

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

Nachweis aktivierter intrazellulärer Signalwege in humanen glialen Tumoren durch Phosphorylierungs-spezifische Immunhistochemie

Christina Susanne Wohlmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer

Die Dissertation wurde am 28.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen.....	7
2. Einleitung.....	9
2.1 . Problemstellung.....	9
2.2 . Klassifikation und Prognose glialer Tumore (nach WHO).....	10
2.3 . Therapieformen glialer Tumore.....	13
2.3.1. Operative Therapie.....	13
2.3.2. Adjuvante Therapie.....	13
2.3.2.1. <i>Strahlentherapie.....</i>	<i>13</i>
2.3.2.2. <i>Chemotherapie.....</i>	<i>15</i>
2.3.2.3. <i>Symptomatische Therapie.....</i>	<i>16</i>
2.3.2.4. <i>Experimentelle Therapie.....</i>	<i>16</i>
2.4 . Signalwege.....	18
2.4.1. Zelluläre Signaltransduktion.....	18
2.4.2. EGFR (Epidermal growth factor receptor).....	19
2.4.3. ERK1/2 (extracellular signal-related kinase).....	20
2.4.4. Proliferationsindex.....	21
2.4.5. PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase).....	22
2.4.6. Akt / PKB (Proteinkinase B).....	23
2.4.7. PTEN – Protein (phosphatase and tensin homology).....	24
2.4.8. p53 - Protein.....	26
2.4.9. p21WAF1/ CIP1/ SDI1 - Protein.....	27
3. Zielsetzung der Arbeit.....	28
4. Material und Methoden.....	29
4.1 . Material.....	29
4.1.1. Geräte und Hilfsmittel	29
4.1.2. Puffer und Lösungen.....	30
4.1.2.1. <i>Puffer und Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen.....</i>	<i>30</i>
4.1.2.2. <i>Puffer und Lösungen für die Westernblot-Analyse.....</i>	<i>30</i>
4.1.2.2.1. <i>Proteinisolierung / quantitative Proteinbestimmung.....</i>	<i>30</i>
4.1.2.2.2. <i>Gel-Elektrophorese / Western-Blot.....</i>	<i>30</i>
4.1.3. Antikörper.....	31
4.1.3.1. <i>Primärantikörper.....</i>	<i>31</i>
4.1.3.2. <i>Sekundärantikörper / Konjugate / Substrate.....</i>	<i>32</i>
4.1.4. Tumormaterial.....	32

4.1.4.1. Paraffin eingebettete Proben.....	32
4.1.4.2. Tiefgekühlte Tumorproben.....	33
4.2 . Methoden.....	33
4.2.1. Proteinisolierung.....	33
4.2.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford-Assay).....	33
4.2.3. Western-Blot-Analyse.....	34
4.2.3.1. Gel-Elektrophorese (SDS-Page).....	34
4.2.3.2. Western-Blot.....	34
4.2.3.2.1. Protein-Transfer.....	34
4.2.3.2.2. Immunreaktion und Proteindetektion.....	34
4.2.4. Immunhistochemie.....	35
4.2.4.1. Vorbehandlungen.....	35
4.2.4.1.1. Hitzedemaskierung im Druckkochtopf	35
4.2.4.1.2. Hitzedemaskierung in der Mikrowelle.....	35
4.2.4.1.3. Blockung der endogenen Peroxidase.....	35
4.2.4.2. Antikörperbehandlungen und Substratnachweis.....	36
4.2.4.3. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	36
4.2.5. Tissue array.....	38
5. Ergebnisse.....	39
5.1 . Nachweis von pAkt und pERK in ausgewählten Tumoren durch Proteinisolierung im Vergleich zur Immunhistochemie.....	39
5.2 . Vergleich der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper mit den Gesamt-Antikörpern.....	41
5.2.1. Verteilung der gesERK im Vergleich zu pERK.....	41
5.2.2. Verteilung der gesAkt im Vergleich zu pAkt.....	42
5.3 . Immunhistochemische Untersuchungen und Auswertung der verwendeten Antikörper.....	43
5.3.1. Tumore astrozytären und oligodendroglialen Ursprungs.....	43
5.3.1.1. Verteilung der einzelnen Faktoren.....	43
5.3.1.1.1. EGFR.....	43
5.3.1.1.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz).....	44
5.3.1.1.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn).....	45
5.3.1.1.4. Proliferationsindex MIB1.....	45
5.3.1.1.5. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz).....	46
5.3.1.1.6. Phospho-Akt nukleär (pAktn).....	46
5.3.1.1.7. PTEN-Protein.....	47

5.3.1.1.8. p21-Protein zytoplasmatisch (p21z).....	47
5.3.1.1.9. p21-Protein nukleär (p21n).....	48
5.3.1.1.10. p53-Protein.....	48
5.3.1.2. Vergleichende Darstellung einzelner Faktoren	48
5.3.1.2.1. Vergleich von pERK und pAkt.....	49
5.3.1.2.2. MIB1 in Abhängigkeit von EGFR	50
5.3.1.2.3. MIB1 in Abhängigkeit von pERK	51
5.3.1.2.4. pERK in Abhängigkeit von EGFR	52
5.3.1.2.5. pAkt in Abhängigkeit von EGFR	53
5.3.1.2.6. pAkt in Abhängigkeit von PTEN	55
5.3.1.2.7. p21 in Abhängigkeit von pAkt.....	56
5.3.1.2.8. p21 in Abhängigkeit von p53	57
5.3.2. Tumore ependymalen Ursprungs	59
5.3.2.1. Verteilung der einzelnen Faktoren.....	59
5.3.2.1.1. p53-Protein.....	59
5.3.2.1.2. Proliferationsindex MIB1.....	59
5.3.2.1.3. EGFR.....	60
5.3.2.1.4. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz).....	60
5.3.2.1.5. Phospho-ERK nukleär (pERKn).....	61
5.3.2.1.6. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz).....	61
5.3.2.1.7. Phospho-Akt nukleär (pAktn).....	62
5.3.2.1.8. PTEN-Protein.....	62
5.3.2.1.9. p21-Protein zytoplasmatisch (p21z).....	63
5.3.2.1.10. p21-Protein nukleär (p21n).....	63
5.3.2.2. Vergleichende Darstellung einzelner Faktoren.....	64
5.3.2.2.1. MIB1 in Abhängigkeit von EGFR	64
5.3.2.2.2. MIB1 in Abhängigkeit von pERK	64
5.3.2.2.3. pERK in Abhängigkeit von EGFR	65
5.3.2.2.4. pAkt in Abhängigkeit von EGFR	66
5.3.2.2.5. Vergleich von pERK und pAkt	67
5.3.2.2.6. pAkt in Abhängigkeit von PTEN	68
5.3.2.2.7. p21 nukleär in Abhängigkeit von pERK.....	69
5.3.2.2.8. p21 nukleär in Abhängigkeit von pAkt	70
5.3.3. Tissue-Array.....	70
5.3.3.1. Tissue-Array – Astrozytäre Tumore.....	71
5.3.3.1.1. EGFR.....	71
5.3.3.1.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz).....	71

5.3.3.1.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn).....	71
5.3.3.1.4. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz).....	71
5.3.3.1.5. Phospho-Akt nukleär (pAktn).....	71
5.3.3.1.6. PTEN-Protein.....	72
5.3.3.1.7. p21-Protein nukleär und zytoplasmatisch (p21n, p21z).....	72
5.3.3.1.8. p53-Protein.....	72
5.3.3.1.9. Proliferationsindex MIB1.....	72
5.3.3.2. <i>Tissue-Array – Ependymale Tumore</i>	72
5.3.3.2.1. EGFR.....	72
5.3.3.2.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz).....	72
5.3.3.2.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn).....	73
5.3.3.2.4. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz).....	73
5.3.3.2.5. Phospho-Akt nukleär (pAktn).....	73
5.3.3.2.6. PTEN-Protein.....	73
5.3.3.2.7. p21-Protein zytoplasmatisch und nukleär (p21z, p21n).....	73
5.3.3.2.8. p53-Protein.....	73
5.3.3.2.9. Proliferationsindex MIB1.....	73
5.3.3.3. <i>Vergleich Tissue-Array – herkömmliche Immunhistochemie</i>	74
5.3.3.3.1. Astrozytäre Tumore.....	74
5.3.3.3.2. Ependymale Tumore.....	75
6. Diskussion.....	76
6.1 . Vergleich der immunhistochemischen Untersuchung mit der Western-Blot-Analyse	76
6.2 . Vergleich des Einsatzes von Gesamtantikörper gegen ERK und Akt mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern an ausgesuchten Präparaten.....	77
6.3 . Interpretation der immunhistochemischen Resultate.....	77
6.3.1. Tumore astrozytär-oligodendrogialen Ursprungs.....	77
6.3.1.1. <i>Proliferationsindex MIB1</i>	78
6.3.1.2. <i>Expression des EGF-Rezeptors und Zusammenhang mit der MIB1-assozierten Proliferation</i>	79
6.3.1.3. <i>Expression der phosphorylierten ERK und Zusammenhang mit der MIB1-assozierten Proliferation sowie dem EGF-Rezeptor</i>	80
6.3.1.3.1. Zusammenhang mit MIB1.....	81
6.3.1.3.2. Zusammenhang mit EGFR.....	82
6.3.1.4. <i>Expression der phosphorylierten Akt und Zusammenhang mit dem EGFR</i>	83
6.3.1.4.1. Zusammenhang mit EGFR.....	83

6.3.1.5. Vergleich von pERK und pAkt.....	84
6.3.1.5.1. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und zytoplasmatischer pAkt.....	84
6.3.1.5.2. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und nukleärer pAkt.....	85
6.3.1.6. Expression von PTEN und Zusammenhang mit pAkt.....	87
6.3.1.7. Expression von p21 und Zusammenhang mit pAkt.....	89
6.3.1.7.1. Zusammenhang mit pAkt.....	89
6.3.1.8. Expression von p53 und Zusammenhang mit p21.....	90
6.3.1.8.1. Zusammenhang mit p21.....	91
6.3.2. Tumore ependymalen Ursprungs.....	91
6.3.2.1. Expression von p53.....	92
6.3.2.2. Expression von MIB1.....	93
6.3.2.3. Expression des EGF-Rezeptors und Zusammenhang mit der MIB1-assoziierten Proliferation.....	93
6.3.2.3.1. Zusammenhang mit MIB1.....	94
6.3.2.4. Expression der phosphorylierten ERK und Zusammenhang mit MIB1 und EGFR.....	94
6.3.2.4.1. Zusammenhang zwischen pERK und MIB1.....	95
6.3.2.4.2. Zusammenhang zwischen pERK und EGFR.....	96
6.3.2.5. Expression der phosphorylierten Akt und Zusammenhang mit dem EGFR.....	96
6.3.2.5.1. Zusammenhang mit EGFR.....	96
6.3.2.6. Vergleich von pERK mit pAkt.....	97
6.3.2.6.1. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und zytoplasmatischer pAkt.....	97
6.3.2.6.2. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und nukleärer pAkt.....	97
6.3.2.7. Expression von PTEN und Zusammenhang mit pAkt.....	98
6.3.2.7.1. Zusammenhang zwischen pAkt und PTEN.....	98
6.3.2.8. Expression von p21 und Zusammenhang mit pERK.....	99
6.3.2.8.1. Zusammenhang zwischen p21 und pERK.....	99
6.3.2.9. Zusammenhang zwischen p21 und pAkt.....	100
6.3.3. Tissue-Array.....	100
6.4 . Kritische Stellungnahme zum Einsatz von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern in der Immunhistochemie.....	101
7. Zusammenfassung.....	103
8. Literatur.....	104

1. Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APS	Amonium-Peroxydisulfat
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BCNU	1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serum-Albumin
Caspase	Cytosolic aspartate specific cysteine protease
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CIP1	CDK-interacting protein 1
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EORTC	European Organisation for the Research and Treatment of Cancer
ERK	Extracellular signal-related kinase
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded
FRAP	FK506 binding protein-rapamycin-associated protein
GBM	Glioblastom
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
IHC	Immunhistochemie
ILK	Integrin linked kinase
JNK	Jun amino-(N) terminal kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MGMT	O6-methylguanine-DNA-Methyltransferase
MMAC	Mutated in multiple advanced cancers
mRNA	Messenger Ribonuclein acid
PAA	Polyacrylamid
PDGF	Platelet derived growth factor
PDK	Phosphatidylinositol-3-phosphate dependent kinase
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pRb	Product of Rb (Retinoblastoma-Gen)
PtdIns	Phospatidylinositol
PTEN	Phosphatase and tensin homology

PVDF	Polyvinylidene difluoride
PXA	Pleomorphes Xanthoastrozytom
RAC	Related to A and C kinase
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SAPK	Stress induced ERK1/2
SDI1	Senescent cell derived inhibitor 1
SEGA	Subependymal giant cell astrocytoma
sGP	Small G-protein
TEP	TGF- α regulated and epithelial cell-enriched phosphatase
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TOR	Target of rapamycin
VEGF	Vascular endothelial growth factor protein
WAF1	Wild type p53 activated fragment 1
wt-p53	Wild type p53

2. Einleitung

2.1. Problemstellung

Die häufigsten Neoplasien des zentralen Nervensystems, die mitunter ein ausgesprochen bösartiges Verhalten zeigen, sind gliale Hirntumore. Charakteristisch für diese Gruppe ist durch die schrittweise Entdifferenzierung der Zellen eine Tumorprogression, an deren Endpunkt das Glioblastom steht. Dieses zeichnet sich nicht nur histopathologisch durch ein buntes Zellbild aus, sondern weist auch pathophysiologisch unterschiedlichste Verhaltensweisen auf.

Auslöser der beginnenden Tumorprogression sind verschiedene genetische Veränderungen. Diese führen zu einer veränderten Proteinexpression, die wiederum direkte Auswirkungen auf intrazelluläre Mechanismen im Rahmen der Signaltransduktion haben. Das Verhalten der Tumore wird zunehmend von einem Ungleichgewicht zwischen Faktoren wie Proliferation, Invasion und Apoptose geprägt.

Eine der bekanntesten genetischen Veränderungen in Glioblastomen ist die Amplifikation des Gens des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Durch diese kommt es zu einer Überexpression des Rezeptor-Proteins (erstmalig beschrieben durch Libermann et al. 1984), woraus eine verstärkte Induktion nachgeschalteter Signalwege resultiert. Diese Beeinflussung geschieht unter anderem durch die Phosphorylierung einzelner Signalwegskomponenten.

Zum Nachweis der Aktivierung stehen seit kurzem Antikörper zur Verfügung, die an formalinfixierten und paraffineingebetteten Präparaten (*Formalin fixed paraffin embedded*, FFPE) ausschließlich das phosphorylierte Protein erkennen. Hierdurch steht eine neue Methode zur Verfügung, das Verhalten der Tumore und die Veränderungen der Signalwege direkt am Gewebe *in situ* zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nachgewiesen werden, inwieweit die Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper für die Immunhistochemie an glialen Tumoren geeignet sind. Außerdem sollte gezeigt werden, ob durch diesen Nachweis Schlüsse auf das Verhalten der aktivierten Proteinkinasen im Gewebe gezogen werden können, welche für die funktionelle Diagnostik von Nutzen wären.

2.2. Klassifikation und Prognose glialer Tumore (nach WHO)

Die Einteilung der Tumore in der vorliegenden Arbeit orientiert sich an den Kriterien der WHO-Klassifikation von 2000 (Kleihues, Cavanee 2000) und ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Neben den aufgeführten histopathologischen Kriterien berücksichtigt die WHO-Klassifikation auch genetische Veränderungen (Kleihues et al. 2002; Radner et al. 2002), auf die zum Teil im Laufe der Arbeit genauer eingegangen wird. Die mittlerweile erneuerte Version der WHO-Klassifikation von 2007 weist keine wesentlichen Veränderungen zu 2000 auf.

Grad	Bezeichnung	Histopathologie	Klinischer Verlauf
Astrozytische Tumore			
<u>Umschriebenes Astrozytom</u>			
WHO I	Pilozytisches Astrozytom	umschriebenes, langsames Wachstum geringe Zelldichte mit bipolaren und multipolaren Zellen, Rosenthalfasern	bei totaler Resektion Heilung möglich teils Regression
WHO I	Subependymales Riesenzellastrozytom (SEGA)	langsames Wachstum in Gruppen angeordnete große ganglioiden Zellen, teils perivaskuläre Pseudopalisaden-Bildung, häufig verkalkend	assoziiert mit Tuberöser Sklerose, Grunderkrankung Prognosebestimmend
WHO II	Pleomorphes Xanthoastrozytom (PXA)	pleomorpher Tumor mit fibrillären und häufig mehrkernigen Riesenzellen, große xanthomatöse Zellen	trotz ausgeprägter Zellpolymorphie niedrig malignes Verhalten mit langem Rezidiv-freiem Überleben (ca. 60% >10 Jahre)
<u>Diffuses Astrozytom</u>			
WHO II	Varianten:		
	fibrilläres Astrozytom	langsames infiltratives, nicht destruierendes Wachstum	nach chirurgischer Intervention durchschnittliche Überlebenszeit 6-8 Jahre
	protoplasmatisches Astrozytom	hoher Differenzierungsgrad (fibrillär, protoplasmatisch, gemistozytisch)	häufig Progression zu Glioblastom nach 4-5 Jahren
	gemistozytisches Astrozytom	geringe Zell- und Kernatypie, selten Mitosen lockere, häufig mikrozystische Matrix	
WHO III	<u>Anaplastisches Astrozytom</u>	diffus infiltrierend, deutliche Progression fokal oder diffus deutlich erhöhte Zelldichte mit Kern- und Zellatypien, gesteigerte mitotische Aktivität, teils atypische Mitosen keine Nekrosen, keine mikrovaskulären Gefäßproliferate	wichtigster prognostischer Faktor: Progression zu Glioblastom im Mittel nach 2 Jahren durchschnittliche Überlebenszeit 3 Jahre

WHO IV	<u>Glioblastom</u>	diffus infiltrierendes, teils multifokales Wachstum hohe Zelldichte mit Zellpolymorphie und Kernatypien, geringe Differenzierung, hohe Mitoserate mit atypischen Mitosen Nekrosen, mikrovaskuläre Gefäßproliferate, teils Mikrothromben häufig Nachweis von genetischen Veränderungen (z.B. p53, PTEN, EGFR)	durchschnittliche Überlebenszeit unter 1 Jahr, abhängig von einer Vielzahl an Faktoren (z.B. Ausdehnung der Tumornekrose, Patientenalter und präoperativer Allgemeinzustand)
	Varianten:		
	Riesenzell-Glioblastom	Variante mit mehrkernigen Riesenzellen	
	Gliosarkom	Variante, gliale und mesenchymale Strukturen nachahmend	

Oligodendrogliale Tumore

WHO II	<u>Oligodendrogliom</u>	gut differenziert, diffus infiltrierend mäßige Zelldichte, geringe Mitoserate Zellen mit runden, homogenen Kernen und deutlichem klarem Zytoplasma („Honigwabens-Struktur“) häufig Mikrokalzifikationen und zystische Degeneration	mittlere postoperative Überlebenszeit 3-5 Jahre
--------	-------------------------	---	---

WHO III	<u>Anaplastisches Oligodendrogliom</u>	diffus infiltrierend, hohe Zelldichte mit gesteigerter Mitoserate teils Gefäßproliferate und Nekrosen	mittlere Überlebenszeit 1- 4 Jahre
---------	--	--	------------------------------------

Mischgliome

WHO II	<u>Oligo-Astrozytom</u>	zwei unterschiedliche zelluläre Komponenten diffus infiltrierend, gut differenziert mäßige Zelldichte	mittlere Überlebenszeit 3-6 Jahre
--------	-------------------------	---	-----------------------------------

WHO III	<u>Anaplastisches Oligo-Astrozytom</u>	zwei unterschiedliche zelluläre Komponenten diffus infiltrierend hohe Zelldichte mit gesteigerter Mitoserate teils Gefäßproliferate und Nekrosen	mittlere Überlebenszeit < 3 Jahren
---------	--	---	------------------------------------

Ependymale Tumore

WHO I	<u>Subependymom</u>	langsames Wachstum in Gruppen angeordnete isomorphe Zellkerne in reichlich fibrillärer Matrix, teils zystisch	Heilung bei totaler Resektion
-------	---------------------	---	-------------------------------

WHO I	<u>Myxopapilläres Ependymom</u>	langsames Wachstum kuboide, radiär um Gefäße angeordnete Zellen, mukoide Degeneration	Überlebenszeit nach totaler und subtotaler Resektion >10 Jahre
-------	---------------------------------	--	--

WHO II	<u>Ependymom</u>		
	Zelluläres Ependymom	langsames Wachstum	5-10 Jahre Progressions-freies Überleben
	Papilläres Ependymom	mäßige Zelldichte mit histo-pathologischen Varianten (zellulär, papillär, klarzellig, tanizytisch)	
	Klarzelliges Ependymom		
	Tanizytisches Ependymom	perivaskuläre Pseudorosetten, Ependymrosetten	
WHO III	<u>Anaplastisches Ependymom</u>	gesteigertes Wachstum hohe Zelldichte mit gesteigerter Mitoserate perivaskuläre Pseudorosetten, keine Ependymrosetten, teils palisadenartige Nekrosen	Prognose nicht direkt von Anaplasie-Kriterien abhängig

Tabelle 1
Klassifikation, Histopathologie und Prognose glialer Tumore nach WHO

2.3. Therapieformen glialer Tumore

2.3.1. Operative Therapie

Ein wichtiger Bestandteil der Therapie von Hirntumoren ist die operative Resektion des Tumors.

Die Indikation zur Operation hängt von verschiedenen Faktoren ab, sowohl seitens des Tumors, als auch des Patienten. Für jeden Patienten muss daher im einzelnen festgelegt werden, ob das postoperative Ergebnis eine Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit und der Lebensqualität erwarten lässt (Rosenblum 1990). Voraussetzung sind eine genaue Diagnosestellung sowie die Erfassung von Tumorgöße und Tumorausdehnung, welche mittels stereotaktischer Serienbiopsie und bildgebender Verfahren festgelegt werden können.

Die operative Entfernung steht bei den niedriggradigen Astrozytomen im Vordergrund. Dies gilt vor allem für das umschrieben wachsende pilozytische Astrozytom, welches bei vollständiger Resektion keine Rezidivneigung zeigt. Auch Astrozytome, Oligodendrogliome sowie Mischgliome mit WHO-Grad II werden möglichst vollständig reseziert, sind jedoch aufgrund eines invasiven Wachstums schlechter abgrenzbar und somit schwieriger *in toto* zu entfernen.

Für die hoch malignen Tumore Grad III und IV gilt, dass die Vorteile einer Operation vor allem in der Volumenreduktion liegen, wodurch das Auftreten klinischer Symptome aufgeschoben oder neurologische Ausfälle reduziert werden können. Die Indikation sollte dann gestellt werden, wenn eine weitgehende Resektion möglich und das Risiko einer postoperativ erhöhten Morbidität gering ist. Um intraoperativ eine bessere Abgrenzung des Tumorgewebes zu erzielen, werden mittlerweile fluoreszierende Substanzen (5-Aminolaevulinsäure) eingesetzt, die sich in den Zellen der malignen Gliome anreichern und eine bessere Resektion sowie eine längere Progressionsfreie Überlebenszeit erzielen (Stummer et al. 2006).

Bei den ependymalen Tumoren kann eine komplette Resektion die Heilung erbringen, allerdings verbieten häufig eine infratentorielle und Mittellinien nahe Lage den operativen Eingriff (Bouffet et al. 1998).

Daneben gibt es für die Ependymome unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Prognose nach einer Operation in Abhängigkeit von Histologie und Anaplasie (Schiffer et al. 1991; Schiffer, Giordana 1998; Robertson et al. 1998; Horn et al. 1999; Figarella-Branger et al. 2000; Ho et al. 2001). Die vollständige Resektion steht unabhängig vom WHO-Grad im Vordergrund, muss jedoch vor allem bei den höher malignen Tumoren durch adjuvante Therapieverfahren ergänzt werden.

2.3.2. Adjuvante Therapie

2.3.2.1. Strahlentherapie

Die konventionelle externe Bestrahlung hat ihren festen Platz in der Therapie glialer Hirntumore und erfolgt in den meisten Fällen im Anschluss an eine Operation.

Für die Durchführung dieser Therapie ist die genaue Diagnose und die Lage des Tumors entscheidend. Die Diagnose lässt Schlüsse auf die Strahlensensibilität des Tumorgewebes zu und die Lokalisation ist in Rücksicht auf die Strahlentoleranz des umliegenden Gewebes mitbestimmend bei der Wahl der Bestrahlungsdosis. Diese ist zum Beispiel in der Hirnstammregion vergleichsweise niedriger als in unempfindlicheren Großhirnarealen.

Standard bei der Planung des Bestrahlungsfeldes ist der Einsatz von bildgebenden Verfahren wie Computer- und Magnetresonanztomographie. Diese bieten insbesondere bei der gängigen fraktionierten Bestrahlung mehrere Vorteile. Das Ziel kann unter Schonung umliegender Bereiche genau bestimmt werden und eine exakte, reproduzierbare Lagerung des Patienten in den einzelnen Sitzungen kann gewährleistet werden. Allerdings findet diese Form der lokalen Radiotherapie gegenüber der Ganzhirnbestrahlung keine prognostische Verbesserung (Shapiro et al. 1989; Garden et al. 1991; Grosu et al. 1998; Sharma et al. 2003).

Unabhängig von der Vorgehensweise muss bei der Strahlentherapie besonders auf radiogen bedingte Früh- und Spätschäden geachtet werden. Neben den selten lebensbedrohlichen Schädigungen der Haut und ihrer Anhangsorgane kann vor allem das akut auftretende Hirnödeme zu einem frühzeitigem Abbruch der Bestrahlung führen. Als mögliche Spätfolge treten großflächige Hirnnekrosen auf, die ihrerseits eine erhebliche Raumforderung verursachen können.

Trotz einer insgesamt eher geringen Strahlensensibilität der astrozytären Tumore, wird die Bestrahlung vor allem bei den höher malignen Neoplasien eingesetzt.

Astrozytome mit WHO-Grad I bedürfen bei kompletter Resektion wegen fehlender Progressionsneigung keiner Nachbehandlung. Eine schwierige Situation ergibt sich, wenn aufgrund der Lokalisation eine Entfernung *in toto* nicht möglich ist. Hier wird meist auf die Bestrahlung zurückgegriffen, die Tumore sprechen aufgrund der niedrigen Proliferationsneigung jedoch häufig schlecht an.

Bei Astrozytomen WHO-Grad II wird aufgrund des infiltrativen Verhaltens nahezu immer eine postoperative Bestrahlung durchgeführt. Gleiches gilt für Oligodendrogliome und Mischgliome (WHO II).

Anders verhält es sich mit den anaplastischen Tumoren, bei denen in jedem Fall zur Verbesserung des Behandlungsergebnisses eine Nachbestrahlung des Tumorbettes angestrebt wird. Liegt ein sehr diffuses Wachstum vor, stellt die Bestrahlung durchaus auch eine primäre Therapieoption dar.

Eine besondere Schwierigkeit ergibt sich bei der Behandlung der Glioblastome. Die Hochdosisbestrahlung gehört hier zum Standard, führt jedoch zu einer vergleichsweise geringen Verbesserung der Prognose (Walker et al. 1978; Curran et al. 1993; Fine 1994). Erst durch die Kombination von Hochdosisbestrahlung mit Chemotherapeutika (Temozolomid) konnte eine Steigerung der 2-Jahres-Überlebenszeit von 10% auf 27% erzielt werden (Stupp et al. 2005). Besonders gut sprechen Tumore an, die eine methylierte Form des „DNA-Reparatur-Gens“ *O6-methylguanine-DNA-Methyltransferase* (MGMT) aufweisen (Hegi et al. 2005).

Bei den Ependymomen kann ab dem WHO-Grad II eine Nachbestrahlung des Tumorbettes sowie eine kranio-spinale Bestrahlung in Erwägung gezogen werden, da diese Tumore zur Ausbreitung von Tumorzellen über die Liquorwege neigen.

Neben der externen Bestrahlung spielen auch die Radiochirurgie und die stereotaktische Strahlentherapie eine Rolle. Gerade bei tiefer gelegenen oder mikrochirurgisch nur teilweise resezierbaren Tumoren kommen diese Verfahren zum Einsatz. Intraoperativ oder auch in lokaler Betäubung mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens kann eine gezielte, hochdosierte Bestrahlung des Tumors erfolgen. Hierzu werden unter anderem Protonen eines 160 MeV-Zyklons oder eines Linearbeschleunigers verwendet (Kimmig et al. 1992). Auf diese Weise kann auch bei niedrig malignen Tumoren (WHO II) eine direkte Bestrahlung des Tumorbettes durchgeführt werden, bei der das umliegende Gewebe weniger belastet wird als bei der perkutanen Methode. Dies hat den Vorteil, dass bei einem Rezidiv oder bei Progression die Option der perkutanen Strahlentherapie unter Umständen noch besteht. Auch Patienten, die aufgrund ihres Allgemeinzustandes nicht für eine Operation geeignet sind, können von der stereotaktischen Methode profitieren.

2.3.2.2. Chemotherapie

Die Chemotherapie findet ihren Einsatz vor allem bei ausgesuchten Tumorentitäten wie zum Beispiel Tumoren mit oligodendroglialer Komponente sowie bei hochgradigen Tumoren im Zuge einer Kombinations- oder Rezidivtherapie (Shapiro et al. 1989; DeAngelis et al. 1998; Hofer, Herrmann 2001). Insbesondere durch die Entwicklung des oral verfügbaren Chemotherapeutikums Temozolomid hat die Kombinationstherapie aus postoperativer Bestrahlung und Chemotherapie einen festen Platz in der Behandlung hoch maligner glialer Tumore erhalten (Stupp et al. 2005).

Generell limitierende Faktoren beim Einsatz einer Chemotherapie sind unter anderem der Allgemeinzustand des Patienten, aber auch das Bestehen einer intakten Blut-Hirn-Schranke (Hofer, Herrmann 2001). Die meisten Tumore weisen hier zwar Lücken auf, jedoch werden nicht alle Tumorareale in ausreichend therapeutischer Konzentration erreicht. Von Seiten des Patienten stellen neben dem Allgemeinzustand die Funktion verschiedener Organsysteme wie Leber und Niere, sowie die Intaktheit des kardialen, pulmonalen und blutbildenden Systems wichtige Voraussetzungen für eine chemotherapeutische Behandlung dar.

Ursprünglich fanden vor allem Nitroseharnstoffderivate sowohl als Einzeltherapeutikum (ACNU, BCNU, CCNU) wie auch als Kombinationstherapie Verwendung (z.B. PCV-Schema: Pocarbacin + CCNU + Vincristin, ACNU+VM-26 als *Second-line* - Therapie der Glioblastom-Behandlung). Gerade im Einsatz bei den hoch malignen Glioblastomen zeigten diese jedoch nur eine begrenzte Verbesserung der Überlebenschancen (Shapiro et al. 1989; Cairncross, MacDonald 1992; Curran et al. 1993). Patienten mit anaplastischem Astrozytom scheinen dagegen von einer Chemotherapie zu profitieren (Fine et al. 1993).

Ein deutlicher Vorteil gegenüber den beschriebenen Chemotherapeutika zeigte sich bei Temozolomid, einem Alkylanz. Die Vorteile dieses Wirkstoffs liegen vor allem in seiner oralen Verfügbarkeit sowie einer vergleichsweise geringen Nebenwirkungsrate. Unter gleichzeitiger Bestrahlung konnte eine Verlängerung der 2-Jahres-Überlebenszeit von 10% auf 27% erzielt werden (Stupp et al. 2005). Auch in der Behandlung von Rezidivgliomen weisen neuere Daten auf eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens hin (Balmaceda et al. 2008).

Bei Ependymomen wird die Chemotherapie vor allem im Kleinkindalter (< 4 Jahre) einer Bestrahlung vorgezogen, um Strahlenspätchäden zu vermeiden. Im Vordergrund der Therapie steht jedoch auch bei dieser Tumorentität die möglichst vollständige Resektion.

2.3.2.3. Symptomatische Therapie

Abgesehen von den kausalen Therapieansätzen darf gerade im fortgeschrittenen Tumorstadium die symptomatische Therapie nicht außer Acht gelassen werden.

Neben einer ausreichenden Schmerzmedikation steht vor allem die Reduktion der Tumorgöße und die Verhinderung des Hirnödems im Vordergrund. Hierbei finden wiederum Bestrahlung und palliative Tumorreduktion ihren Einsatz. Zur Kontrolle eines Perifokalödems eignen sich in erster Linie Kortikosteroide, um die Kapillarpermeabilität zu senken. Muss eine schnelle Reduktion des Hirndruckes erzielt werden, kommen Osmodiuretika wie Mannit oder Sorbit zum Einsatz.

Relativ häufig treten auch rezidivierend epileptische Anfälle auf, die eine entsprechende antikonvulsive Behandlung nötig machen. Daneben kann es in fortgeschrittenen Stadien je nach Tumorlokalisierung zu weiteren neurologischen Ausfällen und psychiatrischen Symptomen kommen, deren Behandlung individuell gestaltet werden muss. Eine Aufklärung des Patienten und seiner Angehörigen diesbezüglich sollte frühzeitig stattfinden.

2.3.2.4. Experimentelle Therapie

Abgesehen von den etablierten Therapiekonzepten werden fortlaufend neue Ansätze untersucht, der Resistenz glialer Tumore entgegen zu wirken.

In klinischen Studien wird zum Beispiel die Wirksamkeit neu entwickelter Chemotherapeutika geprüft. Hierzu gehören das liposomal verkapselte Doxorubicin. Die Wirksamkeit von Doxorubicin an glialen Zellen *in vitro* konnte bereits gezeigt werden, aufgrund der schlechten Penetrationsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke war es dem Einsatz bei hoch malignen Gliomen bislang jedoch vorenthalten (Wolff et al. 1999). Erste Studien mit dem verkapselten Medikament lassen auf weitere Fortschritte in der *second-line*-Therapie von hoch malignen Gliomen hoffen (Hau et al. 2004).

Auch das intraoperative Einbringen von mit einem Chemotherapeutikum versetztem Trägermaterial in die Resektionshöhle ist Teil klinischer Prüfung. Zum Beispiel konnte im Rahmen einer EORTC-Studie bei lokalen Rezidiven eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 12 auf 14 Monate nach

Einbringen eines mit Carmustin versetzten Trägers in die Tumorphöhle erzielt werden (Westphal et al. 2003).

Neben der konventionellen Bestrahlung wird in speziellen Zentren das Einbringen von radioaktiven Implantaten (z.B. I^{125}) durchgeführt, die für eine bestimmte Zeit in der Tumorregion belassen werden (Laperriere et al. 1998; McDermott et al. 1998). Durch die Wahl der Isotope und die individuelle Verweildauer der sogenannten *Seeds* im Tumor lässt sich die Bestrahlungsdosis anpassen. Über die temporäre Implantation radioaktiver Substanzen hinaus wird auch die permanente Brachytherapie beschrieben, die jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Prognose zu haben scheint (Larson et al. 2004). Zu den wichtigsten jüngeren Entwicklungen gehören die Gen-Therapie, die Behandlung mit Immunmodulatoren (z.B. Zytokine, Interferone), der Einsatz spezifischer Antikörper, sowie die Verwendung sogenannter *Radiosensitizer*.

Mittels der Gen-Therapie wird versucht, den Verlust von Tumor-Suppressor-Genen wie etwa p53 durch Einfügen in die Zelle aufzuheben, um diese dadurch direkt am Wachstum zu hindern (Van Meir et al. 1994; Rosenfeld et al. 1995). Ein weiterer Ansatz ist der Transfer von Genen wie dem PTEN-Gen (*Phosphatase and tensin homology*), durch welchen eine höhere Radiosensitivität der Tumorzellen erreicht werden soll (Wick et al. 1999). Daneben werden auch andere *Radiosensitizer* erforscht, die durch Einwirken auf die Signalwege (z.B. PKB/Akt) zu einem verbesserten Ansprechen der Bestrahlung führen sollen (Rodrigus 2003; Handrick et al. 2006).

Bei dem Versuch mit Zytokinen das Wachstum der Tumore aufzuhalten, konnten Hayes et al. bei einzelnen Patienten mit Rezidivgliomen durch die Gabe von Interleukin-2 oder Lymphokin-aktivierten Killerzellen zumindest Teilerfolge erzielen (Hayes et al. 1995). Daneben ist die Immuntherapie Gegenstand weiterer Untersuchungen (z.B. Plautz et al. 2000).

Viel Hoffnung wird nach wie vor in die Verabreichung spezifischer Antikörper gesteckt. Gerade Antikörper gegen den in glialen Tumoren sehr häufig exprimierten Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR) sind hier hervorzuheben, nachdem schon in der Brustkrebstherapie mit dem gleichen Konzept sehr gute Erfolge nachgewiesen wurden (Trastuzumab, Antikörper gegen den Rezeptor ERBB2) (Cobleigh et al. 1999). Bisher ließen sich jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse bei Hirntumoren erzielen (Westphal et al. 1994; Stragliotto et al. 1996; Waksal 1999, Yang et al 2008). Ein neuer Vorstoß ist der Einsatz der so genannten RNA-Interferenz (RNAi), die zum Ausschalten des EGFR-Gens eingesetzt wird (Zhang et al. 2004).

Neben diesen vielen Ansatzpunkten gibt es noch einige andere Versuche, die direkt in die Signalwege der Tumorzellen eingreifen, zum Beispiel mit Substanzen, die spezifisch mit der PI3-Kinase interagieren (z.B. Wortmannin, LY294002) (Vara et al. 2004).

Diese Komplexität der verschiedenen Angriffsmöglichkeiten macht deutlich, dass die Signalwegsveränderungen in glialen Tumoren ein wichtiger Gegenstand weiterer Untersuchungen sind. Sie bieten die Grundlage zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

2.4. Signalwege

2.4.1. Zelluläre Signaltransduktion

Die Vermittlung extrazellulärer Stimuli ins Zellinnere geschieht häufig indirekt über in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptor-Proteine. Diese lösen Signalwegskaskaden aus, die intrazelluläre Mediatoren wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren beeinflussen.

Veränderungen im geregeltem Ablauf der zellulären Signalwege können zur Entstehung von Tumorzellen beitragen.

Im folgenden werden die Schritte und Faktoren der Signalwege beschrieben, die den Weg dieser Arbeit bestimmt haben. Abbildung 1 soll zur Verdeutlichung der Zusammenhänge eine Übersicht bieten und erhebt keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit.

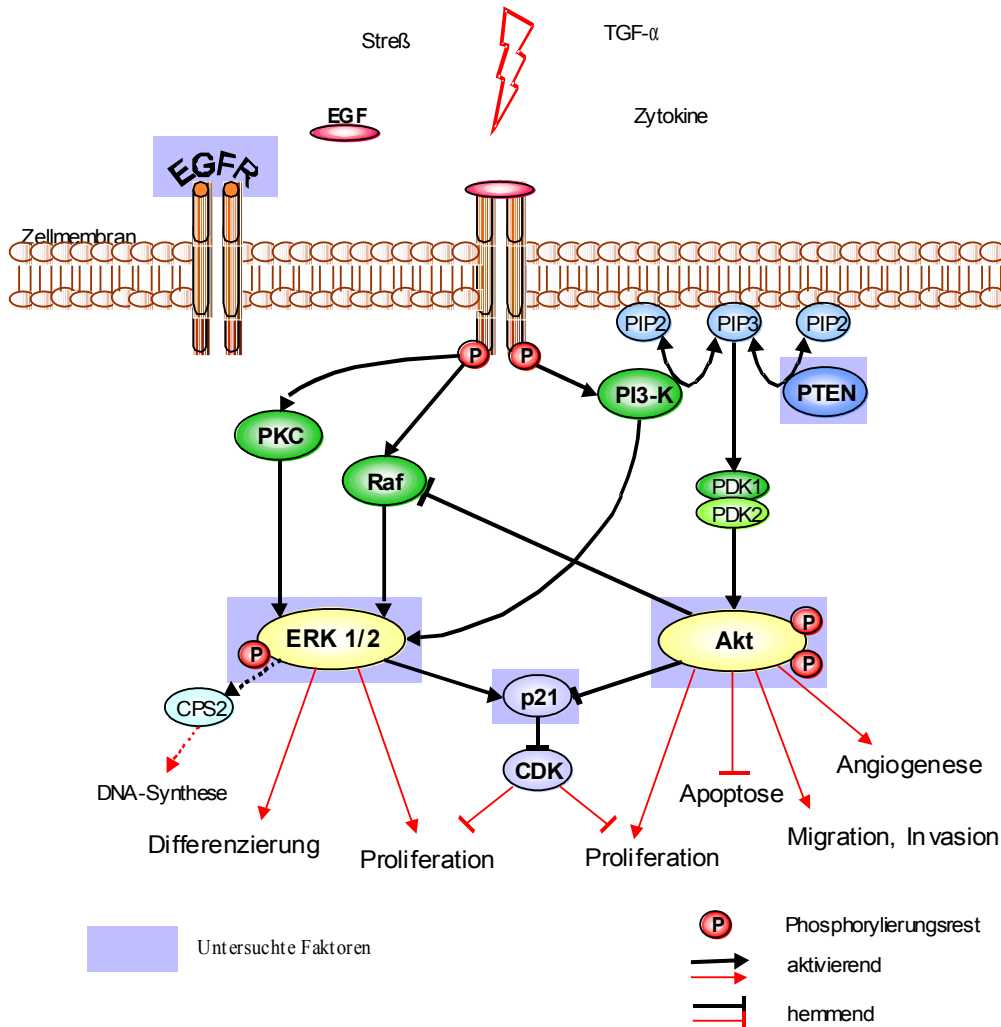


Abb. 1
Vereinfachte Darstellung der Signalwege, Bezug nehmend auf die untersuchten Faktoren

2.4.2. EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Viele intrazelluläre Signalkaskaden beginnen durch die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), die in der Zellmembran verankert sind.

RTKs übernehmen bei verschiedenen Zellantworten wie Proliferation und Zelldifferenzierung die Rolle des primären Überträgers (Zwick et al. 1999).

Eine typische RTK ist der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*Epidermal growth factor*, EGF), dessen Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 7 (7p12) liegt und in höhergradigen, glialen Tumoren häufig hohe Amplifikationsraten aufweist. In Glioblastomen beträgt die Amplifikationsrate 30 bis 40% (Libermann et al. 1984; Wong et al. 1987; Bigner et al. 1988). Daneben weist dieses Gen Veränderungen wie beispielsweise Deletionen auf (Libermann et al. 1985; Malden et al. 1988; Humphrey et al. 1990).

