

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard- Domagk- Institut für Pathologie
- Kommissarische Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Köhler -

**Immunhistochemische und molekularpathologische Charakterisierung
von Rhabdomyosarkomen**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von Lipps, Christiane Waltraud
aus Ibbenbüren

2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Köhler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ullrich Spiegel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Gerhard- Domagk- Institut für Pathologie

Kommissarische Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Köhler

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Köhler

Koreferent: Prof. Dr. med. Ullrich Spiegel

Zusammenfassung

**Immunhistochemische und molekularpathologische Charakterisierung von
Rhabdomyosarkomen**

Lipps, Christiane Waltraud

Rhabdomyosarkome sind im Kindesalter die häufigsten Weichteilmalignome. Sie werden in den embryonalen, alveolären und pleomorphen Subtyp unterteilt.

In dieser Arbeit wurden die Klinik, die Morphologie und die Molekularpathologie dieser malignen Erkrankung näher untersucht. Auch wurden Antikörper, die bisher nicht zur obligaten diagnostischen Strategie gehörten, bzgl. ihrer Aussagekraft überprüft. Zudem wurde die bisher angewandte konventionelle Färbetechnik mit der Technik des Tissue Microarray verglichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Literaturangaben bzgl. der Geschlechtsverteilung und der Lokalisationspräferenz der einzelnen Subtypen decken. In Bezug auf die Altersverteilung der embryonalen Rhabdomyosarkome decken sich die Literaturangaben mit der hier vorliegenden Arbeit nicht vollständig. Diese Arbeit zeigt eine deutliche Präferenz der Altersklasse bis 5 Jahre, wohingegen laut der Literatur die embryonalen Rhabdomyosarkome vor allem im Alter zwischen 5 – 8 Jahren anzutreffen sind.

Insgesamt zeigt sich in dieser Studie eine deutliche Übereinstimmung der konventionellen Färbemethode mit dem Tissue Microarray. Aufgrund der sehr kleinen Stanzproben und möglicher, technisch bedingter Gewebsverluste, sollte bei Verwendung eines Tissue Microarrays jeder Fall mehrfach präsentiert sein.

Bei den immunhistochemischen Färbungen zeigen sich deutliche Übereinstimmungen der konventionellen Methode mit dem Tissue Microarray.

Die Rhabdomyosarkome wurden mittels Antikörper gegen CD 117, VEGF und EGFR untersucht. Es fand sich in allen drei Subtypen eine ausgeprägte Positivität, so dass sich diese Antikörper mit therapeutischer Relevanz möglicherweise für eine klinisch-therapeutische Behandlung des Rhabdomyosarkoms zukünftig einsetzen lassen.

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung.....	1
2.	Klinik, Morphologie und Molekularpathologie des Rhabdomyosarkoms	3
2.1.	Embryonales Rhabdomyosarkom.....	4
2.1.1.	Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)	5
2.1.2.	Lokalisation und klinische Symptomatik	5
2.1.3.	Makroskopie und Histologie.....	6
2.1.4.	Immunhistochemie.....	8
2.1.5.	Molekularpathologie.....	9
2.1.6.	Prognose.....	9
2.2.	Alveoläres Rhabdomyosarkom.....	9
2.2.1.	Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)	9
2.2.2.	Lokalisation und klinische Symptomatik	10
2.2.3.	Makroskopie und Histologie.....	10
2.2.4.	Immunhistochemie.....	10
2.2.5.	Molekularpathologie.....	11
2.2.6.	Prognose.....	12
2.3.	Pleomorphes Rhabdomyosarkom	12
2.3.1.	Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)	12
2.3.2.	Lokalisation und klinische Symptomatik	13
2.3.3.	Makroskopie und Histologie.....	13
2.3.4.	Immunhistochemie.....	14
2.3.5.	Molekularpathologie.....	14
2.3.6.	Prognose.....	15
3.	Fragestellung der Arbeit	16
4.	Material und Methoden	17
4.1.	Histologie und immunhistochemische Untersuchung	17
4.1.1.	Tissue Microarray	17

4.1.2.	Entparaffinierung	18
4.1.3.	Antigen- Demaskierung	18
4.1.4.	Immunhistochemie	19
4.2.	Molekularpathologische Untersuchung	20
4.2.1.	RNA- Gewinnung aus Paraffinmaterial	20
4.2.2.	GAPDH- Bestimmung aus Paraffin- RNA	22
4.2.3.	Nachweis der PAX 3/ FKHR- bzw. PAX 7/ FKHR- Fusions- mRNA in alveolären Rhabdomyosarkomen	22
4.2.4.	Polyacrylamidgel und Visualisierung mittels Silberfärbung	23
5.	Ergebnisse	24
5.1.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Geschlechtsverteilung	24
5.2.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Subtypen	27
5.3.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Lokalisation	28
5.4.	Untersuchungsergebnisse bzgl. des Alters	31
5.5.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Verlaufsbeurteilung	34
5.6.	Vergleich der konventionellen Färbemethode mit dem Tissue Microarray	35
5.7.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Immunhistochemie	40
5.8.	Untersuchungsergebnisse bzgl. der Molekularpathologie	66
6.	Diskussion	67
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Anhang	75
8.1.	Antikörper	75
8.2.	Tabelle immunhistochemisch und molekularpatologisch verwandter Fälle	77
9.	Abbildungsverzeichnis	85
10.	Lebenslauf	86
11.	Danksagung	88

1. Einführung

Bei 6,5% aller kindlichen malignen Neuerkrankungen im Jahr handelt es sich um ein Weichteilsarkom, von denen 61% der Patienten mit einem Rhabdomyosarkom betroffen sind (Speer, 2005). Rhabdomyosarkome stellen die häufigsten Weichteilmalignome im Kindesalter dar (Böcker, 2004) und treten vorwiegend in der Kindheit aber auch im Erwachsenenalter auf, wobei sie bevorzugt das männliche Geschlecht betreffen (Remmele, 1997). In der Regel ist das Rhabdomyosarkom ein vom quergestreiften Muskel ausgehender hochmaligner Tumor (Imbach, 2004).

Zu 26% wird ein Lokalisationsschwerpunkt im Kopf- und Halsbereich vorgefunden - wobei die Orbita alleinig mit 9% vertreten ist, welcher zu 22% vom Urogenitaltrakt und zu 18% von den Extremitäten gefolgt ist. Diesen Lokalisationen schließen sich dann mit geringen Prozentzahlen die übrigen Lokalisationen wie z. B. der Stammbereich und das Retroperitoneum an (Imbach, 2004).

Die Erkenntnis über das Rhabdomyosarkom hat in den letzten Jahrzehnten dank intensiver Forschung und der dadurch erreichten sichereren morphologischen Zuteilung zu einer stadiengerechten Behandlung in randomisierten Studien geführt und so dessen Behandlung und somit auch die Chancen des einzelnen Patienten erheblich verbessert. Dadurch liegt die Prognose heutzutage bei 80% im Gegensatz zu 24% in den Zeiten vor Einführung der Chemo- und Radiotherapie (Imbach, 2004).

Nach der aktuellen WHO- Klassifikation wird das Rhabdomyosarkom in die Subtypen embryonal (53- 64%), alveolär (21%) und pleomorph, welche nur zu einem Prozent im Kindesalter vertreten ist, eingeteilt (Imbach, 2004). Lediglich das alveoläre Rhabdomyosarkom kann durch eine molekularpathologische Besonderheit – der Translokation $t(1;13)$ oder $t(2;13)$ – von der embryonalen bzw. der pleomorphen Unterart abgegrenzt werden.

In der hier vorgestellten Studie wurden an einem großen Kollektiv zum einen Klinik, Morphologie und Molekularpathologie des Rhabdomyosarkoms näher untersucht und zum anderen sowohl die der Standarddiagnostik zugehörigen immunhistochemischen Untersuchungen mittels Antikörpern als auch bislang nicht der Standarddiagnostik zugehörige Antikörper bezüglich ihrer Aussagekraft zur Unterscheidung pleomorpher von embryonalen

und auch alveolären Rhabdomyosarkomen überprüft, um so die diagnostische Zuordnung anhand der immunhistochemischen Untersuchung zu bestätigen.

2. Klinik, Morphologie und Molekularpathologie des Rhabdomyosarkoms

Bei den Rhabdomyosarkomen handelt es sich um seltene Weichteiltumoren. Die Unterteilung dieser Tumoren erfolgt in einen embryonale, einen alveolären und einen pleomorphen Subtypen, wobei die einzelnen Subtypen Unterschiede bezüglich ihrer Lokalisation und auch der Häufigkeit ihres Auftretens in den verschiedenen Altersstufen zeigen, auf die nachfolgend bei den einzelnen Typen näher eingegangen werden soll. Zunächst sollen jedoch einige Gemeinsamkeiten der drei makroskopischen Arten aufgezeigt werden.

Bis zum gegenwärtigen wissenschaftlichen Stand sind keine bestimmten Noxen bekannt, die ein Rhabdomyosarkom in seiner Entstehung unterstützen. Es wird aber davon berichtet, dass das Auftreten eines Rhabdomyosarkoms gehäuft bei Patienten mit einer Neurofibromatose beobachtet wird. Ebenfalls wird eine gehäufte Prävalenz beim Beckwith-Wiedemann-, Rubenstein- Taybi- und Roberts- Syndrom beschrieben. Auch sind Kinder, deren Mütter an einem Mammakarzinom erkrankt waren, häufiger in Zusammenhang mit einem aufgetretenen Rhabdomyosarkom dokumentiert worden (Fletcher, 2002). Dieses weist auf eine genetische Disposition als Ursache der Rhabdomyosarkome hin.

Rhabdomyosarkome leiten sich von Muskelzellen ab und lassen sich immunhistochemisch durch muskelspezifische Proteine verifizieren. Hier seien stellvertretend Aktin, Myosin, Desmin und Myoglobin genannt (Imbach, 2004). Zur weiteren Differenzierung in die einzelnen Subgruppen werden noch weitere Antikörperfärbungen verwendet, die dann zusammen mit dem histologischen Bild die Diagnose stützen.

Die Prognose bei Diagnostik eines Rhabdomyosarkoms – egal welcher Subklassifikation - ist generell abhängig von der Aussage welches Stadium, welche histologische Klassifikation, welchen Differenzierungsgrad und welches Ursprungsgewebe bzw. welche Lokalisation der Tumor aufweist. Als relevant erscheint auch das Alter, in welchem sich der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose befindet. Generell kann man sagen, dass ein Patient, je jünger er bei der Diagnosestellung ist, bessere Chancen auf eine gute Prognose hat. Bei erwachsenen Patienten verhalten sich die Tumorunterarten in der Regel deutlich aggressiver – insbesondere bei Vorliegen eines embryonalen Rhabdomyosarkoms vom spindelzelligen Typ. Ansonsten scheint die histologische Unterart des bei erwachsenen

Patienten vorliegenden Rhabdomyosarkoms keinen Einfluss auf die Prognose zu haben (Fletcher, 2002).

Zunächst scheint eine radikale chirurgische Therapie maßgeblich für den weiteren Krankheitsverlauf (Böcker, 2004). Anhand des operativen Ergebnisses wird der Patient nach der Intergroup- Rhabdomyosarkom- Studie in verschiedene Gruppen eingeteilt, durch die das weitere therapeutische Vorgehen bestimmt wird. Gruppe I- Patienten sind solche, deren Tumor lokalisiert ist und solche, deren Tumor komplett reseziert wurde, welches einer R0- Resektion entspricht. R1- resezierte Patienten, bei denen ein mikroskopischer Resttumor vorhanden ist, werden der Gruppe II zugeordnet, wohingegen die Gruppe III Patienten einschließt, bei denen ein makroskopischer Resttumor vorhanden ist (R2- Resektion). Patienten mit Fernmetastasen werden in die Gruppe IV eingruppiert (Kissane, 1990). Diese Metastasen (unabhängig vom histologischen Subtyp) finden sich prozentual absteigend am häufigsten in der Lunge, den Lymphknoten und Knochen, der Leber und dem Gehirn (Autopsiestatistik von Shimada et al.). Häufig sind bei der Erstdiagnose bereits regionale Lymphknoten befallen (Remmele, 1997).

Je nach Gruppenzugehörigkeit wird postoperativ noch eine Chemotherapie angeschlossen (Böcker, 2004). Entscheidend für den postoperativen Verlauf und somit die Einstufung in den jeweiligen Chemotherapieplan ist unter anderem auch der Grad der Differenzierung des vorliegenden embryonalen Rhabdomyosarkoms. Heutzutage wird zwischen drei Differenzierungsgraden unterschieden: gut differenziert (>50% Tumorzellen mit erkennbarer Myogenese), mäßig differenziert (10- 50% Tumorzellen mit erkennbarer Myogenese), wenig differenziert (<10% Rhabdomyoblasten). Interessant hierbei ist sicherlich die Tatsache, dass der Differenzierungsgrad unter der Chemotherapie deutlich zunehmen kann (Remmele, 1997).

2.1. Embryonales Rhabdomyosarkom

Beim embryonalen Rhabdomyosarkom handelt es sich um ein primitives malignes Weichteilsarkom. Dieses Weichteilsarkom repräsentiert die embryonalen Merkmale der Skelettmuskulatur und kann in eine spindelzellige, botryoide oder anaplastische Variante unterteilt werden (Fletcher, 2002).

2.1.1. Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)

Embryonale Rhabdomyosarkome treten für gewöhnlich in einem Lebensalter unter zwölf Jahren auf, mit einem Häufigkeitsgipfel im Alter zwischen fünf bis acht Jahren (Kissane). In über 60% der kindlichen Fälle eines Rhabdomyosarkoms handelt es sich um den embryonalen Subtyp (Fletcher, 2000). Erwachsene sind selten von einem embryonalen Rhabdomyosarkom betroffen (Kissane, 1990). Kommt es aber dennoch zu dem Vorliegen eines embryonalen Rhabdomyosarkoms beim erwachsenen Patienten, so handelt es sich hierbei in der Regel um interessante Varianten (Fletcher, 2002).

2.1.2. Lokalisation und klinische Symptomatik

Als die mit Abstand häufigste Lokalisation eines embryonalen Rhabdomyosarkoms wird mit 47% die Kopf- und Halsregion angegeben. Hier dominieren vor allem die Orbita, das Augenlid, der Oropharynx, die Parotis, der Gehörgang, das Mittelohr, die Fossa pterygopalatina, der gesamte nasale Bereich, Zunge und Rachen. Gerne werden sowohl auch der Urogenitaltrakt als auch das Retroperitoneum durch den embryonalen Subtyp beherrscht. Auch wird von Fällen, in denen der Gallentrakt und andere viszerale Organe wie Herz, Lunge, Leber und Niere betroffen sind, berichtet (Fletcher, 2002). Nur in 20- 25% der Fälle kommt es zu einem Befall der Extremitäten. Hierbei zeigt sich jedoch die Auffälligkeit, dass dann zumeist Erwachsene von diesem Subtyp eines Rhabdomyosarkoms befallen sind (Kissane, 1990). Ein Primärbefall der Haut kann gelegentlich auch vorkommen (Fletcher, 2002).

Das embryonale Rhabdomyosarkom lässt sich morphologisch weiter unterteilen in eine spindelzellige, botryoide oder anaplastische Form. Diese verschiedenen Formen zeigen weitere Auffälligkeiten bezüglich der Lokalisationshäufigkeit.

Spindelzellige Rhabdomyosarkome treten vor allem paratestikulär auf (Remmele, 1997), wohingegen botryoide Varianten des embryonalen Rhabdomyosarkoms fast immer im Bereich der Vagina, der Cervix uteri und der Blase präsent sind (Böcker, 2004). Seltener wird ihr Auftreten im Nasenraum, Gallengang oder Gehörgang beschrieben (Kissane, 1990).



Abbildung 1: Botryoides Rhabdomyosarkom

Die klinische Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation des embryonalen Rhabdomyosarkoms. Durch die verschiedenen Lokalisationen zeigt sich eine extreme Bandbreite von Symptomen und Symptomenkomplexen, die hier exemplarisch durch Sehstörungen bei einer Infiltration der Orbita oder Hämaturie bei Infiltration der Harnblase repräsentiert werden sollen.

2.1.3. Makroskopie und Histologie

Das embryonale Rhabdomyosarkom besteht aus einem fleischigen, beigen bis bräunlichen Tumor, dessen Zellularität wechselt (Fletcher, 2002). Sie wachsen zwischen Muskelgruppen oder im tiefen subcutanen Gewebe (Kissane, 1990) und repräsentieren die verschiedenen Stadien der Muskelentstehung (Fletcher, 2002). Normalerweise setzen sie sich aus gemischten kleinen, spindelzelligen, sich verjüngenden zytoplasmatischen Erweiterungen zusammen. In der Hauptzahl der Fälle bestehen embryonale Rhabdomyosarkome aus kleinen Zellen, die zum einen Anteil über nur wenig und zum anderen Anteil über viel Zytoplasma verfügen (Kissane, 1990). Dieses Zytoplasma ist eosinophil und PAS- positiv. Der Zellkern

dieser Zelle ist länglich und hyperchromatisch („Spindelzellsarkom“). Er liegt entweder zentral oder exzentrisch (Remmele, 1997) und unterzieht sich häufig Mitosen, so dass die Patienten bedingt durch das schnelle geradezu wuchernde Wachstum frühzeitig durch ihre durch die jeweilige Lokalisation auftretende Symptomatik auffällig werden (Kissane, 1990). Die klassische Form des embryonalen Rhabdomyosarkoms besteht aus kleinen, runden bis ovalen oder spindelförmigen, undifferenzierten mesenchymalen Zellen (Remmele, 1997), die mit einem jeweils mengenmäßig unterschiedlich großem Anteil an runden, kaulquappenartigen eosinophilen Rhabdomyoblasten gemischt sind (Fletcher, 2000). In der Umgebung der Gefäße liegen die Zellen des embryonalen Rhabdomyosarkoms zumeist dichter beieinander als in den Bereichen, in denen die vasale Versorgung nicht so ausgereift ist. In diesen Bereichen spricht man auch von einer myxosarkomatoiden Transformation des Tumorgewebes (Remmele, 1997). Ebenfalls können abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit nekrotische, ulzerierte oder eingeblutete Areale gesehen werden (Leuschner, 1999).

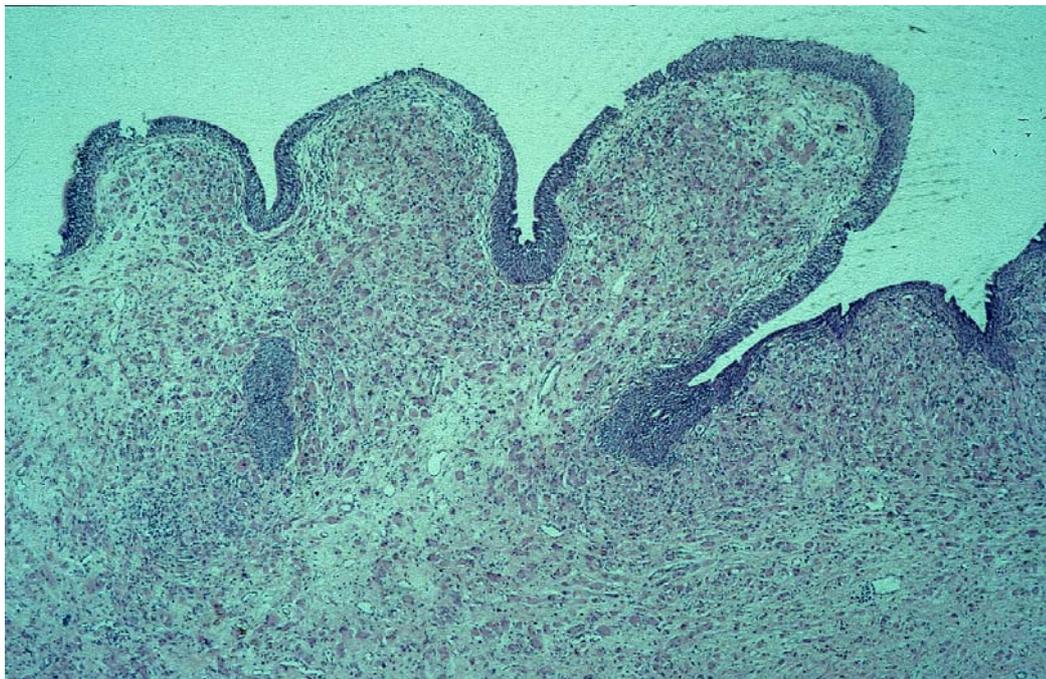


Abbildung 2: Histologisches Bild eines botryoiden Rhabdomyosarkoms (100-fache Vergrößerung)

Spindelzellige Varianten des embryonalen Rhabdomyosarkoms sind schon durch ihre gelbliche Schnittfläche zu erahnen (Fletcher, 2002), die dann mikroskopisch durch das Vorliegen ihrer für sie typischen zigarrenförmigen Tumorzellen bestätigt werden (Remmele,

1997), wohingegen botryoide Varianten ein polyploides Erscheinungsbild präsentieren, welches sich aus knotigen Anteilen zusammensetzt, die an die Epitheloberfläche grenzen (Fletcher, 2002) und traubenförmig in das Lumen hineinwachsen (Böcker, 2004).

Anaplastische Varianten zeichnen sich durch ihre typischen vergrößerten atypischen Zellen mit hyperchromatischen Zellkernen aus. Hier sichtet man bizarre Mitosen, die fokal oder diffus in der Tumormasse auftreten können (Fletcher, 2002).

2.1.4. Immunhistochemie

Diagnostisch beweisend für das Vorliegen eines embryonalen Rhabdomyosarkoms ist die Querstreifung des Zytoplasmas (Remmele, 1997), deren Nachweis jedoch nur in ca. 20-30% der Fälle gelingt (Fletcher, 2000). Das embryonale Rhabdomyosarkom wird durch Marker der Skelettmuskeldifferenzierung detektiert. Durch die Stärke der Anfärbung dieser Marker kann der Grad der Tumorzelldifferenzierung bestimmt werden, da dieser mit dem Grad der Differenzierung korreliert. Vimentin färbt das Zytoplasma der meisten primitiven Zellen. Desmin und Aktin sind in der Lage Rhabdomyoblasten zu identifizieren, wohingegen differenzierte Zellen eine Anfärbung mit Myosin und Myoglobin zeigen (Fletcher, 2002).

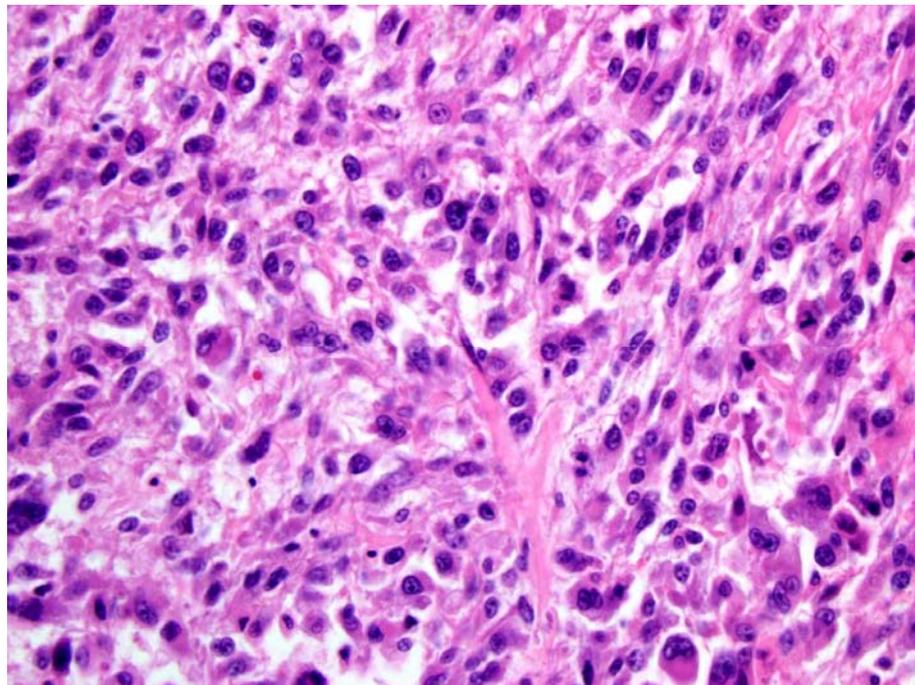


Abbildung 3: Histologisches Bild eines embryonalen Rhabdomyosarkoms (400-fache Vergrößerung)

2.1.5. Molekularpathologie

Molekulargenetisch ist ein „loss of heterozygosity“ (LOH) bekannt. Hierbei handelt es sich um einen Verlust maternalen Genmaterials. Dadurch entsteht eine Disomie des paternalen Genmaterials. Der auf Chromosom 11p15 liegende LOH wird derzeit verdächtigt entweder ein verändertes Tumorsuppressorgen zur Folge zu haben oder aber zu einer Überexpression des Wachstumsgens zu führen (Speer, 2005).

Weitere molekulargenetische Analysen polymorpher Loci konnten zeigen, dass in den meisten embryonalen Rhabdomyosarkomen ein Allel in Chromosom 11p15 verloren wurde. Außerdem fand man heraus, dass bei Chromosomenfragmenten, die noch die Region 11p15 enthalten, eine Wachstumsunterdrückung vonstatten geht. So erhärtete sich der Verdacht, dass in dieser Region ein Tumorsuppressorgen vorhanden sein muss (Fletcher, 2002).

2.1.6. Prognose

Speziell auf das embryonale Rhabdomyosarkom bezogen zeigt sich, dass Patienten mit der Diagnose eines spindelzelligen oder botryoiden Rhabdomyosarkoms eine gute Prognose von bis zu 90% haben, wohingegen anaplastische Varianten über eher schlechtere Prognosen verfügen.

2.2. Alveoläres Rhabdomyosarkom

Eine primitive, maligne und rundzellige Neoplasie, die zytologisch einem kleinen blauen rundzelligen Tumor entspricht und differentialdiagnostisch von Lymphomen oder auch einem Ewing- Sarkom durch seine skelettmuskelartige Differenzierung unterschieden werden muss, repräsentiert das alveoläre Rhabdomyosarkom (Fletcher, 2002).

2.2.1. Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)

Das alveoläre Rhabdomyosarkom erscheint in jeder Altersstufe (Fletcher, 2002), zeigt jedoch eine Häufung bei älteren Kindern bzw. Jugendlichen (10 – 15 Jahren) und jungen Erwachsenen. Selten sind Erwachsene über 50 Jahre betroffen (Kissane, 1990). Sehr selten kommen angeborene Fälle vor. Alveoläre Rhabdomyosarkome kommen deutlich seltener als

embryonale Rhabdomyosarkome vor. Es wird hier von nur 21% in der Intergroup-Rhabdomyosarkom-Studie berichtet. Das weibliche Geschlecht ist in diesen Fällen gleich häufig betroffen wie das männliche Geschlecht (Fletcher, 2002).

2.2.2. Lokalisation und klinische Symptomatik

Wird ein alveoläres Rhabdomyosarkom diagnostiziert, so hat dieses in bis zu 70% der Fälle seinen Ursprung im Extremitätenbereich, wo es vom Muskelgewebe ausgeht und schnell zu einem großem Tumor heranwächst. Nur in 20% der Fälle wird die Kopf- und Halsregion als Ursprungsort des Tumors angegeben (Kissane, 1990).

Die klinischen Symptome sind auch hier abhängig von der Lokalisation. Allen Ursprungsorten gemeinsam ist das schnelle Wachstum des Tumors, welches zu einer schnell fortschreitenden Symptomatik führt (Fletcher, 2002).

2.2.3. Makroskopie und Histologie

Makroskopisch stellt sich das alveoläre Rhabdomyosarkom als eine fleischige, graubraune Masse dar, die verschiedene Anteile fibrösen Gewebes beinhaltet (Fletcher, 2002). Bindegewebige Septen unterteilen das Gewebe in einzelne Gruppen dicht angesiedelter Tumorzellen. Diese vermitteln ein pseudoalveoläres Bild (Böcker, 2004). Beim klassischen alveolären Rhabdomyosarkom findet man Tumorzellen, die in festgelegten Gruppen und Nestern arrangiert sind. Die Zellen an sich präsentieren sich eher rundlich und undifferenziert, teilweise mit großen Zellkernen. Vor allem die großen Zellen verfügen über periphere Zellkerne (Fletcher, 2000). Typisch für das Vorliegen eines alveolären Rhabdomyosarkoms sind mehrkernige Tumorriesenzenellen, die von nekrotischen Tumorzellen umgeben sind. Das Zytoplasma dieser Zellen ist häufig eosinophil und meistens PAS-positiv (Remmele, 1997). Eine Querstreifung ist nur selten vorhanden (Fletcher, 2000).

