

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker

Immunhistologische Untersuchung von Prognose- und
Differenzierungsfaktoren bei Chondrosarkomen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen- Wilhelmsuniversität zu Münster

vorgelegt von
Hattrup, Beate
aus Warendorf
2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Bürger
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Jendrik Harges

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker
Referent: Prof. Dr. med. Horst Bürger
Koreferent: PD Dr. med. Jendrik Harges

Zusammenfassung

Immunhistologische Untersuchung von Prognose- und Differenzierungsfaktoren bei Chondrosarkomen

Hattrup, Beate

Das Chondrosarkom ist ein seltener Knochentumor. Die bis jetzt einzigste kurative Therapie besteht in der radikalen chirurgischen Intervention. Strahlentherapie und Chemotherapie sind nur mäßig bis gar nicht wirksam. Das Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universitätsklinikums Münster besitzt ein in Europa größtes Knochengeschwulstregister, wo die Knochentumoren der letzten Jahrzehnte gelagert werden.

Neue Therapiestrategien, die auf molekularpathologischen Gegebenheiten des Tumors gründen, sollen neue Optionen in der Therapie des Chondrosarkoms aufzeigen. Unter der Erkenntnis der verschiedenen regulierten Gene für Signalwege, Rezeptorkomplexe und Apoptosewege, wo jeweils viele verschiedene Tumorsuppressorgene, Onkogene oder Wachstumsfaktoren eingreifen können, stellt eine neue Option dar. Diese immunhistochemischen Marker, sind Bestandteil dieser Wege, oder greifen in diesen Prozess ein. Aufgrund der Möglichkeit der immunhistochemischen Anfärbung der verschiedenen Marker in entsprechenden Präparaten besteht die Möglichkeit Expressionsmuster der malignen Läsionen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, um somit Rückschlüsse auf die Ätiologie zu gewinnen.

In dieser Arbeit sind Chondrosarkome von 239 Patienten aus den Jahren 1988 bis 2005 immunhistochemisch untersucht worden.

Die zu anfangs generelle Auswertung der Patienten in Hinsicht auf die Geschlechterverteilung und die Lokalisation des Tumors spiegeln die bisher bekannten Literaturdaten wider.

Die anschließend lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch aufbereiteten Schnitte war teilweise limitiert, da viele Gewebeschnitte aufgrund ihrer Knochen-/Knorpelsubstanz nicht ausgewertet werden konnte.

Die folgende biomathematische Auswertung erbrachte leider in allen durchgeführten Konstellationen entweder keine Signifikanz oder eine zu geringe Fallzahl.

Dementsprechend konnten Überlegungen, dass bestimmte Marker in den Entwicklungsprozess der Chondrosarkome eingreifen, bzw spezifisch dafür sind, nicht ausreichend belegt werden. Lediglich das dedifferenzierte Chondrosarkom bietet interessante Ansätze, und zeigte häufig eine pos. Anfärbung bei bestimmten Markern, bei einer zu geringen Fallzahl aber leider keine Signifikanz. Somit ist das histopathologische Grading immer noch entscheidend zur Einstufung des Chondrosarkoms, und zusammen mit der Operabilität, der einzigste Prognosefaktor in Hinblick auf die Überlebensrate.

Auch in klinischer Hinsicht konnte eine Aussage in der Unterscheidung der unterschiedlichen Chondrosarkomen in Bezug auf Wachstumsverhalten und Rezidivrate wegen einer zu geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie von Knochentumoren.....	1
1.2. Ätiologie, Klassifikation und klinisches Bild.....	3
1.3. benigne Knochentumoren.....	3
1.3.1. Osteochondrom.....	3
1.3.2. Chondrom.....	4
1.3.3. Riesenzelltumor.....	5
1.4. maligne Knochentumoren.....	5
1.4.1. Osteosarkom.....	5
1.4.2. Ewing-Sarkom.....	6
1.4.3. Chondrosarkom.....	6
1.4.3.1. periosteales (juxtakortikales) Chondrosarkom.....	11
1.4.3.2. mesenchymales Chondrosarkom.....	11
1.4.3.3. dedifferenziertes Chondrosarkom.....	12
1.4.3.4. Klarzellchondrosarkom.....	12
1.4.3.5. sekundäre Chondrosarkome.....	13
1.4.3.6. Stellenwert der Biopsie.....	13
1.4.3.7. Operative Therapie von Chondrosarkomen.....	15
1.4.3.8. Chemotherapie von Chondrosarkomen.....	15
1.4.3.9. Strahlentherapie von Chondrosarkomen.....	15
1.4.3.10. Therapeutischer Ausblick.....	16
1.5. Immunhistochemische Maker.....	16
1.5.1. Tumorsuppressorgene.....	16
1.5.1.1. Tumorsuppressorgen 53.....	16
1.5.1.2. Tumorsuppressorgen p63.....	18
1.5.1.3. Tumorsuppressorgen p16.....	19
1.5.2. Onkogene.....	19
1.5.2.1. Onkogen Mdm2.....	19
1.5.2.2. Onkogen erb B2.....	20
1.5.2.3. Onkogen Cyclin D1.....	21
1.5.3. Wachstumsfaktor GFR.....	22
1.5.4. Tyrosinkinase c-kit.....	22
1.5.5. Mib-1.....	23
1.5.6. CD34.....	23
1.5.7. bcl-2.....	24
2. Fragestellung.....	25

3. Material und Methode.....	26
3.1. Material.....	26
3.2. Prinzip Tissue Microarray.....	26
3.2.1. Herstellung der Tissue Arrays aus Chondrosarkomen.....	28
3.3. Immunhistochemie.....	29
3.3.1. Antigendemaskierung.....	29
3.3.2. LSAB-Methode.....	30
3.3.3. Rezepturen der verwendeten Lösungen.....	32
3.3.3.1. 10mM Citratlösung.....	32
3.3.3.2. Waschpuffer	32
3.3.3.3. Biotin-Antikörper.....	32
3.3.3.4. Streptavidin-Lösung	33
3.3.3.5. Chromogen-Lösung	32
3.4. Lichtmikroskopische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1. Antikörper- Expression	34
4.1.1. Expression des Tumorsuppressorgens p53	34
4.1.2. Expressin des Tumorsuppressorgens p63	34
4.1.3. Expressio des Tumorsuppressorgens p16	34
4.1.4. Expression des Onkogens Mdm2	35
4.1.5. Expression des Onkogens erb B2	35
4.1.6. Expression des Onkogens Cyclin D1	35
4.1.7. Expression des Wachstumsfaktor EGFR	35
4.1.8. Expression der Tyrosinkinase c-kit	35
4.1.9. Expression von mib-1	35
4.1.10. Expression des Antigens CD34	35
4.1.11. Expression von bcl-2	36
4.1.12. Auflistung der Antikörper-Expression in Prozentwerten	36
4.2. Skelettlokalisation des Chondrosarkoms	37
4.3. Aufteilung in das männliche und weibliche Geschlecht.....	38
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung.....	42
7. Literaturverzeichnis.....	44
8. Abbildungsverzeichnis.....	51
9. Tabellenverzeichnis.....	52

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Knochtumoren sind insgesamt seltene Tumoren. Statische Analysen zeigen eine jährliche Inzidenz von knapp 10 Fällen primärer bösartiger Knochtumoren pro 1 Million Einwohner. Ihr Anteil an der Häufigkeit aller Neoplasien beträgt nur 0,2% wobei die benignen Läsionen weitaus häufiger sind (Dorfmann et al. 2003).

Bei den benignen Tumoren ist das Chondrom mit 31% die häufigste Läsion, gefolgt vom Osteochondrom mit 20% und dem nicht ossifizierenden Fibrom mit 10%. Alle anderen sind relativ selten. Diese Daten stammen aus dem Knochengeschwulstregister des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster. Im Vergleich zu anderen Knochtumorregistern finden sich nur kleine Unterschiede.

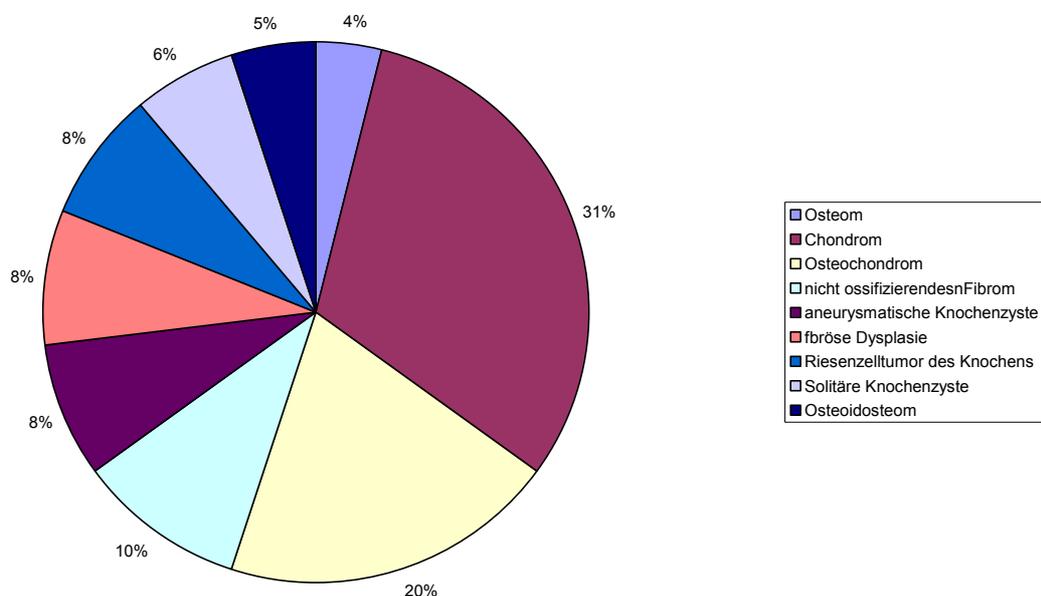


Diagramm 1: Verteilung der häufigsten gutartigen Tumoren aus dem Knochengeschwulstregister des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Münster (n= 7944)

Bei den malignen Tumoren ist das Osteosarkom mit 29% der weitaus häufigste Tumor, gefolgt vom Chondrosarkom (22%), dem Ewing-Sarkom (20%), Geschwülsten ohne nähere Angabe (20%), sonstige Tumoren (6%) und dem Chordom mit 3% (Winkelmann et al. 19-1). Hinsichtlich der Repräsentativität der Häufigkeitsverteilung dieses Zahlenmaterials ist kritisch zu betrachten, da es sich um ein histologisches Register aus einem sehr spezialisierten Zentrum handelt. Das Zentrum hat ein Krankengut, welche die Enantitäten nicht repräsentativ der Allgemeinbevölkerung wiedergeben. Aus diesen Zahlen können deshalb keine direkten Rückschlüsse auf die Prävalenz der Tumorentitäten in der Allgemeinbevölkerung gezogen werden (Dahlin et al.). Traditionell sind die gutartigen Knochentumoren in solchen Zentren im Verhältnis zu ihrer tatsächlichen Prävalenz deutlich unterrepräsentiert.

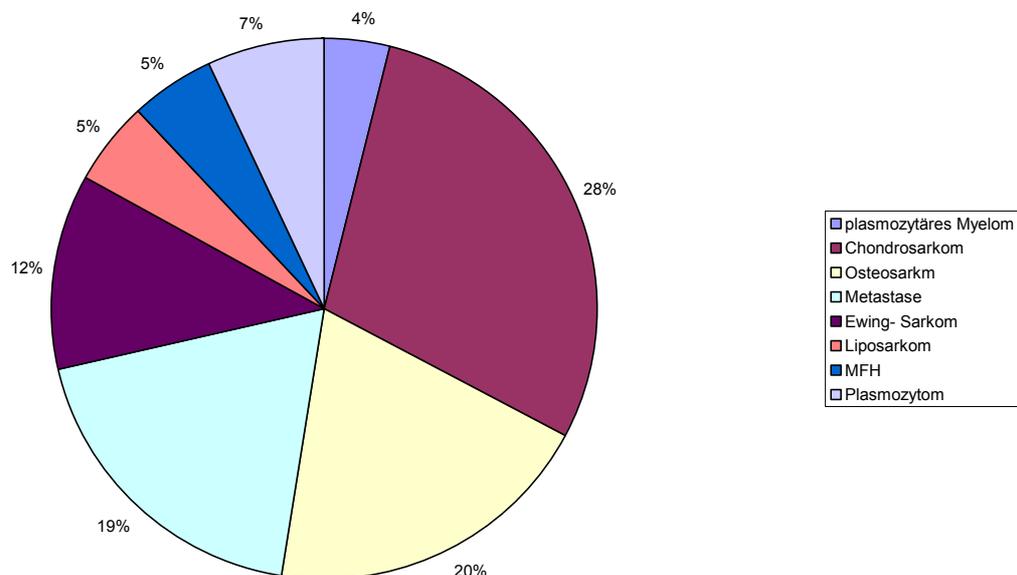


Diagramm 2: Verteilung der häufigsten bösartigen Tumoren aus dem Knochengeschwulstregister des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Münster (n= 4861)

1.2 Ätiologie, Klassifikation und klinisches Bild

Die Ursache der primären Knochentumoren ist bis jetzt ungeklärt. Die sekundären Knochentumoren können auf dem Boden gutartiger Läsionen maligne entarten, bestimmte Umweltfaktoren, ionisierende Strahlung, immunologische und genetische Faktoren können eine weitere Rolle spielen.

Die Basis für die Klassifikation von Tumoren ist histologisch bzw. histogenetisch. Tumoren werden anhand des Zelltyps unterschieden, aus dem sie bestehen und aus dem sie hervorgegangen sind. Bei Knochentumoren beruht die Klassifikation auf den Ergebnissen von Schajowicz u. Mitarb. (1972) und Campanacci (1999), deren Ergebnisse in die WHO-Klassifikation eingegangen sind. Trotzdem besteht noch immer eine gewisse Unsicherheit in der Klassifikation. Deswegen nimmt besonders in den letzten Jahren die Bedeutung immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen zu.

Das klinische Bild der Knochentumoren ist relativ unspezifisch. Deshalb vergeht oft ein längerer Zeitraum, bis zur richtigen Diagnosestellung. Da diese Tumoren relativ selten sind, sollte die Therapie in spezifisch dafür vorgesehenen Zentren stattfinden. Kardinalsymptome sind meistens Schmerzen und Schwellung im betroffenen Körperteil. Weiterhin können allgemeines Unwohlsein, eingeschränkte Beweglichkeit, sowie pathologische Frakturen Anhalt für einen Knochentumor sein. Eine B-Symptomatik wie sie typisch wäre für einen malignen Tumor, mit Fieber, Gewichtsverlust und nächtlichen Schwitzen fehlen fast immer.