Das normale Produkt des EGFR-Gens ist ein transmembranäres Rezeptorprotein mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Es setzt sich aus drei Hauptdomänen zusammen. Extrazellulär liegt die Liganden-bindende Domäne, daran angrenzend folgt eine transmembranär verankerte, hydrophobe Domäne und intrazellulär im Zytoplasma schließlich eine als Tyrosin-Kinase katalytisch wirkende Domäne, deren Carboxy-terminales Ende intrazellulär liegt (Carpenter 1987; Carpenter, Cohen 1990; Waksal 1999).

Die Bindung spezifischer Liganden wie EGF und TGF- α (*Transforming growth factor alpha*) an die Zelloberfläche bewirken eine Transphosphorylierung und Dimerisation des Moleküls (Yarden 1987; Greenfield 1989).

Durch diese Konformationsänderung wird der EGFR in die Lage versetzt, weitere Substrate zu phosphorylieren und so die intrazelluläre Signalvermittlung in Gang zu bringen. Angetrieben werden zum Beispiel Proliferation, Migration, Zelldifferenzierung und Neovaskularisation sowie die Bildung von DNA. Der EGFR wird zu einem zentralen Element der Tumorentstehung und -progression (Waksal 1999).

Zum Beispiel werden durch die Autophosphorylierung des Rezeptors über SH2-Domänen Proteine wie Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) gebunden, wodurch wiederum so genannte kleine G-Proteine (*small G-Protein*, sGP) aktiviert werden (Cobb, Goldsmith 1995). Eines dieser sGPs ist Ras, welches mit Raf, einer weiteren Proteinkinase interagiert. Raf transloziert zur Plasmamembran und wird aktiviert. Anschließend aktiviert Raf so genannte MAPK-Kinasen (MAP2K oder ERK1/2K).

Die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 und der Proteinkinase B (Akt) über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) sind für diese Arbeit die wichtigsten über den EGFR vermittelten Signalwege.

2.4.3. ERK1/2 (extracellular signal-related kinase)

Die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) bilden eine große Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, die in vielen zellulären Abläufen wie zum Beispiel Zellproliferation und -differenzierung eine wichtige Rolle spielen.

Mitglieder dieser Familie sind ERK1/2 (*extracellular signal-related kinase*), JNK1/2/3 (*Jun amino-(N) terminal kinase*) und die p38-Proteine (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen folgt einem geordneten, kaskadenartigen Phosphorylierungssystem, an dessen Anfang ein extrazellulärer Stimulus und an dessen Ende die zelluläre Antwort steht (Abb. 2, frei nach *Cellsignal: Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade*).

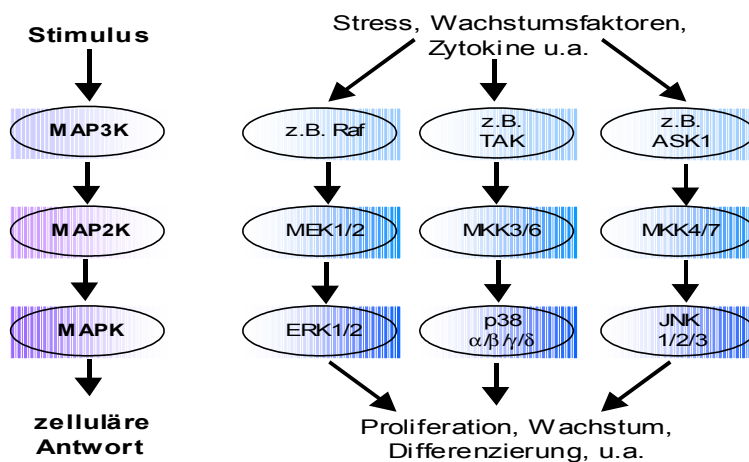


Abb. 2
MAPK- Signalwegskaskaden

Die direkte Aktivierung der MAPK geschieht über ihre Phosphorylierung durch die sogenannten MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K oder MAPKK). Diese werden zuvor durch MAP3-Kinasen (MAP3K oder MAPKKK) phosphoryliert. Die Aktivierung der MAP3K zu Beginn der Signalwegskaskade geschieht über Rezeptoren wie den EGFR. Diese phosphorylieren die MAP3K mittels verschiedener Proteinkinasen oder kleiner G-Proteine (sGP).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der MAPK ERK1/2. Die Phosphorylierung dieser MAPK kann über verschiedene MAP3K ausgelöst werden. Dazu gehört neben der Proteinkinase C vor allem Raf. Diese Proteinkinase wird nach Stimulierung des EGFR über Ras, ein kleines G-Protein, aktiviert. Bondeva et al. sprachen außerdem von einer Aktivierung der ERK1/2 durch PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), wobei PI3-K wiederum die Funktion einer Proteinkinase ausübt (Bondeva et al. 1998).

Das Ende des ERK1/2-Signalweges mündet schlussendlich in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die im Anschluss einer Translokation von ERK1/2 an den Zellkern erfolgt

(Chen et al. 1992; Traverse et al. 1992). Auf diese Weise beeinflusst ERK1/2 verschiedene zelluläre Abläufe.

Zur Steigerung der Proliferation wird zum Beispiel über Phosphorylierung der CPS2 (*Carbamoyl Phosphatase Synthetase 2*) die DNA-Produktion angeregt. Dieses Enzym beeinflusst die Biosynthese der Pyrimidin-Nukleotide und fördert somit die DNA-Synthese (Graves et al. 2000). ERK1/2 führt auf diesem Wege zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen.

Bei diesem Ablauf könnte auch die Lokalisation der phosphorylierten ERK1/2 eine entscheidende Rolle spielen. Zur direkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren finden sich die MAP-Kinasen im Zellkern. Es konnte jedoch eine Beeinflussung der Gentranskription über post-transkriptionelle Mechanismen durch die MAPK JNK in zytoplasmatischer Lokalisation nachgewiesen werden (Chang, Karin 2001). Auch ERK1/2 transloziert nach seiner Aktivierung nur zum Teil in den Zellkern, der Rest verteilt sich in verschiedenen zellulären Kompartimenten (Northwood et al. 1991; Takishima et al. 1991; Chang, Karin 2001).

Neben der Wirkung auf die Proliferation fanden sich Hinweise, dass ERK1/2 auch die Differenzierung der Zelle beeinflussen kann, offensichtlich abhängig von der Lage der Aktivierung (Traverse et al. 1997).

Außerdem scheint ERK1/2 bei anhaltender Phosphorylierung über die Aktivierung von p21^{CIP1/WAF1} negativ auf das Zellwachstum zu wirken. Durch das verstärkt aktivierte p21 kommt es zu einer Hemmung der CDK (*cyclin-dependent kinase*) und damit der Proliferation (Pumiglia, Decker 1997).

2.4.4. Proliferationsindex

Zum Nachweis proliferierender Zellen wurde durch Gerdes et al. (Gerdes et al. 1983) ein Antikörper (MIB1) entwickelt, der sich für die Routine-Diagnostik an FFPE Gewebe eignet.

Dieser monoklonale Antikörper weist ein nukleäres Antigen (Ki-67) nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G₁, S, G₂, M) zu finden ist und nur in der Ruhephase der Zellproliferation (G₀) fehlt (Gerdes et al. 1984).

Der MIB1-Antikörper eignet sich durch diese Eigenschaft sehr gut zum Nachweis proliferierender Zellen und ist der am häufigsten angewandte Antikörper in der Tumordiagnostik (Gerdes 1990; Rose et al. 1994; Lindboe, Torp 2002).

2.4.5. PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase)

Die Signalvermittlung von der Zellwand ins Innere der Zelle kann unter der Bildung von so genannten *second-messengern* ablaufen. Eine Gruppe dieser *second-messenger* wird aus den Phospholipiden der Zellmembran unter Mitwirkung des Enzyms Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) gebildet (Franke 1997). Dieses Enzym nimmt bei vielen funktionellen Reaktionen wie beispielsweise Proliferation, Motilität und Sekretion eine zentrale Rolle ein (Cataldi 2001).

Für einzelne dieser Funktionen wurden Untergruppen der PI3-K beschrieben, die nach Domin und Waterfield (Domin, Waterfield 1997) in drei Klassen unterteilt werden (siehe Tabelle nach Fruman et al. 1998).

Die Klassen ergeben sich aus der Zusammensetzung der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten der PI3-Kinasen. Außerdem werden jeder Gruppe einzelne Substrate zugeordnet, von denen die Signalübertragung und damit die spezifische Funktion ihren Ausgang nehmen soll.

Enzym	Katalytische Untereinheiten	Regulatorische Untereinheiten	In vitro Substrate
Class 1 _A PI3-K	p110 α	p85 α , p55 α , p50 α ,	PdtIns
	p110 β	p85 β , p55 γ	PdtIns-4,5-P
	p110 δ		PdtIns-4-P PdtIns-5-P
Class 1 _B PI3-K	p110 γ	p101	PdtIns PdtIns-4,5-P PdtIns-4-P
Class 2 PI3-K	PI3-KC2 α		PdtIns
	PI3-KC2 β		PdtIns-4-P PdtIns-4,5-P
Class 3 PI3-K		p150	PdtIns

Tabelle 2
Untereinheiten der PI3-Kinase

Die Aktivierung der PI3-K kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Vor allem die Klasse-1-Kinasen werden mit fast allen Rezeptor-vermittelten Signalwegen in Verbindung gebracht. Dabei kann die Bindung des Liganden entweder eine dem Rezeptor zugrunde liegende oder mit diesem assoziierte Tyrosinkinase-Aktivität hervorrufen. Eine andere Möglichkeit ist die Aktivierung von G-Proteinen, die über die Bindung von GTP zur Phosphorylierung der PI3-Kinasen führt (Domin, Waterfield 1997). Ein Beispiel hierfür ist wiederum die Aktivierung über den EGFR-Komplex.

Die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten, wodurch die Untereinheiten des Rezeptors in ihrer Konformation so geändert werden, dass die PI3-Kinase daran binden kann und ihrerseits phosphoryliert beziehungsweise aktiviert wird (Hemmings 1997). Ist diese Aktivierung eingetreten, übernimmt die PI3-K wie oben genannt unter anderem die Aufgabe zur Bildung von *second-messengern*.

Eine Gruppe der *second-messenger* wird aus dem Zellwandbestandteil Phosphatidylinositol (PdtIns) durch Phosphorylierung an seinen Hydroxylresten gebildet. Durch diesen Vorgang werden die Monophosphoinositide (PIP) PdtIns-3-P, PdtIns-4-P und PdtIns-5-P, die Bisphosphoinositide (PIP₂) PdtIns-3,4-P, PdtIns-3,5-P und PdtIns-4,5-P sowie das Trisphosphoinositid (PIP₃) PdtIns-3,4,5-P gebildet (Fruman et al. 1998).

Die interessantesten *second-messenger* für die vorliegende Arbeit sind PdtIns-3,4-P und PdtIns-3,4,5-P.

Die Bildung von PdtIns-3,4-P führt offensichtlich zu einer direkten Aktivierung von Akt (Franke et al. 1997), aber auch PdtIns-3,4,5-P kann über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Phosphat abhängigen Kinase 1 (*phosphatidylinositol-3-phosphate dependent kinase*; PDK1) Akt phosphorylieren (Alessi et al. 1997).

2.4.6. Akt / PKB (Proteinkinase B)

Bei der Kinase Akt handelt es sich um das zelluläre Homologon (c-akt) von v-akt, einem retroviralen Onkogen, das zunächst aus den Zellen einer T-Zell-Leukämie isoliert werden konnte (Bellacosa et al. 1991; Kumar et al. 2001).

Akt ist eine Serin-/ Threoninkinase, deren katalytische Domäne denen der Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC) ähnelt, weswegen sie auch den Namen Proteinkinase B (PKB) beziehungsweise RAC (*related to A and C kinase*) erhalten hat (Kumar et al. 2001). RAC findet jedoch wegen der Ähnlichkeit des Namens mit dem kleinen G-Protein „Rac“ keine Verwendung mehr (Vanhaesebroeck, Alessi 2000).

Es wurden bisher drei Isoformen beschrieben, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ . Ihre Unterschiede liegen zum einen in ihrer chromosomalen Lage, aber auch in der Intensität ihrer Ausprägung in einzelnen menschlichen Organen (Chan et al. 1999). Beispielsweise findet sich im Hirngewebe eine wesentlich stärkere Expression von Akt1 und Akt3 als von Akt2 (Chan et al. 1999).



Abb. 3
Schematische Grundstruktur von Akt

Der Aufbau der drei Unterformen von Akt ist in der Grundstruktur gleich (Abb. 3).

Sie setzt sich aus einer N-terminalen PH-Domäne (*Pleckstrin homology*, PH), einer katalytischen Proteinkinase-Region und einem kurzen Carboxy-terminalen Ende zusammen (Kumar et al. 2001).

Die Aktivierung der Akt folgt vor allem durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die Zelloberfläche. Diese sind zum Beispiel PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) oder auch Insulin (Burgering, Coffey 1995). Dadurch kann der Aktivierungsweg über die PI3-K seinen Lauf nehmen.

Ein wichtiges Element in der Aktivierung von Akt ist die PH-Domäne, an die eine Bindung von Phospholipiden erfolgt, so auch die Produkte der PI3-Kinase PdtIns-3,4-P und PdtIns-3,4,5-P.

Bei einer Aktivierung des EGF-Rezeptors transloziert Akt zur Zellmembran, wo die Bindung stattfindet.

Es tritt eine Konformationsänderung von Akt ein, die eine Phosphorylierung der Untereinheiten Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ erleichtert (Hemmings 1997).

Diese Phosphorylierung am Serin- beziehungsweise Threoninrest (Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸) ist der entscheidende Vorgang in der Aktivierung von Akt. Voraussetzung für die Aktivität ist immer die gleichzeitige

Phosphorylierung beider Reste. Diese wird durch Kinasen katalysiert, die als Phosphatidylinositol-3-Phosphat abhängige Kinasen (*phosphatidylinositol-3-phosphate dependent kinase*, PDK) bezeichnet werden.

Der Mechanismus, der zur Phosphorylierung des Threoninrestes führt, ist weitgehend bekannt. Die betreffende Kinase erhielt den Namen PDK1 (Vanhaesebroeck, Alessi 2000).

Die Phosphorylierung des Ser⁴⁷³-Restes scheint auf einem ähnlichen Wege abzulaufen, so dass die Existenz einer PDK2 postuliert wurde, die noch nicht näher identifiziert werden konnte. Weiterführende Untersuchungen zeigen eine Aktivierung von Akt1 an Ser⁴⁷³ durch die Proteinkinase C α (PKC α), die dadurch als PDK2-Kandidat in Frage kommt (Partovian, Simons 2004). Aber auch die Autophosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ im Anschluss an die Aktivierung von Thr³⁰⁸ (Aoki et al. 1998; Alessi DR et al. 1997) und die Funktion von ILK (*integrin-linked kinase*) wurden diskutiert (Delcommenne et al. 1998; Lynch et al. 1999; Persad et al. 2001).

Eine entscheidende Rolle spielt Akt bei Proliferation, Genexpression und Apoptose durch die indirekte Beeinflussung von Translation und Transkription.

Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von FRAP/ TOR (*FK506 binding protein-rapamycin-associated protein / target of rapamycin*) durch Akt. Die aktivierte FRAP-Kinase aktiviert wiederum die p70 S6 Kinase (Kinase für das ribosomale Protein S6), wodurch vermehrt Signale zur erhöhten Translation von mRNA vermittelt werden (Aoki et al. 1998). Über diesen Weg scheint im Zellzyklus die Progression von der G1-Phase zur S-Phase reguliert zu werden (Dudek et al. 1997).

Ein weiterer Mechanismus ist die Phosphorylierung von Pro-Caspase-9 durch Akt, welche eine Hemmung derselben bewirkt. Pro-Caspase-9 setzt normalerweise eine Kaskade mehrerer Caspasen (*cytosolic aspartate specific cysteine protease*) in Gang, die verschiedene apoptotische Veränderungen hervorrufen. Durch die Hemmung der Pro-Caspase-9 können diese Vorgänge nicht mehr oder nur in geringerem Maße ablaufen und es kommt zu einer Verminderung der apoptotischen Effekte (Cardone et al. 1998).

Außerdem wird Akt zugesprochen, die Lokalisation von p21 zu beeinflussen (Zhou et al. 2001), einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin-dependent Kinase*, CDK), auf die weiter unten genauer eingegangen wird.

Neben den komplexen Aktivierungsmechanismen der Akt und den vielfältigen Funktionen, die sie nach sich zieht, ist bisher nur ein Mechanismus bekannt, der zu einer direkten Hemmung der Akt-Aktivität führt. Es handelt sich hierbei um das Produkt des als Tumor-Suppressor-Gen beschriebenen PTEN.

2.4.7. PTEN – Protein (phosphatase and tensin homology)

Für eine Vielzahl von Tumoren, so auch für gliale Tumore, wurden verschiedene Deletionen auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q22-25) nachgewiesen. Mit PTEN konnte einem dieser Loci ein Genprodukt mit hohem Einfluss auf das Tumorgeschehen zugewiesen werden.

Die Identifizierung dieses Gens gelang zeitgleich verschiedenen Gruppen (Li et al. 1997; Steck et al. 1997; Li, Sun 1997), woraus mehrere Namen für dasselbe Gen hervorgingen, MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancers*), TEP1 (*TGF- α -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase*) und PTEN (*phosphatase and tensin homolog*). Letzter ist die offizielle Bezeichnung der *Human Gene Organisation* (HuGO).

Die Lokalisation von PTEN auf Chromosom 10q23 ist eine Region mit sehr hoher Anzahl an mutagenen Veränderungen, die vor allem in den späten Stadien von Tumoren nachzuweisen sind.

In hochgradigen glialen Tumoren findet sich in bis zu 40% der Fälle eine Mutation im PTEN-Gen.

Während der Tumorprogression treten diese Veränderungen häufig in beiden Allelen auf (Li et al. 1997; Liu et al. 1997; Rasheed et al. 1997; Wang et al. 1997; Duerr et al. 1998). Weitere PTEN-Mutationen wurden auch bei autosomal-dominant vererbten Krankheiten mit erhöhter Prädisposition zu kanzerogenen Veränderungen wie der Cowden-Krankheit oder dem Bannayan-Zonana-Syndrom gefunden (Wang et al. 1997; Furnari et al. 1998; Cantley, Neel 1999).

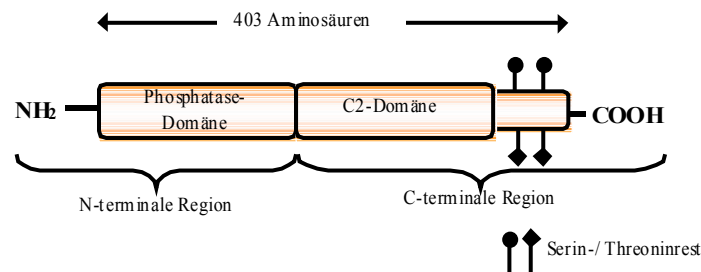


Abb. 4
Schematische Darstellung der Domänen des PTEN-Proteins

Der Aufbau des PTEN-Produktes untergliedert sich in zwei Hauptdomänen (Lee et al. 1999) (Abb. 4). Die eine besitzt eine starke Ähnlichkeit mit dem katalytischen Zentrum der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Dieser Region wird die Fähigkeit zugesprochen, bestimmte Phosphotyrosine zu binden und zu dephosphorylieren. Die andere Hauptdomäne, die C₂-Domäne, bindet Phospholipide, wodurch das PTEN-Molekül der Plasmamembran zugewandt wird und die katalytische Domäne ihre Substrate erreicht (z.B. PtdIns-3,4,5-P) (Yamada, Araki 2001).

Daneben konnten noch andere Regionen identifiziert werden, deren genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Eine dieser Regionen, welche wie die Phosphatase-Domäne am amino-terminalen Ende von PTEN liegt, besitzt eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu Tensin und Auxillin und scheint in Zelladhäsions- und Zellmigrationsvorgänge involviert zu sein (Yamada, Araki 2001).

Auch dem C-terminalen Ende von PTEN werden verschiedene Funktionen zugetragen.

Die Phosphorylierung an verschiedenen Serin- oder Threonin-Resten (Ser³⁸⁰, Thr³⁸², Thr³⁸³) kann die enzymatische Aktivität und die Stabilität von PTEN beeinflussen. Dephosphorylierung oder Verlust des C-terminalen Endes können zu einer verstärkten Phosphatase-Aktivität oder zur Degradierung des Proteins führen (Vasquez et al. 2000).

Die bisher bekannten Hauptfunktionen von PTEN liegen in seiner Aktivität als Phosphatase sowohl gegenüber Lipiden und als auch Proteinen.

Das bedeutendste Substrat ist Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PtdIns-3,4,5-P), das Hauptprodukt der PI3-Kinase.

PTEN spaltet von PtdIns-3,4,5-P den Phosphatrest an der dritten Position, so dass Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PtdIns-4,5-P) entsteht. Die Funktion von PtdIns-3,4,5-P geht verloren (Maehama, Dixon 1998).

PTEN wird durch diese Phosphatase-Aktivität zu einem direkten Regulator der PI3-K.

Wie oben beschrieben ist die PI3-K für die Bildung von PtdIns-3,4,5-P aus PtdIns-4,5-P zuständig. Je mehr PtdIns-3,4,5-P auf diesem Weg gebildet wird, desto stärker wird Akt aktiviert und desto mehr anti-apoptotische Signale gelangen über diesen Signalweg in die Zelle.

Durch die vermehrte Dephosphorylierung von PtdIns-3,4,5-P durch PTEN, wird der Mechanismus der Akt-Aktivierung abgeschwächt oder verhindert (Maehama, Dixon 1998).

PTEN kann auf diese Weise seiner Funktion im Sinne eines Tumor-Suppressor-Gens gerecht werden. Die Annahme, dass ein Verlust des PTEN-Gens ein Tumorwachstum herbeiführt, wird durch den Verlust der Regulierung anti-apoptotischer Funktionen der Zelle erklärt.

2.4.8. p53 - Protein

Das p53-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 (17p13) übernimmt vielfältige Kontrollfunktionen im Zellwachstum. Es reguliert die Zellproliferation und -transformation zum Beispiel nach DNA-Schädigung. Eine Möglichkeit des Eingreifens, ist die direkte Hinderung der Zelle an ihrem Wachstum, solange bis Reparationsmechanismen greifen können. Oder aber es werden durch p53 Signalwege aktiviert, die zum programmierten Zelltod führen (Lane 1992). Daher erhielt p53 den Status eines Tumor-Suppressor-Gens. Der p53 induzierte Zellzyklus-Stop und die Apoptose laufen vor allem über den Weg der Gen-Transkription ab. Unter die dabei gebildeten Genprodukte fallen zum Beispiel der Apoptose-induzierende Faktor Bax, das Zellzyklus-assoziierte Protein Cyclin G und p21, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin dependent Kinase*, CDK) (Cox 1997).

Das Produkt des normalen p53-Gens reagiert nur unter bestimmten zellulären Bedingungen. Diese sind zum Beispiel DNA-Schädigungen durch UV- oder γ -Bestrahlung, p53 wird dann als *wild-type* p53 (wt-p53) bezeichnet (El-Deiry et al. 1993).

In Tumorzellen finden sich häufig Mutationen und Deletionen, die eine Bildung des funktionstüchtigen wt-p53-Proteins verhindern und zu einer nachweisbaren Akkumulation eines Funktionslosen Produktes führen können (Vojtesek et al. 1992). Auch Genverluste mit vollständigem Fehlen oder mit Expression eines Funktionslosen p53-Proteins, wodurch es zu einem Kontrollverlust in der Zellregulation kommt, wurden beschrieben (El-Deiry et al. 1993).

2.4.9. p21^{WAF1/CIP1/SDI1} - Protein

Das p21-Gen wird unter anderem durch p53 transkriptional aktiviert. Seine Beschreibung fand relativ zeitgleich unter verschiedenen Voraussetzungen statt.

El-Deiry et al. untersuchten den direkten Zusammenhang zwischen dem beschriebenen Gen auf Chromosom 6p21.2 und p53. Es erhielt aufgrund dessen die Bezeichnung WAF1 (*wild-type p53-activated fragment 1*) (El-Deiry et al. 1993). Etwa zur gleichen Zeit wurde von Harper et al. die Entdeckung eines für ein 21-Kilo-Dalton-Protein kodierenden Gens veröffentlicht, welches bei der genaueren Untersuchung von Proteinen, die mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin dependent Kinase*, CDK) interagieren, isoliert werden konnte und daraufhin CIP1 (*CDK-interacting protein*) genannt wurde (Harper et al. 1993). Noda et al. beschrieben schließlich 1994 das sogenannte SDI1 (*senescent cell-derived inhibitor*) (Noda et al. 1994), welches sich als gleiches Produkt wie WAF1 und CIP1 erwies.

Seine wichtigste Funktion übernimmt p21 als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin dependent Kinase*, CDK) (Harper et al. 1993; Xiong et al. 1993).

CDKs können verschiedene Substrate, die in den Zellzyklus involviert sind, beeinflussen. Ein Beispiel ist ein Produkt des Retinoblastoma-Gens (*product of Rb*, pRb). pRb wird durch die CDKs phosphoryliert. Nur im phosphorylierten Zustand fördert es den Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase. Auf diese Weise können CDKs die Progression des Zellzyklus fördern (Harper et al. 2001).

Die Hemmung der CDK durch p21 geschieht durch eine Interaktion zwischen dem N-terminalen Ende von p21 und der CDK (Hsiao et al. 1997). Dadurch wird die CDK in ihrer Funktion behindert. Die Folge ist eine Unterbrechung des Zellzyklus durch den fehlenden Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase (El-Deiry et al. 1994).

Diese Fähigkeit des p21-Proteins, das Zellwachstums aufzuhalten beziehungsweise zu stoppen, scheint stark an seine Lokalisation gebunden zu sein (Asada et al. 1999; Zhou et al. 2001). Um mit der CDK interagieren zu können, muss p21 in den Zellkern wandern (Hsiao et al. 1997). Der Mechanismus, der für den Transport vom Zytoplasma in den Zellkern und zurück zuständig ist, ist noch nicht endgültig geklärt. Zhou et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem „Anti-Apoptose-Faktor“ Akt und p21. Akt phosphoryliert p21 an einem Tyrosinrest, woraufhin eine Translokation in das Zytoplasma stattfindet und die hemmende Wirkung von p21 nicht mehr greifen kann (Zhou et al. 2001).

3. Zielsetzung der Arbeit

Die Ursache der Progression glialer Hirntumore liegt in erster Linie in genetischen Veränderungen, die durch eine abgewandelte Proteinexpression Einfluss auf die intrazellulären Signalwege nehmen. Durch die wegfallende Regulation der Signalwege kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und programmiertem Zelltod.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der Nachweis solcher Signalwegsveränderungen auch an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe (*formalin fixed paraffin embedded*, FFPE) *in situ* mittels seit kurzem zur Verfügung stehender Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper möglich ist. Angewendet wurden Antikörper gegen die phosphorylierte MAP-Kinase ERK1/2 sowie gegen die phosphorylierte Proteinkinase B (Akt).

Hierfür sollte zunächst der Gebrauch dieser Antikörper in der Immunhistochemie an FFPE mit dem Einsatz im Western-Blot verglichen werden. An FFPE wurde außerdem die Spezifität der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper im Vergleich zu dem entsprechenden Gesamt-Antikörper untersucht.

Unter Berücksichtigung einer der häufigsten Genveränderungen in glialen Hirntumoren, dem Gen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), über dessen Rezeptor-Protein ERK1/2 und Akt aktiviert werden, wurde die EGFR-Expression immunhistochemisch nachgewiesen.

Basierend auf weiteren genetischen Veränderungen, die vor allem in Glioblastomen vorkommen, wurden in die Untersuchungen PTEN (*phosphatase and tensin homology*) sowie p53 und p21 einbezogen. Um Rückschlüsse auf den proliferativen Einfluss dieser Faktoren zu ziehen, kam als Proliferationsmarker MIB1 zum Einsatz.

Darüber hinaus sollte mittels Tissue Arrays eine Methode überprüft werden, welche den Einsatz der Antikörper an großen Kollektiven erlauben würde. Hierbei stellte sich die Frage, ob diese Methode der Heterogenität der untersuchten Tumore gerecht wird.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräte und Hilfsmittel

	Geräte	Firma	
<u>Immunhisto- chemie</u>	Rotationsmikrotom HM355S	Microm International GmbH, Walldorf, BRD	
	Kühlplatte Tissue Cool Plate COP20, Paraffin-Streckbad TFB35, Objektträger-Streckbank OTS40, Objektträger-Eindeckautomat RCM2000, Tissue Stainers COT20	Medite Medizintechnik, Burgdorf, BRD	
	Trockenschrank TypBE400	Memmert GmbH & CoKG, Schwabach, BRD	
	Objektträger SuperFrostPlus, Deckgläschen (24 x 50 mm)	R. Langenbrink, BRD	
	Covermount (Einschlußmittel für die mikroskopische Technik)	über Labonord, BRD, von HistoLab, Gothenburg, Schweden	
	DAKO TechMate™ 500 Plus, DAKO TechMate™ Horizon Automated Immunostainer, Kapillarspaltobjektträger	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD	
	Secureline Marker II permanent solvent resistant	Precision Dynamics Corporation, San Fernando, CA, USA	
	Mikrowelle NN-T259W Mikrowelle MWD1820 Duo	Panasonic, Matsushita Electric, Cardiff, UK Bauknecht, BRD	
	Fissler Vitarit Schnellkochtopf	Fissler GmbH, Hoppstädten-Weiersbach, BRD	
	Heizplatte Ikatherm HP30 digital, Ika-Vibro-Fix VF2	Janke und Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, BRD	
	pH-Meter WTW Mikroprozessor pH-mV-Meter pH538	wissenschaftliche technische Werkstätten GmbH, Weilheim, BRD	
	Feinwaage Sartorius universal Präzisionswaage Fi210	Sartorius GmbH, Göttingen, BRD Willi Fischer oHG, Frankfurt am Main, BRD	
	Pipetman	Gilson, über Abimed, Langenfeld, BRD	
	Tissue-Arrayer	Alpha Metrix Biotech GmbH, Rodgau, BRD	
	Mikroskop Zeiss Axioplan	Zeiss, Jena, BRD	
	3CCD Color Video Camera	Sony Deutschland GmbH, Köln-Ossendorf, BRD	
	Brutschrank FunctionLine	Heraeus instruments GmbH, Hanau, BRD	
	<u>Western- Blot- Analyse</u>	Glas-Homogenisatoren	Schott AG, Mainz, BRD
		Centrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln, BRD
Pipetten und Zubehör			
Spektralfotometer DU530		Beckmann, Fullerton, CA, USA	
PVDF-Imobilon-Membran		Milipor, Bedford, MA, USA	
Gel-Blotting-Papier		Schleicher und Schuell, Dassel, BRD	
Gel-Elektrophorese-Kammer (Mini-Protean II cell chamber), Blot-Kammer (Semi-Dry Transfer Cell)		BioRad, Hercules, CA, USA	
Spannungsquelle Pharmacia LKB ECPS 3000/150		Pharmacia LKB, Freiburg, BRD	
Röntgenfilm Kodak x-OMAT-MA		Eastman Kodak, Rochester, USA	

Tabelle 3

Namen und Herkunftsangabe verwendeter Hilfsmittel und technischer Geräte

4.1.2. Puffer und Lösungen

4.1.2.1. **Puffer und Lösungen für die immunhistochemischen Färbungen**

Die Entparaffinierung der Präparate wurde in Xylol, sowie 96%igem und 70%igem Alkohol durchgeführt.

Für die Trispuffer-Stammlösung wurden folgende Materialien verwendet:

Trizma-Base T-1503 von Sigma, Steinheim, BRD, 2 N Salzsäure der Apotheke des Klinikums Rechts der Isar (Rdl) der Technischen Universität München, NaCl von Merck KgaA, Darmstadt, BRD.

Der Citratpuffer 10 mMol, pH 6,0 wurde mit Citronensäuremonohydrat von Merck und 2 N Natronlauge der Apotheke des Rdl in destilliertem Wasser hergestellt und bei 4°C gelagert.

Das Wasserstoffperoxid 30%ig und Methanol stammen ebenfalls von Merck.

Für die Färbung in den Maschinen von DAKO wurden als Puffer der DAKO ChemMate™ Buffer Kit und zur Verdünnung der Primärantikörper das DAKO ChemMate™ Antibody Diluent, beide DAKO, Glostrup, Dänemark verwendet.

4.1.2.2. **Puffer und Lösungen für die Westernblot-Analyse**

Die Chemikalien zur Proteinisolierung (Protein-Assay) wurden über BioRad, München, BSA von Roth, Karlsruhe, beide BRD bezogen.

Für den Blot stammten die chemischen Bestandteile von Boehringer Ingelheim Bioproducte, Ingelheim, BRD, das ECL-Reagenz von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, BRD.

4.1.2.2.1. **Proteinisolierung / quantitative Proteinbestimmung**

Zell-Lyse-Puffer	20mM Tris-Cl (pH 7,5) / 150mM NaCl / 1mM EDTA / 1mM EGTA / 1% Triton-x-100 / 2,5mM Natrium Pyrophosphat / 1mM β -Glycerolphosphat / 1mM Na_3VO_4 / 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin / 1mM PMSF
PBS-Puffer (pH 7,4)	138mM NaCl / 4,3mM Na_2PO_4 / 1,4mM KH_2PO_4
Bradford-Reagenz	0,01%iges Coomassie Brilliant Blau G-250 / 4,7% Ethanol / 8,5% Phosphorsäure / Aqua bidest. ad 1l

4.1.2.2.2. **Gel-Elektrophorese / Western-Blot**

TBS-Puffer (pH 7,5)	20mM Tris / 138mM NaCl
TTBS (TBS+Tween)	20mM Tris / 138mM NaCl / 0,1% Tween20
SDS-Ladepuffer	312,5mM Tris-Cl pH6,8 / 10% SDS / 50% Glycerol / 250mM DTT / 0,05% Bromphenol-Blau
SDS-Laufpuffer	25mM Tris / 192mM Glycin / 1% SDS
SDS-Gel	30% PAA / 1M Tris-Cl pH8,8 / 20% SDS / 10% APS / TEMED / Aqua bidest.
Anodenpuffer 1	30mM Tris / 20% Methanol / Aqua bidest. ad 500ml
Anodenpuffer 2	25mM Tris / 20% Methanol / Aqua bidest. ad 500ml
Kathodenpuffer	25mM Tris / 20% Methanol / 40mM ϵ -Amino-n-Capron-Säure / Aqua bidest. ad 500ml

4.1.3. Antikörper

4.1.3.1. Primärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Ursprung	Methode	Verdünnung
EGF-Rezeptor-Antikörper	Gesamt-EGF-Rezeptor-Protein (Phosphorylierungsgrad-unabhängig)	polyklonales Kaninchen-IgG	IHC	1:50
p44/42-MAP-Kinase-Antikörper	Gesamt-MAP-Kinase p44/p42 (ERK1/2).	polyklonales Kaninchen-IgG	IHC	1:200
Phospho-p44/42-MAP-Kinase-Antikörper	phosphorylierte Thr ²⁰² - und Tyr ²⁰⁴ - Reste der p44/p42 MAPK (ERK1/2)	polyklonales Kaninchen-IgG	IHC / <i>Western-Blot</i> -Analyse	1:200 / 1:1000
Akt-Antikörper	Gesamt-Akt-Protein (Unterformen Akt1, Akt2, Akt3)	polyklonales Kaninchen-IgG	IHC	1:100
Phospho-Akt-(Ser ⁴⁷³)-Antikörper	phosphorylierte Ser ⁴⁷³ -Reste von Akt1 (Akt2, Akt3 an äquivalenten Positionen)	polyklonales Kaninchen-IgG	<i>Western-Blot</i> -Analyse	1:1000
Phospho-Akt-(Ser ⁴⁷³)-Antikörper (IHC-spezifisch)	phosphorylierte Ser ⁴⁷³ -Reste von Akt1 (Akt2, Akt 3 an äquivalenten Positionen)	polyklonales Kaninchen-IgG	IHC	1:50
PTEN-(26H9)-Antikörper	54 kDa PTEN-Protein	monoklonales Maus-IgG, Isotyp IgG2b	IHC	1:100
p53-Protein-Antikörper	Epitop des humanen p53-Proteins zwischen den AS 19 und 26	monoklonales Maus-IgG, Isotyp IgG2b, kappa	IHC	1:200
p21 ^{WAF1/CIP1} -Antikörper	p21-Protein	monoklonales Maus-IgG, Isotyp IgG1, kappa	IHC	1:80
Ki-67- Antikörper (Klon MIB1)	nukleäres Ki-67-Antigen und Fragmente des Ki-67-Moleküls	monoklonales Maus-IgG, Isotyp IgG1	IHC	1:250

Tabelle 4

Beschreibung der verwendeten Antikörper

Die Antikörper gegen EGF-Rezeptor-Protein, p44/42-MAP-Kinase, Phospho-p44/42-MAP-Kinase, Akt, Phospho-Akt und gegen das PTEN-Protein stammen von *Cell Signalling Technology*, New England Biolabs, Inc., Beverly, USA.

Die Antikörper gegen p53-Protein (Klon DO-7), p21^{WAF1/CIP1} (Klon SX118) und gegen Ki-67- Antigen (Klon MIB1) wurden bezogen von DAKO, Glostrup, Dänemark.

4.1.3.2. Sekundärantikörper / Konjugate / Substrate

Sämtliche immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem DAKO ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse oder dem DAKO ChemMate™ Detection Kit APAAP Mouse von DAKO, Glostrup, Dänemark durchgeführt.

Zur Blockung unspezifischer Hintergrundfärbung wurde 10%iges nicht-immunisiertes Ziegen Serum aus dem Non-Biotin-Kit von Zytomed GmbH, Berlin verwendet.

4.1.4. Tumormaterial

4.1.4.1. Paraffin eingebettete Proben

Ein Teil der in Paraffin eingebetteten Tumoren stammt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und pathologische Anatomie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München aus den Jahren 1991 bis 2000. Der andere Teil, der ausschließlich ependymale und subependymale Tumore beinhaltet, stammt aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg aus den Jahren 1995 bis 1999. Jeder Tumor wurde nochmals von einem Facharzt für Neuropathologie anhand der WHO-Klassifikation auf seine Diagnose hin überprüft und gegebenenfalls revidiert.

<u>Astrozytär/ Oligodendroglial</u> Diagnose	Anzahl gesamt	Geschlecht		Ø-Alter (Jahre) gesamt	Geschlecht		Range (Jahre)		Anzahl Rezidive gesamt
		♂	♀		♂	♀	Jüngster Patient	Ältester Patient	
Pilozytisches Astrozytom	3	3	0	43	43	-	15	74	0
Astrozytom	10	6	4	54	54	55	31	77	2
Oligodendrogliom	2	1	1	51	28	75	28	75	0
WHO II	12	7	5	54	50	59	28	77	2
Anaplastisches Astrozytom	19	10	9	48	47	49	16	88	6
Anaplastisches Oligo-Astrozytom	4	2	2	45	56	34	32	69	3
Anaplastisches Oligodendrogliom	3	1	2	49	51	47	47	51	2
WHO III	26	13	13	48	49	47	16	88	11
Gliosarkom	5	5	0	57	57	-	56	59	0
Riesenzell-Glioblastom	4	1	3	60	48	64	48	70	1
Glioblastom	100	49	51	60	59	61	17	85	35
WHO IV	109	55	54	60	59	61	17	85	36
gesamt	150	78	72	57	56	58	15	88	49

Tabelle 5a

Klinische Daten zu den untersuchten Tumorpräparaten mit astrozytären und oligodendroglialen Anteilen

<u>Ependymal</u>	Anzahl	Geschlecht		Ø-Alter (Jahre)	Geschlecht		Range (Jahre)		Anzahl Rezidive
		gesamt	♂		♀	gesamt	♂	♀	
Subependymom	6	3	3	54	62	45	38	63	0
Myxopapilläres Ependymom	22	12	10	39	37	41	19	66	4
Ependymom	31	14	17	52	51	53	29	76	4
Anaplastisches Ependymom	10	2	8	42	60	37	1	72	0
gesamt	69	31	38	47	47	46	1	76	8

Tabelle 5b

Klinische Daten zu den untersuchten Tumorpräparaten mit ependymalen Anteilen

4.1.4.2. Tiefgekühlte Tumorproben

Die tiefgekühlten Proben stammen ebenfalls aus dem Archiv der Technischen Universität München aus den Jahren 1996 bis 2000.

Untersucht wurden fünf Tumore, vier Glioblastome sowie ein Gliosarkom. Es handelt sich bei diesen um Gewebe der entsprechend in Paraffin eingebetteten Präparate mit den Nummern 43, 64, 66, 97 und 146.

4.2. Methoden

4.2.1. Proteinisolierung

Die Proteinextraktion aus Tumor-Frischgewebe wurde in Anlehnung an die Aufzeichnungen von Sambrook durchgeführt (Sambrook et al. 1989).

Die Gewebeproben wurden in vorgekühlten Glasgefäßen mit jeweils 5ml Lysepuffer homogenisiert und für 10min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben erneut homogenisiert und auf saubere Eppendorf-Hütchen verteilt. Diese wurden zentrifugiert (15min bei 4°C und 10000 Umdrehungen), der Überstand in frische Hütchen pipettiert und zur weiteren Proteinbestimmung bei Minus 20°C eingefroren.

4.2.2. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford-Assay)

Das verwendete Prinzip der quantitativen Proteinbestimmung wurde 1976 von *Bradford* beschrieben.

Nach Zugabe von *Coomassie*-Blau in das zu untersuchende Proteingemisch binden die Proteine an den Farbstoff. Hieraus resultiert eine Veränderung des Absorptionsmaximums (von 465nm zu 595nm). Zur quantitativen Bestimmung macht man sich zunutze, dass die bei 595nm gemessene Absorption proportional zur Proteinmenge ist (Bradford 1976).

Die Proteinextrakte wurden zunächst mit PBS auf 1 zu 10 verdünnt und durchmischt. Dieses Gemisch wurde zur Herstellung der Probenlösung zum einen auf eine Konzentration von 1 zu 250 mit PBS zum

anderen auf 1 zu 500 mit PBS und 0,01%igem Triton-x-100 versetzt, so dass jeweils 400µl Probenlösung zur Verfügung standen.

Zum Vergleich diente eine aufsteigende Reihe Protein-Standardlösung (je 400µl) aus bovinem Serum-Albumin (BSA), die mittels nebenstehender Tabelle hergestellt wurde.

Jede Probenlösung sowie die Standardlösungen wurden mit 600µl *Bradford*-Reagenz versetzt, durchmischt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption wurde anschließend bei 595nm gemessen und die Konzentration anhand des Proteinstandards berechnet.

BSA-Proteingehalt in µg je 400µl	BSA (0,2mg/ml) in µl	Triton-x-100 (0,01%ig) in µl
0	-	400
2	10	390
4	20	380
6	30	370
8	40	360

Tabelle 6
Verdünnungsangaben für die verwendete Protein-Standardlösung

4.2.3. Western-Blot-Analyse

4.2.3.1. **Gel-Elektrophorese (SDS-Page)**

Von den isolierten Proteinen wurden je 10µg mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5min bei 94°C denaturiert. Diese Lösung wurde nochmals abzentrifugiert (10sec) und der Ansatz auf 10%iges Standardgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 80 Volt für 90min durchgeführt.

