Aus dem Institut für Neuropathologie
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Georg-August Universität zu Göttingen

Immunhistologische Charakterisierung maligner Veränderungen beim Glioblastoma multiforme

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Susan M. Lee
aus
Wolfenbüttel

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Promotor-Vertreterin:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön
I. Berichterstatter:	PD Dr. med. W. Schulz-Schaeffer
II. Berichterstatter:	PD Dr. med. F. Stockhammer
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. C. Kramm
Tag der mündlichen Prüfung:	Mittwoch, den 10.12.2014

Abstract

This study presents the results of paraffin sections from human brain tumors that have been coloured by means of immunohistological staining. Different kinds of glial tumors were investigated: Astrocyte WHO °II, astrocyte WHO °III, astrocyte WHO °IV – also called glioblastoma multiforme (GBM) – and oligodendroglioma WHO °II. Immunohistological markers used for this study were: vimentin, as a marker for undiffereniated cells; GFAP, as a marker for more differentiated cells; p53 as a major gene for tumor suppression; nestin as a marker for so-called progenitor cells; and finally p75, as a stem cell marker;
Three questions were proposed:

1. How does the antigene expression of GBM cells differ from other tumor cells of glial genesis with minor malignancy?
2. Is there a change of antigene expression within GBM cells over time?
3. Is there a change of antigene expression of GBM cells depending on treatment strategies (in this case: tumor debulking and adjuvant radiochemotherapy (RCT) versus tumor debulking without radiochemotherapy)?

A significant rise of vimentin-, nestin- and p75-expression could be shown for GBM cells opposed to other glial tumor cells. GFAP–expression only rose from astrocyte WHO °III compared to GBM cells. Cell staining for p53 was scattered in all types of tumors.
Evaluation of GBM biopsies over time proved no significant changes. The same can be stated for the application of different treatment strategies. However, certain shifts could be observed. Patients that had received tumor debulking and radiochemotherapy showed a decrease in GFAP-, p53- and nestin-expression, but higher vimentin- and p75-expression. Whereas cells from patients treated only by surgical tumor debulking had a decline in vimentin- and p75-expression.
In summary it can be stated that there is a proportional increase concerning tumor malignancy and the expression of vimentin, nestin and p75. Observing GBM biopsies over time, treatment with radiochemotherapy seemed to function as a kind of selection process and foster stem cells. The number of undifferentiated cells rose whereas the number of more differentiated cells decreased under this kind of therapy.
The results are put into perspective mentioning and discussing latest research in this field of investigation like stem cell theories and possible GBM genesis.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Glioblastoma multiforme	6
1.2	Forschung an neuen Behandlungsmethoden	8
1.3	Entstehungstheorien zum Glioblastoma multiforme	9
1.4	Die wandernde Krebszelle	11
1.5	Ein wandlungsfähiger Tumor	12
1.6	Fragestellung	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.2	Methoden	17
2.3	Zu den einzelnen Markern und Färbevorgängen	21
2.4	Vorgehen bei der Auswertung	27
3.	Statistik und Ergebnisse	28
3.1	Statistik	28
3.2	Ergebnisse	47
3.2.1	Antigen-Expression beim GBM im Gegensatz zu glialen Tumoren niedrigerer Malignität	47
3.2.2	Antigen-Expression bei Ausgangstumor und Rezidiv des GBMs	48
3.2.3	Antigen-Expressionunterschiede je nach Therapieregime	48
4.	Diskussion	50
4.1	Wie passen die Ergebnisse zum derzeitigen Stand der Forschung?	50
4.1.1	Vimetin	50
4.1.2	GFAP	51
4.1.3	p53	51
4.1.4	Nestin	52
4.1.5	p75	54
4.2	Datenlage und Einschränkungen	55

5. Zusammenfassung 57

6. Literaturverzeichnis 58

7. Anhang 65
7.1 Abbildungen einiger ausgewählter Schnitte 65
7.2 Arbeitsprotokolle und verwendete Chemikalien 76
7.3 Rohdaten 80

Tabellen-, Abbildungs- und Boxplot-Verzeichnis

Tabelle 1: Astrozytom WHO-Grad II 14
Tabelle 2: Astrozytom WHO-Grad III 15
Tabelle 3: GBM 15
Tabelle 4: Oligodendrogliom WHO-Grad II 16
Tabelle 5: Überlebensrate GBM 49

Abbildung 1.1 Zwei-Schritt-Indirekte-Methode 18
Abbildung 1.2 Streptavidin-Biotin-Methode 19

Boxplots: Gliale Tumoren - Vimentin 30
Boxplots: Gliale Tumoren - GFAP 31
Boxplots: Gliale Tumoren - p53 32
Boxplots: Gliale Tumoren - Nestin 33
Boxplots: Gliale Tumoren - p75 34

Boxplots: GBM – Vimentin 36
Boxplots: GBM – GFAP 37
Boxplots: GBM – p53 38
Boxplots: GBM – Nestin 39
Boxplots: GBM – p75 40

Boxplots: Vimetin bei verschiedenen Therapieregimen 42
Boxplots: GFAP bei verschiedenen Therapieregimen 43
Boxplots: p53 bei verschiedenen Therapieregimen 44
Boxplots: Nestin bei verschiedenen Therapieregimen 45
Boxplots: p75 bei verschiedenen Therapieregimen 46

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol (= Entwicklungslösung)
AK	Antikörper
BEV	Bevacizumab (=AK gegen VEGF)
CCT	kranielle Computertomographie
CRAd	Conditionally Replicative Adenovirus
CSC	Cancer Stem Cell / Tumorstammzelle
DNA	Desoxyribonucleic Acid
FCS	fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein / saures Gliafaserprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IHC / IHCF	Immunhistochemie / immunhistochemische Färbung
IZ	Infiltrationszone
MRT	Magnetresonanztomographie
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGF	Nerve Growth Factor / Neurotrophinrezeptor
NGS	Normal Goat Serum
OP	Operation
RB	Retinoblastom Protein (=Tumorsuppressor)
RCT	Radiochemotherapie
TBS	trisgepufferte Salzlösung
TBST	trisgepufferte Salzsäure mit Zusatz des Proteins „Tween“
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TNF	Tumornekrosefaktor
ÜLR	Überlebensrate
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

Die fibrilläre Glia, das Stützgewebe des Gehirns, sind die Zellen, von der die häufigsten Tumoren des ZNS ausgehen. Laut Klassifikation der ZNS-Tumoren der WHO (Louis et al. 2007) werden gliale Tumoren nach bestimmten Gesichtspunkten eingeteilt. Astrozytome des höchsten Malignitätsgrades (WHO-Grad IV) sind Glioblastome. Im Verlauf einer Tumorerkrankung ist eine Malignisierung von Astrozytom WHO-Grad II und III zu erwarten.
Das Oligodendrogliom als weiterer Vertreter eines Tumors glialen Ursprungs wurde in dieser Arbeit als Kontrollgruppe zu den Astrozytomen mituntersucht. Der Schwerpunkt liegt jedoch auf den Astrozytomen WHO-Grad II, III und insbesondere IV.
Innerhalb der intrakraniellen Tumoren tritt das Glioblastom mit einer Inzidenz von 12-15% am häufigsten auf (Louis et al. 2007). Diese hirneigenen Tumoren werden nach ihrem biologischen Verhalten bzw. ihrer Malignität in vier Schweregrade eingeteilt.
Das Astrozytom WHO-Grad I stellt dabei eine Sonderform dar. Es handelt sich um eine benigne Tumorform, die klassischerweise Kinder und Jugendliche betrifft und meist getrennt von den anderen Astrozytomen zu bewerten ist, daher in dieser Studie auch nicht untersucht wurde.
Das Astrozytom WHO-Grad II tritt meistens zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf und kann rezidivieren. Das Astrozytom WHO-Grad III (anaplastisches Astrozytom) gehört bereits zu den histologisch malignen Tumoren. Der Erkrankungsgipfel liegt hier überwiegend in der fünften Lebensdekade. Das GBM ist der häufigste maligne hirneigene Tumor beim Erwachsenen. Das typische Manifestationsalter liegt durchschnittlich zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis: 1,28:1). Der Tumor ist zu 70% fronto-temporal lokalisiert (Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours 2002). Häufig befallen die Tumorzellen auch die kontralaterale Hemisphäre durch infiltratives Wachstum. Dabei orientieren sie sich an Leitstrukturen wie Neuronenbahnen (u.a. Corpus callosum, Capsula interna, Fornix) und auch Gefäßen (perivaskuläre Infiltration) (Panagiotakos & Tabar 2007).
Man unterscheidet das primäre Glioblastom (>90%) vom sekundären Glioblastom (<10%). Das primäre Glioblastom wächst rasch und de novo. Es entsteht häufig bei älteren Menschen. Das sekundäre Glioblastom hingegen entwickelt sich aus einem niedriggradigeren

Astrozytom. Es wächst langsam(er), tritt eher bei jüngeren Patienten auf, die überwiegend eine längere Überlebensdauer aufweisen. In über 70% der sekundären Glioblastome kann eine Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) festgestellt werden (Nobusawa et al. 2009), die maßgebend für die verlängerte Überlebenszeit sein soll.

Klinische Symptome des GBMs, wie z.B. epileptische Anfälle, Kopfschmerzen, aber auch Persönlichkeitsveränderungen, treten innerhalb von Wochen bis Monaten auf. In diesem Zeitraum ist das Tumorausmaß meist schon deutlich fortgeschritten (Elek et al. 1999).

Für die Bildgebung werden CCT und MRT verwendet. Das GBM erscheint unregelmäßig geformt und zeigt oft eine starke randständige Kontrastmittelaufnahme, die mitunter girlandenförmig imponiert. Es findet sich meist ein ausgeprägtes peritumoröses Ödem. Darüber hinaus sieht man typischerweise Kontrastmittelanreicherung in soliden Tumoranteilen, die sich von zystisch-hämorrhagischen und/oder nekrotischen Anteilen abheben (Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours 2002).

Zur Diagnosesicherung wird eine Biopsie vorgenommen. Mikroskopisch zeigt ein GBM per definitionem folgende Veränderungen: (1) pleomorphe Tumorzellen mit zahlreichen Kern-anomalien, (2) eine gesteigerte Mitoserate, (3) mikrovaskuläre Proliferation und (4) Nekrosen. Oft erkennt man um die kleinen Nekroseareale eine pseudopallisadenartige Stellung der Zellkerne (Freije et al. 2004).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt die mittlere Überlebensdauer meist nur zwischen 6 und 24 Monate, je nach Therapieansatz und Patientengruppen (Denysenko et al. 2010).

Die bisher übliche Behandlung umfasst ein bis mehrere operative Eingriffe zur Verkleinerung des Primärtumors und der innerhalb von wenigen Wochen nachwachsenden Rezidive (Tumordebulking) sowie Durchführung einer adjuvanten Radiochemotherapie (RCT). Rock et al. (2012) sammelten Daten von 273 Patienten mit GBM zwischen 1999 und 2008. Nach Tumordebulking, Radiatio und adjuvanter Chemotherapie lag die mittlere ÜLR bei 13,4 Monaten. Patienten, die operativ und lediglich mit Radiatio behandelt wurden, hatten eine kürzere ÜLR von durchschnittlich 8,8 Monaten.

Eine signifikante Verbesserung der infausten Prognose durch intensivierte Erforschung von Grundlagen und Therapiemöglichkeiten ist derzeit Gegenstand der Forschung.

1.2 Forschung an neuen Behandlungsmethoden

Oliver & Wechsler-Reya (2004) heben vor allem das Problem der erhöhten Wachstumsrate des Glioblastoms hervor, sowie dessen frühe Ausbreitungstendenz: „…rapid growth and tendency to spread throughout the brain…“ (Oliver&Welcher-Reya 2004, S. 885).

Projekte der Abteilung für Neurochirurgie im Universitätsklinikum Göttingen beschäftigten sich mit der Implantation von Chemotherapeutika direkt in die Tumorresektionshöhle (Giese et al. 2004). Dies solle einem Rezidiv entgegenwirken, das sich oft im Bereich des vorangegangenen Operationsfeldes ausbilde (…“recurrent tumors will arise at the resection margin or within 2-3cm of the resection cavity in greater than 95% of patients“ (Giese et al. 2004, S. 358). Das Einbringen von Chemotherapeutika direkt ins Hirngewebe weise, so Giese et al., viele Vorteile auf. So stelle die Blut-Hirn-Schranke kein Überwindungshindernis mehr dar und die Medikation könne direkt vor Ort wirken. Dadurch könne die Konzentration des Wirkstoffes reduziert werden. Dies schone peripher gelegene Zellen und entlaste das System im Ganzen bei gleichzeitig stärkerer Wirkung an den Tumorzellen. Leider seien jedoch auch vermehrt Hirnödeme, Wundheilungsstörungen sowie epileptische Anfälle und zeitweise neurologische Ausfälle beobachtet worden.

Maier-Hauff et al. (2011) führten eine Studie durch, bei der Patienten vor Bestrahlung intrakraniell eisenoxid-haltige Nanopartikel verabreicht wurden. Diese Partikel drangen in Tumorzellen ein und erzeugten dort, mit Hilfe eines Magnetfelds und in Kombination mit der konventionellen Bestrahlung, Hitze. Dies führte zu einer Dezimierung der Gliomzellen.

Tumoren, insbesondere das GBM, zeigen anormale Gefäßneubildung mit hoher Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor). Prados et al. (2011) berichten von der Anwendung von Bevacizumab (BEV) bei Patienten mit GBM-Rezidiv. BEV ist ein Antikörper, der an VEGF bindet und ihn in seiner Aktivität herabsetzt. Seine Anwendung wird bereits u.a. bei der Bekämpfung des Mammakarzinoms genutzt. Das Forscherteam untersuchte zwei Patientengruppen (Behandlung mit BEV und Chemotherapie versus Chemotherapie ohne BEV) und stellte ein signifikant längeres symptomfreies Intervall für Patienten mit BEV- Behandlung fest.

Die Therapie von Glioblastomrezidiven mit einer Kombination aus RCT und dem Antimalaria-Medikament Chloroquin ist Inhalt einer weiteren Studie der Neurochirurgie Göttingen (Kim et al. 2010). Kim et al. vermuten, dass das Chloroquin aufgrund von Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 in den Tumorzellen die Apoptoserate steigere. Die

Zellen seien dadurch sowohl strahlensensibler als auch empfindlicher gegenüber Chemotherapeutika.

Die Behandlung von Glioblastomen mit sogenannter *Virotherapie* fassen Dey et al. (2011) in einer Metaanalyse experimenteller Forschungsergebnisse zusammen. Sie berichten von *CRAd = Conditionally Replicative Adenoviruses*, die an Mäusen getestet wurden. Hierbei handelt es sich um gentechnisch veränderte Adenoviren, die intraoperativ direkt in das erkrankte Hirngewebe eingebracht werden. Die Viren griffen dann spezifisch Tumorzellen an, vermehrten sich in ihnen, und führten letztendlich zu einer Lyse der befallenen Zellen. Es wurden auch Studien zur speziellen Bekämpfung von Tumorstammzellen/Cancer Stem Cells (CSCs) durch manipulierte Adenoviren durchgeführt. Problematisch bei der Erschaffung eines viralen Vektors sei vor allem, die Spezifität für CSC zu gewährleisten. Bisher gestalte sich die Differenzierung zwischen normaler neuronaler Stammzelle/ Normal Stem Cell und Tumorstammzelle weiterhin als sehr schwierig.

1.3 Entstehungstheorien zum Glioblastoma multiforme

Viele Forscherteams arbeiten an Entstehungstheorien des GBMs.

Großes Augenmerk wird dabei in letzter Zeit auf die Tumorstammzellen (CSC) gelegt, die einen zentralen Punkt im Rahmen neuer Thesen zur Krebsentstehung bilden. Stammzellen kommen an verschiedenen Stellen im adulten Körper vor, u.a. auch im Gehirn, speziell im Gyrus dentatus des Hippokampus und der subventrikulären Zone (Fomchenko & Holland 2006, Bernabeu & Longo 2010). Sie haben das Potential zur Selbsterneuerung und gleichzeitig zur Differenzierung. Teilt sich eine Stammzelle, so tut sie das asymmetrisch. Statt zweier gleicher Zellen entsteht eine neue Stammzelle und eine Zelle, die sich weiter differenzieren kann (Dell'Albani 2008). Zudem verfügen Stammzellen über Mobilität und haben die Fähigkeit, sich in Geweben zu bewegen. Mittlerweile weiß man, dass Tumoren nicht nur aus einer Sorte Zellen bestehen, sondern sich aus einem heterogenen Pool vieler unterschiedlicher Zellen zusammensetzen (Kang et al. 2006, Visvader 2011), etwa Zellen für die Gefäßversorgung, Stromazellen, Stammzellen oder nekrotische Zellen (Rich 2007). Ein Großteil der Tumorzellen teilt sich unkontrolliert und schnell: „… bulk of tumor mass…" (Kappadakunnel et al. 2010, S. 359). Diese Zellen sind unbeweglich/ortsständig und werden

durch die üblichen Therapiemaßnahmen (OP, Bestrahlung, Chemotherapie) überwiegend zerstört. Eine andere Gruppe von Tumorzellen sind Tumorstammzellen (CSC). Ihre Teilungsrate ist im Vergleich zu anderen Zellen gering. Zudem verfügen sie, im Gegensatz zu anderen Zellen, über höchst effektive DNA-Reparatur-Mechanismen und sind so auch in der Lage, Bestrahlung und Chemotherapeutika zu überleben (Bao et al. 2006, Denysenko et al. 2010). Es scheint sogar, dass die Anzahl der CSCs durch Bestrahlung und Chemotherapie ansteigt bzw. die Tumorstammzellen angeregt werden. „…chemo- and radio-therapies used in the treatment of GBMs may prime brain tumor stem cells to enhance their stem cell-like characteristics“ (Charles & Holland 2009, S. 1448). Die Folge dieser Resistenzmechanismen sind die für das Glioblastom typischen und rasch auftretenden Rezidive (Lamszus & Günther 2010).

Erklärungsversuche, wie es in erster Linie überhaupt zur Entstehung solcher CSCs kommen kann, stammen u. a. von Bjerkvig et al. (2005). Die Autoren stellen in ihrem Artikel drei Thesen zu möglichen Ursprüngen von Tumorstammzellen auf.

Eine Annahme geht davon aus, dass Tumorstammzellen sowohl aus normalen Stammzellen, aus Vorläuferzellen/Progenitor Cells als auch aus differenzierten Zellen durch eine Reihe von Mutationen hervorgehen könnten. Laut den Autoren stünden diese Entwicklungen jeweils sehr eng mit der unmittelbaren Umgebung (*microenvironment*) in Zusammenhang. So könnten beispielsweise Gewebsverletzungen, Krankheitserreger, Entzündungen und Sauerstoffmangel die Zellkommunikation und Signalkaskaden verändern und auf diese Weise Mutationen begünstigen.

Ein weiterer Ansatz der Forscher geht von Zellverschmelzungsprozessen aus. Es wäre denkbar, so Bjerkvig et al. (2005), dass zwei Tumorzellen miteinander oder eine Tumorzelle mit einer normal differenzierten Zelle fusionierten und dabei eine Tumorstammzelle entstehe. Ebenso könnten normale Stammzellen mit normal differenzierten Zellen verschmelzen und so zu einer Tumorstammzelle mutieren.

Ein drittes Erklärungsmodell der norwegischen Forschungsgruppe beschreibt die Möglichkeit einer Transdifferenzierung einer Zelle. Dabei mutiere eine normal differenzierte Zelle und gehe dann in Apoptose. Es komme zur DNA-Fragmentation und Phagozytose dieser DNA-Partikel durch andere Zellen. Laut den Autoren könnte nun in den aufnehmenden Zellen (die wiederum normale oder auch Tumorzellen sein könnten) eine Reprogrammierung des Erbguts stattfinden und so eine CSC entstehen.

Yan et al. (2009) berichten, dass eine Mutation der IDH1 (= Isocitrat-Dehydrogenase 1) stets anderen Mutationen vorausgehe, die letztendlich in der Entstehung eines Astrozytoms WHO-

Grad II und III, eines sekundären Glioblastoms oder eines Oligodendroglioms endeten. Die Autoren erwähnen den *Warburg Effekt*, der besagt, dass Krebszellen, im Gegensatz zu normalen Zellen, ihre Energie hauptsächlich aus dem Zytosol durch den Vorgang der Glycolyse und der Milchsäuregärung beziehen. Die IDH1 ist ein zytosolisches Enzym des Citratzyklus, bei dem Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat oxidiert wird. Dabei entsteht NADPH, ein Protonendonator, aus dem in der Atmungskette, im Mitochondrium, Energie in Form von ATP (= Adenosintriphosphat) hergestellt werden kann. Ebenso kann mit NADPH auch Glutathion synthetisiert werden, das eines der wichtigsten Antioxidantien im menschlichen Körper darstellt und Zellen vor oxidativem Stress, wie etwa freien Radikalen, schützt. Der Shift im Metabolismus einer Zelle, wie etwa durch eine Mutation der IDH1 hervorgerufen, sei eine wichtige Grundlage zur Entstehung von Krebs laut Yan et al. (2009).

1.4 Die wandernde Krebszelle

Die kanadischen Forscherteams Johnston et al. (2007) und Wang L et al. (2008) untersuchten das Phänomen der migrierenden Zellen. Sie experimentierten unter anderem mit dem Neurotrophinrezeptor p75 und GBM.

p75 ist ein transmembranes Glykoprotein und Mitglied der TNF-Superfamilie. Durch verschiedene biochemische Prozesse, so Johnston et al. (2007), befähige p75 Tumorzellen zur Möglichkeit der Migration und Invasion. Des Weiteren wiesen die Forscher darauf hin, dass vermutlich auch das extrem heterogene Zellbild eines Glioblastoms mit Nekrosen und Hypoxie Tumorzellen zum Ortswechsel veranlasse. Durch oxidativen Stress getriggert, entfernten sich dabei Zellen aus Gebieten mit starker Fluktuation an Nähr- und Sauerstoff.

Diese Beobachtung teilen Heddleston et al. (2010). Sie beschrieben den Zusammenhang von Hypoxie in Geweben und der Anregung von Tumorstammzellen. Die CSCs seien insbesondere in perivaskulären Nischen als auch in Randzonen von nekrotischen Gewebsanteilen lokalisiert. Innerhalb eines Tumors herrsche sowohl ein chaotischer Wechsel von Tumorzellneubildung, überschießender und insuffizienter Gefäßneubildung als auch von Zelluntergängen. In diesen Regionen schwanke die Blutflussgeschwindigkeit und die Sauerstoffversorgung stark. In umliegenden Zellen (sowohl in normalen als auch in Tumorzellen) würden Transkriptionsfaktoren aktiv, die das Sauerstoffniveau überwachten,

sogenannte *HIFs (= Hypoxia Inducible Factors)*. Sinke die Sauerstoffkonzentration einer Zelle ab, würden in nachfolgenden Kaskaden gefäßneubildende und glykolysefördernde Prozesse aktiviert. Die Forscher beobachteten höhere Konzentration von HIFs in Tumorzellen. Sie vermuten, dass sowohl die Dauer als auch die Intervalle der Sauerstoffminderversorgung ausschlaggebend sein könnten für eine zunächst metabolisch angeführte Umwandlung einer normalen Zelle in Richtung einer entarteten Zelle.

1.5 Ein wandlungsfähiger Tumor

Die Studie von Wang J et al. (2009) beobachtete die Entwicklung von Glioblastomen in Laborratten. Dazu wurden die Tiere mit Zellen aus menschlichen GBM infiziert. Die Ratten erhielten in regelmäßigen Abständen eine MRT. Es zeigte sich, besonders zu Beginn (innerhalb von 30 Tagen nach Implantation von Tumormaterial), sowohl eine massive Streuung der malignen Zellen in benachbarte Lobi als auch zur kontralateralen Hemisphäre hin. Zu einem späteren Zeitpunkt, mit dem Einsetzen klinischer Symptome, wuchsen die Tumorzellen deutlich weniger invasiv. Nach dem Versterben der Ratten wurde Tumorgewebe entnommen, aufbereitet und einer neuen Rattengeneration implantiert. Das Forscherteam stellte fest, dass diese *high generation tumors* zu deutlich weniger Migration neigten, dafür die Tumorzellen jedoch an Dichte, an Kernanomalien (steigender Grad an Pleomorphie) und an der Fähigkeit zur Gefäßneubildung (Angiogenesis) zunahmen.
Molina et al. (2010) verpflanzten GBM-Zellen in Mäuse. Das Forscherteam gewann dabei zunächst Tumorzellen, die sie zum einen aus dem Zentrum einer entstandenen Tumormasse entnahmen (*core cells*) und zum anderen aus dem tumorumliegenden Gewebe (*invasive cells*). Diese Zellen wurden nun getrennt in weitere Mäuse reimplantiert. Tiere, denen die *invasive cells* injiziert wurden, zeigten deutlich aggressiveres Tumorwachstum als Mäuse, denen *core cells* eingepflanzt wurden.
Das TCGA Research Network (= The Cancer Genome Atlas, 2008) ist ein amerikanisches Pilotprojekt, das bemüht ist, Datenbanken zu erstellen, um molekulare Charakteristika von Krebserkrankungen besser analysieren zu können. Auswertungen zum GBM ergaben z.B., dass wenn bei Patienten eine Hypermethylierung am Promotor der MGMT (Methylguanin-DNA-Methyltransferase) vorlag, sie einen Vorteil bei der Behandlung mit alkylierenden

Chemotherapeutika, wie z.B. Temozolomid, hatten. (Die MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, welches Methylisierungen wieder rückgängig macht (Weller 2008). Der Promotor ist eine Trinukleotid-Sequenz auf der DNA, die die Expression eines Gens reguliert.) Was sein genetisches Erscheinungsbild betrifft, sei das Glioblastom äußerst heterogen. Neben einigen gemeinsamen pathologischen Veränderungen (*core pathways*) wie Mutationen an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und Tumorsuppressoren wie p53/RB, gebe es viele Hintergrundmutationen, die sowohl in ihrer Lokalisation (auf verschiedenen Genen), als auch in ihrer Art/Mechanismus von Tumor zu Tumor variierten (TCGA Research Network 2008).
Inhalt dieser Studie ist es, das GBM, anhand von humanen Biopsien immunhistochemisch zu untersuchen. Dabei wird vor allem der Wandel des Tumors mit zunehmendem Malignisierungsgrad sowie die Auswirkung verschiedener Therapieregime auf die Zellen beobachtet.

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen experimentell untersucht werden:

1. Wie unterscheidet sich immunhistochemisch ein GBM von glialen Tumoren niedrigerer Malignität (Astrozytom WHO-Grad II und III, Oligodendrogliom WHO-Grad II)?

2. Wie unterscheidet sich die Antigen-Expression im Ausgangstumor von der im Rezidiv beim GBM?

3. Wie verändert sich die Antigen-Expression beim GBM im Verlauf innerhalb eines bestimmten Therapieregimes (OP und adjuvante RCT versus OP ohne RCT)?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Diese Arbeit stützt sich auf eine Auswertung von Biopsien, die im Rahmen der Routinediagnostik der Neuropathologie Göttingen erstellt wurden. Es wurden immunhistochemische Marker verwandt, die zur Diagnosestellung routinemäßig herangezogen werden.
Dazu wurden zunächst Biopsieblöcke aus dem Archiv gesammelt. Um eine einheitliche Färbequalität sowie vergleichbare Auswertung zu schaffen, wurden von den Gewebeproben neue Schnitte angefertigt und Nachfärbungen mit verschiedenen IHC-Markern (Vimentin, GFAP, p53, Nestin, p75) hergestellt. Insgesamt sind 62 Biopsieproben aus dem Archiv der Neuropathologie Göttingen und eine Probe aus dem Universitätsklinikum Marburg für diese Studie verwendet worden. Das in Paraffin eingelegte Hirngewebe stammt von Patienten mit neuroglialen Tumoren, die entweder aus Astrozyten oder Oligodendrozyten hervorgingen. Folgenden Befunde wurden zusammengestellt: Astrozytom WHO-Grad II, III, IV sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II (als Kontrollgruppe zu den Astrozytomen). Kriterien zur Auswahl der Gewebeproben waren u.a. möglichst viel Material pro Block zu erhalten (also z.B. kein Material stereotaktischer Eingriffe) und Astrozytome WHO-Grad II vom fibrillären Typ (mit geringem Anteil an Gemistozyten) zu verwenden.

Tabelle 1: Astrozytom WHO-Grad II (N=12)

Nummer	Geschlecht	Alter bei OP
1	w	62;2
2	m	29;6
3	w	62;10
4	m	67;11
5	w	71;8
6	m	33;3
7	w	37;1
8	m	29;10
9	w	23;11
10	m	60;4
11	w	68;10
12	w	29;5

Tabelle 2: Astrozytom WHO-Grad III (anaplastisches Astrozytom) (N=11)

Nummer	Geschlecht	Alter bei OP
1	m	51;3
2	w	36;10
3	w	49;7
4	m	32;9
5	w	62;4
6	w	41;2
7	w	41;11
8	w	50;5
9	m	36;12
10	m	16;5
11	m	53;8

Tabelle 3: GBM (gesamt) (N=15)

Nummer	Geschlecht	Alter bei Erst-OP	Anzahl OPs
1	m	47;4	2
2	w	38;6	2
3	m	44;1	2
4	w	57;10	2
5	w	51;6	2
6	m	58;9	3
7	m	52;6	2
8	m	65;12	3
9	w	48;10	2
10	m	51;2	3
11	m	62;7	2
12	w	61;3	2
13	w	30;4	2
14	m	50;11	2
15	w	61;6	2

Die Patienten mit den Nummern eins bis zehn erhielten eine adjuvante RCT (60Gy / Temozolomid). Die Patienten mit den Nummern elf bis fünfzehn wurden rein operativ behandelt.

Tabelle 4: Oligodendrogliom WHO-Grad II (N=6)

Nummer	Geschlecht	Alter bei OP
1	w	55;2
2	m	44;12
3	m	45;9
4	w	38;11
5	w	47;6
6	m	56;6

Mittels Sichtung von handschriftlichen Biopsieverzeichnissen (1996-2000) und mit Hilfe elektronisch dokumentierter Biopsien (2001-2010) wurde zunächst ein Kollektiv von Gewebeblöcken gemäß bestimmter Diagnosen (Astrozytom WHO-Grad II, III, IV und Oligodendrogliom WHO-Grad II) aus dem Biopsiearchiv sichergestellt (Protokoll zur Erstellung von Biopsie im Routinelabor siehe Anhang).

Von den Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom *Leica SM 2000 R* ca. 3um dicke histologische Schnittpräparate gefertigt. Um eine bessere Gewebehaftung auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese vorher silanisiert. Abschließend wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 60° C über Nacht getrocknet.

Von jedem Biopsieblock wurde jeweils ein Schnitt mit HE-Färbung (= Hämatoxylin-Eosin) erstellt (Arbeitsprotokoll siehe Anhang). Hierbei werden Zellkerne blauvoilett und Zytoplasma rot angefärbt. Dies dient zur Orientierung und verschafft einen groben Überblick über einen einzelnen Schnitt (wieviel Tumorgewebe, Infiltrationszone und gesundes Gewebe ist zu sehen). Eine weitere Bearbeitung von Schnitten mit IHC-Färbungen erfolgte nur, wenn das Gewebe keine Quetschartefakte aufwies und der nekrotische Gewebsanteil (insbesondere bei den Gliblastomen) gering war. Außerdem musste bei den Astrozytomen WHO-Grad II ein fibrillärer Typ vorliegen, mit keinem oder geringem Anteil an Gemistozyten. Diese Selektion wurde getroffen, da sich Nekrosen und Gemistozyten bei IHC-Verfahren oft mit anfärben. Es entstünde so ein verfälschter bzw. falsch-positiver Eindruck. Die Analyse der Tumorzellen wäre dadurch beeinflusst.