Die meisten Knochentumoren besitzen eine Präferenz für bestimmte Lokalisationen und Alter des Patienten, die noch weiter unten speziell diskutiert werden (Winkelmann et al.19-1).

1.3 Benigne Knochentumoren

1.3.1 Osteochondrom

Das Osteochondrom ist der häufigste Knochentumor mit einer Inzidenz von ca. 40% aller benignen Knochentumoren. Klar ist, dass die Zahl zu gering eingeschätzt wird, da viele Osteochondrome klinisch stumm bleiben. Die meisten Patienten befinden sich in den ersten drei Lebensdekaden. Fast 15% der Patienten haben multiple Läsionen. Köhler und Mitarbeiter haben keine Bevorzugung von einem Geschlecht herausgefunden (Köhler 79-74). Bevorzugte Lokalisationen sind die langen metaphysären Röhrenknochen, also Knochen, mit einem starken Wachstum, wie der

distale Femur, der proximale Humerus und die distale Tibia und die Fibula. Flache Knochen sind nur in ca. 5% der Fälle betroffen.

Klinische Symptome können sich durch Schmerzen im betroffenen Knochen bemerkbar machen oder auch durch sekundäre Komplikationen wie einen eingeklemmten Nerven, eine heterotope Bursabildung und eine mechanische Obstruktion. Nach Verschluss der Wachstumsfugen nimmt der Tumor nicht mehr an Größe zu. Radiologisch erkennt man das Osteochondrom als eine knorpelige Kappe über den ausgezogenen Knochen, sozusagen ein pilzförmiges Wachstum (Khurana et al. 236-234). Spongiosa und Kortikalis werden dabei nie zerstört, nur die Kortikalis kann in manchen Fällen etwas ausgedünnt sein. In der Mikroskopie findet sich eine bedeckende dünne fibröse Periostschicht. Angrenzend stellt sich eine enchondrale Ossifikationszone und Spongiosa dar. In seltenen Fällen kann auf dem Boden eines Osteochondroms ein sekundäres Chondrosarkom entstehen. Bei einer fraglichen Malignität gibt eine vermehrte Speicherung bei der Szintigraphie weiteren Aufschluss. Zu einer Entfernung des Tumors würde man nur raten, wenn er funktionelle Probleme oder Schmerzen auslösen würde, ansonsten reicht eine regelmäßige Kontrolle.

1.3.2 Chondrom (syn.: Enchondrom)

Auch Chondrome sind relativ häufige benigne Knochentumoren, mit ca. 19% aller benignen Knochentumoren. Sie bestehen aus reifem Knorpelgewebe. Nach ihrer Lage unterscheidet man die im Markraum gelegenen Enchondrome von den juxtakortikalen Chondromen sowie eine dritte Form, als Enchondroma protruberans bezeichnet, das vom Markraum aus die Kortikalis abbaut und zur Ausbildung einer dünnen Knochenschale führt (Lucas et al. 240-237) Eine Geschlechtsprävalenz konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Es wurden Patienten im Alter von 5-80 Jahren gefunden, wobei die häufigsten Patienten in der 4. oder 5. Lebensjahrzent sind. Sehr viele Chondrome befinden sich in den Füßen und Händen, wobei das Chondrom der häufigste Handtumor ist. In den Händen befallen sie meist die kurzen Röhrenknochen der Hände und Füße. Weitere Lokalisationen sind der prox. Humerus, Rippen und prox. Tibia. Innerhalb der Röhrenknochen liegen sie meist metaphysär, seltener epiphysär. Wenn der Tumor die Hände befällt, fällt er meist durch eine palpable Schwellung auf, oder Schmerzen. An den anderen Lokalisationen fällt er häufig gar nicht auf oder sehr selten durch pathologische

Frakturen. Meist haben die Tumoren eine scharfe Randabgrenzung und werden nicht größer als fünf Zentimeter. Manchmal besteht jedoch eine Abgrenzung zum hochdifferenzierten Chondrosarkom (Köhler 79-74).

1.3.3 Riesenzelltumor (syn.: Osteoklastom)

Die Dignität des Riesenzelltumors ist nicht geklärt. Er wächst lokal aggressiv und ist in Ausnahmefällen auch zu hämatologischen Metastasen im Stande. Er macht ca. ein Fünftel aller benignen Knochentumoren aus, wobei das weibliche Geschlecht leicht bevorzugt wird. Die meisten Patienten befinden sich in einem Alter zwischen 20 und 25 Jahren. Üblicherweise werden die Diaphysen aller Röhrenknochen wie der Femur, die proximale Tibia und der distale Radius sowie der proximale Humerus betroffen. In ca. 5% Prozent aller Fälle sind auch flache Knochen wie z.B. das Becken betroffen. In der Makroskopie ist zu erkennen, dass Tumorformationen bis an den artikulären Knorpel heranreichen, ihn aber nicht penetrieren. In der Mikroskopie sind die großen osteoklastischen Riesenzellen nicht als neoplastische Zellen zu interpretieren, vielmehr entspricht die mononukleäre Zellpopulation der neoplastischen Komponente. Es besteht in ca. 10 % der Fälle eine Assoziation zu einer aneurysmatischen Knochenzyste. Sie liegt als sekundäre Veränderung vor (Köhler 2005).

1.4. Maligne Knochentumoren

1.4.1 Osteosarkom

Das Osteosarkom ist der häufigste bösartige Tumor unter den Knochentumoren mit einer Inzidenz von ca. 200-300 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Er zeigt ein intramedulläres Wachstum mit Osteoidbildung. Unter den Osteosarkomen kann man zwischen dem konventionellen, teleangiektatischen, kleinzelligen und niedrigmalignen Osteosarkomen unterscheiden. Eine Besonderheit des Tumors ist es, dass er am häufigsten in der zweiten Lebensdekade auftritt. Im Gegensatz zu Erwachsenen, wo das Osteosarkom sehr selten ist, zählt das Osteosarkom bei Kindern zu den häufigeren Tumoren. Jungen sind etwas häufiger als Mädchen betroffen. Auch die Ätiologie ist weitgehend unbekannt. Bevorzugte Lokalisationen sind die metaphysären Abschnitte der langen Röhrenknochen, wobei der distale Femur die mit Abstand häufigste Lokalisation darstellt. Die Klinik ist am Anfang wenig

richtungweisend, später zeigt sich Schwellung und Bewegungsschmerz. Das Osteosarkom metastasiert häufig, meistens in die Lunge. Im Röntgenbild lässt sich der Tumor darstellen und häufig auch reaktive Veränderungen wie Periostabhebung, Zwiebelschalen und Codman-Sporn (Raymond et al. 271-264).

1.4.2. Ewing- Sarkom

Auch das Ewing- Sarkom ist ein Tumor der meist nur bei Kindern vorkommt, er ist jedoch nicht so häufig wie das Osteosarkom (ca. 8% aller primären Knochentumoren). Die Kinder sind etwas jünger als beim Osteosarkom. Der Median liegt ca. bei 10 Jahren. Jungen sind auch hier etwas häufiger betroffen. Die Klinik lässt häufig erst an eine Osteomyelitis denken: Schmerzen, Bewegungseinschränkung, Fieber und Leukozytose. Typisch für den Tumor sind im Röntgenbild zwiebelschalenartige Abhebungen zu sehen. In der Molekulargenetik lassen sich in mehr als 85% der Fälle spezifische Translokationen nachweisen. Bevorzugte Lokalisationen sind die Diaphysen langer Röhrenknochen, das Becken und die Rippen. In 25% der Fälle hat der Tumor schon bei Diagnosestellung in das Skelett oder die Lungen metastasiert (Kalil et al.274-273).

1.4.3. Chondrosarkom

Das Chondrosarkom macht ca. 20% aller Knochentumoren aus, ist also der dritthäufigste Tumor, wobei es sich bei den meisten um primäre Chondrosarkome handelt, mit Ursprung im Markraum. Subperiostale oder extraossäre Chondrosarkome sind Raritäten. Definitionsgemäß ist ein Chondrosarkom ein maligner Tumor, des aus mesenchymalem Gewebe hervorgeht und dabei zum einen Chondroblasten oder Chondrozyten enthält (gleich welchen Differenzierungsgrades) und zum anderen ausschließlich chondroide Matrix bildet. Das Chondrosarkom ist ein Tumor mit einem breiten Spektrum von klinischen, radiologischen und histologischen Manifestationsmöglichkeiten und Varianten. Die durchschnittliche Fünfjahresüberlebensrate von 72,7% (Dorfmann u. Czerniak et al. 203) darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Bandbreite der Chondrosarkome von einem lokal aggressiven und nicht metastasierenden Tumor (Grad I) bis zu einem meist tödlich verlaufenden sog. dedifferenzierenden Chondrosarkom (Grad IV) erstreckt

(Freyschmidt et al. 359). Die sekundären Chondrosarkome beruhen auf prädisponierenden Grunderkrankungen wie dem Maffucci- oder Ollier-Syndrom, Enchondromen und Osteochondromen. Das Chondrosarkom ist ein Tumor des Erwachsenenalters, erkrankte Kinder stellen eine Rarität dar, und sind dann häufig sekundäre Chondrosarkome. Am häufigsten erkranken Erwachsene in der fünften, sechsten oder siebten Lebensdekade (Bürger 124-74). Männer erkranken etwas häufiger als Frauen. Die häufigsten Lokalisationen stellen das Becken, der proximale Femur, die proximale Tibia und der proximale Humerus. Die distalen Extremitäten wie Hände und Füße, sowie Wirbelsäule und Gesichtsknochen sind extrem selten betroffen. Die meisten Tumoren entsprechen dem Malignitätsgrad I (Bertoni et al. 251-247).

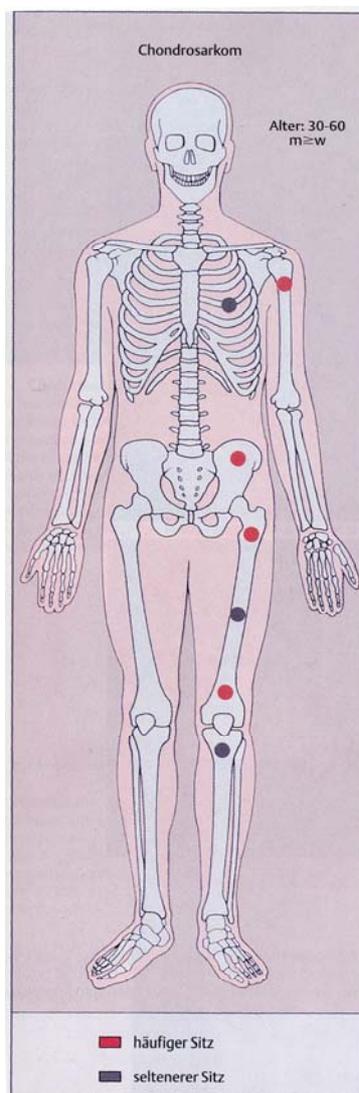


Abbildung 1: Konventionelles Chondrosarkom: bevorzugte Skelettorte, Alters- und Geschlechterverteilung (aus: Knochentumoren von Adam Greenspan und Wolfgang Remagen)

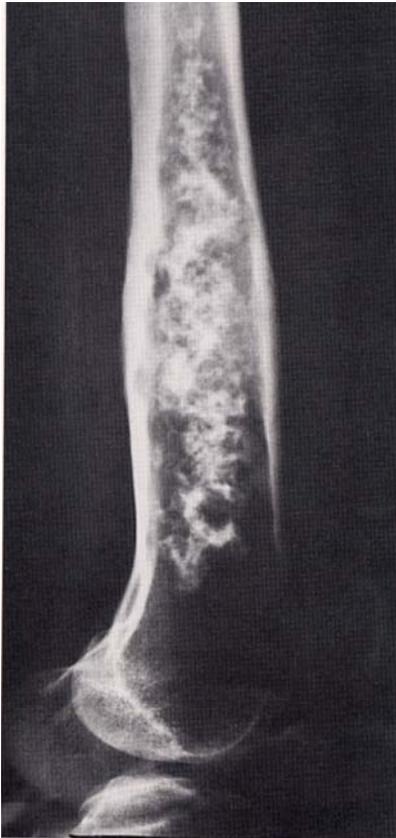
Von besonderer Bedeutung ist beim Chondrosarkom der Zusammenhang zwischen dem individuellen Zellbild und dem klinischen Verhalten des Tumors. Klinisch hochmaligne Tumoren zeigen eine auffallend starke Kernpleomorphie und einen verschiedenen Gehalt an Mitosen oder Areale, die nur aus undifferenziertem sarkomatösen Gewebe bestehen (Grad III und IV). Chondrosarkome mit gut differenziertem Knorpelgewebe (Grad I) sind in ihrem biologischen Verhalten wenig aggressiv, d. h., sie wachsen vorwiegend örtlich expansiv, weniger infiltrativ und metastasieren nicht. Erst wenn es zu Rezidiven mit niedrigerer Differenzierung (ab Grad II) kommt, ist mit einer Metastasierung zu rechnen. Chondrosarkome Grad II werden als intermediärer Malignitätsgrad eingeordnet, während Grad III-IV einem Sarkom von hohem Malignitätsgrad zugerechnet werden (Freyschmidt et al. 359).

Die gewöhnliche Metastasierung erfolgt hämatogen in die Lungen, sehr selten in Leber, Nieren und Lymphknoten (Spjut et al.). Eine Metastasierung in andere Skelettabschnitte wird von McKenna et al. (1966) mit bis zu 18% angegeben.

Die körperlichen Beschwerden sind eher unspezifisch und bestehen in tiefen, dumpfen, mitunter intermittierenden Schmerzen, die nachts intensiver sind. Wenn der Tumor nahe an einem Gelenk liegt oder Strukturen wie Nerven und Gefäße komprimiert, kann es zu Taubheitsgefühl, Einschränkung des Bewegungsumfanges oder Ischämieschmerz kommen. Häufig vergehen zwischen erstem Auftreten der Beschwerden und erster Konsultation eines Spezialisten mehrere Monate, mitunter sogar Jahre.

Das Chondrosarkom zeigt röntgenologisch meist lytische und sklerotische Areale nebeneinander. Die sklerotischen Anteile repräsentieren Gebiete, in denen die chondroide Matrix mineralisiert ist. Sie kennzeichnen sich durch ring- und bogenförmige Verkalkungen, die mitunter zu großen Strukturen zusammenwachsen. Häufig erscheinen auch kalkspritzerartige Ablagerungen innerhalb bogenförmiger, lytischer Areale. Lobulär konfigurierte, aufgehellte Bereiche entsprechen Osteolysen. Je höher das Grading, desto mehr lytische Areale und desto weniger Mineralisation zeigt sich in der Läsion. Ist das Wachstum fortgeschritten, imponiert eine girlandenförmige, endostale Ausdünnung der Kortikalis (Scalloping); letztlich kann die Kortikalis durchbrochen werden und der Tumor ins Weichteilgewebe eindringen. Betrifft die Ausdünnung mehr als zwei Drittel der Kortikalis, besteht der Verdacht auf einen malignen Prozess. Auf Grund des langsamen Wachstums des

Chondrosarkoms sind auch reaktive Veränderungen (Zunahme der Dicke der Kortikalis, Umbau der Kortikalis und Periostreaktion) zu sehen.