4.2.3.2. **Western-Blot**

4.2.3.2.1. **Protein-Transfer**

Die Blottung der SDS-Gele wurde nach Sambrook (Sambrook et al. 1989) im *Semi-Dry*-Verfahren für 1h bei 200mA durchgeführt. Das System besteht aus 3 Puffern, zwei Anoden- und einem Kathodenpuffer zwischen denen das Protein-beladene Gel über eine Polyvinyl-Difluorid-Membran (*Polyvinylidene difluoride*, PVDF) geblottet wird. Als Träger der Elektroden-Puffer wurde spezielles Blotting-Papier verwendet.

4.2.3.2.2. **Immunreaktion und Proteindetektion**

Nach diesem Vorgang wurde die Membran für 1h in einer Lösung aus TTBS-Puffer und 5%igem Fettfreiem Magermilchpulver geblockt, anschließend in TTBS gespült und mit dem Primärantikörper (pAkt und pERK1/2 je 1 zu 1000 in TTBS) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Danach wurde die Membran erneut gespült (3 mal 5min in TTBS) und mit dem Sekundärantikörper versetzt (1 zu 2000 in TTBS + 5%igem fettfreiem Magermilchpulver). Dieser wurde 1h bei Raumtemperatur belassen und im Anschluss daran wiederum mit TTBS (3 mal 5min) gespült.

Die Detektion erfolgte mittels einer Fluoreszenz-Lösung (ECL-Reagenz), die an den Sekundärantikörper bindet und anschließend durch hochsensible Röntgenfilme dauerhaft sichtbar gemacht werden kann. Die Expositionszeit des Röntgenfilmes betrug 2,5min.

4.2.4. Immunhistochemie

4.2.4.1. Vorbehandlungen

Die immunhistochemische Untersuchung wurde nach bekannten in der Routine eingesetzten Maßstäben durchgeführt (beschrieben bei Noll, Schaub-Kuhnen 2000). Die verwendeten Gewebeschnitte hatten eine Dicke von 3µm und wurden auf Objektträgern über Nacht bei 60°C angetrocknet.

Nach der Entparaffinierung wurden die Präparate zur Antigendemaskierung vorbehandelt.

4.2.4.1.1. Hitzedemaskierung im Druckkochtopf

Nach Norton et al. 1994 wurden zwei Liter Citratpuffer im Druckkochtopf bei nicht geschlossenem Deckel zum Kochen gebracht, anschließend die Gewebeschnitte in den sprudelnden Puffer gestellt und der Deckel sofort geschlossen. Die Kochzeit betrug 7min, die den Druckaufbau und eine Kochzeit von 4min bei vollem Druck beinhalten. Danach wurde der Topf unter fließendem Wasser abgekühlt, bis der Druck entwichen war, der Deckel entfernt und die Präparate weiter unter fließendem Leitungswasser vollständig ausgekühlt und in Trispuffer gestellt.

Diese Vorbehandlung wurde für die Antikörper gegen EGFR, gesAkt, pAkt, MIB1 und p21 verwendet.

4.2.4.1.2. Hitzedemaskierung in der Mikrowelle

Die Objektträger wurden in einem Mikrowellen-geeigneten Gefäß vollständig mit Citratpuffer bedeckt und das Gefäß mit einem Deckel locker verschlossen. Bei 900 Watt wurden sie für 2mal 10min unter Nachfüllen des Puffers in der Mikrowelle erhitzt. Nach den 20min wurden die Präparate sofort aus der Mikrowelle genommen, der Citratpuffer ab geschüttet und die Schnitte mit Trispuffer bedeckt. Diese Vorbehandlung wurde bei den Antikörpern p21 und PTEN eingesetzt.

4.2.4.1.3. Blockung der endogenen Peroxidase

Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte anschließend unabhängig von der vorhergehenden Antigendemaskierung in verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ in destilliertem Wasser beziehungsweise in Methanol für 10min inkubiert.

Bei den Antikörpern gegen pERK und pAkt wurde eine 1%ige, für die entsprechenden Gesamt-Antikörper (gesERK, gesAkt) eine 3%ige Lösung aus H₂O₂ in Methanol verwendet, für p21 und PTEN eine 10%ige Verdünnung von H₂O₂ in destilliertem Wasser und für die Antikörper gegen Ki-67 und p53 wurden die Schnitte in einer 20%igen Lösung aus H₂O₂ in destilliertem Wasser inkubiert. Danach wurden die Präparate für weitere 10min in Trispuffer gespült.

4.2.4.2. Antikörperbehandlungen und Substratnachweis

Die Inkubationszeit für EGFR, PTEN, p53, p21 und MIB1 betrug jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper für pAkt und pERK sowie gesAkt und gesERK wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden alle Präparate dreimal für jeweils 3min in Trispuffer gespült, anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen und für 30min wiederum in der feuchten Kammer inkubiert. Auch der Sekundärantikörper wurde dreimal für je 3min in Trispuffer abgespült.

Zur Herstellung des später sichtbaren Immunkomplexes wurde ein Enzymkonjugat aufgetragen und noch einmal für eine halbe Stunde auf den Präparaten in der feuchten Kammer belassen. Wiederum wurde wie zuvor in Trispuffer gespült.

Bis auf den Antikörper gegen MIB1 diente eine Diaminobenzidinlösung (DAB) als Substrat, welche 1½ bis 10min auf dem Gewebe inkubiert wurde bis unter dem Mikroskop eine entsprechend ausreichende Färbung erkannt werden konnte. Diese Zeit betrug für pERK 1½min, für gesERK 3min, für gesAkt, pAkt und PTEN je 4min, und für EGFR, p21 und p53 je 9min.

Als Konjugat für den MIB1-Antikörper diente der APAAP-Komplex (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase), der 9min auf den Präparaten belassen wurde.

Nach Spülen unter fließendem destilliertem Wasser und Gegenfärbung mit saurem Hämalaun wurden die Präparate nach der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Behandlung eingedeckelt.

4.2.4.3. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

In einer 40fachen Vergrößerung wurden jeweils 10 repräsentative Ausschnitte im Gesichtsfeld des Mikroskops ausgewählt und auf die Intensität sowie die Anzahl der positiv gefärbten Zellen überprüft. Bei den Antikörpern gegen MIB1, p53 und p21 wurde auf die Intensität verzichtet, da diese hierbei keine Unterschiede zeigten. Bei den Antikörpern gegen pERK, pAkt und p21 wurden sowohl die Zellkerne, als auch das Zytoplasma beurteilt, für EGFR und PTEN lediglich das Zytoplasma.

Es wurden die Werte 0 bis 3 für die Intensität herangezogen in Anlehnung an vorausgehende immunhistochemische Auswertungen (Remmele et al., 1986). Einem nicht nachweisbaren Ergebnis entspricht die 0, einer sehr intensiven Reaktion die 3 (0 = keine spezifische Färbung erkennbar, 1 = schwache Intensität, 2 = deutlich sichtbare Intensität, 3 = sehr starke Intensität) (Abb. 5).

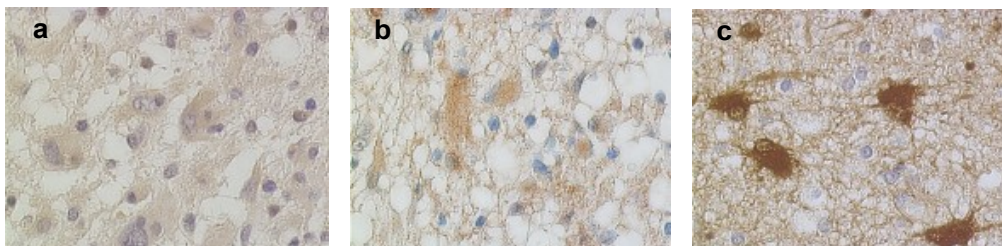


Abb. 5
Darstellung der immunhistochemisch erzielten Farbintensitäten
a: 1 = schwach, b: 2 = deutlich, c: 3 = stark

Die Anzahl der positiven Zellen wurde aus der Beurteilung der 10 Gesichtsfelder in Prozent auf Werte von 0 bis 4 umgelegt (0- 5% positiv reagierende Zellen = 0, 6- 25% = 1, 26- 50% = 2, 51- 75% = 3, 76- 100% = 4).

Um einen Vergleich der gewonnenen Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Werte angelehnt an vorangegangene, immunhistochemische Arbeiten umgerechnet und zusammengefasst (Remmele, Stegner 1987, Gupta et al. 2002; Choe et al. 2003). Für die Antikörper EGFR, PTEN, pAkt und pERK wurden durch Multiplikation von Intensität und Prozentsatz positiver Zellen Werte von 0 bis 12 errechnet, wobei für die Antikörper pERK, pAkt und p21 die zytoplasmatische (z) und nukleäre (n) Reaktion berücksichtigt wurde. Das Ergebnis für die Antikörperfärbung mit MIB1, p53 sowie p21 folgte einer reinen prozentualen Angabe der positiven Zellen.

Um den Gesamtvergleich aller erhaltenen Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Daten in eine Skala von „negativ“ (–), „mäßig“ (+) und „stark“ (++) wie folgt eingeteilt (Gupta et al. 2002; Choe et al. 2003).

Werte	Bezeichnung	EGFR, pERK1/2	PTEN, pAkt	p21, p53, MIB1
–	<i>negativ</i>	0/ 1/ 2	0/ 1/ 2/ 3/ 4	0 bis 5%
+	<i>mäßig</i>	3/ 4/ 6	6/ 8	6 bis 15%
++	<i>stark</i>	8/ 9/ 12	9/ 12	16 bis 100%

Tabelle 7
Umrechnung der immunhistochemischen Daten auf direkt vergleichbare Werte

Für pAkt und PTEN wurde eine schwache Intensität (siehe Abb. 5) als negativ eingeordnet, unabhängig von der Quantität der positiven Zellen. Ein stark positives Resultat ergab sich, wenn mindestens die Hälfte der Zellen stark intens reagierte.

Im Vergleich dazu wurden für die Antikörper gegen EGFR und pERK die Tumore als negativ eingeschätzt, die bei einer schwachen Intensität weniger als 50% positive Zellen aufwiesen. Bereits bei einer mäßigen Reaktion in mindestens $\frac{3}{4}$ der Zellen ergab sich ein stark positives Ergebnis.

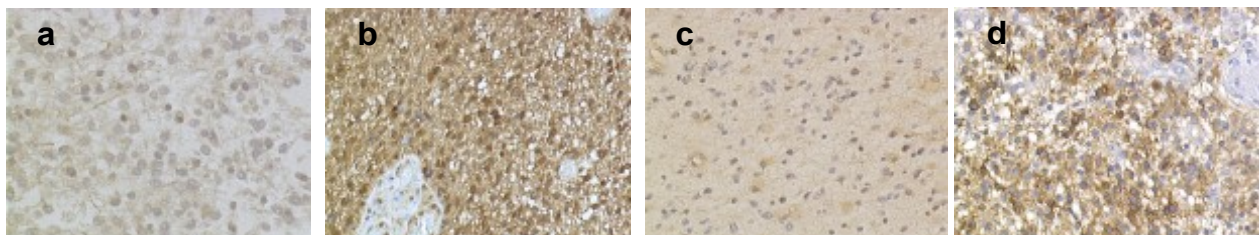


Abb. 6
Beispiele für die immunhistochemische Auswertung von pAkt / PTEN und pERK / EGFR
a: pAkt / PTEN negativ, b: pAkt / PTEN positiv, c: pERK / EGFR negativ, d: pERK / EGFR positiv

Diese leicht divergente Abstufung richtet sich nach den Unterschieden, die jeweils zwischen der schwächsten und stärksten Intensität festzustellen waren. Die Ausprägung negativ (–) beinhaltet auf diese Weise vor allem negativ reagierende Präparate, aber auch solche, deren positiver Anteil im Verhältnis zur stärksten Reaktion vernachlässigbar klein ist (Abb. 6).

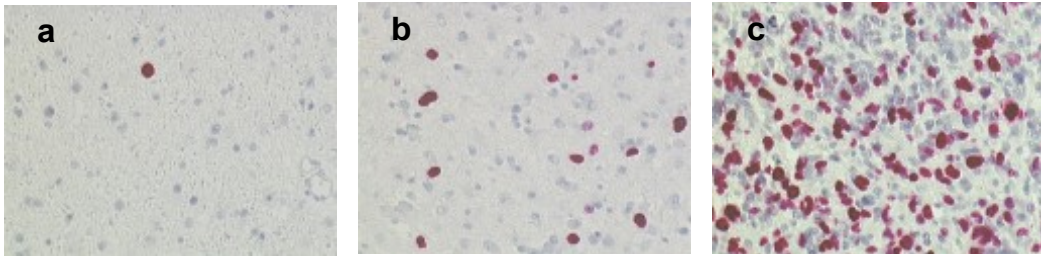


Abb. 7

Beispiele für die immunhistochemische Auswertung von MIB1, p53, p21

a: MIB1 negativ (0-5% positive Zellen), **b:** MIB1 mäßig positiv (6-15% positive Zellen),
c: MIB1 stark positiv (16-100% positive Zellen)

Bei den Antikörpern p21, p53 und MIB1 war lediglich der Prozentsatz der positiven Zellen entscheidend. Die Abstufung ergibt sich daraus, dass bei Tumoren ab einer positiven Reaktion in mehr als 15% der Zellen ein aussagekräftig starkes Ergebnis erbracht wurde (Abb. 7).

Insgesamt spiegelt diese Einteilung nach unseren Auswertungen am besten das Verhalten der Tumorzellen wieder.

4.2.5. *Tissue array*

Zur Untersuchung einer größeren Anzahl von Tumoren unter derselben Antikörperbehandlung dient die Methode des *Tissue arrays*.

Hierfür beschrieb erstmals Battifora 1986 eine Vorgehensweise, bei der aus mehreren Tumoren entnommene, repräsentative Anteile in einem Paraffinzylinder (*multitumor-[sausage]-tissue-block*) zusammengefügt werden (Battifora 1986).

Aus unserem Kollektiv wurden anhand einer HE-Färbung geeignete Gewebe ausgewählt und ein repräsentativer Teil herausgesucht, der dann mit Hilfe einer Stanze entnommen wurde. Auf diese Weise konnten in einem neuen Paraffinblock mehrere Tumoranteile nebeneinander angeordnet werden. Nach Lagerung des Paraffinblocks im Brutschrank bei 60°Celsius zur Verbindung des Gewebes mit dem neuen Paraffin, wurden die Präparate wie oben beschrieben weiter bearbeitet. Zur späteren Identifizierung der unterschiedlichen Tumore wurde auf jeden Block jeweils eine Stanze aus Plazentagewebe als Markierung beigefügt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie bei der Auswertung der vollständigen Gewebeschnitte, jedoch bezogen auf den gesamten Ausschnitt.

Für den Vergleich der beiden Methoden wurde jeweils das Endergebnis mit den gewonnenen Werten (negativ, mäßig und stark positiv) verwendet und ein prozentualer Mittelwert aus den Übereinstimmungen gebildet.

5. Ergebnisse

5.1. Nachweis von pAkt und pERK in ausgewählten Tumoren durch Proteinisolierung im Vergleich zur Immunhistochemie

Insgesamt wurden fünf Tumore mittels *Western-Blot*-Analyse auf die Expression von pERK und pAkt überprüft, vier Glioblastome (Nr. 43, 64, 66 und 97) sowie ein Gliosarkom (Nr. 146).

Als Positivkontrolle (+) diente ein Proteinlysats aus mit epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF) stimulierten LN18-Zellen (Schlegel et al. 2000).

Von den fünf untersuchten Tumoren zeigten im Vergleich zur Kontrollbande von LN-18 alle eine deutlich positive Reaktion gegen pERK (Abb. 8). Bei pAkt fielen die Banden insgesamt schwächer aus (Abb. 9).

Anhand von Ausschnitten aus den Präparaten im Vergleich zur *Western-Blot*-Analyse wird gezeigt, wie die Aktivierung der untersuchten Proteine auch *in situ* nachzuweisen ist.

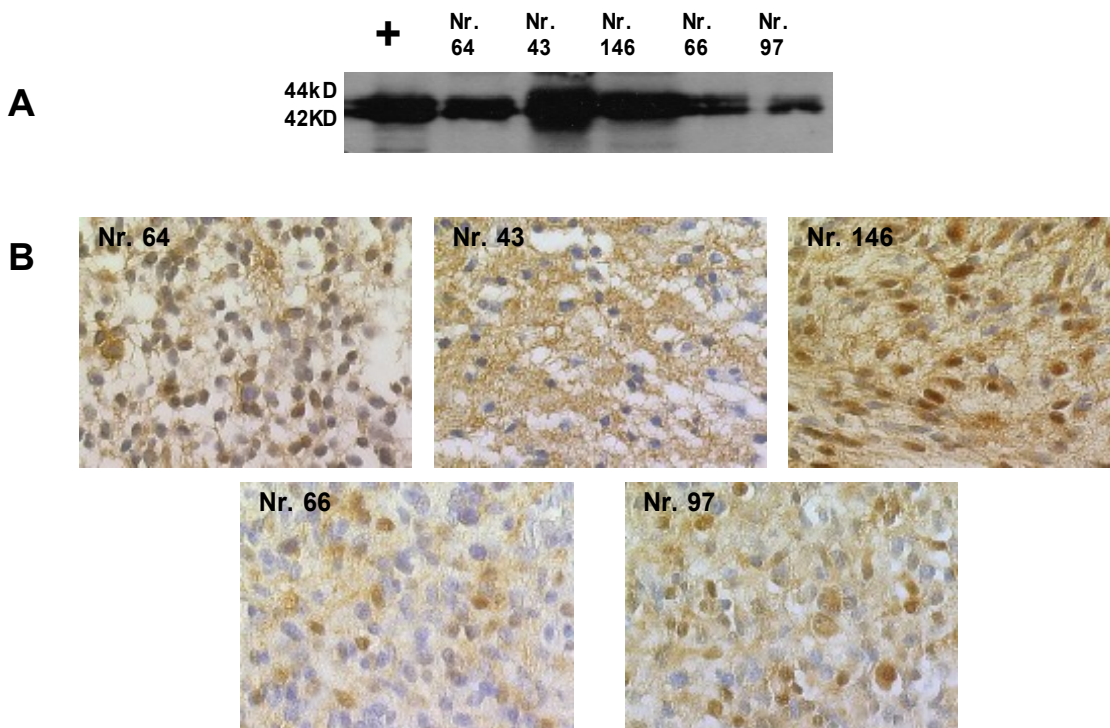


Abb. 8
Vergleich der Proteinverteilung von pERK1/2 im *Western-Blot* (A) mit der immunhistochemischen Verteilung (B).
+: Positivkontrolle

In der *Western-Blot*-Analyse reagierten alle untersuchten Tumore positiv gegen den Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper pERK (Abb. 8A). Die stärksten Banden zeigten sich im Tumor 43. Immunhistochemisch fand sich korrespondierend ein teils deutlich gefärbtes Zytoplasma (Abb. 8B). Sowohl eine immunhistochemische Reaktion im Zytoplasma als auch in den Zellkernen ließ sich in Nummer 146 nachweisen (Abb. 8B). Dieser zeigte gleichermaßen starke Banden im *Western-Blot* (Abb.

8A). Die jeweils schwächer reagierenden Präparate (Nr. 64, 66, 97) wiesen auch in der Immunhistochemie geringere Reaktionen auf. Im Vergleich ist die Bande des Tumors Nummer 64 stärker als in Tumor 66 und 97. Dieser zeigt immunhistochemisch prozentual ähnlich viele positive Zellen wie 66 und 97 bei insgesamt jedoch stärkerer Intensität (Abb. 8).

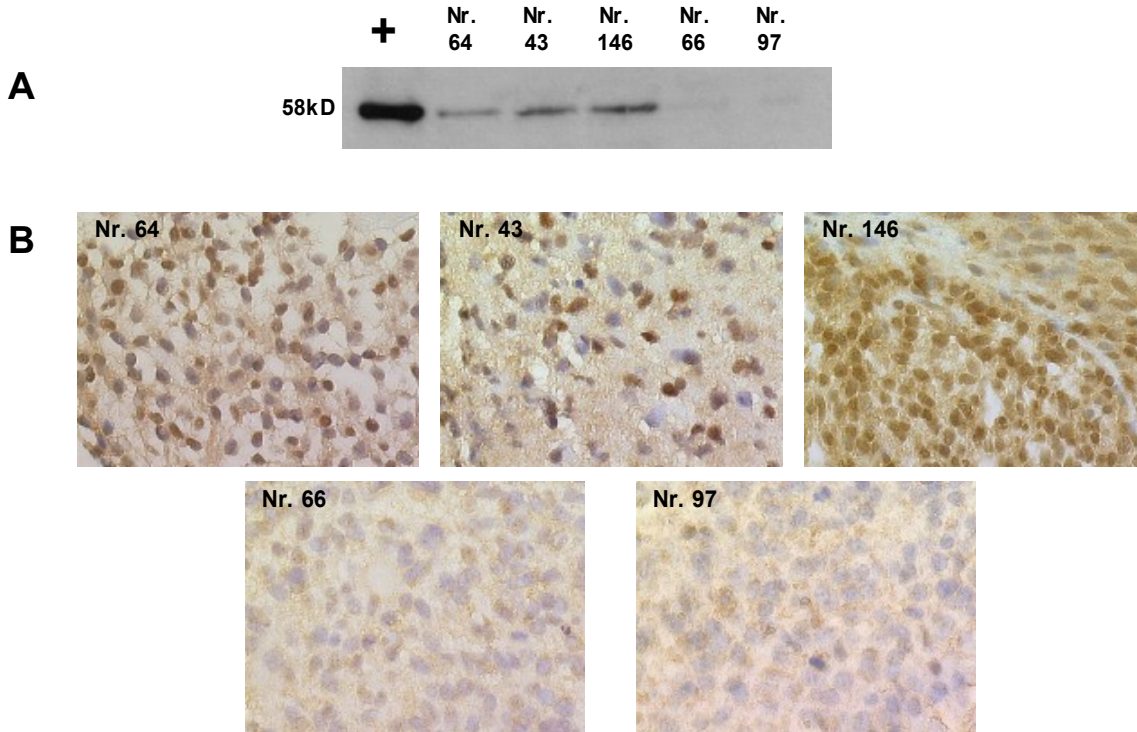


Abb. 9
 Vergleich der Proteinverteilung von **pAkt** im *Western-Blot* (A) mit der immunhistochemischen Verteilung (B).
 +: Positivkontrolle

Der Nachweis von phosphoryliertem Akt gelang in drei der untersuchten Tumore sicher (Abb. 9A). Die deutlichste Bande fand sich im Gliosarkom (Nr. 146). Immunhistochemisch zeigte dieser Tumor als einziger sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär eine deutlich positive Reaktion (Abb. 9B). Die Tumore 43 und 64 wiesen sowohl immunhistochemisch als auch im *Western-Blot* mäßig positive Ergebnisse auf, wohingegen in den Tumoren 66 und 97 bei allenfalls flauen Banden auch die Immunhistochemie sehr kontrastarm blieb.

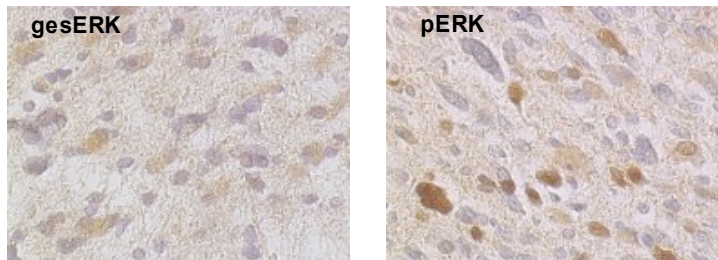
5.2. Vergleich der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper mit den Gesamt-Antikörpern

Um das Verhalten der aktivierten Kinasen (pERK, pAkt) im Vergleich zu den Gesamt-Proteinen deutlich zu machen, wurden an einzelnen Präparaten Färbungen mit den Antikörpern gegen Gesamt-ERK (gesERK) und Gesamt-Akt (gesAkt) durchgeführt (gesERK: Nr. 29, 53, 96, 107, 143; gesAkt: Nr. 9, 50, 53, 82, 106, 143). Insgesamt zeigte sich in den Tumoren eine schwächere und deutlich diffusere Verteilung der Gesamt-Antikörper gegenüber den Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern. Daher wurde im Gegensatz zu den anderen untersuchten Faktoren keine spezielle Einteilung in Intensität und Anzahl der positiven Zellen vorgenommen. Die Präparate werden jeweils direkt hinsichtlich Gesamt-Protein und phosphoryliertem Protein miteinander verglichen.

5.2.1. Verteilung der gesERK im Vergleich zu pERK

Die Tumore Nr. 29, 53 und 82 zeigten nahezu alle eine flau bis mäßig positive zytoplasmatisch lokalisierte Färbung gegen gesERK. Im Vergleich fanden sich in diesen Präparaten nur einzelne vor allem nukleär gelegene positive Reaktionen gegen pERK. Ein Beispiel dafür zeigt ein Ausschnitt aus Fall Nr. 29. In diesem Bereich stellt sich die gesERK allgemein flau dar, die pERK zeigte in einzelnen Zellen und Kernen eine sehr starke Reaktion (Abb. 10).

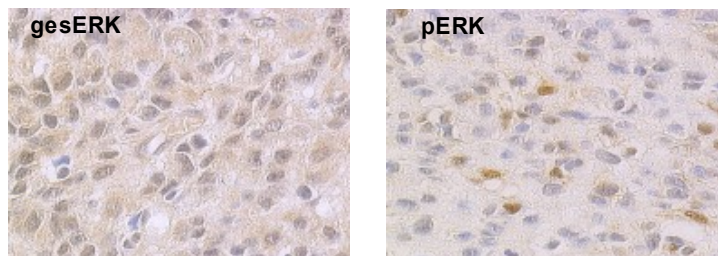
Abb. 10
Beispiel positiver nukleärer Reaktion auf pERK bei schwacher, vor allem zytoplasmatischer Reaktion auf gesERK (aus Präparat Nr. 29)



Einer der auf gesERK untersuchten Tumore fiel durch eine schwach positive Reaktion in einem Großteil der Zellen auf (Nr. 107) (Abb. 11).

Bei der Färbung mit pERK blieb er dagegen bis auf einzelne positive Zellkerne negativ. Wie auch in den anderen Tumoren waren diese positiv reagierenden Zellen jeweils in Gruppen angeordnet.

Abb. 11
Beispiel für diffuse, schwache Verteilung der ges-ERK bei lokalisiertem Nachweis von pERK (aus Präparat Nr. 107)



5.2.2. Verteilung der gesAkt im Vergleich zu pAkt

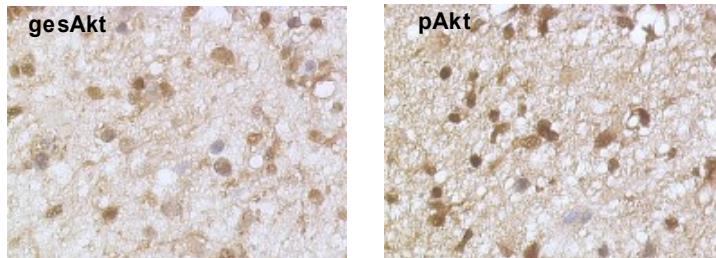
Die Reaktion gegen die gesAkt war ähnlich der gesERK wesentlich gleichmäßiger verteilt und insgesamt schwächer als die pAkt-Reaktionen.

Die Präparate 82 und 143 zeigten eine flauere gesAkt-Ausprägung, die pAkt war vor allem in den Zellkernen mäßig nachweisbar.

Der Fall Nr. 50 verhielt sich ähnlich, wies jedoch auch mäßige zytoplasmatische pAkt-Werte auf.

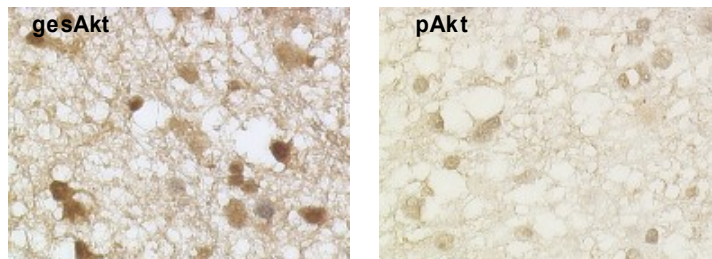
In dem Tumor Nr. 53 fand sich eine deutliche gesAkt-Reaktion im Zytoplasma der meisten Zellen, gleichzeitig war pAkt sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär stark vorhanden (Abb. 12).

Abb. 12
Beispiel für deutliche Reaktion gegen gesAkt und pAkt (aus Präparat 53)



Demgegenüber ist ein Fall zu betrachten, der ebenfalls zytoplasmatisch eine deutliche gesAkt zeigte, allerdings nahezu keine Aktivierung der Akt (pAkt) aufwies (Nr. 9) (Abb. 13).

Abb. 13
Geringe Reaktion gegen pAkt bei starker Reaktion auf gesAkt (aus Präparat 9)



5.3. Immunhistochemische Untersuchungen und Auswertung der verwendeten Antikörper

In dieser Arbeit wurden 219 gliale Hirntumore verschiedener Malignitätsgrade immunhistochemisch untersucht.

Zur Veranschaulichung der gewonnenen Ergebnisse wurden die Tumore nach ihrem zellulären Ursprung (astrozytär, oligodendroglial, ependymal) sowie dem zugehörigen WHO-Grad eingeteilt.

5.3.1. Tumore astrozytären und oligodendroglialen Ursprungs

In diese Gruppe wurden alle Tumore aufgenommen, deren Zellen astrozytär beziehungsweise oligodendroglial geprägt sind. Diese Zusammenfassung wurde gewählt, da sich zum einen die rein oligodendroglialen Tumore in den Ergebnissen praktisch nicht von den astrozytären in ihrer Reaktion abhoben. Zum anderen sollte das häufige Vorkommen oligodendroglialer Bereiche in Glioblastomen Berücksichtigung finden. Auf abweichende Resultate wird gesondert hingewiesen.

Die Einteilung erfolgte gemäß der WHO-Klassifikation.

Unter WHO IV wurden 100 Glioblastome, 5 Gliosarkome und 4 Riesenzell-Glioblastome zusammengefaßt. WHO III beinhaltet 19 anaplastische Astrozytome, 4 anaplastische Oligo-Astrozytome und 3 anaplastische Oligodendroglione und WHO II wird von 10 Astrozytomen sowie 2 Oligodendroglionen gebildet. Von 3 ebenfalls untersuchten pilozytischen Astrozytomen wurden die Daten in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

5.3.1.1. Verteilung der einzelnen Faktoren

5.3.1.1.1. EGFR

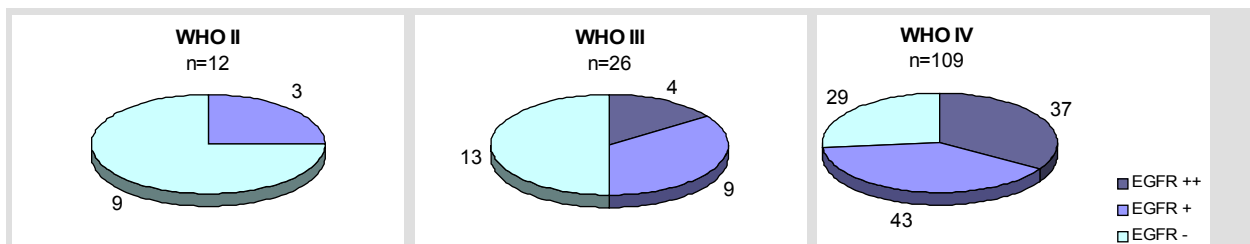


Abb. 14
Verteilung von EGFR in Abhängigkeit des WHO-Grades

Die niedriggradigen Tumoren (WHO II) reagierten in einem Viertel der Fälle positiv (3 von 12, darunter 1 Oligodendroglion), wobei sich keine starke EGFR-Expression nachweisen ließ.

Unter den anaplastischen Tumoren (WHO III) lag der Schwerpunkt der Verteilung mit der Hälfte der Tumoren (13 von 26) bei negativen EGFR-Werten. Weitere 9 Fälle (35%) zeigten demgegenüber eine mäßige Positivität, 4 (15%) wiesen eine starke Reaktion auf. Alle rein oligodendrogialen

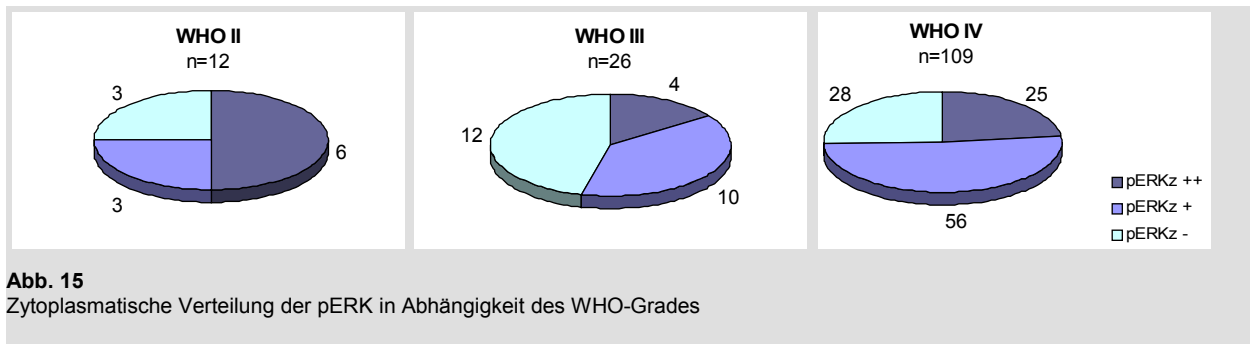
WHO-III	EGFR –	EGFR +	EGFR ++
Anapl. Astrozytom	12	7	
Anapl. Oligo-Astrozytom	1	2	1
Anapl. Oligodendrogliom			3

Tabelle 8
Verteilung des EGFR in anaplastischen Tumoren astrozytären und oligodendrogialen Ursprungs

Tumore fielen unter den Teil mit starker Ausprägung, die rein astrozytären Tumore blieben größtenteils negativ.

Eine starke EGFR-Expression zeigten 37 der 109 Tumore WHO IV (34%). Den größten Anteil in dieser Gruppe bildeten die mäßig reagierenden Präparate mit 43 Fällen (39%). 29 von 109 (27%) blieben negativ.

5.3.1.1.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz)

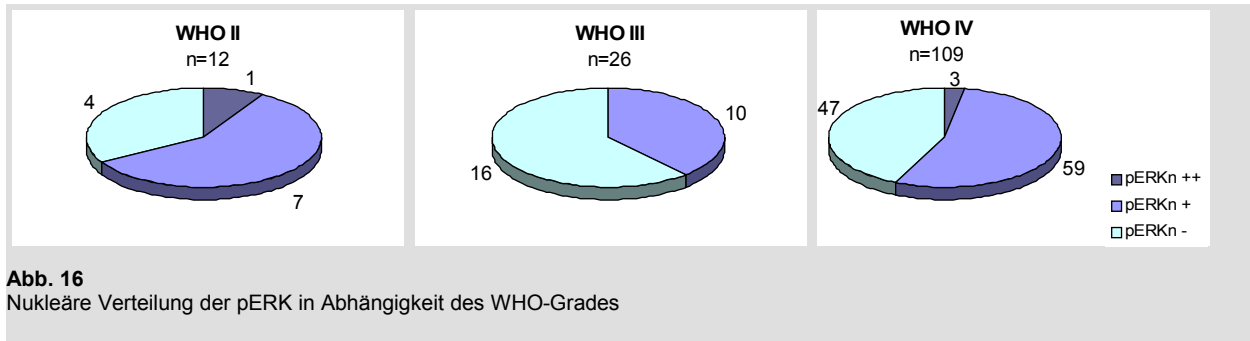


Die Tumore WHO II zeigten hohe Ausprägungen der zytoplasmatischen pERK. 3 von 12 reagierten mäßig und 6 zeigten stark positive Resultate.

Die anaplastischen Tumore wiesen in 12 von 26 Fällen (46%) negative pERK-Werte auf. Insgesamt 14 (54%) reagierten positiv (10 mäßig = 38%; 4 stark = 15%).

Die Tumore WHO IV reagierten im Zytoplasma in 56 Präparaten (51%) mäßig und bei 25 (23%) stark auf den pERK-Antikörper. Mit 28 von 109 blieb gut ein Viertel dieser Präparate (26%) negativ.

5.3.1.1.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn)



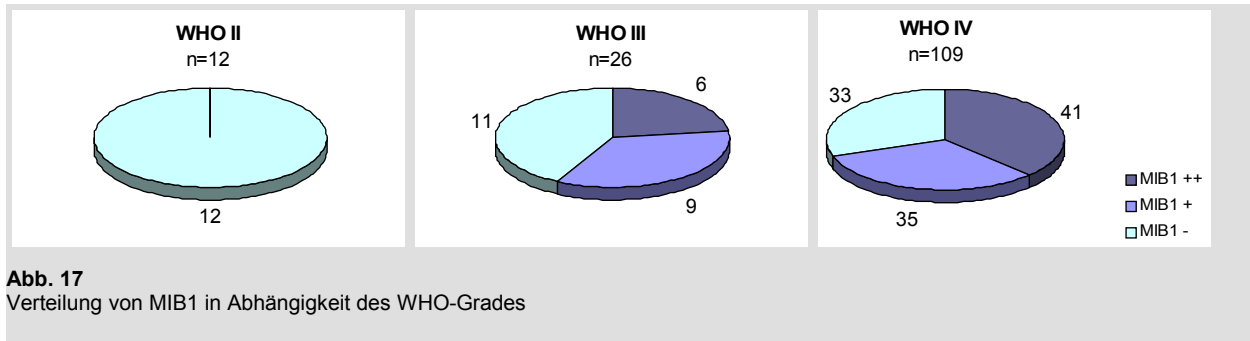
Insgesamt fand sich in 4 Tumoren eine starke nukleäre Reaktion gegen pERK im Zellkern (2 Glioblastome, 1 Gliosarkom, 1 Astrozytom).

Unter den Tumoren WHO II fanden sich weitere 7 von 12 mit mäßigen und 4 mit negativen pERK-Werten im Zellkern.

Bei den meisten der Tumore mit WHO-Grad III fand sich keine ausreichende Reaktion im Zellkern (16 von 26 = 62%). Die übrigen Fälle (10 von 26 = 38%) reagierten mäßig.

Neben den 3 stark EGFR-positiven Fällen (3%) wiesen 59 (54%) mäßige und 47 (43%) negative pERK-Werte im Zellkern auf.

5.3.1.1.4. Proliferationsindex MIB1



Die Ergebnisse des Proliferationsindex spiegeln den Bezug der Proliferation auf den WHO-Grad wieder. In den niedriggradigen Tumoren fanden sich keine erhöhten Proliferationsindizes.

Von den anaplastischen Tumoren (WHO III) waren 11 von 26 Tumoren negativ (42%), 15 (58%) reagierten positiv (9 von 26 = 35 %, 6 von 26 = 23%).

Knapp ein Drittel (33 von 109 = 30%) der Tumore WHO IV zeigte keine erhöhte Proliferation. Die meisten Tumore dieser Gruppe hatten erhöhte Proliferationsindizes (41 von 109 = 38%; 35 von 109 = 32%).

5.3.1.1.5. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz)

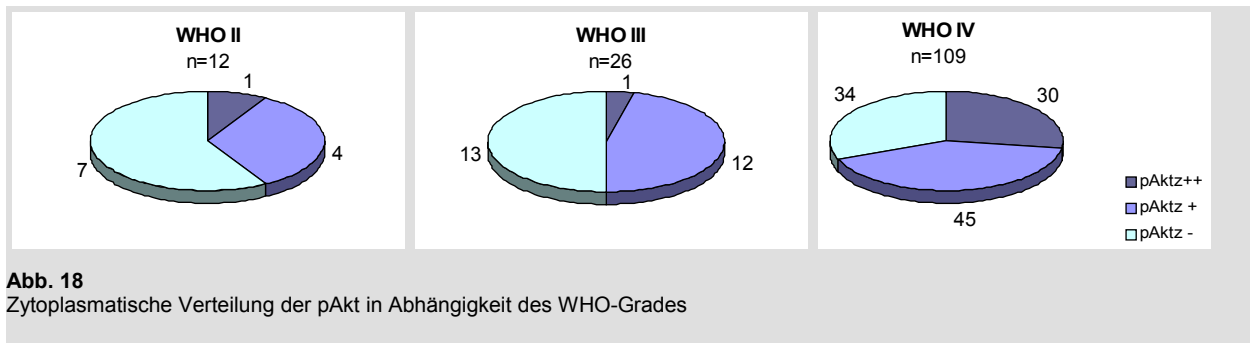


Abb. 18
Zytoplasmatische Verteilung der pAkt in Abhängigkeit des WHO-Grades

Von den niedriggradigen Tumoren (WHO II) reagierte ein Oligodendrogliom mit starker pAkt-Aktivität im Zytoplasma. Die meisten blieben negativ (7 von 12), einzelne reagierten mäßig positiv (4 von 12).

Von den Tumoren WHO III war die Hälfte ohne zytoplasmatische Reaktion (13 von 26 = 50%). Einer reagierte stark positiv (4%), 12 (46%) mäßig.

Die Tumore WHO IV reagierten in insgesamt 69% der Fälle positiv (41% mäßig, 28% stark). 34 von 109 Tumoren (31%) blieben negativ.

5.3.1.1.6. Phospho-Akt nukleär (pAktn)

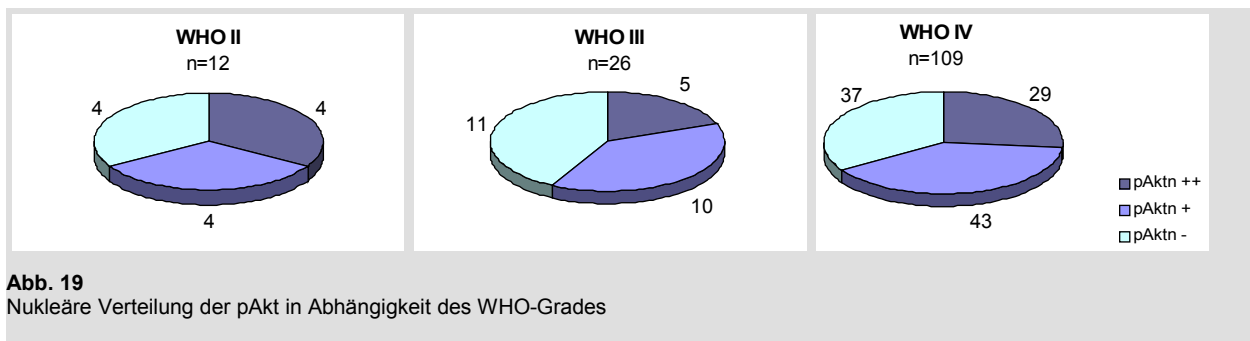


Abb. 19
Nukleäre Verteilung der pAkt in Abhängigkeit des WHO-Grades

Die nukleäre pAkt-Reaktion verteilte sich in den verschiedenen Gruppen ähnlich. Je etwa ein Drittel blieb negativ. Die niedriggradigen Tumore wiesen in gleichen Anteilen mit je 4 von 12 Fällen negative, mäßige und starke Werte auf (33%). In der Gruppe der Tumore WHO III blieben 11 (42%) negativ. 5 (19%) reagierten nukleär stark positiv, 10 (39%) mäßig.

