

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

**Evaluation der Expression von PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67 und Bcl-2
zur Therapieprädiktion bei Riesenzelltumoren des Skelettsystems**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:
Anna-Christina Hausen

aus Dortmund

2009

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

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

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Fillies

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker
Referent: PD Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Fillies
Koreferent: Prof. Dr. med. Horst Bürger

ZUSAMMENFASSUNG

Evaluation der Expression von PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67 und Bcl-2 zur
Therapieprädiktion bei Riesenzelltumoren des Skelettsystems

Anna-Christina Hausen

Die vorliegende Studie untersucht die prognostische Relevanz von PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67 und Bcl-2 bei ossären Riesenzelltumoren zwecks zielgerichteter molekularer Therapien. PDGFR- β als Rezeptortyrosinkinase ist durch Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär für die Regulation des Zellwachstums verantwortlich. Die Tyrosinkinase VEGF-ab1 sorgt für die Angiogenese, sowohl zur Versorgung gesunden Gewebes als auch Tumorgewebes. Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der durch seine Färbung die sogenannte Wachstumsfraktion im Gewebe darstellt. Bcl-2 steht für eine Reihe sowohl proapoptotischer als auch antiapoptotischer Proteine. Eine Überexpression von PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67 und Bcl-2 begünstigen ein tumoröses Wachstum. Dies ist ein potentieller Angriffspunkt für zielgerichtete molekulare Therapien. MATERIAL UND METHODEN: Mittels Tissue Microarray-Verfahren und immunhistochemischer Methoden wurden die Gewebebiopsien von 112 Patienten auf die Expression der oben genannten Wachstumsfaktoren untersucht. Nach lichtmikroskopischer Auswertung fand eine Korrelation mit den klinischen Verläufen statt. SIGNIFIKANTE ERGEBNISSE: 87,2 % des Tumorgewebes zeigte im Stroma keinerlei Expression für Bcl-2. Der Anteil gering oder mittelstark angefärbter Proben war mit jeweils 3,7% sehr gering. Der mit 70,3% größte Anteil der Gewebeproben zeigte ebenfalls keine oder nur eine geringe Expression von Ki-67. Für VEGF konnte bei jeweils 13,8% eine leichte und eine mittelstarke Färbung nachgewiesen werden. Auffallend war, dass 97,2% des Stromas eine Expression von PDGFR- β zeigten. Eine signifikante Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Parametern konnte nicht festgestellt werden. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG: Eine signifikante Korrelation der Proteinexpression mit den klinischen Parametern (Rezidive, Metastasen, Malignität) konnte nicht gesehen werden. Die Expression von PDGFR- β und VEGF legt dennoch die Möglichkeit vom Einsatz angiogenetischer Hemmstoffe in der RZT-Therapie nahe.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2009

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Riesenzelltumore des Knochens	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Einteilung	1
1.1.3 Inzidenz	2
1.1.4 Epidemiologie	2
1.1.5 Ätiologie	2
1.1.6 Klinik	3
1.1.7 Diagnose	4
1.1.8 Differentialdiagnose	6
1.1.9 Therapie	6
1.1.10 Prognose	7
1.2 Tumormarker	8
1.2.1 PDGFR- β	8
1.2.2 VEGF-ab1	11
1.2.2.1 Tyrosinkinase und ihre Bedeutung in der Onkologie	12
1.2.3 Ki-67 (bzw. Mib-1)	14
1.2.4 Bcl-2	15
1.3 Tissue Microarrays (TMA)	16
1.3.1 Entwicklung der Tissue-Microarray-Technik	16
1.3.2 Prinzip der Tissue-Microarray-Technik	17
1.3.3 Anwendungsgebiete der Tissue-Microarray-Technik	19
1.3.4 Fragestellung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Tumorkollektiv	23
2.2 Erstellung des Tumorkollektivs und praktisches Vorgehen	23
2.3 Erstellung der Tissue-Microarrays	25
2.4 Immunhistochemische Färbung	26
2.5 Immunhistochemisches Färbeprotokoll (Hämatoxylin-Eosin)	26
2.5.1 Zusammensetzung (Hämatoxylin-Eosin, HE)	27
2.5.2 Durchführung	27
2.6 Immunhistochemisches Färbeprotokoll (PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67, Bcl-2)	28
2.7 Lichtmikroskopische Auswertung	31
2.7.1 Statistische Auswertung	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Analyse des Patientenkollektivs	32
3.2 Immunhistochemische Ergebnisse	33
3.2.1 Expression von PDGFR- β	33
3.2.2 Expression von VEGF-ab1	35
3.2.3 Expression von Ki-67	37
3.2.4 Expression von Bcl-2	39
3.2.5 Expressionshäufigkeit	41
3.3 Durchgeführte Therapien	41
3.4 Metastasierung und Rezidivrate	42

4 Diskussion	43
4.1 Analyse des Patientenkollektivs	43
4.2 Validität von TMAs	44
4.3 Immunhistochemische Ergebnisse.....	45
4.3.1 Expression von PDGFR- β	45
4.3.2 Expression von VEGF-ab1	48
4.3.3 Expression von Ki-67	50
4.3.4 Expression von Bcl-2	51
4.4 Metastasierung und Rezidivrate.....	53
4.5 Schlussfolgerung.....	54
5 Literaturverzeichnis	56
6 Tabellenverzeichnis	73
7 Abbildungsverzeichnis	74
8 Diagrammverzeichnis.....	75
9 Danksagung	76
10 Lebenslauf.....	77
11 Anhang	I
11.1 Abkürzungen.....	I
11.2 Reagenzien.....	II
11.2.1 Citratpuffer.....	II
11.2.2 Hämatoxylin nach Mayer.....	II
11.2.3 RED Chromogen.....	II

1 Einleitung

1.1 Riesenzelltumore des Knochens

1.1.1 Definition

Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird der Riesenzelltumor wie folgt definiert:

Der RZT des Knochens (Osteoclastoma) ist ein aggressiver Tumor, welcher charakterisiert ist durch reich vaskularisiertes Gewebe aus rundlichen, spindelförmigen oder ovoiden Zellen und durch die Anwesenheit von zahlreichen Riesenzellen vom osteoklastischen Typ, die gleichmäßig im Tumorgewebe angeordnet sind. Kollagen ist relativ wenig enthalten. Vereinzelt treten Bereiche sowohl hämorrhagischer und regressiver Veränderung als auch nekrotischer, fibrotischer und fibrohistiozytotischer Reaktionen auf. Dies kommt besonders in großen oder seit langer Zeit bestehenden Tumoren vor.

1.1.2 Einteilung

Der RZT wird nach dem Enneking-Staging-System für gutartige Knochtumore in drei Stadien unterteilt:

Stadium 1: latente Läsion, biologisch statisch

Stadium 2: aktive, langsam wachsende Läsion, innerhalb des Knochens

Stadium 3: lokal aggressiv mit Ausdehnung ins Weichgewebe

(Enneking, 1986)

Das Campanacci-System basiert hingegen auf dem röntgenologischen Erscheinungsbild:

Grad 1: gut abgegrenzt, mit einem schmalen Knochensaum

Grad 2: relativ gut abgegrenzt, ohne röntgenopaquen Knochensaum

Grad 3: nicht abgegrenzt als Hinweis auf schnelles, infiltrierendes Wachstum, Ausdehnung ins Weichgewebe

(Campanacci et al., 1987)

1.1.3 Inzidenz

Der Riesenzelltumor des Knochens ist ein seltener Tumor. Seine Inzidenz wird in der Literatur zwischen 5% (Gamberi et al., 2003) und 8,6% (Schajowicz, 1994) aller Knochtumore angegeben.

Verschiedene Studien belegen, dass die Inzidenz im westlichen Raum doppelt so hoch ist wie im südostasiatischen Raum (Campanacci, 1987; Goldenberg, 1970; MacDonald, 1986; Leung, 1983; Yip et al., 1996).

1.1.4 Epidemiologie

Alter und Geschlecht

Fast alle betroffenen Patienten sind skelettal ausgewachsen. In seltenen Fällen sind sie unter 15 Jahren oder über 40. Patienten unter 10 oder über 50 sind Ausnahmen. Die meisten Patienten erkranken an einem Riesenzelltumor des Knochens zwischen dem 20. und 40. bzw. 50. Lebensjahr, wobei der Anteil im 3. Lebensjahrzehnt am größten ist (Schajowicz, 1994; Zheng et al., 2001). Riesenzelltumore kommen etwas häufiger bei Frauen als bei Männern vor (Goldenberg et al., 1970; Dahlin et Unni, 1986; Huvos, 1991; Campanacci et al., 1987; Campanacci, 1990; Zheng et al., 2001; Olivera et al., 2002; Feigenberg et al., 2003; Saiz et al., 2004; Su et al., 2004; Zhen et al., 2004).

1.1.5 Ätiologie

Die histologische Pathogenese des RZTs ist immer noch nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (Schajowicz, 1994; Zheng et al., 2001). Einigkeit der meisten Autoren herrscht darüber, dass der Tumor einen neoplastischen Prozess darstellt und dass mononukleäre Zellstroma aus undifferenzierten Mesenchymzellen oder Zellen des unterstützenden Bindegewebes und des Knochenmarks hervorgehen (Goldring et al., 1986; Wulling et al., 2003).

Die Riesenzellen vom osteoklastischen Typ leiten sich von einem Monozyten-Makrophagen-System ab (Suda et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Aubin et al., 2000; Kawaguchi et al., 2000; Kong et al., 2000; Teitelbaum, 2000).

Laut einer Studie von Zheng et al. (2001) sind für die neoplastische Komponente des Tumors nicht, wie der Name vermuten lässt, die vielkernigen Riesenzellen verantwortlich, sondern die stromaähnlichen Zellen, die den größeren Anteil der

mononukleären Zellpopulation darstellen.

In weiteren Studien wird dieser Gedanke fortgeführt: Die mononukleären Stromazellen produzieren Substanzen, z.B. OPGL (Osteoprotegerin-Ligand), die wiederum begünstigen Osteoklasten-ähnliche Zellformationen (Huang et al., 2000; Cheng et al., 2004; Robinson et al., 2003; Nakashima, 2003; Lindeman, 2004; Roux, 2002; Gamberi, 2000; Gamberi, 2004). Die dadurch stimulierten Riesenzellen führen wiederum zur Osteolyse.

1.1.6 Klinik

Lokalisation

Der Riesenzelltumor des Knochens ist meist in den Epiphysen von langen Röhrenknochen anzufinden (Zheng et al., 2001).

Typische Lokalisationen sind das distale Femurende (34-36%), das proximale Tibiaende (33-38%), das distale Radiusende (11-15%) und das proximale Humerusende (ca.13%) (Schajowicz, 1994; Gamberi et al., 2003; Mischczyk et al., 2001). Auch an den Phalangen, Metacarpalen und Metatarsalen kommt der Riesenzelltumor vor. Seltener ist das Vorkommen am distalen Tibiaende, proximalen Femurende, am Os Sacrum und den Spinae. Das Auftreten an Patella, Rippen, Scapula und Mandibula sind Ausnahmen (Schajowicz, 1994; Unni et al., 1995; Wolfe et al., 1983). Eine weitere Ausnahme die jedoch von mehreren Autoren beschrieben wurde, ist die Lokalisation des Tumors in der Metaphyse bei jüngeren, skelettal nicht ausgewachsenen Patienten (Dahlin, 1986; Goldenberg et al., 1970; Peison et al., 1976; Picci et al., 1983; Sherman et al., 1970).

Symptome

Zu den häufigsten und ersten Symptomen gehören Schmerzen (Stacy et al., 2003) mit ansteigender Intensität, lokale Schwellung und weiche Konsistenz des betroffenen Gebiets. Häufig tritt je nach Lokalisation zusätzlich eine Bewegungseinschränkung eines Gelenks (meist des Knies) auf. Selten kommt es zu Zufallsbefunden durch pathologische Frakturen (Pingsmann, 1997; Schajowicz, 1994).

1.1.7 Diagnose

Zur korrekten Diagnosestellung gilt es, Klinik, Patientenalter, radiologische, makro- und mikroskopische Merkmale zu berücksichtigen (Salzer-Kuntschik, 1998). Dabei ist das histologische Erscheinungsbild am aussagekräftigsten (Schajowicz, 1994).

Radiologie

Das radiologische Erscheinungsbild eines RZT des Knochens in einem langen Röhrenknochen ist eine ausgedehnte röntgenologische Aufhellung, die exzentrisch im epiphysalen Ende lokalisiert ist. Die Läsion breitet sich zum einen in Richtung Gelenkknorpel und zum anderen in Richtung Metaphyse aus und erfasst in fortgeschrittenen Stadien die gesamte Breite des Knochens. Insgesamt scheint der Cortex verdünnt, gedehnt und häufig stellenweise durchbrochen, aber eine periostale Reaktion tritt im Allgemeinen nicht auf. Der Übergang zum benachbarten gesunden Knochen ist ungenau und nicht durch einen sklerotischen Saum abgegrenzt (Schajowicz, 1994). Zarte Kortikalisbalkchen bleiben meist erhalten (Mirra, 1989). Trabekel treten nur in seltenen unbehandelten Fällen in einem RZT auf und scheinen ein Anzeichen auf einen nicht aggressiven Tumor zu sein, der sich spontan zurückbilden kann (Jaffe, 1958).

Zur radiologischen Diagnostik und OP-Planung bietet sich nach einer Studie von Hudson et al. (1984) die kontrastverstärkte Computertomographie an, um eine vollständige Beurteilung bezüglich der Ausdehnung in das Weichgewebe und der Beziehung zu größeren Gefäßen zu erhalten. Falls dies nicht ausreicht kann eine zusätzliche Angiographie weiterhelfen.



Abbildung 1: Charakteristische Röntgenaufnahme eines ossären Riesenzelltumors

Solitäre Lysezone im distalen Radius in exzentrischer Lokalisation der Epi- und Metaphyse. Übergangszone scharf konturiert. Kein peripherer Sklerosesaum, keine Binnenkalzifikationen. Die Kompakta ist ausgedünnt und punktförmig unterbrochen. (www.radiagnostics.de)

Makroskopie

Trotz großer Variabilität erscheinen alle RZT des Knochens als beträchtliche, weiche, fleischige Areale von unterschiedlicher Farbe von grau über hell bis hämorrhagisch dunkelrot.

Histologie

Die histologische Struktur ist charakterisiert durch ovale und spindelförmige mononukleäre Zellen und eine Großzahl an vielkernigen, osteoklastischen Riesenzellen, die gleichmäßig im Tumor verteilt sind (Schajowicz, 1994; Zheng et al., 2001).

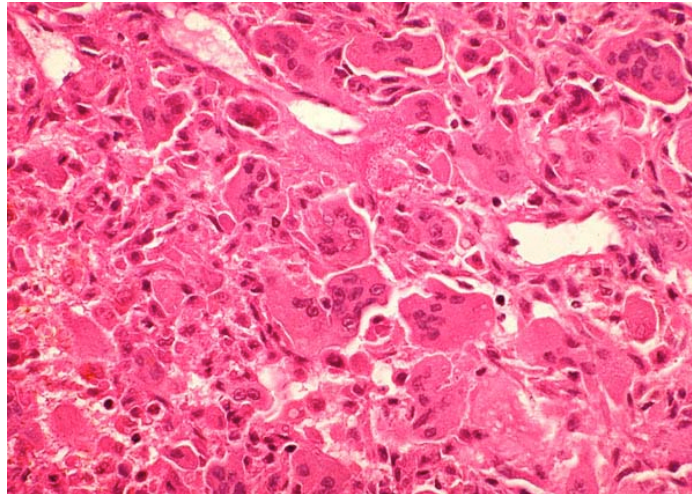


Abbildung 2: Histologische Darstellung eines Riesenzelltumors mit typischen vielkernigen Riesenzellen und spindelförmigen mononukleären Zellen

1.1.8 Differentialdiagnose

Ein RZT des Knochens muss abgegrenzt werden von Chondroblastomen, Osteosarkomen und ossären Erscheinungen des Hyperparathyreoidismus. Eine weitere mögliche Differentialdiagnose v.a. bei jungen Patienten ist eine aneurysmatische Knochenzyste (Salzer-Kuntschik, 1998; Unni, 1995).

1.1.9 Therapie

Es gibt keine klinischen, radiologischen oder histologischen Parameter, um genau vorauszusagen, ob ein RZT rezidiert oder metastasiert (Eckardt et al., 1986).

Bei der Therapie eines Riesenzelltumors sollte so viel Gewebe wie nötig entfernt werden, um den Tumor vollständig zu entfernen und das Rezidivrisiko zu minimieren (Yip et al., 1996) und so viel gesundes Gewebe wie möglich erhalten werden, um den Eingriff in den Bewegungsapparat und die damit verbundenen Einschränkungen so gering wie möglich zu halten. So reicht die Therapie historisch gesehen von einer En-bloc-Resektion bis hin zu einer Kürettage (Schajowicz, 1994).

Heutzutage wird eine intraläsionale Tumorexzision unter Erhaltung des Gelenks angestrebt (Faisham et al., 2006; Malek et al., 2006). Eine vollständige Resektion des Knochens ist nur noch selten indiziert. Ergänzt wird die Therapie durch eine adjuvante Knochenzementplombierung und eventuell durch Phenolinstallation oder Kryotherapie (Faisham, 2006). Bei unvollständiger Entfernung des Riesenzelltumors, Rezidiven, lokal aggressiven oder chirurgisch schlecht zugänglichen Tumoren wird eine

Bestrahlung empfohlen (Miszczyk et al., 2001; Feigenberg et al., 2003; Caudell et al., 2003). Das Auffüllen des Knochendefekts erfolgt zunächst –bis zum Ausschluß eines Rezidivs- mittels PMMA (Polymethylmethacrylat) und kann später durch autogenen Knochen ersetzt werden (Pingsmann et al., 1997).

Yip et al. (1996) erreichten trotz aggressiver Exzision gute funktionelle Ergebnisse durch die Verwendung von mikrochirurgischen Techniken und vaskularisierten Knochensegmenten (meist Os ilium) zur Rekonstruktion.

1.1.10 Prognose

Die Rezidivrate bei RZT des Knochens ist bei unvollständiger Entfernung relativ hoch. Das Therapieziel sollte daher immer eine vollständige Entfernung des Tumors sein, um ein Rezidiv zu vermeiden (Yip et al., 1996).

Faktoren, die den klinische Verlauf und die biologische Aggression des RZTs beeinflussen sind unklar (Zheng et al., 2001). Die Entartungsrate ist mit weniger als 2% sehr gering. Dabei unterscheidet man primär maligne Riesenzelltumoren (PMGCT), die sich aus einem benignen RZT zu einem hochgradig malignen Sarkom (meist Osteosarkom) entwickeln, und sekundär maligne Riesenzelltumore (SMGCT), die nach der Erstbehandlung eines benignen RZT entstehen (Bertoni et al., 2003).

Die Prognose hängt von der lokalen Aggressivität des Tumors ab, die sich aus einer möglichen Infiltration in benachbarte Strukturen und der Radikalität der chirurgischen Entfernung ergibt. Daher ist eine prognostische Einschätzung auf histologischer Grundlage des RZT ohne praktischen Wert (Schajowicz, 1994; Unni, 1995).

Eine solche Klassifizierung wurde zuvor von mehreren Autoren beschrieben (Stewart, 1914; Ewing, 1922; Jaffe et al., 1940; Meyerding, 1941; Murphy et al., 1956; Hutter et al., 1962; Spjut et al., 1971; Dahlin, 1978).

Das Metastasierungsverhalten von Riesenzelltumoren ist ebenfalls kein sicheres Parameter zur Einschätzung der Prognose. Nur in seltenen Fällen kommt es zu Metastasierung der Riesenzelltumore in die Lunge (Campanacci et al., 1987; Unni, 1995) oder in die Lymphknoten (Bertoni et al., 1985; Present et al., 1986; Rock et al., 1984, Bertoni et al., 1988). Die Folgen, die in der Literatur beschrieben werden, reichen von letalem Ausgang bei diffuser Metastasierung (Unni, 1995), über gute Heilung nach vollständiger Entfernung (Unni, 1995), bis hin zu spontaner Ausheilung (Rock et al., 1984; Bertoni et al., 1985; Wray et al., 1990).

1.2 Tumormarker

1.2.1 PDGFR- β

1974 entdeckten Ross et al. einen von Blutplättchen gebildeten Faktor –genannt platelet derived growth factor-, der das Wachstum glatter Muskelzellen aus Affen anregt (Ross et al., 1974). Er ist einer der vielfältigen Wachstumsfaktoren, der die Zellproliferation und die Zellteilung reguliert. Außerdem spielt PDGF eine Rolle bei der Embryogenese (besonders bei der Entwicklung von Niere, Blutgefäßen, Lungen und ZNS), Zellmigration und Wundheilung. Er wird mit Atherosklerose, Fibrose und Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Besonders die angiogenetischen Einflüsse von PDGF sind entscheidend in der Krebstherapie (Li et Eriksson, 2003; Heldin et Westermark, 1999).

Bis dato sind vier Isoformen bekannt (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D), (Li et al., 2000; Bergsten et al., 2001) welche an unterschiedliche Rezeptoren, α und β , an der Zelloberfläche binden (Li et Eriksson, 2003).