2.2 Methoden

Bei IHC-Färbungen werden Gewebe mit Antikörpern behandelt. Dabei binden AK an Epitope eines Antigens. Für die Herstellung von AK werden Tieren menschliche Zellen injiziert, auf die das Immunsystem mit Antikörperbildung reagiert. Für Laborarbeiten werden meist IgG-Antikörper verwendet, da sie über eine längere Halbwertszeit verfügen (Handbuch immunchemische Färbemethoden 2003). Primäre AK entstehen wie oben beschrieben. Bei der Produktion von sekundären AK injiziert man beispielsweise einer Ziege entsprechende Antigene von Mäusen oder Kaninchen, sodass letztendlich der sekundäre AK an den primären AK bindet, während der primäre AK an das Epitop des Antigens bindet.
Des Weiteren unterscheidet man zwischen monoklonalen und polyklonalen AK. Monoklonale AK werden nur von einer bestimmten Zelle (= Klon einer Plasmazelle) gebildet. Sie binden wiederum nur an ein bestimmtes Epitop eines Antigens. Polyklonale Antikörper hingegen werden von verschiedenen Plasmazellklonen gebildet und können ihrerseits mit unterschiedlichen Epitopen eines Antigens reagieren. Epitope können aufgrund von Fixierungsprozessen verändert/maskiert sein (Handbuch immunchemische Färbemethoden 2003). Um sie optimal freilegen zu können, wurden die Gewebeschnitte vorab auf verschiedene Weisen vorbehandelt (z.B. mit Protease, Citratpuffer oder TrisEDTA). Darüber hinaus wurden oft sogenannte Blockungen vorgenommen, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Die IHC-Färbungen wurden für die Marker Vimentin, GFAP, p53, Nestin, und p75 erstellt. Bei Vimentin, GFAP, p53 und Nestin wurde nach der *Zwei-Schritt-Indirekte-Methode* (Handbuch immunchemische Färbemethoden 2003) gefärbt. Nach diversen Vorbehandlungen bindet dabei zunächst ein Primärantikörper an das Gewebeantigen. In einem weiteren Schritt wird dann ein enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der an den Primärantikörper bindet. Durch die abschließende Entwicklung der Schnitte mit Neufuchsin-Entwicklungs-chromogen erscheinen markierte Zellen im Mikroskop dann (rosa-)rot. (Siehe Abbildung 1.1)

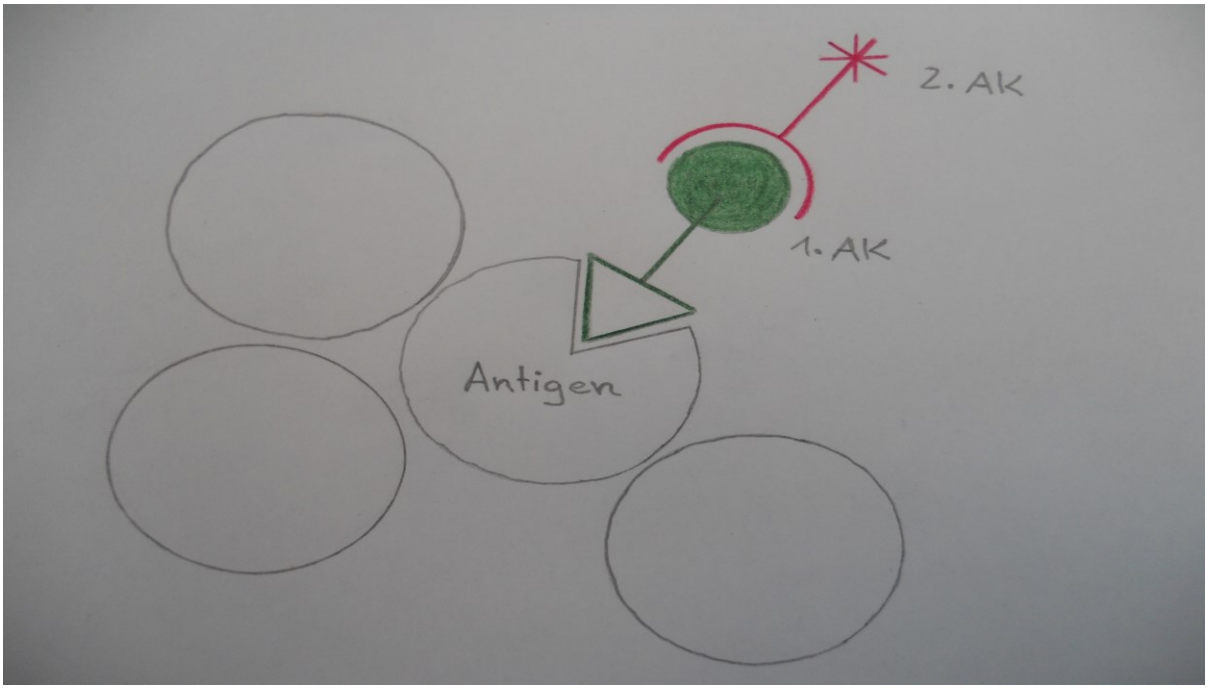


Abbildung 1.1: Zwei-Schritt-Indirekte-Methode (Zeichnung Lee 2013)

Für den Marker p75 bot, nach dem Ausprobieren verschiedener Färbetechniken, die *Streptavidin-Biotin-Methode* (Handbuch immunchemische Färbemethoden 2003) das beste Resultat. Hier bindet ein Primärantikörper an das Gewebeantigen. Ein biotinmarkierter (= biotinylierter) Sekundärantikörper bindet dann an den Primärantikörper. Im letzten Schritt wird schließlich Streptavidin aufgebracht. Streptavidin und Biotin haben eine hohe Affinität zueinander, sodass sich ein Enzymkomplex ausbildet. Dieser ist anfärbbar und wurde mittels Entwicklungschromogen AEC (3-Amino-9-EthylCarbazol) entwickelt. Die markierten Zellen erscheinen dann rot. Diese Methode hat eine hohe Sensitivität und bietet starke Signalamplifikation. Dies ist besonders sinnvoll, um Antigene sichtbar zu machen, die über wenig Epitope verfügen. (Siehe Abbildung 1.2)

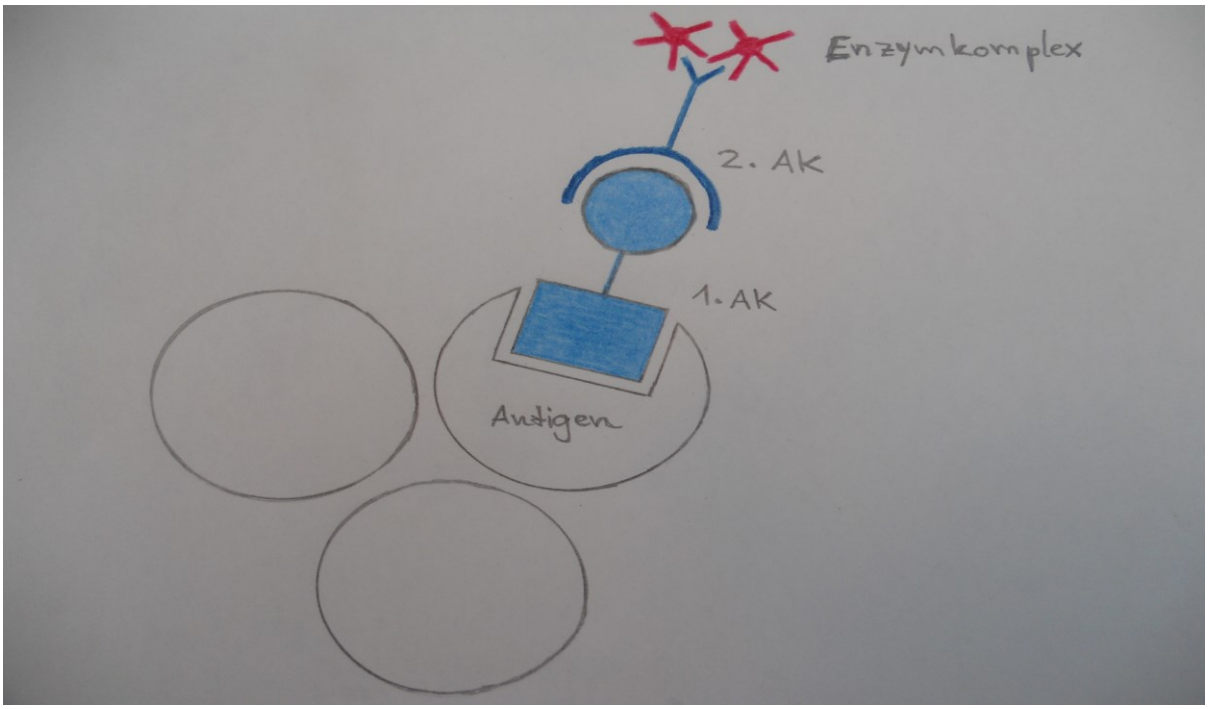


Abbildung 1.2: Streptavidin-Biotin-Methode (Zeichnung Lee 2013)

Die nachfolgend beschriebenen Färbevorgänge sind das Ergebnis der vorgeleisteten Laborarbeit zur Erhebung der hier ausgewerteten Daten. Ziel war, eine optimale Antigendemaskierung (= Epitop-Retrieval) als auch ein klares Signal-Rausch-Verhältnis (deutliche Färbeintensität der zu untersuchenden Zellen bei minimaler Hintergrundfärbung) zu schaffen.
Zur Erstellung der Färbeprotokolle wurden vorab diverse Variablen getestet bzw. verändert. Etwa die (1) Anwendung verschiedener Färbe- und Entwicklungsmethoden pro Marker sowie (2) unterschiedliche Gewebevorbehandlung, eine (3) optimale Verdünnung der Antikörper (sowohl des 1. AK als auch des 2. AK); des Weiteren wurde mit (4) verschiedenen Pufferlösungen, (5) Blockungsschritten, (6) Inkubations- und (7) Entwicklungszeiten experimentiert.
Zu jedem Färbevorgang wurde auch immer zur Qualitätssicherung eine Negativkontrolle erstellt. Dabei handelt es sich um einen Schnitt, der jeweils mit einem sekundären AK behandelt wurde, nicht jedoch mit dem primären AK. Nach Entwicklung der Schnitte im letzten Schritt durften sich auf der Negativkontrolle keine gefärbten Zellen zeigen (Beispielbild siehe Anhang). Zur weiteren Qualitätskontrolle wurden sporadisch Färbungen von Schnitten wiederholt. Um den Handlingsfehler so klein wie möglich zu halten, wurden für einen Färbevorgang höchstens 16 Schnitte bearbeitet. So konnten z.B. variierende Einwirkzeiten bei Vorbehandlungen, Blockungen oder Antikörpern sowie mögliche Austrocknungsartefakte auf einzelnen Schnitten vermieden werden.

2.3 Zu den einzelnen Markern und Färbevorgängen

Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein vom Typ III (= Teil des Zytoskeletts in Wirbeltierzellen). Es kommt in Geweben mesenchymalen Ursprungs, wie etwa Gefäßen, vor und wird zum Nachweis für Weichgewebstumoren genutzt. Zudem gilt Vimentin jedoch auch als ein IHC-Marker undifferenzierter neuronaler Zellen (Rieske et al. 2009).
Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie 3x für jeweils 5 Minuten in Xylol, dann 1x für 1 Minute in Isoxylol (= 100% Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1), dann in absteigender Reihenfolge für jeweils 2 Minuten in Isopropanol gehängt (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) und schließlich für 1x 1 Minute in Aqua bidest. gewässert. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Protease (25mg Protease gelöst in 60ml Aqua bidest.) für 10 Minuten im Wärmeschrank bei 37° C vorbehandelt. Danach erfolgte eine kurze Spülung in 100% Ethanol und Aqua bidest. Nun wurden die Schnitte für 1x 20 Minuten mit Casein geblockt und anschließend für 3x 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Jetzt wurde der 1. AK, der mit der Pufferlösung TBST angesetzt war, auf die Schnitte aufgetragen, dabei wurde der Negativkontrollschnitt ausgespart (hier wurde nur TBST aufgetragen). Bei dem AK handelte es sich um einen monoklonalen AK für Vimentin, der aus Mäusen gewonnen wurde (Firma Dako). Er wurde in einem Verhältnis von 1: 500 verdünnt. Die Schnitte wurden nun für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBST für 3x 5 Minuten. Nun wurde der 2. AK, der wieder mit TBST diesmal im Verhältnis 1:1000 verdünnt wurde, auf alle Schnitte pipettiert. Bei diesem 2. AK handelte es sich um einen Goat/Anti-Mouse-AK. Wieder wurden die Schnitte für 60 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend erfolgte eine letzte Spülung in TBST für 3x 5 Minuten. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte per Neufuchsin-Chromogen-Substrat nach mikroskopischer Kontrolle ca. 15 Minuten entwickelt (Protokoll siehe Anhang), die Zellkerne mit Hämalaun kurz gegengefärbt, gebläut und die Gewebeschnitte per wasserlöslichem Kleber eingedeckelt.
Die Schnitte wurden in Mappen sortiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

GFAP ist ein spezifischer Marker für differenzierte Gliazellen und Astrozyten (Jung et al. 2007). Wie Vimentin gehört es zur Klasse der Intermediärfilamente vom Typ III.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie 3x für jeweils 5 Minuten in Xylol, dann 1x für 1 Minute in Isoxylol (= 100% Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1), dann in absteigender Reihenfolge für jeweils 2 Minuten in Isopropanol gehängt (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) und schließlich für 1x 1Minute in Aqua bidest. gewässert. Hier erfolgte keine Vorbehandlung. Die Schnitte wurden für 1x 15 Minuten mit Casein geblockt und anschließend für 3x 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Jetzt wurde der 1. AK, der mit der Pufferlösung TBS und 1%igem NGS angesetzt war, auf die Schnitte aufgetragen, dabei wurde der Negativkontrollschnitt ausgespart (hier wurde nur TBS mit 1%igem NGS aufgetragen). Bei dem AK handelte es sich um einen monoklonalen AK für GFAP, der aus Mäusen gewonnen wurde (Firma Dako). Er wurde in einem Verhältnis von 1: 500 verdünnt. Die Schnitte wurden nun für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBS für 3x 5 Minuten. Nun wurde der 2. AK, der wieder mit TBS und 1%igem NGS ebenfalls im Verhältnis 1:500, verdünnt wurde, auf alle Schnitte pipettiert. Bei diesem 2. AK handelte es sich um einen Goat/Anti-Mouse-AK. Wieder wurden die Schnitte für 60 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend erfolgte eine letzte Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte per Neufuchsin-Chromogen-Substrat nach mikroskopischer Kontrolle ca. 13 Minuten entwickelt (Protokoll siehe Anhang), die Zellkerne mit Hämalaun kurz gegengefärbt, gebläut und die Gewebeschnitte per wasserlöslichem Kleber eingedeckelt. Die Schnitte wurden in Mappen sortiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

p53 ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zu den Tumorsuppressoren, die die Zelle vor unkontrolliertem Wachstum schützen. In vielen Tumoren läßt sich ein Verlust von p53 nachweisen. In Glioblastomen gehört die Mutation von p53 zu den so genannten *core pathways* (TCGA Research Network 2008).

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie 3x für jeweils 5 Minuten in Xylol, dann 1x für 1 Minute in Isoxylol (= 100% Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1), dann in absteigender Reihenfolge für jeweils 2 Minuten in Isopropanol gehängt (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) und schließlich für 1x 1 Minute in Aqua bidest. gewässert. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Citratpuffer (10mM ph 6, siehe Anhang) für 1x 5 Minuten und dann 4x 3 Minuten in der Mikrowelle (bei 700Watt) vorbehandelt. Danach kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur ab. Es erfolgte eine Spülung in Leitungswasser für 3x 5 Minuten. Nun wurden die Schnitte für 1x 20 Minuten mit Casein geblockt und anschließend für 3x 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Danach folgte eine weitere Blockung, diesmal mit TBS und 10%igem NGS. Diese Blockung wurde per Pipette einzeln auf die Schnitte aufgebracht. Die Schnitte wurden dann für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Jetzt wurde der 1. AK, der mit der Pufferlösung TBS und 1%igem NGS angesetzt war, auf die Schnitte aufgetragen, dabei wurde der Negativkontrollschnitt ausgespart (hier wurde nur TBS und 1%iges NGS aufgetragen). Bei dem AK handelte es sich um einen polyklonalen AK für p53, der aus Kaninchen (*rabbit*) gewonnen wurde (Firma Santa Cruz Biotechnology). Er wurde in einem Verhältnis von 1: 50 verdünnt. Die Schnitte wurden nun für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBS für 3x 5 Minuten. Nun wurde der 2. AK, der wieder mit TBS und 1%igem NGS ebenfalls im Verhältnis 1:50 verdünnt wurde, auf alle Schnitte pipettiert. Bei diesem 2. AK handelte es sich um einen Goat/Anti-Rabbit-AK. Wieder wurden die Schnitte für 60 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend erfolgte eine letzte Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte per Neufuchsin-Chromogen-Substrat nach mikroskopischer Kontrolle ca. 14 Minuten entwickelt (Protokoll siehe Anhang), die Zellkerne mit Hämalaun kurz gegengefärbt, gebläut und die Gewebeschnitte per wasserlöslichem Kleber eingedeckelt. Die Schnitte wurden in Mappen sortiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Nestin ist ein neuroepithelialer Marker und gehört zum Intermediärfilament vom Typ VI. Sogenannte *progenitor cells*, die als ein Vorläufer der Tumorstammzellen gewertet werden, lassen sich mit Nestin kennzeichnen (Bleau et al. 2008). Diese Nestin-positiven Zellen zeigen erhöhte Proliferations- und Migrationsraten.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie 3x für jeweils 5 Minuten in Xylol, dann 1x für 1 Minute in Isoxylol (= 100% Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1), dann in absteigender Reihenfolge für jeweils 2 Minuten in Isopropanol gehängt (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) und schließlich für 1x 1Minute in Aqua bidest. gewässert. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Citratpuffer (10mM ph 6, siehe Anhang) für 1x 5 Minuten, und dann 4x 3 Minuten in der Mikrowelle (bei 700Watt) vorbehandelt. Danach kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur ab. Es erfolgte eine Spülung in Leitungswasser für 3x 5 Minuten. Nun wurden die Schnitte für 1x 15 Minuten mit Casein geblockt und anschließend für 3x 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Danach folgte eine weitere Blockung, diesmal mit TBS und 10%igem NGS. Diese Blockung wurde per Pipette einzeln auf die Schnitte aufgebracht. Diese wurden dann für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Jetzt wurde der 1. AK, der mit der Pufferlösung TBS und 1%igem NGS angesetzt war, auf die Schnitte aufgetragen, dabei wurde der Negativkontrollschnitt ausgespart (hier wurde nur TBS und 1%iges NGS aufgetragen). Bei dem AK handelte es sich um einen polyklonalen AK für Nestin, der aus Kaninchen (*rabbit*) gewonnen wurde (Firma Abcam). Er wurde in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Die Schnitte wurden nun für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBS für 3x 5 Minuten. Nun wurde der 2. AK, der wieder mit TBS und 1%igem NGS diesmal im Verhältnis 1:500 verdünnt wurde, auf alle Schnitte pipettiert. Bei diesem 2. AK handelte es sich um einen Goat/Anti-Rabbit-AK. Wieder wurden die Schnitte für 60 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend erfolgte eine letzte Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte per Neufuchsin-Chromogen-Substrat nach mikroskopischer Kontrolle ca. 10 Minuten entwickelt (Protokoll siehe Anhang), die Zellkerne mit Hämalaun kurz gegengefärbt, gebläut und die Gewebsschnitte per wasserlöslichem Kleber eingedeckelt. Die Schnitte wurden in Mappen sortiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

p75 oder auch NGF (Nerve Growth Factor) genannt, gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Er befähigt Nervenzellen u.a. zur Aussprossung von Axonen und gehört in die Klasse der TNF-Rezeptor-Superfamilie. p75 wird in der Forschung als Stammzellmarker eingesetzt (Johnston et al. 2007). Für den Nachweis von p75 wurde die *Streptavidin-Biotin-Methode* (Dako 2006) verwendet. Dabei bindet an einen 1. AK ein 2. biotinylierter AK. In einem weiteren Schritt wird Streptavidin hinzugefügt, und es bildet sich ein Komplex um den 2. AK aus, der sich unter Entwicklung mit AEC rot anfärben läßt.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie 3x für jeweils 5 Minuten in Xylol, dann 1x für 1 Minute in Isoxylol (= 100% Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1), dann in absteigender Reihenfolge für jeweils 2 Minuten in Isopropanol gehängt (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) und schließlich für 1x 1 Minute in Aqua bidest. gewässert. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Tris EDTA ph 8 (siehe Anhang) für 20 Minuten in einem Steamer vorbehandelt. Danach wurden die Schnitte noch 10 Minuten im ausgeschalteten Gerät belassen, um dann nach Entnahme aus dem Wasserbad bei Raumtemperatur abzukühlen. Es erfolgte eine Spülung in Leitungswasser für 3x 5 Minuten. Nun wurden die Schnitte für 1x 15 Minuten mit TBS und 3%igem Wasserstoffperoxid gespült, um die endogene Peroxidase zu blocken, anschließend Spülung für 3x 5 Minuten in TBS. Danach folgte eine weitere Blockung, diesmal mit TBS und 10%igem NGS sowie 0,1%igem Triton X 100. Diese Blockung wurde per Pipette einzeln auf die Schnitte aufgebracht. Diese wurden dann für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Jetzt wurde der 1. AK, der mit der Pufferlösung TBS angesetzt war, auf die Schnitte aufgetragen, dabei wurde der Negativkontrollschnitt ausgespart (hier wurde nur TBS aufgetragen). Bei dem AK handelte es sich um einen monoklonalen AK für p75, der aus Mäusen gewonnen wurde (Firma Dako). Er wurde in einem Verhältnis von 1:2500 verdünnt. Die Schnitte wurden nun für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBS für 3x 5 Minuten. Nun wurde der 2. AK, der wieder mit TBS diesmal im Verhältnis 1:200, verdünnt wurde, auf alle Schnitte pipettiert. Bei diesem 2. AK handelte es sich um einen biotinylierten Anti-Mouse-AK. Wieder wurden die Schnitte diesmal für 45 Minuten, in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte eine Spülung in TBS für 3x 5 Minuten. Nun wurden die Schnitte mit in fetalem Kälberserum gelöster Streptavidin-Peroxidase (im Verhältnis 1:1000) behandelt und für weitere 45 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS für 3x5 Minuten gespült.

Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte per AEC nach mikroskopischer Kontrolle ca. 20 Minuten entwickelt (Protokoll siehe Anhang), die Zellkerne mit Hämalaun kurz gegengefärbt, gebläut und die Gewebeschnitte per wasserlöslichem Kleber eingedeckelt. Die Schnitte wurden in Mappen sortiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.4 Vorgehen bei der Auswertung

Die Laborarbeiten erfolgten im Zeitraum von 2008-2011.
Mit Hilfe von Herrn PD Dr. W. Schulz-Schaeffer wurden die IHC-gefärbten Schnitte an einem Mikroskop, *Olympus BX 40*, analysiert. Parallel dazu wurde eine handschriftliche Mitschrift verfasst. Die Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte in Prozentangaben von 0-100, je nach Expression eines bestimmten Markers. Dabei wurde zunächst ein Schnitt unter dem Mikroskop komplett gesichtet, um einen Gesamteindruck zu gewinnen. Danach wurde der Schnitt im Detail analysiert. Durch die Heterogenität der Tumoren kam es oft vor, dass sich innerhalb eines Schnittes einige Tumoranteile deutlich weniger anfärben ließen als andere, fokal also deutlich mehr Zellen einen bestimmten Marker exprimierten. Auch zeigten einige Schnitte Anteile der Tumorinfiltrationszone (leider nicht alle). Ein Auszug der Mitschrift sah exemplarisch folgendermaßen aus:

Glioblastom (ohne RCT), Fall 11, 1. Rezidiv
HE: keine Besonderheiten, keine Infiltrationszone
Vimentin: fokal 80% der Zellen positiv, auf den gesamten Schnitt geschätzt 10%
GFAP: 2/3 aller Zellen positiv
p53: Einzelzellen positiv, unter 1%
Nestin: insgesamt 20% aller Zellen positiv
p75: fokal 5% der Zellen positiv, auf den gesamten Schnitt geschätzt unter 1%

Zur statistischen Analyse musste aber eine Auswertungskategorie gefunden werden, die in allen Schnitten vorhanden und nachvollziehbar war. In Rücksprache mit Herrn PD Dr. W. Schulz-Schaeffer wurden daher bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit lediglich die geschätzten Prozentangaben der Antigen-Expression, auf einen Schnitt insgesamt gesehen, bewertet. Proben, die nur einzelne angefärbte Zellen zeigten (= unter 1%), wurden mit 0,5% Antigen-Expression in die Statistik aufgenommen. Schnitte, die keine Antigen-Expression zeigten, sind mit dem Wert 0 festgehalten worden. Im Anhang sind die Rohdaten, in Form von Balkendiagrammen, aufgelistet.

3. Statistik und Ergebnisse

3.1 Statistik

Für die statistischen Berechnungen wurden folgende Hilfsmittel verwendet:

Die beschreibende Statistik wurde handschriftlich und mit einem Taschenrechner (*Dual Power* von Dario) berechnet. *Mean* bedeutet Mittelwert; *Mode* zeigt den/die Wert/e an, der/die am häufigsten vorkam/en; *Range* zeigt Minimum und Maximum an; *SD* steht für Standard Deviation = Standard Abweichung und mit *N* ist die Anzahl der untersuchten Proben gekennzeichnet.

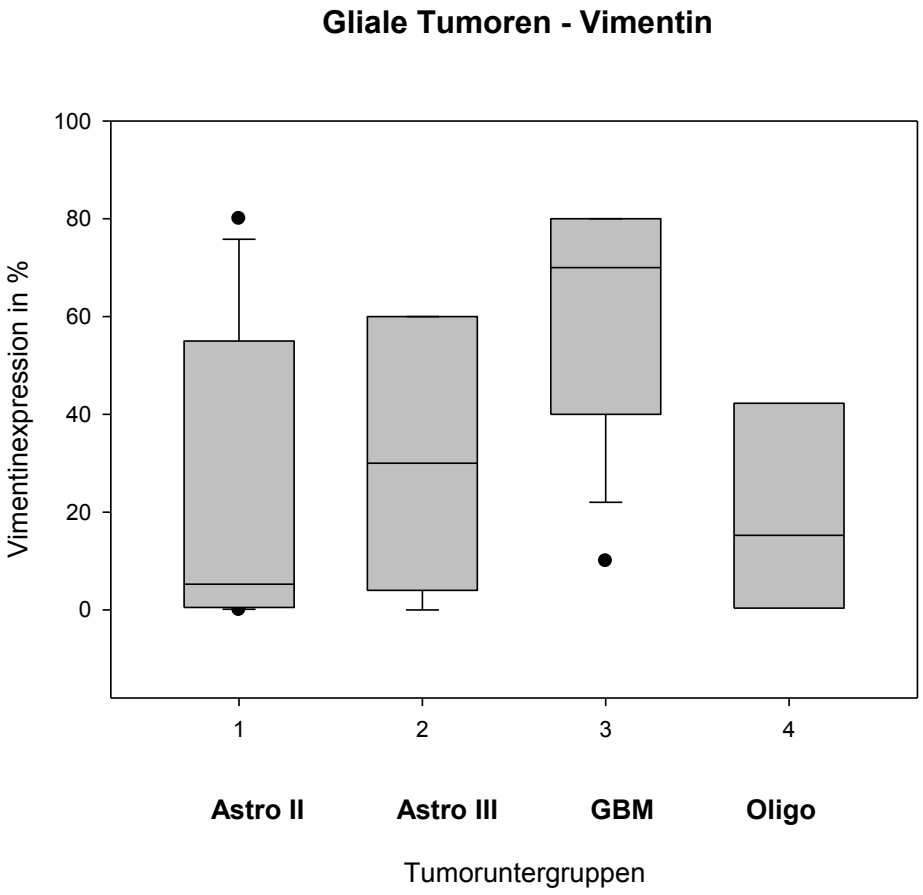
Für die Erstellung der Boxplots wurde die Software: *SigmaPlot 11.0 Notebook* verwendet. Am Boxplot (=Kastengraphik) lassen sich verschiedene Werte ablesen.
Die Box bildende untere und obere Linie stehen für das untere und obere Quartil, welches die mittleren 50% der Daten beinhaltet. Der horizontale Strich innerhalb der Box steht für den Median. Die *Whisker* (= Antennen) stehen für die übrigen 50% der Daten und zeigen das Maß der Datenstreuung an. Die Punkte stehen für Ausreisserwerte.

Fisher-T-Test und paired Fisher-T-Test wurden mit *Microsoft Office Excel*, Version 2003, berechnet. Dabei wurde *p* kleiner oder gleich 0,06 als signifikant gewertet.

Zur Erinnerung und besseren Übersicht werden die drei zentralen Fragen dieser Arbeit im Einzelnen den dazugehörigen Boxplots vorgeschaltet.

Wie verhält sich das Glioblastom im Gegensatz zu anderen glialen Tumoren niedrigerer Malignität?

Dazu sind verschiedene Tumoruntergruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) mit dem GBM anhand verschiedener IHC-Marker verglichen worden.

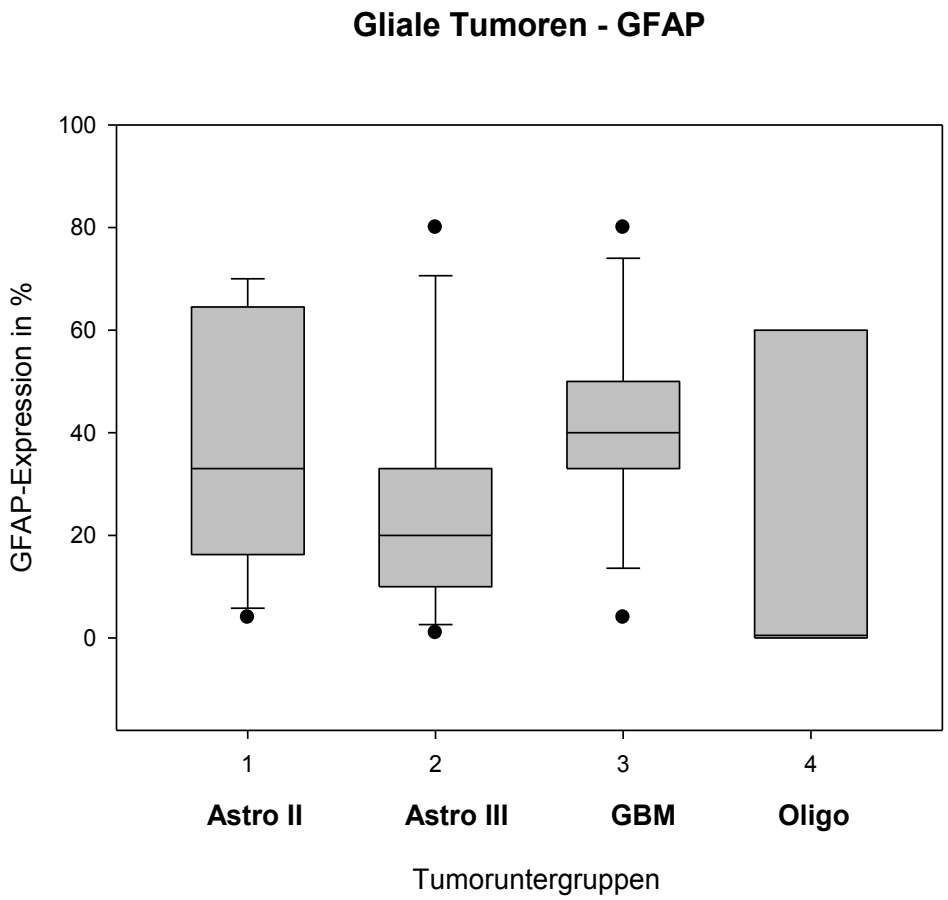


Die Boxplots „Gliale Tumoren - Vimentin“ zeigen die Ergebnisse der IHCF mit Vimentin. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Tumoruntergruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, GBM (nur Proben aus Erst-OPs) sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Vimentin-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „Gliale Tumoren - Vimentin“:

	Astro II	**Astro III**	**GBM**	**Oligo**
Mean	23,2083	28,3636	60,6667	22,3333
Mode	0,5	60	80	0,5
Range	0-80	0-60	10-80	0-70
SD	30,1417	25,6526	21,8654	27,9171
N	12	11	15	6

Vergleicht man die Werte des Astrozytoms WHO-Grad II und III mit denen des GBMs im Fisher-T-Test, zeigen sich signifikant höhere Werte für Vimentin-Expression (II vs. GBM, p=0,000901), (III vs. GBM, p=0,001549).