Die Verteilung der nukleären Akt-Aktivität unterschied sich bei den Tumoren WHO IV nicht wesentlich von der zytoplasmatischen Reaktion, wobei allerdings keine direkte Korrelation vorlag, das heißt die Tumoren wiesen nicht zwangsläufig gleiche zytoplasmatische und nukleäre Werte auf.

Die negativ reagierenden Fälle machten mit 37 von 109 (34%) gut ein Drittel aus, 29 (27%) erbrachten nukleär ein stark positives Ergebnis. Die größte Gruppe bildeten mit 43 von 109 die mäßig gefärbten Präparate (39%).

5.3.1.1.7. PTEN-Protein

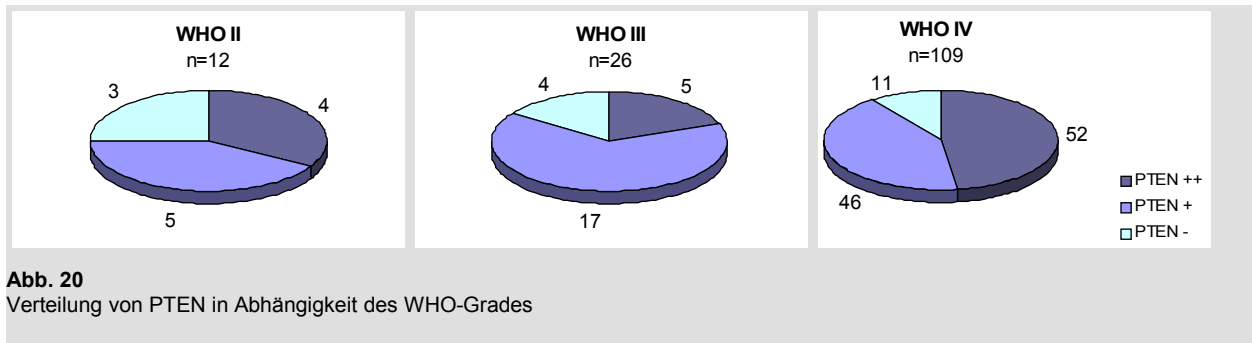


Abb. 20
Verteilung von PTEN in Abhängigkeit des WHO-Grades

Der Nachweis des PTEN-Proteins gelang in den meisten hier untersuchten Tumoren.

Die Verteilung der PTEN-Ausprägung unter den Tumoren WHO II war unter Berücksichtigung der geringen Fallzahl relativ gleichmäßig. 3 von 12 Tumoren blieben negativ, 5 ergaben mäßige und 4 starke Werte.

Von den anaplastischen Tumoren (WHO III) blieben 4 (15%) negativ. Dagegen wiesen 17 (65%) ein mäßiges und 5 (19%) ein starkes Ergebnis auf.

Von den Tumoren WHO IV fielen 11 Fälle (10%) unter die negative Einteilung. Die meisten Präparate zeigten eine mäßige (46 von 109; 42%) oder sogar starke (52 von 109; 48%) Positivität.

5.3.1.1.8. p21-Protein zytoplasmatisch (p21z)

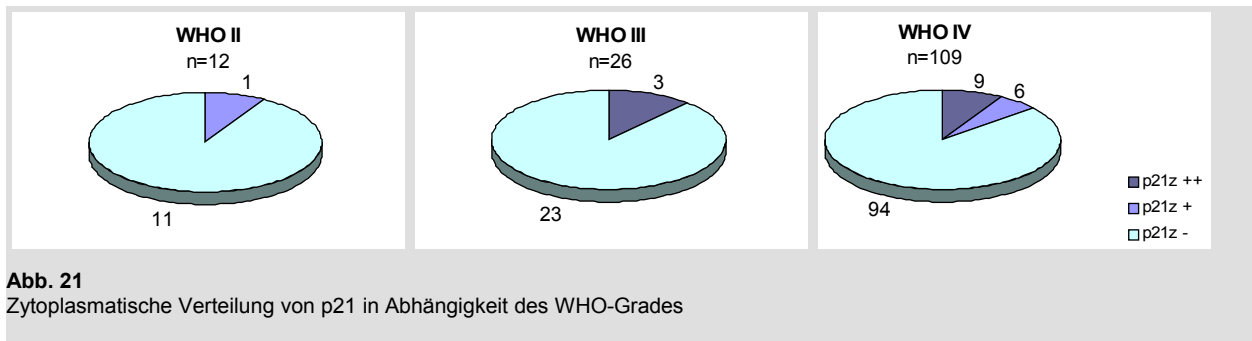


Abb. 21
Zytoplasmatische Verteilung von p21 in Abhängigkeit des WHO-Grades

Eine zytoplasmatisch bedeutende Reaktion gegen p21 wiesen nur sehr wenige Tumore auf.

Dies war ein einzelner Tumor vom WHO-Grad II mit mäßiger, sowie 3 der 26 anaplastischen Tumore (WHO III) mit starker Reaktion (12%).

Von den Tumoren WHO IV reagierten 15% positiv (6 = 6% mäßig, 9 = 8% stark).

Durch eine negative Reaktion zeichneten sich dagegen 11 Tumore WHO II, 23 Tumore WHO III (88%) sowie 94 Tumore WHO IV (86%) aus.

5.3.1.1.9. p21-Protein nukleär (p21n)

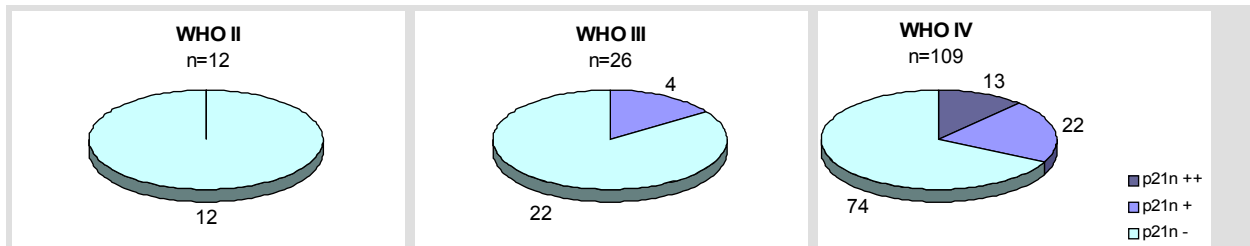


Abb. 22
Nukleäre Verteilung von p21 in Abhängigkeit des WHO-Grades

Im Zellkern kam es ebenfalls selten zu einer positiven Reaktion, die meisten Tumore blieben negativ, hierunter alle niedriggradigen Tumore (WHO II). Von den anaplastischen Tumoren erbrachten nur 4 positive Werte, dies waren 4 anaplastische Astrozytome. Die restlichen 22 (85%) zeigten eine negative Reaktion (15 anaplastische Astrozytome, 4 anaplastische Oligo-Astrozytome, 3 anaplastische Oligodendrogliome). Neben 74 negativ reagierenden Geweben in der Gruppe der Tumore WHO IV (68%) zeigten 22 (20%) ein mäßiges und 13 (12%) ein stark positives Resultat.

5.3.1.1.10. p53-Protein

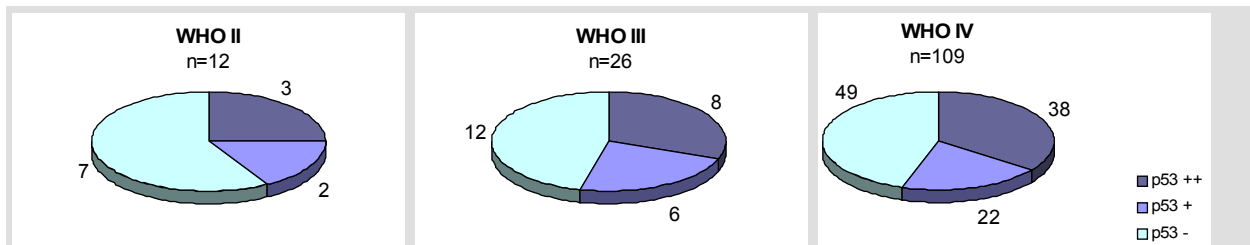


Abb. 23
Verteilung von p53 in Abhängigkeit des WHO-Grades

Unter den Tumoren WHO II fand sich in über der Hälfte der Fälle (7 von 12) ein negatives Resultat. Weitere 2 Gewebe zeigten eine mäßige und 3 eine insgesamt starke Reaktion. Auch die höhergradigen Tumore (WHO III) waren mit 6 (23%) beziehungsweise 8 von 26 (31%) Fällen mäßig bis stark p53-positiv. Knapp weniger als die Hälfte dieser Präparate kennzeichneten sich wiederum durch ein negatives Ergebnis aus (12 von 26; 46%). Von den Tumoren WHO IV reagierten 22 (20%) mäßig und 38 (35%) stark auf den p53-Antikörper. Die restlichen 49 Tumore (45%) ergaben negative Werte.

5.3.1.2. Vergleichende Darstellung einzelner Faktoren

Es folgt eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die beschriebenen Signalwege und deren funktionellen Veränderungen. Die Diagramme sollen die Zusammenhänge verdeutlichen, die absoluten Zahlenwerte sind im Anhang zusammengefasst.

5.3.1.2.1. Vergleich von pERK und pAkt

ERK zeigte in phosphoryliertem Zustand im Zytoplasma stärkere Unterschiede in der Ausprägung als im Zellkern. Daher wird beim Vergleich mit der pAkt nur auf die zytoplasmatisch lokalisierte pERK eingegangen.

5.3.1.2.1.1. Zytoplasmatische pAkt (pAktz) in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (pERKz)

Tumore WHO II

Die Verteilung der pAkt-Werte ist gleichmäßig. Bei negativer und mäßiger zytoplasmatischer pERK waren je 2 von 3 Fällen pAkt-negativ. Ein Präparat zeigte sich mäßig pAkt-positiv bei negativer pERK und eines stark pAkt-positiv bei mäßiger pERK.

Bei einer starken pERK-Expression im Zytoplasma waren je 3 von 6 Fällen pAkt-negativ oder mäßig positiv.

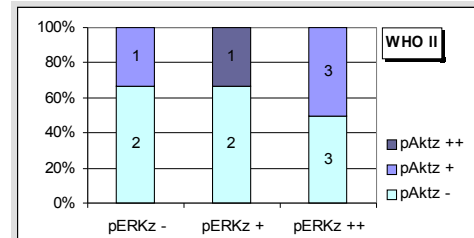


Abb. 24
Zytoplasmatische pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO II)

Tumore WHO III

Bei diesen Tumoren stellt sich die Verteilung ebenfalls sehr gleichmäßig dar. Die Präparate mit negativem Ergebnis für zytoplasmatische pAkt machten jeweils die Hälfte der Fälle der einzelnen Ausprägungsgrade von pERK aus (6 von 12 bei pERKz-, 5 von 10 bei pERKz+, 2 von 4 bei pERKz++). Die andere Hälfte wies bis auf eine Ausnahme (pAkt++) mäßig positive pAkt-Werte auf.

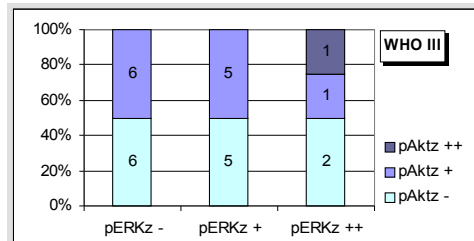


Abb. 25
Zytoplasmatische pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO III)

Tumore WHO IV

Es zeigt sich ein Anstieg der zytoplasmatischen pAkt in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma.

Bei negativer pERK fanden sich 11% (3 von 28) der Präparate mit starker pAkt-Ausprägung. Die Fälle mit stark positiver pAkt-Expression stiegen bei mäßig positiver pERK auf 25% (14 von 56) und bei stark positiver pERK auf 52% (13 von 25) an.

Entgegengesetzt nahmen die Anteile der mäßig positiv und der negativ reagierenden Tumore stetig ab.

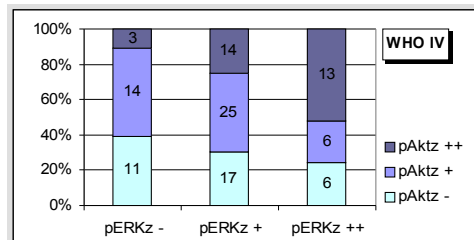


Abb. 26
Zytoplasmatische pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO IV)

5.3.1.2.1.2. Nukleäre pAkt (pAktn) in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (pERKz)

Tumore WHO II

Bei negativer zytoplasmatischer pERK wiesen zwei Fälle (2 von 3) eine mäßig positive pAkt-Reaktion im Zellkern auf. Bei mäßig erhöhter pERK waren wiederum 2 von 3 pAkt-positiv. Bei starker pERK-Expression fanden sich insgesamt 4 positive Fälle (4 von 6). Die Tumore, die nicht auf pAkt im Zellkern reagierten, machten jeweils ein Drittel der Fälle aus.

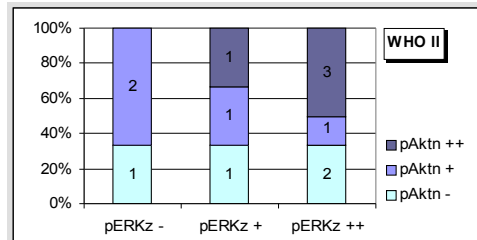


Abb. 27
Nukleäre pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO II)

Tumore WHO III

Die nukleäre pAkt-Ausprägung nahm in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK zu.

Bei negativer pERK fanden sich 5 von 12 positive Fälle. Die Tumore, die mäßig pERK aufwiesen, kennzeichneten sich in 8 von 10 Fällen durch ein positives pAkt-Ergebnis. Bei stark positiver pERK reagierten von 4 Tumoren 2 stark positiv, 2 blieben negativ.

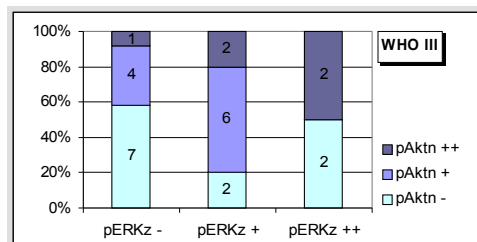


Abb. 28
Nukleäre pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO III)

Tumore WHO IV

Die Verteilung der nukleär pAkt-positiven Präparate in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK war ähnlich der Verteilung der zytoplasmatischen pAkt.

Die Anteile der Präparate ohne pAkt-Reaktion fielen von 46% (13 von 28) bei negativer pERK über 34% (19 von 56) bei mäßig positiver auf 20% (5 von 25) bei stark positiver pERK. Die stark positiven pAkt-Fälle stiegen von 14% (4 von 28) bei negativem zytoplasmatischen ERK über 20% (11 von 56) auf 56% (14 von 25) bei starker pERK-Ausprägung zu.

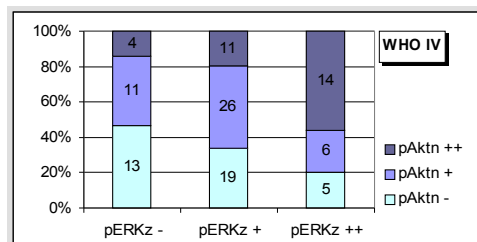


Abb. 29
Nukleäre pAkt in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (WHO IV)

5.3.1.2.2. **MIB1 in Abhängigkeit von EGFR**

Tumore WHO II

Ein direkter Vergleich der EGFR- mit den MIB1-Werten der niedriggradigen Tumore kann hier aufgrund der geringen Fallzahlen nur eingeschränkt vorgenommen werden. Keiner der Tumore zeigte einen erhöhten MIB1-Index und nur 3 von 12 wiesen positive EGFR-Werte auf (+).

Tumore WHO III

In dieser Gruppe lässt sich keine Abhängigkeit der MIB1-Expression vom EGFR nachweisen, allerdings lagen gerade von den stark EGFR-exprimierenden Tumoren zu wenige Fälle vor, um eine repräsentative Aussage zu treffen. Bei negativen und starken EGFR-Werten waren die MIB1-Werte in ihrer Ausprägung gleichmäßig verteilt (4-, 5+, 4++; bzw. 1-, 2+, 1++). Bei mäßig starker EGFR-Färbung überwogen die Fälle mit negativem MIB1-Index (6 von 9).

Tumore WHO IV

Der Anteil der Präparate mit starkem MIB1-Index machte bei den EGFR-negativen Tumoren 34% (10 von 29) aus und stieg mit stärkerer EGFR-Expression weiter an. Von den 43 mäßig EGFR-positiven Fällen wiesen 35% (15 von 43) starke MIB1-Werte auf, von den 37 stark EGFR-positiven waren dies 43% (16 von 37).

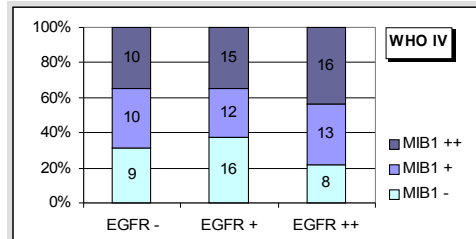


Abb. 30
MIB1 in Abhängigkeit von EGFR (WHO IV)

Die Anteile, die von den MIB1-negativen Präparaten gebildet wurden, fielen nach einem Anstieg von 31% (9 von 29) bei negativem EGFR-Status auf 37% (16 von 43) bei mäßigen EGFR-Werten wieder auf 22% (8 von 37) in stark EGFR-positiven Geweben ab.

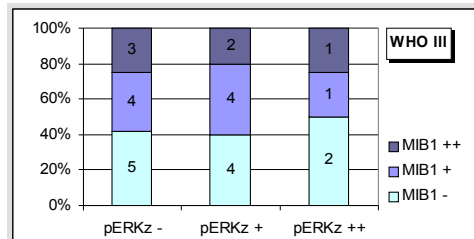
5.3.1.2.3. MIB1 in Abhängigkeit von pERK

Tumore WHO II

Aufgrund der geringen Fallzahl durchgehend negativer MIB1-Werte lässt sich kein Zusammenhang zwischen pERK und MIB1 treffen.

Tumore WHO III

Vergleicht man die zytoplasmatischen pERK-Werte mit der MIB1-Expression, so findet sich tendenziell eine gleichmäßige Verteilung der Ausprägungen. Die negativen MIB1-Resultate machten 5 von 12 bei negativer, 4 von 10 bei mäßiger und 2 von 4 Fällen bei starker pERK im Zytoplasma aus.



Demgegenüber zeigte sich bei den nukleären Ergebnissen der pERK ein leichter Trend hin zu gesteigerter Proliferation mit zunehmender ERK-Aktivierung. Eine starke pERK-Expression im Zellkern wies keines der Präparate auf. Bei negativer pERK fanden sich 7 von 16 ohne Zeichen der gesteigerten Proliferation (44%). Positiv reagierten auf MIB1 in dieser Gruppe insgesamt 9 Tumore

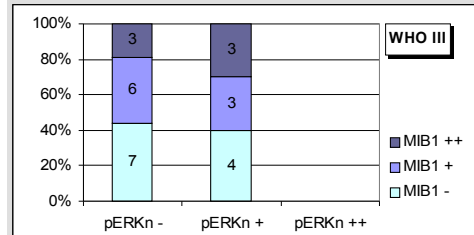


Abb. 31
MIB1 in Abhängigkeit von pERK (WHO III)
Oben: in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK
Unten: in Abhängigkeit von nukleärer pERK

(56%). Die Anzahl der MIB1-positiven Präparate stieg bei positiver pERK nicht wesentlich an (60%), jedoch fanden sich anteilig deutlich mehr stark positiv reagierende Tumore, im Vergleich 19% bei negativer pERK und 30% bei positiver pERK.

Tumore WHO IV

Mit zunehmender Aktivierung der ERK fand sich in dieser Gruppe eine größere Anzahl an Tumoren mit vermehrter Proliferation, unabhängig von der Lokalisation der aktivierten ERK.

Von den im Zytoplasma pERK-negativen Tumoren war der Großteil mit 46% (13 von 28) gleichzeitig durch eine negative MIB1-Ausprägung gekennzeichnet. Dagegen fiel dieser Anteil bei den stark pERK-positiven Tumoren auf 24% (6 von 25) ab und der größte Anteil mit 44% wurde von den stark MIB1-positiven Fällen (11 von 25) ausgemacht.

Beim Vergleich der pERK im Zellkern nahmen die Anteile mit negativem MIB1-Index mit zunehmenden pERK-Werten von 36% (17 von 47) auf 27% (16 von 59) ab, im

Gegenzug stiegen die stark MIB1-positiven Werte von 28% (13 von 47) auf 44% (26 von 59). Die Resultate bei stark ausgeprägter pERK im Zellkern vervollständigen scheinbar diesen Trend, sollen jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht weiter berücksichtigt werden.

5.3.1.2.4. pERK in Abhängigkeit von EGFR

Tumore WHO II

Insgesamt fanden sich 9 Tumore (von 12) ohne Reaktion gegen EGFR. Diese wiesen im Zytoplasma in je 3 Fällen negative, mäßig oder stark positive pERK-Werte auf. Im Zellkern waren 3 der 9 Präparate pERK-negativ, 5 mäßig positiv und ein Fall erbrachte einen stark positiven Wert. 3 weitere Fälle zeigten einen mäßig positiven EGFR-Status. Diese wiesen im Zytoplasma alle stark positive pERK-Werte auf. Im Zellkern reagierte ein Fall negativ und 2 Fälle mäßig positiv gegen pERK.

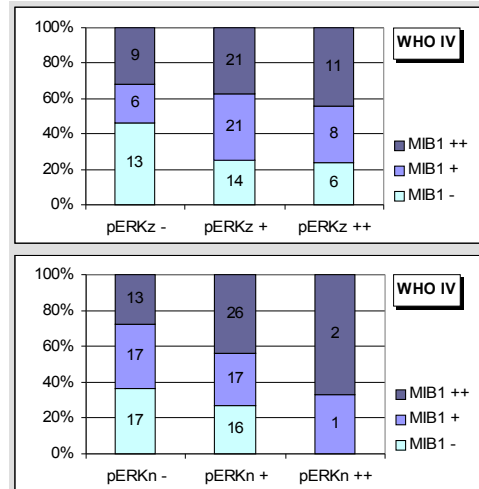


Abb. 32
MIB1 in Abhängigkeit von pERK (WHO IV)
Oben: in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK
Unten: in Abhängigkeit von nukleärer pERK

Tumore WHO III

Von 13 EGFR-negativen Tumoren zeigten 6 Präparate gleichzeitig negative pERK-Werte. 5 waren mäßig und weitere 2 stark pERK-positiv.

Bei einer mäßigen EGFR-Ausprägung verschob sich das Verhältnis zugunsten der pERK-negativen Präparate (5 von 9). Entgegengesetzt fielen die mäßig pERK-positiven Anteile ab, die stark positiven Fälle stiegen anteilmäßig leicht an (2 von 9).

Bei den stark EGFR-positiven Werten fanden sich 3 von 4 Präparate mit positiven pERK-Werten, eines blieb negativ. Kein Tumor wies nukleär einen stark pERK-positiven Befund auf. Der Anteil der mäßig pERK-positiven Fälle nahm mit steigenden EGFR-Werten zu (4 von 13 bei EGFR-, 3 von 9 bei EGFR+, 3 von 4 bei EGFR++).

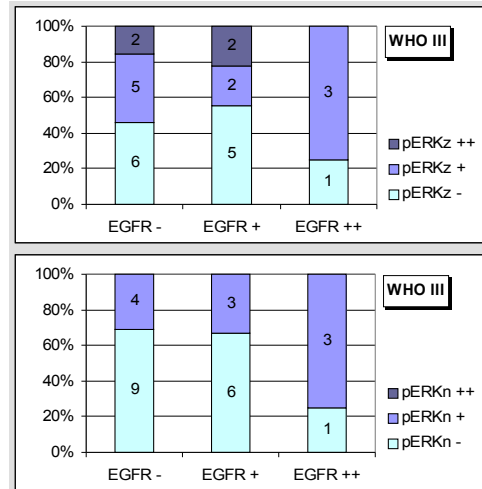


Abb. 33
pERK in Abhängigkeit von EGFR (WHO III)
Oben: pERK zytoplasmatisch
Unten: pERK nukleär

Tumore WHO IV

Die Reaktion von pERK stieg bei verstärktem Auftreten von EGFR an. Dies zeigte sich sowohl in zytoplasmatischer Lokalisation, bei welcher vor allem die stark positiven Präparate zu nehmen (mäßig stark positiv: EGFR- 44%; EGFR+ 56%, EGFR++ 51%; stark positiv: EGFR- 14%, EGFR+ 26%, EGFR++ 27%). Aber auch bei Betrachtung der nukleären pERK in Abhängigkeit vom EGFR-Status bestand dieser Trend (mäßig stark positiv: EGFR- 45%, bei EGFR+ 56%, bei EGFR++ 59%).

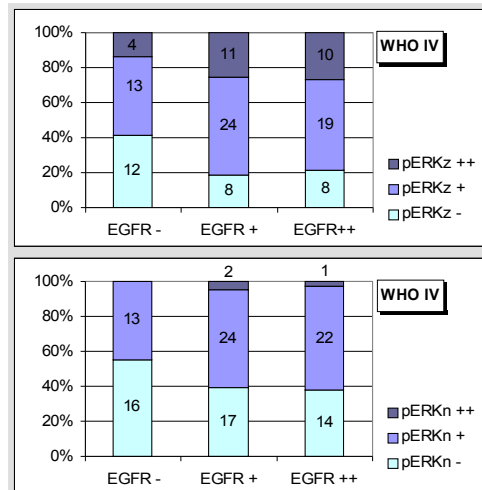


Abb. 34
pERK in Abhängigkeit von EGFR (WHO IV)
Oben: pERK zytoplasmatisch
Unten: pERK nukleär

5.3.1.2.5. pAkt in Abhängigkeit von EGFR

Tumore WHO II

In dieser Gruppe fanden sich keine Präparate, die eine starke EGFR-Expression zeigten. Von 9 Präparaten ohne EGFR-Reaktion reagierten 6 im Zytoplasma pAkt-negativ. Weitere 2 Fälle waren mäßig

pAkt-positiv und nur einer wies einen stark positiven Wert auf. Bei positivem EGFR (EGFR+) fanden sich 2 von 3 Fällen mit mäßiger Reaktion, einer blieb negativ.

Für die nukleäre pAkt-Aktivierung fand sich bei positivem EGFR kein Präparat mit negativer nukleärer pAkt, dagegen waren 4 von 9 EGFR-negativen Präparaten gleichzeitig pAkt-negativ.

Tumore WHO III

Das Auftreten von pAkt lag in Abhängigkeit von EGFR bei je circa 50%. Nur ein einzelner Tumor wies im Zytoplasma stark positive pAkt-Werte auf bei mäßig ausgeprägtem EGFR-Status.

Im Zellkern zeigte sich eine mit steigenden EGFR-Werten kontinuierlich leicht abfallende pAkt-Ausprägung. Die pAkt-negativen Präparate machten 38% der ebenfalls EGFR-negativen Tumore aus (5 von 13). Bei mäßiger EGFR-Positivität waren dies 44% (4 von 9) und schließlich fanden sich unter den stark EGFR exprimierenden Tumoren 50% (2 von 4) mit negativem pAkt.

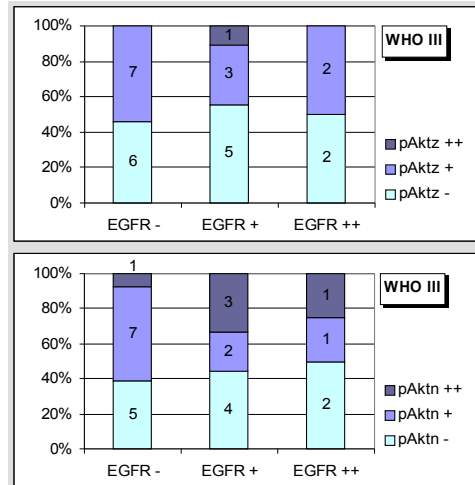


Abb. 35
pAkt in Abhängigkeit von EGFR (WHO III)
Oben: pAkt zytoplasmatisch
Unten: pAkt nukleär

Tumore WHO IV

Betrachtet man die Präparate mit negativer und mäßiger EGFR-Reaktion, so findet sich mit ansteigendem EGFR eine Zunahme der pAkt-Aktivität im Zytoplasma. Die stark positiven pAkt-Fälle nahmen von 14% (4 von 29) auf 27% (16 von 43) zu. Allerdings veränderten sich die Anteile der pAkt bei starken EGFR-Werten nicht weiter zugunsten hoher pAkt-Werte.

Dieser beobachtete Trend zeigt sich noch deutlicher bei der nukleären Aktivität der pAkt. Von 17% (5 von 29) stark pAkt-positiven Präparaten bei negativen EGFR-Werten, stiegen diese bei mäßiger EGFR-Ausprägung auf 35% (15 von 43) und fielen bei starker EGFR-Expression wiederum ab auf 24% (9 von 37).

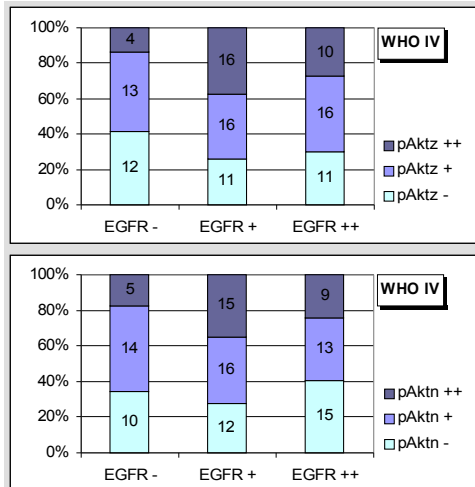


Abb. 36
pAkt in Abhängigkeit von EGFR (WHO IV)
Oben: pAkt zytoplasmatisch
Unten: pAkt nukleär

5.3.1.2.6. pAkt in Abhängigkeit von PTEN

Tumore WHO II

Im Zytoplasma war in Abhängigkeit von PTEN in den meisten Fällen kein pAkt nachweisbar. Negative pAkt-Werte im Zytoplasma fanden sich in 2 von 3 Fällen bei negativem PTEN, in 3 von 5 bei mäßigem PTEN und in 2 von 4 Fällen bei stark positivem PTEN.

Demgegenüber fanden sich im Zellkern ansteigende Reaktionen auf pAkt bei erhöhten PTEN-Werten. Hier machten die pAkt-negativen Tumore nur bei negativem PTEN mehr als die Hälfte der Präparate aus, bei mäßigem PTEN war dies einer von 5 und bei stark positivem PTEN einer von 4 Fällen.

Tumore WHO III

Die meisten Werte für pAkt im Zytoplasma waren bei negativer PTEN-Ausprägung ebenfalls negativ (3 von 4). Unter den mäßigen PTEN-Werten fielen die negativen pAkt-Anteile auf 7 von 17 (41%) ab und stiegen dann wiederum auf 3 von 5 an. Entgegengesetzt verhielten sich die mäßig positiven pAkt-Werte. Nur ein Tumor zeigte eine stark pAkt-positive Reaktion.

Bei negativem PTEN fand sich zunächst ein geringer Anteil negativer pAkt-Werte im Zellkern (1 von 4). Entgegengesetzt dem Abfall der zytoplasmatischen pAkt bei mäßigen PTEN-Werten stiegen die nukleär negativen bei mäßigem PTEN an (8 von 17) und fielen bei starker PTEN-Expression demgegenüber wieder ab (2 von 5).

Tumore WHO IV

In diesen Tumoren zeigte sich eine ausgeprägte PTEN-Expression. Vergleicht man diese mit dem Vorhandensein der pAkt, so fällt einem eine Abnahme vor allem der zytoplasmatisch pAkt-negativen Fälle mit steigenden PTEN-Werten auf.

Der Abfall war im Zytoplasma sehr kontinuierlich, bei negativer PTEN-Ausprägung waren dies 45% (5 von 11). Bei mäßigen PTEN-Werten sank der Anteil der pAkt-negativen Präparate auf 33% (15 von 46) und auf 27% (14 von 52) bei starker PTEN-Positivität.

Die im Zellkern pAkt-negativen Präparate machten bei negativer PTEN-Expression 36% (4 von 11) aus und stiegen bei mäßigen PTEN-Werten auf 39% (18 von 46)

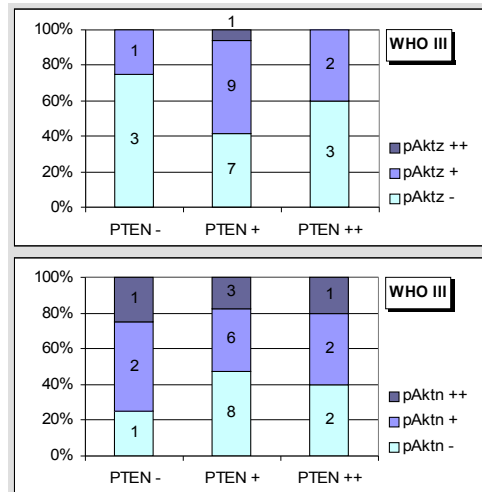


Abb. 37
pAkt in Abhängigkeit von PTEN (WHO III)
Oben: pAkt zytoplasmatisch
Unten: pAkt nukleär

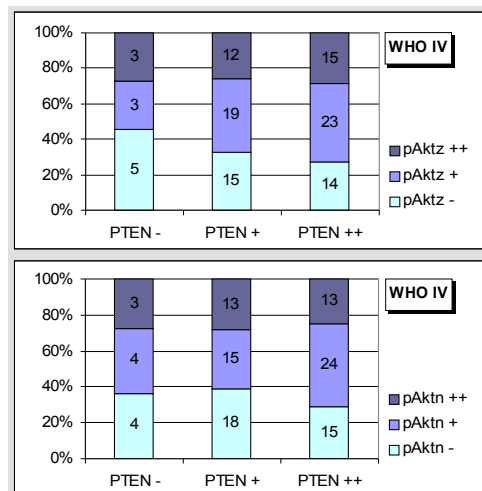


Abb. 38
pAkt in Abhängigkeit von PTEN (WHO IV)
Oben: pAkt zytoplasmatisch
Unten: pAkt nukleär

an. Bei starker PTEN-Ausprägung fand sich demgegenüber jedoch wieder ein Abfall der pAkt-negativen Gewebe (29%) vor allem zugunsten vermehrter mäßiger pAkt-Aktivierung.

5.3.1.2.7. p21 in Abhängigkeit von pAkt

Tumore WHO II

Auf den Vergleich mit pAkt wurde bei den Tumoren der Gruppe WHO-II verzichtet, da sich keine nennenswert gesteigerten p21-Werte zeigten.

Tumore WHO III

In dieser Gruppe wiesen von 26 Tumoren nur 4 einen mäßig erhöhten nukleären p21-Wert auf. Diese hatten gleichzeitig alle eine mäßige zytoplasmatische pAkt-Erhöhung.

Betrachtet man die Tumoren in Hinsicht auf ihre nukleäre Akt-Aktivität, so verteilten sich die 4 Tumore mit mäßig positivem p21n auf einen Tumor mit negativer, 2 mit mäßig positiver und einen mit stark positiver pAkt-Reaktion.

Hinsichtlich ihrer p21-Ausprägung im Zytoplasma in Abhängigkeit von pAkt zeigte sich, dass bei hohen pAkt-Werten und niedriger nukleärer p21-Expression, die zytoplasmatische Aktivität von p21 zunimmt. Nur 3 Tumore (Nr. 18, 23, 39) aus dieser Gruppe wiesen stark erhöhte zytoplasmatische p21-Werte auf. Einer davon war nukleär mäßig p21-positiv (Nr. 18), die anderen beiden (Nr. 23, 39) negativ. Mit einer Ausnahme fanden sich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma mäßig oder stark positive pAkt-Werte auf. Dieser abweichende Tumor (Nr. 23) war im Zytoplasma pAkt-negativ, jedoch bei stark positivem nukleären pAkt-Wert.

Tumore WHO IV

Da sich bei den Tumoren vom Grad IV einige Fälle fanden, die eine zytoplasmatische Aktivität von p21 zeigten, soll der Zusammenhang zwischen pAkt und sowohl dem nukleären als auch zytoplasmatischen p21 hergestellt werden.

p21 nukleär

Mit steigenden zytoplasmatischen pAkt-Werten bestand eine stetige Zunahme von p21 im Zellkern.

Bei negativer zytoplasmatischer pAkt waren 92% (28 von 34) p21-negativ. Dieser Anteil fiel bei mäßiger pAkt-Expression auf 73% (33 von 45) und bei starker pAkt-Ausprägung auf 43% (13 von 30).

Ein ähnliches Bild fand sich bei dem Vergleich von p21 im Zellkern mit der nukleären pAkt-Aktivität. Die p21-negativen Werte nahmen von 81% über 65% auf 55% ab. Die stark ausgeprägten p21-Fälle fielen zunächst in ihrer anteiligen Menge von 11% (4 von 37) bei negativem pAkt

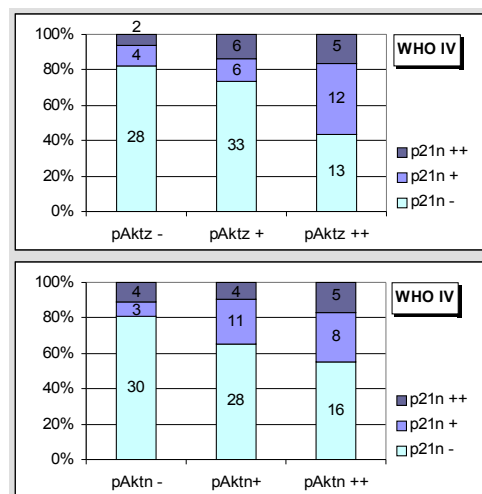


Abb. 39
Nukleäres p21 in Abhängigkeit von pAkt (WHO IV)
Oben: pAkt zyttoplasmatisch
Unten: pAkt nukleär

auf 9% (4 von 43) bei mäßigem pAkt ab, um dann wieder deutlich auf 17% (8 von 29) bei stark positiven pAkt-Werten anzusteigen.

p21 zytoplasmatisch

Auch bei der zytoplasmatischen Ausprägung zeigte sich eine Zunahme der p21-Werte in Abhängigkeit von der Akt-Aktivität. Bei negativem zytoplasmatischen pAkt waren 9% der Fälle (3 von 34) p21-positiv, bei mäßigem pAkt 16% (7 von 45) und bei starker pAkt-Expression 17% (5 von 30).

Diese Verteilung wich bei nukleärer Akt-Aktivierung nur geringfügig ab. Ein Fall verschob sich zu den Tumoren, die keine pAkt-Reaktion zeigten.

p21 zytoplasmatisch bei negativem nukleärem p21

Da pAkt an der Translokation von p21 ins Zytoplasma beteiligt zu sein scheint (Zhou BP et al. 2001), soll hier dargestellt werden, inwiefern die Präparate mit negativem nukleärem p21 (p21n-) bei zunehmender pAkt erhöhte zytoplasmatische p21-Werte aufweisen (p21z+ oder ++). Dabei wird auch die Abhängigkeit der zytoplasmatischen p21-Aktivität von pAkt deutlicher.

Bei negativer nukleärer p21-Expression fand sich ein Anstieg der zytoplasmatischen p21-Ausprägung in Abhängigkeit der pAkt-Werte.

Wie in den Diagrammen dargestellt, betrug der Anteil an stark positivem zytoplasmatischem p21 bei negativer zytoplasmatischer pAkt-Aktivität 4% (1 von 28). Dieser Anteil stieg über 10% (3 von 33) auf 15% (2 von 13) bei starker pAkt-Ausprägung an. Die drei zytoplasmatisch mäßig p21-positive Fälle fanden sich nur bei positiver pAkt.

Auch bei nukleär ansteigenden pAkt-Werten fanden sich ähnlich verteilte Steigerungen der zytoplasmatischen p21 wie im nebenstehenden Diagramm dargestellt.

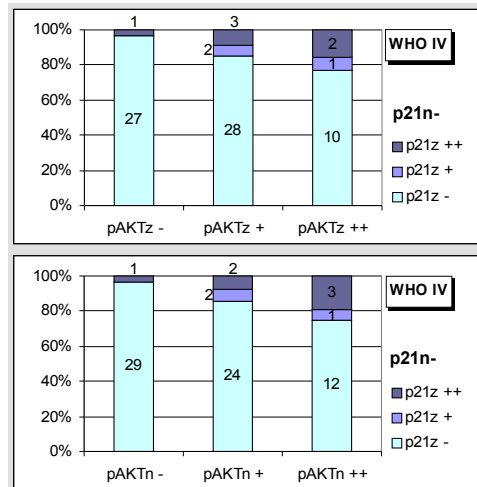


Abb. 40
Zytoplasmatisches p21 in Abhängigkeit von pAkt (Oben: pAktz, Unten: pAktn) bei fehlendem Nachweis von nukleärem p21

5.3.1.2.8. p21 in Abhängigkeit von p53

Tumore WHO II

Trotz mäßiger (2 von 12) bis starker p53-Reaktion (3 von 12) wies keines der Präparate erhöhte p21-Werte auf.

Tumore WHO III

In dieser Gruppe ließ sich kein Zusammenhang zwischen erhöhten p53- und gleichzeitig erhöhten p21-Werten nachweisen.

Von 26 Tumoren zeigten 4 eine mäßige p21-Steigerung im Zellkern. Diese verteilten sich mit 2 Fällen auf negative p53-Werte und mit je einem Fall auf mäßig beziehungsweise stark p53-exprimierende Präparate.

Tumore WHO IV

Die p21-positiven Fälle (mäßig und stark) machten bei negativer p53-Expression zunächst 31% (15 von 49) aus. Dieser Anteil fiel bei mäßig positivem p53 zunächst auf 27% (6 von 22) und stieg dann auf 37% (14 von 38).