2.2.4. Immunhistochemie

Histopathologisch unterteilt man drei Untergruppen des alveolären Rhabdomyosarkoms: solche, die die typischen Merkmale eines alveolären Rhabdomyosarkoms enthalten, solche, die eher vom soliden Typ sind und solche, die einen gemischten embryonal-alveolären Typ beinhalten. Dieser embryonal-alveoläre Typ wird je

nach dem dominanter vorliegenden Anteil entweder dem embryonalen oder dem alveolären Rhabdomyosarkom zugeordnet.

Immunphänotypisch kommt es zu einer Anfärbung mit Antikörpern gegen Muskelproteine. Färbungen, die auf Myo- D 1 bezogen sind, zeigen typischerweise eine streng nukleäre Färbung (Fletcher, 2002).

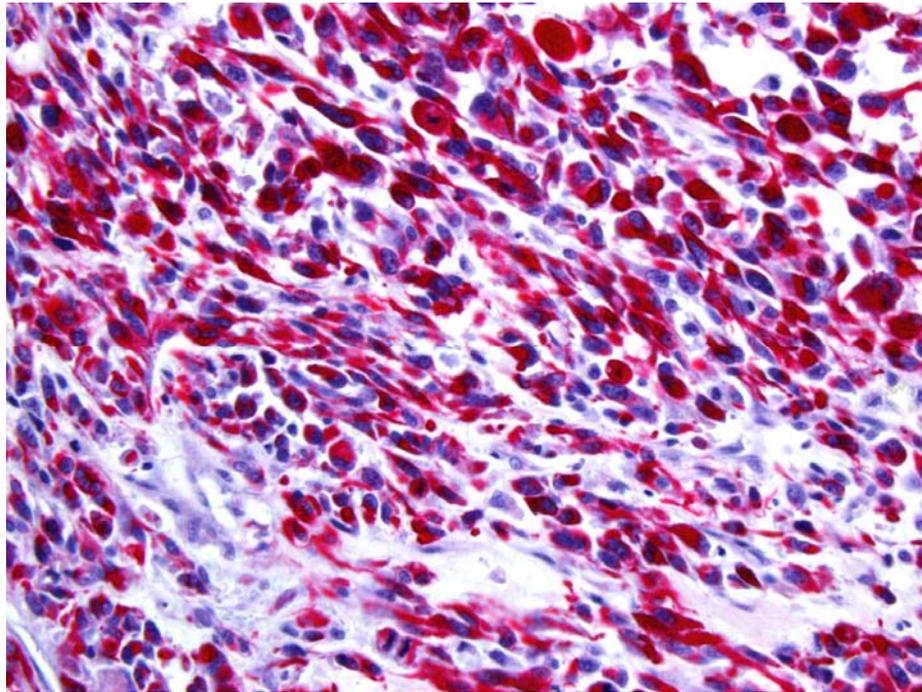


Abbildung 4: Histologisches Bild eines alveolären Rhabdomyosarkoms, Desmin-Färbung (400-fache Vergrößerung)

2.2.5. Molekularpathologie

Als Besonderheit des alveolären Rhabdomyosarkoms konnten charakteristische Translokationen nachgewiesen werden (Speer, 2005). Hierbei handelt es sich zum einen um die Translokation $t(2;13)(q35;q14)$ und zum anderen um die Translokation $t(1;13)(p36;q14)$ (Böcker, 2004). In den meisten Fällen kommt es zu der erstgenannten Translokation (Fletcher, 2002), die eine Translokation zwischen dem langen Arm des Chromosoms 2 und dem langen Arm des Chromosoms 13 darstellt. Molekulargenetisch entspricht diese Translokation dem Rearrangement des PAX- Gens und des FKHR- Gens. Man vermutet, dass es durch dieses Rearrangement zu einer Aktivierung kommt, die zur Transkription von Genen führt und an der Entstehung des abnormen Phänotyps beteiligt sind (Speer, 2005). Im Falle der häufigeren Translokation $t(2;13)(q35;q14)$ handelt es sich um das Rearrangement zwischen dem PAX 3-

Gen und dem FKHR- Gen, wohingegen es bei der selteneren Translokation t(1;13)(p36;q14) zu einem Rearrangement zwischen dem PAX 7- Gen und dem FKHR- Gen kommt (Fletcher, 2002).

2.2.6. Prognose

Vergleichend ist die Prognose bei der Diagnosestellung eines alveolären Rhabdomyosarkoms eher schlechter als bei der Diagnosestellung eines embryonalen Rhabdomyosarkoms (Fletcher, 2002). Nach den Daten der Cooperativen Weichteilsarkomstudie der GPOH (Prof. Dr. J. Treuner, Stuttgart) sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 34,8% der Patienten mit einem alveolären Rhabdomyosarkom bereits Fernmetastasen vorhanden. Somit kommt es hier schon frühzeitig zu einer hämatogenen Dissemination.

Innerhalb der Gruppe des alveolären Rhabdomyosarkoms muss bezüglich der Prognose noch ein bedeutender Unterschied gemacht werden: Patienten, die über eine PAX7/ FKHR- Fusion verfügen haben ein schlechteres Outcome als solche Patienten, bei denen eine PAX3/ FKHR- Fusion nachgewiesen wurde (Fletcher, 2002).

2.3. Pleomorphes Rhabdomyosarkom

Das pleomorphe Rhabdomyosarkom stellt ein hochmalignes Sarkom mit einer skelettmuskelartigen Differenzierung dar (Fletcher, 2002), welches prinzipiell aus keinem bestimmten Schema zusammengesetzt ist (Fletcher, 2000).

2.3.1. Epidemiologie (Häufigkeit und Altersverteilung)

Unter allen Subtypen des Rhabdomyosarkoms ist das pleomorphe Rhabdomyosarkom mit weniger als 1% an Häufigkeit vertreten (Böcker, 2004). Dieser Sachverhalt ist noch nicht lange als Bestand in die Literatur eingegangen, denn früher wurde das pleomorphe Rhabdomyosarkom sehr häufig diagnostiziert. Die Tatsache der Häufigkeitsabnahme bezüglich der Diagnose eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms mag vor allem darin begründet sein, dass heutzutage eine genauere Diagnostik bezüglich der Subtypen anhand vor allem immunhistochemischer und molekularpathologischer Untersuchungen möglich ist, so dass eine genauere und häufigere Zuordnung zum sowohl embryonalen als auch zum

alveolären Subtyp möglich ist. Ebenfalls hat die Differentialdiagnostik insbesondere in Abgrenzung zu den im Erwachsenenalter vorkommenden malignen fibrösen Histiocyten, die eine Präferenz zu den gleichen Lokalisationen wie das pleomorphe Rhabdomyosarkom zeigen, an Präzision gewonnen, so dass inzwischen auch hier eine genauere Diagnosestellung möglich ist (Kissane, 1990). In der Altersverteilung zeigt sich eine deutliche Prädilektion bei erwachsenen Patienten, die in der Regel dem männlichen Geschlecht angehören und sich meistens in der sechsten Lebensdekade befinden (Fletcher, 2002). Weniger als 10% der Fälle eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms werden im Kindesalter vorgefunden (Kissane, 1990) und diese Fälle bleiben weiterhin in ihrer diagnostischen Zuordnung umstritten (Fletcher, 2002).

2.3.2. Lokalisation und klinische Symptomatik

Meistens entwickelt sich das pleomorphe Rhabdomyosarkom im Extremitätenbereich (Fletcher, 2002), wobei hier in über der Hälfte der Fälle die untere Extremität vor allem mit dem Oberschenkelbereich betroffen ist. Auch können die obere Extremität, der Stammbereich und die Kopf- und Halsregion von dem pleomorphen Rhabdomyosarkom beherrscht werden. Gelegentlich wird von Fällen im Retroperitonealbereich und den Eingeweiden berichtet (Kissane, 1990).

Auffällig wird diese Rhabdomyosarkomunterart vor allem durch eine schnell wachsende Schwellung (Fletcher, 2002), die nur in einem Viertel der Fälle von Schmerzen begleitet ist (Kissane, 1990).

2.3.3. Makroskopie und Histologie

Pleomorphe Rhabdomyosarkome wachsen im tiefen Weichgewebe und präsentieren sich meist als große und gut abgrenzbare Tumoren. Diese Abgrenzbarkeit erreichen sie durch eine häufig vorhandene Pseudokapsel. Ihre weißliche Schnittfläche ist mit Hämorrhagien und Nekrosen versehen und sehr schnittfest (Fletcher, 2002). Große Tumorzellen mit reichhaltigem eosinophilem Zytoplasma und oftmals mehreren Kernen sind verdächtig für das Vorliegen eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms (Böcker, 2004). Es entsteht ein eintöniges Erscheinungsbild (Fletcher, 2000). Selten wird eine Querstreifung beobachtet (Fletcher, 2002).

2.3.4. Immunhistochemie

Um eine Abgrenzung gegenüber anderen Sarkomen zu ermöglichen, ist eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Desmin, Myoglobin, Myogenin und Myo D1 sehr hilfreich (Böcker, 2004). Für die Diagnose ist die Präsenz pleomorpher polygonaler Rhabdomyoblasten in der Routine- HE- Färbung erforderlich. Gelegentlich erfolgt auch eine Anfärbung mit Muskelspezifischem Aktin und Myogenin (Fletcher, 2002).

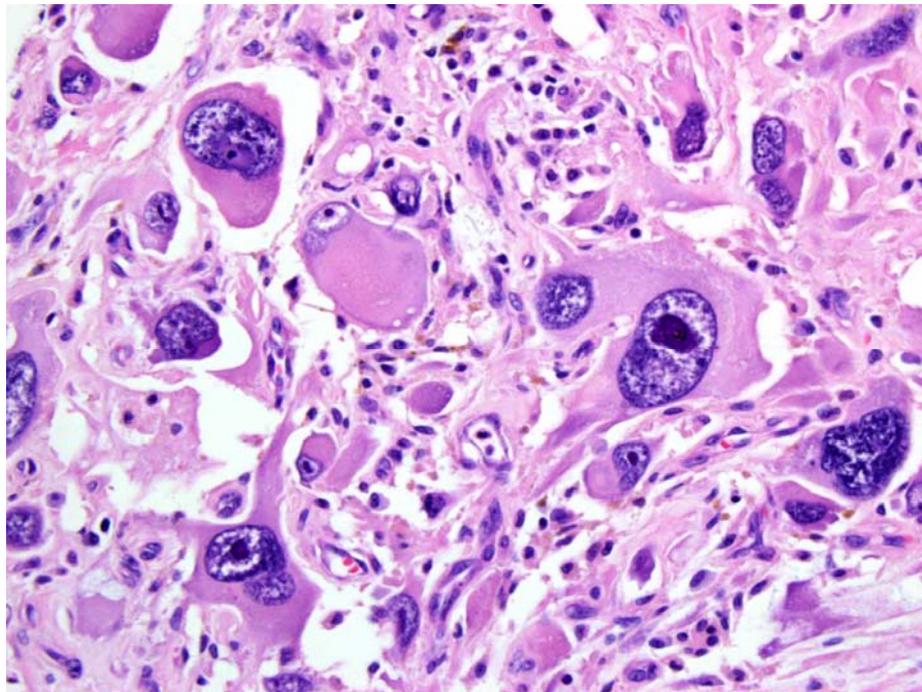


Abbildung 5: Histologisches Bild eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms, HE-Färbung (400-fache Vergrößerung)

2.3.5. Molekularpathologie

Molekularpathologische Besonderheiten können nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft ausgeschlossen werden, da bislang in lediglich sechs Fällen eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms von Chromosomenaberrationen berichtet wurde. Ein Translokationsnachweis konnte bis heute nicht erfolgen (Fletcher, 2002).

2.3.6. Prognose

Das pleomorphe Rhabdomyosarkom hat unter allen Rhabdomyosarkomarten die ungünstigste Prognose. Die 5- Jahres- Überlebensrate beträgt hier 50- 55% (Kissane, 1990).

3. Fragestellung der Arbeit

In der hier vorgestellten Studie wurden zahlreiche Patienten aufgrund ihrer Diagnose eines Rhabdomyosarkoms aus dem Knochen- Geschwulstregister und den Daten der Falldatenbank des Gerhard- Domagk- Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms- Universität in Münster ausgewählt. Anhand dieses großen gewonnenen Kollektivs sollte ein Vergleich bezüglich der Klinik, der Morphologie und der Molekularpathologie der einzelnen Patienten angestrebt werden, um gegebenenfalls prognostische Faktoren ersehen zu können.

Bei den bisher schon in der Standarddiagnostik verwendeten üblichen Antikörper- Färbungen lag das Interesse dieser Arbeit darin, dass die konventionelle Art der Färbung des Präparates anhand eines Schnittes mit der Technik des Tissue Microarrays verglichen werden sollte.

Durch Antikörperfärbungen, die bei Verdacht auf ein Rhabdomyosarkom als Standarddiagnostik angewandt werden, und Antikörperfärbungen, die bislang noch nicht zum Standardrepertoire gehören, sollte überprüft werden, ob anhand dieser Färbungen eine weitere pathomorphologische diagnostische Zuordnung möglich ist.

4. Material und Methoden

4.1. Histologie und immunhistochemische Untersuchung

Für die Rekrutierung der einzelnen Rhabdomyosarkomfälle wurden sowohl die Daten des Knochen- Geschwulstregisters als auch die Daten der Falldatenbank des Gerhard-Domagk- Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms- Universität in Münster herangezogen. Da vor allem das pathologische Gewebe eines Präparates für weitere spätere Untersuchungen aufbewahrt wird, muss dieses insbesondere zur Erhaltung der morphologischen Struktur gut konserviert werden. Methode der Wahl ist seit Jahren formalinfixiertes und paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, deren FFPE- Gewebe in den Jahren 1993 bis 2006 im Institut bzgl. des Vorliegens eines Rhabdomyosarkoms anhand verschiedener Methoden untersucht wurde. Auf diese Weise fanden sich 74 Fälle, von denen das FFPE- Gewebe vorhanden war und deren pathologischer Befund ein Rhabdomyosarkom, ein Rezidiv oder aber eine Metastase eines Rhabdomyosarkoms beinhaltete. Allerdings konnten nur 54 dieser 74 Fälle der experimentellen Untersuchung zugeführt werden, da von den restlichen 20 Fällen nicht ausreichend Gewebe vorhanden war.

4.1.1. Tissue Microarray

Für den Aufbau der Tissue Microarrays (TMA) wurden von den ausgewählten Paraffinblöcken zwei Millimeter große Areale, die den Bereich des Rhabdomyosarkoms darstellten, in Form eines Zylinders gestanzt und in Akzeptorblöcke mit 28- 40 Zylindern pro Block gegossen. Zur Sicherheit und vor allem als Kontrolle wurde dabei jeder Patient durch ein zweites Areal in dem Akzeptorblock repräsentiert. Die nach dem Gießen des Akzeptorblockes angefertigten histologischen Schnitte wurden routinemäßig mit Hämatoxylin- Eosin gefärbt und anschließend nochmalig bzgl. ihrer Präsenz der rhabdomyosarkomatösen Strukturen überprüft bevor weitere immunhistologische Untersuchungen an ihnen durchgeführt wurden. Die Durchführung weiterer immunhistologischer Untersuchungen spart auf diese Weise Zeit.

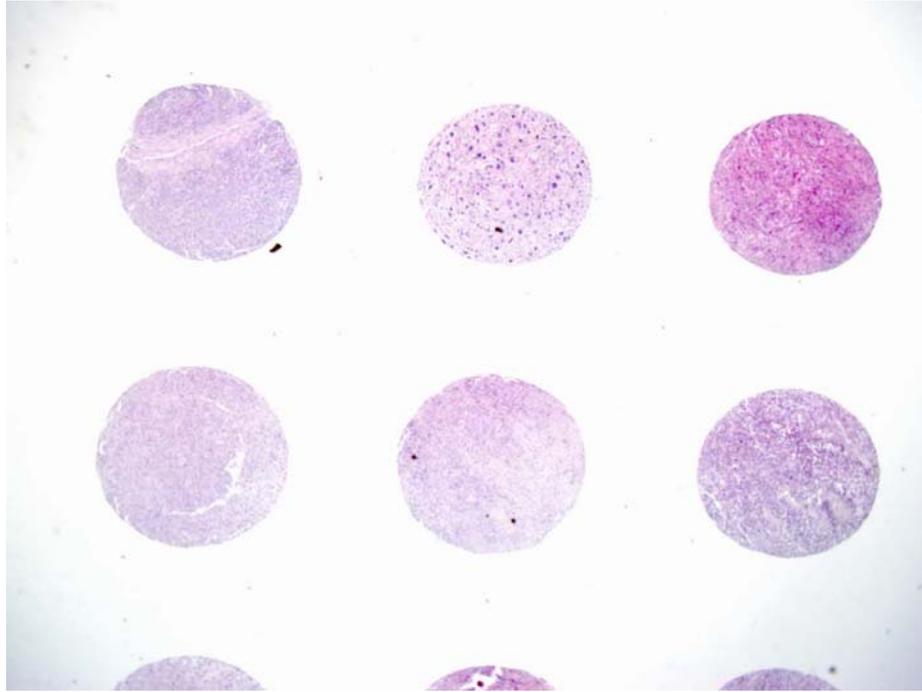


Abbildung 6: Ausschnitt eines Tissue Microarrays

4.1.2. Entparaffinierung

Sowohl die Antikörper, die keine Vorbehandlung erforderten, als auch EGFR wurden nun für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert. Nach der Entparaffinierung wurden sie in der absteigenden Alkoholreihe von 99%-igem zu 70%-igem Alkohol rehydriert, für fünf Minuten gekocht und dann in Aqua destillata gekühlt.

4.1.3. Antigen- Demaskierung

Bei FFPE- Gewebe kommt es gelegentlich zur Bildung von Aldehydvernetzungen. Ebenfalls kann sich die dreidimensionale Struktur des Proteins verändern. Dieses hat zur Folge, dass es bei einigen Antigenen zu schlechten oder gar keinen Anfärbungen kommen kann, da die Epitope, gegen die der Antikörper gerichtet ist, versteckt (maskiert), modifiziert oder durch die Fixierung komplett verloren gegangen sein können (Raem, 2007). Mit Hilfe der sogenannten Antigendemaskierung kann die Immunreaktivität des Gewebes wieder hergestellt werden.

Die Antigendemaskierung erfolgt je nach weiterer geplanter Antikörper- Behandlung hitzeinduziert oder enzymatisch. Lediglich die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von Myoglobin, Desmin und S 100 benötigen keine Vorbehandlung.

Hitzeinduzierte Demaskierung

Prinzip der hitzeinduzierten Demaskierung ist die unterschiedlich lange Einwirkungszeit von Hitze auf FFPE- Gewebeschnitte im wässrigen Milieu. FFPE- Gewebe wird hierbei in 10 mM Citratsäure bei pH 6 bei 100° C im Dampfgarer gekocht. Diese Methode der Demaskierung wurde bei Myogenin, SMA, CD 56, CD 99, CD 117, P 53, P63, c- erb B2, Vimentin, VS 38c, MIB 1 und VEGF angewandt.

Enzymatische Demaskierung

EGFR wurde mittels Proteinkinase K enzymatisch demaskiert. 50 mg Protease wurden in 50 ml Tris- Puffer gelöst, damit eine 0,1%- ige Proteaselösung entstand, die ca. zehn Minuten lang gemischt werden musste, damit die volle Enzymaktivität erreicht werden konnte und die FFPE- Gewebeschnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden konnten. Danach mussten die FFPE- Schnitte dreimalig mit frischem Tris- Puffer gespült werden, damit die Protease nicht weiterhin im Gewebe aktiv werden konnte.

4.1.4. Immunhistochemie

Der Immunhistochemie liegt eine Antigen- Antikörperreaktion zugrunde. Antigene Strukturen sind Proteine. Antikörper sind Proteine, die als Reaktion auf ein Antigen gebildet werden. Die Reaktion erfolgt nach dem „Schlüssel- Schloss- Prinzip“. Der Antikörper wird hierbei an ein Detektionssystem gekoppelt, um im Falle des Vorhandenseins im Präparat sichtbar gemacht werden zu können. Da die immunhistochemische Reaktion aufgrund vieler Variablen - wie z. B. Fixierungsdauer, Einbettungsmethode, pH- Wert – störanfällig ist, wird sie heutzutage zur besseren Standardisierung im Automaten durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurde der DAKO Autostainer (DAKO Cytomation, Typ- Nr.: E 172566, Seriennr.: 3400- 9158- 03, Denmark) verwendet.

LAB/ LSAB- Methode

Für die Antigen- Antikörper- Reaktion und die Visualisierung dieser fand nun im Anschluss an die oben genannten einzelnen Verfahren die Labelled (Strept) Avidin- Biotin- Methode (LAB/ LASAB- Methode) statt. Das Prinzip der LAB/ LSAB- Methode (DAKO

Real™ Detection System, DAKO, Glostrup, Denmark) basiert auf der hohen Affinität von (Strept-) Avidin zu Biotin. Zunächst werden die Schnitte mit dem unkonjugierten Primärantikörper (verwendete primäre und sekundäre Antikörper sind im Anhang in der Antikörpertabelle aufgelistet) beschichtet. Dieser primäre Antikörper sollte eine hohe Spezifität und Affinität zu dem zu markierenden Epitop besitzen und nicht mit strukturähnlichen Epitopen eine Bindung eingehen. Danach erfolgt die Bindung mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Anschließend wird das Avidin- Biotin- Enzymkonjugat (DAKO REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase, DAKO, Glostrup, Denmark) hinzugefügt, dessen Avidin vier mögliche Bindungsstellen für das als Brückenantikörper vorhandene Biotin besitzt und an den nun das Chromogen (DAKO REAL™ Chromogen Red 1, 2, 3), das zuvor mit Hilfe von DAKO REAL™ AP Substrate Buffer verdünnt wurde, binden kann, um durch eine kontrastreiche rote Farbreaktion die Antikörperbindung zu kennzeichnen.

Bevor abschließend die Intensität der immunhistochemischen Reaktion an einem Zeiss- Mikroskop mittels eines viergradigen Scoring- Systems erfolgte, wurde zunächst noch eine Gegenfärbung mit Dako REAL™ Hematoxylin (Code- Nr. S 2020) vorgenommen, damit eine deutliche nukleäre Blaufärbung zur morphologischen Darstellung hervorgerufen werden konnte.

4.2. Molekularpathologische Untersuchung

Zur Vervollständigung der bereits aus routinediagnostischen Untersuchungen vorliegenden Daten wurden die Paraffinblöcke aller gestanzten Fälle, die bisher noch keiner molekularpathologischen Untersuchung unterzogen worden waren, dieser zugeführt.

4.2.1. RNA- Gewinnung aus Paraffinmaterial

Das Mikrotom, welches zum Schmelzen des Paraffinmaterials verwendet wurde, wurde zunächst mit 70%- igem Ethanol gesäubert. Zwei zehn µm große Schnitte wurden angefertigt und in sterile Eppendorf Gefäße gegeben und mit 0,4 ml Xylol versetzt und gut gemischt. Nachdem die Eppendorf Gefäße für 15 Minuten im Brutschrank verweilt hatten, wurden sie für fünf Minuten bei 13 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, damit danach

der Überstand mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden konnte. Erneut erfolgte eine Behandlung mit 0,4 ml Xylol, damit eine komplette Entparaffinierung des Materials gewährleistet werden konnte. Anschließend wurde das vorliegende Material zweimalig mit 100%- igem Ethanol gewaschen und für eine Minute bei 13 000 Umdrehungen pro Minute in der Zentrifuge behandelt. Der Überstand vor dem Pellet wurde mit der Pipette entfernt und zur Entfernung des restlichen noch verbliebenen Alkohols wurde eine Vakuumtrocknung von drei Minuten vorgenommen. Es wurden 230 µl RNA digestion buffer (20 mM Tris/ HCl mit pH 7,5; 20 mM EDTA; 1% SDS in DEPC- Wasser) in das Eppendorf Gefäß hinzugefügt, welches dann mit 20 µl zweiprozentiger Proteinase K (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) versetzt und anschließend bei 56° C über Nacht inkubiert wurde.

Nach der Inkubation wurde zunächst überprüft, ob der vorliegende Mix vollständig verdaut worden war, um ihn dann in zwei gleich große Teile in zwei neuen sterilen Eppendorf Gefäßen gründlich mit 1 ml Trizol und 200 µl Chloroform zu vermischen. Für 15 Minuten wurde dieser bei 12 000x g und bei 4° C zentrifugiert. Der entstandene und sichtbare Überstand wurde zu 70 µl dreimolarigem Natriumacetat und 700 µl kalten Isopropanolalkohol gegeben und über Nacht bei -20° C ausgefällt.

Am folgenden Tag wurden die Eppendorf Gefäße direkt für zehn Minuten bei 12 000x g und 4° C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets zwei Mal mit 700 µl 70%- igem Ethanol gewaschen und für fünf Minuten bei 7500x g erneut zentrifugiert, damit sie nach Abpipettieren des Überstands unter dem Abzug trocknen konnten. Es erfolgte vor der Überführung in ein gemeinsames Eppendorf Gefäß die Resuspendierung der Pellets in je 45 µl DEPC- Wasser (Diethyl Parocarbonate- Wasser der Firma Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

Zur DNase- Behandlung wurde nun ein DNase- Mix aus 30 µl 10x Puffer, 0,3 µl DNase 100 U/µl (Eurogentec, Köln, Germany) und 1,5 µl RNasin (RNA- Guard der Firma Amersham Bioscience, Piscataway, USA) hergestellt. RNasin dient hierbei dem Schutz der RNA, während DNase die überschüssige DNA verdaut und somit entfernt. 90 µl der resuspendierten RNA wurden nun mit 10,6 µl DNase Mix vermischt und für 15 Minuten bei 25° C erwärmt. Anschließend erfolgte die Lösung durch 1 ml Trizol und 200 µl Chloroform, die gut miteinander vermischt wurden bevor sie für 15 Minuten bei 12 000x g bei 4° C zentrifugiert wurden. 500 µl Isopropanol wurden vorgelegt und mit 500 µl RNA aus dem Überstand vermischt. Anschließend erfolgte bei -20° C die Ausfällung über Nacht.

Am nächsten Morgen wurde das Eppendorf Gefäß bei 12 000x g für zehn Minuten bei 4° C wiederholt zentrifugiert. Nach der Behandlung in der Zentrifuge wurde der Überstand abgegossen und 500 µl 70%- igem Ethanol hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte dieses Mal bei 7500x g und 4° C. Erneut wurde der Überstand abgegossen und sowohl Ethanol als auch die Zentrifugation wurden unter den gleichen Bedingungen wie im Schritt zuvor durchgeführt. Wieder wurde der Überstand abgegossen und der verbleibende Rest mit der Pipette sorgfältig abgetragen. 15 Minuten lang trocknete das Material anschließend im Eppendorf Gefäß bevor das Pellet je nach Größe in 30- 100 µl DEPC- Wasser bei -20° C aufgefüllt und gelöst wurde, um für zehn Minuten bei 70° C im Wasserbad zu verweilen, danach direkt auf Eis gestellt zu werden und erst dann die Konzentrationsbestimmung im Photometer durchzuführen. Die RNA wurde anschließend bei -80° C für den nächsten Bearbeitungsschritt aufbewahrt.

4.2.2. GAPDH- Bestimmung aus Paraffin- RNA

Als nächster Schritt in der molekularpathologischen Diagnostik erfolgte nun die GAPDH- PCR. Ziel der GAPDH- PCR ist es herauszufinden, ob die aus Paraffinmaterial gewonnene RNA verwertbar ist. Der eigentliche PCR- Vorgang erfolgt dabei nach Angaben des Herstellers (Titan One Tube RT- PCR- System, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Als anti- sense- Primer dient hierbei GCATTGCTGATGATCTTGAGGCT, während CACCCATGGCAAATTCCATGGC die Rolle des sense- Primers übernimmt.

Die Besonderheit der Titan One Tube RT- PCR in diesem und dem folgenden beschriebenen Schritt liegt darin, dass bereits im ersten Schritt des Protokolls die c- DNA- Synthese erfolgt.