*Abbildung 2: Konventionelles Chondrosarkom
Tumor re. Femur*



*Abbildung 3: Konventionelles Chondrosarkom
Tumor proximale Fibula*

Die Computertomografie ist beim Erkennen von Periostreaktionen und diskreten Matrixverkalkungen hilfreich. Die Computertomografie lässt das Ausmaß der kortikalen Beteiligung, kortikale Reparaturen und Verdickungen sowie die Periostreaktionen besser beurteilen als das Röntgenbild. Zudem ist das Erkennen von extraossären (verkalkten) Tumorkomponenten mittels CT einfacher als anhand des Röntgenbildes. Dabei zeigt die Weichteilkomponente des Tumors häufig punkt- und stippchenförmige Verkalkungen.

Die Magnetresonanztomografie liefert den wichtigsten Beitrag bei der Beurteilung der Tumorausdehnung. Knorpeltumoren zeigen auf T1- gewichteten Bildern eine geringe Signalintensität. Ist das Knochen- und Fettmark noch im Tumor eingeschlossen, zeigen sich helle Punkte in der Läsion. Die nicht mineralisierten knorpeligen Anteile haben eine hohe Signalintensität im T2- Bild, die durch den hohen Wassergehalt des hyalinen Knorpels hervorgerufen wird. Die mineralisierten Areale haben in allen

Wichtigungen des MRT nur eine geringe Signalintensität. Nur mit Hilfe der MRT lässt sich das gesamte Ausmaß der Läsion erkennen. Je undifferenzierter der Tumor ist, desto mehr weicht das Signalverhalten aber von der beschriebenen Charakteristik ab. Nach Kontrastmittelgabe zeigen sich eine septenförmige Anreicherung in der Peripherie (Horn et al. 59-50).



Abbildung 4: Chondrosarkom des Humerus eines 60 jährigen Mannes mit pathologischer Fraktur (Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes Münster)



Abbildung 5: G1 Chondrosarkom des Beckens einer 39 jährigen Frau (Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes Münster)

1.4.3.1 Periosteales (juxtakortikales) Chondrosarkom

Hierbei handelt es sich um einen sehr seltenen im Periost lokalisierten chondrogenen Tumor. Am häufigsten ist er in den metaphysären Abschnitten der langen Röhrenknochen lokalisiert. Die Patienten scheinen zum Beginn der Erkrankung jünger zu sein als Patienten mit einem konventionellen Chondrosarkom (Nojima u. Mitarb., Papagelopoulos u. Mitarb.).

Meist präsentieren sich die Tumoren als relativ scharf abgegrenzte, direkt der Kortikalis anliegende läppchenartig aufgebaute chondrogene Tumoren mit punktförmigen Verkalkungen. Die Kortikalis wird nicht infiltriert oder gar destruiert.

Histologisch stellt sich das periosteale Chondrosarkom genau so dar, wie das konventionelle schlecht differenzierte Chondrosarkom.

Eine schwierige Differentialdiagnose ist das periostale Osteosarkom. Der fehlende Nachweis von Osteoid oder sog. „Tumorknochen“ deutet auf ein periosteales Chondrosarkom hin (Bertoni et al. 251-247).

1.4.3.2. Mesenchymales Chondrosarkom

Drei bis zehn Prozent aller Chondrosarkome sind mesenchymale Chondrosarkome. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Auch hier sind die Erkrankten jünger als beim konventionellen Chondrosarkom, am meisten ist die zweite und dritte Lebensdekade betroffen. Häufig erwächst sich der Tumor aus den extraskelettalen Weichgeweben, aber auch den Rippen, den unteren Extremitätenknochen und den Kiefern.

Tumoren in der Größe von 3 – 30cm werden beschrieben, meistens besitzen sie ein grau-weißes Erscheinungsbild mit fleischiger Konsistenz. Histologisch zeigt der Tumor ein biphasisches Wachstum, was typisch ist für das mesenchymale Chondrosarkom. Es finden sich zum einen regelmäßig in der Größe variierende Inseln von reifen, hyalinen Knorpeln mit Kalzifikationen und Verknöcherungen. Diese sind umgeben von undifferenzierten, teils spindelzelligen, teils rundzelligen Tumoranteilen. Es kann der mikroskopische Eindruck eines Hämangioperizytoms entstehen. Bei Nachweis von ausschließlich undifferenzierten Tumoranteilen ist eine immunhistochemische Abklärung unerlässlich. Da es sich bei dem mesenchymalen Tumor um einen sehr aggressiven Tumor handelt, der eine hohe Metastasierungsrate besitzt, ist die Prognose eher schlecht (Nakashima et al. 256-255, Bürger 124-74).

1.4.3.3. Dedifferenziertes Chondrosarkom

Das dedifferenzierte Chondrosarkom ist ein Tumor mit einer äußerst schlechten Prognose. 90% der Patienten versterben in den ersten zwei Jahren. Der Tumor besteht aus zwei Anteilen, einen low-grade-Chondrosarkom und nicht chondrogenen high-grade-Sarkom. Das dedifferenzierte Chondrosarkom macht ca. zehn Prozent aller Chondrosarkome aus. Die meisten Patienten befinden sich in einem Alter zwischen 50 und 60 Jahren. Bevorzugte Lokalisationen sind das Becken, der Femur und der Humerus. Klinische Symptome sind Schmerzen, Schwellung, Parästhesien und pathologische Frakturen. Anders als bei den anderen Chondrosarkomen ist hier das Krankheitsgefühl oft stärker ausgeprägt. Radiologisch fällt das typische Bild eines Enchondroms mit einer synchronen, aggressiven, teilweise osteolytischen Knochendestruktion auf. Makroskopisch findet man den klar gegliederten chondrogenen Anteil des Tumors oft mit Verkalkungen, neben dem extraossär liegenden high-grade-Sarkom, der zystische, nekrotische Anteile und Einblutungen aufweist.

Histologisch findet man den chondrogenen Anteil des Tumors in Kombination mit einem Osteosarkom, Fibrosarkom oder Rhabdomyosarkom also einem anaplastischen Gewebeanteil. Beide Gewebeanteile sind dabei scharf voneinander abgegrenzt, so dass gelegentlich im Röntgenbild, deutlicher noch in der Computer- oder Magnetresonanztomographie, eine aus zwei Komponenten zusammengesetzte Läsion erkennbar ist. In der Genetik lassen sich regelmäßig p53 Mutationen feststellen (Milchgrub et al. 254-252, Bürger 124-74).

1.4.3.4. Klarzellchondrosarkom

Er ist der seltenste Tumor unter den Chondrosarkomen, er macht nur ca. zwei Prozent aller Chondrosarkome aus. Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 25 und 50 Jahren und ist somit niedriger als beim konventionellen Chondrosarkom.

Bei dem Klarzellchondrosarkom handelt es sich um ein niedrig malignes G1 Chondrosarkom. Die Tumoren sind typischerweise im Bereich der Epiphysenfuge des Femur- und Humerus lokalisiert.

Schmerzen sind auch hier das Hauptsymptom, oft bestehen sie schon mehrere Jahre. Der Tumor kann eine Größe von zwei 2 – 13cm annehmen. Makroskopisch fällt die Abgrenzung zu einem Chondroblastom schwer.

Histologisch finden sich Strukturen und zelluläre Komponenten wie beim Chondroblastom und als sekundäre Zeichen der Regression auch Bilder einer aneurysmatischen Knochenzyste. Dies betrifft speziell die Präsenz von benignen Riesenzellen und unauffälligem Stroma. Es dominieren aber zahlreiche, hellzellige chondroblastäre Zellen mit Übergang in ein konventionelles Chondrosarkom (Mc Carthy et al. 258-257)(Horn et al. 59-50).

1.4.3.5. Sekundäre Chondrosarkome

Sekundäre Chondrosarkome entwickeln sich aus gutartigen Primärläsionen. Die maligne Transformation eines solitären Enchondroms ist äußerst unwahrscheinlich. Ein hohes Entartungsrisiko besteht bei Enchondromatose mit oder ohne Vorliegen eines Morbus Ollier sowie beim Maffucci-Syndrom. Die Rate der malignen Transformation für solitäre Osteochondrome liegt bei ca. 1%. Multiple Osteochondrome weisen mit ca. 10% ein deutlich höheres Risiko auf (Bertoni et al. 251-247).

1.4.3.6. Stellenwert der Biopsie

Die Biopsie muskuloskelettaler Tumoren bedarf gründlicher Kenntnisse und sollte dem Spezialisten vorbehalten bleiben. Sie sollten möglichst vom späteren Operateur durchgeführt werden. Die histologische Aufarbeitung sollte auf jeden Fall an einem spezialisierten Zentrum vorgenommen und im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz beurteilt werden. Da Knorpeltumoren häufig heterogen aufgebaut sind, muss gewährleistet sein, dass das Biopsiematerial ausreichend ist und aus den radiologisch auffälligsten Bereichen stammt, zum Beispiel aus Bereichen verstärkter Kontrastmittelaufnahme oder sichtbarer Osteolysen in der Peripherie. Im Zweifelsfall sollte eine intramedulläre chondroide Läsion im Sinne eines Enchondroms immer komplett mittels einer radikalen Biopsie entfernt werden, da wegen der Heterogenität sonst leicht Fehldiagnosen möglich sind. Die Feinnadelbiopsie zur Materialgewinnung ist also nicht geeignet (Horn et al. 59-50).

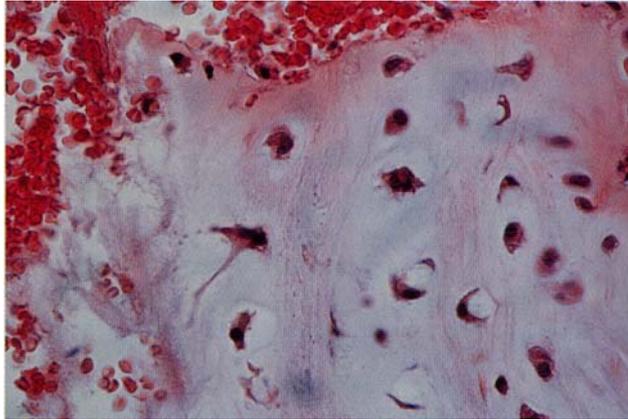


Abbildung 8: Grad 1 Chondrosarkom: Bei starker Vergrößerung werden die Variation der Kernformen und die Hyperchromasie klar sichtbar

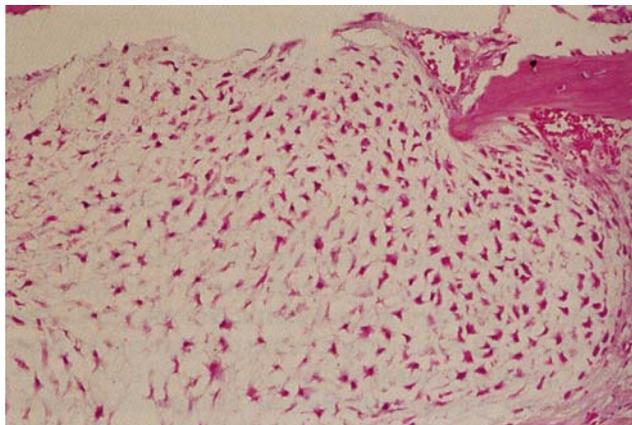


Abbildung 9: Grad 2 Chondrosarkom: mäßig gesteigerter Zellreichtum, herdförmige myxoide Grundsubstanzveränderungen

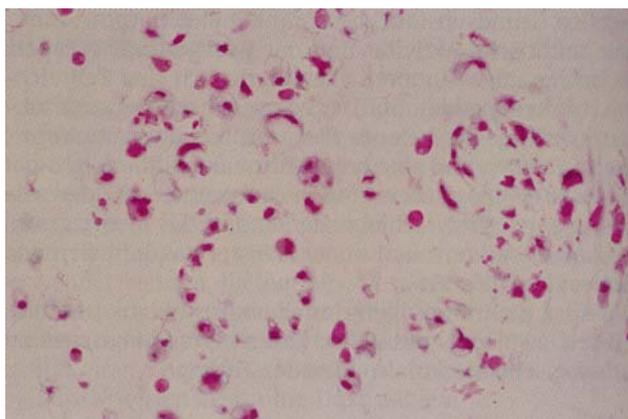


Abbildung 10: Grad 3 Chondrosarkom: Unregelmäßig verteilte Zellen mit betonter Kernpleomorphie. Zahlreiche 2- und 3kernige Zellen

1.4.3.7. Operative Therapie des Chondrosarkoms

Bei lokalisiertem Tumor ohne Fernmetastasen ist das operative Vorgehen das Mittel der Wahl. Ist der Tumor lokal operabel und sind Fernmetastasen ausgeschlossen, so kann ein kurativer Heilungsversuch unternommen werden. Häufig kann die betroffene Extremität mittels (endo) prothetischer Versorgung ganz oder zumindest funktionell erhalten werden, wobei hinsichtlich des onkologisch notwendigen Resektionsausmaßes und Überlebens kein Kompromiss zu Gunsten des Funktionserhaltes eingegangen werden darf. Bei generalisierten Tumorleiden oder inoperablen Tumoren dagegen ist der Lebensqualität des Patienten gegenüber der Radikalität des chirurgischen Vorgehens Vorrang einzuräumen (Horn et al.59-50).

1.4.3.8. Chemotherapie des Chondrosarkoms

Die Chemotherapie erweist sich beim Chondrosarkom im Allgemeinen als wenig wirksam. Eine Erklärung der schlechten Wirksamkeit von Chemotherapeutika mag der hohe Anteil an extrazellulärer Matrix sein, die die Tumorzellen abschottet. Zudem wirken die meisten Chemotherapeutika nur auf stoffwechselaktive Zellen; Chondrosarkome wachsen aber im Vergleich zu anderen Tumoren relativ langsam. Aus diesem Grund wird von manchen Autoren die Ansicht vertreten, dass Chemotherapeutika allenfalls bei Chondrosarkomen, die ein hohes Grading und eine hohe Metastasierungsrate aufweisen (entdifferenziertes und mesenchymales Chondrosarkom), indiziert ist. Therapieschemata, die sich aus kontrollierten Studien ableiten, gibt es bisher nicht (Horn et al 59-50).