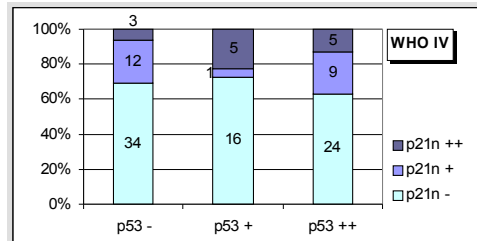


Abb. 41
Verteilung von p21 nukleär abhängig von p53

5.3.2. Tumore ependymalen Ursprungs

Es wurden insgesamt 63 Tumore ependymalen Ursprungs untersucht, 22 myxopapilläre Ependymome (WHO I), 31 Ependymome (WHO II), die hier als klassische Ependymome bezeichnet werden, sowie 10 anaplastische Ependymome (WHO III). Außerdem wurden 6 Subependymome in die Auswertungen einbezogen.

5.3.2.1. **Verteilung der einzelnen Faktoren**

5.3.2.1.1. **p53-Protein**

Es fanden sich im gesamten Kollektiv der ependymalen Tumoren nur einzelne Fälle mit einer positiven p53-Reaktion. In einem der untersuchten 22 myxopapillären Ependymome fand sich eine positive Reaktion (5%). Von den 31 klassischen Ependymomen blieben 27 (87%) negativ, 4 reagierten positiv (13%).

Unter den Subependymomen sowie unter den anaplastischen Ependymomen fanden sich nur negative Ergebnisse.

5.3.2.1.2. **Proliferationsindex MIB1**

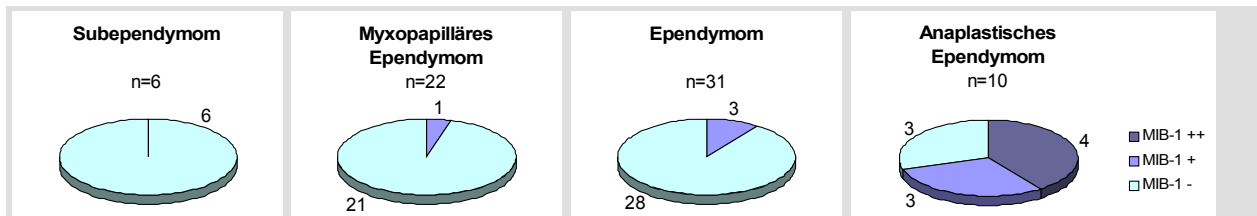


Abb. 42
Verteilung von MIB1 in ependymalen Tumoren

Von den Subependymomen wies keines eine erhöhte Proliferation auf, unter den myxopapillären und klassischen Ependymomen fanden sich nur einzelne erhöhte MIB1-Anreicherungen.

Demgegenüber waren in den anaplastischen Ependymomen deutliche positive Reaktionen nachzuweisen, 7 von 10 reagierten mäßig oder stark positiv, die restlichen 3 der 10 Tumore zeigten keine MIB1-Anreicherungen.

5.3.2.1.3. EGFR

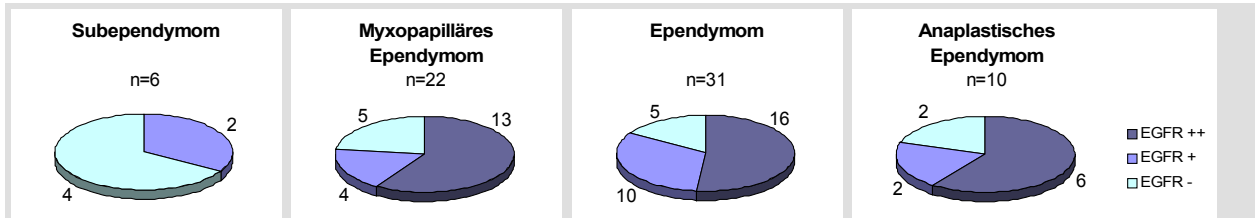


Abb. 43
Verteilung von EGFR in ependymalen Tumoren

Die meisten der ependymalen Tumore gleich welchen Grades zeigten eine starke EGFR-Expression. Ausnahme bildeten die Subependymome.

In 5 von 22 Fällen (23%) zeigten die myxopapillären Ependymome eine negative Reaktion. Weitere 4 von 22 (18%) kennzeichneten sich durch ein mäßig positives Ergebnis aus. Als stark positiv konnten 13 dieser Tumoren (59%) eingeordnet werden.

Von den klassischen Ependymomen blieben 5 von 31 (16%) EGFR-negativ, 10 (32%) wiesen eine mäßige und 16 (52%) eine starke Reaktion gegen EGFR auf.

Die anaplastischen Tumore zeigten in je 2 von 10 Fällen eine negative oder mäßige EGFR-Ausprägung. 6 von 10 Präparaten gehörten zu den stark reagierenden Tumoren.

5.3.2.1.4. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz)

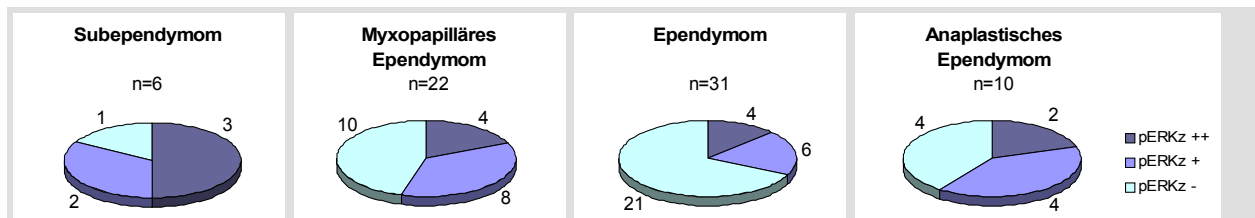


Abb. 44
Zytoplasmatische Verteilung von pERK1/2 in ependymalen Tumoren

Die pERK im Zytoplasma stellte sich zum größten Teil negativ bis mäßig positiv dar.

Die Subependymome fielen aus diesem Muster, da sie in der Hälfte der Fälle zytoplasmatisch stark positiv auf pERK reagierten (3 von 6). 2 weitere Tumore blieben mäßig positiv und einer negativ.

Unter den 22 myxopapillären Ependymomen gab es demgegenüber neben 10 (45%) zytoplasmatisch pERK-negativen Tumoren 8 mäßig reagierende Fälle (36%). Eine starke Färbung konnte für 4 dieser Tumore (18%) festgestellt werden.

Die klassischen Ependymome zeigten in 21 von 31 Fällen (68%) ein negatives Resultat. Weitere 6 Präparate (19%) hatten ein mäßiges Ergebnis und nur bei 4 von 31 (13%) fand sich eine starke Reaktion gegen pERK im Zytoplasma.

Von den anaplastischen Ependymomen wiesen je vier von 10 eine negative beziehungsweise mäßige pERK-Reaktion auf, 2 von 10 reagierten stark positiv.

5.3.2.1.5. Phospho-ERK nukleär (pERKn)

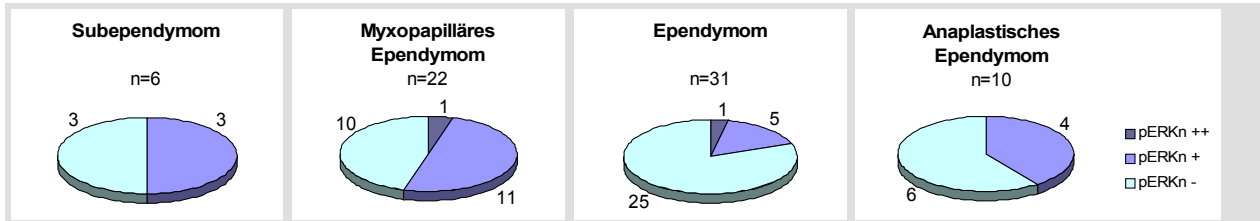


Abb. 45
Nukleäre Verteilung von pERK1/2 in ependymalen Tumoren

In den Zellkernen zeigte sich allgemein eine schwache Reaktion gegen pERK.

Die Subependymome waren in der Hälfte der Fälle entweder negativ oder mäßig positiv.

Von den myxopapillären Ependymomen reagierte ein einzelner Tumor im Zellkern stark gegen den pERK-Antikörper. Die Hälfte der Präparate (11 von 22) zeigte eine mäßige Reaktion und knapp unter 50% wiesen negative Werte auf (10 von 22).

Bei den Ependymomen fand sich ebenfalls ein einzelner Tumor (3%), der eine starke Ausprägung der nukleären pERK aufwies. Dagegen blieben 25 von 31 Präparaten (81%) pERK-negativ. Die restlichen 5 Tumore dieser Gruppe (16%) zeichneten sich durch eine mäßige Reaktion aus.

Von den untersuchten anaplastischen Ependymome zeigte keines eine starke nukleäre pERK-Aktivität. Die meisten dieser Tumore blieben bei negativen Werten (6 von 10), des weiteren erbrachten 4 ein mäßig positives Ergebnis.

5.3.2.1.6. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz)

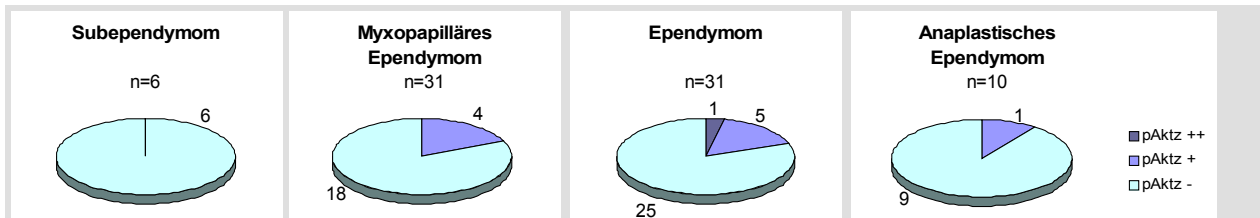


Abb. 46
Zytoplasmatische Verteilung von pAkt in ependymalen Tumoren

Eine starke zytoplasmatische Reaktion gegen pAkt fand sich nur in einem einzigen der 63 ependymalen Tumore. Es handelte sich hierbei um ein klassisches Ependymom (WHO II).

Unter den Subependymomen gab es nur negative Resultate.

Die myxopapillären Ependymome zeigten in 82% der Fälle (18 von 22) ein negatives Ergebnis, 18% reagierten mäßig positiv.

Von den klassischen Ependymomen wiesen 81% (25 von 31) negative zytoplasmatische pAkt-Werte auf. Neben dem einen stark reagierenden Fall kennzeichneten sich weitere 5 Präparate (16%) durch mäßige pAkt-Reaktion aus.

Die anaplastischen Ependymome blieben nahezu alle (9 von 10) im Zytoplasma pAkt-negativ. Ein Fall erbrachte ein mäßig positives Ergebnis.

5.3.2.1.7. Phospho-Akt nukleär (pAktn)

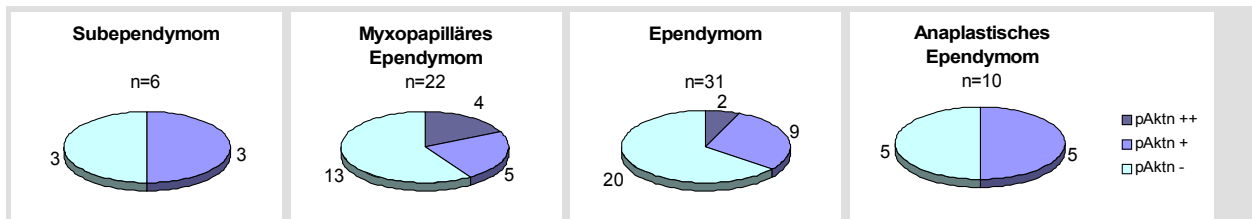


Abb. 47
Nukleäre Verteilung von pAkt in ependymalen Tumoren

Je die Hälfte der Subependymome reagierte negativ oder mäßig positiv auf pAkt im Zellkern (je 3 von 6).

Die myxopapillären Ependymome verteilten sich auf 13 (59%) negativ reagierende Tumore, sowie 5 mäßig (23%) und 4 stark positive (18%) Fälle.

Ähnlich war die Verteilung bei den klassischen Ependymomen. 2 Fälle (6%) wiesen eine starke und 9 der 31 Präparate (29%) eine mäßig positive Reaktion auf, 20 (65%) blieben negativ.

Von den anaplastischen Ependymomen reagierte je die Hälfte negativ oder mäßig auf pAkt im Zellkern (je 5 von 10).

5.3.2.1.8. PTEN-Protein

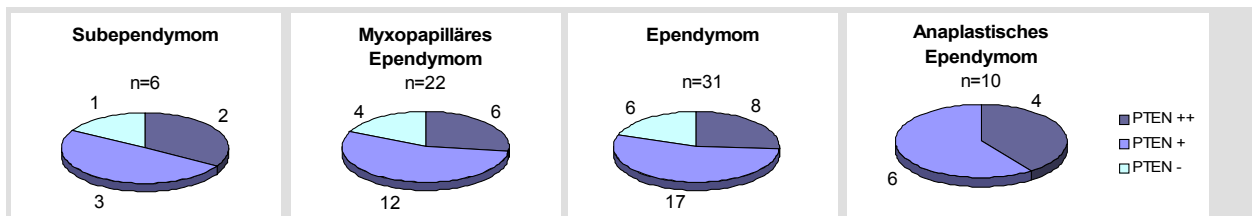


Abb. 48
Verteilung von PTEN in ependymalen Tumoren

Nur einzelne Tumore blieben negativ gegen PTEN, die meisten wiesen eine mäßige bis starke Positivität auf. Dabei zeigte sich unter den Subependymomen sowie den myxopapillären und klassischen Ependymomen eine sehr ähnliche Verteilung der Ausprägungen.

Ein Subependymom blieb negativ, 3 zeigten ein mäßig und 2 ein stark positives Ergebnis.

Bei den myxopapillären Ependymomen reagierten 4 von 22 (18%) negativ, 12 (55%) mäßig und 6 (27%) stark positiv.

Von den klassischen Ependymomen konnten wiederum 6 von 31 (19%) negativ bewertet werden. Mit 17 von 31 waren wiederum über die Hälfte dieser Tumoren (55%) mäßig PTEN-positiv und 8 (26%) zeigten stark positive Werte.

Unter den anaplastischen Ependymomen fanden sich 6 von 10 Tumoren mit mäßiger PTEN-Ausprägung sowie 4 von 10 mit starker Reaktion.

5.3.2.1.9. p21-Protein zytoplasmatisch (p21z)

Auf die Darstellung der zytoplasmatischen p21-Reaktion wird verzichtet. Nur ein einzelner Tumor, ein anaplastisches Ependymom, reagierte im Zytoplasma stark positiv, ansonsten gab es für p21 keine positiven Reaktionen in dieser Lokalisation.

5.3.2.1.10. p21-Protein nukleär (p21n)

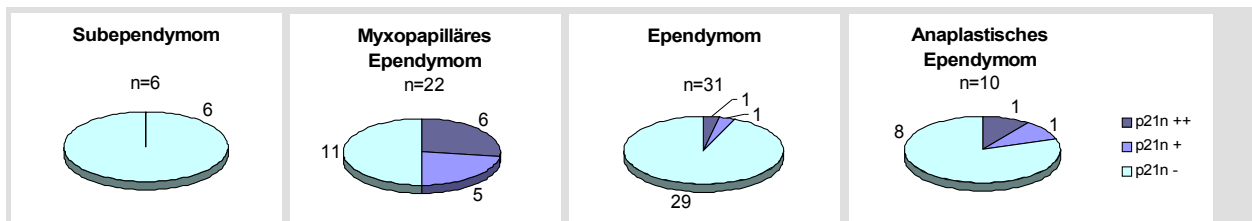


Abb. 49
Nukleäre Verteilung von p21 in ependymalen Tumoren

Unter den Subependymomen fand sich keine positive Reaktion gegen p21.

Von den übrigen Tumoren waren sowohl die klassischen als auch die anaplastischen Ependymome überwiegend p21-negativ. Einzig die myxopapillären Ependymome zeigten deutlich positive Reaktionen. Es fanden sich unter den 22 myxopapillären Ependymomen 6 (27%) mit stark, sowie 5 (23%) mit mäßig positivem Resultat. Die Hälfte blieb negativ (11 von 22).

Die klassischen Ependymome zeigten in 2 Fällen ein positives Ergebnis (je 3%). Die Übrigen 29 Präparate blieben negativ (94%).

Ebenso fanden sich bei den anaplastischen Ependymomen zwei positiv reagierende Fälle (je 1 von 10), 8 wiesen wiederum ein negatives Ergebnis auf.

5.3.2.2. Vergleichende Darstellung einzelner Faktoren

Über den Zusammenhang der Malignität und Prognose mit der Gradeinteilung der Ependymome gibt es in der Literatur unterschiedliche Daten (Schiffer et al. 1991; Schiffer, Giordana 1998; Robertson et al. 1998; Horn et al. 1999; Ho et al. 2001). Da sich auch in dieser Arbeit bei der Verteilung der einzelnen Faktoren ein solcher Bezug nicht eindeutig herstellen ließ, werden die klassischen und anaplastischen Ependymome als eine Gruppe behandelt (Ependymome WHO II/III).

Die Subependymome werden nicht mit aufgeführt, weil es sich um eine gesonderte Tumorentität zu handeln scheint und das Kollektiv zu wenige Fälle für einen Vergleich beinhaltet.

Wegen deutlicher Unterschiede in der Verteilung einzelner Faktoren bei den myxopapillären Ependymomen gegenüber den klassischen und anaplastischen Ependymomen werden diese als gesonderte Gruppe beschrieben. Sie setzt sich aus 22 myxopapillären Ependymomen zusammen und wird in Folge als „Ependymome WHO I“ bezeichnet.

Die andere Gruppe („Ependymome WHO II/III“) enthält insgesamt 41 Tumore, 31 klassische Ependymome (WHO II) und 10 anaplastische Ependymome (WHO III).

5.3.2.2.1. MIB1 in Abhängigkeit von EGFR

Ependymome WHO I

Der EGFR zeigte sich mit 77% in den meisten myxopapillären Ependymomen positiv (17 von 22). Eine Reaktion gegen MIB1 fand sich dagegen in nur einem der 22 Tumore. Dieser wies kein EGFR auf.

Ependymome WHO II/III

Bei insgesamt 7 EGFR-negativen Präparaten fanden sich 5 MIB1-negative Fälle, sowie 2 MIB1-positive Tumore.

Auch bei mäßiger EGFR-Expression stellten sich die meisten Präparate (10 von 12) MIB1-negativ dar, 2 Fälle reagierten mäßig positiv.

Bei starker Ausprägung des EGFR machten erneut die MIB1-negativen Fälle mit 16 von 22 den größten Teil aus.

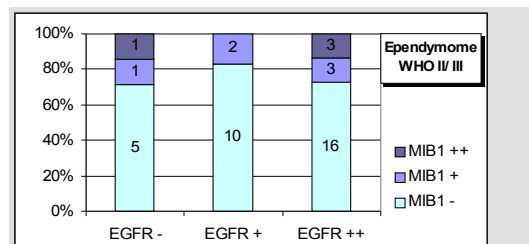


Abb. 50
MIB1 in Abhängigkeit von EGFR

5.3.2.2.2. MIB1 in Abhängigkeit von pERK

Ependymome WHO I

Ein direkter Vergleich der MIB1- mit der pERK-Expression ist erneut wegen der negativen MIB1-Resultate in dieser Gruppe nicht möglich. Der Tumor mit positivem MIB1-Wert zeigte keine nennenswerte pERK-Reaktion.

Ependymome WHO II/III

Die positiv gegen den MIB1-Antikörper reagierenden Fälle nahmen in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK leicht ab. Lag keine pERK-Expression vor, so fanden sich 7 MIB1-positive Fälle (25%), bei mäßig positiver pERK 2 von 10 Tumoren, die stark MIB1 aufwiesen. Bei starker pERK-Expression im Zytoplasma reagierte nur ein Tumor mäßig positiv.

MIB1 in Abhängigkeit von nukleärer pERK zeigte eine Tendenz zu stärkerer Ausprägung. Bei negativer pERK blieb der Großteil MIB1-negativ (25 von 31), 6 Tumore reagierten positiv gegen MIB1. Bei mäßiger pERK-Reaktion fanden sich 5 MIB1-negative Fälle von 9, sowie 4 positive. Der einzelne Fall, der eine stark positive nukleäre pERK aufwies, blieb ohne Anzeichen auf Proliferationssteigerung.

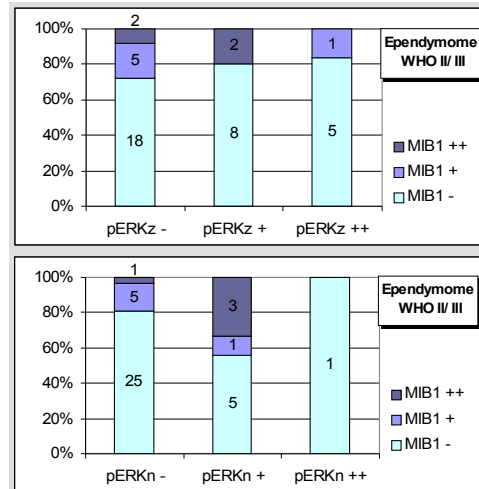


Abb. 51
MIB1 in Abhängigkeit von pERK
Oben: pERK zytoplasmatisch
Unten: pERK nukleär

5.3.2.2.3. pERK in Abhängigkeit von EGFR

Ependymome WHO I

Die Verteilung der pERK zeigte keine besonderen Auffälligkeiten. In Anbetracht der niedrigen Fallzahlen verteilte sich die pERK in Abhängigkeit von EGFR gleichmäßig auf die Ausprägungsgrade. Bei negativem EGFR-Status fanden sich zytoplasmatisch und nukleär 2 pERK-negative, 2 mäßig und je ein stark positiv reagierender Fall. Lag EGFR mäßig erhöht vor, blieb ein Tumor zytoplasmatisch pERK-negativ, nukleär waren dies 2 Fälle. Weiter reagierten im Zytoplasma 2 Präparate mäßig und einer stark pERK-positiv, im Zellkern waren 2 Tumore mäßig positiv. Bei starker EGFR-Expression wiesen zytoplasmatisch 7 Tumore, nukleär 6 negative pERK-Werte auf. 4 Fälle reagierten im Zytoplasma mäßig und 2 stark positiv, während im Zellkern 7 Präparate mäßig positive pERK-Werte aufwiesen.

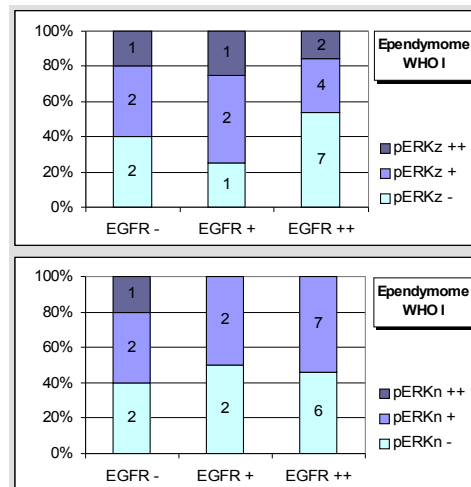


Abb. 52
pERK in Abhängigkeit von EGFR
Oben: pERK im Zytoplasma
Unten: pERK im Zellkern

Ependymome WHO II/III

Es ergab sich eine leichte Tendenz von erhöhten pERK-Werten mit zunehmendem EGFR.

Bei negativem EGFR-Status fanden sich zytoplasmatisch 5 pERK-negative und je ein mäßig und stark positives Ergebnis. Im Zellkern reagierten 6 Tumore negativ und einer mäßig positiv.

Bei mäßig positiver EGFR-Expression erbrachte kein Tumor nukleär positive pERK-Werte (12 pERK-). Im Zytoplasma wiesen dagegen neben 7 negativen Reaktionen 3 Tumore mäßig und 2 stark positive pERK-Werte auf.

Die stark EGFR-positiven Tumore zeigten in je 13 Fällen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär keine pERK-positive Reaktion. Des weiteren reagierten im Zytoplasma 6 Fälle mäßig und 3 Fälle stark positiv auf pERK, im Zellkern gab es 8 mäßig und einen stark positiven Fall.

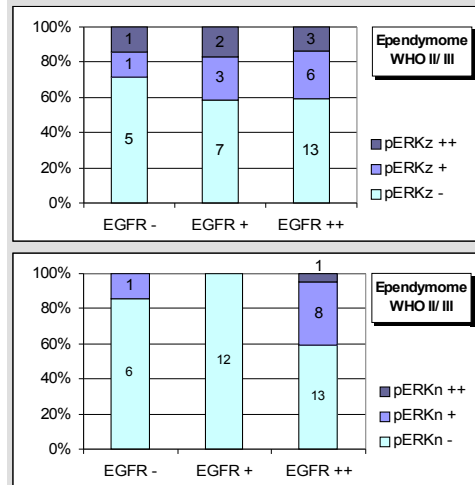


Abb. 53
pERK in Abhängigkeit von EGFR
Oben: pERK im Zytoplasma
Unten: pERK im Zellkern

5.3.2.2.4. pAkt in Abhängigkeit von EGFR

Ependymome WHO I

Die zytoplasmatische pAkt-Reaktion war bei den myxopapillären Ependymomen wesentlich geringer ausgeprägt als die nukleäre, was sich auch beim Vergleich mit der EGFR-Expression deutlich zeigt. Unabhängig vom EGFR waren jeweils die meisten Präparate zytoplasmatisch pAkt-negativ. 4 Fälle wiesen ein mäßig positives Ergebnis auf, ein Fall bei mäßigem EGFR-Status und 3 bei stark ausgeprägtem EGFR.

In den Zellkernen waren dagegen bei negativem EGFR-Status 2 von 5 Fällen negativ, 2 weitere Fälle reagierten mäßig und ein Tumor stark positiv. Bei mäßig ausgeprägtem EGFR lagen mehr pAkt-negative Fälle vor (3 von 4). War die EGFR-Expression stark positiv, blieben von 13 Tumoren 8 pAkt-negativ, 3 reagierten mäßig und 2 stark.

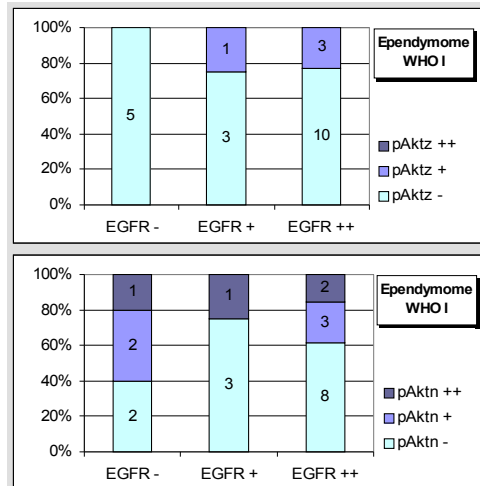


Abb. 54
pAkt in Abhängigkeit von EGFR
Oben: pAkt im Zytoplasma
Unten: pAkt im Zellkern

Ependymome WHO II/III

Auch in dieser Gruppe war die nukleäre pAkt-Reaktion deutlicher als die zytoplasmatische.

Bei negativem EGFR-Status fanden sich ausschließlich negative zytoplasmatische pAkt-Werte (7 von 7). Bei mäßigem EGFR waren 2 von 12 Fällen positiv (je einer mäßig oder stark positiv) und bei starker EGFR-Expression 5 von 22.

Im Zellkern waren bei starker EGFR-Ausprägung ebenfalls die meisten pAkt-positiven Fälle zu finden (9 mäßig positiv, 2 stark positiv). Bei mäßigem EGFR traten 2 von 10 positive Tumore auf und bei fehlendem EGFR-Nachweis neben 4 pAkt-negativen Tumoren 3, die nukleär mäßig pAkt exprimierten.

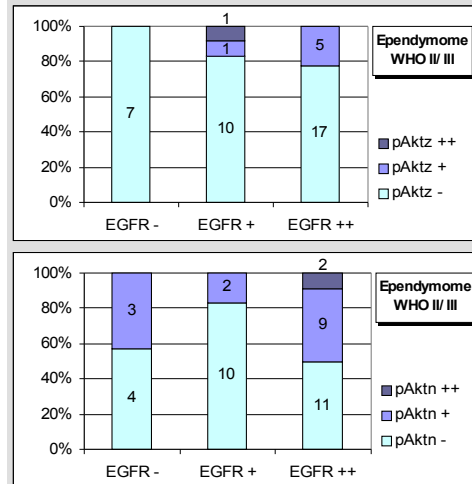


Abb. 55
pAkt in Abhängigkeit von EGFR
Oben: pAkt im Zytoplasma
Unten: pAkt im Zellkern

5.3.2.2.5. Vergleich von pERK und pAkt

5.3.2.2.5.1. Zytoplasmatische pAkt (pAktz) in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (pERKz)

Ependymome WHO I

Die insgesamt 4 Tumore mit mäßig positiver pAkt-Reaktion im Zytoplasma verteilten sich je zur Hälfte auf ein negatives oder mäßig positives pERK-Ergebnis (2 von 10, 2 von 6). Bei starker pERK-Expression war kein Fall im Zytoplasma pAkt-positiv.

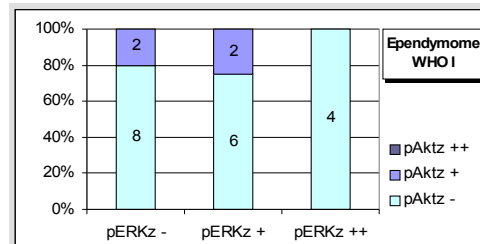


Abb. 56
pAkt im Zytoplasma in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma

Ependymome WHO II/III

Auch bei diesen Tumoren fanden sich die positiv gegen pAkt reagierenden Fälle bei negativer oder mäßiger pERK-Ausprägung. Die stark pERK-positiven Tumore wiesen alle negative pAkt-Werte auf. Bei negativer pERK waren insgesamt 4 von 25 pAkt-positiv, bei mäßigem pERK-Status fanden sich 3 von 10 Fällen mit mäßiger pAkt-Reaktion.

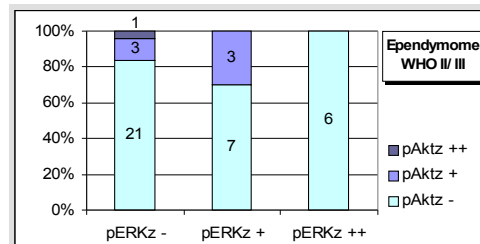


Abb. 57
pAkt im Zytoplasma in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma

5.3.2.2.5.2. Nukleäre pAkt (pAktn) in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pERK (pERKz)

Ependymome WHO I

Im Zellkern war pAkt insgesamt stärker ausgeprägt als im Zytoplasma. Die pAkt-positiven Fälle verteilten sich folgendermaßen auf die pERK-Ausprägungen. Bei negativer pERK waren 2 von 10 Tumoren mäßig pAkt-positiv, bei mäßiger pERK-Ausprägung fanden sich 4 stark positive Fälle und ein mäßig positives Präparat von 8. Je zwei Tumore wiesen bei stark positivem pERK-Status entweder negative oder mäßig positive pAkt-Werte auf.

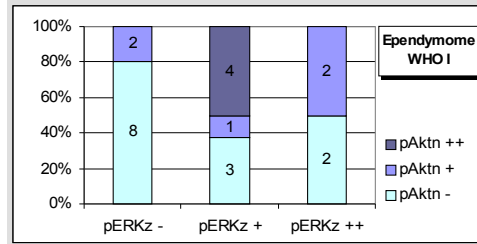


Abb. 58
pAkt im Zellkern in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma

Ependymome WHO II/III

Von 25 pERK-negativen Tumoren waren 15 pAkt-negativ, 8 mäßig und 2 stark positiv. Bei mäßig positivem pERK-Status fanden sich neben 4 pAkt-negativen Fällen 6 mäßig positive.

Die stark auf pERK reagierenden Tumore blieben alle im Zellkern pAkt-negativ.

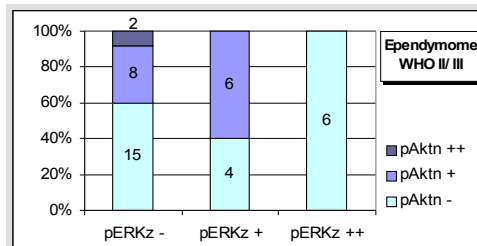


Abb. 59
pAkt im Zellkern in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma

5.3.2.2.6. **pAkt in Abhängigkeit von PTEN**

Ependymome WHO I

Bei negativem PTEN fanden sich ausschließlich pAkt-negative Präparate, von 12 Präparaten mit mäßig erhöhtem PTEN 9 negative und 3 positive pAkt-Reaktionen. Bei einer starken PTEN-Expression blieben 5 von 6 pAkt-negativ.

Die nukleäre pAkt verteilte sich in ihrer Ausprägung mit leichter Schwankung gleichmäßig. Lag keine PTEN-Reaktion vor, so fanden sich von 4 Fällen je zwei negative und zwei positive pAkt-Ergebnisse. Bei mäßigem PTEN waren dies 8 von 12 negative und 4 Fälle mit positiver pAkt-Reaktion im Zellkern. Bei starker PTEN-Expression fanden sich wiederum 3 von 6 negative pAkt-Reaktionen sowie 3 positive Fälle.

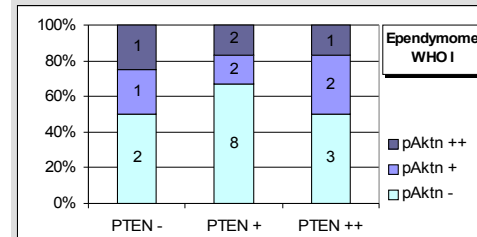
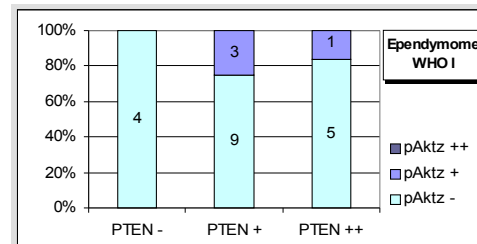


Abb. 60
pAkt in Abhängigkeit von PTEN
Oben: pAkt im Zytoplasma
Unten: pAkt im Zellkern

Ependymome WHO II/III

Von 6 PTEN-negativen Präparaten reagierte kein Fall zytoplasmatisch gegen pAkt, 3 zeigten nukleär ein mäßig positives Ergebnis.

Bei einer mäßigen PTEN-Reaktion fanden sich unter insgesamt 23 Tumoren zytoplasmatisch 18 negative und 5 mäßig positive pAkt-Ergebnisse. Im Zellkern waren neben 15 negativen 8 positive Reaktionen zu sehen.

Die 12 Ependymome mit stark positiven PTEN-Werten zeigten in 10 Fällen zytoplasmatisch keine Reaktion gegen pAkt. Je ein Fall reagierte im Zytoplasma mäßig oder stark positiv. Im Zellkern blieben dagegen 7 Fälle negativ und 5 wiesen mäßige pAkt-Werte auf.

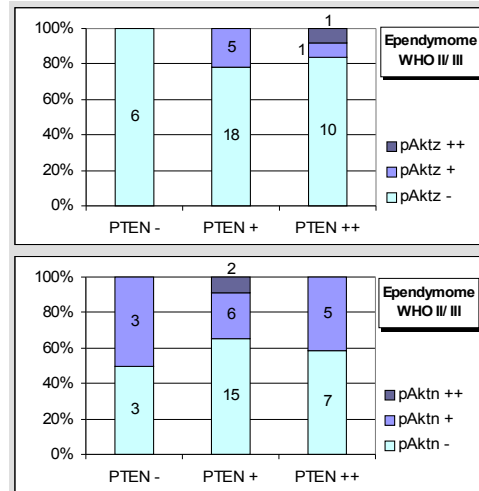


Abb. 61
pAkt in Abhängigkeit von PTEN
Oben: pAkt im Zytoplasma
Unten: pAkt im Zellkern

5.3.2.2.7. p21 nukleär in Abhängigkeit von pERK

Ependymome WHO I

In Abhängigkeit von pERK fanden sich bei zunehmenden pERK-Werten ansteigende Ausprägungen von p21.

Zytoplasmatisch pERK-negative Tumoren wiesen in 7 von 10 Fällen negative p21-Werte auf, in 3 Fällen positive. Bei mäßiger pERK-Expression waren 4 Fälle negativ und 4 positiv. War pERK zytoplasmatisch stark ausgeprägt, reagierten alle Tumore positiv gegen p21, 2 mäßig und 2 stark.

Die p21-Verteilung verhielt sich hinsichtlich der nukleären pERK ähnlich, allerdings lag nur in einem Fall eine stark positive pERK-Expression im Zellkern vor. Bei negativer pERK fanden sich erneut von 10 Tumoren 7 mit negativem, 3 mit positivem p21-Resultat. Bei mäßiger pERK-Ausprägung verteilten sich die Tumore auf 3 negativ, 3 mäßig und 5 stark positiv reagierende Fälle.

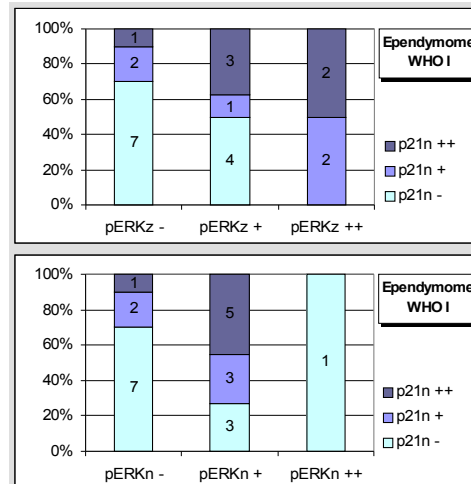


Abb. 62
Nukleäres p21 in Abhängigkeit von pERK
Oben: pERK im Zytoplasma
Unten: pERK im Zellkern

Ependymome WHO II/III

Unter diesen Ependymomen waren mit Ausnahme eines Falles alle p21-positiven Präparate bei zytoplasmatisch und nukleär negativen pERK-Werten zu finden.

Der eine Fall mit stark positivem p21-Wert fand sich ebenfalls bei zytoplasmatisch negativer pERK, dagegen wies der Tumor im Zellkern stark positive pERK-Werte auf.

5.3.2.2.8. p21 nukleär in Abhängigkeit von pAkt

Zytoplasmatisches p21 wird hier nicht mit in die Vergleiche aufgenommen, da es sich nur in einem einzelnen Tumor erhöht zeigte.

Ependymome WHO I

Je die Hälfte der Präparate wies unabhängig vom zytoplasmatischen pAkt-Status negative p21-Werte auf.

Fehlte die zytoplasmatisch aktivierte Akt, so fanden sich 9 p21-negative, 5 mäßig und 4 stark positive Fälle. Lag eine mäßige pAkt-Expression im Zytoplasma vor, so waren 2 von 4 Fällen p21 negativ und 2 stark positiv.

In Abhängigkeit von nukleärer pAkt fanden sich bei fehlendem pAkt 7 p21-negative und 6 positive Fälle (4 mäßig, 2 stark). Die Verteilung bei mäßig positiver pAkt beinhaltete 2 negative, sowie 3 p21-positive Resultate (1 mäßig, 2 stark). Bei starker nukleärer pAkt-Expression wies je die Hälfte negative oder stark positive Werte auf.

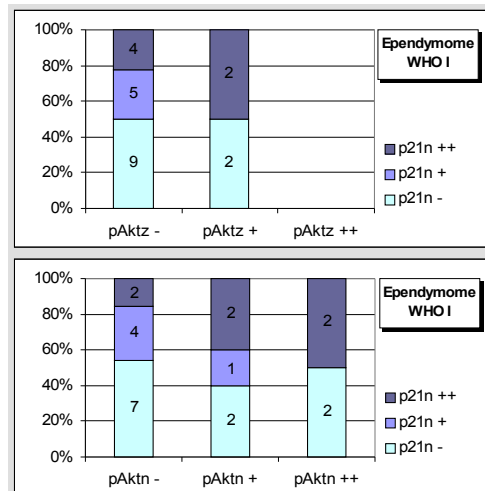


Abb. 63
Nukleäres p21 in Abhängigkeit von pAkt
Oben: pAkt im Zytoplasma
Unten: pAkt im Zellkern

Ependymome WHO II/III

In dieser Gruppe fanden sich sehr wenige p21-positive Fälle, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wird.

Die 4 p21-positiven Tumore waren in Abhängigkeit von zytoplasmatischer pAkt vor allem bei negativer pAkt vertreten (2 Fälle p21+, 1 Fall p21-), ein Fall reagierte bei mäßig positiver pAkt stark p21-positiv.

Bei Betrachtung der nukleären pAkt verteilten sich die positiven Fälle auf die negative pAkt-Ausprägung mit den 2 stark p21-positiven Fällen, sowie mit je einem mäßig positiven Fall auf mäßig oder stark ausgeprägte pAkt-Werte.

5.3.3. Tissue-Array

Als weitere Methode der Untersuchung an FFPE Gewebe wurden *Tissue-Arrays* angefertigt. Da diese Methode es erlaubt, ein größeres Kollektiv an Tumoren zu bearbeiten, soll hier ein Vergleich der herkömmlichen Färbung vollständiger Gewebeschnitte mit *Tissue-Arrays* hergestellt werden. Insbesondere wird auf die Aussagekraft der Immunhistochemie an *Tissue-Arrays* eingegangen.

Die Auswahl der Gewebe wurde anhand von HE-Färbungen getroffen. Hierbei wurden gezielt solche Bereiche der Tumore mit hoher Zellzahl und intaktem Zellverband ausgewählt. Bei den anaplastischen Tumoren und Glioblastomen wurden Bereiche mit hohem Anteil an Gefäßproliferaten und Nekrosen ausgeschlossen.

Es konnten insgesamt 60 astrozytäre und 42 ependymale Tumore in die Vergleichsgruppen aufgenommen werden, 8 Astrozytome (WHO II), 8 anaplastische Astrozytome (WHO III) und 44 Glioblastome (WHO IV) sowie 16 myxopapilläre Ependymome (WHO I), 18 Ependymome (WHO II) und 8 anaplastische Ependymome (WHO III). Im folgenden wird zunächst die Verteilung der einzelnen Faktoren im *Array* dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der herkömmlichen Immunhistochemie mit den Daten der *Arrays* verglichen.

5.3.3.1. Tissue-Array – Astrozytäre Tumore

5.3.3.1.1. EGFR

Unter den Astrozytomen fand sich nur in einem eine positive Reaktion gegen EGFR (+). Mit dem WHO-Grad stieg die Anzahl der positiven EGFR-Reaktionen. Von 8 anaplastischen Astrozytomen waren 3 mäßig positiv. Unter den Glioblastomen fanden sich 24 von 44 (55%) mit positiven Werten. 20 Tumore dieser Gruppe blieben negativ.

5.3.3.1.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz)

Die Verteilung der zytoplasmatischen pERK ähnelte der des EGFR. Insgesamt zeigten die Glioblastome die meisten positiven Reaktionen in 21 von 44 Tumoren (48%). Unter den anaplastischen Astrozytomen waren 2 von 8 positiv und bei den Astrozytomen 3 von 8 (1+, 2++).

