

Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

In vivo Expression des Erythropoietin-Rezeptors
in Meningeomen und Prognose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard- Karls- Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Onno Ernst Küster
aus
Stuttgart
2010

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Roser

Widmung

Meiner Familie

Abkürzungen

Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BclXL	Basal cell lymphoma-extra large
cDNA	Copy DNA
c-IAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic acid
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietinrezeptor
EpoR-F	Erythropoietinrezeptor full-length-form
EpoR-T	Erythropoietin truncated-form
EpoR-S	Erythropoietin soluble-form
FOXO	Forkhead Box Gruppe O
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gy	Gray
HSP-70	Heat shock protein 70
H ₂ O	Destilliertes Wasser
JAK2	Janus kinase 2
kDa	Kilo Dalton
mA	Milli Ampere
MIB-1	Made in Borstel-1 (Stadt in Schleswig-Holstein) monoclonaler Antikörper für Ki-67 (Kiel-67), ein Proliferationsmarker
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NF2	Neurofibromatose 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PgR	Progesteron Rezeptor
PI3	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
rad	Radiation absorbed dose
RNA	Ribonucleic acid
V	Volt

WHO	World Health Organisation
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG	8
a. Meningeome	8
1.a.1. Epidemiologie	8
1.a.2. Histopathologie, Lokalisation, biologisches Verhalten	8
1.a.3. Ätiologie	10
1.a.4. Klinik	11
1.a.5. Bildgebende Verfahren	12
1.a.6. Therapie	12
b. Erythropoietin und der Erythropoietinrezeptor	14
c. Progesteron und der Progesteronrezeptor	17
d. MIB-1	18
e. Studienziel	19
2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODIK	20
a. Patientendaten	20
2.a.1. Gewebeproben	20
2.a.2. Verteilung der Patienten anhand des Geschlechtes	20
2.a.3. Verteilung der Patienten anhand der WHO Klassifikation	20
2.a.4. Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation	20
2.a.5. Tumore mit Hirninfiltration	21
2.a.6. Patienten mit Tumor-Rezidiv	22
2.a.7. Patienten ohne Tumor-Rezidiv	22
b. Material	22
2.b.1. Immunhistochemie	22
2.b.2. PCR	24
2.b.3. Western Blot	27
c. Methoden	30
2.c.1. Immunhistochemie	30
2.c.2. PCR	35
2.c.2.1. Real Time RT- PCR	36
2.c.2.2. Konventionelle RT- PCR	39
2.c.3. Western Blot	44
d. Statistik	47
3. ERGEBNISSE	49
a. Immunhistochemie	49
b. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	50
c. Ergebnisse des Western Blot	60
d. Ergebnisse der RT-PCR	60

4. DISKUSSION	63
a. Material und Methoden	63
b. Progesteronrezeptor	66
c. MIB-1	67
d. Erythropoietinrezeptor	69
5. ZUSAMMENFASSUNG	77
6. ANHANG	79
7. LITERATURVERZEICHNIS	88

1. Einleitung

a. Meningeome

1.a.1. Epidemiologie

Meningeome sind von den Meningen ausgehende, überwiegend langsam wachsende, zumeist benigne Tumoren. Die Ursprungszellen sind die Deckzellen der Arachnoidea Mater des Gehirns und des Rückenmarks [Perry, 2006]. Der Begriff „Meningeom“ geht auf eine Arbeit von Harvey Cushing aus dem Jahre 1922 zurück [Cushing, 1922].

Sie gehören zu den häufigeren Tumoren, so sind schätzungsweise 24 bis 30 % aller primären intrakraniellen Tumore Meningeome [Perry et al. 2007]. Unter den benignen Tumoren des ZNS beträgt der Anteil der Meningeome bis zu 95%. Die Inzidenz liegt bei 13 Personen pro 100.000 Einwohnern (Italien). Viele kleine Meningeome bleiben zu Lebzeiten unentdeckt, so werden bei 1,4 % aller Autopsien inzidentielle Meningeome gefunden [Rausing et al. 1970]. Inzwischen werden, insbesondere durch die seit einiger Zeit häufiger durchgeführten CT- und MRT Untersuchungen, mehr Meningeome als Zufallsbefund entdeckt [Perry et al. 2007]. Frauen erkranken häufiger als Männer, das Verhältnis beträgt bei Menschen mittleren Alters 1.7:1. Dabei ist der Anteil der Frauen mit der Zeit gestiegen [Perry et al. 2007]. Vor allem Menschen mittleren Alters und alte Menschen sind von Meningeomen betroffen, das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Aber auch im Kindesalter können Meningeome auftreten, bei ihnen ist der Verlauf oft aggressiver. Meningeome die mit hereditären Tumorerkrankungen assoziiert sind, erscheinen eher bei jungen Patienten und sind bei beiden Geschlechtern gleich verteilt [Perry et al. 2007].

1.a.2. Histopathologie, Lokalisation, biologisches Verhalten

Die Tumor-Konsensusgruppe der Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt Meningeome in Typen des Grades I bis Typen des Grades III.

Die Mehrzahl der Meningeome ist benigne mit einem niedrigen Rezidivrisiko, einem weniger aggressiven Wachstum und wird als Grad I deklariert. Aus

histologischer Sicht wird die Gruppe der WHO Grad I Meningeome entsprechend ihrem morphologischen Erscheinungsbild unterteilt, ohne dass dies einen Einfluss auf die klinische Relevanz hätte. Hierzu gehören die besonders häufigen meningeotheliomathösen, fibromatösen und transitionalen Meningeome, sowie die etwas seltener auftretenden psammomatösen, die angiomatösen, die mikrozystischen, die sekretorischen, die lymphoplasmazellreichen und die metaplastischen Meningeome.

Meningeome des WHO Grades II und III haben ein höheres Rezidivrisiko und/oder ein aggressiveres Wachstum.

Dem WHO Grad II werden vor allem die atypischen Meningeome (15 bis 20 %) sowie die infiltrativ in das ZNS einwachsenden Formen zugerechnet und die klarzelligen und chordoiden Varianten.

Tumore des WHO Grad III bestehen vor allem aus den anaplastischen Meningeomen (1 bis 2%), desweiteren werden die papillären und die rhabdoiden Meningeome aufgrund ihrer schlechten Prognose ebenfalls in dieser Gruppe aufgeführt [Perry et al. 2007, Perry, 2006]. In malignen Meningeomen wird eine Metastasierung häufiger beobachtet, hierbei streuen sie vor allem in die Lunge, Pleura, Knochen und die Leber [Perry et al. 2007].

Die Mehrzahl der Meningeome wächst in den intrakraniellen, intravertebralen und orbitalen Hohlräumen. Am häufigsten sind intrakranielle Meningeome an der zerebralen Konvexität, oft nah an der Falx Cerebri lokalisiert, während spinale Meningeome vor allem thorakal zu finden sind [Perry et al. 2007] .

Atypische sowie anaplastische Meningeome wachsen eher an der Falx und den lateralen Convexitäten [Maier et al. 1992].

Cushing und Eisenhardt sowie etwas später Simpson gehörten zu den Ersten, die sich mit Rezidiven bei Meningeomen beschäftigten [Cushing et al. 1938, Simpson, 1957]. Die Rezidivrate von benignen Meningeomen liegt bei 7 bis 29 %, die von atypischen bei 29 bis 40 % und die von anaplastischen sogar bei 50 bis 78 %. [Melamed et al. 1979 Jääskeläinen et al. 1985, Kolles et al. 1995, Maier et al. 1992, Perry et al. 1999, Perry et al. 1997]. Somit sind Rezidive bei Meningeomen ein relativ häufiges Ereignis mit klinischer Relevanz.

Wichtig für die Prognose von Rezidiven sind verschiedene Risikofaktoren. Dazu gehören nach Jääskeläinen eine Infiltration der Dura, des Knochens oder eine weiche Konsistenz des Tumors. Bei Patienten ohne einen dieser aufgezählten Risikofaktoren wurde dabei in 11% ein Rezidiv beobachtet, während mit einem Risikofaktor in 15 bis 24% der Fälle und mit zwei Risikofaktoren in 34 bis 56% der Fälle ein Rezidiv auftrat [Jääskeläinen 1986].

In einer anderen Arbeit berichten Mahmood et al. von 2 Rezidiven bei 183 benignen und 10 Rezidiven bei 16 malignen Meningeomen. Weder Geschlecht, noch Lokalisation und Tumorhistologie, noch eine postoperative Radiotherapie hatten einen Einfluss auf das Rezidiv- Verhalten [Adegbite et al. 1983, Mahmood et al. 1994].

Neuere Studien gehen hingegen von einem positiven Einfluss der Radiotherapie aus. Eine postoperative Radiotherapie mit mind. 50 Gy trägt bei Patienten mit atypischen oder malignen Meningeomen zur Verbesserung der Prognose bei [Milosevic et al. 1996, Hug et al. 2000].

1.a.3. Ätiologie

Die Ätiologie von Meningeomen wird kontrovers diskutiert.

Da Frauen häufiger von Meningeomen betroffen sind, wird seit langem diskutiert, ob Steroiden eine Mediatorfunktion zukommt. So wurde der veränderte Sexualhormonstatus von schwangeren Frauen mit Meningeomwachstum in Zusammenhang gebracht [Donnell et al 1979].

Auch von einem epidemiologischen Zusammenhang zwischen Brustkrebs und Meningeomen wurde berichtet [Schoenberg et al. 1979].

Aus diesem Grund sind auch Östrogen- und Progesteronspiegel bzw. ihre Steroidrezeptoren Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten. Der Östrogenrezeptor wird nur in einem geringen Anteil der Meningeome exprimiert, während die Mehrzahl den Progesteronrezeptor (PgR) exprimiert [Carroll et al. 1993, Black et al. 1996, Strik et al. 2002]. Der Beitrag von Sexualhormonen für die Tumorentstehung und die genaue prognostische Verwendbarkeit sind dabei noch nicht endgültig geklärt und Gegenstand der Diskussion. Auf den PgR wird im Kapitel 1.c. genauer eingegangen.

Die Bestrahlung des Kopfes zu therapeutischen Zwecken wird als Auslöser für einen Teil der Meningeome angesehen. So sind Meningeome sowohl nach hohen, als auch nach mittleren und niedrigen Bestrahlungsdosen beschrieben. Das durchschnittliche Auftreten bis zum Erscheinen des Tumors betrug hierbei zwischen 19 und 35 Jahren. Die meisten Patienten in dieser Arbeit hatten wegen einer Tinea Capitis eine niedrigdosierte Bestrahlung erhalten (800 rad), die zweitgrößte Gruppe erhielt eine Hochdosis Bestrahlung (2000 rad) aufgrund von vorhandenen primären Hirntumoren [Harrison et al. 1991]. Meningeome die durch eine Bestrahlung induziert wurden, waren häufiger atypisch oder aggressiv und kamen eher in jüngeren Jahren vor [Harrison et al. 1991, Mack et al. 1993, Musa et al. 1995].

Zytogenetisch scheint auch der Verlust des Chromosoms 22 eine charakteristische Rolle bei der Entstehung von Meningeomen zu spielen [Zang et al. 1982, Zankl et al. 1972]. Karyotypischen Abnormalitäten wie Verlust des Chromosoms 22 und Abnormalitäten der Chromosomen 1, 3 und 6 sind vermehrt in anaplastischen malignen Meningeomen anzutreffen [Perry et al. 1996]. Auch die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 [Kolles et al. 1995] und der Verlust des Chromosoms 14 [Schneider et. al 1995] wurden gehäuft beobachtet.

Häufig ist das auf dem Chromosom 22 kodierte NF2 Gen (Neurofibromatose Typ 2) in Meningeomen mutiert [Perry et al. 2007]. Mutationen des NF2 Genes werden in bis zu 60% der sporadischen Meningeome beobachtet [Lekanne et al. 1994, Papi et al. 1995, Wellenreuther et al. 1995]. Entsprechend werden in 49,2% der NF2- Patienten Meningeome beschrieben [Parry et al. 1994].

1.a.4. Klinik

Ein Großteil der Meningeome zeigt keine Symptome. Vorhandene Symptome sind relativ unspezifisch und werden u.a. durch eine Kompression der angrenzenden Strukturen ausgelöst. Hierzu zählen langsam fortschreitende Kopfschmerzen sowie epileptische Anfälle. Epilepsien treten bei Großhirnkonvexitäts- Meningeomen zumeist fokal, bei basaler Lokalisation

auch generalisiert auf. Bei Falxmeningeomen können Paresen der Beine und Blasenstörungen vorkommen, während es bei Olfaktoriusmeningeomen zu Geruchsstörungen kommen kann. Sehstörungen wie eine Einschränkung des Gesichtsfeldes und eine Verschlechterung des Visus können ein Hinweis auf ein mediales Keilbeinmeningeom sein. Meningeome des Kleinhirnbrückenwinkel können zusätzlich zu Hörminderungen führen. Bei Rückenmarks-Meningeomen kann es zu Querschnittslähmungen kommen. Auch psychische Veränderungen werden beobachtet [Müller et al. 2006, Perry et al. 2007].

1.a.5. Bildgebende Verfahren

In Röntgenübersichtsaufnahmen des Schädels können Hyperostosen als indirekter Hinweis für eine Meningeominfiltration entdeckt werden. Die bildgebenden Methoden der Wahl zur Erkennung von Meningeomen sind aber das CCT oder die MRT. Die durabasierte Raumforderung ist im Kontrastmittel-CT stark hyperdens und zum Gehirn scharf abzugrenzen, eventuell mit Verkalkungen und einem perifokalen Ödem. Angiographisch zeigt sich ein typisches Gefäßbild mit einer sehr guten Vaskularisation [Müller et al. 2006].