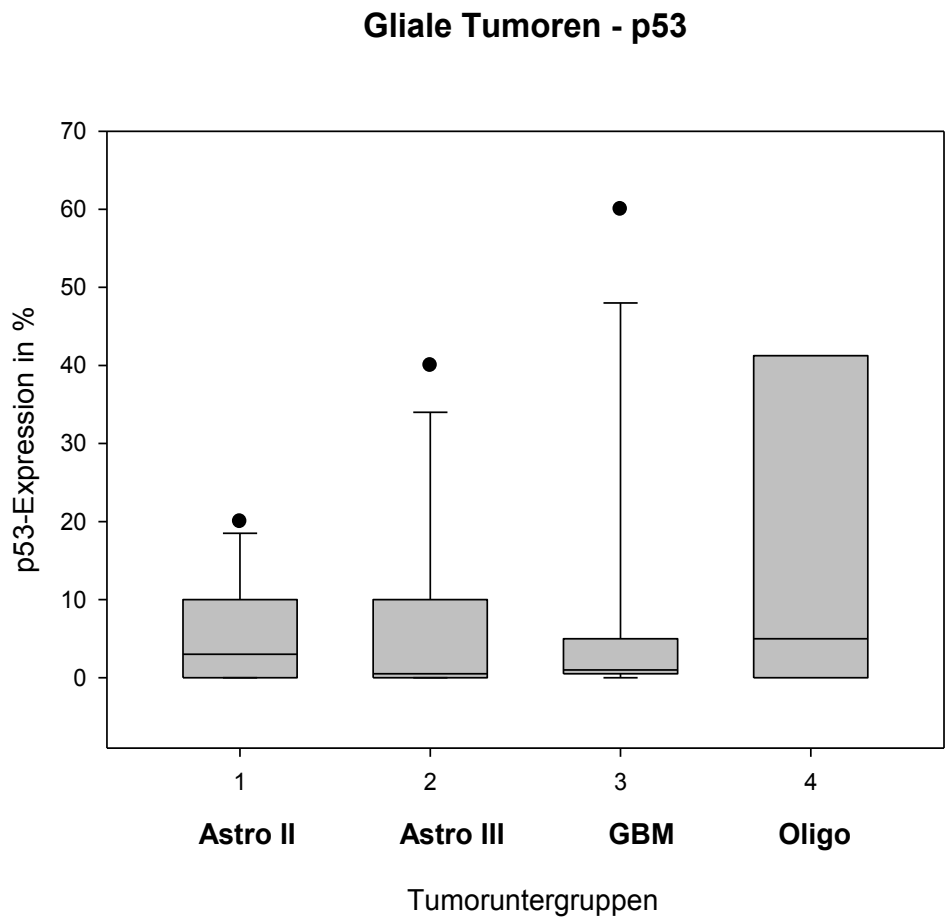


Die Boxplots „Gliale Tumoren - GFAP“ zeigen die Ergebnisse IHCF mit GFAP. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Tumoruntergruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, GBM (nur Proben aus Erst-OPs) sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) aufgetragen. Die Y-Achse bildet die GFAP-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „Gliale Tumoren - GFAP“:

	Astro II	**Astro III**	**GBM**	**Oligo**
Mean	37,5833	25,8182	43,4667	20,1667
Mode	33/70	33	40	0/0,5/60
Range	4-70	1-80	4-80	0-60
SD	23,7887	21,0752	19,3939	30,8556
N	12	11	15	6

Vergleicht man die Werte des Astrozytoms WHO-Grad II und III mit denen des GBMs im Fisher-T-Test, zeigen sich nur zwischen Astrozytom WHO-Grad III und GBM signifikant höhere Werte für GFAP-Expression (II vs.GBM, p=0,262641), (III vs. GBM, p=0,022493).

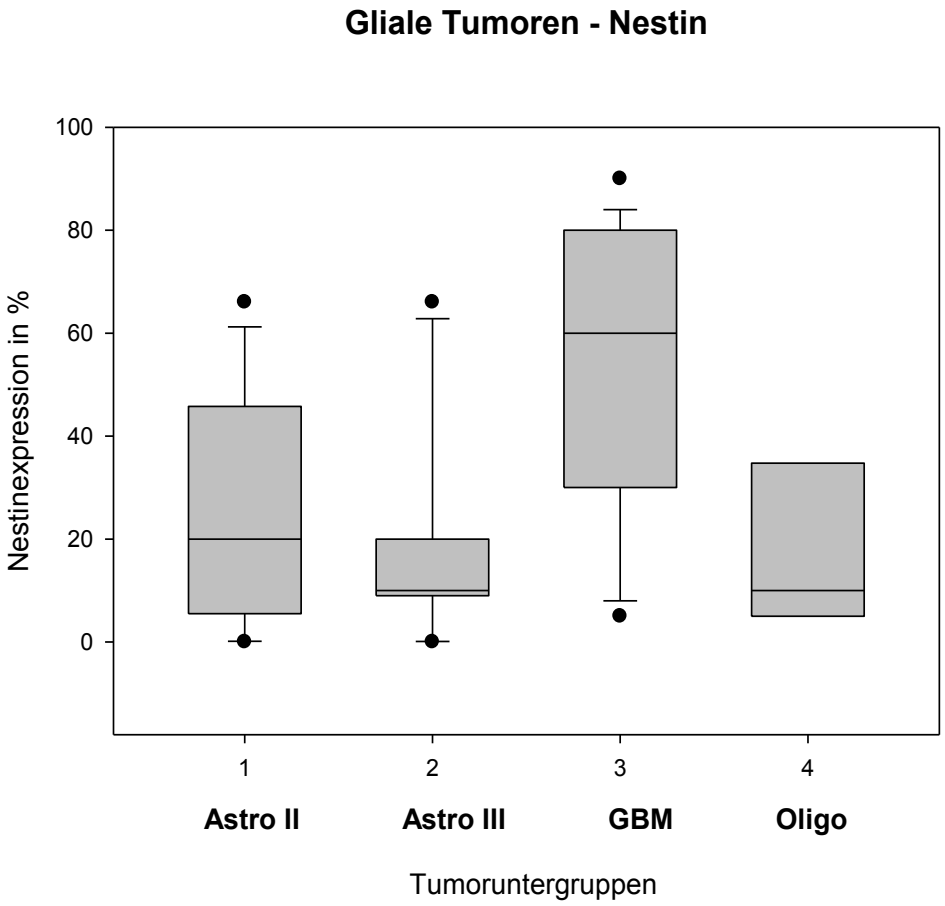


Die Boxplots „Gliale Tumoren - p53“ zeigen die Ergebnisse der IHCF p53. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Tumorgruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, GBM (nur Proben aus Erst-OPs) sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) aufgetragen. Die Y-Achse bildet die p53-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „Gliale Tumoren - p53“:

	Astro II	**Astro III**	**GBM**	**Oligo**
Mean	5,5	6,4091	10,6	18,1667
Mode	0	0	0,5	0
Range	0-20	0-40	0-60	0-66
SD	6,789	11,96	19,2476	26,7014
N	12	11	15	6

Vergleicht man die Werte des Astrozytoms WHO-Grad II und III mit denen des GBMs im Fisher-T-Test, zeigen sich keine signifikanten Werte für p53-Expression (II vs. GBM, p=0,176150, (III vs. GBM, p=0,250786).

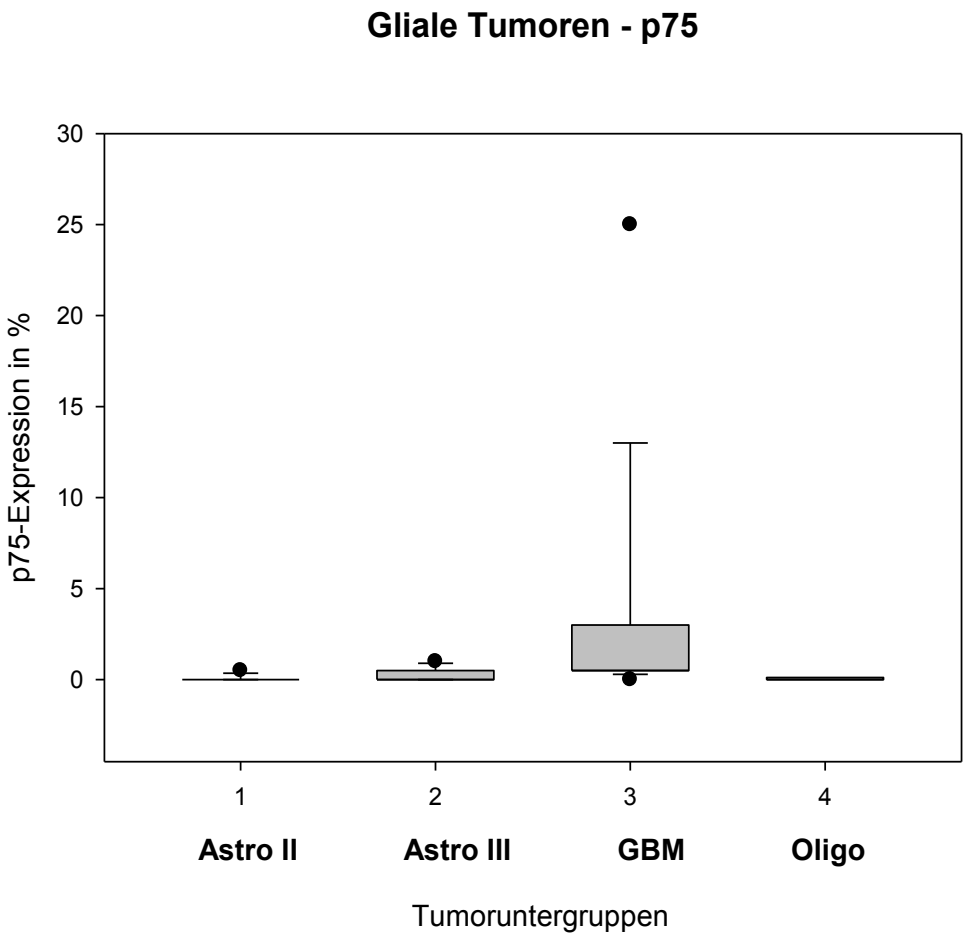


Die Boxplots „Gliale Tumoren - Nestin“ zeigen die Ergebnisse der IHCF mit Nestin. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Tumoruntergruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, GBM (nur Proben aus Erst-OPs) sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Nestin-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „Gliale Tumoren - Nestin“:

	Astro II	**Astro III**	**GBM**	**Oligo**
Mean	23,625	19,1364	49,8	17,1667
Mode	20	10	60/80	5
Range	0-66	0-66	5-90	5-40
SD	21,666	20,5768	27,3318	15,6258
N	12	11	15	6

Vergleicht man die Werte des Astrozytoms WHO-Grad II und III mit denen des GBMs im Fisher-T-Test, zeigen sich signifikant höhere Werte für Nestin-Expression (II vs. GBM, p=0,006779), (III vs. GBM, p=0,002249).



Die Boxplots „Gliale Tumoren - p75“ zeigen die Ergebnisse der IHCF mit p75. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Tumoruntergruppen (Astrozytom WHO-Grad II, III, GBM (nur Proben aus Erst-OPs) sowie Oligodendrogliom WHO-Grad II) aufgetragen. Die Y-Achse bildet die p75-Expression in Prozent ab.

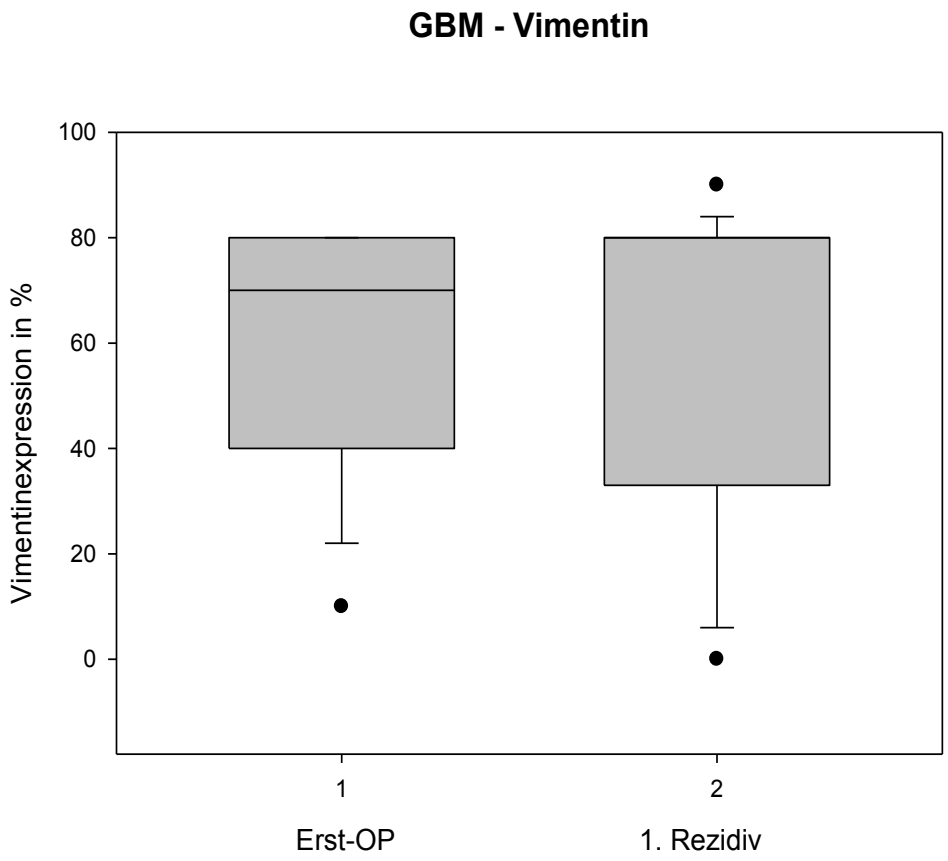
Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „Gliale Tumoren - p75“:

	Astro II	**Astro III**	**GBM**	**Oligo**
Mean	0,0417	0,2727	2,8333	0,0833
Mode	0	0	0,5	0
Range	0-0,5	0-1	0-25	0-0,5
SD	0,1443	0,3438	6,3123	0,2041
N	12	11	15	6

Vergleicht man die Werte des Astrozytoms WHO-Grad II und III mit denen des GBMs im Fisher-T-Test, zeigen sich signifikant höhere Werte für p75-Expression (II vs. GBM, p=0,054432), (III vs. GBM, p=0,069521).

Wie unterscheidet sich die Antigen-Expression im Ausgangstumor von der im Rezidiv beim GBM?

Dazu sind fünfzehn Patientenfälle mit Glioblastom, Erst-OP und jeweils 1. Rezidiv, zusammengestellt und untersucht worden.

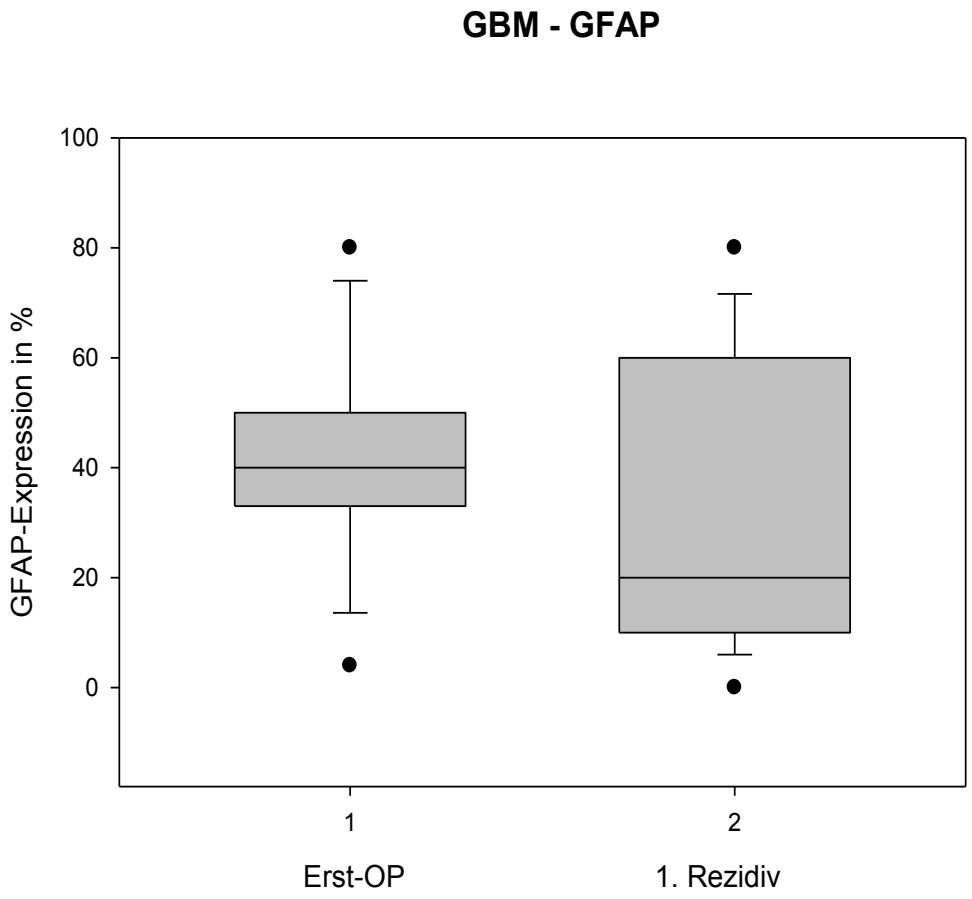


Die Boxplots „GBM – Vimentin“ zeigen das Ergebnis der IHCF mit Vimentin beim GBM. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs aufgelistet. Die Y-Achse bildet die Vimentin-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „GBM – Vimentin“:

	Erst-OP	**1. Rezidiv**
Mean	60,6667	63,0667
Mode	80	80
Range	10-80	0-90
SD	21,8654	29,1755
N	15	15

Berechnung mittels des paired Fisher-T-Tests ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Erst-OP Biopsien und den Proben der jeweils ersten Rezidive innerhalb des GBMs für die Vimentin-Expression (p=0,800776).

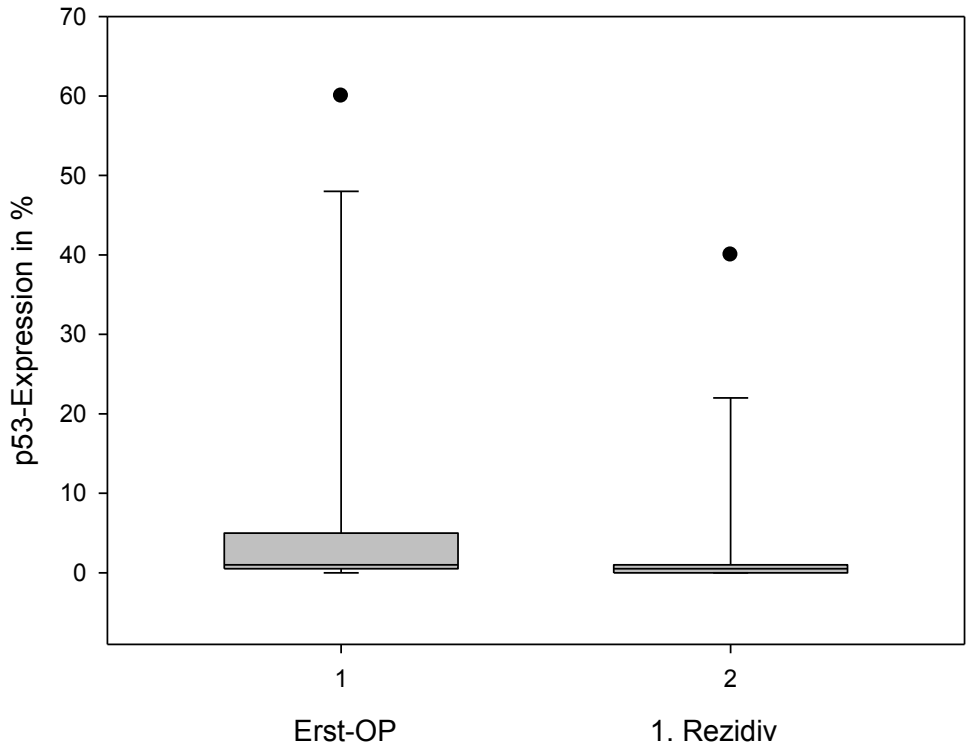


Die Boxplots „GBM – GFAP“ zeigen das Ergebnis der IHCF mit GFAP beim GBM. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs aufgelistet. Die Y-Achse bildet die GFAP-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „GBM – GFAP“:

	Erst-OP	**1. Rezidiv**
Mean	43,4667	33,0667
Mode	40	20
Range	4-80	0-80
SD	19,3939	25,1495
N	15	15

Berechnung mittels des paired Fisher-T-Tests ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Erst-OP Biopsien und den Proben der jeweils ersten Rezidive innerhalb des GBMs für GFAP-Expression (p=0,232902).

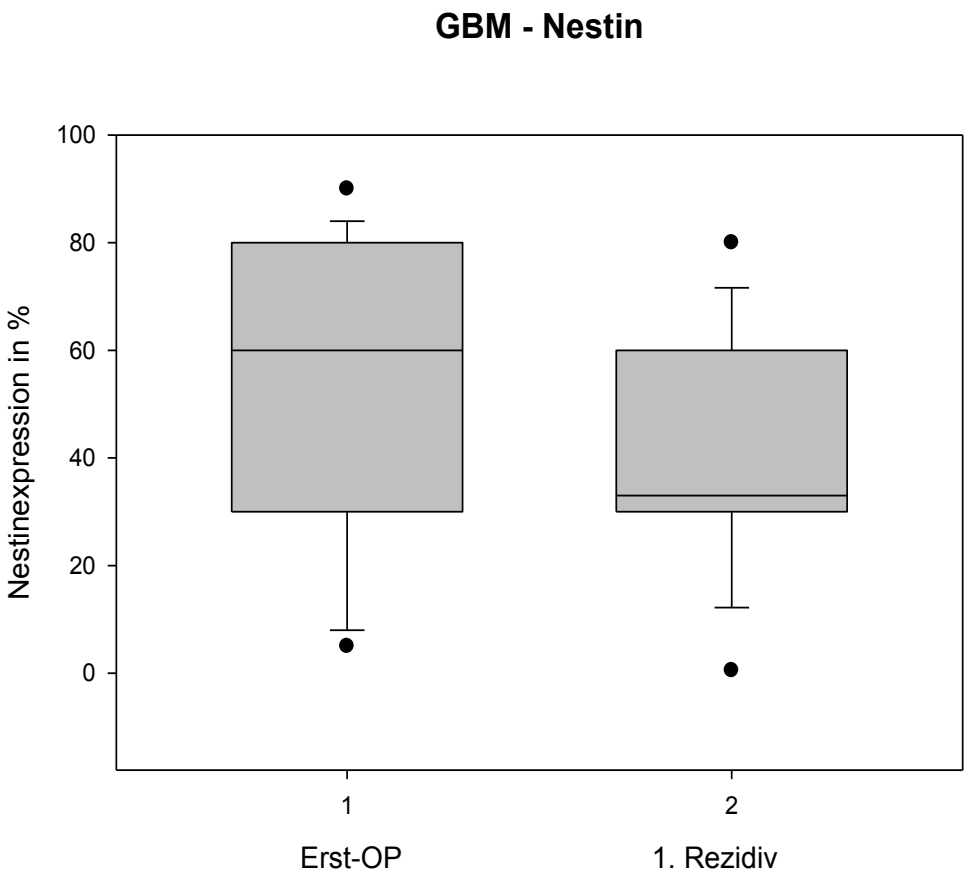


Die Boxplots „GBM – p53“ zeigen das Ergebnis der IHCF mit p53 beim Gliom. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs aufgelistet. Die Y-Achse bildet die p53-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „GBM – p53“:

	Erst-OP	**1. Rezidiv**
Mean	10,6	3,9
Mode	0,5	0,5
Range	0-60	0-40
SD	19,2476	10,3185
N	15	15

Berechnung mittels des paired Fisher-T-Tests ergeben einen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Erst-OP Biopsien und den Proben der jeweils ersten Rezidive innerhalb des GBMs für p53-Expression (p=0,245601).

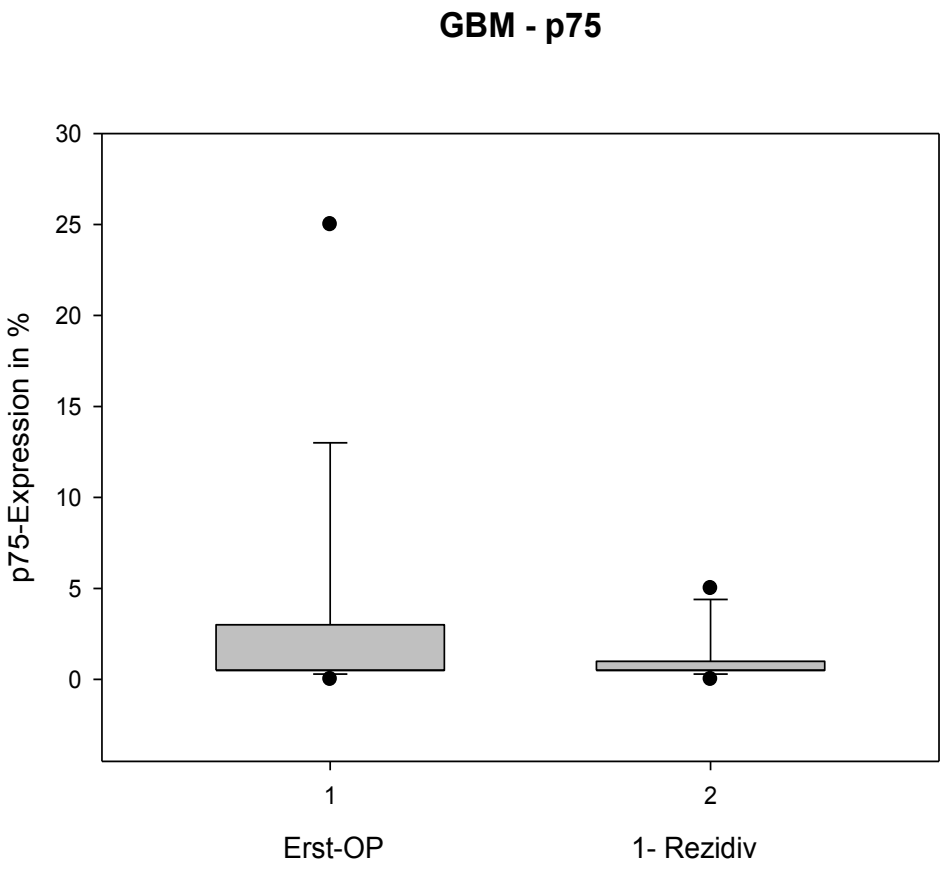


Die Boxplots „GBM – Nestin“ zeigen das Ergebnis der IHCF mit Nestin beim Gliom. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs aufgelistet. Die Y-Achse bildet die Nestin-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „GBM – Nestin“:

	Erst-OP	**1. Rezidiv**
Mean	49,8	43,2333
Mode	60/80	60
Range	5-90	0,5-80
SD	27,3318	22,6044
N	15	15

Berechnung mittels des paired Fisher-T-Tests ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Erst-OP Biopsien und den Proben der jeweils ersten Rezidive innerhalb des GBMs für Nestin-Expression (p=0,545868).



Die Boxplots „GBM – p75“ zeigen das Ergebnis der IHCF mit p75 beim Gliom. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs aufgelistet. Die Y-Achse bildet die p75-Expression in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu Boxplots „GBM – p75“:

	Erst-OP	**1. Rezidiv**
Mean	2,8	1,3333
Mode	0,5	0,5
Range	0-25	0-5
SD	6,324	1,5887
N	15	15

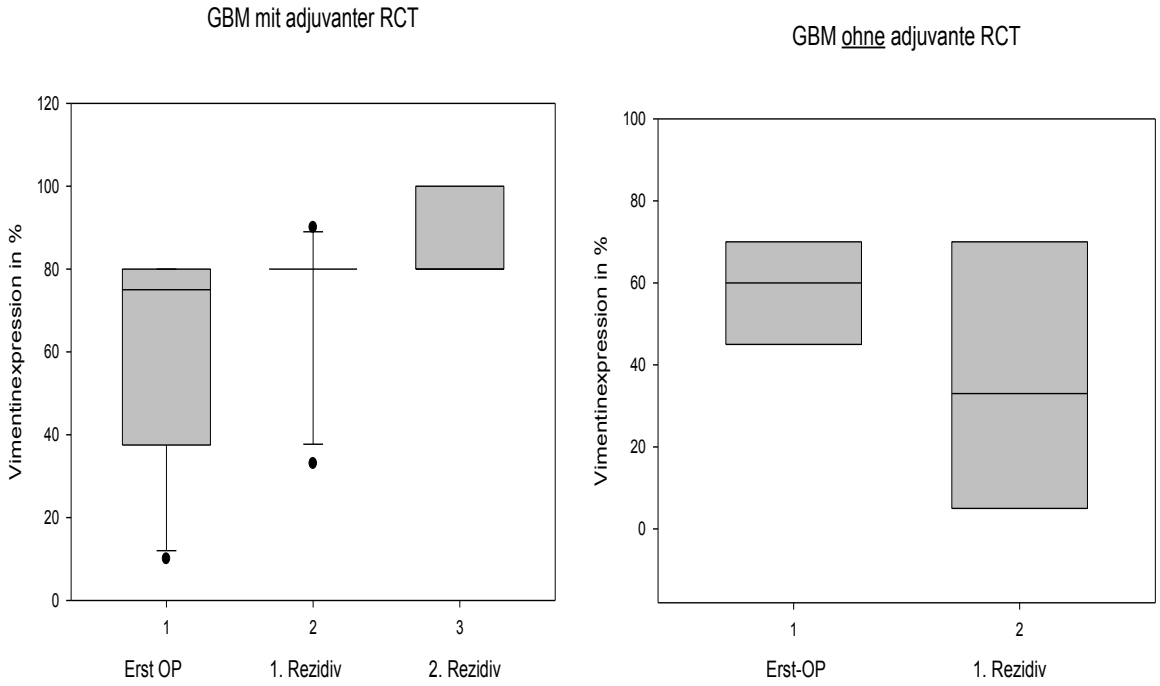
Berechnung mittels des paired Fisher-T-Tests ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Erst-OP Biopsien und den Proben der jeweils ersten Rezidive innerhalb des GBMs für p75-Expression (p=0,385540).

Gibt es Unterschiede der Antigen-Expression beim GBM im Krankheitsverlauf, je nachdem welche Behandlung Patienten erhalten haben?

Dazu werden zwei Therapieregime miteinander verglichen:
Operation und adjuvante RCT versus rein operative Maßnahmen.

Zu dieser Frage sind fünfzehn Patientenfälle mit Glioblastom zusammengestellt worden, die alle mehrmals operiert wurden. Es gibt von allen fünfzehn Patienten mindestens zwei Biopsien: Erst-OP und 1. Rezidiv – in drei Fällen auch noch eine Biopsie des 2. Rezidivs (aufgrund dieser geringen Anzahl wurden die Zweitrezidive jedoch nicht in die Berechnungen des paired Fisher-T-Test aufgenommen). Die Gruppe lässt sich unterteilen in Patienten, die eine adjuvante RCT erhielten ((N=10) jeweils links aufgelistet), und Patienten, die rein operativ behandelt wurden ((N=5) rechts aufgelistet).

Vimentin bei verschiedenen Therapieregimen



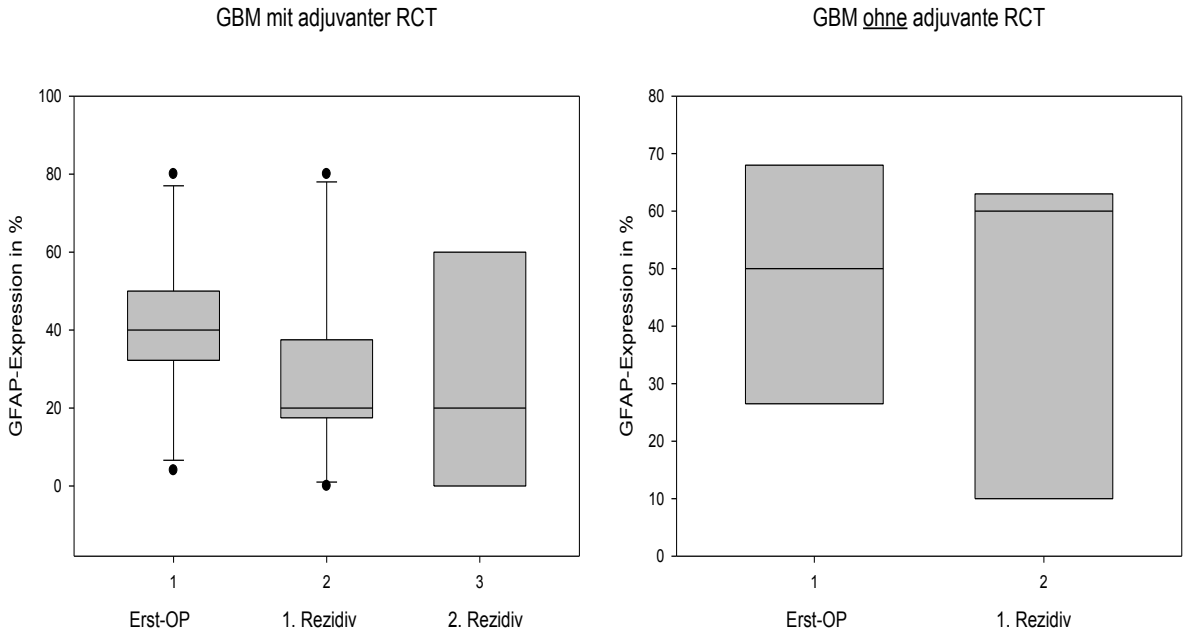
Die angeführten Boxplots zeigen die Ergebnisse der IHCF mit Vimentin beim Gliom. Links sind Patientenfälle aufgeführt, die eine adjuvante RCT erhielten. Rechts sind Patientenfälle, die rein operativ behandelt wurden, aufgelistet. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP, des 1. und ggf. 2. Rezidivs aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Expression von Vimentin in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu oben stehenden Boxplots:

	GBM mit RCT			**GBM ohne RCT**	
	Erst-OP	**1. Rezidiv**	**2. Rezidiv**	**Erst-OP**	**1. Rezidiv**
Mean	62,0	76,3	83,3333	58,0	36,6
Mode	80	80	80	70	40
Range	10-80	33-90	80-90	40-70	0-80
SD	25,7337	15,5353	5,7735	13,0384	33,5082
N	10	10	3	5	5

Vergleicht man die Werte der Erst-OP-Biopsien mit denen des 1. Rezidivs bei den Patientenfällen mit RCT mittels des paired Fisher-T-Tests, zeigt sich kein signifikanter Anstieg der Vimentin-Expression (p=0,153537).Vimentin ist bei den Patientenfällen ohne RCT ebenfalls nicht signifikant verändert (paired Fisher-T-Test: p=0,238765).