1.4.3.9. Strahlentherapie des Chondrosarkoms

Das Chondrosarkom (gleich welcher Art) ist außerordentlich strahlenresistent. Deshalb ist die Therapie nur zu erwägen, wenn das Chondrosarkom und operative Therapie nicht greifen, ausgereizt sind oder ohnehin nur eine palliative Therapie möglich ist. Bei G1- Chondrosarkomen wird derzeit bei lokaler Inoperabilität die Bestrahlung mit Schwerionen erprobt. Die Ressourcen für das Verfahren sind allerdings begrenzt und die Erfahrungen bisher gering (Horn et al.59-50).

1.4.3.10. Therapeutischer Ausblick des Chondrosarkoms

Da sich die chemotherapeutischen Schemata bislang nicht durchschlagend wirksam gegenüber dem Chondrosarkom gezeigt haben, werden neue Therapiestrategien, die auf den molekularpathologischen Gegebenheiten des Tumors gründen, entwickelt. Ziel der Strategien ist unter anderem die Beeinflussung verschiedener, die Apoptose regelnder Gene und Signalwege, verschiedener Rezeptorkomplexe und nachgeschalteter Signalwege. Auch bestimmte Proteine und Enzyme (Metalloproteasen, Proteinkinasen und Proteinasen), die der Tumor für sein Wachstum braucht, stellen mögliche Angriffsziele dar, die mittlerweile intensiv erforscht werden. Leider sind die meisten dieser Strategien bislang nur an in-vitro-Modellen erprobt und finden in der Klinik noch keine Anwendung (Horn et al. 59-50).

1.5. Immunhistochemische Marker

1.5.1. Tumorsuppressorgene

Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kommt eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung und Progression maligner Tumoren zu. Da eine kausale Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp der maligne entarteten Zelle besteht, sind Mutationen von Tumorgenen und den entsprechenden Genprodukten mit ganz wenigen Ausnahmen spezifisch für Tumorzellen. Der Nachweis genetischer Veränderungen von Tumorgenen ist daher in der Regel beweisend für die Anwesenheit von Tumorzellen. Einige Mutationen sind bereits in Läsionen nachweisbar, die noch nicht alle Kriterien maligner Zellen erfüllen. Weiterhin gibt es Beispiele, dass Tumorzellen mit spezifischen Mutationen von Tumorgenen über Jahre im Organismus vorhanden sein können, ohne dass eine Progression der Erkrankung zu beobachten ist. Der Nachweis mutierter Tumorgene ist somit oftmals gleichbedeutend mit der Diagnose eines progressiv wachsenden malignen Tumors (Ponder 1050, Sidransky 1054, Wagener 728).

1.5.1.1. Tumorsuppressorgen p53

Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der

Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reperatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 16-15). Die besondere medizinische Bedeutung erklärt sich aus dem Befund, dass p53 in nahezu 50% aller menschlichen Tumoren mutiert ist (Soussi et al. 1). Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs, ist jedoch nicht der ursächliche Auslöser für das unkontrollierte Wachstum von Zellen.

Das TP53-Tumorsuppressor-Gen auf dem Chromosom 17p13.1 kodiert für das Protein p53, welches seinen Namen aufgrund des Molekulargewichtes von 53 kDa erhielt. p53 ist von Natur aus instabil, wird aber regelmäßig „nachgeliefert“. Kommt es in der DNA jedoch zu Schäden, etwa einem Doppelstrangbruch, die eine Replikation oder eine Mitose fehlerhaft ablaufen lassen würden, so wird p53 innerhalb von 30 Minuten posttranslational stabilisiert, wodurch sich p53 in der Zelle akkumuliert.

Die Akkumulation von p53 hat viele Folgen. So werden einerseits DNA-Reparatur-Mechanismen in Gang gesetzt, andererseits wird der Zellzyklus gestoppt. Letzteres geschieht dadurch, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Produktion des Enzyms p21 induziert. p21 wiederum hemmt sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den CyclinE/CDK2-Komplex. Diese werden eigentlich benötigt, um einen vom Protein pRB gebundenen weiteren Transkriptionsfaktor (E2F) freizusetzen, der den Zellzyklus weiterführen würde. Die Zelle bekommt also durch p53 Zeit, sich selbst zu reparieren, bevor sie sich teilt. Ist die DNA wieder in Ordnung, so sinkt der p53-Spiegel wieder, p21 wird nicht mehr transkribiert und nach einer Weile geht der Zellzyklus weiter.

Wird p53 jedoch zu stark angehäuft und kommen weitere Faktoren hinzu, so aktiviert p53 Gene der Bcl2-Familie (insbesondere den Apoptose-Regulator BAX), die wiederum in Form einer Signalkaskade Caspasen auslösen und so zu Apoptose führen. Demnach ist p53 wie eine Art Bremse, die nötig ist, um Zellen vom unkontrollierten Wachstum und weiterer Schädigung abzuhalten, und deren Mutation zu verstärkter Zellteilung führt.

p53 ist ein Kernenzym mit enormer Bedeutung, ein Defekt hat demnach große schädigende Wirkung. Bei einer Mutation im Gen TP53, das für p53 kodiert, wird das Enzym schadhaf und inaktiv. Nach heutigem Kenntnisstand sind im Allgemeinen Punktmutationen, die zu einem Funktionsverlust führen. Als Folge dieses Verlustes ist weder ein Anhalten des Zellzyklus zur DNA-Reperatur, noch die Einleitung der

Apoptose möglich. Die Zellen beginnen sich auch mit Schäden in der DNA unkontrolliert zu teilen, es kommt zu Tumorbildung. Patienten, die mit dem Li-Fraumeni-Syndrom geboren werden, haben eine angeborene Mutation in p53. So kommt es bei Menschen mit dieser Mutation schon in frühesten Kindheit zu diversen Tumoren.

Neben spontan auftretenden Mutationen gibt es auch andere Ursachen für Schäden an p53 bzw. seiner Funktionen. So gibt es tumorinduzierende Viren (so genannte Onkoviren), die p53 hemmen, abbauen oder dessen natürlichen Abbau beschleunigen.

Weiterhin kann p53 durch chemische Stoffe geschädigt werden, zum Beispiel durch Tabakrauch enthaltene Benzopyren oder durch Aflatoxin. Diese Stoffe hinterlassen charakteristische Merkmale in der geschädigten DNA und können dadurch als Verursacher identifiziert werden (Hainaut et al., Ferbeyre u. Lowe 27-26, Lane et al. 263-261, Linzer et al. 52-53).

1.5.1.2. Tumorsuppressorgen p63

Zu dem oben erwähnten Tumorsuppressorgen p53 sind in den letzten Jahren zwei weitere Tumorsuppressorgene gefunden worden, nämlich das p73- und das p63-Tumorsuppressorgen. Alle beide beweisen eine hohe Homologie zu p53. p53, p73 und p63 weisen ähnliche Domänenorganisation auf, die aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne besteht. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde vorgeschlagen, dass die Überwachung des Zellzyklus nicht nur durch p53 erfolgt, sondern von einem Protein-Netzwerk, bestehend aus p53, p73 und p63, ausgeführt wird.

Die biologische Funktion von p63 wurde an Knock-out-Mäusen, die das Protein p63 nicht bilden konnten, untersucht. Die Mäuse zeigten sehr starke Entwicklungsschäden. Sie werden zwar lebend geboren, ihnen fehlen aber große Teile der äußeren Extremitäten. Ihre Haut besteht nur aus einer primitiven, einzellschichtigen Struktur, im Gegensatz zur normalen Haut, die aus mehreren Zellschichten aufgebaut ist. Darüber hinaus fehlen den Mäusen die Zähne und Schnurrhaare, Augenlider sowie Milch-, Tränen- und Speicheldrüsen. Der Grund liegt im C-terminalen Ende des Proteins. Während der C-Terminus von p53 eine nur 26 Aminosäuren bestehende, unstrukturierte Domäne bildet, existiert der C-Terminus

von p63 in drei verschiedenen Variationen (p63-gamma, die kürzeste Form, p63-alpha und p63-beta).

Auch der N-Terminus von p63 kommt in zwei verschiedenen Variationen vor. Durch die Kombination der drei verschiedenen C-Termini mit den beiden N-Termini ergeben sich somit sechs verschiedene Formen des Proteins p63, die alle eine transkriptionelle Aktivität besitzen. Bei Patienten mit EEC-Syndrom (Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, and Cleft lip with or without cleft palate) sind Mutationen im p63-Protein gefunden worden (Dötsch, V. 55-53, Yang, A. et al. 305-316 und 718-714, Serber, Z. et al. 8611-8601, Celli, J. et al. 153-143).

1.5.1.3. Tumorsuppressorgen p16

p16INK4a ist ein Protein, das auf den Chromosomen 9 lokalisiert ist. Der INK4a/ARF-Locus umfasst zwei verschiedene Tumorsuppressorgene, p16INK4a und p14ARF, die beide unabhängig voneinander in wesentliche Signalwege zur Zellzyklus-Kontrolle involviert sind, den RB-Signalweg (p16) und den p53-Signalweg (p14).

Eine funktionelle Inaktivierung des p53/p14ARF/MDM2- und des RB/p16INK4a-Signalwegs findet sich häufig in Tumoren. Mutationen von p16 findet man häufig beim familiären Melanon, sowie bei Kolon- und Lungentumoren (Lain et al. 154-136) p16 ist somit ein Inhibitor im Zellzyklus. (Sherr et al. 731-7, 103-12).

1.5.2. Onkogene

1.5.2.1. Onkogen mdm2 (murine double minute gene)

Das Mdm2-Gen wurde in einer spontan transformierten Mutante einer murinen Fibroblasten-Zelllinie identifiziert (Oliner et al. 80). Ein wichtiger Regulator der p53-Stabilität ist mdm2, eine E3-Ligase, die die Ubiquitylierung und den Proteasom-vermittelten Abbau von p53 stimuliert. Das p53-Protein wird zwar kontinuierlich in der Zelle produziert, hat aber in Gegenwart von aktivem mdm2 nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten. mdm2-Knockout-Mäuse sind embryonal letal aufgrund eines frühen Defekts während der Implantation des Embryos. Dieser Defekt beruht offensichtlich auf der fehlerhaften Inaktivierung von p53, da mdm2^{-/-}, p53^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse sich weitgehend normal entwickeln. Diese bemerkenswerte

Beobachtung impliziert zwei wichtige Annahmen: mdm2 ist der zentrale Regulator von p53 und mdm2 scheint neben der Inaktivierung von p53 keine weiteren essentiellen Aufgaben zu haben. Damit liegt der Fokus der p53-Regulation auf mdm2. Neben mdm2 wurden zwar noch drei weitere E3-Ligasen beschrieben, die p53 ubiquitinylieren können, keine ist jedoch in der Lage, die Funktion von mdm2 in der Embryonalentwicklung zu ersetzen. Daher nimmt man an, dass die Funktion von mdm2 möglicherweise nicht nur in der p53-Ubiquitinylierung liegt, sondern vor allem auch darin, direkt an das Proteasom binden zu können und so unmittelbar eine Rekrutierung von p53 an das Proteasom zu bewerkstelligen. mdm2 ist somit der zentrale Regulator des Abbaus von p53-Protein. Wie mdm2 selber in der Zelle reguliert wird, konnte noch nicht bis ins Detail geklärt werden (Hölzel et al. 378-367, 1132-1125, Schlosser et al. 524-520, 6156-6148, Schumacher et al 406-397).

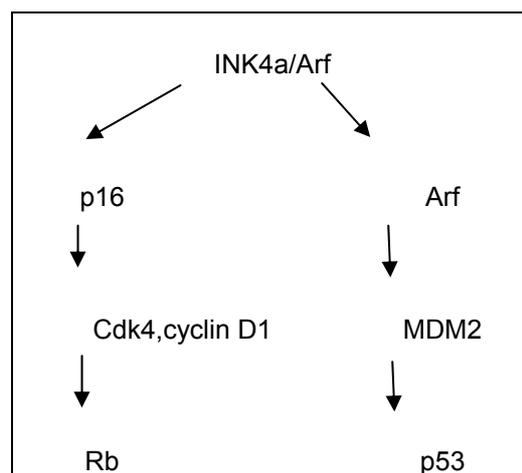


Diagramm 3: Der INK4a/Arf Locus kodiert für zwei Tumorsuppressorenwege die transkribiert werden von verschiedenen Promotoren. Diese Tumorsuppressoren sind p16INK4a und p19Arf, diese inhibieren die Tumorsuppressorengene Rb und p53 durch die Suppression von CDK4 und MDM2

1.5.2.2. Onkogen erb B2

Bei erbB2 handelt es sich um einen Wachstumsfaktorrezeptor. Eine Gruppe von Onkogenen kodiert für Wachstumsfaktorrezeptoren. Es handelt sich um transmembranäre Moleküle mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne, die in der Regel Protein-(Tyrosin-) Kinaseaktivität aufweist. Die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren oder die Expression von mutierten Wachstumsfaktorrezeptoren, die konstitutiv aktiv sind,

spielen bei einer Reihe von Tumoren eine Rolle. Sie bewirken somit eine permanente mitogene Stimulation und sind transformierend.

Die Überexpression von erbB2, findet man bei einer Reihe von Adenokarzinomen der Mamma, des Ovars, des Magens, der Speicheldrüse sowie der Lunge. Die Amplifikation ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (Fajac et al. 146, Gullick 55). Häufig liegt dieser Rezeptorüberexpression eine Genamplifikation zugrunde. Die Überexpression führt durch Dimerisierung (ohne Ligandenbindung) des entsprechenden Wachstumsfaktors zu einer wirksamen mitogenen Stimulation (Böcker, W. 211-164).

1.5.2.3. Onkogen Cyclin D1

Der Zellzyklus unterliegt einer präzisen Regulation durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren. Von besonderer Bedeutung bei der Zellregulation sind regulatorische Proteine (Cycline), die phasenspezifisch hochreguliert werden und durch Bindung an inaktive zyklinabhängige Proteinkinasen (CDK) zur Aktivierung der Kinasen führen. Die in die G1-Phase regulierenden D- und E-Cycline sind von besonderer Bedeutung, die sie für den Übergang in die wachstumsfaktorenunabhängige Phase des Zellzyklus und in die S-Phase verantwortlich sind. Der Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass CyclinD/CDK4 und 6 und CyclinE/CDK das Retinoblastomprotein inaktivieren und damit den mitogenen Transkriptionsfaktor freisetzen.