	PDGF A	PDGF B	PDGF C	PDGF D
Hämatopoetische Zellen und Gefäßzellen	Gefäßendothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen, Blutplättchen	Gefäßendothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen, Blutplättchen	glatte Gefäßmuskelzellen	Fibroblastische Adventitia
Nervensystem	Astrozyten, Schwann-Zellen, Neurone	Astrozyten, Schwann-Zellen, Neurone		
Lunge	Epithelzellen		Epithelzellen, Mesenchymzellen, glatte Muskelzellen, Bronchien	
Niere	Mesangiale Zellen, Henle-Schleife	Mesangiale Zellen		
Fortpflanzungsorgane	Leydig-Zellen, Oozyten, Uterusendometrium, Zytotrophoblasten	Leydig-Zellen, Uterusendometrium, Zytotrophoblasten		
Sonstige	Fibroblasten, intestinales Epithel	Fibroblasten	intestinales Epithel	

Tabelle 1: Vorkommen der PDGF-Isoformen

Die ca. 170-180 kDa großen Rezeptoren PDGFR- α und PDGFR- β werden definiert als Rezeptortyrosinkinase (RTK) der Klasse III nach Yarden und Ullrich (1987) und bestehen aus fünf immunoglobulinähnlichen Domänen im Extrazellulärraum, einer transmembranären Domäne und einer geteilten Tyrosinkinasedomäne, die im Zytoplasma der Zelle liegt (Blume-Jensen et Hunter, 2001; Matsui et al., 1989; Yu et al., 2003). Physiologischerweise werden PDGF-Rezeptoren auf Monozyten, Megakaryozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten, Gliazellen und erythroiden und myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert (Fletcher, 2004).

	PDGFR-α	PDGFR-β
Hämatopoetische Zellen und Gefäßzellen	Glatte Gefäßmuskelzellen, Blutplättchen	Glatte Gefäßmuskelzellen, gefäßendothelzellen, Perizyten, T-Zellen, Makrophagen, myeloische hämatopoetische Zellen
Nervensystem	Astrozyten, Neurone, Schwann-Zellen	Neurone, Schwannzellen, postnatale Neurone
Lunge	Mesenchymzellen	
Niere	Mesangiale Zellen	Mesangiale Zellen
Fortpflanzungsorgane	Leydig-Zellen, intestinale Zellen, Gonaden	Leydig-Zellen, intestinale Zellen, Gonaden
Leber	Sinusoidale Leberzellen	Ito-Zellen
Sonstige	Fibroblasten, Epithelzellen	Fibroblasten, Epithelzellen, Myoblasten

Tabelle 2: Vorkommen der PDGF-Rezeptoren

Da die Rezeptoren in dimerer Form ($\alpha\alpha$ -Form, $\alpha\beta$ -Form oder $\beta\beta$ -Form) vorliegen, können nicht alle Liganden an alle PDGF-Rezeptoren binden. Während die $\beta\beta$ -Form durch PDGF-BB und -DD aktiviert wird, kann an der $\alpha\beta$ -Form nur PDGF-AB, -BB und -CC wirken. An die $\alpha\alpha$ -Form des Rezeptors können PDGF-AA, -BB, -CC und -AB binden (Yu et al., 2003). Abbildung 3 veranschaulicht die verschiedenen Bindungsmöglichkeiten.

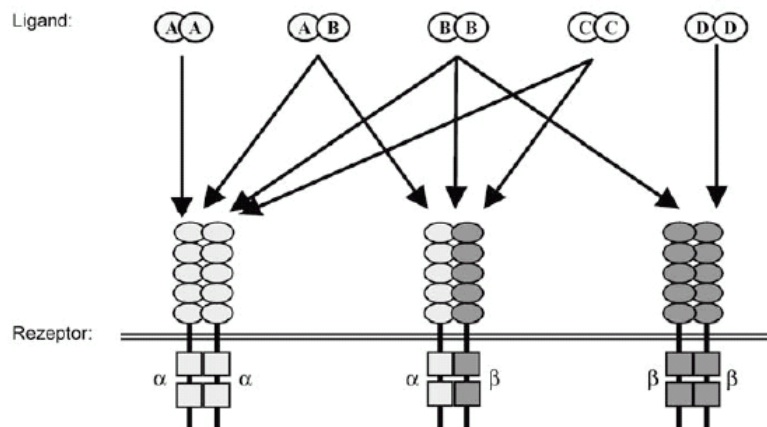


Abbildung 3: Interaktion zwischen den PDGF-Rezeptoren und ihren Liganden. Die fünf möglichen Liganden-Dimere PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD können jeweils mit den durch einen Pfeil gekennzeichneten Rezeptoren interagieren. Während PDGF-AA und PDGF-DD jeweils nur an eine Rezeptorform binden können, kann PDGF-BB an alle drei Rezeptorformen binden. PDGF-AB und PDGF-CC können nur an PDGFR- $\alpha\alpha$ und PDGFR- $\alpha\beta$ binden. (nach Yu et al., 2002)

Dabei bindet PDGF in Form eines Dimers, das durch eine Disulphidbrücke verbunden ist, an zwei Rezeptoren und bringt diese näher aneinander, so dass sich diese gegenseitig an Tyrosinen phosphorylieren können (Kazlauskas et al., 1991). Es kommt zu einer Suppression der Phosphatase-Aktivität (Kovalenko et al., 2003). Dies bewirkt wiederum eine erhöhte Aktivität der Kinase und eine Formation von Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle (z.B. SH2). Innerhalb von Minuten werden mehrere Signalsysteme aktiviert, wie die Signaltransduktionsmoleküle PI3K, Ras, Phospholipase C γ 1 (PLC γ) und Src. Diese drei Signalenzyme besitzen eine SH2 Domäne, über die sie mit hoher Affinität an den Rezeptor binden. Neben diesen Signalenzymen können eine Reihe weiterer Enzyme über ihre SH2 Domäne an den PDGF-Rezeptor binden (SHP-2, GAP, Shc, Grb2/7, Crk usw.) (Tallquist et al., 2004).

Die PI3K spielt eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion, kann durch verschiedene Signale aktiviert werden und führt unter anderem zu Aktin-Reorganisation, Chemotaxis, Zellwachstum und Antiapoptose.

Die Aktivierung von Ras nimmt Einfluß auf das Zellwachstum, Migration und Zelldifferenzierung.

Zwischen diesen beiden Signalwegen, PI3K und Ras, besteht ein „Cross-talk“, der die Signalkaskaden beeinflussen kann (Hu et al., 1995).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen PDGFR- β -Überexpression bzw. autokriner Stimulierung und der Onkogenese bestimmter Krebsformen wie z.B.

Dermatofibrosarkomen (Greco et al., 1998).

Unter anderem werden Fibroblasten durch PDGF und zusätzlich erforderliche Faktoren zur Zellteilung angeregt. Interessanterweise wirkt PDGF einerseits stark stimulierend, andererseits wird bei Fehlen weiterer Faktoren anstelle der Proliferation die Apoptose eingeleitet (Kim et al., 1995). Dies ist jedoch eine Ausnahmereaktion. Für die Onkogenese ist der antiapoptotische Einfluß von PDGFR entscheidend.

Deshalb gewinnt die Entwicklung von Hemmstoffen solcher bei Tumoren überaktiven RTK, die an der Stelle des phosphorylierenden ATP binden, in der Krebstherapie zunehmend an Bedeutung. Ob das ein möglicher Ansatz zielgerichteter molekularer Therapien bei ossären Riesenzelltumoren ist, soll mit der vorliegenden Studie untersucht werden.

1.2.2 VEGF-ab1

Als vascular endothelial growth factor (VEGF) wird eine Proteinfamilie von Wachstumsfaktoren bezeichnet, die hauptsächlich vaskuläres Endothel stimulieren, aber auch andere Zellen wie beispielsweise Monozyten und Makrophagen. In vitro regt VEGF die Teilung und Migration von Endothelzellen an. Als wichtiges Signalmolekül ist VEGF sowohl an der Vaskulogenese (de novo Bildung des embryonalen Blutkreislaufes) als auch an der Angiogenese beteiligt.

Der 1989 von Ferrara et al. klonierte VEGF ist einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren (Leung et al., 1989). Durch alternatives Splicing entstehen aus dem auf Chromosom 6 liegenden Gen vier verschiedene Isoformen von VEGF-A: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ (Ferrara et Davis-Smyth, 1997).

Neben VEGF-A wurden in den letzten Jahren weitere VEGF-Formen entdeckt: VEGF-B und PlGF (Placental growth factor) sowie VEGF-C und -D. Verwandte virale Homologen sind VEGF-E und das im Schlangengift enthaltene VEGF-F (Karkkainen et Petrova, 2000).

Es existieren drei verschiedene VEGF-Rezeptoren, die ebenfalls Tyrosinkinasen darstellen. Dabei bindet VEGF-A nur an den Rezeptor Typ 1 und 2, während PlGF und VEGF-B nur an den Rezeptor Typ 1 und VEGF-C und VEGF-D nur an die Rezeptoren Typ 2 und 3 binden. VEGF-E und -F binden ausschließlich an den Rezeptor Typ 2.

Die VEGF-A-Isoformen binden mit unterschiedlich hoher Affinität an die beiden Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1 und VEGFR-2. Die Ligandenbindung erfolgt im

Bereich der extrazellulären Ig-artigen Domäne II und III. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus der juxtaglomerulären-transmembranösen (JM) Region sowie zwei Domänen mit Proteinkinaseaktivität (PTK) (Blume-Jensen et Hunter, 2001; Robinson et al., 2000). Die Rezeptoren dimerisieren nachdem sie VEGF an die extrazelluläre Domäne gebunden haben, die katalytische Aktivität erhöht sich und es kommt zur Autophosphorylierung der Rezeptoren. In Folge dessen werden verschiedene Signalwege aktiviert. Aus der VEGF vermittelten Aktivierung des VEGFR-2 resultiert eine Ras- und Proteinase-c- (PKC) Aktivierung, wodurch Zellproliferation induziert wird. Außerdem kommt es durch eine Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase zu einem starken Survivalsignal in der Zelle (Blume-Jensen et Hunter, 2001; Karkkainen et Petrova, 2000).

Wenn Zellen nicht genug Sauerstoff erhalten, produziert die Zelle HIF's (Hypoxia inducible factors), die zur Ausschüttung von VEGF und somit zur Angiogenese führen. Dies gewährleistet nicht nur die Versorgung gesunder Zellen, sondern auch die Neoangiogenese von Tumorgefäßen, die das Tumorgewebe versorgen.

1.2.2.1 Tyrosinkinasen und ihre Bedeutung in der Onkologie

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vermitteln extrazelluläre Signale in das Zellinnere. Durch pathologische Vorgänge kommt es zu einer manifestierten Dysregulation des Zellwachstums und somit zu maligner Entartung des Gewebes (Zwick et al., 2002). Tyrosinkinasen sind an der Pathogenese vieler maligner Erkrankungen beteiligt, so dass ein großes Interesse besteht, therapeutisch wirksame pharmakologische Inhibitoren in Form von monoklonalen Antikörpern oder kleiner inhibitorischer Substanzen zu entwickeln. Entscheidend für die Wirkung ist die Frage, ob die Tumoraktivität von der Tyrosinkinase abhängig ist. Für viele Tyrosinkinasen wurden bereits Inhibitoren entwickelt, die jedoch Nebenwirkungen hervorrufen, die sich von klassischen Zytostatika stark unterscheiden und schlecht vorhersehbar sind (Müller-Tidow et al., 2007). Im menschlichen Genom sind ca. 90 Tyrosinkinasen kodiert, davon 58 als Rezeptortyrosinkinasen auf Zelloberflächen (Robinson et al., 2000). Sie stellen Enzyme dar, die Substrate durch Übertragung einer Phosphatgruppe modifizieren. Dies führt zu Zellproliferation und Geweberegeneration oder hemmt den programmierten Zelltod. Die Entstehung maligner Tumoren kann über unterschiedliche Wirkungsmechanismen stattfinden.

Einige Beispiele sind:

- Fusion einer Tyrosinkinase mit einem Brückenprotein > dauerhafte Aktivierung
- Aktivierung durch aktivierende Mutationen
- Überexpression durch Genamplifikation
- vermehrte Aktivierung durch Überexpression der Liganden

(Müller-Tidow et al., 2007)

Der Angriffspunkt monoklonaler Antikörper liegt an der extrazellulären Ligandenbindungsstelle, so dass das Binden des Liganden an den Rezeptor verhindert wird. In vielen Studien konnte für VEGF eine direkte Korrelation zwischen Serumkonzentration und Tumorstadium bzw. Prognose bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Poon et al., 2001). Ein Therapeutikum ist der Antikörper Bevacizumab, der durch Neutralisierung des Liganden zur Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinase beiträgt. Bevacizumab verlängert -teils mit adjuvanter Chemotherapie- bei kolorektalen Tumoren (Hurwitz et al., 2004), metastasierten Nierenkarzinomen (Yang et al., 2003), nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (Sandler et al., 2005) und metastasierten Mammakarzinomen (Miller, 2003) die Überlebensdauer um einige Monate. Nebenwirkungen sind allerdings arterieller Hypertonus und zum Teil tödlich verlaufende Hämoptysen bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge.

Seit 1991 wurden eine Reihe spezifischer PDGFR-Kinase-Inhibitoren -u.a. AGL 2033/2043 (Quinoxalines) und SU11248 (Indolonone)- entwickelt, die speziell die Signalkaskade des PDGF-Rezeptors unterbrechen sollen. Der Prototyp spezifischer Inhibitoren von Tyrosinkinase-Domänen ist jedoch das Medikament STI571 (Imatinib), das als oral applizierbares Phenylaminopyrimidin-Derivat mit hoher Spezifität die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinasen abl, c-kit und PDGFR- α und - β kompetitiv hemmt (Buchdunger et al., 2000; Reichardt et al., 2002). Große Bedeutung erlangte dieses Medikament vor allen Dingen in der Behandlung der CML (chronische myeloische Leukämie), aber auch bei hämatologischen Erkrankungen (durch balancierte Translokation für PDGFR- β oder abl) oder gastrointestinale Stromazelltumoren (Corless et al., 2004; Reichardt et al., 2002) wurden Erfolge erzielt.

SU11248 (Sunitinib) ist ein Indolderivat, das alle VEGF-Rezeptor-Subtypen und PDGF-Rezeptoren hemmt (Sun et al., 2003). Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom konnten hiermit sogar erfolgreicher als mit der üblichen Interferon-

Therapie behandelt werden (Motzer et al., 2006). Die Überlebensdauer von Patienten mit Imatinib-resistenten Stromatumoren konnte durch Sunitinib verlängert werden (FDA Consum, 2006).

Es hat sich herausgestellt, dass der oral applizierbare Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib (BAY 43-9006) nicht nur Raf-1, sondern auch Subtypen der VEGF-Rezeptorgruppe, PDGF, Flt3 und c-kit hemmt (Wilhelm et al., 2004).

Die Möglichkeit, unterschiedliche Rezeptor-Tyrosinkinasen durch eine Kombination zu inhibieren scheint interessant aber auch riskant zu sein, da durch den verstärkten Eingriff in physiologische Signaltransduktionswege eine überadditive und unerwartete Toxizität bewirkt werden kann (Müller-Tidow et al., 2007).

1.2.3 Ki-67 (bzw. Mib-1)

1983 gelang Gerdes und seinen Mitarbeitern erstmalig die Herstellung des monoklonalen Antikörpers Ki-67 durch die Fusion von Mausmyelomzellen mit Mauslymphozyten und einer Injektion von L428-Zellen (von der Hodgkin-Krankheit abstammende Zelllinien). Ki-67 erkennt ein Antigen, das nur in proliferativen Zellen exprimiert wird, in ruhenden Zellen aber fehlt (Gerdes et al., 1983). Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki-67-Antigen nicht (Gerdes, 1984). Als Schlussfolgerung dieser Beobachtungen wurde Ki-67 als Proliferationsmarker für Tumoren vorgeschlagen, da er die Zellen anfärbt, die sich vermehren, die sogenannte Wachstumsfraktion (Gerdes, 1983). Die Färbung für Ki-67 gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors und ist deshalb in der Routinediagnostik von hohem Wert. Der Ki-67-Färbeindex errechnet sich aus dem relativen Anteil der Ki-67 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl. Ziel dieser Studie ist es, herauszufinden, ob Ki-67 bzw. Mib-1 auch zur Prognoseprädiktion bei Riesenzelltumoren des Knochens dient. Die Fragestellung ist, ob eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und klinischen Werten, wie z.B. Rezidivierung, Metastasierung oder maligner Entartung, in den vorliegenden 112 Patientenfällen besteht.

1.2.4 Bcl-2

Bcl-2 ist die Bezeichnung für eine Reihe von zurzeit 25 bekannten Proteinen, die bei der Regulation der Zellapoptose eine Rolle spielen. Seinen Namen hat die Proteingruppe aufgrund der Tatsache erhalten, dass sie erstmalig im B-Zellen-Lymphom („BCL“) isoliert wurden. Einige dieser Proteine sind für die Förderung (z.B. Bax, Bad, Bok) und andere für die Verhinderung (z.B. Bcl-2 proper, Bcl-xl, Bcl-w) der Apoptose verantwortlich (Zamzami et al., 1998).

Zur Wirkungsweise gibt es unterschiedlich Theorien:

1. Die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran in das Cytosol wird induziert (proapoptotisch) oder gehemmt (antiapoptotisch). Durch Cytochrom C wird in der Zelle Caspase-3 und Caspase-9 aktiviert, welches zum Zelltod führt.

2. Durch Hemmung (Bcl-2, Bcl-xl) oder Aktivierung (Bax) des Multiproteinkomplexes permeability transition (PT) pore auf der Kontaktseite der Mitochondrieninnen- und -außenmembran wird die Konzentration von Ca^{2+} , der pH-Wert und die intrazelluläre Spannung beeinflusst (Zamzami et al., 1998; Marzo et al., 1998). Der Zelltod wird durch Toxine, Anoxine (superoxide Anionen), reaktive Oxygene und Calcium-Überschuß hervorgerufen. Der PT-Proteinkomplex wird durch Thiolreaktive Agenzien, Calcium, Cyclophilin D-Liganden (Cyclosporin A und nicht immunsuppressive Cyclosporin A-Derivate), Liganden des Adenin-Nucleotid-Translocators, Caspasen und Bcl-2-ähnlichen Proteinen reguliert.

Außerdem sind einige der Bcl-2-Proteine an der Aktivierung der Procaspasen beteiligt. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten. Daher der Name: C-asp-ase (englisch: cysteinyl-aspartate-cleaving proteases).

Die korrekte Einleitung der Apoptose im menschlichen Körper ist äußerst wichtig. Da eine Mutation gravierende Folgen haben kann, gilt diese Proteinfamilie auch als menschliches Proto-Onkogen. Mutierte Bcl-2 Proteine verlieren sowohl ihr zellschützendes Potential als auch ihren Einfluss auf die Regulierung der PT-Poren (Marzo et al., 1998). Die Inhibition von PT durch Pharmazeutika oder durch Bcl-2 kann den Zelltod verhindern (Zamzami et al., 1997). Eine Überaktivierung führt zur Proliferation des Gewebes und möglicherweise zur malignen Entartung. So herrscht bei vielen Krebserkrankungen ein Überschuss an Zelltod hemmenden Mitgliedern der Bcl-

2-Familie, Bcl-x1 und Bcl-2, die zur Tumorbildung, -entwicklung und Resistenz gegenüber Therapien beisteuern. Die Expression von Bcl-x1 korreliert mit der Chemo-Resistenz von Tumorzelllinien und durch eine Bcl-2-Reduktion nimmt die Empfindlichkeit auf Chemotherapeutika zu und erhöht das Überleben in vivo (Oltersdorf et al., 2005). Trotz differierender Zellapoptose oder -nekrose-Modelle ist die Vorstellung, dass mitochondrische Veränderungen Einfluß auf den Zelltod haben, eine wichtige Basis für die Entwicklung von Medikamenten, die das Überleben von Patienten verlängert (Zamzami et al., 1997). Die Entwicklung von Bcl-x1 und Bcl-2 Hemmern als potentielle Krebstherapeutika wurde bereits erforscht, aber potente, niedermolekulare Inhibitoren zu erhalten, gestaltete sich als schwierig (Oltersdorf et al., 2005).

1.3 Tissue Microarrays (TMA)

1.3.1 Entwicklung der Tissue-Microarray-Technik

Bereits 1986 beschrieb Hector Battifora einen MTTB (multitumor tissue block oder sausage block), mit dessen Hilfe er 100 oder mehr Gewebe gleichzeitig untersuchte. Durch die Behandlung unterschiedlicher Gewebe in einem Block konnten Schwankungen durch Messfehler nahezu ausgeschaltet und Vergleiche unter den Geweben vereinfacht werden. Ein weiterer Vorteil war die Materialersparnis, da jeweils nur ein Tropfen eines Antikörpers benötigt wurde (Battifora, 1986).

Im Gegensatz zu den heutigen TMA (tissue microarray, zu deutsch ungefähr eine „Mikrosammlung von Geweben“) verwandte Battifora größere Gewebeproben, welche vergleichsweise ungeordnet in einen Paraffinblock eingesenkt wurden.

Heutzutage können durch die TMA-Technik und die Verwendung eines Stanzgerätes (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin, USA), welches durch das National Institute of Health entwickelt wurde, bis zu 1000 Gewebeproben gleichzeitig mittels Fluoreszenz in situ Hybridisation, RNA in situ Hybridisation oder Immunhistochemie untersucht werden (Moch et al., 2001). Die Präzision wurde wesentlich erhöht, dadurch dass nun genormte zylindrische Proben mit einem festen Durchmesser in einen Paraffinblock eingebracht werden, so dass ein reproduzierbares Muster entsteht. Von Vorteil ist außerdem, dass der Block, aus dem das zu untersuchende Gewebe entnommen wird, lediglich geringfügig beschädigt wird. Gesetzt

den Fall, dass ein Tumor eine Größe von 18 x 18 mm hat, können theoretisch bis zu 300 Stanzproben entnommen werden, so dass wenn jede dieser Proben –wie der Ursprungsblock- in 300 Schichten geschnitten wird, im Idealfall 90 000 (300 x 300) in situ Analysen eines einzigen Tumors durchgeführt werden können (Bubendorf et al., 2001).