GFAP bei verschiedenen Therapieregimen



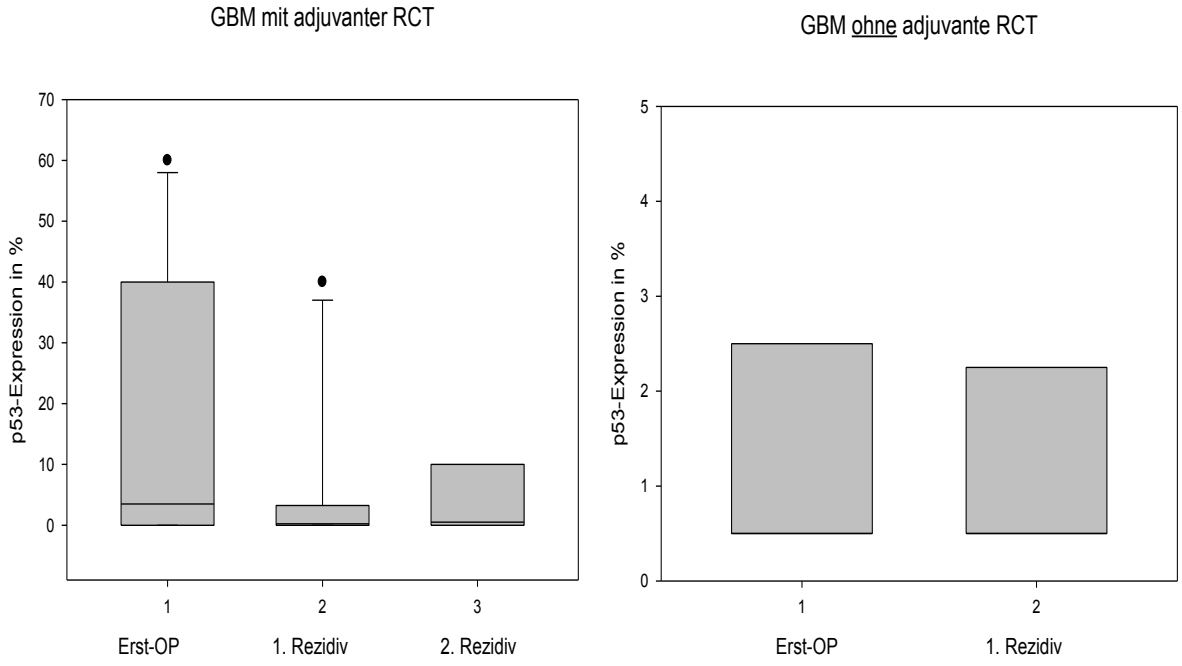
Die angeführten Boxplots zeigen die Ergebnisse der IHCF mit GFAP beim Gliom. Links, sind Patientenfälle aufgeführt, die eine adjuvante RCT erhielten. Rechts, sind Patientenfälle, die rein operativ behandelt wurden, aufgelistet. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP, des 1. und ggf. 2. Rezidivs aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Expression von GFAP in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu oben stehenden Boxplots:

	GBM mit RCT			**GBM ohne RCT**	
	Erst-OP	**1. Rezidiv**	**2. Rezidiv**	**Erst-OP**	**1. Rezidiv**
Mean	40,7	29,0	26,6667	49,0	41,2
Mode	40	20	0/20/60	66	10/60
Range	4-80	0-80	0-60	20-66	10-66
SD	18,974	23,7814	30,5505	21,1896	28,5867
N	10	10	3	5	5

Vergleicht man die Werte der Erst-OP-Biopsien mit denen des 1. Rezidivs bei den Patientenfällen mit RCT mittels des paired Fisher-T-Tests, zeigt sich kein signifikanter Unterschied der GFAP-Expression (p=0,240404).GFAP ist bei den Patientenfällen ohne RCT nicht signifikant verändert (paired Fisher-T-Test: p=0,690799).

p53 bei verschiedenen Therapieregimen



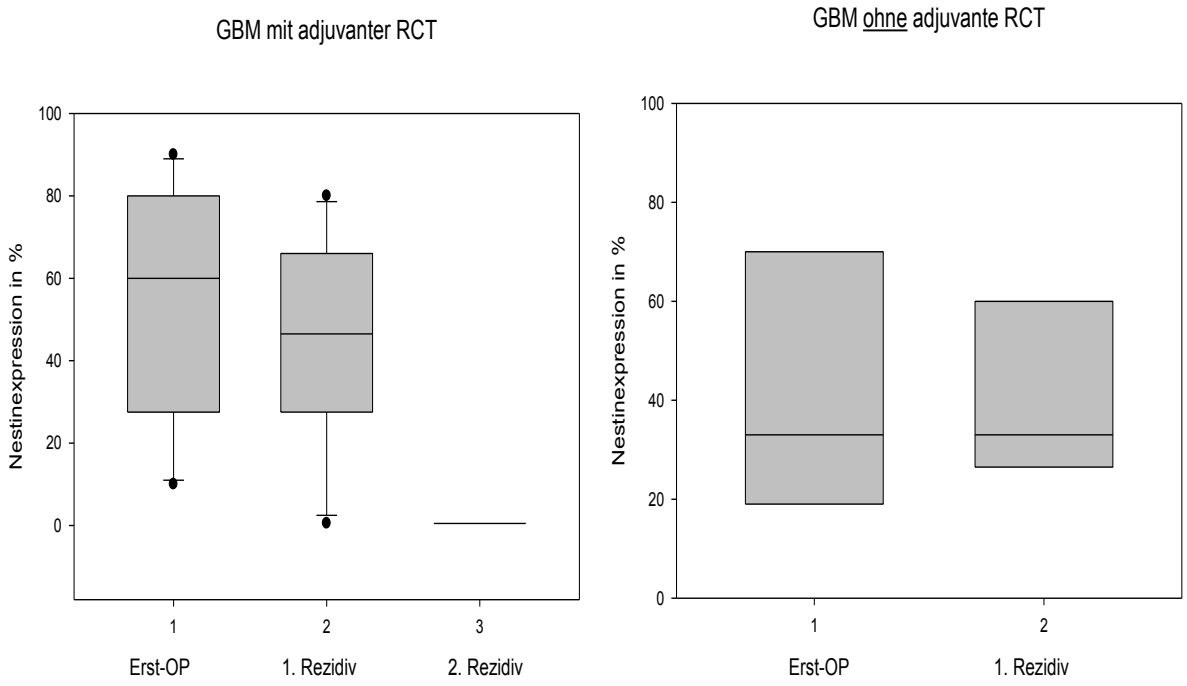
Die angeführten Boxplots zeigen die Ergebnisse der IHCF mit p53 beim Gliom. Links, sind Patientenfälle aufgeführt, die eine adjuvante RCT erhielten. Rechts, sind Patientenfälle, die rein operativ behandelt wurden, aufgelistet. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP, des 1. und ggf. 2. Rezidivs aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Expression von p53 in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu oben stehenden Boxplots:

	GBM mit RCT			**GBM ohne RCT**	
	Erst-OP	**1. Rezidiv**	**2. Rezidiv**	**Erst-OP**	**1. Rezidiv**
Mean	15,25	5,25	10,0	1,3	1,2
Mode	0	0	0	0,5	0,5
Range	0-60	0-40	0-30	0,5-4	0,5-4
SD	22,4317	12,588	17,3205	1,5248	1,5652
N	10	10	3	5	5

Vergleicht man die Werte der Erst-OP-Biopsien mit denen des 1. Rezidivs bei den Patientenfällen mit RCT mittels des paired Fisher-T-Tests, zeigt sich kein signifikanter Anstieg der p53-Expression (p=0,236907). p53 ist bei den Patientenfällen ohne RCT nicht signifikant verändert (paired Fisher-T-Test: p=0,921016).

Nestin bei verschiedenen Therapieregimen



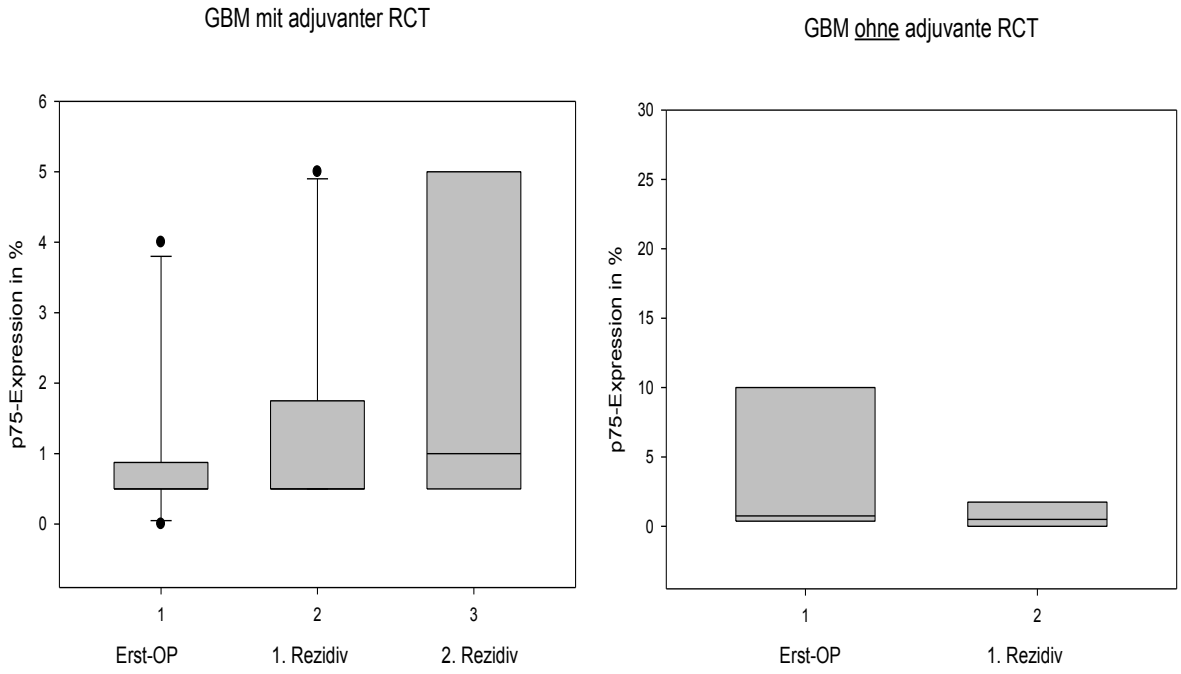
Die angeführten Boxplots zeigen die Ergebnisse der IHCF mit Nestin beim Gliom. Links, sind Patientenfälle aufgeführt, die eine adjuvante RCT erhielten. Rechts, sind Patientenfälle, die rein operativ behandelt wurden, aufgelistet. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP, des 1. und ggf. 2. Rezidivs aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Expression von Nestin in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu oben stehenden Boxplots:

	GBM mit RCT			**GBM ohne RCT**	
	Erst-OP	**1. Rezidiv**	**2. Rezidiv**	**Erst-OP**	**1. Rezidiv**
Mean	53,6	44,55	0,5	42,2	40,6
Mode	60/80	30/60/66	0,5	33	60
Range	10-90	0,5-80	0,5	5-80	20-60
SD	27,3382	25,2855	0,0	28,7176	18,3521
N	10	10	3	5	5

Vergleicht man die Werte der Erst-OP-Biopsien mit denen des 1. Rezidivs bei den Patientenfällen mit RCT mittels des paired Fisher-T-Tests, zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Nestin-Expression (p=0,515476). Nestin ist bei den Patientenfällen ohne RCT nicht signifikant verändert (paired Fisher-T-Test: p=0,949290).

p75 bei verschiedenen Therapieregimen



Die angeführten Boxplots zeigen die Ergebnisse der IHCF mit p75 beim Gliom. Links, sind Patientenfälle aufgeführt, die eine adjuvante RCT erhielten. Rechts, sind Patientenfälle, die rein operativ behandelt wurden, aufgelistet. Auf der X-Achse sind Biopsien der Erst-OP, des 1. und ggf. 2. Rezidivs aufgetragen. Die Y-Achse bildet die Expression von p75 in Prozent ab.

Beschreibende statistische Werte zu oben stehenden Boxplots:

	GBM mit RCT			**GBM ohne RCT**	
	Erst-OP	**1. Rezidiv**	**2. Rezidiv**	**Erst-OP**	**1. Rezidiv**
Mean	1,05	1,4	2,1667	6,4	1,2
Mode	0,5	0,5	0,5/1/5	0,5	0,5
Range	0-4	0,5-5	0,5-5	0,5-25	0-4
SD	1,3218	1,6633	2,4664	10,5676	1,6047
N	10	10	3	5	5

Vergleicht man die Werte der Erst-OP-Biopsien mit denen des 1. Rezidivs bei den Patientenfällen mit RCT mittels des paired Fisher-T-Tests, zeigt sich kein signifikanter Anstieg der p75-Expression (p=0,609075). p75 ist bei den Patientenfällen ohne RCT nicht signifikant verändert (paired Fisher-T-Test: p=0,335321).

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Antigen-Expression beim GBM im Gegensatz zu glialen Tumoren niedrigerer Malignität

Zur Beantwortung der ersten Frage ist festzustellen, dass sich das GBM deutlich von den anderen glialen Tumoren unterscheidet.
Es sei erwähnt, dass es bis auf einen Marker keine Signifikanzen zwischen dem Astrozytom WHO-Grad II und III gab. (Vimentin: II vs. III, p=0,332397, GFAP: II vs. III, p= 0,111198, p53: II vs. III, p= 0,413793, Nestin: II vs. III, p= 0,307856).
Für p75 konnte ein signifikanter Anstieg von Astrozytom WHO-Grad II zu III festgestellt werden (p= 0,029410).
Die Werte der Oligodendrogliome WHO-Grad II zeigen überwiegend sehr große Streuung und liegen mit ihren Werten zwischen denen der Astrozytome WHO-Grad II und III.
Bei der Betrachtung der Boxplots-Diagramme sieht man, dass sich das GBM in seiner Antigen-Expression signifikant von den anderen Tumorgruppen abhebt. Vimentin zeigt die stärkste Vimentin-Expression (die Daten der Glioblastomproben zeigen dazu den höchsten Mittelwert und die kleinste Standardabweichung).
Für GFAP scheinen die Unterschiede weniger deutlich. Das GBM zeigt im Vergleich wieder den höchsten Mittelwert und die kleinste Datenstreuung. Jedoch ist statistisch nur zwischen dem Astrozytom WHO-Grad III und dem GBM ein signifikanter Anstieg für GFAP nachzuweisen.
Bei der p53-Expression weisen die Glioblastomproben eine starke Streuung auf. Dennoch liegen die mittleren 50% der Daten unter den Werten der anderen Tumorgruppen, sodass man insgesamt von einer abnehmenden Tendenz für p53-Expression beim Glioblastomgewebe sprechen kann.
Die Nestin-Expression beim GBM ist sowohl gegenüber den Biopsien der Astrozytome WHO-Grad II als auch III, signifikant ansteigend.
Mit zunehmender Malignität steigt die Expression von p75. Dies ist statistisch signifikant.
(Astrozytom WHO-Grad II vs. III, p=0,029410 / Astrozytom WHO-Grad II vs. GBM,
p= 0,054432 / Astrozytom WHO-Grad III vs. GBM, p= 0,069521)
Von den Oligodendrogliomen WHO-Grad II zeigt nur eine von sechs Proben p75-Expression.

3.2.2 Antigen-Expression bei Ausgangstumor und Rezidiv des GBMs

Die Auswertung der IHC-Färbungen innerhalb der Gruppe des GBMs im Verlauf (Erst-OP vs. 1. Rezidiv) ergibt für die Expression der verschiedenen Marker keine signifikanten Unterschiede. Es zeigen sich leichte Tendenzen, dass die Vimentin- und die p75-Expression im Verlauf der Erkrankung zunehmen. Rezeptoren für GFAP, p53 und Nestin hingegen scheinen mit fortschreitender Entwicklung des GBMs weniger exprimiert zu werden.

3.2.3 Antigen-Expressionunterschiede je nach Therapieregime

Zwar sind bei Gegenüberstellung der verschiedenen Therapieregime keine signifikanten Unterschiede festzustellen, interessanterweise sind aber auch hier Tendenzen erkennbar. Die Gewebeproben von Patienten mit Erhalt einer RCT zeigen einen angedeuteten Anstieg von Vimentin- und p75-Expression, während es bei Patienten ohne Erhalt einer RCT eher zu einer Abnahme der Vimentin- bzw. p75-Expression kommt. Eine gegenläufige Beobachtung kann man für GFAP festhalten. Unter Erhalt von RCT sinkt die Nestin-Expression tendentiell ab. p53 zeigt in beiden Therapieregimen große Streuung.

In Bezug auf die klinischen Daten, speziell der ÜLR von Patienten mit GBM, ist zu vermerken:

Tabelle 5: Überlebensrate GBM (N=15)

Nummer	Geschlecht	Alter bei Erst-OP	Anzahl OPs	ÜLR in Monaten (ab 1.OP)
1	m	47;4	2	82 (6J 10M)
2	w	38;6	2	10
3	m	44;1	2	15 (1J 3M)
4	w	57;10	2	38 (3J 2M)
5	w	51;6	2	10
6	m	58;9	3	53 (4J 5M)
7	m	52;6	2	22 (1J 10M)
8	m	65;12	3	26 (2J 2M)
9	w	48;10	2	29 (2J 5M)
10	m	51;2	3	21 (1J 9M)
11	m	62;7	2	5
12	w	61;3	2	6
13	w	30;4	2	1
14	m	50;11	2	10
15	w	61;6	2	10

Von diesen 15 Patienten mit diagnostiziertem GBM erhielten die Patienten mit den Nummern eins bis zehn eine adjuvante RCT (Temozolomid, 60Gy). Die Patienten mit den Nummern elf bis fünfzehn wurden rein operativ behandelt. Die Überlebensrate (ÜLR) wurde in Monaten ab dem Zeitpunkt der Erst-OP berechnet.

Der Auflistung zu entnehmen ist, dass Patienten mit Erhalt einer adjuvanten RCT mit einem Mittelwert von 30,6 Monate versus 6,4 Monate ohne RCT deutlich länger überlebten.

4. Diskussion

4.1 Wie passen die Ergebnisse zum Stand der derzeitigen Forschung?

4.1.1 Vimentin

Wie sind die Ergebnisse nun zu interpretieren? Für die Expression des Neurofilaments Vimentin stellt man fest, dass sie beim GBM jeweils imVergleich zum Astrozytom WHO-Grad II & III signifikant ansteigt. Vimentin-Expression kann in fetalen Nervenzellen nachgewiesen werden, bevor sich diese in ihrer Entwicklung weiter differenzieren. Auch nach Hirnverletzungen kommt es zu einer Steigerung von Vimentin im Bereich der Läsion (Levin et al. 2009). Bei Verletzungen des Gehirns werden aber auch andere Marker stärker exprimiert, wie etwa GFAP und Nestin (Wiese et al. 2004). Andere Autoren kommentieren im Zusammenhang von Hirntumoren und Vimentin-Expression: „Aggressive brain tumors are well known to contain poorly differentiated cells“ (Park & Rich 2009, S. 8). Beim Vergleich zwischen den Biopsien der Erst-OP und des 1. Rezidivs im Krankheitsverlauf eines Patienten mit GBM konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden. Die Expression von Vimentin zeigt jedoch eine ansteigende Tendenz. Dazu passen die Forschungsergebnisse von Wang J et al. (2009), die feststellten, dass proportional zur Zeit und mit zunehmender Malignität die Vimentin-Expressivität beim GBM ansteigt. Interessanterweise gab es bei den vorliegenden Ergebnissen, wenn auch nicht signifikant, gegenläufige Vimentin-Expression je nach Therapieregime. Patienten, die eine RCT erhalten hatten, zeigten eine ansteigende Tendenz für Vimentin-Expression im Gegensatz zu Patienten, bei denen keine RCT durchgeführt wurde. Dies lässt vermuten, dass es mit zunehmender Malignität und unter dem Einfluss einer RCT zu einer Selektion von Zellen kommt, die Vimentin exprimieren. Dieses Antigen ist dabei als ein Maß für Unreife bzw. Dedifferenzierung einer Nervenzelle zu werten.

4.1.2 GFAP

GFAP gilt als hochspezifischer Marker für differenzierte astrozytische Zellen (Molina et al. 2010). Yuan et al. (2004) beobachteten, dass GBM mit starker Zellproliferationsrate erhöhte Anteile an undifferentzierten Astrozyten zeigten, die kaum noch GFAP exprimierten. Dieses Ergebnis konnte eine Arbeit von Kondo (2006) bestätigen. Jung et al. (2007) beschreiben stark schwankende GFAP-Expression innerhalb von Glioblastomen. Ergebnisse aus der vorliegenden Studie zeigen einen signifikant ansteigenden Shift für GFAP-Expression vom Astrozytom WHO-Grad III zum GBM. Beim Vergleich zwischen Erst-OP und 1. Rezidiv innerhalb eines GBMs besteht insgesamt eine sinkende Tendenz für GFAP-Expression (unabhängig vom Therapieregime). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Jung et al. (2007), die eine Downregulation von GFAP im GBM im Verlauf beschrieben, die assoziiert sei mit aggressiverem Verhalten und gesteigerter Invasivität.
Fasst man die neu gewonnenen Beobachtungen für die Vimentin- und GFAP-Expression zusammen, scheinen sich die Zellen des GBMs im Verlauf dahingehend zu verändern, dass sich Vimentin und GFAP in ihrer Expression tendenziell invers zueinander verhalten: Also eine Zunahme von undifferenzierten Zellen bei gleichzeitiger Abnahme von differenzierten Zellen.

4.1.3 p53

Die p53-Expression zeigte lediglich im Vergleich von Erst-OP zu 1. Rezidiv beim GBM eine abnehmende Tendenz. Die restlichen Daten wiesen eine große Streuung auf. Galderisi et al. (2006) beschreiben, dass die frühe Inaktivierung von p53, der als Transkriptionsfaktor der Apoptose und Regulator des G1-Zellarrestes wirkt, eine wichtige Rolle bei der malignen Entartung von Tumoren spiele. Fatoo et al. (2011) stellen fest, dass der Tumorsuppressor p53 zu den häufigsten Mutationen innerhalb des GBMs gehöre und der Verlust von p53 zu einer schnelleren Ansammlung von onkogenen Mutationen führen könne. Fedrigo et al. (2011) bestätigen: „…p53 gene is the most commonly mutated tumor suppressor gene in malignant gliomas“ (Fedrigo et al. 2011, S.2). Die Forscher experimentierten *in vitro* mit Glioblastom-

zelllinien, die sie einer Bestrahlung aussetzten. Passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Veränderungen für die Expression von p53, was Fedrigo et al. (2011) dazu veranlasste, p53 als prognostischen Faktor beim GBM zu verwerfen.

4.1.4 Nestin

Fatoo et al. (2011) berichten über Nestin: „Not only is it more highly expressed in GBMs than other glial tumors, Nestin expression in tumor cells may also correlate with dedifferentiation status, enhanced cell motility, invasive potential and increased malignancy“ (Fatoo et al. 2011, S.399).

Yuan et al. (2004) bezeichnen Nestin als Marker für proliferierende, undifferenzierte Zellen, die auch als sog. neuronale Vorläuferzellen (*progenitor cells*) bezeichnet werden. Vorläuferzellen teilten, was ihre Funktion anginge, viele Gemeinsamkeiten mit Stammzellen. Insbesondere seien sie, wie Stammzellen, zur Tumorentstehung, Progression und Rezidivbildung in der Lage (Galli et al. 2004). Von einigen Autoren werden daher auch Marker für Vorläuferzellen wie Stammzellmarker eingesetzt (Korzhevskii & Gilyarov 2008). Wiese et al. (2004) hingegen grenzen die *progenitor cells* von Stammzellen ab. Ein wesentlicher Unterschied bestünde darin, dass Vorläuferzellen multipotent, Stammzellen jedoch pluripotent seien. Tatsächlich existiere keine einheitliche Definition der Begrifflichkeiten (Polyak & Hahn 2006) und viele Autoren unterstreichen die Möglichkeit der fließenden Übergänge. Eine Vorläuferzelle könne durchaus im Verlauf Fähigkeiten und Funktionen einer Stammzelle anreichern (Charles & Holland 2009, Galli et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen signifikanten Anstieg von Nestin-Expression beim GBM im Vergleich zu den Astrozytomen WHO-Grad II & III. Beim Vergleich zwischen Erst-OP und 1. Rezidiv sank die Nestin-Expression tendentiell, unabhängig vom Therapieregime. Die proportionale Zunahme dieser Antigen-Expression zur Malignität des Tumors bestätigen Schiffer et al. (2010).

Von einer Gegenüberstellung von GFAP und Nestin beim GBM berichten Molina et al. (2010). Sie stellten in ihren Untersuchungen fest, dass sog. *invasive cells* in der Peripherie eines GBMs stark Nestin-positiv seien. *Core cells* wiederum, die sich mittig in der

Tumormasse befanden, hohe GFAP-Expression zeigten. Prestegarden et al. (2010) beschrieben ebenfalls migrierende Zellen in Tumorausläufern, die hohe Expression von Nestin aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Studien decken sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. Persano et al. (2011) hingegen beschrieben Nestin-positive Zellen in der zentralen Tumorregion eines GBMs und differenziertere Zellen in der Peripherie.

Im überwiegenden Teil der aktuellen Literatur wird mit Maus- oder Rattenmodellen gearbeitet. Ein praktischer Vorteil bei diesem Vorgehen ist, dass bei Gewebeproben Querschnitte des kompletten Gehirns auf einem Objektträger aufgebracht werden können. So wird eine genauere Beobachtung von Infiltrationszonen und Migrationsverhalten von Zellen möglich. Die menschlichen Gewebsschnitte, die für die vorliegende Arbeit untersucht wurden, zeigen jeweils nur einen Ausschnitt eines Tumors und verfügten leider nicht einheitlich über eine Infiltrationszone, sodass eine statistische Untersuchung hier entfiel. Es sei jedoch vermerkt, dass Nestin auf Schnitten mit vorhandener Infiltrationszone dort fokal auch deutlich höher exprimiert wurde und sich Nestin-exprimierende Zellen oft perivaskulär ansiedelten.

Wie bereits erwähnt, vermutet man Tumorstammzellen sowohl als Ursache für die Entstehung eines GBMs als auch für die Ausbildung von Rezidiven und Resistenzentwicklung unter RCT (Fatoo et al. 2011). Pilkington (2005) schreibt dazu: „…although existing therapy that kills non-stem cell tumor cells may reduce the tumor mass, resistant self-renewing tumor stem cells will regenerate the neoplasm“ (Pilkington 2005, S.425). Charles & Holland (2009) wiesen nach, dass Zellen, die RCT-Resistenz zeigten, erhöhte Expression von Anti-Apoptose-Genen aufwiesen, über schnellere DNA-Reparaturmechanismen verfügten und höhere Konzentrationen von MGMT zeigten. Sie vermuten, dass ein Teil der Tumorzellen von vornherein über diese Funktionen verfüge (= CSC), während ein anderer Teil der Tumorzellen erst durch die RCT angeregt werde, sich wie eine Tumorstammzelle zu verhalten bzw. zu entwickeln (Selektionsprozess). Denysenko et al. (2010) bezeichnen CD 133 und Nestin als typische Zelloberflächenmarker für Stammzellen. Allerdings berichten Prestegarden et al. (2010), dass auch CD 133-negative Zellen über Stammzelleigenschaften verfügten. Es sei wichtig, Zellsubpopulationen von Tumoren zu studieren, um biologische Marker identifizieren zu können, die bei der Einschätzung der Prognose helfen und die Entwicklung spezifischer Therapien weiter antreiben können (Park & Rich 2009).

4.1.5 p75

p75 wird in der fetalen Phase in vielen Gehirnzellen exprimiert. Postnatal kann man den Marker noch in Stammzellen der subventrikulären Zone nachweisen, so Young et al. (2004). Auch in der vorliegenden Studie wurde p75 als Stammzellmarker eingesetzt.

Zusammendfassend fiel auf, dass p75-Expression im Gegensatz zu den anderen Markern nur in einem sehr kleinen Anteil von Zellen nachzuweisen war. Dennoch zeigte sich beim GBM ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Astrozytomen WHO-Grad II & III. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Therapieregime zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch ein deutlicher Trend. Mit RCT konnte eine ansteigende Tendenz für p75-Expression nachgewiesen werden, während ohne RCT die Expression sank (z.B. GBM, Fall 13, von 25% auf 4%). Johnston et al. (2007) berichten ebenfalls von stärkerer p75-Expression beim GBM im Gegensatz zu niedrig maligneren Hirntumoren. Zudem stellten sie fest, dass nach einer Downregulation von p75 die Tumoren in ihrem Invasions- und Migrations-verhalten signifikant blockiert gewesen seien.

Ein Hauptproblem bei der Erforschung des GBMs ist seine ja bereits im Namen festgehaltene Heterogenizität und Vielfältigkeit, sowohl von Individum zu Individuum als auch innerhalb eines Patienten während des Krankheitsverlaufs (Hambardzumyan et al. 2008). Denysenko (2010) beobachtete, dass IHC-Marker beim GBM innerhalb von Patientengruppen sehr unterschiedlich exprimiert wurden. Dirks (2001) betont die Dynamik und Entwicklungs-möglichkeiten von Zellen innerhalb eines Tumors im Verlauf. Dabei spiele die unmittelbare Umgebung (*microenvironment*) und insbesondere der Sauerstoffgehalt eine große Rolle (Persano et al. 2011). Dies gelte auch für normale Stammzellen, die sich bevorzugt in perivas-kulären Nischen aufhalten (Ricci-Vitiani et al. 2010). Denysenko et al. (2010) kommentieren dazu: „Features of stem cells are tighly regulated by the microenvironment“ (Denysenko et al. 2010, S. 348).

Gilbertson (2006) und Fatoo et al. (2011) stellen fest, dass CSCs des GBMs viele Gemeinsamkeiten mit normalen Stammzellen teilten. In Zukunft müsse man weiter nach spezifischeren Markern forschen, die eine genauere Trennung der beiden Zelltypen zulasse, um das GBM effektiver bekämpfen zu können.

4.2 Datenlage und Einschränkungen

Zu kritisieren gibt es zunächst sicherlich die geringe Anzahl an Gewebeproben und die damit verbundene niedrige Repräsentativität der Daten. Die Ergebnisse der Auswertungen sind vor diesem Hintergrund zu berücksichtigen. Die Entscheidung, in welcher Form man die Daten überhaupt erst einmal erfasst, war nicht einfach. Beim Sichten der IHC-Schnitte wurde vor allem das typische Merkmal des GBMs deutlich, nämlich die enorme Bandbreite und Vielseitigkeit dieses Tumors. Schon die Zuschnitte der Biopsien variierten stark. In einigen waren noch Infiltrationszonen zu erkennen, andere stammten eher mittig aus einer Tumormasse. Aus der Literatur ersichtlich, wie z.B. bei Molina et al. (2010), ergibt sich jedoch ein Unterschied bezüglich der Antigen-Expression und der Lokalisation im Tumor. Für zukünfige Projekte wäre es daher wünschenswert, Infiltrationszone mit Infiltrationszone und Tumorbulk mit Tumorbulk vegleichen zu können, um präzisere Ergebnisse zu erlangen. Um dennoch eine Auswertung der Daten vornehmen zu können, wurde beschlossen, eine prozentuale Schätzung der Antigen-Expression über den gesamten Schnitt abzugeben. Auch wenn bei der Datenanalyse die Auswertung eine hohe Intrareliabilität aufwies, ist fraglich, ob ein anderer Auswerter die gleichen Prozentangaben gemacht hätte.