Im MRT zeigen sich Meningeome als isodense Kontrastmittelaufnehmende durale Masse, die kalzifiziert sein kann. Charakteristisch ist ein sog. „dural tail“, der eine durale Ausdehnung anzeigen kann, in manchen Fällen aber auch nur hypervaskularisiertes Gewebe darstellt [Perry et al. 2007].

1.a.6. Therapie

Je nach WHO Klassifikation ist das therapeutische Vorgehen unterschiedlich.

Meningeome, WHO Grad I:

Alle Subgruppen werden nach dem gleichem Schema therapiert, da die histologischen Varianten keine prognostische Bedeutung haben. Das Ziel einer Operation ist hierbei eine kurative Resektion. Bei bestimmten Lokalisationen ist dies oft nicht möglich, wie im Bereich großer venöser Blutleiter, bei Optikusmeningeomen oder bei einer Infiltration des Sinus cavernosus, da hier die Gefahr einer Visusverschlechterung oder einer Okulomotorikstörungen besteht. Bei symptomatischen, inoperablen Tumoren oder progredientem

Rezidiv erfolgt eine Strahlentherapie mit 5 x 1,8 Gy pro Woche mit 50,4 bis 54 Gy.

Der Sicherheitssaum ist dabei abhängig von der Lokalisation des Tumors und dem Immobilisierungssystem. Für Optikusscheidenmeningeome die mit 3-D-konformaler Präzisionstherapie in einem Heidelberger Maskensystem behandelt werden, beträgt er 5 mm, bei diffusen Konvexitätsmeningeomen und konventioneller Technik beträgt er bis zu 2 cm. Fraktionierte Konformationsbestrahlung wird bei inoperablen Meningeomen, Sinus Cavernosus- und Optikusscheidenmeningeomen angewandt. Für kleine lokalisierte Meningeome kann eine stereotaktische Einzelbestrahlung in Betracht gezogen werden.

Wenn es nach einer Bestrahlung zu einer Progression kommt, kann eine Chemotherapie mit Hydroxyharnstoff versucht werden, mit 20 mg/kg/Tag über 1 bis 2 Jahre.

Zur Nachsorge werden MRT Untersuchungen empfohlen. Die erste erfolgt in der Regel nach einem Jahr, dann in zweijährigem Abstand, später in größeren Intervallen. Bei Patienten mit Tumoren der Sehbahn, bzw. bei therapeutischen Eingriffen in dieser Region sollten zusätzlich ophtalmologische und endokrinologische Kontrollen erfolgen.

Meningeome, WHO Grad II:

Die Therapie erfolgt wie bei Meningeomen des Grades I und die Nachsorge wie beim Grad III.

Maligne Meningeome, WHO Grad III:

Die Operation hat das Ziel der mikrochirurgisch kompletten Resektion. Bei inkompletter Resektion oder nach einem Rezidiv mit makroskopisch kompletter Resektion, wird mit einer Dosis von 5 x 2 Gy pro Woche bis 60 Gy mit 3 bis 4 cm Sicherheitssaum bestrahlt. Die Indikation zur Chemotherapie ist hier individuell zu stellen. Zur Nachsorge sollten postoperativ in den ersten 2 Jahren halbjährlich MRT Untersuchungen stattfinden, danach jährlich [Weller et al. 2006].

b. Erythropoietin und der Erythropoietinrezeptor

Erythropoietin (Epo) ist ein 30 kDa großes Glykoprotein. Es wird zu 80 bis 90% in den Nieren, zu 10 bis 15% in der Leber und zu kleinen Teilen auch im Gehirn gebildet und ist vor allem als zentraler hormoneller Regulator der Erythropoese bekannt. Die physiologische Wirkung des im Gehirn gebildeten Epos könnte in einer neuroprotektiven Wirkung vor Sauerstoffmangel liegen. Es kann wegen der Blut- Hirnschranke nicht in die allgemeine Zirkulation gelangen.

Die Freisetzungsrage von Epo in den Kreislauf hängt direkt von der Neubildungsrage ab, da die Zellen keinen Speicher anlegen. Die Epo Bildung wird vor allem durch den Sauerstoff- Transport des Blutes reguliert. Verminderte Sauerstoffzufuhr zur Nierenrinde steigert die Epo Bildung durch verstärkte Transkription des Epo Genes [Löffler et al. 2003].

Der Erythropoietinrezeptor (EpoR) gehört zur Familie der Zytokinrezeptoren [Löffler et al. 2003]. Für den EpoR sind derzeit 3 Isoformen bekannt. Neben der full-length Form EpoR-F, existieren eine lösliche soluble Form, der EpoR-S und eine gegenüber der Hauptform gekürzte truncated Form, der EpoR-T mit kleinerem Proteingewicht [Nakamura et al. 1992].

Die exakte molekulare Größe des EpoR Proteins ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion vieler Arbeiten. Sie betrage 59 kDa [Elliott et al. 2006, Brown et al. 2007], zwischen 62 und 66 kDa [Jones et al. 1990, Yoshimura, D'Andrea 1990, Sawyer et al. 1993, Arcasoy et al. 2003, Hamadmad et al. 2007], oder 78 kDa [Sawyer et al. 1993]. Der soluble EpoR wird als 26 kDa oder 27 kDa Bande beschrieben [Arcasoy et al. 2003, Harris et al. 1996]. Die Halbwertszeit des EpoR bewegt sich um eine Stunde [Yoshimura et al. 1990, Neumann et al. 1993]. Interessant ist auch, dass nur ein geringer Teil des EpoR auf der Zelloberfläche exprimiert wird [Yoshimura et al. 1990]. Die Autoren untersuchten den EpoR dabei in lymphoiden Zelllinien und fanden EpoR Größen von 62, 64 und 66 kDa.

Im Nervensystem kommt Erythropoietin eine Rolle für die Entwicklung, die Erhaltung, den Schutz und die Reparatur des ZNS zu. Auf verschiedenen

Zellen des Nervensystems (neuronale Zellen, Gliazellen und endotheliale Zellen) wurden Epo und der EpoR nachgewiesen, wenngleich in niedrigen Konzentrationen [Genc et al. 2004]. Unter metabolischen Streßbedingungen wird Epo im ZNS aufreguliert und entfaltet unter hypoxischen Bedingungen eine protektive Wirkung [Ehrenreich et al. 2002]. Desweiteren sind Epo und der EpoR während der Entwicklung des Nervensystems im ZNS präsent [Knabe et al. 2004]. Sie haben neurotrophische Effekte [Konishi et al. 1993] und stimulieren neuronale Funktionen durch eine Calcium-Kanal-Aktivierung [Koshimura et al. 1999] Epo befördert die Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Astrozyten [Lee et al. 2004].

In einer Studie mit EpoR Knockout Mäusen, wurde während der Embryogenese ein Abfall von neuralen Vorläufer Zellen, eine verminderte Neurogenese sowie eine vermehrte neuronale Apoptose festgestellt [Yu et al. 2002]. Epo und der EpoR scheinen demnach essentiell für die embryonale neuronale Entwicklung zu sein. Eine weitere Rolle spielen sie für die adulte Neurogenese und für die Migration von regenerierenden Neuronen während der Erholung nach einem Schlaganfall [Tsai et al. 2006]. Bei Gabe von rekombinanten Epo zeigte sich eine signifikante Verkleinerung eines Infarktolumens [Bernaudin et al. 1999].

Die EpoR Expression wurde auch in einigen nicht hämatopoetischen Geweben nachgewiesen, darunter z.B. endotheliale Zellen [Anagnostou et al. 1994], glatte Muskelzellen [Ammarguella et al. 1996], Myoblasten [Ogilvie et al. 2000], Neuronen [Nagai et al. 2001], Photorezeptoren der Retina [Grimm et al. 2002] und die Plazenta [Sawyer et al. 1989].

Aber auch in verschiedenen neoplastischen Geweben und Zellkulturen wurde der Rezeptor nachgewiesen, unter anderem in Mamma-Carzinomen, Prostata Karzinomen, HeLa Zervixkarzinom Zellen, Neuroblastom Zellen und Glioblastom Zellen [Acs et al. 2001, Arcasoy et al. 2005].

Da der EpoR in vielen Tumoren unterschiedlich exprimiert wird, ist sein Nachweis in bisher noch nicht untersuchten Tumorgeweben von Interesse, dem EpoR könnte eine Schlüsselfunktion beim Tumorwachstum zukommen. Damit wäre er ein potentiell nützlicher Marker für beispielsweise die Vorhersage von

Prognosen, Rezidiven, einer Tumorstratifikation oder ein mögliches Ziel onkologischer Behandlungsstrategien.

Epo wird seit einigen Jahren vermehrt klinisch eingesetzt, um Anämien im Rahmen von neoplastischen Erkrankungen zu verbessern. Die Auswirkungen der Gabe von Epo wurden von viele Autoren untersucht. Durch Gabe von rekombinantem humanem Epo wurde die Radiosensitivität in Glioblastomen und Ösophagustumoren durch eine verbesserte Tumoroxygenierung gesteigert [Stuben et al. 2003, Rades et al. 2008].

Epo hatte einen protektiven Effekt gegen eine Cisplatin induzierte Neuropathie und gegen eine Doxorubicin induzierte Kardiotoxizität [Bianchi et al. 2006, Hamed et al. 2006]. Mittelman et al. postulierten einen antineoplastischen Effekt von Epo [Mittelman et al. 2004]. Andere Arbeiten berichteten, dass Epo neoplastisch veränderten Zellen zur Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie verhilft: Die Zugabe von exogenem, rekombinantem humanem Epo induzierte bei Krebszellen einen JAK2 (Januskinase 2) abhängigen stärkeren in vitro Widerstand gegen ionisierenden Strahlen und Cisplatin [Belenkov et al. 2004].

Epo kann anti-apoptotisch wirken und so über den EpoR- Weg einerseits Tumorwachstum befördern und andererseits einen neuroprotektiven Einfluss haben: Epo reguliert den nukleären Transkriptionsfaktor NF-kB hoch, der wiederum die Transkription der Apoptose Inhibitoren XIAP und c-IAP2 steigert [Digicaylioglu et al. 2001]. Rekombinantes humanes Epo verminderte die Apoptose über Induktion des Hitze Schock Proteins 70 (HSP70) [Yang et al. 2003]. Durch eine Phosphorylierung wird das Stat 5 Protein, ein cytoplasmatischer Transkriptionsfaktor, aktiviert. Dieser kann die Transkription von anti-apoptotischen Genen, wie BclXL steigern [Silva et al. 1999]. Ein weiterer Weg ist die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) über die PI3 Kinase (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), diese inaktiviert pro-apoptotischen Faktoren wie Bad und Caspase 9 oder führt zur Hemmung von FOXO Transkriptionsfaktoren. Protease 9 inhibiert dabei direkt die Proteasen- Aktivität [Kashii et al. 2000].

Epo kann auch über die Stimulation der Angiogenese zu Tumorwachstum führen: Es kann direkt mit endothelialen Zellen interagieren und sowohl in vivo als auch in vitro eine angiogenetische Antwort hervorrufen [Batra et al. 2003, Ribatti et al. 1999].

Kürzliche Arbeiten aus dem Institut für Hirnforschung wiesen nach, dass der EpoR in astrozytären Tumoren mit dem Grad der Malignität abfällt und positiv mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert [Mittelbronn et al. 2007].

Da sowohl günstige als auch negative Effekte gefunden wurden, ist die Rolle des EpoR bei Neoplasien noch nicht eindeutig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

c. Progesteron und der Progesteronrezeptor

Progesteron gehört zu den steroiden Sexualhormonen. Wichtig ist Progesteron in seiner Funktion als Sexualhormon: In der Mamma bewirkt es die Ausbildung eines sekretionsfähigen Milchgang Systems. Es führt zum Wachstum des Uterus und zur Umwandlung des Endometriums vom Proliferations- zum Sekretionsstadium. Durch direkte Einwirkung auf das Temperaturzentrum des Gehirns führt es zu einem Temperaturabstieg um 1,4-1,8 °C [Löffler et al. 2003]. Um seine Zielorgane zu erreichen, wird es im Blut an das Protein Transcortin gebunden und bindet in der Zielzelle an spezifische Rezeptoren.

Der PgR ist ein Protein aus 930 Aminosäuren.

Der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern überführt, bindet an die DNA und beeinflusst die Transkription spezifischer für Wachstum und Differenzierung zuständiger Gene.

Auch in Meningeomen wurde der PgR in zahlreichen Arbeiten in bis zu 87% der Meningeome nachgewiesen. [Blankenstein et al. 2000].

Einige Arbeiten deuten auf einen günstigen Effekt der Expression des PgR hin:

So postuliert eine Arbeit, dass in anaplastischen Tumoren der PgR häufiger fehlt [Gabos et al. 1992]. PgR negative Tumore tendierten dazu größer zu sein als positive, bei non-benigen Tumoren fehlte der PgR häufiger und PgR negative Tumore hatten eine schlechtere Prognose [Brandis et al. 1993].

Die Bedeutung der PgR Expression für Rezidive wurde ebenso von vielen Autoren untersucht. Das Fehlen des PgR könnte dabei ein Indikator für das Auftreten eines Rezidivs sein [Kostron et al. 1990], während PgR positive Meningeome seltener ein Rezidiv aufwiesen [Fewings et al. 2000].

Eine Arbeit aus unserem Institut zeigte, dass Meningeome des WHO Grad I mit einer geringeren PgR Expression ein signifikant höheres Risiko für ein Rezidiv haben [Strik et al. 2002]. Somit ist die Anwesenheit von PgR ein positiver prognostischer Faktor für Meningeome [Hsu et al. 1997]. Proliferationsraten und PgR Expression scheinen dabei nicht altersabhängig zu sein [Roser et al. 2005].

d. MIB-1

MIB-1 hat sich als monoklonaler muriner Referenzantikörper für den Nachweis rekombinanter Anteile des Ki-67-Antigens an paraffineingebetteten Geweben etabliert. Damit hat MIB-1 den originären Ki-67 Antikörper, der nur an tiefgefrorenen Gewebe eingesetzt werden konnte, in der pathologischen Routinediagnostik weitgehend abgelöst.