Die Aktivität der CDK wird andererseits von Inhibitoren reguliert. Eine Familie dieser Inhibitoren umfasst unter anderen die Proteine p15, p16, p18 und p19, die selektiv CyclinD/CDK4 und CyclinD/CDK6 inhibieren (inhibitors of CDK4 und CDK6) und daher INK-Proteine bezeichnet werden.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass Cycline als Onkogene wirken können. In der Tat ist CyclinD1 bei einem hohen Prozentsatz von Ösophagus- und Magenkarzinomen überexprimiert, wobei eine Amplifikation des Genlokus 11p13 als Ursache angenommen wird. Die auf Chromosomen 12 liegende cyclinabhängige Kinase 4 (CDK4) ist ebenfalls bei einigen Tumoren überexprimiert (z.B. Melanome und Sarkome). Folge der Überexpression von Cyclin D1 bzw. CDK4 ist die Inaktivierung des Rb-Proteins und führt zur Expression eines entsprechenden chimären Proteins abl mit Tyrosinkinaseaktivität (Böcker, W et al. 211-164).

1.5.3. Wachstumsfaktor EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Der EGFR gehört zu einer ganzen Gruppe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Interleukine, Erythropoetin und viele mehr. Er ist aus 1186 Aminosäuren aufgebaut, dessen extrazellulärer, ligandenbindender Teil aus zwei cysteinreichen Domänen besteht, und dessen intrazellulärer Teil die Tyrosin-Kinase-Domäne beherbergt. Das EGFR-Gen ist auf den kurzen Arm des Chromosomen 7 lokalisiert (7p12) (Kondo et al. 14-9, Wang et al. 406-399). Es erstreckt sich über eine Länge von 100kB und ist zu 26 Exons organisiert (Ishii et al. 4924-4920, Haley et al. 396-275). Nachdem ein Ligand am EGFR gebunden hat, kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und anschließend zur Dimerisierung mit einem anderen erbB-Rezeptor. Bevor das Protein internalisiert wird, wird eine Tyrosinkinase aktiviert, die wiederum intrazelluläre Proteine phosphoryliert, die für die Signaltransduktion der Differenzierung und das Zellwachstum wichtig sind (Gebhardt et al. 105-10).

Die Bedeutung des EGFR für die Entstehung von Neoplasien und für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums liegt darin, dass in bestimmten Tumoren (Lungen-, Magen-, Zervixtumoren u.v.m.) eine Überexpression nachweisbar ist. Durch eine Überexpression, der eine gesteigerte Synthese des Proteins zugrunde liegt, wird die Anzahl der an der Zelloberfläche verfügbaren Rezeptoren erhöht.

1.5.4. Tyrosinkinase c-kit

Tyrosinkinasen übermitteln intrazellulär Signale, die viele zelluläre Reaktionen, wie Proliferation, Zelldifferenzierung und Überleben, über ein komplexes intrazelluläres Signalnetzwerk regulieren.

Im Rahmen dieser Reaktionen bindet die extrazelluläre Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase den entsprechenden Liganden und bildet dabei ein Dimer. In der Folge phosphorylieren die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen gegenseitig zytoplasmatische Tyrosinreste im Rezeptor (Transautophosphorylierung) und setzen eine Kaskade von intrazellulären Signalmechanismen in Aktion, über die es schließlich über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zu einer entsprechenden Beeinflussung der Genexpression kommt (Böcker et al. 68-36).

c-kit ist ein Transmembranprotein, das auch als CD117 bekannt ist und normalerweise als Rezeptor für den Stammzellfaktor fungiert. Der Rezeptor ist auf

seiner intrazellulären Seite mit einer Tyrosinkinase assoziiert. Seit 1998 ist bekannt, dass Zellen einer seltenen Form von Sarkomen, des gastrointestinalen Stromatumors und der chronisch myeloischen Leukämie, c-kit exprimieren. Während in intakten c-kit tragenden Zellen die Tyrosinkinase nur aktiv wird, wenn der Rezeptor durch Stammzellefaktor stimuliert wird, weist c-kit bei den meisten gastrointestinalen Stromatumoren Mutationen auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase führt (Sheer et al. 113-95).

Imatinib ist ein Phenylaminopyrimidin-Derivat und wird zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie, gastrointestinalen Stromatumoren, sowie weiteren malignen Erkrankungen eingesetzt. Der Wirkungsmechanismus von Imatinib besteht in der kompetitiven und selektiven Blockade der ATP-Bindungsstelle Tyrosinkinasen, wie z. B. Abl, c-kit und der PDGF- Rezeptor. Durch diese Blockade wird die Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat verhindert (O'Brien, S.G. 1004-994).

1.5.5. Mib-1

Erstmals beschrieb Stein und seine Mitarbeiter (Stein et al. 125-34) 1981 den monoklonalen Mäuseantikörper Ki-67

Ki-67 ist ein Antigen, das nur in Zellen außerhalb der G0 Phase detektiert werden kann, daher eignet es sich, um die Proliferationsaktivität eines Tumors zu bestimmen. Eine erhöhte Proliferationsaktivität ist oft mit einem geringeren Differenzierungsgrad, einem negativen Steroidhormonrezeptorstatus und einer ungünstigen Prognose assoziiert. Mittels des MIB-1 Antikörpers ist es möglich das Ki-67-Antigen nachzuweisen, welches als Proliferationsmarker gilt. Eine eindeutige Differenzierung zwischen der ruhenden und der aktiven Tumorzellpopulation und somit die Beurteilung der Proliferationsaktivität ist möglich.

Während Ki-67 einfach an Gefrierschnitten nachgewiesen werden kann, erkennt der später entwickelte Antikörper MIB-1 natives Ki-67-Antigen an Gefrier- und Paraffinschnitten (Gerdes et al. 68-85).

1.5.6. Antigen CD34

Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116kD. Es wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Dieses Antigen wird auch genutzt, um hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut

für eine Stammzelltransplantation anzureichern. Daneben wird das CD34-Antigen auch auf Kapillarendothelien und in embryonalen Fibroblasten gebildet. Mit zunehmender Reifung verschwindet die Expression von CD34.

Eine CD34-Expression wird in undifferenzierten Leukämien, akuten myeloischen Leukämien und akuten lymphoblastischen Leukämien gefunden. Unter den Weichteilsarkomen reagieren insbesondere Gefäßtumoren (Kaposi-Sarkom) mit diesem Marker.

Daneben eignet sich der Marker auch für die Darstellung von Kapillarendothelien zum Beweis einer Lymph- oder Hämangiosis carcinomatosa (Civin, C. L. et al. 1975, Mason, D. et al. 2002).

1.5.5. bcl-2 („B-cell-leukemia/lymphoma“) Apoptosehemmer

Das bcl-2-Gen wurde 1985 von Tsujimoto Y. et al. In folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen entdeckt (Tsujimoto et al 1987-89). Auf dem Gen wurde eine t(14;18) Translokation festgestellt. Bcl-2 kodiert auf dem langen Arm des Chromosomen 18 (18q21) für ein Protein mit einer relativen Molmasse von 26 kDa. Das Protein ist in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Hockenbery, D. et al. 1990). Die biologische Wirkung des bcl-2-Proteins ist die Hemmung der Apoptose. Der molekulare Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt.

In Lymphomzellen ist bcl-2 überexprimiert. Das Protein schützt lymphatische Zellen vor der Apoptose, und die Patienten entwickeln langsam wachsende Lymphome (Fennell, D., A. 226-210).

2. Fragestellung

Chondrosarkome sind Knochentumoren, die ein geringes Ansprechen auf Chemotherapie und Strahlentherapie besitzen. Die einzigste kurative Therapie ist bis heute die radikale chirurgische Intervention. Deswegen hofft man, durch immunhistochemische Untersuchungen neue Therapieansätze zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurden Chondrosarkome aus dem Knochen und Geschwulst Register des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Münster immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden die Chondrosarkome mithilfe verschiedener monoklonaler Antikörper (p53, Mdm2, p16, c-kit, bcl-2, erb b2, EGFR, Cyclin D1, ed34, p63, mib-1) angefärbt. Danach wurde der prozentuale Anteil der positiv abgefärbten Zellen ermittelt und verglichen.

Zudem wurde eine biomathematische Berechnung der untersuchten Läsionen durchgeführt.

Ziele dieser Arbeit sind:

- Die Ermittlung des immunhistochemischen Expressionsmusters der Chondrosarkome.
- Der Vergleich des immunhistochemischen Expressionsmuster in Subgruppen von Chondrosarkomen (mesenchymales, dedifferenziertes, periostales und Klarzellchondrosarkom)
- Die verschiedenen Differenzierungsgrade des Tumors in Bezug auf das Überleben
- Die Operabilität im Bezug auf das mediane Überleben
- Das Rezidivverhalten des Chondrosarkoms

3. Material und Methode

3.1. Material

Die Grundlage unserer Untersuchungen bildet das Knochengeschwulstregister des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster. In diesem Register sind alle relevanten Knochen- und Geschwulsttumoren gesammelt. Das Gerhard-Domagk-Institut besitzt eines der größten Sammlungen in Europa. Aus diesem Register stammen die in Paraffin eingebetteten Schnittproben mit den dazugehörigen Hämatoxylin- Eosin- Schnittpräparate aus dem Jahre 1988 bis 2005. Insgesamt wurden Chondrosarkome von 239 Patienten in die Untersuchungen einbezogen.

Die Hämatoxylin- Eosin- Schnittpräparate wurden benutzt, um die malignen Läsionen in den paraffineingebetteten Schnittproben zu identifizieren.

3.2. Prinzip Tissue Microarray

Ein Tissue Arrayer ist ein einfaches manuell zu bedienendes Laborgerät, das es Forschern ermöglicht bis zu 1000 Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock als Matrix anzulegen. Der Arrayer zeigt seinen Nutzen insbesondere in der Krebsforschung. Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, der den Verlust, Rearrangements und Amplifikationen von diversen chromosomalen Regionen und multiplen Genen beinhaltet. Diese Vorkommnisse führen zur Dysregulation von Signaltransduktionswegen die für Zellwachstum, Apoptosis und Differenzierung wichtig sind. Die Einzelheiten dieses komplexen Prozesses sind nur unvollständig verstanden, teilweise weil Hochdurchsatzstrategien und –technologien zur Analyse solcher genetischen Änderungen in einer großen Anzahl von unkultivierten humanen Tumoren nicht verfügbar waren.

Weil die zur Verfügung stehende Gewebemenge endlich ist und deshalb zum limitierenden Faktor für solche Untersuchungen wird ist die Möglichkeit Gewebe für molekulare Analytik zu gewinnen, zu fixieren, zu speichern und zu verteilen essentiell. Dies muss in einer Art und Weise geschehen, die den Verbrauch dieser oftmals einzigartigen und kostbaren Tumorproben optimiert. Durch die Herstellung von Tissue Arrays aus hunderten von Tumorgeweben lässt sich Hochdurchsatzanalytik zur Gen- und Expressionsanalyse durchführen (Kononen et al. 844-7). Die größten Vorteile der Tissue Array Technologie beinhalten größere Anzahl

der Gewebeproben, geringere vernachlässigbare Schädigung des Spenderblocks, präzise Anordnung in der neuen Matrix und die Benutzbarkeit in unterschiedlichen molekularen Analysen. Die Entnahme von 10 bis 20 Stanzen aus dem Spenderblock ohne signifikante Schädigung ist möglich. Die Anwendung eines hochpräzisen Gerätes um eine Probe in ein vorgegebenes Format zu bringen, macht eine automatisierte Form der Auswertung durch eine mikroskopische Analyse erst möglich. Abhängig von der Dicke der Originalblöcke können zwischen 150 und 300 Schnitte aus jedem Array-Block geschnitten werden (Packer et al. 204-198).

Die Auswahl der richtigen Entnahmeposition aus dem Spenderblock ist von essentieller Bedeutung für die Konstruktion eines Tissue Arrays. Ein frischer HE Schnitt sollte von jedem Spenderblock angefertigt werden und dient als Übersicht um die richtige Entnahmestelle festzulegen. Die Entnahmestelle sollte durch eine Markierung auf dem jeweiligen zur Probe korrespondierenden HE-Schnitt gekennzeichnet sein, bevor man mit der eigentlichen Fertigung des Array-Blocks beginnt. Die Spenderblöcke sollten eine Dicke von 1mm nicht unterschreiten. Die besten Ergebnisse werden mit Blöcken erzielt die nicht dünner als 3-4mm sind.

Ein leerer Paraffinblock ist der Empfänger für die Stanzen der Gewebeproben. Der Durchmesser der Stanzbiopsien aus dem Donor-Block beträgt je nach Stanznadel 0,6 bis 2mm.

Das meist verwendete Gerät für die TMA-Herstellung ist das TMA-Präzisionsgerät von Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, USA, welches dem Prototyp aus den Anfängen der TMA-Herstellung sehr ähnlich ist. Mit Hilfe des Gerätes wird dann in dem Rezipienten-Paraffinblock ein zylinderförmiges Bohrloch gestanzt. Danach wird im Donor-Paraffinblock aus der vorher definierten Entnahmestelle eine Stanze entnommen die von den Maßen etwas kleiner ist als das Bohrloch, damit die zylinderförmige Donorstanze genau in dieses Bohrloch des Rezipienten-Paraffinblocks passt (Kononen et al. 844-47, Torhorst et al. 2249-56). Die Stanzen sollten in ein x-y-Koordinatensystem, das mit Hilfe des Gerätes eingestellt werden kann, übertragen werden, um nachher im Rezipienten-Paraffinblock die einzelnen Stanzen den jeweiligen Patientendaten zuordnen zu können (Bubendorf et al. 79-72).

3.2.1. Herstellung der Tissue Arrays aus Chondrosarkomen

Mit Hilfe der Hämatoxylin- Eosin-Schnittpräparate der Chondrosarkomen wird lichtmikroskopisch die Region festgelegt, aus dem ein Stück zu untersuchendes Gewebe aus den jeweilig dazugehörigen Paraffinblöcken entnommen werden soll. Danach werden mit Hilfe einer Excel-Computerdatei die Patientennummern bzw. Patientendaten mit den jeweiligen Tissue Microarrays- Koordinaten zugeführt.

Bei dem Gerät für die Stanzen handelt es sich um das TMA-Präzisionsgerät von Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, USA. Mithilfe dieses Gerätes werden aus der vorher definierten Region des Donor-Paraffinblockes zylinderförmige Stanzbiopsien entnommen und anschließend an einer vorbestimmten Stelle des x-y Koordinatensystems in den Rezipienten-Paraffinblock eingeführt. Der Durchmesser der Stanzbiopsien aus dem Donor-Block betragen 0,6mm und der Abstand der jeweiligen Stanzen im Rezipienten-Paraffinblock 0,8mm.