Ein weiterer Punkt, der berücksichtigt werden musste, ist, dass es bei IHC-Färbungen zu Kreuzreaktionen kommen kann. Für den Marker Vimentin z.B. war zu beachten, dass er neben undifferenzierten Tumorzellen auch Gefäßendothel anfärbt. Bei der Schätzung des Anteils von Tumorzellen war also zunächst die Menge von mitangefärbten Endothelzellen abzuziehen.

Um den Handlingsfehler klein zu halten, wurde zu jedem Färbevorgang eine Negativkontrolle erstellt und mit nicht mehr als 16 Schnitten gleichzeitig gearbeitet. Zudem wurden sporadisch von einigen Biospieblöcken mehrere Gewebeschnitte im Verlauf mit demselben Marker gefärbt und dann miteinander verglichen, um die Validität zu gewährleisten.

Eine grundsätzliche Kritik an der Grundlagenforschung zum GMB äußern Park & Rich (2009). Wie zuvor erwähnt, halten auch sie das *microenvironment* bei der Entstehung / Aufrechterhaltung eines Tumors für äußerst wichtig. Bei Versuchen *in vitro* würde man die Beziehung zu den umgebenden Zellen jedoch vernachlässigen. „The in vitro environment assumes a reductionistic view that ignores the critical role of the niche interactions with other cells. (…) …in vitro growth may also represent an artifact resulting from physical detachment of the cell from its native microenvironment.“ (Park & Rich 2009, S. 9).

Auch bei Experimenten *in vivo* gibt es zu bemängeln, dass Ergebnisse bei Nagetieren nicht zwingend auf den Menschen zu überttragen sind. Dies treffe umso mehr zu, wenn es sich bei den Versuchstieren um immundefiziente Nager handelte (Hambardzumyan et al. 2008).
Ein letzter die Daten betreffender Punkt, der jedoch positiv auffällt, ist die überdurchschnittlich lange ÜLR der Glioblastompatienten mit adjuvanter RCT von ca. zweieinhalb Jahren. (Es bestanden keine weiteren Angaben zu Vor-OPs oder Besonderheiten bei diesen Patienten. Histologisch lag bei allen ein klassisches GBM vor.)
Dennoch, die Prognose des GBMs ist sehr schlecht und hat sich in den letzten 30 Jahren nicht grundlegend verändert (Deorah 2006). Für die Forschung steht dabei die Frage nach der Genese (*cell of origin*) im Mittelpunkt des Interesses. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Theorien zu Stammzellen diskutiert. Weiterhin bleibt die Abgrenzung zwischen Vorläuferzellen, normalen Stammzellen und CSC schwierig und es stehen keine eindeutigen Marker zur Verfügung. Es besteht daher die Notwendigkeit der weiteren Forschung nach spezifischen Zelloberflächenmarkern als gezielte Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Biopsien glialer Hirntumoren, die im Rahmen der Routinediagnostik der Neuropathologie enstanden, gesammelt und mittels IHC gefärbt und miteinander verglichen. Dabei wurden die Marker: Vimentin, GFAP, p53, Nestin und p75 verwendet. Drei Fragen wurden erörtert:

Wie unterscheidet sich das GBM von anderen glialen Tumoren niedrigerer Malignität?

Besteht ein Unterschied in der Antigen-Expression im Ausgangstumor von der im Rezidiv beim GBM?

Zeigt sich eine Veränderung in der Antigen-Expression beim GBM je nach Therapieregime (OP und RCT vs. OP ohne RCT)?

Die Ergebnisse zeigen, dass das GBM gegenüber den anderen glialen Tumoren signifikant stärkere Expression für Vimentin, Nestin und p75 aufweist. Der Anstieg der GFAP-Expression beim GBM war nur im Vergleich zum Astrozytom WHO-Grad III signifikant. Die Werte für p53 zeigten insgesamt eine starke Streuung. Bei der Gegenüberstellung von Ausgangstumor und Rezidiv sowie Unterteilung nach Therapieregime beim GBM ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dennoch zeichneten sich gewisse Tendenzen ab. Gewebeproben von Patienten mit GBM, die RCT erhielten, zeigten steigende Vimentin- und p75-Expression. Dagegen sank die Expression für GFAP, p53 und Nestin. Die Gewebeproben der Patientengruppe, die keine RCT erhalten hatte, wies rückläufige Expression für Vimentin und p75 auf.

Insgesamt steigt mit zunehmender Malignität glialer Tumoren die Anzahl der als undifferenziert anzusehenden Zellen (Vimentin). Dies gilt auch für die als Vorläuferzellen beschriebenen Zellen (Nestin), sowie die Zellen, die einen Stammzellmarker exprimieren (p75). Innerhalb der Gruppe des GBMs (Erst-OP, 1. Rezidiv, 2. Rezidiv) scheinen Stammzellen durch RCT selektiert zu werden. Des Weiteren tendiert die Anzahl differenzierterer Zellen (GFAP) unter RCT zu sinken, während die Menge der undifferenzierteren Zellen (Vimentin) zunimmt.

Die Ergebnisse wurden vor dem Hintergrund aktueller Forschungsbeiträge diskutiert. Dabei wurde näher auf die mögliche Genese von GBM und Stammzellhypothesen eingegangen.

6. Literaturverzeichnis

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 447, 756-760

Bernabeu RO, Longo FM (2010): The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse denate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis.
BMC Neuroscience 11, 136-147

Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJA (2005): The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. Nature 5, 899-904

Bleau A-M, Howard BM, Taylor LA, Gursel D, Greenfield JP, Lim Tung HY, Holland EC, Boockvar JA (2008): New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. Neurosurg Focus 24, (3-4):E27
DOI:10.3171/FOC/2008/24/3-4/E27

Charles N, Holland EC (2009): Brain tumor treatment increases the number of cancer stem-like cells. Expert Reviews 9, 1447-1449

Dell'Albani P (2008): Stem cell markers in gliomas. Neurochem Res 33, 2407-2415

Denysenko T, Gennero L, Roos MA, Melcarne A, Juenemann C, Faccani G, Morra I, Cavallo G, Reguzzi S, Pescarmona G, Ponzetto A (2010): Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies.
Cell Biochem Funct 28, 343-351

Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC (2006): Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: surveillance, epidemiology, and end results program, 1973 to 2001. Neurosurg Focus 20, (4):E1

Dey M, Ulasov IV, Tyler MA, Sonnabend AM, Lesniak MS (2011): Cancer stem cells: the final frontier for glioma virotherapy. Stem Cell Rev 7, 119-129

Dirks PB (2001): Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration. J Neurooncol 53, 203-212

Elek G, Slowik F, Eross L, Toth S, Szabo Z, Balint K (1999): Central neurocytoma with malignant course. Pathology Oncology Research 5, 155-159

Fatoo A, Nanaszko MJ, Allen BB, Mok CL, Bukanova EN, Beyene R, Moliterno JA, Boochvar JA (2011): Understanding the role of tumor stem cells in glioblastoma multiforme: a review article. J Neurooncol 103, 397-408

Fedrigo CA, Grivicich I, Schunemann DP, Chemale IM, dosSantos D, Jacovas T, Boschetti PS, Jotz GP, Filho AB, daRocha AB (2011): Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. Radiation Oncology 6, 156-166

Fomchenko EI, Holland EC (2006): Origins of brain tumors – a disease of stem cells? Nature Clinical Practice Neurology 2, 288-289

Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liau LM, Mischel PS, Nelson SF (2004): Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. Cancer Res 64, 6503-6510

Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A (2006): Stem cells and brain cancer. Cell Death and Differentiation 13, 5-11

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, DeVitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004): Isolation and characterization of tumorgenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res 64, 7011-7021

Giese A, Kucinski T, Knopp U, Goldbrunner R, Hamel W, Mehdorn HM, Tonn JC, Hilt D, Westphal M (2004): Pattern of recurrence following local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) implants in patients with glioblastoma. J Neurooncol 66, 351-360

Gilbertson RJ (2006): Brain tumors provide new clues to the source of cancer stem cells. Cell Cycle 5, 135-137

Hambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC (2008): Glioma formation, cancer stem cells, and Akt signaling. Stem Cell Rev 4, 203-210

Handbuch immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation. Hrsg. von Boenisch T 3. Auflage, Hamburg 2003

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN (2010): Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. British Journal of Cancer 102, 789-795

Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours. Churchhill Livingstone. Hrsg. Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO, Edinburgh 2002

Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, Parney IF, Hempstead BL, Robbins SM, Forsyth PA, Senger, DL (2007): The p75 neurothrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. PlosBiology 5, 1723-1736

Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007): Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. Brain 130, 3336-3341

Kang SK, Park JB, Cha SH (2006): In focus: neural stem cells. Stem Cells and Development 15, 423-435

Kappadakunnel M, Eskin A, Dong J, Nelson SF, Mischel PS, Liau LM, Ngheimphu P, Lai A, Cloughsey TF, Goldin J, Pope WB (2010): Stem cell associated gene expression in glioblastoma multiforme: relationship to survival and the subventricular zone. J Neurooncol 96, 359-367

Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücker E-M, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A (2010): Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. J Neurooncol 12, 389-400

Kondo T (2006): Brain cancer stem-like cells. EJC 42, 1237-1242

Korzhevskii DE, Gilyarov AV (2008): Optimization of a method for the immunocytochemical detection of nestin in paraffin sections of the rat brain. NeurosciBehavPhysiol 38, 135-137

Lamszus K, Günther HS (2010): Glioma stem cells as a target for treatment.
Targ Oncol 5, 211-215

Levin EC, Acharya NK, Sedeyn JC, Venkataraman V, D'Andrea MR, Wang HY, Nagele RG (2009): Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer's disease brain may be part of a generalized dendritic damage repair mechanism. Brain Res 1298, 194-207

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Schreithauer BW, Kleinhues P (2007): The WHO classification of tumors of the central nervous system.
Acta Neuropathol 114, 97-109

Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A (2011): Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. J Neurooncol 103, 317-324

Molina JR, Hayashi Y, Stephens C, Georgescu M-M (2010): Invasive glioblastoma cells aquire stemness and increased Akt activation. Neoplasia 12, 453-463

Nobusawa S, Watanabe T, Kleinhues P, Ohgaki H (2009): IDH 1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res 15, 6002-6007

Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2004): Getting at the root and stem of brain tumors.
Neuron 42, 885-888

Park DM, Rich JN (2009): Biology of glioma cancer stem cells. Mol Cells 28, 7-12

Panagiotakos G, Tabar V (2007): Brain tumor stem cells.
Curr Neurol Neurosci Rep 7, 215-220

Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G (2011): The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. ScientificWorldJournal 11, 1829-1841

Pilkington GJ (2005): Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. Cell Prolif 38, 423-433

Polyak K, Hahn WC (2006): Roots and stems: stem cells in cancer. Nature Medicine 11, 298-300

Prados M, Cloughesy T, Samant M, Fang L, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WKA, Paleologogs N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Das A, Friedman HS (2001): Response as a predictor of survival in patients with recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. J Neurooncol 13, 143-151

Prestegarden L, Svendsen A, Wang J, Sleire L, Skaftnesmo KO, Bjerkvig R, Yan T, Askland L, Persson A, Sakariassen PO, Enger PO (2010): Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. Cancer Res 70, 4274-4278

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, DeMaria R (2010): Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. Nature 468, 824-828

Rich JN (2007): Cancer stem cells in radiation resistance. Cancer Res 67, 8980-8984

Rieske P, Golanska E, Zakrzewska M, Piaskowski S, Hulas-Bigoszewska K, Wolanczyk M, Szybka M, Witusik-Perkowska M, Jaskolski DJ, Zakrzewski K, Biernat W, Krynska B, Liberski PP (2009): Arrested neural and advanced mesenchymal differentiation of glioblastoma cells – comparative study with neural progenitors. BMC Cancer 9:54 DOI:10.1186/1471-2407-9-54

Rock K, McArdle O, Forde P, Dunne M, Fitzpatrick D, O'Neill B, Faul C (2012): A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme – the validation in a non-trial population of the results of a randomised phase III clinical trial: Has a more radical approach improved survival? BJR 85, 729-733

Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M (2010): On the origin and growth of gliomas. Anticancer Research 30, 1977-1999

The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.
Nature 455, 1061-1068

Visvader JE (2011): Cells of origin in cancer. Nature 469, 314-322

Wang J, Miletic H, Sakariassen PO, Huszthy PC, Jacobsen H, Brekka N, Li X, Zhao P, Mork S, Chekenya M, Bjerkvig R, Enger PO (2009): A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. BMC Cancer 9, 465-477

Wang L, Rahn JJ, Lun X, Sun B, Kelly JJP, Weiss S, Robbins SM, Forsyth PA, Senger DL (2008): Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. PlosBiology 6, 2496-2511

Weller M (2008): Chemotherapie von Hirntumoren bei Erwachsenen. Nervenarzt 79, 231-241

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004): Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells?
Cell Mol Life Sci 61, 2510-2522

Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons W (2009): Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. Cancer Res 69, 9157-9159

Young KM, Merson TD, Sotthibundhu A, Coulson EJ, Bartlett BF (2007): p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-resonsive neurogenic precursor cells.
J Neurosci 27, 5146-5155

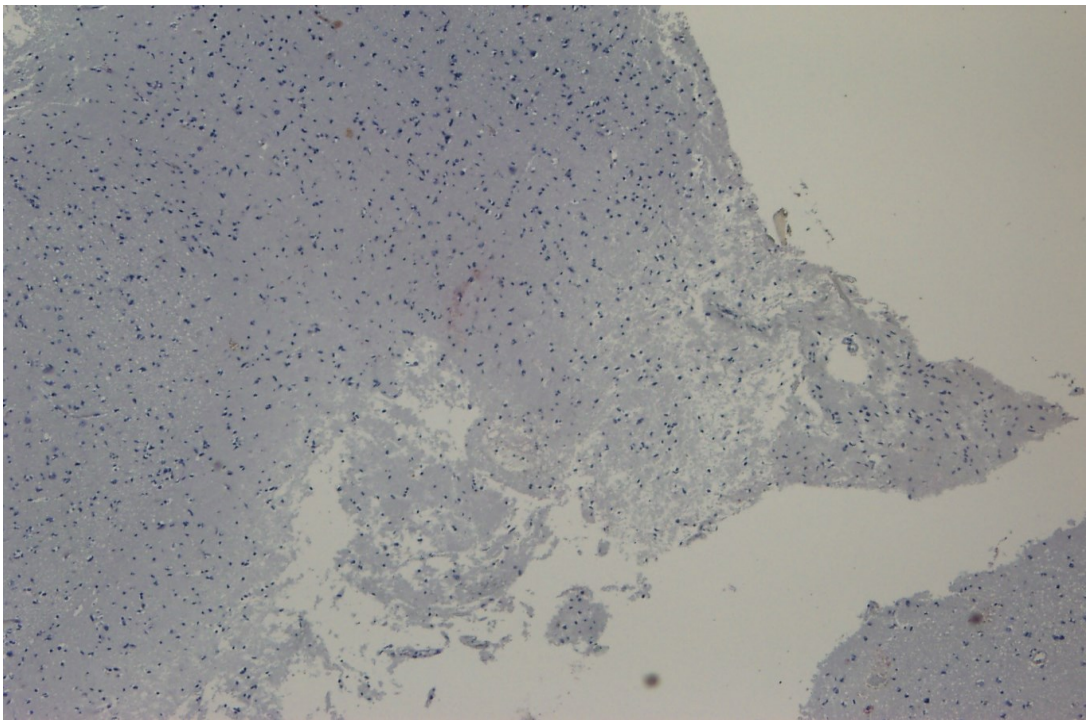
Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004): Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. Oncogene 23, 9392-9400

7. Anhang

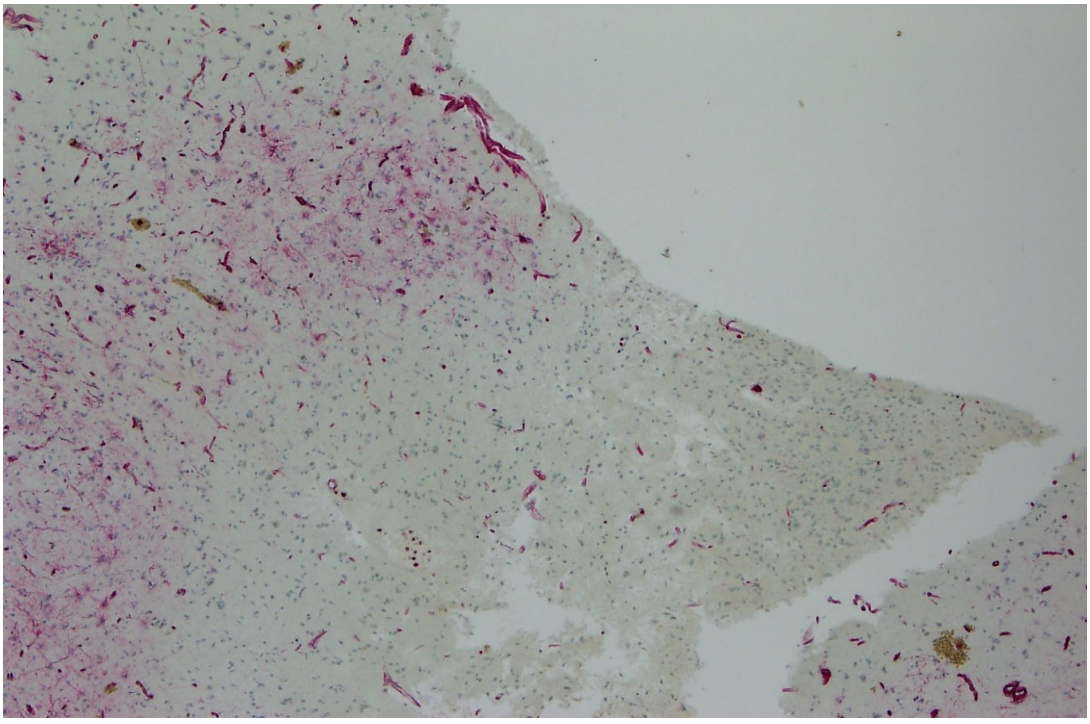
7.1 Abbildung einiger ausgewählter Schnitte

Auf den folgenden Seiten sollen die statistischen Ergebnisse noch einmal in Photoaufnahmen ausgewählter Schnitte veranschaulicht werden. Die Schnitte wurden dazu mit einem Kameramikroskop (Mikroskop: *Olympus BX 51*, Kamera: *Olympus DP 71*, Software: *cell^F*) photographiert.

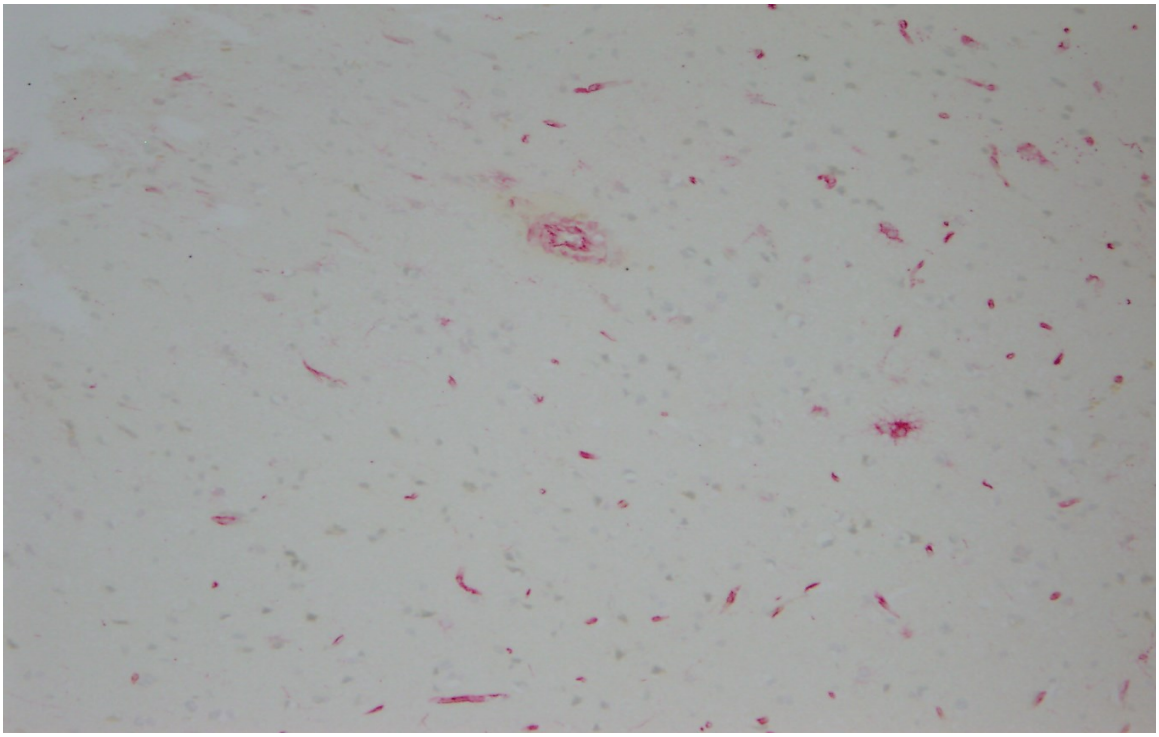
Beispiel für eine Negativkontrolle: Vimentin, Astrozytom WHO-Grad II (Vergrößerung 4x0,13)



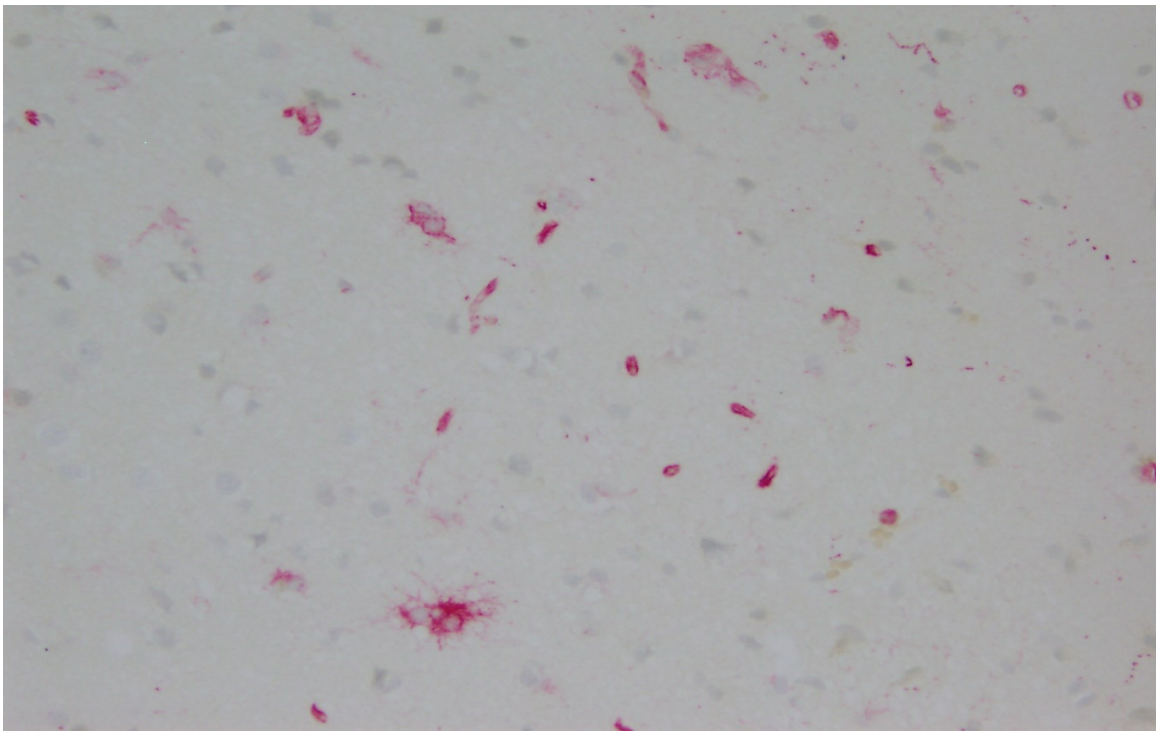
Positivkontrolle: Vimentin (Vergrößerung 4x0,13)



Vimentin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **Astrozytom WHO-Grad II** (Fall 10: 0,5%)

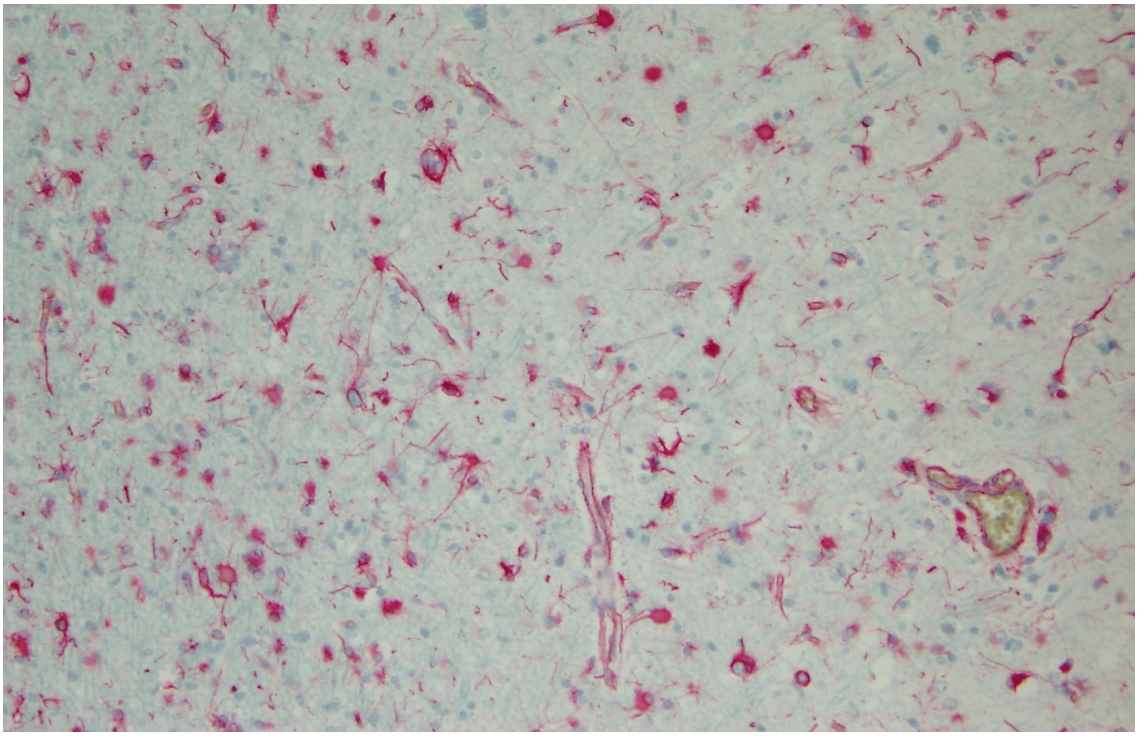


(Vergrößerung 10x0,3)

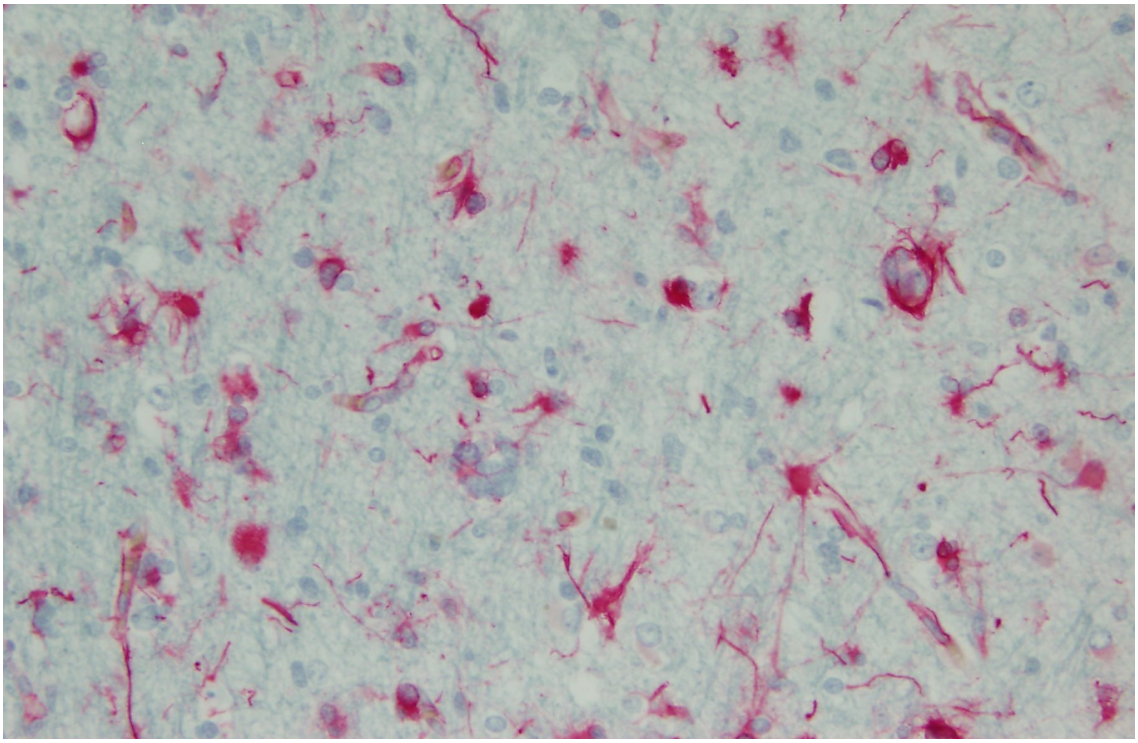


(Vergrößerung 20x0,5)

Vimentin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **Astrozytom WHO-Grad III** (Fall 7: 50%)

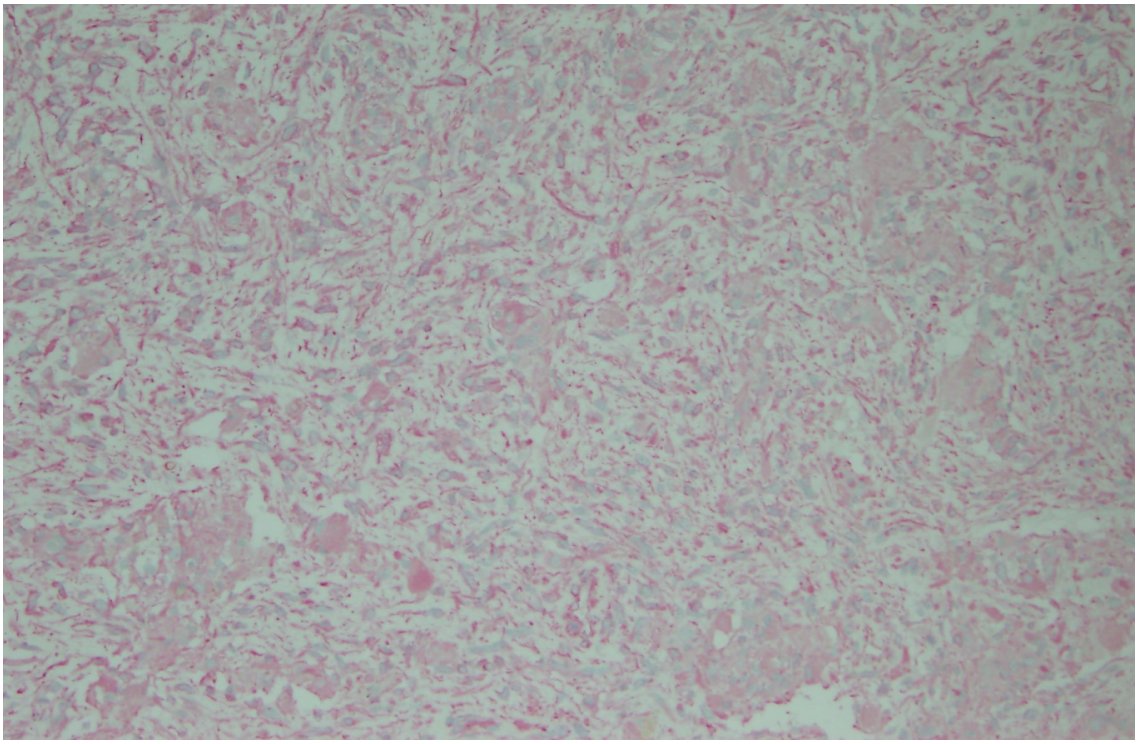


(Vergrößerung 10x0,3)