5.3.3.1.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn)

In der Verteilung der nukleären pERK fanden sich wenig Abweichungen im Vergleich zur zytoplasmatischen. Unter den Astrozytomen WHO II zeigte je die Hälfte (4 von 8) positive beziehungsweise negative Werte. Unter den anaplastischen Astrozytomen wies nur ein Tumor eine positive Reaktion auf. In 17 von 44 (39%) der Glioblastome reagierte pERK im Zellkern positiv.

5.3.3.1.4. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz)

Unter den Astrozytomen WHO-Grad II und III fanden sich vor allem negative Werte der pAkt im Zytoplasma (7 von 8 Astrozytomen, 5 von 6 Anaplastischen Astrozytomen). Ein Astrozytom sowie 3 anaplastische Astrozytome zeigten positive Ergebnisse. Bei den Glioblastomen überwogen die positiven Reaktionen in insgesamt 25 von 44 Tumoren (57%).

5.3.3.1.5. Phospho-Akt nukleär (pAktn)

Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Ausprägung der pAkt zeigte sich in den Zellkernen vermehrt eine positive Reaktion. Bei den Astrozytomen fanden sich 3 von 8 Tumoren mit negativem, 5 von 8 mit positivem Ergebnis. Unter den anaplastischen reagierte einer von 8 negativ. Die Glioblastome blieben in 8

von 44 (18%) negativ. Von den restlichen Tumoren WHO III hatten 20 (46%) eine mäßige und 16 (36%) eine starke Intensität.

5.3.3.1.6. PTEN-Protein

PTEN war in den Astrozytomen in 3 Tumoren mäßig und 2 stark positiv ausgeprägt, während 3 nicht reagierten. In den anaplastischen fand sich dagegen vor allem eine negative Reaktion (5 von 8) bei einem stark positiven Ergebnis. Die Glioblastome zeigten in 26 Fällen eine mäßige, in 4 eine starke PTEN-Reaktion (68%).

5.3.3.1.7. p21-Protein nukleär und zytoplasmatisch (p21n, p21z)

In keinem der im *Tissue-Array* untersuchten astrozytären Tumore fand sich eine positive zytoplasmatische p21-Reaktion.

Auch im Zellkern zeigte sich überwiegend ein negatives Ergebnis. Einzig in 8 von 44 untersuchten Glioblastomen konnte p21 in den Zellkernen mäßig positiv nachgewiesen werden.

5.3.3.1.8. p53-Protein

Zwei der Astrozytome reagierten positiv gegen den p53-Antikörper, einer davon deutlich. Unter den anaplastischen Astrozytomen waren es bereits 5 von 8 mit positiver Reaktion. Die Glioblastome zeigten in 21 von 44 (48%) kein p53, 13 (29%) reagierten jedoch mäßig und 10 (23%) stark positiv.

5.3.3.1.9. Proliferationsindex MIB1

Die niedriggradigen Astrozytome zeigten keine MIB1-assoziierte Proliferationssteigerung und unter den anaplastischen reagierte einer von 8 positiv. Auch in den Glioblastomen fand sich im *Tissue-Array* in 27 von 44 (61%) kein Anhalt für gesteigerte Proliferation. 11 (25%) Glioblastome reagierten mäßig und 6 (14%) stark positiv.

5.3.3.2. *Tissue-Array* – Ependymale Tumore

5.3.3.2.1. EGFR

Unter den ependymalen Tumoren zeigten nur 6 aus der Gruppe der myxopapillären Ependymome eine starke Reaktion gegen EGFR. Aus dieser Gruppe reagierten 8 von 16 mäßig, 2 blieben negativ. Unter den klassischen Ependymomen zeigten 6 von 18 keine Reaktion ebenso wie 3 der 8 anaplastischen Ependymome. Dies entspricht einer positiven Reaktion bei der Mehrzahl der myxopapillären Ependymome, bei zwei Dritteln der klassischen Ependymome sowie gut der Hälfte der anaplastischen Ependymome.

5.3.3.2.2. Phospho-ERK zytoplasmatisch (pERKz)

Bei den myxopapillären Ependymomen verteilte sich die EGFR-Ausprägung relativ gleichmäßig mit 7 negativen, und 9 positiven Ergebnissen. Dagegen wiesen die Ependymome WHO II in der Mehrzahl (12 von 18) keine Reaktion auf, ebenso wie alle der 8 untersuchten anaplastischen Ependymome.

5.3.3.2.3. Phospho-ERK nukleär (pERKn)

Von allen untersuchten Tumoren dieser Gruppe fand sich nur in 2 myxopapillären Ependymomen (von insgesamt 42) eine starke pERK-Anreicherung im Zellkern. Die restlichen myxopapillären sowie klassischen Ependymome verteilten sich je zur Hälfte auf negative und mäßige Reaktionen (je 7 myxopapilläre und je 9 klassische Ependymome). Von den anaplastischen Ependymomen zeigte nur eines von 8 mäßig positive Werte.

5.3.3.2.4. Phospho-Akt zytoplasmatisch (pAktz)

Von den myxopapillären Ependymomen reagierten 10 im Zytoplasma nicht auf pAkt, 6 mäßig positiv. Von den Ependymomen blieben 7 negativ, 10 mäßig, einer stark positiv. Unter den anaplastischen fanden sich 3 negative und 4 mäßig positive Tumore. Insgesamt reagierten von den 42 ependymalen Tumoren 2 stark im Zytoplasma gegen den pAkt-Antikörper.

5.3.3.2.5. Phospho-Akt nukleär (pAktn)

Die meisten myxopapillären Ependymome blieben im Zellkern pAkt-negativ (11 von 16). Einer zeigte eine starke Reaktion. Unter den klassischen Ependymomen fanden sich 2 stark reagierende Präparate, daneben reagierten 7 mäßig und 9 blieben negativ. Auch bei 5 der 8 anaplastischen Ependymome fand sich ein negatives Ergebnis.

5.3.3.2.6. PTEN-Protein

In der Mehrzahl der ependymalen Tumore zeigte sich eine positive Reaktion gegen den PTEN-Antikörper. Es blieben 4 der 16 myxopapillären, 6 der 18 klassischen und 5 von 8 anaplastischen Ependymomen negativ.

5.3.3.2.7. p21-Protein zytoplasmatisch und nukleär (p21z, p21n)

Zwei Tumore zeigten in der *Tissue*-Analyse eine positive zytoplasmatische Reaktion gegen p21 (p21z), ein klassisches Ependymom reagierte mäßig und ein anaplastischer Tumor stark positiv.

Im Zellkern (p21n) konnten in 7 von 16 myxopapillären und 2 von 8 anaplastischen Geweben positive Werte nachgewiesen werden. Die klassischen Ependymome blieben negativ.

5.3.3.2.8. p53-Protein

Das p53-Antigen ließ sich vor allem in den klassischen Ependymomen nachweisen (6 von 18). Die myxopapillären blieben alle negativ. Auch unter den anaplastischen Ependymomen fand sich von 8 Tumoren nur ein einziger, der im *Tissue-Array* eine positive Reaktion zeigte.

5.3.3.2.9. Proliferationsindex MIB1

Im *Tissue-Array* fanden sich nur in 3 der 42 ependymalen Tumore Zeichen einer erhöhten Proliferation. Dies waren 3 der 8 anaplastischen Ependymome. Alle übrigen blieben negativ.

5.3.3.3. Vergleich Tissue-Array – herkömmliche Immunhistochemie

Im folgenden soll ein Vergleich zwischen der herkömmlichen Immunhistochemie an vollständigen Gewebeschnitten und den gezielt ausgewählten Proben der *Tissue-Arrays* gezogen werden. Hierbei wird erneut die angewandte Unterteilung in Tumoren mit astrozytärem (Abb. 64) sowie mit ependyalem (Abb. 65) Ursprung verwendet. Die dargestellten Diagramme sollen die Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungsmöglichkeiten veranschaulichen. Hierbei ist jedoch auf die zum Teil geringen absoluten Zahlen der geprüften Untergruppen hinzuweisen, welche die prozentualen Ergebnisse teils verzerrt darstellen.

5.3.3.3.1. Astrozytäre Tumore

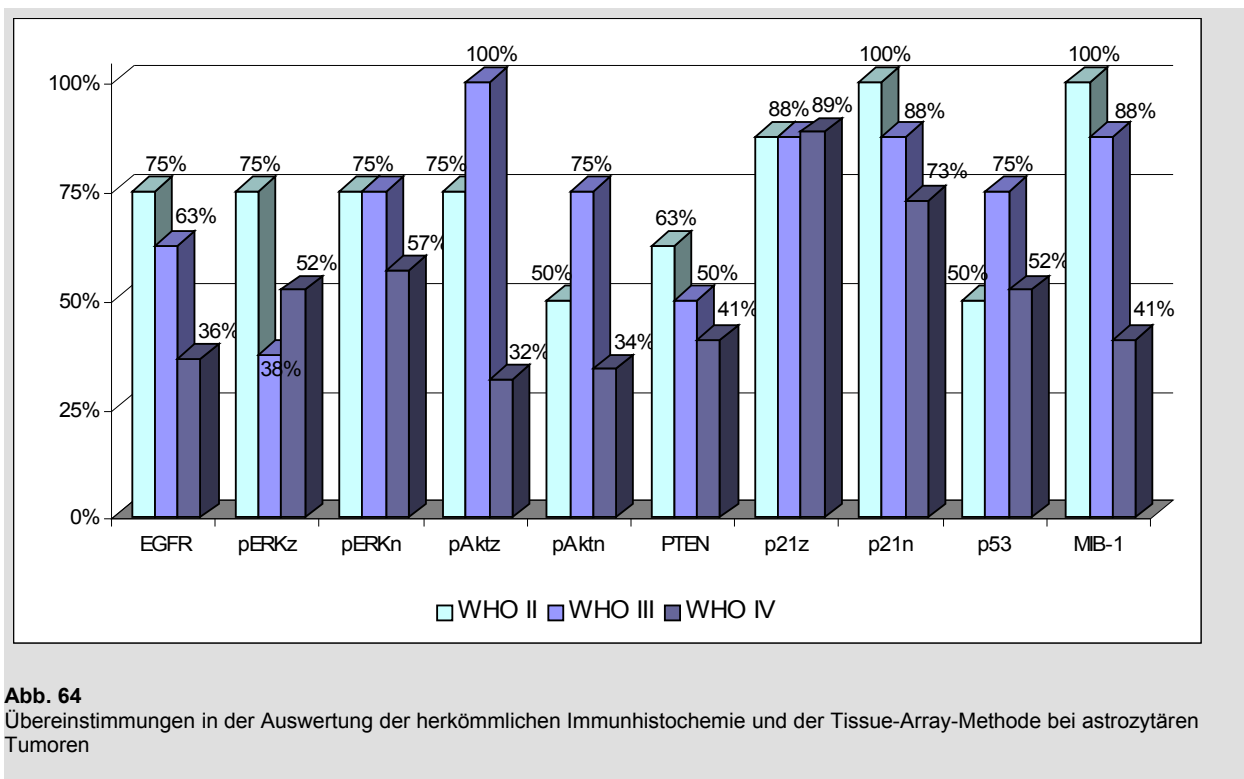


Abb. 64

Übereinstimmungen in der Auswertung der herkömmlichen Immunhistochemie und der Tissue-Array-Methode bei astrozytären Tumoren

Insgesamt zeigten sich die meisten Übereinstimmungen in den Untersuchungsergebnissen bei den Astrozytomen WHO-Grad II. Hier fand sich bei keinem der geprüften Faktoren eine Übereinstimmung von unter 50%. Die geringste Übereinstimmung mit je 50% der Präparate war bei pAkt im Zellkern und p53 sowie PTEN mit 63% zu ermitteln.

Auch die anaplastischen Astrozytome hatten eine gute Übereinstimmungsquote. Hier war jedoch vor allem bei der Ausprägung der zytoplasmatischen pERK eine deutliche Abweichung (38%) zu verzeichnen. Auch die Werte von PTEN stimmten nur in der Hälfte der Präparate überein.

Die Glioblastome schließlich als Tumore mit höchster Malignität erbrachten nur für den Faktor p21 ein zufriedenstellendes Ergebnis mit über 70% (zytoplasmatisch 89%, nukleär 73%). Daneben lagen nur noch

bei pERK und p53 Übereinstimmungen von mehr als 50% vor (pERK zytoplasmatisch 52%, nukleär 57%, p53 52%).

Im Überblick findet sich für die Faktoren EGFR, pERK nukleär, PTEN, p21nukleär und MIB1 eine deutliche Abnahme der Übereinstimmung mit dem Ansteigen des WHO-Grades.

5.3.3.3.2. Ependymale Tumore

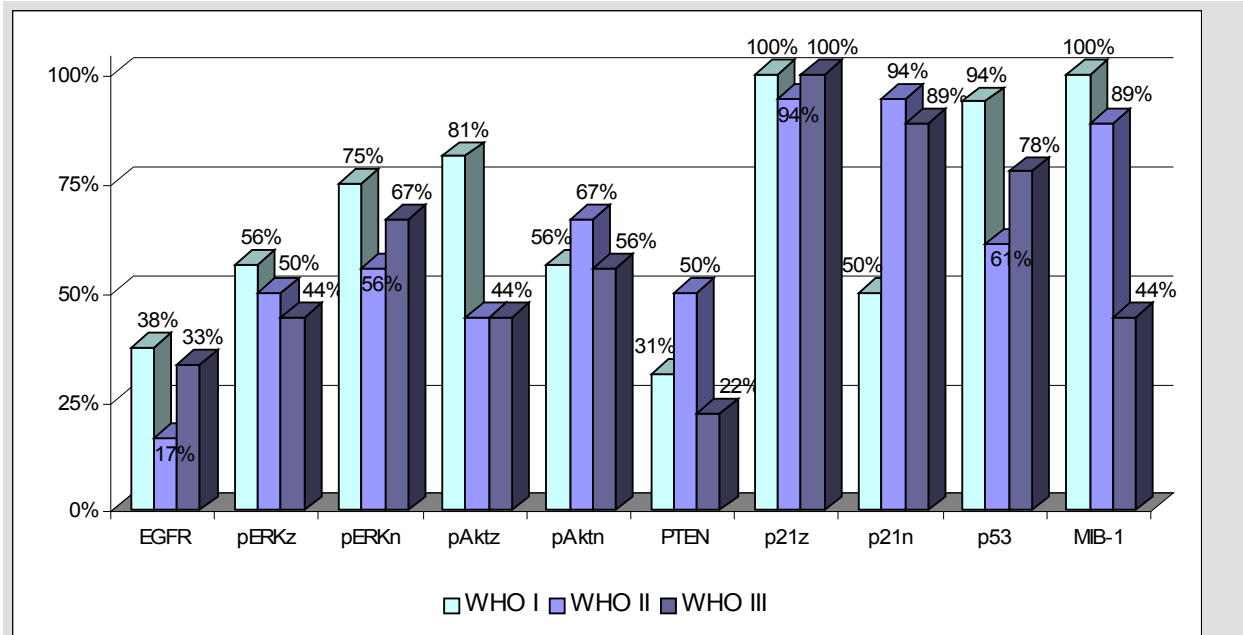


Abb. 65
Übereinstimmungen in der Auswertung der herkömmlichen Immunhistochemie und der *Tissue-Array*-Methode bei ependymalen Tumoren

Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Untersuchungen wich bei den ependymalen Tumoren ebenfalls zum Teil deutlich voneinander ab. Insbesondere für den EGFR und PTEN fanden sich sichtbar mehr Abweichungen unabhängig vom Malignitätsgrad. Die myxopapillären Ependymome erbrachten beim Vergleich in Abhängigkeit des WHO-Grades insgesamt die meisten Übereinstimmungen. Ausnahme bildete pAkt im Zellkern sowie PTEN.

Die besten Ergebnisse fanden sich für p21, p53 und MIB1, allerdings bei insgesamt schwacher Ausprägung dieser Faktoren in der Gruppe der ependymalen Tumore.

6. Diskussion

Bei dieser Dissertation handelt es sich um eine immunhistochemische Untersuchung, die zum einen den Wert von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern und zum anderen deren Aussagekraft in der Beurteilung von funktionellen Signalwegsveränderungen in glialen Hirntumoren prüfen soll.

Durch einen ausgewählten Vergleich von Gesamtantikörpern mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern sowie anhand einer Gegenüberstellung des immunhistochemischen Verfahrens mit der *Western-Blot*-Analyse sollen die Spezifität und der Einsatz der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper in der Immunhistochemie diskutiert werden.

Anschließend werden die untersuchten Faktoren und deren Zusammenhänge unter Beibehaltung der bisherigen Gruppierung besprochen und es wird auf die Möglichkeiten der *Tissue-Array*-Analyse eingegangen.

6.1. Vergleich der immunhistochemischen Untersuchung mit der *Western-Blot*-Analyse

In dieser Arbeit sollte unter anderem geprüft werden, ob die immunhistochemische Methode geeignet ist, aktivierte Enzyme intrazellulärer Signalwege mittels Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper nachzuweisen.

Es wurde anhand einzelner Fälle überprüft, ob der Nachweis von aktivierter ERK1/2 (pERK) und aktivierter Akt (pAkt) aus den Proteinextrakten dieser Tumore in der immunhistochemischen Untersuchung nachzuvollziehen ist. Dazu standen einzelne Tumore in Form von FFPE sowie tiefgekühltem Gewebe zur Verfügung, an welchen der Einsatz der Antikörper gegen pERK und pAkt in der Immunhistochemie und der *Western-Blot*-Analyse miteinander verglichen werden konnte.

Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung im direkten Vergleich der beiden Auswertungen. Wie unter 5.1. zu sehen, erzielt man mit der immunhistochemischen Färbung ähnliche Ergebnisse wie nach der Extraktion des Proteins. Durch die Immunhistochemie ist also eine Bewertung des Vorkommens aktivierter Proteine möglich.

In der immunhistochemischen Auswertung wurde neben dem quantitativen Auftreten des untersuchten Proteins auch der Intensität Berücksichtigung geschenkt und ein Mittelwert aus allen untersuchten Tumorzellen gebildet, um so dem sehr heterogenen Zellbild der vorliegenden Tumorentität gerecht zu werden. Im Gegensatz hierzu ist in der *Western-Blot*-Analyse die quantitative Proteinbestimmung zwar möglicherweise weniger Fehlern in der Auswertung unterlegen, zeigt im Ergebnis jedoch einen Durchschnitt der Proteine aller im Tumor enthaltenen und somit unter Umständen nicht Tumorspezifischen Zellen (z.B. Gefäßstrukturen). Da mit Hilfe der Immunhistochemie die gezielte Auswertung der Tumorzellen erfolgt, erlangt diese Methode eine höhere Spezifität (Mandell et al. 1998).

6.2. Vergleich des Einsatzes von Gesamtantikörper gegen ERK und Akt mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern an ausgesuchten Präparaten

Die Gesamt-Proteine (gesERK, gesAkt) in den Tumoren zeigten eine wesentlich gleichmäßigere Verteilung als die entsprechenden Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper. Sie waren in nahezu allen Zellen zu finden, was für ein allgegenwärtiges Vorhandensein dieser Proteine spricht (Cobb, Goldsmith 1995; Franke 2000).

Im Vergleich zwischen den Tumoren bestand dennoch ein Unterschied in der Ausprägung sowohl bei gesERK als auch bei gesAkt. Die meisten Fälle zeigten lediglich eine flauere Intensität, jeweils ein Fall wies dagegen deutlichere Färbungsgrade auf (gesERK Nr. 107, gesAkt Nr. 9). Auffällig war, dass der einzige auf gesAkt stärker reagierende Tumor (Nr. 9) gleichzeitig der einzige niedriggradige Tumor (WHO II) war. Inwiefern die Ausprägung des Gesamt-Proteins bei zunehmender Malignität zugunsten des aktivierten Proteins abnimmt, wäre Gegenstand künftiger Untersuchungen.

Die aktivierten Enzyme zeigten im Vergleich mit der gleichmäßigen Verteilung des Gesamt-Proteins deutliche Unterschiede (siehe 5.2.).

Bei positiver Reaktion der pERK war diese entweder ausschließlich sehr lokalisiert in Zellgruppen oder aber nur in einzelnen Zellen beziehungsweise Zellkernen vorhanden. Im Vergleich mit gesERK spricht diese spezifische Verteilung dafür, dass die Aktivierung des Proteins in einzelnen Zellen mittels Immunhistochemie nachweisbar ist.

Die pAkt war demgegenüber in den meisten Fällen wesentlich stärker vorhanden als pERK und zeigte ein eher generalisiertes Vorkommen. Hervor stach ein Tumor mit ausgeprägter Reaktion gegen gesAkt, jedoch ohne Nachweis des phosphorylierten Anteils. Bei ubiquitärem Nachweis des Gesamt-Proteins war also keinerlei Aktivierung der Akt zu finden. Bei diesem handelt es sich wiederum um den einzigen auf gesAkt untersuchten Tumor vom WHO-Grad II (Astrozytom Nr. 9). Der fehlende Nachweis einer Akt-Aktivierung deckt sich mit der Annahme, dass erst in hochgradigen Tumoren beispielsweise durch PTEN-Mutationen eine verstärkte Aktivierung dieses Proteins erfolgt.

Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass mittels der Immunhistochemie auch die Umverteilung der Akt vom Zytoplasma zum Zellkern nachzuvollziehen ist. Akt wandert nach seiner Aktivierung Richtung Zellkern, wo es seine unterschiedlichen Funktionen ausübt (Meier et al. 1997; Andjelkovic et al. 1997). Der Nachweis von gesAkt war in den meisten Zellen vor allem zytoplasmatisch lokalisiert, wohingegen die phosphorylierte Akt vor allem im Zellkern beziehungsweise um den Zellkern herum zu finden war.

6.3. Interpretation der immunhistochemischen Resultate

6.3.1. Tumore astrozytär-oligodendroglialen Ursprungs

Grundlage der vorliegenden Arbeit war eine Studie, die in glialen Zelllinien entweder eine ausschließliche Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 oder aber der Proteinkinase B (Akt) zeigte. Außerdem fand sich eine

deutlich gesteigerte Aktivierung beider Proteine nach Stimulierung der Zellen mit EGF (Schlegel et al. 2000).

Daneben brachte die Entwicklung Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper eine neue Möglichkeit, diese Proteine in ihrer aktivierten Form an FFPE Geweben *in situ* nachzuweisen. Erste Arbeiten dazu zeigten die aktivierte ERK (pERK) im Vergleich mit Gesamt-ERK in Neuronen und Gliazellen der Ratte aber auch in glialen Neoplasien (Mandell et al. 1998; Irving et al. 2000). Zu aktivierter Akt (pAkt) und deren Zusammenhang mit weiteren Faktoren (u.a. p21, EGFR) in astrozytären Tumoren wurden verschiedene immunhistochemische Untersuchungen veröffentlicht (Choe et al. 2003, Hlobilkova A et al. 2007).

Auf diesen Grundlagen war es zum einen das Ziel zu überprüfen, ob sich mit der immunhistochemischen Methodik eine konstitutive Aktivierung von ERK und Akt nachweisen lässt. Zum anderen galt es, die zugehörigen Signalwege und deren funktionellen Veränderungen in glialen Hirntumoren *in situ* näher zu beleuchten.

Als weiterer wichtiger Faktor wurde daher die Expression des **EGF-Rezeptors** untersucht. Das Gen des EGFR gilt als eines der am häufigsten in hoch malignen glialen Tumoren amplifizierten Gene (Libermann et al. 1985; Wong et al. 1987; Ekstrand et al. 1991). Es steht im Zusammenhang mit der Aktivierung Proliferations-assoziiertes (pERK) sowie anti-apoptotischer Signaltransduktion (PI3-K, pAkt) (Burgering, Coffey 1995; Cobb, Goldsmith 1995; Marshall 1995; Bellacosa et al. 1998).

Daneben wurden als funktioneller Antagonist der Akt das **PTEN**-Protein, als Proliferationsmarker **MIB1** sowie das in Glioblastomen häufig defekte Produkt des **p53**-Gens aufgenommen.

Aufgrund einer Veröffentlichung von Zhou et al. (Zhou et al. 2001), die einen Zusammenhang zwischen der aktivierten Akt und der Lokalisation beziehungsweise daraus folgend der funktionellen Aktivität des CDK-Inhibitors p21 zeigten, wurde dieser (**p21^{WAF1/CIP1}**) ebenfalls untersucht. Das Ergebnis wird sowohl mit der pAkt-Ausprägung als auch aufgrund der p53-abhängigen p21-Aktivierung mit dem p53-Status verglichen (El-Deiry et al. 1993; 1994).

6.3.1.1. Proliferationsindex MIB1

Erwartungsgemäß ergab sich eine Zunahme des Proliferationsindex mit zunehmendem Malignitätsgrad. Bei WHO-Grad II fand sich keinerlei Hinweis auf eine erhöhte Proliferation, dagegen wiesen von den hochgradigen Fällen bis zu 70% vermehrt MIB1 auf.

Auch zwischen Grad III und IV zeigte sich noch eine Steigerung (WHO III 58%, WHO IV 70%).

Das Ergebnis stimmt gut mit anderen Angaben über MIB1 in glialen Tumoren sowie mit dem gesteigertem Proliferationsverhalten bei höherer Malignität überein (Bouvier-Labit et al. 1998; Heesters et al. 1999). Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Kriterien, welche zur Diagnosestellung und Einteilung der Malignität herangezogen werden, auch die Ausprägung der Proliferation beinhaltet, welche wiederum meist mit Hilfe von MIB1 ermittelt wird.

6.3.1.2. Expression des EGF-Rezeptors und Zusammenhang mit der MIB1-assoziierten Proliferation

Zwischen der Amplifikation und der Expression des EGF-Rezeptors wurde in malignen Gliomen ein direkter Zusammenhang beschrieben (Liebermann et al. 1984; Wong et al. 1987; Ekstrand et al. 1991).

Auch in unserem Kollektiv ergab der Nachweis des EGF-Rezeptors ein Muster, das mit der Amplifikationsrate des zugehörigen Gens in hochgradigen Tumoren in Einklang zu bringen ist.

Mit zunehmendem WHO-Grad zeigte sich ein Anstieg der stark EGFR-aufweisenden Tumore. Von den untersuchten Glioblastomen wiesen 34% eine starke Expression auf. Dieser Wert deckt sich gut mit den in der Literatur angegebenen Amplifikationsraten des EGF-Rezeptors in Glioblastomen von 30-40% (Liebermann et al. 1984; Wong et al. 1987; Ekstrand et al. 1991).

Bei Grad III fand sich ausschließlich in den Tumoren mit oligodendroglialem Anteil (3 anaplastische Oligodendrogliome, 1 anaplastisches Oligo-Astrozytom) eine starke EGFR-Erhöhung. Bei WHO II war keine gesteigerte EGFR-Ausprägung zu finden.

Wir postulieren daher einen Zusammenhang zwischen einer äußerst starken Expression des EGFR in der Immunhistochemie mit einer Amplifikation des Rezeptor-Gens in den hochgradigen Tumoren. Daneben nehmen die Fälle mit überwiegend oligodendroglialen Zellen offensichtlich in der EGFR-Expression eine gesonderte Stellung ein.

Die Überexpression des EGF-Rezeptors spielt weiterhin eine wichtige Rolle in der Proliferation glialer Zellen (Liebermann et al. 1984). Um dies zu überprüfen wurde ein Vergleich der EGFR-Expression mit dem als Proliferationsmarker eingesetzten MIB1 vorgenommen.

Bei WHO IV bestand ein Zusammenhang zwischen erhöhter EGFR-Expression und vermehrter Proliferation.

Bei sehr starken EGFR-Werten fand sich ein größerer Anteil an Fällen mit stark positivem Proliferationsindex (43%) als mit mäßigem (35%) oder negativem (34%). Dieser Zusammenhang scheint allerdings nur dann zu gelten, wenn die EGFR-Expression stark ausgeprägt ist. Möglicherweise spiegelt die immunhistochemisch dargestellte Ausprägung des EGFR die Amplifikation des EGFR-Gens in den entsprechenden Tumoren wieder.

Für die Tumore WHO-Grad II und III lässt sich dieser Bezug nicht weiter verfolgen. Es besteht kein Zusammenhang einer durch MIB1 nachgewiesenen Proliferation mit dem EGFR-Status. Alle niedriggradigen Gewebe (WHO II) wiesen unabhängig von der EGFR-Expression ein negatives MIB1-Resultat auf.

Der Verdacht eines direkten Zusammenhangs zwischen EGFR und MIB1 ließ sich somit nicht für alle Tumore bestätigen. Andererseits wiesen die Ergebnisse der Glioblastome auf eine Verbindung des EGF-Rezeptors mit einer erhöhten Proliferation hin.

Die mit zunehmendem Malignitätsgrad ansteigende EGFR-Expression ist ein Zeichen dafür, dass der EGFR in der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielt. Mögliche Ursachen, weshalb dies nicht durch

MIB1 nachgewiesen werden kann, ist zum einen eine durch den MIB1-Antikörper nicht detektierbare Proliferation. Zum anderen könnte ein Zusammenhang mit anti-apoptischen Veränderungen und weniger mit proliferativen Mechanismen im Vordergrund stehen.

6.3.1.3. Expression der phosphorylierten ERK und Zusammenhang mit der MIB1-assoziierten Proliferation sowie dem EGF-Rezeptor

Die Reaktion gegen den pERK-Antikörper zeigte unterschiedliche Lokalisationen - im Zellkern und im Zytoplasma. Diese Verteilung weist auf unterschiedliche Funktionen der pERK abhängig von der jeweiligen Lokalisation hin.

Wie Chang et al. zeigten, transloziert nur ein Teil der aktivierten ERK zum Zellkern, um die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren auszuführen. Der Rest der aktivierten ERK verbleibt im Zytoplasma oder in anderen subzellulären Kompartimenten und scheint dort regulierende Funktionen in der Genexpression zu übernehmen, die durch zytoplasmatisch lokalisierte, post-transkriptionelle Mechanismen ausgelöst werden (Chang et al. 2001).

Zwischen den beiden Lokalisationen konnten wir keinen eindeutigen Zusammenhang feststellen. Tendenziell wiesen die Tumore jedoch bei hoher zytoplasmatischer pERK-Ausprägung auch gesteigerte nukleäre Werte auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie von Mandell et al., die eine wesentlich stärkere nukleäre Ausprägung in höhergradigen Tumoren fanden, als geringer malignen (Mandell et al. 1998), fand sich in unserem Kollektiv eine vernachlässigbar kleine Anzahl an nukleär stark positiven Reaktionen gegen pERK.

Unsere Resultate sprechen jedoch für eine Abhängigkeit der Malignität von der zytoplasmatischen Lokalisation, da die Glioblastome in wesentlich höherem Maße (74%) zytoplasmatisch aktivierte ERK aufwiesen als die anaplastischen Astrozytome (54%). Die entsprechende nukleäre Reaktion fiel dabei in den meisten Tumoren deutlich geringer aus.

Allerdings wird der Zusammenhang eingeschränkt, da die Tumore WHO II in über der Hälfte wiederum positive Werte zeigten (von 12 Tumoren zytoplasmatisch 9, nukleär 8 positiv).

Dieses entgegengesetzte Verhältnis könnte außer durch die kleine Fallzahl der niedriggradigen Tumore (WHO II) auch durch die Funktion der ERK in der Zelldifferenzierung hervorgerufen sein. Des weiteren könnten die hohen Werte in den Astrozytomen WHO-Grad II durch eine frühzeitige Aktivierung der ERK hervorgerufen sein und mit einer aus dieser Aktivierung resultierenden Neigung zur Proliferation und Progression zusammenhängen.

Diese Annahme lässt sich durch die Erkenntnis festigen, dass die Hälfte der 6 Tumore WHO II (Nr. 5, 6, 7) mit starker zytoplasmatischer pERK-Aktivität im Vergleich zu jenen ohne wesentliche pERK-Reaktion leicht erhöhte MIB1-Werte (3-5% aller Zellen) aufwiesen. Im Verhältnis zu allen untersuchten Tumoren fallen sie zwar unter ein negatives Resultat, sollten in diesem speziellen Zusammenhang jedoch nicht unberücksichtigt bleiben.

Zwei dieser Tumore rezidierten im Laufe von 2 bis 3 Jahren, einer (Nr. 7) erneut als Astrozytom WHO-Grad II, der andere (Nr. 5) zeigte eine Progression zu einem anaplastischen Astrozytom.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die aktivierte ERK im Zytoplasma das Zellverhalten maßgebend beeinflusst und möglicherweise schon in niedrigmalignen Astrozytomen eine Aussage über das Progressionsverhalten geben kann.

6.3.1.3.1. Zusammenhang mit MIB1

Da die MAP-Kinase ERK1/2 Wachstumsfaktor-abhängig stimuliert wird und durch starke Aktivierung der Proliferation anti-apoptotische Funktionen zu haben scheint (Cobb, Goldsmith 1995; Yujiri et al. 1998; Cross et al. 2000), soll anhand von MIB1 ein möglicher Zusammenhang der aktivierten ERK mit einer erhöhten Proliferation hergestellt werden.

In den niedriggradigen Tumoren (WHO II) fanden sich erhöhte Werte für pERK ohne deutliche Anzeichen einer Proliferationssteigerung. Hier sei jedoch erneut auf die oben beschriebenen Fälle hingewiesen, die bei positiver pERK einzelne positiv auf MIB1 reagierende Zellen aufwiesen (Nr. 5, 6, 7) und klinisch durch ein rezidivierendes Verhalten hervorstechen.

Betrachtet man die Tumore vom Grad III, ließ sich zwischen der zytoplasmatischen pERK-Reaktion und dem Anteil proliferierender Zellen keine Abhängigkeit herstellen. Die stark proliferierenden Tumore machten jeweils zwischen 20 und 25% aus, unabhängig von der zytoplasmatischen pERK (5.3.1.2.3.).

Bei Betrachtung der nukleären pERK-Werte fiel eine Zunahme der stark auf MIB1 reagierenden Präparate (MIB1++) von 19% bei negativer nukleärer pERK auf 30% bei mäßig positiver pERK auf.

Noch deutlicher sieht man einen Zusammenhang zwischen pERK und MIB1 bei den hoch malignen Glioblastomen, der sowohl für pERK im Zytoplasma als auch im Zellkern nachzuvollziehen ist.

Die MIB1 Werte steigen von 32% bei negativer zytoplasmatischer pERK über 38% bei mäßiger auf 44% bei stark ausgeprägter pERK an. Die Präparate mit mäßiger und negativer Proliferation nehmen entgegengesetzt stetig ab (5.3.1.2.3.).

Auch die nukleäre pERK scheint einen Einfluss auf die Proliferation zu haben. Bestand keine nukleäre Aktivität, fand sich nur bei 28% der Fälle eine starke MIB1-Erhöhung. Bei mäßig gesteigerten Werten der pERK im Zellkern machten diese schon 44% aus.

Ein gewisser Einfluss der MAP-Kinase ERK1/2 auf die Proliferation der Zellen wird mit diesen Ergebnissen bestätigt. Dass sie allerdings auch andere Funktionen übernehmen muss, zeigt die starke Ausprägung der pERK in den niedriggradigen Tumoren.

Auf welche Weise die Einflussnahme von statt geht, ob direkt proliferativ oder indirekt über anti-apoptotische Signalwege, lässt sich aus unseren Ergebnissen nur vermuten. Unter 6.3.1.5. wird ein möglicher Einfluss von pERK auf die mit Antiapoptose in Verbindung gebrachte pAkt-Expression beschrieben.

Interessant ist darüber hinaus, dass offensichtlich die zytoplasmatische und die nukleäre Aktivierung in den Tumoren der verschiedenen Malignitätsgrade unterschiedlich auf die Proliferation einwirken.

In den hoch malignen Glioblastomen sieht es so aus, als könne sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Aktivierung der pERK eine Proliferationssteigerung bewirken. Dagegen spielt in den Tumoren des Grades III vor allem die nukleäre Aktivierung wenn auch in niedrigerer Ausprägung die offensichtlich größere Rolle.

Eine mögliche Erklärung findet sich darin, dass bei den anaplastischen Tumoren (WHO III) das Tumorwachstum vor allem über eine durch nukleäre ERK eingeleitete Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stattfindet (Davis 1993). Dagegen kann es offensichtlich bei den höchst malignen Tumoren (WHO IV) zu einer weiteren ERK-induzierten Verstärkung des Proliferationsverhaltens kommen. Diesem könnten andere Funktionen unterliegen, die im Zytoplasma möglicherweise post-transkriptionelle Mechanismen wie die direkte Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren auslösen (Chang, Karin 2001).

Diese Vermutung wird um so mehr durch die pAkt-Verteilung bestätigt. Es zeigte sich in unseren Ergebnissen bei hochgradigen Tumoren eine direkte Abhängigkeit der Akt-Aktivierung von der zytoplasmatischen pERK (siehe 5.3.1.2.1. und 6.3.1.5.). Da Akt vor allem mit anti-apoptotischer Signaltransduktion in Verbindung gebracht wird (Franke et al. 1997; Kennedy et al. 1997), ist es durchaus möglich, dass auch die ERK ihre anti-apoptotischen Funktionen durch ein Zusammenspiel mit Akt ausübt.

6.3.1.3.2. Zusammenhang mit EGFR

Als einer der Aktivatoren der ERK gilt der EGFR, der eine wichtige Rolle in der Proliferation glialer Zellen spielt (Libermann et al. 1984). Darüber hinaus hatten Traverse et al. gezeigt, dass nur bei Vorliegen einer Überexpression des Rezeptors der epidermale Wachstumsfaktor zu einer ausgeprägten Aktivierung der ERK führt, bei normaler Rezeptor-Expression dagegen keine nennenswerte Aktivierung stattfindet (Traverse et al. 1994). Der Vergleich der pERK- mit der EGFR-Expression soll darlegen, ob sich diese Feststellung *in situ* nachweisen lässt.

In unserem Kollektiv zeigte sich bei den Tumoren mit Grad IV ein gewisser Zusammenhang. Die pERK war bei diesen Tumoren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern in Abhängigkeit vom EGFR-Status entsprechend stark ausgeprägt. Bei negativem EGFR fand sich in geringerem Maße eine starke Aktivierung der ERK (14%) als bei positiver EGFR-Ausprägung (bis 27%) (siehe 5.3.1.2.4.). In der Gruppe der anaplastischen Tumore (WHO III) war eine deutliche Erhöhung der pERK erst bei starker Expression des EGFR zu sehen. Auch in den niedriggradigen Tumoren scheint es eine Abhängigkeit der ERK-Aktivität vom EGFR zu geben. Bei positivem Rezeptor-Nachweis waren ausschließlich Tumore mit starker ERK-Aktivität vorhanden.

Unsere Ergebnisse bestätigen einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Überexpression in glialen Tumoren und gesteigerter Aktivierung der ERK. Allerdings findet sich diese EGFR-abhängige pERK-Aktivierung nicht nur im Zellkern, wo sie transkriptionelle Aufgaben erfüllt, sondern auch im Zytoplasma. Inwieweit ERK dort anti-apoptotische Funktionen ausführt, wird in Folge noch diskutiert.

6.3.1.4. Expression der phosphorylierten Akt und Zusammenhang mit dem EGFR

Die phosphorylierte Akt ließ sich wie pERK sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisen und kann unter anderem durch EGF aktiviert werden (Burgering, Coffey 1995). Auch in malignen Gliomen, für die eine erhöhte EGFR-Dichte typisch ist, liegt Akt gehäuft in aktivierter Form vor (Holland et al. 2000).

Die Anzahl der untersuchten Tumore unseres Kollektivs, die zytoplasmatisch positive pAkt-Werte zeigten, stieg mit dem WHO-Grad deutlich an (5.3.1.1.5). Die Zunahme der nukleären pAkt-Ausprägung war jedoch nur zwischen Grad III (58%) und IV (66%) zu sehen (5.3.1.1.6.), noch deutlicher bei den stark positiv reagierenden Tumoren (WHO III 19%, WHO IV 26%).

Diese Daten entsprechen der Annahme, dass Akt in seiner aktivierten Form eine wichtige Rolle in der Malignitätsentwicklung von Neoplasien spielt (Zhou et al. 2001). Dazu scheint nach der Aktivierung des Proteins an der Zellmembran die Wanderung von pAkt zum Zellkern von Bedeutung zu sein (Andjelkovic et al. 1997; Meier et al. 1997).

Es fiel in unseren Untersuchungen auf, dass die positiven Zellkerne vor allem peripher stark reagierten, dass sie zentral dagegen sehr häufig hell blieben. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die Meier et al. veröffentlichten. Sie wiesen bei Aktivierung der PKB β eine Verdichtung um den Zellkern herum nach, das Zytoplasma blieb ebenfalls positiv (Meier et al. 1997). Diese Konstellation scheint daraufhin zu deuten, dass die Funktion der Akt nicht durch eine Translokation in den Zellkern geschieht, sondern schon an der Kernmembran abläuft.

In unserem Kollektiv zeigten daneben auch die niedriggradigen Tumore (WHO II) gehäuft eine starke pAkt-Reaktion im Zellkern (4 von 12), jedoch nur in einem Fall (Nr. 15) gleichzeitig im Zytoplasma. Dies war das einzige Oligodendrogliom unter diesen vier Neoplasien. Bei den anderen drei Fällen handelte es sich erneut um die drei Astrozytome, die schon bei der pERK- und MIB1-Verteilung aus dem Muster fielen (Nr. 5, 6, 7). Offensichtlich nehmen diese drei Tumore unter den niedriggradigen Geweben unseres Kollektivs eine Sonderstellung ein.

Da wie bereits beschrieben gerade diese Fälle einen schlechteren Verlauf mit Rezidivneigung zeigten, stellt sich die Frage, ob pAkt als Marker für die Prognose geeignet ist. Einer anderen Studie zufolge scheint pAkt die Radiosensitivität von Tumoren als sekundär prognostischer Faktor zu beeinflussen (Gupta et al. 2002).

6.3.1.4.1. Zusammenhang mit EGFR

Da der EGFR auch in glialen Hirntumoren sehr häufig durch Amplifikation des Gens stark exprimiert ist (Liebermann et al. 1995; Wong et al. 1987), soll hier überprüft werden, ob immunhistochemisch ein Zusammenhang zwischen einer hohen EGFR-Expression und der Aktivierung von Akt besteht.

Bei jedem Malignitätsgrad nahmen zunächst die Anteile der Präparate mit positiver pAkt bei vermehrter EGFR-Expression zu. War allerdings eine sehr starke Ausprägung des Rezeptors nachzuweisen, so sanken die pAkt-positiven Fälle wieder auf Werte ab, die in etwa denen bei negativem EGFR-Status

entsprechen. Dieser Zusammenhang bestand mit geringfügigen Unterschieden in der Verteilung sowohl für die Akt im Zytoplasma als auch im Zellkern.

Der erwartete Bezug, der auf eine stärkere Akt-Aktivierung bei erhöhtem EGFR hinweist, bleibt aus.

Unsere Ergebnisse sprechen daher insgesamt gegen den Zusammenhang der EGFR-Überexpression mit einer vermehrten Aktivierung der Akt.