Das zell-proliferations-assoziierte Ki-67 Antigen wird während der aktiven Phase der Zellteilung (G1, S, G2-Phase) in den Zellkernen exprimiert, ist jedoch in ruhenden Zellen (G0-Phase) nicht nachweisbar [Gerdes 1984, Cattoretti et al. 1992]. Damit eignet er sich als Proliferationsmarker in der pathologischen Routinediagnostik. Das für Ki-67-Expression verantwortliche Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert [Fonatsch 1991].

Zwar gibt eine statistisch signifikante Bedeutung von Ki-67 für das Rezidivrisiko von Meningeomen [Takeuchi et al. 1997] und andere Autoren fanden eine prognostische Bedeutung für Ki-67 [Perry et al. 1999], jedoch hat Ki-67 in der Praxis einen geringen Stellenwert bei der prognostischen Aussage von

Rezidiven bei Meningeomen [Moeller et al. 1997]. Höhere MIB-1 Werte korrelieren zwar mit einem größeren Risiko für Rezidive, allerdings variieren die Level und Zähltechniken beträchtlich zwischen den verschiedenen Studien [Perry et al. 2007].

e. Studienziel

Obwohl in letzter Zeit zahlreiche Studien zur Bedeutung der Erythropoietingabe bei Neoplasien erschienen sind [Siegmond-Schultze, 2007], existieren derzeit für den EpoR bei Meningeomen keine aussagekräftigen Daten. Ziel der Studie war daher das Expressionsverhalten des EpoR in Meningeomen auf molekularer Ebene und auf Proteinebene zu untersuchen. Die Untersuchungen sollten mit etablierten Methoden der Immunhistochemie, Immunoblot, RT-PCR und Realtime-RT PCR erfolgen. Bei Vorliegen einer positiven Expression ergeben sich hieraus folgende Fragestellungen:

1. Wird EpoR in Meningeomen exprimiert?
2. Gibt es einen Unterschied in der Expression zwischen Meningeomen mit Rezidiven und Meningeomen ohne Rezidive?
3. Existiert ein Unterschied bei hirninvasiven und nichtinvasiven Meningeomen?
4. Gibt es analog zu den bisher untersuchten Steroidrezeptoren einen Unterschied in der Expression zwischen den Geschlechtern?
5. Wird der Rezeptor in allen Altersgruppen gleichmäßig exprimiert?
6. Haben Tumoren verschiedener WHO Klassifikationen unterschiedliche Expressionsmuster?
7. Sind Korrelationen mit Proliferationsmarkern, wie MIB-1 oder prognostisch bedeutsamen Marken wie dem PgR zu beobachten?
8. Welche der drei bekannten Isoformen des EpoR kommen im Falle einer positiven Expression in Meningeomen vor? In diesem Fall können Primer speziell für die jeweiligen Varianten designed und mittels einer konventioneller RT-PCR nachgewiesen werden.

2. Patienten, Material und Methodik

a. Patientendaten

2.a.1. Gewebeproben

Die Gewebeproben der untersuchten Meningeome stammen von Patienten, die zwischen 1979 und 2006 in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Tübingen oder in der Asklepios Klinik Schildautal in Seesen operiert wurden. Insgesamt wurden 94 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus dem Archiv des Institutes für Hirnforschung der Universität Tübingen untersucht.

2.a.2. Verteilung der Patienten anhand des Geschlechtes

Das Untersuchungskollektiv umfasste 54 (57%) weibliche und 40 (43%) männliche Patienten. Das entspricht einem Verhältnis von 1,4:1 und bildet damit das von der WHO angegebene Verhältnis von 1,7:1 in etwa ab [Perry et al. 2007].

2.a.3. Verteilung der Patienten anhand der WHO Klassifikation

65 (69%) Patienten wiesen ein Meningeom vom WHO Grad I, 16 (17%) vom WHO Grad II und 13 (14%) vom WHO Grad III auf. Dieses Verteilungsmuster bildet ebenfalls grob die Verteilungshäufigkeit der Meningeome ab, bei denen die WHO Grad I Gruppe am häufigsten auftritt. Zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung war die WHO Klassifikation von 2007 noch nicht in Kraft getreten, so dass hirninvasive Tumore z.T. noch zum WHO Tumor Grad I gerechnet wurden. Diese werden seitdem als „brain invasive, otherwise benign“ bezeichnet und ebenfalls als WHO Grad II klassifiziert.

2.a.4. Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors lag zwischen 14 und 85 Jahren, der Mittelwert betrug ca. 58 Jahre. Diese Zahlen entsprechen in etwa den Zahlen der Altersverteilung, die in der Literatur für Meningeome angegeben werden, zwischen dem 40. Und dem 70. Lebensjahr treten nach der WHO die meisten Meningeome auf [Perry et al. 2007].

Die auf das Geschlecht bezogene Altersverteilung lag bei den weiblichen Patientinnen zwischen 14 und 85 Jahren, der Mittelwert betrug 56,76.

Bei den männlichen Patienten lag sie zwischen 17 und 82 Jahren, der Mittelwert betrug 58,55 Jahre. Patienten mit einem Tumor des WHO Grad I waren durchschnittlich 57,4 Jahre alt, die Altersspanne reichte von 19 bis 85 Jahren. Patienten mit einem WHO Grad II Tumor waren durchschnittlich 56,11 Jahre und von 14 bis 84 Jahre alt. Die mit einem WHO Grad III Tumor diagnostizierten Fälle waren durchschnittlich 59,9 Jahre alt, die Spannweite reichte von 17 bis 78 Jahren. Ein Histogramm der Tumore nach Alter findet sich in Abbildung 1.

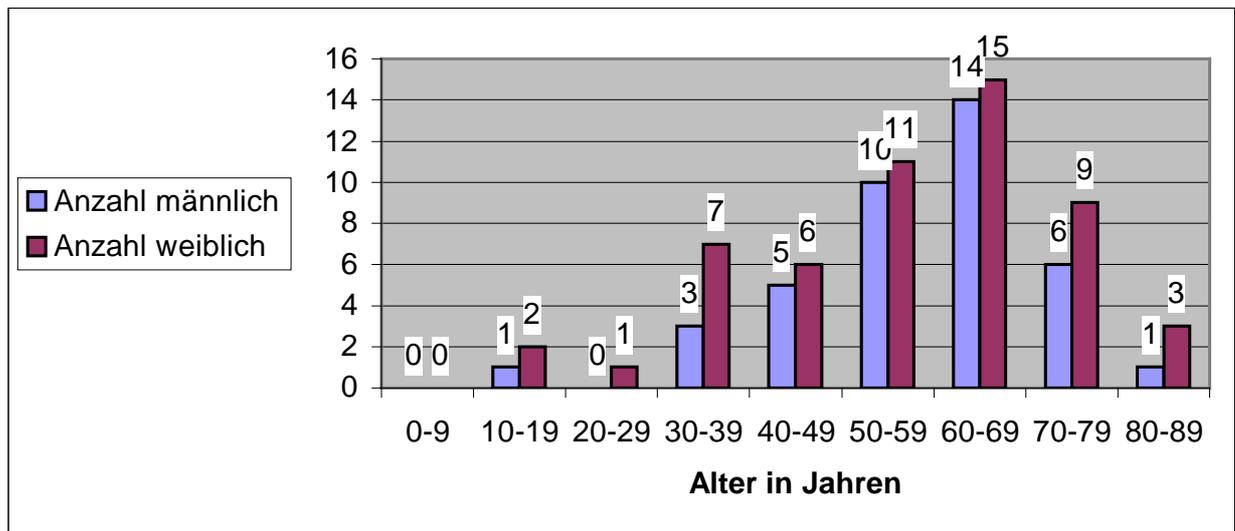


Abbildung 1: Alter der Patienten getrennt nach Frauen und Männern

2.a.5. Tumore mit Hirninfiltration

22 (23%) Meningeome wiesen eine Hirninfiltration auf, 70 (75%) waren nicht infiltrativ und in 2 Fällen waren retrospektiv keine sicheren Daten feststellbar. Diese wurden daher in der statistischen Auswertung für diese Fragestellung nicht einbezogen. Histologisch ist die Hirninvansion definiert durch die Ruptur der Basalmembran, sowie irreguläre Grenzen mit zapfenförmigem Vordringen in das angrenzende Hirngewebe [Fritz et al. 2005, Perry, 2006, Perry et al. 2007]. Diese Kriterien waren in den vorliegenden Tumoren erfüllt. 18 Tumore wurden in der erfolgten Auswertung wie bisher üblich als WHO Grad I gewertet und gelten nach der neuen WHO Klassifikation vom 2007 als Grad II WHO

„otherwise benign“. 1 Tumor gehörte zur Gruppe der WHO Grad II „otherwise atypical“ und 3 Tumore wurden als WHO Grad III eingestuft.

2.a.6. Patienten mit Tumor-Rezidiv

Bei 21 Patienten war ein Rezidiv aufgetreten. Davon hatte ein Fall 4 Rezidive, zwei Fälle wiesen 3 Rezidive, zwei Fälle 2 Rezidive und 15 Fälle 1 Rezidiv auf. Die Zeitspanne im Auftreten der Rezidive betrug von 8 Monaten bis 9 Jahre.

In der Gruppe mit Rezidiven waren 11 Personen weiblich (53%) und 10 Personen (47%) männlich. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 51 Jahre und das Alter der Patienten lag zwischen 19 und 74 Jahren.

2.a.7. Patienten ohne Tumor-Rezidiv

Bei 20 Patienten konnte mittels follow-up ein Rezidiv über einen großen Zeitraum, von mindestens 10 Jahren bis 20 Jahren ausgeschlossen werden. Davon waren 12 Personen weiblich und 8 Personen männlich. Das Alter der Patienten lag zwischen 38 und 82 Jahren. Das durchschnittliche Alter lag bei 55,65 Jahren.

b. Material

2.b.1. Immunhistochemie

Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Immunhistochemie eingesetzt:

EPO-Rezeptor:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) EpoR Antikörper,
Klon 38409, Verdünnung: 1:200
Quelle: R&D Systems, Minneapolis, USA
- Monoklonaler (Rabbit Anti-Human) EpoR Antikörper
Verdünnung 1:350,
Quelle: Upstate, NY, USA

Progesteronrezeptor:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Progesteronrezeptorantikörper,
Klon PgR 636, Verdünnung: 1:200

Quelle: DAKO, Glostrup, Dänemark

MIB-1:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Antikörper gegen das Ki-67 Antigen, Klon MIB 1, Verdünnung: 1:100

Quelle: Dako, Glostrup, Dänemark

Reagenzien für die Färbung (Ventana) ®

- CC1: Cell Conditioning Solution, enthält einen Tri-basierten Puffer
EZPrep CC Volume Adjust
- RB Reaction Buffer
- LCS: Liquid Coverslip Solution
- Amplifier A: Vorverdünntes Kaninchen-Anti-Maus-IgG
- Amplifier B: Vorverdünntes Maus-Anti-Kaninchen-IgG
- Blocker A: Avidin (Hühnereiweiß)
- Blocker B: Freies Biotin
- Fixative 1
- I-View Inhibitor: 3% Wasserstoffperoxidlösung
- I-View SA-HRP: Konjugierte Merettich Peroxidase Lösung mit einem Protein stabilisator und einem Konservierungsstoff
- I-View Biotin Ig: Sekundärer biotinylierter Ig Antikörper, affinitätsgereinigtes Ziege-Anti-Maus IgG und IgM sowie Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, jeweils <200µg/ml in einem Phosphatpuffer mit einem Konservierungsstoff
- I-View DAB: Diaminobenzidin, 2 g/l in stabilisierender Lösung mit Konservierungsstoff
- I-View Copper: Kupfersulfat 5 g/l in Pufferlösung mit Konservierungsstoff
- I-View H₂O₂: 0,04 bis 0,08% Wasserstoffperoxid in einer stabilisierenden Lösung

Quelle der Reagenzien: Ventana Medical Systems, S.A., Illkirch, Frankreich

- Haematoxylin:
Quelle: ThermoShandon, Pittsburgh, USA

- HICO-MIC ®: Permanentes Mikroskopier-Einschlußmittel
Quelle: Hirtz & Co., Köln

2.b.2. PCR

Reagenzien der RNA Extraktion für die Real Time RT- PCR

Zur RNA Extraktion wurde das µMACS mRNA Isolation Kit von Miltenyi verwendet.

- Lysis/Binding Buffer: Ein Salzreicher Puffer, enthält 1 % SDS
- Oligo (dT) Microbeads: Nicht sedimentierende MicroBeads, mit Oligo dTs konjugiert, enthält 0,1 % SDS
- Wash Buffer: Ein salzarmer Puffer
- Equibrilation/Wash Buffer: Zur Einstellung des pH Wertes
- Lyophilized Enzyme Mix: Enthält Reverse Transkriptase
- Resuspension Buffer: Enthält Puffer für Reverse Transkriptase
- Sealing Solution: Ölhaltige Lösung zur Vermeidung von Verdunstung
- DNA Release Solution: Enzym das die Oligos abtrennt
- CDNA Elution Buffer: Rnase freies H₂O.

Quelle der Reagenzien: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Reagenzien für die Realtime RT-PCR

- QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit:
Quelle: Qiagen, Hilden
- FITC: (flourescein isothiocyanate)
Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim
- 96 Well Platten: Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted
Quelle: Abgene, Epsom, U.K.
- Folie:
Quelle: Abgene, Epsom, U.K.
- Combi Thermo-Sealer:
Quelle: Abgene, Epsom, U.K.