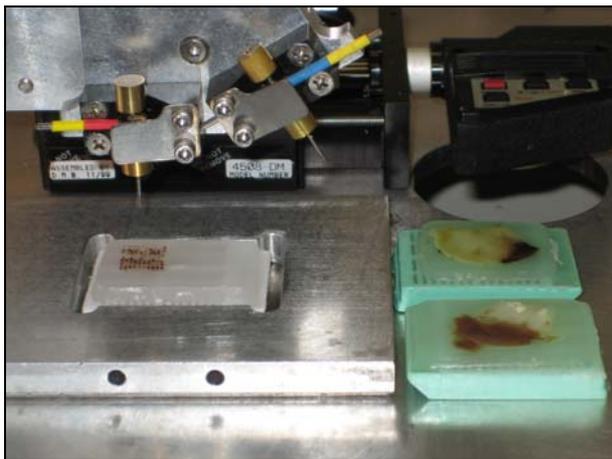


Abbildung 6 und 7: Gerät zur Herstellung der Tissue Arrayer's

Nach einer gewissen Trainingszeit entstanden von den 239 Patienten somit 717 Stanzen verteilt auf jeweils zwei Rezipienten-Paraffinblöcken a 400 Stanzen. So weit es keine Schwierigkeiten bereitete sind aus dem jeweils einem Donor-Paraffinblock drei Stanzen entnommen worden. Teilweise war das Läsionsgewebe der Donor-Paraffinblöcke sehr hart und konnte nicht, oder nur inkomplett in das Rezipienten-Paraffinblock überführt werden. Die jeweils drei Stanzen dienen somit der besseren statistischen Auswertung.

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. Antigendemaskierung

Immunhistochemische Untersuchungen ermöglichen den Nachweis zellulärer Antigene in Gewebeschnitten mittels Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen. Enzymatische Vorbehandlungen sind vor dem Einsatz einiger Antikörper notwendig, damit der Antikörper das spezifische Antigen/Epitop im Gewebe identifizieren kann. Während der Fixierung, meistens in Formalin, entstehen Aldehydvernetzungen, welche eine Bindung des Antikörpers verhindern können. Auch kann sich dadurch die dreidimensionale Struktur eines Proteins (Antigens) verändern und so für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein (Antigenmaskierung).

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden am Mikrotom 2-3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Wichtig ist das Aufziehen der Schnitte auf beschichtete Objektträger, da die Schnitte sich sonst sehr leicht vom Objektträger lösen. In diesen Fall wurden die „Superfrost plus“ beschichteten Objektträger benutzt. Die Vorbehandlung erfolgt im Anschluss an die Entparaffinierung, bevor der Primärantikörper aufgetragen wird. Durch den Einsatz einer enzymatischen Vorbehandlung kann außerdem die Endverdünnung eines Antikörpers, der auch ohne jegliche Vorbehandlung reagiert, in vielen Fällen um ein vielfaches gesteigert werden. Zum Trocknen wurden diese Präparate über Nacht bei 56 °C in einem Brutschrank gelagert.

Der Begriff „paraffingängig“ bei Antikörpern ist irreführend, denn die Antikörper müssen nicht das Paraffin passieren, da dieses durch das Xylol bereits herausgelöst wurde. Vielmehr ist damit gemeint, dass die Antikörper meistens an formalinfixiertem Material und nachfolgender Paraffineinbettung zum Einsatz kommen. Das Problem für die Antikörper ist also nicht das Paraffin, sondern das Formalin (Höfler et al 43-40). Somit wurden am nächsten Tag die auf Raumtemperatur abgekühlten Schnitte für zweimal 10min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je einmal 99%, 96%, 80% und 70%) bis zum destillierten Wasser rehydratisiert.

Zur Vorbehandlung der Schnitte bestehen nun drei verschiedene Möglichkeiten:

- 1) ohne Vorbehandlung.
- 2) Enzymandaunung mit Proteinase K.
- 3) Hitzebehandlung.

Nur für die Schnitte, die der EGFR-Antigen Darstellung dienten, wurde die Andauung mithilfe der Proteinase K genutzt. Diese Schnitte wurden dafür etwa 10min in einer Plastikküvette mit dem proteolytischen Enzym (Proteinase K, DAKO Cytomation ChemMate™) inkubiert und anschließend mit Waschpuffer abgespült.

Bei den anderen 10 Antikörpern stand die Hitzevorbehandlung im Vordergrund. Dazu wurden die Schnitte in eine Plastikküvette, die 10mM Citratlösung enthielt, gestellt und mithilfe eines Dampfgarers (Steamer) für 35min auf etwa 100°C erhitzt. Anschließend wurden diese Schnitte in kaltem Leitungswasser abgekühlt.

3.3.2. LSAB-Methode (Labeled Strept Avidin-Biotin-Methode)

Bei der Labeled Strept Avidin-Biotin-Methode macht man sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Tetramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin. Das Molekulargewicht beträgt 68 kDa. Ziel dieser Methode ist die Immunhistochemische Färbung der vorbehandelten Schnitte mit alkalischer Phosphatase im DAKO-Autostainer.

Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, jedoch binden in der Regel weniger als vier Biotinmoleküle. Bei dieser Methode wird ein biotinylierter Zweitantikörper benötigt, der zunächst an den Primärantikörper bindet und an dessen Biotin dann auch enzymmarkiertes (hier: alkalische Phosphatase) Avidin binden kann. Die alkalische Phosphatase des Avidin-Biotin-Komplexes wandelt dann hinzugefügtes Chromogen in einen roten Farbstoff um. Das Chromogen weist nur eine kurze HWZ von etwa 45min auf und muss nach dem Ansetzen möglichst schnell verarbeitet werden, um eine gute Farbintensität zu erreichen.

In dem DAKO-Autostainer wurden die Schnitte an vorgeschriebenen Positionen eingelegt und mit verdünntem Waschpuffer befeuchtet. Tabelle 4 zeigt die Vorbereitung der einzelnen monoklonalen Primärantikörper (p53, p63, p16, Mdm2, c-kit, Mib-1, EGFR, cerbB-2, Cyclin D1, CD 34, bcl-2) auf.

Antikörper	Firma	Clone	Verdünnung	Antigen Retrieval	Nachweis
p53	DAKO	DO-7	1:2000	Steamer	LSAB
P63	DAKO	4A4	1:100	Steamer	LSAB
Mdm2	DAKO				LSAB
erbB-2	DAKO		1:4000	Steamer	LSAB
Cyclin D1	DAKO	G124-326	1:800	Steamer	LSAB
EGFR	DAKO	H11	1:5	Proteinase K	LSAB
c-kit	DAKO	CD 117	1:200	Wasserbad 1*	LSAB
Mib-1	DAKO	Mi 67	1:200	Wasserbad 2*	LSAB
CD34	DAKO	QB End 10	1:100	Wasserbad 1*	LSAB
bcl-2	DAKO	124	1:100	Wasserbad 1*	LSAB

1*Wasserbad: 96,6°C in Reh. Solution pH6,0

2*Wasserbad: 96,6 in Boral pH8,9

Diagramm 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei der LSAB-Methode

Anschließend wurde an den im Autostainer vorgesehenen Positionen etwa 200 µl des jeweiligen Primärantikörper (CK 5/6, CK 8/18, CK 14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, cerbB-2, Cyclin D1, ER, PR) aufgetragen und 25min inkubiert. Nach gründlichem Abspülen des Primärantikörpers mit verdünntem Waschpuffer, folgte die Inkubation mit dem Biotin-Antikörper (200 µl pro Schnitt) für 25min. Nach erneutem gründlichem Abspülen mit verdünntem Waschpuffer, erfolgte eine 25-minütige Inkubation mit Streptavidin (200 µl pro Schnitt), welches mit der alkalischen Phosphatase markiert war. Bevor die Enzymreaktion mit dem Chromogen für zweimal 25min ausgelöst wurde, musste nochmals mit Waschpuffer gespült werden. Nach dem Herausnehmen aus dem Autostainer wurden die Schnitte in Aqua dest. gefüllte Küvetten eingelegt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Meyer (etwa 3min) und dem anschließendem Bläuvorgang für 5min unter fließendem Leitungswasser. Nach dem Überführen in Aqua dest. und der aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils einmal 70%, 80%, 96%, 99%) wurden die Schnitte noch zweimal 8min in Xylol gegeben. Die Konservierung der Schnitte wurde mit Vitro Clud vorgenommen.

3.3.3. Rezepturen der verwendeten Lösungen

3.3.3.1. 10mM Citratlösung

Für die Citratlösung wurde zunächst eine „Stammlösung A“ aus 10,5g Citronensäuremonohydrat in 500ml Aqua dest. aufgelöst, wodurch eine 0,1M Citronensäure entstand. Anschließend wurde 0,1M Natriumcitrat (die sog. Stammlösung B) aus 29,41g Natriumcitrat-Dihydrat, aufgefüllt mit 1000ml Aqua dest. hergestellt.

Durch Mischen von 18ml Stammlösung A mit 82ml Stammlösung B und Auffüllen mit Aqua dest. auf 1000ml entstand die Gebrauchslösung 10mM Citratpuffer, der auf einen pH von 6,0 eingestellt wurde.

3.3.3.2. Waschpuffer

Der Waschpuffer der Firma DCS enthält 500ml 20fach konzentrierte Tris-Pufferlösung mit 0,09%igen Natriumazid. Zum Ansetzen einer gebrauchsfertigen Lösung wurden 500ml des 20fach konzentrierten Waschpuffers mit 10l deionisiertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde ein pH von 7,2 +/-0,2 eingestellt.

3.3.3.3. Biotin-Antikörper

Der Biotin-Sekundärantikörper (linked, biotinylated Secondary Antibodies AB2) stammte von der Firma DAKO Cytomation ChemMate™.

3.3.3.4. Streptavidin- Lösung

Das Streptavidin war gebrauchsfertig mit alkalischer Phosphatase markiert (DAKO Cytomation ChemMate™).

3.3.3.5. Chromogen-Lösung

Für das Anfärben von 24 Schnitten wurde 16ml Chromogenlösung verwendet. Diese bestand aus 7,25ml AP (=Alkalische Phosphatase), Substrate Buffer (DAKO Cytomation ChemMate™), 2,8µl Chromogen Red 1 (DAKO Cytomation

ChemMate™), 2,8µl Chromogen Red 2 (DAKO Cytomation ChemMate™) und 2,8µl Chromogen Red 3 (DAKO Cytomation ChemMate™). Zur Blockierung der endogenen Alkalischen Phosphatase des AP Substrate Buffer wurde noch ein Tropfen Levimasol (DAKO Cytomation ChemMate™) hinzugefügt.

3.4. Lichtmikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Präparate wurde an einem Axiophot-Mikroskop der Firma Zeiss in 10- und 20-facher Vergrößerung vorgenommen.

In der lichtmikroskopischen Auswertung wurde zu einem beurteilt, ob die Stanze ausgewertet werden konnte, und wenn dies möglich war, in welcher Intensität sich die Zellen anfärben ließen.

Antikörper	Kategorisierung der immunhistochemischen Marker				
	n	0	1	2	3
p53 p63 Mdm2 erb-B2 Cyclin D1 EGFR c-kit Mib-1 CD 34 bcl-2	eine Auswertung nicht möglich	keine Anfärbung der Zellen	schwache Anfärbung der Zellen	mittlere Anfärbung der Zellen	starke Anfärbung der Zellen

Tabelle 5: Beschreibung der Kategorisierung der immunhistochemischen Marker

4. Ergebnisse

4.1. Antikörper-Expression in der Gesamtheit der Chondrosarkome

Insgesamt sind Läsionen von 239 Patienten mit in die Auswertung eingegangen. Von den ausgesuchten Paraffinblöckchen sind pro Block in den meisten Fällen 3 Stenzen gemacht worden. Befand sich auf dem Block zwei interessante maligne Läsionen, sind in Ausnahmefällen auch sechs Stenzen pro Block gemacht worden. Somit sind insgesamt 800 Stenzen angefertigt worden.

Da Chondrosarkome relativ härter in ihrer eigentlichen Zusammensetzung sind als beispielsweise Lebergewebe, war es relativ schwierig die Stenzen herzustellen, und nachher am Mikrotom zu schneiden. Deswegen konnten leider einige Stenzen lichtmikroskopisch nicht mit in die Auswertung eingehen.

4.1.1. Die Expression des Tumorsuppressorgens p53

Bei dem Tumorsuppressorgen p53 konnten von 239 Läsionen 89 (37%) nicht ausgewertet werden. Bei 124 (52%) gelang keine Anfärbung. 12 Läsionen (5%) zeigten eine schwache Anfärbung, 9 (4%) zeigten eine mittlere, und 5 (2%) zeigten eine starke Anfärbung der Zellen.

4.1.2. Die Expression des Tumorsuppressorgens p63

Die Anfärbung der Zellen zum Nachweis des Tumorsuppressorgens p63 gelang nur in 2 Fällen (1,5%). In den anderen 137 Läsionen (98,5%) gelang es leider nicht.

4.1.3. Die Expression des Tumorsuppressorgens p16

Auch die lichtmikroskopische Auswertung von p16 war nur teilweise möglich. Bei 165 (69%) von 239 verschiedenen Läsionen war eine Auswertung nicht möglich. Bei 58 (24%) zeigte sich keine Anfärbung der Zellen. Bei 13 (5,5%) zeigte sich eine leichte, keine Läsion zeigte eine mittlere Anfärbung und 3 (1,5%) zeigte eine starke Anfärbung der Zellen.

4.1.4. Die Expression des Onkogens mdm2

Der Nachweis des Onkogens mdm2 gelang in 92 (38%) von 239 Läsionen nicht. In 101 Läsionen (42%) war eine Anfärbung der Zellen zum Nachweis von mdm2 nicht möglich. 21 (9%) zeigten eine leichte Anfärbung, 18 (8%) eine mittlere und in 7 Läsionen (3%) zeigte sich eine starke Anfärbung der Zellen.

4.1.5. Die Expression des Onkogens erb B2

Ein Nachweis in Form von einer Anfärbung der Zellen für das Onkogen erb B2 war leider nicht möglich. 63 (26%) der insgesamt 239 malignen Läsionen konnten nicht in die Auswertung mit aufgenommen werden. 176 (74%) der Läsionen färbten sich nicht an.

4.1.6. Die Expression des Onkogens Cyclin D1

Eine starke Anfärbung der Zellen zum Nachweis des Onkogens Cyclin D1 gelang in 4 malignen Läsionen (1,5%) von 239 Läsionen. In 6 Läsionen (2,5%) gelang eine mittlere Intensität in der Anfärbung der Läsionen, und in 15 Läsionen (6%) gelang eine schwache Anfärbung der Zellen. In 121 (51%) der Läsionen war keine Anfärbung nachweisbar, 93 Läsionen (39%) konnten nicht ausgewertet werden.

4.1.7. Die Expression des Wachstumsfaktors EGFR

50 (21%) der insgesamt 239 Läsionen konnten nicht ausgewertet werden. 183 (76,5%) zeigten keine Anfärbung. 5 (2%) zeigten eine leichte, keine eine mittlere, und 1 (0,5%) eine starke Anfärbung der Zellen.

