Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung von Erythropoietin und seinem Rezeptor für die Prognose humaner Glioblastome

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jonas Brunotte
aus
Hildesheim

Göttingen 2010

D e k a n: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. H.M. Strik

II. Berichterstatter/-in:

III. Berichterstatter/-in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS / GLOSSAR IV

1 EINLEITUNG 1

1.1 Hirntumore 1

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie 1

1.1.2 Klassifizierung von Hirntumoren 1

1.1.3 Die Tumorentität Glioblastoma multiforme 2

1.1.4 Krankheitsbild des Glioblastoma multiforme 3

1.2 Das EPO/EPOR – System 7

1.2.1 Biochemische Grundlagen 7

1.2.2 Funktionen des EPO-/EPOR-Signalweges 11

1.2.3 EPO/EPOR im Gehirn 13

1.2.4 Immunhistochemische Antikörper gegen EPO und EPOR 17

1.3 Die Relevanz von EPO/EPOR bei malignen Neoplasien 18

1.3.1 Tumoranämie und EPO 18

1.3.2 Hypoxische Tumoren und Radiochemoresistenz – Korrektur durch EPO? 18

1.3.3 Sicherheit von EPO in der Tumortherapie 20

1.3.4 Expression von EPO und EPOR in Tumorzellen 21

1.3.5 Nachgewiesene EPO-/EPOR-Signalwege in Tumoren 22

1.4 EPO/EPOR und Hirntumore 22

1.5 Zielsetzung und Fragestellung 23

2 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 Material 24

2.1.1 Gewebeproben 24

2.1.2 Labormaterial 25

2.2 Methoden 26

2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes 26

2.2.2 Immunhistochemische Färbung ... 26
2.2.3 Morphometrie ... 30
2.2.4 Statistische Auswertung ... 30

3 ERGEBNISSE ... 33

3.1 Patientendaten ... 33
3.1.1 Geschlechtsverteilung ... 33
3.1.2 Altersverteilung bei Erstdiagnose ... 33
3.1.3 Überlebenszeiten ... 33

3.2 Statistische Korrelation von Überlebenszeiten mit Kofaktoren ... 34
3.2.1 Zusammenhang zwischen Geschlecht und Überleben ... 34
3.2.2 Zusammenhang zwischen Alter und Überleben ... 34
3.2.3 Zusammenhang zwischen Therapiegruppe und Überleben ... 34
3.2.4 Zusammenhang zwischen Resektionsausmaß und Überleben ... 35

3.3 Statistische Auswertung der Scores von EPO/EPOR ... 36
3.3.1 Allgemeine Beobachtungen während der Auswertung ... 36
3.3.2 Patientendaten der EPO-Gruppe ... 39
3.3.3 Patientendaten der EPOR-Gruppe ... 42
3.3.4 Korrelation von EPO- und EPOR-Scores mit Geschlecht und Alter ... 46
3.3.5 Korrelation von EPO mit EPOR ... 47
3.3.6 Korrelation von EPO- und EPOR-Scores mit Gesamtüberleben ... 47
3.3.7 Multivariate Regressionsmodelle für das Gesamtüberleben ... 50
3.3.8 Geschichtete Regressionsanalysen des Überlebens ... 50
3.3.9 Verknüpfte Analysen: Gemeinsamer Einfluss von EPO und EPOR ... 53
3.3.10 Ergebnisübersicht zum Einfluss von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben ... 55
3.3.11 Vergleich der Scores Primärtumor mit Scores Rezidivtumor ... 57

4 DISKUSSION ... 59

4.1 Grenzen der Methodik ... 60
4.1.1 Immunhistochemie ... 60
4.1.2 Retrospektive Analyse ... 62

4.2 Allgemeine Beobachtungen dieser Arbeit ... 62
4.2.1 Patientenkollektiv ... 62
4.2.2 Statistische Überlebenszeitanalysen nach Kofaktoren ... 63
4.2.3 Beobachtungen zur EPO- bzw. EPOR-Expression ... 64

4.3 Ergebnisse dieser Arbeit: Überlebensvorteil durch EPO/EPOR ... 65

4.4 EPO und Tumoren – Fluch oder Segen? ... 69
4.4.1 EPO und EPOR in Tumorzellen – Bedeutung überschätzt? ... 69
4.4.2 Hypoxie und Tumoren ... 71
4.4.3 Proliferationsstudien in Zellkultur – kein Konsens ... 73
4.4.4 EPO in Xenograft-Tumortiermodellen – kein Überlebensnachteil ... 74
4.4.5 EPO und Tumorangiogenese – Relevanz unklar ... 75
4.4.6 Klinischer Einfluss auf das Gesamtüberleben ... 77

4.5 EPO und EPOR bei Hirntumoren ... 77
4.5.1 Die kontroverse Studienlage zu EPO bei Glioblastomen ... 78
4.5.2 EPO und Entzündungshemmung – im GBM ohne Relevanz? ... 83

5 ZUSAMMENFASSUNG ... 85

6 LITERATURVERZEICHNIS ... 86

Abkürzungsverzeichnis / Glossar

ACNU	Nimustin (ein Nitrosoharnstoff)
adj.	adjuvant
AKT	Proteinkinase B
APC	Antigen-Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
Asn	Asparagin
BCL	B-Cell Lymphoma (Gruppe von Botenstoffen der Apoptose)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCNU	Lomustin (ein Nitrosoharnstoff)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CIS	Cytokine-Induced SRC homology 2 protein (Gruppe von Botenstoffen)
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
EGF	Epidermal Growth Factor (ein Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor-Receptor (Rezeptor für EGF)
EMP	Erythroblast Macrophage Protein
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cells (endotheliale Vorläuferzellen)
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
ERK	Extracellular signal-Regulated protein Kinase (eine Gruppe von Kinasen)
etc.	et cetera
f-EPOR	full-length Erythropoietin Receptor (normale Variante des EPOR)
Fa.	Firma
GBM	Glioblastoma multiforme
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (ein Wachstumsfaktor)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (“Saures Gliafaserprotein”)
GH	Growth Hormon (Wachstumshormon)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (ein Wachstumsfaktor)

Gy	Gray (Einheit für radiologische Strahlenintensität)
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin (eine histologische Standardfärbung)
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
HIF	Hypoxia-Inducible Factor (ein Botenstoff der durch Hypoxie getriggert wird)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSP	Heat Shock Protein (Gruppe von Proteinen)
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILGF	Insulin-Like Growth Factor (ein Wachstumsfaktor)
In-111	Indium 111
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IU	International Unit = IE (internationale Einheit für biologische Aktivität)
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
KÖF	Körperoberfläche
Komb.	Kombinierte
Konk.	Konkomitant
MAD	Mitotic Arrest Deficient (Gruppe von Proteinen zur Mitoseregulierung)
MAKP	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP	Macrophage Chemotactic Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (eine Nukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Transkriptionsfaktor)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid

NT	Human Neuron-committed Teratocarcinoma
OP-Art	Resektionsausmaß
$p70^{s6k}$	p70S6 Kinase
PAS	Periodic-Acid-Schiff (eine histologische Färbung)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCV	Procarbazin + Lomustin + Vincristin (Kombination von Chemotherapeutika)
PGE	Prostaglandin E
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAS	Rat Sarcoma (ein Proto-Onkogen)
RCT	Radiochemotherapie
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
RR	relatives Risiko
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s-EPOR	soluble Erythropoietin Receptor (lösliche Variante des EPOR)
Ser	Serin
SHP	SRC Homology Phosphatase
SRC	eine Gruppe von protoonkogenitischen Tyrosinkinasen (SRC leitet sich von „sarcoma“ ab)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SYP	SRC homology-2 containing tyrosine phosphatase
t-EPOR	truncated Erythropoietin Receptor (gekürzte Variante des EPOR)
TGF	Transforming Growth Factor = Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
Tx-Gruppe	Therapiegruppe
U	Unit = Einheit
UKZ	Ultrakurzzeitüberleber
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (ein Wachstumsfaktor)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Hirntumore

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Hirneigene Neoplasien treten mit einer Inzidenz von 11-12 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf (unter der Berücksichtigung von Astrozytomen WHO Grad I-IV, Oligodendrogliomen, Mischgliomen, Ependymomen und Medulloblastomen) (Wrensch et al. 2002). Davon entfällt eine Inzidenz von 6-7/100.000/Jahr auf maligne Tumoren. Diese sind für ca. 1% der jährlichen Krebsneuerkrankungen verantwortlich und machen ca. 2% der jährlichen Todesfälle aus (Legler et al. 1999).
Die Neuerkrankungsrate steigt im höheren Lebensalter an (CBTRUS 2009). Am niedrigsten ist die Inzidenz in der Gruppe der 15- bis 24-Jährigen.
Für Gliome gilt allgemein, dass sie häufiger bei Männern als bei Frauen auftreten. Hier liegt die Neuerkrankungsrate für Männer bei 7,09/100.000/Jahr und für Frauen bei 4,96/100.000/Jahr (CBTRUS 2009).
Am Rande sei erwähnt, dass Metastasen anderer extrakranialer Primärtumoren deutlich häufiger auftreten als hirneigene Neoplasien (DeAngelis 2001).

Über die Ätiopathogenese von hirneigenen Tumoren ist bisher immer noch relativ wenig bekannt. Als sicherer Risikofaktor gilt allerdings eine Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, wahrscheinlich aber auch eine hochdosierte Chemotherapie zur Behandlung systemischer Tumoren (Neglia et al. 1991, Ohgaki und Kleihues 2005, Salminen et al. 1999, Soffer et al. 1983).
Dabei scheinen auch genetische Polymorphismen die Anfälligkeit gegenüber diesen Risikofaktoren mitzubestimmen (Relling et al. 1999).

1.1.2 Klassifizierung von Hirntumoren

Die Einteilung der Hirntumoren erfolgt anhand der Klassifizierung der WHO in die Grade I-IV (Louis et al. 2007). Die Grundlage der Einteilung bildet dabei ein histogenetisches System, das den Tumor dem Ursprungszelltyp zuordnet. Diese Doktorarbeit widmet sich den Gliomen. Dies sind Tumoren, deren Zellen astrozytär erscheinen, also Zellen des hirneigenen Stützgewebes entsprechen (Neglia et al. 1991). Ein Gliom, das aus astrozytären Zellen gebildet wird, bezeichnet man nach WHO dann entsprechend als Astrozytom. Gliome machen ca. 77% aller malignen hirneigenen Neoplasien aus (Schwartzbaum et al. 2006).

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl verschiedenster Tumorentitäten, weshalb die Gradierung in die WHO-Grade I-IV eine erhebliche Erleichterung in der klinischen Praxis darstellt. Dabei werden im Allgemeinen Parameter wie das Ausmaß zellulärer Differenzierung, zelluläre und nukleäre Polymorphie, Tumorzelldichte, mitotische Aktivität, Endothelproliferate und Tumorgewebsnekrosen herangezogen. Ein WHO-Grad I bezeichnet einen hoch differenzierten Tumor mit geringer Wachstumsgeschwindigkeit und guter Prognose. Ein WHO-Grad IV ist ein hochmaligner, wenig differenzierter Tumor mit hoher Wachstumstendenz und schlechter Prognose. Die WHO-Grade II und III sind entsprechend intermediär einzuordnen (Wiestler und Reifenberger 2003).

1.1.3 Die Tumorentität Glioblastoma multiforme

Die Fragestellungen dieser Arbeit beziehen sich auf den häufigsten Tumor aus dem Formenkreis der Gliome, das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV). Dieses macht ca. 50% aller Gliome des Erwachsenenalters und mit 22,6% auch einen bedeutenden Anteil aller hirneigenen Tumoren aus (Weller und Westphal 2003). Die Inzidenz dieses Tumors liegt bei ca. 3/100.000/Jahr (CBTRUS 2008). Das Glioblastom hat seinen Erkrankungsgipfel in etwa zwischen dem 45. – 70. Lebensjahr (im Mittel 62 Jahre, Median 64 Jahre), wobei der Tumor jedoch, wenn auch selten, in jedem Alter, einschließlich Kindern, auftreten kann (Wiestler und Reifenberger 2003).

Das Glioblastoma multiforme ist bei Erwachsenen typischerweise in den Großhirnhemisphären lokalisiert, kann sich allerdings auch, besonders bei Kindern, im Bereich des Hirnstammes manifestieren. Der Name leitet sich aus dem makroskopisch vielgestaltigen Erscheinungsbild ab, das durch ein Mischbild aus vitalem Tumorgewebe, Nekrosen, Einblutungen, zystischen Veränderungen und Narben entsteht. Meist sind Glioblastome von einem deutlichen perifokalen Ödem umgegeben, das auch einen ausgeprägten raumfordernden Aspekt mit Massenverschiebung verursacht. Die mit bloßem Auge häufig scharf abgegrenzt erscheinenden Tumoren zeigen mikroskopisch meist ein diffuses, weit ins makroskopisch gesunde Hirngewebe reichendes, infiltratives Wachstum. Das histologische Bild der Glioblastome ist sehr variabel. Typisch sind eine hohe Zelldichte sowie deutliche zelluläre und nukleäre Pleomorphie. Der Zelltyp vermag fibrillär, gemistozytär, kleinzellig oder spindelförmig erscheinen und kann selbst riesenzellige Formen annehmen. Selten imponieren Glioblastome durch epithelial differenzierte, PAS-positive, granulahaltige oder fettreiche Tumorzellen. Charakteristisch für den Tumor sind eine hohe Zellteilungsrate sowie häufige atypische Mitosen. Hinzu kommen pathologische mikrovaskuläre Proliferate, die meist ein glomeruläres oder girlandenförmiges

Erscheinungsbild bieten. Häufig findet man diese in der Nähe des gesunden Hirngewebes sowie im Bereich von Tumornekrosen. Die pathologischen Gefäße neigen zur Thrombosierung und zeigen teilweise hämorrhagische Aspekte. Die Gewebsnekrosen sind typischerweise entweder strich- oder flächenförmig. Erstere sind klassischerweise von einem palisadenartigen Tumorzellsaum umgeben. Immunhistochemisch findet sich in fast allen Fällen die Expression von GFAP (saures Gliafaserprotein). Ebenfalls häufig (>50% der Fälle) existiert eine gesteigerte Expression des EGF-Rezeptorproteins. Mit dem Nachweis des Proliferationsmarkers KI-67 erreicht man häufig Markierungsraten oberhalb von 10% (Wiestler und Reifenberger 2003).

Für die Einteilung in den WHO-Grad IV sind die entscheidenden Kriterien der Nachweis von mikrovaskulären Proliferaten oder Tumorgewebsnekrosen, welche in einem nicht vorbehandelten diffusen Tumor astrozytären Zelltyps beweisend für das Vorliegen eines Glioblastoms sind (Wiestler und Reifenberger 2003).

In der WHO-Klassifikation werden zusätzlich zwei Varianten des Glioblastoms unterschieden. Diese sind das Gliosarkom und das Riesenzellglioblastom.
Das Gliosarkom macht etwa 2% aller Glioblastome aus, das Riesenzellglioblastom nimmt einen Anteil von weniger als 5% aller Glioblastome ein. (Wiestler und Reifenberger 2003). Prognostisch ergibt sich kein wesentlicher Unterschied zum typischen Gliom (Wiestler und Reifenberger 2003).

Zudem gilt noch zu erwähnen, dass eine Metastasierung des Glioblastoms in andere Gewebe praktisch nicht vorkommt (Wiestler und Reifenberger 2003).

1.1.4 Krankheitsbild des Glioblastoma multiforme

1.1.4.1 Klinik

Die Symptome von Hirntumoren sind meist wenig spezifisch. Verdächtig auf intrakraniell raumfordernde Prozesse sind erstmalig auftretende fokale oder generalisierte zerebrale Krampfanfälle, neurologische Herdsymptomatik, Persönlichkeitsveränderungen und Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit oder Erbrechen (Diener und Putzki 2008, Weller und Westphal 2003).
In der klinischen Untersuchung muss besonderer Wert auf die differenzialdiagnostische Abgrenzung zu metastasierenden Prozessen gelegt werden.

1.1.4.2 Diagnostik

Besteht der Verdacht auf einen Hirntumor, hat eine bildgebende Diagnostik mittels CT- oder MRT-Untersuchung zu erfolgen, wobei den Goldstandard für Diagnose und Verlaufskontrolle beim Glioblastom die MRT-Untersuchung darstellt (Diener und Putzki 2008).
Typischerweise zeigt sich eine ringförmige kontrastmittelaufnehmende Läsion, in deren Zentrum sich eine Nekrosezone befindet. Zudem erscheint ein deutliches perifokales Ödem. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die meist mehrere Zentimeter ins gesund erscheinende Hirngewebe vordringenden infiltrierenden Tumorzellen radiologisch nicht nachgewiesen werden können (Weller und Westphal 2003).

Zur definitiven Diagnose eines Glioblastoms ist die Gewinnung einer Gewebeprobe aus dem Tumor mit anschließender histopathologischer Untersuchung notwendig. Da bei Verdacht auf ein Gliom ein zuwartendes oder palliatives Vorgehen nur indiziert ist, wenn das Risiko der Intervention den Nutzen der histologischen Diagnose übersteigt, wird im Allgemeinen die Gewebegewinnung gleichzeitig als definitive Therapie genutzt. So wird bei der Operation nach Möglichkeit eine makroskopisch komplette Entfernung des Tumors angestrebt (Diener und Putzki 2008).
Besteht aufgrund eines eingeschränkten Allgemeinzustandes des Patienten nicht die Möglichkeit einer Operation, kann eine stereotaktische Biopsie in Lokalanästhesie durchgeführt werden. Die diagnostische Zuverlässigkeit ist mit 90% hoch, Mortalität (1%) und Morbidität (3-4%) sind gering (Diener und Putzki 2008).
Die histologische Standarduntersuchung erfolgt am HE-Paraffinschnitt unter oben beschriebenen Gesichtspunkten.

1.1.4.3 Therapie

Grundsätzlich ist anzumerken, dass eine Heilung von Glioblastomen derzeit nicht möglich ist. Therapeutische Maßnahmen gestalten sich oft schwierig und haben meist nur beschränkte Wirkung.

Nach andauernden Kontroversen über den positiven prognostischen Nutzen maximal zytoreduktiver operativer Eingriffe besteht mittlerweile ein breiter Konsens, der die Komplettresektion des radiologisch nachweisbaren Teils operabler Tumoren als Standard empfiehlt. Eine Reihe von Studien belegt die Bedeutung der Resektion als prognostischen Faktor (Hess 1999, Lacroix et al. 2001, Vuorinen et al. 2003, Weller et al. 2003).

Zum Erreichen einer möglichst vollständigen Tumorentfernung wird zunehmend die fluoreszenzgestützte Resektion durchgeführt (Stummer et al. 2006).
Die Mortalität beträgt etwa 2% in erfahrenen Zentren, die Morbidität 5% (Weller und Westphal 2003).

Die adjuvante Strahlentherapie mit 54 bis möglichst 60 Gy (Fraktionen 1,8-2 Gy) ist Standard und hat einen hohen Stellenwert in der Therapie (Laperriere et al. 2002). Die mediane Verlängerung des Überlebens durch Radiotherapie beträgt ca. 6 Monate (Diener und Putzki 2008). Bei älteren Menschen oder Patienten mit schlechterer Prognose besteht die Möglichkeit einer akzelerierten Strahlentherapie (30-45 Gy zu 3 Gy-Fraktionen) (Roa et al. 2004).

Als Standard der Chemotherapie wird derzeit eine adjuvante und konkomitant zur Radiotherapie durchgeführte Behandlung mit Temozolomid betrachtet (Diener und Putzki 2008, Stupp et al. 2005).
Das Standardschema beinhaltet eine Dosierung von 75 mg/m² KÖF täglich konkomitant, und 150-200 mg/m² KÖF im Anschluss an die Radiotherapie (6 Zyklen, Tag 1-5, alle 4 Wochen) (Diener und Putzki 2008).
Experimentelle Ansätze in der Chemotherapie verfolgen meist das Ziel, Dosierungsschemata für Temozolomid anzupassen oder dieses mit anderen Wirkstoffen zu kombinieren (Herrlinger et al. 2006).
Ältere wirksame Schemata stellen die Therapie mit Nitrosoharnstoffen (ACNU, CCNU) (DeAngelis et al. 1998, Fine et al. 1993) und das PCV-Schema (Levin et al. 1990) dar.

Im Rezidiv sollte, wenn der Zustand des Patienten und die Lokalisation dies sinnvoll erscheinen lassen, eine Reoperation erwogen werden. Auch besteht die Möglichkeit einer erneuten Radiotherapie (hypofraktioniert, z. B. 4x5 Gy (Shepherd et al. 1997)).
Auch eine erneute Chemotherapie ist meist indiziert. Hier gibt es eine Vielzahl vorgeschlagener Rezidivtherapieschemata (Brandes et al. 2006, Kappelle et al. 2001, Schmidt et al. 2006, Wick et al. 2007, Wong et al. 1999, Yung et al. 2000). Eine Dosisintensivierung und Verkürzung der freien Intervalle scheint hier besonders in Hinsicht auf die Anwendung von Temozolomid vielversprechend (Strik et al. 2008).

Als supportive Maßnahmen in der Therapie des Glioblastoms sind das Vermeiden von erhöhtem Hirndruck mittels Kortikosteroiden, Osmotherapeutika oder auch dekomprimierende

Operationen wesentlich (Diener und Putzki 2008). Zudem besteht bei Gliompatienten ein höheres postoperatives Thromboserisiko als bei anderen Erkrankungen (Marras et al. 2000), das durch geeignete Antikoagulation, beispielsweise mit niedermolekularen Heparinen kontrolliert werden kann. Ebenso ist eine antikonvulsive Therapie angezeigt (Diener und Putzki 2008).

Neuere Ansätze sehen Potenzial in der Verwendung von EPO in der unterstützenden Therapie. EPO gilt als neuroprotektiv (siehe auch Kapitel 1.2.3.2, Seite 13) und könnte die kognitiven Beeinträchtigungen, die nicht selten von kranialer Radiotherapie bzw. Chemotherapie ausgelöst werden, abmildern (Erbayraktar et al. 2006, Smith 2004). Zudem könnte EPO durch seine Fähigkeit zur Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke möglicherweise die Entstehung von Ödemen oder Krampfanfällen reduzieren (Martinez-Estrada et al. 2003, Uzum et al. 2006). Weiter besteht die Möglichkeit, EPO zur Behandlung einer chemotherapie-assoziierten Anämie einzusetzen.

Die Verwendung von EPO zur Behandlung von tumorassoziierter Anämie bei systemischen Tumoren ist derzeit sehr kontrovers diskutiert (Kokhaei et al. 2007, Sadoff 2005). Obwohl zahlreiche Studien die Sicherheit von EPO in der Krebstherapie nahegelegt haben (Bohlius et al. 2006b, Glaspy und Dunst 2004), weisen einige aktuellere Versuche darauf hin, dass EPO möglicherweise Tumorzellapoptose hemmt, die Invasivität erhöht und Tumorangiogenese fördert und somit das Outcome der Patienten verschlechtert (Ceelen et al. 2007, Maiese et al. 2005, Rades et al. 2008, Sadoff 2005). Dieses Thema soll daher in den folgenden Kapiteln näher behandelt werden.

1.1.4.4 Prognose

Die Prognose des Glioblastoms ist schlecht. Das mediane Überleben beträgt typischerweise etwa 12 Monate. Das 2-Jahresüberleben liegt bei ca. 9%, das 5-Jahresüberleben bei 3% (Davis et al. 1999). Das Alter bei Erstdiagnose ist ein wesentlicher prognostischer Faktor, wobei jüngere Patienten ein längeres Überleben zeigen (Mittelbronn et al. 2007).

1.2 Das EPO/EPOR – System

1.2.1 Biochemische Grundlagen

1.2.1.1 EPO

Das EPO-Protein ist ein Glykoproteinhormon, das primär als Regulator der Erythropoese bekannt ist. Die Epo-mRNA kodiert ein PräPro-Protein mit 193 Aminosäuren (Mulcahy 2001, Sasaki et al. 2000), wobei bei der posttranslationalen Modifikation N-terminal 27 Aminosäuren und C-terminal die Aminosäure Arginin durch eine intrazelluläre Carboxypeptidase entfernt werden. Es resultiert das 165 Aminosäuren lange EPO-Protein. Die Struktur wird durch zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 7 und 161 sowie 29 und 33 stabilisiert, welche für die biologische Aktivität unentbehrlich sind (Chong et al. 2002a, Sasaki et al. 2000). Das Protein besitzt vier Seitenketten aus variablen sialylierten Oligosacchariden, wovon drei N-glykosidisch gebunden an den Positionen 24, 38 und 84 (Gordeuk et al. 2004) sowie eine O-glykosidisch gebunden an Position 126 (Ser) vorliegt (Sasaki et al. 2000). Die O-gebundene Kette scheint dabei keine wesentliche Funktion zu besitzen. Die N-gebundenen Ketten sind aber für die Stabilität des Proteins in der systemischen Zirkulation wichtig (Mulcahy 2001, Sasaki et al. 2000). Ohne diese ist EPO zwar biologisch aktiv, aber extrem kurzlebig (Dordal et al. 1985). Die Aminosäuresequenz des rhEPO ist identisch zur körpereigenen Form (Farrell und Lee 2004).

1.2.1.2 EPOR

Der EPO-Rezeptor gehört zu der Familie der Zytokinrezeptoren (Leyland-Jones 2002), zu denen auch die Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren, wie GH, Prolactin, G-CSF, GM-CSF, Thrombopoetin und zahlreiche Interleukine gehören. Strukturell gemeinsam ist diesen Rezeptoren die extrazelluläre Domäne zur Bindung des Liganden, die zwei Paare von Cysteinen sowie die direkt neben der Transmembrankomponente gelegene Sequenz Trp – Ser – variable Aminosäure – Trp – Ser enthält. Zusätzlich besitzen die Rezeptoren eine intrazelluläre Domäne (Farrell und Lee 2004).

In den Vorläuferzellen der Erythropoese wurden verschiedene Formen des EPOR nachgewiesen, darunter eine f-EPOR-Variante (full-length EPOR), eine t-EPOR-Variante (truncated) und eine s-EPOR-Variante (soluble). Alle drei besitzen die extrazelluläre Bindungsdomäne. Allerdings führt alternatives Splicing bei f-EPOR und s-EPOR zur Verkürzung der zytoplasmatischen bzw. transmembranösen Komponente (Nakamura et al. 1992).

T-EPOR scheint dabei funktionell eine abgeschwächte agonistische Wirkung zu vermitteln (Li K et al. 2003, Nakamura et al. 1998), während s-EPOR im Nervengewebe als kompetitiver EPOR-Antagonist agiert, indem er mit f-EPOR um die EPO-Bindung konkurriert (Sakanaka et al. 1998).
Die physiologischen Funktionen von t-EPOR und s-EPOR konnten bisher nicht genau ermittelt werden.

Die Translokation von EPOR an die Zelloberfläche scheint ein sehr ineffizienter Prozess zu sein, da weniger als 1% der gesamten zellulären EPOR-Proteine tatsächlich an die Zelloberfläche gelangen, wofür eine kurze Halbwertszeit (1-2 Stunden), ineffiziente Prozessierung für die Oberflächenexpression und Proteindegradation im endoplasmatischen Retikulum sowie in Proteasomen und Lysosomen verantwortlich sind (Hilton et al. 1995, Meyer et al. 2007, Supino-Rosin et al. 1999, Walrafen et al. 2005).
Die Anwesenheit von EPO scheint die Verlagerung von EPOR auf die Zelloberfläche zu fördern (Migliaccio et al. 1991). So kann z. B. die durch EPO-Bindung aktivierte Janus-Kinase-2 EPOR im endoplasmatischen Retikulum binden und für die korrekte Proteinfaltung und Translokation des EPOR-Proteins an die Oberfläche beitragen (Huang et al. 2001).
Hohe Mengen von EpoR-mRNA bedeuten daher nicht zwangsläufig ein hohes Niveau von EPOR-Protein an der Zelloberfläche (Hermine et al. 1996, Migliaccio et al. 1991).

1.2.1.3 Signaltransduktion

Bindet EPO an seinen Rezeptor, homodimerisiert dieser und ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg bewirkt die Differenzierung und Proliferation der roten Blutvorläuferzellen.
Dabei besitzt der EPOR im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren keine intrinsische Kinaseaktivität zur Aktivierung des Signalwegs. Stattdessen bewirkt die Homodimerisierung die Transphosphorylierung und somit die Aktivierung der JAK2, eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die der intrazellulären Domäne des EPOR zugeordnet ist. JAK2 phosphoryliert nun einige intrazelluläre Proteine, einschließlich des EPOR selbst. Phosphorylierte Tyrosine des EPOR dienen dann als Kopplungsstation für z. B. SHP1, SHP2, Pi3K, MAPK und das Signaltransduktionsprotein STAT5

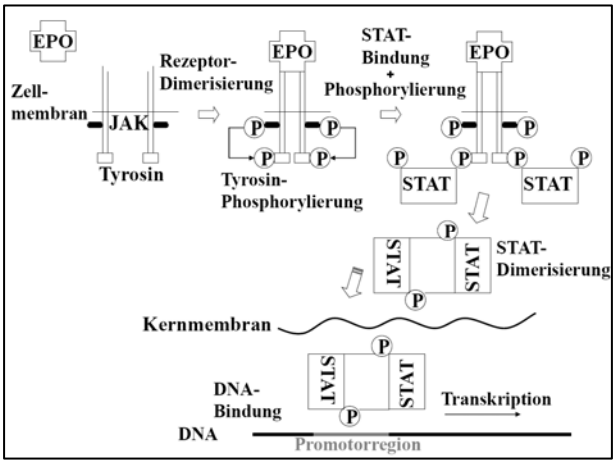

Abbildung 1 JAK/STAT - Signalweg

(Chong et al. 2005a, Quelle et al. 1996, Zhao et al. 2006). Binden diese an den phosphorylierten EPOR, werden sie ihrerseits durch JAK2 phosphoryliert und somit aktiviert, was zu nachgeschalteten Signaltransduktionen führt (Lacombe und Mayeux 1998).

Der JAK2/STAT5 – Signalweg führt zur Dimerisierung zweier phosphorylierter STAT5-Moleküle, die transloziert in den Nukleus an spezifische regulatorische Sequenzen binden. Dadurch wird die Transkription von Zielgenen zur Differenzierung roter Blutkörperchen ausgelöst (Leyland-Jones 2002, Mulcahy 2001).

Andere durch EPO vermittelte Signalwege beinhalten die Aktivierung von STAT3 (Asaumi et al. 2007, Chong und Maiese 2007), ERK1/2 (Chong und Maiese 2007), RAS, NF-κB (Chong et al. 2002b, Digicaylioglu und Lipton 2001) und Pi3K. Pi3K führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung von AKT und $p70^{s6k}$, welche Einfluss auf Transkription und Zellzykluskontrolle haben (Sivertsen et al. 2006, Zhao et al. 2006).

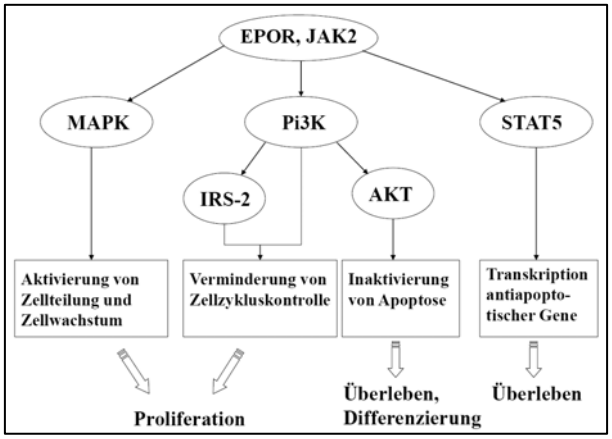

Abbildung 2 Andere durch EPOR vermittelte Signalwege

Der Signalweg wird durch Dephosphorylierung deaktiviert. Hierbei spielt z. B. die Phosphatase SHP1 eine Rolle. SHP1 wird durch Bindung an ein phosphoryliertes Tyrosin des EPOR aktiviert, woraufhin es die JAK2 dephosphoryliert und damit inaktiviert. Die nachgeschalteten Signalkaskaden kommen somit zum Erliegen (Barbone et al. 1999, Klingmuller et al. 1997, Mulcahy 2001). Eine mutierte Form des EPOR, dem die Bindungsstelle für SHP1 und somit die dadurch vermittelte Deaktivierung der JAK2 fehlt, geht mit einer Hypersensitivität des EPOR einher und findet sich in einer Form der Polyzythämie wieder (de la Chapelle et al. 1993, Mulcahy 2001).

Zusätzlich hemmt wahrscheinlich CIS-1 die proliferativen Signalwege des EPOR durch Hemmung von STAT5 (Mui et al. 1996, Verdier et al. 1998) und fördert die Degradierung des EPOR (Verdier et al. 1998, Wojchowski et al. 1999).

1.2.1.4 Biochemische Mechanismen unter hypoxischen Bedingungen

Über die letzen Jahre setzte sich die Erkenntnis durch, dass ein niedriger Hb-Wert des Blutes nicht der einzige Faktor zur Stimulierung der EPO-Produktion ist. Vielmehr bedarf es auch eines erniedrigten Sauerstoffpartialdruckes. So fand man heraus, dass auch in nicht-hämatopoetischen Zellen Hypoxie zu vermehrter Expression des EPOR führt, was Funktionen

von EPO jenseits der Erythropoese impliziert. Die Produktion von EPO wird wesentlich durch den *Hxpoxia-Inducible Factor* (HIF) getriggert (Grimm et al. 2002), welcher zusätzlich auch andere angiogenetische und zellstabilisierende Faktoren unter Hypoxie, wie VEGF, iNOS, Transferrin, Endothelin-1, etc. aktiviert (Goonewardene et al. 2002).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Gentranskription von EPO durch einen Enhancer am 3'Ende des EPO-Gens gesteigert wird, an den HIF-1 spezifisch zu binden vermag (Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus den Untereinheiten HIF-1α und HIF-1β besteht. HIF-1α ist dabei sauerstofflabil und wird unter normoxischen Bedingungen durch das Ubiquitin-Proteasom degradiert. Unter Hypoxie wird die Bindung von HIF-1α an das Hippel-Lindau Protein verhindert, welches normalerweise die Proteasom-Degradierung vermittelt. Fehlt diese Bindung, kann HIF-1α in den Zellkern gelangen und dort mit HIF-1β heterodimerisieren und dann als stabiler HIF-1-Komplex die Transkription des EPO-Genes hochregulieren (Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005).

Darüber hinaus wird die EPO-Expression via HIF-1 auch bei Hypoglykämie, erhöhtem intrazellulärem Calcium und bei vermehrtem Aufkommen mitochondrialer Sauerstoffradikale gesteigert. Des Weiteren können Anämie, Insulin-Freisetzung und Zytokine wie ILGF, TNF, IL-1β oder IL-6 die EPO- bzw. EPOR-Produktion steigern (Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005).

Neuere Forschungsergebnisse lassen zudem die Vermutung entstehen, dass die durch Hypoxie vermittelte Steigerung der EPO-Produktion auch wesentlich, z. B. in Astrozyten, durch HIF-2 bestimmt wird (Chavez et al. 2006, Warnecke et al. 2004).

Weiter wird angenommen, dass EPO die Produktion seines eigenen Rezeptors steigern kann, was das Vorhandensein autokriner und parakriner Signalwege impliziert (Beleslin-Cokic et al. 2004, Grossi et al. 1998, Ohigashi et al. 1996).

