buffer
6 x 5 min waschen in PBS
30 min in 2 % Glutaraldehyd postfixieren
3 x 5 min waschen in PBS
3 x 10 min waschen in Aqua dest.
30 min Silver Enhancement Mixture
3 x 10 min waschen in Aqua dest.

Entwässern und Einbetten

3.8.2 Post-embedding

Bei dem Post-embedding-Verfahren werden die Gewebeproben vor der Immunmarkierung eingebettet. Der immunhistochemische Nachweis erfolgt an den angefertigten

Ultradünnschnitten. Vorteilhaft hierbei ist, dass ungefärbte und gefärbte Ultradünnschnitte des gleichen Gewebes gut miteinander verglichen werden können. Das Post-embedding-Verfahren ist allerdings nicht mit jedem Einbettmedium gleichermaßen gut durchzuführen. Am besten sind die Ergebnisse an in Lowicryl-Harz eingebetteten Geweben. Die Einbettung mit Lowicryl-Harz ist allerdings wesentlich aufwändiger als mit Epoxid-Harz. In dieser Arbeit wurde mit beiden Einbettmedien gearbeitet, aus praktischen Gründen aber hauptsächlich das Epoxid-Harz verwendet. Im Folgenden wird das Immunogold-Post-embedding zur Visualisierung der Antigene beschrieben.

Immunogold-Post-embedding nach Aurion Protokoll an Ultradünnschnitten

Das folgende Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Einbettmedium wurde sowohl Epoxid-Harz als auch Lowicryl-Harz getestet.

Die gesamte Prozedur erfolgte in einer feuchten Kammer, auf deren Boden ein großer Streifen Parafilm ausgelegt wurde. Auf den Parafilm wurden mit einer Pipette kleine Tropfen der Lösungen gesetzt. Die Grids wurden mit einer dünnen Pinzette mit der Seite des Schnittes nach unten auf dem Tropfen platziert. Es ist erforderlich, dass die Grids auf der Oberfläche des Tropfens verbleiben und nicht auf den Boden des Tropfens sinken.

Die Schnitte aus Epoxid-Harz wurden vor Beginn des Protokolls mit Natriumhydroxid angeätzt, um die Durchlässigkeit des Harzes zu erhöhen und ein optimales Eindringen der Antikörper zu ermöglichen.

Protokoll Immunogold-Post-embedding:

Vorbehandlung bei Epoxid-Harz:

0,5 - 1 min	ätzen auf Natriumhydroxid-Lösung
4 x 5 min	waschen in EtOH absolut
5 min	waschen in Aqua dest.

Immunogold-Staining bei Epoxid- und Lowicryl HM20-Harz:

5 min	PBS
15 min	0,05 M Glycine in PBS (inaktiviert die freien Aldehydgruppen)
30 min	AURION Blocking Solution
3 x 5 min	waschen in Incubation Buffer
30 - 60 min	1. Antikörper verdünnt in Incubation Buffer
6 x 5 min	waschen in Incubation Buffer
120 min	Immunogold-konjugierter 2. Antikörper verdünnt in Incubation Buffer
6 x 5 min	waschen in Incubation Buffer
3 x 5 min	waschen in PBS
5 min	2% Glutaraldehyd in PBS
5 min	waschen in PBS

5 x 2 min	waschen in Aqua dest.
Silverenhancement zur Verstärkung des Signals	
30 - 40 min	AURION R-GENT SE-EM (silver enhancement reagent)
3 x 10 min	waschen in Aqua dest.
kontrastieren	

Es wurden Anstrengungen unternommen auf der Basis des Immunogold-Post-embedding-Protokolls ein Post-embedding-Protokoll mit der DAB-Methode zu entwickeln. Dafür wurden einige Schritte des Immunogold-Protokolls verändert. Da dieses entwickelte Protokoll aber primär keine guten Ergebnisse brachte, wurde es nicht weiter verfolgt. Das entsprechende Protokoll befindet sich im Anhang.

3.9 Auswertung

Im Folgenden wird beschrieben, auf welche Weise die Auswertung der verschiedenen immunhistochemischen Markierungen vorgenommen wurde.

3.9.1 Auswertung der Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Auswertungen wurden an dem Gerät LEO 912 von der Firma Zeiss (Leo) durchgeführt.

Zur Unterscheidung von Immunogold von anderen unspezifischen elektronendichten Ablagerungen (Kontrastierungsmittel) wurde die definierte Körnchengröße der Goldpartikel und deren Position im Gewebe herangezogen. Durch ein Auszählen der Goldkörnchen sollte eine Quantifizierung der Antigene vorgenommen werden.

Als Anforderung für eine spezifische Markierung mit Diaminobenzidin wurde ausschließlich die Lokalisation der Präzipitate definiert.

3.9.2 Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Markierungen

Die Auswertung der lichtmikroskopischen immunhistochemischen GPNMB- und Nestin-Färbungen erfolgte semiquantitativ nach 4 Färbestärken. Dabei wurde festgelegt: Stärke 0 = keine Färbung, 1 = geringe Färbung, 2 = mittlere Färbung, 3 = starke Färbung.

Bei der GPNMB-Färbung wurde die Lokalisation der Färbung nach nukleär und zytoplasmatisch differenziert. Die Auswertung der einzelnen Fälle wurde mit dem Mentor diskutiert und eine übereinstimmende Graduierung verwendet. In der Arbeit von Milde et al. wird eine Auswertung nach den Variablen Nestin-positiv und -negativ als vorteilhaft beschrieben. Dieses Vorgehen soll die Interobserver-Variabilität vermindern und Nestin als unabhängigen prognostischen Faktor hervorheben (Milde et al., 2012). Um die Ergebnisse mit

dieser Arbeit zu vergleichen, wurde neben der Auswertung nach Nestin-Färbestärke auch eine Auswertung nach den Variablen positiv und negativ durchgeführt. Dabei wurden alle Färbungen mit Färbestärke 0 und 1 als negativ gewertet und alle ab Färbestärke 2 als positiv.

3.9.3 Statistik

Um die prognostische Relevanz von GPNMB und Nestin in kindlichen Ependymomen zu untersuchen, wurde die Expression mit den klinischen Angaben Lokalisation der Tumoren, Patientenalter, Ependymom-Grad und Überlebenszeit korreliert. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen dem Patientenalter und dem Ependymom-Grad sowie zwischen dem Patientenalter und der Lokalisation der Ependymome untersucht.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS in der Version 21. Für die statistische Analyse wurden nicht-parametrische Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-Test, Kolmogorov-Smirnov-Test) sowie der T-Test und χ^2 -Test durchgeführt. Für die Evaluation einer Korrelation zwischen Nestin-Expression und Überlebenszeit der Patienten wurde die Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden alle Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Elektronenmikroskopie

Für die Technik der im Elektronenmikroskop sichtbaren Immunmarkierung wurde ein Pre-embedding-Verfahren mit Diaminobenzidin am ZMNH unter Anleitung an Gliomen durchgeführt und anschließend im Institut für Neuropathologie etabliert. Als Antikörper für die Etablierung wurden MAP2c (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c) und GFAP verwendet, da sich diese in der Routine als verlässlich funktionierend erwiesen haben. Abbildung 7 zeigt die MAP2c-Färbung mit Diaminobenzidin.

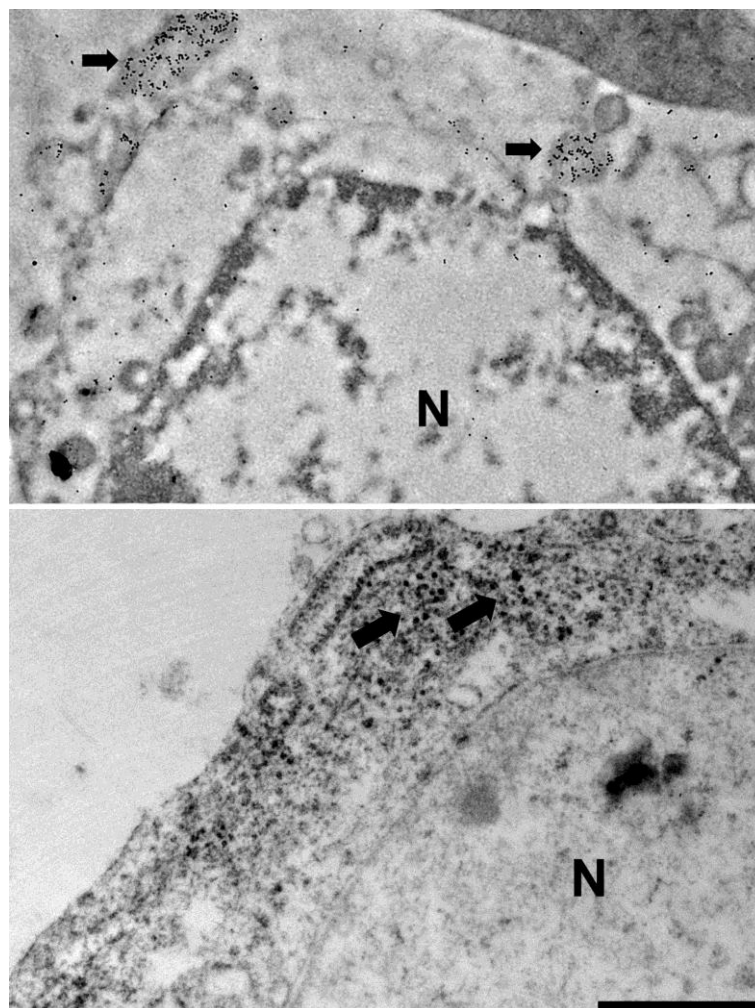


Abbildung 7: GFAP-Markierung mit Immunogold (oben) und MAP2c-Nachweis mit Diaminobenzidin (unten)
(Pfeile = Gold- bzw. DAB-Ablagerungen, N = Nucleus, Maßstab = 1 µm, Vergrößerung = x 20000)

Das Ziel der elektronenmikroskopischen Untersuchungen war es, eine Quantifizierung der Antigene zu ermöglichen. Hierfür ist die Sichtbarmachung der Antikörper mit

Diaminobenzidin keine geeignete Methode, da es zu Agglomeration der Diaminobenzidin-Moleküle kommt. Als eine zur Quantifizierung geeignete Methode wird die Immunogold-Methode angesehen.

Die Immunogold-Methode wurde als Pre-embedding und Post-embedding-Verfahren nach unterschiedlichen Protokollen mit den Einbett-Medien Lowicryl HM20 und Epoxid-Harz sowie verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Siehe hierfür auch Kapitel 3.8. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse des Immunogold-Post-embedding-Verfahrens zu sehen.

Beim Vergleich der verschiedenen Einbettmedien zeigten sich in der Handhabung der Auswertung beim Lowicryl deutliche Nachteile gegenüber dem Epoxid-Harz. Die Schnitte waren empfindlich und wurden bei stärkeren Vergrößerungen im Elektronenmikroskop schnell verbrannt. Eine deshalb durchgeführte Beschichtung der Grids mit Formvar konnte das Problem nicht zufriedenstellend beheben, sodass eine gründliche Auswertung der Immunmarkierung nicht möglich war.

Die Ergebnisse waren jedoch auch bei der Einbettung in Epoxid-Harz nicht dahingehend auswertbar, dass spezifische Strukturen im Gewebe durch die Goldkörnchen sichtbar gemacht wurden. Trotz Einsatz verschiedener Proben und Variationen der Inkubationszeiten konnte keine spezifische Markierung erreicht werden.

4.2 Immunhistochemie

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen werden im Folgenden beschrieben:

4.2.1 Immunhistochemie GPNMB

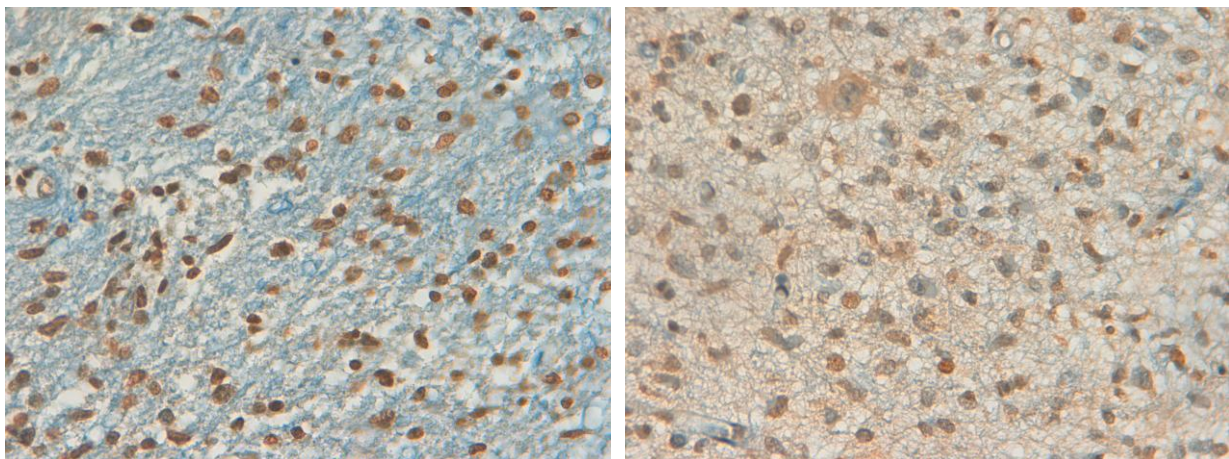
Die Auswertung der immunhistochemischen Markierungen von GPNMB an kindlichen Ependymomen nach Lokalisation ist in Tabelle 10 dargestellt. In 17,4% (n = 4) der Fälle war keine Färbung nachzuweisen. Eine geringe Färbung zeigte sich in 39,1% (n = 9) und eine mittlere Färbung in 43,5% (n = 10) der Fälle. Eine starke Färbung wurde in keinem der Fälle nachgewiesen.