Durch zahlreiche Studien wurden seit der erstmaligen Beschreibung der Tissue Microarray Technik (Kononen et al., 1998) die Praktikabilität und Kostenersparnis des Verfahrens belegt (Moch et al., 1999; Mucci et al., 2000; Horvath et al., 2001; Packeisen et al., 2002).

1.3.2 Prinzip der Tissue-Microarray-Technik

Zur Herstellung eines Tissue-Microarray wird ein speziell dafür hergestelltes Stanzgerät (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin) verwendet, mit welchem Gewebebiopsien aus Paraffinblöcken entnommen werden können.



Abbildung 4: MTA-1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments)

Dieses Stanzgerät enthält zwei hohle, dünnwandige Nadeln aus rostfreiem Stahl: Die eine wird benötigt, um zu untersuchendes Gewebe aus einem Paraffinblock zu entnehmen, die andere, um zuvor aus dem herzustellenden Block einen Hohlraum zu schaffen, in welchen das Gewebe später eingebettet werden kann.

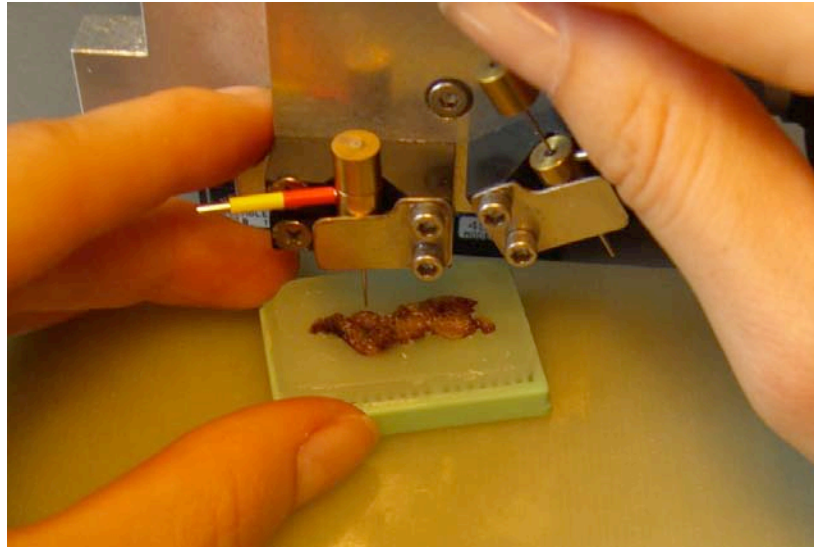


Abbildung 5: Gewebeentnahme aus dem "donor"-Block

Dementsprechend wird der Block, aus dem Gewebe entnommen wird, „donor“- (deutsch: „Geber“) und der leere, neue Paraffinblock „recipient“- (deutsch: „Empfänger“) Block genannt.

Die Regionen, aus denen die Biopsie entnommen wird, werden zuvor entsprechend ihrer morphologischen Repräsentativität mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin-Schnitten ausgesucht.

Um das mit der Nadel herausgestanzte Gewebe oder Paraffin wieder entfernen zu können, ist jede der Nadeln mit einem Stempel versehen. So kann einerseits das Paraffin aus dem Empfängerblock herausgedrückt und verworfen und andererseits das repräsentative Gewebe in den Empfängerblock hineinbefördert werden. Dabei ist darauf zu achten, dass alle Biopsiestanzen in der gleichen Höhe in den Empfängerblock eingesetzt werden.

Anfangs betragen die Nadeldurchmesser noch 3 mm. Sukzessive konnte der Durchmesser aber auf 0,6 mm gesenkt werden. Diese Größe ist ausreichend, um die morphologischen Eigenschaften des Gewebes beurteilen zu können (Hoos et al., 2001a). Heutzutage kann die Platzierung der Biopsien und der Abstände zwischen ihnen durch eine digitale Präzisionssteuerung genau kontrolliert werden. Dadurch kann das entstehende Geweberaster abhängig vom Durchmesser der Stanzen einige Hundert bis Tausend Proben enthalten. Je nach Dicke des entstandenen Blocks können 200 bis 300 aufeinander folgende 5 µm dicke Schnitte hergestellt werden. Die Färbung erfolgt entweder mittels Hämatoxylin-Eosin oder wird auf DNA, RNA oder Proteine

untersucht. Wie z.B. mit Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH), in situ Polymerasekettenreaktion, RNA in situ Hybridisation oder Immunhistochemie (IHC) (Moch et al., 2001). So können also mittels TMA-Technik bis zu zweihundert aufeinander folgende Schnitte mit bis zu eintausend Gewebeproben untersucht werden. Dies bedeutet nicht nur einen hohen ökonomischen und verfahrenstechnischen Vorteil, sondern auch eine hohe Standardisierung, da die Proben alle unter identischen Bedingungen behandelt und analysiert werden (Kononen et al., 1998; Kallioniemi et al., 2001; Bubendorf et al., 2001; Skacel et al., 2002).



Abbildung 6: Schnittpräparat eines Tissue Microarray

Die Tatsache, dass die Gewebeproben in einem Raster angeordnet werden, ist Basis für die automatisierte Konstruktion und Analyse der Tissue-Microarrays (Theillet, 1998; Nocito et al., 2001; Moch et al., 2001), so dass seit einigen Jahren ein computerunterstütztes Gerät auf dem Markt ist, welches automatisch Microarrays produziert (Beecher Instruments, 2001).

1.3.3 Anwendungsgebiete der Tissue-Microarray-Technik

Heutzutage stellt sich nicht mehr die Entdeckung der Gene als Problem dar, sondern die Frage nach ihrer Funktion. Seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms steht eine große Menge von Informationen von Zehntausenden von Genen und deren Struktur der Wissenschaft zur Verfügung (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001).

Mittels DNA-Microarrays können alle in einer Zelle vorkommenden Gene identifiziert werden, so dass dies heute ein wichtiger Arbeitsschritt in der Erforschung von Zell-Genomen auf der DNA- und RNA-Ebene ist (Schena et al., 1995; Lockhart et al., 1996; DeRisi et al., 1996; Schena et al., 1996). Da ihre Qualität und ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel mit diesem Verfahren jedoch nicht beurteilt werden kann, verwendet man zusätzlich Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) und TMAs, die dafür optimal

geeignet sind (Bubendorf et al., 1999a; Moch et al., 1999; Hofele et al., 2002).

Weitere auf Tissue-Microarrays anwendbare Verfahren sind die Immunhistochemie (IHC) zur Lokalisierung von Proteinen und mRNA in situ Hybridisierung zur Lokalisierung von mRNA (Kononen et al., 1998). Wobei erwähnt werden muss, dass letztere ein schwieriges und nicht unumstrittenes Verfahren ist, da der Fixationsprozess die Ergebnisse beeinflusst (Kallioniemi et al., 2001). Dies wurde versucht durch den Einsatz von Kryo-Arrays zu umgehen (Hoos et al., 2001a).

Mit Tissue-Microarrays können verschiedene Fragestellungen behandelt werden, die sich nach dem jeweiligen Design der TMAs richten:

a. Multitumor TMAs :

Enthalten Spots aus Tumorgewebe verschiedener Art.

Indikation: Behandelt die Fragestellung, welche DNA, RNA oder Proteine in welcher Tumorart vorkommen (Schraml et al., 1999; Andersen et al., 2000).

b. Progression TMAs:

Enthalten Gewebe einer Tumorart, jedoch aus verschiedenen Tumorstadien

Indikation: Zur Feststellung, ob ein Gen in verschiedenen Phasen der Tumorentwicklung unterschiedlich stark exprimiert wird (Kononen et al., 1998; Bubendorf, Kononen et al., 1999; Bowen et al., 2000).

c. Prognostic (bzw. Prognose) TMAs:

Kombination aus den Spots eines Microarrays und den jeweiligen Follow-up-Daten der Patienten.

Indikation: Zur Feststellung, ob ein bestimmtes Protein oder eine bestimmte DNA/RNA prognostische Relevanz besitzt (Moch et al., 1999; Barlund et al., 2000; Torhorst et al., 2001).

In der Krebsforschung ergeben sich hieraus folgende Anwendungsgebiete für Tissue-Microarrays:

- Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung von Molekülen.
- Verknüpfung der Informationen über ein Molekül auf DNA-, RNA- und Proteinebene.
- In vivo-Überprüfung von Hypothesen, die an Zelllinien oder in Tierversuchen erarbeitet wurden, an Gewebeproben von Patienten.

- Überprüfen von Ergebnissen, die mit einer limitierten Anzahl von Gewebeproben durch cDNA-Microarrays gewonnen wurden, an einer repräsentativen Probenanzahl im TMA.
- Erforschung eines Auftretens von mutmaßlichen Tumorgenen und deren Produkten in verschiedenen Tumorstadien.
- Herstellung einer Verbindung zwischen molekularbiologischen und pathohistologischen Patientendaten.

(Spyro et al., 2001)

Darüber hinaus finden TMAs auch außerhalb der Krebsforschung in vielen anderen Bereichen Anwendung. So können Arrays mit Geweben von Tieren oder Arrays zur Altersforschung verwendet werden (Kallioniemi et al., 2001).

Auch in der Lehre erscheint der Einsatz von TMAs als sinnvoll, um an ihnen exemplarisch gewebsspezifische Details zu zeigen. Denn die einzelnen Proben repräsentieren immer einen charakteristischen Ausschnitt des Gewebes.

Ein weiteres Anwendungsgebiet finden TMAs in der Entwicklung, Testung und Verbesserung neuer Antikörper und Färbemethoden, insbesondere wenn man TMAs mit normalen Gewebeproben nutzt.

TMAs sind außerdem gut geeignet, wenn Patientendaten von Gewebeproben anonymisiert werden sollen (Bubendorf et al., 2001).

1.3.4 Fragestellung der Arbeit

Ossäre Riesenzelltumore können in seltenen Fällen metastasieren, häufig rezidivieren und/oder maligne entarten. Die Prognose ist weder klinisch noch röntgenologisch oder histologisch abzusehen (Schajowicz, 1994; Jaffe, 1953b, 1958). So soll diese Studie Aufschluss darüber geben, ob VEGF-ab1, PDGFR- β , Bcl-2 und Ki-67 in Zusammenhang mit der Metastasierung, Rezidivierung oder Entartung gebracht werden können. Gleichzeitig wären diese Faktoren ein möglicher Angriffspunkt für zielgerichtete molekulare Therapeutika, die durch Inhibition dieser Wachstumsfaktoren eine adjuvante Therapie zur momentan fast ausschließlich chirurgischen Behandlung bieten würden. Die vorliegende Arbeit untersucht daher 112 Patienten mit einem Osteoklastom des Röhrenknochens auf den Gehalt von VEGF-ab1, PDGFR- β , Bcl-2 und Ki-67 und stellt die Ergebnisse den klinischen Krankheitsverläufen gegenüber.

2 Material und Methoden

2.1 Tumorkollektiv

Als Grundlage der Studie wurden in Paraffin eingebettete Tumorgewebsblöcke von 112 Patienten verwendet, welche in der orthopädischen Abteilung der Universitätsklinik Münster (54%) und in umliegenden Krankenhäusern (9%) aufgrund von Riesenzellknochentumoren behandelt wurden oder Kliniken, die das entsprechende Gewebe zur Referenzbegutachtung übersandt haben (37%). Die histopathologische Untersuchung fand im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität statt.

Die Einschlusskriterien der Patienten wurden wie folgt gewählt:

- Zustand nach Probeexzision oder Totalexzision eines RZT des Knochens
- ausreichend beurteilbares Gewebematerial des Riesenzelltumors
- OP-Zeitraum von 1989 bis 2004

Im Rahmen der Studie wurden Gewebsblöcke mit Riesenzelltumoren des Knochens verwendet, die in einem Zeitraum von 15 Jahren (1989 bis 2004) im Gerhard-Domagk-Institut untersucht wurden.

Das Alter der Patienten betrug im Durchschnitt 35,4 Jahre.

2.2 Erstellung des Tumorkollektivs und praktisches Vorgehen

Zunächst wurde eine Liste aller zu berücksichtigenden Patienten erstellt, deren Riesenzelltumor-Biopsiepräparat zwischen 1989 und 2004 im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie histopathologisch untersucht wurde. Anhand dieser Liste, die Name, Vorname, Geburtsdatum, Diagnose, Journalnummer und IH-Nummer des jeweiligen Patienten bzw. dessen Biopsiepräparat enthielt, wurden zunächst die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin-Schnittpräparate aus dem Archiv herausgesucht.



Abbildung 7: Schnittpräparatarchiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie

Nach lichtmikroskopischer Begutachtung und Beurteilung durch Prof. Dr. med. Bürger, Facharzt für Pathologie am Gerhard-Domagk-Institut in Münster, wurden die tumorreichsten HE-Schnittpräparate ausgewählt und die entsprechenden Paraffinblöcke erneut auf ausreichendes Tumormaterial untersucht. Tumorfremie Schnittpräparate wurden dementsprechend zurücksortiert.

Das tumorreichste Areal des Paraffinblockes wurde auf dem entsprechenden Schnittpräparat gekennzeichnet, um bei dem Tissue-Microarray-Verfahren (TMA) ausreichend repräsentatives Gewebe zu verwenden.

Gleichzeitig wurde eine Datenbank erstellt, in der alle Daten der in der Studie berücksichtigten Patienten, festgehalten wurden. Dies geschah anhand der Journalnummern mit Hilfe des Patientenprogrammes „Gap-It!“.

Notiert wurden:

- Name
- Vorname
- Alter
- Tumorlokalisation
- Geburtsdatum
- Diagnose
- Arrayposition
- Journalnummer
- Block-Nummer
- Auftreten von Rezidiven oder Metastasen

2.3 Erstellung der Tissue-Microarrays

Um die Anordnung der Gewebeproben festzulegen und zu dokumentieren, wurde nun mit Hilfe des Programms „Excel“ eine Datenmaske angelegt, welche nach folgenden Gesichtspunkten angelegt wurde:

Die Proben sollten auf zwei Empfängerblöcke (Block 1 und Block 2), welche jeweils maximal 400 Stanzproben enthalten, verteilt werden. Diese 400 Proben wurden innerhalb des Empfängerblocks auf 4 Quadranten zu je 100 Proben aufgeteilt. So entstanden Felder mit 10 x 10 Stanzproben, wobei jeweils zweimal 5 Stenzen von zwei unterschiedlichen Patienten eine vertikale Reihe bildeten. Jeder Quadrant (A, B, C, D) enthält je fünf Stenzen von maximal 20 Patienten.

Die Bezeichnung der Reihen in einem Feld erfolgte -ähnlich einem Schachbrett- in der Horizontalen nach dem Alphabet (A-J) und in der Vertikalen mittels arabischer Zahlen (1-10).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	489/93 I.13 4	489/93 I.8 3	865/93 II /	865/93 VIII 4	8426/93 II WS1 3	8426/93 II NS7 3	9098/93 I.8 3	9098/93 I.9 3?	9298/93 VIII 3	9298/93 IX 3
2	10057/93 V 3	10057/93 III 0	10237/93 IV /	10237/93 IX 4	11013/93 I3 3	11013/93 I9 3	11427/93 XI 4	11427/93 XII 4	11771/93 III.10 2	11771/93 III.10 3
3	11887/93 I.12 4	11887/93 I.5 3	12210/93 VII 3	12210/93 X 0?	12992/93 I 0	12992/93 VI 4	13492/93 I.2 3	13492/93 I.2 4	14962/93 IV.4 4	14962/93 IV.9 /
4	15728/93 I.10 4	15728/93 I.10 3	15930/93 III.12 4	15930/93 III.14 4	16385/93 IV /	16385/93 VII /	19042/93 I.12 4	19042/93 I.15 4	19694/93 X 4	19694/93 V /
5	23937/93 I.5 4	23937/93 I.7 3	27071/93 VIII /	27071/93 V 3	27210/93 I.3 3	27210/93 I.3 4	28284/93 VII 4	28284/93 XV 5	28287/93 II.14 /	28287/93 II.12 4
6	29406/93 X 4	29406/93 VIII 5	30096/93 IV 0?	30096/93 V 3	31201/93 V 3	31201/93 IV 4	31541/93 I.1 0	31541/93 I.3 3	33522/93 I.7 3	33522/93 I.3 4
7	34661/93 II.1 3	34661/93 II.2 3	34882/93 I.16 4	34882/93 I.6 4	36535/93 IX 3	36535/93 XIII 0	36541/93 VII.4 4	36541/93 VIII.6 /	38201/93 I.3 3?	38201/93 I.5 /
8	42158/93 II.7 0	42158/93 II.8 4	42872/93 II.6 4	42872/93 II.14 4	1303/94 I.4 4	1303/94 I.7 3	1903/94 II.11 3	1903/94 II.15 3	2306/94 XIII 3	2306/94 VB 0
9	3278/94 XXV 3	3278/94 VI 3	4068/94 I.7 3	4068/94 I.3 3	4230/94 I.6 2	4230/94 I.11 3	4464/94 I.9 3	4464/94 I.17 4	6765/94 VIII.a 4	6765/94 IV.a 3
10	7152/94 I.3 4	7152/94 I.9 5	7865/94 I.5 0?	7865/94 I.7 4	7866/94 I.3 3	7866/94 I.5 3	9346/94 XV 4	9346/94 XIII 3	9349/94 XII 4	9349/94 IX 4

Abbildung 8: Detaillierte Darstellung eines beispielhaften Empfängerblockquadranten

Insgesamt wurden Proben von 112 Patienten, die an einem RZT des Knochens erkrankt waren, untersucht. Dementsprechend wurden für den Primärblock 5 x 112, d.h. 560 Stanzbiopsien entnommen und zusätzlich erneut 560 zur Herstellung eines Sekundärblocks, welcher lediglich eine Kopie des Primärblocks darstellt.

Anhand dieser Datenmaske wurden nun die Paraffinblöcke und die dazu entsprechenden und im tumorreichsten Areal markierten Schnitte sortiert und ihren Feldern in den nun zu erstellenden Tissue Microarrays (TMA) zugeteilt.



Abbildung 9: Paraffinblockarchiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie

2.4 Immunhistochemische Färbung

Nach der Herstellung der Tissue-Microarray-Blöcke wurden sowohl von den Primärals auch von den Sekundärblöcken Schnittpräparate angefertigt. Diese Schnittpräparate wurden auf die Tumordichte untersucht und von den Paraffinblöcken mit der höchsten Tumordichte weitere Schnitte für die immunhistologische Färbung angefertigt.

2.5 Immunhistochemisches Färbeprotokoll (Hämatoxylin-Eosin)

Nach dem Schneiden sind die Schnitte immer noch mit Paraffin durchtränkt und müssen, damit das Gewebe sichtbar gemacht wird, angefärbt werden.

Dazu muss das Paraffin zuerst ausgeschmolzen und schließlich mittels Lösemittel (Xylol) komplett herausgelöst werden. Danach werden die Gewebeschnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und im Anschluss angefärbt.

Die in der Histologie am meisten verwendete Färbung ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, welche aufgrund unterschiedlicher Ladungen der Farbstoffe verschiedene Strukturen anfärbt.

So erscheinen bei dieser Färbung Zellkerne blau, das Zytoplasma unter bestimmten Umständen ebenfalls blau und die Proteine des Zytoplasmas und das extrazellulär gelegene Kollagen rot.

Dies hat folgende Ursachen:

Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff und hat somit eine Affinität zu negativ geladenen Teilchen, wie z.B. den Ribonukleinsäuren (DNA und RNA), welche sich bekannterweise gehäuft bzw. ausschließlich im Zellkern befinden. Aus diesem Grund erscheint dieser blau.

Ist aufgrund von Stoffwechselaktivierung (z.B. Regeneration) im Zytoplasma sehr viel Ribonukleinsäure in Form von RNA enthalten, so wird auch dieses blau angefärbt.

Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff, welcher somit positiv geladene Teilchen wie die Proteine des Zytoplasmas und extrazelluläres Kollagen rot anfärbt.

Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Schnitte zunächst entwässert und schließlich mit einem Deckgläschen und Eukitt, einem speziellen, flüssigen Harz versiegelt, so dass sie mikroskopisch untersucht und befundet werden können. In der Regel erfolgt das Anfärben und Eindeckeln automatisiert.

2.5.1 Zusammensetzung (Hämatoxylin-Eosin, HE)

Saures Hämalaun nach Mayer:

1 g Hämatoxylin

0,2 g Natriumjodat

50 g Kalialaun in 1 l Aqua dest. lösen

50 g Chloralhydrat

1 g kristalline Zitronensäure

vor Gebrauch filtrieren

Eosin:

1 % wässriges Eosin G

2.5.2 Durchführung

Anfertigen von Schnitten auf Objektträgern aus dem Wasserbad

25 min in Brutschrank bei 60 °C

4 x 2 min Xylol um das Paraffin auszulösen

absteigende Alkoholreihe zum Rehydrieren:

2 x 2 min 99% Isopropanol

1 x 2 min 70% Isopropanol

2 min Aqua dest.

4 x 2 min Hämatoxylin
2 min fließend wässern (Bläuen)
2 min 1% Eosin
1 x 2 min in Aqua dest. auswaschen
aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren:
2 min 70% Isopropanol
2 x 2 min 99% Isopropanol
2 x 2 min Xylol
Eindecken mit Eukitt

2.6 Immunhistochemisches Färbeprotokoll (PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67, Bcl-2)

Zur Vorbereitung auf das immunhistochemischen Färbeverfahren wurden Schnitte mit einer Schichtstärke von 3 μm auf Superfrost Plus Objektträger (FA Langenbrinck, Tenningen, Deutschland) angefertigt und über Nacht in einem Brutschrank bei 56°C getrocknet. Dabei wurde eine bessere Haltbarkeit der Schnitte erreicht und es kam zu einer beginnenden Entparaffinisierung.