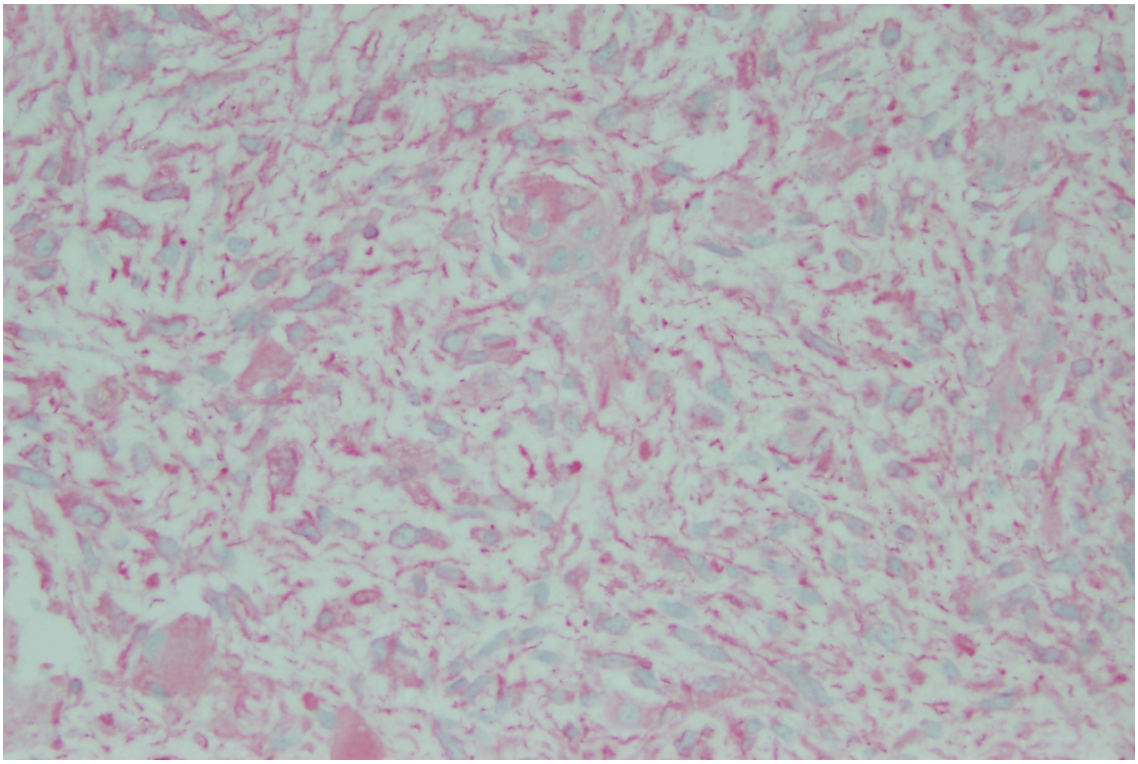


(Vergrößerung 20x0,5)

Vimentin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **GBM** (Erstdiagn., Fall 10: 80%)

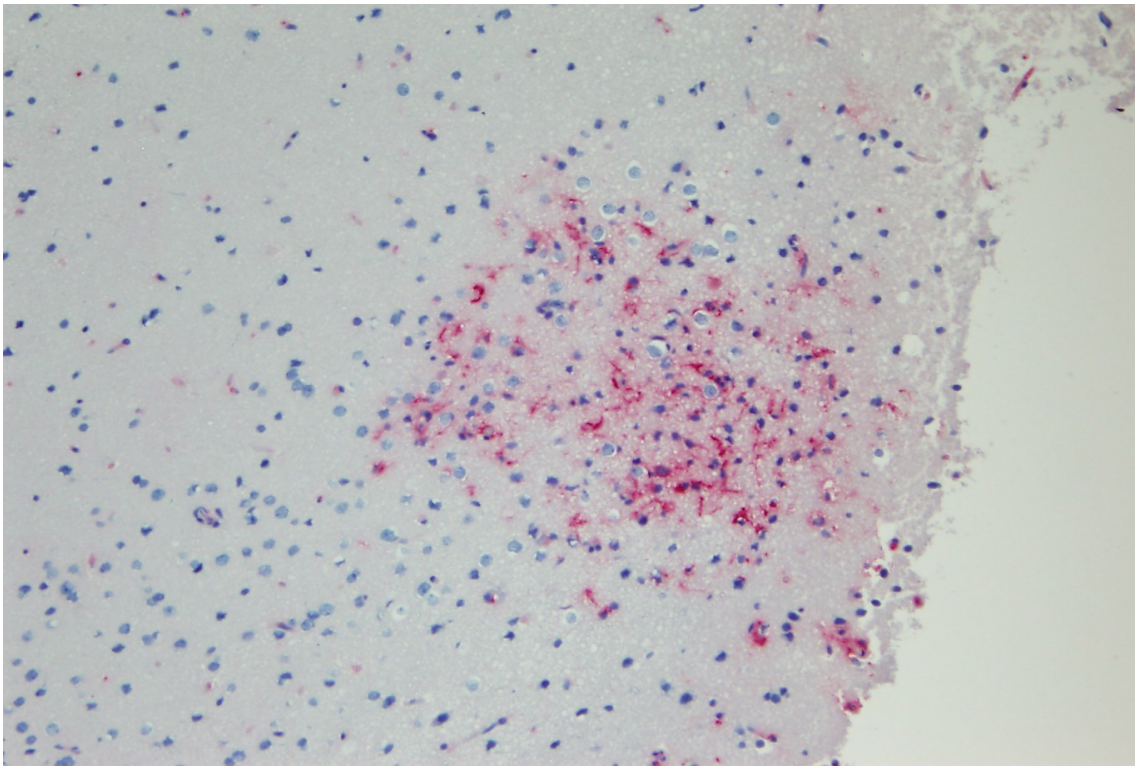


(Vergrößerung 10x0,3)

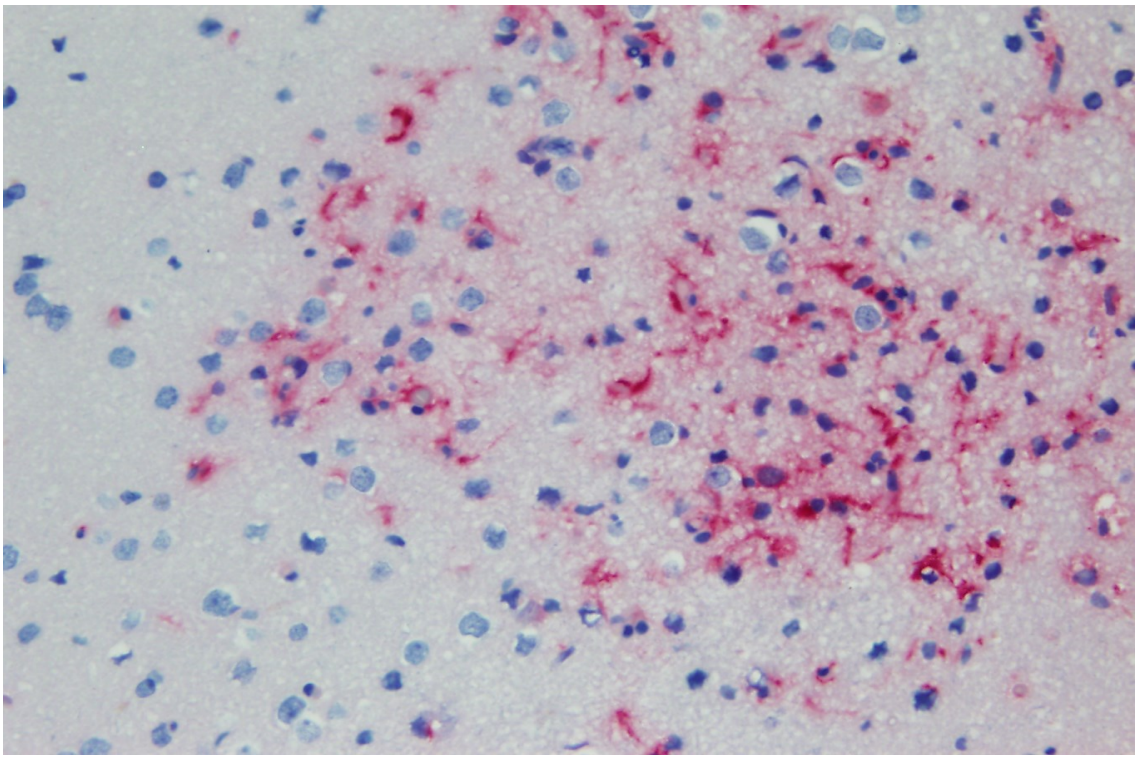


(Vergrößerung 20x0,5)

Nestin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **Astrozytom WHO-Grad II** (Fall 12: 20%)

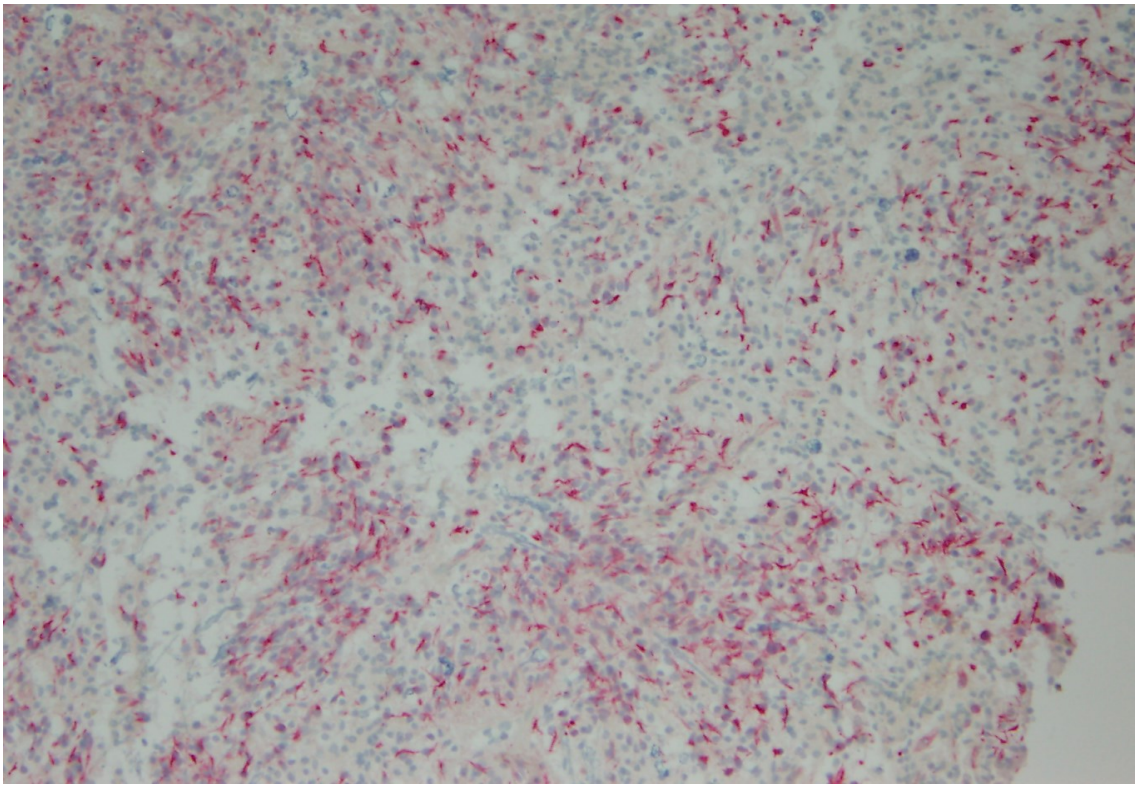


(Vergrößerung 10x0,3)

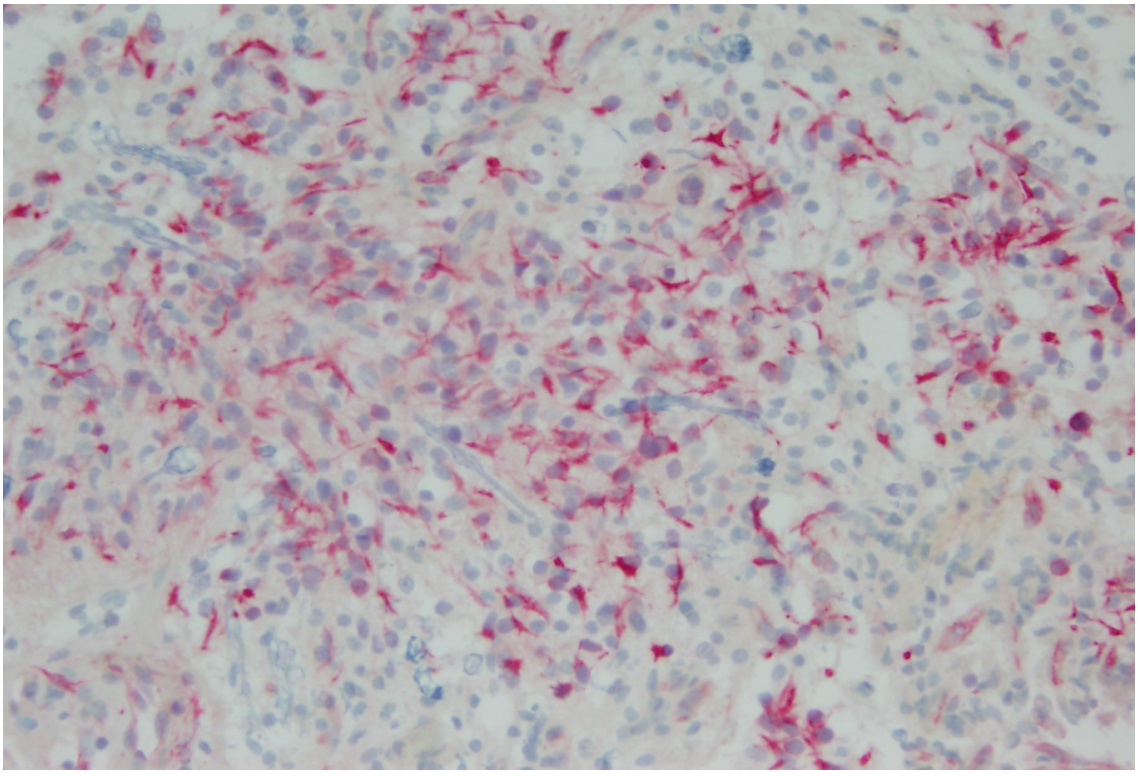


(Vergrößerung 20x0,5)

Nestin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **Astrozytom WHO-Grad III** (Fall 5: 66%)

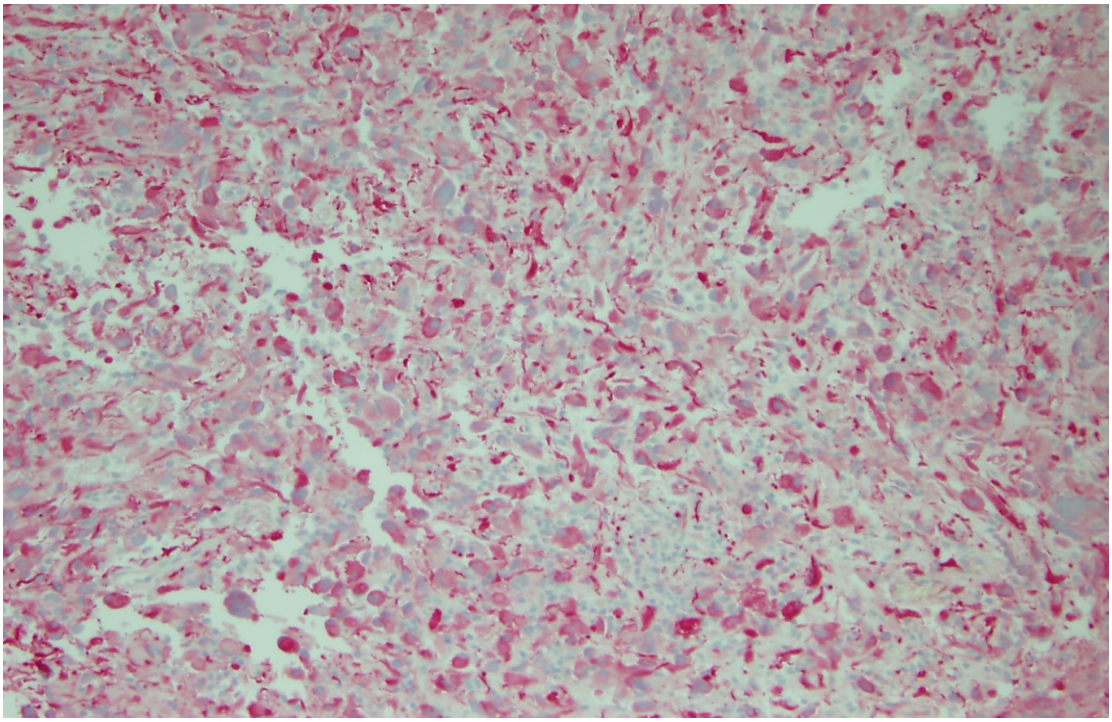


(Vergrößerung 10x0,3)

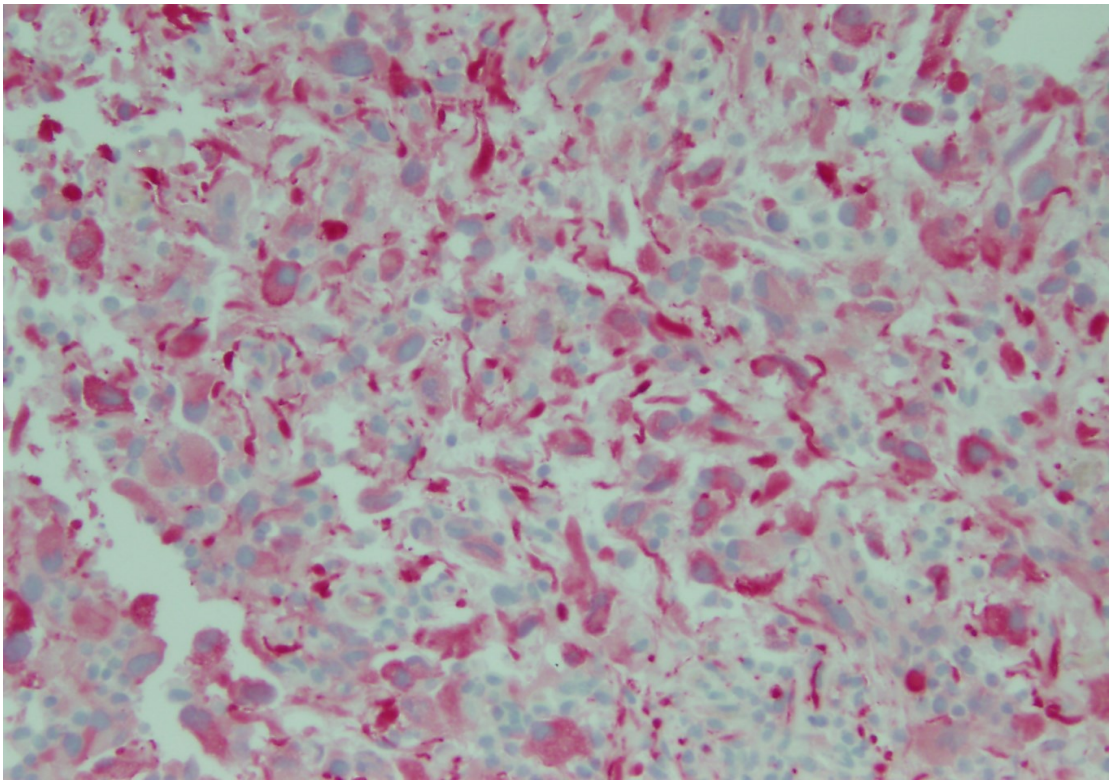


(Vergrößerung 20x0,5)

Nestin-Expression steigt mit Malignitätsgrad: **GBM** (Erstdiagn., Fall 2: 80%)

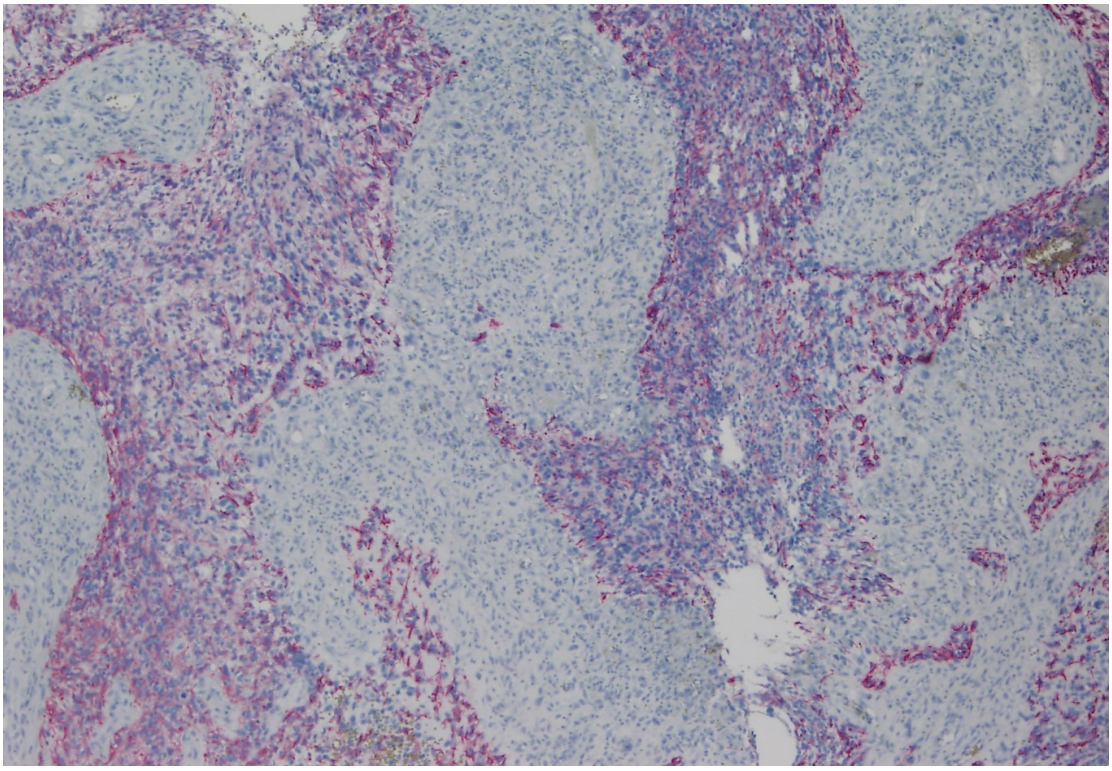


(Vergrößerung 10x0,3)

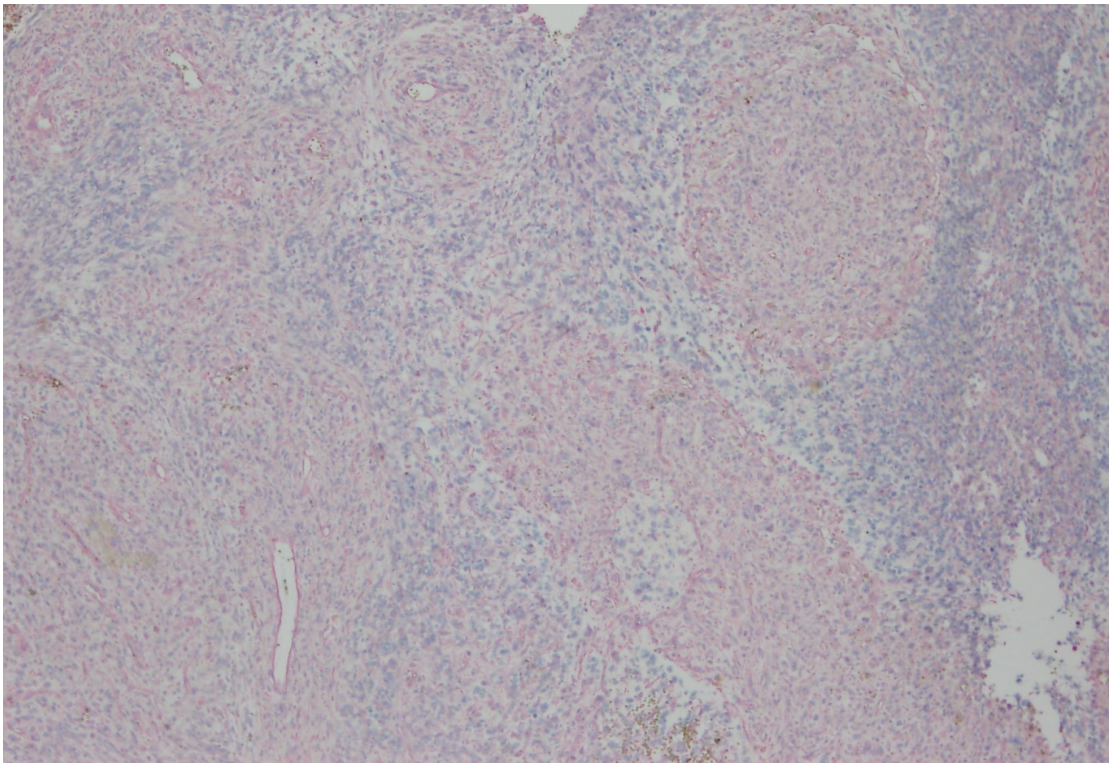


(Vergrößerung 20x0,5)

Inverses Verhalten von GFAP & Vimentin beim GBM (Erstdiagn., Fall 5, Vergrößerung: 4x0,13)

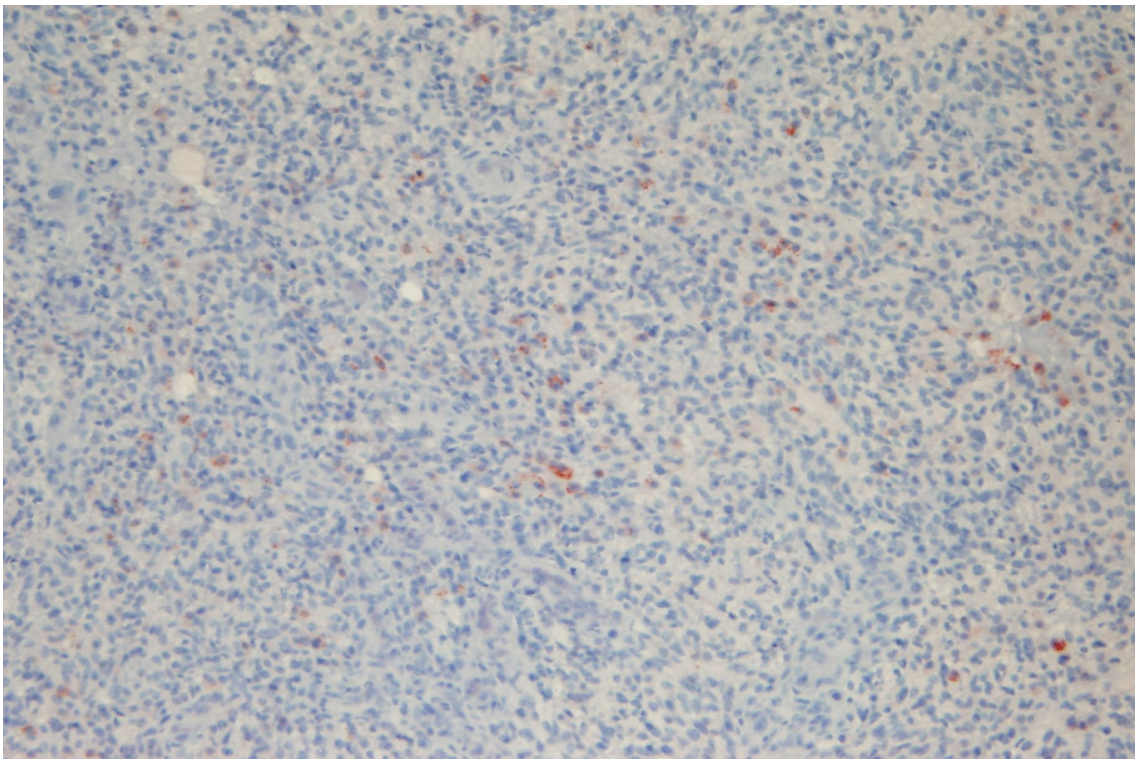


GFAP

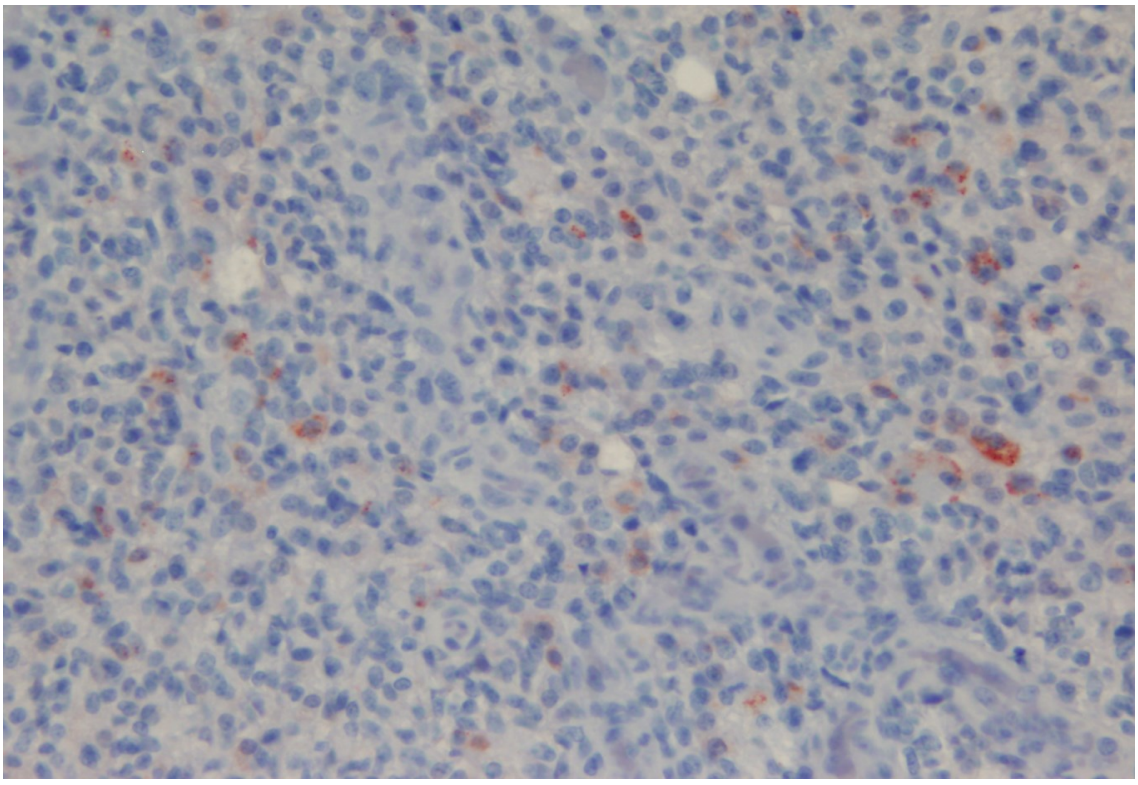


Vimentin

p75-Expression steigt nach Behandlung mit RCT: **GBM vor RCT** (Fall 3, Erstdiagn.: 3%, fokal 5%)

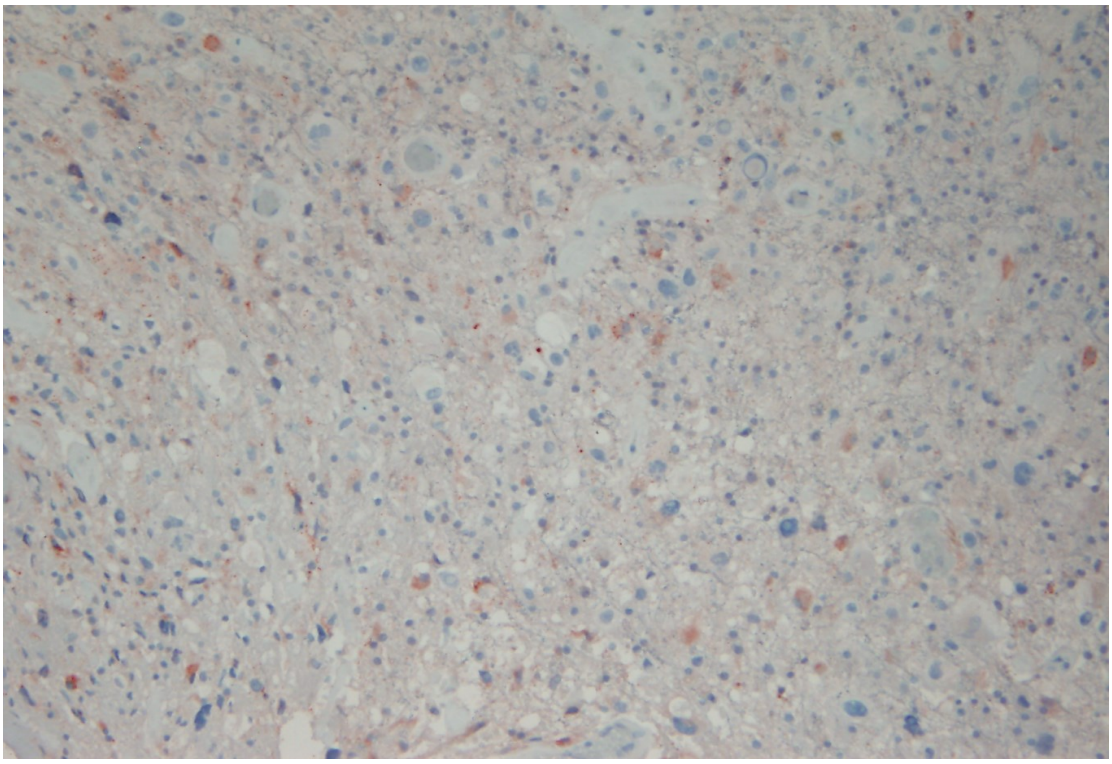


(Vergrößerung 10x0,3)

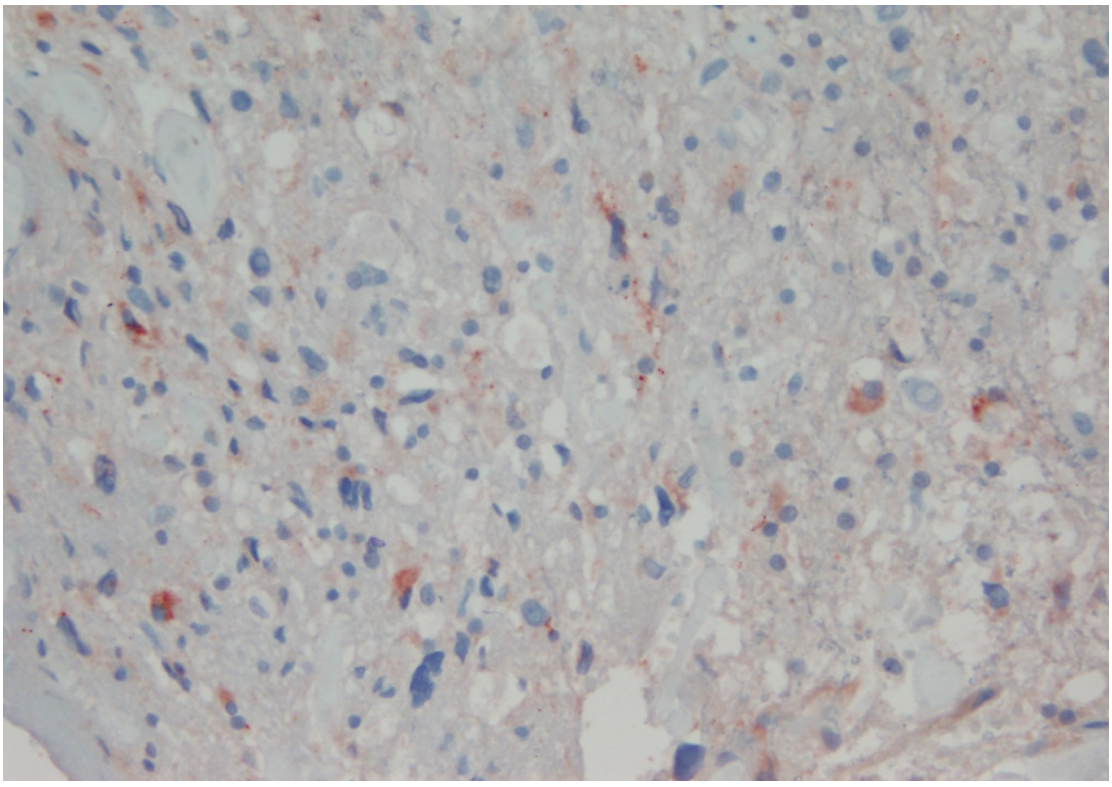


(Vergrößerung 20x0,5)

p75-Expression steigt nach Behandlung mit RCT: **GBM nach RCT** (Fall 3, 1. Rezidiv: 5 %, fokal 10%)



(Vergrößerung 10x0,3)



(Vergrößerung 20x0,5)

7.2 Arbeitsprotokolle und verwendete Chemikalien

Herstellung von Biopsieblöcken im Routinelabor

Das aus operativen Eingriffen gewonnene Biopsiematerial wird über Nacht in 4%igem Formalin fixiert, dann für zwei Stunden gewässert und schließlich mit Hilfe des Einbettautomaten *TP 1020 von Leica* in zwölf Stufen in Paraffin eingebettet. Dabei werden die Präparate zunächst in Isopropanol und Xylol jeweils für 90 Minuten in aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 3x90%, 3x100%, 2x Xylol) eingehängt. Dann erfolgt ein 2-faches Bad in Paraplast. Die Paraffinblöcke werden abschließend gekühlt und archiviert.