- iCycler: Fa. Biorad:
Quelle: Hercules, Californien, USA

Die Primer wurden mit Hilfe der Programme Primer 3 zum Erstellen der Primer [Rozen et al. 2000] und Primer Premier 5 zum Überprüfen auf Sekundärstrukturen und Dimere ausgewählt [Premier Biosoft International, Paolo Alto, CA, USA]

Primer

- EpoR- Primer:
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GCCTTCAAACCTCGCTCTCTGG
- GAPDH- Primer:
forward: TCA ACA GCG ACA CCC ACT CC
reverse: TGA GGT CCA CCA CCC TGT TG

Quelle: MWG Biotech, Ebersberg

Reagenzien der RNA-Extraktion für die konventionelle RT- PCR

- RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit ,
Quelle: Qiagen, Hilden
- Chloroform
Quelle: Merck, Darmstadt

Reagenzien für die konventionelle RT-PCR

- Agarose:
Quelle: Seakem® FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA
- ATaq DNA Polymerase:
Quelle: Promega GmbH, Mannheim
- Bromphenolblau:
Quelle: Merck, Darmstadt
- Desoxyribonukleotide (dNTP): PCR Nucleotid Mix, (10 mM each)

- Quelle: Promega GmbH, Mannheim
- Ladder: Ultra Low Range DNA-Leiter 2.
Quelle: PeqLab, Erlangen
- PCR Kit:
Quelle: Qiagen, Hilden
- Random Primer: Random Primer 500 µg/ ml.
Quelle: Promega GmbH, Mannheim
- Reverse Transkriptase: M-MLV RT, 200 u / µl.
Quelle: Promega GmbH, Mannheim
- RRNasin® Ribonuclease Inhibitor: 40 u / µl.
Quelle: Promega GmbH, Mannheim
- Sucrose:
Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim
- TBE-Puffer:
108g Tris base: Trisma ® Base
Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim
55g Borsäure:
Quelle: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
40 ml 0.5 M EDTA, pH 8,0: Ethylendiamine-Tetraaceticacid,
Quelle: 0,5 M Sigma-Aldrich, Steinheim.

- Human Temporal Cortex Brain Total RNA,
Quelle: Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt.

Primer

- EpoR-F
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GCCTTCAAACCTCGCTCTCTGG
- EpoR-T
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GGC ACTGAGGGGACAACCA(GG)

- EpoR-S
forward: ACGTCTCACATCCGCTACGAG
reverse: CTGGTGGAACTGAGCCAATCA
- β -Actin:
forward: AGAAAATCTGGCACCCACACC
reverse: AACGGCAGAAGAGAGAACCA

Quelle: MWG- Biotech, Ebersberg

2.b.3. Western Blot

Reagenzien der Proteinextraktion für den Western Blot

- 10 mmolar Tris: Trizma ® Base Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim
- NatriumChlorid: Merck, Darmstadt
- ZinkChlorid : Merck, Darmstadt
- DTT (Dithiothreitol): Sigma-Aldrich, Steinheim
- 1 Vol % Triton X 100: Sigma-Aldrich, Steinheim
- Lyse Puffer: Aus 10 mmolar Tris, mit einem von pH-Wert von 7.2, 50 mmolar NatriumChlorid, 5 μ molar ZinkChlorid, 2 mmolar DTT und 1 Vol % Triton X 100.

Reagenzien für den Western Blot und den Bradford Assay

Antikörper

- Primärantikörper: Monoklonaler (Maus Anti-Human) EpoR Antikörper, Klon 38409, Verdünnung: 1:200
Quelle: R&D Systems, Minneapolis, USA
- Sekundärantikörper: Goat Anti- Mouse IgG-HRP
Quelle: Santa Cruz Biotechnology, Californien, USA

Reagenzien für den Western Blot

- Acrylamid: 30 %
Quelle: Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

- APS: Ammoniumperoxidsulfat Pulver in H₂O angesetzt
Quelle: Roth, Karlsruhe
- β Mercapto Ethanol:
Quelle: Roth, Karlsruhe
- Bradford Reagenz: Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Verdünnt 1:5 mit H₂O,
Quelle: Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
- Bromphenolblau: Sigma-Aldrich, Steinheim
- BSA: Albumin Fraktion V, Bovine
Quelle: Roth, Karlsruhe
- ECL (enhanced chemiluminescence): Western Blotting Substrate, (Detection Reagent 1: Peroxide Solution, Detection Reagent 2: Luminol Enhancer Solution)
Quelle: Pierce, Rockford, Illinois, USA
- Filterpapier:
Quelle: Roth, Karlsruhe
- Glycin:
Quelle: Roth, Karlsruhe
- Isopropanol:
Quelle: Merck, Darmstadt
- Längenstandard: Novex®Sharp Prestained Protein Standard
Quelle: Invitrogen, Karlsruhe
- Methanol:
Quelle: Merck, Darmstadt
- NaCl:
Quelle: Merck, Darmstadt
- Skim Milk: Difco
Quelle: Becton Dickinson, Heidelberg
- SDS Ultra Pure:
Quelle: Roth, Karlsruhe
- TEMED: (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)
Quelle: Roth, Karlsruhe

- Tris: Trizma ® Base
Quelle: Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tween: 1 % Tween ® 20
Quelle: Roth, Karlsruhe

- Blotting Kammer: Mini Trans Blot,
Quelle: Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
- Blotting Membran: Nitrocellulose Membran, 0,45 µm Porengröße
Quelle: Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

Lösungen, Gele und Puffer

- Blocking Solution: 5 % Slim- Milk in 0,05 % TBS/ Tween (TBS-T).

- BSA-Lösung für die Standardreihe: BSA wurde 1:10 verdünnt: Es wurden 20 µl BSA mit 180 µl H₂O verdünnt, so dass die Arbeitslösung eine Konzentration von 1 mg/ml hat und 1 µl damit 1 µg Protein enthält. Äquivalent wurden Lösungen angefertigt für 2-, 4-, 6-, 8-, 10- und 12 µl.

- Lämmli Lade Puffer: Verwendet wurden 2 ml eines 0,5 M Tris-HCl mit pH 6,8, 400 mg von 4 % SDS, 20 mg von 0,2 %igem Bromphenolblau, 2ml von 20 %igem Glycerol und am Schluss wurde mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt.

- Running Buffer: (10 x Transfer Puffer) Aus 30,3 g 25 mM Tris-HCl, 144 g 192 mM Glycin und 1000 ml H₂O.

- TBS (Tris-gepufferte-Saline) Gebrauchslösung: 10 x Stammlösung, 30,3 g Tris, 81,8 g NaCl in 800 ml H₂O lösen und mit 25 % HCl auf pH 7,5 einstellen, mit H₂O auf 1 Liter auffüllen.

- TBS-T: 0,05 % Tween ® 20 in TBS Gebrauchslösung.

- 1 x Transfer Puffer: 100 ml des 10 x Transfer Puffer wurden mit 200 ml Methanol und 700 ml H₂O gemischt.
- Separating Gel, 12%ig:
Pro Gel wurden 1,7 ml H₂O, 2ml eines 30 %igen Acrylamid Mixes, 1,3 ml von 1.5 M Tris-HCl mit einem pH von 8,8, 0,05 ml 10 %iges SDS, 0,002 ml TEMED und zum Schluss 0,05 ml 10 %iges APS verwendet.
- Stacking Gel: Pro Gel wurden 1,15 ml H₂O, 0,33 ml eines 30 %igen Acrylamid Mixes, 0,5 ml eines 0.5 M Tris-HCl mit einem pH von 6,8, 0,02 ml eines 10 %igen SDS, 0,002 ml TEMED und zuletzt 10 %iges APS verwendet.

c. Methoden

2.c.1. Immunhistochemie

Theorie der Immunhistochemie

Mit dem immunhistochemischen Verfahren können auf Gewebsschnitten einzelne Proteine sichtbar gemacht werden, indem sie mit einem farbstoffgebundenen Antikörper markiert werden. Diese können dann morphologisch bestimmten Zellkompartimenten zugeordnet werden. Die Affinität des Antikörpers zu einem bestimmten Gewebebestandteil (Epitop) beruht auf einer spezifischen Bindung, der sog. Antigen-Antikörper-Reaktion.

Der primäre Antikörper bindet mit seinem Fab2 Fragment an das Antigen. Der im nachfolgenden Schritt aufgetragene, speziesspezifische sekundäre Antikörper erkennt das freigebliebene Fc Fragment des primären Antikörpers und bindet daran. Zur Signalverstärkung binden schließlich multiple ubiquitär einsetzbare Tertiärantikörper an den Sekundärantikörper. Diese sind mit einem Enzym gekoppelt, das durch einen Substratzusatz mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Hierzu existieren verschiedene Methoden [Löffler et al. 2003].

Die Farbmarkierung der Gewebeschnitte in dieser Arbeit wurden mit der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Biotin (Vitamin H) ist eine Verbindung aus Harnstoff und einem substituierten Thiophanring. Das Glycoprotein Avidin kann Biotin binden [Löffler et al. 2003]. Avidin hat einen isoelektrischen Punkt bei $pI = 10$ und hat daher die Neigung bei physiologischem pH an negativ geladene Gewebebestandteile zu binden. Sowohl Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) als auch Avidin (Hühnereiweiß) besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Zuerst wird ein unkonjugierter Primärantikörper dazugeben, dann ein biotinylierter Sekundärantikörper, zuletzt ein Avidin-Biotin Enzymkomplex oder ein enzymmarkiertes Streptavidin [Hsu et al. 1981, Boenisch, 2006].

Das am Sekundärantikörper gebundene Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin ($K_m=10^{-15}$ M) sowie zu Avidin. Nach der Zugabe des Sekundärantikörpers, folgt eine Inkubation mit einem Strept (Avidin)- Biotin-Enzyme-Complex (ABC-Methode), dieser bindet nun an die biotinylierten Antikörper.

Immun-enzymatische Färbemethoden arbeiten mit Enzym- Substratreaktionen, um das farblose Chromogen in ein angefärbtes Produkt umzuwandeln.

Oft wird dafür die Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) verwendet. Sie ist relativ günstig und wird kovalent an Streptavidin gebunden, ohne dass die Enzymaktivität aufgehoben wird.

In Anwesenheit eines Elektronendonors bildet sich durch die Peroxidase-Aktivität zuerst ein Enzym-Substrat-Komplex und anschließend durch die Oxidation des Elektronendonors das Endprodukt. Der Elektronendonator ist dabei die treibende Kraft für die Katalyse, also die Umsetzung von H_2O_2 .

Der Elektronendonator, in unserem Fall Diaminobenzidin (DAB), wird durch die Oxidation in ein wasserunlösliches Farbstoffprodukt, das sogenannte Chromogen umgewandelt. Im Falle von DAB bildet sich ein braunes Endprodukt [Boenisch, 2006].

Herstellung der histologischen Präparate

Von den in Paraffinblöcken eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3 μm dicke Schnitte

gefertigt, auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen und vor der Weiterverwendung in einem Wärmeschrank bei 55 °C getrocknet.

Vorbereiten der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Benchmark immunhistochemistry system (Ventana, Strasbourg, France) durchgeführt.

Die Entparaffinierung der Präparate und die Antigendemaskierung mittels einer sogenannten „Cell Conditioning Solution“ (mCC1) erfolgt vollautomatisch in dem Färbeautomaten nach eigenen Protokollen.

Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle wurde für die MIB-1 Färbung ein hochproliferativer maligner Tumor (Glioblastom), für den PgR ein hormonaktiver Tumor (Mamma-Karzinom), für den EpoR normales Gewebe mit bekannter Erythropoietinproduktion (Knochenmark und Nierengewebe) genommen.

In den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper ausgelassen und durch identisches Volumen an TBS-Puffer ersetzt.

Immunhistochemische Färbung des EpoR

Eine Vorbehandlung bei 75 bis 76°C dauerte 16 Minuten. Nach der Deparaffinierung wurde der Objektträger für 2 Minuten bis 42°C aufgeheizt.

Während der Antigendemaskierung mit dem Conditioner (mCC1) wurden die Proben 12 Minuten zwischen 95 und 100°C aufgeheizt und danach noch einmal 16 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Objektträgerheizung ausgeschaltet, 8 Minuten inkubiert und wieder bei 42°C 2 Minuten inkubiert.

Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu inhibieren, wurde 1 Tropfen I-View Inhibitor aufgetragen und für 4 Minuten inkubiert. Ein Tropfen vom Primärantikörper EpoR, sowie Liquid Coverslip (LCS) als Verdunstungsschutz, wurden manuell auf die Proben aufgetragen und für 32 Minuten inkubiert. Als Primärantikörper wurde der monoklonale (Maus Anti-Human) EpoR Antikörper,

Klon 38409, der Firma R&D Systems verwendet. Mit dem monoklonalen (Rabbit Anti-Human) EpoR Antikörper der Firma Upstate wurden zusätzlich Kontrollen gefärbt. Die Kontrollen sahen mit beiden Antikörpern gleich aus.

Ein Tropfen Ampilifier Avitin und Biotin wurden aufgetragen und für je 8 Minuten inkubiert. Je ein Tropfen Avidin- und Biotin Blocker wurden auf die Proben aufgetragen um endogenes Biotin nicht unspezifisch mit anzufärben und jeweils 4 Minuten inkubiert. Somit wurde die Hintergrundfärbung reduziert.

Anschließend folgten 8 Minuten Inkubation mit einem Tropfen I-View-Biotin Ig. Zur Sichtbarmachung von DAB wurden die Schnitte für 8 Minuten mit 1 Tropfen I-View SA-HRP und danach für 8 Minuten mit je einem Tropfen I-View DAB und I-View H₂O₂ und LCS inkubiert. Das LCS verhindert die Verdunstung der wasserhaltigen Reagenzien. Zum Schluss wurden die Schnitte mit einem Tropfen I-View Copper verstärkt und für 4 Minuten inkubiert, gewaschen und mit Haematoxylin für 2 Minuten gegengefärbt.