Nach Abschluss des Protokolls wird die RNA auf Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Silber gefärbt. Dieses Verfahren wird weiter unten ausführlich beschrieben.

4.2.3. Nachweis der PAX 3/ FKHR- bzw. PAX 7/ FKHR- Fusions- mRNA in alveolären Rhabdomyosarkomen

Nachdem nun die Amplifizierbarkeit der RNA im vorangegangenen Schritt überprüft worden war, wurde nun die Titan- RT- PCR ebenfalls nach Herstellerangaben (Titan One Tube RT- PCR- System, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) durchgeführt. Hier

wurden als sense- Primer für PAX 3 GCAGCACCGTTCACAGACCTCA und für PAX 7 GCAGCACTGTGCACCGGCCTCA verwandt. Als anti- sense- Primer wurde für FKHR titan CCTCTGGATTGAGCATCCACCAAGA benutzt.

Anschließend erfolgte die nested- PCR zur Erhöhung der Ausbeute aus der Vorrunde. Bei der nested- PCR handelt es sich um eine Standard- PCR. Diese verwendet als anti- sense- Primer für FKHR CTGCACACGAATGAACTTGC. Als sense- Primer wird für PAX GACASCAGCTCTGCCTAC verwandt.

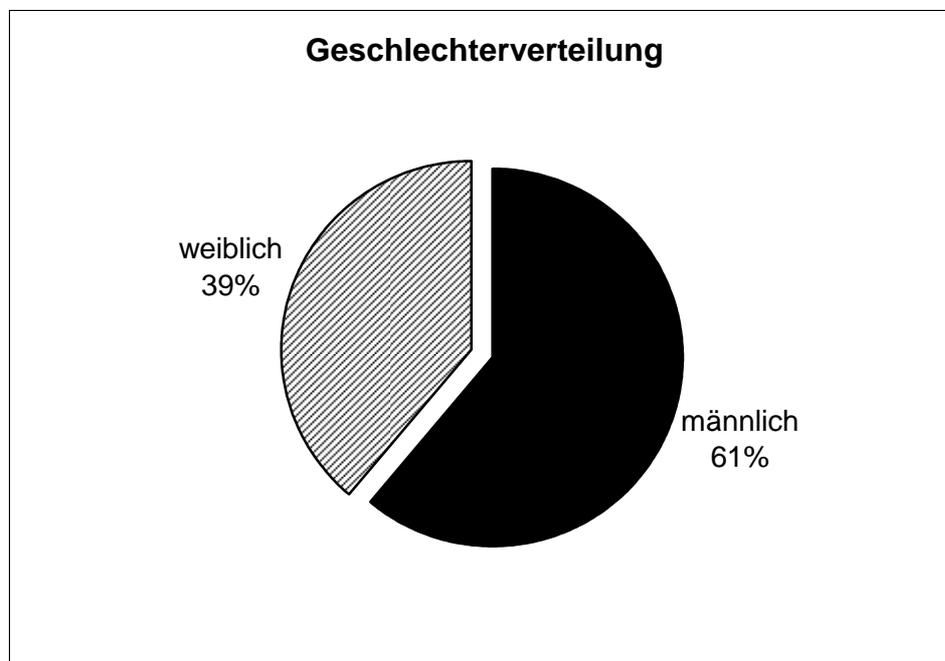
4.2.4. Polyacrylamidgel und Visualisierung mittels Silberfärbung

Abschließend erfolgte die Längenauftrennung mittels einer Elektrophorese mit 12%-igem Polyacrylamid- Gel. Nach Auftragen und Wanderung der DNA auf dem Polyacrylamid- Gel wurden diese mit Hilfe von HNO₃ (Salpetersäure) fixiert. Danach erfolgte eine Spülung mit Wasser, um das überschüssige HNO₃ zu entfernen. Um die DNA zu visualisieren, wurde diese nun für 20 Minuten in einer Silberlösung eingelegt. Auf diese Weise konnten sich die Silbernitrationen an die DNA- Banden lagern. Nachdem überschüssige Ionen mit Wasser abgewaschen worden waren, wurden die Silbernitrationen durch Zugabe von 150 µl alkalischem Formaldehyd und 250 ml Natriumcarbonat zu Silber reduziert. Durch diesen Schritt erreichten die DNA- Banden nun ihre schwarzbraune Farbe und der molekularpathologische Befund konnte ausgewertet werden. Damit der jeweilige Befund auch in Zukunft weiter einsehbar bleibt, war als abschließender Schritt noch eine Fixation mit Essigsäure nötig. Die Aufgabe der Essigsäure besteht darin, dass alles an Silber, was nicht an DNA gebunden ist, entfärbt wird. Durch Glycerin, welches das Gel geschmeidig macht, wird dann eine lange Lagerungszeit erreicht.

5. Ergebnisse

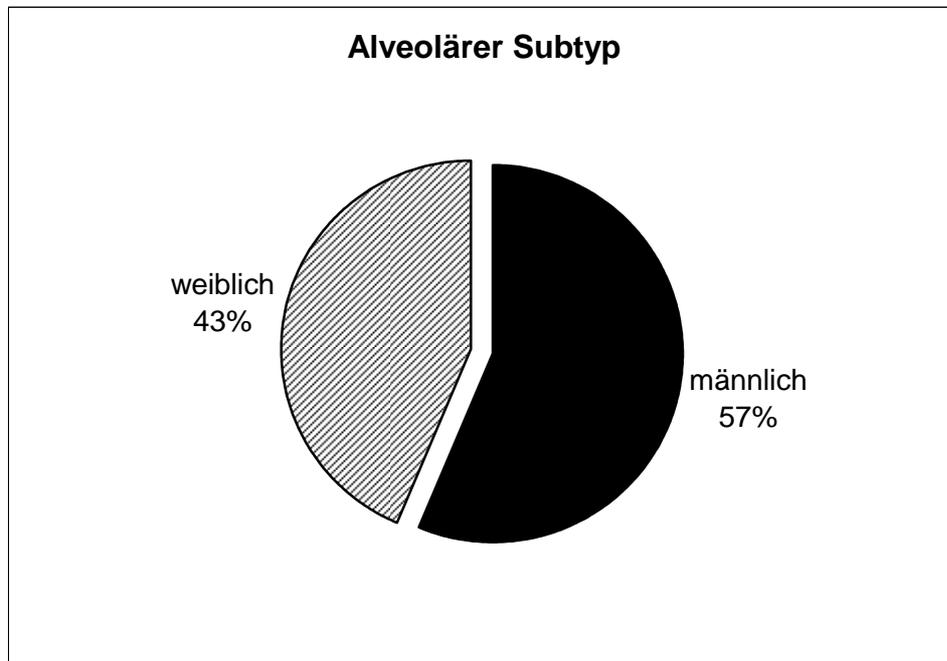
In den allgemeinen vergleichenden Anteil dieser Arbeit können alle 72 im Knochenregister und den Daten der Falldatenbank des Pathologischen Instituts der Westfälischen Wilhelms- Universität in Münster aufgefundenen Fälle einfließen.

5.1. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Geschlechterverteilung



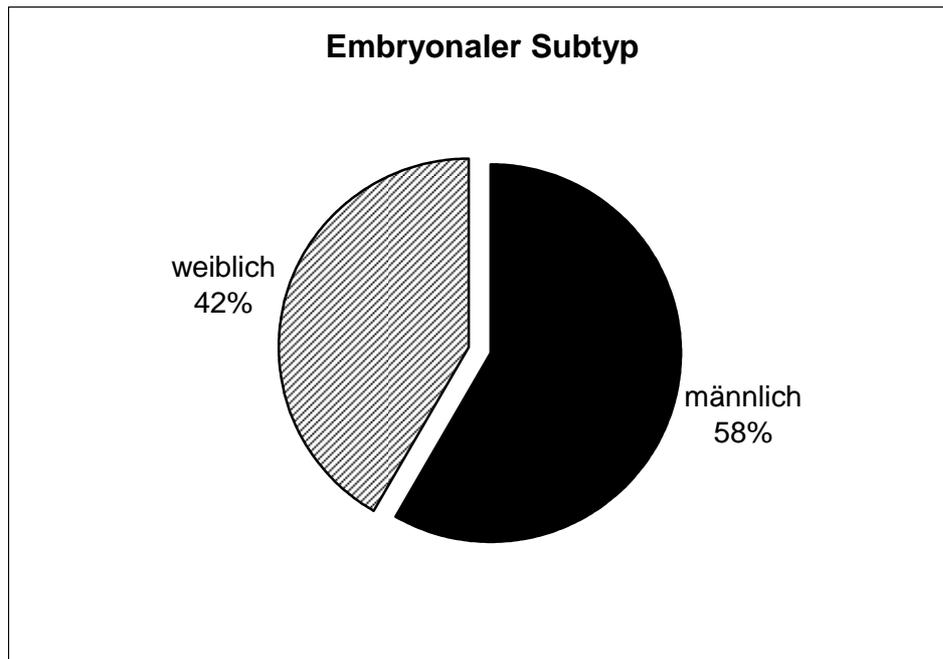
Zu 61% (44 von 72 Fällen) handelt es sich um Präparate männlicher Patienten, zu 39% (28 von 72 Fällen) sind Präparate weiblicher Patientinnen vorgefunden worden.

Bei der weiteren Aufteilung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms fällt die vorliegende Verteilung auf:

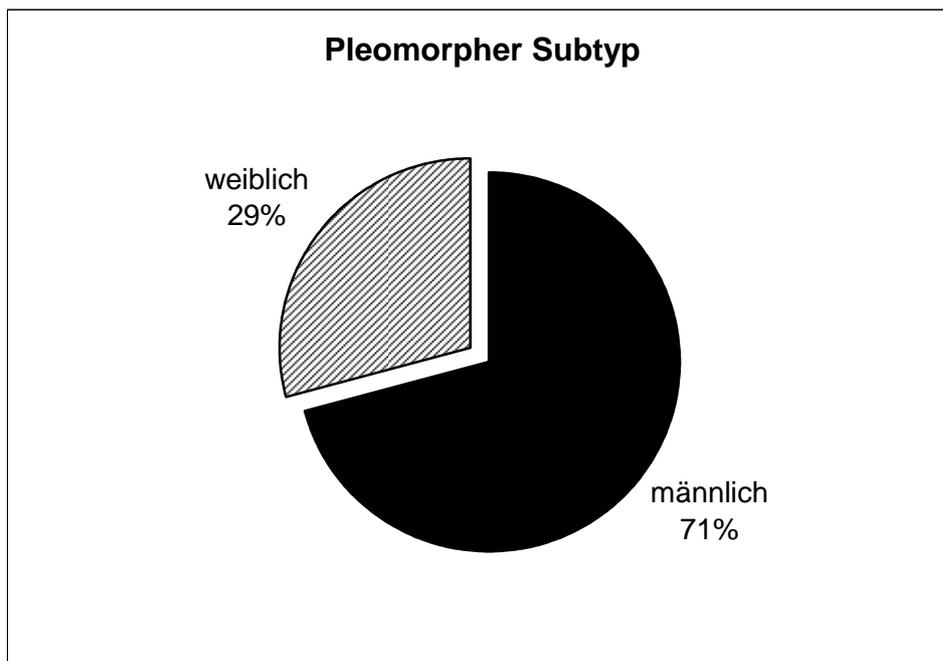


Beim alveolären Subtyp (23 Fälle der Gesamtzahl) kommt es zu einer nahezu gleichförmigen Verteilung zwischen beiden Geschlechtern mit 57% (13 von 23 Fällen) bei den Männern und 43% (10 von 23 Fällen) bei den Frauen.

Der Subtyp, der hier als alvolär/ embryonal bezeichnet wird, kommt zu 100% (1 Fall von 1Fall) bei den weiblichen Fällen vor.

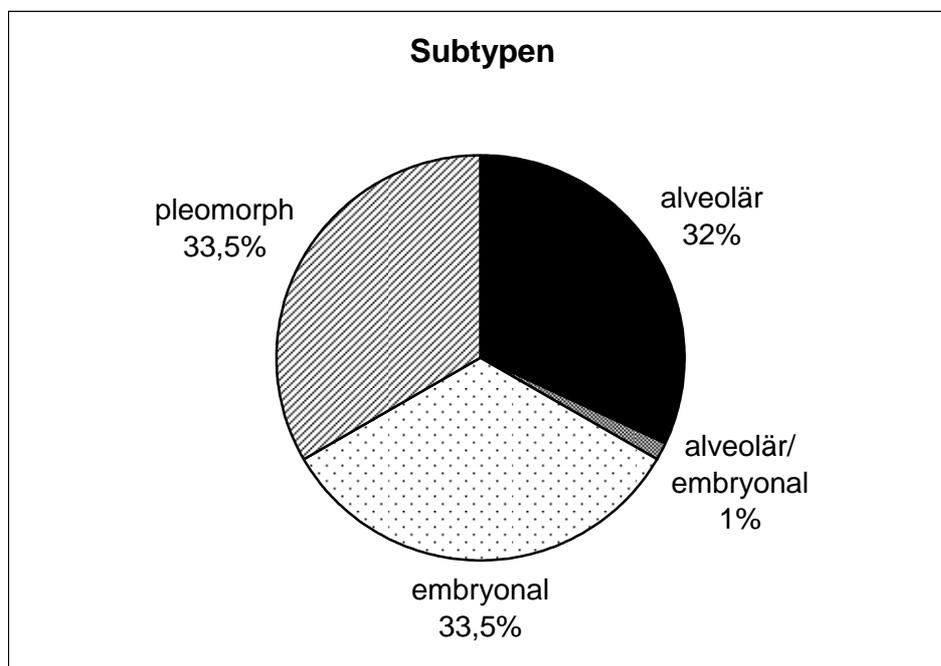


Beim embryonalen Subtyp, der mit 24 Fällen an der Gesamtzahl vertreten ist, liegt wie beim alveolären Subtyp eine recht gleichförmige Verteilung zwischen den Geschlechtern vor. Hier dominiert ebenfalls diskret das männliche Kollektiv mit 58% (14 von 24 Fällen), wohingegen das weibliche Kollektiv mit 42% (10 von 24 Fällen) vertreten ist.



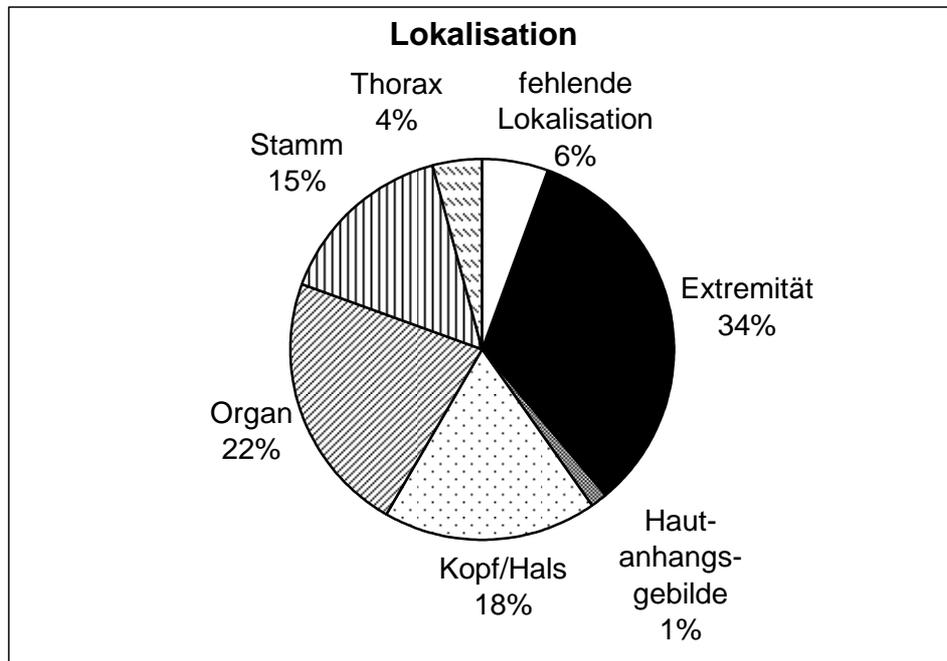
Zu einer auffälligen Verteilung und somit deutlichen Präferenz für ein Geschlecht kommt es lediglich beim pleomorphen Subtyp des Rhabdomyosarkoms. Hier dominiert auffällig das männliche Patientenkollektiv mit 71% (17 von 24 Fällen), während das weibliche Patientenkollektiv lediglich mit 29% (7 von 24 Fällen) vertreten ist.

5.2. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Subtypen



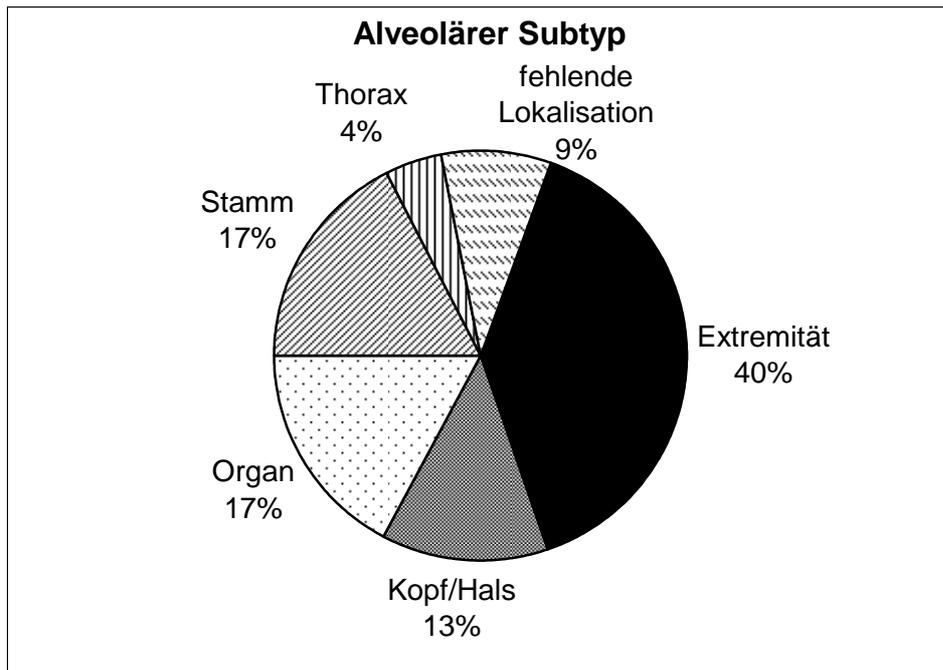
Wenn man das Gesamtkollektiv der 72 Fälle nach den Subtypen des Rhabdomyosarkoms einteilt, dann fällt eine nahezu gleichförmige Verteilung dieser auf. Die embryonale und die pleomorphe Unterart sind zu 34% (24 von 72 Fällen) vertreten und das alveoläre Rhabdomyosarkom präsentiert sich in 32% (23 von 72 Fällen). Ein Fall ist nicht sicher in alveolär oder embryonal einzuteilen und zeigt sich mit 1% somit als eigenständig.

5.3. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Lokalisation



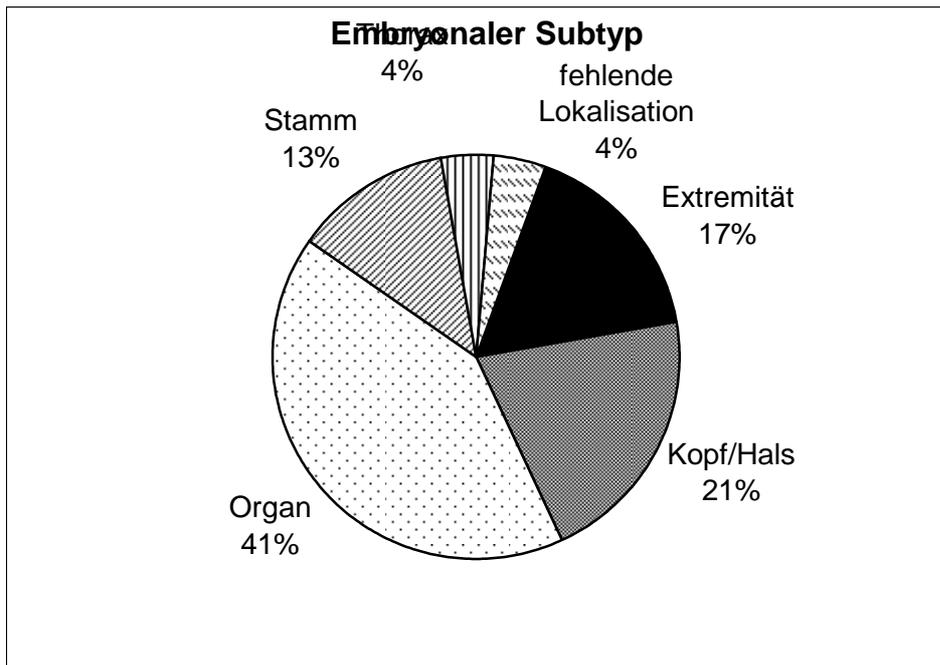
Bei der Lokalisationsverteilung zeigt sich im allgemeinen betrachtet, dass der größte Anteil mit 34% (24 von 72 Fällen) im Bereich der Extremitäten lokalisiert ist. Nachfolgend dominieren verschiedene Organsysteme mit 22% (16 von 72 Fällen) das Feld, dicht gefolgt von der Lokalisation im Kopf- und Halsbereich mit 18% (13 von 72 Fällen) und im Stammbereich mit 15% (11 von 72 Fällen). Im Thoraxbereich waren lediglich 4% (3 von 72 Fällen) angegeben und im Bereich der Hautanhangsgebilde wurde nur in 1% (1 von 72 Fällen) das Rhabdomyosarkom lokalisiert. In 6% (4 von 72 Fällen) war keine Lokalisationsangabe vorhanden.

Wenn man sich nun die Lokalisationsangaben bzgl. der Unterarten des Rhabdomyosarkoms näher betrachtet, kommt es zu folgender Verteilung:

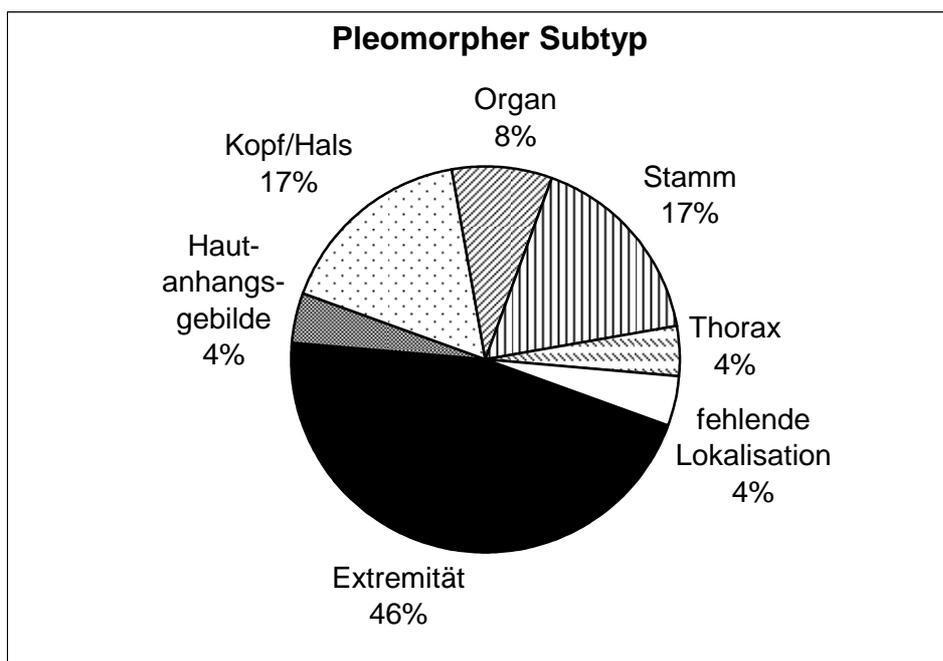


Das alveoläre Rhabdomyosarkom ist im Gesamtkollektiv mit insgesamt 23 Fällen vertreten. Der größte Anteil dieses Subtyps ist mit 40% (9 von 23 Fällen) im Bereich der Extremitäten lokalisiert. Die Lokalisation sowohl im Stamm- als auch im Organbereich liegt bei 17% (4 von 23 Fällen). Fast kaum weniger häufig kommt das alveoläre Rhabdomyosarkom beim vorliegenden Patientenkollektiv im Kopf- und Halsbereich vor. Hier sind 13% der Fälle vertreten (3 von 23 Fällen). Ein geringer Anteil entfällt noch mit 4% (1 von 23 Fällen) auf den Thorax. Bei 9% (2 von 23 Fällen) ist die Lokalisation nicht angegeben.

Das alveoläre/ embryonale Rhabdomyosarkom, welches nicht sicher einem dieser Subtypen zuzuordnen war, ist im Kopf- und Halsbereich aufgetreten.

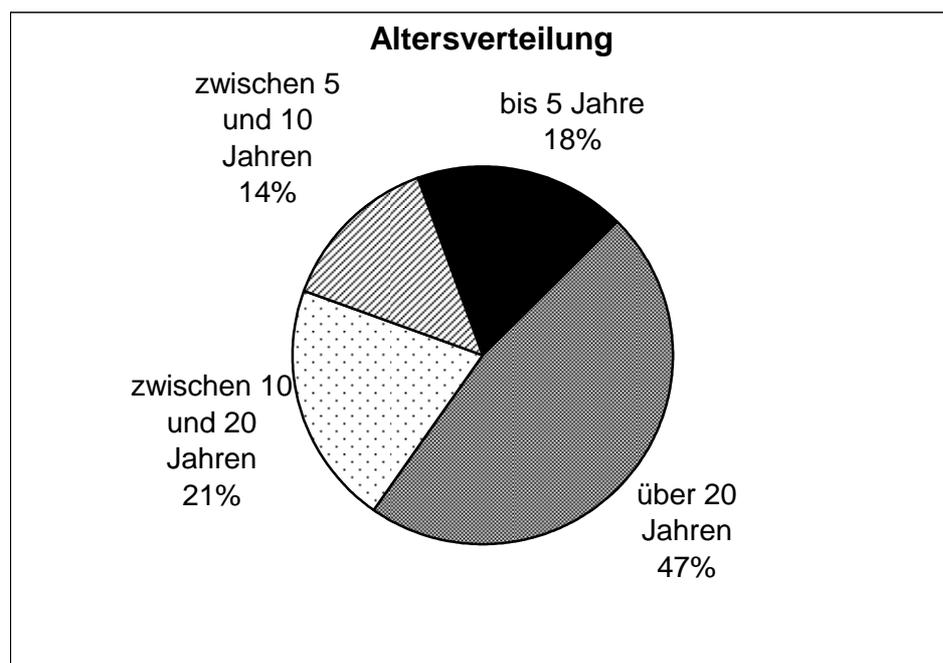


41% der embryonalen Rhabdomyosarkome (10 von 24 Fällen) sind in den verschiedenen Organen vorzufinden. Lediglich die Hälfte der Fälle ist hier im Kopf- und Halsbereich mit 21% (5 der 24 Fälle) zu finden. Die Verteilung mit 17% im Extremitäten- (4 von 24 Fällen) und 13% im Stammbereich (3 von 24 Fällen) ist nahezu gleichförmig. Am Thorax waren nur 4% (1 von 24 Fällen) nachweisbar und auch bei diesem Subtypen des Rhabdomyosarkoms gibt es einen Fall ohne Lokalisationsangabe (4%; 1 von 24 Fällen).