4.1.8. Die Expression der Tyrosinkinase c-kit

Die Tyrosinkinase c-kit zeigte in 11 malignen Läsionen (5%) von insgesamt 239 Läsionen eine schwache Anfärbung der Zellen. In 140 (58%) zeigte sich keine Anfärbung, und in 88 (37%) Läsionen war eine Auswertung nicht möglich.

4.1.9. Die Expression von mib-1

17 (7%) von 239 Läsionen zeigte eine leichte Anfärbung der Zellen. In den restlichen 128 (54%) konnte keine Anfärbung nachgewiesen werden. 94 (39%) konnten nicht mit in die Auswertung aufgenommen werden.

4.1.10. Die Expression des Antigens CD34

76 (32%) Läsionen von 239 konnten nicht mit in die Auswertung aufgenommen werden. 160 maligne Läsionen (67%) zeigten keine Anfärbung. Lediglich 3 (1%) der Läsionen zeigte eine leichte Anfärbung der Zellen.

4.1.11. Die Expression von bcl-2

73 (31%) von 239 malignen Läsionen gingen nicht mit in die Auswertung ein. In 163 (68%) zeigte sich keine Anfärbung der Zellen, und nur in 3 (1%) der Läsionen zeigte sich eine leichte Anfärbung der Zellen.

4.1.12. Auflistung der Antikörper- Expression in den einzelnen Läsionen in Form von Prozentwerten

	n	0	1	2	3
p53	37%	52%	5%	4%	2%
p63	98%	0%	1,5%	0%	0%
p16	69%	24%	5,5%	0%	1,5%
Mdm2	38%	42%	9%	8%	3%
erbB2	26%	74%	0%	0%	0%
Cyclin D1	39%	51%	6%	2,5%	1,5%
EGFR	21%	76,5%	2%	0%	0,5%
c-kit	37%	58%	5%	0%	0%
mib1	39%	54%	7%	0%	0%
cd34	32%	67%	1%	0%	0%
bcl-2	31%	68%	1%	0%	0%

Tabelle 6: Prozentwerte der einzelnen malignen Läsion

n: eine Auswertung war nicht möglich

0: keine Anfärbung der Zellen

1: schwache Anfärbung der Zellen

2: mittlere Anfärbung der Zellen

3: starke Anfärbung der Zellen

4.2. Skelettllokalisierung des Chondrosarkoms

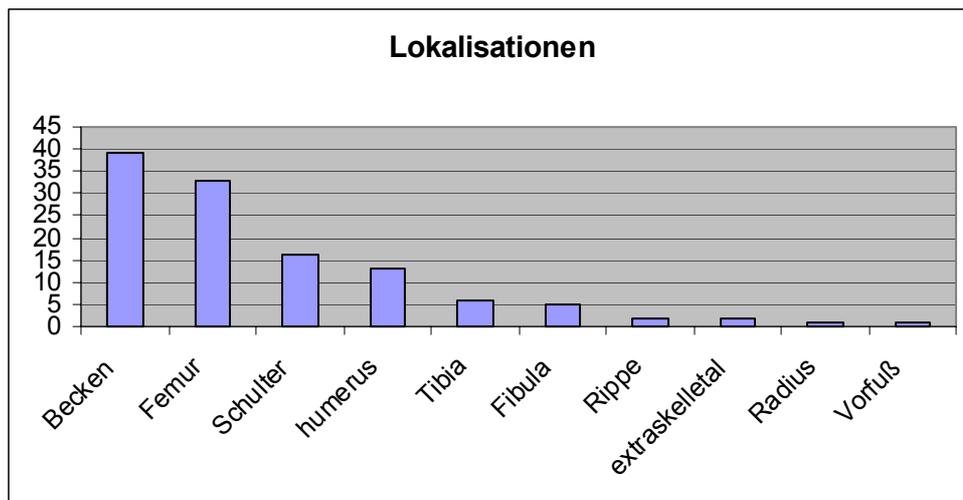


Diagramm 8: Lokalisation der Chondrosarkome bei den Patienten, die mit in die Auswertung aufgenommen worden sind

Lokalisation

Becken	33,50%
Femur	28,50%
Schulter	14%
Humerus	11%
Tibia	5%
Fibula	4%
Extraskelletal	2%
Radius	1%
Vorfuß	1%

4.3. Aufteilung in das männliche und weibliche Geschlecht bei den Chondrosarkomen.

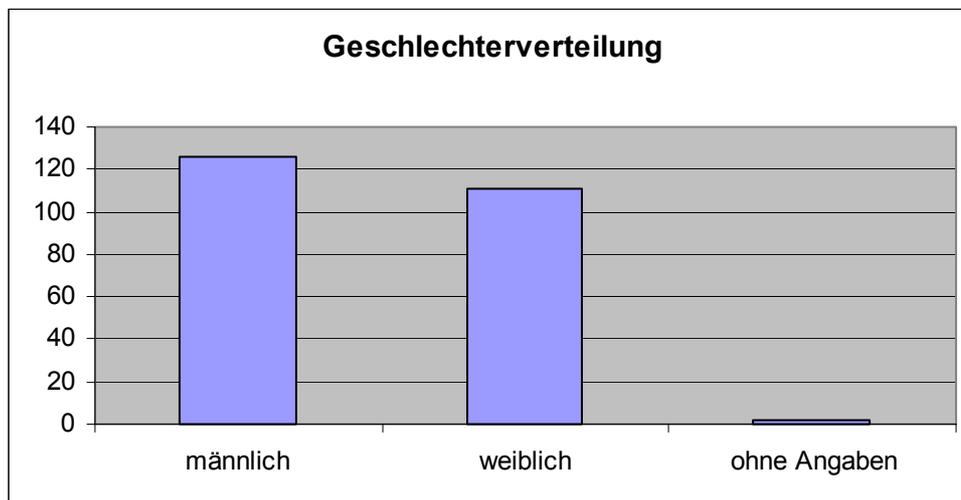


Diagramm 7: Geschlechtsverteilung der Patienten mit Chondrosarkom, die mit in die Auswertung aufgenommen worden sind

<u>Geschlecht</u>	
männlich	53%
weiblich	47%

5. Diskussion

Ätiologisch sind die primären Chondrosarkome bis heute ungeklärt. Reproduzierbare Einflüsse durch Umweltfaktoren, ionisierter Strahlung oder genetische Faktoren sind nur in Ausnahmefällen nachweisbar. Immunhistochemische Untersuchungen sollen bei der Aufklärung helfen und eventuell Ansätze liefern, wie das Chondrosarkom besser behandelt werden kann. Chemotherapeutika und auch die Strahlentherapie sind wenig bis gar nicht wirksam, die einzigste kurative Therapie besteht bis heute in der radikalen chirurgischen Resektion. Da der Tumor aber häufig an Prädilektionsstellen des Körpers entsteht, wie z.B. das Becken, sind manchmal radikale Resektionen nicht durchführbar. Deshalb erhofft sich unter der Erkenntnis der verschieden regulierten Gene für Signalwege, Rezeptorkomplexe und Apoptosewege, neue Therapieansätze zu finden (Horn et al. 59-50). Die immunhistochemischen Marker wie z.B. p53, p16 und EGFR die weiter oben ausführlich behandelt worden sind, sind Bestandteil dieser Wege, oder greifen in diesen Prozess ein. Aufgrund der Möglichkeit der immunhistochemischen Anfärbung der verschiedenen Marker in entsprechenden Präparaten besteht die Möglichkeit Expressionsmuster der malignen Läsionen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, um somit Rückschlüsse auf die Ätiologie zu gewinnen.

In dieser Studie wurde die Expression der verschiedenen immunhistochemischen Marker mithilfe monoklonaler Antikörper in Chondrosarkomen bestimmt.

Da Chondrosarkome relativ härter in ihrer eigentlichen Zusammensetzung sind, als beispielsweise Lebergewebe, war es relativ schwierig die Stenzen herzustellen, und nachher am Mikrotom zu schneiden. Deswegen konnten leider einige Stenzen lichtmikroskopisch nicht mit in die Auswertung einfließen.

Chemotherapeutika und Strahlentherapie sind beim Chondrosarkom wenig bis gar nicht wirksam. Deswegen sind neue Therapiestrategien, die auf molekularpathologischen Gegebenheiten des Tumors gründen eine andere Option, und sollten in dieser Arbeit eventuell neue Ansätze liefern.

In Kapitel 4 sind schon ausführlich die Ergebnisse der einzelnen immunhistochemischen Untersuchungen aufgelistet worden. Leider konnten in der Antikörper-Expression der einzelnen Läsionen Biomathematisch keine signifikanten Werte erhoben werden. Somit konnte leider kein Marker spezifisch für die des

Chondrosarkoms identifiziert werden. Es konnte des Weiteren auch kein bestimmter Marker eines bestimmten Chondrosarkomsubtyps (mesenchymalen-, periostalen-, und Klarzellchondrosarkom) zugeordnet werden.

Auch sollte untersucht werden, dass wie auch aus anderen Literaturen bekannt, die Überlebensrate signifikant mit dem Grading des Tumor in Zusammenhang steht. Auch hier konnte leider keine eindeutige Aussage getroffen werden. Eine mögliche Annahme dazu besteht darin, dass man zu dem Grading immer noch die Operabilität mit in Betracht ziehen muss. Viele Tumoren sind operativ schwierig lokalisiert, sodass sie nicht selten die Resektionsränder im Präparat nicht frei waren. Das gleiche gilt auch für die Rezidivrate. In dieser Auswertung kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches der Chondrosarkome die höchste bzw. niedrigste Rezidivrate hat, bzw. von welchen Parametern diese abhängig ist. Das gleiche gilt auch für die Metastasierungsrate.

Kreicbergs und Mitarbeiter (Kreicbergs et al. 390- 1/ 121-3) fanden eine schlechte Prognose bezüglich des Rezidivverhaltens bei zytometrisch aneuploiden Chondrosarkomen; allerdings wurde diese Untersuchung nicht an zytologischen Präparaten durchgeführt, so dass dieser Befund noch der Bestätigung bedarf.

Auch eine generelle Unterscheidung zwischen dem mesenchymalen-, periostalen-, und Klarzellchondrosarkom in Bezug auf das mediane Überleben, oder etwaigen anderen Expressionsmuster in der Immunhistochemie konnte aufgrund der zu geringen auszuwertenden Präparaten nicht getroffen werden. Das dedifferenzierte Chondrosarkom zeigte in der mikroskopischen Auswertung aufgrund seiner zweiteiligen malignen Läsion interessante Ansätze in der Immunhistochemie. Da es sich aber leider um einen sehr seltenen Tumor handelt, erbrachte die Fallzahl von 14 Patienten keine Signifikanz. Was jedoch zu beobachten war, dass das dedifferenzierte Chondrosarkom bei fast allen Makern häufig positiv war.

In einer Arbeit von Rozeman (Rozeman et al. 25-1) wurden verschiedene Marker im Hinblick auf die Entstehung eines Chondrosarkoms hin untersucht. In dem Ergebnis zeigte sich, dass hinsichtlich des Entstehungsmechanismus das Chondrosarkom in zentrale und periphere Chondrosarkome unterschieden werden muß. Für die weitaus häufigeren zentralen Chondrosarkome sind auch hier keine spezifischen Marker gefunden worden. Jedoch zeigte sich, dass bei der Entstehung vom Osteochondrom zum sekundären niedrig malignen peripheren Chondrosarkom BCL2 eine entscheidende Rolle spielt.

Wie schon erwähnt ist die Therapie der Wahl die Chirurgie. Dabei ist das chirurgische Vorgehen nicht nur vom histologischen Grad der Läsion, sondern auch von den lokalen Verhältnissen abhängig zu machen. Insbesondere von der Frage, ob die Kompakta beteiligt ist, und der Tumor in die benachbarten Weichgewebe penetriert (Campanacci et al. 387-1). Schajowicz (1994) empfiehlt für die histologischen Grade I und II eine Tumorsektion, kombiniert mit prothetischem oder Knochenersatz. Für den histologischen Grad II und bei einer Kompaktabeteiligung (auch bei Grad I und II) bevorzugt die Amputation oder Exartikulation.

Prognostische Faktoren, insbesondere im Hinblick auf die Beziehung zwischen Histologie und biologischem Tumorverhalten, wurden von Evans et al. (1977) an 71 Fällen eines Chondrosarkoms untersucht. Die Fünfjahresüberlebensrate betrug für den histologischen Grad I 90%, für den Grad II 81% und für den Grad III 29%. In anderen Untersuchungsserien war die Fünfjahresüberlebensrate weniger günstig und variierte von 48,6% (McKenna et al. 48-1) bis zu 61% (Henderson und Dahlin 1450-45). Die letzte Auswertung der SEER-Daten (Dorfmann u. Czerniak 203) zeigte eine Fünfjahresüberlebensrate für alle Chondrosarkome von 72,7% bezogen auf den Zeitraum 1973-1987, wobei kein Trend zur Verbesserung der Prognose im Auswertungszeitraum erkennbar wurde. Die Zehnjahresüberlebensrate liegt allgemein bei etwa 40% (Henderson u. Dahlin 1450-45).

Grundsätzlich gilt, dass sich die Prognose umso besser gestaltet, je kleiner der Tumor und je besser die histologische Differenzierung ist, je radikaler die Resektion mit tumorfreien Resektionsrändern ausfällt (Shet et al. 745-78) und je niedriger der DNA/zytoplasmatische Quotient in der Flußzytometrie liegt (Marcove et al. 561-54).

6. Zusammenfassung

Das Chondrosarkom ist ein seltener Knochentumor. Die bis jetzt einzigste kurative Therapie besteht in der radikalen Chirurgischen Intervention. Strahlentherapie und Chemotherapie sind nur mäßig bis gar nicht wirksam.

Das Gerhard-Domagk- Institut für Pathologie der Universitätsklinikums Münster besitzt ein in Europa größtes Knochengeschwulstregister, wo die Knochentumoren der letzten Jahrzehnte gelagert werden.

Neue Therapiestrategien, die auf molekularpathologischen Gegebenheiten des Tumors gründen, sollen neue Optionen in der Therapie des Chondrosarkoms aufzeigen. Unter der Erkenntnis der verschiedenen regulierten Gene für Signalwege, Rezeptorkomplexe und Apoptosewege, wo jeweils viele verschiedene Tumorsuppressorgene, Onkogene oder Wachstumsfaktoren eingreifen können, stellt eine neue Option dar. Diese immunhistochemischen Marker, sind Bestandteil dieser Wege, oder greifen in diesen Prozess ein. Aufgrund der Möglichkeit der immunhistochemischen Anfärbung der verschiedenen Marker in entsprechenden Präparaten besteht die Möglichkeit Expressionsmuster der malignen Läsionen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, um somit Rückschlüsse auf die Ätiologie zu gewinnen.