Zur endgültigen Entparaffinisierung wurden die Präparate 20 min in Xylol eingelegt.

Zum Rehydrieren wurde eine absteigende Alkoholreihe verwendet:

2 x 99%, 1 x 96%, 1 x 70%, Aqua dest.

Für die Antikörper Ki-67, Bcl-2 und VEGF-ab1 erfolgte nach der Entparaffinisierung und vor dem Auftragen des Primärantikörpers eine Vorbehandlung, um die ursprüngliche Proteinform wiederherzustellen und somit ein eindeutiges Färbeergebnis zu erhalten. Denn durch die Fixierung, die meist mittels Formalin erfolgt, kommt es zu Aldehydvernetzungen, die die Antikörperbindung verhindern können oder zu einer Antigenmaskierung führen. Der Antikörper wäre dann nicht mehr erkennbar.

Diese Vorbehandlung erfolgte für Ki-67 und Bcl-2 in Form einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierung. Dafür wurden die Schnitte in einer Küvette mit Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 für 30 Minuten bei 99°C in einen Steamer (Dampfgarer Multigourmet, FA Braun) gegeben.

Für den Antikörper VEGF-ab1 wurde eine Vorbehandlung mit Proteinase K durchgeführt. Dazu erfolgte nach dem Pipettieren von 200 µl Proteinase K eine 10-minütige Inkubation.

Eine Gewebeprevorbehandlung für PDGFR-β war nicht notwendig.

Antikörper	Hersteller	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung	Spezies
PDGFR-β	DAKO	Santa Cruz	1:100	Hitze	Kaninchen
VEGF-ab1	Calbiochem	poly	1:200	Proteinase	Kaninchen
Bcl-2	DAKO	mono	1:2000	Hitze	Maus
Ki-67	DAKO	mono	1:2000	Hitze	Maus

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Antikörper

Die eigentliche Immunhistochemische Färbung wurde mit Hilfe eines Dako-Immufärbeautomaten Autostainer (Dako REAL™) und einem dazugehörigen Kit (Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Hamburg, FRG) durchgeführt.



Abbildung 10: DAKO-Immufärbeautomat

Dabei wird ein Dreischrittverfahren angewendet, das auf der LSAB-Methode (Labeled Strept Avidin-Biotin-Methode) beruht. Grundlage dieser Methode ist die Affinität von Avidin zu Biotin durch den Einsatz eines biotinylierten Brückenantikörpers. Im Gegensatz zu anderen Verfahren erfolgte in einem dritten Schritt das Auftragen eines direkt mit einem Enzym (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) gebundenen (labeled) Avidins. Hier sind alle vier möglichen Bindungsstellen für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin frei. Der Einsatz der LSAB-Methode ist nach heutigem

Erkenntnisstand eine der spezifischsten und durch seine einfache Handhabung bevorzugten Methoden.

Der Ablauf der Schritte war wie folgt:

- 25 min Inkubation mit optimal verdünntem primären Kaninchen- o. Maus-AK
- 20 min Inkubation mit sek. AK Dako REAL™ Link Biotinylated Secondary Antibodies
- 20 min Inkubation mit Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase

Nach jedem Schritt erfolgte eine Spülung mit Waschpuffer DCS LabLine

Die Reaktion wurde durch RED Chromogen sichtbar gemacht, welches auch im Kit enthalten war. Dies wurde 2 x 8 min zugegeben. Zur Kontrolle des Farbergebnisses wurde eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt. Für Bcl-2 und Ki-67 war dies ein Tonsillen-, für VEGF-ab1 ein Plazenta- und für PDGFR- β ein Milzpräparat.

Die Substrat-Arbeitslösung, d.h. das Chromogen, lagerte sich an den Antikörper an und erzeugte dort ein kontrastreiches rotes Endprodukt.

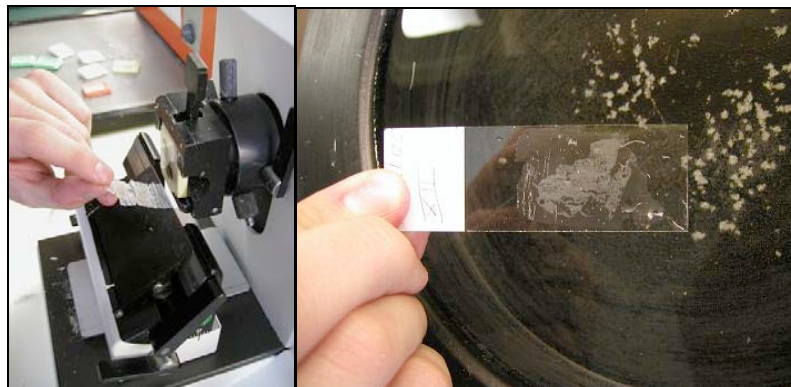


Abbildung 11: Anfertigung eines Schnittpräparates mit Hilfe eines Mikrotoms

Nach diesem maschinellen Färbevorgang wurde nun eine manuelle Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt, so dass nach anschließendem Bläuen durch 5-minütiges Wässern des Schnittes unter fließendem Leitungswasser ein kontrastreiches Endprodukt resultierte. Die Zellkerne des Präparates nahmen eine blaue Farbe an.

Abschließend durchlief das Präparat zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol und wurde mit Vitro-Clud® (FA R.Langenbrinck, Labor und Medizintechnik, Teningen) eingedeckt.

2.7 Lichtmikroskopische Auswertung

Im Anschluss an die immunhistochemischen FärbeprozEDUREN erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung.

Für PDGFR- β , VEGF-ab1 und Bcl-2 wurde die zytoplasmatische Expression mit einem semiquantitativen Score von 0 bis 3 für jeden Tumor ermittelt. Für Ki-67 wurde die Häufigkeit der nukleären Expression in Prozent angegeben, da dieser Marker nur die sich im Wachstum befindende Region anfärbt.

2.7.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Korrelationsanalyse wurde mit der bivariaten Korrelationsanalyse von Kendells τ durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv bestehend aus insgesamt 112 Patienten setzte sich jeweils zur Hälfte aus Frauen (56) und Männern (56) zusammen.

Die meisten Patienten mit 33% waren 30 bis 40 Jahre alt (37 Patienten), 19,6% waren 40 bis 50 Jahre alt (22 Patienten); 18,8% zwischen 50 und 60 Jahren (21 Patienten). Ältere Patienten ab dem 60. Lebensjahr (16 Patienten) waren mit 14% nahezu gleich häufig vertreten wie jüngere Patienten zwischen 20 und 30 mit 13% (15 Patienten).

Die Ausnahme bildete ein 13-jähriges Kind (0,9%).

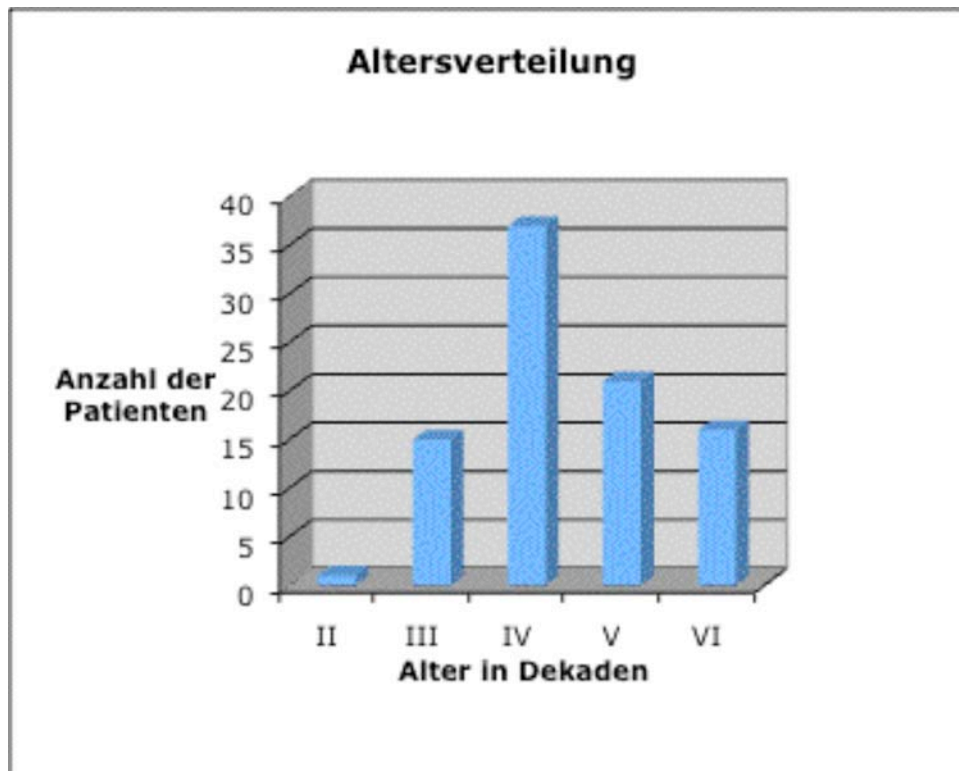


Diagramm 1: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Das Durchschnittsalter lag bei 35,42 Jahren. Das Altersminimum betrug 13 und das Altersmaximum 67 Jahre.

Der Beobachtungszeitraum betrug im Durchschnitt 73,7 Monate. Der minimale Beobachtungszeitraum lag bei 5,7 Monaten, das Maximum bei 229,2.

3.2 Immunhistochemische Ergebnisse

Für jeden Tumor wurde sowohl die membranöse als auch die zytoplasmatische Expression durch einen semiquantitativen Score von 0 bis 3 getrennt ausgewertet. Dabei steht 0 für keine, 1 für geringe, 2 für mittelstarke und 3 für starke Expression. Für einige Zellen wurde kein Ergebnis notiert, da die Färbung nicht eindeutig zu interpretieren war. Eine Ungenauigkeit des Färbeergebnisses kann entstehen, wenn beispielsweise einzelne Stanzzylinderabschnitte abschwimmen oder in dem Schnitt kein repräsentatives Gewebematerial enthalten ist. Der Vollständigkeit halber wurde die Färbung der Riesenzellen mit ausgezählt, jedoch nicht für weitere Auswertungen genutzt.

3.2.1 Expression von PDGFR- β

Die Expression für PDGFR- β lag mit 59,4% (63 Zellen) bei über der Hälfte des Anteils bei Score 2 und 34% (36 Zellen) bei Score 1. Geringe Anteile waren gar nicht (2,8% bzw. 3 Zellen Score 0) und einige stark (3,8% bzw. 4 Zellen, Score 3) angefärbt. 7 Zellen wiesen kein eindeutiges Färbeergebnis auf.

Insgesamt zeigten 97,2% (103 Zellen) des Stromas eine mehr oder weniger starke Expression von PDGFR- β .

Die Färbung der Riesenzellen war zu 7,1% (7 Zellen) nicht vorhanden, zu 48,5% (48 Zellen) bei einem Score von 1, zu 44,4% (44 Zellen) bei einem Score von 2. 13 Zellen konnten nicht eindeutig ausgewertet werden.

N=112	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Kein Ergebnis
Stromazellen	3	36	63	4	6
Riesenzellen	7	48	44	0	13

Tabelle 4: Ergebnisse von PDGFR- β bezogen auf den Tumorscore

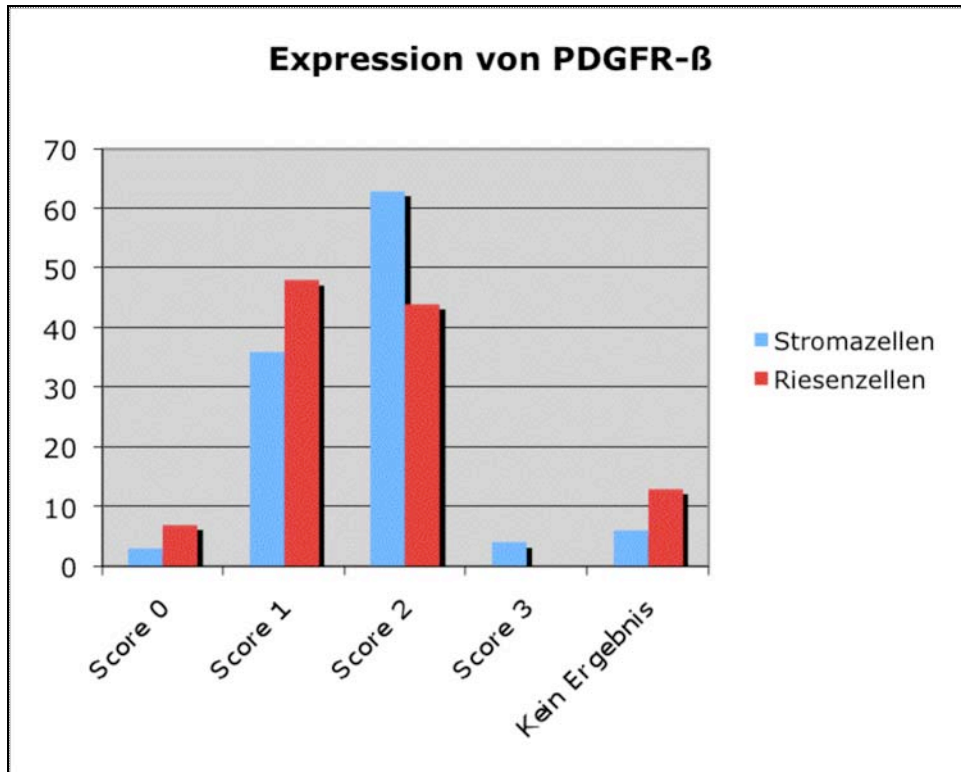


Diagramm 2: Expression von PDGFR- β nach immunhistochemischer Untersuchung

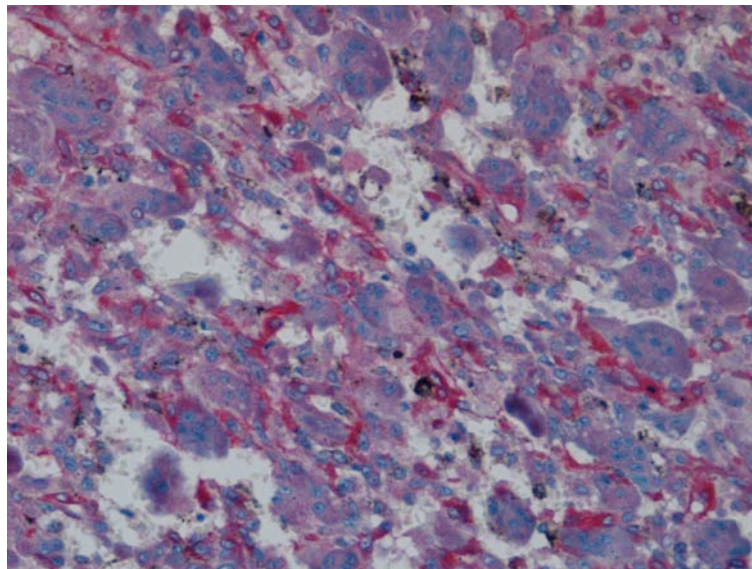


Abbildung 12: Die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen den PDGF-Rezeptor- β zeigt zum Großteil eine leichte bis mittelstarke Expression im Stromakompartiment (20x)

Aus der untenstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass 9 Patienten mit Rezidiven eine schwache Färbung und 14 Patienten mit Rezidiven eine mittelstarke Färbung von PDGFR- β zeigten. Gleichzeitig ist jedoch die Expressionshäufigkeit bei Patienten ohne Rezidiv ebenfalls erhöht.

Score	Rezidiv	Kein Rezidiv	Pat. insgesamt
0	1	2	3
1	9	27	36
2	14	47	61
3	0	4	1
			101

Tabelle 5: Gegenüberstellung von Rezidivierung und PDGFR- β -Expression

Die bivariate Korrelationsanalyse mit Bestimmung von Kendalls τ ergab, dass eine Korrelation der vorliegenden klinischen Daten mit der analysierten Proteinexpression von PDGFR- β nicht nachweisbar war.

3.2.2 Expression von VEGF-ab1

Die Quantifizierung der Expression von VEGF-ab1 ergab folgende Ergebnisse: 72,5% (79 Zellen) zeigten keinerlei Färbung im Stroma (Score 0). Die Anteile mit geringer Expression von 13,8% (15 Zellen) und mittelstarker Expression von 13,8% (15 Zellen) sind gleich groß. Kein eindeutiges Ergebnis wurde bei 5 Zellen festgestellt. Eine starke Expression (Score 3) von VEGF-ab1 konnte weder für Riesenzellen noch für das Stromakompartiment nachgewiesen werden.

Mit 96% (97 Zellen) war der Anteil der nicht angefärbten Riesenzellen am größten. Lediglich 4% (4 Zellen) der Riesenzellen wiesen eine leichte Expression (Score 1) auf.

N=112	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Kein Ergebnis
Stromazellen	79	15	15	0	3
Riesenzellen	97	4	0	0	11

Tabelle 6: Expression von VEGF-ab1 bezogen auf den Tumorscore

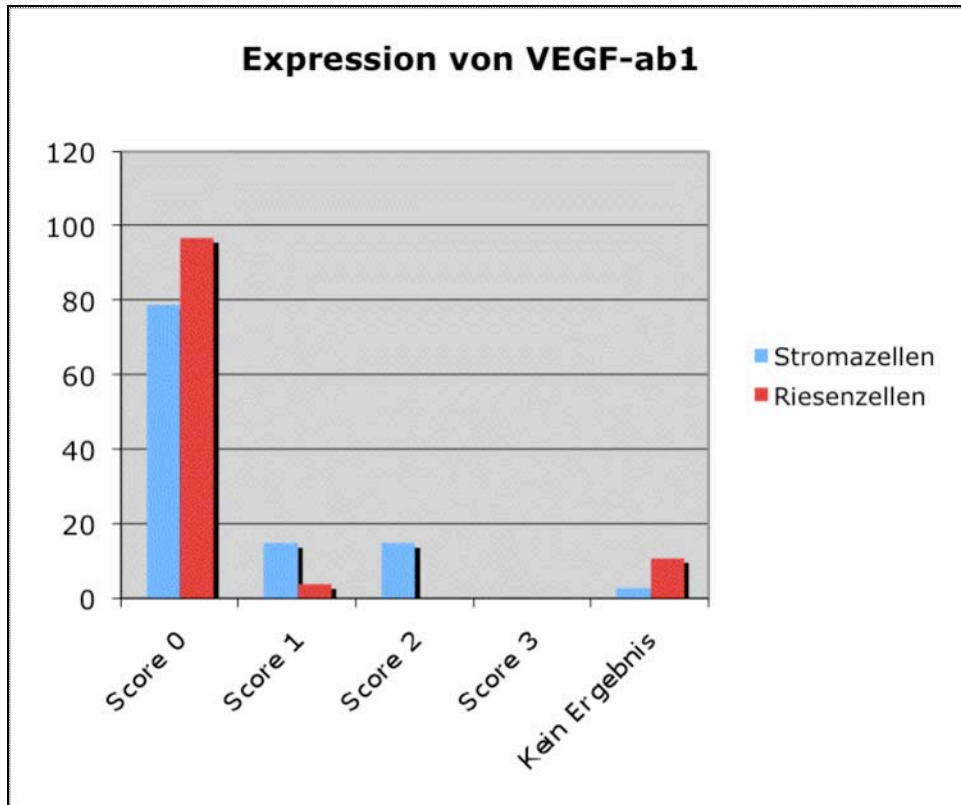


Diagramm 3: Expression von VEGF-ab1 nach immunhistochemischer Untersuchung

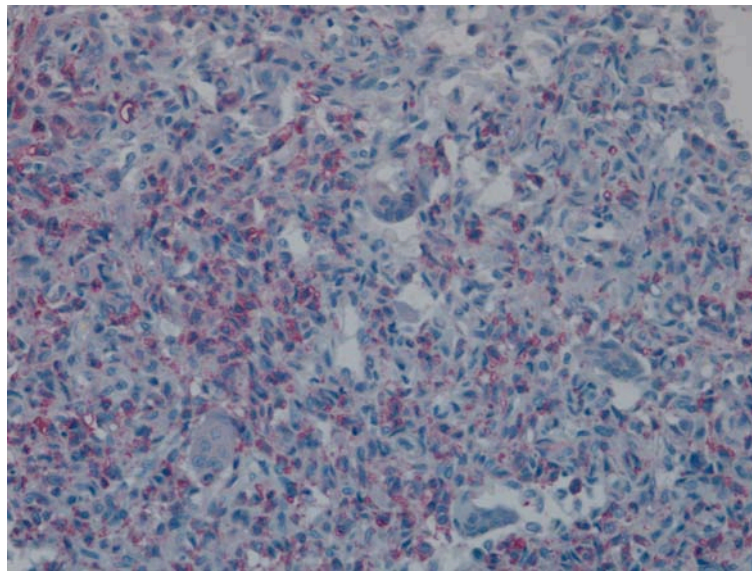


Abbildung 13: Das histologische Bild nach immunhistochemischer Behandlung mit Antikörpern zeigt zu 27,6% eine leichte bis mittelstarke Expression von VEGF-ab1 (20x)

Score	Rezidiv	Kein Rezidiv	Pat. insgesamt
0	16	41	57
1	5	5	10
2	3	7	10
3	0	0	0
k.E.	1	2	3

Tabelle 7: Gegenüberstellung von Rezidivierung und VEGF-ab1-Expression

Auch bezüglich VEGF-ab1 war eine Expression sowohl bei rezidivierenden als auch bei nicht rezidivierenden Fällen festzustellen. 5 Gewebeproben von Patienten die später ein Rezidiv erlitten zeigten eine schwache Färbung; 3 Proben eine mittelstarke Färbung. Die bivariate Korrelationsanalyse nach Kendalls τ bestätigte auch hier keinerlei Korrelation zwischen VEGF-ab1-Expression und klinischen Parametern.