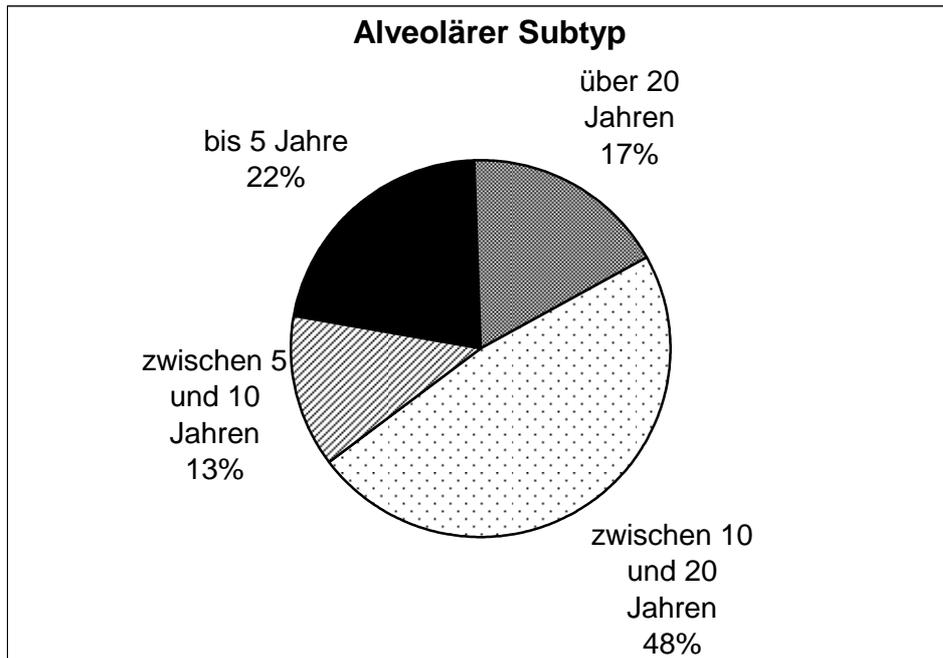
Beim pleomorphen Subtyp dominiert mit 46% (11 von 24 Fällen) die Lokalisation im Bereich der Extremitäten. Auffallend ist hier die gleiche Anzahl sowohl im Bereich von Kopf- und Halsbereich und Stamm mit 17% (4 von 24 Fällen) als auch im Bereich von Thorax und Hautanhangsgebilden mit 4% (1 von 24 Fällen). Die Organe sind mit 8% (2 von 24 Fällen) vertreten. Auch hier gibt es wieder einen Fall, der keine Lokalisationsangabe hat (4%).

5.4. Untersuchungsergebnisse bzgl. des Alters



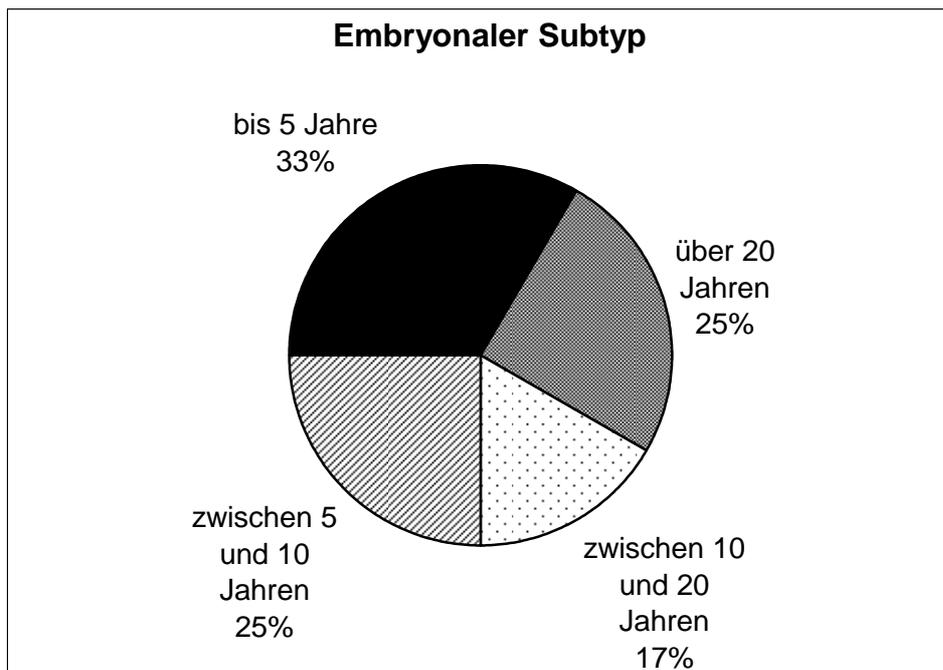
18% (13 von 72 Fällen) sind im Alter bis fünf Jahre, zwischen 5 und 10 Jahren sind 14% (10 von 72 Fällen) vertreten und im Alter zwischen zehn und zwanzig Jahren sind 21% (15 von 72 Fällen) vertreten. Der weitaus größte Teil liegt mit 47% im Alter über zwanzig Jahren (34 von 72 Fällen).

Betrachtet man nun auch das Alter bei Erstdiagnose des Rhabdomyosarkoms hinsichtlich der Klassifikation in die Subtypen, so kommt es zu folgender Verteilung:



Beim alveolären Subtyp (23 der gesamten Fälle) dominiert auffällig die Altersklasse zwischen 10 und 20 Jahren mit 48% (11 von 23 Fällen), wohingegen mit nur 22% (5 von 23 Fällen) die Altersklasse bis 5 Jahren vertreten ist. 17% (4 von 23 Fällen) entfallen noch auf das Patientenkollektiv über 20 Jahren und 13% (3 von 23 Fällen) auf die Altersklasse zwischen 5 und 10 Jahren.

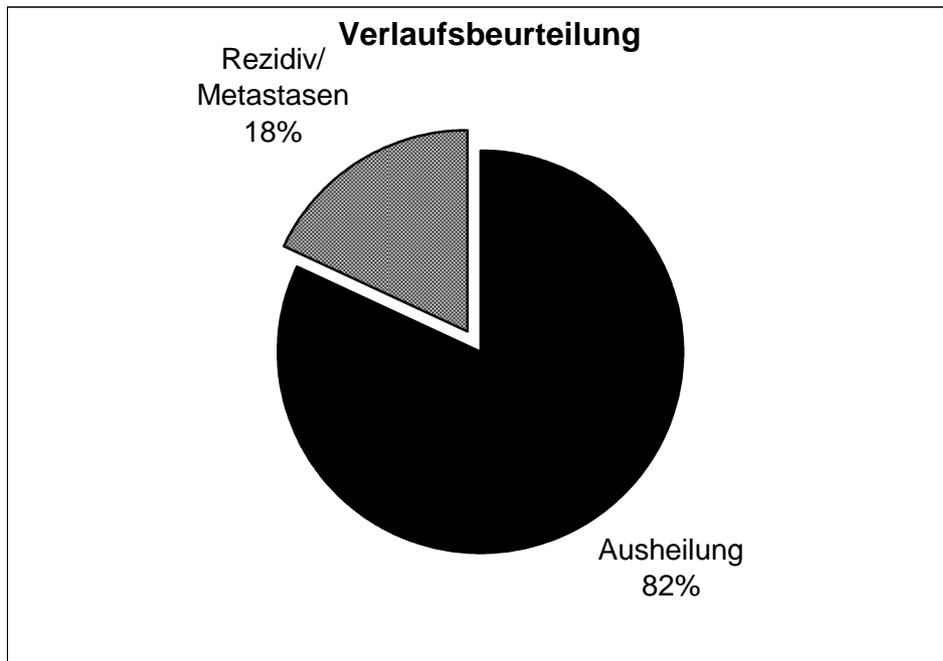
Der eine Fall, der nicht näher dem alveolären oder embryonalen Subtypen zuzuordnen ist, entfällt auf die Altersklasse zwischen 5 und 10 Jahren.



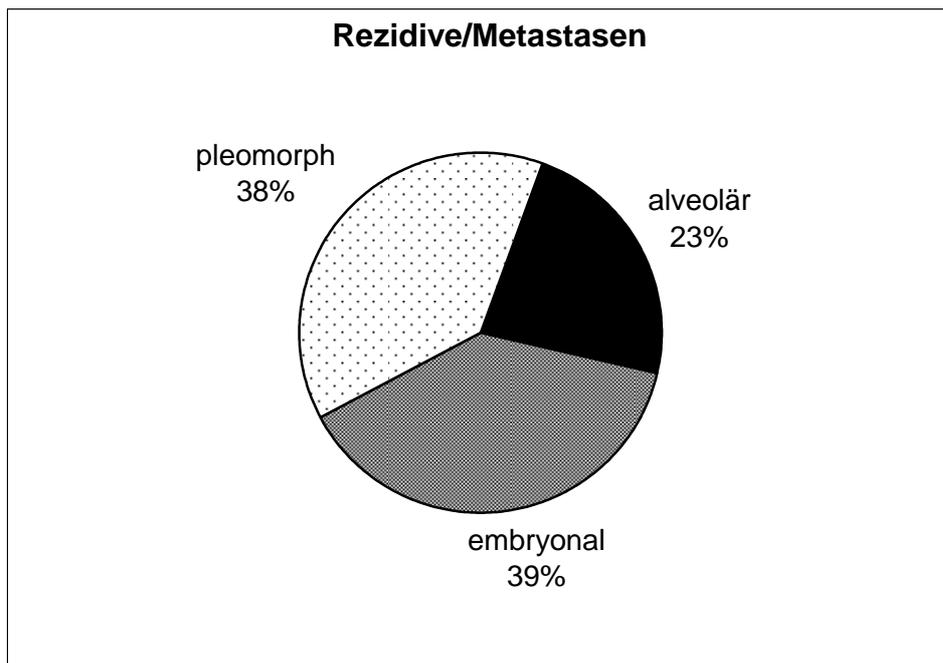
Bei der Betrachtung des embryonalen Rhabdomyosarkoms fällt bei dem vorliegenden Patientenkollektiv eine nahezu gleiche Präsenz in jeder Altersklasse auf. Lediglich die Altersgruppe bis 5 Jahre dominiert ganz diskret mit 33% (8 von 24 Fällen) gegenüber der Altersklasse über 20 Jahren und der mit 5 bis 10 Jahren, welche beide jeweils mit 25% (6 von 24 Fällen) vertreten sind. Auf die Gruppe zwischen 10 und 20 Jahren entfallen hier noch einmal 17% (4 von 24 Fällen).

Deutlich auffallend ist die Altersverteilung bei näherer Betrachtung des pleomorphen Rhabdomyosarkoms, da hier 100% (24 von 24 Fällen) auf die Altersklasse über 20 Jahren entfallen.

5.5. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Verlaufsbeurteilung



Bei der Verlaufsbeurteilung zeigt sich, dass es bei 82% (59 von 72 Fällen) innerhalb des Beobachtungszeitraums der Studie zu keiner erneuten Vorstellung des Patienten durch ein Rezidiv oder Metastasen gekommen ist. In 18% (13 von 72 Fällen) kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einem Rezidiv oder Metastasen.



Im Falle der Rezidive bzw. Metastasen zeigt sich keine auffällige Verteilung der Subtypen. 23% (3 von 13 Fällen) sind alveolären Ursprungs, der Rest verteilt sich mit 38,5% (5 von 13 Fällen) gleichmäßig auf die embryonalen und pleomorphen Unterarten.

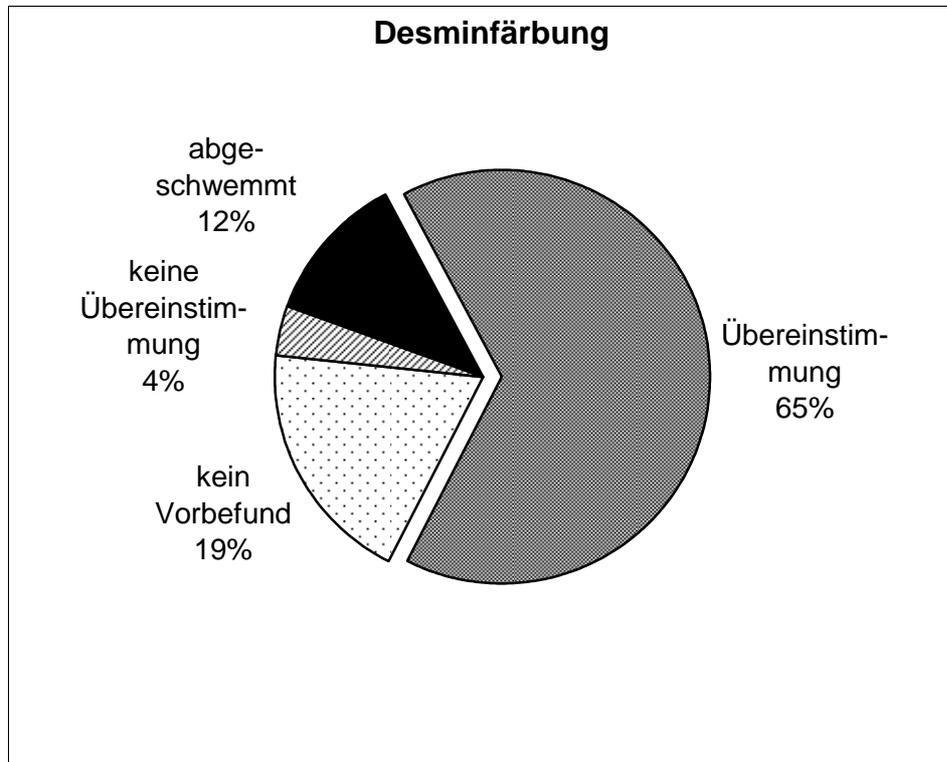
5.6. Vergleich der konventionellen Färbemethode mit dem Tissue Microarray

In den immunhistochemischen Teil dieser Arbeit gehen 52 der zuvor eruierten 72 Fälle mit Rhabdomyosarkom ein. Dieses liegt darin begründet, dass von der Differenz der übrigen 20 Fälle von Anfang an nicht ausreichend Material für die Stanzbiopsien zur Verfügung stand, welches für die immunhistochemischen Untersuchungen hätte verwendet werden können.

Zunächst werden die Standardfärbungen bezüglich ihrer Aussagekraft im alten konventionellen Verfahren gegenüber der Tissue Microarray- Technik betrachtet.

Desmin

Desmin färbt bevorzugt quergestreifte als auch glatte Muskulatur. Der Antikörper ist zur Identifikation von Rhabdomyosarkomen (Chang, 1989; Pollock, 1995) geeignet.



Bei der Auswertung der Desminfärbung fällt in 65% (34 von 52 Fällen) eine Übereinstimmung bezüglich der konventionellen Färbemethode am Schnittpräparat und der Färbung des Tissue Microarrays auf. In nur 4% (2 von 52 Fällen) liegt keine Übereinstimmung des Vorergebnisses mit der neuen Methode vor. In insgesamt 16% (8 von 52 Fällen) konnte kein Vergleich bezüglich der beiden Methoden erfolgen, da entweder kein Vorbefund (19%; 10 von 52 Fällen) vorhanden war oder aber das Gewebe im Tissue Microarray, welches verwandt wurde, abgeschwemmt worden war (12%; 6 von 52 Fällen).

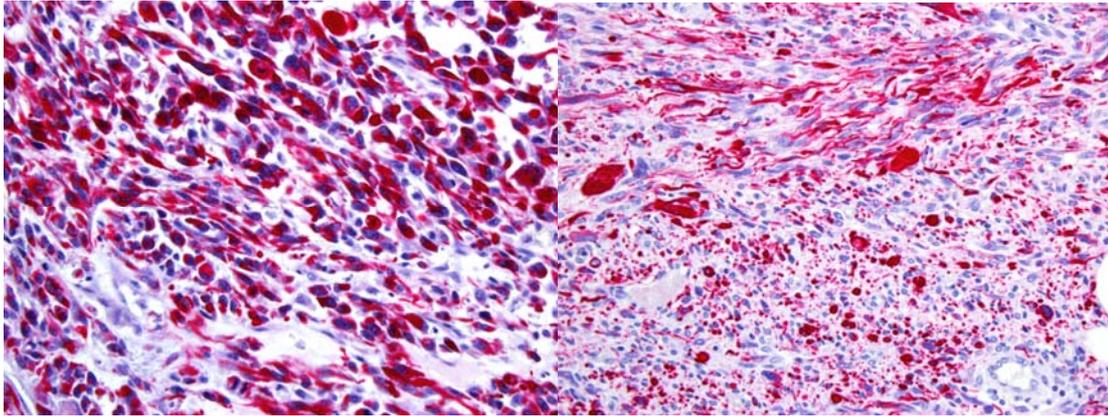
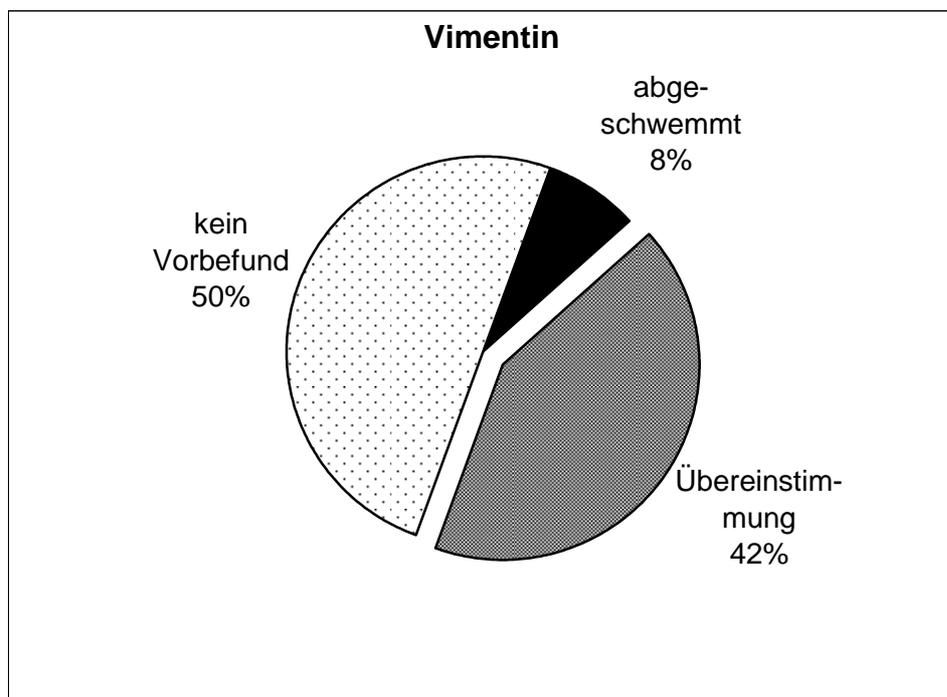


Abbildung 7: Desminfärbung beim alveolären (links) und embryonalen (rechts) Rhabdomyosarkom (400-fache Vergrößerung)

Vimentin

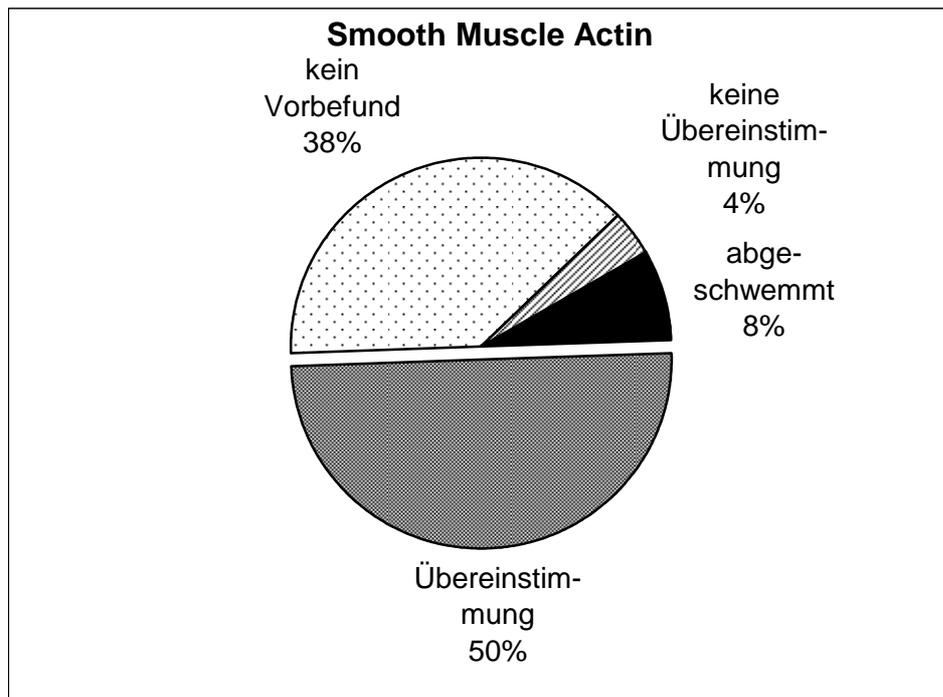
Vimentin markiert Zellen mesenchymalen Ursprungs in physiologischen und pathologischen Geweben; Sarkome sind somit üblicherweise Vimentin-positiv (Azumi, 1987).



In 50% (26 von 52 Fällen) liegt leider kein Vorbefund zum Vergleich vor. Bei der verbleibenden Hälfte zeigt sich eine Übereinstimmung der beiden Methoden in 42% (22 von 52 Fällen), 8% (4 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt.

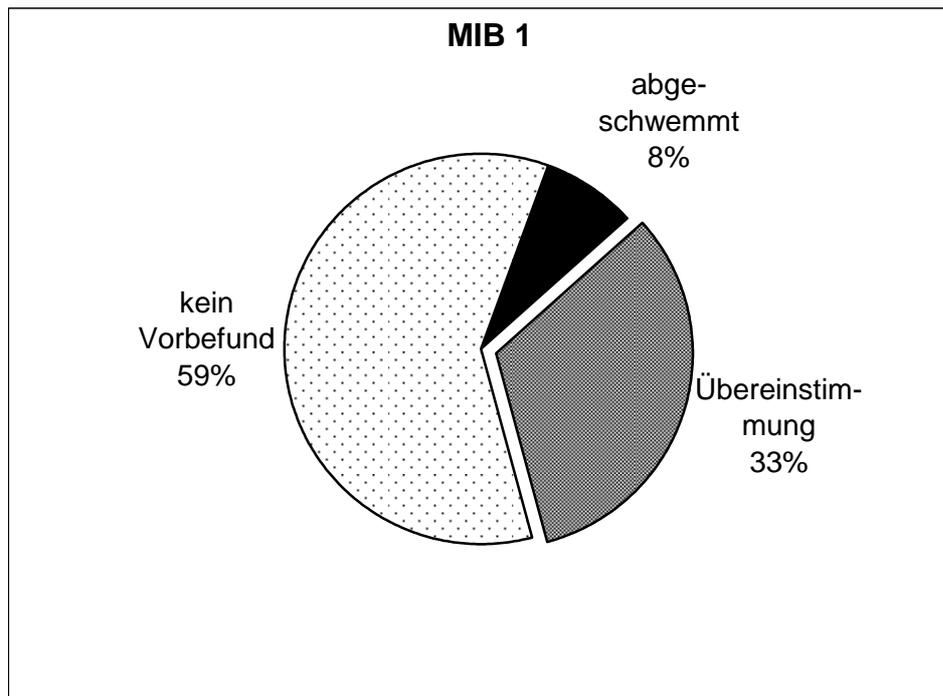
Smooth Muscle Actin

Dieser Antikörper färbt glatte Muskelzellen, Myofibroblasten und myoepitheliale Zellen an (Brennan, 2000).



SMA stimmt in 50% (26 von 52 Fällen) mit dem Vorergebnis überein. In nur 4% (2 von 52 Fällen) kommt es zu keiner Übereinstimmung der konventionellen Färbetechnik mit dem Tissue Microarray. Allerdings können insgesamt 46% (24 von 52 Fällen) nicht mit in die Auswertung einfließen, da 8% (4 von 52 Fällen) abgeschwemmt worden sind und es in 38% (30 von 52 Fällen) keinen Vorbefund gibt.

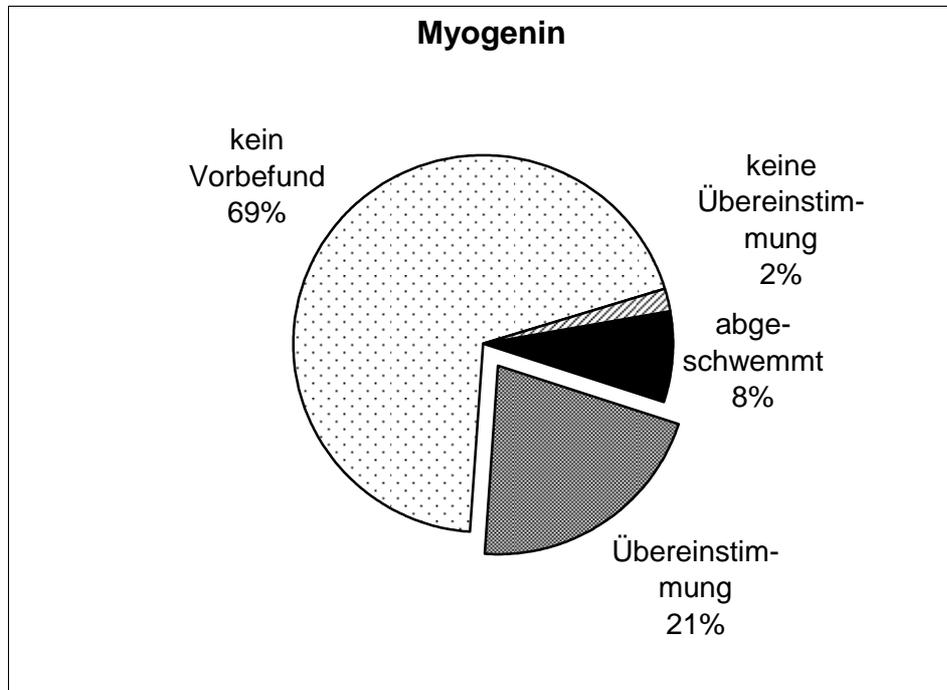
MIB 1



Bei dieser Färbung zeigt sich in 33% (17 von 52 Fällen) eine Übereinstimmung zwischen beiden Methoden. Hier können insgesamt 67% (35 von 52 Fällen) nicht bewertet werden, da in 59% (31 von 52 Fällen) kein Vorbefund vorliegt und in 8% (4 von 52 Fällen) das Material abgeschwemmt ist.

Myogenin

Myogenin färbt Muskelgewebe und mesodermale Zellen in Myoblasten an (Wright, 1989; Auradé, 1994; Weintraub, 1991).



Die Myogenin- Färbung zeigt in 21% (11 von 52 Fällen) ein gleiches Ergebnis in der herkömmlichen Methode und dem Tissue Microarray. Nur 2% (1 von 52 Fällen) sind nicht übereinstimmend. In 69% (36 von 52 Fällen) war kein Vorbefund vorhanden und 8% (4 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt.

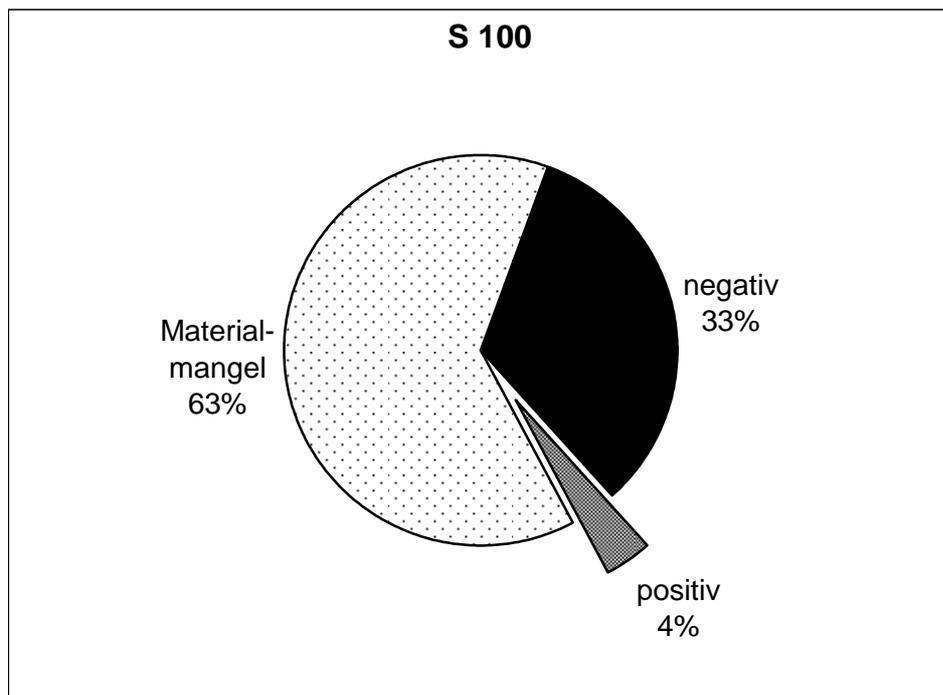
5.7. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Immunhistochemie

Experimentell erfolgte ebenfalls an diesen 52 Fällen die immunhistochemische Färbung mit verschiedenen Markern, die bisher nicht standardgemäß in der Diagnostik des Rhabdomyosarkoms eingesetzt werden.