Tabelle 10: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit GPNMB

WHO-Grad	supratentoriell			infratentoriell		
	I	II	III	I	II	III
0	1	-	-	-	1	2
1	-	2	1	-	3	3
2	-	1	1	-	5	3
3	-	-	-	-	-	-

Bei den Tumoren mit den Färbestärken 1 bis 3 wurde nach Lokalisation der Färbung differenziert. In den meisten Fällen wurden nur die Kerne der Tumorzellen angefärbt, in zwei Fällen zeigte sich aber auch eine reine Färbung des Zytoplasmas. In 4 Fällen wurden sowohl das Zytoplasma als auch die Zellkerne angefärbt.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Färbung mit GPNMB.



(a) Kernfärbung

(b) Zytoplasmafärbung

Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung mit GPNMB. Kernfärbung (a) und Zytoplasmafärbung (b)

GPNMB ist ein membranständiges Antigen. In mehreren Arbeiten wird die Lokalisation als zytoplasmatisch beschrieben (Kuan et al., 2006; Siegel et al., 2013).

Erwartet wurde daher eine Anfärbung des Zytoplasmas der Tumorzellen. Die immunhistochemischen Markierungen dieser Arbeit zeigten in den meisten Fällen eine Anfärbung des Zellkerns und nur in wenigen Fällen eine zytoplasmatische Färbung, die bei Wiederholung nicht reproduziert werden konnte. Es wurden unterschiedliche Protokolle mit verschiedenen Fixierungsmethoden, Vorbehandlungen, Antikörperkonzentrationen und Einwirkzeiten erprobt, aber keiner der Ansätze führte zu einer spezifischen Färbung des Zytoplasmas. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen GPNMB handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper von der Firma „abcam“, der für Western Blot und Paraffin Immunhistochemie geeignet ist. Die Untersuchungen wurden an gleichartigem Material mit gleichartigem Protokoll wie im Referenzartikel von Kuan et al. durchgeführt (Kuan et al., 2006). Schlussendlich brachten die Untersuchungen jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse.

4.2.2 Immunhistochemie Nestin

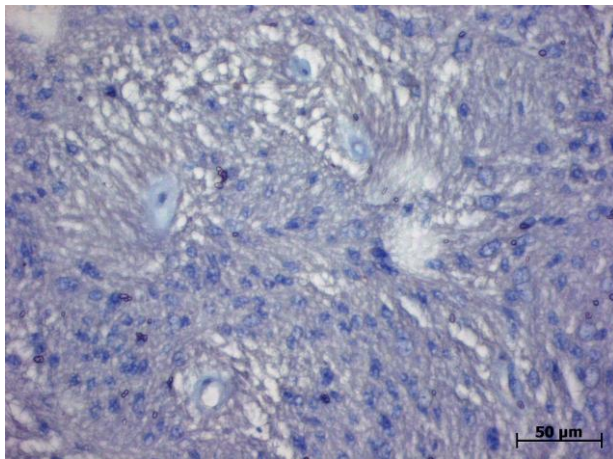
Die Auswertung der immunhistochemischen Markierungen von Nestin an kindlichen Ependymomen ist in Tabelle 11 und 12 dargestellt. Die Tabellen zeigen außerdem die klinisch relevanten Daten: Alter, Geschlecht, Lokalisation und Grad der Ependymome (für die ausführlichen Daten siehe Tabelle 15 im Anhang). In 12,5% der Fälle blieb die Nestin-Färbung negativ (Färbestärke 0). Eine geringe Färbung (Färbestärke 1) zeigten 25%, eine mittlere Färbung (Färbestärke 2) 41,7% und eine starke Färbung (Färbestärke 3) 20,8% der Fälle. Nach der Einteilung der Nestin-Färbung in entweder positiv (ab Färbestärke 2) oder negativ (Färbestärke 0 und 1) sind 37,5% negativ und 62,5% positiv. Beispiele der verschiedenen Färbestärken sind in Abbildung 9 gezeigt.

Tabelle 11: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit Nestin

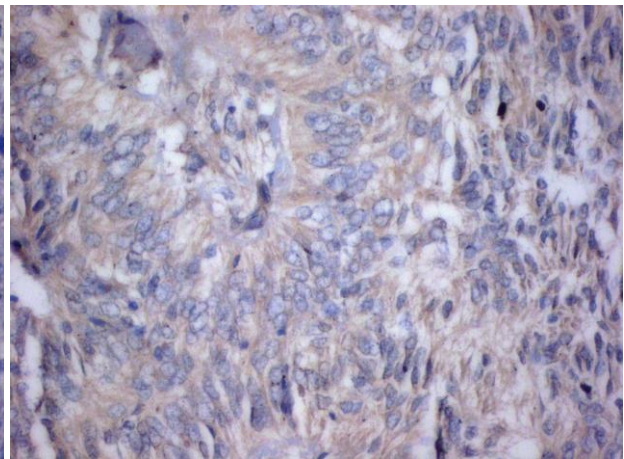
Variable	Anzahl	%
Alter		
<4 Jahre	10	41,7
≥4 Jahre	14	58,3
Nestin-Färbestärke		
0	3	12,5
1	6	25
2	10	41,7
3	5	20,8
Nestin-positiv/negativ		
Positiv	15	62,5
Negativ	9	37,5

Tabelle 12: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit Nestin aufgeschlüsselt nach WHO-Grad und Lokalisation

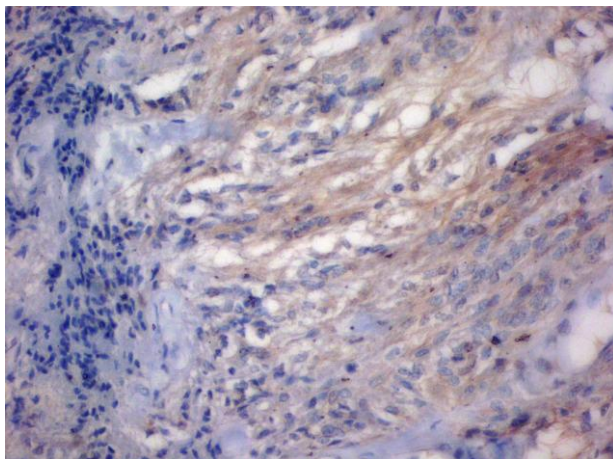
WHO-Grad	supratentoriell			infratentoriell		
	I	II	III	I	II	III
Nestin- Färbestärke	0	1		1	1	
	1		1	3	2	
	2	1	1	2	6	
	3	2		3		



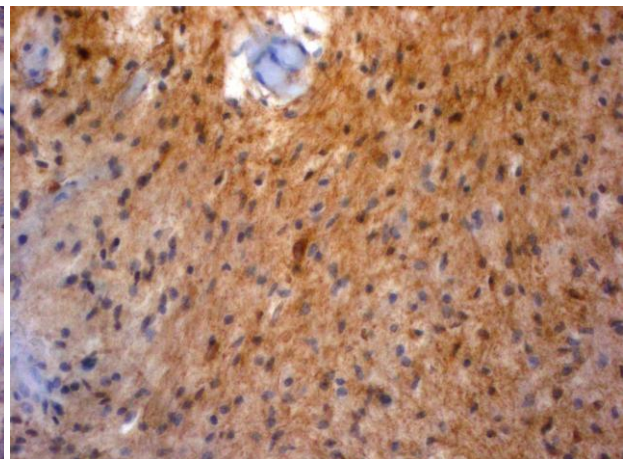
(a) Nestin Färbestärke 0



(b) Nestin Färbestärke 1



(c) Nestin Färbestärke 2



(d) Nestin Färbestärke 3

Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen Nestin Färbestärken

Durch die im Folgenden beschriebenen statistischen Tests wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Nestin-Färbung, dem Alter der Patienten, der Lokalisation der Ependymome und dem WHO-Grad untersucht.

4.3 Statistische Auswertung der Nestin-Färbung

Die statistischen Tests T-Test und χ^2 -Test wurden mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS durchgeführt, um zu untersuchen, ob zwischen den verschiedenen klinischen Daten und der Nestin-Expression eine Korrelation vorhanden ist.

4.3.1 Korrelation von Nestin-Expression und Lokalisation der Ependymome

Weder im T-Test noch im χ^2 -Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Nestin-Expression von supratentoriellen vs. infratentoriellen Ependymomen.

Die supratentoriellen Ependymome exprimierten in 67 % und die infratentoriellen in 61 % der Fälle Nestin.

4.3.2 Korrelation von Nestin-Expression und Patientenalter

Bei jüngeren Patienten würde eine höhere Nestin-Expression erwartet werden, als bei älteren Patienten, da Stammzellen mit steigendem Alter abnehmen. Deshalb wurde das Alter der Patienten mit Nestin-positiven und -negativen Ependymomen verglichen.

Das Patientenalter mit einer positiven Nestin-Expression lag im Durchschnitt bei 7,4 Jahren. Das durchschnittliche Patientenalter mit einer negativen Nestin-Expression lag bei 7,6 Jahren. Der T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied für das Patientenalter.

4.3.3 Korrelation von Nestin-Expression und Ependymom-Grad

Für die Prüfung eines Zusammenhangs zwischen der Nestin-Expression und dem Grad der Ependymome wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied der Nestin-Expression zwischen den Ependymomen verschiedener WHO-Grade.

4.3.4 Korrelation von Nestin-Expression und Überlebenszeit

Um zu evaluieren, ob die Nestin-Expression in der untersuchten Kohorte mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert, wurde die Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den vorhandenen Überlebensdaten der Kohorte und der Nestin-Expression.

4.3.5 Korrelation von Patientenalter und Lokalisation der Ependymome

Um nachzuvollziehen, ob es einen Unterschied in der Lokalisation der Ependymome abhängig vom Alter der Patienten gibt, wurde auch hier ein T-Test durchgeführt. Dieser ergab keinen signifikanten Unterschied. Die supratentoriellen Ependymome zeigten ein durchschnittliches Patientenalter von 8,76 Jahren und die infratentoriellen Ependymome ein durchschnittliches Patientenalter von 6,74 Jahren.

4.3.6 Korrelation von Patientenalter und Ependymome-Grad

In der Literatur ist beschrieben, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Ependymom-Grad und dem Alter der Patienten gibt. Dabei treten die malignen Formen eher bei jüngeren Kindern auf. Um dies an der getesteten Kohorte nachzuvollziehen, wurde ein T-Test durchgeführt, der einen signifikanten Unterschied ergab ($p < 0,05$). Die Patienten mit einem Grad-II-Ependymom waren im Durchschnitt 9,67 Jahre und die Patienten mit einem Grad-III-Ependymom 4,08 Jahre alt.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Relevanz von GPNMB bei Gehirntumoren und insbesondere bei kindlichen Ependymomen zu untersuchen. Hierzu sollten immunhistochemische Untersuchungen erfolgen und zusätzlich die subzelluläre Lokalisation von GPNMB in Glioblastomen und Ependymomen elektronenmikroskopisch mit der Immunogold-Methode bestimmt werden. Als weiteres Antigen wurde die Expression von Nestin an einer Kohorte kindlicher Ependymome untersucht um einen möglichen Zusammenhang mit der Prognose nachzuvollziehen. Die Ergebnisse wurden dann mit denen einer Voruntersuchung (Hagel et al., 2013) an derselben Kohorte kindlicher Ependymome in Beziehung gesetzt.

Die Diskussion ist in einen methodischen und einen inhaltlichen Teil gegliedert. Im methodischen Teil werden die Probleme, die mit der Immunogold-Methode eintraten, aufgezeigt und mögliche Fehlerquellen analysiert. Im inhaltlichen Teil werden die Ergebnisse der Immunhistochemie sowie die Problematik der prognostischen Faktoren der Ependymomdiagnostik diskutiert.

5.1 Methodik

5.1.1 Elektronenmikroskopie Immunogold-Methode

Die Nutzung von kolloidalem Gold in der Immunelektronenmikroskopie wurde von Faulk und Taylor im Jahre 1971 das erste Mal durchgeführt (Faulk & Taylor, 1971). Das kolloidale Gold wurde anfangs hauptsächlich für die Post-embedding-Immunmarkierung genutzt und wird mittlerweile auch für Pre-embedding-Verfahren eingesetzt. Bei der Immunogold-Methode werden Sekundärantikörper oder Protein A und Protein G mit Goldkörnchen definierter Größe beladen und damit gesuchte Antigene im Elektronenmikroskop visualisiert. Die Proteine A und G sind bakterielle Proteine, die das Fc-Fragment der Immunglobuline von Säugern binden. Sie können so über einen Zwischenantikörper indirekt an das gesuchte Antigen binden und dieses sichtbar machen (Roth et al., 1978; Polak & Priestley, 1992, S. 64). In Abbildung 10 werden die Unterschiede der Bindung von dem Gold-konjugierten Sekundärantikörper und dem Protein-A-Gold an das gesuchte Antigen schematisch dargestellt.