1.2.2 Funktionen des EPO-/EPOR-Signalweges

Primär ist EPO, welches beim Menschen vornehmlich in der Niere gebildet wird, aus der Erythropoese bekannt. Hier stimuliert es das Wachstum, die Differenzierung und verhindert den apoptotischen Zelltod der roten Blutzellvorläufer (Lacombe und Mayeux 1999). Als klinischer Effekt zeigt sich ein steigender Hb-Wert des Blutes. Therapeutisch werden rekombinant hergestellte Medikamente (rhEPO, z. B. Epoetin alpha) bei Erkrankungen wie beispielsweise Niereninsuffizienz, Krebserkrankungen und zur Linderung der Nebenwirkungen antineoplastischer Therapien eingesetzt.

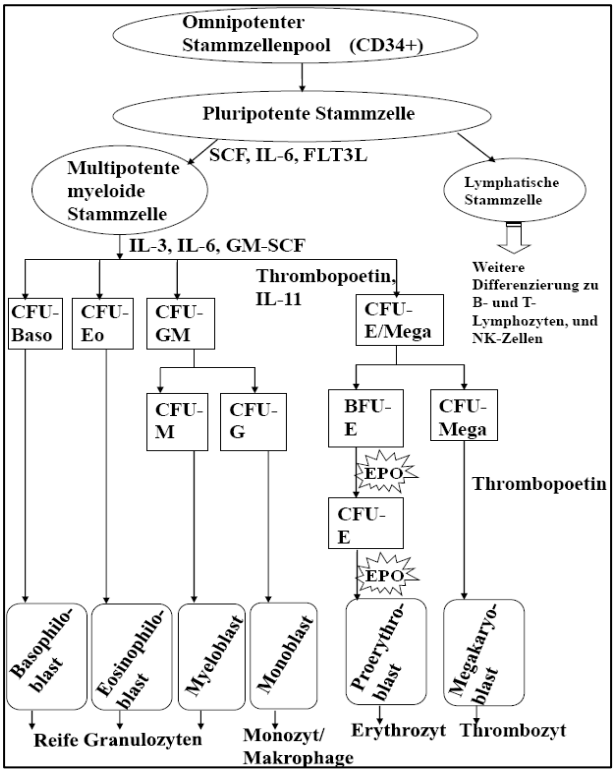

Abbildung 3 Hämatopoese

Aber auch in anderen Geweben konnten eine EPO-Produktion und der EPOR physiologisch nachgewiesen werden, so z. B. in Leber, Uterus, ZNS, Muskelzellen, Insulin-produzierenden Zellen oder Endothelzellen (Digicaylioglu et al. 1995, Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2008, Marti et al. 1997). Über die Funktionen jenseits der Erythropoese ist bisher noch relativ wenig bekannt.

1.2.2.1 Beispiele des gewebeprotektiven Einflusses von EPO bei verschiedenen Erkrankungen

Es gibt Veröffentlichungen, die am ischämischen Herzen die protektiven Eigenschaften von EPO aufzeigen. Dabei vermag EPO die durch hypoxischen Stress ausgelösten Folgen am Herzen abzumildern (Asaumi et al. 2007, Cai et al. 2003, Joyeux-Faure et al. 2005, Joyeux-Faure et al. 2006, Lipsic et al. 2004, Parsa et al. 2003).

Auch bei ischämischen Ereignissen in der Lunge vermochte EPO die Lungenfunktion im Tiermodell zu verbessern (Wu H et al. 2006). Darüber hinaus konnte durch EPO *in vitro* eine Hemmung von Apoptose in respiratorischem Epithel in der Lunge gezeigt werden (MacRedmond et al. 2009).

EPO erscheint ebenfalls als nützlich für das Überleben retinaler Zellen beim Glaukom (Tsai et al. 2007).

1.2.2.2 Stimulation von Endothelzellen durch EPO

Auch in Endothelzellen bewirkt EPO zahlreiche Effekte. Durch Bindung von EPO an den reifen EPOR werden vermehrte Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert (Anagnostou et al. 1990, Anagnostou et al. 1994). EPO vermag unabhängig Angiogenese zu initiieren. So stimuliert es z. B. die Formation von Kapillaren ausgehend von bestehenden Blutgefäßen zur Versorgung einer bisher avaskularisierten Region, wobei EPO auch chemotaktische Wirkung besitzt (Li Y et al. 2007a, Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005, Reinders et al. 2006).

In Zellkulturen schützte EPO Endothelzellen vor Hypoxieschäden, sorgte für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials und verhinderte apoptotische Vorgänge durch Inhibition von Caspase 1, 3 und 8 (Chong et al. 2002b).

In anderen Versuchen wurde der direkte steigernde Einfluss von EPO auf die Expression von eNOS, NO und cGMP unter hypoxischen Bedingungen demonstriert (Beleslin-Cokic et al. 2004). Transgene Mäuse mit hoher EPO-Verfügbarkeit zeigten ebenfalls erhöhte Level von eNOS, NO und NO-vermittelter Gefäßrelaxation, was den bedrohlichen Effekt eines sehr hohen Hämatokrits (Thromboserisiko) konterkarierte (Ruschitzka et al. 2000).

Endothelzellen sind zudem wichtiger Bestandteil des Stammzellreservoirs von Neuronen (Shen et al. 2004). Dies lässt die Vermutung zu, dass eine EPO-getriggerte Stimulation des Endothels direkt zu Neurogenese und Neuroprotektion führen könnte. So wurde gezeigt, dass EPO die Angiogenese um eine Infarktzone des Gehirns förderte und auch die Migration von Neuroblasten in diese Region induzierte, was eine Verbindung beider Vorgänge annehmen lässt (Wang et al. 2006).

Interessant erscheint auch die Tatsache, dass die EPO-Produktion im Gehirn auch in Endothelzellen stattfindet. So findet sich nach ischämischem Insult bei Mäusen neben einer basalen EPO-Produktion in Neuronen und Astrozyten etwa einen Tag nach dem Infarkt auch EPO-Produktion in Endothelzellen (Bernaudin et al. 1999).

1.2.3 EPO/EPOR im Gehirn

1.2.3.1 EPO- und EPOR-Expression im Gehirn

Der Nachweis des EPO-/EPOR-Signalweges in Endothel- und Nervenzellen gelang bereits in den 90er Jahren (Anagnostou et al. 1990, Anagnostou et al. 1994, Jelkmann und Wagner 2004, Morishita et al. 1997). Eine EPO-Produktion wurde mittlerweile in verschiedensten Regionen des Gehirns nachgewiesen (z. B. im Hippokampus und Kortex) (Digicaylioglu et al. 1995, Marti et al. 1996) und fand sich dabei beispielsweise in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten (Marti et al. 1996, Sugawa et al. 2002).

Die Expression von EPOR wurde jenseits des Nachweises in mesenzephalen, hippokampalen und kortikalen Neuronen auch in Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und kapillären Endothelzellen im Gehirn entdeckt (Bernaudin et al. 1999, Marti et al. 1996, Marti 2004, Masuda et al. 1994, Morishita et al. 1997, Nagai et al. 2001, Sugawa et al. 2002, Yamaji et al. 1996).

Neben der typischen reifen EpoR-mRNA, die auch in den Zellen der Erythropoese vorkommt, finden sich in Zellen des ZNS eine Reihe ineffizient prozessierter Formen von EpoR-mRNA, was die insgesamt deutlich geringere Konzentration von EPOR im Gehirn im Vergleich zu Zellen der Erythropoese erklären könnte (Chin et al. 1995, Yamaji et al. 1996).

Zellkulturversuche zeigten, dass durch den EPO-/EPOR-Signalweg beispielsweise die Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten gefördert wird (Sugawa et al. 2002).

1.2.3.2 EPO und Neuroprotektion bei toxischen Zuständen im Gehirn

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass EPO ein potentes Neuroprotektivum darstellt. Somit erscheint es als vielversprechender Kandidat die therapie-assoziierten Kollateralschäden an gesundem Hirngewebe bei der Behandlung von Hirntumoren abzumildern. Die vielfältigen neuroprotektiven Eigenschaften EPOs sollen im Folgenden dargestellt werden.

Unter Hypoxie (scheinbar aber nicht direkt HIF vermittelt) wird die EPOR-Expression in neuronalen Zellen gesteigert und damit die Sensitivität gegenüber EPO erhöht (Chin et al. 2000, Yu et al. 2002). So vermittelt der EPO-/EPOR-Signalweg einen gewissen Schutz von embryonalen und postnatalen Neuronen-Zellkulturen gegenüber durch Hypoxie ausgelöstem Zelltod (Lewczuk et al. 2000, Yu et al. 2002).

Die Herstellung von EPO (HIF vermittelt) durch Astrozyten und Neuronen steigt unter Hypoxie zudem deutlich an (Marti et al. 1996).

In Mäusen mit fokaler zerebraler Ischämie zeigt sich beispielsweise eine Induktion von EPOR in Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten, gefolgt von einer Steigerung der EPO-Expression (Bernaudin et al. 1999).

Für die EPO vermittelte Neuroprotektion sind unter anderem Signalwege, die JAK-2, ERK-1/-2 (Bullard et al. 2005) und AKT aktivieren, mitverantwortlich. Im Mediainfarktmodell bei der Maus wurde hierbei ein erhöhter Level an BCL-X_l gemessen, welches als Mitglied der BCL-2 Proteinfamilie antiapoptotische Eigenschaften besitzt (Kilic et al. 2005).

In einem anderen Modell mit hippokampalen Neuronen zeigte sich eine durch EPO vermittelte Aktivierung des AKT-Signalweges, was zu einer verminderten Ausschüttung apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, Caspase 1, 3 und 8 führte (Chong et al. 2003a).

Auch wurde die Hemmung des Transkriptionsfaktors FOXO-3a durch EPO-Signalwege nachgewiesen. So verhindert AKT die Translokation von FOXO-3a in den Zellkern, welches dort normalerweise die Transkription pro-apoptotischer Gene auslöst und Einfluss auf Zellzyklus und Wachstumskontrolle bei Neoplasien nimmt (Lehtinen et al. 2006, Li Y et al. 2007b, Maiese et al. 2007). In ähnlicher Weise vermag EPO auch die Phosphorylierung und Degradation von FOXO-3a zu fördern, indem es diesen durch Bindung an das Protein 14-3-3 im Zytoplasma zurückhält (Chong und Maiese 2007).

Des Weiteren wurde die durch EPO ausgelöste Aktivierung von NF-κB als Vermittler von Neuroprotektion identifiziert (Digicaylioglu und Lipton 2001). Gesteigerte Expression von NF-κB und Translokation in den Zellkern bewirkt eine Aktivierung antiapoptotischer Gene (Chong et al. 2005b, Li F et al. 2006, Spandou et al. 2006).

EPO kann das Überleben von Zellen des Nervensystems unter zahlreichen toxischen Bedingungen verbessern (Lykissas et al. 2007, Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005). Neben dem Schutz vor ischämischer Hypoxie (Chong et al. 2002b, Chong et al. 2003a, Chong et al. 2003c, Keogh et al. 2007, Li F et al. 2006, Li Y et al. 2007a) kann EPO bei Neuronen des Gehirns und der Retina die schädlichen Auswirkungen von freien Radikalen (Chong et al. 2003b, Chong et al. 2003c), Exzitotoxizität (Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005, Morishita et al. 1997), Amyloidtoxizität (Chong et al. 2005b) oder dopaminerger Zellschädigung (McLeod et al. 2006) mildern.

Im Zellkulturversuch konnte EPO Oligodendrozyten vor Interferon-γ- und Lipopolysaccharidtoxizität schützen, insbesondere durch Hemmung der iNOS-Expression und Nitrit-Produktion (Genc K et al. 2006, Li W et al. 2004, Zhang et al. 2005). Im Rattenmodell des Rückenmarktraumas führte eine EPO-Behandlung zu verminderter Apoptose von Oligodendrozyten und

zum Erhalt von weißer Substanz im Gehirn (Arishima et al. 2006, Vitellaro-Zuccarello et al. 2007).
Die systemische Gabe von EPO kann bei Rückenmarksverletzungen (King et al. 2007, Okutan et al. 2007), zerebralem Ödem (Verdonck et al. 2007), zerebralem Trauma (Cherian et al. 2007) oder epileptischer Aktivität (Mikati et al. 2007, Nadam et al. 2007) das funktionelle Bild verbessern und Zelltod verhindern.
Ein therapeutischer Einsatz von EPO im Parkinson-Mausmodell führte zur Verbesserung der motorischen Aktivität und des Überlebens dopaminerger Neurone (Genc S et al. 2001).
In Nagetieren, die einer milden Hirnischämie ausgesetzt wurden, führte die Infusion von löslichem EPOR in den Seitenventrikel, der die Wirkung EPOs am Gewebe abschwächte, zu neuronaler Degeneration und geminderter Lernfähigkeit (Sakanaka et al. 1998).
Die Senkung verfügbaren EPOs durch Verabreichung von löslichem EPOR in den zerebralen Ventrikelraum führt dabei zu einer Reduktion des neuroprotektiven Effektes in der Größenordnung von 40% - 88% (Malhotra et al. 2006, Prass et al. 2003). In einem *in-vitro*-Modell zerebraler Ischämie wurde ebenfalls gezeigt, dass die neuroprotektive Wirkung von EPO, die zum Schutz primärer kortikaler Neurone vor Hypoxie führt, durch Gabe von löslichem EPOR, anti-EPOR-Antikörpern und eines JAK-2-Inhibitors aufgehoben werden kann (Ruscher et al. 2002).

In zellulären Entzündungsreaktionen greift EPO regulierend ein. So wird die Zytokinproduktion in Endothelzellen, die TNF-α ausgesetzt waren, reduziert (Maiese et al. 2005). Darüber hinaus kann die primäre Aktivierung und Proliferation von Mikroglia durch oxidativen Stress blockiert werden (Chong et al. 2003a, Chong et al. 2005b). Die Phagozytoseaktivität mikroglialer Zellen gegenüber verletzten Zellen wird durch EPO vermindert, wobei AKT (Chong et al. 2004) und die Regulation von Caspasen eine Rolle spielen (Chong et al. 2003a, Chong et al. 2003b, Wu Y et al. 2007).
Die direkte Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF-α und MCP-1 durch EPO konnte gezeigt werden (Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005). Auch durch Leukozyten verursachte Entzündungsreaktionen werden durch EPO reduziert (Contaldo et al. 2007). Im Gegenzug ist EPO aber auch in der Lage, die Erhaltung mikroglialer Zellen durch Verhinderung von Apoptose zu unterstützen, die für die Restrukturierung von Neuronen und Gefäßzellen wichtig sind (Li F et al. 2006).

All diese Erkenntnisse lassen EPO über die Anämiebehandlung hinaus für eine Vielzahl von zerebralen Störungen als vielversprechende therapeutische Substanz, wie z. B. bei zerebraler Ischämie, Rückenmarksverletzungen, Multipler Sklerose, Parkinson, Schizophrenie und ähnlichen Erkrankungen, aber eben auch zur Linderung von neurologisch kompromittierenden Effekten der Therapie von Hirntumoren, in Betracht kommen.

Für die zukünftige Anwendung gibt es sogar weiter entwickelte EPO-Analoga, die die Blutbildung nicht stimulieren, ihren zyto- bzw. neuroprotektiven Charakter aber weiter behalten (Moon et al. 2006).

1.2.3.3 EPO und die Bluthirnschranke

Da EPO ein Molekulargewicht von 34 kDa aufweist (Krantz 1991) und als Peptidhormon hydrophile Eigenschaften besitzt, erscheint ein passives Überwinden der Blut-Hirn-Schranke (BHS) mittels Diffusion unwahrscheinlich (Noguchi et al. 2007). Stoffe, die die BHS passieren, haben idealerweise eine hohe Lipidlöslichkeit und eine geringe Größe (max. ca. 500 Dalton). Es stellt sich daher die Frage, wie und ob EPO die BHS durchquert.

Eine erhöhte EPO-Konzentration im Nervenwasser nach Hirntrauma korreliert nicht mit der EPO-Konzentration im Serum, sondern mit dem Ausmaß der Dysfunktion der BHS (Marti et al. 1997). Das impliziert, dass EPO diese nicht einfach überwindet.

Studien fanden allerdings einen Transport von EPO über die intakte BHS, der mit einer sehr langsamen, nicht sättigbaren Kinetik, in etwa vergleichbar mit der von Albumin, stattfindet. Die Aufnahme erreichte ihren Höhepunkt 3 Stunden nach Applikation und lag bei 0,05 bis 1% der injizierten Dosis EPO pro Gramm Gehirn (Banks et al. 2004).

In einem anderen Versuch erhielten Patienten hohe Dosen EPO intravenös. Hier begann die EPO-Konzentration im Nervenwasser nach 3 Stunden anzusteigen, wobei die Zunahme einer Kinetik erster Ordnung folgte und von der Permeabilität der BHS abhing (Xenocostas et al. 2005).

So scheint die Überwindbarkeit der BHS wesentlich von der Beeinträchtigung ihrer Integrität abzuhängen, so dass z. B. im Modell des ischämischen Insults deutlich mehr exogenes EPO die BHS überwindet als im gesunden Gehirn (Abraham et al. 2002). Auch Glioblastome verursachen eine Störung der BHS, was auch die Entstehung ausgedehnter perifokaler Ödeme unterstützt (Mittelbronn et al. 2007).

Die Zusammenschau der Ergebnisse lässt einen nicht rezeptorvermittelten Transport von EPO über die BHS vermuten, der nur in sehr geringem Maß stattfindet, wenn sie unversehrt ist.

Obwohl die Größe des EPO-Moleküls dessen Fähigkeit zur Überwindung der BHS einschränkt, haben dennoch zahlreiche Studien den wirksamen Einfluss der intravenösen oder peritonealen Gabe von EPO bei zerebralen Prozessen gezeigt.
So vermittelte die systemische bzw. intraperitoneale Gabe von EPO bei neonatalen und ausgewachsenen Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie, Hirntrauma oder experimentell ausgelöster Autoimmun-Enzephalomyelitis neuroprotektive Effekte (Springborg et al. 2003, Sun et al. 2004, Yatsiv et al. 2005).
Im Tiermodell führte eine intravenöse EPO-Gabe bei Rückenmarksverletzungen zu verbessertem funktionellem neurologischem Status (Celik et al. 2002, Gorio et al. 2002).
Auch bei anderen neurodegenerativen Störungen vermag peritoneal appliziertes EPO die kognitiven Leistungen zu stabilisieren (Ehrenreich et al. 2004).

Interessant ist, dass EPO selbst als direkter protektiver Faktor für die Integrität der BHS vermutet wird. So verringerte die Vorbehandlung mit EPO bei Ratten die Erhöhung der Durchlässigkeit der BHS, die durch Pentylentetrazol induzierte Krampfanfälle ausgelöst wurde (Uzum et al. 2006).
Bei Rindern wurde *in vitro* gezeigt, dass EPO die BHS vor VEGF-vermittelter Erhöhung der Permeabilität schützt (Martinez-Estrada et al. 2003). So scheint neben dem direkten protektiven Einfluss von EPO auf Neuronen auch der Schutz der BHS für die neuroprotektiven Effekte von EPO mit verantwortlich zu sein.

1.2.4 Immunhistochemische Antikörper gegen EPO und EPOR

Der verwendete Antikörper zur Herstellung der Markierungen des EPO-Proteins war der N-19 Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology. Zielepitop ist ein Peptid am N-terminalen Ende von menschlichem EPO (Santa Cruz Biotechnology, Epo (N-19): sc-1310 Product Datasheet).
Zur Anfärbung des EPOR wurde der C-20-Antikörper, ebenfalls von Santa Cruz Biotechnology, eingesetzt. Zielepitop dieses Antikörpers ist hier ein Peptid am C-terminalen Ende der zytoplasmatischen Domäne des menschlichen EPOR (Santa Cruz Biotechnology, EpoR (C-20): sc-695 Product Datasheet). Bezüglich der Spezifität sind kommerzielle EPOR-Antikörper in letzter Zeit jedoch umstritten (Elliott et al. 2006). In unserer Studie ergab sich jedoch kein Hinweis auf ein unspezifisches Verhalten des Antikörpers.

1.3 Die Relevanz von EPO/EPOR bei malignen Neoplasien

1.3.1 Tumoranämie und EPO

Neben den vielfältigen Ansätzen, EPO als Therapeutikum bei neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Schlaganfall oder neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson einzusetzen, besitzt EPO ein hohes Potenzial in der supportiven Krebstherapie.

Anämie ist eine häufige Komplikation, die bei bis zu 75% aller Patienten mit Malignomen beobachtet werden kann (Groopman und Itri 1999, Ludwig et al. 2004, Steensma 2004) und ist dabei ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben von Krebspatienten (Caro et al. 2001). Die Behandlung mit Bluttransfusionen ist dabei zwar der schnellste Weg Symptome der Anämie zu mildern, allerdings birgt die Anwendung auch eine Reihe von einschlägig bekannten Risiken, wie Infektionen oder Unverträglichkeiten (Bohlius et al. 2005). Da aber Symptome der Anämie wie beispielsweise Müdigkeit, Antriebslosigkeit, Luftnot oder Schwindel die Lebensqualität eines Patienten stark beeinflussen, muss dies in therapeutische Überlegungen mit eingehen (Curt et al. 2000, Knight et al. 2004, Vogelzang et al. 1997).
Es wurde vielfach dargestellt, dass die Gabe von rekombinantem EPO die Anämie im Rahmen maligner Erkrankungen bei vielen Patienten korrigieren kann (Khan et al. 2008).

1.3.2 Hypoxische Tumoren und Radiochemoresistenz – Korrektur durch EPO?

Neben den Auswirkungen auf das Befinden des Patienten hat der Hb-Wert auch direkten Einfluss auf die Oxygenierung von Tumorzellen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Tumorgewebe typischerweise eine schlechtere Sauerstoffversorgung als das umgebende Gewebe hat (Molls et al. 1998). Dies hängt im wesentlichen vom Ausmaß der Durchblutung und Mikrozirkulation, aber eben auch von der Höhe der Hb-Konzentration ab, so dass ein erhöhter Hb-Wert auch mit verbesserter Oxygenierung der Tumorzellen einhergeht (Kelleher et al. 1996).
Generell gilt, dass hypoxische Tumoren weniger gut auf Bestrahlung und Chemotherapie ansprechen und eine verminderte lokale Krankheitskontrolle aufweisen als besser oxygenierte Tumoren derselben Größe und desselben Stadiums (Brizel et al. 1997, Höckel et al. 1996). Hypoxie von Tumoren ist daher assoziiert mit einem klinisch aggressiveren Phänotyp, Therapieresistenz und schlechterer Prognose (Graeber et al. 1996, Vaupel und Harrison 2004).
In einer großen Studie (889 Patienten) wurde entsprechend die hochsignifikante Auswirkung einer Anämie auf den Effekt der Strahlentherapie bei Hals- und Kopftumoren evaluiert. Das

5-Jahresüberleben bei Patienten mit einem Hb ≥13 g/dl bei Männern, bzw. 12 g/dl bei Frauen, betrug 58.2%, während in der Gruppe mit niedrigeren Hb-Werten dieses bei nur 28.4% lag (Frommhold et al. 1998).
Auch andere Studien bestätigten die Ergebnisse, dass Radiotherapie und niedrigere Hb-Werte mit verkürzter Überlebenszeit, schlechterer Lokalkontrolle und erhöhter Metastasierungsneigung einhergehen (Girinski et al. 1989, Grogan et al. 1999). Die Gabe von rhEPO konnte Tumorwachstum verringern und Radiosensitivität wieder herstellen (Ning et al. 2005, Pinel et al. 2004, Thews et al. 1998).
Auch für die Wirksamkeit von Chemotherapie scheint Hypoxie eine Bedeutung zu haben. So könnte die Resistenz mancher Tumoren gegenüber Chemotherapeutika auch auf ungenügende Vaskularisation von Tumoren mit entsprechender Hypoxie zurückzuführen sein (Vaupel et al. 1989). In vielen kontrollierten Studien wurde demonstriert, dass die Gabe von Epoetin alpha auch bei chemotherapierten Patienten gut in der Lage war, den Hb-Wert anzuheben und die Lebensqualität der Patienten zu steigern (Abels 1992, Littlewood et al. 2001).

Zahlreiche weitere Studien wiesen die positiven Auswirkungen der EPO-Gabe, wie geringeres Auftreten von Rezidiven, verminderter Transfusionsbedarf, verbesserte Lebensqualität, besseres Ansprechen auf Radiochemotherapie und längeres Gesamtüberleben nach (Glaser et al. 2001, Höckel et al. 1998, Lavey und Dempsey 1993, Littlewood et al. 2001, Nordsmark et al. 1996, Teicher et al. 1990). Allerdings konnten einige Studien den radiosensibilisierenden Effekt von EPO trotz nachgewiesener Verbesserung der Tumoroxygenierung nicht reproduzieren (Kirkpatrick et al. 2006).

Interessant ist, dass durch EPO-Gabe auch jenseits der einfachen Korrektur des Hb-Wertes zusätzliche günstige Effekte bei Malignomen erzielt werden konnten.
In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass nicht anämische Ratten mit experimentellen Adenokarzinomen, unabhängig von der Höhe des Hb-Wertes, eine verbesserte Tumoroxygenierung zeigten, wenn sie EPO erhielten (Blackwell et al. 2003). Auch andere Studien präsentierten in Xenograft-Modellen eine verbesserte Tumoroxygenierung unter rhEPO (Kelleher et al. 1996, Ning et al. 2005, Pinel et al. 2004). So bewirkte beispielsweise eine Gabe von Darbepoetin zwei Stunden vor Radiotherapie einen radiosensibilisierenden Effekt, bevor sich Auswirkungen auf den Hb-Wert manifestieren konnten (Ning et al. 2005).

Aber der Einsatz von EPO birgt auch Gefahren. So wurde gezeigt, dass das Risiko für thromboembolische Ereignisse unter EPO-Therapie erhöht ist (RR 1,67) (Bohlius et al. 2006b). Dieses Risiko ist generell insbesondere bei Patienten erhöht, die gleichzeitig eine Chemotherapie erhalten. Weitere Nebenwirkungen sind ein dosisabhängiger Blutdruckanstieg, bis hin zu hypertensiven Krisen sowie generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle. Auch kann es zu einer Antikörperbildung gegen Erythropoietine kommen (European Medicines Agency, Product Information Epoetin alfa Hexal).

Insbesondere gibt es aber, in Anbetracht der Tatsache, dass zahlreiche Tumorarten EPOR exprimieren sowie aufgrund der vielfältigen zellulären Funktionen, wie z. B. gesteigerter Angiogenese, Antiapoptose und der Suppression von Entzündungsreaktionen, Befürchtungen, dass EPO bei malignen Erkrankungen das Tumorwachstum beschleunigen könnte. Dies soll im Folgenden detailliert dargestellt werden.

1.3.3 Sicherheit von EPO in der Tumortherapie

Obwohl viele Studien gezeigt haben, dass Anämie bei Krebspatienten einen negativen Einfluss auf das Überleben hat und dass ein klinischer Nutzen durch die Gabe von EPO erzielt werden kann (Binet et al. 1981, Caro et al. 2001, Hasenclever und Diehl 1998, Moullet et al. 1998), riefen einige neuere Studien Bedenken bezüglich des Einsatzes von EPO-Analoga auf.
Henke et al. (2003) zeigten in einer Studie mit 351 Patienten, die an Tumoren der Hals- und Kopfregion litten, einen Überlebensnachteil von Patienten, die EPO erhielten. Das Studiendesign sah dabei vor, den Hb-Wert über 14 g/dl bei Frauen und über 15 g/dl bei Männern zu stabilisieren, wobei allerdings nur in einer Gruppe EPO gegeben wurde, in der anderen hingegen ein Placebo. Alle Patienten erhielten Strahlentherapie.
Ein weiteres Ergebnis war die erhöhte Rate lokoregionaler Tumorprogressionen unter EPO-Therapie (RR 1.69, KI 1.16-2.47, p=0.007) im Vergleich zur Placebo-Gruppe.

Die zweite Studie von Leyland-Jones et al. (2005) untersuchte 939 Patienten mit Brustkrebs, wobei die Applikation von EPO (40.000 U pro Woche für 12 Monate) gegen Placebo randomisiert wurde. Der Zielbereich für das Hb lag bei 12 – 14 g/dl. Diese Studie wurde vorzeitig abgebrochen, da die Analyse der Daten der ersten 4 Monate ergab, dass in der EPO-Gruppe bereits 41 Todesfälle aufgetreten waren gegenüber nur 16 Todesfällen in der Placebo-Gruppe. Die Analyse der Daten nach einem Jahr ergab ein Überleben von 70% in der EPO-Gruppe gegenüber 76% in der Placebo-Gruppe (p=0.01).

Diese Erkenntnisse haben die Theorie aufgeworfen, dass die Beseitigung von Tumorhypoxie das Wachstum von Malignomen fördern kann, was den Einsatz von EPO in der Krebstherapie kritisch überdenken lässt. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Mehrzahl der Studien in der Vergangenheit die Sicherheit von EPO in der Behandlung von Tumorerkrankungen gezeigt haben (Bohlius et al. 2006a).

1.3.4 Expression von EPO und EPOR in Tumorzellen

Die Expression von EPO wurde in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen und zeigte sich, wie auch die Expression von EPOR, durch Hypoxie (insbesondere durch HIF) stimulierbar (Acs et al. 2001, Acs et al. 2002, Arcasoy et al. 2002, Batra et al. 2003, Dagnon et al. 2005, Westenfelder und Baranowski 2000, Yasuda et al. 2002).
Die Transkription von EPOR wurde ebenfalls auf unterschiedlichsten Tumorzellen mittels RT-PCR oder IHC nachgewiesen.

Tabelle 1 Maligne Neoplasien und EPOR-Expression

Organsystem	Studie
Mamma	(Acs et al. 2001, Arcasoy et al. 2002, Westphal et al. 2002)
Nieren	(Westenfelder und Baranowski 2000, Westphal et al. 2002)
Kolon	(Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
Magen	(Yasuda et al. 2003)
Pankreas	(Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
Prostata	(Feldman et al. 2006, Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
weibliche Fortpflanzungsorgane	(Acs et al. 2003, Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2001, Yasuda et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
Leber	(Batra et al. 2003, Westphal et al. 2002)
Lunge	(Yasuda et al. 2003)
Haut	(Kumar et al. 2005, Selzer et al. 2000, Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
Kopf und Hals	(Lai et al. 2005)
hämatopoetische Zellen	(Westphal et al. 2002, Yasuda et al. 2003)
Gehirn	(Batra et al. 2003, Westphal et al. 2002)

In einer Studie wurde beschrieben, dass von 23 untersuchten Tumorzelllinien 20 den EPOR exprimierten. Die EpoR-Transkription korrelierte dabei mit dem immunhistochemischen Nachweis des EPOR-Proteins (Westphal et al. 2002).

Bei simultaner EPO- und EPOR-Expression lassen sich autokrine und parakrine Stimulationswege annehmen (Acs et al. 2001, Hardee et al. 2007, Sytkowski 2007).

1.3.5 Nachgewiesene EPO-/EPOR-Signalwege in Tumoren

In-vitro-Studien berichteten von einer vermehrten Phosphorylierung von Tyrosinen in Zelllinien von Mamma- und Zervixkarzinomen, die hohen Dosen von rhEPO ausgesetzt wurden. Es wurde vermutet, dass dies tumorfördernde Effekte haben könnte (Acs et al. 2001, Acs et al. 2003). Auch beobachtete man, dass rhEPO die Translokation von NF-κB (siehe auch Kapitel 1.2.3.2, Seite 14) in den Zellkern förderte und somit die Transkription antiapoptotischer Gene steigerte, woraus gefolgert wurde, dass daraus ein negativer Einfluss auf das Überleben resultieren könnte.
So scheinen die physiologisch durch EPO/EPOR vermittelten Signalwege möglicherweise auch in Tumorzellen aktiv zu sein.

1.4 EPO/EPOR und Hirntumore

Im normalen Hirngewebe wird von vielen Zelltypen EPO und sein Rezeptor exprimiert. Darunter fallen Neurone (Bernaudin et al. 2000, Masuda et al. 1993), Endothelzellen (Anagnostou et al. 1990) und insbesondere Astrozyten (Masuda et al. 1994), die die bedeutendste Quelle endogener EPO-Produktion unter hypoxischen Bedingungen im ZNS darstellen (Masuda et al. 1994, Ruscher et al. 2002).
Entsprechend fanden sich auch EPO- und EPOR-Expression in verschiedensten Tumoren des Gehirns, wie z. B. pilozytische Astrozytome, anaplastische Ependymome, Medulloblastome, Neuroblastome (Batra et al. 2003), Meningeome (Kuster et al. 2009) und auch Glioblastome (Berdel et al. 1991, Mohyeldin et al. 2007, Yasuda et al. 2003).

Es gibt bisher nur wenige Studien, die den Einfluss von EPO auf die in dieser Arbeit untersuchten Glioblastome analysiert haben. Auch hier liegen, wie auch bei EPO und Tumoren allgemein, stark diskrepante Ergebnisse, ob EPO einen positiven oder doch einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat, vor.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

In dieser Dissertation soll an immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitten von Glioblastompatienten retrospektiv untersucht werden, ob die Expression von tumoreigenem EPO und EPOR in diesen Tumoren eine Auswirkung auf den klinischen Verlauf haben könnte und ob anzunehmen ist, dass diese endogene EPO- und EPOR-Expression Einfluss auf die Effektivität von Radiochemotherapie hat. Dazu wurde eine hohe Zahl von Präparaten von Gliompatienten herangezogen und nach verschiedenen Therapieformen differenziert.

Dies soll Hinweise ergeben, ob die Supportivtherapie zur Behandlung von Anämie und Nebenwirkungen von Radiochemotherapie bei Glioblastompatienten mittels EPO ein Risiko der Tumorprogression bietet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben

Aus einer retrospektiven Serie der Neurochirurgischen Klinik der Universität Göttingen wurden Fälle von Glioblastomen WHO-Grad IV zusammengestellt, von denen die Daten über Krankheitsverläufe und Behandlungen sowie in Paraffin eingebettetes Operationsmaterial zur Verfügung stand.

Für die immunhistochemischen Markierungen standen 107 Operationspräparate von Hirntumoren aus dem Gewebearchiv der Neuropathologischen Abteilung der Universität Göttingen zur Verfügung. Davon waren 89 Primärtumorpräparate, von denen in 13 Fällen auch das Erstrezidiv und in 5 Fällen das Zweitrezidiv verfügbar war. Histologisch handelte es sich dabei, bis auf zwei Gliosarkome des WHO Grades IV, ausschließlich um neuropathologisch gesicherte Glioblastome des WHO Grades IV. Die Tumore wurden zwischen Januar 1998 und Oktober 2005 in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Göttingen operiert.

Die Patienten wurden fünf verschiedenen Therapiegruppen zugeteilt. In der ersten Gruppe befanden sich 36 Patienten, die ausschließlich operiert wurden. Zehn Patienten erhielten eine adjuvante Radiotherapie und kombinierte Chemotherapie mit Nimustin und Temozolomid (konkomitant und adjuvant). Acht Patienten wurden mit adjuvanter Radio-/Chemotherapie, die die Gabe von Temozolomid konkomitant zur Radiotherapie und in Monotherapie umfasste, behandelt (Temozolomid konkomitant 75 mg/m^2 KÖF, Monotherapie 150-200 mg/m^2 KÖF). Weitere 14 Patienten wurden nach der Bestrahlung adjuvant mit Nimustin chemotherapiert. 21 Patienten erhielten nach der Radiotherapie eine adjuvante Monochemotherapie mit Temozolomid (150-200 mg/m^2 KÖF).