Betrachtet man dieses Ergebnis im Kontext mit den anderen gewonnenen Resultaten, so scheint es ein Hinweis auf EGFR-unabhängige Aktivierungswege in Glioblastomen zu sein. Hier sei besonders der Zusammenhang der pAkt- mit der pERK-Aktivierung erwähnt (siehe 6.3.1.5.).

Daneben muss die Aktivierung der Akt über Wachstumsfaktor-unabhängige Wege wie zum Beispiel über Insulin oder *insulin-like growth factor1* (IGF-1) in diese Überlegungen einbezogen werden (Alessi et al. 1996).

6.3.1.5. Vergleich von pERK und pAkt

Schlegel et al. hatten in glialen Zelllinien eine konstitutive Aktivierung entweder nur der ERK oder aber der Akt festgestellt (Schlegel et al. 2000).

Es war unter anderem Aufgabe dieser Promotion zu prüfen, ob diese sich scheinbar gegenseitig ausschließende Aktivierung auch *in situ* an in Paraffin eingebetteten glialen Tumoren mit Hilfe Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper möglich ist.

Zunächst sei hier auf die Schwierigkeit eines direkten Vergleichs hingewiesen, die durch die unterschiedliche Ausprägung beider Proteine in Zellkern und Zytoplasma entsteht.

Da wir zu dem Schluss kommen, dass beide aktivierten Kinasen vor allem in der zytoplasmatischen Lokalisation auf die Malignität Einfluss nehmen, wird dieser Vergleich als erstes diskutiert. Daneben wird der Unterschied der zytoplasmatischen und der nukleären pAkt in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma in Bezug auf die Malignität dargelegt.

6.3.1.5.1. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und zytoplasmatischer pAkt

In den Glioblastomen (WHO IV) bestand im Gegensatz zu den Tumoren mit niedrigerem Grad ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Proteinen, der auf eine direkte Abhängigkeit der pAkt von pERK hinweist.

Der Anteil der Tumore, die pAkt stark exprimierten, stieg mit zunehmenden pERK-Werten deutlich an (von 11% auf 52%) (5.3.1.2.1.1).

Dieser Bezug gilt allerdings nur für die Tumoren höchster Malignität (WHO IV).

Betrachtet man demgegenüber die etwas niedriger malignen Gewebe (WHO II und III), so fand sich ein gleichbleibendes Verhältnis der pAkt zur pERK unabhängig von deren Ausprägungsgraden.

6.3.1.5.2. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und nukleärer pAkt

Bei dieser Betrachtung findet sich ein ähnlicher Zusammenhang zwischen pERK und pAkt wie oben für zytoplasmatische ERK und zytoplasmatische Akt in den Glioblastomen beschrieben.

Im Zellkern verteilte sich pAkt bei den Glioblastomen in Abhängigkeit von pERK nahezu gleich wie pAkt im Zytoplasma. Dagegen zeigten die niedriger malignen Tumore ein anderes Muster.

War bei den Tumoren WHO II und WHO III die zytoplasmatische pAkt-Ausprägung von pERK unabhängig, so gab es zwischen der nukleären pAkt-Expression und der ERK-Aktivität eine gewisse Abhängigkeit (5.3.1.2.1.2).

Bei den Tumoren WHO II war das Verhältnis zwischen pAkt-positiven und pAkt-negativen Fällen bei jedem Ausprägungsgrad von pERK annähernd gleich. Allerdings zeigte sich bei mäßiger und starker pERK-Expression eine Zunahme der stark pAkt exprimierenden Fälle. Da es sich bei diesen jedoch um die mehrfach erwähnten Tumore handelt (Nr. 5, 6, 7), steht dieser Anstieg hier im Hintergrund.

Gewichtiger gewertet werden muss demgegenüber die Vermehrung der pAkt-positiven Fälle in Abhängigkeit von pERK bei den anaplastischen Tumoren.

Unsere Ergebnisse weisen auf einen mit zunehmender Malignität bedeutender werdenden Zusammenhang zwischen pERK und pAkt hin.

Eine konstitutive Aktivierung in der Form, wie sie bei glialen Zelllinien zu finden war (Schlegel et al. 2000), konnten wir anhand der immunhistochemischen Untersuchung aber nicht feststellen.

Die wahrscheinlichste Ursache hierfür liegt in der Schwierigkeit, Untersuchungen an Zelllinien mit solchen an Geweben *in situ* zu vergleichen.

Bei Zelllinien finden sich nur Abkömmlinge eines Klons, die alle ein gleiches Reaktionsmuster zeigen und sich wahrscheinlich aus den widerstandsfähigsten Zellen entwickeln. Die Zellen aus vollständigen Tumorverbänden weisen dagegen häufig sehr unterschiedliche Formen auf. Gerade die Glioblastome zeichnen sich durch ein sehr buntes Muster an Zellen aus, die verschiedene Verhaltensweisen an den Tag legen können. Zusätzlich waren die kultivierten Zellen Serum-freien Bedingungen ausgesetzt und wurden zum Nachweis der Proteine mit EGF stimuliert. Andere störende Umstände und Einflüsse können in der Zellkultur weitgehend reduziert werden. Solche definierten Bedingungen finden sich in den Tumoren nicht.

Die hohe Expression des EGF-Rezeptors in den Glioblastomen spricht zwar dafür, dass die Zellen Wachstums-stimulierenden Faktoren ausgesetzt sind, allerdings kann es sich hier um eine Vielzahl an Mediatoren handeln, die ebenfalls am EGFR ansetzen können, ein Beispiel wäre TGF- α (Waksal 1999). Die gleichzeitige Aktivierung von Akt und ERK könnte also auch Ausdruck einer Stimulierung der Zellen mit anderen Faktoren sein.

Dass in den untersuchten Zelllinien jeweils ausschließlich ein Nachweis der pERK oder der pAkt gelingt, wird möglicherweise durch einen Selektionsprozess bei der Kultivierung der Zellen aus Tumorgewebe hervorgerufen, bei dem entweder nur Zellen überleben, die ERK aktiviert haben oder aber Akt.

In vielen der untersuchten Tumore sahen wir hohe Ausprägungen sowohl von pAkt als auch pERK. Außerdem konnten wir, wie oben beschrieben, einen Zusammenhang zwischen beiden Faktoren nachweisen. Unklar bleibt, auf welche Weise Akt und ERK sich gegenseitig beeinflussen.

Ein Mechanismus, der als mögliche Verbindung zwischen beiden Kinasen beschrieben wurde, läuft über die Proteinkinase Raf ab. Raf gehört zu den Faktoren, die eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK bewirken können (Abb. 66).

Akt besitzt die Fähigkeit, das Raf-Protein durch Phosphorylierung an einem Serin-Rest (Ser²⁵⁹) zu hemmen. Dadurch wird die Fähigkeit, ERK zu phosphorylieren aufgehoben und ERK bleibt in seinem inaktiven Zustand (Zimmermann, Moelling 1999) (Abb. 66).

Diese Feststellung spricht bei erster Betrachtung dagegen, dass pERK einen Einfluss auf die Akt-Aktivität zu haben scheint. Eher läge die Vermutung nahe, dass mit hohen pAkt-Werten die Aktivität der ERK abnimmt. Bei den Untersuchungen von Zimmermann et al. wurde jedoch nicht auf weitere Verbindungen der Signalwege eingegangen.

Eine Aktivierung von Akt durch ERK ist denkbar, wenn man den Weg, der über Raf zur Hemmung von ERK führt, als einen Mechanismus mit negativer Rückkopplung betrachtet. Das hieße, dass bei hoher zytoplasmatischer ERK-Aktivität anti-apoptotische Signale über Akt vermittelt werden. Die Phosphorylierung des Serin-Restes von Raf durch Akt führt wiederum zu einer reduzierten Phosphorylierung der ERK. Zur Verhinderung einer überschießenden ERK-Aktivierung hemmt Akt über den Raf-Weg die Aktivierung der ERK (Abb. 66).

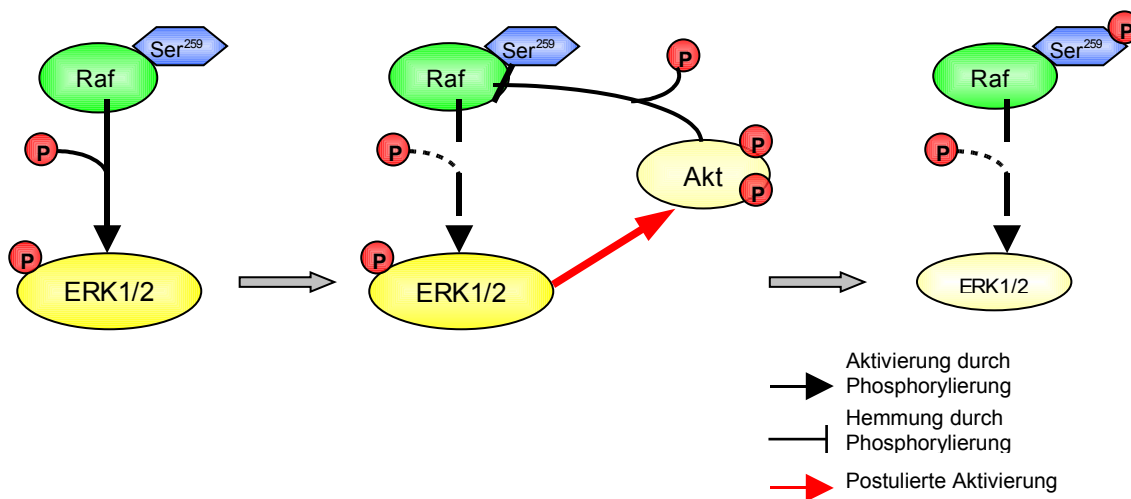


Abb. 66
Schematische Darstellung der ERK-Aktivierung durch Raf sowie einer postulierten negativen Rückkopplung durch Akt

Dieser Mechanismus könnte bei zytoplasmatischer Akt-Aktivität eine wichtige Rolle spielen und in den Glioblastomen offensichtlich verloren gehen.

Die zytoplasmatische Akt-Aktivierung ist bei WHO II und III ERK-unabhängig. Der postulierte Mechanismus scheint hier noch zu funktionieren und über eine Rückkopplung ein Gleichgewicht zwischen pERK und pAkt zu bewirken (Abb. 67 links).

Betrachtet man daneben die Glioblastome, bewirkt die ERK außer dem nukleären auch einen zytoplasmatischen Anstieg von pAkt. Bei diesen Tumoren fehlt offenbar der hemmende Einfluss (Abb. 67 rechts).

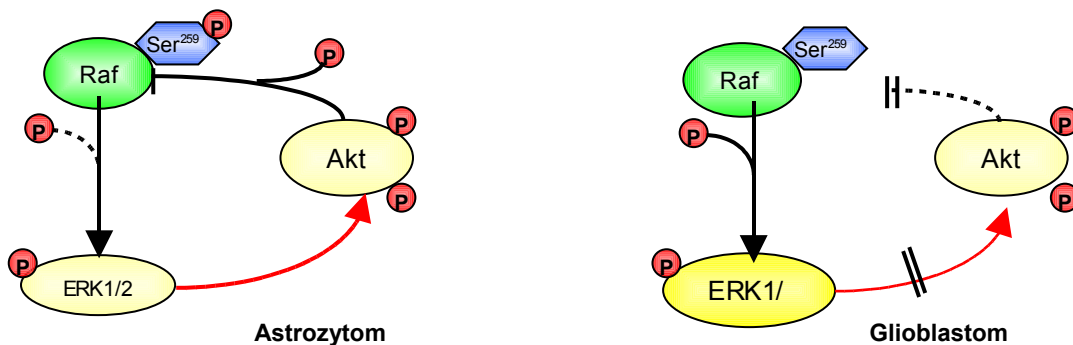


Abb. 67
Schematische Darstellung der erhaltenen negativen Rückkopplung in Astrozytomen (links), aufgehoben in Glioblastomen (rechts) (Legende siehe Abb. 66)

Auf einen solchen Mechanismus weisen auch Ergebnisse von Rommel et al. hin, die in Muskelzellen den hemmenden Einfluss von Akt auf Raf nur in differenzierten Zellen nachweisen konnten, bei undifferenzierten Zellen bestand ein solcher Zusammenhang nicht (Rommel et al. 1999). Auch in Prostata-Carcinomen wurde eine Verbindung zwischen Akt-Hemmung und damit induziertem ERK-Anstieg über Raf postuliert (Lee JT Jr et al. 207). Aufgrund des typischen histo-pathologischen Kriteriums der Entdifferenzierung der Glioblastomzellen, ergibt sich die Vermutung, dass der postulierte negative Rückkopplungsmechanismus in diesen Tumoren verloren geht.

6.3.1.6. Expression von PTEN und Zusammenhang mit pAkt

Das PTEN-Gen weist in vielen Tumoren, darunter vor allem in hoch malignen Glioblastomen, sehr hohe Mutationsraten auf (Li et al. 1997; Liu et al. 1997; Rasheed et al. 1997; Wang et al. 1997; Duerr et al. 1998). Diese resultieren in einem Defekt des PTEN-Proteins oder führen zu seinem vollständigen Verlust. In unseren Kollektiv konnte mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad der Tumoren keine Reduktion der PTEN-Expression nachweisen.

In nahezu allen untersuchten glialen Geweben ließ sich PTEN gut bis sehr deutlich darstellen. Der Anteil an stark positiv reagierenden Präparaten nahm sogar mit steigendem Grad zu (WHO III 19%, WHO IV

48%). Negativ blieben nur 10% der Glioblastome, die anderen Tumore (WHO II, WHO III) zeigten in 15-20% negative Resultate.

Eine der wichtigsten Funktionen von PTEN in glialen Tumoren ist seine Phosphatase-Aktivität gegen Phosphoinositide, vor allem PtdIns-3,4,5-P. Durch die Dephosphorylierung dieses Substrates in PtdIns-4,5-P wird der PI3K-Signalweg unterbrochen und es findet keine Aktivierung der Akt über PI3K statt (Maehama, Dixon 1998; Stambolic et al. 1998; Wu et al. 1998). Auf diese Weise werden viele Funktionen von Akt, die das Tumorwachstum beschleunigen (z.B. Migration, Zellwachstum) verhindert. PTEN erhielt deshalb den Status eines Tumor-Suppressor-Gens.

Durch den Verlust des funktionsfähigen PTEN-Proteins infolge von Mutationen geht der Regulierungsmechanismus verloren und es kommt zu einer überschießenden Aktivierung von Akt (Li, Sun 1999; Li et al. 1997; Steck et al. 1997).

Wie bereits oben beschrieben, konnte der Verlust des PTEN-Proteins mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden. In den wenigen Präparaten mit negativem PTEN war im Vergleich zu den Präparaten mit erhöhten PTEN-Werten auch keine zu erwartende Steigerung der Akt-Aktivität vorhanden. Unsere Ergebnisse können also den beschriebenen Zusammenhang zwischen PTEN-Verlust und Akt-Aktivierung nicht bestätigen.

Dies widerspricht auch Daten, die Choe et al. 2003 veröffentlichten. Diese Gruppe zeigte an FFPE Glioblastomen mit Hilfe vergleichbarer immunhistochemischer Untersuchungen eine Korrelation von aktivierter Akt mit dem Verlust von PTEN (Choe et al. 2003). Allerdings erlauben die veröffentlichten Daten keinen direkten Vergleich der absoluten Werte. Zu berücksichtigen ist auch der Unterschied des Tumor-Kollektivs. Bei Choe et al. bestand dieses im Gegensatz zu dem hier untersuchten ausschließlich aus unbehandelten, primären Glioblastomen (*de novo*). Diese selektive Auswahl könnte eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in der PTEN-Expression sein.

Auch andere Studien zeigten deutliche Abweichungen in der Frequenz der PTEN-Mutationen in primären (bis zu 40% der Fälle) und sekundären Glioblastomen (<10% der Fälle) (Tohma et al. 1998; Tortosa et al. 2000, Ohgaki, Kleihues 2007). In einer Arbeit, die sowohl primäre als auch sekundäre Glioblastome untersuchte, fanden sich bei 15% der Tumore PTEN-Mutationen (Duerr et al. 1998).

In den von uns untersuchten Glioblastomen war in 10% PTEN nicht relevant nachzuweisen. Da es sich bei einem großen Teil (47%) unseres Kollektivs um sekundäre Glioblastome handelt, liegt der prozentuale Anteil der PTEN-negativen Tumore und damit der postulierten Mutationsrate (10%) in Höhe der Mutationen in sekundären (<10%) (Duerr et al. 1998) oder unselektierten Glioblastomen (15%) (Tohma et al. 1998; Tortosa et al. 2000).

Bislang liegen jedoch keine Daten über den immunhistochemischen Nachweis von PTEN bei bekannter Mutation des Gens vor, so dass es weiterer Untersuchungen bedarf, inwieweit die genetische Veränderung mit dem Nachweis des Proteins in der Immunhistochemie zusammenhängt.

Eine Ursache des fehlenden Zusammenhangs zwischen Akt und PTEN könnte in einer PTEN- und PI3K-unabhängigen Aktivierung von Akt liegen. So weist eine Untersuchung des PI3K-Signalweg auf Genveränderungen und Genamplifikationen direkt im Akt-Gen selbst hin (Knobbe, Reifenberger 2003). In jedem Fall scheinen die Veränderungen im PI3K-Signalweg zusammen mit EGFR und PTEN ein prädiktiver Faktor für das Therapieansprechen der glialen Tumore zu sein (Kita D et al. 2007).

6.3.1.7. Expression von p21 und Zusammenhang mit pAkt

Ein potenter Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), p21, wirkt hemmend auf das Zellwachstum verschiedener Tumore (El-Deiry et al. 1993; Harper et al. 1993). Zu seiner Expression in glialen Neoplasien gibt es verschiedene Angaben.

Jung et al. zeigten eine Erhöhung unabhängig vom Malignitätsgrad. Allerdings wurde in dieser Arbeit postuliert, dass speziell die p21-Expression nach p53-abhängiger Aktivierung durchaus Tumorstadiumspezifisch sei (Jung et al. 1995). Demgegenüber fanden Korkolopoulou et al. eine Elevation der p21-Expression vor allem in hochgradigen glialen Hirntumoren (Korkolopoulou et al. 1998). Beide Gruppen wiesen ausschließlich eine nukleäre Reaktion gegen p21 nach.

Die Verteilung des nukleären p21 in unserem Kollektiv bestätigt eher die Annahme, dass p21 mit zunehmendem Malignitätsgrad stärker exprimiert wird. Bei WHO II fand sich keine relevante Anzahl positiver Reaktionen im Zellkern. In den anaplastischen Tumoren wiesen dagegen 15% eine erhöhte Expression auf und die Tumore WHO IV reagierten in insgesamt 32% positiv.

Neben der nukleären p21-Steigerung zeigte sich in unserer Auswertung in einzelnen höhergradigen Tumoren (WHO III 12%, WHO IV 14%) auch eine zytoplasmatische Reaktion.

6.3.1.7.1. Zusammenhang mit pAkt

p21 gilt in erster Linie als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und führt durch diesen hemmenden Mechanismus zu einem Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase (El-Deiry et al. 1994). Diese Funktion scheint streng an die nukleäre Lokalisation des p21 gebunden zu sein (Asada et al. 1999).

Außerdem werden dem p21-Protein anti-apoptotische Funktionen zugesprochen. So bildet es einen Komplex mit der ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) und verhindert dadurch die Aktivierung der Stress-induzierten ERK (SAPK), was zu einem Verlust der Apoptose-Fähigkeit der Zelle führt (Asada et al. 1999). Diese Funktion gilt jedoch im Gegensatz zur CDK-hemmenden Funktion als Zytoplasma-gebunden (Asada et al. 1999).

Wodurch allerdings die Lokalisation von p21 reguliert wird, blieb bislang nicht endgültig geklärt. Eine gute Begründung für diese Translokation lieferten Zhou et al.. Sie konnten nachweisen, dass Akt in der Lage ist, einen Threonin-Rest von p21 (Thr¹⁴⁵) zu phosphorylieren, infolgedessen p21 vom Zellkern in das Zytoplasma wandert (Zhou et al. 2001). Diese Beobachtung festigten sie durch eine Untersuchung *in situ* an ausgewählten paraffinfixierten Geweben von Brusttumoren. Bei einem Nachweis von aktivierter Akt mit Hilfe Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper fand sich p21 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma.

Ließ sich jedoch keine Akt-Aktivierung finden, so stellte sich p21 ausschließlich im Zellkern dar (Zhou BP et al. 2001).

Auch in unserem Kollektiv ergab sich eine Unterscheidung in zytoplasmatische und nukleäre Reaktion. Die vermehrte nukleäre Reaktion war wie oben beschrieben ausschließlich bei höhergradigen Tumoren zu finden. Dieses Ergebnis erlaubt eine Bestätigung der Annahme, dass p21 in seiner nukleären Lokalisation Einfluss auf die Malignität des Tumors nehmen kann.

Daneben ließ sich ein Zusammenhang zwischen aktivierter Akt und p21 zeigen. Mit zunehmendem Nachweis von pAkt fand sich in den hoch malignen, glialen Geweben auch vermehrt p21. Dieses war sowohl im Zellkern als auch in geringerem Maße im Zytoplasma nachzuweisen, unabhängig von der Lokalisation der pAkt (siehe 5.3.1.2.7.).

Wie Zhou et al. dies gezeigt hatten wurde bei pAkt-negativen Tumoren nicht ausschließlich eine nukleäre Lokalisation von p21 gefunden.

Um zu überprüfen, ob die Translokalisierung von p21 vom Zellkern ins Zytoplasma von pAkt abhängig ist, wurden nochmals gezielt alle Präparate mit fehlender nukleärer Reaktion auf einen Zusammenhang zwischen pAkt und zytoplasmatischem p21 überprüft. Es zeigte sich mit zunehmendem pAkt-Nachweis eine Steigerung des zytoplasmatischen p21 (siehe 5.3.1.2.7.), was für den Einfluss der aktivierten Akt auf den Transport von p21 ins Zytoplasma spricht.

6.3.1.8. Expression von p53 und Zusammenhang mit p21

Das so genannte *wild-type* p53-Protein, das in normal funktionierenden Zellen exprimiert wird, ist für einen immunhistochemischen Nachweis zu instabil (Cox 1997). Dagegen findet man in Tumoren, die Mutationen im p53-Gen aufweisen in hohem Maße gesteigerte p53-Expressionen durch Stabilisierung des Proteins (Vojtesek et al. 1992).

In unserem Kollektiv war häufig, besonders bei WHO III und IV eine p53-Akkumulation zu sehen. Die Verteilung der unterschiedlichen Ausprägungsgrade in diesen beiden Gruppen war ähnlich (5.3.1.1.10.). Aber auch bei den niedriger malignen Tumoren (WHO II) fanden sich mehrere Fälle, die positive p53-Expressionen aufwiesen.

Da die p53-positiven Tumoren unter den hochgradigen einen deutlich größeren Anteil ausmachten (WHO III 54%, WHO IV 55%) als unter den niedriggradigen (WHO II 42%) bestätigen die Daten, dass p53 vor allem in hochgradigen Tumoren immunhistochemisch nachweisbar ist.

Mögliche falsch negative Ergebnisse müssen allerdings berücksichtigt werden, da gerade in den Glioblastomen immer wieder ein durch Mutationen entstandener völliger Verlust des Proteins auftritt (Hollstein et al. 1991, Vojtesek et al. 1992). Daneben sind in Geweben mit intaktem p53-Gen auch ohne Mutationen immunhistochemisch erhöhte Ausprägungen des Proteins beschrieben (MacGeoch et al. 1993). Die Darstellung von p53 in der Immunhistochemie sollte unter diesem Wissen möglicher falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse mit Skepsis betrachtet werden.

Für die Prognose-Abschätzung scheint p53 aber einen gewissen Wert zu haben.

In primären Glioblastomen (*de novo*) fanden sich andere Mutationen im p53-Gen als in den Tumoren, die eindeutig einer Progression unterworfen waren. Diese Mutationen der sekundären Tumore waren nicht erst im Stadium des Glioblastoms nachweisbar, sondern auch schon in den entsprechenden frühen, niedriggradigen Tumorstadien (Sidransky et al. 1992).

Wenn man auf diesen Grundlagen nun die drei Fälle WHO II unseres Kollektivs betrachtet, die sehr hohe p53-Werte aufwiesen, stellt man fest, dass einer dieser Fälle (Nr. 9) später eine Progression zu einem anaplastischen Tumor durchmachte. Die beiden anderen Gewebe mit dem hohen p53-Wert stammten von ein und demselben Patienten, allerdings im Abstand von drei Jahren (Nr. 7 und 13). Dieser Tumor zeigte zwar keine Progression, das rezidivierende Auftreten nach drei Jahren ist dennoch Hinweis für ein aggressiveres Verhalten.

Das Ergebnis erhärtet die Vermutung, dass der erhöhte Nachweis von p53-Protein in Tumorzellen wahrscheinlich auch schon in frühen Tumorstadien für eine schlechtere Prognose spricht (Sidransky et al. 1992).

6.3.1.8.1. Zusammenhang mit p21

Die wichtigste Aufgabe des p53-Gens besteht darin, eine gewisse Schutzfunktion für die Zelle zu übernehmen, wenn diese schädigenden Faktoren ausgesetzt ist. Die Aktivierung des intakten wt-p53 führt die Zelle entweder in den programmierten Zelltod oder es werden weitere Mechanismen aktiviert, die einen Stopp im Zellzyklus bewirken, wodurch die Zelle entstandene Schäden beheben kann (Lane 1992). Einer der Faktoren, die mit diesem Zellzyklus-Stopp in Verbindung stehen, ist p21.

Die Aktivierung von p21 geschieht zum einen transkriptionell durch p53 (El-Deiry et al. 1993), zum anderen durch p53-unabhängige Mechanismen (Zeng, El-Deiry 1996, Zupanska et al. 2007).

In unserem Kollektiv konnten wir sowohl für p21 als auch für p53 in den höher malignen Tumoren eine Zunahme der Expression feststellen. Ein direkter Zusammenhang beider Faktoren lässt sich aber nur für einen Teil der hoch malignen Glioblastome vermuten. Hier fand sich mit zunehmender p53-Expression ebenfalls ein gehäuftes Auftreten von nukleär positivem p21. In den anaplastischen Tumoren war diese Abhängigkeit nicht zu finden, weshalb hier andere Mechanismen der p21-Aktivierung postuliert werden müssen.

6.3.2. Tumore ependymalen Ursprungs

Eine Gruppe von Tumoren des zentralen Nervensystems, deren biologisches Verhalten in weiten Teilen noch ungeklärt ist, sind die Ependymome.

Die Klassifikation teilt nach histopathologischen Kriterien vier Hauptgruppen ein, Subependymome (WHO I), myxopapilläre Ependymome (WHO I), Ependymome (WHO II) sowie anaplastische Ependymome (WHO III). Letzteren wird ein aggressiveres Verhalten zugeordnet, jedoch weichen die Veröffentlichungen über die optimale Therapie und die Prognose dieser Tumoren voneinander ab (Schiffer et al. 1991;

Hamilton, Pollack 1997; Bouffet et al. 1998; Ritter et al. 1998; Robertson et al. 1998; Horn et al. 1999; Ho et al. 2001; Suzuki et al. 2001).

Daher scheint es wichtig, geeignete molekularbiologische Marker zu finden, die als zusätzliches Diagnosekriterium herangezogen werden können. Erste Ansätze dazu finden sich vor allem in Analysen genetischer Veränderungen (Bijlsma et al. 1995; von Haken et al. 1996; Ebert et al. 1999; Hirose et al. 2001; Carter et al. 2002; Korshunov et al. 2003), aber auch immunhistochemische Untersuchungen mit Korrelation der Überlebenszeiten beziehungsweise der Progressions-freien Zeiten wurden durchgeführt (Korshunov et al. 2000, 2002; Suzuki et al. 2001; Verstegen et al. 2002). Diese haben meist den Proliferationsmarker MIB1 sowie p53 zum Thema. Korshunov et al. untersuchten des weiteren die Expression von Tenascin, VEGF (*vascular endothelial growth factor protein*) und EGFR sowie von dem CDK-Inhibitor p27^{Kip1} (Korshunov et al. 2000). Weitere Proliferations- und Apoptose- assoziierte Proteine beinhaltet eine Veröffentlichung von Verstegen et al. (Verstegen et al. 2002).

Im folgenden Abschnitt soll die Verteilung der schon für die astrozytär-oligodendroglialen Tumoren beschriebenen Antikörper und eine sich daraus ergebende Bedeutung diskutiert werden.

6.3.2.1. Expression von p53

Das p53-Protein lässt sich in vielen Tumoren als Folge von Mutationen im zugehörigen Gen immunhistochemisch nachweisen (Vojtesek et al. 1992). In Ependymomen bestehen jedoch nahezu keine derartigen Veränderungen (Bijlsma et al. 1995; Fink et al. 1996; von Haken et al. 1996; Kramer et al. 1998).

In dem von uns untersuchten Kollektiv fand sich nur in einzelnen Fällen eine positive Reaktion gegen den p53-Antikörper. Dies waren 4 klassische Ependymome und ein myxopapilläres Ependymom. Keines der untersuchten anaplastischen Ependymome wies erhöhte Werte auf. Dass es sich bei den positiven Werten um eine Anreicherung aufgrund einer Mutation im p53-Gen handelt, ist aufgrund der geringen Mutationsraten in Ependymomen nicht anzunehmen (Bijlsma et al. 1995; Fink et al. 1996; von Haken et al. 1996; Kramer et al. 1998).

Geht man davon aus, dass eine nachweisbare Ausprägung des p53-Proteins nur in höhergradigen Tumoren gelingt, wie es zum Beispiel Suzuki et al. beschrieben haben (Suzuki et al. 2001), so widersprechen unsere Ergebnisse dieser Annahme. Es finden sich aber auch andere Arbeiten, die keinen Zusammenhang der p53-Expression mit dem Malignitätsgrad feststellen konnten (z.B. Verstegen et al. 2002). Allerdings korrelierte das Vorhandensein von p53 ähnlich der MIB1-Expression mit einer schlechteren Prognose und weist auf eine höhere Strahlen-Resistenz hin (Verstegen et al. 2002, Gaspar et al. 2006).

6.3.2.2. Expression von MIB1

Unsere Daten bestätigen, dass in niedriggradigen Ependymomen (WHO I und II) einschließlich der Subependymome in wesentlich geringerem Maße MIB1 nachweisbar ist, als in anaplastischen Ependymomen.

Die Korrelation des Proliferationsmarkers MIB1 mit der Malignität der Ependymome sowie mit der Progressions-freien Zeit war bereits Inhalt mehrerer Studien (Ritter et al. 1998; Figarella-Branger et al. 2000; Ho et al. 2001; Suzuki et al. 2001; Korshunov et al. 2002; Verstegen et al. 2002).

Meist wurde eine Korrelation des Proliferationsindex mit der Malignität der Tumore und kürzeren Progressions-freien Zeiten gefunden. Jedoch gab es auch entgegengesetzte Angaben.

Verstegen et al. widersprachen einer direkten Abhängigkeit des MIB1-Wertes vom WHO-Grad. Keiner der von ihnen untersuchten Faktoren ließ auf einen solchen Zusammenhang schließen (Verstegen et al. 2002). Allerdings zeigten sie gleichzeitig, dass die MIB1-Expression unabhängig vom Grad mit der Überlebenszeit der Patienten zusammenhängt. Daneben wiesen Ritter et al. nach, dass nahezu alle Kriterien der Anaplasie in Ependymomen wie Nekrosen, Mitosen oder Gefäßproliferationen mit MIB1 in Zusammenhang stehen (Ritter et al. 1998).

Ein erhöhter MIB1-Wert darf also durchaus zur Diagnosestellung herangezogen werden. Bei fehlenden histopathologischen Kriterien der Anaplasie sollte dies jedoch keine direkte Aufwertung der Malignität bedeuten. Wegen eines möglicherweise erhöhten Rezidivrisikos und einer schlechteren Prognose sollten MIB1-Erhöhungen in die Gestaltung der Therapie und in die Überwachung der Patienten einbezogen werden.

6.3.2.3. Expression des EGF-Rezeptors und Zusammenhang mit der MIB1-assoziierten Proliferation

Die Expression des EGFR war mit Ausnahme der Subependymome in allen Ependymomen ähnlich verteilt. In den meisten Fällen fand sich eine sehr starke Ausprägung des Rezeptor-Proteins (50-60%), die sogar die Ausprägung des EGFR in den untersuchten Glioblastomen überschritt (34%). Ob es jedoch einen Zusammenhang mit einer EGFR-Amplifikation gibt, wie er für die Glioblastome besteht (Wong et al. 1987), ist schwer zu beurteilen und scheint eher zweifelhaft. Bisher beschränkt sich die Untersuchung dieser Gen-Veränderung auf wenige Fälle. In 12 untersuchten Ependymomen wiesen Diedrich et al. nur in einem Fall eine entsprechende Mutation nach (Diedrich et al. 1995). Auch die in den niedriggradigen Ependymomen erhöhten Werte sprechen gegen diesen Zusammenhang.

Unsere Ergebnisse lassen sich am ehesten mit den Resultaten von Hall et al. in Einklang bringen, die ebenfalls in allen untersuchten Ependymomen einen erhöhten EGFR-Status nachwiesen (Hall et al. 1990). Dagegen gibt es jedoch auch widersprüchliche Daten, die mit steigendem Grad eine Zunahme der EGFR-Expression feststellten, jedoch nur bei den niedriggradigen Ependymomen einen Zusammenhang zwischen EGFR-Status und Prognose finden konnten (Korshunov et al. 2000).

Da sich keine definitiven Anzeichen für einen Zusammenhang des EGFR mit der Malignität der Ependymome finden, scheint dem Rezeptor eine andere Funktion zuzukommen als die der Vermittlung wachstumsfördernder Signale. Möglicherweise spielt der Rezeptor schon zu Beginn der Entwicklung dieser Tumore eine wichtige Rolle. Dazu würde auch die Verteilung des EGFR in den Subependymomen passen. In diesen Tumoren scheint der EGFR eher eine untergeordnete Bedeutung zu spielen, was für die Annahme spricht, dass es sich um eine gesonderte Tumorentität handelt, deren Entstehung im Vergleich zu den Ependymomen auf anderen Mechanismen beruht.

6.3.2.3.1. Zusammenhang mit MIB1

In der Annahme, dass der EGFR durch die Verarbeitung externer Signale das Zellwachstum beschleunigt, zeigt auch der Vergleich der EGFR-Expression mit einer erhöhten Proliferation (MIB1), dass dieser Rezeptor in den Ependymomen keinen oder nur geringen Einfluss auf die Proliferation des Tumors hat.

Zwar kennzeichneten sich einige Tumore durch einen hohen EGFR-Status bei gleichzeitig starker MIB1-Expression aus, allerdings fanden sich auch unter den EGFR-negativen Präparaten hohe MIB1-Ausprägungen.

Es scheinen also andere Mechanismen für das Wachstum dieser Tumore ausschlaggebend zu sein.

Gilbertson et al. zeigten zum Beispiel einen Zusammenhang zwischen der Proliferation und anderen Mitgliedern der ERBB-Familie (Gilbertson et al. 2002). In ihrem Kollektiv fand sich in über 75% der untersuchten Ependymome eine Co-Expression von ERBB2 und ERBB4 sowie ein direkter Zusammenhang mit MIB1 (Gilbertson et al. 2002). Dagegen war EGFR (ERBB1) in wesentlich weniger Tumoren nachweisbar (<30%). Zu einer Korrelation des EGFR mit MIB1 gibt es keine veröffentlichten Daten.

Im Vergleich zu den astrozytär-oligodendroglialen Tumoren, bei denen die Anzahl der stark MIB1-positiven Tumoren mit steigender EGFR-Expression deutlich zunahm (siehe 5.3.1.2.), muß offensichtlich in den ependymalen Tumoren eher Augenmerk auf die Expression der anderen Mitglieder der ERBB-Familie gelegt werden.

6.3.2.4. Expression der phosphorylierten ERK und Zusammenhang mit MIB1 und EGFR

Die ERK gehört zu den Proteinen, denen die Regulation proliferativer Funktionen zugeschrieben werden (Chang, Karin 2001).

In den Ependymomen ließ sich neben der zytoplasmatischen eine weniger stark ausgeprägte nukleäre Anreicherung der phosphorylierten ERK nachweisen.

Vor allem in den Subependymomen fand sich in der Hälfte der Fälle eine starke zytoplasmatische Expression, wodurch sie sich wiederum von dem Verteilungsmuster in den anderen Tumoren abhoben. Der nukleäre Nachweis zeigte dagegen keine besonderen Abweichungen und es fand sich kein Zusammenhang der zytoplasmatischen mit der nukleären Reaktion.

Bei der Verteilung der zytoplasmatischen pERK in den anderen untersuchten Ependymomen stellt man fest, dass sich das Muster in den myxopapillären und anaplastischen Ependymomen ähnelt. Es fanden

sich etwa gleich viele negativ und positiv reagierende Präparate. Die klassischen Ependymome zeigten dagegen in wesentlich höherem Maße negative Resultate (68%).

Auch bei der nukleären Verteilung der pERK bestand dieser Unterschied. In den myxopapillären und anaplastischen Ependymomen fanden sich anteilig insgesamt deutlich mehr positiv reagierende Tumoren als in den klassischen. Die myxopapillären wiesen sogar mit knapp über 50% mehr positive Fälle auf als die anaplastischen Ependymome (40%).

Geht man von der Annahme aus, dass die ERK einen deutlichen Einfluss auf die Proliferation ausübt (Cowley et al. 1994; Graves et al. 2000), so passt die Zunahme der pERK-positiven Fälle von den klassischen zu den anaplastischen Ependymomen gut in dieses Bild.

Die myxopapillären Ependymome fallen aus dem Muster allerdings vollständig heraus, was vermuten lässt, dass diese Tumore eine eigene Tumorentität darstellen, die sich nicht nur im histologischen Bild sondern im biologischen Verhalten von den klassischen Ependymomen unterscheiden. Welche Bedeutung die pERK in den einzelnen Ependymomen spielt, bleibt unklar.

6.3.2.4.1. Zusammenhang zwischen pERK und MIB1

In den myxopapillären Ependymomen ist es unwahrscheinlich, dass pERK einen Einfluss auf die Proliferation ausübt, da sich keine Anzeichen für eine Proliferationssteigerung fanden, jedoch in über der Hälfte der Fälle eine erhöhte Ausprägung der pERK sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen vorlag. Allerdings bezieht sich unsere Untersuchung nur auf die durch MIB1 nachweisbare Steigerung der Proliferation.

Betrachtet man demgegenüber die anderen Ependymome, so gibt es eher Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen beiden Faktoren. Dieser liegt in der Aktivierung der nukleären ERK. Bei nukleär positiver pERK traten auch prozentual in dieser Gruppe häufiger stark MIB1-exprimierende Ependymome auf (44% im Vergleich zu 19% bei negativer nukleärer pERK). Im Gegensatz dazu nahmen die Fälle mit erhöhter Proliferationsneigung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen ERK-Aktivierung leicht ab (siehe Diagramm 5.3.2.2.2.).

Diese Feststellung passt erneut zu dem schon bei den astrozytär-oligodendroglialen Tumoren beschriebenen Umstand, dass eine nukleäre ERK-Aktivierung über direkte Proliferationssteigerung und die zytoplasmatisch aktivierte ERK über anti-apoptotische Signalwege zu einem Wachstum der Zellen führt (Davis 1993; Chang, Karin 2001). Die Betrachtung der prozentualen Werte muss jedoch aufgrund der geringen Fallzahl an Tumoren mit positivem pERK-Ergebnis kritisch betrachtet werden.

Auf der anderen Seite sprechen die erhöhten pERK- Werte in den myxopapillären Ependymomen gegen einen Zusammenhang der pERK mit Proliferation oder Antiapoptose, da dieser Tumor sich grundsätzlich gutartig verhält und langsam wächst. Hier müssen andere Ursachen für die pERK- Erhöhung verantwortlich sein (z.B. Zell-Differenzierung) oder aber es treten weitere Mechanismen auf, die den proliferativen Effekt der aktivierten ERK hemmen (siehe 6.3.2.8.).

6.3.2.4.2. Zusammenhang zwischen pERK und EGFR

Die Proliferations-steigernde Funktion der ERK wird über Liganden-gebundene EGFR-Stimulierung aktiviert (Ahn et al. 1990).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und ERK-Aktivierung fand sich nur für die Ependymome WHO II und III.

Die myxopapillären Ependymome wiesen zwar ebenfalls in einigen Fällen erhöhte nukleäre oder zytoplasmatische pERK-Werte auf, jedoch trat diese gesteigerte Expression unabhängig vom EGFR-Status auf und scheint nicht mit der Proliferation in Zusammenhang zu stehen (s.o.).

Demgegenüber waren bei den klassischen und anaplastischen Ependymomen mit zunehmender EGFR-Ausprägung auch höhergradige pERK-Werte vorhanden. Vor allem die nukleäre Aktivierung der ERK scheint unter anderem vom EGFR-Status abzuhängen. Bei starker Expression des EGFR fanden sich vermehrt Tumore, die eine gesteigerte ERK-Aktivität zeigten.

6.3.2.5. Expression der phosphorylierten Akt und Zusammenhang mit dem EGFR

Über die Expression von Akt in Ependymomen finden sich in der Literatur bisher nahezu keine Angaben. Gilbertson et al. zeigten in ependymalen Zelllinien eine Aktivierung der Akt in Abhängigkeit von der Stimulierung der Zellen mit EGF (Gilbertson et al. 2002).

In unserem Kollektiv fand sich zytoplasmatisch insgesamt eine geringe Expression von pAkt. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Zahlenverhältnisse, so hebt sich die Verteilung in den einzelnen Tumorgaden nicht wesentlich voneinander ab. Einzig in den Subependymomen war kein aktiviertes Protein nachzuweisen.

Demgegenüber waren in den Zellkernen häufiger höhere Ausprägungen der pAkt vertreten. Vor allem in den myxopapillären Ependymomen fand sich eine starke Expression der nukleären pAkt.

Die Verteilung dieser Kinase alleine lässt jedoch keine weiteren Schlüsse auf das Verhalten der Ependymome zu.

Interessant ist allerdings der Vergleich mit der pAkt-Verteilung in den astrozytär-oligodendroglialen Tumoren. Die nukleäre pAkt-Expression war in allen WHO-Graden nahezu identisch verteilt, die zytoplasmatische pAkt wies dagegen abhängig vom WHO-Grad Unterschiede auf. In den Ependymomen scheint dies genau umgekehrt der Fall zu sein. Hier liegt bei der zytoplasmatischen Verteilung eine wesentlich größere Ähnlichkeit zwischen den Graden vor als bei der nukleären Ausprägung. Diese Feststellung spricht für einen Unterschied der Akt-Funktion in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation, wie er für die ERK schon beschrieben wurde (Davis 1993; Chang, Karin 2001).