Das kolloidale Gold hat als Marker verschiedene Vorteile. Es kann aufgrund seiner granulären und elektronendichten Eigenschaft leicht im Elektronenmikroskop detektiert werden. Durch eine Auszählung der Partikel im Elektronenmikroskop ist eine Quantifizierung von Antigenen

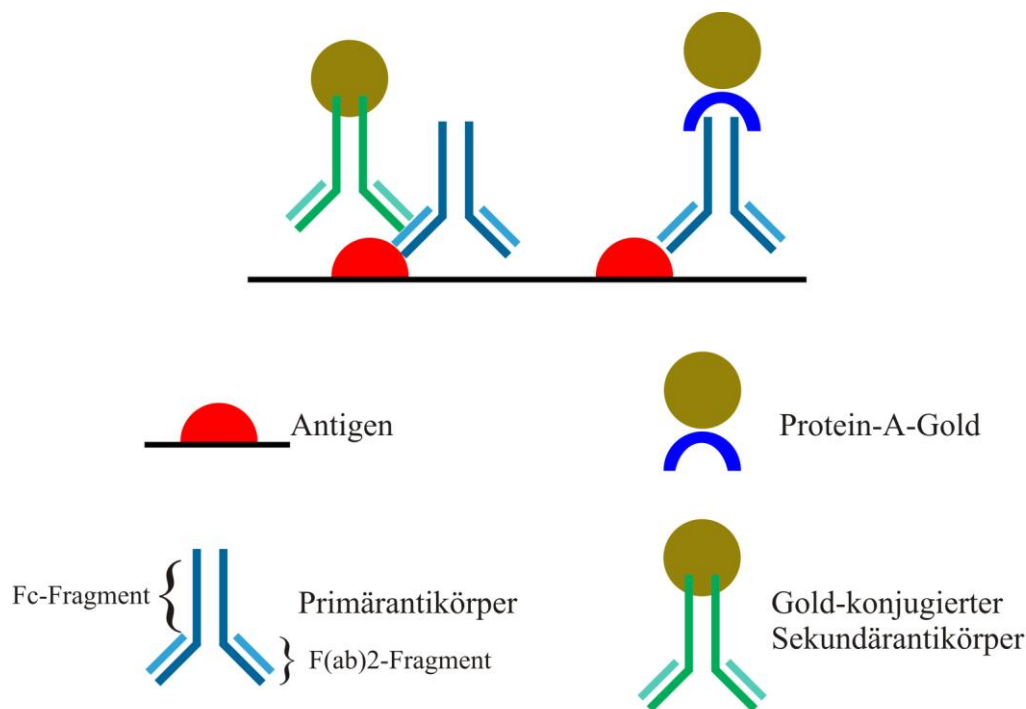


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Protein-A-Gold und Gold-konjugierten Sekundärantikörpern

möglich (Horisberger & Rosset, 1977; Polak & Priestley, 1992, S. 6). Da die Goldpartikel in verschiedenen Größen hergestellt werden, ist es zudem möglich verschiedene Antigene in einem Präparat zu markieren.

Die Größe der Goldpartikel ist entscheidend für die Eindringtiefe ins Gewebe. Die Verwendung von Goldkörnchen mit einem Durchmesser von 5 bis 10nm ist nur für das Post-embedding-Verfahren geeignet, da die mit Gold beladenen Sekundärantikörper bei dem Pre-embedding-Verfahren nicht tief genug in das Gewebe eindringen. Das Ultra Small Immunogold (AURION) ist, aufgrund der geringen Größe der Goldpartikel, sowohl für Pre- als auch für Post-embedding-Verfahren geeignet. Die Goldkörnchen haben in diesem Fall einen Durchmesser von 0,8nm oder kleiner. Sie sind im Elektronenmikroskop nur mit einer vorher durchgeführten Silberverstärkung sichtbar.

Im Vergleich zu der Immunmarkierung mit Diaminobenzidin handelt es sich bei der Immunogold-Methode um ein vergleichsweise aufwendiges Verfahren.

Das Verfahren wird am UKE derzeit am Zentrum für Molekulare Neurobiologie und im Heinrich-Pette-Institut durchgeführt. Die Methode sollte im Institut für Neuropathologie etabliert werden, um sie in speziellen Fällen anzuwenden, in denen eine Quantifizierung der Antigene erforderlich ist.

Um die Methode zu erlernen wurde am ZMNH zunächst ein Pre-embedding-Verfahren mit DAB und schließlich ein Immunogold Post-embedding-Verfahren unter Anleitung durchgeführt. Das Gewebe wurde hierfür in Lowicryl HM20 eingebettet und als Primärantikörper CD44 und GFAP genutzt. Mit diesen Antikörpern wurden in der vorher durchgeführten immunhistochemischen Markierung gute Ergebnisse erzielt. Für die Visualisierung der Primärantikörper wurde am ZMNH das Protein-A-Gold verwendet.

Für das Immunogold Post-embedding-Verfahren ist es von Vorteil, wenn die Proben in Lowicryl HM20 eingebettet sind. Die Eigenschaften dieses Harzes führen zu besseren Ergebnissen als die Einbettung in Epoxid-Harz. Die Gewebeproben im Institut für Neuropathologie werden jedoch üblicherweise in Epoxid-Harz eingebettet, da sich dieses Verfahren der Einbettung, aufgrund der sonst guten Ergebnisse und der im Verhältnis unkomplizierteren Technik bewährt hat. Zudem wird für die Einbettung in Lowicryl HM20 eine Gefriersubstitutionsmaschine benötigt. Aus diesen Gründen ist eine Einbettung in Lowicryl HM20 im Institut für Neuropathologie nicht möglich.

Um die Durchlässigkeit des Epoxid-Harzes zu verbessern wurden die Ultradünnschnitte mit einer ätzenden Lösung vorbehandelt. Um den Einfluss des Einbettmediums auf die Ergebnisse zu umgehen wurde zudem ein Pre-embedding-Verfahren genutzt. Da die Verwendung von Protein-A-Gold somit nicht möglich war, wurde das Ultra Small Gold verwendet und hiermit im Institut für Neuropathologie sowohl ein Post-embedding als auch ein Pre-embedding-Protokoll nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Das am ZMNH erlernte Post-embedding-Verfahren konnte durch die Verwendung der unterschiedlichen Einbettmedien und Gold-Markierungen nicht exakt übernommen werden.

Das Pre-embedding-Verfahren mit DAB lieferte bei Wiederholung im Institut für Neuropathologie vergleichbare Ergebnisse. Die Ergebnisse der Gold-Markierung waren nicht zufriedenstellend. Die Übertragung der Immunogold-Methode auf die Gegebenheiten des Instituts für Neuropathologie waren daher leider nicht erfolgreich. Dies ist vermutlich auf Unterschiede in der Methodik zurückzuführen.

In der Tabelle 13 wird das Vorgehen am ZMNH und im Institut für Neuropathologie im Vergleich dargestellt.

Tabelle 13: Vergleich der Post-embedding-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten im ZMNH und im Institut für Neuropathologie

ZMNH	Institut für Neuropathologie
Gewebe eingebettet in Lowicryl HM20	Gewebe eingebettet in Epoxid-Harz
	Vorbehandlung mit Natriumhydroxid-Lösung
Grids 15 min auf PBS-Glycin um unspezifische Bildungsstellen zu maskieren und freie Aldehydgruppen zu inaktivieren	
2 x 10 min auf PBG (Gelatine in PBS gelöst)	30 min auf AURION Blocking Solution waschen in AURION Incubation Buffer
1. Antikörper verdünnt in PBG 2 h bei Raumtemperatur inkubieren	1. Antikörper verdünnt in Incubation Buffer 30-60 min bei Raumtemperatur
auf PBG waschen	auf Incubation Buffer waschen
2. Antikörper (Protein-A-Gold) in PBG verdünnt 45-60 min inkubieren	Immunogold-konjugierter 2. Antikörper verdünnt in Incubation Buffer 2 h
Waschschritte mit PBG und PBS und Aqua bidest	Waschschritte mit Incubation Buffer und PBS
2 min mit 1-2 % wässrigem Uranylacetat kontrastieren	Nachfixierung mit 2 % Glutaraldehyd
Waschschritte mit Aqua bidest	Waschschritte mit PBS und Aqua dest
	Silverenhancement zur Verstärkung des Signals mit AURION R-GENT SE-EM
Kontrastieren nach Bedarf	Kontrastieren
Mikroskopieren	Mikroskopieren

Ein ersichtlicher Unterschied besteht in dem Gebrauch verschiedener Lösungen, wie der Blockierlösung und dem Verdünnungsmedium für die Antikörper. Nach dem Protokoll vom ZMNH wurden die Lösungen selbst angesetzt. Im Institut für Neuropathologie wurden die gebrauchsfertigen Lösungen des Herstellers der Goldpartikel genutzt. Dies geschah zum einen, da der Hersteller dies empfiehlt und zum anderen, um mögliche Fehlerquellen, die bei der Herstellung der Lösungen auftreten könnten, zu vermeiden. Der Vorteil dieser fertigen

Lösungen besteht darin, dass der Hersteller garantiert, dass die Lösungen zu den mitbestellten Goldpartikeln passen und die Methode daher gut funktionieren sollte.

Als weiterer Vorteil sollen die Lösungen, laut Herstellerangaben, den unspezifischen Hintergrund verringern.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Nutzung verschiedener Methoden, um das Goldkörnchen an das gesuchte Antigen zu binden. Bei der Methode mit Protein-A-Gold bindet, wie oben beschrieben, das Protein A an das Fc-Fragment des Erstantikörpers, der an dem gesuchten Antigen haftet. Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass pro Antigen nur ein Goldkörnchen zu sehen ist und das Protein-A-Gold für die Markierung verschiedenster Antikörper einsetzbar ist. Protein-A-Gold kann allerdings nur für Post-Embedding-Verfahren genutzt werden. Im Institut für Neuropathologie war eine Einsetzbarkeit für ein Pre- und Post-embedding-Verfahren gewünscht, sodass aus diesem Grund ein mit Ultra Small Gold-konjugierter Zweitantikörper verwendet wurde. Durch die Bindung des Zweitantikörpers an das F(ab)₂-Fragment wird der Abstand von Antigen zu Goldpartikel im Vergleich zum Protein-A-Gold verringert. Der Unterschied zwischen Protein-A-Gold und Gold-konjugierten Zweitantikörpern wurde schematisch in Abbildung 10 gezeigt.

Die Nutzung des Ultra Small Goldes könnte eine relevante Fehlerquelle darstellen, da die gute Detektierbarkeit der Goldkörnchen durch die benötigte Silberverstärkung in Mitleidenschaft gezogen werden kann. Die Silberverstärkung ist stark von der Einwirkzeit abhängig. Eine zu kurze oder zu lange Einwirkzeit kann dementsprechend eine Nichtdetektierbarkeit oder eine übermäßige Verstärkung und damit einhergehend eine Akkumulation der Partikel bewirken. Um diese Fehlerquelle als Ursache des Nichtgelingens der Methode auszuschließen, wurden verschiedene Einwirkzeiten der Silberverstärkung erprobt. Dies führte jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg.

Die Behandlung mit Glutaraldehyd, die sowohl eine Nachfixierung des Gewebes als auch eine Fixierung der Immunmarkierung bewirken soll, stellt eine weitere Abweichung der Protokolle dar. Sie wird im Protokoll des Herstellers empfohlen, daher ist es unwahrscheinlich, dass sie für das Nichtgelingen verantwortlich ist.

Wie bereits erwähnt, wurde als Einbettmedium Epoxid-Harz verwendet. Es ist möglich, dass die Eigenschaft des Harzes das Eindringen der Gold-konjugierten Sekundärantikörper negativ beeinflusst hat und daher keine Immunmarkierung nachgewiesen werden konnte. Denkbar wäre, dass die Eigenschaften des Harzes ein Binden der Primär- bzw. der Sekundärantikörper

verhindert haben und daher in der Auswertung keine Goldpartikel nachweisbar waren. Die Gründe für das Nichtgelingen der Methode konnten letztendlich nicht geklärt werden.

5.1.2 Elektronenmikroskopie DAB-Methode

Die immunhistochemische Färbemethode mit DAB wurde im Institut für Neuropathologie bislang nur für die Lichtmikroskopie verwendet. DAB ist ein Substrat der Meerrettichperoxidase, das durch diese oxidiert wird und ein unlösliches Präzipitat bildet. Dieses weist lichtmikroskopisch eine braune Farbe auf und ist elektronendens, sodass es auch elektronenmikroskopisch dargestellt werden kann. Die DAB-Methode ist ein recht störungsunempfindliches Verfahren, das verlässliche Ergebnisse liefert. Insofern bietet eine Färbung mit DAB viele Vorteile. Eine Quantifizierung der Antigene, wie sie mit der Immunogold-Methode durchgeführt werden kann, ist zwar nicht möglich, für viele Fragestellungen reicht jedoch ein qualitativer Nachweis aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Elektronenmikroskopie ein Pre-embedding-Verfahren mit DAB etabliert.

5.2 Expression von Antigenen in kindlichen Ependymomen

5.2.1 GPNMB

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 referiert, ließen sich die immunhistochemischen Reaktionen mit dem GPNMB-Antikörper an paraffinfixiertem Material lichtmikroskopisch nicht reproduzieren. Es wurden bis auf wenige Ausnahmen nur die Zellkerne angefärbt, siehe Abbildung 8. Darüber hinaus erbrachten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen mittels DAB-Nachweis in keinem der Ansätze eine, bestimmten Zellorganellen spezifisch zuzuordnende, Markierung. Es ist daher nicht sicher, ob der Antikörper überhaupt eine spezifische Immunreaktion zeigt. Soweit der Autorin bekannt, gibt es bislang keine immunoelektronenmikroskopischen Nachweise von GPNMB. Weitere Ansätze, eventuell mit einem anderen GPNMB-Antikörper, sind daher erstrebenswert.

5.2.2 Nestin

Nestin ist ein Intermediärfilament, das hauptsächlich in den Zellen der radiären Glia, exprimiert wird (Taylor et al., 2005; Poppleton & Gilbertson, 2007). Nestin kann als Stammzellmarker angesehen werden und gilt als ein prognostischer Marker für High-grade-Gliome (Zhang et al., 2008). In der Arbeit von Milde et al. wurde eine Korrelation zwischen einer Nestin-Expression und einer schlechten Prognose bei Ependymomen gezeigt

(Milde et al., 2012). Die Bedeutung eines solchen prognostischen Markers ist bei Ependymomen groß, da bei diesen Tumoren eine Korrelation zwischen dem histopathologischen grading und der Prognose der Patienten kontroverse Ergebnisse liefert (Korshunov et al., 2004, 2010; Ellison et al., 2011; Godfraind et al., 2012).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung erbrachte allerdings keine Korrelation zwischen den Überlebensdaten und der Nestin-Expression.

Weiterhin ergab sich kein Hinweis auf Unterschiede in der Expression von Nestin in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (infratentorielle vs. supratentorielle Ependymome) und dem Alter der Patienten. Gleichmaßen korrelierte die Nestin-Expression nicht mit dem WHO-Grad des Tumors. Die Ergebnisse von Milde et al. konnten somit nicht reproduziert werden.