Tabelle 2 Therapiegruppen

	N=
OP	36
OP, Radiatio, Nimustin adjuvant	14
OP, Radiatio, TMZ adjuvant	21
OP, Radiatio, TMZ konkomitant + adjuvant	8
OP, Radiatio, TMZ konkomitant + adjuvant; Nimustin adj.	10

2.1.2 Labormaterial

2.1.2.1 Technische Geräte

- Lichtmikroskop Fa. Zeiss (Nr. 47 30 11 – 9901)
- Okular Zeiss , Kpl – W10x / 18 (Nr. 46 60 43 – 9902)
- Okular Zeiss, mit morphometrischem Zählgitter, Kpl – W10x / 18 (Nr. 46 60 43 – 9902)
- Objektive Zeiss: Plan 2,5 / 0,08; 160/- (Nr. 5053813)
  Plan 40 / 0,65; 160/0,17 (Nr. 5021055)
  Plan 16 / 0,35; 160/- (Nr. 4429376)
- Oberschalenwaage, Sartorius, 1204-MP
- pH-Meter, Knick, CG-811
- Magnetrührer mit Rührstäbchen, Ika Combimag Ret.
- Feuchte Kammer
- Silanisierte Objektträger Histobond®, Marienfeld (zur Anfertigung der Schnitte)
- Deckgläschen, Marienfeld
- Wärmeschrank (zur Anfertigung der Schnitte)

2.1.2.2 Antikörper

- Goat Anti-EPO (N-19): sc-1310, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Rabbit Anti-EPOR (C-20): sc-695, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Brückenantikörper: AffiniPure Rabbit Anti-Goat, Lot 77186, dianova
- EnVision-Reagenz des Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code K5007

2.1.2.3 Lösungen/Reagenzien

- 6% ige H_2O_2-Lösung
  10 ml 30%iges H_2O_2, Merck
  40 ml Aqua bidest.
- TRIS-Puffer (pH 7,4)
  6,5 g TRIS, Roth
  8,95 g NaCl, Merck
  ad 1000 ml Aqua bidest.
  Titrieren auf pH-Wert mit 1 molarer HCl (Merck), gegebenenfalls Korrektur mit 1 molarer NaOH (Merck)

- BSA, Roth (10%ige Lösung)
- Farbreagenz aus dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Code K5007

  50 µl Dako REAL™ Substrate Buffer

  1 µl Dako REAL™ DAB+ Chromogen (50x konzentriert)
- Entmineralisiertes Wasser
- Alkoholreihen: Ethanol, Chemievertrieb Hannover

  Zur Verdünnung mit Aqua bidest. auf 100%, 96%, 70%
- Xylol, Mallinckrodt Baker, 3410
- Cytoseal (60), Richard Allen Scientific
- Mayers Hämalaun, Roth
- TWEEN 20, Calbiochem, Molekular Biology Grade

2.1.2.4 Verwendete Software

- Statistica v8.1
- Microsoft Excel 2000
- Microsoft Word 2000

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes

Für diese Arbeit wurden die bereits in Paraffin eingebetteten Operationspräparate (diese waren zuvor in 4%igem Formalin fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließendem Xylolbad dehydriert, bevor sie mit Paraplast eingebettet wurden) dem Gewebearchiv der Neuropathologischen Abteilung der Universität Göttingen entnommen. Anschließend wurden mit einem Schlitten-Mikrotom 2-4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, welche nach dem Aufbringen auf Silan-beschichtete Objektträger über Nacht bei 37° C (im Wärmeschrank) fixiert und getrocknet wurden.

2.2.2 Immunhistochemische Färbung

Zur Anfärbung von EPO-Protein bzw. des EPOR wurden die oben angegebenen Primärantikörper angewendet. Zur farblichen Darstellung der gebundenen Antikörper wurde dann das EnVision Detection System von Dako eingesetzt, dessen Reagenz aus einem Dextran-Grundgerüst besteht, an den zahlreiche Meerrettich-Peroxidase-Moleküle (HRP) und Sekundärantikörper gekoppelt sind, welche gleichermaßen mit Maus- wie Kaninchenantikörpern

reagieren. In einem weiteren Schritt wurde dann Diaminobenzidinlösung (DAB) zusammen mit dem wasserstoffperoxidhaltigen Substratpuffer zugegeben, wobei mittels der Peroxidase ein braunes Endprodukt am Ort des Zielantigens entsteht.
Die genauen Reaktionsschritte des Färbeprotokolls werden im Folgenden beschrieben. Sämtliche Verdünnungen der Antikörper, des Farbstoffs und des Wasserstoffperoxids wurden stets kurz vor der Anwendung frisch angesetzt und alle Schritte des Protokolls ohne Unterbrechungen durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Bei Waschschritten wurden die Präparate, falls nicht anders beschrieben, für ca. 30 Sekunden in der Lösung geschwenkt.

2.2.2.1 Entparaffinierung

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen war es zunächst notwendig die Schnitte zu entparaffinieren. Dazu wurden die Präparate eingangs für 20 min im Xylol-Bad gehalten und anschließend zur Rehydratation in einer absteigenden Ethanolreihe, beginnend bei 100% (3x) über 96% (2x) und 70% (1x), gewaschen. Abschließend erfolgten drei Spülungen in entmineralisiertem Wasser.

2.2.2.2 Vorbehandlung der Präparate

Anschließend wurden die Schnitte zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Moleküle für 20 min in 6%ige Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben und daraufhin dreimal in entmineralisiertem Wasser gewaschen. Zur Pufferung des pH-Wertes wurden die Präparate nun für ca. eine Minute in TRIS gehalten und dann, nach vorheriger Entfernung überschüssiger Flüssigkeit, mit je 100 µl BSA für 20 min in einer feuchten Kammer beschickt. Das BSA hatte die Funktion, die Bindung der Antikörper an unerwünschte Epitope zu blockieren und die bessere Verteilung des Antikörpers auf dem Objektträger zu gewährleisten. Im Protokoll für die Färbung von EPO-Protein wurde die BSA-Anwendung ausgelassen, da hier eine Kreuzreaktion des Brückenantikörpers mit BSA nachzuweisen war.

2.2.2.3 Primärantikörper

Im nächsten Schritt wurden nach Entfernen überschüssiger Lösung 100 µl der jeweiligen Primärantikörper mit einer Konzentration von 2 µg/ml aufgetragen und für 60 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Verdünnung des EPOR-Antikörpers erfolgte dabei mit reinem TRIS-Puffer, wohingegen die Verdünnung des EPO-Antikörpers mit TRIS-Puffer, dem zuvor Tween-Reagenz im Verhältnis von 1:200 zugesetzt wurde, stattfand. Das Tween erleichterte durch Herabsetzen der Oberflächenspannung die Verteilung der Antikörper auf dem

Objektträger, was bei dem EPOR-Antikörper durch das vorherige Auftragen des BSA gewährleistet war. Nach Ablauf der 60 min wurden die Schnitte zweimal in TRIS-Puffer gewaschen.

2.2.2.4 Brückenantikörper

Für die Färbereaktion mittels EPO-Protein-Antikörper war der Einsatz eines Brückenantikörpers notwendig, da der EPO-Antikörper von der Ziege stammte, das Dako REAL™ EnVision™ Detection System allerdings nur mit Antikörpern von Maus oder Kaninchen reagiert.
So wurde für die Färbung im EPO-Protein-Protokoll zusätzlich ein Kaninchen Anti-Ziege-Antikörper eingesetzt, der gegen den Fc-Teil der gebundenen EPO-Antikörper gerichtet war und somit dann mit seinem Kaninchen-Fc-Teil als Angriffsziel für die im EnVision enthaltenen Sekundärantikörper dienen konnte.
Dazu wurden 100 µl Kaninchen Anti-Ziege-Antikörper mit einer Konzentration von 4,5 µg/ml auf die Schnitte aufgebracht und diese für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit TRIS-Puffer gewaschen.

2.2.2.5 Sekundärantikörper

Um die spezifisch erfolgte Bindung der Primärantikörper farblich darstellen zu können, wurde das EnVision-Reagenz aus dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System verwendet. Die Anti-Maus/Kaninchen-Antikörper, die zahlreich an das im Reagenz enthaltene Polymer gekoppelt waren, konnten nun spezifisch an die Fc-Teile des EPOR-Primärantikörpers bzw. des Brückenantikörpers (in der EPO-Protein-Färbung) binden. Dieses bildete die Grundlage für eine ortspezifische Färbereaktion.
Nach Protokoll wurden 100 µl des EnVision-Reagenzes je Präparat aufgetragen und abermals für 30 min inkubiert. Abschließend wurde erneut zwei Mal mit TRIS-Puffer gewaschen.

2.2.2.6 Färbereaktion

Um nun ein gefärbtes Endprodukt nach anfangs erläuterter Methode herstellen zu können, wurde zunächst das Farbreagenz im folgenden Verhältnis aus den im Dako REAL™ EnVision™ Detection System enthaltenen Bestandteilen hergestellt:
50 µl Dako REAL™ Substrate Buffer
1 µl Dako REAL™ DAB+ Chromogen (50x konzentriert).
Die Lösung wurde dann zeitnah mit 100 µl je Schnitt aufgebracht und in einer abgedunkelten feuchten Kammer für 20 min belassen (DAB-Chromogen ist lichtempfindlich).

In einer Reaktion mittels der am Polymer des EnVision-Reagenzes gekoppelten Peroxidase-Moleküle (HRP), des DAB-Chromogens sowie des im Puffer enthaltenen Wasserstoffperoxids entstand dann der braune Farbstoff spezifisch am Ort der Bindung des Primärantikörpers.
Nach Abschluss der Inkubation wurde vier Mal mit entmineralisiertem Wasser gespült.

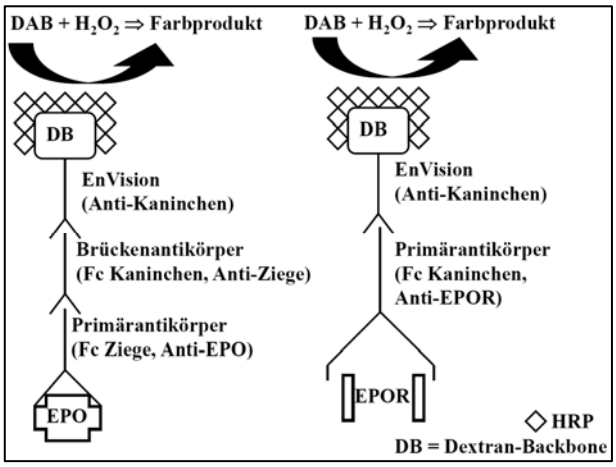

Abbildung 4 Immunhistochemie:
links EPO-Protokoll, rechts EPOR-Protokoll

2.2.2.7 Gegenfärbung

Zur Kerngegenfärbung wurden die Schnitte für 2 min in Mayers-Hämalaun-Lösung getaucht und anschließend für 1 min unter laufendem Leitungswasser gebläut.

2.2.2.8 Eindecken

Zum Eindecken wurden die Schnitte zunächst durch Behandlung in einer aufsteigenden Ethanolreihe, beginnend bei 70% (1x) über 96% (2x) und abschließend 100% (3x), entwässert und dann dreimal im Xylolbad gespült.
Als Einschlussmittel wurde schließlich ein Tropfen Cytoseal 60 verwendet und mit einem Deckgläschen abgeschlossen.

2.2.2.9 Positiv- und Negativkontrollen

Zur initialen Prüfung der Färbereaktionen wurden anfangs einige Präparate humaner Nieren als Positivkontrollen nach den obigen Protokollen gefärbt.
Ebenso wurden Negativkontrollen aus Präparaten von humanen Nieren und aus als bereits positiv befundenen Glioblastompräparaten erstellt. Dazu wurden die Präparate nach den obigen EPO- bzw. EPOR-Protokollen gefärbt, wobei jeweils nur die Primärantikörperlösung durch TRIS-Puffer gleicher Menge (100 µl) ersetzt wurde. Alle anderen Parameter blieben identisch. Die Durchführung erfolgte im gemeinsamen Arbeitsschritt mit den regulär zu färbenden Präparaten bzw. Positivkontrollen, so dass ein direkter Vergleich der Negativkontrollen mit den normal angefärbten Schnitten desselben Arbeitsganges möglich war.

2.2.3 Morphometrie

Die lichtmikroskopische semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte mit 400-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines morphometrischen Zählgitters.

Bei 400-facher Vergrößerung betrug die Fläche des quadratischen Zählfeldes 0,0625 mm^2, bei einer Kantenlänge von jeweils 0,25 mm.

Pro Gewebeschnitt wurden acht bis zehn Gesichtsfelder vitales Tumorgewebe ausgewertet. In Bereichen von Infiltrationszonen oder Nekrosen wurden keine Auswertungen vorgenommen. Dabei wurden folgende Scores zur semiquantitativen Bewertung verwendet. Ein Einzelscore von Null bezeichnete die vollständige Abwesenheit gefärbter Tumorzellen im Gesichtsfeld. Der Score 1 bedeutete positive Tumorzellen < 5%, der Score 2 positive Tumorzellen im Bereich von 5 bis 20%. Der Score 3 deckte den Anteil positiver Tumorzellen von >20% bis 50% ab. Als höchster Score 4 wurden Gesichtsfelder mit über 50% positiven Tumorzellen gewertet.

Die Scores wurden dabei unter Betrachtung der Zellen des Gesichtsfeldes im Zählgitter abgeschätzt, wobei eine Zelle als positiv gewertet wurde, wenn eine, deutlich vom Hintergrund abgehobene, der Zelle klar zuzuordnende Färbung erkennbar war (Zytoplasma und Zellmembran wurden berücksichtigt).

Zur Auswertung wurde ein Gesamtscore aus dem mit Faktor 10 multiplizierten Mittelwert der Einzelscores der ausgewerteten Gesichtsfelder gebildet, so dass der für die statistische Auswertung gebildete Score Werte zwischen 0 und 40 annehmen konnte.

Stark nekrotische und sehr kleine Präparate, die das Auszählen von mindestens acht Gesichtsfeldern oder die Identifizierung von vitalem Tumorgewebe sehr schwierig machten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Daten wurden mit dem rechnergestützten Statistikprogramm Statistica v8.1 ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0{,}05$ gewählt.

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die zur Analyse verwendeten Tests:

Tabelle 3 Übersicht angewandter statistischer Tests (fortlaufend = keine Einteilung in Subgruppen)

Untersuchte Faktoren	Angewandter Test
-Altersgruppe und Überleben (Alter median geteilt in jung und alt) -Geschlecht und Überleben	Gehans Wilcoxon -Test
-Therapiegruppen und Überleben -Resektionsausmaß und Überleben	Chi-Quadrat-Test im Rahmen einer Cox Regression
-Geschlecht und EPO-/EPOR-Scores	Mann-Whitney-U-Test
-Alter (fortlaufend) und EPO-/EPOR-Scores	Spearmans Rangkorrelation
-EPO- und EPOR-Score (fortlaufend)	Spearmans Rangkorrelation
-EPO-/EPOR-Scores und Überleben (Scores median geteilt in hoch und niedrig)	Gehans Wilcoxon-Test
-Multivariate Analysen (Einschluss von Score, Alter (fortlaufend), Therapiegruppe , Resektionsausmaß)	Cox Regression
-Stratifizierte Analysen der Scores (stratifiziert jeweils nach Therapiegruppe (eingeteilt in zwei Gruppen: RCT erhalten/nicht erhalten), Resektionsausmaß, Altersgruppe)	Cox Regression
Verknüpfte Analysen EPO und EPOR: -Gruppenanalyse (EPO hoch/niedrig in Kombination mit EPOR hoch/niedrig und Überleben) -Summenscore aus Addition EPO- + EPOR-Score und Überleben -Summenscore (median in hoch/niedrig) und Überleben	 Chi-Quadrat-Test im Rahmen einer Cox Regression Cox Regression Gehans Wilcoxon-Test
Primärtumor und Sekundärtumor	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test

Anmerkung: Chi-Quadrat-Test im Rahmen einer Cox Regression = Analysefunktion von Überlebenszeiten bei mehreren Gruppen:
Dieser in Statistica implementierte Test basiert auf Gehans generalisiertem Wilcoxon-Test, Peto und Petos generalisiertem Wilcoxon-Test und dem log-rank-Test. Dabei wird zunächst jeder Überlebenszeit mittels der Prozedur von Mantel ein Score zugeordnet und danach ein ChiQuadrat-Wert des Summenscores jeder Gruppe berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Für die Analyse wurden initial immunhistochemische Färbungen des Gewebematerials von 89 Patienten durchgeführt.

3.1.1 Geschlechtsverteilung

Von den 89 Patienten waren 52 männlich (58%), 37 waren weiblich (42%).

3.1.2 Altersverteilung bei Erstdiagnose

Der Mittelwert des Alters bei Erstdiagnose betrug 61,9 Jahre, der Median 63 Jahre. Die Altersspanne erstreckte sich von 30 Jahren beim jüngsten bis zu 81 Jahren beim ältesten Patienten.

Die Alterskurve ist dabei in etwa normalverteilt, der Gipfel liegt zwischen 60 und 65 Jahren (15,7% aller Patienten). Allerdings gibt es eine zweite Erkrankungsspitze im Bereich von 70 – 75 Jahren (25,8% aller Patienten).

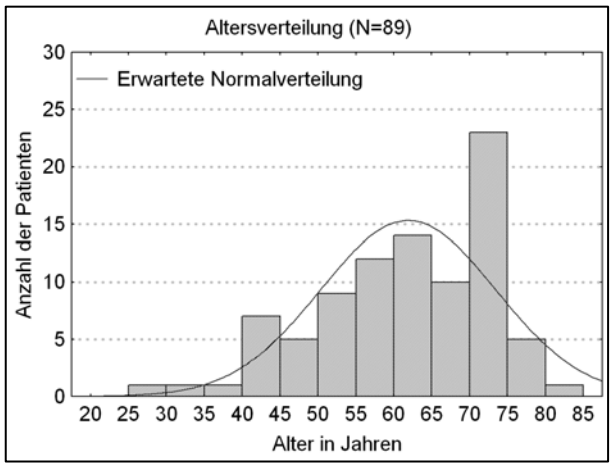

Abbildung 5 Altersverteilung Gesamtkollektiv

3.1.3 Überlebenszeiten

Das mediane Überleben der 89 Patienten lag bei 9 Monaten. Die kürzeste Überlebenszeit betrug wenige Tage, der einzige zum Zeitpunkt des Abschlusses der Studie noch lebende Patient erreichte mit bislang 115 Monaten die Spitze der Überlebenszeit in der Studienpopulation. Die 25%-Perzentile lag bei 3 Monaten, die 75%-Perzentile bei 16 Monaten. Nur ca. 5% der Patienten lebten länger als 40 Monate.

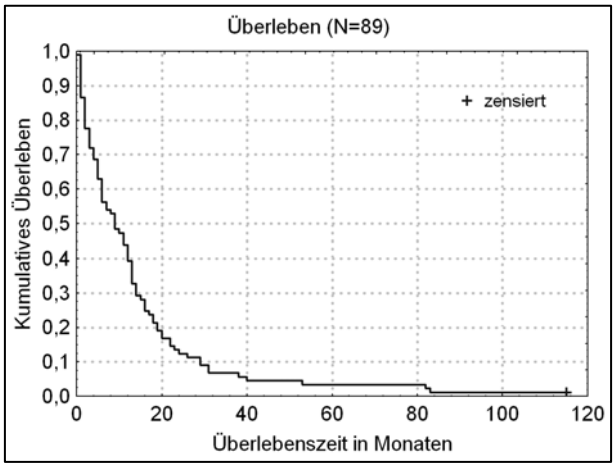

Abbildung 6 Kaplan-Meier Überlebenskurve für das Gesamtkollektiv

3.2 Statistische Korrelation von Überlebenszeiten mit Kofaktoren

3.2.1 Zusammenhang zwischen Geschlecht und Überleben

Der Gehans Wilcoxon-Test ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Geschlecht und Überleben.

3.2.2 Zusammenhang zwischen Alter und Überleben

Teilt man die Patienten anhand des medianen Alters (≤ 63 Jahre und >63 Jahre) in zwei Gruppen, so ergibt sich ein deutlich längeres Überleben von jungen Patienten (p=0,00005). Das mediane Überleben dieser Patienten betrug hier 13 Monate im Gegensatz zu 5 Monaten bei alten Patienten.

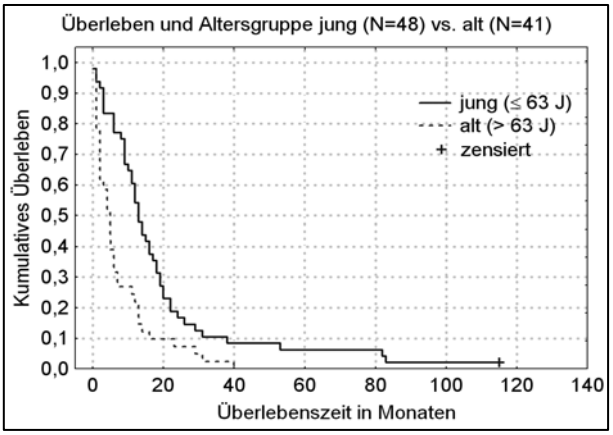

Abbildung 7 Überleben nach niedrigem und hohem Alter

3.2.3 Zusammenhang zwischen Therapiegruppe und Überleben

Wie bereits erwähnt konnten die Patienten fünf verschiedenen Therapiegruppen zugeordnet werden.

Tabelle 4 Verteilung in Therapiegruppen

	N=	Mittleres Überleben (Monate)	% der Patienten
Nur OP	36	3,6	40,5
TMZ nur adjuvant	21	16,1	23,6
TMZ konkomitant und adjuvant	8	22,1	9,0
ACNU adjuvant	14	23,1	15,7
TMZ konkomitant + adj., ACNU adj.	10	25,9	11,2

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Analysefunktion von Überlebenszeiten bei mehreren Gruppen.

Dabei ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang von Therapiegruppe und Überlebenszeit (p<0,00001).

Dabei zeigte sich, dass nur operierte Patienten, im Gegensatz zu ergänzend radiochemotherapierten Patienten, ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen.

Dieser Effekt war für jedes untersuchte Chemotherapieprotokoll in unterschiedlicher Ausprägung zu erkennen.

Betrachtet man die Patienten, die nur operiert wurden und die Patienten, die eine anschließende Radiochemotherapie (RCT, unter Zusammenfassung der verschiedenen Therapiegruppen) erhielten, ergibt sich für erstere ein medianes Überleben von 2 Monaten, gegenüber 14 Monaten bei weiter therapierten Patienten (p<0,00001).

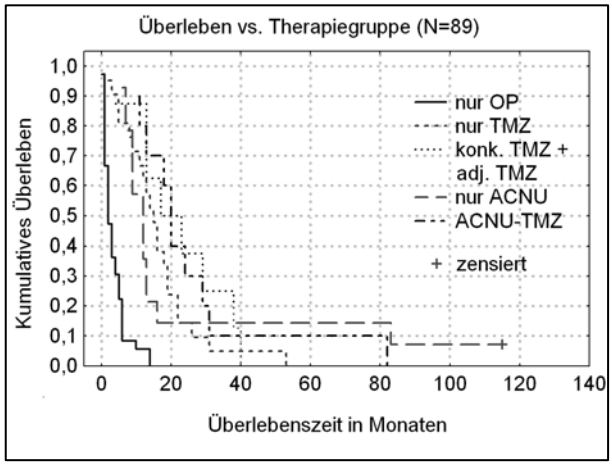

Abbildung 8 Überleben nach Therapiegruppe

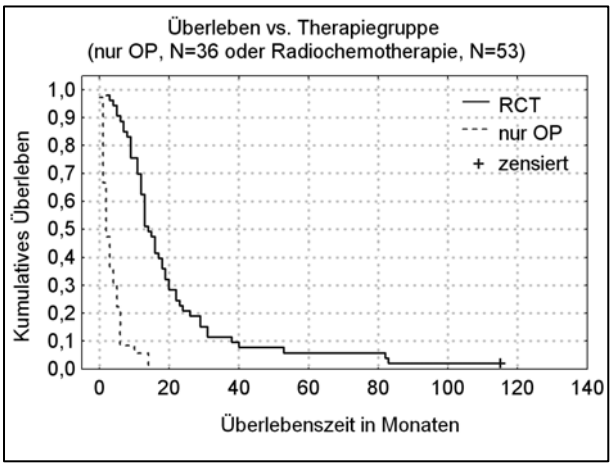

Abbildung 9 Überleben nach Therapiegruppe nur OP vs. RCT

3.2.4 Zusammenhang zwischen Resektionsausmaß und Überleben

Bei den Patienten konnte das Operationsausmaß in drei Gruppen eingeteilt werden:

Tabelle 5 Einteilung des Resektionsausmaßes

	N=	Prozent
Vollresektion	45	50,6
Teilresektion	33	37,1
Biopsie	11	12,3

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls anhand der Analysefunktion von Überlebenszeiten bei mehreren Gruppen. Dabei ergab sich ein klarer Überlebensvorteil für

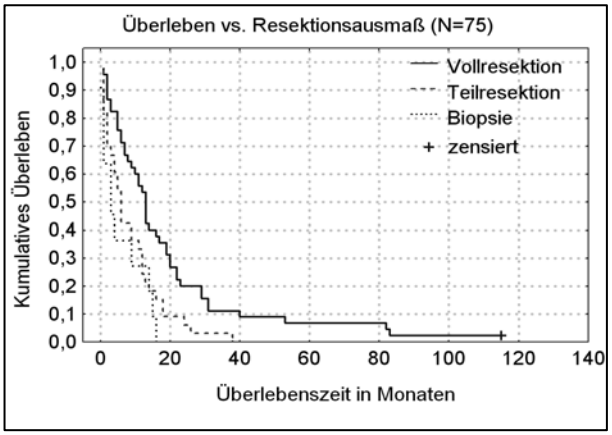

Abbildung 10 Überleben nach Resektionsausmaß

die vollresezierten Patienten. So betrug deren medianes Überleben 13 Monate, während die teilresezierten Patienten bei 6 Monaten lagen und die biopsierten Patienten ein medianes Überleben von 3 Monaten aufwiesen ($p<0,004$).

3.3 Statistische Auswertung der Scores von EPO/EPOR

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem EPO- bzw. EPOR-Antikörper resultierten in einer deutlich erkennbaren Anfärbung positiver Zellen. Dadurch war eine Abgrenzung gegenüber dem allenfalls schwach ausgeprägten Hintergrund sehr gut möglich.

Die jeweils mitgeführten Negativkontrollen zeigten im direkten Vergleich mit den regulär angefärbten Präparaten durchweg keine Anfärbung und keine unspezifische Hintergrundfärbung.

Der zur statistischen Auswertung verwendete Score eines Präparates ergab sich aus der Summe der zehn Einzelscores, bzw. bei vereinzelten Präparaten mit zu wenig Gewebe aus dem mit Faktor 10 multiplizierten Mittelwert (Bereich 0-40 bei Einzelscores von 0-4) der jeweiligen Einzelscores. Dieser Wert wird in den nachfolgenden Analysen als EPO-/EPOR-Score bezeichnet.

Aufgrund stark nekrotischer oder zu kleiner Präparate mussten einige Fälle aus der Auswertung der EPO-/EPOR-Scores ausgeschlossen werden (in der EPOR-Gruppe N=13, in der EPO-Gruppe N=17).

Die Anzahl der Patienten in der EPO- und der EPOR-Gruppe unterscheiden sich, da einige Gewebeschnitte aus den verbliebenen Randgebieten der jeweiligen Paraffinblöcke angefertigt wurden. So ergab sich, dass in seltenen Fällen die Schnitte desselben Blockes für EPO und EPOR recht unterschiedliche Massen an Tumorzellen enthielten, so dass zwar die EPOR-Schnitte noch verwertet werden konnten, die Präparatgröße des nachfolgenden Schnittes dann aber nicht mehr für die EPO-Auswertung genügte. So ergaben sich in der statistischen Analyse für die Kollektive von EPO bzw. EPOR leicht unterschiedliche Präparatzahlen.

3.3.1 Allgemeine Beobachtungen während der Auswertung

Beim Erstellen der Scores fiel auf, dass in einigen Präparaten Regionen sehr hoher als auch sehr niedriger Expression von EPOR wie auch EPO selbst erkennbar waren, welche zum Teil klar voneinander getrennt waren. Ein Färbeartefakt als Ursache dieses Unterschiedes erscheint aufgrund der engen räumlichen Nähe der unterschiedlich gefärbten Areale unwahrscheinlich.

Zudem zeigte sich, dass mitotische und auch besonders große oder mehrkernige Zellen tendenziell eine eher stärkere Anfärbung als andere umgebende Tumorzellen aufwiesen. Perinekrotische Areale riefen im Bereich der Pseudopalisaden meist auffallend starke Färbereak-

tionen hervor. Eine ähnliche starke Anfärbung fand sich auch im Endothel mikrovaskulärer Proliferate.

Die Expression von EPO und EPOR in gesundem Hirngewebe zeigte im Kortexbereich sowie perivaskulär ebenfalls stets ein hohes Niveau, während in der weißen Substanz kaum EPO bzw. EPOR nachweisbar waren.

3.3.1.1 Beispielhafte Markierungen des EPO-Proteins (Vergrößerung in Klammern)

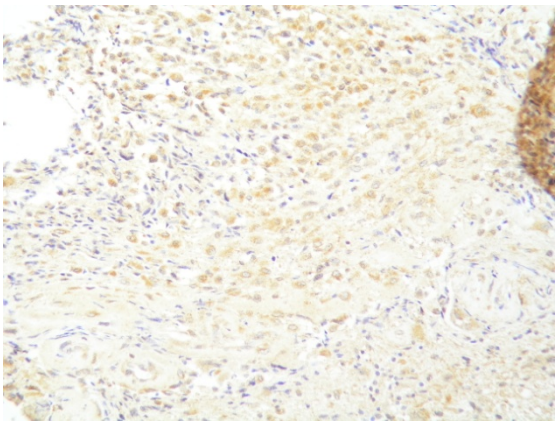

Abbildung 11 Hohe EPO-Expression (200x)

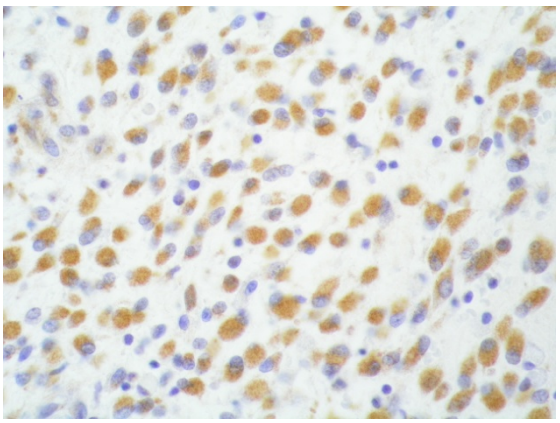

Abbildung 12 Hohe EPO-Expression (500x)

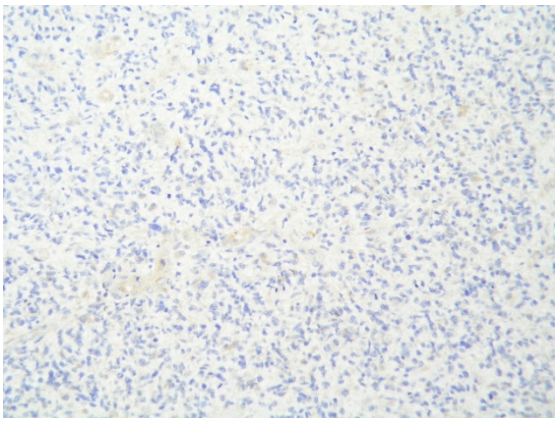

Abbildung 13 Niedrige EPO-Expression (200x)

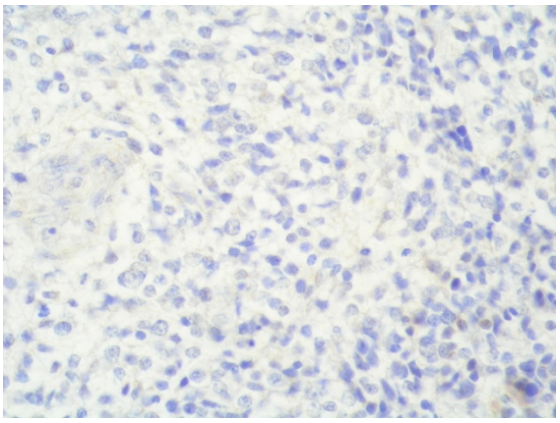

Abbildung 14 Niedrige EPO-Expression (500x)

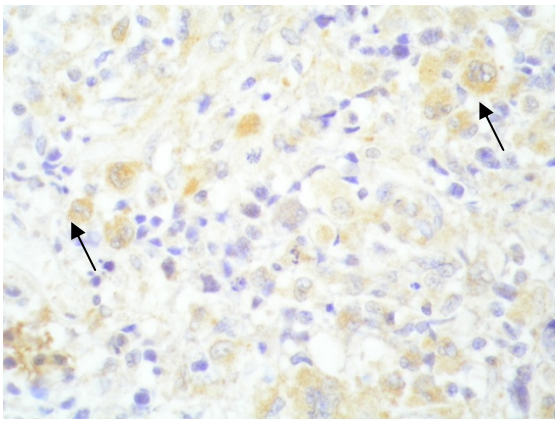

Abbildung 15 Mitotische und mehrkernige Zellen (500x)

3.3.1.2 Beispielhafte Markierungen des EPOR (Vergrößerung in Klammern)

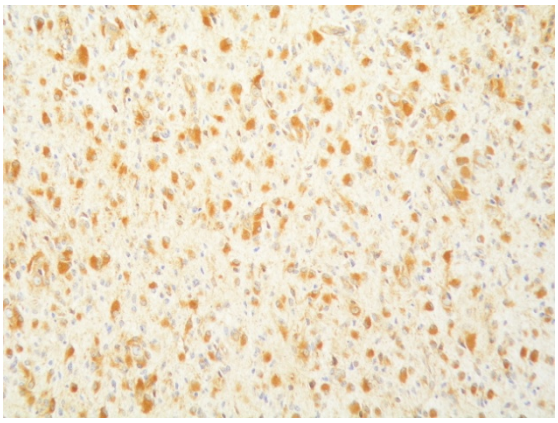

Abbildung 16 Hohe EPOR-Expression (200x)

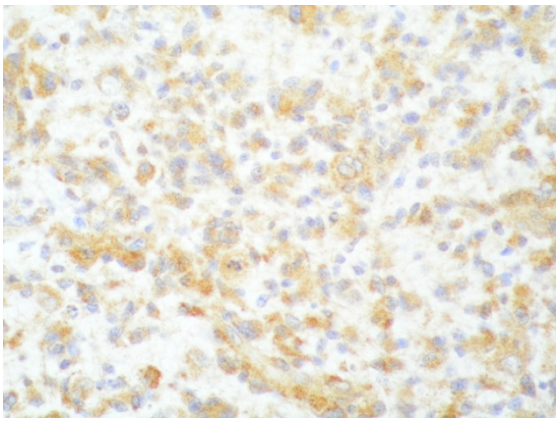

Abbildung 17 Hohe EPOR-Expression (500x)

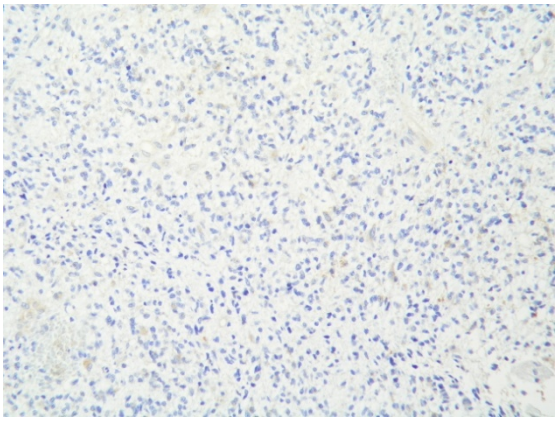

Abbildung 18 Niedrige EPOR-Expression (200x)

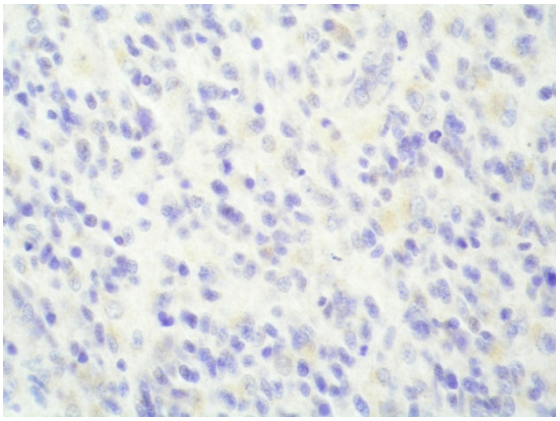

Abbildung 19 Niedrige EPOR-Expression (500x)

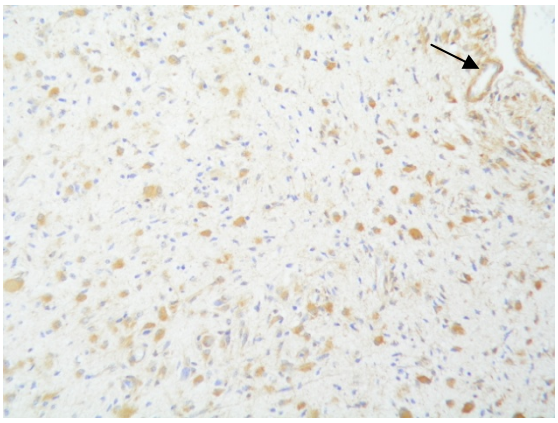

Abbildung 20 Hohe EPOR-Expression im Endothel (200x)

3.3.2 Patientendaten der EPO-Gruppe

Für die Auswertung konnten von 72 Patienten immunhistochemische Färbungen und 11 zugehörige Rezidivschnitte (Erst- bzw. Zweitrezidive) verwendet werden.