3.2.3 Expression von Ki-67

Das Ergebnis von Ki-67 wird nicht anhand von Score-Werten bestimmt, sondern die Anzahl der positiv angefärbten Zellen wird anteilig angegeben.

Dabei stellte sich heraus, dass die größten Anteile keine Expression (33,3%) oder eine sehr geringe Expression von ca. 2% aufwiesen(37%). 23,1% der Stromazellen waren zu 5% angefärbt; 4,5% zu 10% und ein sehr geringer Anteil von jeweils 0,9% zeigten eine Ki-67-Expression von ca. 5% bzw. von ca. 15%.

Eine nukleäre Expression von Ki-67 war nicht vorhanden.

	0%	2%	5%	7%	10%	15%
Stromazellen	33,3%	37%	23,1%	0,9%	4,6%	0,9%
Riesenzellen	100%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabelle 8: Expression von Ki-67 bezogen auf den Anteil der positiv angefärbten Zellen

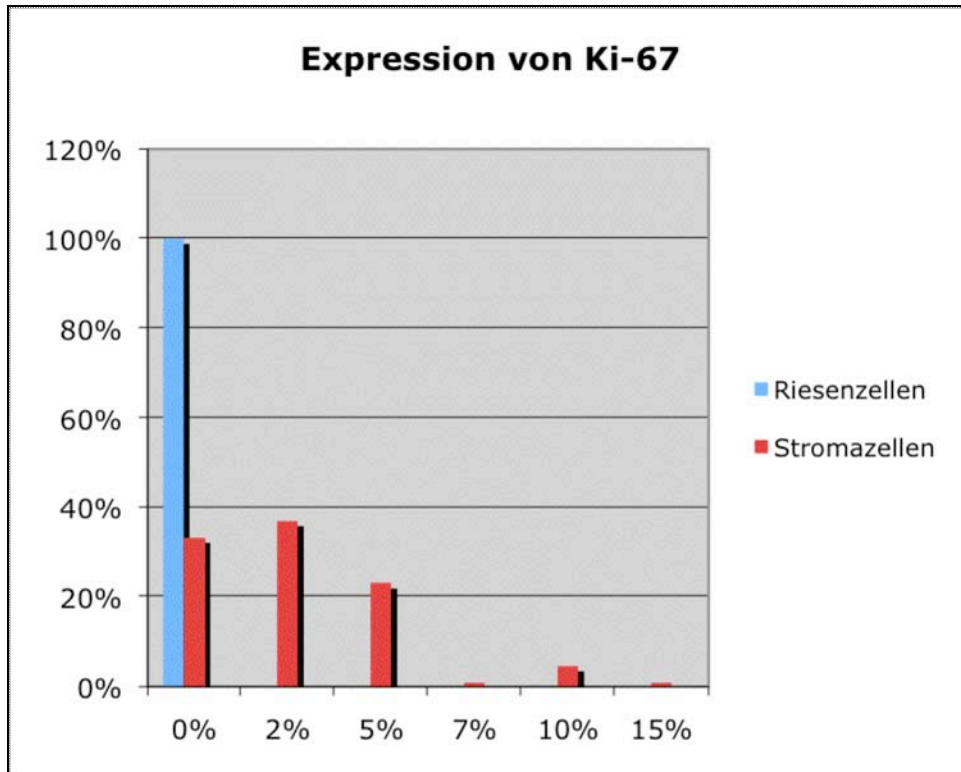


Diagramm 4: Expression von Ki-67 nach immunhistochemischer Untersuchung

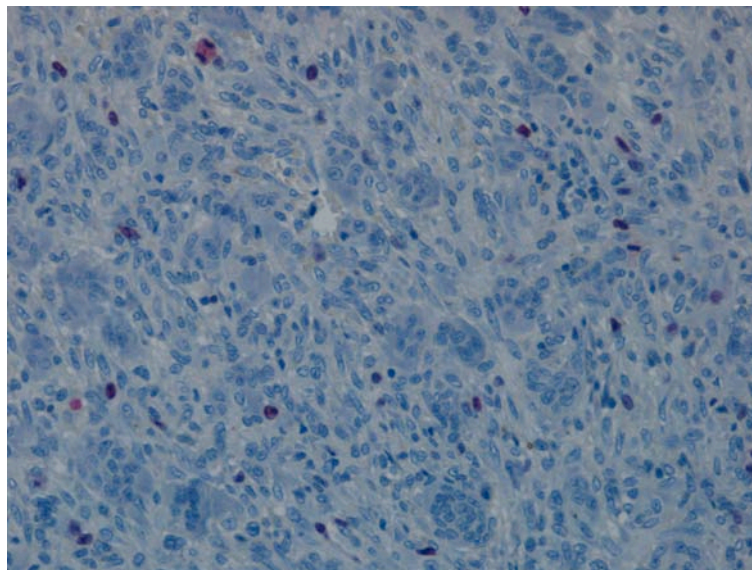


Abbildung 14: Nach immunhistochemischer Anfärbung ist eine geringe Ki-67-Expression zu erkennen (20x)

Die bivariate Korrelationsanalyse von Kendalls τ ergab keine Korrelation von klinischen Parametern und dem Proliferationsindex mittels Ki-67.

3.2.4 Expression von Bcl-2

Der mit 87,2% (95 Zellen) größte Anteil des Tumorgewebes, das mit Bcl-2 angefärbt wurde zeigte im Stroma keinerlei Expression (Score 0). 9,2% (10 Zellen) zeigten eine geringe (Score 1) und 3,7% (4 Zellen) eine mittelstarke (Score 2) Färbung an. Bei 4 Zellen konnte kein eindeutiges Ergebnis bestimmt werden.

Die Anfärbung der Riesenzellen ergab zu 56% keine, zu 39% eine geringe und zu 5% eine mittelstarke Expression von Bcl-2. Das Ergebnis von 12 Zellen war nicht eindeutig.

N=112	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Kein Ergebnis
Stromazellen	95	10	4	0	3
Riesenzellen	56	39	5	0	12

Tabelle 9: Expression von Bcl-2 bezogen auf den Tumorscore

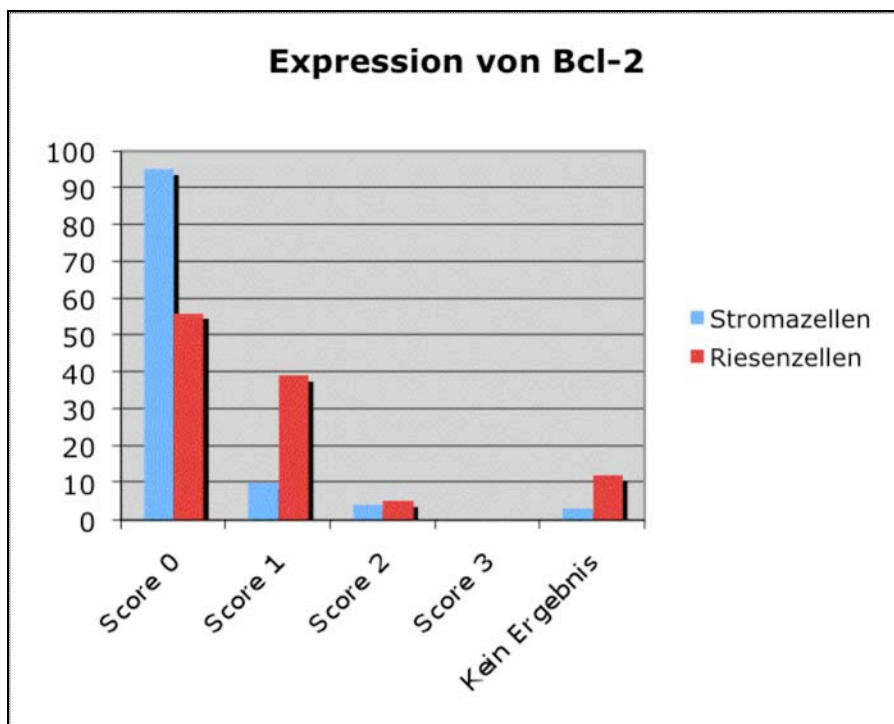


Diagramm 5: Expression von Bcl-2 nach immunhistochemischer Untersuchung

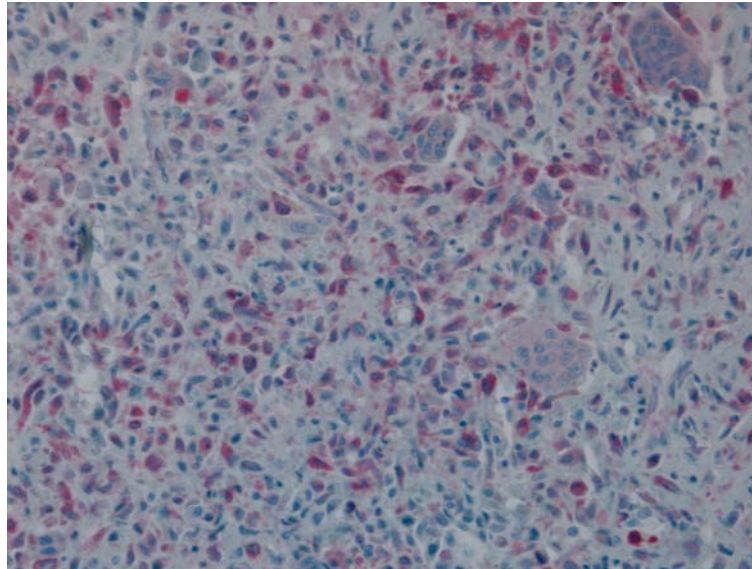


Abbildung 15: Nach immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern zeigte sich keine Expression von Bcl-2

Die untenstehende Tabelle zeigt, dass in vier Fällen, bei denen später ein Rezidiv festgestellt werden konnte, eine geringe Bcl-2-Expression vorhanden ist; in einem Fall sogar eine mittelstarke Expression. Jedoch zeigen 20 Rezidivfälle keinerlei Expression und vier nicht-rezidivierende Fälle weisen ebenfalls eine geringe bis mittelstarke Färbung für Bcl-2 auf.

Score	Rezidiv	Kein Rezidiv	Pat. insgesamt
0	20	49	69
1	4	2	6
2	1	2	3
3	0	0	0
k.E.	0	2	2

Tabelle 10: Gegenüberstellung von Rezidiven und Bcl-2-Expression

Die bivariate Korrelationsanalyse mit Bestimmung von Kendalls τ ergab, dass die vorliegenden klinischen Daten mit der analysierten Proteinexpression von Bcl-2 nicht korrelierten.

3.2.5 Expressionshäufigkeit

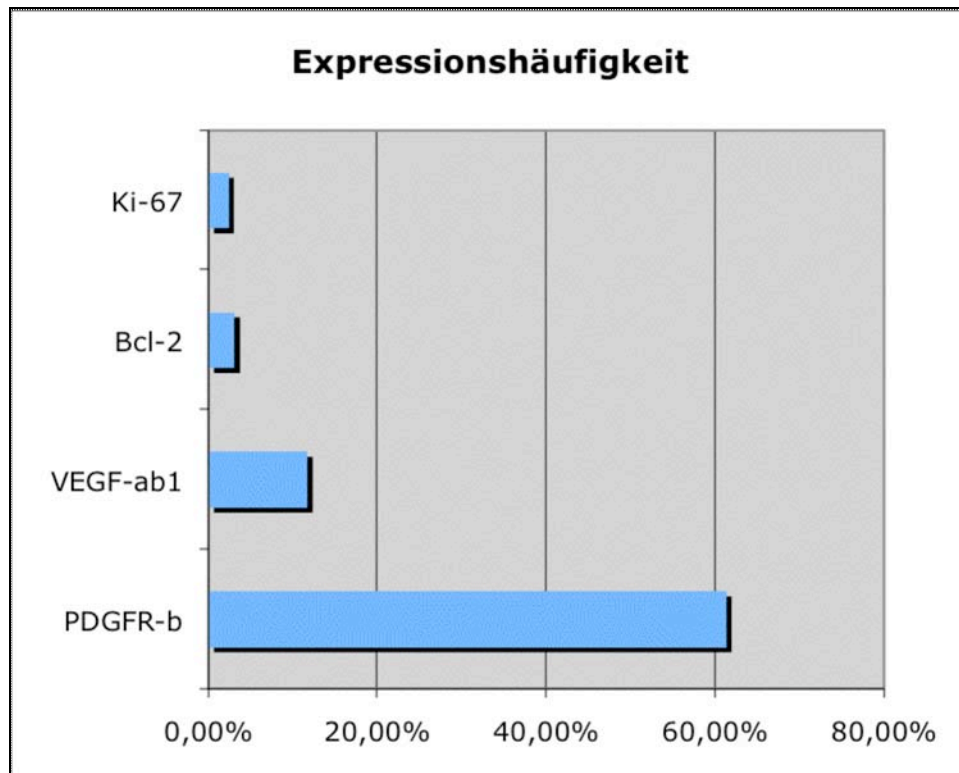


Diagramm 6: Expressionshäufigkeit der verschiedenen Faktoren

PDGFR- β wurde in 61,3%, VEGF in 11,7% und Bcl-2 in 3,1% der Fälle exprimiert. Für Ki-67 war keine nukleäre Expression nachweisbar, während die spindelzellige Tumorkomponente eine Proliferationsrate von 2,36% mit einer Standardabweichung von 2,7 und einem Maximum von 15% aufwies.

Die Auswertung der Tumormarker zeigte keine Korrelation mit den klinischen Daten, d.h. die Patientenfälle, bei denen der Riesenzelltumor rezidierte bzw. metastasierte, zeigten keine verstärkte Expression von PDGFR- β , VEGF-ab1, Ki-67 und Bcl-2.

3.3 Durchgeführte Therapien

Bei dem mit 67,9% (76) größten Anteil der Patienten erfolgte eine intraläsionale Exzision; bei lediglich 5,4% (6) der Patienten wurde eine so genannte weite Resektion vorgenommen.

Zum Auffüllen des Defektes wurde zu 65,5% (51 Patienten, n= 78) beim Ersteingriff Palacos eingebracht. Dies ist ein polymeres Methylmethacrylat (PMMA), das meist zur

Infektionsprophylaxe mit einem Antibiotikum (z.B. Gentamycin) kombiniert verwendet wird.

Bei 34,6% (27 Patienten) wurde beim Ersteinriff nur reseziert (16%, 13 Patienten) oder direkt Spongiosa (10%, 8 Patienten), eine Endoprothese (8%, 6 Patienten) oder ein Knochenersatzmaterial namens Pyrost® (1,3%, 1 Patient) implantiert. Von diesen 27 Patienten erlitten 44,4% (12 Patienten) ein Rezidiv. Dies entspricht bei insgesamt 25 Rezidivfällen ca. der Hälfte.

Eine zusätzliche Strahlentherapie wurde nur in 2 Fällen (1,8%) durchgeführt. In diesen Fällen trat während des Beobachtungszeitraums kein Rezidiv auf.

Eine Chemotherapie erfolgte in keinem der hier untersuchten Fälle.

3.4 Metastasierung und Rezidivrate

In 1,8% der Fälle (2 Patienten) traten Metastasen auf.

Bei 21,4% (24 Patienten) wurde ein lokales Rezidiv beobachtet. Die durchschnittliche Dauer bis zur Entdeckung eines Rezidivs betrug 75,5 Monate.

Eine maligne Entartung konnte in keinem der Fälle festgestellt werden. Außerdem ist kein Patient während des Beobachtungszeitraums an den Folgen des Riesenzelltumors verstorben.

4 Diskussion

Riesenzelltumore des Knochens haben ein lokal aggressives Wachstum und können unter Umständen metastasieren und/oder maligne entarten. Bis dato sind keine prognostischen Faktoren bekannt, um das individuelle Patientenrisiko zu bestimmen. Daher gestaltet sich das Ergreifen der adäquaten Therapie immer noch als schwierig.

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und weitere Fortschritte in der Molekularbiologie haben zahlreiche Marker hervorgebracht, die möglicherweise ausschlaggebend in der Tumorentwicklung sind.

Mithilfe des 1998 erstmalig von Kononen et al. veröffentlichten Tissue-Microarray-Systems ist es möglich immunhistochemische Untersuchungen in epidemiologisch relevanter Anzahl, mit geringem Aufwand und wenig Messungenauigkeiten durchzuführen.

Dieses Verfahren wurde für die vorliegende Arbeit genutzt, um die prognostische Relevanz der Marker VEGF-ab1, PDGFR- β , Ki-67 und Bcl-2 zu screenen und als mögliche Angriffspunkte molekularer Therapien zu bestimmen.

4.1 Analyse des Patientenkollektivs

Die Daten des Patientenkollektivs entsprechen nahezu denen weiterer Studien über ossäre Riesenzelltumore.

Das durchschnittliche Patientenalter beträgt in der vorliegenden Studie 35,4 Jahre. 33% der Patienten waren zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Es lag somit eine charakteristische Altersverteilung vor wie sie in der Literatur beschrieben wird (Campanacci et al., 1987; Dorfman et al., 1998; Schajowicz et al., 1994; Unni et al., 1996; Zheng et al., 2001). Laut einer Studie von Schajowicz (1994) sind Patienten unter dem 15. oder über dem 40. Lebensjahr selten, unter 10 oder über 50 die Ausnahme und der Anteil im 3. Lebensjahrzehnt am häufigsten. Insgesamt tritt der ossäre Riesenzelltumor hauptsächlich bei skelettal ausgewachsenen Patienten auf (Goldenberg et al., 1970; Zheng et al., 2001; Schajowicz et al., 1994).

In Bezug auf die Geschlechterverteilung gibt es nur geringfügige Abweichungen. Das Verhältnis Frauen zu Männern liegt in der vorliegenden Studie bei 1:1 mit exakt 56 Frauen und 56 Männern. In der Literatur werden hingegen Studien beschrieben, die einen geringgradig größeren Frauenanteil enthalten (Campanacci, 1990; Dahlin et Unni,

1986; Goldenberg et al., 1970; Huvos, 1991). Die Ursache dieser teils weiblichen Dominanz ist nicht geklärt und kann durch diese Studie nicht bestätigt werden.

4.2 Validität von TMAs

Da beim Tissue-Microarray-Verfahren immer nur ein kleiner Ausschnitt eines Tumors repräsentativ für das gesamte Gewebe gewertet wird und einige Tumoren eine heterogene Validität aufweisen, stellt sich die Frage nach der Validität dieses Verfahrens. Wann ist der Ausschnitt groß genug, um genügend repräsentatives Material zu enthalten? Mit diesem Thema haben sich zahlreiche Autoren befasst und das TMA-Verfahren kritisch anderen Verfahren gegenübergestellt.

Um die Aussagekraft des Gewebes nicht einzuschränken, begannen Bubendorf et al. (2001) mit einem Durchmesser von 3 mm.

Skacel et al. (2002), stellten bei einer vergleichenden Studie von TMA-Verfahren und konventionellem Verfahren in Bezug auf die Expression von ER (estrogen receptor), PR (progesteron receptor) und die HER-2/NEU-Amplifikation (FISH) bei Mammakarzinomen fest, dass die Ergebnisse zu 100% übereinstimmten. Bei dem Vergleich der Prozentzahlen von ER- und PR-positiven Zellen gab es lediglich geringe Abweichungen von 10-20% in 90% der Proben beim TMA-Verfahren gegenüber Verfahren mit größeren Gewebeproben. Bei weiteren Studien lag die Konkordanz sogar bei 90 bis 95% (Camp et al., 2000; Gillett et al., 2000; Torhorst et al., 2001).

Einige Autoren stellten ebenfalls fest, dass sich die Ergebnisse konventioneller Verfahren nicht von denen des Microarray-Verfahrens unterscheiden:

Kononen et al. (1998) untersuchten die Häufigkeiten von HER-2/NEU-, c-myc-, cyclin-D1- und 17q23-Amplifikation in Brustkrebs mittels TMA.

Sallinen et al. (2000) stellten die Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Häufigkeitsanalyse von p53 in Gliomen fest und Mucci et al. (2000) bei einer Studie über Prostatakrebs.

Auch in Bezug auf Mammakarzinome steht das TMA-Verfahren den konventionellen Verfahren in nichts nach (Moch et al., 2001).

Bei einer Untersuchung von 59 Fibroblastomen auf die Expression von Ki-67, p53 und pRB lag die Konkordanz zwischen 96 und 98%. Voraussetzung dafür war ein Minimum von drei Gewebebiopsien (Hoos et al., 2001b).

Dies zeigt, dass für eine höhere Validität des Verfahrens nicht nur der Durchmesser der Biopsiestanze, sondern auch die Anzahl der Stenzen ein entscheidender Faktor ist.

Laut einer Microarray-Studie von Schraml et al. (1999) ist pro Tumorart ein Minimum von 25 Fällen die Voraussetzung für den Nachweis von 92% der bekannten Genveränderungen.

Skacel et al. (2002) untersuchten in ihrer Studie nicht nur die Unterschiede zwischen konventionellem und Microarray-Verfahren, sondern auch die Aussagekraft von TMAs bei unterschiedlich großem Biopsiedurchmesser. Es zeigte sich abschließend, dass ein kleiner Biopsiedurchmesser von 0,6 mm ebenso adäquat die Expression und Amplifikation wiedergibt wie ein größerer Durchmesser. Allerdings ist das Risiko eines Coreverlustes erhöht.