Es gibt verschiedene Gründe, die für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Bei Milde et al. wurden die immunhistochemischen Markierungen an *Tissue-Microarrays* durchgeführt. Bei der Herstellung von den *Tissue-Microarrays* wird ein kleiner Bereich des Tumors aus dem Paraffinblock herausgestanzt und zusammen mit anderen derartigen Stenzen in einen Block eingebettet (Korshunov et al., 2010). Auf diese Art ist es möglich, viele verschiedene Tumoren gleichzeitig immunhistochemisch zu färben. Fraglich ist, ob diese kleinen, wenn auch repräsentativen Bereiche der Tumoren anders bewertet werden als deutlich größere Bereiche. Insbesondere Ependymome weisen oft ein sehr heterogenes histologisches Bild auf (Tihan et al., 2008; Ellison et al., 2011). In dieser Arbeit wurden Präparate mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 2 cm² ausgewertet. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum Teil darauf zurückzuführen sein.

Die relativ geringe Größe der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte ist bei Betrachtung der statistischen Ergebnisse zu berücksichtigen. Die geringe Anzahl an Proben ist zum einen dem seltenen Vorkommen der Ependymome geschuldet und ergibt sich zum anderen daraus, dass in die Kohorte nur pädiatrische Patienten eingeschlossen wurden. Hieraus ergibt sich der Vorteil eines homogeneren Patientenkollektivs im Vergleich zur Studie von Milde et al.

In der Literatur finden sich weitere Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Nestin-Expression und dem Malignitätsgrad der Tumoren nachweisen. So wiesen Yang et al. eine statistisch signifikant höhere Nestin-Intensität in den hochmalignen gastrointestinalen Stromatumoren und Angiosarkomen als in den weniger malignen Tumoren nach (Yang et al., 2008). Eine ebenfalls positive Korrelation zwischen der Nestin-Expression und der Prognose der Patienten zeigt sich bei Gliomen (Zhang et al., 2008; Arai et al., 2012). Matsuda et al.

wiesen in einer Untersuchung an Pankreaskarzinomzellen nach, dass eine Erhöhung der Nestin-Expression mit einer stärkeren Zellmigration sowie einer erhöhten Invasivität und Metastasierungstendenz korreliert (Matsuda et al., 2011). Kleeberger et al. stellten eine Funktion für die Migration und Metastasierung in Prostatakarzinomen fest (Kleeberger et al., 2007).

Es gibt verschiedene möglich Gründe, warum Nestin durch diese Zusammenhänge als ein Marker für eine ungünstige Prognose bei malignen Tumoren fungieren kann. Nestin ist ein Marker für Stammzellen. Nach der Stammzelltheorie sind die Stammzellen verantwortlich für die Tumorentstehung, das Wachstum und das Wiederauftreten von Tumoren. Sie machen nur eine kleine Subpopulation der Tumorzellen aus (Reya et al., 2001; Abbott, 2006; Clarke et al., 2006), führen aber häufig zu einer erschwerten Therapie, da sie eine höhere Resistenz gegenüber der konventionellen Radio- und Chemotherapie aufweisen als die anderen Tumorzellen (Bao et al., 2006). Nach dieser Theorie wäre eine Korrelation zwischen einer ungünstigen Prognose und dem Nachweis einer hohen Rate an Stammzellmarkern nachvollziehbar. In mehreren Studien konnte ein solcher Zusammenhang zwischen einem hohen Level an Stammzellmarkern in Gliomen und einem aggressiveren Phänotyp nachgewiesen werden (Strojnik et al., 2007; Zeppernick et al., 2008; Zhang et al., 2008).

Milde et al. fanden außerdem heraus, dass eine Reihe von Genen neben Nestin koexprimiert werden. Diese sind an entwicklungs- und epigenetischen Prozessen beteiligt und können so zu der Entwicklung eines, eventuell aggressiveren und undifferenzierteren Phänotyps der Ependymome führen. Ihnen könnte daher auch eine prognostische Relevanz zukommen.

Als ein weiteres Ergebnis der Studie von Milde et al. zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen von Nestin-positiven Ependymomen in einer supratentoriellen Lokalisation (Milde et al., 2012). Dieser Zusammenhang zwischen Nestin und der Lokalisation konnte auch in einer Studie zur Co-Expression von Nestin und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gezeigt werden. Nambirajan et al. wiesen eine deutlich erhöhte Expression von Nestin und VEGF in supratentoriellen Ependymomen nach, die mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert waren. Die Autoren vermuten, dass dieser Zusammenhang die Hypothese einer lokalisationspezifischen Ependymomentstehung (Taylor et al., 2005) unterstützt und Ependymome die in den anderen Kompartimenten des zentralen Nervensystems entstehen, womöglich aus radialen Gliazellen hervorgehen, die keine Nestin-Expression aufweisen und ein besseres Outcome zeigen (Nambirajan et al., 2014).

Innerhalb der GIST und Angiosarkome, beides mesenchymale Tumoren, wird eine verstärkte Nestin-Expression in den Tumoren mit einer niedrigeren Differenzierung beschrieben (Yang et al., 2008). Auch bei Gliomen gibt es Hinweise darauf, dass Nestin je nach Differenzierung unterschiedlich exprimiert wird. High-Grade-Gliome beispielsweise können in drei molekulare Subgruppen unterteilt werden. In einer der Subgruppen zeigen die Tumoren mesenchymale Merkmale. Die Tumoren weisen eine schlechtere Prognose auf und exprimieren vermehrt Nestin (Phillips et al., 2006). Bei anderen Tumoren mit einer derartigen mesenchymalen Dedifferenzierung wurde ebenfalls eine erhöhte Nestin-Expression festgestellt. Ohike et al. wiesen eine Nestin-Expression in Pankreaskarzinomen insbesondere in dedifferenzierten Arealen nach. Die Autoren nehmen an, dass Nestin im Rahmen einer Epithelialen-Mesenchymalen Transition re-exprimiert bzw. verstärkt exprimiert wird (Ohike et al., 2007).

In Ependymomen wurden mesenchymale Veränderungen nur vereinzelt nachgewiesen (Louis et al., 1990; Rodriguez et al., 2008). In diesem Kontext wären die Ergebnisse einer fehlenden Korrelation zwischen der Nestin-Expression und der Prognose der Patienten stimmig.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der Literatur einige Hinweise darauf zu finden sind, dass Nestin in Ependymomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Da die Studien sich aber nicht einheitlich auf ein pädiatrisches Patientenkollektiv beziehen, sind weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig.

5.3 Korrelation der Ergebnisse mit denen einer vorausgegangenen Studie

Die Ergebnisse dieser Studie wurden mit den Ergebnissen einer vorausgegangenen Studie (die an derselben Kohorte durchgeführt wurde) zusammengeführt. In der früheren Studie von Hagel et al. wurden folgende Antikörper auf Unterschiede in ihrer Expression bei supra- und infratentoriellen Ependymomen untersucht: Die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA (NTRK1) und p75 (NGFR), die neuronalen Marker NeuN (RBFOX3) und Synaptophysin, der Marker SOX9 für radiäre Gliazellen, die Adhäsionsmoleküle CD56 und CD44, das Transmembranprotein Connexin 43, das saure Gliafaserprotein GFAP und der Proliferationsmarker Ki67 (Hagel et al., 2013).

Die Kohorte der kindlichen Ependymome wurde in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen, um einen Bezug zu den vorangegangenen Daten herzustellen.

Das Zusammenführen der Ergebnisse ergab eine positive Korrelation zwischen der Expression von Nestin und CD44. CD44 ist ein multifunktionelles Adhäsionsmolekül der Zellwand, das ubiquitär, mit einer großen Anzahl von Isoformen vorkommt und an

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist. Durch diese Interaktionen spielt es eine Rolle für den Verbleib der Zelle an einem Ort im Zellverband sowie für die Migration der Zelle (Stamenkovic & Yu, 2009). CD44 wird wie Nestin auch in vielen unterschiedlichen malignen Tumoren exprimiert. Unter anderem in Gliomen (Ylagan & Quinn, 1997; Hagel & Stavrou, 1999; Wei et al., 2010; Hagel et al., 2013), kolorektalen Karzinomen (Cho et al., 2012), Mamma-Karzinomen (Beça et al., 2013), Leukämien und Lymphomen (Elli et al., 2012). In Gliomen konnte eine positive Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Grad der Tumoren gezeigt werden (Yoshida et al., 2012). Shu et al. wiesen kürzlich nach, dass CD44 ein zuverlässiger Marker für die Prognose und Klassifikation von pädiatrischen Ependymomen der hinteren Schädelgrube ist (Shu et al., 2018). In mehreren Veröffentlichungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD44, dem Zellwachstum und der Invasivität von Tumorzellen gezeigt werden (Pusch et al., 2010; Fang et al., 2011; Pongcharoen et al., 2011).

Diese Eigenschaften könnten dafür sprechen, dass eine erhöhte CD44-Expression mit einer höheren Malignität und somit einer schlechteren Prognose korreliert. In diesem Zusammenhang wäre die hier gefundene Korrelation zwischen CD44 und Nestin stimmig und würde zu den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Nestin passen.

In der Literatur werden bezüglich einer Korrelation zwischen der CD44-Expression und dem Malignitätsgrad von Tumoren unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Kuppner et al. fanden in High-grade-Gliomen eine höhere Expression als in anderen Gehirntumoren mit niedriger Malignität (Kuppner et al., 1992). Yoshida et al. stellten ebenfalls eine positive Korrelation zwischen einer ausgeprägten CD44-Expression und einem hohen Malignitätsgrad bei Gliomen fest (Yoshida et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnten Frank et al. keinen Unterschied in der Expression von CD44 bei Gliomen unterschiedlichen Gratings feststellen (Frank et al., 1996). Auch Kaaijk et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Malignitätsgrad und der CD44-Expression in primären Gehirntumoren (Kaaijk et al., 1995). Hagel et al. untersuchten den Zusammenhang von CD44-Expression und dem Malignitätsgrad von Oligodendrogliomen und fanden eine signifikant höhere Expression in High-grade-Oligodendrogliomen (Hagel & Stavrou, 1999).

CD44 wird wie Nestin auch als Stammzellmarker angesehen. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Korrelation von Nestin und CD44 könnte die entscheidende Rolle von Zellen mit Stammzeleigenschaften in Ependymomen unterstreichen.

5.3.1 Zusammenschau der prognostischen Faktoren

Wie in der Einleitung dargestellt gibt es ein großes Spektrum an potentiellen prognostischen Faktoren für Ependymome. Eine Bewertung der prognostischen Qualität dieser Faktoren ist schwierig, da viele der zugrunde liegenden Studien an sehr heterogenen Kohorten durchgeführt wurden. Der Nachweis der Existenz unterschiedlicher molekularer Subgruppen der Ependymome verdeutlicht, dass es sich nicht um eine einheitliche Tumorentität handelt. Es bestehen insbesondere alters- und lokalisationspezifische Unterschiede. Mögliche prognostische Faktoren sollten hierzu in Beziehung gesetzt werden. Da eine Untersuchung der molekularen Subgruppen nicht einheitlich in der Routinediagnostik durchgeführt werden kann, sollten Studien zu prognostischen Faktoren zumindest mit den klinischen Merkmalen korrelieren. Metaanalysen bilden eine Möglichkeit, um aus den häufig heterogenen und kleinen Studien valide Aussagen abzuleiten, da auf diese Weise eine größere Menge von Daten ausgewertet werden kann.

Für einen umfangreichen Überblick über die potentiellen prognostischen Faktoren speziell kindlicher Ependymome wird hier auf die Metaanalyse von Kilday et al. verwiesen. In der Arbeit werden 32 immunhistochemische und genetische Faktoren, unter anderem in einer fast 6 seitigen Tabelle, dargestellt und bewertet (Kilday et al., 2009). Die Komplexität des Themas wird hier sehr deutlich.

Kindliche Ependymome weisen im Vergleich zu denen erwachsener Patienten wesentlich häufiger ein balanciertes genetisches Profil mit weniger Mutationen auf (Carter et al., 2002; Kilday et al., 2009).

Grundsätzlich werden Malignome als eine genetische, durch Mutationen verursachte Erkrankung angesehen. Die meisten malignen Tumoren weisen ein Genom mit einem aneuploiden Chromosomensatz auf. Es existieren aber auch maligne Tumoren mit einem stabilen Genom, wie beispielsweise der hoch maligne atypische teratoide/rhabdoide Tumor, der in der frühen Kindheit auftritt. Lee et al. wiesen in einer Studie extrem niedrige bis fehlende Mutationslevel in diesen Tumoren nach. Sie zeigten damit, dass die Entstehung von Malignomen auch ohne eine hohe Rate an Mutationen möglich ist. Die Autoren nehmen an, dass die Tumorentstehung in diesen Fällen auf andere Ursachen, wie beispielsweise epigenetische Veränderungen, zurückzuführen ist. Eine entscheidende Rolle könnte auch die Tumorentstehung während einer bestimmten Entwicklungsphase spielen. Die Autoren vermuten, dass Zellpopulationen mit einer hohen Proliferationsfähigkeit, die nur in bestimmten Entwicklungsphasen besonders empfindlich auf bereits minimale Mutationen reagieren, das Tumorstadium initiieren

können (Lee et al., 2012). Die Theorie, dass bereits kleinste Veränderungen während einer bestimmten Entwicklungsphase zur Entstehung eines Tumors führen, könnte auch für die Entstehung von Ependymomen bei Kindern bedeutsam sein. Dies würde eventuell eine Erklärung für die deutlichen Unterschiede zwischen kindlichen Ependymomen und denen erwachsener Patienten bieten.

Die durch die Methylomanalyse gewonnene Erkenntnis über die Existenz von molekularen Subgruppen verdeutlicht diese Unterschiede (Pajtler et al., 2015). Die beschriebenen Beobachtungen lassen darauf schließen, dass sich die Ependymome von Kindern nicht nur hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens und der Lokalisation, sondern auch in ihrer Entstehung von denen erwachsener Patienten unterscheiden.

Aufgrund der beschriebenen Heterogenität der Ependymome wäre die Möglichkeit einer individualisierten Therapie wünschenswert. Bei pädiatrischen Patienten wirken sich die derzeitigen therapeutischen Optionen zudem teilweise negativ auf das sich noch in der Entwicklung befindende Gehirn aus.