3.3.2.1 Beschreibung der EPO-Scores

Bei der Auswertung der gefärbten EPO-Präparate wurde ein sehr hohes Niveau an EPO-Expression nachgewiesen, so dass die Scores deutlich im oberen Bereich der möglichen Werte von 0-40 lagen.

Tabelle 6 Deskriptive Statistik (Anzahl, Mittelwert, Median, Spannbreite)

	N	Mittel	Median	Minimum	Maximum
EPO-Score	72	33,9	35,0	22,0	40,0

Für den EPO-Score wurden orientiert am Median hohe und niedrige Expression festgelegt.

Tabelle 7 Einteilung der Scores in niedrig/hoch

	EPO-Score	N
Niedrig	<35	37
Hoch	35-40	35

3.3.2.2 Geschlechtsverteilung

In der EPO-Gruppe wurden 29 Präparate weiblicher Patienten (40%) und 43 Präparate männlicher Patienten (60%) ausgewertet.

Für die hohe bzw. niedrige EPO-Expression stellten sich die Zahlen wie folgt dar: Von den Frauen befanden sich 48% in der Gruppe niedriger Expression, entsprechend 52% in der Gruppe hoher Expression. Für die Männer galt, dass 49% eine niedrige Expression hatten.

Die Gruppen waren damit sehr homogen verteilt.

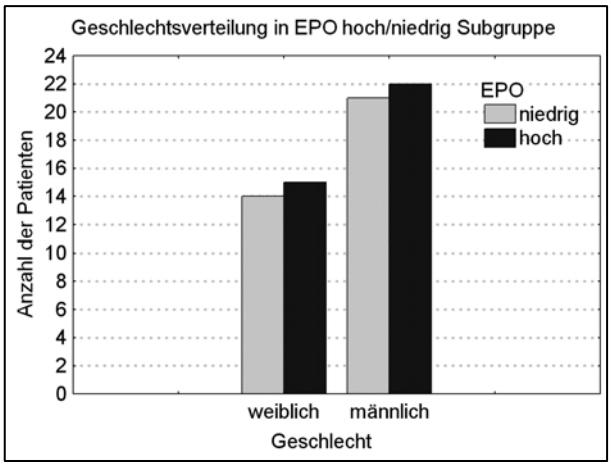

Abbildung 21 Geschlechtsverteilung nach EPO hoch/niedrig

3.3.2.3 Altersverteilung bei Erstdiagnose

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose der Patienten in der EPO-Proteingruppe betrug 61,5 Jahre, der Median lag bei 62,5 Jahren. Auch hier war der jüngste Patient 30 Jahre und der älteste 81 Jahre alt.

Auch in dieser Gruppe liegt der Altersgipfel bei Erkrankung zwischen 70 und 80 Jahren (30,6% aller Patienten).

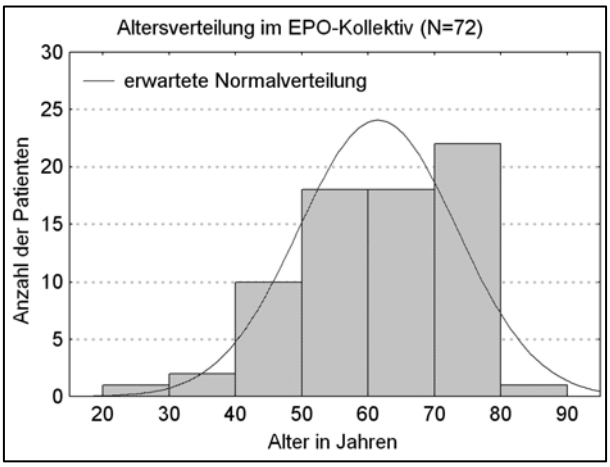

Abbildung 22 Altersverteilung EPO-Kollektiv

Bei der Unterscheidung zwischen hoher und niedriger EPO-Expression wurde ein Durchschnittsalter von 63,4 Jahren für die Gruppe der niedrigen Expression und ein Median von 66 Jahren ermittelt. In der Gruppe der hohen Expression lagen die Zahlen mit einem Altersdurchschnitt von 59,7 Jahren und einem Median von 59 Jahren etwas darunter.

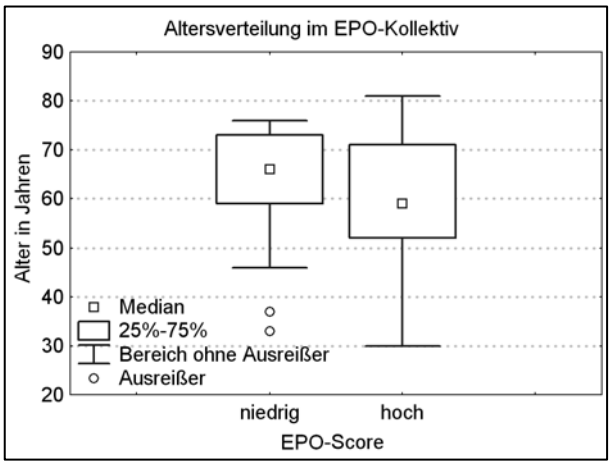

Abbildung 23 Altersverteilung EPO hoch/niedrig

3.3.2.4 Überlebenszeiträume

Das mediane Überleben der 72 Patienten betrug 9,5 Monate. Die kürzeste Überlebenszeit betrug weniger als einen Monat.

Der einzige zum Zeitpunkt des Abschlusses der Studie noch lebende Patient stellt mit 115 Monaten das Maximum der Überlebenszeit dar. Die 25%-Perzentile lag bei 3 Monaten, die 75%-Perzentile bei 18,5 Monaten. Nur etwa 5% der Patienten lebten länger als 40 Monate. Langzeitüberleber (>24 Monate) waren hier ca. 16% der Patienten. In 11% der Fälle verstarben die Patienten innerhalb eines Monats (=Ultrakurzüberleber, N=8).

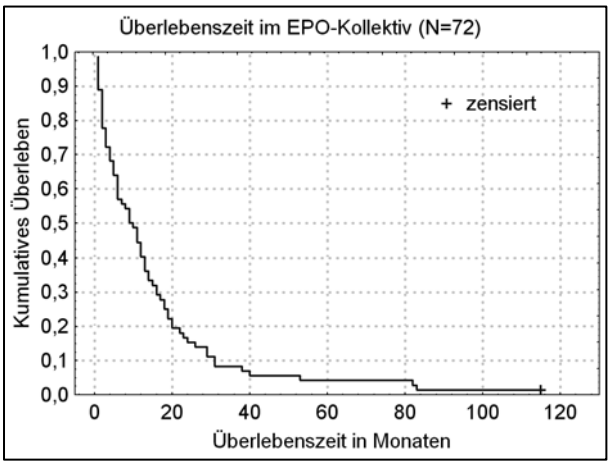

Abbildung 24 Überleben in der EPO-Gruppe

3.3.2.5 Verteilung nach Resektionsausmaß

Von den 72 Patienten des EPO-markierten Kollektivs konnte bei 39 Patienten der Tumor komplett reseziert werden (54%), bei 29 war eine Teilresektion möglich (40%). Vier Patienten wurden nur biopsiert (6%).

Bei Unterscheidung in hohe und niedrige EPO-Expression findet sich ein höherer Anteil von vollresezierten Patienten in der Gruppe der hohen Expression.

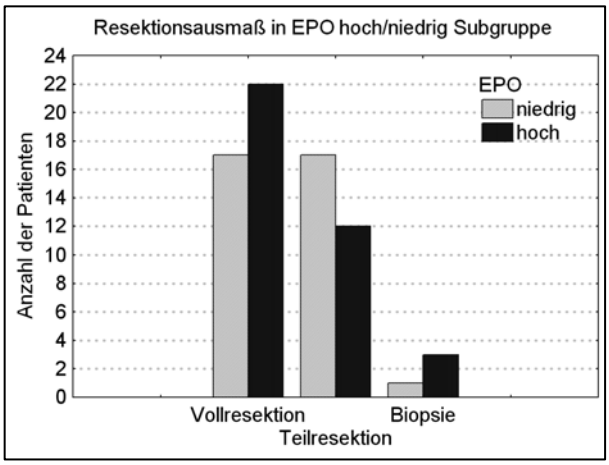

Abbildung 25 Resektionsausmaß EPO-Kollektiv

Tabelle 8 Verteilung nach Resektionsausmaß nach EPO hoch/niedrig

EPO-Score	Vollresektion	Teilresektion	Biopsie	Total
Niedrig	17 (48,5 %)	17 (48,5 %)	1 (3%)	35 (100%)
Hoch	22 (59,5 %)	12 (32,5%)	3 (8%)	37 (100%)
Total	39	29	4	72

3.3.2.6 Verteilung in Therapiegruppen

Die 72 Patienten waren folgendermaßen in die fünf Therapiegruppen zuzuteilen:

Tabelle 9 Verteilung in Therapiegruppen im EPO-Kollektiv

	Nur OP	TMZ adj.	TMZ konk. + TMZ adj.	ACNU adj.	ACNU adj. –TMZ adj. + konk.
Anzahl	28 (39%)	17 (24%)	8 (11%)	9 (12%)	10 (14%)

Somit erhielten 44 Patienten (61%) eine weitergehende Behandlung mit Chemotherapie.

Für die Verteilung auf hohe und niedrige Expression ergaben sich folgende Zahlen:

Tabelle 10 Verteilung in Therapiegruppen nach EPO hoch/niedrig

EPO-Score	Nur OP	TMZ adj.	TMZ konk. + TMZ adj.	ACNU adj.	ACNU adj. – TMZ adj. + konk.	Total
Niedrig	17 (49%)	5 (14%)	4 (11,5%)	5 (14%)	4 (11,5%)	35 (100%)
Hoch	11 (30%)	12 (32%)	4 (11%)	4 (11%)	6 (16%)	37 (100%)
Total	28	17	8	9	10	72

Damit ist auch hier eine abweichende Verteilung in den beiden Gruppen vorhanden, da in der Gruppe der niedrigen Expression rund 50% der Patienten nur operiert wurden, in der Gruppe hoher Expression dies aber nur bei 30% der Patienten der Fall war. Somit erhielten 70% Patienten der Gruppe der hohen Expression eine weitergehende Therapie.

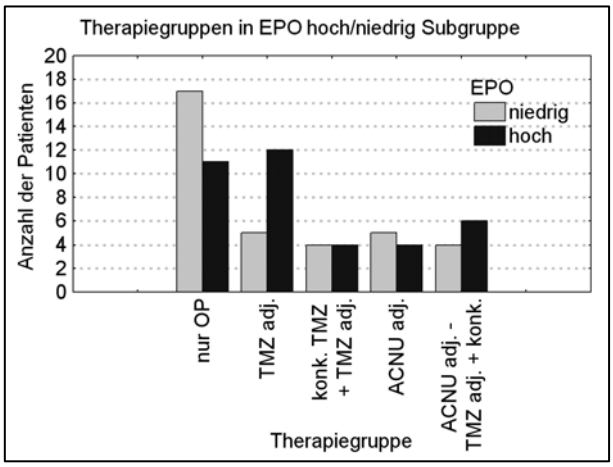

Abbildung 26 Verteilung in Therapiegruppen nach EPO hoch/niedrig

3.3.3 Patientendaten der EPOR-Gruppe

Für die Analysen standen immunhistochemische Färbungen von 76 Patienten zur Verfügung. Für die Rezidivanalysen waren von 12 Patienten ebenfalls die ausgewerteten Färbungen von Rezidivpräparaten vorhanden (Erst- bzw. Zweitrezidive desselben Patienten).

3.3.3.1 Beschreibung der EPOR-Markierungen

Bei der Auswertung des EPOR fiel auf, dass, wie bei den EPO-Markierungen, das Tumorgewebe oftmals ein hohes Niveau an EPOR-Expression aufwies, so dass die Scores insgesamt eher im oberen Bereich der Spanne 0-40 anzusiedeln waren.

Tabelle 11 Deskriptive Statistik (Anzahl, EPOR-Mittelwert, Median, Spannbreite)

	N=	Mittel	Median	Minimum	Maximum
EPOR-Score	76	30,7	31,0	19,0	40,0

Für die Unterscheidung in hohe und niedrige Expression des EPOR-Scores wurde auch hier der Median zu Grunde gelegt.

Tabelle 12 Einteilung der Scores in niedrig/hoch

	EPOR-Score	N=
Niedrig	< 31	46
Hoch	31-40	30

3.3.3.2 Geschlechtsverteilung

Von den 76 Patienten waren 32 (42%) weiblich und 44 (58%) männlich.

41% der Frauen hatten niedrige EPOR-Werte, 59% hohe Werte. Bei den Männern hatten 39% eine niedrige EPOR-Expression. Die Verteilung der EPOR-Expression zeigte somit keine geschlechtsspezifischen Unterschiede.

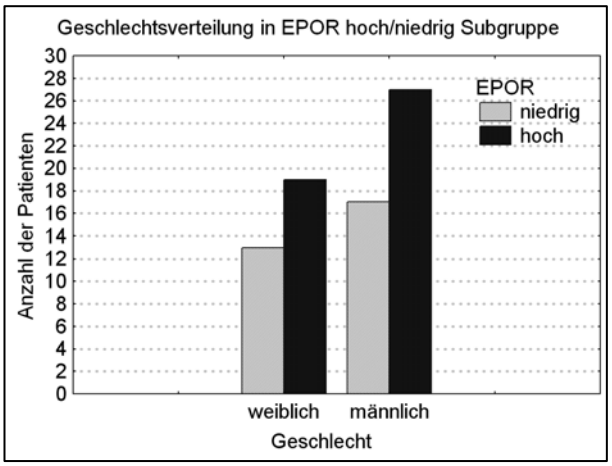

Abbildung 27 Geschlechtsverteilung EPOR hoch/niedrig

3.3.3.3 Altersverteilung bei Erstdiagnose

Das mittlere Alter bei Erstdiagnose betrug 62,1 Jahre, der Median lag bei 63,5 Jahren. Die Altersspanne erstreckte sich wie im Gesamtkollektiv von 30 Jahren beim jüngsten Patienten bis zu 81 Jahren beim ältesten Patienten.

Die Gipfel der Alterskurve liegt bei EPOR-gefärbten Präparaten bei 70-80 Jahren. Dieser Altersgruppe gehörten 32,9 % aller Patienten an.

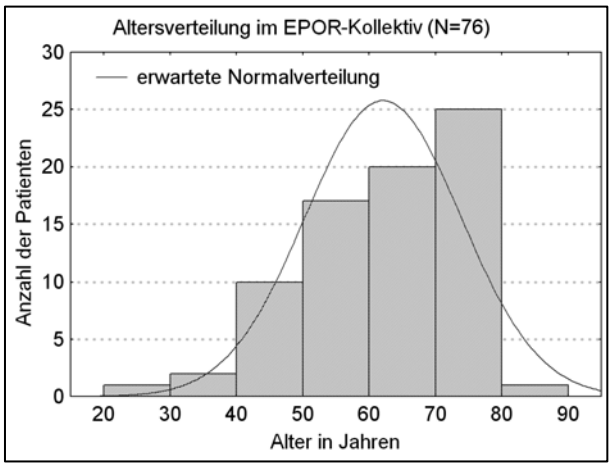

Abbildung 28 Altersverteilung EPOR-Kollektiv

Bei der Unterscheidung in hohe und niedrige EPOR-Expression wurde für die Gruppe der niedrigen Expression ein Durchschnittsalter von 63,7 Jahren ermittelt. Der Median lag bei 67 Jahren. Im Gegensatz dazu lag der Altersdurchschnitt in der Gruppe der hohen Expression mit 61 Jahren und einem Median von 63 Jahren etwas niedriger.

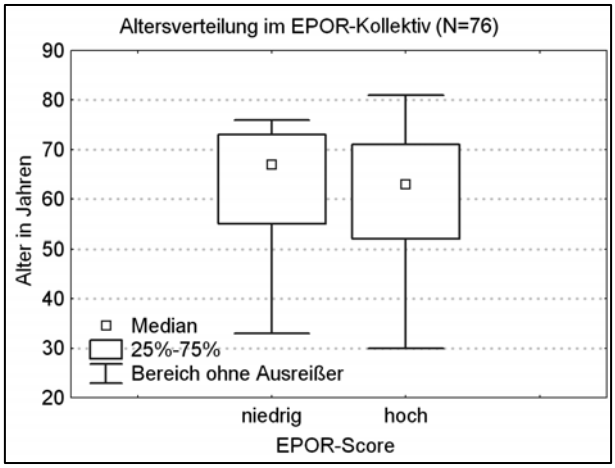

Abbildung 29 Altersverteilung EPOR hoch/niedrig

3.3.3.4 Überlebenszeiträume

Das mediane Überleben der 76 Patienten lag bei 9 Monaten. Die kürzeste Überlebenszeit betrug hier wiederum weniger als einen Monat. Zu diesem Kollektiv gehört auch der mit 115 Monaten am längsten überlebende Patient. Die 25%-Perzentile lag bei 3 Monaten, die 75%-Perzentile bei 18 Monaten. Nur ca. 5% der Patienten überlebten länger als 40 Monate. Etwa 15% überlebten mehr als 24 Monate. Ca. 13% der Patienten verstarben innerhalb des ersten Monats (=Ultrakurzüberleber, N=10).

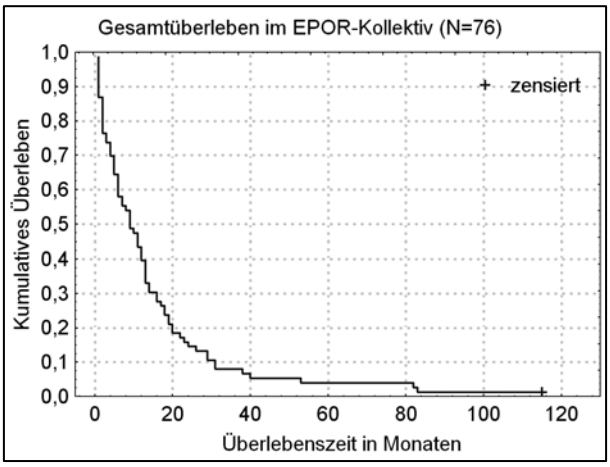

Abbildung 30 Überlebensanalyse EPOR-Kollektiv

3.3.3.5 Verteilung nach Resektionsausmaß

Von den 76 Patienten des EPOR-markierten Kollektivs wurden 41 Patienten vollreseziert (54%), 30 teilreseziert (39%) und 5 biopsiert (7%).

In der Verteilung in hohe und niedrige Expression findet sich ein deutlich höherer Anteil von vollresezierten Patienten in der Gruppe der hohen EPOR-Expression.

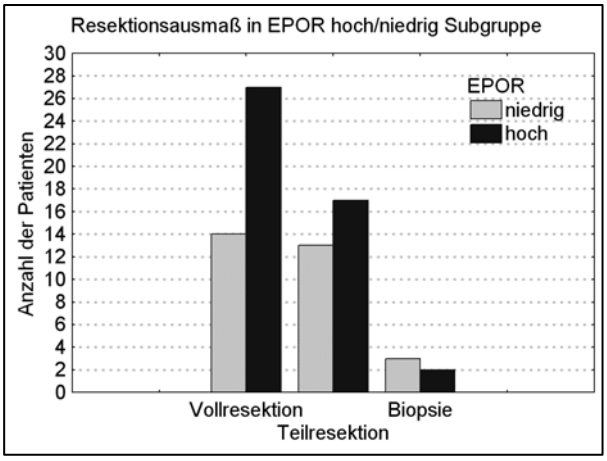

Abbildung 31 Resektionsausmaß nach EPOR hoch/niedrig

Tabelle 13 Resektionsausmaß nach EPOR hoch/niedrig

EPOR-Score	Vollresektion	Teilresektion	Biopsie	Total
Niedrig	14 (47%)	13 (43%)	3 (10%)	30 (100%)
Hoch	27 (59%)	17 (37%)	2 (4%)	46 (100%)
Total	41	30	5	76

3.3.3.6 Verteilung in Therapiegruppen

Die 76 Patienten verteilten sich wie folgt in die Therapiegruppen:

Tabelle 14 Verteilung in Therapiegruppen im EPOR-Kollektiv

	Nur OP	TMZ adj.	TMZ konk. + TMZ adj.	ACNU adj.	ACNU adj. –TMZ adj. + konk.
Anzahl	28 (37%)	18 (24%)	8 (10%)	12 (16%)	10 (13%)

Eine weiterführende Chemotherapie erhielten also 48 Patienten (63%)

Für die Verteilung auf hohe und niedrige Expression ergaben sich folgende Zahlen:

Tabelle 15 Therapiegruppe nach EPOR niedrig/hoch

EPOR-Score	Nur OP	TMZ adj.	TMZ konk. + TMZ adj.	ACNU adj.	ACNU adj. – TMZ adj. + konk.	Total
Niedrig	15 (50%)	4 (13%)	5 (17%)	4 (13%)	2 (7%)	30 (100%)
Hoch	13 (28%)	14 (30%)	3 (7%)	8 (17,5%)	8 (17,5%)	46 (100%)
Total	28	18	8	12	10	76

Damit befanden sich in der Gruppe der niedrigen Expression rund 50% nur operierte und nicht weiter therapierte Patienten, wohingegen in der Gruppe hoher Expression dies nur zu 28% der Fall war und somit 72% der Patienten eine zusätzliche Therapie erhielten.

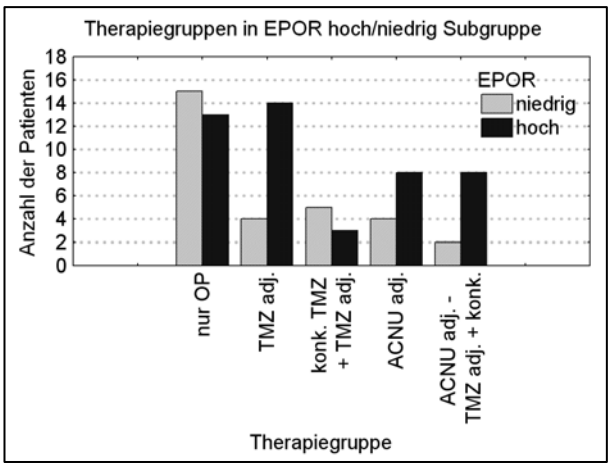

Abbildung 32 Therapiegruppen nach EPOR hoch/niedrig

3.3.4 Korrelation von EPO- und EPOR-Scores mit Geschlecht und Alter

3.3.4.1 Zusammenhang zwischen EPO und Geschlecht

Der Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikante Abhängigkeit des EPO-Scores vom Geschlecht nachweisen.

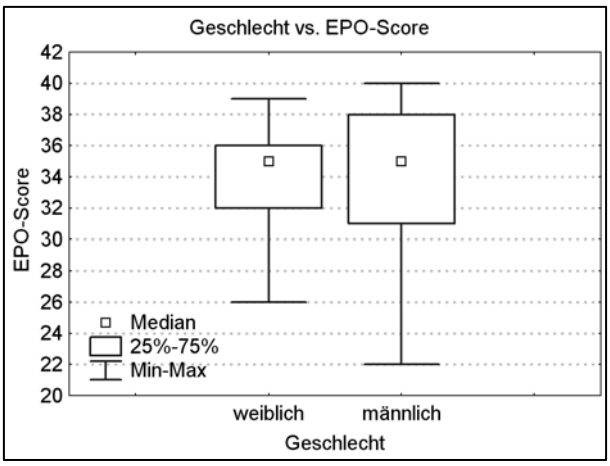

Abbildung 33 Zusammenhang von EPO und Geschlecht

3.3.4.2 Zusammenhang zwischen EPO und Alter

Spearmans Rangkorrelation ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Alter und EPO-Expression.

3.3.4.3 Zusammenhang zwischen EPOR und Geschlecht

Auch hier ergab der Mann-Whitney-U Test keinen signifikanten Zusammenhang zwischen EPOR-Scores und dem Geschlecht.

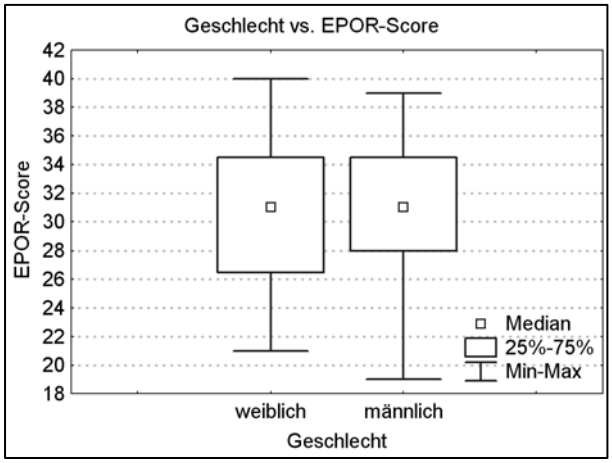

Abbildung 34 Zusammenhang von EPOR und Geschlecht

3.3.4.4 Zusammenhang zwischen EPOR und Alter

Spearmans Rangkorrelation ergab keinen signifikanten Einfluss des Alters auf die EPOR-Expression.

3.3.5 Korrelation von EPO mit EPOR

Bei 68 Patienten konnten sowohl EPO- als auch EPOR-Färbungen gemeinsam ausgewertet werden. Der Spearman Rangkorrelationstest ergab eine hochsignifikante Korrelation zwischen EPO-Scores und EPOR-Scores (p<0,000001).
Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Parametern betrug +0,56.

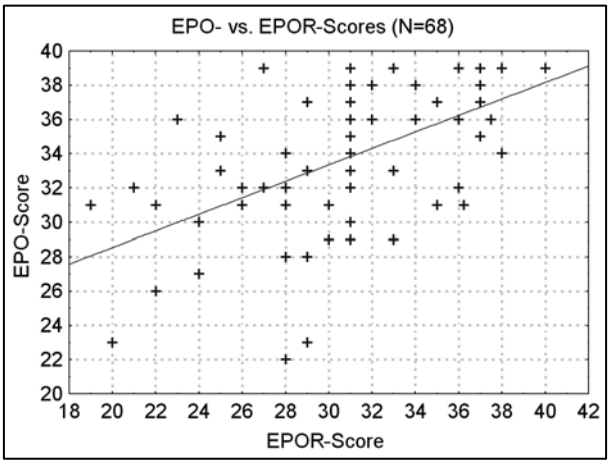

Abbildung 35 Korrelation von EPO und EPOR

3.3.6 Korrelation von EPO- und EPOR-Scores mit Gesamtüberleben

Für statistische Analysen von EPO bzw. EPOR, die das Überleben betreffen, wurden Ultrakurzüberleber (UKZ - Überlebenszeit bis zu 1 Monat) aus der Auswertung ausgeschlossen. Dies bleibt der Annahme geschuldet, dass Patienten, die so kurz nach der Operation verstarben, nicht an den Folgen des Tumors selbst, sondern an perioperativen Komplikationen verstorben sind. Um aber einen umfassenden Überblick über die statistischen Ergebnisse zu vermitteln, wurden die Ergebnisse inklusive der Ultrakurzüberleber ebenfalls kurz erwähnt.

Anmerkung: Unter Ausschluss der UKZ ergibt sich ein medianes Gesamtüberleben in den Gruppen zur EPO- (ohne UKZ N=64) bzw. EPOR-Analyse (ohne UKZ N=66) von 11,5 Monaten, was nah an dem in der Literatur beschriebenen Wert liegt (siehe Kapitel 1.1.4.4, Seite 6).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Kofaktoren in der Überlebensanalyse.

Tabelle 16 Übersicht der Verteilung verschiedener Faktoren in EPO bzw. EPOR hoch/niedrig Subgruppe (RCT=Radiochemotherapie, Vollres.=Vollresektion, Teilres.=Teilresektion, medianes Alter, M=männlich, W=weiblich, Exp.=Expression)

Exp./Kofaktor	Nur OP	RCT	Vollres.	Teilres.	Biopsie	Alter	M	W
EPO niedrig	49%	51%	48,5%	48,5%	3%	66 J.	60%	40%
EPO hoch	30%	70%	59,5%	32,5%	8%	59 J.	59%	41%
EPOR niedrig	50%	50%	47%	43%	10%	67 J.	57%	43%
EPOR hoch	28%	72%	59%	37%	4%	63 J.	59%	41%

Hier wird deutlich, dass die Therapiegruppen und das Resektionsausmaß (gering auch das mediane Alter) in den Gruppen mit hoher bzw. niedriger EPO- bzw. EPOR-Expression ungleich verteilt sind. In Kapitel 3.2 (Seite 34) wurde gezeigt, dass Resektionsausmaß, Therapiegruppe und Alter einen deutlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben.
So ist die ungleiche Verteilung ein möglicher Einflussfaktor bei Überlebensanalysen von EPO und EPOR.

3.3.6.1 Überlebensanalyse nach hoher und niedriger EPO-Expression

Mit dem Gehans Wilcoxon-Test konnte kein signifikant längeres Überleben der Patienten in der Gruppe der hohen EPO-Expression nachgewiesen werden (p≈0,16; bei EPO-Score inklusive UKZ ergibt sich allerdings ein signifikant positiver Effekt von EPO auf das Gesamtüberleben p<0,05).

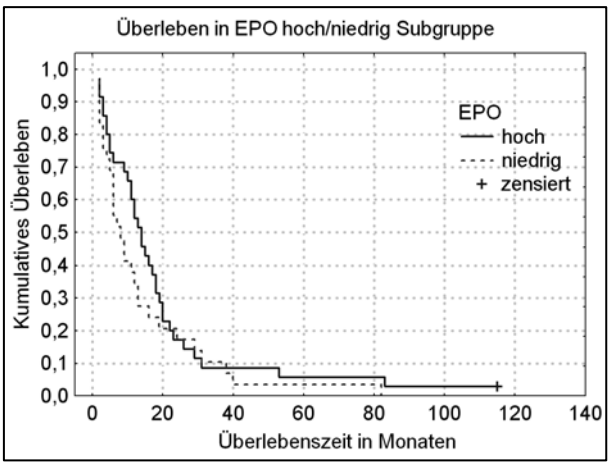

Abbildung 36 Gesamtüberleben nach EPO-Score hoch/niedrig

Ohne UKZ beträgt das mediane Überleben bei hohem EPO-Score 14 Monate (mittleres Überleben 19,1 Monate, 95% KI 11,2-26,9) und 8 Monate (mittleres Überleben 14,1 Monate, 95% KI 7,7-20,6) bei niedrigem EPO-Score.

3.3.6.2 Überlebensanalyse nach hoher und niedriger EPOR-Expression

Der Gehan's Wilcoxon Test ergab ein signifikant längeres Überleben in der Gesamtgruppe der Patienten mit hoher EPOR-Expression. (p<0,01; ebenso mit UKZ)
Das mediane Überleben ohne UKZ bei hoher EPOR-Expression betrug 14 Monate (mittleres Überleben 19,8 Monate, 95% KI 13-26,6), bei niedriger Expression 6 Monate (mittleres Überleben 11,7 Monate, 95% KI 4,8-18,5).

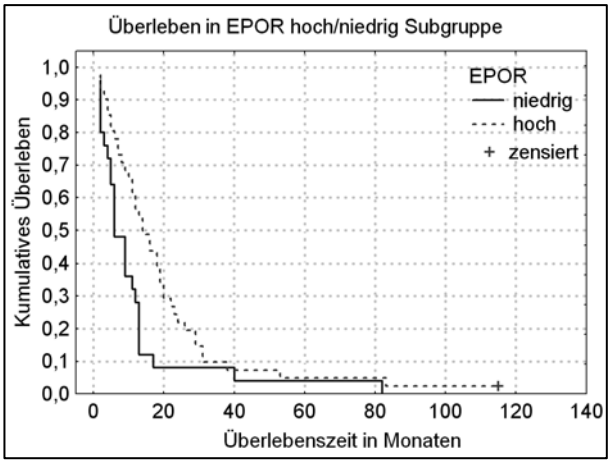

Abbildung 37 Gesamtüberleben nach EPOR-Score hoch/niedrig

3.3.6.3. Vergleich des Effektes von EPO- und EPOR-Expression auf das Überleben in nur operierten gegenüber radiochemotherapierten Patienten

Das mediane Überleben in der Gruppe radiochemotherapierter Patienten mit hoher EPOR-Expression betrug 18 Monate, bei niedriger EPOR-Expression 12 Monate (ohne UKZ p≈0,06; mit UKZ p≈0,06).

In der Subgruppe nur operierter Patienten ergab sich kein deutlicher Unterschied.

Bei der Auswertung des EPO-Scores konnte bei separater Analyse weder in der Gruppe der nur operierten, noch in der Gruppe der radiochemotherapierten Patienten ein signifikanter Einfluss des EPO-Proteins auf das Überleben nachgewiesen werden.

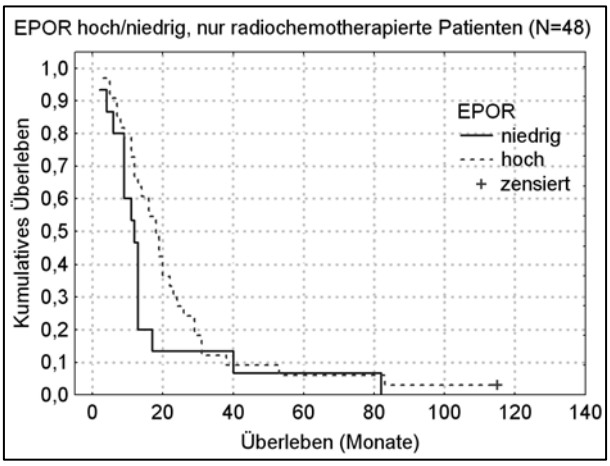

Abbildung 38 Überleben radiochemotherapierter Patienten nach EPOR-Score hoch/niedrig

3.3.6.4 Vergleich des Effektes von EPO- und EPOR-Expression auf das Überleben junger gegenüber alten Patienten

Der Gehan's Wilcoxon Test ergab in der Gruppe der jungen Patienten (≤ 63 Jahre) ein medianes Überleben bei hoher EPOR-Expression von 18 Monaten gegenüber 10 Monaten bei niedriger Expression (p<0,01; mit UKZ p≈0,01).

Bei Betrachtung von EPO ergab sich bei jungen Patienten kein signifikanter Einfluss.