6.3.2.5.1. Zusammenhang mit EGFR

Den Nachweis einer gesteigerten Aktivität der Akt nach Behandlung mit EGF brachten Gilbertson et al. an ependymalen Zellen, die neben ERBB2 und ERBB3 auch EGFR (ERBB1) exprimierten (Gilbertson et al. 2002).

Auch in Voruntersuchungen der vorliegenden Arbeit schien eine hohe EGFR-Expression nahezu immer mit einer vermehrten Aktivierung von Akt zusammen zuhängen. Nachdem wir unser Kollektiv erweitern konnten, verschob sich dieses Verhältnis jedoch. Bestätigen ließ sich die Annahme, dass die Ependymome fast alle eine hohe EGFR-Expression aufweisen.

Insgesamt findet man weiterhin vor allem in den klassischen Ependymomen (WHO II) die Tendenz, dass bei stark erhöhter EGFR-Ausprägung in deutlich mehr Tumoren eine pAkt-Anreicherung vorliegt, als bei Tumoren mit geringer bis fehlender EGFR-Expression.

Die Bedeutung von Akt als wichtiger Faktor im Überleben der Zelle und deren Wachstum kann anhand unserer Ergebnisse dennoch nur erahnt werden und sollte Gegenstand weiterer funktioneller Untersuchungen sein.

6.3.2.6. Vergleich von pERK mit pAkt

In den hoch malignen Tumoren astrozytär-oligodendroglialen Ursprungs fanden wir einen Zusammenhang der ERK mit Akt. Wir postulierten einen Mechanismus, der bei zytoplasmatisch aktiver ERK zu einer Aktivitätssteigerung der Akt führt. Über einen solchen Weg könnte ERK in zytoplasmatischer Lokalisation im Sinne einer posttranskriptionalen Einleitung anti-apoptotischer Signalwege fungieren.

Da sich auch in den Ependymomen Steigerungen beider Kinasen zeigten, wurden beide Faktoren in dieser Tumorentität ebenfalls verglichen.

6.3.2.6.1. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und zytoplasmatischer pAkt

Die Darstellung der Abhängigkeit zytoplasmatisch aktivierter Akt von zytoplasmatisch aktivierter ERK war für beide Gruppen sehr ähnlich, eine Abhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden.

Sowohl bei den myxopapillären als auch bei den klassischen und anaplastischen Ependymomen zeigte sich keine aussagekräftige Zunahme der pAkt in Abhängigkeit einer gesteigerten pERK-Ausprägung. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fallzahlen lag eine gleichmäßige Verteilung vor. Einzig die stark pERK-positiven Tumore wiesen ausschließlich negative pAkt-Werte auf.

6.3.2.6.2. Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer pERK und nukleärer pAkt

Betrachtet man die nukleäre pAkt-Expression in Abhängigkeit von pERK im Zytoplasma, so gab es in beiden Gruppen zunächst bei mäßig starker pERK-Expression eine Zunahme der pAkt-positiven Präparate. Allerdings fielen sie bei starker pERK-Ausprägung wieder ab, so dass sich vor allem unter in den Ependymomen WHO II und III keine pAkt-positiven Fälle mehr fanden.

Anders als bei den Glioblastomen ließ sich somit weder bei den myxopapillären noch bei den klassischen und anaplastischen Ependymomen ein Zusammenhang in der Expression beider aktivierten Kinasen herstellen. In den Ependymomen scheint der beschriebene Mechanismus keine Rolle zu spielen.

6.3.2.7. Expression von PTEN und Zusammenhang mit pAkt

Über Mutationen oder Deletionen des so genannten Tumor-Suppressorgens PTEN in Ependymomen sind in der Literatur nur wenige Fälle zu finden (Fink et al. 1996; Duerr et al. 1998; Ebert et al. 1999; Zhou et al. 1999).

Es zeigt sich anhand unserer Ergebnisse sehr deutlich, dass die Verteilung von PTEN in den niedriger malignen Ependymomen (WHO I oder II), einschließlich der Subependymome sehr ähnlich war. Jeweils 15-20% der Tumore blieben ohne PTEN-Expression, in 50-55% fanden sich mäßig starke Ausprägungen und in etwa 25-30% stark erhöhte Werte. Demgegenüber gelang in den anaplastischen Ependymomen ein stark positiver Nachweis von PTEN in gesteigertem Maße (40%).

Diese hohe PTEN-Expression in den anaplastischen Ependymomen könnte ihre Ursache in der Aktivitätssteigerung des PTEN-Gens haben. Die Tumor-suppressiven Funktionen von PTEN werden eingeleitet und Proliferation und Zellwachstum gestoppt. Allerdings weist entgegen dieser Behauptung gerade eine Anaplasie auf einen Verlust von Tumor-suppressiven Funktionen hin.

Möglicherweise tritt PTEN in den ependymalen Tumoren in einer anderen Funktion auf. PTEN steht zum Beispiel in Zusammenhang mit der normalen Entwicklung des Gehirns, wo stark erhöhte PTEN-Expressionen auftreten (Gimm et al. 2000). Da PTEN auch in den Subependymomen und myxopapillären Ependymomen klar nachweisbar war, könnte es in diesen Zellen entweder schon in sehr niedrigen Tumorstadien suppressiv wirken oder wie in embryonalen Zellen Funktionen in Zellentwicklung und -differenzierung übernehmen (Gimm et al. 2000).

6.3.2.7.1. Zusammenhang zwischen pAkt und PTEN

PTEN-Deletionen führen in glialen Tumoren häufig zu Steigerungen der Akt-Aktivierung und damit zu anti-apoptotischen Effekten, da der hemmende Einfluss verloren geht (Maehama, Dixon 1998; Stambolic et al. 1998; Wu et al. 1998). Unter den Ependymomen wurden jedoch bisher nur sehr wenige Fälle mit PTEN-Mutationen beschrieben (Fink et al. 1996; Duerr et al. 1998; Ebert et al. 1999; Zhou et al. 1999).

Die PTEN-Expression war in den untersuchten Ependymomen in den meisten Fällen mäßig bis stark positiv nachweisbar. Lediglich 16% kennzeichneten sich durch ein negatives Resultat (1 Subependymom, 4 myxopapilläre und 6 klassische Ependymome von 69 Ependymomen).

Der Vergleich von PTEN mit der pAkt-Ausprägung brachte bei insgesamt wenig pAkt-positiven Fällen keinen Zusammenhang beider Faktoren. Sowohl unter den myxopapillären als auch unter den höhergradigen Ependymomen waren die pAkt-positiven Präparate gleichmäßig auf die verschiedenen PTEN-Ausprägungsgrade verteilt. Ein negatives PTEN-Ergebnis hing nicht gehäuft mit gesteigerten pAkt-Werten zusammen.

Da PTEN in diesen Tumoren allerdings sehr stark ausgeprägt war, sind offensichtlich andere Funktionen dieses Gens von Bedeutung (siehe 6.3.2.7.).

6.3.2.8. Expression von p21 und Zusammenhang mit pERK

Anders als in den Tumoren astrozytär-oligodendroglialen Ursprungs war in den Ependymomen p21 zytoplasmatisch nicht zu finden mit Ausnahme eines anaplastischen Ependymoms. Im Zellkern konnten dagegen mehrere positive Resultate nachgewiesen werden. Diese waren vor allem unter den myxopapillären Ependymomen zu finden, die in der Hälfte der Fälle positiv reagierten.

Dieses Resultat steht in Kontrast mit dem Ergebnis, dass in glialen Tumoren die p21-Expression mit dem WHO-Grad und somit der Malignität zusammenhängt (siehe 6.3.1.7., Korkolopoulou et al. 1998). In den Ependymomen fehlt dieser Bezug.

Eine wichtige Bedeutung scheint p21 in den myxopapillären Ependymomen zu spielen. Die hohe Expression ist ein Hinweis darauf, dass p21 in diesen Tumoren einen wichtigen Beitrag zur ihrer geringen Proliferationsneigung leistet, zum Beispiel indem es seine Funktion als CDK-Inhibitor ausübt (Harper et al. 1993; Xiong et al. 1993) und so der Zellzyklus reguliert wird.

6.3.2.8.1. Zusammenhang zwischen p21 und pERK

Möglicherweise wird dieser Mechanismus über die ERK reguliert. Pumiglia und Decker postulierten, dass bei anhaltender Aktivierung der ERK über den CDK-Inhibitor p21^{CIP1/WAF1} ein Stillstand des Zellwachstums eintreten würde (Pumiglia, Decker 1997).

Es zeigte sich in den myxopapillären Ependymomen beim Vergleich beider Faktoren, dass die Anteile der p21-positiven Tumore mit zunehmender pERK deutlich anstiegen. Vor allem bei pERK im Zellkern war dieser Anstieg ausgeprägt. Lagen bei negativer pERK im Zellkern noch 7 von 10 Präparaten ohne Reaktion gegen p21 vor, so waren es bei positiver pERK nur 3 von 11 (siehe 5.3.2.2.7.).

Die myxopapillären Ependymome werden in der WHO-Klassifikation mit dem Grad I benannt, was einer geringen Malignität entspricht. Sie zeichnen sich durch ein langsames Wachstum aus und proliferative Faktoren sind selten nachweisbar (Prayson 1997).

Neben der fehlenden MIB1-Ausprägung fand sich in den myxopapillären Ependymomen eine gesteigerte Expression von pERK. Anders als in den klassischen und anaplastischen Ependymomen war in dieser Gruppe allerdings kein Zusammenhang mit MIB1 festzustellen, was auf eine andere Funktion der ERK in diesen Tumoren hinweist.

Für die Annahme, dass ERK in diesen Ependymomen einen Stillstand des Zellwachstums bewirkt indem es den CDK-Inhibitor p21 aktiviert, sprechen verschiedene Argumente.

Zum einen ist p21 in den myxopapillären Ependymomen in hohem Maße nachweisbar, jedoch findet sich kein Zusammenhang mit dem p21-Aktivator p53, der nur in einem myxopapillären Ependymom zu finden ist (siehe 5.3.2.1.1.). Es scheinen also p53-unabhängige Mechanismen für den hohen p21-Nachweis verantwortlich zu sein. Die ERK wäre ein denkbarer Kandidat.

Zum anderen konnten wir für die Aktivität der ERK in den myxopapillären Ependymomen weder eine direkte Verbindung mit proliferativen Faktoren (MIB1) noch mit anti-apoptotischen (Akt) nachweisen, wie es hingegen bei den Glioblastomen gelang (siehe 5.3.1.2.3., 5.3.1.2.1.).

Der Zusammenhang zwischen ERK und p21 liefert ein überzeugendes Argument für die Erhöhung beider Faktoren und ihren Einfluss auf das Verhalten der myxopapillären Ependymome.

Für die p53-unabhängige Aktivierung von p21 in Zusammenhang mit dem ERK-Signalweg spricht auch eine Veröffentlichung von Zeng und el-Deiry. Sie zeigten Hinweise auf die p21-Aktivierung über die Proteinkinase C (PKC) (Zeng, el-Deiry 1996). Da PKC ein möglicher Aktivator der ERK ist (Kazlauskas, Cooper 1988; L'Allemain et al. 1991; Kolch et al. 1993), scheint durchaus auch eine gleichzeitige Aktivierung beider Faktoren in Abhängigkeit von der PKC denkbar.

6.3.2.9. Zusammenhang zwischen p21 und pAkt

Der Zusammenhang zwischen p21 und Akt tritt in Anbetracht des Einflusses, den ERK in den myxopapillären Ependymomen auf p21 ausübt, etwas in den Hintergrund, soll aber dennoch erwähnt werden.

Die nukleäre p21-Ausprägung nahm in Abhängigkeit von pAkt leicht zu. Bei höherer pAkt-Expression fanden sich unabhängig von der Lokalisation prozentual mehr Fälle mit stark positivem p21. Ein aussagekräftiger Zusammenhang bestand nicht.

Welchen Einfluss Akt auf die p21-Expression hat und welche Auswirkungen dadurch hervorgerufen werden, ist noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch beeinflusst die Akt-Aktivität die Lokalisation von p21 (Zhou et al. 2001).

Da in den Ependymomen mit Ausnahme eines Falles zytoplasmatisch kein Nachweis von p21 gelang, ist eine nähere Beleuchtung nicht möglich.

6.3.3. Tissue-Array

Als weiteren Punkt der vorliegenden Arbeit, überprüften wir, ob die Methode der *Tissue-Array*-Analyse im Vergleich zur herkömmlichen Immunhistochemie ausreichende Ergebnisse liefern kann.

Auf die einzelnen Ergebnisse der Auswertung der *Tissue-Arrays* soll in diesem Punkt nicht mehr eingegangen werden. Vielmehr wird direkt der Vergleich beider Methoden und die Aussagekraft der *Tissue-Arrays* diskutiert.

Insgesamt zeigten sich für die einzelnen untersuchten Faktoren sehr unterschiedliche Resultate. Im Überblick fällt auf, dass die Wahrscheinlichkeit im *Tissue-Array* gleiche Ergebnisse zu erhalten wie in der herkömmlichen Auswertung mit zunehmendem WHO-Grad sinkt. Unter den astrozytär-oligodendroglialen Tumoren fand sich die höchste Kongruenz bei den Astrozytomen (WHO II). Mit steigendem WHO-Grad ließ die Übereinstimmung nach. Dies ist besonders gut bei EGFR, nukleärer pERK, PTEN, nukleärer p21 und MIB1 zu sehen, wo sich bei den Astrozytomen keine Abweichung von über 50% zeigte. Bei den anaplastischen Astrozytomen stimmten dagegen zum Beispiel bei der Auswertung der zytoplasmatischen pERK nur 38% der Präparate im *Tissue-Array* mit denen in der Immunhistochemie des gesamten Präparates überein. Unter den Glioblastomen gab es schließlich ausgeprägte Unterschiede im Endergebnis.

Der vom WHO-Grad abhängige Trend ist auch in den ependymalen Tumoren zu erkennen. Auffallend waren hier aber zusätzlich einzelne Faktoren (EGFR, PTEN), bei denen sich insgesamt eine sehr schlechte Übereinstimmung fand.

Im Fall der astrozytären Tumore ist davon auszugehen, dass die Abweichungen gerade bei den höhergradigen Tumoren durch die ausgeprägte Heterogenität der Zellen bedingt ist. Es wurde bei der Auswahl des Gewebes für die *Tissue-Arrays* zwar darauf geachtet, einen möglichst repräsentativen Bereich des Tumors zu wählen, jedoch bezieht sich diese Auswahl lediglich auf das histologische Zellbild des Gewebes. Das biologische Verhalten der einzelnen Tumorbezirke fließt hier noch nicht mit ein. Des Weiteren konnte insbesondere bei den Glioblastomen festgestellt werden, dass die vorherige Auswahl am HE-gefärbten Präparat nicht eindeutig eine Garantie dafür ist, dass im *Array* schließlich der ausgewählte Bezirk zur Darstellung kommt. In einzelnen Fällen sah man auf dem *Tissue-Array* letztlich einen nekrotischen Bereich. Obwohl im Vorfeld sorgfältig der Paraffin-Block mit dem HE-Schnitt zur Auswahl der Gewebeprobe verglichen worden war, war es durch die weitere Verarbeitung zu einem Verlust des ausgewählten Tumorareals gekommen und ungeeignetes Material kam zur Darstellung.

Ein weiteres Problem, welches die unterschiedlichen Ergebnisse auch in der Ependymom-Auswertung bedingen könnte, ist eine möglicherweise in einzelnen Präparaten vorliegende starke Aktivität des untersuchten Faktors (z.B. EGFR), wodurch der verwendete Antikörper von einzelnen Geweben so stark gebunden wird, dass er für die restlichen Präparate nicht mehr in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Der Antikörper wird sozusagen von einem hochaktiven Gewebe abgezogen und steht den restlichen Geweben des *Tissue-Array* nicht mehr zur Verfügung wodurch falsch negative Ergebnisse auftreten können.

6.4. Kritische Stellungnahme zum Einsatz von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern in der Immunhistochemie

Eine Grundlage dieser Arbeit war die Frage, welchen Aussagewert Phosphorylierungs-spezifische Antikörper in der Immunhistochemie haben. Im Vorfeld hatten bereits einige Veröffentlichungen die Anwendung dieses Verfahrens beschrieben (Mandell et al. 1998; Irving et al. 2000; Zhou et al. 2001; Choe et al. 2003). Mit Hilfe eines Vergleichs der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper mit der Verteilung des Gesamt-Proteins sowie mit dem Nachweis durch die quantitative Proteinbestimmung als Positiv-Kontrolle wurde die Spezifität der Antikörper nochmals geprüft. Durch Einsatz von *Gewebearrays* gingen wir einer Möglichkeit der Screening-Untersuchung nach. Schlussendlich sollte angelehnt an die bekannten Signalwegsveränderungen in glialen Tumoren mit Hilfe der Phosphorylierungs-spezifischen sowie weiterer Antikörper beleuchtet werden, wie sich durch die Verteilung der untersuchten Faktoren im Gewebe weitere Schlüsse auf Signalwegsveränderungen ziehen lassen.

Im Vergleich mit der quantitativen Proteinbestimmung konnte gezeigt werden, dass Tumore, die im *Western-Blot* einen hohen Anteil an aktiviertem Protein aufweisen auch in der Immunhistochemie eine hohe Ausprägung dieses Proteins zeigen. Die Methoden erlauben jedoch nur einen eingeschränkten

quantitativen Vergleich. Dies liegt in der Verschiedenheit der beiden Verfahren. In der Immunhistochemie ist in der Auswertung trotz harter Kriterien eine Subjektivität der auswertenden Person nicht vollständig vermeidbar. Aber auch im *Western-Blot* kommt es zu Fehlern. Zum Beispiel fließen in der *Western-Blot*-Analyse neben den zu untersuchenden Tumorzellen auch andere Zelltypen wie Endothelien aus Gefäßproliferaten in das Ergebnis ein. Hierdurch kann es beim Vergleich mit der Immunhistochemie, die selektiv die Tumorzellen bewertet, zu stärkeren Ausprägungen des gesuchten Proteins kommen. Die immunhistochemische Methode mit Einsatz von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern erlaubt also eine wesentlich exaktere Beurteilung des Verhaltens der einzelnen Tumorzellen.

Für die Aussagekraft der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper spricht auch der Vergleich mit der Verteilung des Gesamt-Proteins (gesERK, gesAkt). In den Präparaten, die sowohl hinsichtlich des Gesamt-Proteins als auch des aktivierten Proteins (pERK, pAkt) untersucht wurden, fanden sich unterschiedliche Verteilungsmuster, die alle den Hinweis darauf geben, dass der Phosphorylierungs-spezifische Antikörper jeweils nur das aktivierte Protein nachweist. Es handelt sich dementsprechend bei den in der Immunhistochemie angewandten Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern um eine Methode, welche es erlaubt, Enzyme in ihrer aktiven Form im intakten Zellverband nachzuweisen.

Der Anwendung dieser Methode im Rahmen von *Tissue-Arrays* sind jedoch Grenzen gesetzt. Wie sich beim Vergleich der Immunhistochemie am gesamten Tumorauschnitt mit der Immunhistochemie am *Array* zeigte, weichen diese trotz vorheriger Auswahl des *Array*-Arreals teilweise deutlich voneinander ab. Ursächlich ist wahrscheinlich die Heterogenität der Tumore, weniger die Methode selbst.

Durch die Korrelation der aktivierten Enzyme mit weiteren Faktoren der untersuchten Signalwege lassen sich funktionelle Zusammenhänge im Verhalten der Tumore, die teils mehrfach beschrieben wurden nachvollziehen. Ein Beispiel hierfür ist die Verbindung einer gesteigerten Proliferation in hochgradigen glialen Tumoren mit der Ausprägung der aktivierten ERK (siehe 5.2.1.2.3.).

Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass sich Phosphorylierungs-spezifische Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung aktivierter Enzyme eignen und darüber hinaus durch den Nachweis des aktivierten Proteins im intakten Zellverband Aussagen über das funktionelle Verhalten der Tumore getroffen werden können.

7. Zusammenfassung

Die häufigsten und mitunter sehr malignen Neoplasien des zentralen Nervensystems sind gliale Hirntumore, deren teils rasche Progression auf verschiedenen genetischen Veränderungen basiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den hierdurch hervorgerufenen Abweichungen in Signaltransduktion und Proteinexpression speziell an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe (*formalin fixed paraffin embedded*, FFPE).

Mit Hilfe von seit kurzem für die Immunhistochemie zur Verfügung stehenden Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern wurde anhand Vergleichen mit anderen Methoden gezeigt, dass die phosphorylierten und damit aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 und Akt an FFPE *in situ* nachweisbar sind. Um einen Zusammenhang zwischen den aktivierten Proteinkinasen und dem Verhalten der Tumore herstellen zu können, wurde die Expression anderer Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion untersucht und mit den phosphorylierten Proteinen verglichen. Ferner wurde geprüft, ob mittels *Tissue-Arrays* eine Methode zur Darstellung der Proteine an einem großen Kollektiv zur Verfügung steht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper in der Lage sind, aktivierte Formen der gesuchten Proteine im Tumorgewebe immunhistochemisch kenntlich zu machen. Anhand der Farbintensität und dem Prozentsatz der positiv reagierenden Zellen können Aussagen über das Verhalten der Tumore getroffen werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Astrozytome (WHO-Grad II) mit erhöhter Expression von phosphorylierter ERK1/2 eine verstärkte Tendenz zu Proliferation und Progression haben.

Der Einsatz von *Tissue-Arrays* wird zur Klärung des Tumorverhaltens keine Relevanz haben, da durch die Untersuchung eines sehr umschriebenen Tumorareals der Heterogenität vieler glialer Hirntumore nicht Rechnung getragen werden kann.

Der immunhistochemische Nachweis der Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper bietet möglicherweise einen Ansatz, in Zukunft eine genauere Prognose über das Verhalten eines Tumors bezogen auf Proliferation, Aggressivität und gerade bei den Glioblastomen Therapie-Resistenz treffen zu können.

8. Literatur

1. Ahn NG, Weiel JE, Chan CP, Krebs EG. Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *J Biol. Chem.* 265 (1990) 11487-11494
2. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15 (1996) 6541-6551
3. Alessi DR, James SR, Downes AB. Characterisation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates PKB α . *Curr. Biol.* 7 (1997) 261-269
4. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol. Chem.* 12 (1997) 31515-31524
5. Aoki M, Batista O, Bellacosa A, Tsichlis P, Vogt PK. The Akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 14950-14955
6. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 18 (1999) 1223-34
7. Balmaceda C, Peereboom D, Panullo S, Cheung YKK, Fisher PG, Alavi J, Sisti M, Chen J, Fine RL. Multi-institutional phase II study of temozolomide administered twice daily in the treatment of recurrent high-grade gliomas. *Cancer.* 112 (2008) 1139-1146
8. Battifora H. Methods in laboratory investigation The multitumor (sausage) tissue block: Novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab. Invest.* 55 (1986) 244-248
9. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17 (1998) 313-325
10. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254 (1991) 274-277
11. Bigner SH, Burger PC, Wong AJ, Werner MH, Hamilton SR, Muhlbaier LH, Vogelstein B, Bigner DD. Gene amplification in malignant human gliomas: clinical and histopathological aspects. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 47 (1988) 191-205
12. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS, Bigner DD. Characterisation of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and Xenografts. *Cancer Res.* 50 (1990) 8017-8022
13. Bijlsma EK, Voesten AM, Bijleveld EH, Troost D, Westerveld A, Merel P, Thomas G, Hulsebos TJ. Molecular analysis of genetic changes in ependymomas. *Genes Chromosomes Cancer* 13 (1995) 272-277
14. Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M. Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med. Pediatr. Oncol.* 30 (1998) 319-331

15. Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufourt H, Figarella-Branger D. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24 (1998) 381-388
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254
17. Burgering BMT, Coffey PJ. Protein kinase B (cAkt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376 (1995) 599-602
18. Cairncross JG, MacDonald DR. Chemotherapy for oligodendroglioma. Progress report. *Arch. Neurol.* 48 (1991) 225-227
19. Cantley LC, Neel BG. Review: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide / Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 4240-4245
20. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 (1998) 1318-1321
21. Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J, Allibone R, Balaji V, Perry R, Walker D, Gilbertson R, Ellison DW. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *Br. J Cancer* 86 (2002) 929-939
22. Cataldi A, Zauli G, DiPietro R, Castorina S, Rana R. Involvement of the pathway Phosphatidylinositol-3-OH kinase / Akt-1 in the establishment of the survival response to ionising radiation. *Cellular Signalling* 13 (2001) 369-375
23. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 (2001) 37-40
24. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell Biol.* 12 (1992) 915-27
25. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, Inge L, Smith BL, Sawyers CL, Mischel PS. Analysis of the Phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res.* 63 (2003) 2742-2746
26. Cobb MH, Goldsmith EJ. Minireview: How MAP kinases are regulated. *J Biol. Chem.* 270 (1995) 14843-14846
27. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin. Oncol.* 17 (1999) 2639-2648
28. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAPkinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77 (1994) 841-852
29. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Minireview: Serine/Threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256 (2000) 34-41

30. Curran WJ Jr, Scott CB, Weinstein AS, Martin LA, Nelson JS, Phillips TL, Murray K, Fischbach AJ, Yakar D, Schwade JG. Survival comparison of radiosurgery-eligible and ineligible malignant glioma patients treated with hyperfractionated radiation therapy and carmustine: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *J Clin. Oncol.* 11 (1993) 857-862
31. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol. Chem.* 268 (1993) 14553-14556
32. DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG. Malignant glioma: Who benefits from adjuvant Chemotherapy? *Ann. Neurol.* 44 (1998) 691-695
33. Deimling v. A, Louis DN, Ammon v. K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yasargil G, Wiestler OD, Seizinger BR. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 77 (1992) 295-301
34. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15 (1998) 11211-11216
35. Domin J, Waterfield MD. Minireview: Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Letters* 410 (1997) 91-95
36. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275 (1997) 661-665
37. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, v Deimling A. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16 (1998) 2259-2264
38. Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A. Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 627-632
39. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 51 (1991) 2164-2172
40. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (1993) 817-825
41. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1 / CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54 (1994) 1169-1174

42. Figarella-Branger D, Civatte M, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Gambarelli D, Gentet JC, Lena G, Choux M, Pellissier JF. Prognostic factors in intracranial ependymomas in children. *J Neurosurg.* 93 (2000) 605-613
43. Fine HA. The basis of current treatment recommendations for malignant glioma. *J Neurooncol.* 20 (1994) 111-120
44. Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS. Meta-Analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71 (1993) 2585-2597
45. Fink KL, Rushing EJ, Schold SC Jr, Nisen PD, Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas. *J Neurooncol.* 27 (1996) 111-115
46. Franke TF, Assays for Akt. *Methods in Enzymology* 322 (2000)
47. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81 (1995) 727-736
48. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: Downstream Aktion blocks Apoptosis. *Cell* 88 (1997) 435-437
49. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 481-507
50. Furnari FB, Huang H-JS, Cavenee WK. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res.* 58 (1998) 5002-5008
51. Garden AS, Maor MH, Yung WK, Bruner JM, Woo SY, Moser RP, Lee YY. Outcome and patterns of failure following limited-volume irradiation for malignant astrocytomas. *Radiother. Oncol.* 20 (1991) 99-110
52. Gaspar N, Grill J, Georger B, Lellouch-Tubiana A, Michalowski MB, Vassal G. p53 pathway dysfunction in primary childhood ependymomas. *Pediatr Blood Cancer.* 46 (2006) 604-613
53. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133 (1984) 1710-1715
54. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 1 (1990) 199-206
55. Gimm O, Attie-Bitach T, Lees JA, Vekemans M, Eng C. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development. *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1633-1639
56. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS 3rd, Evans DR. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403 (2000) 328-332
57. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp III HS, Evans DR. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403 (2000) 328-332

58. Grosu AL, Feldmann HJ, Albrecht C, Kneschaurek P, Wehrmann R, Gross MW, Zimmermann FB, Molls M. 3-Dimensional irradiation planning in brain tumors. The advantages of the method and the clinical results. *Strahlenther. Onkol.* 174 (1998) 7-13
59. Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 885-892
60. Haken von MS, White EC, Daneshvar-Shyesther L, Sih S, Choi E, Kalra R, Cogen PH. Molecular genetic analysis of chromosome arm 17p and chromosome arm 22q DNA sequences in sporadic pediatric ependymomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17 (1996) 37-44
61. Hall WA, Merrill MJ, Walbridge S, Youle RJ. Epidermal growth factor receptors in ependymomas and other brain tumors. *J Neurosurg.* 71 (1990) 641-646
62. Hamilton RL, Pollack IF. The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol.* 7 (1997) 807-822
63. Handrick R, Rübél A, Faltin H, Eibl H, Belka C, Jendossekv. Increased cytotoxicity of ionising radiation in combination with membrane-targeted apoptosis modulators involves downregulation of protein kinase B / Akt - mediated survival-signaling. *Radiother Oncol.* 80 (2006) 199-206
64. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (1993) 805-816
65. Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rümmele P, Grauer O, Bock A, Dietmaier C, Dietmaier W, Dietrich J, Dudel C, Hübner F, Jauch T, Drechsel E, Kleiter I, Wismeth C, Zellner A, Brawanski A, Steinbrecher A, Marienhagen J, Bogdahn U. Pegylated Liposomal Doxorubicin-Efficacy in Patients with recurrent High-Grade Glioma. *Cancer.*100 (2004) 1199-1207
66. Hayes RL, Koslow M, Hiesiger EM, Hymes KB, Hochster HS, Moore EJ, Pierz DM, Chen DK, Budzilovich GN, Ransohoff J. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokin-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 76 (1995) 840-852
67. Heesters MA, Koudstaal J, Go KG, Molenaar WM. Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: prognostic and clinical value. *J Neurooncol.* 44 (1999) 255-266
68. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kross JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352 (2005) 997-1003
69. Hemmings BA. Akt signaling: Linking events of Life and Death Decisions. *Science* 275 (1997) 628-630
70. Hirose Y, Aldape K, Bollen A, James CD, Brat D, Lamborn K, Berger M, Feuerstein BG. Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1137-1143

71. Hlobilkova A, Ehrmann J, Sedlakova E, Krejci V, Knizetova P, Fiuraskova M, Kala M, Kalita O, Kolar Z. Could changes in the regulation of the PI3/PKB/Akt signalling pathway and cycle be involved in astrocytic tumor pathogenesis and progression? *Neoplasma*. 54 (2007) 334-341
72. Ho DM, Hsu Cy, Wong TT, Chiang H. A clinicopathologic study of 81 patients with ependymomas and proposal of diagnostic criteria for anaplastic ependymoma. *J Neurooncol*. 54 (2001) 77-85
73. Hofer S, Herrmann R. Chemotherapy for malignant brain tumours of astrocytic and oligodendroglial lineage. *J Cancer Res. Clin. Oncol*. 127 (2001) 91-95
74. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet*. 25 (2000) 55-57
75. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 253 (1991) 49-53
76. Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, Tomita T, Schomberg P, Ater J, Luchtman-Jones L, Rivlin K, Lamborn K, Prados M, Bollen A, Berger M, Dahl G, McNeil E, Patterson K, Shaw D, Kubalik M, Russo C. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr. Hematol. Oncol*. 21 (1999) 203-211
77. Hsiao M, Tse V, Carmel J, Costanzi E, Strauss B, Haas M, Silverberg GD. Functional expression of human p21 WAF1/CIP1 gene in rat glioma cells supresses tumor growth in vivo and induces radiosensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233 (1997) 329-335
78. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller Gn, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal-growth-factor-receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 4207-4211
79. Irving EA, Barone FC, Reith AD, Hadingham SJ, Parsons AA. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. *Mol. Brain Res*. 77 (2000) 65-75
80. Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kobayashi T, Levin VA, Zhang W. Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene* 11 (1995) 2021-2028
81. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol. Chem*. 276 (2001) 18169-18177
82. Kazlauskas A, Cooper JA. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J. Cell Biol*. 106 (1988) 1395-1402
83. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan L, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/ Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes. Dev*. 11 (1997) 701-713
84. Kimmig B, Wowra B, Engenhardt R. Stereotaktische Photonen-Konvergenzbestrahlung. In Betz H (ed) *Conscientia diagnostica - Hirntumoren*. Schnetztor Verlag, Konstanz (1992)

85. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PI3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 113 (2007) 295-302
86. Kleihues P, Cavenee WK. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon, 2000
87. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 61 (2002) 215-229
88. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol.* 13 (2003) 507-518
89. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364 (1993) 249-252
90. Korkolopoulou P, Kouzelis K, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E. Expression of retinoblastoma gene product and p21 (WAF1/Cip1) protein in gliomas: correlations with proliferation markers, p53 expression and survival. *Acta Neuropathol.* 95 (1998) 617-624
91. Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases. *J Neurol. Sci.* 177 (2000) 72-82
92. Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for prognosis of epidymal neoplasms. *J Neurooncol.* 58 (2002) 255-270
93. Korshunov A, Neben K, Wrobel G, Tews B, Benner A, Hahn M, Golanov A, Lichter P. Short Communication Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 1721-1727
94. Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, Sutton LN, Biegel JA. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. *J Neurooncol.* 37 (1998) 25-33
95. Kumar CC, Diao R, Yin Z, Liu J-H, Samatar AA, Madison V, Xiao L. Expression, purification, characterization and homology modeling of active Akt, a key enzyme involved in cell survival signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1526 (2001) 257-268
96. L'Allemain G, Sturgill TW, Weber MJ. Defective regulation of mitogen-activated protein kinase activity in a 3T3 cell variant mitogenically nonresponsive to tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 1002-1008
97. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (1992) 15-16
98. Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, Milosevic M, Wong S, Glen J, Pintilie M, Bernstein M. Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 41 (1998) 1005-1011
99. Larson DA, Suplica JM, Chang SM, Lamborn KR, McDermott MW, Sneed PK, Prados MD, Wara WM, Nicholas MK, Berger MS. Permanent iodine 125 brachytherapy in patients with progressive or recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro-oncol.* 6 (2004) 119-126

100. Lee YO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99 (1999) 323-334
101. Lee JT Jr, Steelman LS, Chappell WH, McChubrey JA. Akt inactivates ERK causing response to chemotherapeutic drugs in advanced CaP cells. *Cell Cycle*. 6 (2007)
102. Li DM, Sun H. PTEN/ MMAC1/ TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1999) 15406-15411
103. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275 (1997) 1943-1947
104. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature* 313 (1985) 144-147
105. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptor in human brain tumors. *Cancer Res.* 44 (1984) 753-760
106. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin. Pathol.* 55 (2002) 467-471
107. Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res.* 57 (1997) 5254-5257
108. Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 23 (1999) 8024-8032
109. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J Biol. Chem.* 273 (1998) 13375-13378
110. MacGeoch C, Barnes DM, Newton JA, Mohammed S, Hodgson SV, Ng M, Bishop DT, Spurr NK. p53 protein detected by immunohistochemical staining is not always mutant. *Dis. Markers* 11 (1993) 239-250
111. Malden LT, Novak U, Kaye AH, Burgess AW. Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal-growth-factor-receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 48 (1988) 2711-2714
112. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In Situ visualization of intratumor growth factor signalling: Immunohistochemical localisation of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1411-1423
113. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80 (1995) 179-185
114. McDermott MW, Sneed PK, Gutin PH. Interstitial brachytherapy for malignant brain tumors. *Semin. Surg. Oncol.* 14 (1998) 79-87

115. Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J Biol. Chem.* 272 (1997) 30491-30497
116. Milne DM, Campbell DG, Caudwell FB, Meek DW. Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J Biol. Chem.* 269 (1994) 9253-9260
117. Milne DM, Campbell LE, Campbell DG, Meek DW. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun Kinase, JNK1. *J Biol. Chem.* 270 (1995) 5511-5518
118. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211 (1994) 90-98
119. Noll S, Schaub-Kuhnen S. „Praxis der Immunhistochemie“ herausgegeben von Höfler H, Müller KM; Urban & Fischer Verlag, München, Jena 1. Auflage 2000
120. Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol.* 173 (1994) 371-379
121. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 1445-1453
122. Partovian C, Simons M. Regulation of protein kinase B/ Akt and Ser⁴⁷³ phosphorylation by protein kinase C α in endothelial cells. *Cellular Signalling* 16 (2004) 951-957
123. Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol. Chem.* 276 (2001) 27462-27469
124. Plautz GE, Miller DW, Barnett GH, Stevens GH, Maffett S, Kim J, Cohen PA, Shu S. T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 2209-2218
125. Prayson RA. Myxopapillary ependymomas: a clinicopathologic study of 14 cases including MIB-1 and p53 immunoreactivity. *Mod. Pathol.* 10 (1997) 304-310
126. Pumiglia KM, Decker SJ. Cell cycle arrest mediated by MEK / mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 448-452
127. Radner H, Blumcke I, Reifenberger G, Wiestler OD. The new classification of tumors of the nervous system 2000. *Pathology and genetics. Pathologie* 23 (2002) 260-283
128. Rasheed ABK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res.* 57 (1997) 4187-4190
129. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 409 (1986) 127-147

130. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8 (1987) 138-140
131. Ritter AM, Hess KR, McLendon RE, Langford LA. Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. *J Neurooncol.* 40 (1998) 51-57
132. Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, Stanley P, Li H, Albright AL, McGuire-Cullen P, Finlay JL, Stevens KR Jr, Milstein JM, Packer RJ, Wisoff J. Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children's Cancer Group. *J Neurosurg.* 88 (1998) 695-703
133. Rodrigus P. Motexafin gadolinium: a possible new radiosensitiser. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 12 (2003) 1205-1210
134. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286 (1999) 1738-1741
135. Rose DS, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin. Pathol.* 47 (1994) 1010-1014
136. Rosenblum ML. General surgical principle, alternatives, and limitations. In: Rosenblum ML (ed.) *Neurosurgery of Surgery in North America – The Role of Surgery In Brain Tumor Management.* Saunders, Philadelphia (1990) 19-36
137. Rosenfeld MR, Meneses P, Drobnjak M, Cordon-Cardo C, Kaplitt MG. Gene transfer of wild-type p53 results in restoration of tumor-suppressorfunction in a medulloblastoma cell line. *Neurology* 45 (1995) 1533-1539
138. Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edition 1989
139. Schiffer D, Chio A, Cravioto H, Giordana MT, Migheli A, Palma B, Soffietti R, Vigliani MC. Ependymoma: internal correlation among pathological signs: the anaplastic variant. *Neurosurgery* 29 (1991) 106-210
140. Schiffer D, Giordana MT. Prognosis of ependymoma. *Childs Nerv Syst.* 14 (1998) 357-361
141. Schlegel J, Piontek G, Budde B, Neff F, Kraus A. The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 158 (2000) 103-108
142. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Strike TA, Pistenmaa DA. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. *J Neurosurg.* 71 (1989) 1-9
143. Sharma RR, Singh DP, Pathak A, Khandelwal N, Seghal CM, Kapoor R, Goshal S, Patel FD, Sharma SC. Local control of high-grade gliomas with limited volume irradiation versus whole brain irradiation. *Neurology india* 51(2003) 512-517

144. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 355 (1992) 846-847
145. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/ Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95 (1998) 29-39
146. Steck PA, Perouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Maumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15 (1997) 356-362
147. Stragliotto G, Vega F, Stasiecki P, Gropp P, Poisson M, Delattre JY. Multiple infusions of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (EMD 55,900) in patients with recurrent malignant gliomas. *Eur. J Cancer* 32A (1996) 636-640
148. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolaevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7 (2006) 392-401
149. Stupp R, Warren PM, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Kudwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross G, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 352 (2005) 987-996
150. Suzuki S, Oka H, Kawano N, Tanaka S, Utsuki S, Fujii K. Prognostic value of Ki-67 (MIB-1) and p53 in ependymomas. *Brain Tumor Pathol.* 18 (2001) 151-154
151. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 57 (1998) 684-689
152. Toker A, Cantley LC. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387 (1997) 673-676
153. Tortosa A, Ino Y, Odell N, Swilley S, Sasaki H, Louis DN, Henson JW. Molecular genetics of radiographically defined *de novo* glioblastoma multiforme. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26 (2000) 544-552
154. Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem. J* 288 (1992) 351-355
155. Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. EGF triggers neuronal differentiation in PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Biol.* 4 (1994) 694-701

156. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (1990) 203-212
157. Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavanee WK. Release of inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat. Genet.* 8 (1994) 171-176
158. Vara JAF, Casado E, deCastro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón. PI3K/ Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* 30 (2004) 193-204
159. Vasquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 5010-5080
160. Versteegen MJ, Leenstra DT, Ijst-keizers H, Bosch DA. Proliferation- and apoptosis-related proteins in intracranial ependymomas: an immunohistochemical analysis. *J Neurooncol.* 56 (2002) 21-28
161. Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol. Methods* 151 (1992) 237-244
162. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 49 (1978) 333-343
163. Waksal HW. Role of anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 18 (1999) 427-436
164. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 57 (1997) 4183-4186
165. Westphal M, Hamel W, Zirkel D, Herrmann HD, Bilzer T, Reifenberger G, Schober R, Wechsler W, Albert FK, Behnke J. Epidermal growth factor receptor expression in human malignant glioma: in vitro and in vivo effects of application of monoclonal antibodies to the epidermal growth factor receptor. *Recent Results Cancer Res.* 135 (1994) 171-184
166. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen, Ram Z.A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol*, 5 (2003) 79-88
167. Wick W, Furnari FB, Naumann U, Cavanee WK, Weller M. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene* 18 (1999) 3936-3943
168. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 6899-6903
169. Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase / Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 15587-15591

170. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38-MAP kinases on apoptosis. *Science* 270 (1995) 1326-133
171. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 (6456) (1993) 701-704
172. Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signalling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 114 (2001) 2375-2382
173. Yang W, Wu G, Barth RF, Swindall MR, Bandyopadhyaya AK, Tjarks W, Tordoff K, Moeschberger M, Sferra TJ, Binns PJ, Riley KJ, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Wikstrand CJ. Molecular targeting and treatment of composite EGFR and EGFRvIII-Positive gliomas using boronated monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 883-891
174. Yujiri T, Sather S, Fanger GR, Johnson GL. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282 (1998) 1911-1914
175. Zeng YX, el-Deiry WS. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12 (1996) 1557-1564
176. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3667-77
177. Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, Laurent-Puig P, Mokhtari K, Longy M, Sanson M, Delattre JY, Thomas G, Hamelin R. Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int. J. Cancer* 84 (1999) 150-154
178. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M-H, Hung M-C. Cytoplasmic localisation of p21^{Cip1/Waf1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 245-252
179. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein kinase B). *Science* 286 (1999) 1741-1744
180. Zupanska A, Adach A, Dziembowska M, Kaminska B. Alternative pathway of the transcriptional induction of p21WAF1/Cip1 by cyclosporine A in p53-deficient human glioblastoma cells. *Cell Signal.* 19 (2007) 1268-1278
181. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGFR receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *TIPS* 20 (1999) 408-412