In einer Reihe von Malignomen ist eine Therapie durch eine Immun-Checkpoint-Inhibition möglich. Hwang et al. wiesen in einer Studie an verschiedenen pädiatrischen Hirntumoren, unter anderem in Ependymomen, den *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1) nach. Dieses Protein kann durch eine Rezeptorinteraktion T-Zellen deaktivieren und dient laut Aussage der Autoren somit als ein vielversprechender Marker für die Möglichkeit einer Checkpoint-Blockade. Ob die Hirntumoren auf eine solche Therapie ansprechen, muss in weiteren Studien gezeigt werden (Hwang et al., 2018).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die prognostische Relevanz von GPNMB und Nestin bei Gehirntumoren und insbesondere bei kindlichen Ependymomen zu untersuchen. Hierfür wurde Nestin an einer Kohorte von kindlichen Ependymomen immunhistochemisch untersucht und die Ergebnisse in Beziehung zu verschiedenen klinischen Daten gesetzt.

Weiterhin sollte die subzelluläre Expression von GPNMB in Gehirntumoren licht- und elektronenmikroskopisch dargestellt und eine Quantifizierbarkeit erreicht werden. Für dieses Ziel sollte die Immunogold-Methode im Institut für Neuropathologie des UKE etabliert werden.

Mit der Immunogold-Methode konnten, in dem zur Verfügung stehenden Zeitraum, keine zufriedenstellend verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Zusätzlich traten Schwierigkeiten mit dem GPNMB-Antikörper auf, sodass das Ziel, die subzelluläre Lokalisation von GPNMB zu bestimmen und den Antikörper an einer Kohorte kindlicher Ependymome zu testen, innerhalb dieser Arbeit nicht erreicht werden konnte.

Die immunhistochemischen Nestin-Färbungen zeigten eindeutige Ergebnisse, die in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen der Nestin-Expression von supratentoriellen vs. infratentoriellen Ependymomen, keine Korrelation zwischen Nestin-Expression und dem Patientenalter, dem Ependymom-Grad oder der Überlebenszeit der Patienten erbrachten. Eine signifikante Korrelation der klinischen Parameter zeigte sich zwischen Patientenalter und Ependymom-Grad.

Schließlich wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Daten einer vorangegangenen Studie, die an derselben Kohorte kindlicher Ependymome durchgeführt wurde, zusammengeführt. Dabei wurde überprüft, ob die Expression von Nestin mit der anderer Antigene korreliert und eine Korrelation mit CD44 festgestellt. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Stammzellmarker, die in malignen Tumoren vermehrt exprimiert werden und deren prognostische Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist.

Bei Ependymomen zeigt das derzeitige histologische Grading im Vergleich zu anderen Gliomen keine zufriedenstellende Korrelation mit der Prognose, sodass neue Faktoren und Kriterien gesucht werden, die eine bessere Beurteilung und Einschätzung der Prognose von Patienten mit Ependymomen ermöglichen. Trotz vielversprechender Erkenntnisse aus dem Bereich der Methylomanalyse sind weitere immunhistochemische Untersuchungen sinnvoll, da diese Methodik in der Routinediagnostik nahezu überall verfügbar ist.

Summary

The aim of the present study was to investigate the prognostic relevance of GPNMB and nestin in brain tumors, especially in childhood ependymomas. Therefore, nestin was immunohistochemically examined in a cohort of pediatric ependymomas and the results were related to various clinical data.

Furthermore, the subcellular expression of GPNMB in brain tumors was to be visualized by light and electron microscopy and a quantifiability was to be achieved. For this purpose, the immunogold method was supposed to be established at the Institute of Neuropathology of the UKE.

The Immunogold method failed to produce satisfactory, usable results. In addition, difficulties were encountered with the GPNMB antibody, so that the goal of determining the subcellular location of GPNMB and testing the antibody on a cohort of infant ependymomas could not be achieved within the framework of this thesis.

The immunohistochemical nestin staining clearly showed that there is no significant difference between the nestin expression of supratentorial vs. infratentorial ependymomas. Moreover, no correlation between nestin expression and patient age, ependymoma grade, or patient survival could be found. A significant correlation of clinical parameters was, however, found between patient age and ependymoma grade.

Finally, the results of the present study were merged with data from a previous study conducted on the same cohort of pediatric ependymomas. It was examined whether the expression of nestin correlated with the one of other antigens and a correlation with CD44 was discovered. Both proteins are stem cell markers that can be found to an increasing degree in malignant tumors and whose prognostic significance has not yet been entirely clarified.

In ependymal tumors current histologic grading is not satisfactorily correlated with prognosis compared to other gliomas. Therefore, new factors and criteria are sought to better evaluate and estimate the prognosis of patients with ependymomas.

Despite promising findings in the field of methylomanalysis, further immunohistochemical investigations should be performed since this methodology is available almost everywhere in routine diagnostics.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten des untersuchten Patientenkollektivs	27
Tabelle 2: Frischproben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	28
Tabelle 3: Reagenzien für die Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge	28
Tabelle 4: Reagenzien für die Elektronenmikroskopie in alphabetischer Reihenfolge	29
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	30
Tabelle 6: Lösungen für die Immunhistochemie in alphabetischer Reihenfolge.....	30
Tabelle 7: Lösungen für die Elektronenmikroskopie in alphabetischer Reihenfolge	30
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge	32
Tabelle 9: Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge.....	32
Tabelle 10: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit GPNMB.....	41
Tabelle 11: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit Nestin	43
Tabelle 12: Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung mit Nestin aufgeschlüsselt nach WHO-Grad und Lokalisation	43
Tabelle 13: Vergleich der Post-embedding-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten	49
Tabelle 14: Daten des Patientenkollektivs	78
Tabelle 15: Auswertung Nestin-Färbung.	79

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines Subependymoms.....	5
Abbildung 2: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines Myxopapillären Ependymoms..	7
Abbildung 3: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines WHO-Grad-II-Ependymoms....	8
Abbildung 4: Beispielhafte mikroskopische Aufnahme eines anaplastischen Ependymoms.	10
Abbildung 5: Grafische Darstellung der 9 molekularen Subgruppen	12
Abbildung 6: Grafische Darstellung der wichtigsten molekularen und biologischen Charakteristika der unterschiedlichen Subgruppen	14
Abbildung 7: GFAP-Markierung mit Immunogold (oben) und MAP2c-Nachweis mit Diaminobenzidin (unten).....	40
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung mit GPNMB.....	42
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen Nestin Färbestärken	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung von Protein-A-Gold und Gold-konjugierten Sekundärantikörpern	47

9 Abkürzungsverzeichnis

GFAP	Saures Gliafaserprotein
GPNMB	Glykoprotein nonmetastatic melanoma protein B
CC1	Cell Conditioning Solution
CDKN2A	Cyclin dependend kinase inhibitor 2A
CGH	Comparative genomic hybridization
CNAs	Copy number alterations
CNS-PNETs	Primitive Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System
DAB	3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Epithelial membrane antigen
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
L1CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
MAP2c	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NCAM1	Neural Cell Adhesion Molecule 1
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OS	Overall survival
PF-EPN-A	Posterior fossa ependymoma, group A
PF-EPN-B	Posterior fossa ependymoma, group B
PF-SE	posterior fossa subependymoma
PFS	Progression free survival
SP-EPN	Spinal ependymoma
SP-MPE	Spinal myxopapillary ependymoma
SP-SE	Spinal subependymoma
ST-EPN	Supratentorial ependymoma
ST-EPN-RELA	Supratentorial ependymoma, RELA-fusion
ST-EPN-YAP1	Supratentorial ependymoma, YAP1-fusion
ST-SE	Supratentorial subependymoma
TBS	Tris buffered saline
TNC	Extracellular matrix glycoprotein tenascin-C

TOP2B	DNA Topoisomerase II Beta
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Literaturverzeichnis

- Abbott, A.** (2006) Cancer: The root of the problem, *Nature*. Nature Publishing Group, 442(7104), pp. 742–743.
- Ackermann, J., Frutschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A. and Beermann, F.** (2005) Metastasizing Melanoma Formation Caused by Expression of Activated N-Ras Q61K on an INK4a-Deficient Background, *Cancer Research*. AACR, 65(10), pp. 4005–4011.
- Aguilera, D. G., Mazewski, C., Schniederjan, M. J., Leong, T., Boydston, W. and MacDonald, T. J.** (2011) Neurofibromatosis-2 and spinal cord ependymomas: Report of two cases and review of the literature, *Child's Nervous System*. Springer, 27(5), pp. 757–764.
- Akyuz, C., Suna, E., Akalan, N., Soylemezoglu, F., Kutluk, T. and Buyukpamukcu, M.** (2000) Intracranial Ependymomas in Childhood: A Retrospective Review of Sixty-two Children, *Acta Oncologica*, 39(1), pp. 97–100.
- Almqvist, P. M., Mah, R., Lendahl, U., Jacobsson, B. and Hendson, G.** (2002) Immunohistochemical Detection of Nestin in Pediatric Brain Tumors, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 50(2), pp. 147–158.
- Andreiuolo, F., Le Teuff, G., Bayar, M. A., Kilday, J.-P., Pietsch, T., von Bueren, A. O., Witt, H., Korshunov, A., Modena, P., Pfister, S. M., Pagès, M., Castel, D., Giangaspero, F., Chimelli, L., Varlet, P., Rutkowski, S., Frappaz, D., Massimino, M., Grundy, R., et al.** (2017) Integrating Tenascin-C protein expression and 1q25 copy number status in pediatric intracranial ependymoma prognostication: A new model for risk stratification, *PLOS ONE*. Edited by M. M. Alonso, 12(6), p. e0178351.
- Arai, H., Ikota, H., Sugawara, K., Nobusawa, S., Hirato, J. and Nakazato, Y.** (2012) Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas, *Brain Tumor Pathology*. Springer, 29(3), pp. 160–167.
- Araki, A., Chocholous, M., Gojo, J., Dorfer, C., Czech, T., Heinzl, H., Dieckmann, K., Ambros, I. M., Ambros, P. F., Slavc, I. and Haberler, C.** (2016) Chromosome 1q gain and tenascin-C expression are candidate markers to define different risk groups in pediatric posterior fossa ependymoma, *Acta Neuropathologica Communications*. Acta Neuropathologica Communications, 4(1), p. 88.
- Bächner, D., Schröder, D. and Gross, G.** (2002) mRNA expression of the murine glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnm) gene is linked to the developing retinal pigment epithelium and iris, *Gene Expression Patterns*. Elsevier, 1(3–4), pp. 159–165.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D. and Rich, J. N.** (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature*. Nature Publishing Group, 444(7120), pp. 756–760.
- Barbarotto, E., Schmittgen, T. D. and Calin, G. A.** (2008) MicroRNAs and cancer: Profile, profile, profile, *International Journal of Cancer*. Wiley Online Library, 122(5), pp. 969–977.
- Beça, F. F. de, Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C. A., Gomes, M., Paredes, J. and Schmitt, F.** (2013) Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types, *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group, 66(3), pp. 187–191.
- Del Bigio, M. R.** (2010) Ependymal cells: biology and pathology, *Acta Neuropathologica*, 119(1), pp. 55–73.

- Birch, B. D., Johnson, J. P., Parsa, A., Desai, R. D., Yoon, J. T., Lycette, C. A., Li, Y. M. and Bruce, J. N.** (1996) Frequent Type 2 Neurofibromatosis Gene Transcript Mutations in Sporadic Intramedullary Spinal Cord Ependymomas, *Neurosurgery*. Oxford University Press, 39(1), pp. 135–140.
- Bouffet, E., Perilongo, G., Canete, A. and Massimino, M.** (1998) Intracranial ependymomas in children: A critical review of prognostic factors and a plea for cooperation, *Medical and Pediatric Oncology*. Wiley Online Library, 30(6), pp. 319–329.
- Bruni, J. E.** (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: A review, *Microscopy Research and Technique*, 41(1), pp. 2–13.
- Carter, M., Nicholson, J., Ross, F., Crolla, J., Allibone, R., Balaji, V., Perry, R., Walker, D., Gilbertson, R. and Ellison, D.** (2002) Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 86(6), pp. 929–939.
- Chai, Y.-H., Jung, S., Lee, J.-K., Kim, I.-Y., Jang, W.-Y., Moon, K.-S., Kim, J.-H., Lee, K.-H., Kim, S.-K. and Jung, T.-Y.** (2017) Ependymomas: Prognostic Factors and Outcome Analysis in a Retrospective Series of 33 Patients, *Brain Tumor Research and Treatment*, 5(2), pp. 70–76.
- Chaturvedi, M. M., Sung, B., Yadav, V. R., Kannappan, R. and Aggarwal, B. B.** (2011) NF- κ B addiction and its role in cancer: ‘one size does not fit all’, *Oncogene*. Nature Publishing Group, 30(14), pp. 1615–1630.
- Cho, S., Park, Y., Kim, H., Kim, C., Lim, S., Huh, J., Lee, J. and Kim, H.** (2012) CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion, *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications, 41(1), pp. 211–218.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. and Wahl, G. M.** (2006) Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells, *Cancer Research*, 66(19), pp. 9339–9344.
- Colin, C., Virard, I., Baeza, N., Tchoghandjian, A., Fernandez, C., Bouvier, C., Calisti, A., Tong, S., Durbec, P. and Figarella-Branger, D.** (2007) Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis, *Neuropathology and Applied Neurobiology*. Wiley Online Library, 33(4), pp. 431–439.
- Dahlstrand, J., Collins, V. P. and Lendahl, U.** (1992) Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors., *Cancer research*. AACR, 52(19), pp. 5334–41.
- Dyer, S., Prebble, E., Davison, V., Davies, P., Ramani, P., Ellison, D. and Grundy, R.** (2002) Genomic Imbalances in Pediatric Intracranial Ependymomas Define Clinically Relevant Groups, *The American Journal of Pathology*. Elsevier, 161(6), pp. 2133–2141.
- Ebert, C., von Haken, M., Meyer-Puttlitz, B., Wiestler, O. D., Reifenberger, G., Pietsch, T. and von Deimling, A.** (1999) Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas., *The American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 155(2), pp. 627–632.
- Ehrmann, J., Kolář, Z. and Mokřý, J.** (2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours, *Journal of clinical pathology*. BMJ Publishing Group, 58(2), pp. 222–223.
- Elli, M., Dagdemir, A., Bozkurt, C., Pinarli, F. G., Duzgun, A., Ozmen, Z. C., Ertem, U. and Acar, S.** (2012) Serum osteopontin and CD44 levels in lymphoreticular