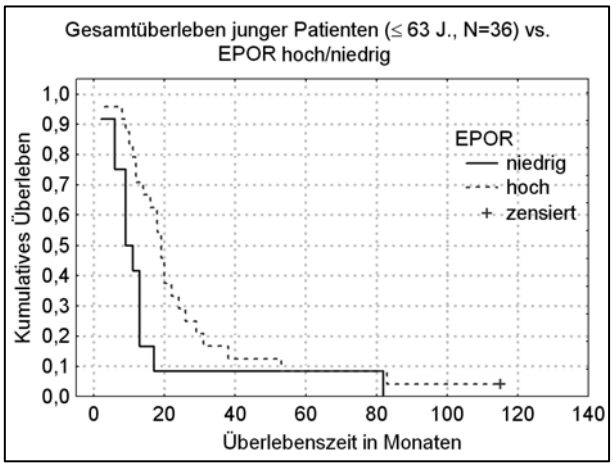

Abbildung 39 Überleben junger Patienten nach EPOR hoch/niedrig

In der Gruppe der alten Patienten ergaben sich weder für EPO noch für EPOR signifikante Zusammenhänge.

3.3.7 Multivariate Regressionsmodelle für das Gesamtüberleben

Diese Analysen dienen dazu, die Stärke des Einflusses der untersuchten Faktoren auf das Überleben im Vergleich miteinander abzuschätzen.

3.3.7.1 EPO

Tabelle 17 Regressionsmodell inklusive Kofaktoren und EPO-Score (N=64)

N=64	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPO-Score	0,03	-2,12	0,03
OP-Art	0,25	2,11	0,03
Alter	0,01	2,10	0,04
Tx-Gruppe	0,12	-3,60	0,0003

Das EPO-Protein hat in dieser Analyse einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben

3.3.7.2 EPOR

Tabelle 18 Regressionsmodell inklusive Kofaktoren und EPOR-Score (N=66)

N=66	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPOR-Score	0,03	-2,28	0,02
OP-Art	0,25	2,31	0,02
Alter	0,02	2,12	0,03
Tx-Gruppe	0,12	-2,63	0,008

Das Regressionsmodell zeigt wie erwartet einen signifikanten Einfluss von Resektionsausmaß, Alter und Therapiegruppe, aber auch von EPOR auf die Überlebenszeit.

3.3.8 Geschichtete Regressionsanalysen des Überlebens

Die geschichteten Analysen dienen dazu, störende Wechselwirkungen von Kofaktoren, die ebenfalls Einfluss auf das Überleben haben, aufzudecken. So werden für jede Gruppe in der Schichtungsvariable getrennte Regressionsmodelle angepasst und später mit dem Gesamtmodell über alle Gruppen verglichen.

3.3.8.1 Einfluss von EPO bzw. EPOR und Alter auf das Überleben unter Schichtung nach Therapiegruppe

Unter Verwendung des Cox Proportional Hazard Models konnte, unter Einbeziehung der Faktoren EPO, Resektionsausmaß und Alter in der nach Therapiegruppe geschichteten Analyse (Unterteilung in zwei Gruppen: Radiochemotherapie erhalten bzw. nicht erhalten), kein signifikanter Einfluss von EPO festgestellt werden.

Tabelle 19 Überlebensanalyse EPO und Alter geschichtet nach RCT

N=64	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPO-Score	0,04	-0,97	0,331
Op-Art	0,26	1,55	0,122
Alter	0,01	1,92	0,054

In der Analyse für EPOR zeigte sich hier allerdings ein nur knapp über dem Signifikanzniveau gelegener Einfluss von EPOR auf das Überleben.

Tabelle 20 Überlebensanalyse EPOR und Alter geschichtet nach RCT

N=66	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPOR-Score	0,03	-1,91	0,056
Op-Art	0,28	1,40	0,161
Alter	0,02	2,02	0,043

Ein Erklärungsansatz für die abgeschwächte bzw. aufgehobene Signifikanz sind Wechselwirkungen zwischen EPO bzw. EPOR und der Therapiegruppe, die sich durch die Ungleichverteilung dieses Faktors in den Gruppen hoher und niedriger Expression erklären lassen (siehe Tabelle 16, Seite 47).

Am Rande sei bemerkt, dass zudem Wechselwirkungen zwischen Resektionsausmaß und Therapiegruppe sowie gering ausgeprägt, zwischen Alter und Therapiegruppe, bestehen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in einem Konzept der Vollresektion des Tumors auch eher eine RCT durchgeführt werden kann (besserer Zustand des Patienten), bzw. dass jüngere Patienten eher mit einer multimodalen Therapie behandelt werden.

3.3.8.2 Einfluss von EPO bzw. EPOR, Alter und Therapiegruppe auf das Überleben unter Schichtung nach Resektionsausmaß

Erneut wurde das Cox Proportional Hazard Model zur statistischen Analyse angewandt. Als unabhängige Faktoren wurden abermals das Alter und der EPO-Score sowie die Therapiegruppe einbezogen und die Analyse geschichtet nach Resektionsausmaß durchgeführt (N=64).

Tabelle 21 Überlebensanalyse EPO, Alter und Therapiegruppe geschichtet nach Resektionsausmaß

N=64	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPO-Score	0,036	-2,38	0,017
Alter	0,02	2,06	0,039
Tx-Gruppe	0,13	-3,60	0,0003

Es konnte ein signifikanter Einfluss von EPO auf das Gesamtüberleben gefunden werden

Die für den EPOR-Score in äquivalenter Weise durchgeführten Analysen (N=66) ergaben für den EPOR-Score ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Überleben nach Schichtung durch die Gruppe des Resektionsausmaßes ($p<0,04$).

Tabelle 22 Überlebensanalyse EPOR, Alter und Therapiegruppe geschichtet nach Resektionsausmaß

N=66	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPOR-Score	0,03	-2,08	0,038
Alter	0,02	2,14	0,032
Tx-Gruppe	0,12	-2,58	0,001

Auch hier müssen bei geringer Abschwächung der Signifikanz leichte Wechselwirkungen zwischen EPOR und dem Resektionsausmaß, am ehesten aufgrund der vorbeschriebenen Ungleichverteilung dieses Faktors in hoher und niedriger EPOR-Expression, wie aus Tabelle 18 ersichtlich, angenommen werden.
Insgesamt scheinen hier Wechselwirkungen aber eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.3.8.3 Einfluss von EPO bzw. EPOR und Therapiegruppe auf das Überleben unter Schichtung nach Altersgruppen

Unter Stratifizierung der Analyse nach Altersgruppe (≤ oder > 63 J, nach Median geteilt) ergibt sich für EPO ein signifikanter Einfluss auf das Überleben von Glioblastompatienten.

Tabelle 23 Überlebensanalyse EPO, Resektionsausmaß, Therapiegruppe geschichtet nach Altersgruppe

N=64	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPO-Score	0,03	-2,25	0,024
Op-Art	0,26	2,39	0,017
Tx-Gruppe	0,12	-3,41	0,0006

Für EPOR ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss in äquivalent durchgeführter Analyse:

Tabelle 24 Überlebensanalyse EPOR, Resektionsausmaß, Therapiegruppe geschichtet nach Altersgruppe

N=66	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPOR-Score	0,03	-2,31	0,021
Op-Art	0,26	2,545	0,011
Tx-Gruppe	0,11	-2,48	0,013

Hier scheinen Wechselwirkungen von EPO bzw. EPOR und Alter keine wesentliche Rolle zu spielen.

3.3.9 Verknüpfte Analysen: Gemeinsamer Einfluss von EPO und EPOR

Im Folgenden werden Analysen vorgestellt, die EPO und EPOR gemeinsam als Faktor für das Überleben betrachten.

3.3.9.1 Kombinationsgruppen

Hier wurde die Expression von EPO hoch/niedrig und EPOR hoch/niedrig in vier Gruppen eingeteilt und analysiert. Besonders Patienten mit hoher EPOR-Expression überlebten signifikant länger als die Patienten in anderen Gruppen (N=60, p=0,046).

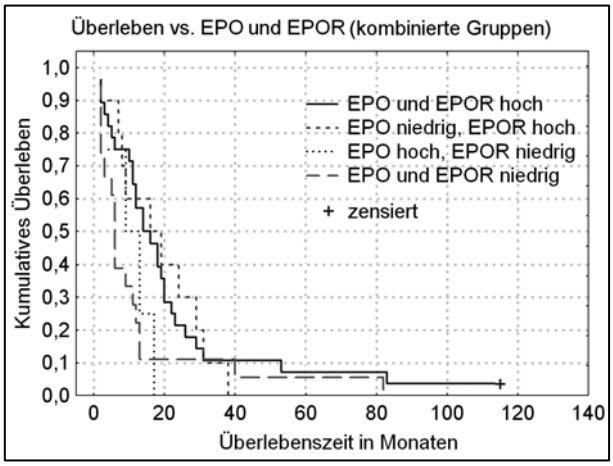

Abbildung 40 Analyse nach kombinierten Gruppen

Betrachtet man nur die Gruppen EPOR hoch/EPO hoch und EPOR niedrig/EPO niedrig, so zeigt sich, mit im Median 15 Monaten, ein signifikant längeres Überleben bei hoher Expression von EPO und EPOR, gegenüber nur 6 Monaten bei jeweils niedriger Expression (p<0,02).

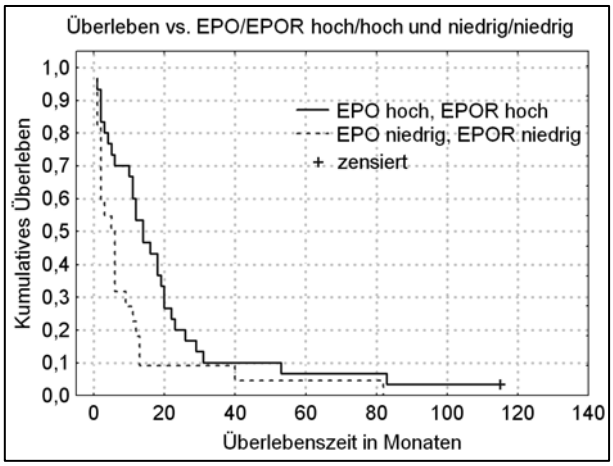

Abbildung 41 Analyse nach hoch/hoch vs. niedrig/niedrig EPO/EPOR

3.3.9.2 Summenbildung aus den Scores von EPO und EPOR

Die Analyse der addierten Scores von EPO und EPOR ergibt mit dem Cox Proportional Hazard Model bei hohen Werten ein signifikant besseres Überleben (N=60, p<0,003).
Dieses Ergebnis bleibt auch in einer multifaktoriellen Analyse signifikant.

Tabelle 25 Multifaktorielle Analyse der Summe EPO+EPOR-Score, Resektionsausmaß, Therapiegruppe und Alter

N=60	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
EPO+EPOR (Scores)	0,02	-2,48	0,013
OP-Art	0,28	1,95	0,050
Tx-Gruppe	0,12	-3,00	0,003
Alter	0,02	1,87	0,061

Auch wenn der stärkste Faktor die Radiochemotherapie zu sein scheint, zeigt sich dennoch ein gemeinsamer signifikanter Einfluss von EPO und EPOR.
In nahezu allen geschichteten Analysen ist dieses Ergebnis reproduzierbar:

Tabelle 26 Summe EPO+EPOR-Score vs. Überleben geschichtet nach Resektionsausmaß

N=60	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
Summenscore	0,02	-2,17	0,030
Tx-Gruppe	0,12	-2,48	0,013
Alter	0,02	1,73	0,083

Tabelle 27 Summe EPO+EPOR-Score vs. Überleben geschichtet nach Therapie (RCT)

N=60	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
Summenscore	0,02	-1,82	0,069
Op-Art	0,30	1,15	0,252
Alter	0,02	1,97	0,049

Tabelle 28 Summe EPO+EPOR-Score vs. Überleben geschichtet nach Altersgruppe

N=60	Standardfehler	t-Wert	p-Wert ≈
Summenscore	0,02	-2,56	0,010
Op-Art	0,29	2,23	0,026
RCT	0,12	-2,86	0,004

Lediglich bei Stratifizierung durch die Therapiegruppe (RCT) ergibt sich keine Signifikanz. Dies mag wiederum auf den weiter oben beschriebenen Wechselwirkungen beruhen.

3.3.9.3 Vergleich hoher und niedriger Scores aus der Summenbildung von EPO und EPOR

Teilt man die Summe von EPO- und EPOR-Score nach dem Median in hoch und niedrig (niedrig < 66), ergibt sich folgendes Bild:
Das mediane Überleben bei niedrigem Score liegt bei 7,5 Monaten, bei hohem Score hingegen bei 16 Monaten (p=0,012).
Diese Ergebnisse zeigen einen sich verstärkenden Effekt von summiertem EPO und EPOR als begünstigenden Einflussfaktor auf das Überleben.

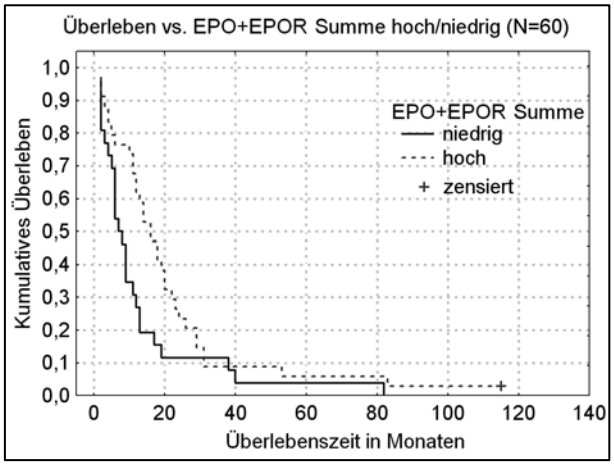

Abbildung 42 Überleben vs. hoch/niedrig EPO+EPOR Summe

3.3.10 Ergebnisübersicht zum Einfluss von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben

Die Analysen zeigen einen signifikanten positiven Einfluss von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben. Die Summenwirkung beider Faktoren weist einen besonders starken Effekt auf. Aus den Kaplan-Meier-Analysen lässt sich ableiten, dass der positive Effekt von EPO bzw. EPOR mit zunehmend längerem Überleben der Patienten an Bedeutung verliert. Im Be-

reich von 20 bis 30 Monaten führen so Kurven hoher und niedriger Expression auf ein gemeinsames Niveau.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die wichtigsten Testergebnisse:

Tabelle 29 Übersicht über den Einfluss von EPO und EPOR auf das Überleben

*** (Der mediane Überlebensvorteil wurde bei den Cox Regressionsanalysen nicht berechnet, da hier nicht in Gruppen eingeteilt wurde.)**

VERGLEICH	Statist. Methode	p-Wert (Signifikanzniveau p≤0,05)	Medianer Überlebensvorteil bei hoher Expression (EPOR bzw. EPO)
EPO hoch vs. EPO niedrig	Gehans Wilcoxon	P≈0,16 Keine Signifikanz	6 Monate (Nicht signifikant)
EPOR hoch vs. EPOR niedrig	Gehans Wilcoxon	p<0,01	8 Monate
EPO hoch vs. EPO niedrig (Radiochemotherapie)	Gehans Wilcoxon	Keine Signifikanz	(Nicht signifikant)
EPOR hoch vs. EPOR niedrig (Radiochemotherapie)	Gehans Wilcoxon	P≈0,06 Keine Signifikanz	6 Monate (Nicht signifikant)
EPO hoch vs. EPO niedrig (junges Alter)	Gehans Wilcoxon	Keine Signifikanz	(Nicht signifikant)
EPOR hoch vs. EPOR niedrig (junges Alter)	Gehans Wilcoxon	P<0,01	8 Monate
EPO multivariat	Cox Regression	P≈0,03	*
EPOR multivariat	Cox Regression	P≈0,02	*
Komb. Gruppe EPO & EPOR hoch/hoch vs. niedrig/niedrig	Gehans Wilcoxon	P<0,02	9 Monate
Summenscore (EPO+EPOR) multivariat	Cox Regression	P≈0,01	*
Summenscore hoch vs. Summenscore niedrig	Gehans Wilcoxon	P≈0,01	8,5 Monate

3.3.11 Vergleich der Scores Primärtumor mit Scores Rezidivtumor

3.3.11.1 Vergleich in der EPO-Gruppe

Um etwaige Zusammenhänge zwischen der EPO-Expression von Primär- und Rezidivtumoren zu erkennen, wurden die Werte von Primär- und Rezidivtumoren mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert (N=11).

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der EPO-Konzentration vom Primärtumor zum Rezidiv (p≈0,05).

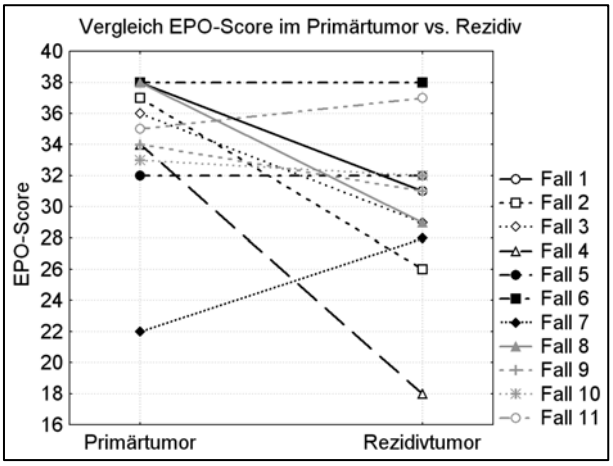

Abbildung 43 Entwicklung EPO Primärtumor zu Rezidiv

Der Mittelwert in der Primärtumorgruppe der EPO-Score betrug 34,3, der Wert in der Rezidivtumorgruppe war mit 30,1 niedriger. Die Signifikanz erreichte dabei knapp das gewählte Signifikanzniveau von p=0,05.

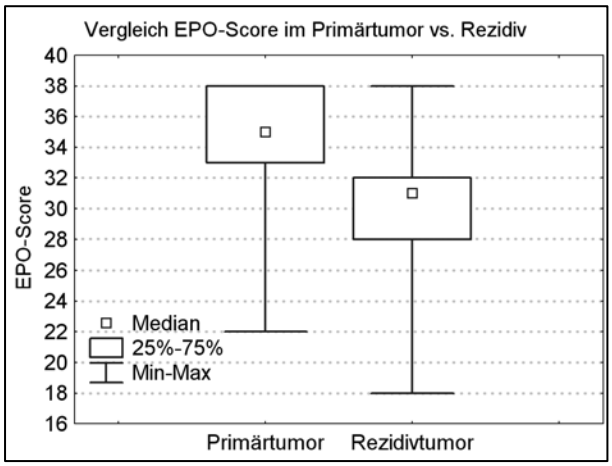

Abbildung 44 Entwicklung EPO Primärtumor zu Rezidiv

3.3.11.2 Vergleich in der EPOR-Gruppe

In äquivalenter Weise erfolgte die Analyse für die EPOR-Scores (N=12).

Dabei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

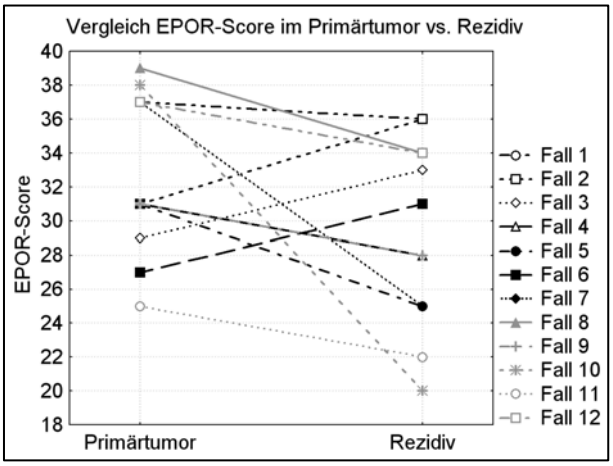

Abbildung 45 Entwicklung EPOR Primärtumor zu Rezidiv

In der Primärtumorgruppe betrug der Mittelwert des EPOR-Scores 32,8, in der Rezidivtumorgruppe 29,3. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant.

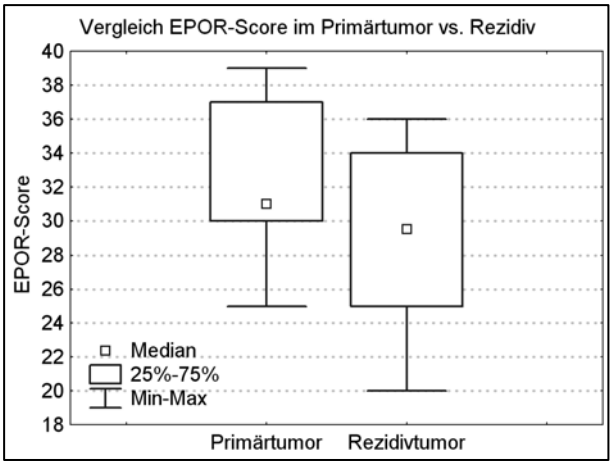

Abbildung 46 Entwicklung EPOR Primärtumor zu Rezidiv

4 Diskussion

In der hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob die endogene Expression von EPO-Protein oder EPO-Rezeptor einen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten hat, die an einem Glioblastom erkrankt sind.

In den letzten Jahren wurde in verschiedensten Studien ein neuroprotektiver Effekt von EPO nachgewiesen (Smith 2004). Dies ließ die Idee entstehen, EPO in der Therapie von Gliompatienten einzusetzen, um die neurodegenerativen Effekte von Chemotherapie oder Strahlentherapie abzumildern und so kognitive Fähigkeiten zu erhalten und damit die Lebensqualität der Patienten zu steigern. Über die Wirksamkeit dieses Konzeptes gibt es entsprechende Tierversuchsstudien (Erbayraktar et al. 2006). Darüber hinaus könnte EPO, durch seine Fähigkeit, die Bluthirnschranke zu stabilisieren, auch die Entstehung von Ödemen und Krampanfällen reduzieren (Martinez-Estrada et al. 2003, Uzum et al. 2006). Bedeutsam ist auch eine Stabilisierung des Hb-Wertes von Tumorpatienten, die Radiochemotherapie erhalten, da Anämie einen wesentlichen Einfluss auf die Lebensqualität hat (Curt et al. 2000) und zudem ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Caro et al. 2001).

Der EPOR wurde auf vielen Tumorzellen nachgewiesen, unter anderem auch bei Glioblastomen (Mohyeldin et al. 2007, Yasuda et al. 2003). Eine Steigerung der Proliferation und Invasivität von Krebszellen durch eine Anwendung von EPO ist, in Anbetracht der ausgelösten Signalwege, wie beispielsweise die Hemmung von Apoptose (Kilic et al. 2005), durchaus denkbar.

In den Ergebnissen unserer Arbeit zeigte sich allerdings ein verlängertes Überleben von Patienten mit hoher endogener EPO- und besonders EPOR-Expression. Die Differenzierung nach verschiedenen Therapiesubgruppen erhöht den Wert der Aussagekraft unserer Daten, da andere Studien oftmals nicht differenzierten, ob und in welchem Umfang adjuvante Therapie durchgeführt wurde. So konnten wir auch zeigen, dass in der Subgruppe radiochemotherapierter Patienten keine Verminderung des Überlebens bei hoher endogener EPO- oder EPOR-Expression nachzuweisen war.

4.1 Grenzen der Methodik

4.1.1 Immunhistochemie

Für die Auswertung immunhistochemischer Färbungen müssen die Grenzen der quantitativen Analyse beachtet werden. Die Unterscheidung in positive und negative Zellen ist durch Schwankungen der Färbeintensität verschiedener Präparate teilweise schwierig. Daher wurde in dieser Arbeit eine semiquantitative Auswertungsweise gewählt (Scores), die zwar weniger fein Unterschiede differenziert, dafür aber Schwankungen in der Auswertung ausgleicht.
Somit muss das Ergebnis einer solchen Anfärbung als semiquantitatives Ergebnis interpretiert und nicht als absoluter Wert angesehen werden. Dennoch können durch den Vergleich der Ergebnisse sinnvolle Schlüsse gezogen werden.
Ferner ist das untersuchte Material lediglich als Stichprobe anzusehen, da nur ein kleiner Teil des Gewebes der Gesamttumormasse betrachtet werden kann. So spiegelt das untersuchte Präparat möglicherweise nicht die Verhältnisse innerhalb des Gesamttumors wieder.
Vorteil der IHC ist hingegen, dass die Färbung die Situation *in vivo* wiederspiegelt und die Verteilung des untersuchten Antigens im Gewebe darstellt.

Für viele Studien zur Untersuchung der Expression von EPO und EPOR wurden kommerzielle Antikörper für Immunblotting und Immunhistochemie verwendet (Acs et al. 2001, Arcasoy et al. 2002, Arcasoy et al. 2003, Kumar et al. 2005, Ribatti et al. 1999, Selzer et al. 2000, Westenfelder und Baranowski 2000, Westphal et al. 2002). Elliott et al. zweifelten in ihrer Veröffentlichung von 2006 die Spezifität der kommerziellen EPOR-Antikörper an. Daraufhin entbrannte eine Diskussion, ob diese Antikörper für valide Studien in Zukunft genutzt werden könnten und ob Ergebnisse früherer Studien, die unter Anwendung dieser Antikörper durchgeführt wurden, überhaupt verwertbar seien (Agarwal et al. 2007, Della et al. 2007, Jelkmann und Laugsch 2007).
Der in dieser Studie verwendete C-20-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology gegen das EPOR-Protein ist insbesondere Gegenstand der Diskussion. Dieser und andere kommerzielle EPOR-Antikörper detektieren Proteine in der Größenordnung zwischen 66 – 78 kDa, was deutlich größer als das berechnete Gewicht von EPOR ist (56-57 kDa). C-20 detektierte drei verschiedene Proteine (35, 66 und 100 kDa) in Tumorzelllinien. Das 66 kDa Protein wurde als HSP70 identifiziert und HSP70 Peptide waren spezifisch in der Lage, die Bindung von C-20 an das 66 kDa Molekül zu blocken (Elliott et al. 2006). Diese reduzierten bzw. entfernten auch die Immunreaktivität des C-20 Antikörpers von nicht-kleinzelligen Lungenkarzi-

nomtumoren (Brown et al. 2007). Die Kreuzreaktivität von C-20 mit HSP wird auch in dem Produktdatenblatt des Herstellers erwähnt (Santa Cruz Biotechnology, EpoR (C-20): sc-695 Product Datasheet).

So entstand die Vermutung, dass frühere Studien eventuell HSP und nicht EPOR detektierten, wobei erwähnt werden muss, dass HSP gerade in Tumoren unter hypoxischen Bedingungen in hohem Maße exprimiert werden (Fandrey 2008).

HSP sind dafür bekannt, in malignen Neoplasien für vermehrtes Zellüberleben und Apoptoseresistenz mitverantwortlich zu sein (Sizer 2007) und dass daher dessen Expression mit kürzerem Überleben und gesteigerter Behandlungsresistenz korreliert (Ciocca und Calderwood 2005, Schmitt et al. 2007).

Trotz der Erkenntnisse, dass die C-20-Spezifität nicht perfekt ist und dessen Anwendung mit Vorsicht interpretiert werden sollte (Elliott et al. 2006), haben zahlreiche andere Autoren Hinweise für eine gute Spezifität in der Anwendung von C-20 in ihren Studien gefunden.

Mohyeldin et al. zeigte mittels Antikörper-Absorptionstest die Spezifität von C-20, wobei der Primärantikörper mit dem kommerziellen Peptid (erhältlich bei Santa Cruz Biotechnology) oder rhEPO blockiert wurde. In beiden Fällen war die Folge eine komplette Auslöschung des immunhistochemischen Signals (Mohyeldin et al. 2005, Mohyeldin et al. 2007).

Auch andere Autoren zeigten in ihren Studien die Spezifität des C-20-Antikörpers (Acs et al. 2001, Acs et al. 2003, Yasuda et al. 2003).

In Reaktion auf Elliott et al. wurden zudem methodische Fehler angemahnt (Henke et al. 2006) und Verdier et al. betonten den langjährigen spezifischen Einsatz von C-20 in ihren Western Blots (Verdier et al. 2000, Walrafen et al. 2005). Darüber hinaus identifizierten sie EPOR-Proteine im Größenbereich von 64 – 69,5 kDa und deuteten an, dass Elliott et al. das Molekulargewicht von EPOR mit einer Annahme < 60 kDa unterschätzt habe (Elliott et al. 2006, Verdier et al. 2006).

Insgesamt erscheint der Einsatz von kommerziellen EPOR-Antikörpern zwar nicht als Ideallösung, aber dennoch als probates Mittel, um EPOR nachzuweisen.

Wichtig ist, dass C-20 gegenüber anderen kommerziellen Antikörpern den Vorteil besitzt, dass es gegen die intrazelluläre Komponente des EPOR gerichtet ist, so dass

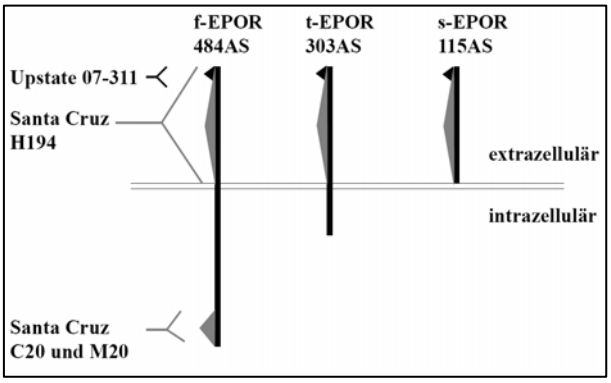

Abbildung 47 Epitope kommerzieller Antikörper

funktionslose Formen wie der t-EPOR oder s-EPOR nicht fälschlicherweise nachgewiesen werden.

Die Annahme, der C-20 Antikörper könnte mit HSP kreuzreagiert haben (Elliott et al. 2006), erscheint, bei den hier vorliegenden Ergebnissen eines positiven Einflusses von EPOR auf das Outcome der Patienten, als unwahrscheinlich, da HSP eher mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Ciocca und Calderwood 2005, Schmitt et al. 2007).

Über den verwendeten Antikörper N-19 von Santa Cruz Biotechnology gegen das EPO-Protein wurden bisher keine ernsthaften Diskussionen bezüglich seiner Sensitivität oder Spezifität geführt. Der Antikörper wurde erfolgreich in verschiedenen Studien eingesetzt (Kishore et al. 2007, Pollio et al. 2005, Yan et al. 2000). Auch in unseren Versuchen konnten wir eine spezifische und saubere Anfärbung von EPO darstellen.

4.1.2 Retrospektive Analyse

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Daten in retrospektiver Auswertung gewonnen wurden. So sind Beobachtungen, dass Patienten, die vollreseziert oder weiter chemotherapiert wurden und dann ein längeres Gesamtüberleben aufwiesen, Interkorrelationseffekten unterworfen. Patienten, die in einem zu schlechten Allgemeinzustand waren oder ein weit fortgeschrittenes Stadium des Hirntumors zeigten, so dass eine größere Operation oder die Folgen von Radiochemotherapie nicht zumutbar oder indiziert waren, haben natürlich aufgrund dieses Zustandes auch unabhängig von weiterführender Therapie eine schlechtere Prognose.

Ein weiterer Nachteil ist, dass diese Doktorarbeit nicht die Anwesenheit von exogenem EPO untersuchen konnte und damit die Effekte einer iatrogenen Gabe nicht ermittelt werden können. Dennoch liefert die Analyse der endogenen Expression von EPO und EPOR wichtige Anhaltspunkte für die Wirkung von EPO in Glioblastomen.

4.2 Allgemeine Beobachtungen dieser Arbeit

4.2.1 Patientenkollektiv

In unseren Daten überwogen leicht die Patienten männlichen Geschlechts (58%), was der etwas höheren Inzidenz von Gliomen bei Männern gerecht wird (CBTRUS 2009). Das mittlere Erkrankungsalter lag mit 61,9 Jahren nahezu exakt auf dem selben Wert wie in der Literatur

beschrieben (62 Jahre) (Weller und Westphal 2003). Auch mit der Spannweite von 30 – 81 Jahren liegen die Daten im typischen Bereich.

Das mediane Überleben von 9 Monaten liegt in unserem Kollektiv relativ niedrig. In der Literatur sind Werte um die 12 Monate als typisch beschrieben (Davis et al. 1999). Dies ist damit zu erklären, dass in unserem Patientenkollektiv eine große Anzahl von Patienten vorhanden war, die nach chirurgischer Intervention keine weitere adjuvante Therapie erhalten haben, die dann entsprechend kürzere Überlebenszeiten aufwiesen.

Ein großer Teil von Patienten überlebte in unserer Gruppe extrem kurz. Einen Monat nach Operation waren bereits knapp 15% verstorben. Dies ist eher auf peri- oder postoperative Komplikationen als auf direkte Tumorfolgen zurückzuführen. Deshalb wurden für die Überlebenszeitanalysen die Ultrakurzüberleber von bis zu einem Monat ausgeschlossen. In der verbleibenden Patientengruppe betrug das mediane Überleben dann 12 Monate.

4.2.2 Statistische Überlebenszeitanalysen nach Kofaktoren

Ein geschlechtsspezifischer Einfluss auf das Überleben von GBM-Patienten ist bisher nicht bekannt. Auch unsere Daten zeigten keinen Überlebensvorteil von Männern oder Frauen.

Der bekannte Einfluss des Alters auf die Prognose bestätigte sich in unserer Arbeit. Im medianen Überleben ergab sich für junge Patienten (≤ 63 Jahre, Teilung nach medianem Alter des Kollektivs) ein Vorteil von 8 Monaten gegenüber alten Patienten.

Wie zu erwarten konnte retrospektiv ein positiver Einfluss von Radiochemotherapie auf das Überleben nachgewiesen werden. Erhielten Patienten zusätzlich zur Operation eine adjuvante Radiochemotherapie, lag deren medianes Überleben bei 14 Monaten, wogegen die Überlebenszeit nach rein chirurgischer Intervention lediglich bei 2 Monaten lag. Hier spielt sicherlich auch eine Interkorrelation eine Rolle, da Patienten mit perioperativen Komplikationen eine hohe Mortalität haben und einer Radiochemotherapie gar nicht erst zugeführt werden konnten.

Als sehr erfolgreiches Schema erwies sich hierbei die Gabe von Temozolomid konkomitant und adjuvant zur Strahlentherapie. Dies entspricht auch den aktuellen Erfahrungen in anderen Arbeitsgruppen (Diener und Putzki 2008, Stupp et al. 2005) und hat sich deshalb zur Standardtherapie in der Primärbehandlung von Glioblastomen etabliert.

Auch das Ausmaß der durchgeführten Resektion ist ein prognostischer Faktor. Vollresezierte Patienten wiesen ein signifikant längeres Überleben als teilresezierte oder biopsierte Patienten auf. Unter Berücksichtigung oben erwähnter Einschränkungen der Aussagekraft durch Interkorrelationseffekte, kann dennoch die Bedeutung der Resektion, wie in anderen Studien beschrieben, bestätigt werden (Hess 1999, Lacroix et al. 2001, Vuorinen et al. 2003).

4.2.3 Beobachtungen zur EPO- bzw. EPOR-Expression

Die Beobachtung, dass innerhalb eines Präparates Regionen hoher und niedriger EPO- bzw. EPOR-Expression direkt nebeneinander lagen, ist etwas überraschend. Hypoxie oder andere lokale Umgebungsfaktoren erscheinen als Erklärung unwahrscheinlich, da die räumliche Nähe der entsprechenden Areale sehr dicht war. Dies spricht für eine ausgeprägte genetische Heterogenität innerhalb von Glioblastomen, woraus sich ableiten lässt, dass kein deutlicher Selektionsvorteil von Tumorzellen mit hoher EPO- oder EPOR-Expression besteht.