Immunhistochemische Färbung von MIB-1

Das Protokoll war identisch wie bei EpoR, lediglich folgende Parameter wurden modifiziert:

Ein Tropfen vom Primärantikörper MIB-1 sowie LCS das vor Verdunstung schützt wurden manuell auf die Proben aufgetragen und für 6 Minuten inkubiert. Je ein Tropfen Avidin- und Biotin Blocker wurden auf die Proben aufgetragen, um endogenes Biotin nicht unspezifisch mit anzufärben und jeweils 4 Minuten inkubieren gelassen.

Immunhistochemische Färbung des PgR

Das Protokoll war identisch wie bei EpoR, lediglich folgende Parameter wurden modifiziert:

Während der Antigendemaskierung mit dem Conditioner (mCC1) wurde 12 Minuten zwischen 95 und 100°C aufgeheizt und danach noch einmal 32 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Objektträgerheizung ausgeschaltet, 8 Minuten inkubiert und wieder bei 42°C 2 Minuten inkubiert.

Ein Tropfen vom PgR Primärantikörper, sowie LCS das vor Verdunstung schützt wurden manuell auf die Proben aufgetragen und für 14 Minuten

inkubiert. Ein Tropfen Fixative 1 und LCS wurden für 4 Minuten inkubieren gelassen. Je ein Tropfen Ampilifier Avitin und Biotin wurden aufgetragen und für je 8 Minuten inkubieren gelassen. Je ein Tropfen Avidin- und Biotin Blocker wurden auf die Proben aufgetragen, um endogenes Biotin nicht unspezifisch mit anzufärben und jeweils 4 Minuten inkubieren gelassen.

Fertigstellung der Schnitte

Nach Abschluss der automatischen Färbeprozedur wurden die Schnitte in Leitungswasser mit Spülmittel gespült um Öl abzuwaschen.

Zur schrittweisen Entziehung des Wassers wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (70%, 96%, 100%, 100%) und drei mal 2 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend wurden sie mit einem Tropfen HICO-MIC ® und einem Deckglas eingedeckelt.

Lichtmikroskopie

Die Schnitte wurden mit einem Olympus BX50 Licht-Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

Auswertung der Immunhistochemie

EpoR

Aufgrund der unterschiedlichen Intensität der cytoplasmatischen Färbung des EpoR wurde ein bewährter vierstufiger Score zur Auswertung eingesetzt [Schittenhelm et. al. 2008]. Um eine objektive Auswertung zu gewährleisten wurden die Präparate verblindet, d.h. zum Zeitpunkt der Auswertung waren weder die klinischen Daten der Fälle bekannt (Rezidiv, Einstufung, Lokalisation), noch die Ergebnisse der übrigen immunhistochemischen Färbungen (MIB-1, PgR).

Ein Score von 0 wurde für eine fehlende EpoR Expression im Tumorgewebe gewählt. Ein Score von 1 war für Fälle mit schwacher Expression, ein Score von 2 für eine mittelstarke Expression, ein Score von 3 für eine starke Expression vorgesehen. Dura mater, Gefäße und ZNS-Gewebe waren von der Wertung ausgenommen. Zusätzlich wurden die Präparate von zwei Auswertern unabhängig voneinander eingestuft und ein Mean Score als Mittelwert gebildet.

PgR

Zum Teil konnte retrospektiv auf bereits erhobene Werte zurückgegriffen werden. Bei dem Großteil der Präparate war eine erneute Färbung und Auszählung notwendig, da entweder Immunfärbungen von Hand vorlagen oder keine PgR- Bestimmung durchgeführt worden war. Aufgrund regionaler Unterschiede in der Expression, wurden 3 Gesichtsfelder zufällig ausgesucht und bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurde lediglich eine nukleäre Expression des Antikörpers berücksichtigt. Die markierten Zellen wurden zu den nicht markierten Zellen in Relation gesetzt und ein prozentualer Anteil gebildet.

MIB-1

Auch hier konnte zum Teil retrospektiv auf bestehende Färbungen zurückgegriffen werden. Die meisten Präparate mussten aber ebenso nochmals ausgezählt werden. Aufgrund heterogener Expressionsverteilung wurden wieder 3 Gesichtsfelder zufällig ausgesucht und bei 400 facher Vergrößerung eine positive Kernfärbung bestimmt. Die markierten Zellen wurden zu den nicht markierten Zellen in Relation gesetzt und ein prozentualer Anteil gebildet.

2.c.2. PCR

Theorie der PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde 1986 von Kary Mullis vorgestellt und dient der in vitro Amplifizierung von Nucleinsäurefragmenten [Mullis et al. 1986]. Hierbei wird ein DNA Doppelstrang durch Temperaturerhöhung auf etwa 90°C denaturiert und nach erfolgter Trennung der komplementären Stränge wieder auf etwa 50°C abgekühlt. Nun können zwei Primer aus Oligonucleotiden zugesetzt werden, die der Sequenz der 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Nun werden eine DNA-Polymerase und Desoxyribonucleotide zugegeben und die beiden Einzelstränge können zum Doppelstrang vervollständigt werden. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt und es ergibt sich daraus eine exponentielle Zunahme der amplifizierten Moleküle. Mit der Reversen Transkription PCR (RT- PCR) ist

es möglich, auch RNA als Ausgangsmaterial zu verwenden. Die mRNA muss dazu vorher in cDNA umgeschrieben worden sein [Löffler et al. 2003].

Das synthetisierende Enzym benutzt wie bei der Replikation den Einzelstrang als Matrize zur Synthese des komplementären Stranges. Durch Wahl eines Primers wird der Startpunkt der Synthese festgelegt.

Mittels automatisiertem Thermocyclern werden durch zyklische Wiederholungen der Schritte Denaturierung, Annealing und Extension eine Amplifikation der Zielsequenz erreicht.

Die von uns verwendeten nativen Tumorgewebeproben wurden nach der Entnahme mit Tissue-Tek auf einen Träger aufgezogen und sofort in einem Behälter mit Isopentan in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Kryotank bei - 80°C aufbewahrt.

2.c.2.1. Real Time RT- PCR

RNA Extraktion und cDNA-Umschrieb

Extrahierte eukaryontische messenger RNA (mRNA) dient als Transkript für die Proteinsynthese, aus der sich Information über die spezifische Genexpression in Zellen und Geweben ableiten lassen.

Die Extraktionen der Proben wurden für die Realtime RT-PCR mit einem μ MACS™ mRNA Isolation Kit durchgeführt.

Bei dieser Methode hybridisieren magnetische Oligo (dT) MicroBeads an den Poly-A Schwanz aus Adenin-Nukleotiden am 3' Ende der mRNA. Die so etikettierte mRNA kann nun mittels Anlegen eines Magnetfeldes isoliert werden. Da die RNA Extraktion nur 15-30 Minuten dauert, wird das Risiko ihres Abbaus reduziert. Die dabei durchgeführten Wasch-Schritte verringern die Gefahr einer Kontamination. Anschließend wurde für die folgende cDNA Synthese eine reverse Transkription in den μ -MACS-Säulen durchgeführt [Quelle: Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach].

Jeweils ca. 30 mg (3mm³) Gewebe wurde zusammen mit 1ml Lysis/Binding Buffer homogenisiert bis es schaumig wurde. Das entstandene Lysat wurde auf die LysatClear Säulen aufgetragen und zum Trennen der Gewebepartikel von der m-RNA haltigen Lösung bei 13000 g für 3 Minuten zentrifugiert.

Nun wurden spezielle Trennsäulen (μ -MACS-Columns) in den Separator eingesetzt. Die Säulen wurden zur Vorbereitung mit 100 μ l Lysis/Binding Buffer gespült und das Lysat aufgetragen.

Anschließend wurden pro Säule 50 μ l Oligo (dT) MicroBeads hinzugegeben und 2 bis 3 Mal durchpipettiert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat auf die Säulen gegeben und das Magnetfeld des Separators aktiviert. Die nun an ihren Poly-A-Schwänzen magnetisch etikettierte mRNA verblieb in der Säule. Um rRNA und DNA zu entfernen, wurden die Säulen mit 2 Mal 200 μ l Lysis/Binding Buffer und mit 4 Mal 100 μ l Wash Buffer gespült. Anschließend wurde zur Neutralisation des pH-Wertes die Säule 2 Mal mit 200 μ l Equibrilation/Wash Buffer gespült. Danach erfolgte der Umschrieb der mRNA in cDNA.

Dazu wurde das lysophylisierte Enzymgemisch in Resuspension Buffer aufgelöst und jeweils 20 μ l auf die Säulen auftragen. Um ein Verdunsten während des Umschriebes zu verhindern, wurde 1 μ l Sealing Solution darüberschichtet. Der ThermoMACS Separator wurde dann eine Stunde lang auf 42°C geheizt. Nach erfolgtem Umschrieb wurde 2 Mal mit 100 μ l Equibrilation/Wash Buffer gespült, 20 μ l DNA Release Solution auftragen und 10 Minuten auf 42°C zur enzymatische Abspaltung der Magnetpartikel geheizt. Um das Eluat zu erhalten, wurden anschliessend frische Tuben untergestellt und 70 μ l cDNA Elution Buffer auftragen. Zum Schluss wurde der Gehalt an cDNA im Eluat photometrisch bestimmt.

Photometrische Bestimmung des cDNA Gehaltes

Der cDNA Gehalt der Proben und ihre Reinheit wurden photometrisch mit einem Photometer der Firma Eppendorf geprüft. 5 μ l cDNA wurden mit 45 μ l H₂O verdünnt und gegen 5 μ l DNA Release Solution in 45 μ l H₂O als Leerwert photometrisch vermessen. Die Bestimmung der Ratio von Absorptionswerten erfolgte im Bereich von 260 und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). Die Messwerte sind in Tabelle 8 im Anhang aufgelistet. Bei RNA sollte dieser Quotient im Bereich von ca. 2.0 liegen, was in den verwendeten Proben gemessen wurde. Die Reinheit der Proben sowie eine erfolgreich durchgeführte Extraktion wurden damit bestätigt.

Primer für die Real Time RT- PCR

Für die PCR Amplifizierung werden sog. Primer benutzt. Dies sind synthetische Basen-Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Nukleotiden. Die Primer binden zueinander antiparallel an den mRNA-Strang. Im Idealfall sollten die Primer 20-24 Basenpaare lang sein und der GC-Gehalt sollte 45 bis 63% betragen. Damit wird die spezifische Anlagerung sowie eine Annealingtemperatur bei 62 bis 63°C erreicht. Für die Produktlänge wurden für den EpoR ein Abstand von 103 Basenpaaren und für GAPDH ein Abstand von 126 Basenpaaren gewählt. Die Primer hatten folgende Sequenzen

- EpoR- Primer:
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GCCTTCAAACCTCGCTCTCTGG
- GAPDH- Primer:
forward: TCA ACA GCG ACA CCC ACT CC
reverse: TGA GGT CCA CCA CCC TGT TG

Um die Spezifität der Primer im zu untersuchenden Genom zu gewährleisten, wurden sie im Internet mit der GenBank Datenbank abgeglichen [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi].

Setting der Real Time RT- PCR

Die Realtime RT-PCR wurde in einem iCycler durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen bestanden aus einem ca. 15 µl großem Endvolumen aus 7,5 µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit inklusive 0,015 µl (10 nM) FITC, das zum Kalibrieren dient, optische Fehler des Gerätes ausgleicht und eine Hintergrundangleichung aller Wells auf das gleiche Niveau gewährleistet. Zusätzlich wurden je 1,25 µl Sense- und Antisenseprimer entsprechend einer Endkonzentration von je 0,3 µM und 5 µl cDNA dazugeben und auf Platten mit 96 Wells pipettiert.

Um der jeder PCR-Reaktion intrinsischen Variabilität Rechnung zu tragen, wurden dabei je drei Wells mit der gleichen Probe besetzt. Die Platte wurde anschließend mit Folie im Combi Thermo-Sealer luftdicht verschweißt.

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen:

Zu Beginn die Polymeraseaktivierung für 15 Minuten bei 95°C, dann 40 Zyklen von je 15 Sekunden bei 95°C zum Denaturieren der Doppelstränge, nun 30 Sekunden bei 60°C für den Annealing Schritt und zuletzt 10 Sekunden bei 72°C für die Elongation. Die Fluoreszenzmessung, der eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen wurde, erfolgte bei 72°C. Die Schmelzkurven wurden bei einer schrittweisen Temperaturerhöhung um je 0,5°C für 10 Sekunden von 70 - 95°C gemessen, um das Amplifikationsprodukt zu identifizieren und eine eventuelle Verunreinigung durch unspezifisch vervielfältigte Produkte auszuschließen. Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass jeder DNA-Doppelstrang abhängig vom jeweiligen GC-Gehalt einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist, an welchem definitionsgemäß 50% der DNA-Stränge aufgetrennt sind.

Auswertung der Real Time RT- PCR

Die Etablierung einer Real Time RT-PCR für den EpoR gelang nicht.

Hierfür sind verschiedenen Gründen denkbar:

1. Die Qualität der Lysate und die enthaltene Tumormenge waren nicht ausreichend. Schwierigkeiten könnte die Isolierung der Lysate bereitet haben, da das Hirngewebe relativ fettreich ist.
2. Die mRNA des EpoR könnte zu schnell zerfallen sein, da die Halbwertszeit relativ kurz ist, sie bewegt sich um eine Stunde. [Yoshimura et al. 1990] [Neumann et al. 1993]
3. Das verwendete Kit zur RNA Extraktion (μ MACS™ mRNA Isolation Kit) ist für die Proben mit kurzem Poly-A-Schwanz ungeeignet gewesen.