Letztendlich sind sich die Autoren einig darüber, dass das Tissue-Microarray-Verfahren besonders geeignet ist, um eine große Menge an Gewebeproben unter identischen Voraussetzungen auf das Vorhandensein bestimmter Marker zu untersuchen (Skacel et al., 2002; Kallioniemi et al., 2001; Bubendorf et al., 2001; Moch et al., 2001).

4.3 Immunhistochemische Ergebnisse

4.3.1 Expression von PDGFR- β

Der Wachstumsfaktorrezeptor PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) besitzt Tyrosinkinaseeigenschaften (Bishayee et al., 1986). Durch die Dimerisierung von zwei Rezeptoren nach Aktivierung durch den passenden Liganden werden Kinasevorgänge induziert, der Rezeptor autophosphoryliert und nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Diese Signalwege beeinflussen Angiogenese, Proliferation, Überleben und Migration der Zelle (Pietras et al., 2003). Von einer Beteiligung von PDGF bzw. PDGF-Rezeptoren an der Tumorentstehung geht man beim Dermatofibrosarkom, beim Hypereosinophilen Syndrom (HES) und bei der chronischen, myelomonozytären Leukämie (CMML) aus (Shimizu et al., 1999; Greco et al., 1998; Cools et al., 2003; Carroll et al., 1996). Auch bei anderen bösartigen Tumorerkrankungen wie Glioblastomen, Medulloblastomen, Dermatofibrosarkomen, Riesenzellfibromen und auch bei Knochentumoren konnte eine verstärkte PDGFR- β -Expression beobachtet werden (Merchant et al., 2002; Hotfilder et al., 2002; Lagonigro et al., 2006; Sjoblom et al., 2001; Uren et al., 2003; Scotlandi et al., 2003).

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob der Wachstumsfaktorrezeptor PDGFR- β bei ossären Riesenzelltumoren verstärkt exprimiert wird, die Expression prognostischen Nutzen besitzt oder, ob PDGFR- β ein möglicher Angriffspunkt für eine gezielte medikamentöse Therapie wäre, wie bereits in der Behandlung von Leukämiepatienten mit Imatinib.

In unserer Studie zeigte der Großteil des Stromas -insgesamt 97,2% (103 Zellen)- eine mehr oder weniger starke Expression von PDGFR- β .

Die Expression für PDGFR- β liegt mit 59,4% (63 Zellen) bei über der Hälfte des Anteils bei Score 2 und 34% (36 Zellen) bei Score 1. Geringe Anteile sind gar nicht (2,8% bzw. 3 Zellen Score 0) und einige sind stark (3,8% bzw. 4 Zellen, Score 3) angefärbt.

Eine Korrelation mit klinischen Werten, wie dem Auftreten von Rezidiven, Metastasierung oder maligner Entartung, konnte nicht festgestellt werden.

Bei anderen Knochentumoren wurde bereits eine PDGFR- β -Expression bestätigt und als möglicher therapeutischer Angriffspunkt entdeckt. Dazu gehört die Familie der Ewing-Sarkom-Tumore (Uren et al., 2003; Bozzi et al., 2007), Chondrosarkome (Lagonigro et al., 2006) und Osteosarkome (Oda et al., 1995).

2007 untersuchten Do et al. 71 Ewing Sarkome auf KIT-Expression und Mutationen von c-kit und PDGFR. Dabei konnten keine aktivierende Mutation in den PDGF- α - und - β -Rezeptoren gefunden werden, jedoch ein Polymorphismus in Exon 18 des PDGFR- α -Gens.

Uren et al. (2003) fanden in neun Zelllinien von Ewing-Sarkom-Familiertumoren keinerlei Expression für PDGFR- α , jedoch in acht Fällen signifikante Expression von PDGFR- β . Durch immunhistochemische Färbung wurden 90,4% (47 von 52 Proben) positiv für PDGFR- β ausgewertet. Außerdem konnte im Tierversuch eine Inhibition von PDGFR- β mittels AG1295 erreicht werden. Die Aktivierung, nachgeschaltete Signalwege, das Zellwachstum und die Chemotaxis von TC-32-Zellen wurden so blockiert. Zusätzlich verzögerte AG1295 die Tumorformation und verlängerte das Überleben im Tierversuch.

Eine immunhistochemische und biochemische Analyse von Chondrosarkomen zeigte eine Expression für PDGFR- α und - β mit größerer Expression und Phosphorylation des β -Rezeptors.

Die Ergebnisse, ohne aktivierende Mutationen oder abnormes Genprofil und PDGF-A und PDGF-B-Expression, entsprechen einem autokrin/parakrinen Aktivierungskreislauf der korrespondierenden Rezeptoren (Lagonigro et al., 2006).

Da in Osteosarkomen reichlich PDGF-Rezeptoren nachzuweisen sind, untersuchten McGary et al. (2002) die Wirkung von Imatinib auf das PDGF-vermittelte Zellwachstum bei Osteosarkomen in vitro und anhand von Tierversuchen mit Nacktmäusen. Im Tierversuch zeigte die Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied zu den mit Imatinib und/oder Taxol behandelten Mäusen. In vitro hemmte Imatinib jedoch das PDGF-vermittelte Wachstum und führte zu Apoptose von Osteosarkomzellen durch selektive Inhibition von PDGF-Rezeptortyrosinkinasen. Dies bestätigt Imatinib als mögliches Medikament bei Osteosarkomen.

Bis dato gibt es in der Literatur keine Studie über Riesenzelltumore in Zusammenhang mit PDGFR- β oder der Wirksamkeit von PDGF-Rezeptor-Inhibitoren bei Riesenzelltumoren.

PDGFR- β kommt zwar physiologischerweise in verschiedenen Gewebetypen vor, jedoch zeigen diese Werte eine eindeutige Überexpression. Obwohl die Expression von PDGFR- β nach unserer Studie keinen prognostischen Wert besitzt, ist die Überexpression möglicherweise ein Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie von Riesenzelltumoren des Knochens. Da PDGFR- β in der Hämatopoese eine wichtige Rolle spielt (Fletcher, 2004), könnte durch entsprechende Angiogenese-Inhibitoren (z.B. Imatinib) eventuell das Tumorwachstum gehemmt werden. Bisher zielten Therapiestrategien vorwiegend auf VEGF-Antagonisten ab, die jedoch hauptsächlich bei unreifen Gefäßen ohne die umgebende Schicht von Perizyten wirksam waren. Die Kombination von VEGF- und PDGF-Antagonisten scheint deshalb besonders günstig zu sein, da PDGF-Antagonisten speziell die Organisation der Perizyten behindern, während VEGF-Antagonisten auf die Endothelzellen wirken (Bergers et al., 2003).

Dies sollte in weiteren Studien, z.B. in vitro oder mittels Tierversuchen, genauer untersucht werden.

4.3.2 Expression von VEGF-ab1

Die Expression und Produktion von VEGF konnte in zahlreichen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden. Dazu gehören Lymphome, Kaposi Sarkome, multifforme Glioblastome, verschiedene Adenokarzinome, Melanome und Osteosarkome (Berse et al., 1992; Weindel et al., 1992; Berkman et al., 1993; Plate et al., 1992; Yeo et al., 1993; Sulzbacher et al., 2002).

So steht mittlerweile fest, dass die Produktion von VEGF die Hauptursache für die Tumorangiogenese ist (Hanahan et Xavier, 1996; Fukuruma et al., 1998; Folkman, 1990).

In einigen Studien wurde herausgefunden, dass übermäßige VEGF-Expression in Tumorzellen einen negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat und die Überlebenszeit bei Osteosarkomen verkürzt (Sulzbacher et al., 2002; Jung et al., 2005; Charity et al., 2006). Bei unbehandelten Osteosarkomen ist eine Prädiktion von Lungenmetastasen mit Hilfe der VEGF-Expression möglich (Kaya et al., 2000).

Bei Riesenzelltumoren des Knochens konnten drei Hauptisoformen von VEGF (121 am häufigsten, 165 und 189) in spindelförmigen, stromaähnlichen Zellen, in runden, makrophagenähnlichen Zellen und osteoklastenähnlichen, vielkernigen Riesenzellen durch FISH und Immunhistochemie nachgewiesen werden (Zheng et al., 2000; Kumta et al., 2003).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass von 112 Proben 72,5% der Stromazellen keinerlei Färbung aufwiesen (Score 0), 13,8% eine leichte Färbung (Score 1) und 13,8% mittelstark (Score 2) angefärbt wurden. Eine starke Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

Lediglich 4% der Riesenzellen zeigten eine leichte VEGF-Expression (Score 1).

Eine Korrelation zwischen VEGF-Expression und Rezidiven besteht in der vorliegenden Studie nicht. Die Patienten, die ein Rezidiv aufwiesen, zeigten keine signifikante Überexpression von VEGF (0 von 24 Patienten) im Gegensatz zu Patienten ohne Rezidiv. 27,6% zeigten eine leichte oder mittelstarke Färbung.

In einer Studie von Sulzbacher et al. (2002) über die Expression von VEGF und OPN (Osteopontin) in benignen und malignen Knochentumoren konnte zum einen eine

Korrelation zwischen OPN und VEGF-Expression hergestellt werden und zum anderen ein negativer Einfluß von VEGF auf die Überlebensrate.

Therapeutisch werden vielfach Medikamente (z.B. Bevacizumab, Sunitinib) verwendet, die als neutralisierende Antikörper von VEGF bereits bei Karzinomen der Nieren, der nichtkleinzelligen Bronchien, der Mamma, der Prostata und kolorektalen Karzinomen zu längerer Überlebensdauer führten (Hurwitz et al., 2004; Yang et al., 2003; Sandler et al., 2005; Miller, 2003; Willet et al., 2004).

Die Expression von VEGF korrelierte in anderen Studien mit dem Enneking Staging-System, so dass eine Überexpression mit einem fortgeschrittenen Stadium des Tumors einhergeht, d.h. mit einer Knochendestruktion und lokalen Rezidiven (Zheng et al., 2000; Kumta et al., 2003).

Da Inhibitoren von VEGF bereits bei anderen Tumoren therapeutische Erfolge verzeichnen konnten, sollte diese Möglichkeit auch bei Riesenzelltumoren in Betracht gezogen werden. Weitere Studien sollten herausfinden, ob neu entwickelte oder bereits vorhandene monoklonale Antikörper als Angiogenesehemmstoffe, das Tumorstadium bei ossären Riesenzelltumoren verlangsamen oder aufhalten, eine Verkleinerung bewirken können oder ein progressionsfreies Überleben verlängern. Entsprechend der Studien von Folkman (1985) und Holmgren et al. (1995) tritt ab einem bestimmten Tumordurchmesser durch die entstehende Unterversorgung des Gewebes mit Blut, die Rate der neu entstehenden Tumorzellen und die Rate der absterbenden Tumorzellen in ein Gleichgewicht. Erst die Vaskularisierung erlaubt dem Tumorgewebe ohne Ischämie weiter zu wachsen und sich auszubreiten.

4.3.3 Expression von Ki-67

Das biologische Verhalten von Tumoren wird zu einem großen Anteil durch die Proliferationsaktivität beeinflusst (Scotlandi et al., 1995; Stenzel et al., 1996; Vollmer et al., 1989). Der monoklonale Antikörper Ki-67 färbt die Wachstumsfraktion in Zellen an und gibt so beispielsweise bei Tumorzellen Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors. Zusammenhänge zwischen Ki-67-Färbeindex und histologischer Differenzierung, Metastasierung und der Klinik werden in der Literatur kontrovers diskutiert, wurden jedoch bereits bei Prostata-, Mamma-, Ösophagus- und Blasenkarzinomen festgestellt (Aaltomaa et al., 1997; Isola et al., 1990; Jansen et al., 1998; Chino et al., 1998; Oosterhuis et al., 2000; Popov et al., 1997).

Mit Hilfe der vorliegenden Studie kann ein Rezidivrisiko in Zusammenhang mit Ki-67 bei RZT nicht bestätigt werden. Durch weitere Untersuchungen mit höherer Rezidivanzahl müsste die Korrelation genauer untersucht werden. Einen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Tumors und dem Proliferationsindex konnte nicht bestätigt werden.

Im Falle von Knochentumoren konnte eine Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und der Malignität bestätigt werden (Scotlandy et al., 1995; Vollmer et al., 1989). Laut einer Studie von Antal et al. (1999) ist die Expression von Ki-67 bei primären Tumoren mit Spätrezidiven und bei Rezidivtumoren höher als bei den nicht-rezidivierenden Osteoklastomen. Die Primärtumore, eingeteilt nach dem Enneking-Staging-System 1-3, zeigten einen Anstieg des Proliferationsindex und der Rezidivwahrscheinlichkeit, jedoch ohne statistische Signifikanz. Von 46 Primärtumoren zeigten die Proben im Enneking-Stadium I (latent) eine Ki-67-Expression von 7,5%, im Stadium II (aktiv) von 13% und im Stadium III (aggressiv) 14%. Die vorliegende Studie stellt den Proliferationsindex nicht in Zusammenhang mit dem Enneking-Staging-System. Hier liegt der Großteil der Proben mit 93,4% bei einem geringen Proliferationsindex von 0 bis 5%. Davon zeigen 33,3% eine Ki-67-Expression von 0%, 37% eine Expression von 2% und 23,1% von 5%. Eine stärkere Ki-67-Expression wie in der Studie von Antal et al. (1999) tritt in unserer Studie nur selten auf. 0,9% zeigen eine Expression von 7%, 4,6% eine Expression von 10% und 0,9% eine Expression von 15%. Eine nukleäre Expression von Ki-67 konnte nicht festgestellt werden. Die spindelzellige

Tumorkomponente zeigte im Mittel eine Proliferationsrate von 2,36% mit einer Standardabweichung von 2,7 und einem Maximum von 15%. Die Werte der Ki-67-Expression von Antal et al. (1999) sind auffallend höher als die Ergebnisse unserer Studie. Möglicherweise befinden sich die Tumorproben von Antal et al. allgemein in einem wesentlich stärker fortgeschrittenen Stadium.

Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass unter den von Antal (1999) untersuchten 46 Primärtumoren allein 25 sich im Enneking Stadium III für aggressives Wachstum befinden und 15 Rezidivfälle beschrieben wurden. Unter den von uns untersuchten 112 Riesenzelltumoren befinden sich lediglich 24 Rezidivfälle. Das Stadium des Riesenzelltumore ist nicht näher beschrieben und möglicherweise gering, evtl. durch frühzeitige Diagnose und Einleitung therapeutischer Schritte.

Antal et al. (1999) empfehlen bei Überschreiten der Proliferationsrate über 12% einen kürzeren Patientenrecall, da das Rezidivrisiko stark erhöht ist.

1996 untersuchten Sulh et al. 13 nichtrezidivierende und 7 rezidivierende ossäre Riesenzelltumore mit Ki-67 und CD34, um herauszufinden, ob der Proliferationsindex oder die Gefäßdichte als prognostische Marker bei diesen Tumoren herangezogen werden kann. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass weder mit Hilfe von Gefäßdichte noch Proliferationsindex Rezidive oder Metastasen abzusehen sind. In einem Fall war der Proliferationsindex eines histologisch gutartigen Primärtumors nicht signifikant niedriger als der Proliferationsindex der später entstandenen Lungenmetastase.

In einer Fallstudie von Osaka et al. 2004 wurden ebenfalls 5 seltene Fälle von Lungenmetastasen bei histologisch benignen Riesenzelltumoren des Knochens auf Ki-67-Expression untersucht. Zwei Fälle mit letalem Ausgang wiesen sowohl im Primärtumor als auch im Rezidivgewebe und in den Metastasen eine Ki-67-Expression von 9 bis 11,5% auf. In den restlichen drei Fällen lag die Anfärbung von Ki-67 positiven Zellen lediglich bei 4,2 bis 6,2%. Dies bestätigt wiederum die Notwendigkeit der Nutzung von Ki-67 als Marker für den aggressiven Typ von ossären Riesenzelltumoren.

4.3.4 Expression von Bcl-2

Bcl-2 wurde ursprünglich als ein bei B-Zell-Lymphomen von Chromosom 18 auf Chromosom 14 transloziertes Proto-Onkogen beschrieben, das eine Inhibition des programmierten Zelltodes, der Apoptose, verursacht (Tsujimoto et Shimizu, 2000). Bcl-

2 bildet mit weiteren homologen Proteinen die Bcl-2-Familie, deren Mitglieder zum Teil die Apoptose hemmen (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w) und zum Teil stimulieren (Bax, Bad). Die Mechanismen der Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Familie sind noch nicht vollständig geklärt (Antonsson et Martinou, 2000).

87,2% (95 Zellen) der Tumorzellen in unserer Studie zeigten im Stroma keinerlei Bcl-2-Expression (Score 0). Lediglich 9,2% (10 Zellen) waren gering (Score 1) und 3,7% (4 Zellen) mittelstark (Score 2) angefärbt. Eine Korrelation zwischen klinischen Werten und der Expression von Bcl-2 konnte nicht festgestellt werden.

Somit bestätigt die vorliegende Studie den prognostischen Wert von Bcl-2 in Bezug auf die Rezidivierung von Riesenzelltumoren des Knochens nicht. Da nur zwei Metastasierungsfälle und kein Fall mit maligner Entartung untersucht wurden, kann diesbezüglich keine endgültige Aussage getroffen werden. Hier gilt es dies anhand weiterer Fälle zu prüfen.

Vergleichbare Studien über die Expression von Bcl-2 und ossäre Riesenzelltumore sind in der Literatur nicht zu finden.

Bcl-2, als antiapoptotisches, körpereigenes Protein, ist bei vielen Krebserkrankungen überexprimiert und steht im Zusammenhang mit der Tumorbildung, -entwicklung und Therapieresistenz (Oltersdorf et al., 2005). In einer Reihe von Tumoren konnte eine Überexpression von Bcl-2 nachgewiesen werden (Reed et Albino, 1999). Beim kutanen malignen Melanom (Saenz-Santamaria, 1994; Collins et White, 1995; Tang et al., 1998) und bei Leukämie (Tsujiimoto et al., 1985; Vaux et al., 1988) wurde eine starke Bcl-2-Anfärbbarkeit beschrieben. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz von Bcl-2 gibt es unterschiedliche Meinungen in der Literatur. Bei uvealen Melanomen konnte keine Korrelation zwischen Expression und Prognose hergestellt werden (Mooy et al., 1995). Dagegen war die Überexpression bei Kolon- (Öfner et al., 1995) und bei Bronchialkarzinomen (Fontanini et al., 1995) ein günstiger und bei Prostatakarzinomen (Matsushima et al., 1996), follikulären B-Zell-Lymphom, multiplen Myelom, CLL und ALL ein ungünstiger Faktor.

Eine Chemotherapieresistenz bei erhöhter Bcl-2-Expression wurde sowohl bei Hodgkin-Lymphomen als auch bei Ovarialkarzinomen beschrieben (Smolewski et al., 2000; Mano et al., 1999).

2005 testeten Oltersdorff et al. ABT-737, einen kleinen molekularen Inhibitor für Bcl-2, Bcl-xl und Bcl-w. Dieser initiiert nicht direkt einen apoptotischen Prozess, sondern steigert die Wirkung von tödlichen Signalen und entwickelt Zytotoxizität in Verbindung mit Chemotherapeutika und Bestrahlung. Im Tierversuch mit Lymphomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen kam es zu längerer Überlebensrate, Rückbildung von bestehenden Tumoren und Ausheilung bei einem hohen Anteil der Mäuse.

4.4 Metastasierung und Rezidivrate

Die Ansicht, dass der ossäre Riesenzelltumor ausschließlich gutartig ist (Nelaton, 1860; Gross, 1879; Bloodgood, 1923), ist längst nicht mehr zu halten. Sein Wachstumsverhalten kann nicht als benigne angesehen werden, sondern beschreibt einen progressiven, potentiell malignen und in 20 bis 40% der Fälle rezidivierenden Prozess. Die Entartungsrate beträgt 5 bis 10% und Metastasen treten -ohne eine offensichtliche Malignität des Tumors- vereinzelt auf (Schajowicz, 1994; Finch et al., 1926, Dyke, 1931; Murphy et al., 1956; Jewell et al., 1964; Spjut et al., 1971; Pan et al., 1964; Lasser et al., 1957; Gresen et al., 1973; Maloney et al., 1983; Vanel et al., 1983; Bertoni et al., 1985; Bertoni et al., 1988; Wray et al., 1990).

Aus diesem Grund wurde der Riesenzelltumor des Knochens auch als „niedrig-gradig maligner neoplastischer Tumor“ (Mirra, 1980) oder als „semimaligne“ (Uehlinger, 1976) bezeichnet.

In der vorliegenden Studie war die Metastasierungsrate sehr gering bei 1,8%, d.h. nur 2 von 112 Patienten waren betroffen. Diese beiden Fälle unterschieden sich nicht von den anderen Patientenfällen. Es gab auch keine bedeutende Überexpression der untersuchten Faktoren bei diesen Fällen. Eine Korrelation der untersuchten immunhistochemischen Daten mit den klinischen Werten fehlt. Aus diesem Grund ist auch hier im Speziellen keine prognostische Wertung zur Metastasierung dieser Fälle möglich. Die Analyse der beiden Ausnahmen unserer Studie von Riesenzelltumoren mit Metastasen entspricht der Meinung der meisten Autoren (Spjut et al., 1971; Goldenberg et al., 1970; McGrath 1972; Larsson et al., 1975; McInerney et Middlemis, 1978), dass aggressive oder offenkundig maligne RZT histologisch nicht auf den ersten Blick von den gutartigen differenzierbar sind.