Sollte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine weitere Unterteilung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms erforderlich gewesen sein, so ist jeweils der eine Fall, der weder sicher dem alveolären noch sicher dem embryonalen Subtyp zugeordnet werden konnte, nicht näher berücksichtigt worden.

S 100

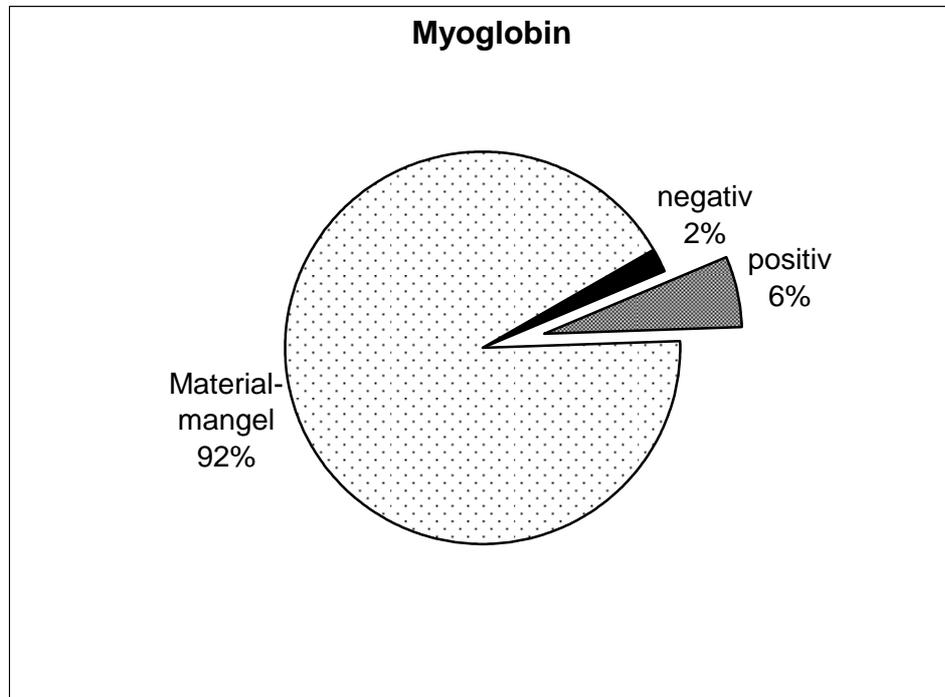
S 100 wird bevorzugt auf neurogenen Tumoren jedoch auch von verschiedenen anderen Tumoren exprimiert (Orchad, 2000; Wick 1988). Hierzu gehören auch maligne Melanome, Langerhans Histiozytosen (Ye, 1990), Chondroblastomen (Edel, 1992) und Schwannomen (Gould, 1986) vorkommen.



Hier zeigt sich, dass 63% (33 von 52 Fällen) aufgrund von nicht ausreichend vorhandenem Material nicht beurteilbar waren und es in dem restlichen Patientenkollektiv mit noch ausreichend Material für diese Untersuchung nur in 4% (2 von 52 Fällen) zu einem positiven Ergebnis gekommen ist. 33% (17 von 52 Fällen) waren negativ.

Myoglobin

Es handelt sich um einen muskulären Marker. Der Antikörper reagiert mit menschlichem Myoglobin.

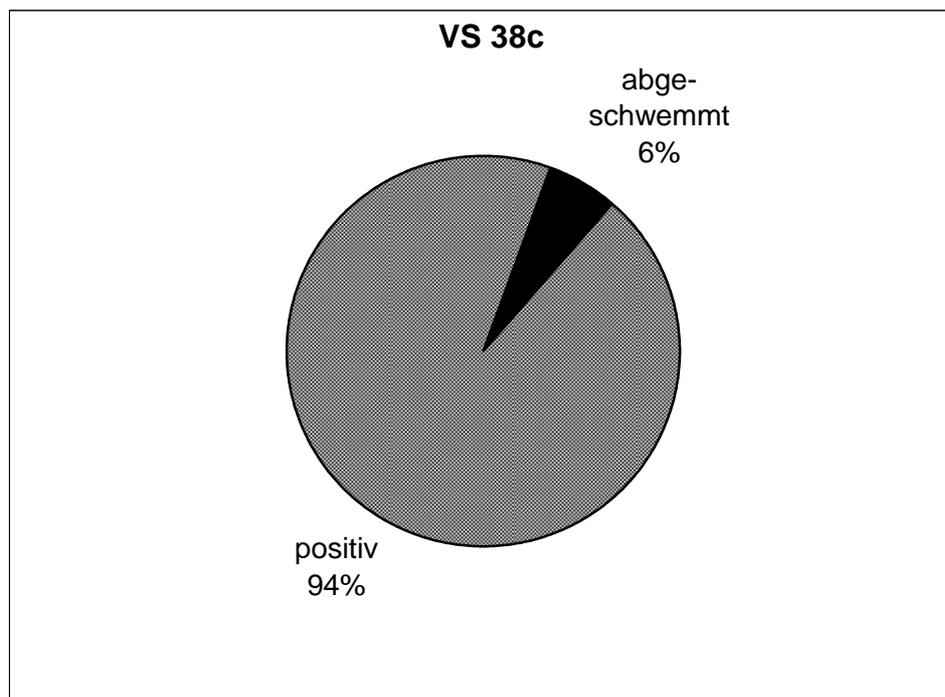


Bei der Auswertung der Myoglobinfärbung fällt ebenfalls ein sehr hoher Anteil mit nicht erfolgtem Untersuchungsgut aufgrund von Materialmangel auf. Diese Gruppe besteht aus 92% (48 von 52 Fällen). Bei den verbleibenden 4 Fällen, zeigen sich 6% (3 von 52 Fällen) positiv und 2% (1 von 52 Fällen) sind negativ.

Auch hier erfolgt keine Aufspaltung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms, da diese nicht als repräsentativ gewertet werden kann. Zudem sind hier auch alle Subtypen des Rhabdomyosarkoms vertreten.

VS 38c

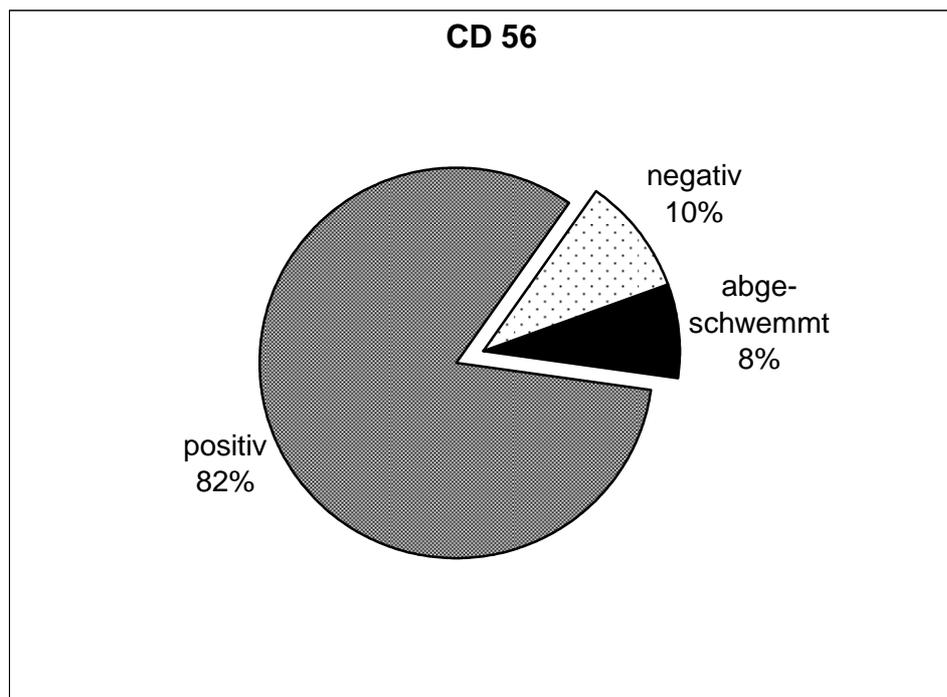
VS 38c ist ein intrazelluläres transmembranöses Protein, welches im rauen Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Schweizer, 1995). Der monoklonale Antikörper reagiert mit menschlichen Plasmazellen (Turley, 1994).



Bei VS 38c kommt es in 94% der Fälle (49 von 52 Fällen) zu einem positiven Ergebnis. Nur 6% (3 von 52 Fällen) der Fälle sind abgeschwemmt und können somit nicht in die Auswertung einfließen.

CD 56

Dieser Antikörper färbt eine Vielzahl von Tumoren, darunter auch Rhabdomyosarkome. Er weist die Existenz von NK- Zellen nach. NK- Zellen sind eine Untergruppe aktivierter T- Lymphozyten und neuroektodermaler Zellen (NCCLS, 1991).

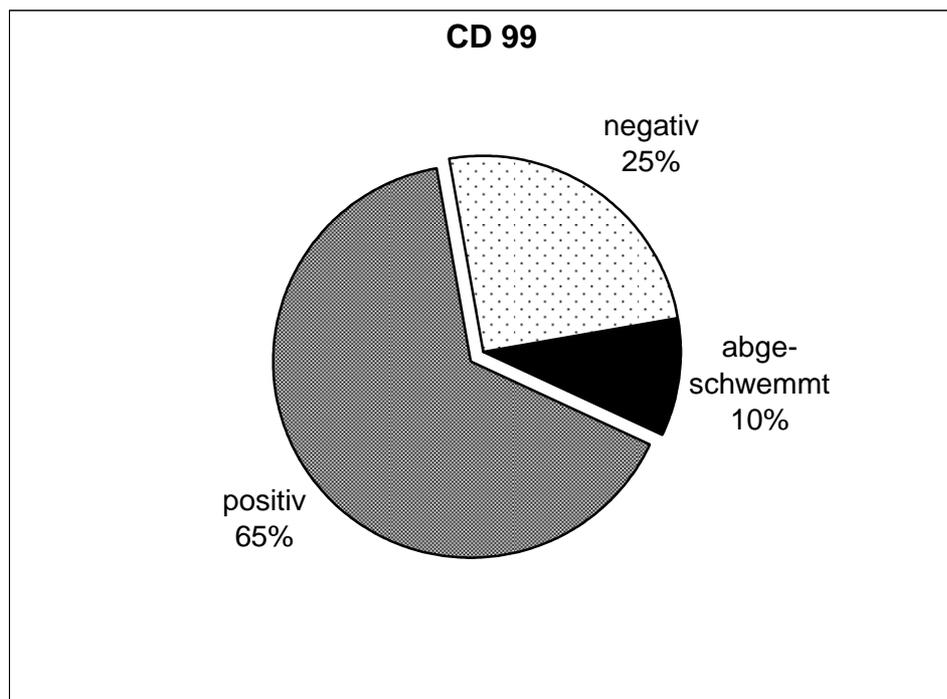


Die Färbung mit CD 56 zeigt in 82% (43 der 52 Fälle) ein positives Ergebnis. Lediglich 10% (5 von 52 Fällen) sind negativ und 8% (4 von 52 Fällen) sind durch ihr abgeschwemmtes Ergebnis nicht verwertbar.

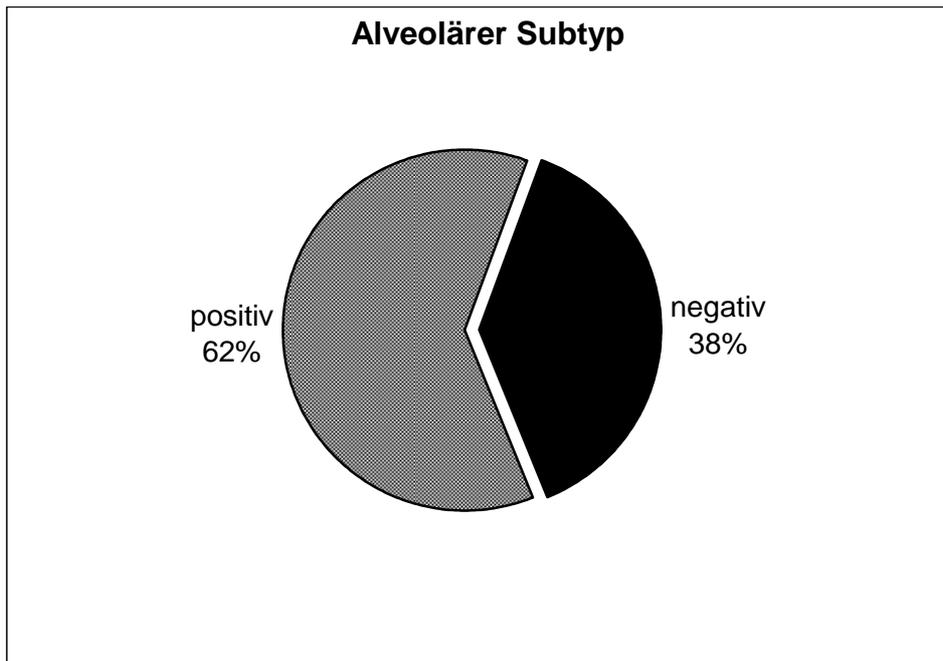
Auch hier erfolgt aufgrund des hohen positiven Ergebnisses keine Aufspaltung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms, da dieser keine Aussagekraft beigewogen werden kann.

CD 99

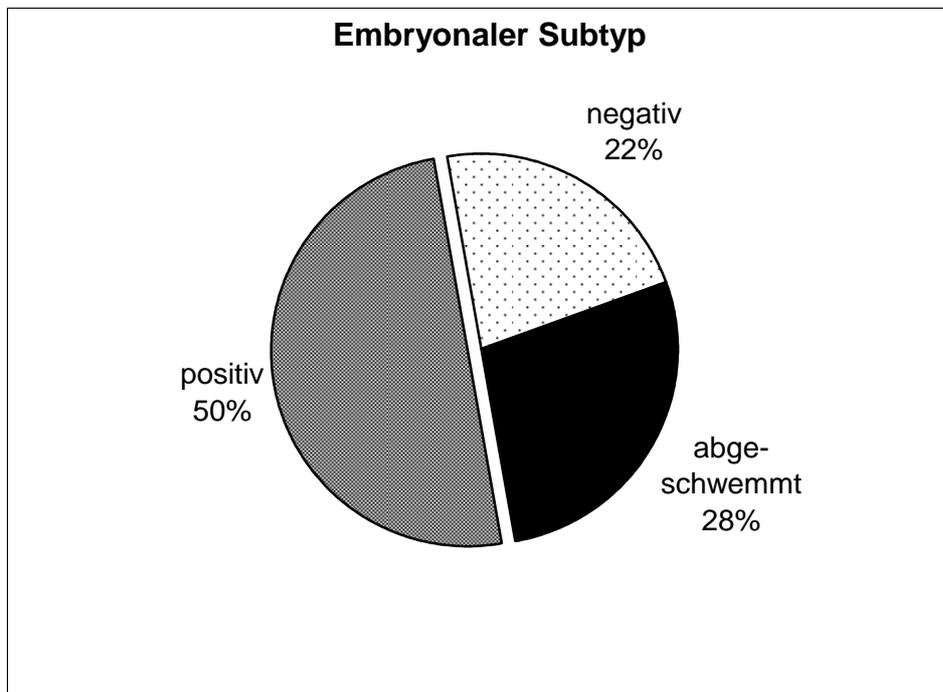
CD 99 ist ein Marker, welcher bevorzugt membranständig bei Tumoren der Ewing-Sarkomfamilie zu beobachten ist, jedoch auch von malignen Lymphomen exprimiert wird. Er kann somit als differenzialdiagnostischer Marker eingesetzt werden.



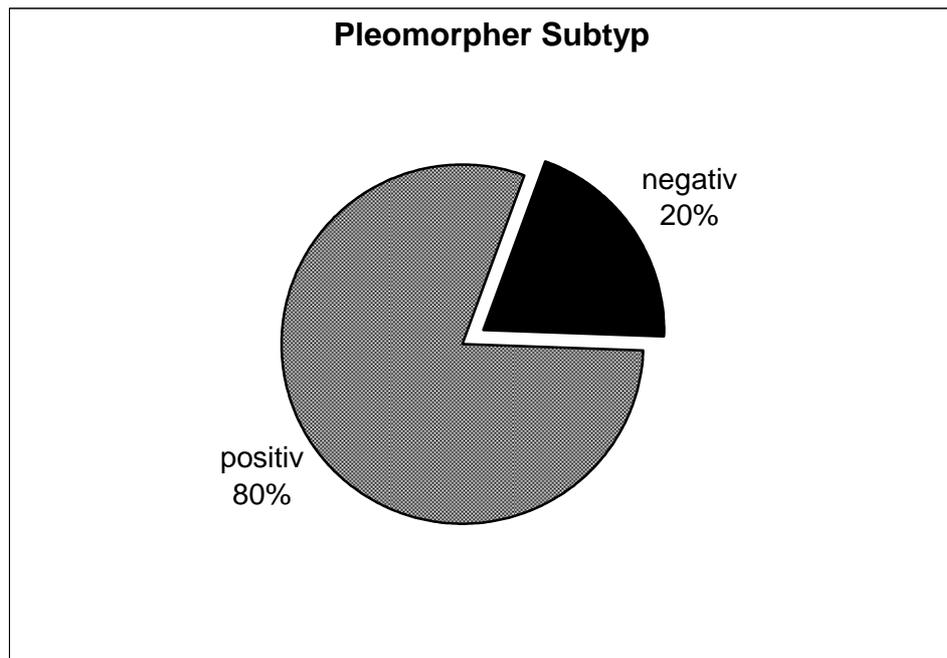
Bei der Auswertung der Ergebnisse der Färbung mit CD 99 zeigt sich folgendes Ergebnis, was aufgrund seiner Verteilung anschließend noch einmal näher unter Einteilung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms betrachtet werden muss: 65% der gestanzten Kollektivs sind positiv (34 von 52 Fälle), 25% (13 von 52 Fällen) zeigen ein negatives Ergebnis und nur 10% (5 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt worden.



Beim alveolären Subtyp zeigt sich hier kein signifikant relevantes Ergebnis, 38% (5 von 13 Fällen) zeigen ein negatives Ergebnis, während es in 62% (8 von 13 Fällen) zu einem positiven Ergebnis kommt.



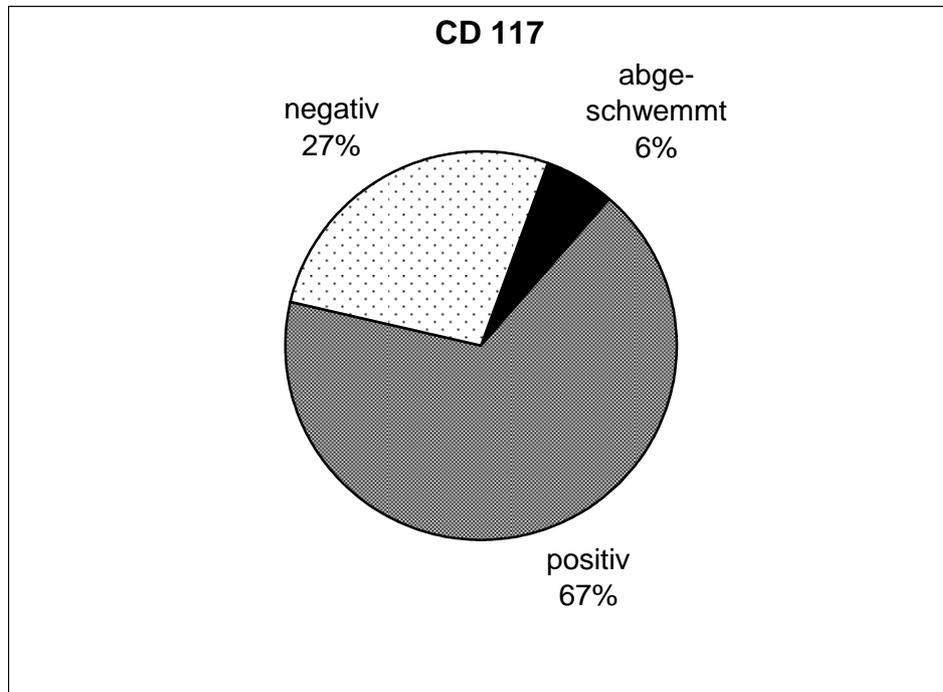
Der embryonale Subtyp zeigt bei der näheren Betrachtung schon deutlichere Auffälligkeiten: 50% (9 von 18 Fällen) der Färbungen sind positiv ausgefallen, lediglich 22% (4 von 18 Fällen) der Färbungen sind negativ ausgefallen. In 28% (5 von 18 Fällen) konnte aufgrund von abgeschwemmten Material leider keine Beurteilung erfolgen, was bei dem vorliegenden Ergebnis der CD 99- Färbung durchaus hätte relevant sein können.



Ein deutliches Ergebnis zeigt sich bei der pleomorphen Unterart, da es hier in 80% (16 von 20 Fällen) zu einem positiven Ergebnis gekommen ist. Nur 20% (4 von 20 Fällen) sind negativ.

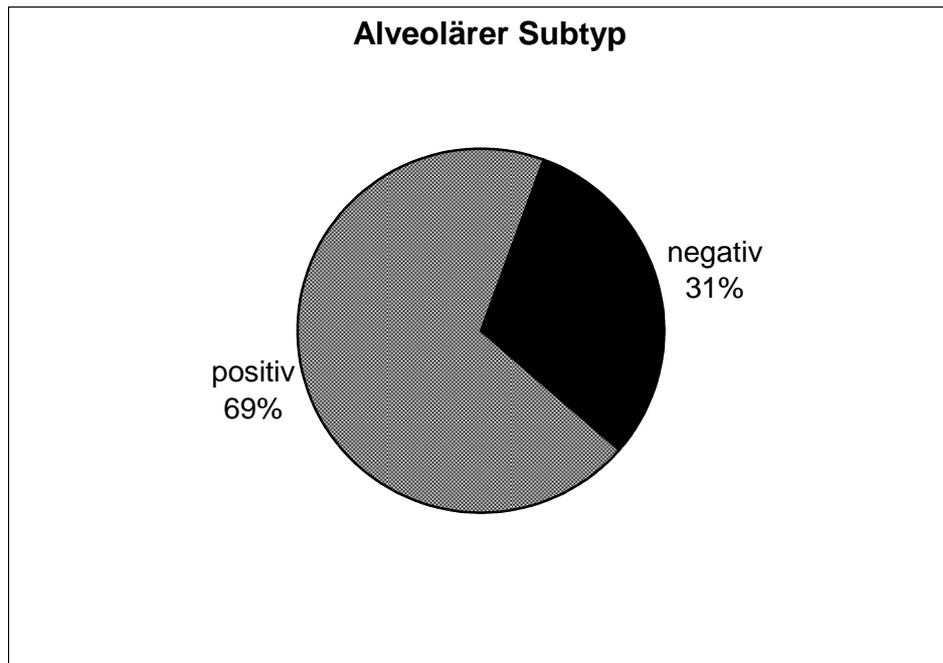
CD 117

CD 117 hat therapeutische Relevanz (Tsuura, 1994; van Oostermon, 2001; Hornick, 2002; Smithey, 2002).

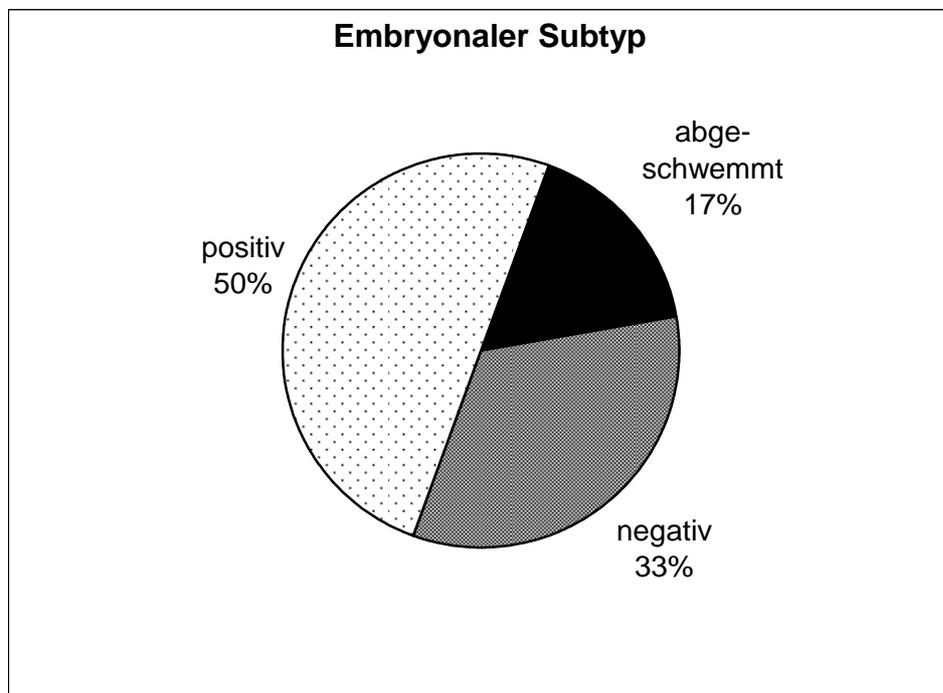


CD 117 zeigt eine Positivität in 67% (35 von 52 Fällen). Negativ sind nur 27% (14 von 52 Fällen). 6% (3 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt worden.

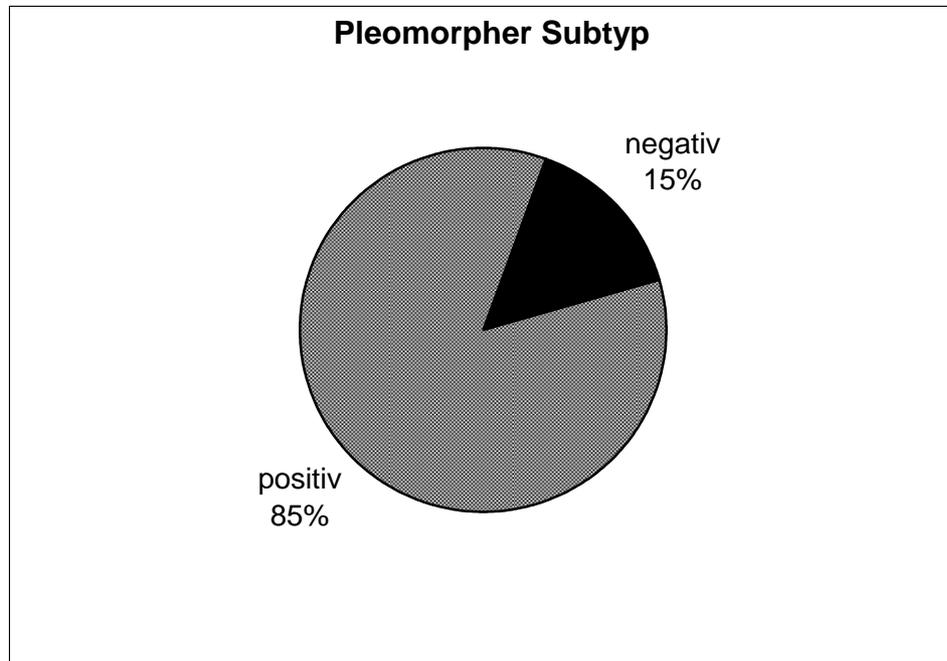
Auch dieses Ergebnis sollte unter Berücksichtigung der Subtypen näher betrachtet werden:



Beim alveolären Subtypen kommt es hier in 69% (9 von 13 Fällen) zu einem positiven Ergebnis, wohingegen 31% (4 von 13 Fällen) negativ sind.