Daher wurde die Etablierung eines Real Time PCR Protokolls zugunsten der Durchführung der Versuche in einer konventionellen RT-PCR unter Einsatz eines speziell auf ZNS-Gewebe optimierten Extraktionskits aufgegeben.

2.c.2.2. Konventionelle RT- PCR

RNA Extraktion

Die RNA Extraktion wurde mit dem „RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit“ von Qiagen gemacht, welches für RNA-Extraktionen aus ZNS Gewebe und entsprechenden Tumoren optimiert ist.

Bis zu 100 mg gefrorenes Gewebe wurde in 1 ml „QIAzol Lysis Reagent“ steril gemörsert, homogenisiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

200 µl Chloroform wurden hinzugefügt und der Ansatz für 15 Sekunden kräftig gevortexed und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren gelassen.

Der Ansatz wurde nun bei 4°C und 12000 g für 15 Minuten zentrifugiert.

Die nun entstandene obere wässrige Phase (ca. 600 µl) wurde abpipettiert, mit 600 µl 70% Ethanol aufgefüllt und gevortexed. 700 µl des Ansatzes wurden auf eine Säule gegeben und 15 Sekunden bei >8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Schritt mit dem restlichen Ansatz wiederholt durchgeführt. 700 µl RW1-Puffer wurden auf die Säule gegeben und wieder 15 Sekunden bei >8000 g zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde zweimalig mit einem 500 µl RPE-Puffer wiederholt. Bei der letzten Wiederholung wurde die Zentrifugation für 2 Minuten durchgeführt. Zum Eluieren wurden 30-50 µl Rnase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran der Säule pipettiert und 1 Minute bei >8000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einem zweiten Gefäß wiederholt, um die verbliebene RNA aufzufangen.

Photometrische Bestimmung des cDNA- Gehaltes

Um die Qualität der RNA Extraktion und die gewonnene RNA Menge zu bestimmen, wurde eine photometrische Bestimmung der Ratio von Absorptionswerten im Bereich von 260 und 280 nm durchgeführt (A₂₆₀/A₂₈₀).

Dazu wurden 5 µl der Proben in 45 µl H₂O aufgenommen. Die ermittelten Quotienten, sind in Tabelle 7 angegeben. Die Reinheit der Proben wurde bestätigt.

cDNA-Umschrieb mit Reverse Transkriptase PCR

Mit einer RT-PCR wurde aus der mRNA durch eine reverse Transkriptase Reaktion cDNA hergestellt. Hierbei wird ein komplementärer Strang zur vorhandenen mRNA synthetisiert. Der verwendete cDNA Ansatz bestand aus 50 µl pro Reaktionsgefäß bestehend aus:

- 10 µl 5 x M-MLV Reaktions-Puffer mit 1 x Endkonzentration

- 1 µl Random Hexamers als Primeräquivalent mit der Endkonzentration 0,5 µg/ µl RNA
- 1 µl RNase Inhibitor (Endkonzentration 1 u/ µl)
- 1 µl von 10 mMol dNTPs (Endkonzentration 0,2mM)
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Endkonzentration 200 u/µl)
- 36 µl eines H₂O -RNA Gemisches (Endkonzentration 1µg)

Die Endkonzentration der RNA sollte 1 µg betragen, daher wurde photometrisch der Gehalt bestimmt, die jeweils benötigte Menge ausgerechnet und mit H₂O auf 36 µl aufgefüllt.

Zur Kontrolle wurde Astrozytom-RNA mit bekannter Epo-Expression und RNA eines kommerziell erhältlichen Cortex mit standardisierten RNA-Anteil verwendet (Human Temporal Cortex Brain Total RNA).

Primer für die konventionelle PCR

Für die PCR-Amplifizierung wurden folgende Primer eingesetzt:

- EpoR-F
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GCCTTCAAACCTCGCTCTCTGG
Produkt: 103 Basenpaare
- EpoR-T
forward: TCATCCTGGTGCTGCTGACC
reverse: GGCAGTGGGGGACAACCA(GG)
Produkt: 163 Basenpaare
- EpoR-S
forward: ACGTCTCACATCCGCTACGAG
reverse: CTGGTGGAACCTGAGCCAATCA
Produkt: 104 Basenpaare
- β-Actin:
forward: AGAAAATCTGGCACCCACACC
reverse: AACGGCAGAAGAGAGAACCA
Produkt: 209 Basenpaare

Die Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 zum Erstellen der Primer [Rozen et al. 2000] und Primer Premier 5 zum Überprüfen auf Sekundärstrukturen und Dimere [Premier Biosoft International, Paolo Alto, CA, USA] ausgewählt. Um die Spezifität der Primer im zu untersuchenden Genom zu gewährleisten, wurden sie im Internet mit der GenBank Datenbank abgeglichen [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi].

Etablierung der PCR mit Hilfe eines Temperaturgradienten

Mit Hilfe eines Temperaturgradienten von 50-60°C wurden die Annealingbedingungen optimiert, da diese bei den einzelnen Primerpaaren häufig unterschiedlich sind. Dafür wurden die bereits etablierten Astrozytomproben verwendet.

Bedingungen des Temperaturgradienten-Programms 50-60°C:

- Aktivierung der Taq DNA-Polymerase: 2 Minuten bei 95°C
- Denaturierung: 30 Sekunden bei 95°C
- Annealing: 45 Sekunden mit einem Temperaturgradienten von 50° bis 60°C mit 1°C Unterschied pro Well.
- Elongation: 60 Sekunden bei 72°C
- Wiederholen der Schritte 2-4 für 35 Zyklen
- 10 Minuten bei 72°C

Gelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente abhängig von deren Größe und von der Dichte des Gels und erlaubt somit die Größenbestimmung der amplifizierten Fragmente. Pro Gel wurden 1,25 g Agarose und 50 ml 1 x TBE Puffer gemischt und aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid zur späteren Sichtbarmachung der DNA dazugegeben. Ein Kamm wurde in die Gelkammer eingesetzt, um Probenaschen zu bilden. Dann wurde das Gel in die Kammer gegossen und konnte sich ca. 30 Minuten festigen. Um das Austrocknen des Gels zu verhindern wurde es mit 1 x TBE Puffer beschichtet.

Die erste Probestasche wurde zur Längenbestimmung mit 2 µl eines kommerziell erhältlichen Längenmarkers gemischt mit 2 µl Bromphenolblau und 9 µl H₂O gefüllt. Für die Analyseproben wurden je 10 µl vom Sample mit 2 µl Sucrose und 1 µl Bromphenolblau zur Verdichtung gemischt. Die Proben wurden in die anderen Gelkammern pipettiert und für 35 Minuten eine Spannung von 125 V angelegt.

PCR optimiert für EpoR-F

Das PCR-Setting erfolgte wie oben dargestellt, für die Annealingtemperatur wurden 59°C gewählt. Für den PCR Ansatz wurden pro Tube 50 µl gewählt: Darin waren 7 µl cDNA, 3 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, je 2,5 µl der reversen und forward Primer, 5 µl Puffer 0,3 µl Polymerase und 28,7 µl H₂O enthalten.

PCR optimiert für EpoR-T

Das PCR-Setting erfolgte wie oben dargestellt, für die Annealingtemperatur wurden 59°C gewählt. Für den PCR Ansatz wurde auf das Protokoll vom EpoR-F zurückgegriffen, lediglich die Primer wurden angepasst.

PCR optimiert für EpoR-S

Das PCR-Setting erfolgte wie oben dargestellt, für die Annealingtemperatur wurden 56°C gewählt und 30 Zyklen gefahren. Für den PCR Ansatz wurde auf das Protokoll vom EpoR-F zurückgegriffen, lediglich die Primer wurden angepasst.

PCR mit β -Actin als Kontrolle

Das PCR-Setting erfolgte wie oben dargestellt, für die Annealingtemperatur wurden 59°C gewählt und 30 Zyklen gefahren. Für den PCR Ansatz wurde auf das Protokoll vom EpoR-F zurückgegriffen, lediglich die Primer wurden angepasst.

2.c.3. Western Blot

Proteinextraktion für den Western Blot

Für die Proteinextraktion wurde ein Lyse Puffer hergestellt aus 10 mmolar Tris, mit einem von pH-Wert von 7.2, 50 mmolar NatriumChlorid, 5 μ molar ZinkChlorid, 2 mmolar DTT und 1 Vol % Triton X 100. Zum gefrorenen Gewebe wurde etwa das Fünffache an Lyse-Puffer bezüglich des Volumens der Kryoprobe gegeben. Das Gewebe wurde nun im gefrorenen Zustand mit Hilfe einer Pipette im Puffer homogenisiert. Anschließend wurde es bei 13000 Umdrehungen in einer Kältekammer bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert.

Die Überstände wurden abgenommen und zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Siehe Tabelle 6.

Theorie des Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine durch eine Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend transferiert man sie auf eine Membran und weist sie durch geeignete Agenzien nach. Man kann das Verfahren als Immunoblot bezeichnen, wenn man spezifische Antikörper zum Nachweis eines Proteins verwendet. Der Name Western Blot geht auf eine modifizierte Technik des Southern Blots zurück, welcher nach seinem Entdecker Edwin Southern benannt wurde [Southern et al. 1971].

Zur Trennung der Proteinproben wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Dafür gießt man ein Trenn- und ein Sammelgel, füllt die Gele zwischen zwei Glasplatten und setzt einen Kamm in die obere Sammelgellösung. Nach Einsetzen der Glasplattenhalterung in eine Elektrophoreseapparatur wird diese mit einem Laufpuffer gefüllt. In die durch den Kamm entstandenen Taschen des Gels werden nun die Proteinextrakte pipettiert. Die Auftrennung der Proteine kann während des Gellaufs optisch verfolgt werden. Nun folgt der Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran. Während dieser Zeit werden die Proteine durch einen angelegten Strom elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert. Dort blockt man zuerst freie Bindungsstellen ab und trägt den Primärantikörper auf. Nach Waschen wird der Zweitantikörper aufgetragen.

Nach nochmaligem Waschen wird das Antigen über eine Peroxidase vermittelte Chemolumineszenz-Reaktion detektiert.

Proteinbestimmung

Vor der Durchführung des Western Blots wurden die Proteine mit einem Bradford Assay bestimmt. Zur Vorbereitung der Proteinbestimmung wurden BSA- Lösungen von 0 bis 12 µg Protein für eine Standardreihe angesetzt, als Triplets auf eine 96-well-Platte aufgetragen und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. In die 96-well-Platte wurden für die Proben jeweils 50 µl H₂O vorgelegt und jeweils 1 µl der Lysatproben als Triplet dazu pipettiert. Pro Well wurden 150 µl Bradford Reagenz dazugegeben. Nach erfolgtem Farbumschlag wurde die Platte mit einem Elisa-Reader bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration in µg/µl gemessen. Aus der Konzentration wurde für jede Probe ausgerechnet, wieviel µl des Lysats benötigt werden, um letztendlich auf die gewünschte Proteinmenge von 20 µg zu kommen.

SDS Gel Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden zuerst die Gele gegossen: 5 ml eines 12%igen Separating Gels (Trenngel) wurden gegossen und 4 ml davon zwischen die zwei Glasplatten gefüllt. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und das Gel zu glätten. Für die obere Schicht wurden 2 ml eines Sammelgels (Stacking Gel) gegossen und eingefüllt, ein Kamm zur Bildung der Geltaschen in die Gelkammer eingesetzt und das Gel 30 Minuten polymerisieren gelassen. Die jeweilige Polymerisation der zwei Gele wurde durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Acrylamid bildet mit freien Radikalen, die durch den Radikalbildner APS gestellt werden, lange Polymere; TEMED dient dabei als Katalysator. Das Sammelgel, das über das Trenngel gegossen wird, dient dazu eine schärfere Bandentrennung zu erreichen. Es hat größere Poren und einen anderen pH- Wert.

Ein Running Buffer (10 x Transfer Puffer) und ein Loading Buffer Lämmli für die Elektrophorese wurden angefertigt. Das enthaltene SDS lagert sich an Proteine an, denaturiert diese und durch die Sulfatgruppen erhalten diese eine

gleichmäßig verteilte negative Ladung. Damit ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von der Molekülmasse abhängig. Das Bromphenolblau im Lämmli Puffer dient zur Beobachtung, wie weit die Proteine im Gel bereits gelaufen sind. Mit dem Lämmli Puffer wurden die Proben aliquotiert, d.h. die Menge des Puffers ist gleich der Menge Lysat, die für die benötigten 20 µl Protein genommen wurde. Direkt vor dem Gebrauch wurde 0,5 – 1 µl pro Probe β MeOH hinzugefügt, das zur weiteren Proteindenaturierung diente. Die Proben kamen nun in ihren Eppendorf Cups für 5 Minuten auf einen Heizblock bei 95 °C, um die Proteine zu denaturieren. Nach kurzem Abzentrifugieren kamen die Proben bis zur Elektrophorese auf Eis.

Die fertigen Gele wurden nun in die Elektrophorese Kammer eingesetzt und 1 x Running Buffer wurde in die Kammer eingefüllt. Ein Marker als Längenstandard und die verschiedenen Proben wurden in die dafür vorgesehenen Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 V gestartet und auf 200 V erhöht. Hierbei liegt die Stromstärke je Gel zu Beginn bei ca. 60 – 70 mA und nimmt im Laufe der Elektrophorese bis ca. 20 mA ab. Die Dauer der Elektrophorese betrug ca. 60 Minuten. Anhand des vorgefärbten Markers konnte die Auftrennung beurteilt und bei Bedarf verkürzt oder verlängert werden.