Im Gegensatz zu unserer Studie wird in Studien wie denen von Meary et al. (1975) und Spjut et al. (1971) behauptet, dass in nahezu 10% der Fälle maligne Erscheinungen auftreten. Bei uns trat keine maligne Entartung auf. Nur in zwei Fällen waren Metastasen vorhanden. Zur Diskussion steht, ob in den obengenannten Studien eine falsche Diagnose der Grund für ein ungewöhnlich gehäuftes Metastasierungsmuster bei Riesenzelltumoren war. Eventuell war der RZT eigentlich ein Osteosarkom oder ein fibröses Histiozytom (Unni, 1995).

Die Rezidivrate betrug in unserer Studie 21% (n=112, 24 Patienten). In unserer Studie wurde in 51 von insgesamt 78 Fällen PMMA als unmittelbare Defektdeckung eingesetzt. Der Rest (34 Patienten) der 112 Patienten war aus den Akten nicht ersichtlich. Wir haben dadurch in unserer Studie eine deutliche Reduzierung der Rezidivrate festgestellt ebenso wie die Autoren O'Donnell et al. (1994). Sie berichten über durchschnittlich 8,4% Rezidivrate (Bereich 0-29%, n= 270, >2 Jahre postoperativ) nach Kürettage mit Zementauffüllung, wohingegen eine alleinige intraläsionale Kürettage ohne PMMA eine durchschnittliche Rate von 37% (Bereich 7-47%, n = 553, >2 Jahre postoperativ) hat. Ein ähnliches Ergebnis liegt auch nach unseren Untersuchungen vor. Eine durchschnittliche Rezidivrate von 44,4% bei den 27 Patienten, die ohne PMMA behandelt wurden. Bei den aus den Akten ersichtlichen 51 Patienten, die mit PMMA behandelt wurden hatten 23,5% ein Rezidiv. Insgesamt hatten von den 112 Patienten 21% ein Rezidiv. Ob letztlich das Monomer oder die Polymerisationswärme entscheidend zum Erfolg beiträgt, ist nicht geklärt (Charnley, 1970; Hovy et al., 1990; Linder et al., 1976; Willert et al., 1979).

4.5 Schlussfolgerung

Ziel dieser Studie war es anhand der Untersuchung von 112 ossären Riesenzelltumoren auf Ki-67, VEGF-ab1, PDGFR- β und Bcl-2 Tumormarker zu finden, die eine prognostische Relevanz bezüglich Rezidivierung, Metastasierung oder maligner Entartung aufweisen und/oder mögliche Kandidaten zielgerichteter molekularer Therapien wären.

Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen klinischen Daten und den analysierten Proteinexpressionen festgestellt werden.

Bcl-2 scheint aufgrund der fehlenden Expression keine Angriffsmöglichkeit für zielgerichtete molekulare Therapien zu sein.

Ki-67 ist -nach unserer Studie zu urteilen- in Bezug auf ossäre Riesenzelltumore kein prognostischer Faktor.

Die Expression von PDGFR- β und VEGF spricht für eine mögliche Wirksamkeit von Angiogenesehemmstoffen. Dies gilt es, in weiteren Studien mittels in vitro- und in vivo-Versuchen genauer zu untersuchen.

Aus Mangel an vergleichbaren Studien über Riesenzelltumore sind für zukünftige Studien weitere ausführliche Analysen sinnvoll, um unser Ergebnis zu bestätigen oder zu negieren. Da das Ergebnis der vorliegenden Studie in Bezug auf die Prognoseprädiktion gescheitert scheint, ist zusätzlich die Suche nach anderen Markern gefordert. Das Wissen über die Wachstumsregulation hat in den letzten Jahren rapide zugenommen und so ist es wahrscheinlich, dass dieses Wissen in Zukunft helfen wird, neue und bessere histologische Tumormarker zu etablieren.

5 Literaturverzeichnis

Aaltomaa, S., Lipponen, P., Vesalainen, S., Ala-Opas, M., Eskelinen, M., Syrjanen, K. (1997) Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur Urol* 32:410-415

Andersen, C.L., Monni, O., Wagner, U., Kononen, J., Barlund, M., Bucher, C., Haas, P., Nocito, A., Bissig, H., Sauter, G., Kallioniemi, A. (2002) High-throughput copy number analysis of 17q23 in 3520 tissue specimens by fluorescence in situ hybridisation to tissue microarrays. *Am J Pathol* 161:73-79

Antal, I., Sapi, Z., Szendrői, M. (1999) The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant-cell tumor of bone. *Int Orthop* 23(6):315-9

Antonsson, B., Martinou, J.C. (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256:50-57

Aubin, J.E., Bonneleye, E. (2000) Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 11:905-913

Barlund, M., Forzan, F., Kononen, J., Bubendorf, I., Chen, Y., Bittner, M.L., Torhorst, J., Haas, P., Bucher, C., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A. (2000) Detecting activation of ribosomal protein S6 Kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 92:1252-1259

Battifora, H. (1986) The multitumor (sausage) block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*, 55:244-8

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., Hanahan, D. (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111(9):1287-95

Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C.H., Alitalo, K., Eriksson, U. (2000) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF-receptor. *Nat Cell Biol* 3(5):512-6

Berkman, R., Merrill, M., Reinhold, W.C. et al. (1993) Expression of the Vascular vascularisation factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 91:153-159

Berse, B., Brown, L., Van de Water, L. et al. (1992) Vascular vascularisation factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell* 3:211-220

Bertoni, F., Bacchini, P., Staals, E.L. (2003) Malignancy in giant cell tumor of bone. *Cancer* 97: 2520-2529

- Bertoni, F., Present, D., Enneking, W.F. (1985) Giant-cell tumor of bone with pulmonary metastases. *J Bone Joint Surg [Am]* 8:890-900
- Bertoni, F., Present, D., Enneking, W.F. (1985) Giant-cell tumor of bone with pulmonary metastases. *J Bone Joint Surg [Am]* 66:269-274
- Bertoni, F., Present, D.A., Sudanese, A. et al. (1988) Giant-cell tumor of bone with pulmonary metastases: six case reports and review of the literature. *Clin Orthop* 237:275-285
- Bishayee, S., Ross, A.H., Worner, R., Scher, C.D. (1986) Purified human platelet-derived growth factor receptor has ligand-stimulated tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(18):6756-60
- Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J. et al. (2000) Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancer correlates with tumor progression. *Cancer Res* 60:6111-6115
- Bloodgood, J.C. (1923) Benign giant-cell tumor of bone: its diagnosis and conservative treatment. *Am J Surg* 37:105-116
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-65
- Bozzi, F., Tamborini, E., Negri, T., Pastore, E., Ferrarri, A., Luksch, R., Casanova, M., Pierotti, M.A., Bellani, F.F., Pilotti, S. (2007) Evidence for activation of KIT, PDGFRalpha, and PDGFRbeta receptors in the Ewing sarcoma family tumors. *Cancer* Apr 15;109(8):1638-45
- Bubendorf, L., Kolmer, M., Kononen, J., Koivisto, P., Mouses, S., Chen, Y., Mahlamaki, E., Schraml, P., Moch, H., Willi, N., Elkahloun, A.G., Pretlow, T.G., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P. (1999a) Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst* 91:1758-1764
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., Sauter, G. (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195:72-79
- Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., et al. (2000) Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:139-45
- Campanacci, M., Baldini, N., Boriani, S., et al. (1987) Giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am* 69: 106-114
- Campanacci, M. (1990) Bone and soft tissue tumors. *Springer*, Vienna New York

- Carroll, M., Tomasson, M.H., Barker, G.F., Golub, T.R., Gilliland, D.G. (1996) The TEL/platelet-derived growth-factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14845-50
- Caudell, J.J., Ballo, M.T., Zagars, G.K. et al. (2003) Radiotherapy
Cheng, Y.Y., Huang, L., Lee, K.M., et al. (2004) Bisphosphonates induce apoptosis of stromal tumor cells in giant cell tumor of bone. *Calcif Tissue Int* 75:71-77
- Charity, R.M., Foukas, A.F., Deshmukh, N.S., Grimer, R.J. (2006) Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 448:193-8
- Charnley, J. (1970) Acrylic cement in orthopaedic surgery. Livingstone, Edinburgh London
- Chino, O., Makuuchi, H., Shimada, H. et al. (1998) Assessment of the proliferative activity of superficial esophageal carcinoma using MIB-1 immunostaining for the Ki-67-Antigen. *J Surg Oncol* 67:18-24
- Collins, K.A., White, W.L. (1995) Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 17:429-438
- Cools, J., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Stover, E.H., Legare, R.D., Cortes, J., Kutok, J., Clark, J., Galinsky, I., Griffin, J.D., Cross, N.C., Tefferi, A., Malone, J., Alam, R., Schrier, S.L., Schmid, J., Rose, M., Vandenberghe, P., Verhoef, G., Boogaerts, M., Wlodarska, I., Kantarjian, M., Marynen, P., Coutre, S.E., Stone, R., Gilliland, D.G. (2003) A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood* 101(12):4714-6
- Corless, C.L., Fletcher, J.A., Heinrich, M.C. (2004) *Biology of gastrointestinal tumors.* J Clin Oncol 22:3813-25
- Dahlin, D.C. (1978) Bone tumors, 3rd edn. Charles C. Thomas, Springfield, IL
- Dahlin, D.C., Unni, K.K. (1986) Bone tumors: general aspects and data on 8542 cases. Charles C. Thomas, Springfield, IL
- De Risi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A., Trent, J.M. (1996) Use of cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457-460
- Do, I., Araujo, E.S., Kalli, R.K., Bacchini, P., Bertoni, F., Unni, K.K., Park, Y.K. (2007) Protein expression of KIT and gene mutation of c-kit and PDGFRs in Ewing sarcomas. *Pathol Res Pract* 203(3):127-34. Epub 2007 Feb 12

- Dorfman, H.D., Czerniak, B. (1998) Vascular lesions. In: *Bone Tumor*. Mosby: St. Louis, pp.729-814
- Dyke, S.C. (1931) Metastases of the „benign“ giant cell tumor of bone (osteoclastoma). *J Pathol Bacteriol* 34:259-263
- Eckardt, J.J., Grogan, T.J. (1986) Giant cell tumor of bone. *Clin Orthop Relat Res* Mar;(204): 45-58
- Enneking, W.F. (1986) A system of staging musculoskeletal neoplasms.
- Ewing, J. (1922) A review and classification of bone sarcomas. *Arch Surg* 4:485-533
- Faisham, W.I., Zulmi, W., Halim, A.S., Biwal, B.M., Mutum, S.S., Ezane, A.M. (2006) Aggressive giant cell tumor of bone. *Singapore Med J* 47(8):679-683
- FDA (no authors listed); (2006) New targeted therapy for rare stomach, kidney cancers. *FDA Consum* 40(3):5
- Feigenberg, S.J., Marcus, R.B. Jr, Zlotecki, R.A., et al. (2003) Radiation therapy for giant cell tumors of bone. *Clin Orthop*. 207-216
- Ferrara, N., Henzel, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 15;161(2):851-8.
- Ferrara N., Davis-Smith, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25
- Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25(4):581-611.
- Finch, G.F., Gleave, H.H. (1926) A case of osteoclastoma (myeloid sarcoma, benign giant tumor) with pulmonary metastases. *J Pathol Bacteriol* 29:339
- Fletcher, J.A. (2004) Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins. *Semin Oncol* 31(2Suppl6):4-11
- Folkman, J. (1985) Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43:175-203
- Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6
- Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, M., Angeletti, C.A., Basolo, F., Bevilacqua, G. (1995) Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 71:1003-1007
- Fukurama, D.,Xavier,R., Sugiura, T. et al. (1998) Tumor induction of VEGF promote activity in stromal cells. *Cell* 94:715-725

Gamberi, G., Benassa, M.S., Pompetti, F., et al. (2000) Presence and expression of the Simian Virus-40 genome in human giant cell tumor of bone. *Genes Chromosom Cancer* 28:23-30

Gamberi, G., Benassi, M.S., Ragazzini, P. et al. (2004) Proteases and interleukin-6 gene analysis in 92 giant cell tumor of bone. *Ann Oncol.* 15:498-503

Gamberi, G., Serra, M., Ragazzini, P., et al. (2003) Identifications of markers of possibile prognostic value in 57 giant cell tumors of bone. *Oncol Reports* 10:351-356

Gelb, A.B., Sudilovsky, D., Wu, C.D. et al. (1997) Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 80:1768-75

Gerdes, J., Dallenbach, F., Lennert, K. et al. (1983) Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2:365-71

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H. et al. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5

Goidanich, I.F. (1956) I tumori primitivi dell'osso. *Atti 41st Congr Soc Ital Ortop Traumatol*

Goldenberg, R.R., Campbell, C.J., Bonifiglio, M. (1970) Giant-Cell tumor of bone: an analysis of 218 cases. *J Bone Joint Surg [Am]* 52:619-663

Goldring, S.R., Schiller, A.L., Mankin, H.J., Dayer, J.M., Krane, S.M. (1986) Characterization of cells from human giant cell tumors of bone. *Clin Orthop Relat Res* Mar;(204):59-75

Greco, A., Fusetti, L., Villa, R., Sozzi, G., Minoletti, F., Mauri, P., Pierotti, M.A. (1998) Transforming activity of the chimeric sequence formed by the fusion of collagen gene COL1A1 and the platelet derived growth factor b-chain gene in dermatofibrosarcoma protuberans. *Oncogene* Sep 10;17(10):1313-9

Greco, A., Roccato, E., Miranda, C., Cleris, L., Formalli, F., Pierotti, M.A. (1997) Growth-inhibitory effect of STI571 on cells transformed by the COL1A1/PDGFB rearrangement. *Int J Cancer* 92(3):354-60

Gresen, A.A., Dahlin, D.C., Peterson, L.F.A., Payne, W.S. (1973) „Benign“ giant cell tumor of bone metastazing to lung: report of case. *Ann Thorac Surg* 16:531-535

Gross, S.A. (1879) Sarcoma of the long bone: based upon a study of 175 cases. *Am J Med Sci* 155:2-57

- Hanahan, D., Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364
- Hantschmann, P., Lampe, B., Beysiegel, S. et al. (2000) Tumor proliferation in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int Gynecol Pathol* 19:361-8
- Heldin, C.H., Westermark, B. (1999) Mechanism of action in vivo role of platelet derived growth factor. *Physiol Rev* 79(4):1283-316
- Hofele, C., Joos, S., Flechtenmacher, C., Bosch, X.F., Lichter, P., Mühling, J., Freier, K. (2002) Möglichkeiten und Chancen der Gewebechiptechnologie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 6:394-401
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J. (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1:149-53
- Hoos, A., Cordon-Cardo, C. (2001a) Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: Opportunities and Limitations. *Lab Invest*, 81:1331-1338
- Horvath, L., Henshall, S. (2001) The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 33:125-129
- Hotfilder, M., Lanvers, C., Jurgens, H., Boos, J., Vormoor, J. (2002) c-Kit-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemother Pharmacol* 50(2):167-9
- Hovy, L., Wahlig, H. (1990) Die Wärmeentwicklung von Knochenzement am Zement-Knochen-Interface. *Orthop Mitteilungen* 3:169
- Hu, Q. (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3-kinase. *Science* 268(5207):100-2
- Huang, L., Xu, J., Wood, D.J., et al. (2000) Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in giant cell tumor of bone. Possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol* 156:761-767
- Hudson, T.M., Schiebler, M., Springfield, D.S., Enneking, W.F., Hawkins, I.F., Spanier, S.S. (1984) Radiology of Giant Cell Tumor of Bone: Computed Tomography, Arthro-Tomography, and Scintigraphy. *Skeletal Radiol* 11:85-95
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335-42

- Hutter, R.V.P., Worcester, J.N. Jr., Francis, K.C., Foote, F.W. Jr., Stewart, F.W. (1962) Benign and malignant giant cell tumors of bone: a clinicopathological analysis of the natural history of the disease. *Cancer* 15:653-690
- Huvos, A.G. (1991) Bone tumors: diagnosis, treatment, prognosis. W.B. Saunders, Philadelphia
- Isola, J.J., Helin, H.J., Helle, M.J. et al. (1990) Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow, cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer* 65:1180-4
- Jaffe, H.L., Lichtenstein, L., Portis, R.B. (1940) Giant cell tumor of bone: its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch Pathol* 30:993-1031
- Jaffe, H.L. (1953b) Giant cell tumor (osteoclastoma) of bones: its pathology delimitation and the inherent clinical implications. *Ann R Coll Surg Engl* 13:343-355
- Jaffe, H.L. (1958) Tumors and tumorous conditions of the bones and joints. *Lea & Febiger*, Philadelphia
- Jansen, R.L., Hupperets, P.S., Arends, J.W., Joosten-Achjane, S.R., Volovics, A., Schouten, H.C., Hillen, H.F. (1998) MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer* 78:460-465
- Jewell, J.H., Bush, L.F. (1964) „Benign“ giant cell tumor of bone with a solitary pulmonary metastasis: a case report. *J Bone Joint Surg [Am]* 56:848-852
- John, H., Birnstiel, M., Jones, K. (1969) RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 223:582-587
- Jung, S.T., Moon, E.S., Seo, H.Y., Kim, J.S., Kim, G.J., Kim, Y.K. (2005) Expression and significance of TGF-beta isoform and VEGF in osteosarcoma. *Orthopedics* 28(8):755-60
- Kallioniemi, O.P., Wagner, U., Kononen, J., Sauter, G. (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10:657-662
- Karkkainen, M.J., Petrova, T.V. (2000) Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19:5598-605
- Kawaguchi, N., Noda, M. (2000) MITF is expressed in osteoclast progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 260:284-291
- Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., Akatsuka, T., Kawaguchi, S., Nagoya, S., Shindoh, M., Higashino, F., Mezawa, F., Okada, F., Ishii, S. (2000) Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6:572-577

- Kazlauskas, A., Durden, D.L., Cooper, J.A. (1991) Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul* 2(6):413-25
- Kim, H.R., Upadhyay, S., Li, G., Palmer, K.C., Deuel, T.F. (1995) platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 10;92(21):9500-4
- Kong, Y.Y., Penninger, J.M. (2000) Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol* 35:947-956
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844-847
- Kovalenko, M.V., Kazlauskas, K. (2003) Signaling by the platelet derived growth factor receptor family. Handbook of cell signalling, ed. R.A., Bradshaw and E.A. Dennis. 2003, Amsterdam: Elsevier. 297-404
- Kumta, S.M., Huang, L., Cheng, Y.Y., Chow, L.T., Lee, K.M., Zheng, M.H. (2003) Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. *Life Sci* Aug 1; 73(11):1427-36
- Lagonigro, M.S., Tamborini, E., Negri, T., Staurengo, S., Dagrada, G.P., Miselli, F., Gabanti, E., Greco, A., Casali, P.G., Carbone, A., Pierotti, M.A., Pilotti, S. (2006) PDGFR α , PDGFR β and KIT expression/ activation in conventional chondrosarcoma. *J Pathol* Apr;208(5):615-23
- Larsson, S.E., Lorentzon, R., Boquist, L. (1975) Giant cell tumor of bone: a demographic, clinical and histopathological study of all cases recorded in the Swedish Cancer Registry for the years 1958 through 1968. *J Bone Joint Surg [Am]* 57:167-173
- Lasser, E.C., Tetwsky, H. (1957) Metastazing giant cell tumors:report of an unusual case with indolent bone and pulmunory metastases. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 78:804-811
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secret angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-9
- Leung, P.C. (1983) Reconstruction of a large femoral defect using a vascularized iliac crest graft. *J Bone Surg* 65A:1179
- Li, X., Eriksson, U. (2003) Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Adv Drug Deliv Rev. Cytokine Growth Factor Rev* 14(2):91-8
- Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C.H., Alitalo, K.,

- Ostman, A., Eriksson, U. (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2(5):302-9
- Lindeman, J.H., Hanemaaijer, R., Mulder, A. et al. (2004) Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. *Am J Pathol* 165:593-600
- Linder, L.G., Harthorn, L., Kullberg, L. (1976) Monomer leakage from polymerizing acrylic bone cement. *Clin Orthop* 119:242-249
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridisation to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14:1675-1680
- McDonald, D., Sim, F.H., McLeod, R.A. et al. (1986) Giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg* 68A:235-242
- Malek, F., Krueger, P., Hatmi, Z.N., Malayeri, A.A., Faezipour, H., O'Donnell, R.J., (2006) Local control of long bone giant cell tumor using curettage, burring and bone grafting without adjuvant therapy. *Int Orthop* DOI 10.1007/s00264-0060146-3
- Maloney, W.G., Vaughan, L.M., Jones, M.H., Ross, J. (1983) Benign metastazing giant cell tumor of bone. Report of three cases and review of literature. *Clin Orthop* 243:208-215
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. *J Exp Med* Apr20;187(8):1261-71
- Matsui, T., Heideran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J., Aaronson, S. (1989) Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* Feb 10;243(4892):800-4
- Matsushima, H., Hosaka, Y., Suzuki, M., Mizutani, T., Ishizuka, H., Kawabe, K. (1996) Bcl-2 expression on prostate cancer and ist relationship to cell cycle and prognosis. *Int J Urol* 3:113-117
- McDonald, D., Sim, F.H., McLeod, R.A. et al.(1986) Giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg* 68A:235-242
- McGary, E.C., Weber, K., Mills, L., Doucet, M., Lewis, V., Lev, D-C., Fidler, I.J., Bar-Eli, M. (2002) Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* Nov;8(11):3684-91
- Mc Grath , P.M. (1972) Giant cell tumor of bone: an analysis of 52 cases. *J Bone Joint Surg [Br]* 52:216-219