Die Erkenntnis, dass mitotische oder mehrkernige Zellen eine besonders starke Expression von EPO und EPOR aufweisen, lässt sich auf die Induktion der Mitose durch den EPO-/EPOR-Signalweg erklären (Miura et al. 1991). Dabei bindet der aktivierte EPOR die Tyrosinphosphatase SYP und verringert die Menge von benötigtem EPO, um diese zu phosphorylieren. Es resultiert eine Induktion der Mitose (Tauchi et al. 1996). Entsprechend können große mehrkernige Zellen als Stadien unvollständig abgelaufener Mitose betrachtet werden. Dies könnte auf den Verlust des Tumorsuppressors MAD2 zurückzuführen sein, was zu einer frühzeitigen Degradation des zellzyklussteuernden Cyclin B führt. Die Folge ist ein vorzeitiger Mitosearrest, was zur Entstehung multinukleärer Zellen führt (Michel et al. 2004).

Die Tatsache, dass perinekrotisch, im Bereich der Pseudopalisaden gelegene Tumorzellen eine erhöhte EPO- und EPOR-Expression aufweisen, kann durch eine ausgeprägte Hypoxie dieser Regionen erklärt werden. Diese führt zu einer starken Expression von HIF-1α und zu einer konsekutiv vermehrten Expression von EPO und EPOR (Brat et al. 2004, Brat und Mapstone 2003, Zagzag et al. 2000). Obwohl bisher im Gegensatz zu EPO auf dem EPOR-Gen keine direkte HIF-1 Bindungsstelle gefunden wurde (Mohyeldin et al. 2007), kann angenommen werden, dass Hypoxie via HIF indirekt die Expression von EPOR stimuliert. Dies ist denkbar durch eine Steigerung von EPO durch HIF, welches dann wiederum die Expression seines eigenen Rezeptors anregt (Beleslin-Cokic et al. 2004, Grossi et al. 1998, Ohigashi et al. 1996). Ein äquivalenter Mechanismus ist bereits in normalen Astrozyten beschrieben worden (Sugawa et al. 2002). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass perinekrotische Bereiche immunhistochemisch oft ein unspezifisches Verhalten zeigen.

Die Expression von EPO und EPOR in zum Teil noch erkennbarem gesundem Hirngewebe zeigte im Kortexbereich sowie perivaskulär ebenfalls stets ein hohes Niveau, während in der weißen Substanz kaum Färbung nachweisbar war.

Dies ist interessant angesichts der Tatsache, dass besonders Neurone von der protektiven Wirkung des EPO-/EPOR-Signalwegs profitieren, da diese schädlichen Einflüssen gegenüber besonders anfällig sind. So erscheint es logisch, dass EPO und EPOR besonders in der neuronenreichen grauen Substanz exprimiert werden.

4.3 Ergebnisse dieser Arbeit: Überlebensvorteil durch EPO/EPOR

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen einen leichten positiven Einfluss hoher Konzentrationen von EPO und EPOR in Glioblastomzellen für das Gesamtüberleben annehmen. Wesentlich ist aber, dass sich aus den gewonnenen Daten keinerlei Anhaltspunkt für einen negativen Effekt von endogenem EPO oder EPOR auf das Überleben abzeichnet.

Bei der Unterscheidung in hohe und niedrige EPO- bzw. EPOR-Expression (mediane Teilung) und anschließender Korrelation mit dem Gesamtüberleben zeigte sich ein signifikanter medianer Überlebensvorteil von 8 Monaten für die Gruppe der hohen EPOR-Expression.
Dies zeigte sich für den EPO-Score initial nicht. Allerdings ergaben sich hier signifikante Ergebnisse unter Einschluss der Ultrakurzzeitüberleber. Dies ist teilweise dadurch erklärbar, dass eine höhere Fallzahl in dieser Analyse auch einen schwachen Einfluss von EPO in den Tests statistisch deutlich machen konnte. Einschränkend muss aber berücksichtigt werden, dass UKZ, aus den bereits weiter oben erwähnten Gründen (wahrscheinlich andere Todesursache als der Tumor selbst, wie bspw. postoperative Komplikation), möglicherweise die Ergebnisse verzerren.

Die durchgeführten Analysen lassen die Vermutung zu, dass sowohl EPOR, aber auch EPO einen Einfluss auf das Überleben von Gliompatienten ausüben. EPO und EPOR sind vermutlich getrennte Prognosefaktoren, obwohl in unseren Daten eine hohe Korrelation zwischen EPO und EPOR bestand. Dabei imponiert der Einfluss von EPO gegenüber EPOR deutlich schwächer.

Die Ergebnisse erscheinen vor dem Hintergrund der Gesamtstudienlage nicht überraschend. Die überwiegende Zahl von Studien, sowohl an primären als auch an metastatischen Hirntumoren, beschreibt positive Effekte von EPO, bzw. EPOR. Zusätzlich kann bei Glioblastompatienten ein besonderer Vorteil durch EPO vermittelte Signalwege aufgrund von ihren neuroprotektiven Eigenschaften, insbesondere dem Schutz von gesundem Hirngewebe, angenommen werden (Arishima et al. 2006, Uzum et al. 2006, Yatsiv et al. 2005).

Zur Verifizierung der Ergebnisse von Hassouna et al. (2008), die in ihren Zellkulturversuchen eine EPO-induzierte Resistenz gegenüber RCT nachwiesen, führten wir in der Subgruppe der Patienten mit RCT separate Analysen durch.
Unsere Daten zeigten hier einen signifikanten positiven Einfluss von EPOR auf das Überleben. Für das EPO-Protein fand sich kein signifikanter Einfluss. Negative Auswirkungen beider Faktoren konnten nicht gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass *in-vivo*-Effekte von Zellkulturuntersuchungen abweichen. Es erscheint zudem nicht unlogisch, dass der EPO-/EPOR-Signalweg, mit seiner Fähigkeit die O_2-Versorgung von Tumorzellen zu verbessern, dadurch eine erhöhte Wirksamkeit von RCT hervorruft, die auf eine gute Sauerstoffversorgung angewiesen ist. Hier sind klinische Studien erforderlich, um den Einfluss von EPO *in vivo* auf Effekte von RCT bei Glioblastompatienten zu ermitteln.
Ein weiterer indirekter Erklärungsansatz, warum der EPO-/EPOR-Signalweg einen positiven Effekt auf das Überleben haben könnte, mag in der Tatsache begründet liegen, dass die Hypoxie der Tumorzellen, die zu expansivem Wachstum und vermehrter Invasivität führt (Vaupel und Harrison 2004), durch den EPO-/EPOR-Signalweg, unabhängig vom Hämoglobinwert des Blutes, korrigiert wird. Der Ausgangsbefund vor Operation solcher Tumoren könnte dann deutlich besser sein, und die folgende Therapie, aus Operation und Radiochemotherapie, wäre mit größerem Erfolg durchführbar.

In einer weiteren Untersuchung konnten wir zeigen, dass, bei medianer Teilung der Patienten in hohes und niedriges Alter, besonders junge Patienten von einer hohen EPOR-Expression profitieren. Dies entspricht den Ergebnissen, die auch Mittelbronn et al. in ihrer Studie fanden (Mittelbronn et al. 2007). Dieses Ergebnis war unerwartet und über die Ursachen kann nur spekuliert werden. Möglicherweise haben die neuroprotektiven Effekte von EPO bei jüngeren Patienten ein größeres Gewicht. Auch erscheint generell wahrscheinlich, dass jüngere Patienten etwas mehr von einem überlebensverlängernden Faktor profitieren, da sie ohnehin länger überleben und sich dadurch ein protektiver Faktor stärker auswirken kann. Möglicherweise spielen hier noch nicht identifizierte molekulare Faktoren eine Rolle, die zwar früher zur Tumorentstehung führen, aber gleichzeitig eine geringere Therapieresistenz bedingen.

Um die Gewichtung des Einflusses von EPO und EPOR gegenüber den Kofaktoren zu bestimmen, wurden zusätzlich multivariate Analysen (Cox Regression) durchgeführt, in denen sich EPOR als signifikanter positiver Faktor auf das Überleben bestätigte ($p \approx 0{,}02$). Erfreuli-

cherweise zeigte unter Einbeziehung der Kofaktoren nun auch EPO einen signifikanten Einfluss in der durchgeführten Analyse ($p \approx 0{,}03$).

Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass die Faktoren Alter, Resektionsausmaß und anschließende RCT gewichtige klinische Einflussfaktoren auf das Überleben darstellen. Leider zeigte sich in der Analyse der Daten, dass, bei medianer Teilung der EPO- bzw. EPOR-Scores in hohe und niedrige Expression, diese Kofaktoren in den Gruppen nicht gleich gewichtet waren. So befanden sich deutlich mehr Vollresezierte und anschließend radiochemotherapierte Patienten in den Gruppen hoher EPO- als auch hoher EPOR-Expression. Zusätzlich war das mediane Alter in den Gruppen hoher Expression geringer als in den Gruppen niedriger Expression (siehe Tabelle 16, Seite 47).
Die Aussagekraft der Daten wird dadurch etwas eingeschränkt, da möglicherweise die signifikanten Ergebnisse Wechselwirkungen mit anderen Kofaktoren unterworfen sind.
Andererseits könnte dies auch ein Hinweis sein, dass Patienten mit hoher EPO- und EPOR-Expression, durch einen positiven Einfluss dieser Faktoren, von vorneherein besser therapierbare Tumoren aufweisen und deshalb mehr maximal therapierte Patienten (OP, RCT) in den Gruppen hoher Expression zu finden sind.

Um einzelne Kovariablen gezielt auf Wechselwirkungen in den Tests zu untersuchen, wurden daher geschichtete Regressionsanalysen durchgeführt.
Für EPO und den EPOR bestätigten sich bei Schichtung nach Altersgruppe und Resektionsausmaß signifikante Einflüsse auf das Überleben. Lediglich bei Schichtung nach RCT (durchgeführt ja/nein) ergaben sich nicht signifikante Werte. Dies ist - wie bereits im Ergebnisteil beschrieben - sehr wahrscheinlich durch statistische Wechselwirkungen zwischen dem Kofaktor “Therapiegruppe“ und EPO- bzw. EPOR-Score verursacht. Dies schränkt die Aussagekraft dieser Analyse ein.

Die Ursache für die in verschiedenen Tests unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich eines signifikanten Einflusses von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben ist komplex. Zum einen besteht eine Ungleichverteilung der verschiedenen Kofaktoren (siehe oben). Zum anderen sind gerade in geschichteten Analysen die Subgruppen derart klein, dass fundierte statistische Berechnungen nur eingeschränkt möglich sind.
Darüber hinaus kann angenommen werden, dass sowohl die Effekte von EPO als auch von

EPOR auf das Überleben eher von geringerer Bedeutung sind, da sich deren Signifikanz nicht in allen Tests bestätigt.

Ergänzend führten wir statistische Tests durch, die EPO und EPOR als gemeinsamen Summenfaktor auf das Überleben untersuchten. Hier zeigte sich in nahezu allen Analysen (multifaktoriell als auch geschichtet) ein signifikanter Einfluss auf das Überleben (schlechtester Wert: geschichtete Analyse nach RCT, $p \approx 0{,}07$, vermutlich Wechselwirkungen, sonst alle $p < 0{,}05$).
Dies lässt mit großer Sicherheit die Annahme zu, dass ein sich gegenseitig verstärkender positiver Einfluss von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben vorliegt, während die Faktoren einzeln einen schwächeren Effekt haben (mögliche Auswirkung autokriner und parakriner Signalwege (Mohyeldin et al. 2007)). Ein positiver Effekt des EPO-/EPOR-Signalweges in Tumorzellen von Glioblastompatienten ist damit sehr wahrscheinlich.

Eine weitere wesentliche Beobachtung, die aus allen Kaplan-Meier-Überlebenskurven abgeleitet werden kann, ist der schwindende Effekt der positiven Einflüsse von EPO und EPOR auf das Gesamtüberleben ab einer Überlebenszeit in etwa um die 30 Monate (siehe Grafiken). Man muss aber berücksichtigen, dass, gerade im Bereich der Langzeitüberleber, eine nur sehr geringe Fallzahl verbleibt und die Ergebnisse in diesem Bereich etwas eingeschränkt beurteilbar sind.
Als Erklärung mag angenommen werden, dass Tumoren über die Zeit ihre EPO- bzw. EPOR-Expression verlieren. Hinweise darauf geben unsere Analysen, die zeigten, dass Rezidivtumore tendenziell eher eine niedrigere Expression aufwiesen als die zugehörigen Primärtumoren. Diese Ergebnisse waren allerdings nur für den EPOR schwach signifikant und die Fallzahlen waren klein. Welche Ursache ein Absinken der EPO- bzw. EPOR-Expression vom Primärtumor zum Rezidivtumor haben könnte, ist unklar. Eine durch die operative Intervention erzielte Entfernung großer Mengen hypoxischen Tumorgewebes könnte als Erklärung dienen, da Hypoxie ja einen wesentlichen Stimulus der EPO- bzw. EPOR-Produktion darstellt.

4.4 EPO und Tumoren – Fluch oder Segen?

4.4.1 EPO und EPOR in Tumorzellen – Bedeutung überschätzt?

Der Nachweis von EPO und EPOR gelang, wie auch in unserer Arbeit am Glioblastom, mittels unterschiedlicher Methoden in den verschiedensten Tumorarten (siehe Kapitel 1.3.4, Seite 21). Dennoch bleibt eine gewisse Unklarheit, ob tatsächlich funktionierende Signalwege in relevanter Ausprägung vorliegen.

Da die in vielen Untersuchungen verwendete RT-PCR-Methode zwischen den verschiedenen Splicevarianten des EPOR nicht differenziert, ist nicht klar, ob wirklich funktionell aktiver EPOR im angegebenen Maße exprimiert wird. Tatsächlich wurde gezeigt, dass gerade in Tumorzellen eine hohe Rate alternativen Splicings der EpoR-mRNA stattfindet, die für funktionslose oder antagonistische Formen des EPOR-Proteins kodieren (Arcasoy et al. 2003). Interessant ist, dass die Transkriptionsraten von EPOR in Tumorzellen deutlich niedriger imponieren als im gesunden Knochenmark, wo die roten Blutzellvorläufer zu finden sind. Auch ist die Expression in Tumorzellen nicht höher als in äquivalentem gesundem Gewebe (Sinclair et al. 2008). Dies wurde auch mit gematchten Tumor- und Nicht-Tumorproben (gleicher Patient) von Lungen- bzw. Kolontumoren bestätigt (Sinclair et al. 2008).

Andere Studien untermauern dies. So findet sich in neoplastischem Prostatagewebe keine Erhöhung der EPOR-Transkription gegenüber normalem Prostatagewebe (Feldman et al. 2006) und diese war ebenso äquivalent in Plattenzellkarzinomen und gesundem Plattenepithel des Kopf- und Halsbereiches (Winter et al. 2005).

Dies lässt die Vermutung zu, dass kein Selektionsvorteil von Tumorzellen für die EPOR-Überexpression besteht (Sinclair et al. 2008).

Auch die Frage, ob funktionell aktive EPOR-Proteine überhaupt und in welchem Maße aus dem Zytoplasma an die Zelloberfläche gelangen, ist nicht sicher geklärt (Sinclair et al. 2007, Sinclair et al. 2008). Immunhistochemische Markierungen konnten bisher EPOR hauptsächlich im Zytoplasma nachweisen (Jelkmann und Laugsch 2007). In dieser Arbeit wurde für die Auswertung nicht nach Färbung an der Zelloberfläche oder Zellplasma unterschieden. Tatsächlich schienen EPO- und EPOR-Markierungen die Zelloberfläche aber in überwiegendem Maße das Zytoplasma anzufärben. Eine Aussagekraft über die Aktivität von Signalwegen lässt sich aber daraus nicht unmittelbar ableiten, da EPOR an der Zelloberfläche funktionslos sein kann, im Umkehrschluss aber auch nicht ausgeschlossen ist, dass im Zytoplasma befindliche EPOR- oder EPO-Moleküle in großer Anzahl noch an die Oberfläche transportiert werden.

Zudem stellt sich die methodische Frage, ob aufgrund der oben erwähnten fehlenden Sicherheit der Spezifität der kommerziellen EPOR-Antikörper stets EPOR nachgewiesen wurde und nicht etwa doch andere Proteine, wie beispielsweise HSP (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 60). Andererseits bergen viele andere kommerzielle Antikörper, anders als der hier verwendete C-20-Antikörper, die Problematik, dass sie gegen die extrazelluläre Komponente des EPOR gerichtet sind und somit auch funktionslose Varianten des EPOR, wie s-EPOR oder t-EPOR, nachweisen könnten.

Einige wenige Studien führten EPO-binding-assays durch, um die Expression von EPOR auf der Zelloberfläche von Tumoren nachzuweisen (Masuda et al. 1993, Okuno et al. 1990, Westenfelder und Baranowski 2000). Dabei stellte man fest, dass die Bindungsaffinität von EPOR in den untersuchten Tumorzellen deutlich geringer war als die auf erythroiden Vorläuferzellen (Anagnostou et al. 1990, Broudy et al. 1988, Broudy et al. 1991, Masuda et al. 1993, Okuno et al. 1990, Westenfelder und Baranowski 2000). Andere Studien lieferten dafür einen Erklärungsansatz durch Nachweis von extrem niedrigen Konzentrationen von EPOR auf der Zelloberfläche von Tumorzellen (Lamontagne et al. 2006, Sinclair et al. 2008, Um et al. 2007).
Da das EPOR-Protein in der Gesamtmenge im Western Blot in gleicher Größenordnung in Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen vorhanden ist, scheinen Transportmechanismen, die den EPOR an die Zelloberfläche befördern, in Tumorzellen ein limitierender Faktor für die Stimulierbarkeit durch EPO darzustellen (Lamontagne et al. 2006, Sinclair et al. 2008).

Auch auf molekularer Ebene wurden EPO- und EPOR-Signalwege untersucht. *In vitro* fand sich eine vermehrte Phosphorylierung von Tyrosinen bei Mamma- und Zervixkarzinomen (Acs et al. 2001, Acs et al. 2003). Dabei beobachtete man, dass durch NF-κB die Transkription antiapoptotischer Gene gesteigert wurde, was den Verdacht eines tumorfördernden Effektes von EPO entstehen ließ. Allerdings wurden keine entsprechenden objektivierten Überlebensstudien durchgeführt (Batra et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie, dass rhEPO die NF-κB induzierte Transkription antiapoptotischer Gene hemmen kann und damit den Chemotherapie-induzierten Zelltod sogar steigert (Carvalho et al. 2005).
In einem weiteren Versuch sollte der Nachweis des EPO-abhängigen JAK-2- und STAT-5–Signalwegs in Tumoren durch Injektion von antagonistischen s-EPOR und Anti-EPO-Antikörpern in *ex-vivo*-Organkulturen demonstriert werden (Yasuda et al. 2002). Es waren

allerdings sehr hohe Dosen s-EPOR und Anti-EPO-Antikörper nötig, um eine Reduktion von aktiviertem STAT-5 zu erreichen.

Auch diesbezüglich erscheint die Relevanz des EPO-/EPOR-Signalweges in Tumorzellen zumindest fraglich, zumal STAT-5 durch eine Reihe anderer Zytokine aktiviert werden kann (Seidel et al. 2000).

Abschließend bleibt eine Unsicherheit über das Ausmaß der Aktivität von EPO-/EPOR-Signalwegen in Tumoren. Es scheint gesichert, dass diese zwar prinzipiell aktiviert sind, wahrscheinlich allerdings in deutlich geringerem Umfang, als beispielsweise in Zellen der Erythropoese.
Auch unsere Ergebnisse lassen eher vermuten, dass EPO-vermittelte antiapoptotische Signalwege in Tumorzellen eine untergeordnete Rolle spielen, da wir keinen Selektionsvorteil von Tumoren mit hoher EPO- oder EPOR-Expression nachweisen konnten und kein Überlebensnachteil von Patienten gefunden wurde, die hohe EPO- oder EPOR-Expression aufwiesen. Rein theoretische Überlegungen und *in-vitro*-Versuche scheinen nicht direkt auf die Situation *in vivo* übertragbar zu sein. Eine genauere Erforschung des EPO-/EPOR-Signalweges in Tumorzellen auf molekularer Ebene ist notwendig.

4.4.2 Hypoxie und Tumoren

Die Vermeidung von hypoxischen Zuständen in Tumoren ist wichtig, da diese mit einem klinisch aggressiveren Phänotyp, Therapieresistenz und schlechterer Prognose einhergehen (Graeber et al. 1996, Vaupel und Harrison 2004).
Den Einfluss von Hypoxie auf das Outcome von Tumorpatienten schreibt man im Wesentlichen drei Mechanismen zu. Zum einen bewirkt Hypoxie die Expression von VEGF, welches die Angiogenese und damit das Potenzial für Tumorwachstum und Metastasierung fördert. Zum anderen bewirkt therapeutisch eingesetzte ionisierende Strahlung die Entstehung freier Radikale in den Zellen, die in Anwesenheit von Sauerstoff fixiert und dabei mit der DNA und Zellmembran interagieren, was zum Zelltod führt. Bei unzureichender Oxygenierung funktioniert dieser Mechanismus schlechter und Zelltod kann weniger häufig induziert werden. Schließlich vermittelt Hypoxie einen Wachstumsvorteil der Zellen, die resistent gegenüber Apoptose sind, was die Chancen zur Heilung oder Kontrolle der malignen Erkrankung verringert (Höckel et al. 1999, Khan et al. 2008).
Auch für das Ansprechen auf Chemotherapie hat Hypoxie Bedeutung. Eine schlechtere O_2-Versorgung im Tumor hat möglicherweise Auswirkungen auf die Anzahl der Zellen im Zell-

zyklus und die Überexpression von multi-drug-Resistenzen oder p53-Protein (Pirollo et al. 2000). *In-vitro*-Studien ergaben eine 2- bis 6-fach höhere Chemoresistenz von hypoxischen Zellen gegenüber normal oxygenierten Zellen (Teicher et al. 1990). Andere Studien bestätigten den Effekt der Steigerung der Zytotoxizität von Chemotherapeutika unter EPO-Administration (Thews et al. 2001).
Da gezeigt wurde, dass EPO bei chemotherapierten Patienten den Hb-Wert anheben kann und die Hypoxie in Tumoren reduzieren kann (Abels 1992, Littlewood et al. 2001), muss dessen Gabe auch in Zukunft in therapeutische Überlegungen mit eingehen.

Ein viel diskutiertes Thema ist auch hier die Frage nach der Hemmung der Apoptose von Tumorzellen durch EPO und eine dadurch vermittelte Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung.
Es wurde berichtet, dass rhEPO (25-200 U/ml) unter Cisplatintherapie das Überleben von Zervixkarzinomzellen um 5 – 60% verbesserte (Acs et al. 2003). Allerdings waren nur 10% des Cisplatin-induzierten Zelltods auf apoptotische Mechanismen zurückzuführen, wobei eine Dosis von 200 U/ml rhEPO die Apoptoserate lediglich um 5% senkte (Sinclair et al. 2007).
Bei myeloblastischen Knochenmarkszellen der Maus führte die Administration von 5 U/ml rhEPO zu einem verminderten Cisplatin-induzierten Wachstumsarrest und reduzierte die Apoptoserate innerhalb der ersten 24 Stunden. Allerdings zeigte sich bei längerer Beobachtung eine kompensatorische Steigerung des nekrotischen Zelltods (Nimbalkar et al. 2003).
In ähnlichen Studien mit einer Glioblastom- (U87) und einer Zervixkarzinomzelllinie (HT100) wurde unter Gabe von 30 U/ml rhEPO eine erhöhte Radiochemotherapieresistenz beobachtet (Belenkov et al. 2004).
Im Gegenzug wurde demonstriert, dass das Ausmaß des Cisplatin-vermittelten Zelltods durch Vorbehandlung mit rhEPO (10 U/ml) nicht beeinträchtigt wurde (Liu et al. 2004).
Eine Reihe weiterer Studien demonstrierte die Harmlosigkeit, bzw. sogar den positiven Effekt von EPO-Gabe während Radiochemotherapie in verschiedenen Xenograft-Modellen (siehe unten).
Auch unsere *in-vivo*-Studie liefert eindeutige Daten, dass eine hohe endogene EPO- bzw. EPOR-Expression und gleichzeitige Radiochemotherapie nicht mit schlechterem Überleben einhergeht. Es bleibt zu betonen, dass möglicherweise eine starke Divergenz in den Ergebnissen von *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien besteht. Leider existieren bisher nur wenige *in-vivo*-Experimente zu diesem Thema.

4.4.3 Proliferationsstudien in Zellkultur – kein Konsens

Es wurde der Verdacht geäußert, EPO könnte die Proliferation von Tumorzellen fördern. Eine Reihe von Zellproliferationsstudien wurde zu diesem Thema in der Vergangenheit durchgeführt.

Bei der Interpretation der folgenden Studienergebnisse ist zu beachten, dass die pharmakologische Konzentration von rhEPO, nach subkutaner Injektion eines Bolus von 600 U/kg KG (oberer Bereich der empfohlenen therapeutischen Dosis), in etwa 1 U/ml im Serum erreicht (Ramakrishnan et al. 2004). Die im Folgenden beschriebenen Studien verwendeten oftmals deutlich höhere Dosen von rhEPO.

So führte eine 1.000-fach höhere als im klinischen Alltag empfohlene Applikation von rhEPO in sechs Tumorzelllinien (Brust, Pankreas, Prostata, Niere und Knochenmark) nicht zu einer Steigerung der Proliferation, obwohl EPOR-Transkription und EPOR-Protein in jeder Zelllinie nachgewiesen wurde (Westphal et al. 2002). Dies bestätigte sich in sieben weiteren Studien, in denen bei 58 Tumorzelllinien keine Zunahme der Proliferation durch EPO-Gabe beobachtet wurde (Berdel et al. 1991, Berdel et al. 1992, Dunlop et al. 2006, Liu et al. 2004, Mundt et al. 1992, Rossler et al. 2004, Rosti et al. 1993). Allerdings untersuchte nur eine Studie genauer, ob EPOR tatsächlich auf der Zelloberfläche exprimiert war. In dieser Studie war dies aber der Fall (Liu et al. 2004).

In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei Melanomzelllinien kein Unterschied in der Wachstumscharakteristik der Kulturen auftrat, obwohl eine Hälfte den EPOR exprimierte und die andere nicht (Selzer et al. 2000). Ein Selektionsvorteil von Tumorzellen mit hoher EPOR-Expression ist somit unwahrscheinlich.

Andere Studien berichten von einer Zunahme der Proliferation von Tumorzellen unter rhEPO-Administration (Acs et al. 2001, Takeshita et al. 2000). Die Untersuchungsergebnisse einer dieser Studien, die die proliferative Antwort von Tumorzellen in einer Brustkrebszelllinie demonstrierte, (Acs et al. 2001) konnten aber in vier anderen Studien, die die gleiche Zelllinie verwendeten, nicht beobachtet werden (Berdel et al. 1991, Berdel et al. 1992, Mundt et al. 1992, Rosti et al. 1993). Zudem lag die Zunahme der Proliferationsaktivität bei diesen Studien noch im Bereich der für Zellproliferationsversuche typischen Schwankungsbreite (Sinclair et al. 2007).

Zwei weitere Studien untersuchten EPO-induziertes Tumorzellwachstum. Hier wurde die Proliferationsrate von sieben humanen Nieren- und Prostatatumorzelllinien durch rhEPO-Gabe (0,5 U/ml bis 100 U/ml) 1,25- bis 4-fach gesteigert, sowohl in serumfreiem als auch in serumhaltigem Medium (Feldman et al. 2006, Westenfelder und Baranowski 2000). Der Einsatz

von suprapharmakologischen Dosen von rhEPO schwächt die Aussagekraft dieser Studien für den Einsatz von rhEPO in der tatsächlichen klinischen Praxis allerdings ab. Im Vergleich dazu reichen pharmakologische Dosen zwischen 0,01 U/ml und 0,4 U/ml rhEPO aus, um bei der Erythropoese eine Steigerung der Proliferation roter Blutvorläuferzellen um den Faktor 6,5 (650%) zu erreichen (Hammerling et al. 1996).

In der Zusammenschau ergibt sich die Erkenntnis, dass der mit Abstand überwiegende Teil dieser Studien keine Zunahme der Proliferation von Tumorzellen unter Gabe von EPO erkennen ließ. In den wenigen Studien, in denen dies beobachtet wurde, war die Zunahme der Proliferation, trotz Verwendung suprapharmakologischer Konzentrationen, meist marginal. Nochmals muss betont werden, dass die Aussagekraft von Zellkulturstudien bei komplexen Interaktionen von Signalwegen im Vergleich zu *in-vivo*-Experimenten begrenzt ist.

4.4.4 EPO in Xenograft-Tumortiermodellen – kein Überlebensnachteil

Den Verhältnissen bei humanen Tumorerkrankungen wird am ehesten eine EPO-Administration in Xenograft-Tiermodelle gerecht.

In sieben Studien an verschiedenen Tumormodellen (Melanom, Sarkom, Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Karzinome des Hals – und Kopfbereiches) unter Administration von EPO wurde kein Effekt auf Tumorwachstum, Gesamtüberleben oder Therapieansprechen (Radiotherapie, Chemotherapie, IL-12 Therapie) nachgewiesen (Golab et al. 1998, Hardee et al. 2005, Hardee et al. 2006, Kelleher et al. 1996, Kirkpatrick et al. 2006, Lamontagne et al. 2006, van Halteren et al. 2004). Dabei wurde EPO-/EPOR-Signalaktivität in einer Studie eindeutig nachgewiesen (Hardee et al. 2006) und auch eine Verbesserung der Oxygenierung von Tumorgewebe durch EPO gezeigt (Kirkpatrick et al. 2006).

In einer Veröffentlichung wurde hingegen unter Gabe von EPO eine leichte Zunahme des Tumorwachstums in Kombination mit operativer Intervention (Durchtrennung des Tumors mit einer Nadel) beschrieben. Die alleinige Gabe von EPO ohne Operation zeigte aber keinen Effekt (Kjellen et al. 2006).

Im Gegensatz dazu fand sich in einer Vielzahl von Studien ein positiver Einfluss von EPO in der Tumortherapie. Bei den meisten dieser Untersuchungen wurde kein Effekt auf die Tumorzellen bei alleiniger Gabe von EPO beobachtet. Allerdings führte die Kombination mit Radiotherapie (Ning et al. 2005, Pinel et al. 2004, Stuben et al. 2001, Stuben et al. 2003, Thews et al. 1998) oder Chemotherapie (Shannon et al. 2005, Sigounas et al. 2004, Silver und Piver 1999, Thews et al. 2001, Tovari et al. 2005) zu besserem Ansprechen und verstärkter Wirkung dieser Therapien. In einer weiteren Studie stellte die Gabe von EPO die Sensibilität von Kolon-Karzinomzellen gegenüber photodynamischer Therapie wieder her (Golab et al. 2002).

In einem anderen Versuchsansatz wurden zur Blockierung des EPO-/EPOR-Signalweges Anti-EPO-Antikörper und löslicher EPOR direkt in Tumoren injiziert, was zu einer Tumorverkleinerung in Mäusen führte (Yasuda et al. 2001). Ob der EPOR-Signalweg dadurch allerdings tatsächlich inhibiert wurde, ist nicht genauer untersucht.
In einem ähnlichen Studiendesign wurden EPO-antagonistische (EMP-9) und -agonistische (EMP-1) Peptide bei Magenkarzinomen und Melanomen eingesetzt (Yasuda et al. 2003). Die Antagonisierung bewirkte eine Hemmung von Angiogenese und damit eine Beeinträchtigung des Überlebens von Tumorzellen. Die Agonisierung von EPO hatte gegenteilige Effekte. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass EMP-1 *in vivo* eine sehr geringe Potenz besitzt (rhEPO Aktivität ist etwa 65.000 mal stärker) (Barbone et al. 1999) und dass es unter Antagonisierung, wie auch unter Agonisierung, nicht zu Änderungen des Hämatokrits gekommen ist, was die Beteiligung des EPOR-Signalweges an den oben beschriebenen Effekten als fraglich erscheinen lässt (Yasuda et al. 2003).
In einem weiteren Versuch wurden Anti-EPO-Antikörper, löslicher EPOR und der JAK-2-Antagonist AG490 lokal in Tumoren appliziert, um den EPO-/EPOR-Signalweg zu unterbrechen. Dies führte zu einem Absterben von Krebszellen in Ratten (Arcasoy et al. 2002). Allerdings ist AG490 nicht spezifisch für JAK-2, sondern ein viel potenterer Inhibitor von EGFR (100-fach stärker) (Gazit et al. 1991, Goldshmit et al. 2004) und zudem wirksam bei HER-2 (Gazit et al. 1991) und JAK-3 (Wang et al. 1999), so dass die beobachteten tumorinhibitorischen Reaktionen in diesem Versuch auch anderen Mechanismen als der Hemmung des EPOR-Signalweges zuzuschreiben sein könnten.
Die Tatsache, dass in Xenograft-Modellen kaum eine Studie einen negativen Effekt von EPO auf das Überleben nachweisen konnte, wird durch unsere Ergebnisse gestärkt.

4.4.5 EPO und Tumorangiogenese – Relevanz unklar

Die in unserem Versuch verstärkte Anfärbung von Endothelzellen entspricht der Erkenntnis, dass durch Bindung von EPO an den EPOR von Endothelzellen deren Proliferation und Migration gefördert werden (Anagnostou et al. 1990, Anagnostou et al. 1994). Die angiogenen Fähigkeiten von EPO könnten daher einen wesentlichen Mechanismus in der Angiogenese von Tumoren darstellen (Ribatti et al. 1999).
Demgegenüber steht die Überlegung, dass EPO-Signalwege die Integrität der BHS schützen (Martinez-Estrada et al. 2003) und diese auch vor einer durch VEGF–vermittelten Erhöhung der Permeabilität zu schützen vermag, was zur Entstehung großer peritumoraler Ödeme beiträgt. So ist eine geringe Expression von EPO und EPOR mit einem hohen Niveau von VEGF assoziiert, was zu vermehrter Angiogenese und erhöhter Malignität führen könnte.

In vitro stimulierte rhEPO die Proliferation von primären Endothelzellen (Anagnostou et al. 1990, Yamaji et al. 1996) und endothelialen Zelllinien (Ribatti et al. 1999). Hierzu ist zu bedenken, dass teils sehr hohe Dosen von rhEPO eingesetzt wurden (10 U/ml und 30 U/ml), die dann in einigen Tumorzelllinien auch eine Freisetzung von VEGF induzierten (Batra et al. 2003). So kann angenommen werden, dass die Effekte von rhEPO und VEGF auf die Endothelzellproliferation Hand in Hand gehen (Alvarez Arroyo et al. 1998).

In-vivo-Studien, die die Auswirkungen von rhEPO auf Endothelzellen in Mammakarzinom- (bei der Ratte) und Kolonkarzinommodellen (bei der Maus) untersuchten, fanden keinen Unterschied in der Angiogenese zwischen der Placebotherapiegruppe und der rhEPO-Therapiegruppe (Hardee et al. 2005). Ebenso wurde keine Veränderung der Gefäßdichte oder der Gefäßmorphologie unter rhEPO-Administration bei zwei verschiedenen Gliom-Xenograftmodellen beobachtet (Pinel et al. 2004).
Vielmehr zeigte eine Studie, dass rhEPO, in therapeutisch üblicher Dosis, Einfluss auf tumoreigene Blutgefäße nimmt und dadurch das Ansprechen auf Chemotherapie verbessert, möglicherweise durch eine Steigerung der Bioverfügbarkeit der Medikamente am Tumor (Tovari et al. 2005).