Nun folgte das Western Blotting. Das Gel wurde mit seiner Glasplatte vorsichtig aus der Apparatur geholt. Die Proteine mussten jetzt aus dem Gel auf eine Membran überführt werden. Vor Beginn wurden die Membranen mit einem Kugelschreiber beschriftet, dann kurz in H₂O gelegt und anschließend in eine Wanne mit kaltem 1 x Transfer Puffer. Das Filterpapier, die Schwämme und das Gel auf der Glasplatte wurden ebenfalls kurz in den Puffer gelegt und das „Sandwich“ zusammengebaut: Die Blotting-Klammer wurde mit der schwarzen Seite nach oben aufgeklappt. Darauf kam ein Schwamm, eine doppelte Lage Filterpapier, das Gel, die beschriftete Blotting Membran, wieder eine doppelte Lage Filterpapier und ein Schwamm. Die Klammer wurde geschlossen und in die Transferkammer eingesetzt. Der 1 x Transfer Puffer wurde in die Kammer eingefüllt, eine Cooling Unit eingesetzt und die Kammer auf einen Magnetrührer gestellt. Das Blotting wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V

gestartet. Die Stromstärke lag bei ca. 250 mA und stieg während des Blottens auf ca. 350 mA an. Das Blotten dauerte eine Stunde. Da das elektrische Feld senkrecht zu der vorherigen Laufrichtung der Proteine ist, können diese aus dem Gel auf die Membran wandern und dort gebunden werden. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose Membran für eine Stunde in einer Blocking Solution geblockt damit freie Bindungsstellen abgesättigt werden können. Dies erfolgte mit einem Protein, welches der Antikörper nicht erkennt. Vom Erstantikörper wurden 20 µl pro ml aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, drei Mal je 5 Minuten mit TBS-T. Das an den Proteinen angelagerte SDS wurde ausgewaschen, die Proteine konnten renaturieren und teilweise wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur. Nun wurden die Membranen mit 1 µl des Sekundärantikörpers und 5 ml TBS-T eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren gelassen. Danach wurde 2 mal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und 1 mal 10 Minuten mit TBS, damit unspezifisch gebundene Antikörper wieder entfernt werden konnten. Die Membranen wurde nun in einer ECL Lösung für 1 Minute inkubiert. Dabei katalysierte eine Peroxidase die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, so dass eine Lumineszenz detektiert werden konnte. Nach Abtupfen der Membran wurde sie zwischen zwei Klarsichtfolien in die Filmkassette gelegt. Der Film wurde aufgelegt und einmal für 30 und einmal für 60 Sekunden belichtet.

d. Statistik

Die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen von Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen zu vergleichenden Gruppen zu zeigen, wurden individuelle p-Werte berechnet. Werte unter $p=0,05$ wurden als signifikant angesehen. Paarweise Vergleiche wurden mit Hilfe des Student *t*-Tests durchgeführt. Die unteren und oberen 95%-Konfidenzintervalle wurden wie im folgenden Beispiel dargestellt angegeben: (95% CI: 1,90 bis 2,26). Zur Stabilisierung der Varianzen beim Vergleich der PgR Expression und des WHO Grades von Meningeomen wurde vorher eine Box-Cox-Transformation der

Daten vorgenommen. Die errechneten Mittelwerte und deren Konfidenzintervalle wurden zur besseren Lesbarkeit nach der statistischen Berechnung zurück transformiert. Die Formel für die Box-Cox Transformation lautet:

$$\text{Pr } gR = (1 - 0.0436 * y)^{-5} - 0.5$$

Beim Vergleich des Zusammenhangs der MIB-1 Expression und des WHO Grades wurde zur Stabilisierung ebenso eine Transformation der Daten vorgenommen. Die errechneten Mittelwerte und deren Konfidenzintervalle wurden zur besseren Lesbarkeit zurück transformiert. Die Formel dazu heißt:

$$MIB - 1 = e^{\frac{y}{2.375}} - 0.5$$

Für die statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm JMP IN verwendet (www.jmp.com)

.

3. Ergebnisse

a. Immunhistochemie

Die mit dem EpoR markierten Präparate wiesen aufgrund der vorwiegend cytoplasmatischen und membranösen Lokalisation eine diffuse Färbung auf. Das kollagene Bindegewebe in den Septen im Tumor sowie teilweise vorhandenen Dura Mater-Anteile stellten sich negativ für den EpoR dar. Auch hämatopoetische Zellen sowie das Gefäßendothel waren immunonegativ, was auf eine Gewebespezifität des EpoR deutet. Verwendet wurde ein vierstufiger Score wie auf S. 34 beschrieben. Präparate mit starker EpoR Expression aber regionalen Intensitätsunterschieden wurden zum Score 2 gezählt.

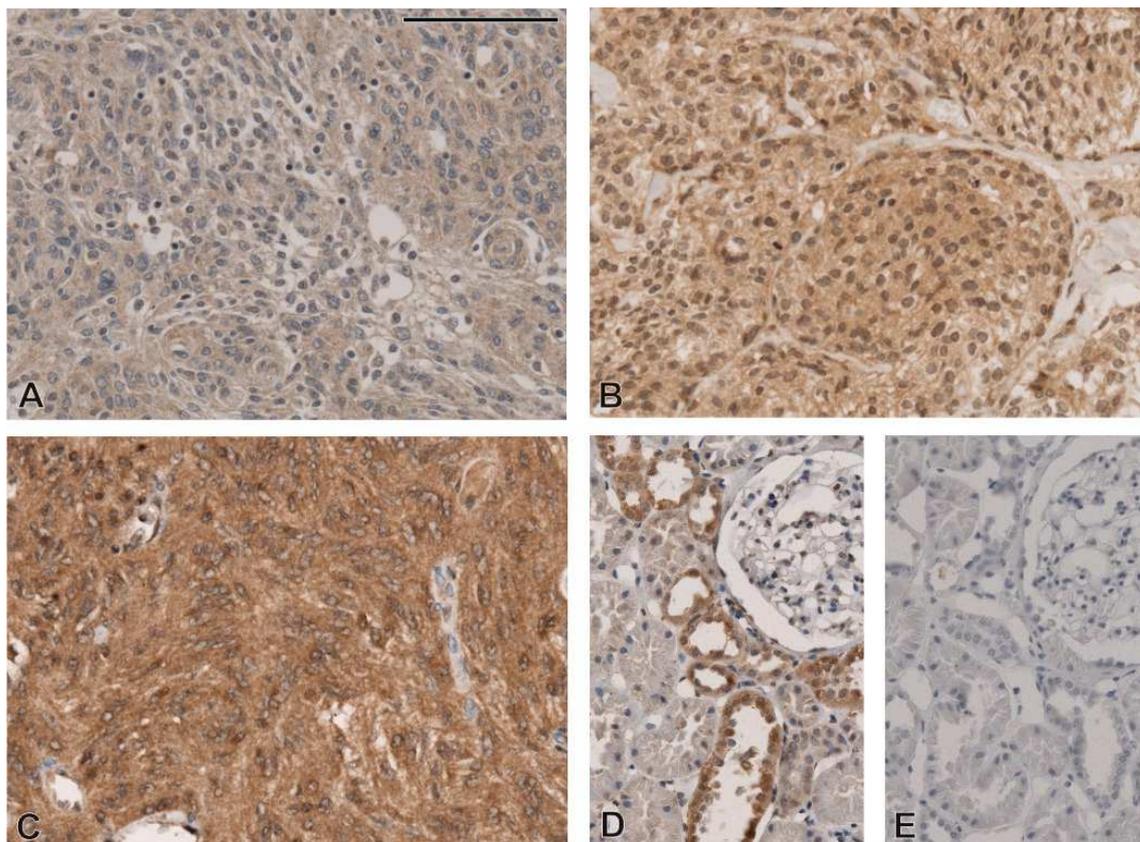


Abbildung 2: Meningeome mit A) schwacher EpoR Expression, entsprechend einem Score 1, B) mittelstarker EpoR Expression, Score 2, C) starker EpoR Expression, Score 3, D) Positivkontrolle, E) Negativkontrolle

Die Präparate für PgR und MIB-1 zeigten eine deutlich abgrenzbare nukleäre Färbung der positiven Kerne. Regionale Unterschiede der Färbungen wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

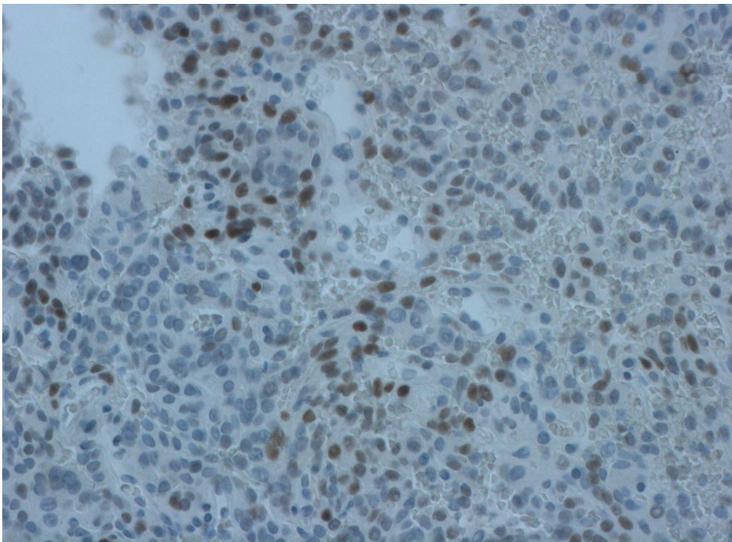


Abbildung 3: Meningeom mit nukleärer PgR Färbung

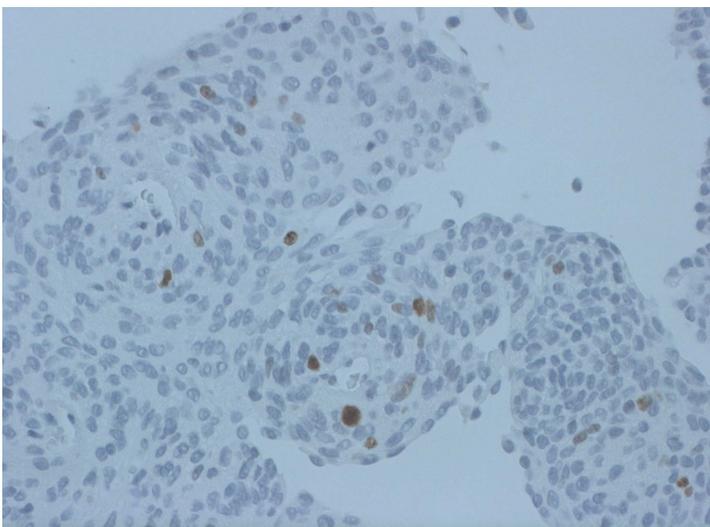


Abbildung 4: Meningeom mit MIB-1 Proliferationsindex unter 2 %.

b. Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Korrelation der Expression des EpoR mit dem Geschlecht

Es wurden 40 männliche und 54 weibliche Patienten untersucht. In der statistischen Auswertung mittels Varianzanalyse wurde festgestellt: Der Mittelwert des EpoR Mean Scores der männlichen Patienten betrug 2,10. (95%

CI: 1,91 bis 2,27). Bei den weiblichen Patienten betrug der Mittelwert 1,98. (95% CI: 1,83 bis 2,13). Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0.3712, beim t- Test ergab sich eine Differenz von -0,89863. D.h. es konnte keine statistische signifikante Korrelation zwischen dem Mean Score beider Geschlechter gefunden werden. Somit ist die Expression von EpoR geschlechtsunabhängig.

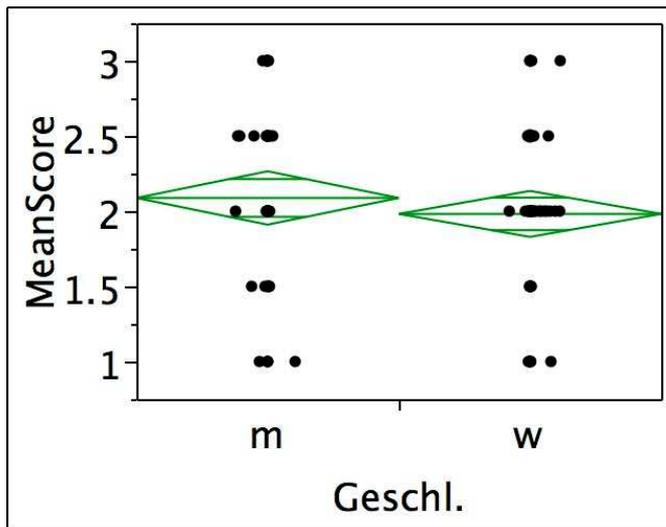


Abbildung 5: Der Mittelwert der EpoR Expression in Korrelation mit dem Geschlecht

Korrelation der Expression des EpoR mit der Altersverteilung

Der Mittelwert der eingeschlossenen Proben betrug 57,53 Jahre. Anhand des p-Wertes (0,950) und der Punktwolke wird deutlich, dass es keine Korrelation (0,084486) zwischen der Altersverteilung und den verschiedenen Mittelwerten des EpoR gibt. Somit ist die EpoR- Expression altersunabhängig.