- malignancies in children., *Bratislavské lekárske listy*, 113(9), pp. 534–538.
- Ellison, D., Love, S., Chimelli, L., Harding, B. N., Lowe, J. and Vinters, H. V.** (2004) Neuropathology: A Reference Text of CNS Pathology. 2nd edn. Edinburgh: Mosby.
- Ellison, D. W., Kocak, M., Figarella-Branger, D., Felice, G., Catherine, G., Pietsch, T., Frappaz, D., Massimino, M., Grill, J., Boyett, J. M. and Grundy, R. G.** (2011) Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts, *Journal of Negative Results in BioMedicine*. BioMed Central, 10(1), p. 7.
- Ellison, D. W., Korshunov, A. and Witt, H.** (2016) Ependymoma, RELA fusion-positive, in Louis, D. N. et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edn. Lyon: IARC, p. 112.
- Ellison, D. W., McLendon, R., Wiestler, O. D., Kros, J. M., Korshunov, A., Ng, H.-K., Witt, H. and Hirose, T.** (2016a) Anaplastic ependymoma, in Louis, D. N. et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edn. Lyon: IARC, pp. 113–114.
- Ellison, D. W., McLendon, R., Wiestler, O. D., Kros, J. M., Korshunov, A., Ng, H.-K., Witt, H. and Hirose, T.** (2016b) Ependymoma, in Louis, D. N. et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edn. Lyon: IARC, pp. 106–111.
- Fang, X. J., Jiang, H., Zhao, X. P. and Jiang, W. M.** (2011) The role of a new CD44st in increasing the invasion capability of the human breast cancer cell line MCF-7, *BMC Cancer*. BioMed Central, 11(1), p. 290.
- Faulk, W. and Taylor, G.** (1971) Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope, *Immunochemistry*, 8(11), pp. 1081–1083.
- Figarella-Branger, D., Civatte, M., Bouvier-Labit, C., Gouvernet, J., Gambarelli, D., Gentet, J.-C., Lena, G., Choux, M. and Pellissier, J. F.** (2000) Prognostic factors in intracranial ependymomas in children, *Journal of Neurosurgery*. Journal of Neurosurgery Publishing Group, 93(4), pp. 605–613.
- Frank, S., Rihs, H.-P., Stöcker, W., Müller, J., Dumont, B., Baur, X., Schackert, H. K. and Schackert, G.** (1996) Combined Detection of CD44 Isoforms by Exon-Specific RT-PCR and Immunohistochemistry in Primary Human Brain Tumors and Brain Metastases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier, 222(3), pp. 794–801.
- Gatta, G., Botta, L., Rossi, S., Aareleid, T., Bielska-Lasota, M., Clavel, J., Dimitrova, N., Jakab, Z., Kaatsch, P., Lacour, B., Mallone, S., Marcos-Gragera, R., Minicozzi, P., Sánchez-Pérez, M.-J., Sant, M., Santaquilani, M., Stiller, C., Tavilla, A., Trama, A., et al.** (2014) Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EURO CARE-5—a population-based study, *The Lancet Oncology*. Elsevier, 15(1), pp. 35–47.
- Ghilardi, C., Chiorino, G., Dossi, R., Nagy, Z., Giavazzi, R. and Bani, M.** (2008) Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium, *BMC Genomics*. BioMed Central, 9(1), p. 201.
- Gilhuis, H. J., van der Laak, J., Wesseling, P., Boerman, R. H., Beute, G., Teepen, J. L. M. J., Grotenhuis, J. A. and Kappelle, A. C.** (2004) Inverse correlation between genetic aberrations and malignancy grade in ependymal tumors: a paradox?, *Journal of neuro-oncology*. Springer, 66(1–2), pp. 111–116.
- Godfraind, C., Kaczmarzka, J. M., Kocak, M., Dalton, J., Wright, K. D., Sanford, R. A., Boop, F. A., Gajjar, A., Merchant, T. E. and Ellison, D. W.** (2012) Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas, *Acta Neuropathologica*. Springer, 124(2), pp. 247–257.

- Goldwein, J. W., Glauser, T. A., Packer, R. J., Finlay, J. L., Sutton, L. N., Curran, W. J., Laehy, J. M., Rorke, L. B., Schut, L. and J. D'Angio, G.** (1990) Recurrent intracranial ependymomas in children survival, patterns of failure, and prognostic factors, *Cancer*. Wiley Online Library, 66(3), pp. 557–563.
- Goldwein, J. W., Leahy, J. M., Packer, R. J., Sutton, L. N., Curran, W. J., Rorke, L. B., Schut, L., Littman, P. and D'Angio, G. J.** (1990a) Intracranial ependymomas in children, *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*. Elsevier, 19(6), pp. 1497–1502.
- Grill, J., Avet-Loiseau, H., Lellouch-Tubiana, A., Sévenet, N., Terrier-Lacombe, M.-J., Vénuat, A.-M., Doz, F., Sainte-Rose, C., Kalifa, C. and Vassal, G.** (2002) Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas, *Cancer genetics and cytogenetics*. Elsevier, 136(2), pp. 121–125.
- Grundy, R. G., Wilne, S. A., Weston, C. L., Robinson, K., Lashford, L. S., Ironside, J., Cox, T., Chong, W. K., Campbell, R. H., Bailey, C. C., Gattamaneni, R., Picton, S., Thorpe, N., Mallucci, C., English, M. W., Punt, J. A., Walker, D. A., Ellison, D. W. and Machin, D.** (2007) Primary postoperative chemotherapy without radiotherapy for intracranial ependymoma in children: the UKCCSG/SIOP prospective study, *The Lancet Oncology*. Elsevier, 8(8), pp. 696–705.
- Hagel, C. and Stavrou, D. K.** (1999) CD44 expression in primary and recurrent oligodendrogliomas and in adjacent gliotic brain tissue., *Neuropathology and applied neurobiology*, 25(4), pp. 313–318. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10476048>.
- Hagel, C., Stemmer-Rachamimov, A. O., Bornemann, A., Schuhmann, M., Nagel, C., Huson, S., Evans, D. G., Plotkin, S., Matthies, C., Kluwe, L. and Mautner, V.-F.** (2012) Clinical presentation, immunohistochemistry and electron microscopy indicate neurofibromatosis type 2-associated gliomas to be spinal ependymomas, *Neuropathology*. Wiley Online Library, 32(6), pp. 611–616.
- Hagel, C., Treszl, A., Fehlert, J., Harder, J., von Haxthausen, F., Kern, M., von Bueren, A. O. and Kordes, U.** (2013) Supra- and infratentorial pediatric ependymomas differ significantly in NeuN, p75 and GFAP expression, *Journal of Neuro-Oncology*. Springer, 112(2), pp. 191–197.
- Hoashi, T., Sato, S., Yamaguchi, Y., Passeron, T., Tamaki, K. and Hearing, V. J.** (2010) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b, a melanocytic cell marker, is a melanosome-specific and proteolytically released protein, *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology, 24(5), pp. 1616–1629.
- Hoffman, L. M., Donson, A. M., Nakachi, I., Griesinger, A. M., Birks, D. K., Amani, V., Hemenway, M. S., Liu, A. K., Wang, M., Hankinson, T. C., Handler, M. H. and Foreman, N. K.** (2014) Molecular sub-group-specific immunophenotypic changes are associated with outcome in recurrent posterior fossa ependymoma, *Acta Neuropathologica*. Springer, 127(5), pp. 731–745.
- Horisberger, M. and Rosset, J.** (1977) Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 25(4), pp. 295–305.
- Hovestadt, V., Remke, M., Kool, M., Pietsch, T., Northcott, P. A., Fischer, R., Cavalli, F. M. G. G., Ramaswamy, V., Zapatka, M., Reifenberger, G., Rutkowski, S., Schick, M., Bewerunge-Hudler, M., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., Pfister, S. M. and Jones, D. T. W. W.** (2013) Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays, *Acta Neuropathologica*. Springer, 125(6), pp.

913–916.

- Hwang, K., Koh, E. J., Choi, E. J., Kang, T. H., Han, J. H., Choe, G., Park, S.-H., Yearley, J. H., Annamalai, L., Blumenschein, W. and others** (2018) PD-1/PD-L1 and immune-related gene expression pattern in pediatric malignant brain tumors: clinical correlation with survival data in Korean population, *Journal of neuro-oncology*. Springer, pp. 1–11.
- Ishiwata, T., Matsuda, Y. and Naito, Z.** (2011) Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis, *World journal of gastroenterology: WJG*. Baishideng Publishing Group Inc, 17(4), pp. 409–418.
- Jaing, T. H., Wang, H. S., Tsay, P. K., Tseng, C. K., Jung, S. M., Lin, K. L. and Lui, T. N.** (2004) Multivariate analysis of clinical prognostic factors in children with intracranial ependymomas, *J Neurooncol*, 68(3), pp. 255–261.
- Jeuken, J. W. M., Sprenger, S. H. E., Gilhuis, J., Teepen, H. L. J. M., Grotenhuis, A. J. and Wesseling, P.** (2002) Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH, *The Journal of Pathology*. Wiley Online Library, 197(2), pp. 238–244.
- Johnson, R. A., Wright, K. D., Poppleton, H., Mohankumar, K. M., Finkelstein, D., Pounds, S. B., Rand, V., Leary, S. E. S., White, E., Eden, C., Hogg, T., Northcott, P., Mack, S., Neale, G., Wang, Y.-D., Coyle, B., Atkinson, J., DeWire, M., Kranenburg, T. A., et al.** (2010) Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma, *Nature*. Nature Publishing Group, 466(7306), pp. 632–636.
- Kaaijk, P., Troost, D., Morsink, F., Keehnen, R. M. J., Leenstra, S., Bosch, D. A. and Pals, S. T.** (1995) Expression of CD44 splice variants in human primary brain tumors, *Journal of neuro-oncology*. Springer, 26(3), pp. 185–190.
- Kasper, M., Perry, G. and Stosiek, P.** (1991) Cytokeratin expression in human spinal meninges and ependymal cells., *Journal fur Hirnforschung*, 32(1), pp. 19–25.
- Kilday, J.-P., Mitra, B., Domerg, C., Ward, J., Andreiuolo, F., Osteso-Ibanez, T., Mauguen, A., Varlet, P., Le Deley, M.-C., Lowe, J., Ellison, D. W., Gilbertson, R. J., Coyle, B., Grill, J. and Grundy, R. G.** (2012) Copy Number Gain of 1q25 Predicts Poor Progression-Free Survival for Pediatric Intracranial Ependymomas and Enables Patient Risk Stratification: A Prospective European Clinical Trial Cohort Analysis on Behalf of the Children’s Cancer Leukaemia Group (CCLG), *Clinical Cancer Research*. AACR, 18(7), pp. 2001–2011.
- Kilday, J.-P., Rahman, R., Dyer, S., Ridley, L., Lowe, J., Coyle, B. and Grundy, R.** (2009) Pediatric Ependymoma: Biological Perspectives, *Molecular Cancer Research*, 7(6), pp. 765–786.
- Kleeberger, W., Bova, G. S., Nielsen, M. E., Herawi, M., Chuang, A.-Y., Epstein, J. I. and Berman, D. M.** (2007) Roles for the Stem Cell–Associated Intermediate Filament Nestin in Prostate Cancer Migration and Metastasis, *Cancer Research*. AACR, 67(19), pp. 9199–9206.
- Klöppel, G., Kreipe, H. H. and Remmele, W.** (2012) Pathologie: Neuropathologie. 3. neubear. Berlin: Springer-Verlag.
- Kobayashi, M., Sjöberg, G., Söderhäll, S., Lendahl, U., Sandstedt, B. and Sejersen, T.** (1998) Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin, *Pediatric research*. Nature Publishing Group, 43(3), pp. 386–392.
- Kong, L.-Y., Wei, J., Haider, A. S., Liebelt, B. D., Ling, X., Conrad, C. A., Fuller, G. N., Levine, N. B., Priebe, W., Sawaya, R. and Heimberger, A. B.** (2014) Therapeutic targets in subependymoma, *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier, 277(1–2), pp. 168–175.

- Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R. and Pronin, I.** (1999) Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases, *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group, 52(8), pp. 574–580.
- Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R. and Timirgaz, V.** (2004) The Histologic Grade Is a Main Prognostic Factor for Patients with Intracranial Ependymomas Treated in the Microneurosurgical Era: An Analysis of 258 Patients, *Cancer*, 100(6), pp. 1230–1237.
- Korshunov, A., Golanov, A. and Timirgaz, V.** (2002) Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms, *Journal of Neuro-Oncology*, 58(3), pp. 255–270.
- Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Benner, A., Remke, M., Ryzhova, M., Milde, T., Bender, S., Wittmann, A., Schöttler, A., Kulozik, A. E., Witt, O., Von Deimling, A., Lichter, P. and Pfister, S.** (2010) Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults, *Journal of Clinical Oncology*, 28(19), pp. 3182–3190.
- Kuan, C.-T., Wakiya, K., Keir, S. T., Li, J., Herndon, J. E., Pastan, I. and Bigner, D. D.** (2011) Affinity-matured anti-glycoprotein NMB recombinant immunotoxins targeting malignant gliomas and melanomas, *International journal of cancer*. Wiley Online Library, 129(1), pp. 111–121.
- Kuan, C. T., Wakiya, K., Dowell, J. M., Herndon, J. E., Reardon, D. A., Graner, M. W., Riggins, G. J., Wikstrand, C. J. and Bigner, D. D.** (2006) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme, *Clinical Cancer Research*, 12(7 D), pp. 1970–1982.
- Kuppner, M. C., Van Meir, E., Gauthier, T. H., Hamou, M. F. and De Tribolet, N.** (1992) Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours, *International journal of cancer*. Wiley Online Library, 50(4), pp. 572–577.
- Kurt, E., Zheng, P. P., Hop, W. C. J., Van Der Weiden, M., Bol, M., Van Den Bent, M. J., Avezaat, C. J. J. and Kros, J. M.** (2006) Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas, *Cancer*, 106(2), pp. 388–395.
- Lambert, S. R., Witt, H., Hovestadt, V., Zucknick, M., Kool, M., Pearson, D. M., Korshunov, A., Ryzhova, M., Ichimura, K., Jabado, N., Fontebasso, A. M., Lichter, P., Pfister, S. M., Collins, V. P. and Jones, D. T. W.** (2013) Differential expression and methylation of brain developmental genes define location-specific subsets of pilocytic astrocytoma, *Acta Neuropathologica*. Springer, 126(2), pp. 291–301.
- Lee, R. S., Stewart, C., Carter, S. L., Ambrogio, L., Cibulskis, K., Sougnez, C., Lawrence, M. S., Auclair, D., Mora, J., Golub, T. R., Biegel, J. A., Getz, G. and Roberts, C. W. M.** (2012) A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers, *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), pp. 2983–2988.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D. G.** (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein, *Cell*. Elsevier, 60(4), pp. 585–595.
- Li, A. M., Dunham, C., Tabori, U., Carret, A.-S., McNeely, P. D., Johnston, D., Lafay-Cousin, L., Wilson, B., Eisenstat, D. D., Jabado, N., Zelcer, S., Silva, M., Scheinemann, K., Fryer, C., Hendson, G., Fotovati, A., Hawkins, C., Yip, S., Dunn, S. E., et al.** (2015) EZH2 expression is a prognostic factor in childhood intracranial ependymoma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium study, *Cancer*, 121(9), pp. 1499–1507.
- Li, H., Cherukuri, P., Li, N., Cowling, V., Spinella, M., Cole, M., Godwin, A. K., Wells, W. and DiRenzo, J.** (2007) Nestin Is Expressed in the Basal/Myoepithelial Layer of the Mammary Gland and Is a Selective Marker of Basal Epithelial Breast Tumors, *Cancer Research*. AACR, 67(2), pp. 501–510.

- Louis, D. N., Hedley-Whyte, E. T. and Martuza, R. L.** (1990) Sarcomatous proliferation of the vasculature in a subependymoma: a follow-up study of sarcomatous dedifferentiation, *Acta neuropathologica*. Springer, 80(5), pp. 573–574.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D. and Cavenee, W. K.** (2016) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th edn. Edited by D. N. Louis et al. Lyon: I.A.R.C.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W. and Kleihues, P.** (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathologica*, 114(2), pp. 97–109.
- Mack, S. C., Witt, H., Piro, R. M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A. M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., Zhang, X., Ramaswamy, V., Jäger, N., Jones, D. T. W., Sill, M., Pugh, T. J., Ryzhova, M., Wani, K. M., Shih, D. J. H., et al.** (2014) Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy, *Nature*. Nature Publishing Group, 506(7489), pp. 445–450.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. and Götz, M.** (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage, *Development*. The Company of Biologists Ltd, 127(24), pp. 5253–5263.
- Matsuda, Y., Naito, Z., Kawahara, K., Nakazawa, N., Korc, M. and Ishiwata, T.** (2011) Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis, *Cancer Biology & Therapy*. Taylor & Francis, 11(5), pp. 512–523.
- McLendon, R., Schiffer, D., Rosenblum, M. K. and Wiestler, O. D.** (2016) Myxopapillary ependymoma, in Louis, D. N. et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edn. Lyon: IARC, pp. 104–105.
- McLendon, R., Schiffer, D., Rosenblum, M. K., Wiestler, O. D., Rushing, E. J., Hirose, T. and Santi, M.** (2016a) Subependymoma, in Louis, D. N. et al. (eds) *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edn. Lyon: IARC, pp. 102–103.
- Mendrzyk, F., Korshunov, A., Benner, A., Toedt, G., Pfister, S., Radlwimmer, B. and Lichter, P.** (2006) Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma, *Clinical Cancer Research*, 12(7 I), pp. 2070–2079.
- Metz, R. L., Patel, P. S., Hameed, M., Bryan, M. and Rameshwar, P.** (2007) Role of human HGFIN/nmbin breast cancer, *Breast Cancer Research*. BioMed Central, 9(5), p. R58.
- Milde, T., Hielscher, T., Witt, H., Kool, M., Mack, S. C., Deubzer, H. E., Oehme, I., Lodrini, M., Benner, A., Taylor, M. D., von Deimling, A., Kulozik, A. E., Pfister, S. M., Witt, O. and Korshunov, A.** (2012) Nestin Expression Identifies Ependymoma Patients with Poor Outcome, *Brain Pathology*, 22(6), pp. 848–860.
- Moore, L. D., Le, T. and Fan, G.** (2013) DNA Methylation and Its Basic Function, *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 38(1), pp. 23–38.
- Nambirajan, A., Sharma, M. C., Gupta, R. K., Suri, V., Singh, M. and Sarkar, C.** (2014) Study of stem cell marker nestin and its correlation with vascular endothelial growth factor and microvascular density in ependymomas, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(6), pp. 714–725.
- Nomiyama, H., Egami, K., Wada, N., Tou, K., Horiuchi, M., Matsusaki, H., Miura, R., Yoshie, O. and Kukita, T.** (2005) Short Communication: Identification of Genes Differentially Expressed in Osteoclast-like Cells, *Journal of Interferon & Cytokine Research*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, 25(4), pp. 227–231.

- Ohike, N., Sato, M., Hisayuki, T., Imataka, H., Sato, S., Wada, Y., Saito, K., Takahashi, M., Tajiri, T., Kunimura, T. and Morohoshi, T.** (2007) Immunohistochemical analysis of nestin and c-kit and their significance in pancreatic tumors, *Pathology International*, 57(9), pp. 589–593.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C. and Barnholtz-Sloan, J.** (2014) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011, *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 16(suppl 4), pp. iv1-iv63.
- Pajtler, K. W., Witt, H., Sill, M., Jones, D. T. W., Hovestadt, V., Kratochwil, F., Wani, K., Tatevossian, R., Punchihewa, C., Johann, P., Reimand, J., Warnatz, H. J., Ryzhova, M., Mack, S., Ramaswamy, V., Capper, D., Schweizer, L., Sieber, L., Wittmann, A., et al.** (2015) Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups, *Cancer Cell*, 27(5), pp. 728–743.
- Panwalkar, P., Clark, J., Ramaswamy, V., Hawes, D., Yang, F., Dunham, C., Yip, S., Hukin, J., Sun, Y., Schipper, M. J., Chavez, L., Margol, A., Pekmezci, M., Chung, C., Banda, A., Bayliss, J. M., Curry, S. J., Santi, M., Rodriguez, F. J., et al.** (2017) Immunohistochemical analysis of H3K27me3 demonstrates global reduction in group-A childhood posterior fossa ependymoma and is a powerful predictor of outcome, *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 134(5), pp. 705–714.
- Parker, M., Mohankumar, K. M., Punchihewa, C., Weinlich, R., Dalton, J. D., Li, Y., Lee, R., Tatevossian, R. G., Phoenix, T. N., Thiruvengatam, R., White, E., Tang, B., Orisme, W., Gupta, K., Rusch, M., Chen, X., Li, Y., Nagahawhatte, P., Finkelstein, D., et al.** (2014) C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-κB signaling in ependymoma, *Nature*, 506(7489), pp. 451–455.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P. M., Modrusan, Z., Feuerstein, B. G. and Aldape, K.** (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis, *Cancer Cell*, 9(3), pp. 157–173.
- Plotkin, S. R., O'Donnell, C. C., Curry Jr, W. T., Bove, C. M., MacCollin, M. and Nunes, F. P.** (2011) Spinal ependymomas in neurofibromatosis Type 2: a retrospective analysis of 55 patients, *Journal of Neurosurgery: Spine*. American Association of Neurological Surgeons, 14(4), pp. 543–547.
- Polak, J. M. and Priestley, J. V** (1992) Electron microscopic immunocytochemistry: principles and practice. Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo.
- Pongcharoen, P., Jinawath, A. and Tohtong, R.** (2011) Silencing of CD44 by siRNA suppressed invasion, migration and adhesion to matrix, but not secretion of MMPs, of cholangiocarcinoma cells, *Clinical & Experimental Metastasis*. Springer, 28(8), pp. 827–839.
- Poppleton, H. and Gilbertson, R. J.** (2007) Stem cells of ependymoma, *British Journal of Cancer*, 96(1), pp. 6–10.
- Purdy, E., Johnston, D. L., Bartels, U., Fryer, C., Carret, A.-S., Crooks, B., Eisenstat, D. D., Lafay-Cousin, L., Larouche, V., Wilson, B., Zelcer, S., Silva, M., Bouffet, E., Keene, D. and Strother, D. R.** (2014) Ependymoma in children under the age of 3 years: a report from the Canadian Pediatric Brain Tumour Consortium, *Journal of Neuro-Oncology*. Springer, 117(2), pp. 359–364.
- Pusch, A., Boeckenhoff, A., Glaser, T., Kaminski, T., Kirfel, G., Hans, M., Steinfarz, B., Swandulla, D., Kubitscheck, U., Gieselmann, V., Brüstle, O. and Kappler, J.** (2010) CD44 and hyaluronan promote invasive growth of B35 neuroblastoma cells

- into the brain, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1803(2), pp. 261–274.
- Qian, X., Mills, E., Torgov, M., LaRochelle, W. J. and Jeffers, M.** (2008) Pharmacologically enhanced expression of GPNMB increases the sensitivity of melanoma cells to the CR011-vcMMAE antibody-drug conjugate, *Molecular Oncology*. Wiley Online Library, 2(1), pp. 81–93.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L.** (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells, *Nature*. Nature Publishing Group, 414(6859), pp. 105–111.
- Ridley, L., Rahman, R., Brundler, M.-A., Ellison, D., Lowe, J., Robson, K., Prebble, E., Lockett, I., Gilbertson, R. J., Parkes, S., Rand, V., Coyle, B. and Grundy, R. G.** (2008) Multifactorial analysis of predictors of outcome in pediatric intracranial ependymoma, *Neuro-Oncology*, 10(5), pp. 675–689.
- Ripoll, V. M., Irvine, K. M., Ravasi, T., Sweet, M. J. and Hume, D. A.** (2007) Gpnmb is induced in macrophages by IFN- γ and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses, *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immunol, 178(10), pp. 6557–6566
- Rodriguez, F. J., Scheithauer, B. W., Perry, A., Oliveira, A. M., Jenkins, R. B., Oviedo, A., Mork, S. J., Palmer, C. A. and Burger, P. C.** (2008) Ependymal tumors with sarcomatous change ('ependymosarcoma'): a clinicopathologic and molecular cytogenetic study, *The American journal of surgical pathology*. LWW, 32(5), pp. 699–709.
- Rose, A. A. N., Grosset, A. A., Dong, Z., Russo, C., MacDonald, P. A., Bertos, N. R., St-Pierre, Y., Simantov, R., Hallett, M., Park, M., Gaboury, L. and Siegel, P. M.** (2010) Glycoprotein Nonmetastatic B Is an Independent Prognostic Indicator of Recurrence and a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer, *Clinical Cancer Research*. AACR, 16(7), pp. 2147–2156.
- Rose, A. A. N., Pepin, F., Russo, C., Khalil, J. E. A., Hallett, M. and Siegel, P. M.** (2007) Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone, *Molecular Cancer Research*. AACR, 5(10), pp. 1001–1014.
- Rose, A. A. and Siegel, P. M.** (2010) Emerging therapeutic targets in breast cancer bone metastasis, *Future Oncology*, 6(1), pp. 55–74.
- Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L.** (1978) Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 26(12), pp. 1074–1081.
- Sala, F., Talacchi, A., Mazza, C., Prisco, R., Ghimenton, C. and Bricolo, A.** (1998) Prognostic Factors in Childhood Intracranial Ependymomas: The Role of Age and Tumor Location, *Pediatric neurosurgery*. Karger Publishers, 28, pp. 135–142.
- Sarnat, H. B.** (1992) Regional differentiation of the human fetal ependyma: Immunocytochemical markers, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, pp. 58–75.
- Sarnat, H. B.** (1998) Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus, *Microscopy Research and Technique*, 41(1), pp. 14–28.
- Sayegh, E. T., Aranda, D., Kim, J. M., Oh, T., Parsa, A. T. and Oh, M. C.** (2014) Prognosis by tumor location in adults with intracranial ependymomas, *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(12), pp. 2096–2101.
- Schild, S. E., Nisi, K., Scheithauer, B. W., Wong, W. W., Lyons, M. K., Schomberg, P. J. and Shaw, E. G.** (1998) The results of radiotherapy for ependymomas: the mayo clinic experience, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. Elsevier, 42(5), pp. 953–958.