Neben der Förderung von Proliferation und Angiogenese durch EPO wurde beschrieben, dass dieses die Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) aus dem Knochenmark in das periphere Blut auslösen kann, um dann die Neoangiogenese zu unterstützen (Bahlmann et al. 2004, Heeschen et al. 2003).
Ob dieser Mechanismus in der Tumorangiogenese relevant ist, scheint unklar. Einige Studien beschreiben im Tiermodell, dass EPCs aus dem Knochenmark zu Endothelzellen heranreifen und dann an der Gefäßbildung im Tumor beteiligt sind (Asahara et al. 1999). Andere Autoren sehen keine Beteiligung aus dem Knochenmark stammender EPCs an der Tumorvaskularisation im Mausmodell (Gothert et al. 2004). Zudem fand man, dass diese beim Menschen lediglich zu <5% an dem Tumorgefäßendothel beteiligt sind. Somit wären die Auswirkungen auf die Tumorangiogenese wahrscheinlich äußerst moderat, selbst wenn rhEPO die Mobilisation von EPCs aus dem Knochenmark fördern würde (Peters et al. 2005).

Es bleibt unsicher in welchem Ausmaß EPO an der Tumorangiogenese beteiligt ist. Fest steht, dass eine Vielzahl anderer Faktoren, wie bspw. VEGF, an diesem Prozess mitwirken.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass der Stellenwert von EPO *in vivo* eher gering ist, da wie bereits erwähnt, kein Selektionsvorteil und keine erhöhte Malignität von Glioblastomen mit erhöhter EPO- oder EPOR-Expression gefunden wurde.

4.4.6 Klinischer Einfluss auf das Gesamtüberleben

Die zwei meist beachteten Studien, die für eine EPO-Administration ein verschlechtertes Überleben von Patienten, die an Hals- und Kopftumoren bzw. Brustkrebs erkrankt waren, postulierten (siehe Kapitel 1.3.3, Seite 20), waren die klinischen Versuche von Henke et al. (2003) und Leyland-Jones et al. (2005). Kritisch bleibt bei beiden Arbeiten anzumerken, dass der Ziel-Hb-Wert sehr hoch angesetzt war (bis zu 14g/dl). Die EPO-Gruppe zeigte bei Henke et al. entsprechend vermehrt Komplikationen wie arterielle Hypertonie, Blutungen und Thromboembolien, die wohl einen wesentlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben nahmen (RR für Tod 1.39, KI 1.05-1.84, p=0.02). Dies ließe sich in der klinischen Praxis durch niedrigere Ziel-Hb-Werte korrigieren.

Bei Leyland-Jones et al. ist zu berücksichtigen, dass auch hier unter EPO-Gabe vermehrt thromboembolische Ereignisse nachgewiesen werden konnten, die entsprechenden Einfluss auf das Outcome hatten. Zusätzlich war zu beobachten, dass die beiden Überlebenskurven der Placebo- bzw. EPO-Gruppe sich nach 19 Monaten follow-up anglichen, so dass kein langfristiger Nachteil durch EPO-Gabe gefunden werden konnte und die anfängliche Differenz möglicherweise durch Nebenwirkungen der EPO-Therapie entstand.

Es wird eine Reihe weiterer klinischer Studien bedürfen, um die Sicherheit von EPO in der Tumortherapie zu be- oder widerlegen.

Bezüglich unserer Fragestellung bleibt allerdings offen, inwieweit Erkenntnisse an systemischen Tumoren überhaupt auf Hirntumore übertragen werden können. Im folgenden soll daher die Situation im Hirntumor näher erläutert werden.

4.5 EPO und EPOR bei Hirntumoren

Die Diskussion, ob EPO in der Anwendung zur supportiven Krebstherapie Gefahren bergen, lässt auch den Bereich der Hirntumoren nicht aus. Wie bei systemischen Tumoren ist auch hier die Studienlage nicht eindeutig. Eine kürzlich veröffentlichte Studie an Meningeomen berichtete zuletzt, dass Tumoren mit einem niedrigen Niveau von EPOR-Expression ein höheres Risiko für Rezidive haben (Kuster et al. 2009).

4.5.1 Die kontroverse Studienlage zu EPO bei Glioblastomen

4.5.1.1 Zellkulturstudien an Glioblastomzelllinien

Für die in dieser Arbeit untersuchten höhergradigen Tumoren astrozytären Ursprungs veröffentlichten Mohyeldin et al. (2007) eine vielbeachtete Studie. Diese wies EPO- und EPOR-Expression in den humanen Gliomzelllinien U87, U251 und U373 im Western Blot sowie immunhistochemisch in primären Gliomen des WHO Grades II und IV nach. Von den insgesamt 65 Proben (22 Grad II, 43 Grad IV) waren 68% immunhistochemisch EPO-positiv und 100% EPOR-positiv. Die Expression von EPOR war in den Gliomzelllinien deutlich höher als in normalen Astrozyten und normales Hirngewebe zeigte nur eine schwache immunhistochemische Anfärbung für EPO und EPOR. Bezüglich der Größe des EPOR-Proteins fand diese Studie ein Vorherrschen eines ca. 66 kDa EPOR-Proteins in den humanen Gliomzelllinien.
Besonders hohe Expression von EPO und EPOR wurde immunhistochemisch in Regionen im Übergang zwischen Tumor und noch normalem Hirngewebe, in perivaskulären Tumorzellen, wie auch im tumoreigenen Gefäßendothel gefunden. Extrem hohe Expression wurde im Bereich der die nekrotischen Areale in Glioblastomen umgebenden Pseudopalisaden beobachtet, welcher bekanntermaßen sehr zu Hypoxien neigt (Brat et al. 2004, Zhong et al. 1999) und eine ausgeprägte Transkription Hypoxie-induzierbarer Gene aufweist (Brat und Mapstone 2003). Mohyeldin et al. berichteten entsprechend von einer hohen Expression von HIF-1α in diesen Regionen. Das Expressionsmuster des EPOR gleicht im wesentlichen den Beobachtungen dieser Arbeit.
Die Produktion von EPO und EPOR war in Glioblastomen deutlich höher als in Gliomen WHO Grad II. Zudem zeigten 2/3 der GBM immunhistochemisch eine hohe Expression von MMP-2, ein Marker für die Invasivität von Tumorzellen (Mohyeldin et al. 2007).
Dass der EPO-/EPOR-Signalweg intakt ist, wurde in U251 Gliomzellen demonstriert. Hier führte die Gabe von Epoetin alpha (200 U/ml) zu einem Anstieg von phosphoryliertem JAK-2, AKT und STAT-5. Eine Inkubation dieser Zellen bei 1% O_2 führte im Vergleich zu Zellen bei 21% O_2 zu einem deutlichen Anstieg von HIF-1α und dessen Kernbindungsaktivität, was von einer erhöhten Expression von Epo- und EpoR-mRNA begleitet war (RT-PCR-Analysen). Längere Inkubation unter Hypoxie führte dann auch zu vermehrt nachweisbarem EPOR im Western Blot, was den Autor die Existenz autokriner und parakriner EPO-Signalwege in den Tumorzellen annehmen ließ (Mohyeldin et al. 2007).
Ein weiterer Aspekt in der Veröffentlichung von Mohyeldin et al. war der EPO-vermittelte Schutz vor Cisplatin-induzierter Zytotoxizität. Die Autoren fanden, dass dieser Schutz bei

U251-Zellen schon nach kurzer Behandlungszeit (5 min) mit rhEPO dosisabhängig eintrat. In einem anderen Versuchsansatz, mit 24 Stunden Hypoxiezeit der Zellen und Gabe von 1 U/ml EPO, zeigte sich ebenfalls ein Schutz vor Cisplatin-Zytotoxizität. Allerdings bestätigte sich dieser Effekt bei alleiniger Gabe von EPO in Dosen, die kleiner als 10 U/ml waren und ohne begleitende Hypoxie nicht. Wie oben bereits erwähnt, liegt eine typische Konzentration in pharmakologischer Dosis allerdings im Bereich von nur etwa 1 U/ml (Ramakrishnan et al. 2004).

Die Autoren untersuchten auch invasives Zellwachstum durch Matrigel. RhEPO erzielte hier erst ab weit suprapharmakologischen Konzentrationen von 100 U/ml eine signifikante Steigerung der Invasion von U251, C6 und U373 Zelllinien. Die Steigerung der Invasivität war zudem durch reine Hypoxie von 1% O_2 deutlich stärker als die alleinige EPO-Gabe in hohen Dosen, so dass hier die Hypoxie als wesentlicher Faktor angenommen werden kann. Diese würde *in vivo* wiederum durch EPO verringert.

Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Gabe von anti-EPO-Antikörpern die Hypoxie-ausgelöste Steigerung der Invasivität von U251 Zellen abzumildern vermag, was eine Beteiligung von EPO an diesem Prozess postuliert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde zudem eine Induktion der Aktivität von MMP-2 durch EPO (200 U/ml) und Hypoxie gezeigt, wobei eine Blockierung der MMP-Aktivität die Invasivität von Tumorzellen abmilderte.

Die Untersuchung der MMP-mRNA-Synthese unter EPO-Gabe auf Genebene ergab kein signifikantes Ergebnis. Allerdings wurde gezeigt, dass wiederum Hypoxie die Transkription von MMP-mRNA steigern konnte, so dass auch hier die Hypoxie als wesentlicher effektauslösender Faktor angenommen werden kann, die auch andere als den EPO-/EPOR-Signalweg aktiviert.

Zudem zeigten die Autoren im Transfektionsmodell eine Verringerung von Wachstum und Invasivität bei U251 Tumorzellen, die vermehrt eine funktionslose t-EPOR–Form exprimierten.

Die Autoren vermuten einen indirekten steigernden Einfluss von Hypoxie auf die EPOR-Produktion in Glioblastomzellen, da bisher keine HIF-Bindungsstelle im EPOR-Gen gefunden wurde (Mohyeldin et al. 2007).

Eine weitere Zellkulturstudie fand Ergebnisse, die die Hypothesen von Mohyeldin et al. unterstützten (Yin et al. 2007). Yin et al. wiesen EPOR in den Glioblastomzelllinien U87, U118, U343, U373, T98G, in explantierten Glioblastomen (JM94) und in frischen Glioblastomen

mittels Western Blot nach. Durch Real-time PCR wurde das Vorkommen von EpoR-mRNA in allen untersuchten Zelllinien, explantierten Gliomen und normalem Hirngewebe, nachgewiesen. Die EpoR-mRNA Expression war dabei in Glioblastom- und normalem Hirngewebe etwa gleich hoch. Die Messung der mRNA-Expression besitzt allerdings nur bedingt Aussagekraft zur Quantifizierung von funktionell aktivem EPOR.
Die Autoren demonstrierten, dass die Zellzahl von U87 und T98G Zelllinien in serumfreiem Medium signifikant um etwa 10-20% anstieg, wenn EPO in Konzentrationen von 2 U/ml oder größeren Dosen gegeben wurde. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar, wenn serumhaltige Medien (1% und 10%) verwendet wurden, was einem Zustand, wie er *in vivo* herrscht, deutlich näher käme.
Gezeigt wurde eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT in T98G-, U87- und JM94-Gliomzellen unter EPO-Gabe (1 U/ml). Die Aktivierung von AKT konnte mit einem Pi3K-Hemmer blockiert werden. Weitere Proteine wurden durch EPO aktiviert, darunter ERK und JNK, aber auch antiapoptotische Proteine wie BCL-2 und BCL-X_l.

Eine Zellkulturstudie von Hassouna et al. (2008) untersuchte die Effekte von EPO auf die humanen Glioblastomzelllinien U87, G44, G112 und die Gliosarkomzelllinie G28.
Hier vermittelte EPO einen Schutz gegen Radiochemotherapie in drei von vier Tumorzelllinien. Dem entgegengesetzt steht die Beobachtung, dass die Gabe von EPO dosisabhängig das Überleben von G28 Gliosarkomzellen vermindern konnte.
Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation von HIF-1α-Expression und EGFR-Expression festgestellt. Eine Korrelation von EPOR und EGFR fand sich nicht.
Der Schutz vor RCT könnte daher auch durch eine Hochregulation von EGFR unter hypoxischen Bedingungen erklärbar sein. In unserer Untersuchung in der Subgruppe der radiochemotherapierten Patienten fand sich, wie bereits erwähnt, kein Anhalt für verringertes Überleben von Patienten, die eine hohe EPO- bzw. EPOR-Expression zeigten.
Weiter konnten die Autoren keine Modulation der basalen Zellmigration unter EPO feststellen und in nur einer von vier Zelllinien wurde eine Stimulation der Proliferation durch EPO ausgelöst.
Die Autoren folgern, dass eine Beeinflussung des basalen Tumorwachstums von Gliomen unwahrscheinlich ist (Hassouna et al. 2008).
Die Mehrzahl der Studien in der Vergangenheit legt nahe, dass EPO keine für den Patienten negativen Effekte auf das Verhalten von Glioblastomen hat. Berdel et al. (1991) fanden unter

Einsatz von rhEPO (0,01 – 100 U/ml) keinen Einfluss auf klonales Wachstum von U87MG und 87HG31 Glioblastomzelllinien.

4.5.1.2 Xenograft-Modelle und in-vivo-Expressionsanalysen von Glioblastomen

Ein fehlender negativer Einfluss des EPO-/EPOR-Signalweges bestätigt sich insbesondere bei der Betrachtung von entsprechenden Xenograft-Tumormodellen und Expressionsstudien.
So zeigten in den Versuchen von Hassouna et al. (2008) in Mausgehirne implantierte U87-Zellen unter der Gabe von EPO (5.000 U/kg intraperitoneal) keine vermehrte Proliferation.

Ebenso beschrieben Pinel et al. (2004) ein fehlendes Tumorwachstum und keine Zunahme der Gefäßdichte in Tumoren bei alleiniger EPO-Gabe (300 U/kg/Tag) in Nan1 und U87 Glioblastomzelllinien, die in ein Xenograft-Mausmodell implantiert worden waren. Die Verabreichung von rhEPO reduzierte die Anzahl hypoxischer Tumorzellen und erhöhte signifikant die Effektivität von Strahlentherapie.

Stuben et al. (2001) konnten im Xenograftmodell mit Glioblastomzellen keinen Effekt von EPO auf Tumorwachstum und Überleben von anämischen Mäusen nachweisen. Eine anschließende Bestrahlung verursachte eine Verzögerung des Tumorwachstums, welche unter EPO-Therapie signifikant länger ausfiel. Die Autoren schlossen daraus, dass EPO in der Lage ist, die Radiosensitivität der Tumoren durch Anämiebehandlung wiederherzustellen.
In einer ähnlichen Studie von 2003 bestätigten Stuben et al. diese Ergebnisse und fanden abermals eine stärkere Wachstumsverzögerung nach Strahlentherapie und gleichzeitiger EPO-Administration im Glioblastom-Mausmodell. Es wurde demonstriert, dass bereits eine leichte Anämie die Effektivität der Strahlentherapie signifikant herabsetzt und dass rhEPO geeignet ist, dies zu korrigieren. Dies entspricht den Ergebnissen vieler Studien an Tumoren anderer Gewebe.

Eine Expressionsstudie von Mittelbronn et al. (2007) untersuchte, wie in der hier vorgelegten Arbeit, immunhistochemisch die Expression von EPOR (bei 79 Glioblastomen). Äquivalent zu Mohyeldin et al. (2007) fand sich auch hier in neoplastischen Gliazellen eine deutlich höhere EPOR-Expression als in Gliazellen aus normalem Hirngewebe. Abweichend wiesen die Autoren keine Unterschiede der EPOR-Expression in Infiltrationszonen und dem Tumorzentrum nach. Bei der Untersuchung von 31 Glioblastomrezidiven zeigte sich im Vergleich zum Primärtumor kein signifikanter Unterschied zur EPOR-Expression des korrespondierenden Primärtumors. Hier lieferte unsere Studie, mit eher absinkender Expression von EPOR im

Rezidivtumor, andere Ergebnisse. Dabei muss zugestanden werden, dass unsere Fallzahl kleiner und das Ergebnis gerade eben signifikant war.
Mittelbronn et al. bestätigten auch die verstärkte Expression von EPOR in perinekrotischen Tumorzellen. Darüber hinaus fanden die Autoren eine EPOR-Hochregulation in großen, multinukleären Tumorzellen, wie auch in mitotischen Zellen. Dies entspricht in hohem Maße den Beobachtungen der hier vorgelegten Arbeit.
Beschrieben wurde außerdem eine sehr niedrige Expression von EPOR in der weißen Substanz im Gegenzug zu hoher Expression in kortikalen Neuronen, so dass die graue Substanz insgesamt eine deutlich höhere EPOR-Expression als die weiße Substanz zeigte.
Weiter berichteten Mittelbronn et al., dass keine Korrelation von Alter oder Geschlecht mit der EPOR-Expression bestand. Auch diese Ergebnisse werden durch unsere Studie bestätigt.
Die zentrale Aussage der Experimente von Mittelbronn besteht aber in der Feststellung, dass eine hohe EPOR-Expression in Glioblastomen mit einem verlängerten Überleben, insbesondere bei jüngeren Patienten, einhergeht (Mittelbronn et al. 2007). Auch unsere Daten zeigen einen besonders gewichtigen positiven Einfluss der EPOR-Expression bei jüngeren Patienten (≤ 63 Jahre, mediane Teilung des Kollektivs).

Zusammenfassend sind die bisherigen Ergebnisse der *in-vitro*-Studien zum Effekt von EPO in der Tumortherapie diskrepant. Es werden sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Effekte von EPO in Glioblastomzelllinien beschrieben. Problematisch ist, dass Zellkulturstudien die Bedingungen *in vivo* nicht widerspiegeln können und dass häufig zu hohe Dosen von EPO verabreicht wurden.
Bemerkenswert ist, dass bisher in keiner einzigen *in-vivo*-Xenograft-Studie bei Glioblastomen ein verschlechtertes Outcome unter EPO-Gabe, selbst bei weit suprapharmakologischen Dosen, beobachtet wurde, auch bei gleichzeitiger Durchführung von Radiochemotherapie.
Die einzigen *in-vivo*-Daten, die über den Einfluss von EPO- und EPOR-Expression auf das Überleben von Patienten bisher erhoben wurden, stammen zum einen aus der Studie durch Mittelbronn et al., zum anderen aus dieser Arbeit. Bemerkenswert ist, dass sich die Ergebnisse dieser beiden unabhängigen Studien in fast allen Aspekten in hohem Maße gleichen. Daher messen wir unseren Daten, trotz der retrospektiven Analyse, einige Aussagekraft bei.

Aber auch die Zusammenschau der Ergebnisse unter Einschluss von *in-vitro*-Studien lässt eine Zunahme von Proliferation in Glioblastomen durch EPO unwahrscheinlich erscheinen.

Allerdings muss die Frage, ob gleichzeitige Anwendung von EPO und RCT die Wirkung dieser unter bestimmten Bedingungen abschwächen kann, weiter untersucht werden.

Leider wurden bislang keinerlei systematische klinische Studien zur Wirkung von EPO bei malignen Gliomen durchgeführt. Rückschlüsse aus anderen Tumorarten können kaum gezogen werden, da die Biologie maligner Gliome nicht ohne weiteres mit der systemischer Tumoren verglichen werden kann.

4.5.2 EPO und Entzündungshemmung – im GBM ohne Relevanz?

Ergänzend soll hier der mögliche Einfluss einer immunsuppressiven Wirkung von EPO auf Hirntumore diskutiert werden.

So vermochte EPO in früheren Studien die Aktivierung, Proliferation und Phagozytoseaktivität von Mikroglia zu vermindern (Chong et al. 2003a, Chong et al. 2004). Zudem konnte EPO die proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF-α und IFN-γ hemmen (Genc et al. 2006, Maiese et al. 2004, Maiese et al. 2005). Andere Autoren zeigten eine Reduktion der durch Leukozyten ausgelösten Entzündungsreaktion unter EPO-Gabe (Contaldo et al. 2007).

Da aber immunologische Reaktionen durchaus an der Bekämpfung von Tumoren beteiligt sind, muss überlegt werden, ob EPO die Immunreaktion gegen Glioblastomzellen abschwächt und dadurch einen negativen Einfluss auf das Überleben von Glioblastompatienten haben könnte, wofür sich in unserer Studie allerdings kein Anhalt ergab.

Grundsätzlich gilt, dass Immunreaktionen innerhalb des ZNS anders als in peripheren Regionen ausgeprägt sind. Es besteht eine starke Expression immunsuppressiver Zytokine, die Immunreaktionen verzögern oder abschwächen können (Nguyen et al. 2002). Dennoch konnte gezeigt werden, dass im ZNS durchaus gegen den Tumor gerichtete Immunaktivität stattfindet. So sind aktivierte T-Zellen in der Lage, die BHS zu überwinden (Hickey et al. 1991), intrakranielle Tumoren zu infiltrieren und dort den Tumor zu attackieren (Hazelrigg et al. 2002, Merchant et al. 1997, Plautz et al. 1997). Darüber hinaus wurden Interaktionen von T-Zellen und Makrophagen innerhalb und in der Umgebung von ZNS-Tumoren nachgewiesen, welche für eine Auslösung von T-Zelleffekten nötig sind (Mukai et al. 1999).

Wesentliche Mechanismen, die eine gezielte und potente Immunantwort gegen Tumorzellen hervorrufen sollen, benötigen eine adäquate Reaktion der angeborenen Immunabwehr. Diese umfasst unter anderem die Sekretion von IFN-γ durch NK-Zellen und TNF-α durch Makrophagen (Diefenbach et al. 2000). Dennoch bleibt die Relevanz einer möglichen Unterdrückung dieser Mechanismen durch EPO unklar, da es eine Reihe von Möglichkeiten gibt, wie sich Gliomzellen ohnehin vor Immunreaktionen schützen. So sind im ZNS die anatomischen

Rahmenbedingungen grundsätzlich anders als in der Peripherie, wie z. B. die Existenz der BHS oder das Fehlen eines klassischen Lymphabflusses. Zudem herrschen höhere Konzentrationen immunregulierender Faktoren, wie TGF-β, PGE2, IL-10, etc. sowie eine geringere MHC-Expression auf den parenchymatösen Zellen, als in anderen Körperregionen (Prins und Liau 2003, Walker et al. 2003).

Aber auch die Gliomzellen selbst sezernieren oft immunsuppressive Zytokine wie TGF-β oder IL-10 und hemmen damit die anti-tumoröse Aktivität von T-Zellen (Seo et al. 2001, Weller und Fontana 1995). Auch entgehen Tumorzellen der Erkennung durch T- und NK-Zellen durch Herunterregulierung von MHC Klasse-I-Molekülen (Prins und Liau 2004). Darüber hinaus sind neoplastische Zellen teilweise in der Lage, durch bestimmte Botenstoffe die Reifung und Funktion von APC zu hemmen (Gabrilovich et al. 1996, Munn et al. 2002, Prins et al. 2002), die ihrerseits für die Aktivierung von T-Zellen notwendig sind. Es wurde außerdem gezeigt, dass T-Zellen in Tiermodellen bzw. Tumorpatienten oftmals Defekte von Signalmolekülen aufweisen, die für ihre Aktivierung und Funktion notwendig sind (Bukowski et al. 1998, Correa et al. 1997, Dix et al. 1999, Mizoguchi et al. 1992, Morford et al. 1997, Prins et al. 2001). Auch zeigt sich hier ein größerer Anteil von T-Zellen, die in Apoptose gehen (Hoffmann et al. 2002, Saito et al. 2000). So muss festgestellt werden, dass eine Aktivität gegen ZNS-Tumoren von T-Zellen, trotz Infiltration, nicht gesichert ist. Studien konnten zeigen, dass tumorspezifische T-Zellen oftmals frühzeitig inaktiviert werden (Ochsenbein et al. 1999, Staveley-O'Carroll et al. 1998) oder Defekte in den für die Lyse von Tumorzellen notwendigen Molekülen tragen, so dass sie bei Tumorzellkontakt keine Effekte bewirken können (Radoja et al. 2001, Radoja und Frey 2000). Zusätzlich wurde vermutet, dass oftmals zu geringe Überlebenssignale für Lymphozyten in Tumoren vorherrschen, so dass diese ihr zytolytisches Potenzial gegenüber den malignen Zellen nicht zur Wirkung bringen (Prins et al. 2004).

Die Frage, ob EPO durch Hemmung von Entzündungsreaktionen das Überleben von Tumorzellen in Glioblastomen begünstigt, erscheint daher nachrangig, da diese ohnehin stark supprimierte inflammatorische Reaktionen aufweisen und das Immunsystem auf verschiedenste Weise daran hindern, die Tumorzellen zu attackieren (Prins und Liau 2004).

5 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass höhere EPOR-Konzentrationen in GBM mit längerem Überleben einhergehen, unterstützt die Ergebnisse der ähnlichen Studie von Mittelbronn et al. (2007), die einen zunehmenden Verlust von EPOR bei steigendem WHO-Grad der Tumoren nachwies und auch in der Gruppe der Glioblastome einen positiven Effekt von EPOR fand. Insbesondere scheinen jüngere Patienten von den positiven Effekten des EPO-/EPOR-Signalweges zu profitieren. Anlehnend an Mittelbronn et al. kann angenommen werden, dass malignere Formen von Hirntumoren eher die Tendenz haben, den EPOR zu verlieren.

Ob diese Beobachtungen auf die Gabe von exogenem EPO in der GBM-Therapie übertragen werden können, muss in prospektiven klinischen Studien genauer evaluiert werden.

Unsere Studie ergibt keinen Anhalt für einen negativen Einfluss des EPO-/EPOR-Signalweges auf das Überleben von GBM-Patienten. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich um eine retrospektive Expressionsanalyse handelte und der Einfluss von exogenem EPO nicht untersucht wurde.

Ein systematischer Einsatz von EPO-Analoga bei Glioblastompatienten, zum Beispiel zur Neuroprotektion unter Therapie, sollte deshalb nur im Rahmen prospektiver randomisierter Studien erfolgen.

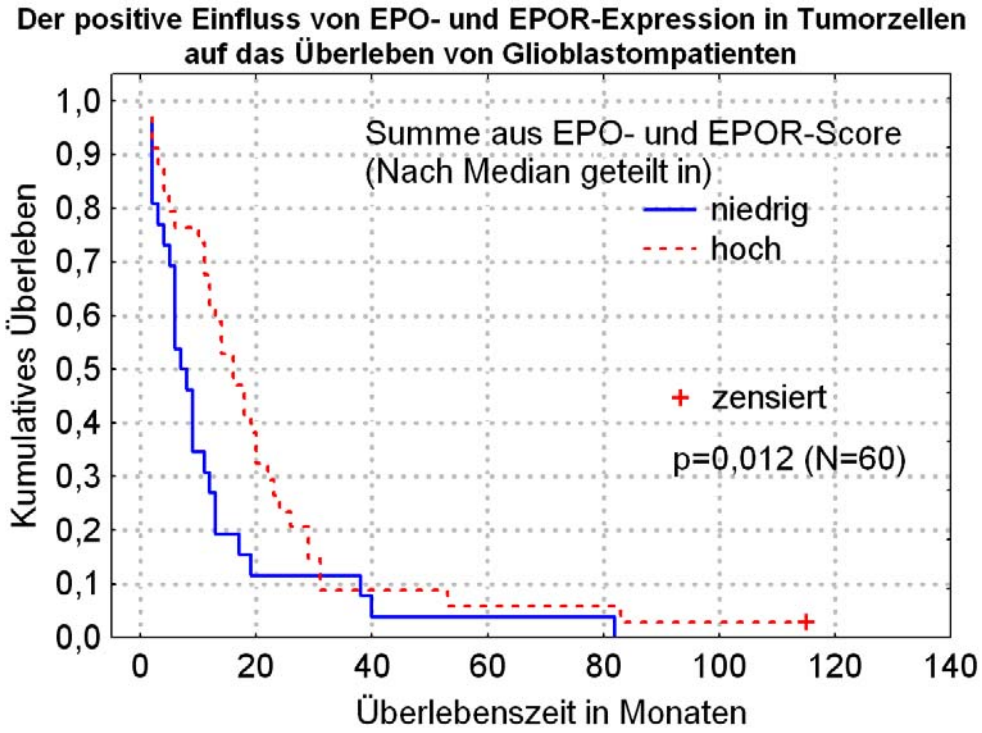

Abbildung 48 Effekt endogener EPO- und EPOR-Expression auf das Überleben

6 Literaturverzeichnis

Abels RI (1992): Use of recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia in patients who have cancer. Semin Oncol 19, 29-35

Abraham CS, Harada N, Deli MA, Niwa M (2002): Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Cell Mol Neurobiol 22, 455-462

Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A (2001): Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. Cancer Res 61, 3561-3565

Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A (2002): Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. Cancer 95, 969-981

Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A (2003): Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. Am J Pathol 162, 1789-1806

Agarwal N, Gordeuk VR, Prchal JT (2007): Are erythropoietin receptors expressed in tumors? Facts and fiction--more careful studies are needed. J Clin Oncol 25, 1813-1814

Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C (1998): Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. J Am Soc Nephrol 9, 1998-2004

Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M (1990): Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 5978-5982

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994): Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 3974-3978

Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA, Haroon ZA (2002): Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. Lab Invest 82, 911-918

Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA (2003): Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. Biochem Biophys Res Commun 307, 999-1007

Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S (2006): Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. Spine 31, 2432-2438

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res 85, 221-228

Asaumi Y, Kagaya Y, Takeda M, Yamaguchi N, Tada H, Ito K, Ohta J, Shiroto T, Shirato K, Minegishi N et al. (2007): Protective role of endogenous erythropoietin system in nonhematopoietic cells against pressure overload-induced left ventricular dysfunction in mice. Circulation 115, 2022-2032

Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D (2004): Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. Blood 103, 921-926

Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC (2004): Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. Eur J Pharmacol 505, 93-101

Barbone FP, Johnson DL, Farrell FX, Collins A, Middleton SA, McMahon FJ, Tullai J, Jolliffe LK (1999): New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. Nephrol Dial Transplant 14, 80-84

Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P (2003): Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. Lab Invest 83, 1477-1487

Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Cournoyer D, Belzile JP, Souhami L, Devic S, Chow TY (2004): Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. Mol Cancer Ther 3, 1525-1532

Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT (2004): Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. Blood 104, 2073-2080

Berdel WE, Oberberg D, Reufi B, Thiel E (1991): Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro. Ann Hematol 63, 5-8

Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Oberberg D, Zafferani M (1992): Effects of hematopoietic growth factors on malignant nonhematopoietic cells. Semin Oncol 19, 41-45

Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999): A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 19, 643-651

Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET, Petit E (2000): Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. Glia 30, 271-278

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F et al. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 48, 198-206

Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Snyder SA, Broadwater G, Farrell F, Jolliffe L, Brizel DM, Dewhirst MW (2003): Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effects on hemoglobin. Cancer Res 63, 6162-6165

Bohlius J, Langensiepen S, Schwarzer G, Seidenfeld J, Piper M, Bennett C, Engert A (2005): Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive meta-analysis. J Natl Cancer Inst 97, 489-498

Bohlius J, Weingart O, Trelle S, Engert A (2006a): Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin--an updated overview. Nat Clin Pract Oncol 3, 152-164

Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B et al. (2006b): Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. J Natl Cancer Inst 98, 708-714

Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Bertorelle R, Gioia V, Franceschi E, Biscuola M, Blatt V, Crino L, Ermani M (2006): Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO). Br J Cancer 95, 1155-1160

Brat DJ und Mapstone TB (2003): Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. Ann Intern Med 138, 659-668

Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG (2004): Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. Cancer Res 64, 920-927

Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW (1997): Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. Int J Radiat Oncol Biol Phys 38, 285-289

Broudy VC, Lin N, Egrie J, de Haen C, Weiss T, Papayannopoulou T, Adamson JW (1988): Identification of the receptor for erythropoietin on human and murine erythroleukemia cells and modulation by phorbol ester and dimethyl sulfoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 6513-6517

Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T (1991): Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. Blood 77, 2583-2590

Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR (2007): Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. Stem Cells 25, 718-722

Bukowski RM, Rayman P, Uzzo R, Bloom T, Sandstrom K, Peereboom D, Olencki T, Budd GT, McLain D, Elson P et al. (1998): Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. Clin Cancer Res 4, 2337-2347

Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM (2005): Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. Basic Res Cardiol 100, 397-403

Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003): Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. Circulation 108, 79-85

Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G (2001): Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. Cancer 91, 2214-2221

Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Metivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G (2005): Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. Oncogene 24, 737-745

CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) (2008): Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000-2004. Hindsdale, IL; http://www.cbtrus.org

CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) (2009): Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2004-2005. Hindsdale, IL; http://www.cbtrus.org

Ceelen W, Boterberg T, Smeets P, Van Damme N, Demetter P, Zwaenepoel O, Cesteleyn L, Houtmeyers P, Peeters M, Pattyn P (2007): Recombinant human erythropoietin alpha modulates the effects of radiotherapy on colorectal cancer microvessels. Br J Cancer 96, 692-700

Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A et al. (2002): Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2258-2263

Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P (2006): The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. J Neurosci 26, 9471-9481

Cherian L, Goodman JC, Robertson C (2007): Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. J Pharmacol Exp Ther 322, 789-794

Chin K, Oda N, Shen K, Noguchi CT (1995): Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. Nucleic Acids Res 23, 3041-3049

Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT (2000): Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. Brain Res Mol Brain Res 81, 29-42

Chong ZZ und Maiese K (2007): Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. Br J Pharmacol 150, 839-850

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2002a): Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. J Cereb Blood Flow Metab 22, 503-514

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2002b): Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. Circulation 106, 2973-2979

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2003a): Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. Br J Pharmacol 138, 1107-1118

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2003b): Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. J Cereb Blood Flow Metab 23, 320-330

Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K (2003c): Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. J Neurosci Res 71, 659-669

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K (2004): AKT1 drives endothelial cell membrane asymmetry and microglial activation through Bcl-xL and caspase 1, 3, and 9. Exp Cell Res 296, 196-207

Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005a): Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. Prog Neurobiol 75, 207-246

Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005b): Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. Curr Neurovasc Res 2, 387-399

Ciocca DR und Calderwood SK (2005): Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones 10, 86-103

Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA (2007): Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293, H274-H283

Correa MR, Ochoa AC, Ghosh P, Mizoguchi H, Harvey L, Longo DL (1997): Sequential development of structural and functional alterations in T cells from tumor-bearing mice. J Immunol 158, 5292-5296

Curt GA, Breitbart W, Cella D, Groopman JE, Horning SJ, Itri LM, Johnson DH, Miaskowski C, Scherr SL, Portenoy RK et al. (2000): Impact of cancer-related fatigue on the lives of patients: new findings from the Fatigue Coalition. Oncologist 5, 353-360

Dagnon K, Pacary E, Commo F, Antoine M, Bernaudin M, Bernaudin JF, Callard P (2005): Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. Clin Cancer Res 11, 993-999

Davis FG, McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML (1999): The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. Cancer 85, 485-491

DeAngelis LM (2001): Brain tumors. N Engl J Med 344, 114-123

DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG (1998): Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? Ann Neurol 44, 691-695

De la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E (1993): Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4495-4499

Della RF, Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Perrotta S (2007): Erythropoietin receptors on cancer cells: a still open question. J Clin Oncol 25, 1812-1813

Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH (2000): Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. Nat Immunol 1, 119-126

Diener HC und Putzki N: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008

Digicaylioglu M und Lipton SA (2001): Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. Nature 412, 641-647

Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M (1995): Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 3717-3720

Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999): Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. J Neuroimmunol 100, 216-232

Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E (1985): The role of carbohydrate in erythropoietin action. Endocrinology 116, 2293-2299

Dunlop EA, Percy MJ, Boland MP, Maxwell AP, Lappin TR (2006): Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. Neurodegener Dis 3, 94-100

Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S et al. (2004): Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. Mol Psychiatry 9, 42-54

Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG (2006): Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. Blood 107, 1892-1895

Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbiniere A, Knisely JP, Erbayraktar Z, Yilmaz O, Cerami A, Coleman TR, Brines M (2006): Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. Mol Med 12, 74-80

European Medicines Agency: Product Information Epoetin alfa Hexal, http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/epoetinalfahexal/emea-combined-h726de.pdf

Fandrey J (2008): Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean? Oncologist 13 Suppl 3, 16-20

Farrell F und Lee A (2004): The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. Oncologist 9, 18-30

Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ (2006): Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. Prostate 66, 135-145

Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP (1993): Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. Cancer 71, 2585-2597

Frommhold H, Guttenberger R, Henke M (1998): The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience. Strahlenther Onkol 174, 31-34

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP (1996): Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med 2, 1096-1103

Gazit A, Osherov N, Posner I, Yaish P, Poradosu E, Gilon C, Levitzki A (1991): Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases. J Med Chem 34, 1896-1907

Genc K, Genc S, Baskin H, Semin I (2006): Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. Physiol Res 55, 33-38

Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloglu M, Gure A (2001): Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. Neurosci Lett 298, 139-141

Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C, Malaise EP, Haie C, Gerbaulet A, Chassagne D (1989): Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: results of a retrospective study of 386 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 16, 37-42

Glaser CM, Millesi W, Kornek GV, Lang S, Schull B, Watzinger F, Selzer E, Lavey RS (2001): Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 50, 705-715

Glaspy J und Dunst J (2004): Can erythropoietin therapy improve survival? Oncology 67, 5-11

Golab J, Zagozdzon R, Stoklosa T, Jakobisiak M, Pojda Z, Machaj E (1998): Erythropoietin prevents the development of interleukin-12-induced anemia and thrombocytopenia but does not decrease its antitumor activity in mice. Blood 91, 4387-4388

Golab J, Olszewska D, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, Jakobisiak M (2002): Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. Clin Cancer Res 8, 1265-1270

Goldshmit Y, Walters CE, Scott HJ, Greenhalgh CJ, Turnley AM (2004): SOCS2 induces neurite outgrowth by regulation of epidermal growth factor receptor activation. J Biol Chem 279, 16349-16355

Goonewardene TI, Sowter HM, Harris AL (2002): Hypoxia-induced pathways in breast cancer. Microsc Res Tech 59, 41-48

Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Okhotin D, Voloshin Y, Choyke PL, Butman JA, Jedlickova K, Prchal JT, Polyakova LA (2004): Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. Blood 103, 3924-3932

Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M (2002): Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 9450-9455

Gothert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Gottgens B, Izon DJ, Begley CG (2004): Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. Blood 104, 1769-1777

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature 379, 88-91

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE (2002): HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. Nat Med 8, 718-724

Grogan M, Thomas GM, Melamed I, Wong FL, Pearcey RG, Joseph PK, Portelance L, Crook J, Jones KD (1999): The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. Cancer 86, 1528-1536

Groopman JE und Itri LM (1999): Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. J Natl Cancer Inst 91, 1616-1634

Grossi A, Vannucchi AM, Bacci P, Caporale R, Cappelli G, Visconti G, Pagliai G, Ferrini PR (1998): Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. Leuk Res 22, 145-151

Hammerling U, Kroon R, Wilhelmsen T, Sjodin L (1996): In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. J Pharm Biomed Anal 14, 1455-1469

Hardee ME, Kirkpatrick JP, Shan S, Snyder SA, Vujaskovic Z, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Blackwell KL (2005): Human recombinant erythropoietin (rEpo) has no effect on tumour growth or angiogenesis. Br J Cancer 93, 1350-1355

Hardee ME, Rabbani ZN, Arcasoy MO, Kirkpatrick JP, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Blackwell KL (2006): Erythropoietin inhibits apoptosis in breast cancer cells via an Akt-dependent pathway without modulating in vivo chemosensitivity. Mol Cancer Ther 5, 356-361

Hardee ME, Cao Y, Fu P, Jiang X, Zhao Y, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Arcasoy MO (2007): Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. PLoS One 2, e549

Hasenclever D und Diehl V (1998): A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med 339, 1506-1514

Hassouna I, Sperling S, Kim E, Schulz-Schaeffer W, Rave-Frank M, Hasselblatt M, Jelkmann W, Giese A, Ehrenreich H (2008): Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide. Int J Radiat Oncol Biol Phys 72, 927-934

Hazelrigg MR, Hirsch JI, Merchant RE (2002): Distribution of adoptively transferred, tumor-sensitized lymphocytes in the glioma-bearing rat. J Neurooncol 60, 143-150

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood 102, 1340-1346

Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C et al. (2003): Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 362, 1255-1260

Henke M, Verma A, Acs G (2006): Erythropoietin receptors on cancer cells: exciting perspectives, difficult to appreciate. Blood 108, 1107-1108

Hermine O, Dubart A, Porteux F, Mayeux P, Titeux M, Dumenil D, Vainchenker W (1996): Inhibition of the erythropoietin-induced erythroid differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the human UT-7 cell line is not due to a negative regulation of the erythropoietin receptor. Blood 87, 1746-1753

Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, Steinbach JP, Hundsberger T, Wick W, Meyermann R et al. (2006): Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. J Clin Oncol 24, 4412-4417

Hess KR (1999): Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. J Neurooncol 42, 227-231

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991): T-lymphocyte entry into the central nervous system. J Neurosci Res 28, 254-260

Hilton DJ, Watowich SS, Murray PJ, Lodish HF (1995): Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 190-194

Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P (1996): Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. Cancer Res 56, 4509-4515

Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P (1998): Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. Int J Cancer 79, 365-369

Höckel M, Schlenger K, Höckel S: Association between tumor hypoxia and malignant progression: The clinical evidence in cancer of the uterine cervix. In: Tumor Hypoxia: Pathophysiology, Clinical Significance and Therapeutic Perspectives; Vaupel P und Kelleher DK, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1999, 65-74

Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL (2002): Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. Clin Cancer Res 8, 2553-2562

Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF (2001): The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. Mol Cell 8, 1327-1338

Jelkmann W und Wagner K (2004): Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. Ann Hematol 83, 673-686

Jelkmann W und Laugsch M (2007): Problems in identifying functional erythropoietin receptors in cancer tissue. J Clin Oncol 25, 1627-1628

Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuot C (2005): Erythropoietin and myocardial protection: what's new? Fundam Clin Pharmacol 19, 439-446

Joyeux-Faure M, Ramond A, Beguin PC, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Ribuot C (2006): Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. Fundam Clin Pharmacol 20, 51-56

Kappelle AC, Postma TJ, Taphoorn MJ, Groeneveld GJ, van den Bent MJ, van Groeningen CJ, Zonnenberg BA, Sneeuw KC, Heimans JJ (2001): PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma multiforme. Neurology 56, 118-120

Kelleher DK, Mattheinsen U, Thews O, Vaupel P (1996): Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. Cancer Res 56, 4728-4734

Keogh CL, Yu SP, Wei L (2007): The effect of recombinant human erythropoietin on neurovasculature repair after focal ischemic stroke in neonatal rats. J Pharmacol Exp Ther 322, 521-528

Khan FA, Shukla AN, Joshi SC (2008): Anaemia and cancer treatment: a conceptual change. Singapore Med J 49, 759-764

Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM (2005): Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. FASEB J 19, 2026-2028

King VR, Averill SA, Hewazy D, Priestley JV, Torup L, Michael-Titus AT (2007): Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. Eur J Neurosci 26, 90-100

Kirkpatrick JP, Hardee ME, Snyder SA, Peltz CM, Zhao Y, Brizel DM, Dewhirst MW, Blackwell KL (2006): The effect of darbepoetin alfa on growth, oxygenation and radioresponsiveness of a breast adenocarcinoma. Radiat Res 165, 192-201

Kishore BK, Isaac J, Westenfelder C (2007): Administration of poly-D-glutamic acid induces proliferation of erythropoietin-producing peritubular cells in rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol 292, F749-F761

Kjellen E, Sasaki Y, Kjellstrom J, Zackrisson B, Wennerberg J (2006): Recombinant erythropoietin beta enhances growth of xenografted human squamous cell carcinoma of the head and neck after surgical trauma. Acta Otolaryngol 126, 545-547

Klingmuller U, Wu H, Hsiao JG, Toker A, Duckworth BC, Cantley LC, Lodish HF (1997): Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 3016-3021

Knight K, Wade S, Balducci L (2004): Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. Am J Med 116, 11S-26S

Kokhaei P, Abdalla AO, Hansson L, Mikaelsson E, Kubbies M, Haselbeck A, Jernberg-Wiklund H, Mellstedt H, Osterborg A (2007): Expression of erythropoietin receptor and in vitro functional effects of epoetins in B-cell malignancies. Clin Cancer Res 13, 3536-3544

Krantz SB (1991): Erythropoietin. Blood 77, 419-434

Kumar SM, Acs G, Fang D, Herlyn M, Elder DE, Xu X (2005): Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. Am J Pathol 166, 823-830

Kuster O, Simon P, Mittelbronn M, Tabatabai G, Hermann C, Strik H, Dietz K, Roser F, Meyermann R, Schittenhelm J (2009): Erythropoietin receptor is expressed in meningiomas and lower levels are associated with tumour recurrence. Neuropathol Appl Neurobiol 35, 555-565

Lacombe C und Mayeux P (1998): Biology of erythropoietin. Haematologica 83, 724-732

Lacombe C und Mayeux P (1999): The molecular biology of erythropoietin. Nephrol Dial Transplant 14, 22-28

Lacroix M, Abi-said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E et al. (2001): A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg 95, 190-198

Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR (2005): Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene 24, 4442-4449

Lamontagne KR, Butler J, Marshall DJ, Tullai J, Gechtman Z, Hall C, Meshaw A, Farrell FX (2006): Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. Mol Cancer Ther 5, 347-355

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. Radiother Oncol 64, 259-273

Lavey RS und Dempsey WH (1993): Erythropoietin increases hemoglobin in cancer patients during radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 27, 1147-1152

Legler JM, RIES LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS (1999): Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. J Natl Cancer Inst 91, 1382-1390

Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A (2006): A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. Cell 125, 987-1001

Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB (1990): Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. Int J Radiat Oncol Biol Phys 18, 321-324

Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, Ehrenreich H (2000): Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. Neuroreport 11, 3485-3488

Leyland-Jones B (2002): Evidence for erythropoietin as a molecular targeting agent. Semin Oncol 29, 145-154

Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J et al. (2005): Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. J Clin Oncol 23, 5960-5972

Li F, Chong ZZ, Maiese K (2006): Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and nuclear factor-kappaB. Curr Neurovasc Res 3, 187-201

Li K, Menon MP, Karur VG, Hegde S, Wojchowski DM (2003): Attenuated signaling by a phosphotyrosine-null Epo receptor form in primary erythroid progenitor cells. Blood 102, 3147-3153

Li W, Maeda Y, Yuan RR, Elkabes S, Cook S, Dowling P (2004): Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. Ann Neurol 56, 767-777

Li Y, Lu Z, Keogh CL, Yu SP, Wei L (2007a): Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 27, 1043-1054

Li Y, Wang Z, Kong D, Murthy S, Dou QP, Sheng S, Reddy GP, Sarkar FH (2007b): Regulation of FOXO3a/beta-catenin/GSK-3beta signaling by 3,3'-diindolylmethane contributes to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in prostate cancer cells. J Biol Chem 282, 21542-21550

Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2004): Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol 44, 473-479

Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B (2001): Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Oncol 19, 2865-2874

Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S (2004): Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. Oncogene 23, 981-990

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

Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, Birgegard G, Bokemeyer C, Gascon P, Kosmidis P, Krzakowski M, Nortier J, Olmi P et al. (2004): The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. Eur J Cancer 40, 2293-2306

Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Sakellariou E, Beris AE (2007): The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. Clin Neurol Neurosurg 109, 639-644

MacRedmond R, Singhera GK, Dorscheid DR (2009): Erythropoietin inhibits respiratory epithelial cell apoptosis in a model of acute lung injury. Eur Respir J 33, 1403-1414

Maiese K, Li F, Chong ZZ (2004): Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 25, 577-583

Maiese K, Li F, Chong ZZ (2005): New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA 293, 90-95

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC (2007): "Sly as a FOXO": new paths with Forkhead signaling in the brain. Curr Neurovasc Res 4, 295-302

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC (2008): Raves and risks for erythropoietin. Cytokine Growth Factor Rev 19, 145-155

Malhotra S, Savitz SI, Ocava L, Rosenbaum DM (2006): Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. J Neurosci Res 83, 19-27

Marras LC, Geerts WH, Perry JR (2000): The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. Cancer 89, 640-646

Marti HH (2004): Erythropoietin and the hypoxic brain. J Exp Biol 207, 3233-3242

Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996): Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosci 8, 666-676

Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C (1997): Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. Kidney Int 51, 416-418

Martinez-Estrada OM, Rodriguez-Millan E, Gonzalez-De VE, Reina M, Vilaro S, Fabre M (2003): Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. Eur J Neurosci 18, 2538-2544

Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Tabira T, Sasaki R (1993): Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. J Biol Chem 268, 11208-11216

Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994): A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. J Biol Chem 269, 19488-19493

McLeod M, Hong M, Mukhida K, Sadi D, Ulalia R, Mendez I (2006): Erythropoietin and GDNF enhance ventral mesencephalic fiber outgrowth and capillary proliferation following neural transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci 24, 361-370

Merchant RE, Baldwin NG, Rice CD, Bear HD (1997): Adoptive immunotherapy of malignant glioma using tumor-sensitized T lymphocytes. Neurol Res 19, 145-152

Meyer L, Deau B, Forejtnikova H, Dumenil D, Margottin-Goguet F, Lacombe C, Mayeux P, Verdier F (2007): beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. Blood 109, 5215-5222

Michel L, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VV, Benezra R (2004): Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 4459-4464

Migliaccio AR, Migliaccio G, D'Andrea A, Baiocchi M, Crotta S, Nicolis S, Ottolenghi S, Adamson JW (1991): Response to erythropoietin in erythroid subclones of the factor-dependent cell line 32D is determined by translocation of the erythropoietin receptor to the cell surface. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 11086-11090

Mikati MA, El Hokayem JA, El Sabban ME (2007): Effects of a single dose of erythropoietin on subsequent seizure susceptibility in rats exposed to acute hypoxia at P10. Epilepsia 48, 175-181

Mittelbronn M, Capper D, Bunz B, Dietz K, Goeppert B, Ajaaj R, Tabatabai G, Stubenvoll F, Schlaszus H, Merseburger AS et al. (2007): De novo erythropoietin receptor (EPO-R) expression in human neoplastic glial cells decreases with grade of malignancy but is favourably associated with patient survival. Neuropathol Appl Neurobiol 33, 299-307

Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN (1991): Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. Mol Cell Biol 11, 4895-4902

Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC (1992): Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. Science 258, 1795-1798

Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, Lai SY, Cohen N, Acs G, Verma A (2005): Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. Neoplasia 7, 537-543

Mohyeldin A, Dalgard CL, Lu H, Mcfate T, Tait AS, Patel VC, Wong K, Rushing E, Roy S, Acs G et al. (2007): Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin. J Neurosurg 106, 338-350

Molls M, Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Dunst J (1998): Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. Strahlenther Onkol 174, 13-16

Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott SJ, Lakatta EG, Talan MI (2006): Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. J Pharmacol Exp Ther 316, 999-1005

Morford LA, Elliott LH, Carlson SL, Brooks WH, Roszman TL (1997): T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. J Immunol 159, 4415-4425

Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R (1997): Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience 76, 105-116

Moullet I, Salles G, Ketterer N, Dumontet C, Bouafia F, Neidhart-Berard EM, Thieblemont C, Felman P, Coiffier B (1998): Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients. Ann Oncol 9, 1109-1115

Mui AL, Wakao H, Kinoshita T, Kitamura T, Miyajima A (1996): Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. EMBO J 15, 2425-2433

Mukai S, Kagamu H, Shu S, Plautz GE (1999): Critical role of CD11a (LFA-1) in therapeutic efficacy of systemically transferred antitumor effector T cells. Cell Immunol 192, 122-132

Mulcahy L (2001): The erythropoietin receptor. Semin Oncol 28, 19-23

Mundt D, Berger MR, Bode G (1992): Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titertec-tetrazolium assay. Arzneimittelforschung 42, 92-95

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R et al. (2002): Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science 297, 1867-1870

Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales A, Ryvlin P, Bezin L (2007): Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. Neurobiol Dis 25, 412-426

Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU (2001): Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. J Neuropathol Exp Neurol 60, 386-392

Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H (1992): A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. Science 257, 1138-1141

Nakamura Y, Takano H, Osawa M, Tomita T, Kim DK, Kojima M, Motohashi T, Miyoshi S, Hiroyama T, Tokumoto Y et al. (1998): Impaired erythropoiesis in transgenic mice overexpressing a truncated erythropoietin receptor. Exp Hematol 26, 1105-1110

Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD (1991): Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med 325, 1330-1336

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002): Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? Nat Rev Neurosci 3, 216-227

Nimbalkar D, Henry MK, Quelle FW (2003): Cytokine activation of phosphoinositide 3-kinase sensitizes hematopoietic cells to cisplatin-induced death. Cancer Res 63, 1034-1039

Ning S, Hartley C, Molineux G, Knox SJ (2005): Darbepoietin alfa potentiates the efficacy of radiation therapy in mice with corrected or uncorrected anemia. Cancer Res 65, 284-290

Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y (2007): Role of erythropoietin in the brain. Crit Rev Oncol Hematol 64, 159-171

Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J (1996): Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Radiother Oncol 41, 31-39

Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM (1999): Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2233-2238

Ohgaki H und Kleihues P (2005): Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol 109, 93-108

Ohigashi T, Yoshioka K, Fisher JW (1996): Autocrine regulation of erythropoietin gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. Life Sci 58, 421-427

Okuno Y, Takahashi T, Suzuki A, Ichiba S, Nakamura K, Hitomi K, Sasaki R, Imura H (1990): Expression of the erythropoietin receptor on a human myeloma cell line. Biochem Biophys Res Commun 170, 1128-1134

Okutan O, Solaroglu I, Beskonakli E, Taskin Y (2007): Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats. J Clin Neurosci 14, 364-368

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS et al. (2003): A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. J Clin Invest 112, 999-1007

Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B et al. (2005): Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. Nat Med 11, 261-262

Pinel S, Barberi-Heyob M, Cohen-Jonathan E, Merlin JL, Delmas C, Plenat F, Chastagner P (2004): Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. Int J Radiat Oncol Biol Phys 59, 250-259

Pirollo KF, Bouker KB, Chang EH (2000): Does p53 status influence tumor response to anticancer therapies? Anticancer Drugs 11, 419-432

Plautz GE, Touhalisky JE, Shu S (1997): Treatment of murine gliomas by adoptive transfer of ex vivo activated tumor-draining lymph node cells. Cell Immunol 178, 101-107

Pollio F, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Persico F, De Falco M, Di Lieto A (2005): Erythropoietin and erythropoietin receptor system in a large uterine myoma of a patient with myomatous erythrocytosis syndrome: possible relationship with the pathogenesis of unusual tumor size. Hum Pathol 36, 120-127

Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A (2003): Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. Stroke 34, 1981-1986

Prins RM und Liau LM (2003): Immunology and immunotherapy in neurosurgical disease. Neurosurgery 53, 144-152

Prins RM und Liau LM (2004): Cellular immunity and immunotherapy of brain tumors. Front Biosci 9, 3124-3136

Prins RM, Graf MR, Merchant RE (2001): Cytotoxic T cells infiltrating a glioma express an aberrant phenotype that is associated with decreased function and apoptosis. Cancer Immunol Immunother 50, 285-292

Prins RM, Scott GP, Merchant RE, Graf MR (2002): Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. Cancer Immunol Immunother 51, 190-199

Prins RM, Incardona F, Lau R, Lee P, Claus S, Zhang W, Black KL, Wheeler CJ (2004): Characterization of defective CD4-CD8- T cells in murine tumors generated independent of antigen specificity. J Immunol 172, 1602-1611

Quelle FW, Wang D, Nosaka T, Thierfelder WE, Stravopodis D, Weinstein Y, Ihle JN (1996): Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. Mol Cell Biol 16, 1622-1631

Rades D, Golke H, Schild SE, Kilic E (2008): The impact of tumor expression of erythropoietin receptors and erythropoietin on clinical outcome of esophageal cancer patients treated with chemoradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 71, 152-159

Radoja S und Frey AB (2000): Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. Mol Med 6, 465-479

Radoja S, Saio M, Schaer D, Koneru M, Vukmanovic S, Frey AB (2001): CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. J Immunol 167, 5042-5051

Ramakrishnan R, Cheung WK, Wacholtz MC, Minton N, Jusko WJ (2004): Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. J Clin Pharmacol 44, 991-1002

Reinders ME, Rabelink TJ, Briscoe DM (2006): Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. J Am Soc Nephrol 17, 932-942

Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, Kun LE, Walter AW, Evans WE, Pui CH (1999): High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. Lancet 354, 34-39

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F (1999): Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. Blood 93, 2627-2636

Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, Fisher B, Fulton D, Gulavita S, Hao C et al. (2004): Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. J Clin Oncol 22, 1583-1588

Rossler J, Stolze I, Frede S, Freitag P, Schweigerer L, Havers W, Fandrey J (2004): Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. J Cell Biochem 93, 153-161

Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, Zibera C, Novella A, Lucotti C, Della Cuna GR, Cazzola M (1993): Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. Haematologica 78, 208-212

Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A (2002): Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. J Neurosci 22, 10291-10301

Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschning T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T et al. (2000): Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 11609-11613

Sadoff L (2005): Erythropoietin and cancer. JAMA 293, 1858-1859

Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL (2000): Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. Clin Cancer Res 6, 1351-1364

Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998): In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4635-4640

Salminen E, Pukkala E, Teppo L (1999): Second cancers in patients with brain tumours--impact of treatment. Eur J Cancer 35, 102-105

Santa Cruz Biotechnology: Epo (N-19): sc-1310 Product Datasheet. http://datasheets.scbt.com/sc-1310.pdf, Webpage: http://www.scbt.com/datasheet-1310-epo-n-19-antibody.html

Santa Cruz Biotechnology: EpoR (C-20): sc-695 Product Datasheet. http://datasheets.scbt.com/sc-695.pdf, Webpage: http://www.scbt.com/datasheet-695-epor-c-20-antibody.html

Sasaki R, Masuda S, Nagao M (2000): Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. Biosci Biotechnol Biochem 64, 1775-1793

Schmidt F, Fischer J, Herrlinger U, Dietz K, Dichgans J, Weller M (2006): PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. Neurology 66, 587-589

Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C (2007): Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. J Leukoc Biol 81, 15-27

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006): Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nat Clin Pract Neurol 2, 494-503

Seidel HM, Lamb P, Rosen J (2000): Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. Oncogene 19, 2645-2656

Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B (2000): Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. Melanoma Res 10, 421-426

Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y (2001): Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. Immunology 103, 449-457

Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D (2005): Correction of anaemia through the use of darbepoetin alfa improves chemotherapeutic outcome in a murine model of Lewis lung carcinoma. Br J Cancer 93, 224-232

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004): Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. Science 304, 1338-1340

Shepherd SF, Laing RW, Cosgrove VP, Warrington AP, Hines F, Ashley SE, Brada M (1997): Hypofractionated stereotactic radiotherapy in the management of recurrent glioma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 37, 393-398

Sigounas G, Sallah S, Sigounas VY (2004): Erythropoietin modulates the anticancer activity of chemotherapeutic drugs in a murine lung cancer model. Cancer Lett 214, 171-179

Silver DF und Piver MS (1999): Effects of recombinant human erythropoietin on the antitumor effect of cisplatin in SCID mice bearing human ovarian cancer: A possible oxygen effect. Gynecol Oncol 73, 280-284

Sinclair AM, Todd MD, Forsythe K, Knox SJ, Elliott S, Begley CG (2007): Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. Cancer 110, 477-488

Sinclair AM, Rogers N, Busse L, Archibeque I, Brown W, Kassner PD, Watson JE, Arnold GE, Nguyen KC, Powers S et al. (2008): Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells. Br J Cancer 98, 1059-1067

Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, Dosen G, Smeland EB, Blomhoff HK, Myklebust JH (2006): PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. Br J Haematol 135, 117-128

Sizer KC (2007): Heat shock protein 70, erythropoietin, and cancer. J Clin Oncol 25, 4326-4327

Smith RE (2004): Erythropoietic agents in the management of cancer patients. Part 2: studies on their role in neuroprotection and neurotherapy. J Support Oncol 2, 39-49

Soffer D, Pittaluga S, Feiner M, Beller AJ (1983): Intracranial meningiomas following low-dose irradiation to the head. J Neurosurg 59, 1048-1053

Spandou E, Tsouchnikas I, Karkavelas G, Dounousi E, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O, Tsakiris D (2006): Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. Nephrol Dial Transplant 21, 330-336

Springborg JB, Sonne B, Frederiksen HJ, Foldager N, Poulsgaard L, Klausen T, Jorgensen OS, Olsen NV (2003): Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage originates from the brain. Brain Res 984, 143-148

Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H (1998): Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1178-1183

Steensma DP (2004): Management of anemia in patients with cancer. Curr Oncol Rep 6, 297-304

Strik HM, Buhk JH, Wrede A, Hoffmann A, Bock C, Christmann M, Kaina B (2008): Rechallenge with temozolomide with different scheduling is effective in recurrent malignant gliomas. Mol Med 1, 863-869

Stuben G, Thews O, Pottgen C, Knuhmann K, Vaupel P, Stuschke M (2001): Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. J Cancer Res Clin Oncol 127, 346-350

Stuben G, Thews O, Pottgen C, Knuhmann K, Sack H, Stuschke M, Vaupel P (2003): Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. Strahlenther Onkol 179, 620-625

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol 7, 392-401

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352, 987-996

Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H (2002): Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. Neurosci Res 44, 391-403

Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH (2004): Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. J Cereb Blood Flow Metab 24, 259-270

Supino-Rosin L, Yoshimura A, Altaratz H, Neumann D (1999): A cytosolic domain of the erythropoietin receptor contributes to endoplasmic reticulum-associated degradation. Eur J Biochem 263, 410-419

Sytkowski AJ (2007): Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. Sci STKE 2007, e38

Takeshita A, Shinjo K, Higuchi M, Miyawaki S, Takemoto Y, Kishimoto Y, Saito K, Takuchi H, Kuriyama K, Kimura Y et al. (2000): Quantitative expression of erythropoietin receptor (EPO-R) on acute leukaemia cells: relationships between the amount of EPO-R and CD phenotypes, in vitro proliferative response, the amount of other cytokine receptors and clinical prognosis. Japan Adult Leukaemia Study Group. Br J Haematol 108, 55-63

Tauchi T, Damen JE, Toyama K, Feng GS, Broxmeyer HE, Krystal G (1996): Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. Blood 87, 4495-4501

Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, Herman TS (1990): Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIC murine fibrosarcoma. Cancer Res 50, 3339-3344

Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P (1998): Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. Br J Cancer 78, 752-756

Thews O, Kelleher DK, Vaupel P (2001): Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. Cancer Res 61, 1358-1361

Tovari J, Gilly R, Raso E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vago A, Timar J (2005): Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. Cancer Res 65, 7186-7193

Tsai JC, Song BJ, Wu L, Forbes M (2007): Erythropoietin: a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. J Glaucoma 16, 567-571

Um M, Gross AW, Lodish HF (2007): A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. Cell Signal 19, 634-645

Uzum G, Sarper DA, Bahcekapili N, Ziya ZY (2006): Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures. Life Sci 78, 2571-2576

Van Halteren HK, Bongaerts GP, Verhagen CA, Kamm YJ, Willems JL, Grutters GJ, Koopman JP, Wagener DJ (2004): Recombinant human erythropoietin attenuates weight loss in a murine cancer cachexia model. J Cancer Res Clin Oncol 130, 211-216

Vaupel P und Harrison L (2004): Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. Oncologist 9, 4-9

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989): Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res 49, 6449-6465

Verdier F, Chretien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P (1998): Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. J Biol Chem 273, 28185-28190

Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P (2000): Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. J Biol Chem 275, 18375-18381

Verdier F, Gomez S, Lacombe C, Mayeux P (2006): Selected anti-Epo receptor antibodies predict Epo receptor expression. Blood 108, 1106

Verdonck O, Lahrech H, Francony G, Carle O, Farion R, Van de Looij Y, Remy C, Segebarth C, Payen JF (2007): Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. J Cereb Blood Flow Metab 27, 1369-1376

Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Gorio A, De Biasi S (2007): Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. Neuroscience 144, 865-877

Vogelzang NJ, Breitbart W, Cella D, Curt GA, Groopman JE, Horning SJ, Itri LM, Johnson DH, Scherr SL, Portenoy RK (1997): Patient, caregiver, and oncologist perceptions of cancer-related fatigue: results of a tripart assessment survey. The Fatigue Coalition. Semin Hematol 34, 4-12

Vuorinen V, Hinkka S, Farkkila M, Jaaskelainen J (2003): Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. Acta Neurochir 145, 5-10

Walker PR, Calzascia T, de Tribolet N, Dietrich PY (2003): T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. Brain Res Brain Res Rev 42, 97-122

Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chretien S, Lacombe C, Mayeux P (2005): Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. Blood 105, 600-608

Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M (2006): Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. J Neurosci 26, 5996-6003

Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL (1999): JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. J Immunol 162, 3897-3904

Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU (2004): Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. FASEB J 18, 1462-1464

Weller M und Fontana A (1995): The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. Brain Res Brain Res Rev 21, 128-151

Weller M und Westphal M: Glioblastom. In: Neuroonkologie; Schlegel U, Weller M, Westphal M; 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 196-204

Weller M, Muller B, Koch R, Bamberg M, Krauseneck P (2003): Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. J Clin Oncol 21, 3276-3284

Westenfelder C und Baranowski RL (2000): Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. Kidney Int 58, 647-657

Westphal G, Niederberger E, Blum C, Wollman Y, Knoch TA, Rebel W, Debus J, Friedrich E (2002): Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality. Tumori 88, 150-159

Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, Herrlinger U, Platten M, Blaschke B, Meyermann R, Reifenberger G, Weller M, Wick W (2007): Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. J Clin Oncol 25, 3357-3361

Wiestler OD und Reifenberger G: Pathologische Anatomie und WHO-Klassifikation der Tumoren. Gliome. In: Neuroonkologie; Schlegel U, Weller M, Westphal M; 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 12-28

Winter SC, Shah KA, Campo L, Turley H, Leek R, Corbridge RJ, Cox GJ, Harris AL (2005): Relation of erythropoietin and erythropoietin receptor expression to hypoxia and anemia in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 11, 7614-7620

Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ (1999): Signal transduction in the erythropoietin receptor system. Exp Cell Res 253, 143-156

Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK (1999): Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. J Clin Oncol 17, 2572-2578

Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS (2002): Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro Oncol 4, 278-299

Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, Zheng X, Jing H (2006): Pretreatment with recombined human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. Eur J Cardiothorac Surg 29, 902-907

Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R (2007): Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. Apoptosis 12, 1365-1375

Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, Crump M, Lipton JH, Kiss TL, Lau CY et al. (2005): The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. Eur J Clin Pharmacol 61, 189-195

Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y (1996): Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. Eur J Biochem 239, 494-500

Yan Z, Zhang Y, Duan D, Engelhardt JF (2000): Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6716-6721

Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, Mori S, Matsuo T, Nakamura Y (2001): Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. Ital J Anat Embryol 106, 215-222

Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R et al. (2002): Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. Carcinogenesis 23, 1797-1805

Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K et al. (2003): Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. Carcinogenesis 24, 1021-1029

Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsenter J, Shohami E (2005): Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. FASEB J 19, 1701-1703

Yin D, Kawabata H, Tcherniamtchouk O, Huynh T, Black KL, Koeffler HP (2007): Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. Int J Oncol 31, 1193-1198

Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC et al. (2002): Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. Development 129, 505-516

Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W et al. (2000): A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. Br J Cancer 83, 588-593

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL (2000): Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. Cancer 88, 2606-2618

Zhang J, Li Y, Cui Y, Chen J, Lu M, Elias SB, Chopp M (2005): Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. Brain Res 1034, 34-39

Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S (2006): Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. Blood 107, 907-915

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res 59, 5830-5835

Danksagung

Herrn PD Dr. med. H. M. Strik möchte ich für die Überlassung dieses spannenden und überaus interessanten Dissertationsthemas danken. Die freundschaftlich motivierende Art seiner umfassenden Betreuung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Stets war er in allen Fragen ansprechbar und stand prompt zur Seite, wenn man nicht mehr weiter wusste. Dabei ließ er es nie an aufgebrachter Zeit mangeln, obwohl ihm davon eigentlich nur wenig zur Verfügung stand. Schließlich spornte er mich auch durch sein wirklich schnelles Korrekturlesen an, das Ziel beim Schreiben nicht aus den Augen zu verlieren.
Vielen Dank für diese vorbildliche Begleitung auf dem Weg zur Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. med. C. Bock möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung der neurochirurgischen Patientendaten bedanken, die einen unentbehrlichen Bestandteil dieser Arbeit bilden.

Herrn Prof. Dr. med. W. Brück und der gesamten Abteilung Neuropathologie der Universität Göttingen danke ich für die enorme Unterstützung und großzügige Bereitstellung der Gewebeschnitte.

Herrn PD Dr. med. B. Hemmerlein gilt besonderer Dank für die Anleitung und Hilfestellungen zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen. Aufgrund seines Einfallsreichtums und schnellen Umsetzens konnte die Laborarbeit, trotz anfänglicher Schwierigkeiten, hervorragend gelingen.

R. Kleinhans danke ich für die zuvorkommende Betreuung und die hilfreichen Anregungen zur praktischen Durchführung der Labortätigkeiten.
Bei I. Nagel möchte ich mich für die Bereitstellung des Fotomikroskops bedanken.

Dr. K. Jung war eine große Hilfe zur Einarbeitung in die statistischen Methoden.

Danken möchte ich auch besonders M. Curth, die aufopferungsvoll Korrektur las und mich mit Ihrer schier endlosen Geduld immer bedingungslos unterstützte.

Lebenslauf

Am 25.07.1983 wurde ich in Hildesheim als Sohn von Jürgen Brunotte, Angestellter bei der Gemeinde-Unfallversicherung Hannover, und Ute Engelke-Brunotte, Lehrerin, geboren.

Ich besuchte von 1989 bis 1993 die Grundschule in Achtum und anschließend von 1993 bis 2002 das Bischöfliche Gymnasium Josephinum in Hildesheim. Während dieser Zeit absolvierte ich ein 3-wöchiges Sozialpraktikum im Städtischen Krankenhaus Hildesheim. Meine Abiturprüfung legte ich im Juni 2002 mit dem Ergebnis 1,8 ab.

Im Anschluss an die Schulzeit leistete ich vom Juli 2002 bis April 2003 den Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in Hildesheim ab. Hier war ich im Behindertenfahrdienst sowie als Betreuer im Hausnotruf tätig. In diesem Rahmen betätigte ich mich auch im Bereich der ambulanten Pflege.

Danach absolvierte ich im Sommer 2003 ein Krankenpflegepraktikum auf einer internistischen Station im St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim.

Leider bekam ich nicht sofort einen Studienplatz im Fach Humanmedizin zugewiesen. Im Oktober 2003 begann ich daher zunächst das Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen, um bereits Lehrinhalte des Studiums der Humanmedizin zu erarbeiten. In den Semesterferien von Januar bis März 2004 absolvierte ich erneut ein Krankenpflegepraktikum in der Inneren Medizin, diesmal im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen. Im Anschluss arbeitete ich hier immer wieder als Pflegehelfer. Im April 2004 konnte ich dann das Studium der Humanmedizin, ebenfalls an der Georg-August-Universität in Göttingen, aufnehmen.

Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich im März 2006 mit der Note 2,0 in Göttingen ab. Danach famulierte ich in den Fächern Neurologie, Radiologie und Dermatologie im Universitätsklinikum Göttingen. Im Fach Augenheilkunde famulierte ich in einer Praxis in Göttingen.

Mein Praktisches Jahr begann ich im Fach Chirurgie im Bürgerspital Solothurn in der Schweiz. Hier war ich im Bereich der Orthopädie, Unfallchirurgie und Allgemeinchirurgie tätig. Im Anschluss absolvierte ich mein zweites Tertial im Fach Innere Medizin im Klinikum Herzberg (Harz). Hier lag der Schwerpunkt der Ausbildung in den Bereichen Kardiologie und Gastroenterologie. Im letzten Tertial meines Praktischen Jahres war ich in meinem Wahlfach Augenheilkunde im Universitätsklinikum Göttingen tätig. Den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung werde ich voraussichtlich im Frühjahr 2010 absolvieren.