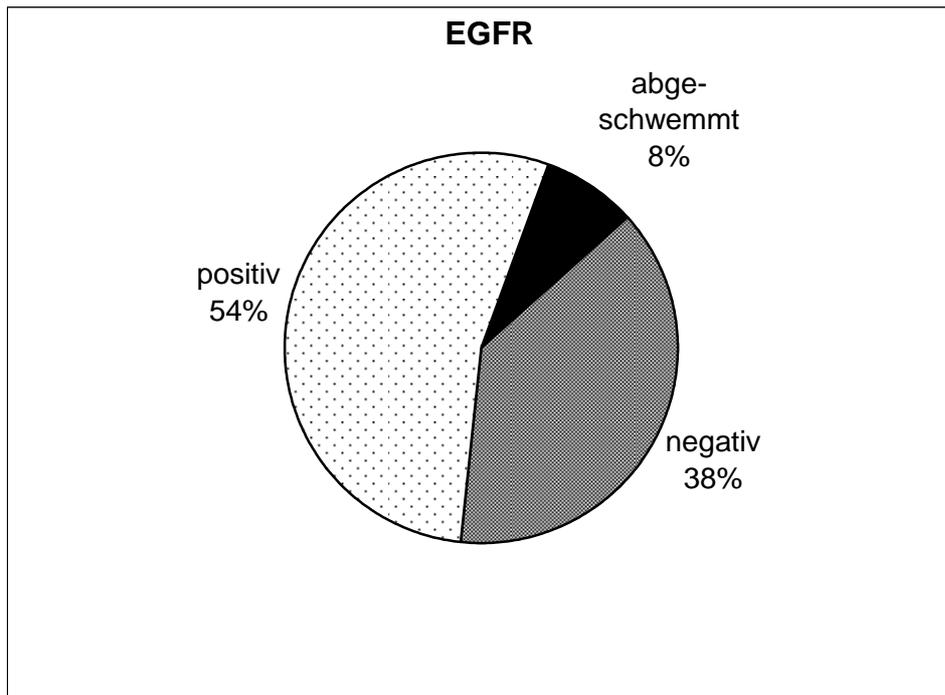
Der embryonale Subtyp zeigt mit 50% (9 von 18 Fällen) eine positive Anfärbung, 33% (6 von 18 Fällen) sind negativ und 17% (3 von 18 Fällen) können nicht mit in die Bewertung einfließen.



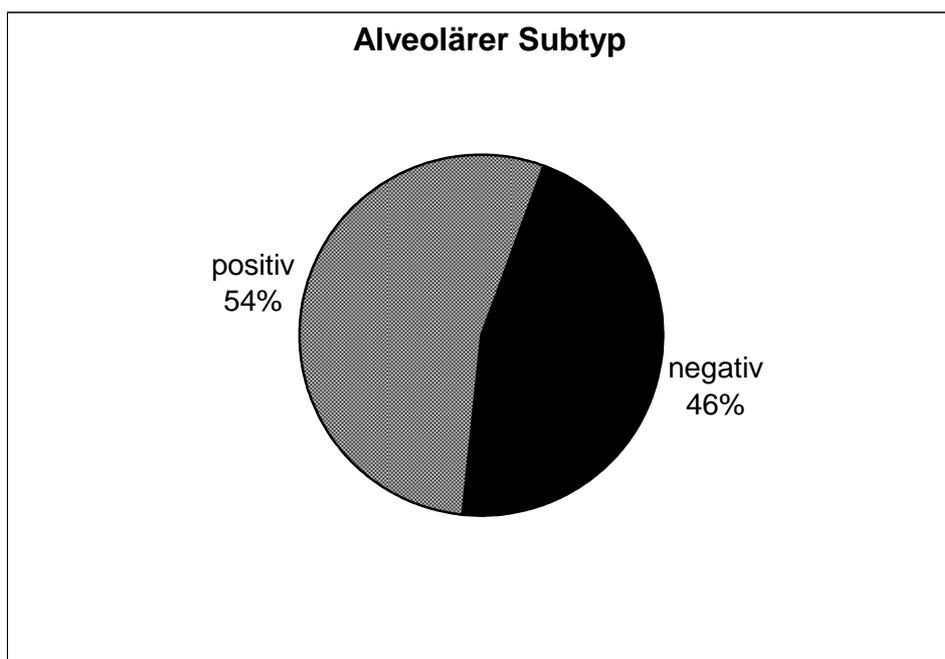
Ein sehr deutliches Ergebnis zeigt auch bei dieser Antikörper- Färbung wieder der pleomorphe Subtyp, da 85% (17 von 20 Fällen) der pleomorphen Fälle sich mit dem Antikörper färben. Nur 15% (3 von 20 Fällen) zeigen ein negatives Ergebnis.

EGFR

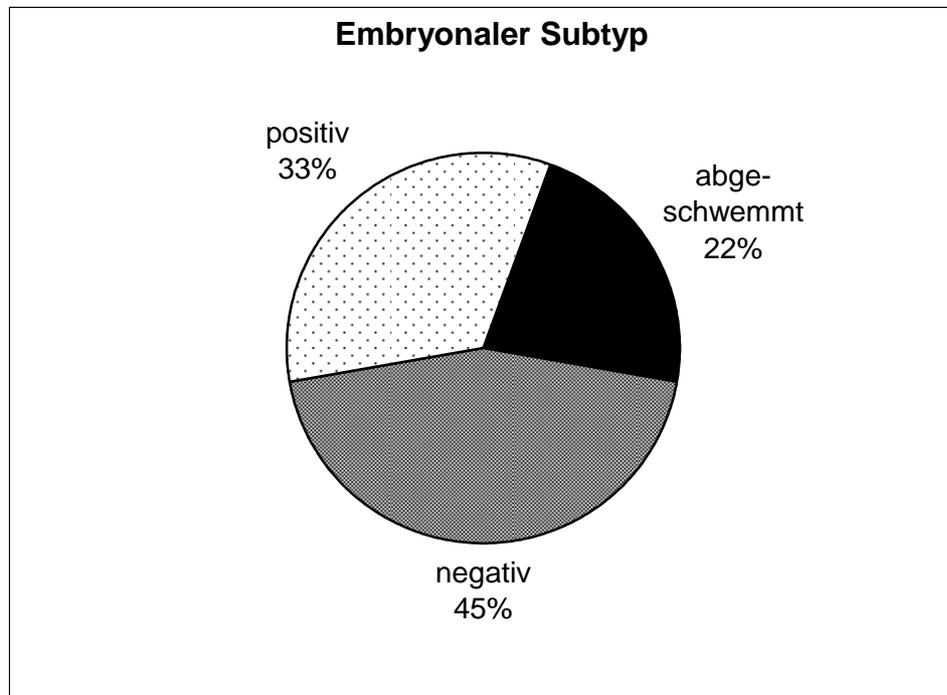
Dieser Marker ist therapeutisch einsetzbar. Epidermal Growth Factor Receptor ist ein 170- kD- Transmembran- Glykoprotein, das verschiedene Liganden binden und von ihnen aktiviert werden kann. Diese Bindung führt letztendlich zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums und somit zu einer erhöhten DNA- Synthese, Zellproliferation und Differenzierung (Gullick, 1991; Carpenter, 1987; Margolis, 1989; Schlesinger, 1983).



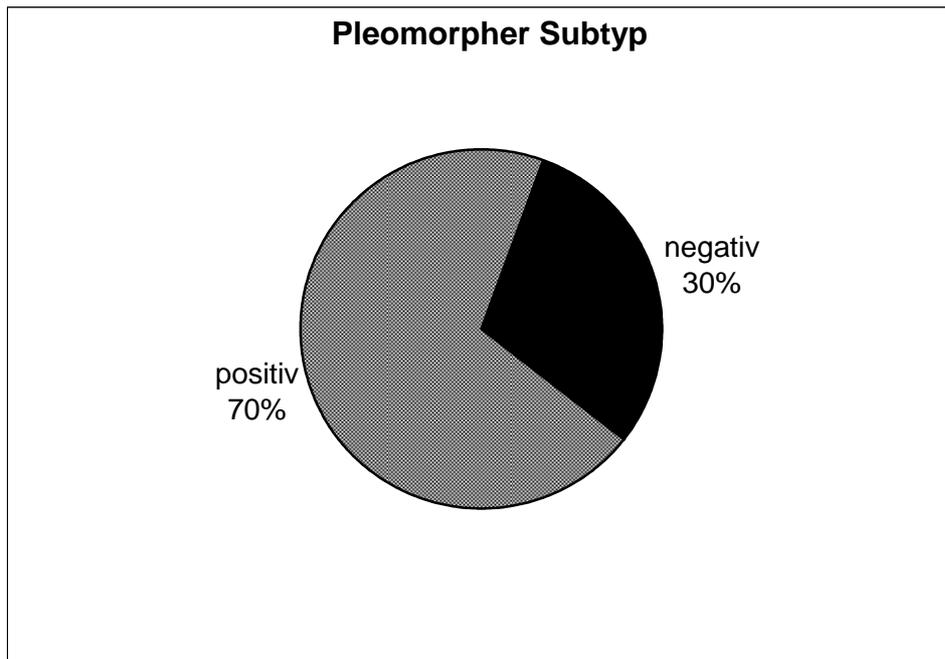
Bei der Färbung mit EGFR zeigt sich in 54% (28 von 52 Fällen) eine Positivität. Demgegenüber sind 38% (20 von 52 Fällen) negativ. 8% (4 von 52 Fällen) sind durch ihr abgeschwemmtes Material nicht verwertbar. Auch dieses Ergebnis muss näher betrachtet werden.



Beim alveolären Subtypen kommt es zu keinem signifikanten Ergebnis. 46% (6 von 52 Fällen) sind negativ, 54% (7 von 52 Fällen) sind positiv.



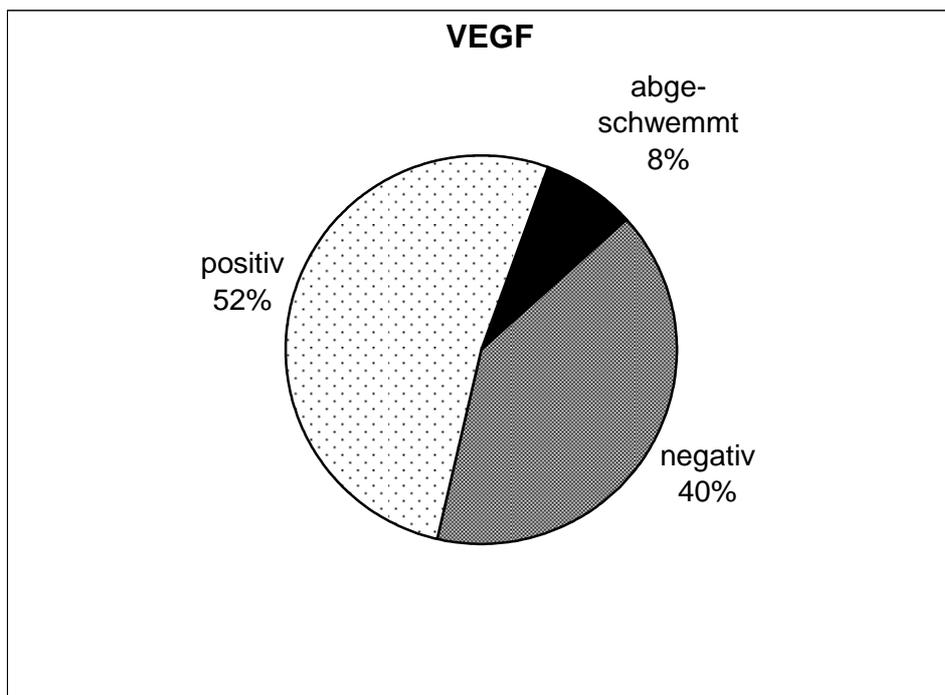
Das embryonale Rhabdomyosarkom zeigt in 45% (8 von 18 Fällen) ein negatives Ergebnis, 33% (6 von 18 Fällen) sind positiv. Allerdings sind 22% (4 von 18 Fällen) abgeschwemmt.



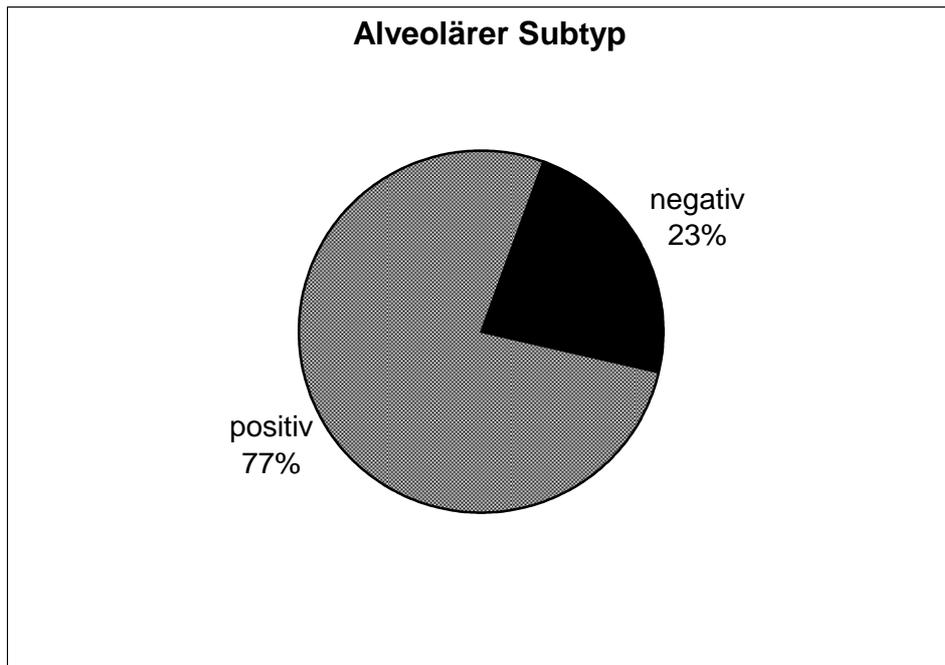
Pleomorphe Rhabdomyosarkome zeigen auch hier wieder ein deutlich positives Ansprechen auf die Anfärbung: 70% (14 von 20 Fällen) sind positiv und nur 30% (6 von 20 Fällen) zeigen kein Ansprechen auf die Färbung.

VEGF

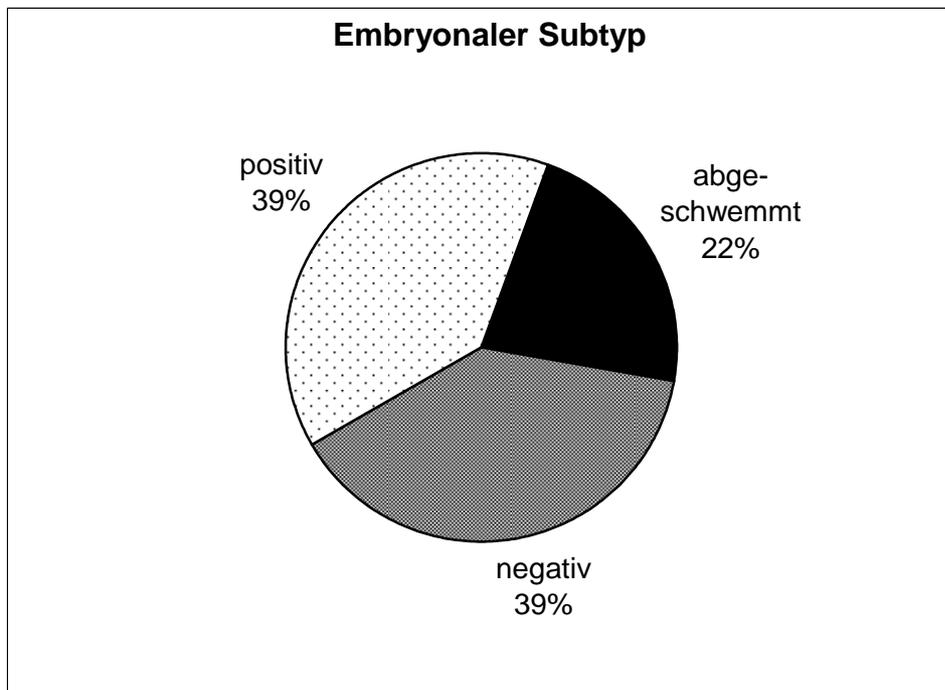
VEGF ist ein Glykoprotein, welches die Angiogenese carcinomatöser und metastatischer Strukturen aufweist. Dieser Marker ist von therapeutischer Relevanz, jedoch nicht wesentlicher diagnostischer Relevanz zur Charakterisierung der Weichteiltumoren.



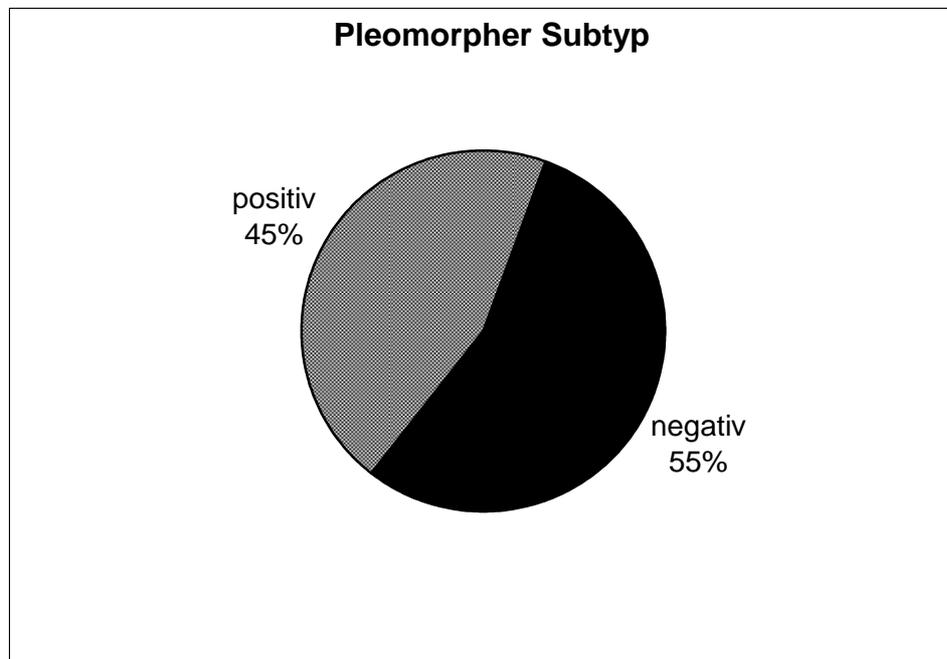
Die Auswertung der Färbung mit VEGF zeigt eine Positivität in 52% (27 von 52 Fällen) und 40% (21 von 52 Fällen) sind negativ. Nur 8% (4 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt. Nun erfolgt die weitere Differenzierung in die Unterarten des Rhabdomyosarkoms.



Das alveoläre Rhabdomyosarkom zeigt hier eine deutliche Neigung zu einer positiven Reaktion, welche bei dem vorliegenden Kollektiv mit 77% (10 von 13 Fällen) anzugeben ist. Nur 23% (3 von 13 Fällen) sind negativ.



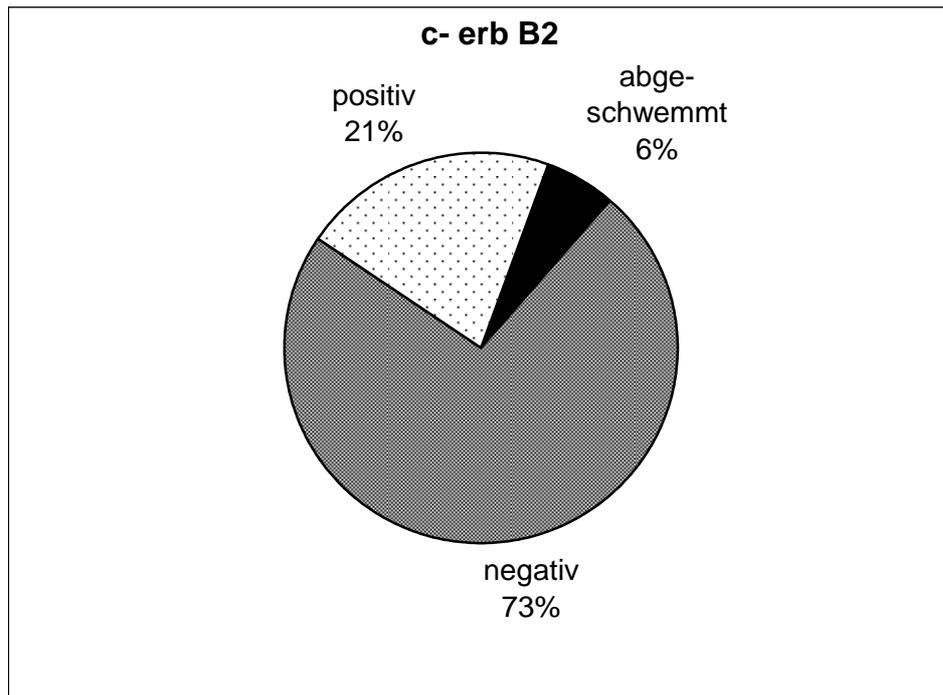
Jeweils 39% (7 von 18 Fällen) erweisen sich sowohl als negativ als auch als positiv bezüglich ihrer Anfärbarkeit beim embryonalen Rhabdomyosarkom. 22% (4 von 18 Fällen) sind abgeschwemmt worden.



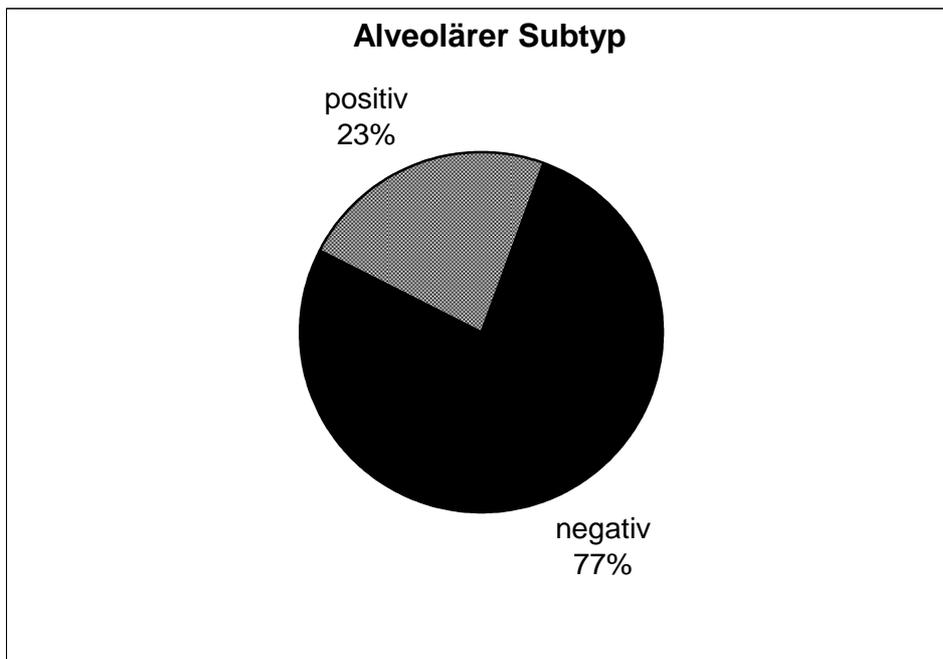
Das pleomorphe Rhabdomyosarkom zeigt keine deutliche Präferenz für eine negative (55%; 11 von 20 Fällen) oder positive (45%; 9 von 20 Fällen) Färbung.

c- erb B2

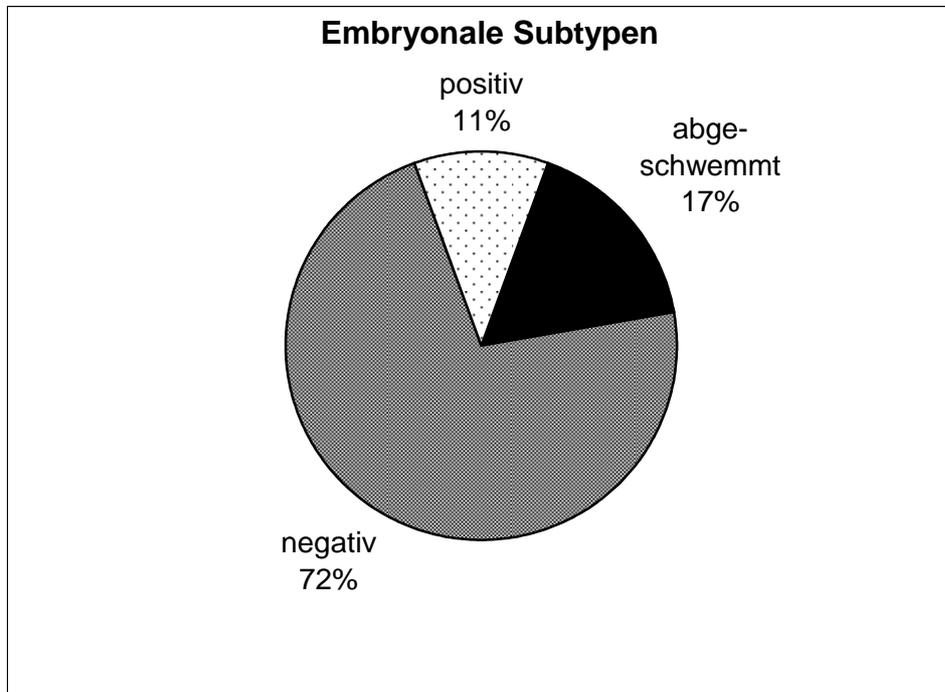
Es handelt sich um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, welcher therapeutischen Relevanz, insbesondere bei Adenocarcinomen z.B. der Mamma aufweist. Der Rezeptorüberexpression liegt eine Genamplifikation zu grunde.



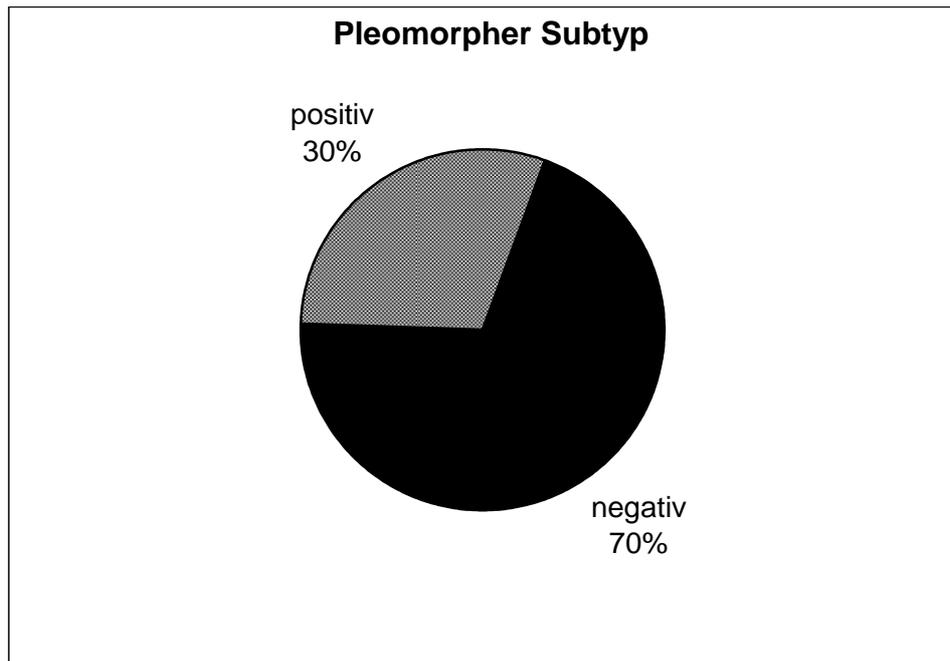
In 73% (48 von 52 Fällen) zeigt diese Färbung ein negatives Verhalten. Nur 21% (11 von 52 Fällen) sind positiv und 6% (3 von 52 Fällen) können nicht beurteilt werden, da sie abgeschwemmt worden sind. Aufgrund des Ergebnisses erfolgt die weitere Differenzierung.



Beim alveolären Rhabdomyosarkom zeigt sich mit 77% (10 von 13 Fällen) eine deutliche Negativität bezüglich der Antikörper-Färbung. Nur 23% (3 von 13 Fällen) sind positiv.