- McInerney, D.P., Middlemis, J.H. (1978) Giant cell tumors of bone. *Skeletal Radiol* 2:195-204
- Meary, R., d'Àubergine, M.R., Tomeno, B., Sedel, L. (1975) Tumeurs a cellules geantes. 85 observations suivies. *Revue de Chir. Orthopedique* 61:391-413
- Merchant, M.S., Woo, C.W., Mackall, C.L., Thiele, C.J. (2002) Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 94(22):1673-9
- Meyerding, H.W. (1941) Benign and malignant giant cell tumor of bone: diagnosis and results of treatment. *JAMA* 117:1849-1855
- Miller, K.D. (2003) E 2100: a phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel/bevacizumab for metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3:421-2
- Mirra, J.M. (1980) Bone tumors: diagnosis and treatment. J.B. Lippincott, Philadelphia
- Mirra, J.M. (1989) *Bone tumors. Clinical, radiological, and pathological correlations.* Lea & Febiger, Philadelphia
- Miszczyk, L., Wydmanski, J., Spindel, J. (2001) Efficacy of radiotherapy for giant cell tumor of bone: given either postoperatively or sole treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49:1239-1242
- Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., Mirlacher, M., Kononen, J., Gasser, T., Mihatsch, M.J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154:981-986
- Moch, H., Kononen, J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (2001) Tissue Microarrays: What will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8:14-20
- Mooy, C.M., Luyten, G.P.M., de Jong, P.T.V.M., Luider, T.M., Stijnen, T., van de Ham, F., van Vroonhoven, C.C.J., Bosman, F.T. (1995) Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am J Pathol* 147:1097-1104
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomzcak, P., et al. (2006) Phase III randomized trial of sunitinib malta (SU11248) versus interferon-alfa (IFN-a) as first-line systemic therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol*; ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 24(18s): abstract LBA3
- Mucci, N.R., Akdas, G., Manely, S., Rubin, M.A. (2000) Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high-throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 31:406-414

- Murphy, W.R., Ackermann, L.v. (1956) Benign and malignant giant cell tumor of bone. *Cancer* 9:317-339
- Nakashima, H., Sugiura, h., Nishida, Y. et al. (2003) Stimulated type I collagen turnover in patients with giant cell tumor of bone. *Calcif Tissue Int* 73:5-8
- Nelaton, E. (1860) D'une nouvelle espèce de tumeurs benignes des os, ou tumeurs a myeloplaxes. *Delahaye, Paris*
- Nocito, A., Kononen, J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (2001) Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 94:1-5
- Oda, Y., Wehrmann, B., Radig, K., Walter, H., Röse, I., Neumann, W., Roessner, A. (1995) Expression of growth factors and their receptors in human osteosarcomas. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and their receptors: its correlation with proliferating activities and p53 expression. *Gen Diagn Pathol* Oct;141(2):97-103
- O'Donnell, R.J., Springfield, D.S., Motwani, H.K., Ready, J.E., Gebhardt, M.C., Mankin, H.J. (1994) Recurrence of giant-cell tumors of the long bones after curettage and packing with cement. *J Bone Joint Surg [Am]* 76:1827-1833
- Öfner, D., Riehemann, K., Maier, H., Riedmann, B., Nehoda, H., Totsch, M., Bocker, W., Jasani, B., Schmid, K.W. (1995) Immunohistochemical detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 72:981-985
- Olivera, P., Perez, E., Ortega, A., et al. (2002) Estrogen receptor expression in giant cell tumors of bone. *Hum Pathol* 33:165-169
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W., Rosenberg, S.H. (2005) An inhibitor of Bcl-family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* Jun 2;435(7042):677-81. *Epub* May 15
- Oosterhuis, J.W., Schapers, R.F., Janssen-Heijnen, M.J., Smeets, A.W., Pauwels, R.P. (2000) MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 1;88(11):2598-605
- Osaka, S., Sugita, H., Osaka, E., Yoshida, Y., Ryu, J., Hemmi, A., Suzuki, K. (2004) Clinical and immunohistochemical characteristics of benign giant cell tumour of bone with pulmonary metastases: case series. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 12(1):55-62

- Packeisen, J., Buerger, H., Krech, R., Boecker, W. (2002) Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* Aug; 55(8):613-615
- Pan, P., Dahlin, D.C., Lipscomb, P.R., Bernatz, P.E. (1964) „Benign“ giant cell tumor of bone of the radius with pulmonary metastasis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 39:334-349
- Pardue, M.L., Gall, J.G. (1969) Molecular hybridisation of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600-604
- Peison, B., Feigenbaum, J. (1976) Metaphysical giant-cell tumor in a girl of 14. *Radiologie* 118:145-146
- Picci, P., Manfrini, M., Zucchi, V. et al. (1983) Giant-cell tumor of bone in skeletally immature patients. *J Bone Joint Surg [Am]* 65:486-490
- Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C.H., Ostman, A. (2003) PDGFreceptors as a cancer drug targets. *Cancer Cell* 3(5):439-43
- Pingsmann, A., Müller, R.T. (1997) Process and outcome quality in giant cell tumor in relation to surgical management. *Unfallchirurg* 100(7):547-551
- Plate, K., Breier, G., Weich, H. et al. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845-848
- Present, D.A., Bertoni, F., Springfield, D. et al. (1986) Giant cell tumor of bone with pulmonar and lymph metastases: a case report. *Clin Orthop* 209:286-291
- Poon, R.T., Fan, S.T., Wong, J. (2001) Clinical implications of circulating angiogenic factor in cancer patients. *J Clin Oncol* 19:1207-25
- Popov, Z., Hoznek, A., Colombel, M. et al. (1997) The prognostic value of p 53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 80:1472-81
- Reed, J.A., Albino, A.P. (1999) Update of diagnostic and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 17:631-643
- Reichardt, P., Pink, D., Hohenberger, P. (2002) Paradigmenwechsel in der Therapie gastrointestinaler Stromatumoren (GIST). *Der Onkologe* 8(4):378-384
- Robinson, D.R., Wu, Y.M., Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19:5548-57
- Robinson, D., Segal, M., Nevo, Z. (2003) Giant cell tumor of bone. The role of fibroblast growth factor 3 positive mesenchymal stem cells in its pathogenesis. *Pathobiology* 75:71-77

- Rock, M.G., Pritchard, D.J., Unni, K.K. (1984) Metastases from histologically benign giant cell tumor of bone, *J Bone Joint Surg [Am]* 66: 269-274
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L. (1974) A platelet-dependent, serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(4):1207-10
- Roux, S., Amazit, L., Meduri, G., et al. (2002) RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone. *Am J Clin Pathol* 117:210-216
- Saenz-Santamaria, M.C., Reed, J.A., McNutt, N.S., Shea, C.R. (1994) Immunohistochemical expression of Bcl-2 in melanomas and intradermal nevi. *J Cutan Pathol* 21:393-397
- Saiz, P., Virkus, W., Piasecki, P., et al. (2004) Results of giant cell tumor of bone treated with intralesional excision. *Clin Orthop Related Res.* 221-226
- Salzer-Kuntschik, M. (1998) Differential diagnosis of giant cell tumor of bone. *Verh Dtsch Ges Path* 82:154-159
- Sandler, A.B., Gray, R., Brahmer, L., et al. (2005) Randomized phase II/III Trial of pemetaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC # 704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial- E4599. *J Clin Oncol*; ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 23(16S):abstract 4
- Schajowicz, F. (1994) Giant-Cell Tumor (Osteoclastoma). Tumors and Tumorlike Lesions of Bone. *Springer: Berlin-Heidelberg-New York*
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA. *Science* 270:467-470
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., Davis, R.W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10614-10619
- Schraml, P., Kononen, J., Bubendorf, L., Moch, H., Bissig, H., Nocito, A., Mihatsch, M.J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5:1966-1975
- Scotlandi, K., Manara, M.C., Strammiello, R., Landuzzi, L., Benini, S., Perdichizzi, S., Serra, M., Astolfi, A., Nicoletti, G., Lollini, P.L., Bertoni, F., Nanni, P., Picci, P. (2003) C-Kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol* 21 (10):1952-60

Scotlandi, K., Serra, M., Manara, M.C., Maurici, D., Benini, S., Nini, G., Campanacci, M., Baldini, N. (1995) Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumors. *Cancer* 75:806-814

Sherman, M., Fabricius, R. (1961) Giant cell tumor in metaphysis in a child. Report of an unusual case. *J Bone Joint Surg [Am]* 43:1225-1229

Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistological staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-8

Shimizu, A., O'Brien, K.P., Sjoblom, T., Pietras, K., Buchdunger, E., Collins, V.P., Heldin, C.H., Dumanski, J.P., Ostman, A. (1999) The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type I α 1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. *Cancer Res* 59(15):3719-23

Sjoblom, T., Shimizu, A., O'Brien, K.P., Pietras, K., Dal Cin, P., Buchdunger, E., Dumanski, J.P., Ostman, A., Heldin, C.H. (2001) *Cancer Res* Aug 1;61(15):5778-83

Skacel, M., Skilton, B., Pettay, J.D., Tubbs, R.R. (2002) Tissue microarrays: A powerful tool for High Throughput Analysis of Clinical Specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10:1-6

Spjut, H.J., Dorfmann, H.D., Fechner, R.E., Ackermann, L.V. (1971) Tumors of bone and cartilage. Atlas of tumor pathology, 2nd series, Fasc5. *Armed Forces Institute of Pathology*, Washington, DC

Spyro, M., Kallioniemi, A., Kauraniemi, P., Elkahlon, A., Kallioniemi, O.P. (2001) Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. *Curr Opin Chem Biol* 6:97-101

Stacey, G.S., Peabody, T.D., Dixon, L.B. (2003) Mimics on radiography of giant cell tumor of bone. *AJR Am J Roentgenol.* 181:1583-1589

Stenzel, I., Posl, M., Ritzel, H., Hentz, M., Werner, M., Delling, G. (1996) Cell proliferation in bone tumors. Immunohistologic study of Ki-67 protein expression. *Pathology* 17:56-62

Stewart, M.J. (1914) Observation on myeloid sarcoma with an analysis of 50 cases. *Lancet* II: 1236-1242

Su, Y.P., Chen, W.M., Chen, T.H. (2004) Giant-cell tumor of bone : analysis of 87 cases. *Int Orthop.* 28 :239-243

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., et al. (1999) A new member of osteoclast differentiation and function by new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357

- Sulh, M.A., Greco, M.A., Jiang, T., Goswami, S.B., Present, D., Steiner, G. (1996) Proliferation index and vascular density of giant cell tumors of bone: are they prognostic markers? *Cancer*. May 15;77(10):2044-51
- Sun, L., Liang, C., Shirazian, S., et al. (2003) Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 46:1116-9
- Takahashi, N., Udagawa, N., Suda, T. (1999) A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:449-455
- Tallquist, M., Kazlauskas, A. (2004) PDGF signalling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(4):205-13
- Tang, L., Tron, V.A., Reed, J.C., Mah, K.J., Krajewski, M., Li, G., Zhou, X., Ho, V.C., Trotter, M.J. (1998) Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4:1865-1871
- Teitelbaum, S.L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504-1508
- Theillet, C. (1998) Full speed ahead for tumor screening. *Nat Med*, 4:767-768
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249-2256
- Trifaud, A., Faysse, R., Papillon, J. (1956) Les tumeurs à myélopaxes des os ou tumeurs à cellules géantes. *Rev Chir Orthop* 43: 413-513
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1440
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466:6-10
- Uehlinger, E. (1976) Primary malignancy, secondary malignancy and semimalignancy of bone tumors. In: Grundmann, E. (ed) Malignant bone tumors. *Springer*, New York Berlin Heidelberg, pp 109-119
- Unni, K.K. (1996) Dahlin's Bone Tumors General Aspects and Data on 11,087 cases. 5th ed. Lippincott-Raven: Philadelphia

- Unni, K.K., Inwards, C.Y. (1995) Tumors of the osteoarticular system. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 2:1097-1128
- Uren, A., Merchant, M.S., Sun, C.J., Vitolo, M.I., Sun, Y., Tsokos, M., Illei, P.B., Ladanyi, M., Passaniti, A., Mackall, C., Toretsky, J.A. (2003) Beta-platelet-derived growth-factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 22(15):2334-42
- Vanel, D., Contesso, G., Rebibo, G. et al. (1983) Benign giant cell tumor of bone with pulmonary metastases and favourable prognosis. Report on two cases and review of the literature. *Skeletal Radiol* 10:221-226
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, T.M. (1988) Bcl-2 promotes the survival of hematopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
- Vollmer, E., Roessner, A., Wuisman, P., Harle, A., Grundmann, E. (1989) The proliferation behavior of bone tumors investigated with the monoclonal antibody Ki-67. *Curr Top Pathol* 80:91-114
- Weindl, K., Marme, D., Weich, H.A. (1992) AIDS-associated Kaposi's Sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 183:1167-1174
- Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., et al. (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64:7099-109
- Willert, H.G., Enderle, A. (1979) Temporäre Zementplombe bei Tumoren fraglicher Dignität. *Z Orthop* 117:224-232
- Willet, C.G., Boucher, Y. et al. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects on human rectal cancer. *Nature Medicine* 10(2):145-147
- Wolfe, J.T. III, Scheithauer, B.W., Dahlin, D.C. (1983) Giant-cell tumor of bone: review of 10 cases. *J Neurosurg* 59:322-327
- Wray, C.C., MacDonald, A.W., Richardson, R.A. (1990) Benign giant cell tumor of bone with metastases to bone and lunge. *J Bone Joint Surg [Br]* 72:486-489
- Wulling, M., Delling, G., Kaiser, E. (2003) The origin of the neoplastic cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol* 34:983-993

- Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., et al. (2003) A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349:427-34
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., Ullrich, A. (1987) Human proto-oncogene c-Kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for unidentified ligand. *EMBO J* 6(11):3341-51
- Yeo, K.T., Wang, H., Nagy, J. et al. (1993) Vascular vascularisation factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res* 53: 2912-2918
- Yip, K.M., Leung, P.C., Kumta, S.M. (1996) Giant cell tumor of bone. *Clin Orthop Relat Res.* Feb; (323): 60-64
- Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X., Kroemer, G. (1997) Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* Apr;29(2):185-93
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Kroemer, G. (1998) Subcellular and mitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* Apr 30;16(17):2265-82
- Zhen, W., Yaotin, H., Songjian, L., et al. (2004) Giant cell tumor of bone. The long-term results of treatment by curettage and bone graft. *J Bone Joint Surg Br.* 86-B: 212-216
- Zheng, M.H., Robbins, P., Xu, J., Huang, L., Wood, D.J., Papadimitriou, J.M. (2001) The histogenesis of giant cell tumor of bone: A model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol* 16(1):297-307
- Zheng, M:H:Robbins, P., Pavlos, N., Wysocki, S., Kumta, S.M., Wood, D.J., Papadimitriou, J.M. (2000) Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. *Hum Pathol* 31(7):804-12
- Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* Jan;8(1):17-23

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorkommen der PDGF-Isoformen	8
Tabelle 2: Vorkommen der PDGF-Rezeptoren	9
Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Antikörper	29
Tabelle 4: Ergebnisse von PDGFR- β bezogen auf den Tumorscore	33
Tabelle 5: Gegenüberstellung von Rezidivierung und PDGFR- β -Expression	35
Tabelle 6: Expression von VEGF-ab1 bezogen auf den Tumorscore	35
Tabelle 7: Gegenüberstellung von Rezidivierung und VEGF-ab1-Expression	37
Tabelle 8: Expression von Ki-67	37
Tabelle 9: Expression von Bcl-2 bezogen auf den Tumorscore	39
Tabelle 10: Gegenüberstellung von Rezidiven und Bcl-2-Expression	40

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Röntgenaufnahme eines ossären Riesenzelltumors	5
Abbildung 2: Histologische Darstellung eines Riesenzelltumors	6
Abbildung 3: Interaktion zwischen den PDGF-Rezeptoren und ihren Liganden	10
Abbildung 4: MTA-1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments)	17
Abbildung 5: Gewebeentnahme aus dem "donor"-Block	18
Abbildung 6: Schnittpräparat eines Tissue Microarray	19
Abbildung 7: Schnittpräparatarchiv des G.-Domagk-Institutes für Pathologie	24
Abbildung 8: Darstellung eines beispielhaften Empfängerblockquadranten	25
Abbildung 9: Paraffinblockarchiv des G.-Domagk-Institutes für Pathologie	26
Abbildung 10: DAKO- Immunfärbeautomat	29
Abbildung 11: Anfertigung eines Schnittpräparates mit Hilfe eines Mikrotoms	30
Abbildung 12: Die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen den PDGF-Rezeptor- β	34
Abbildung 13: Das histologische Bild nach immunhistochemischer Behandlung mit Antikörpern von VEGF-ab1	36
Abbildung 14: Nach immunhistochemischer Anfärbung ist eine geringe Ki-67-Expression zu erkennen	38
Abbildung 15: Nach immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern zeigt sich keine Expression von Bcl-2	40

8 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Altersverteilung des Patientenkollektivs	32
Diagramm 2: Expression von PDGFR- β	34
Diagramm 3: Expression von VEGF-ab1	36
Diagramm 4: Expression von Ki-67	38
Diagramm 5: Expression von Bcl-2	39
Diagramm 6: Expressionshäufigkeit der verschiedenen Faktoren	41

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen, die in unterschiedlicher Weise an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, bedanken.

Zunächst einmal danke ich Herrn Prof. Dr. med. Werner Böcker für die Ermöglichung dieser Arbeit am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie.

Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und Betreuung in Bezug auf diese Arbeit.

Herrn Dr. med. Christian Kersting danke ich für die stets gegebene Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit der kritischen Diskussion.

Den Mitarbeiterinnen des Routinelabors des Gerhard-Domagk-Institutes möchte ich meinen Dank aussprechen für die technische Unterstützung und Informationen über die immunhistochemischen Arbeitsabläufe.

Ebenso möchte ich mich bei Marie Christine Matz und Albrecht Kitzmann bedanken, die mir bei EDV- und Formatierungsproblemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre stetige, liebevolle Unterstützung und Förderung.

10 Lebenslauf

Anna-Christina Hausen

*05. September 1979 in Dortmund

Eltern:

Dr.med. Thomas Hausen

Katrin-Annette Hausen, geb. Lüttig

1986- 1990	Heckerschule, Essen-Werden
1990- 1999	Gymnasium Essen-Werden
26.05.1999	Allgemeine Hochschulreife
1999 – 2002	Ausbildung zur Zahntechnikerin Dentallabor Hoffmann und Käufer in Essen
01.07.2002	Abschluss der Ausbildung, Gesellenprüfung
SS 2001- SS 2006	Studium der Zahnmedizin an der WWU Münster
11.09.2002	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
01.10.2003	Zahnärztliche Vorprüfung
10.07.2006	Staatsexamen in Zahnmedizin an der WWU Münster
02.01.07 bis 30.4.08	Vorbereitungsassistentz, Praxis Dr. Hillgärtner, Hamburg-Poppenbüttel
seit 01.05.08	Kieferorthopädische Weiterbildungsassistentz, Praxis Dr. Anderson, Wedel

Famulaturen und Tätigkeiten neben dem Studium

SS 2003	Tutorin in der Zahnklinik Münster im Phantomkurs I
2003 - 2005	Skiübungsleiterin beim Hochschulsport der Universität Münster
13.09.04- 01.10.04	Famulatur an der Universitätsklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie in der Evangelischen HuysSENS- Stiftung in Essen

11 Anhang

11.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aCML	atypische chronische myeloische Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Karzinom
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CRC	kolorektales Karzinom
dest.	destillata
d.h.	das heißt
DNA	Desoxy Ribonuclein Acid
ER	estrogen receptor
Et al.	et alera – (lat.) und andere
Fa.	Firma
FDA	U.S. Food and Drug Association
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hypereosinophiles Syndrom
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled Strept Avidin-Biotin Methode
Lsg.	Lösung
MTTB	multitumor tissue block
NSCLC	nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
OPN	Osteopontin
PMGCT	primary malignant giant cell tumor
PMMA	Polymethylmethacrylat
PDGF(R)	platelet derived growth factor (receptor)
PIGF	placental growth factor
PR	progesteron receptor
PT	permeability transition pore
RCC	Nierenzellkarzinom
RNA	Ribonuclein Acid
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RZT	Riesenzelltumor
SMGCT	secondary malignant giant cell tumor

TK	Tyrosinkinasen
TMA	Tissue Microarray
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

11.2 Reagenzien

11.2.1 Citratpuffer

Stammlösung A:

0,1 M Citronensäure
10,5 g $C_6H_8O_7 \times 2 H_2O$ auf 500 ml Aqua dest.

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat
29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$ auf 1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B mischen
pH 6,0 einstellen

11.2.2 Hämatoxylin nach Mayer

Gebrauchslösung:

1,0 g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest. gelöst
0,2 g Natrium-Iodat ($NaIO_3$)
50,0 g Kalialaun ($KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$)
50,0 g Chloralhydrat
1,0 g kristalline Citronensäure

Lsg. bei Zugabe der Substanzen erwärmen, nach dem Abkühlen sofort gebrauchsfertig

11.2.3 RED Chromogen

Stammlösung:

5% Neofuchsinlsg. In 2N HCl

Puffer:

17,4g NaCl
3,0 g Tris-HCl
9,8 g Tris
in 2000 ml Aqua bidest.

Propandiol:

21 g Propandiol in 1000 ml Aqua bidest. gelöst

Gebrauchslösung:

a) 0,125 ml Stammlsg.
0,313 ml 4% Na-Nitrit
unter Abzug 60 s reagiert

b) 0,025 g Levamisol

43,75 ml Entwicklungspuffer

15,60 ml Propandiol

c) 0,0375 ml N,N-Dimethylformamid

Lsg. a), Lsg. b) und Lsg c) mischen mit 2N HCl auf 8,8 einstellen und filtrieren,
Schnitte 25 min auf dem Rüttler inkubieren