HE-Färbung

Schnitte entparaffinieren
(3x5 Min. Xylol, 1x1 Min. Isoxylol, 5x2 Min. absteigende Reihe Isopropanol (100%, 100%, 90%, 70%, 50%), 1x1 Min. Aqua bidest.)

8 Min. Hämalaun
kurz in Aqua bidest. spülen

3x kurz in HCl-Alk. (= salzsäurehaltige Lösung) tauchen
5 Min. unter laufendem Leitungswasser bläuen

5 Min. Eosin
kurz in Aqua bidest. spülen

Schnell aufsteigende Reihe Isopropanol (50%, 70%, 90%), 100% 2x je 1 Min. spülen, Isoxylol kurz, Xylol 5 Min.

Eindeckeln mit wasserfestem Kleber (*DePex)*

Neufuchsin-Chromogen-Substrat (= Entwicklungslösung für Vimentin, GFAP, p53, Nestin)

Zutaten vorher im Routinelabor abwiegen (Naphthol aus Gefrierfach)

Becherglas mit 50ml TBS pH 8,8 (Verdünnen von 10xTBS pH 8,8) bereitstellen

I 20-25 mg Levamisol in 1ml Aqua bidest.

II 14 mg Naphthol-AS-Biphosphat
+ 300 Mikroliter Dimethylformamid

III 10mg Natriumnitrit
+ 250 Mikroliter Aqua bidest.
+ 100 Mikroliter Neufuchsin (auf Pipettenspitze aufpassen – färbt stark ab!)

Zutaten in Epis 2 Min. ruhen lassen

I, II und III zum TBS geben und pH prüfen, evtl. titrieren

Lösung über Filter in Küvette mit Gewebsschnitten träufeln und einwirken lassen

(abschließend Lösung über weißen Kanister unterm Abzug entsorgen)

Schnitte mehrmals kurz in Aqua bidest. spülen

Kurz in Hämalaun gegenfärben (ca. 20 Sek.)

Mehrmals kurz in Leitungswasser spülen

Eindeckeln mit wasserlöslichem Kleber (*Immu-Mount*)

AEC (3-Amino-9-EthylCarbazol) (Entwicklungslösung für p75)

Nacheinander 56ml 0,1M Acetatpuffer (pH 5,2) und 4ml AEC-Stammlösung
in Küvette mit Schnitten filtrieren.
Zuletzt 20 Mikrogramm Wasserstoffperoxid dazugeben & nach mikroskopischer Kontrolle, ca. 20 Min., entwickeln (Entwicklungslösung gesondert entsorgen)

Spülen mit Aqua bidest.

Gegenfärben mit Hämalaun

Spülen in Leitungswasser

Eindeckeln mit wasserlöslichem Kleber (*ImmuMount*)

10xTBS pH 7,6 (für 1 Liter)

60,5g Tris Base
85 g NaCl
In Aqua bidest. lösen

Nicht ganz auf einen Liter auffüllen, sondern vorher mit 30%iger Salzsäure den pH-Wert titrieren

10xTBST (für 1 Liter)

100ml Tris HCl pH 7,8 (Tris-Base mit Salzsäure auf entspr. pH-Wert titrieren)
200ml NaCl (5 molar)
In Aqua bidest. lösen
5 ml Tween 20

Citratpuffer 10mM pH 6 (für 1 Liter)

2,1 g Citronensäure-Monohydrat
In Aqua bidest. lösen

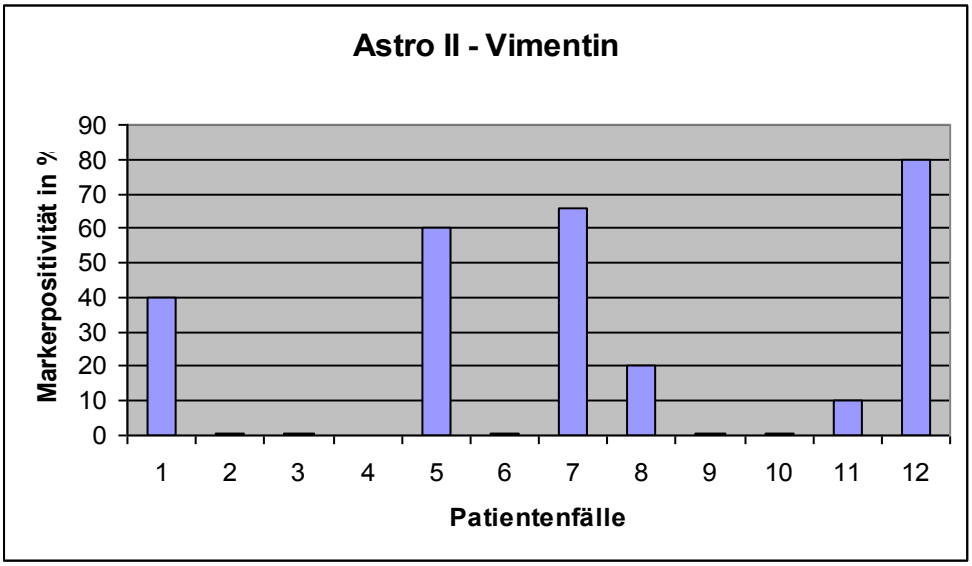
Nicht ganz auf einen Liter auffüllen, sondern vorher mit 10M NaOH, dann mit 1M NaOH pH titrieren

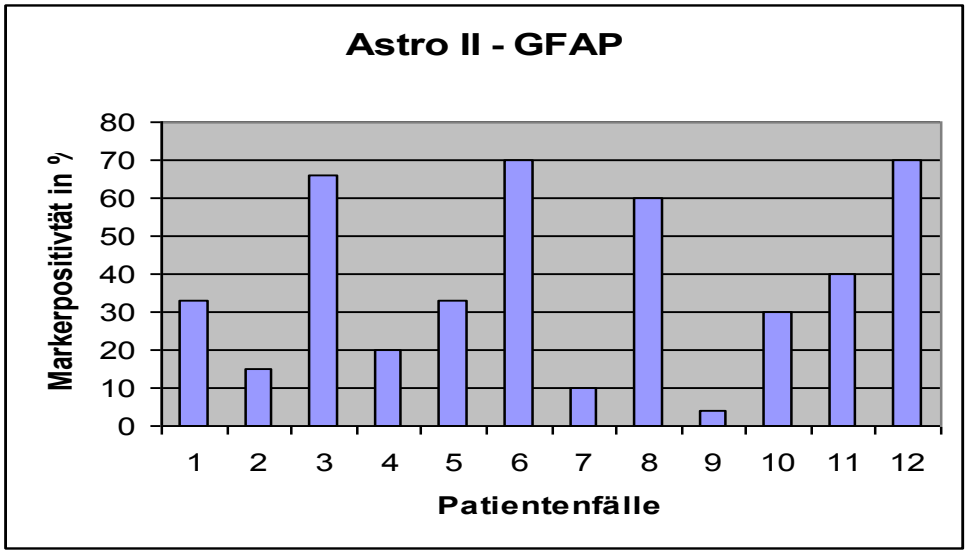
Tris EDTA pH 8 (10mM)

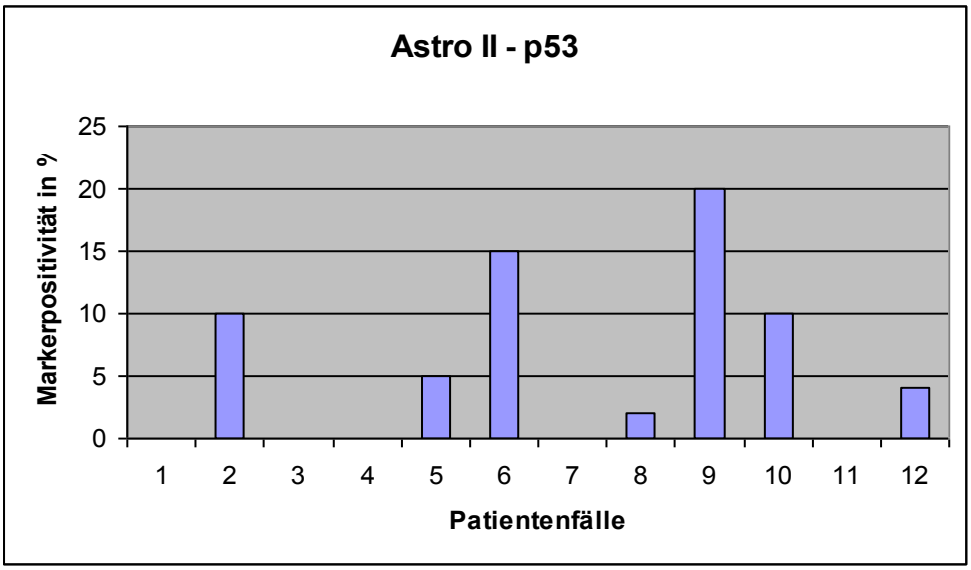
1,21g Tris-Base
0,37g EDTA
mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen, auf pH 8 titrieren
0,5ml Tween zugeben, gut mischen

7.3 Rohdaten

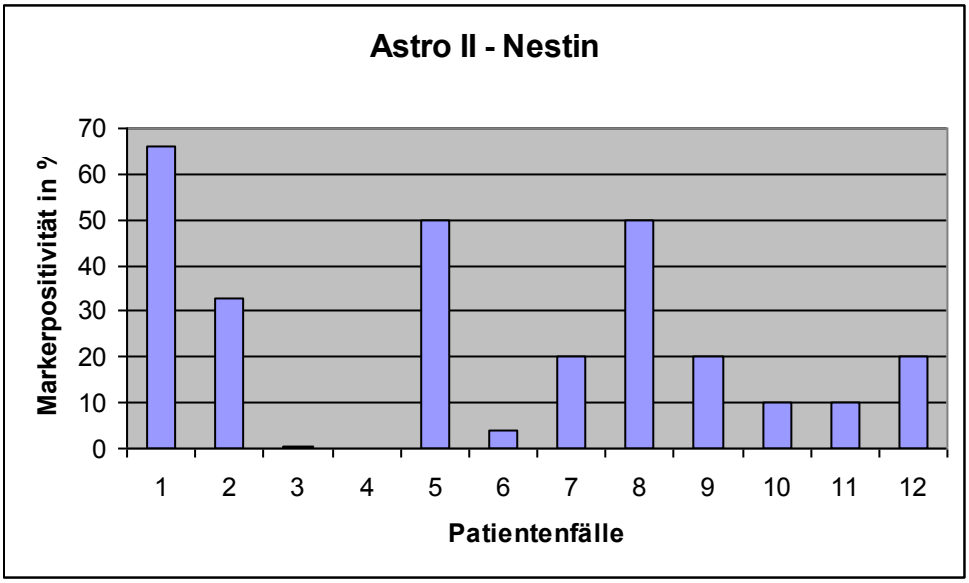
Proben, deren Anfärbung mit unter 1% bewertet wurde (= einzelne Zellen), sind jeweils mit dem Wert 0,5% in die Auflistungen aufgenommen worden. Proben, die keine gefärbten Zellen zeigten sind mit dem Wert 0 festgehalten worden. Proben auf denen Infiltrationszone zu sehen war, sind mit *IZ* gekennzeichnet.


Astro II - Vimentin
Markerpositivität in %
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Patientenfälle

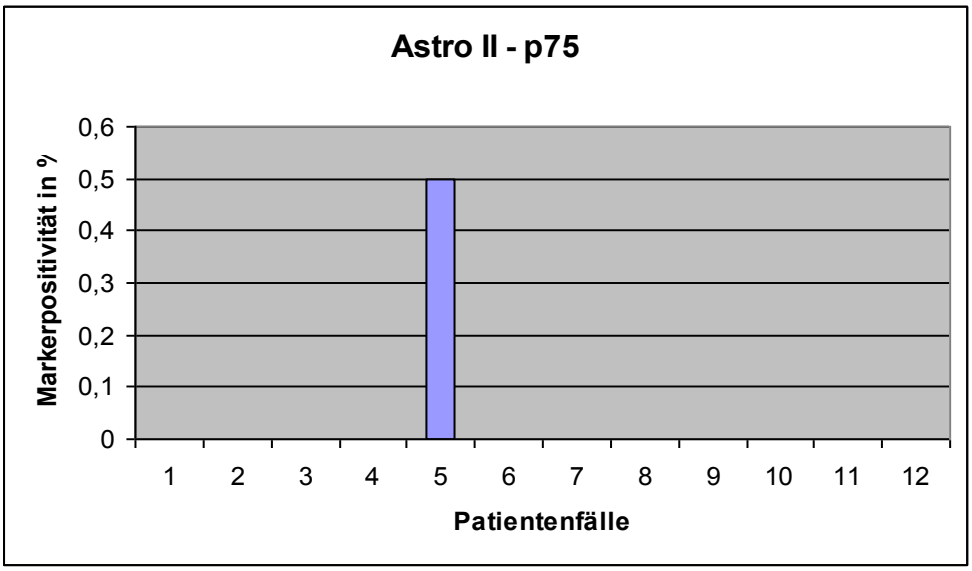

Astro II - GFAP
Markerpositivtät in %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Patientenfälle

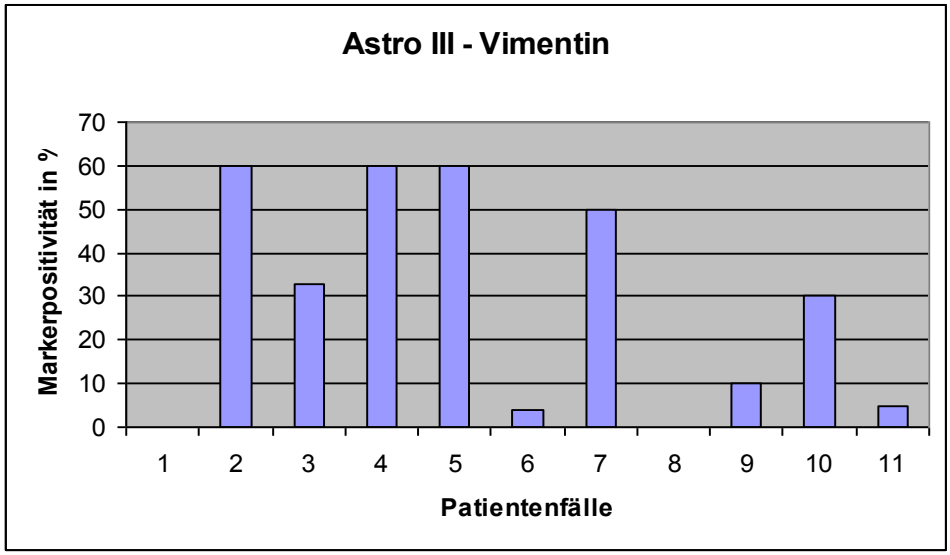

Astro II - p53
Markerpositivität in %
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Patientenfälle

2+6 mit IZ

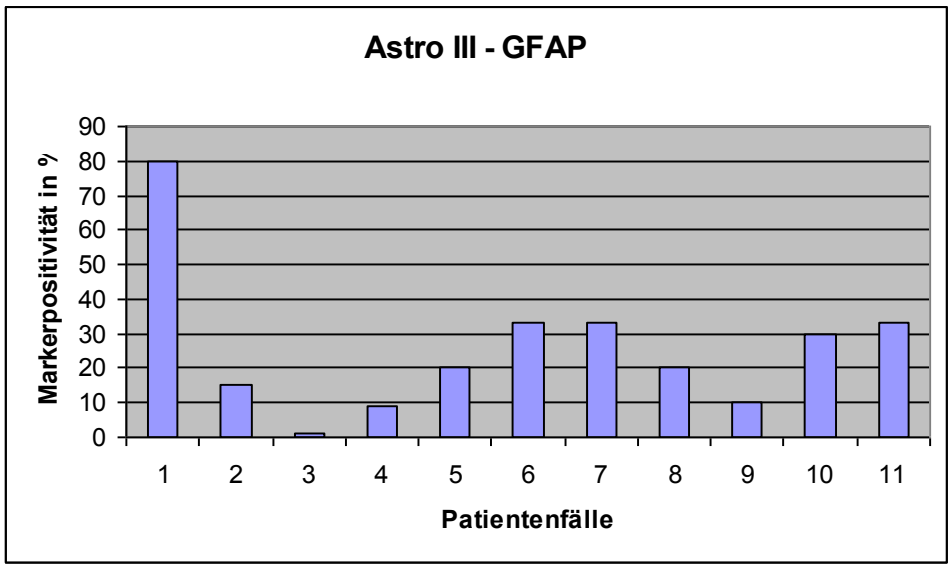

Astro II - Nestin
Markerpositivität in %
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Patientenfälle

2+11 mit IZ

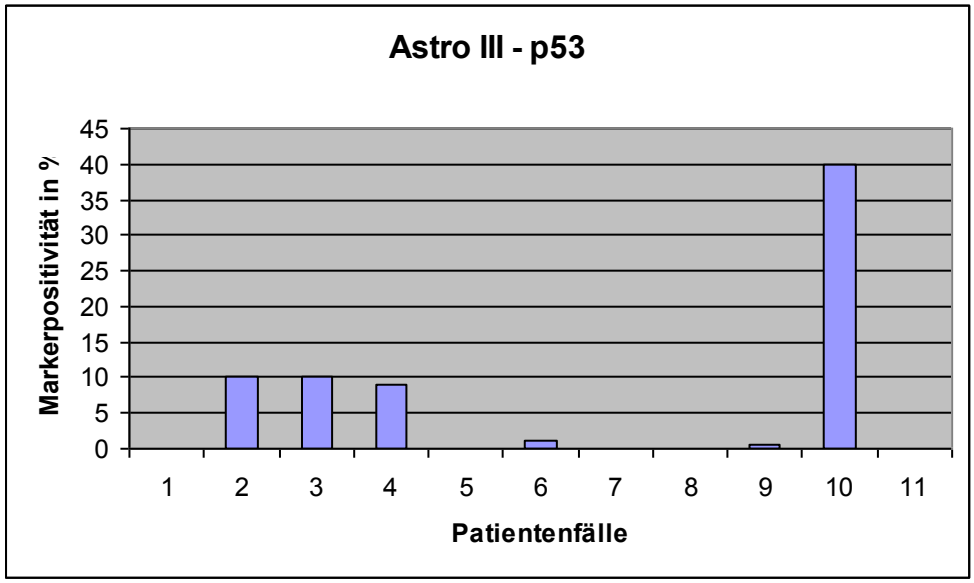

Astro II - p75
Markerpositivität in %
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Patientenfälle



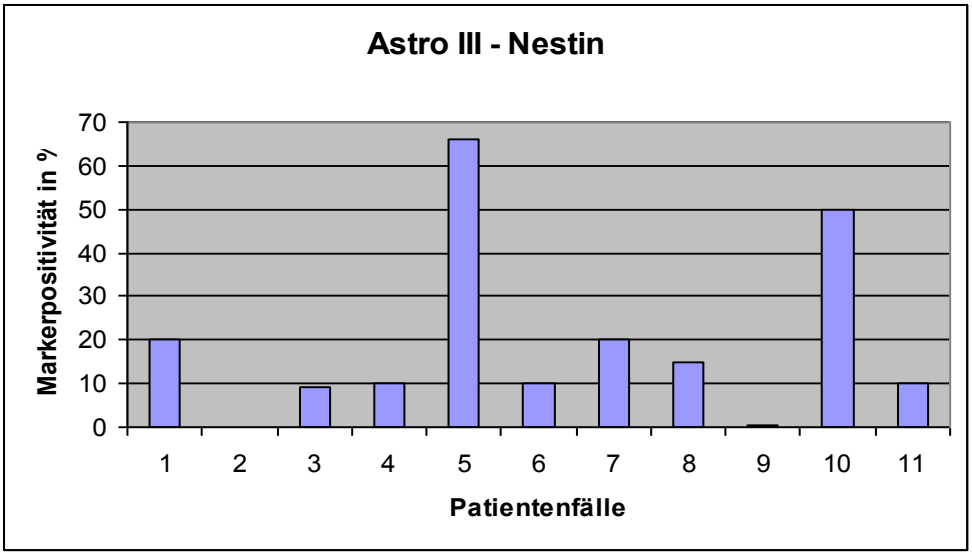
2+3 mit IZ



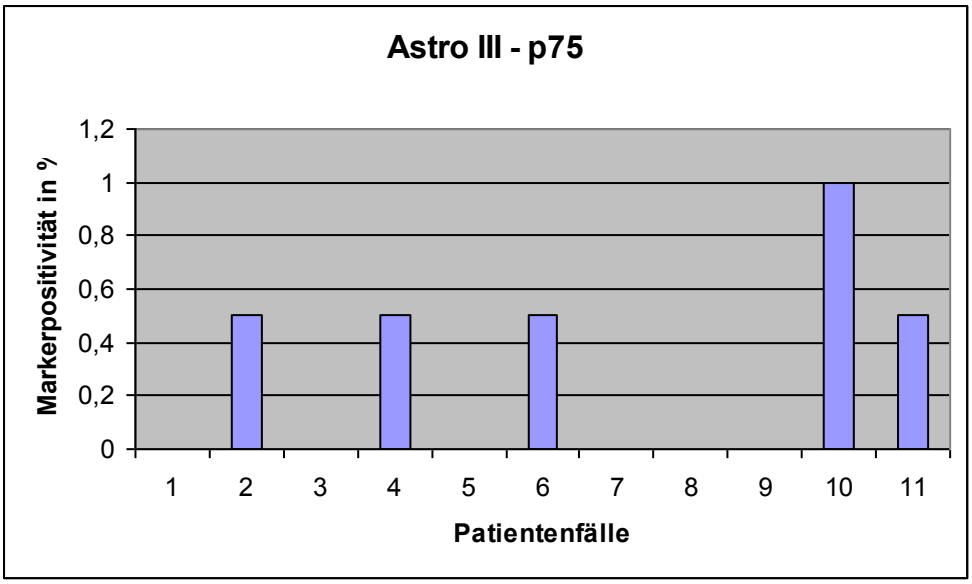
3 mit IZ

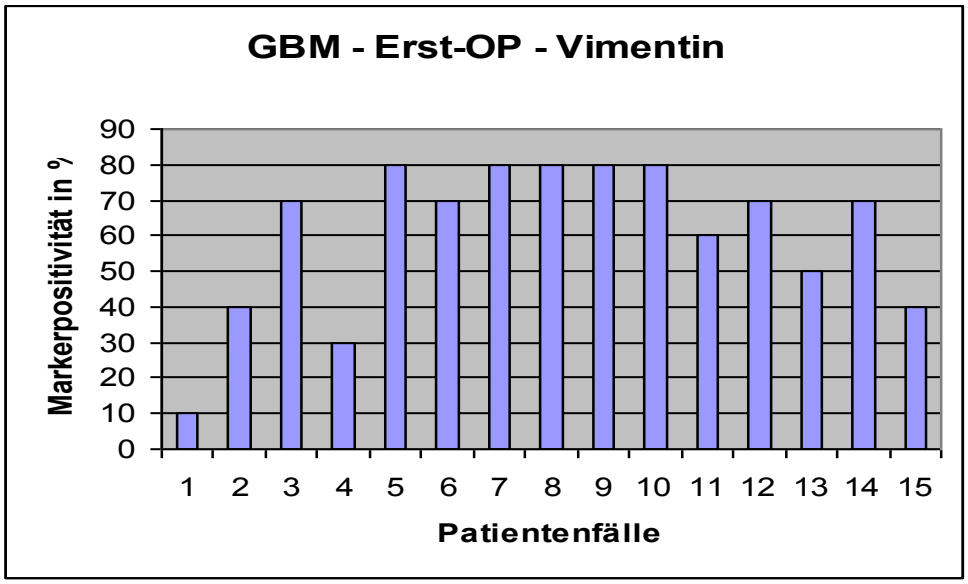


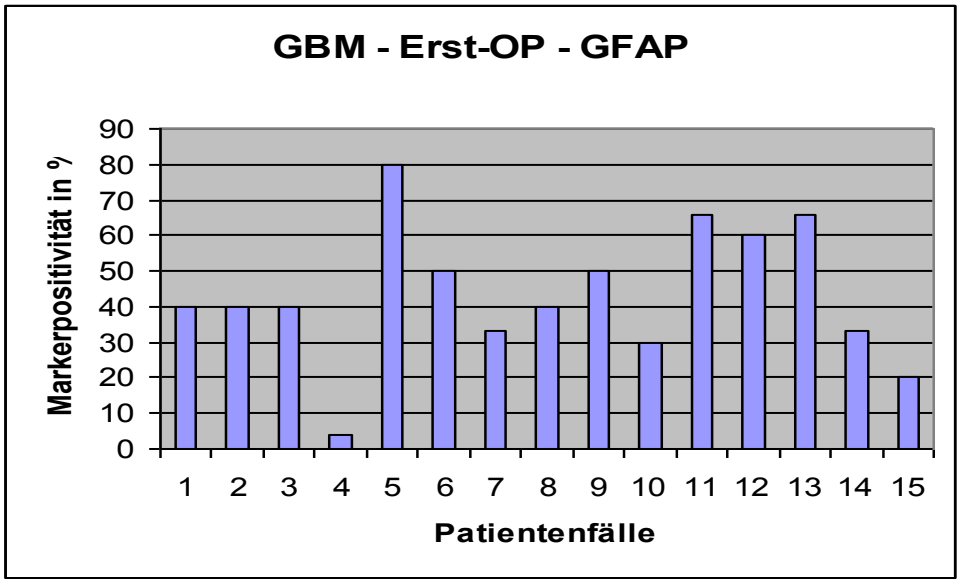
2,3,4 mit IZ

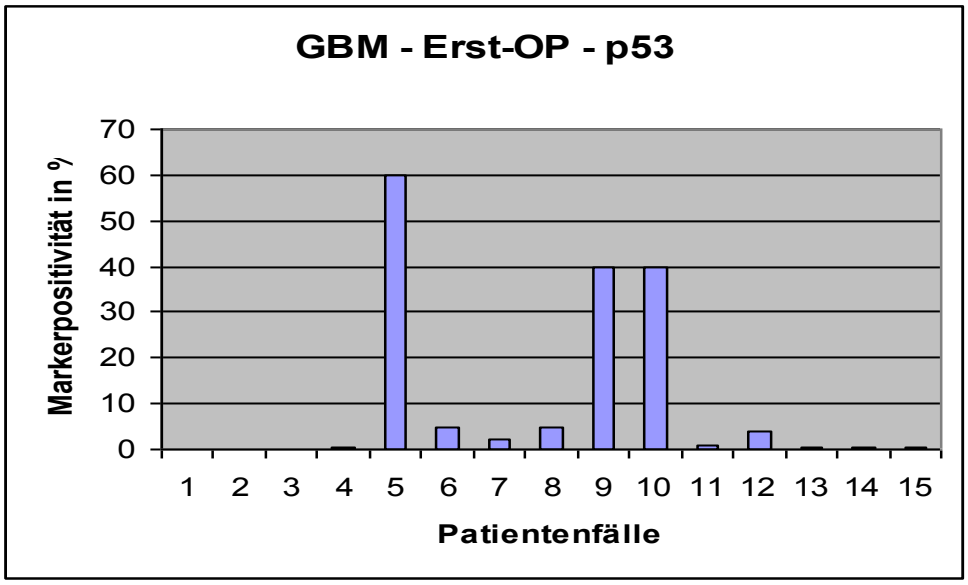

Astro III - Nestin
Markerpositivität in %
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Patientenfälle

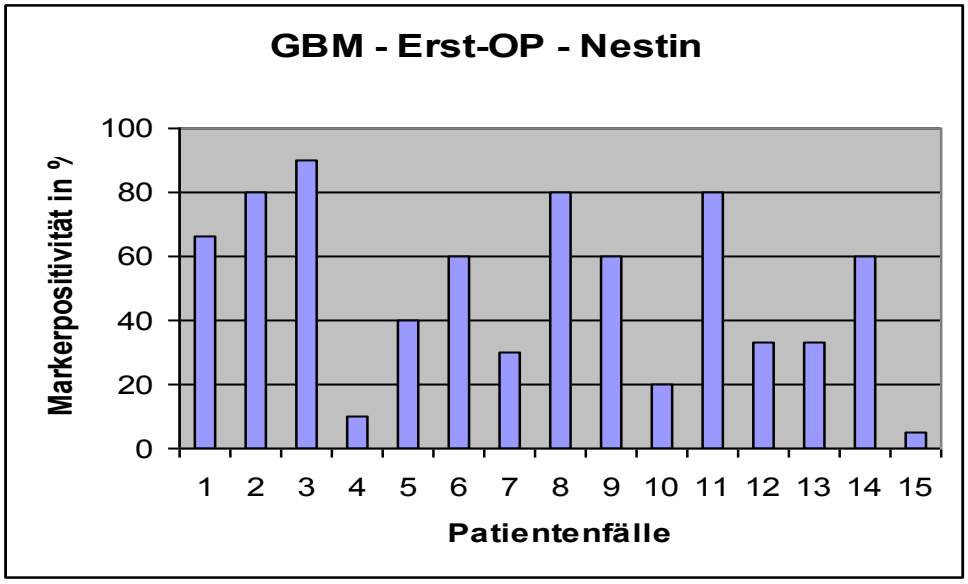
1,4,6,7,8,11 mit


Astro III - p75
Markerpositivität in %
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Patientenfälle