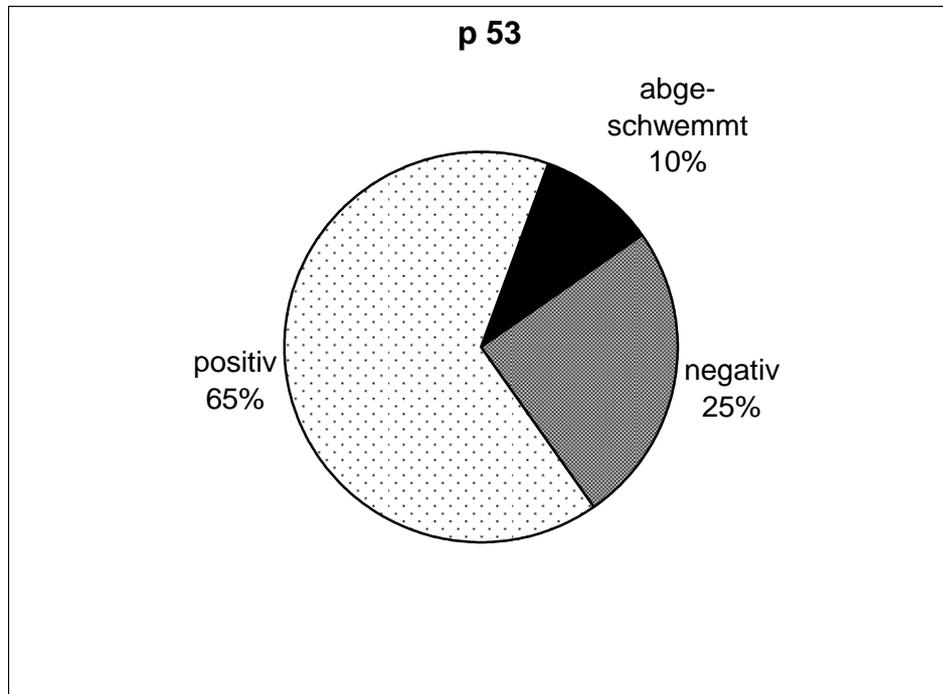
Auch der embryonale Subtyp zeigt eine deutliche Präferenz zur negativen Antikörper-Färbung. 72% (13 von 18 Fällen) folgen dieser und es zeigen sogar nur 11% (2 von 18 Fällen) ein positives Verhalten. 17% (3 von 18 Fällen) sind abgeschwemmt worden.



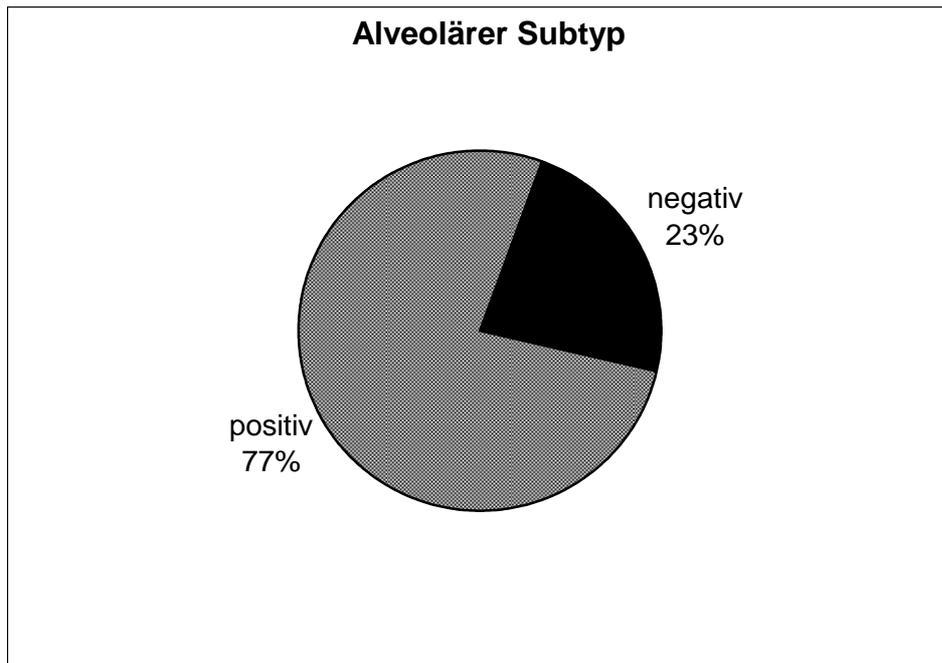
Auch der pleomorphe Subtyp neigt eher mit 70% (14 von 20 Fällen) zu einer negativen Reaktion. 30% (6 von 20 Fällen) zeigen sich positiv.

p 53

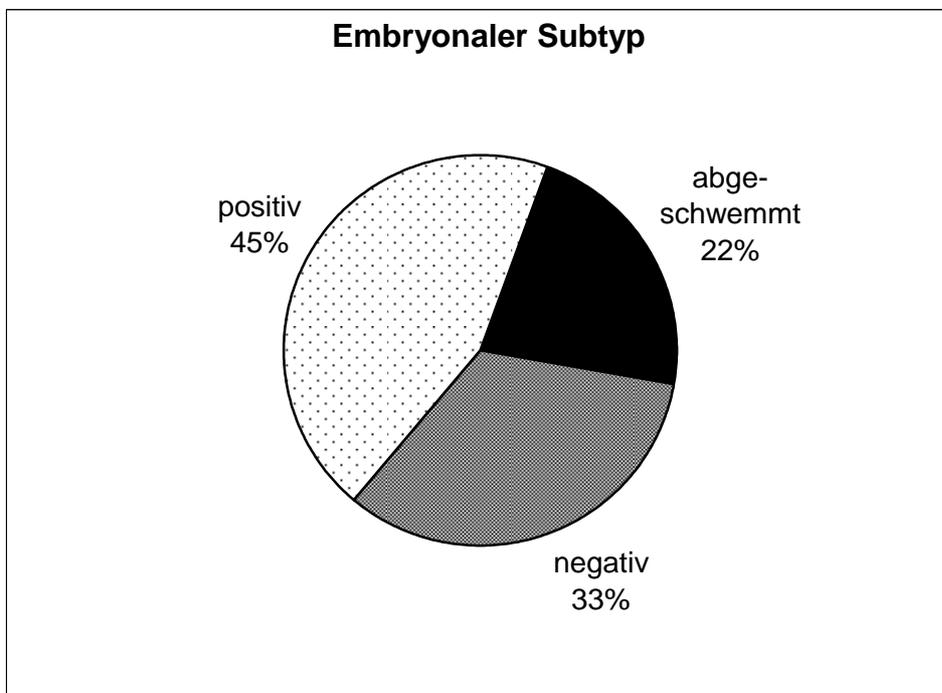
P 53 identifiziert p 53- Akkumulationen in humanen Neoplasien (Vojtesek, 1992; Nieder, 2001; Ramael, 1992).



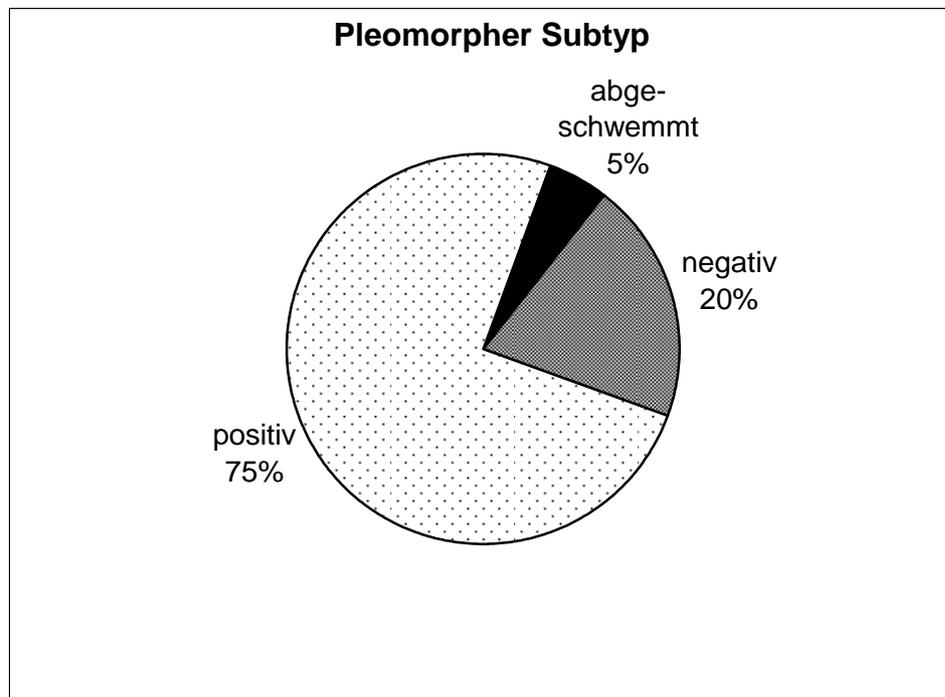
Bei der Färbung mit diesem Antikörper fällt eine positive Reaktion in 65% (34 von 52 Fällen) auf. 25% (13 von 52 Fällen) sind negativ und in 10% (5 von 52 Fällen) ist das Material abgeschwemmt. Auch hier erfolgt nun jeweils eine weitere Betrachtung des alveolären, embryonalen und pleomorphen Rhabdomyosarkoms.



Eine deutliche positive Reaktion liegt bei diesem Marker für das alveoläre Rhabdomyosarkom mit 77% (10 von 13 Fällen) vor. Nur 23% (3 von 13 Fällen) sind negativ.



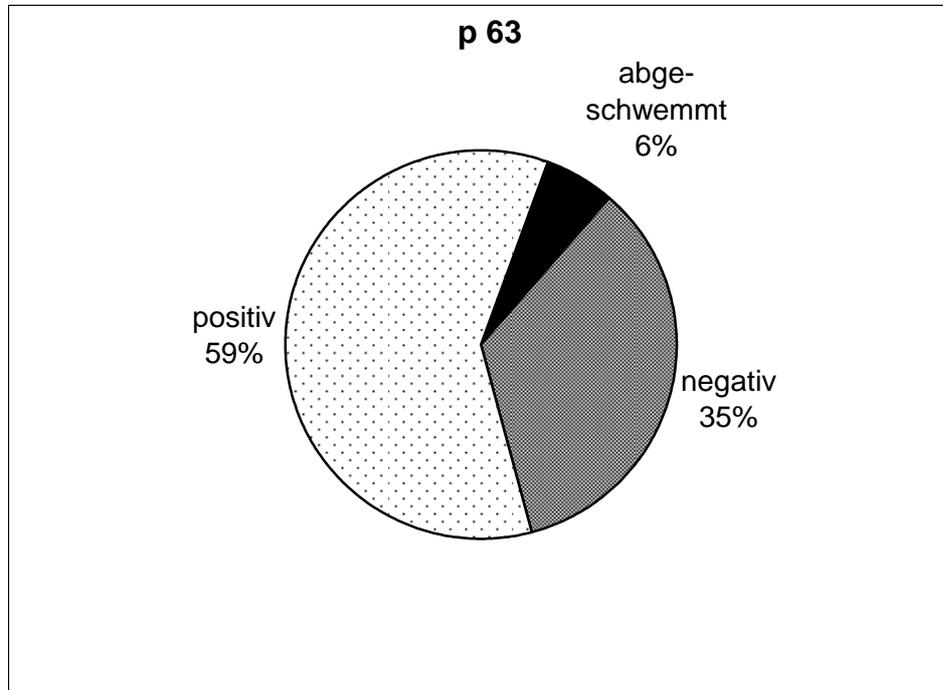
Im embryonalen Subtyp kommt es zu keiner direkt auffälligen Verteilung. 45% (8 von 18 Fällen) sind positiv, 33% (6 von 18 Fällen) sind negativ. 22% (4 von 18 Fällen) sind abgeschwemmt.



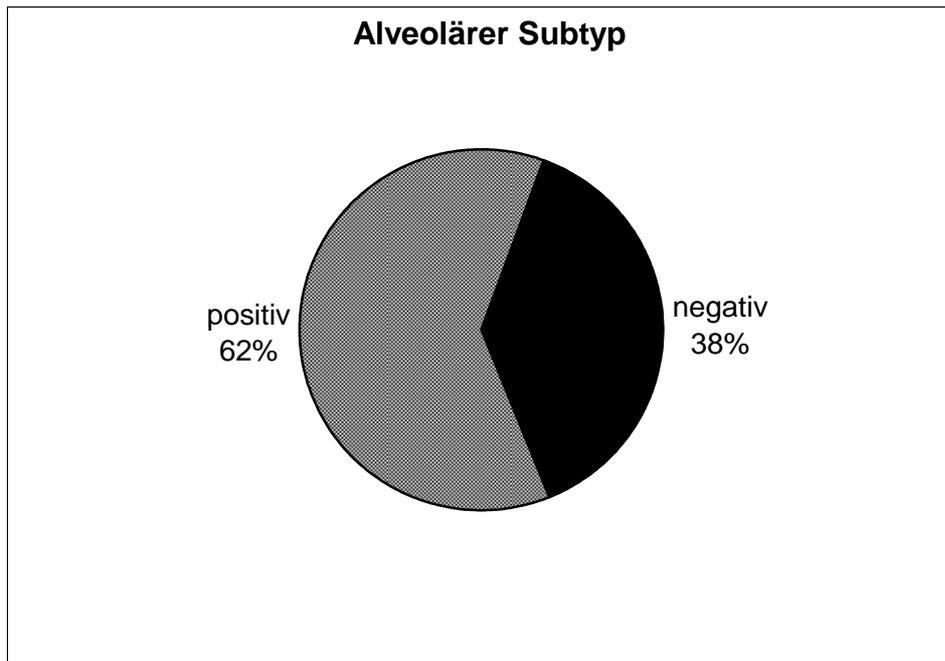
Hier zeigt sich beim pleomorphen Rhabdomyosarkom eine deutlich positive Reaktion mit 75% (15 von 20 Fällen). 20% (4 von 20 Fällen) des Gesamtkollektivs verhält sich bei der Färbung negativ und als abgeschwemmt gelten 5% (1 von 20 Fällen).

p 63

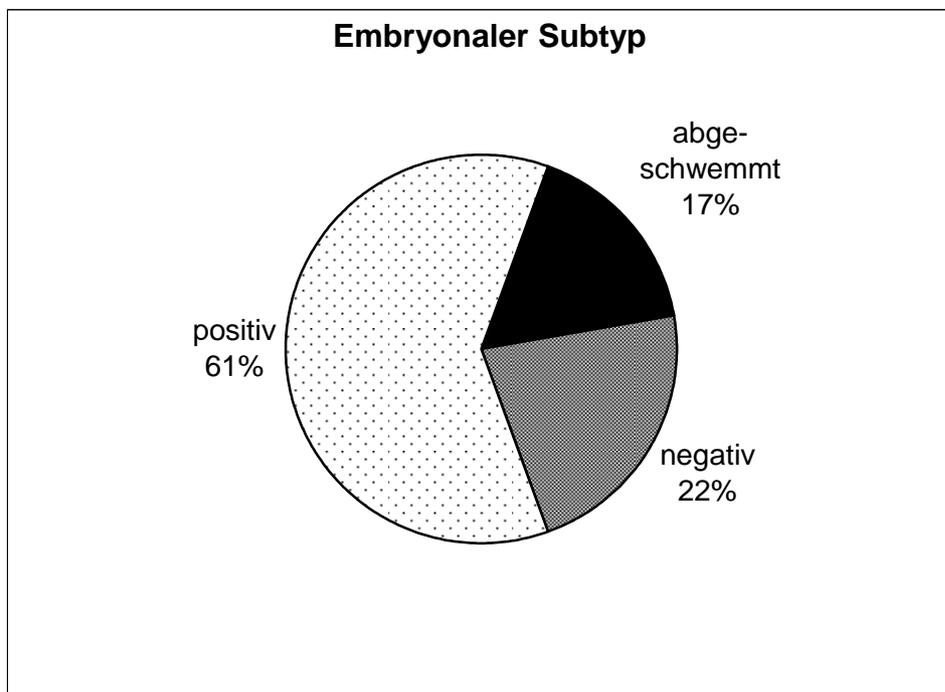
P 63 gehört zur Tumorsupressorgenfamilie.



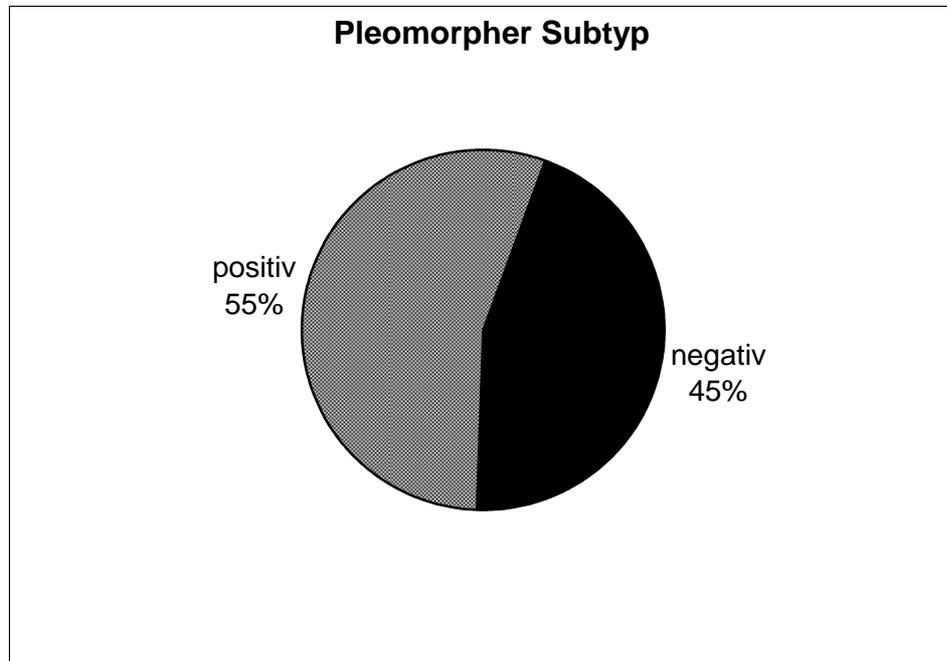
Dieser Antikörper färbt in 59% (31 von 52 Fällen) positiv an. 35% (18 von 52 Fällen) verhalten sich negativ und 6% (3 von 52 Fällen) sind abgeschwemmt worden. Auch hier erfolgt nun eine nähere Betrachtung der Subtypen.



Das alveoläre Rhabdomyosarkom färbt sich in 62% (8 von 13 Fällen) an. 38% (5 von 13 Fällen) sind negativ.



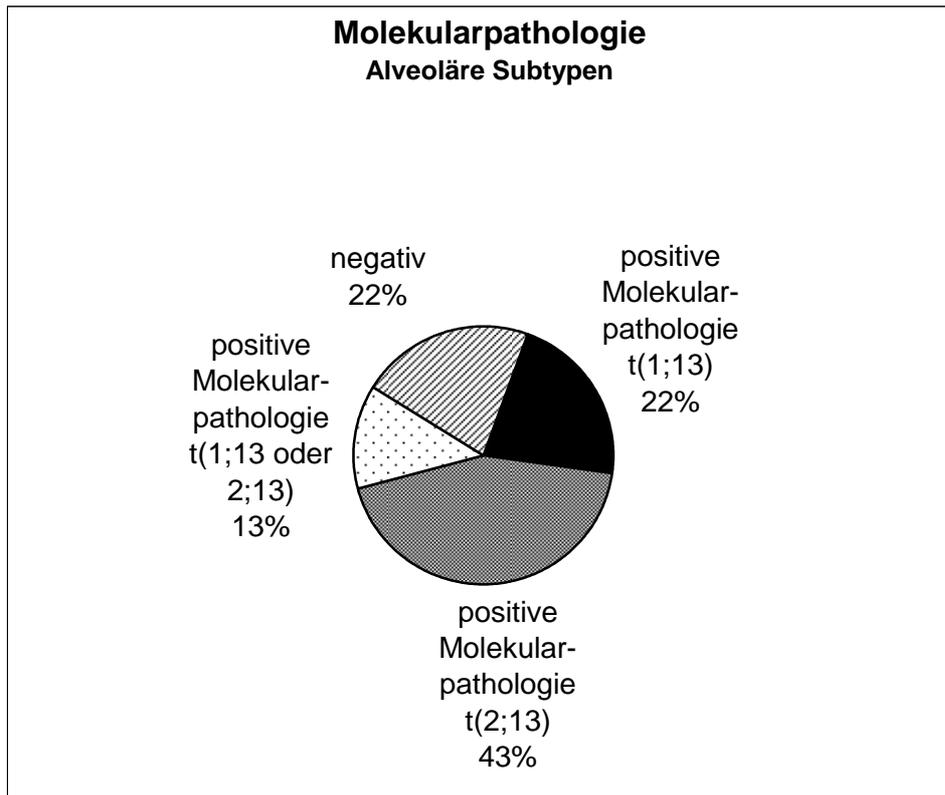
Das embryonale Rhabdomyosarkom zeigt sich in 61% (11 von 18 Fällen) positiv bezüglich der Anfärbung. 22% (4 von 18 Fällen) sprechen nicht auf die Färbung an und 17% (3 von 18 Fällen) sind abgeschwemmt worden.



Das pleomorphe Rhabdomyosarkom zeigt keine besondere Vorliebe. 55% (11 von 20 Fällen) färben sich mit dem Antikörper an, 45% (9 von 20 Fällen) hingegen nicht.

5.8. Untersuchungsergebnisse bzgl. der Molekularpathologie

Beim alveolären Subtyp des Rhabdomyosarkoms können charakteristische Translokationen molekularpathologisch nachgewiesen werden, welche bei den anderen Subtypen des Rhabdomyosarkoms nicht vorhanden sind.



In 22% (5 von 23 Fällen) liegt eine positive Molekularpathologie mit der Translokation t(1;13) vor. In 43% (10 von 23 Fällen) liegt eine positive Molekularpathologie mit der Translokation t(2;13) vor. 13% (3 von 23 Fällen) sind positiv, aber aufgrund von Mangel an histologischen Präparat nicht näher verifizierbar bzgl. der vorliegenden Translokation. In 22% (5 von 23 Fällen) kann eine Molekularpathologie nicht nachgewiesen werden.

6. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten die Literaturergebnisse bzgl. der **Geschlechtsverteilung** bestätigt werden. Auch hier waren mehr männliche als weibliche Patienten betroffen (Fletcher, 2002).

Auch konnten die bisherigen Literaturangaben bzgl. der **Lokalisationen** untermauert werden. Alveoläre Rhabdomyosarkome treten meist im Extremitätenbereich auf (Kissane, 1990), wohingegen die embryonalen Subtypen mehr im Bereich der Organe anzutreffen sind (Böcker, 2004). Ebenso sind die pleomorphen Rhabdomyosarkome - wie in der Literatur angegeben – vermehrt im Bereich der Extremitäten anzutreffen (Fletcher, 2002).

Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei der **Altersverteilung**. Hier sind laut Literaturangaben die embryonalen Rhabdomyosarkome meist im Alter von 5 - 8 Jahren anzutreffen. Dieses ist in der hier durchgeführten Studie anders, da hier eine Dominanz des embryonalen Rhabdomyosarkoms vor allem im Alter bis zu fünf Jahren vorherrscht. Übereinstimmung bzgl. der Literatur und den Ergebnissen dieser Studie wird bei der Altersverteilung der pleomorphen und alveolären Rhabdomyosarkome erreicht.

Auf die **Molekularpathologie** bezogen harmonieren die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie mit den Literaturangaben. Die embryonalen und pleomorphen Subtypen zeigen – wie in der Literatur angegeben - keine Molekularpathologie (Fletcher, 2002), wobei hier darauf hingewiesen werden muss, dass bei zwei Fällen (Fall 39 – embryonales Rhabdomyosarkom - und ein weiterer Fall eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms, der nicht im Tissue Microarray vertreten wurde) aufgrund dessen, dass sie lediglich im Rahmen einer referenzpathologischen Beurteilung in die Datenbank aufgenommen wurden, nicht ausreichend Material für eine molekularpathologische Beurteilung vorgelegen hat.

Statistisch auffallend ist jedoch, dass sich in 7% (5 von 72 Fällen) sogar beim alveolären Subtypen eine Molekularpathologie (weder eine Mutation für t(1;13) noch für t(2;13) ist nachweisbar) nicht nachgewiesen werden konnte. Hier muss allerdings darauf verwiesen werden, dass im Fall von Fall 8 ein alveoläres Rhabdomyosarkom sicher diagnostiziert

werden konnte – obwohl die Molekularpathologie nicht nachweisbar war. An diesen Fall schließen sich zwei weitere Fälle an, die zum einen als Rezidiv und zum anderen als Metastase in diese Arbeit eingeflossen sind und sich hier auch im weiteren Verlauf histologisch ein alveoläres Rhabdomyosarkom mit negativer Molekularpathologie zeigte.

In Anlehnung an diesen Fall präsentiert sich auch der Fall 7, bei dem ebenfalls trotz keines molekularpathologischen Nachweises histologisch ein alveoläres Rhabdomyosarkom sicher diagnostiziert wurde.

Interessant zu betrachten ist der Fall 52, der als Rezidiv des Falls 51 in diese Studie eingegangen ist. War die Molekularpathologie des Primärtumors noch positiv, so zeigt sich im Falle des Rezidivs nun kein molekularpathologischer Nachweis. Histologisch ist aber weiterhin der alveoläre Subtyp von Bestand.

Insgesamt kann in dieser Studie eine deutliche Übereinstimmung der konventionellen Färbemethode mit dem **Tissue Microarray** aufgezeigt werden. Allerdings muss bei dieser Aussage darauf hingewiesen werden, dass auffallend ist, dass ein Anteil der Stenzen, die den einzelnen Patientenfall im Tissue Microarray darstellten, während des Verfahrens abgeschwommen sind und somit aussagegelos geblieben sind. Daher müsste bei einem dauerhaften Einsatz des Tissue Microarrays der einzelne Patient zur Gewährleistung eines Ergebnisses durch mehrere Stenzen repräsentiert werden. Das Abschwemmen im Tissue Microarray führte somit in dieser Studie zu einer teilweise unzureichenden Auswertung der experimentellen immunhistochemischen Auswertung. Bei den nicht abgeschwommenen Stenzen zeigt sich – mit Ausnahme der Färbung mit Desmin – eine deutliche Übereinstimmung der beiden Verfahren.

Bezogen auf die **immunhistochemischen Färbungen** mit **Desmin** zeigen sich einige Male unterschiedliche Ergebnisse in der konventionellen Färbemethode gegenüber den Ergebnissen im Tissue Microarray. Begründet werden kann diese Tatsache damit, dass unterschiedliche Antikörper verwendet wurden. Bei einigen älteren konventionellen Färbungen wurden Ventana- Antikörper verwendet, die inzwischen nicht mehr eingesetzt werden. Der Fall 35 soll hier als Synonym für diese Fälle erwähnt werden, bei denen ein unterschiedliches Ergebnis zwischen dem Primärpräparat und dem Tissue Microarray in der Desminfärbung vorliegt.

VS 38c und **CD 56** färben sich in einem großen Teil der Fälle an, so dass sie bzgl. einer weiteren Unterteilung in die Subtypen des Rhabdomyosarkoms nicht weiterhelfen.

Da es nur in 4% der Fälle bei der Färbung mit **S 100** zu einem positiven Ergebnis gekommen ist, ist eine weitere Betrachtung der S 100- Färbung unter dem Gesichtspunkt der Subtypen des Rhabdomyosarkoms nicht erforderlich.

c- erb B2 zeigt bei allen Subtypen eine geringe Anfärbung, so dass diesem Marker kein hoher diagnostischer Wert zugesprochen werden kann.

P 53 und **P 63** färben bei allen Subtypen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit an.

CD 117, **VEGF** und **EGFR** sind Marker, die keine diagnostische Relevanz besitzen, sondern lediglich in Bezug auf eine mögliche Therapie mit Antikörpern genutzt werden können. Diese zeigen in der hier vorliegenden Studie bei allen drei Subtypen des Rhabdomyosarkoms eine hohe Anfärberate. In dem Fall der Anfärbung könnte man einen therapeutischen Nutzen aus diesem Sachverhalt ziehen.

Um dieses zu verdeutlichen: 67% aller Fälle lassen sich mit **CD 117** anfärben. **VEGF** färbt 52% aller Fälle an, **EGFR** färbt 54% aller Fälle an. Bei der näheren Betrachtung der Subtypen zeigt sich das pleomorphe Rhabdomyosarkom bzgl. CD 117 und EGFR sehr gut anfärbbar, wohingegen bei VEGF das alveoläre Rhabdomyosarkom dominiert. Lediglich das embryonale Rhabdomyosarkom zeigt bei keinem der drei Marker eine herausragende Anfärbbarkeit.

Bei **CD 99** ist zu berücksichtigen, dass dieser Marker nicht nur bei Rhabdomyosarkomen, sondern ebenfalls bei Ewing- Sarkomen und Lymphomen eine Anfärbung zeigt. Dieses nimmt bzgl. der differentialdiagnostischen Überlegungen einen hohen Stellenwert ein und die Diagnose sollte immer durch weitere immunhistochemische Färbungen gesichert werden.