- Sheng, M. H.-C., Wergedal, J. E., Mohan, S. and Lau, K.-H. W.** (2008) Osteoactivin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and activity, *FEBS Letters*. Wiley Online Library, 582(10), pp. 1451–1458.
- Shu, C., Wang, Q., Yan, X. and Wang, J.** (2018) Prognostic and microRNA profile analysis for CD44 positive expression pediatric posterior fossa ependymoma, *Clinical and Translational Oncology*. Springer International Publishing, 20(11), pp. 1439–1447.
- Siegel, P., Rose, A., Annis, M. and Maric** (2013) Glycoprotein non-metastatic b (GPNMB): A metastatic mediator and emerging therapeutic target in cancer, *OncoTargets and Therapy*. Elsevier, 133, p. 839.
- Sowar, K., Straessle, J., Donson, A. M., Handler, M. and Foreman, N. K.** (2006) Predicting which children are at risk for ependymoma relapse, *Journal of neuro-oncology*. Springer, 78(1), pp. 41–46.
- Spassky, N., Merkle, F., Flames, N., Tramontin, A., García-Verdugo, J. and Alvarez-Buylla, A.** (2005) Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis, *Journal of Neuroscience*, 25(1), pp. 10–18.
- Stamenkovic, I. and Yu, Q.** (2009) Shedding Light on Proteolytic Cleavage of CD44: The Responsible Sheddase and Functional Significance of Shedding, *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 129(6), pp. 1321–1324.
- Strojnik, T., Røsland, G. V., Sakariassen, P. O., Kavalar, R. and Lah, T.** (2007) Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival, *Surgical Neurology*, 68(2), pp. 133–143.
- Sturm, D., Orr, B. A., Toprak, U. H., Hovestadt, V., Jones, D. T. W., Capper, D., Sill, M., Buchhalter, I., Northcott, P. A., Leis, I., Ryzhova, M., Koelsche, C., Pfaff, E., Allen, S. J., Balasubramanian, G., Worst, B. C., Pajtler, K. W., Brabetz, S., Johann, P. D., *et al.* (2016) New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs, *Cell*, 164(5), pp. 1060–1072.**
- Taylor, M. D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., Magdaleno, S., Dalton, J., Calabrese, C., Board, J., MacDonald, T., Rutka, J., Guha, A., Gajjar, A., Curran, T. and Gilbertson, R. J.** (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma, *Cancer Cell*, 8(4), pp. 323–335.
- Thomas, S. K., Messam, C. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. and Ross, R. A.** (2004) Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells, *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 279(27), pp. 27994–27999.
- Tihan, T., Zhou, T., Holmes, E., Burger, P. C., Ozuysal, S. and Rushing, E. J.** (2008) The prognostic value of histological grading of posterior fossa ependymomas in children: A Children’s Oncology Group study and a review of prognostic factors, *Modern Pathology*, 21(2), pp. 165–177.
- Timmermann, B.** (2018) Ependymome im Kindes- und Jugendalter, S1-Leitlinie 025/025, *AWMF online*. Available at: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-0251_S1_Ependymome-Kinder-Jugendliche_2018-04.pdf (Accessed: 15 November 2018).
- Tomihari, M., Hwang, S.-H., Chung, J.-S., Cruz Jr, P. D. and Ariizumi, K.** (2009) Gpnmb is a melanosome-associated glycoprotein that contributes to melanocyte/keratinocyte adhesion in a RGD-dependent fashion, *Experimental dermatology*. Wiley Online Library, 18(7), pp. 586–595.
- Tomita, T., McLone, D. G., Das, L. and Brand, W. N.** (1988) Benign ependymomas of the posterior fossa in childhood, *Pediatric Neurosurgery*. Karger Publishers, 14(6), pp. 277–285.

- Tse, K. F., Jeffers, M., Pollack, V. A., McCabe, D. A., Shadish, M. L., Khramtsov, N. V., Hackett, C. S., Shenoy, S. G., Kuang, B., Boldog, F. L., MacDougall, J., Rastelli, L., Herrmann, J., Gallo, M., Gazit-Bornstein, G., Senter, P., Meyer, D., Lichenstein, H. and LaRoche, W.** (2006) CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma., *Clinical cancer research*. AACR, 12(4), pp. 1373–1382.
- Tsou, J. A., Hagen, J. A., Carpenter, C. L. and Laird-Offringa, I. A.** (2002) DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis, *Oncogene*, 21(35), pp. 5450–5461.
- van Veelen-Vincent, M.-L. C., Pierre-Kahn, A., Kalifa, C., Sainte-Rose, C., Zerah, M., Thorne, J. and Renier, D.** (2002) Ependymoma in childhood: prognostic factors, extent of surgery, and adjuvant therapy, *Journal of neurosurgery*. Journal of Neurosurgery Publishing Group, 97(4), pp. 827–835.
- Verma, A., Zhou, H., Chin, S., Bruggers, C., Kestle, J. and Khatua, S.** (2012) EGFR as a predictor of relapse in myxopapillary ependymoma, *Pediatric blood & cancer*. Wiley Online Library, 59(4), pp. 746–748.
- Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T. and Relichova, J.** (2006) Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme, *BMC Cancer*. BioMed Central, 6(1), p. 32.
- Virág, J., Haberler, C., Baksa, G., Piurkó, V., Hegedüs, Z., Reiniger, L., Bálint, K., Chocholous, M., Kiss, A., Lotz, G., Glasz, T., Schaff, Z., Garami, M. and Hegedüs, B.** (2017) Region Specific Differences of Claudin-5 Expression in Pediatric Intracranial Ependymomas: Potential Prognostic Role in Supratentorial Cases, *Pathology and Oncology Research*, 23(2), pp. 245–252.
- Wani, K., Armstrong, T. S., Vera-Bolanos, E., Raghunathan, A., Ellison, D., Gilbertson, R., Vaillant, B., Goldman, S., Packer, R. J., Fouladi, M., Pollack, I., Mikkelsen, T., Prados, M., Omuro, A., Soffiatti, R., Ledoux, A., Wilson, C., Long, L., Gilbert, M., *et al.*** (2012) A prognostic gene expression signature in infratentorial ependymoma, *Acta neuropathologica*. Springer, 123(5), pp. 727–738.
- Wei, K.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Feng, L.-Y., Wu, T.-W. E., Chen, S.-M., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Tsang, N.-M., Tseng, C.-K., Pai, P. and Shin, J.** (2010) Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme, *Anticancer research*. International Institute of Anticancer Research, 30(1), pp. 253–259.
- Welsch, U.** (2006) Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Auflage. München, Jena: Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Weterman, M. A. J., Ajubi, N., van Dinter, I. M. R., Degen, W. G. J., van Muijen, G. N. P., Ruiter, D. J. and Bloemers, H. P. J.** (1995) nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts, *International journal of cancer*. Wiley Online Library, 60(1), pp. 73–81.
- Witt, H., Mack, S. C., Ryzhova, M., Bender, S., Sill, M., Isserlin, R., Benner, A., Hielscher, T., Milde, T., Remke, M., Jones, D. T. W., Northcott, P. A., Garzia, L., Bertrand, K. C., Wittmann, A., Yao, Y., Roberts, S. S., Massimi, L., Van Meter, T., *et al.*** (2011) Delineation of Two Clinically and Molecularly Distinct Subgroups of Posterior Fossa Ependymoma, *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 20(2), pp. 143–157.
- Yang, X. H., Wu, Q. L., Yu, X. B., Xu, C. X., Ma, B. F., Zhang, X. M., Li, S. N., Lahn, B. T. and Xiang, A. P.** (2008) Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade, *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group, 61(4), pp. 467–473.
- Ylagan, L. R. and Quinn, B.** (1997) CD44 expression in astrocytic tumors., *Modern Pathology*, 10(12), pp. 1239–1246.

- Yoshida, T., Matsuda, Y., Naito, Z. and Ishiwata, T.** (2012) CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration, *Pathology international*. Wiley Online Library, 62(7), pp. 463–470.
- Zakrzewska, M., Fendler, W., Zakrzewski, K., Sikorska, B., Grajkowska, W., Dembowska-Bagińska, B., Filipek, I., Stefańczyk, Ł. and Liberski, P. P.** (2016) Altered microRNA expression is associated with tumor grade, molecular background and outcome in childhood infratentorial ependymoma, *PLoS ONE*, 11(7), pp. 1–15.
- Zamecnik, J., Snuderl, M., Eckschlager, T., Chanova, M., Hladikova, M., Tichy, M. and Kodet, R.** (2003) Pediatric Intracranial Ependymomas: Prognostic Relevance of Histological, Immunohistochemical, and Flow Cytometric Factors, *Modern Pathology*, 16(10), pp. 980–991.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. and Herold-Mende, C. C.** (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients, *Clinical Cancer Research*. AACR, 14(1), pp. 123–129.
- Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z. and Fang, J.** (2008) Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. BioMed Central, 27(1), p. 85.

11 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Dr. Hagel, der mir mit viel Geduld und Muße immer mit Rat und Tat beiseite stand und stets Zeit für konstruktive und inspirierende Gespräche fand. Ich danke Herrn Professor Dr. Glatzel für die Überlassung des interessanten Themas, Frau Dr. Schweizer für die Einführung in die Methodik der Immunelektronenmikroskopie sowie Frau Junker-Polzin für die ausgezeichnete Unterstützung im Labor.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Schwiegermutter für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur der Dissertationsschrift sowie meiner ganzen Familie für den wundervollen Rückhalt, die verlässliche und liebevolle Hilfe bei der Kinderbetreuung und auch die Unterstützung während des Studiums.

12 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

13 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 einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

15 Anhang

Tabelle 14: Daten des Patientenkollektivs

Fallnummer	Alter der Patienten in Jahren	Geschlecht ¹	Lokalisation der Ependymome ²	WHO-Grad ³
1	15	1	2	II
2	18	2	2	II
3	18	1	1	II
4	13	2	2	II
5	16	2	2	III
6	2	1	2	III
7	3	1	2	II
8	18	2	2	II
9	10	2	2	II
10	4	1	2	III
11	1	2	2	III
12	8	1	2	III
13	3	1	2	II
14	3	2	2	II
15	0	2	2	III
16	2	2	2	II
17	7	2	2	III
18	2	1	2	III
19	3	2	2	III
20	5	1	1	II
21	15	2	1	I
22	2	2	1	III
23	8	1	1	II
24	4	2	1	III

¹1 = weiblich, 2 = männlich

²1 = supratentoriell, 2 = infratentoriell

³Gradeinteilung nach WHO-Klassifikation in Grad I bis III

Tabelle 15: Auswertung Nestin-Färbung

Fallnummer	Nestin Färbestärke ¹	Nestin pos/neg ²	Alter der Patienten in Jahren	Geschlecht ³	Lokalisation der Ependymome ⁴	WHO-Grad ⁵
1	1	0	15	1	2	II
2	0	0	18	2	2	II
3	3	1	18	1	1	II
4	1	0	13	2	2	II
5	2	1	16	2	2	III
6	2	1	2	1	2	III
7	3	1	3	1	2	II
8	3	1	18	2	2	II
9	2	1	10	2	2	II
10	2	1	4	1	2	III
11	1	0	1	2	2	III
12	0	0	8	1	2	III
13	2	1	3	1	2	II
14	1	0	3	2	2	II
15	2	1	0	2	2	III
16	3	1	2	2	2	II
17	2	1	7	2	2	III
18	1	0	2	1	2	III
19	2	1	3	2	2	III
20	0	0	5	1	1	II
21	2	1	15	2	1	I
22	2	1	2	2	1	III
23	3	1	8	1	1	II
24	1	0	4	2	1	III

¹ 0 = keine Färbung, 1 = geringe Färbung, 2 = mittlere Färbung, 3 = starke Färbung

² 1 = Färbung positiv, 2 = Färbung negativ

³ 1 = weiblich, 2 = männlich

⁴ 1 = supratentoriell, 2 = infratentoriell

⁵ Gradeinteilung nach WHO-Klassifikation in Grad I bis III

15.1 DAB-Pre-embedding an Vibratomschnitten

3 x 5 min	waschen in PBS
Alkoholpermeabilisierung	
3 x 5 min	waschen in PBS
10 min	EtOH 10%
10 min	EtOH 20%
10 min	EtOH 40%
10 min	EtOH 20%
10 min	EtOH 10%
3 x 5 min	waschen in PBS
10 min	0,5% Na-borhydrid
3 x 5 min	waschen in PBS
30 min	0,3% H ₂ O ₂ auf dem Schüttler
3 x 5 min	waschen in PBS
30 - 60 min	Blocken („Block ohne Triton“, ZMNH)
Über Nacht	1. Antikörper in Carrier („Carrier ohne Triton“, ZMNH)
3 x 5 min	waschen in PBS
90 - 120 min	biotinylierter 2. Antikörper
3 x 5 min	waschen in PBS
90 - 120 min	ABC-Kit aus Avidin und Biotin
3 x 5 min	waschen in PBS
3 x 5 min	waschen in Tris-Puffer 50mM
10 min	DAB-Lösung
3 x 5 min	waschen in PBS
Zur Kontrolle der Färbung, Schnitt auf Objektträger aufziehen und an der Luft trocknen lassen. Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe und den Schnitt mit Eukitt eindecken.	
Osmierung der restlichen Schnitte	
3 x 5 min	waschen in Cacodylat-Lösung um PBS zu entfernen
20 min	auf Eis osmieren
30 min	waschen in Cacodylat-Lösung, dabei die Lösung 7 bis 10 x wechseln
Einbettung	
5 min	waschen in Cacodylat-Lösung
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe	
90 min	Propylenoxid
90 min	Epon/Propylenoxid 1:1
120 min	Epon/Propylenoxid 2:1
Über Nacht	reines Epon

Epon noch einmal auswechseln, dann die Schnitte in einem Tropfen Epon auf eine feste Folie geben und eine zweite Folie darauflegen. Die Schnitte in den Folien zwischen zwei mit Alufolie umhüllten Plexiglasscheiben im Brutschrank bei 70°C auspolymerisieren. Anschließend die Folien von den Schnitten entfernen, die gewünschten Bereiche der Schnitte mit einer Rasierklinge ausschneiden und mit Zweikomponentenkleber auf einen vorpolymerisierten Eponblock kleben. Nach dem Trocknen des Klebers Semi- bzw. Ultradünnschnitte anfertigen.

15.2 DAB-Post-embedding-Protokoll

Vorbehandlung bei Epoxid-Harz:

0,5 -1 min	Ätzen auf Natriumhydroxid-Lösung
4 x 5 min	waschen in EtOH absolut
5 min	waschen in Aqua dest.
	DAB-Staining bei Epoxid- und Lowicryl HM20-Harz
5 min	PBS
15 min	0,05 M Glycine in PBS (inaktiviert die freien Aldehydgruppen)
3 x 5 min	waschen in PBS
10 min	0,5 % Na-borhydrid in PBS
3 x 5 min	waschen in PBS
30 min	0,3 % H ₂ O ₂ in PBS
3 x 5 min	waschen in PBS
60 min	1. Antikörper
6 x 5 min	waschen in PBS
120 min	2. Antikörper
3 x 5 min	waschen in PBS
15 min	DAB-Reaktionslösung
3 x 5 min	waschen in PBS
	kontrastieren