In dieser Arbeit sind Chondrosarkome von 239 Patienten aus den Jahren 1988 bis 2005 immunhistochemisch untersucht worden.

An Markern sind benutzt worden z. B. die Tumorsuppressorgene p53, p63 und p16, die Onkogene mdm2 (murine double minute gene), CyclinD und erbB2, der Wachstumsfaktor EGFR (Epidermal growth factor receptor), die Tyrosinkinase c-kit und Mib-1, sowie das Antigen CD34 und Apoptosehemmer bcl-2.

Die zu anfangs generelle Auswertung der Patienten in Hinsicht auf Die Geschlechterverteilung und die Lokalisation des Tumors spiegeln die bisher bekannten Literaturdaten wider. In unserer Auswertung waren 47% der Patienten weiblich und dementsprechend 53% der Patienten männlich. Die Hauptlokalisation war mit 33,5% das Becken, gefolgt mit 28,5% der Femur. Die Schulter ist mit 14% betroffen und der Humerus mit 11%. Alle anderen Lokalisationen sind vergleichsweise selten.

Die anschließend lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch aufbereiteten Schnitte war teilweise limitiert, da viele Gewebeschnitte aufgrund ihrer Knochen-/Knorpelsubstanz nicht ausgewertet werden konnte.

Die folgende biomathematische Auswertung erbrachte leider in allen durchgeführten Konstellationen entweder keine Signifikanz oder eine zu geringe Fallzahl.

Dementsprechend konnten Überlegungen, dass bestimmte Marker in den Entwicklungsprozess der Chondrosarkome eingreifen, bzw spezifisch dafür sind, nicht ausreichend belegt werden. Lediglich das dedifferenzierte Chondrosarkom bietet interessante Ansätze, und zeigte häufig eine pos. Anfärbung bei bestimmten Markern, bei einer zu geringen Fallzahl aber leider keine Signifikanz. Somit ist das histopathologische Grading immer noch entscheidend zur Einstufung des Chondrosarkoms, und zusammen mit der Operabilität, der einzige Prognosefaktor in Hinblick auf die Überlebensrate.

Auch in klinischer Hinsicht konnte eine Aussage in der Unterscheidung der unterschiedlichen Chondrosarkomen (mesenchymal-, perostal-, dedifferenziert- und Klarzellchondrosarkom) in Bezug auf Wachstumsverhalten und Rezidivrate wegen einer zu geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

Somit bleibt nach neusten Erkenntnissen die einzig kurative Therapie des Chondrosarkoms die rechtzeitige Diagnosestellung und die vollständige operative Resektion des Tumors.

Literaturverzeichnis

Bertoni, F. et al. „Chondroacoma“
Bone tumors (2005): 252-247

Böcker, W. et al. „Knochentumoren“
Pathologie 3-437-42380-0 (2001):982-957

Böcker, W. et al. „Zell und Gewebsreaktionen“
Pathologie 3-437-42380-0 (2001): 68-36

Böcker, W. et al. „Allgemeine Tumorpathologie“ Pathologie
3-437-42380-0 (2001): 211-164

Bubendorf, L. et al. „Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology
Archives for high- throughput in situ studies“ J. Pathol. 195.1 (2001): 79-72

Bürger, H. „Spezielle Pathologie maligner Knochetumoren“ Tumoren und
Tumorähnliche Erkrankungen 3-13-126181-1 (2005): 125-103

Campanacci. A. et al. „Chondrosarcoma“ A study of 133 cases, 80 with
Longterm follow-up. Ital J Orthop Traumatol (1975) 387-1

Celli, J. et al. „Heterozygous germ line mutations in the p53 homolog p63 are
The cause of EEC syndrome“ Cell 99 (1999): 153-143

Civin, C.L. et al. „Antigenic analysis of hematopoiesis III“ J. Immunol. 133
(1984): 157-65

Dahlin, DC „Bone tumors“ 3rd edn. Thomas Springfield (1978)

Dorfmann, H.D. , Czerniak, B. „ Bone cancers“ Cancer 75 (1994) : 203

Dötsch, V. „p63-Ein neuer Wächter des Genoms“ Frankfurter Zeitung

Thema Forschung (2005): 55-53

Evans, EL. Et al. „Prognostic factors in chondrosarcoma of bone“ A clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. Cancer (1972): 808-40

Fajac, A. et al. „c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis“ Int J Cancer 64 (1995): 146

Fennell, D., A. „Apoptosis: molecular physiology and significance for cancer therapeutics“ Cellular and Molecular Biology of Cancer 0-19-856853-3 (2006): 226-210

Ferbeyre, G. et al. „The prices of tumor suppression?“ Nature 415, (2002) 27-26

Freyschmidt, J. et al. „Chondrosarkome“ Knochtumoren (2003) : 359

Gebhardt, F., H. Burger, and B. Brandt. "Modulation of EGFR gene transcription by a polymorphic repetitive sequence--a link between genetics and epigenetics." Int.J.Biol.Markers 15.1 (2000): 105-10.

Gerdes, J. et al. "Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues." J.Pathol. 168.1 (1992): 85-86.

Gullick, W.J. "The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer." Int J Cancer Suppl 5 (1990): 55

Hainhaut, P. et al. „25 years of p53 research“ Kluwer Academic Publishers (2005): 1-4020-2920-9

-
- Haley et al. „Oncogene“ Res. 1 (1987): 396-275
- Henderson, ED. Et al. „Chondrosarcoma of bone.“ A study of two hundred and eighty-eight cases. J Bone Joint Surg (1963): 1450-45
- Hockenbery, D. et al. „Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks Programmed cell death“ Nature 348.6299 (1990): 334-36
- Höfler, H. et al. „Enzymatische Demaskierung“ Praxis der Immunhistochemie 3-437-45526-5 (2000): 43-40
- Horn, C. et al. „Maligne Knochentumoren“ Orthopädie& Rheuma 2-2006 (2006): 59-50
- Hölzel, M. et al. „Mammalian WDR12vis a novel member of the Pes1-Bop1 Complex and required for ribosome biogenesis and cell proloferation“ J.Cell Bio. 170 (2005): 378-367
- Hölzel, M. et al. „Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of Productive cell cycles“ EMBO Reports,2, (2001): 1132-1125
- Ishii et al. „Proc. Natl. Acad. Sci.“ USA 82 (1985): 4924-4920
- Kalil, R. et al. „Ewing Sarcoma“ Bone tumors (2005): 274-273
- Khurana, J. et al. „Osteochondroma“ bone tumors (2005): 136-134
- Kononen, J. et al. „Tissue microarrays for highthroughput moleular profiling Of tumor specimens“ Natural Medicine 4(7) (1998): 844-7
- Kondo et al. „Cytogenetic“ Cell Genet. 35 (1983): 14-9
- Kreicbergs, A., Slezak, E., Söderberg, G.: „ The prognostic significance of different histomorphologic features in chondrosarcoma.“ Virchows Arch (1981) :390-1

Kreichberg, A., Cewrien, G., Tribukeit, B. et al.: "Comparative single cell and flow DNA analysis of bone sarcoma." Analyt Quant Cytol (1981): 121-1

Lain, S. et al. „Tumor suppressor genes“ Cellular and Molecular Biology of Cancer 0-19-856853-3 (2006): 154-136

Lane, D.P. „Cancer. P53 guardian of the genome“ Nature 358 (1992): 16-15

Lane, D.P. et al. „T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed Cells“ Nature 278 (1979): 263-261

Linzer, D. I. et al. „Characteration of a 54 K dalton SV 40 tumor antigen present In SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells“ Cell 17 (1979): 52-43

Ludwig, K. et al. „Radilogische Diagnostik von Knochentumoren“ Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen 3-13-126181-1 (2005) 42-20

Lucas, D. et al. „Chondromas“ bone tumors (2005): 240-237

Marcove, RC. Et al. „Chondrosarcoma of the pelvis and upper end of the femur.“ J Bone Joint Surg (1972): 561-54

Mason, D. et al. „Leucocyte Typing VII“ white celldifferentiation antigens Oxford University Press (2002)

McCarthy, E.F. et al. „Clear cell chondrosarcoma“ bone tumors (2005): 258-257

McKenna, R. J. et al. „Sarcomata of the osteogenic series“ An analysis of 552 cases. J Bone Joint Surg (1966): 48-1

Milchgrub, S. et al. „dedifferentiated chondrosarcoma“ bone tumors (2005): 254-252,

Nakashima, Y et al. „Mesenchymal Chondrosarcoma“ bone tumors (2005) 256-255

Niethard, F. et al. „Tumoren“ Orthopädie 3-13-130815-x
(2005): 253-226

O`Brien , S.G. et al. „Imatinib compared ith interferon and low-dose cytarabine
For newly diagnosed chronic-phase myeloid leukemia“
N Engl J 12637609 (2003): 1004-994

Oliner, J.D. et al. „Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in
Human sarcomas.“ Nature 358 (1992):80

Packeisen, J. et al. „ Demystified... tissue microarray technology“ Mol. Pathol. 56.4
(2003): 2004-198

Raymond, A. et al. „Conventional osteosarcoma“ bone tumors (2005): 271-264

Rozeman, Leida B. et al. „Molecular profiling of solitary and Ollier disease-related
Central chondrosarcomas“ (2005): 25-1

Ponder, B. „Genetic testing for cancer risk.“ Science 278 (1997) 1050

Pritzl, T. et al. „Chondrosarkom“ Leitlinien Orthopädie 033/036
(2002): 15-1

Schajowicz, F. „Chondrosarkom“ Tumor and Tumorlike Lesions of Bone
Springer Berlin (1994):3-1

Schlosser, I. et al. „Dissection of transcriptional programmes in response to serum
And c-Myc in human B cell line“ Oncogene 24 (2005): 524-520

Schlosser, I. et al. „A role of c Myc in the regulation of ribosomal RNA
Processing“ Nucleic Acids Res. 31 (2003): 6156-6148

-
- Schumacher, M. et al. „The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc“ Nucleic Acids Res. 29 (2001): 406-397
- Serber, Z. et al. „A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by intramolecular mechanism“ Mol. Cell. Biol. 22 (2002): 8611-8601
- Shet, DS. Et al. „Chondrosarcoma of the pelvis.“ Cancer (1996): 745-78
- Sherr, C.J. „The INK4a/Arf network in tumor suppression“ Nat Rev Moll cell Biol 2 (2001): 731-7
- Sherr, C.J. et al. „ The RB and p53 pathway in cancer“ Cancer Cell 2 (2002): 103-12
- Sherr, D. et al. „Molecular cytogenetics of cancer“ Cellular and Molecular Biology of Cancer 0-19-856853-3 (2006): 113-95
- Sidransky, D. „Nucleic acid-based methods for the detection of cancer.“ Science 278 (1997): 1054
- Soussi, T. et al. „Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review.“ Int J Cancer 57 (1994) 1
- Spjut, H.J. et al. „Tumors of bone and cartilage“ Atlas of tumor pathology 5. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC (1971)
- Stein, H. et al. "Immunohistological analysis of Hodgkin's and Sternberg-Reed cells: detection of a new antigen and evidence for selective IgG uptake in the absence of B cell, T cell and histiocytic markers." J.Cancer Res.Clin.Oncol. 101.1 (1981): 125-34.
- Tsujimoto, Y. et al. „Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the (14;18) chromosome translocation“ Science 226.4678

(1984): 1097-99

Torhorst, J. et al. „Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to Clinical endpoints“ Am J. Pathol. 159.6 (2001): 2249-56

Yang, A. et al. „p63, ap53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with Transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities“
Molecular Cell 2 (1998) 316-305

Yang, A. et al. „p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and Epithelial development“ Nature 398 (1999): 718-714

Wang et al. „Jpn. J. Hum. Genet.“ Genetic 28 (1993): 406-399

Wagener, C. „Molecular diagnostics.“ J Mol Med 75 (1997) 728

Winkelmann, W. et al. „Allgemeine Pathologie der Knochentumoren und Tumorartigen Läsionen“ Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen 3-13-126181-1 (2005): 20-5

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konventionelles Chondrosarkom : bevorzugte Skelettorte, Alters- und Geschlechtsverteilung.....	7
Abbildung 2: Konventionelles Chondrosarkom: Tumor re. Femur.....	9
Abbildung 3: Konventionelles Chondrosarkom: Tumor proximale Fibula.....	9
Abbildung 4: Chondrosarkom des Humerus eines 60 jährigen Mannes.....	10
Abbildung 5: G1 Chondrosarkom des Beckens einer 39 jährigen Frau.....	10
Abbildung 6: Gerät zur Herstellung der Tissue Arrayer`s.....	28
Abbildung 7: Gerät zur Herstellung der Tissue Arrayer`s	28
Abbildung 8: Grad 1 Chondrosarkom: Bei starker Vergrößerung werden die Variation der Kernformen und der Hyperchromasie klar sichtbar.....	14
Abbildung 9: Grad 2 Chondrosarkom: mäßig gesteigerter Zellreichtum Herdförmige myxoide Grundsubstanzveränderungen.....	14
Abbildung 10: Grad 3 Chondrosarkom: Unregelmäßig verteilte Zellen mit Betonter Kernpleiomorphie. Zahlreiche 2- und 3kernige Zellen.....	14

9 Tabellen-/Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Verteilung der häufigsten gutartigen Tumoren.....	1
Diagramm 2: Verteilung der häufigsten malignen Tumoren.....	2
Diagramm 3: Tumorsuppressorwege.....	20
Diagramm 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei der LSAB-Methode.....	31
Tabelle 5: Beschreibung der Kategorisierung der Immunhistochemischen Marker	33
Tabelle 6: Prozentwerte der einzelnen malignen Läsionen.....	36
Diagramm 7: Geschlechtsverteilung der Patienten mit Chondrosarkom, die mit in die Auswertung aufgenommen worden sind.....	38
Diagramm 8: Lokalisation der Chondrosarkome bei den Patienten, die mit in die Auswertung aufgenommen worden sind.....	37

Danksagung

Meinen herzlichen Dank gilt Prof. Dr. H. Bürger, der das Thema dieser Arbeit vorgeschlagen und zur Verfügung gestellt hat. Er stand mir während des Verlaufs der gesamten Arbeit mit seiner Erfahrung und mit seinem Wissen hilfreich und kompetent zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Streitbürger bedanken, der mir die nötigen Patientendaten zur Verfügung gestellt hat, und mich in der biomathematischen Auswertung maßgeblich unterstützt hat.

Meinen herzlichen Dank gilt den MTA`s des Gerhard-Domagk- Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster, die mir bei vielen Arbeitsschritten hilfreich und unterstützend zur Seite standen.

Ich danke meinen Eltern, dass Sie mir immer die nötige Freiheit und Unterstützung in allen meinen Handlungen gegeben haben.

Lebenslauf