Interessant zu betrachten ist der Fall 16, bei dem sich in der Färbung mit CD 56 eine positive Färbung „bizarrer Zellen“ zeigt, wohingegen es bei der Färbung mit CD 117 zu der Anfärbung anderer Zellen gekommen ist. Hierbei handelt es sich um einen Fall nach Chemotherapie. Wahrscheinlich handelt es sich bei den kleinen Zellen um Tumorzellen. Myogenin färbt hier positiv an, wohingegen Desmin komplett negativ bleibt. Hierbei bleibt

nun fraglich, ob es sich in diesem Fall wirklich um ein Rhabdomyosarkom handelt oder ob nach einer erfolgten Chemotherapie nun undifferenzierte Tumorzellen vorhanden sind, die myogene Marker exprimieren.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Raem, A. M., Rauch, P. Immunoassays, 1. Auflage, München: Elsevier 2007; 155/156
- (2) Remmele, W. Pathologie 4, 2. Auflage, Springer, 1997; 526 – 533
- (3) Imbach, P., Kühne, T. Kompendium Kinderonkologie, 2. Auflage, Heidelberg: Springer, 2004; 179
- (4) Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U. Pathologie, 3. Auflage, München: Elsevier, 2004; 1082- 1084
- (5) Speer, C. P., Gahr, M. Pädiatrie, 2. Auflage, Heidelberg: Springer, 2005; 802- 804
- (6) Berry, C. L. Pediatric Pathology, 2nd edition, Springer; 783- 785
- (7) Fletcher, Diagnostic histopathology of Tumors II, 2nd edition, Churchill, Livingstone, 2000; 1515- 1517
- (8) Kissane, J. M. Anderson`s Pathology, Volume Two, 9th edition; 1990; 1864- 1871
- (9) WHO Tumors of the Breast an Female Genital Organs; 326
- (10) Fletcher, C. D. M., Unni, K.K., Mertens, F. WHO Classification of Tumors Pathology and Genetics, Tumors of Soft Tissue and Bone, IARC Press, 2002; 146- 149
- (11) Leuschner, I., Harms, D. Pathologie der Rhabdomyosarkome des Kinder- und Adoleszentenalters, Der Pathologe, 1999; 87- 97
- (12) Leonard, D. G. B. Diagnostic Molecular Pathology, Volume 41 in the Series Major Problems in Pathology, Saunders, 2003
- (13) Chang TK, Li CY, Smithson WA. Immunocytochemical study of small round cell tumors in routinely processed specimens, Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 1343- 8
- (14) Pollock L, Rampling D, Greenwald SE, Malone M. Desmin expression in rhabdomyosarcoma: influence of the desmin clone and immunohistochemical method, J Clin Pathol 1995; 48: 535- 8
- (15) Azumi N, Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms, Am J Clin Pathol 1987; 88: 286- 96
- (16) Brennan PA, Umar T, Zaki GA, Langdon JD, Spedding A, Buckley J, et al. Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide

synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study, *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 279- 83

(17) Wright WE, et al. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD, *Cell* 1989; 56:607

(18) Auradé F, et al. Myf5, MyoD, myogenin and MRF 4 myogenic derivatives of the embryonic mesenchymal cell line C3H10T1/2 exhibit the same adult muscle phenotype, *Differentiation* 1994; 55:185

(19) Weintraub H, et al. The myoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage, *Science* 1991; 251: 761

(20) Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S 100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma, *Histochem J* 2000; 32:475-81

(21) Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB- 45. An immunohistochemical study of 200 paraffin- embedded cutaneous tumors, *J Cutan Pathol* 1988; 15:201-7

(22) YE F, Huang S-W, Dong H-J. Histiocytosis X. S 100 protein, peanut agglutinin, and transmission electron microscopy study, *Am J Clin Pathol* 1990; 94:627-31

(23) Edel G, Ueda Y, Nakanishi J, Brinker KH, Roessner A, Blasius S, et al. Chondroblastoma in bone. A clinical, radiological, light and immunohistochemical study, *Virchows Arch A Pathol Anat* 1992; 421:355-66

(24) Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Schwechtheimer K, Franke WW. The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms, *Lab Invest* 1986; 55:463-74

(25) Schweizer A, Rohrer J, Slot JW, Geuze HJ, Kornfeld S. Reassessment of the subcellular localization of p63, *J Cell Science* 1995; 108:2477-85

(26) Turley H, Jones M, Erber W, Mayne K, de Waele M, Gatter K. VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections, *J Clin Pathol* 1994;47:418-22

(27) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue, proposed guideline, Villanova, P. A. 1991;7(9). Order code M29-P

- (28) Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T et al. Preferential localization of c- kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/ dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin- fixed, paraffin- embedded tissues, *Virchows Arch* 1994; 424: 135 – 41
- (29) van Oostermon AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola ED, Dimitrijevic S, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study, *Lancet* 2001; 358: 1421 – 3
- (30) Hornick JL, Fletcher CDM. Immunohistochemical staining for KIT (CD 117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution, *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 188 – 93
- (31) Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C- kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study, *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 486 – 92
- (32) Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers, *Br Med Bull* 1991; 47 (1): 87
- (33) Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens, *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 881
- (34) Margolis B et al. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- II: A potential mechanism for egfr signaling, *Cell* 1989; 57: 1101
- (35) Schlesinger J et al. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor, *CRC Crit Rev Biochem* 1983; 14 (2): 93
- (36) Vojtesek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p 53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p 53, *J Immunol Methods* 1992; 151: 237 – 44
- (37) Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p 53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non- Hodgkin's lymphoma (review), *Ann Hematol* 2001; 80: 2 – 8
- (38) Ramael M, Lemmens G, Eerdekens C, Buysse C, Devlier I, Jacobs W et al. Immunoreactivity for p 53 protein in malignant mesothelioma and non- neoplastic mesothelium, *J Pathol* 1992; 168: 371 – 5

(39) Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch et al. P 63, a p53 homolog at 3q 27 – 29, encodes multiple products with transactivating, death- inducing, and dominant- negative activities, Mol Cell 1998; 2: 305 – 16

8. Anhang

8.1. Antikörper

Desmin	Monoclonal Mouse Anti- Human Desmin, Clone D 33, Code- Nr. M 0760, Edition 19.12.02, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
Vimentin	Monoclonal Mouse Anti- Vimentin, Clone V9, Code No. M 0725 Lot. 092, Edition 16.09.02, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark
	Abgebrochen am 12.02.04: Monoclonal Mouse Anti- Vimentin, Clone V9, Code No. M 0725, Lot. 090, Edition 30.08.00, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark
Smooth Muscle Actin	Monoclonal Mouse Anti- Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, Code No. M 0851 Lot. 070, Edition 17.10.01, DAKO, Glostrup, Denmark
Myogenin	Monoclonal mouse Anti- rat Myogenin, Clone: F5D, Code M3559, DAKO Cytomation, Via Real, USA
S 100	Polyclonal Rabbit Anti- S 100, Code No. Z 0311, Lot 017, Edition 05.08.02, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
Myoglobin	Rabbit Anti- Human Myoglobin, code No. A 324, Lot 062, Edition 01.08.94, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
VS 38c	Monoclonal Mouse Anti- Human Plasma Cell, Clone VS 38c, Code No. M 7077, Lot 028. Edition 30.03.00, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
CD 56	DAKO REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
MIB 1	Monoclonal Mouse Anti- Human, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark

CD 99	Monoclonal Mouse Anti- Human, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
CD 117	Polyclonal Rabbit Anti- Human CD 117, c- kit, Dode A 4502, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
EGFR	Code M 3563, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
VEGF	Mouse Monoclonal Antibody, Lab Vision, Fremont CA, USA
c- erb B2	Polyclonal Rabbit Anti- human c- erbB- 2 Oncoprotein, Code No. A 0485, Edition 30.04.03, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
p 53	Monoclonal Mouse Anti- Human p 53 Protein, Clone DO- 7, Code No./ M 7001, Edition 18.12.02, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
p 63	Monoclonal Mouse Anti- Human p 63 Protein, Clone 4A4, Code No. M 7247, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark

8.2. Tabelle immunhistochemisch und molekularpathologisch verwandter Fälle

Laufende Nummer	Immunhistochemie															
	Desmin	Vimentin	SMA	MIB 1	Myogenin	S 100	Myoglobin	VS 38 c	CD 56	CD 99	CD 117	EGFR	VEGF	c-erb 2	p 53	p 63
1	neg neg	pos schwach pos	neg neg	vereinzelte	pos schwach pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M	neg	neg	neg	neg	neg	0%	0%
2	pos	pos	?schwach pos	90%	pos			stark pos, Z	stark pos, M + Z	schwach pos, Z	?schwach pos, M	schwach pos, Z	schwach pos, Z	neg	> 50%	< 5%
3	pos stark pos	schwach pos	neg neg	75%	mäßig pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M	schwach pos, Z	schwach pos, M	neg	schwach pos, Z	?schwach pos, Z	15-20%	0%
4	pos pos	pos pos	neg neg	40% 50%	pos pos	pos		stark pos, Z	stark pos, M	mäßig pos, Z + ?M	neg	mäßig pos, Z	pos, Z	neg	50%	vereinzelte
5	pos	pos	neg	50%	pos			stark pos, Z	stark pos, Z + M	neg	neg	schwach pos, Z	?schwach pos	neg	50%	5%
6	stark pos	pos	neg	30%	stark pos			stark pos, Z	stark pos, M	neg	schwach pos, ?Z	neg	schwach pos, Z	vereinzelte pos, Z + M	25%	10%
7	pos pos	pos schwach pos	pos schwach pos	gering vereinzelte	schwach pos	neg	pos	pos mäßig pos, Z	mäßig pos, M	mäßig pos, Z	mäßig pos, M	neg	schwach pos, Z	stark pos, Z	< 5%	0%
8	pos pos	pos pos	neg neg	ca. 40% 75%	pos			stark pos, Z	stark pos, M	neg	mäßig pos, M	mäßig pos, Z	mäßig pos, Z	neg	30%	< 5%
9	pos neg	pos	neg neg	5%	mäßig pos			stark pos, Z	stark pos, M	neg	neg	mäßig pos, Z	mäßig pos, Z	neg	30%	0%
10	pos pos	pos	pos pos	2- 5% <5%	pos	neg	pos	stark pos, Z	mäßig pos, ?M	stark pos, Z	einzelne pos, Z	mäßig pos, Z	neg	neg	30%	10%
11	pos pos	pos	neg	15-20%	schwach pos			stark pos, Z	stark pos, M	schwach pos, Z	schwach pos, Z	stark pos, Z	neg	neg	< 5%	0%
12	pos pos	pos	schwach pos schwach pos	75%	schwach pos	neg	neg	stark pos, Z	stark pos, M	schwach pos, Z	schwach pos, Z	schwach pos, Z	neg	schwach pos, Z	90%	< 5%
13	pos pos, 30%	pos pos	?pos	5%	schwach pos		pos	stark pos, Z	mäßig pos, M + Z	neg	einzelne pos, Z + ?M	?schwach pos, Z	einzelne schwach pos, Z	neg	90%	0%
14	mäßig pos	schwach pos	? Schwach pos	25-30%	schwach pos			mäßig pos, Z	stark pos, M	neg	schwach pos, Z	mäßig pos, M	schwach pos, Z + ?M	schwach pos, Z + M	5%	0%
15	neg neg	pos	pos pos	30%	schwach pos			stark pos, Z	mäßig pos, M	mäßig pos, Z	stark pos, Z	neg	schwach pos, Z	neg	< 5%	50%

Laufende Nummer	Molekularpathologie	Diagnose	Differenzierung (embryonal, pleomorph, alveolär, unbestimmt)	Lokalisation	Erkrankungsalter in Jahren	Geschlecht (männlich/weiblich)	Primärtumor/ Rezidiv
1	t (1;13) Exonsequenzen (PAX 7/ FKHR)	alveoläres RMS	alveolär	intrathorakaler Tumor im unteren linken Mediastinum	4	w	Primärtumor
2	t (2;13)	alveoläres RMS, Z. n. PE und Chemo: Regressionsgrad V nach Salzer- Kuntschik-Schema l vitale Tumorzellen	alveolär	rechter Vorfuß	16	w	Primärtumor
3	t (2;13) PAX 3/ FKHR	alveoläres RMS mit teilweise anaplastischer Komponente	alveolär	rechter Fußrücken	15	w	Primärtumor
4	t (2;13) PAX 3/ FKHR	alveoläres RMS	alveolär	rechte Hand	10	m	Primärtumor
5	t (2;13)	alveoläres RMS	alveolär	linker proximaler Oberschenkel, gluteal gelegen	75	m	Primärtumor
6	t (1;13) PAX 7/ FKHR	alveoläres RMS	alveolär		0	w	Primärtumor
7	neg	Infiltration der linken Niere durch ein RMS, G2	alveolär	Unterpole der linken Niere	55	w	Primärtumor
8	neg	Lymphknotenmetastasen eines alveolären RMS	alveolär	Halslymphknoten links	19	w	LK- Metastasen eines in der Studie aufgenommenen Primärtumors
9	neg	Infiltrate eines RMS- Rezidivs	alveolär	LK links thorakal	19	w	Rezidiv eines in der Studie aufgenommenen Primärtumors
10	neg	pleomorphes RMS, G2	pleomorph	rechter lateraler Oberschenkel	50	w	Primärtumor
11	neg	pleomorphes RMS mit fokaler Desminexpression, G3	pleomorph	rechter lateraler Oberschenkel	51	w	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommenen Primärtumors
12	neg	pleomorphes RMS, G3	pleomorph	Weichgewebe mit Scapula	63	m	Primärtumor
13	neg	pleomorphes RMS	pleomorph	Hypopharynx	77	m	Primärtumor
14	neg	pleomorphes RMS, pT1 pN0 (0/29) pMx, G3	pleomorph	linker Sinus piriformis	77	m	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommenen Primärtumors
15	neg	metastatische Infiltration (Rezidiv) der Lunge durch ein unbekanntes pleomorphes RMS	pleomorph	rechter Lungenoberlappen	63	m	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommenen RMS

16	neg neg	pos	neg	30-40% 50-75%	pos pos			stark pos, Z	mäßig pos, M	schwa ch pos, Z	stark pos, Z + M	stark pos, M + Z	neg	neg	0%	> 50%
17	pos mäßig pos	pos pos	pos schwa ch pos	> 80% 75%	schwa ch pos	neg		stark pos, Z	mäßig bis stark pos, M	mäßig pos, Z	schwa ch pos, Z	stark pos, Z	neg	schwa ch pos, Z	0%	0%
18	pos neg	pos pos	neg neg	> 40% 20%	neg	neg		stark pos, Z	neg	mäßig pos, Z	neg	neg	neg	neg	nicht beurtei lbar	0%
19	pos pos	pos	pos	ca. 90%	pos schwa ch pos			stark pos, Z	stark pos, M	stark pos, M + Z	?schw ach pos, Z	stark pos, M	neg	neg	0%	75- 80%
20	neg neg	pos pos	pos schwa ch pos	vereinz elt pos	neg neg			stark pos, Z	stark pos, M	neg	neg	neg	neg	neg	> 90%	0%
21	pos schwa ch pos	pos pos	schwa ch pos schwa ch pos	ca. 15% 5%	pos	pos		stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z	stark pos, M	stark pos, Z	neg	neg	50%	< 5%
	neg	pos	pos			neg										
22	neg	pos	pos	5%	neg			stark pos, Z	?schw ach pos, M	neg	neg	schwa ch pos, M	neg	neg	40%	0%
23	pos stark pos	pos pos	pos neg	80%	schwa ch pos			stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z	?schw ach pos	neg	neg	?schw ach pos, 1 Zelle	< 5%	10%
24	pos stark pos	pos pos	pos pos	80%	neg	neg		stark pos, Z	mäßig pos, M	schwa ch pos, Z	schwa ch bis mäßig pos, Z + M	schwa ch pos, Z + M	schwa ch pos, Z	neg	80%	5- 10%
25	pos mäßig pos	pos pos	neg	vereinz elt	schwa ch pos	neg		stark pos, Z	schwa ch pos, M	mäßig pos, Z + ?M	einzel n mäßig pos, M	schwa ch pos, Z	?schw ach pos, Z	neg	50%	0%
26	pos stark pos	pos pos	pos mäßig pos	70% 30%	neg neg			stark pos, Z	stark pos, M	pos	mäßig pos, Z	neg	schwa ch pos, Z	neg	0%	vereinz elt
27	pos stark pos	pos	neg	90%	pos pos			stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos	einzel n stark pos, Z/ mäßig pos, M	neg	pos, Z	mäßig pos, Z	50%	30%
28	30-40% ?schw ach pos	>95% pos	20-30% schwa ch pos	90%	?schw ach pos	neg		stark pos, Z	neg	mäßig pos, Z	schwa ch pos, Z	mäßig pos, M	mäßig pos, Z	neg	< 5%	< 5%
29	schwa ch pos	pos	neg	20%	?schw ach pos			stark pos, Z	neg	?schw ach pos, Z	?schw ach pos, ?M	schwa ch pos	schwa ch pos, Z	vereinz elt schwa ch pos, Z	10%	0%
30	pos nicht beurtei lbar	neg	ausges chwem mt	0%	stark pos			mäßig pos, Z	neg	ausges chwem mt	neg	neg	mäßig pos, M	neg	0%	0%
31	pos pos	pos	neg	einzel ne Zellen	schwa ch pos			stark pos, Z	vereinz elt mäßig pos, Z + ?M	neg	mäßig pos, M	neg	mäßig pos, M	neg	< 5%	vereinz elt

16	neg	Z. n. Vor- OP und Chemo; Resektat mit vitalen Tumorfiltreten eines gering differenzierten RMS	pleomorph	laterales Kniegelenk	42	m	Primärtumor
17	neg	hochmalignes, pleomorphes RMS	pleomorph	rechter ventraler Unterschenkel, Tibialis- anterior- Loge	53	m	Primärtumor
18	neg	hochmalignes, pleomorphes RMS, G3	pleomorph	linker dorsaler Oberschenkel	67	m	Primärtumor
19	neg	pleomorphes RMS	pleomorph	linker Oberschenkel	73	m	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommene n Primärtumors
20	neg	Metastase eines vorbekanntes ovariellen RMS	pleomorph	linker Hemipelvis, Tuber ischadicum	26	w	Primärtumor
21	neg	pleomorphes RMS	pleomorph	parahepatisch	77	m	Primärtumor
	neg	hochmalignes spindelzelliges Sarkom vom Typ pleomorphes RMS, G3	pleomorph	Stanzpräparat	39	w	Primärtumor
22	neg	pleomorphes RMS	pleomorph	linker Oberschenkel	69	m	Primärtumor
23	neg	pleomorphes RMS	pleomorph	Schulter	36	m	Primärtumor?
24	neg	primäres pleomorphes RMS	pleomorph	linke Hals- Nerven- Scheide	55	w	Primärtumor?
25	neg	hochmalignes, pleomorphes RMS	pleomorph	retroperitoneal	54	m	Primärtumor
26	neg	gering differenziertes RMS	pleomorph	rechter Oberschenkel	51	m	Primärtumor
27	neg	große Manifestation eines RMS im Larynx mit fokaler Infiltration des Taschenbandes mit Unterminierung der intakten Schleimhaut, pT3 N1 (1/11) Mx R0 G3	pleomorph	Larynx	35	m	Primärtumor
28	neg	Rezidiv eines hochgradigen RMS der Pectoralmuskulatur im oberen/ unteren äußeren Quadranten des rechtsseitigen Mammaabladates, G3 nach FFCC	pleomorph	rechte Mamma	37	w	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommene n Primärtumors
29	neg	Rezidiv des vordiagnostizierten RMS	pleomorph	Thoraxwand	38	w	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommene n Rezidivs
30	neg	Rezidiv des vordiagnostizierten RMS in der Harnblasenwand	embryonal	Harnblasenwa nd	6	w	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommene n Primärtumors
31	neg	geringgradige diffuse residuale Infiltration durch bekanntes RMS vom botryoiden Typ	embryonal	Harnblase/ - röhre	6	w	Resektat eines in der Studie aufgenommene n Rezidivs

32	pos pos	pos pos	neg	0%	pos			?mäßig pos, Z	einzeln schwa ch pos, M	neg	stark pos, Z + ?M	schwa ch pos, Z	mäßig pos, Z + M	neg	0%	vereinz elt
33	pos pos	stark pos	neg neg	80% 75%	pos schwa ch pos			stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z	schwa ch pos, Z	stark pos, Z	schwa ch pos, Z	einzeln schwa ch pos, Z	30%	< 5%
34	pos schwa ch pos	pos pos	neg neg	60% 75%	pos			stark pos, Z	mäßig pos, M	neg	neg	neg	neg	neg	< 5%	10%
35	pos n.b.	pos pos	neg neg	50%	pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z + M	neg	neg	mäßig pos, Z	neg	0%	0%
36	ausges chwem mt	ausges chwem mt	neg	ausges chwem mt	ausges chwem mt			ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	0%
37	pos pos	pos stark pos	neg neg	ca. 70% 50%	pos schwa ch pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M + ?Z	stark pos, Z	mäßig pos, M	mäßig pos, Z	neg	neg	0%	vereinz elt
38	pos	stark pos	neg	50%	schwa ch pos			stark pos, Z	stark pos, M	stark pos, Z	schwa ch pos, Z	schwa ch pos, Z	neg	neg	0%	0%
39	pos pos	pos stark pos	pos pos	70% 90%	pos			stark pos, Z	stark pos, M	neg	neg	neg	neg	neg	50%	35%
40	pos ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt			schwa ch pos, Z	ausges chwem mt	ausges chwem mt	neg	ausges chwem mt	ausges chwem mt	neg	ausges chwem mt	ausges chwem mt
41	pos stark pos	stark pos	pos neg	ca. 40% 10%	pos			stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z	stark pos, M	neg	stark pos, Z + M	einzeln schwa ch pos, Z	60%	bis 30%
42	pos ausges chwem mt	pos ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	neg		ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt
43	pos ausges chwem mt	pos ausges chwem mt	pos ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt			ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt	ausges chwem mt
44	pos schwa ch pos	pos stark pos	neg neg	10%	mäßig pos	neg		stark pos, Z	mäßig pos, M	schwa ch pos, Z	stark pos, M	neg	neg	neg	30- 50%	< 5%
45	stark pos	stark pos	schwa ch pos	einzeln e Zellen	stark pos			stark pos, Z	stark pos, Z + M	schwa ch pos, Z	stark pos, M	mäßig pos, Z	mäßig pos, M	neg	60%	< 5%
46	neg neg	stark pos	schwa ch pos	1/3	pos mäßig pos	neg		stark pos, Z	mäßig bis fokal stark pos, M	mäßig pos, Z	neg	mäßig pos, Z	neg	neg	0%	30%
47	pos neg	schwa ch pos	neg	ca. 30% 10%	pos			stark pos, Z	mäßig pos, M	schwa ch pos, Z + M	?schw ach pos, M	neg	neg	neg	30%	? 10%
48	pos schwa ch pos	pos pos	pos ?pos	ca. 80% 75%	ca. 70% ca. 50% pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M	schwa ch pos, Z	neg	mäßig pos, Z + M	mäßig pos, Z	neg	30%	40%

32	neg	Zystektomiepräparat mit Infiltration durch ein Rezidiv des bekannten RMS	embryonal	Harnblase	6	w	Resektat eines in der Studie aufgenommenen Rezidivs
33	neg	Rezidiv eines bekannten embryonalen RMS geringen Differenzierungsgrades der rechten Orbita	embryonal	rechte Orbita	3	m	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommenen Primärtumors
34	neg	embryonales RMS	embryonal	paratestikulär	14	m	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommenen Primärtumors
35	neg	gering differenziertes embryonales RMS	embryonal	linker Unterschenkel	1	w	Primärtumor
36	LOH 11p15.5	embryonales RMS	embryonal	BWK 5	16	w	Primärtumor
37	neg	embryonales RMS, Malignitätsgrad 3 nach Coindre	embryonal	rechter Unterschenkel	80	w	Primärtumor
38	neg	teils anaplastisches, teils spindelzelliges embryonales RMS	embryonal	M. gastrocnemius	80	w	Resektat des gleichen bereits in der Studie aufgenommenen Primärtumors
39		embryonales RMS	embryonal	cervical	2	m	Primärtumor
40	neg	Rezidiv eines vorbekannten RMS	embryonal	Hoden	7	m	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommenen Primärtumors
41	neg	embryonales RMS	embryonal	Hoden	9	m	Primärtumor
42	neg	unreifes embryonales RMS	embryonal	retro- bzw. prostaticher Tumor	30	m	Primärtumor
43	neg	spindelzelliges RMS von hohem Malignitätsgrad, G3	embryonal	präthorakal	18	w	Primärtumor
44	neg	spindelzelliges RMS	embryonal	paratestikulär	47	m	Primärtumor
45	neg	Gewebsresektat mit Anteilen der Harnblasenwand mit einem ausgeprägt regressiv veränderten teils hyalinisiertem RMS mit aktiven Tumoranteilen	embryonal	Harnblasenwand	4	w	Primärtumor
46	neg	Infiltration durch ein bereits vordiagnostiziertes, gering differenziertes RMS, G3	embryonal	rechter dorsaler Oberschenkel	51	m	Primärtumor
47	neg	Rezidiv des bekannten embryonalen RMS	embryonal	linker Gehörgang	3	m	Rezidiv eines nicht in der Studie aufgenommenen Primärtumors
48	neg	Alveoläres/ embryonales RMS	alveolär/ embryonal	Nasenrachenraum	7	w	Primärtumor

49	pos pos	pos	schwa ch pos schwa ch pos	40- 50% 40%	pos	neg		stark pos, Z	stark pos, M	mäßig pos, Z	mäßig pos, Z + M	schwa ch pos, Z	mäßig pos, Z	neg	60%	0%
50	pos schwa ch pos	pos	neg neg	ca. 60% 90%	pos			stark pos, Z	stark pos, Z	?schw ach pos, M	einzeln schwa ch pos, Z	neg	neg	neg	75%	20- 30%
51	neg	?schw ach pos	neg	90%	schwa ch pos			stark pos, Z	mäßig pos, M	schwa ch pos, Z	einzeln schwa ch pos, M	schwa ch pos, Z	neg	neg	0%	Verein zelt
52	pos pos	pos pos	neg neg	10%	schwa ch pos neg			mäßig pos, Z	neg	?schw ach pos, nukleär	schwa ch pos, Z	neg	mäßig pos, Z	neg	0%	50%

49	pos	alveoläres RMS mit teils pleomorpher Komponente	alveolär	rechts subskapulär	10	m	Primärtumor
50	pos	alveoläres RMS	alveolär	linker Hals	1	m	Primärtumor
51	pos	alveoläres RMS	alveolär		9	m	Primärtumor
52	neg	kleinherdige Infiltration durch ein RMS- Rezidiv	alveolär	Lungenparenchym	9	m	Rezidiv eines in der Studie aufgenommen Primärtumors

9. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Botryoides Rhabdomyosarkom	6
Abbildung 2: Histologisches Bild eines botryoiden Rhabdomyosarkoms	7
Abbildung 3: Histologisches Bild eines embryonalen Rhabdomyosarkoms.....	8
Abbildung 4: Histologisches Bild eines alveolären Rhabdomyosarkoms	11
Abbildung 5: Histologisches Bild eines pleomorphen Rhabdomyosarkoms	14
Abbildung 6: Ausschnitt eines Tissue Microarrays.....	17
Abbildung 7: Desminfärbung beim alveolären und embryonalen Rhabdomyosarkom .	37

10. Lebenslauf

11. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt hiermit meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Gabriele Köhler für die freundliche Überlassung dieser Promotionsarbeit und Ihrer immer hilfsbereiten, erfahrenen und sehr netten Unterstützung. Es hat mir viel Freude bereitet diese Arbeit unter Ihrer Leitung durchführen zu können und jederzeit einen anregenden und hilfreichen Gedankenaustausch führen zu dürfen.

Für die Einarbeitung danke ich Herrn Dr. med. Evgeny Minin, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich zudem in die Methode des Tissue Microarrays einarbeitete.

Für die geduldige Erläuterung der PCR- Methode mit all ihren Finessen danke ich Frau Petra Fischer.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die ich nicht persönlich erwähnt, die mir aber bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben, möchte ich hiermit in der Gesamtheit noch einmal danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Waltraud und Olaf Lipps, die mich während meines Studiums und während meiner Promotionszeit auf verschiedenste Art und Weise stets unterstützt haben.