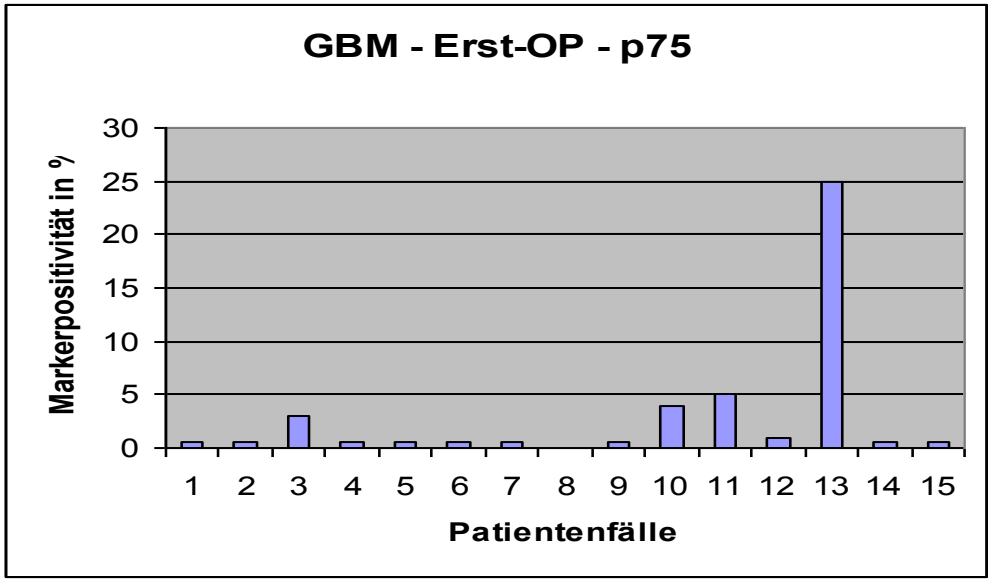

GBM - Erst-OP - Vimentin
Markerpositivität in %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle

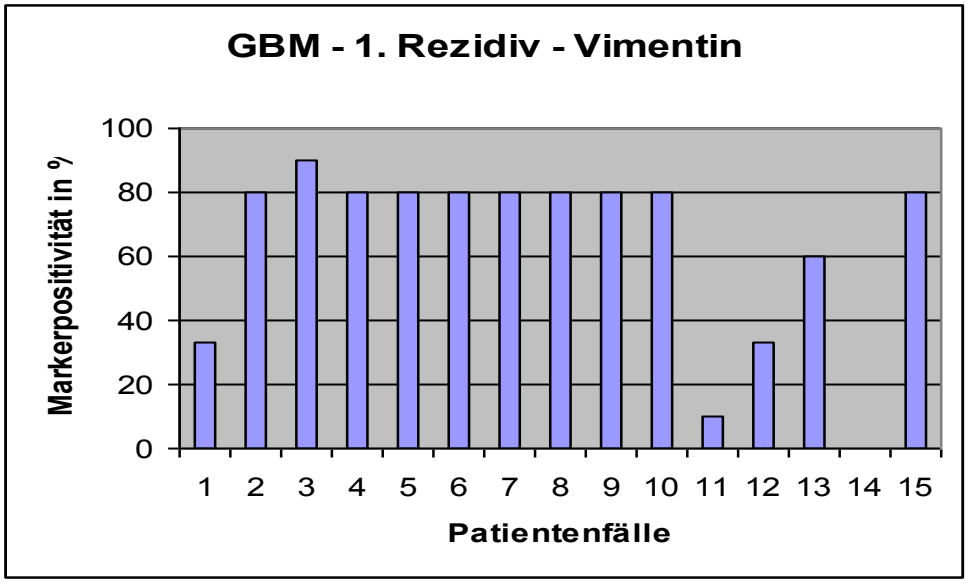

GBM - Erst-OP - GFAP
Markerpositivität in %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle


GBM - Erst-OP - p53
Markerpositivität in %
0
10
20
30
40
50
60
70
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle

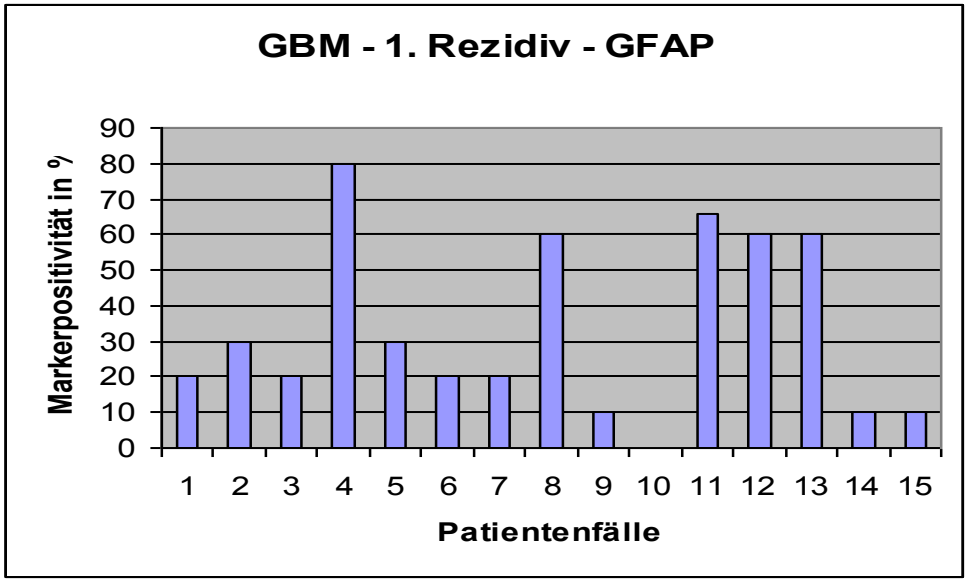

GBM - Erst-OP - Nestin
Markerpositivität in %
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle

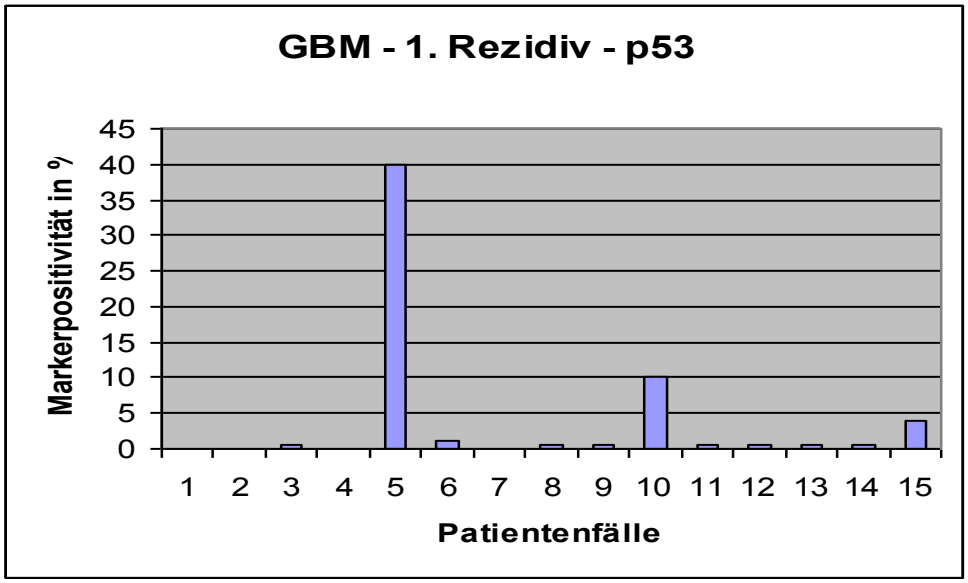
6+7 mit IZ


GBM - Erst-OP - p75
Markerpositivität in %
30
25
20
15
10
5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle

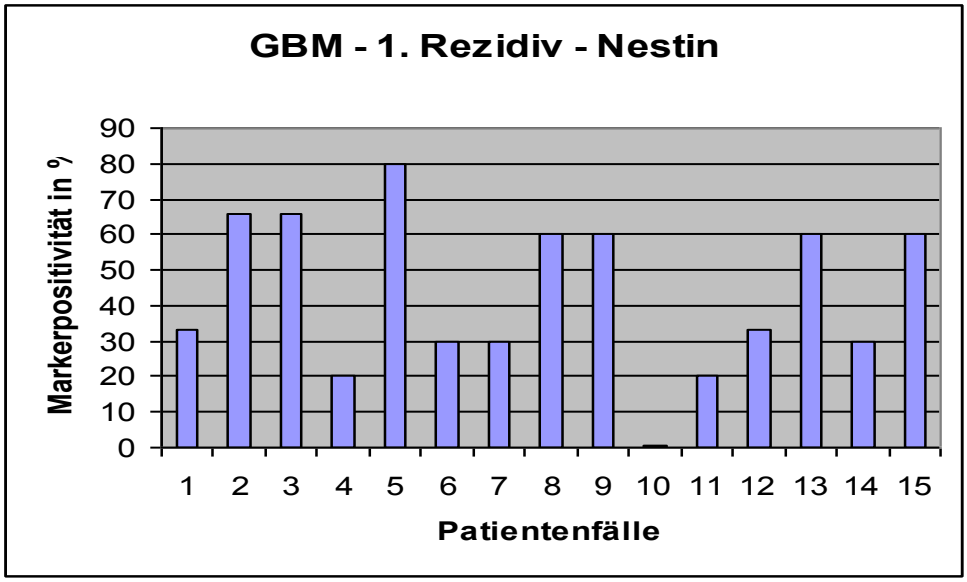


3 mit IZ

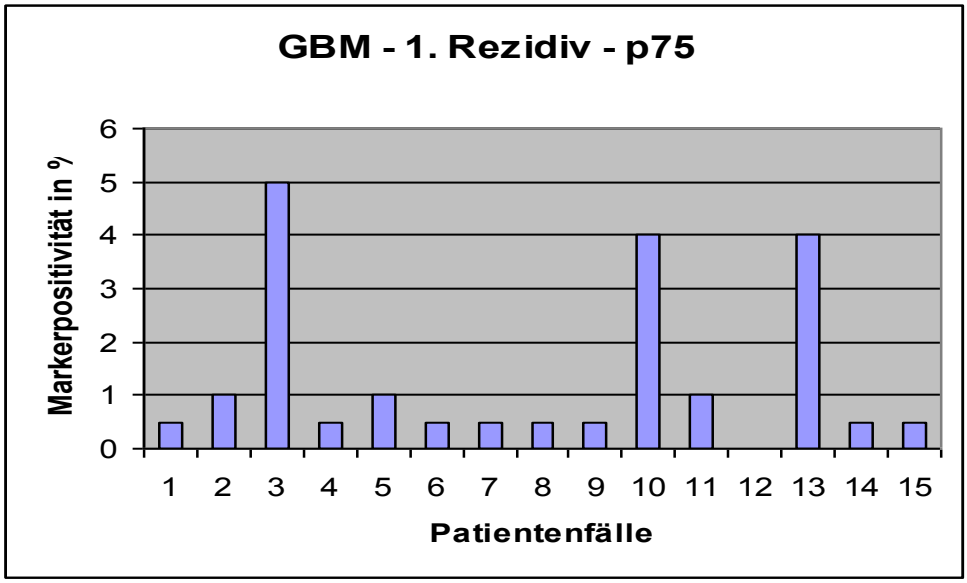


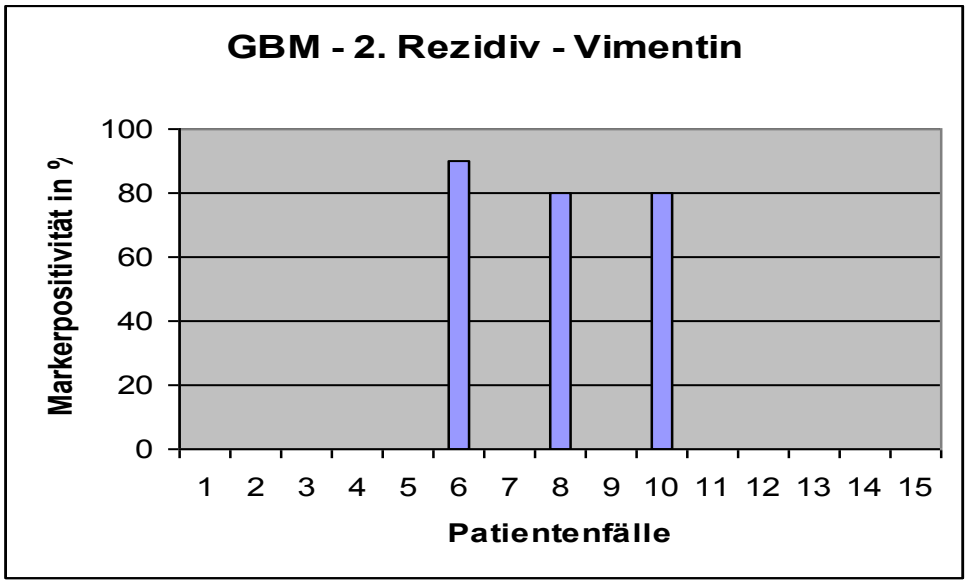


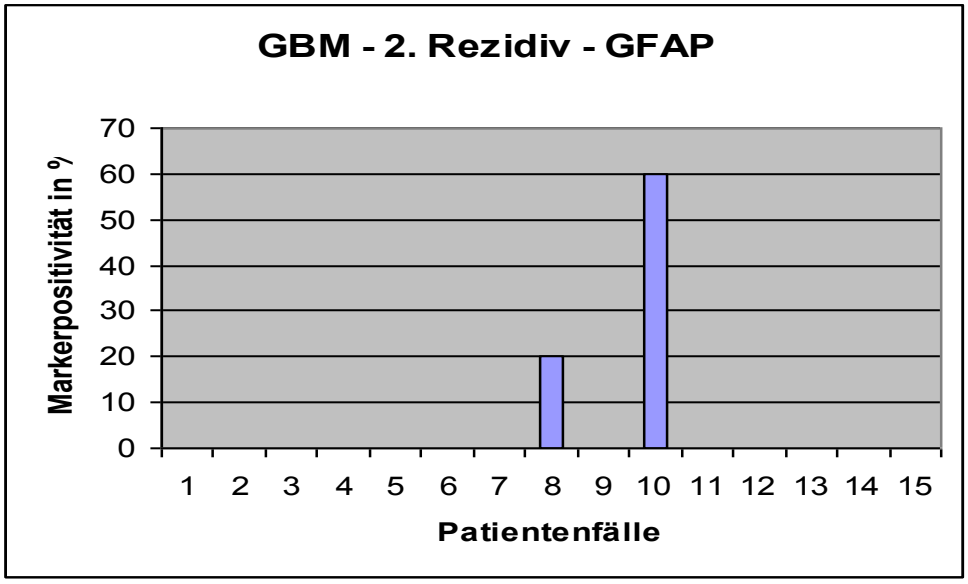
5+9 mit IZ



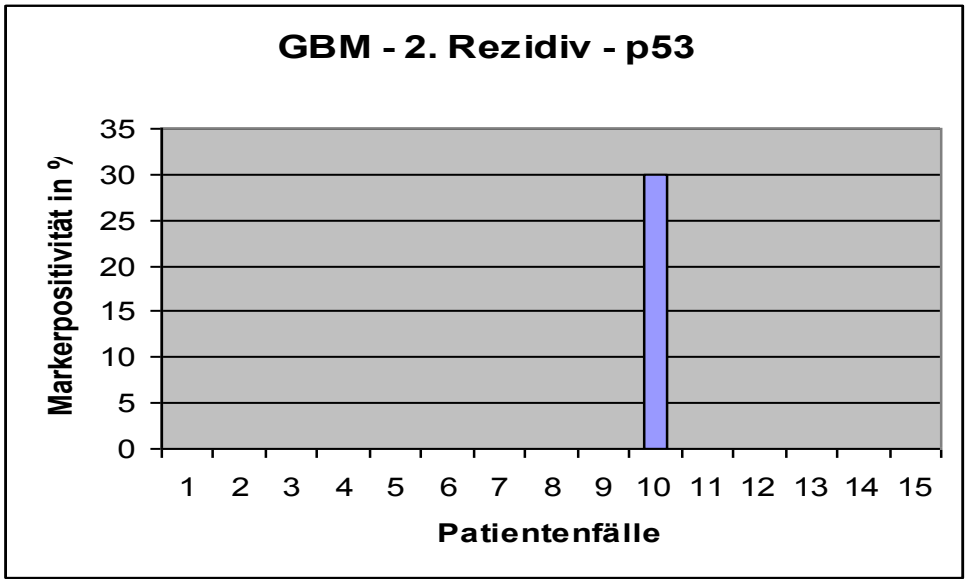
1,4,5,6,10,13 mit



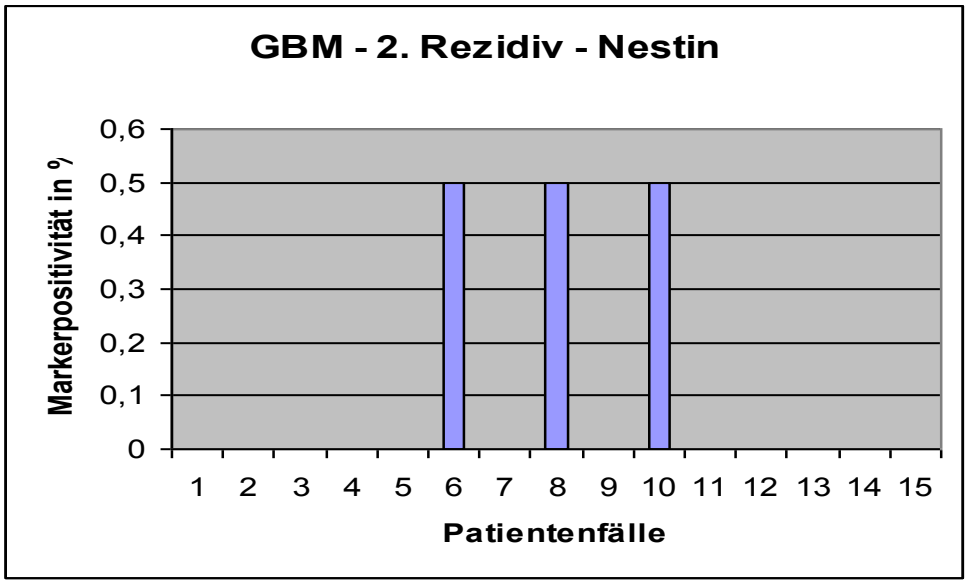


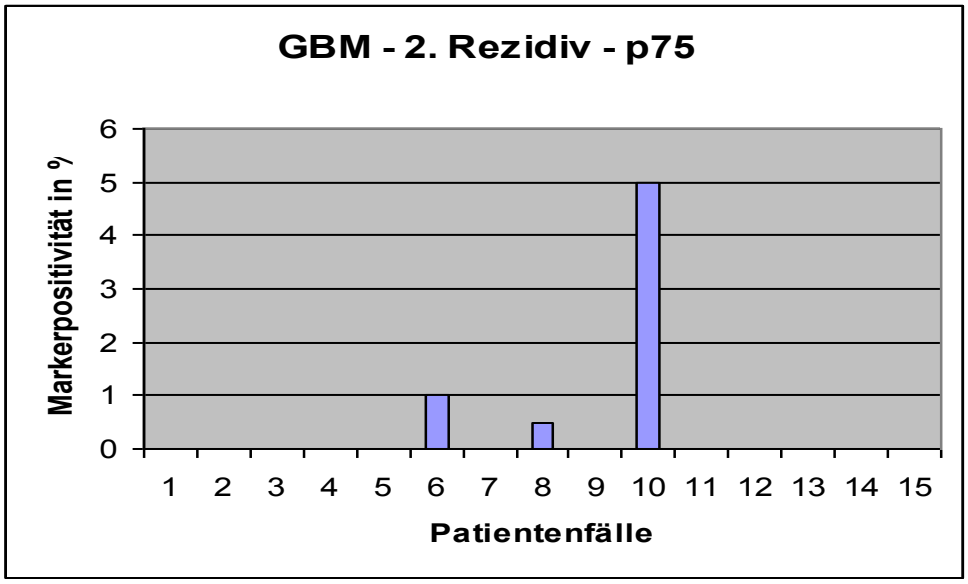


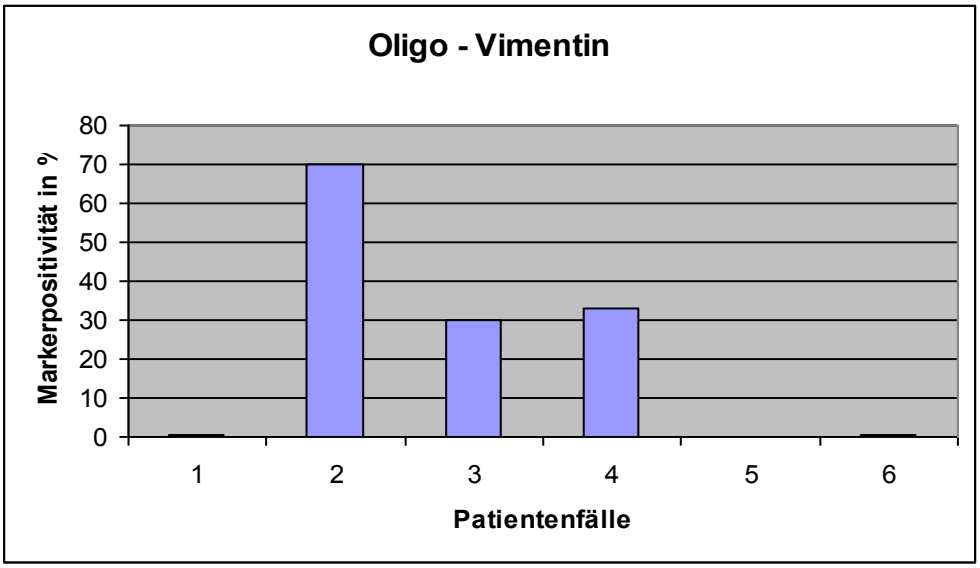
10 mit IZ

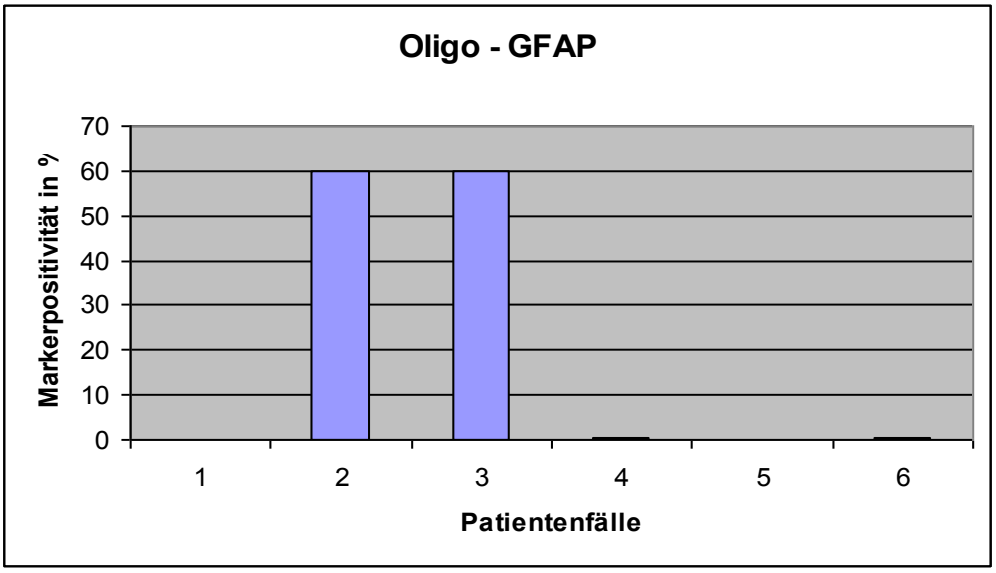


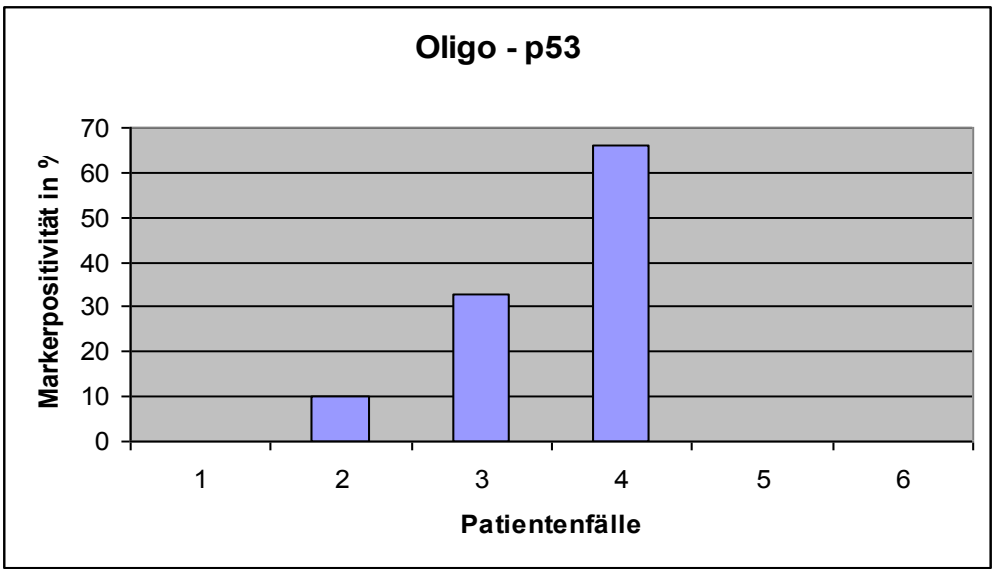
10 mit IZ

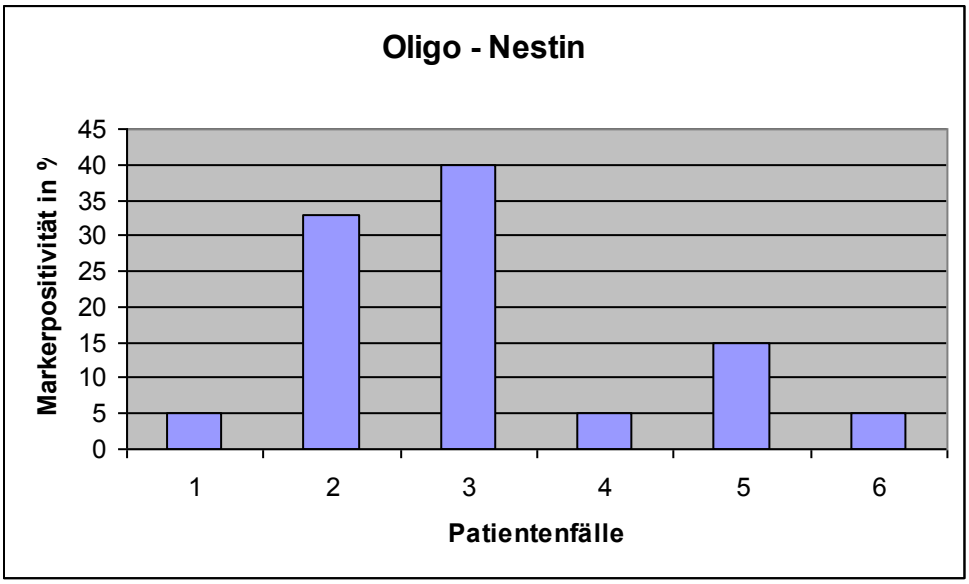

GBM - 2. Rezidiv - Nestin
Markerpositivität in %
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle

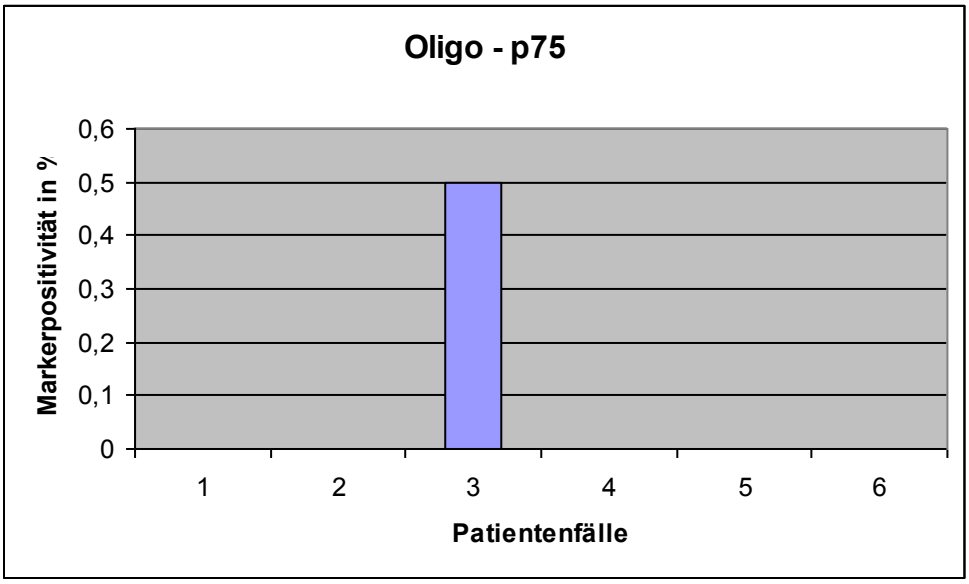

GBM - 2. Rezidiv - p75
Markerpositivität in %
6
5
4
3
2
1
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Patientenfälle


Oligo - Vimentin
Markerpositivität in %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
Patientenfälle


Oligo - GFAP
Markerpositivität in %
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
Patientenfälle


Oligo - p53
Markerpositivität in %
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
Patientenfälle


Oligo - Nestin
Markerpositivität in %
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
Patientenfälle


Oligo - p75
Markerpositivität in %
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
1
2
3
4
5
6
Patientenfälle

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. W. Schulz-Schaeffer, für die Anregungen, die Begleitung und Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Ebenso danke ich den medizinisch-technischen Assisteninnen, die mich trotz der vielen Arbeit ihrerseits, stets geduldig und freundlich in die vielfältigen und komplexen Arbeitstechniken im Labor einwiesen.

Lebenslauf

Am 23.08.1976 wurde ich in Wolfenbüttel, Niedersachsen, als jüngere zweier Töchter der Eheleute Earl Clifford Lee und Anne-Luise Lee, geb. Krappe, geboren.Von 1983 bis 1996 besuchte ich zunächst Grundschulen in Königslutter sowie Kaufering und später Gymnasien in Landsberg am Lech und Braunschweig. 1996 erhielt ich an der Neuen Oberschule Braunschweig mein Abitur. Nach einem Praktikum im Sprachheilkindergarten der Lebenshilfe in Helmstedt begann ich 1997 meine Ausbildung zur Logopädin an der Logopädenlehranstalt in Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. E. Kruse. Im Jahr 2000 legte ich meine Prüfung zur staatlich anerkannten Logopädin ab. Zwei Jahre lang arbeitete ich in logopädischen und HNO-ärztlichen Praxen in Sarstedt und Münster. Von 2002 bis 2003 studierte ich am Department of Speech unter der Leitung von Prof. Dr. N. Miller an der Universität in Newcastle upon Tyne, Großbritannien. Mein Studium, das durch ein Stipendium der Carl-Duisberg-Gesellschaft gefördert wurde, verstand sich inhaltlich als Aufbau zu meiner Logopädieausbildung. Ich beendete das Studium mit dem Abschluß: Master of Science (MSc) in Human Communication Sciences. Im Rahmen meiner Abschlußarbeit in Newcastle upon Tyne entstand ein Kontakt zum Department of Ear, Nose & Throat am Voice Center des Universitätsklinikums in Pittsburgh, USA, und es war mir möglich, dort noch ein mehrmonatiges Praktikum bei Dr. C. Rosen und Prof. K. Verdolini zu absolvieren. Von 2004 bis 2005 arbeitete ich als Logopädin in der HNO-Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen. Das Studium der Humanmedizin begann ich 2005 an der Georg-August Universität Göttingen und erhielt 2011 meine Approbation. Von 2012 bis 2013 arbeitete ich als Assistenzärztin in der HNO-Abteilung des Sana-Ohre-Klinikums in Haldensleben und seit 2014 in der HNO-Abteilung im Klinikum Braunschweig.