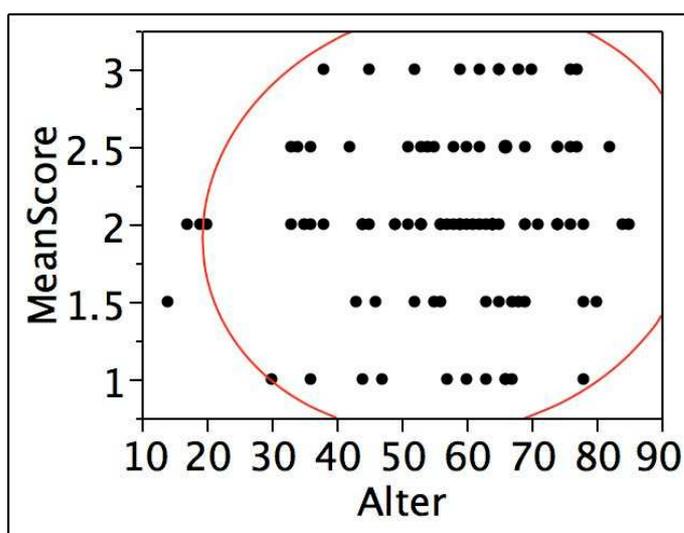


Abbildung 6: Der Mittelwert der EpoR Expression in Korrelation mit dem Alter

Korrelation der Expression des EpoR mit der WHO Klassifikation

Es wurden insgesamt 65 Proben mit dem WHO Grad I, 16 mit der WHO Grad II und 13 mit der WHO Grad III untersucht. Obwohl hirninvasive Meningeome nach der aktuellen WHO Klassifikation zu den WHO Grad II Tumoren gezählt werden [Perry et al. 2007], wurden hirninvasive Meningeome mit benignem Bild aufgrund ihrer Histologie hier der Gruppe der Grad I WHO Tumoren zugeordnet, dies erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit mit alten Studien. Tumoren mit und ohne Hirninvansion wurden gesondert ausgewertet. Die Auswertung der Mittelwerte nach den WHO Graden ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Der Mittelwert der Patienten mit WHO Grad I betrug 1,98 (95% CI: 1,84 bis 2,12). Der Mittelwert der Patienten mit WHO Grad II betrug 2,16 (95% CI: 1,87 bis 2,44) und war somit am Höchsten. Der Mittelwert der Patienten mit WHO Grad III betrug 2,08 (95% CI: 1,76 bis 2,39).

Mittels One Way Varianzanalyse wurde festgestellt:

WHO I vs WHO II	p = 0,2810
WHO I vs WHO III	p = 0,5934
WHO II vs WHO III	p = 0,7088

Diese Werte sind größer als Alpha 0,05, also besteht keine Signifikanz zwischen den drei WHO Graden.

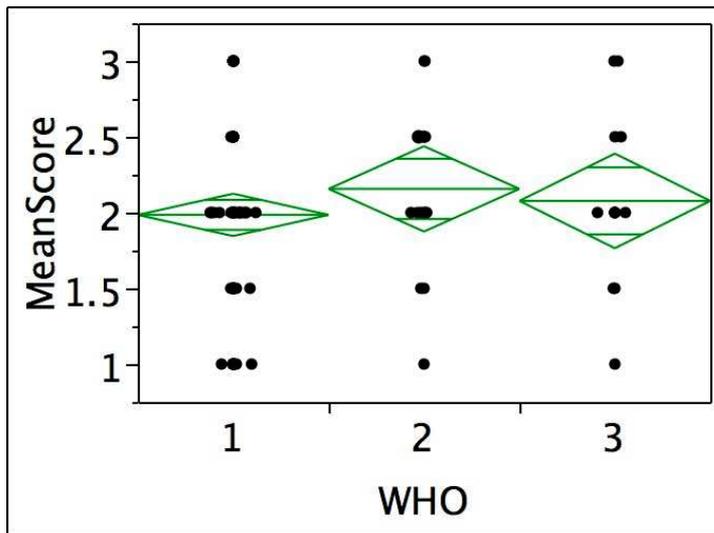


Abbildung 7: Der Mittelwert der EpoR Expression in Korrelation mit den WHO Graden

Korrelation der Expression des EpoR und einer Hirninfiltation

Es wurden 70 Patienten ohne und 22 Patienten mit einem hirninfiltrierendem Meningeom untersucht. Der Mittelwert der Patienten ohne Hirninfiltation betrug 2,06 (95% CI: 1,92 bis 2,19), während der Mittelwert der Patienten mit Hirninfiltation, unabhängig vom WHO Grad, 1,93 betrug (95% CI: 1,69 bis 2,17). Eine Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Mean Score der Tumore mit bzw. ohne Hirninfiltation ($p = 0,3722$, Differenz im t-Test: -0,89683). Somit besteht kein Zusammenhang zwischen der Expression des EpoR in Meningeomen und einer ZNS Infiltration.

Korrelation der Expression des EpoR und Meningeomen mit Rezidiv

Ein Rezidiv ging als ja oder nein Variable, d.h. nominal ein. Es wurden 20 Patienten ohne und 21 Patienten mit Rezidiv beurteilt. Bei den Patienten ohne Rezidiv betrug der Mittelwert 2,20 (95% CI: 1,96 bis 2,44) und bei Patienten mit Rezidiv betrug der Mittelwert 1,79 (95% CI: 1,55 bis 2,02). Der p-Wert ergab in der Varianzanalyse 0,0168, der t-Wert betrug -2,49834. Das bedeutet, dass Meningeome mit Rezidiv den EpoR signifikant schwächer exprimierten. Da der Mean Score nicht normalverteilt war, wurde zur Sicherheit noch der Wilcoxon-Test verwendet. Der p-Wert dabei ist praktisch gleich und beträgt 0.0178.

Tumore mit einem Rezidiv haben demnach einen signifikant niedrigeren EpoR Score als Tumore ohne Rezidiv.

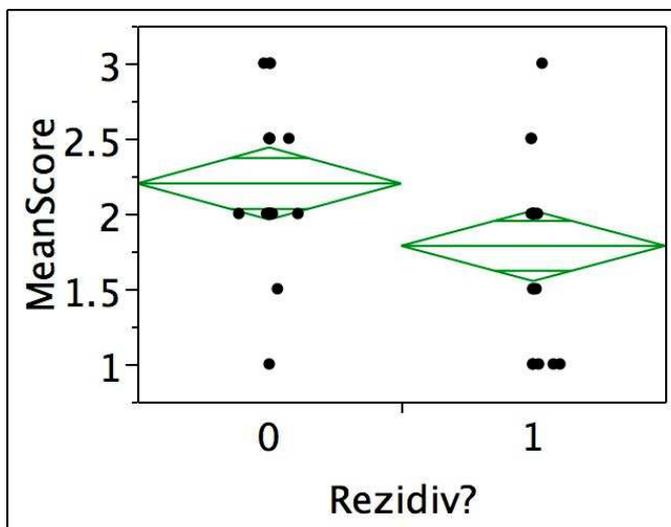


Abbildung 8: Die Mittelwerte der EpoR Expression von Meningeomen sind bei einem Rezidiv signifikant niedriger als ohne Rezidiv.

Korrelation der Expression des EpoR mit der Rezidivanzahl

Es wurden 16 Patienten mit einem Rezidiv, 2 mit zwei Rezidiven, 2 mit drei Rezidiven und 1 Patient mit vier Rezidiven verglichen. Da die Punktwolke nicht einer bivariaten Normalverteilung entsprach, wurde ein nicht parametrischer Korrelationskoeffizient verwendet. Hierbei ergab nach der statistischen Auswertung Spearman's Rho einen p-Wert von 0,0123. Der Korrelationskoeffizient war negativ, er betrug -0.3876. Damit gibt es eine negative Assoziation zwischen der Anzahl der Rezidive und dem Mean Score, d.h. mit zunehmender Rezidivhäufigkeit fällt der EpoR Score ab.

Korrelation der Expression des PgR und der Expression des EpoR

Beim Vergleich von 75 Tumoren konnte keine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,6749$) zwischen der Expression des PgR und dem Mean Score des EpoR gefunden werden. Der Mittelwert der PgR Expression lag am höchsten bei Meningeomen mit schwächerer EpoR Expression des Mean Scores 1 und betrug 26,50 (95% CI: 10,06 bis 42,94). Die anderen Mittelwerte betragen 13,02

(95% CI: 4,53 bis 21,51) für den Mean Score 2 und 14,90 (95% CI: 0,19 bis 29,61) für den Mean Score 3.

Korrelation der Expression des PgR mit der Altersverteilung

Es wurden 58 Patienten untersucht. Dabei zeigte sich eine leichte Zunahme der PgR Expression mit dem Alter, diese war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,4103$).

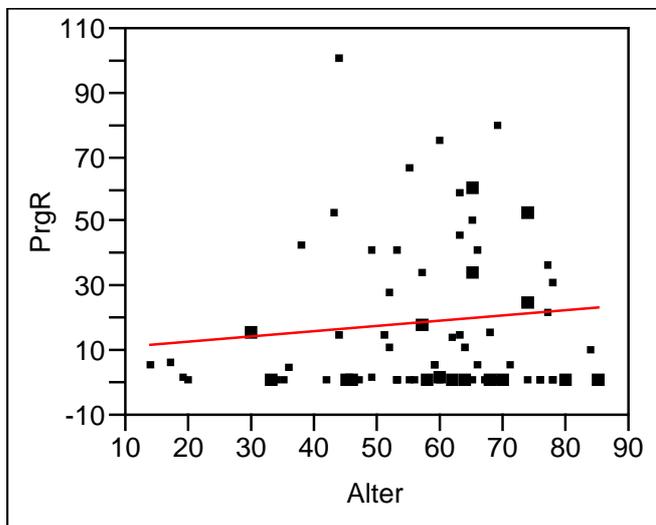


Abbildung 9: Die PgR Expression in Abhängigkeit des Alters

Korrelation der Expression des PgR mit der WHO Klassifikation

Insgesamt wurden 75 Fälle auf einen Zusammenhang untersucht. 41 (54,6%) der Tumore exprimierten den PgR. Die höchsten Expressionswerte für PgR wurden in Tumoren des WHO Grad I beobachtet, der Mittelwert betrug 20,9 (95% CI: 14,60 bis 27,40). Es zeigte sich eine Abnahme über WHO Grad II Tumoren, der Mittelwert betrug 9,35 (95% CI: 0 bis 21,10) zu WHO Grad III Tumoren, der Mittelwert betrug hier 2,5 (95% CI: 0 bis 14,70). Diese Abnahme war statistisch signifikant ($p = 0,0169$) für den Vergleich der Expression des WHO Grades I und der des WHO Grades III.

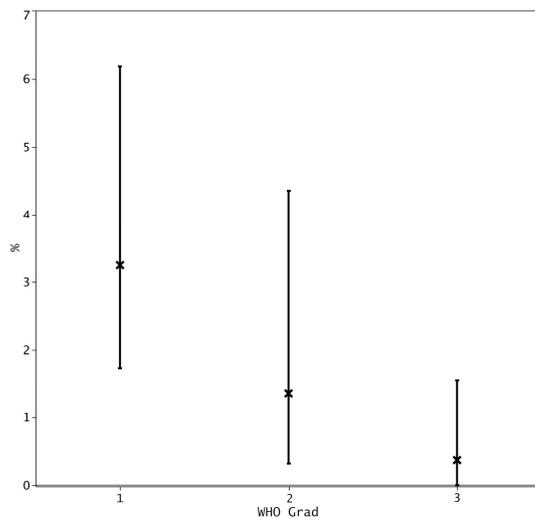


Abbildung 10: Die PgR Expression in Meningeomen des WHO Grad III ist signifikant niedriger als in Meningeomen des WHO Grad I.

Korrelation der Expression des PgR mit einer Hirninfektion

Es wurden 55 Fälle mit und 18 ohne Hirninfektion untersucht.

Bei Meningeomen ohne Hirninfektion lag der Mittelwert der PgR Expression bei 15,03 (95% CI: 8,70 bis 21,30) und war damit leicht niedriger als bei Tumoren mit Hirninfektion, hier lag der Mittelwert bei 18,77 (95% CI: 7,80 bis 29,70). Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0,5574. Im t-Test betrug die Differenz 0,589. Es zeigte sich somit kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Korrelation der Expression des PgR und Meningeomen mit Rezidiv

Es wurden 12 Meningeome ohne Rezidiv und 16 Meningeome mit Rezidiv untersucht. Bei Tumoren ohne Rezidiv lag der Mittelwert der PgR Expression bei 15,66 (95% CI: 1,18 bis 30,14) und war damit geringer als bei Tumoren mit Rezidiv. Hier lag der Mittelwert bei 18,18 (95% CI: 5,64 bis 30,72). Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0,7889, es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gesehen werden.

Korrelation der Expression des PgR mit der Rezidivanzahl

In den 21 untersuchten Fällen zeigte sich keine Korrelation zwischen der PgR Expression und der Rezidivanzahl. Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0,8461.

Korrelation von MIB-1 und der Expression des EpoR

Beim Vergleich von 74 Tumoren konnte keine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,2041$) zwischen der MIB-1 Expression und dem Mean Score des EpoR gefunden werden. Der Mittelwert von MIB-1 bei Tumoren des Mean Scores 1 betrug 1,86 (95% CI: -1,23 bis 4,94). Die anderen Mittelwerte betragen für den Mean Score 2 3,56 (95% CI: 2,10 bis 5,03) und für den Score 3 2,06 (95% CI: -0,67 bis 4,78).

Korrelation von MIB-1 mit der Altersverteilung

Es wurden 55 Patienten untersucht. Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0,9534. Die MIB-1 Expression war demnach altersunabhängig.

Korrelation von MIB-1 mit der WHO Klassifikation

Es wurden 74 Fälle verglichen. 56 (75,6 %) Meningeome exprimierten MIB-1. Am schwächsten war die MIB-1 Expression in Tumoren des WHO Grades I, der Mittelwert betrug 2,55 (95% CI: 1,40 bis 3,70) und stieg über Tumoren des WHO Grades II (der Mittelwert betrug hier 4,21 (95% CI: 2,11 bis 6,31) bis zur stärksten Expression in Tumoren des WHO Grades III mit einem Mittelwert von 6,34 (95% CI: 4,10 bis 8,52). Der Vergleich zwischen allen WHO Graden und der MIB-1 Expression war schwach signifikant ($p = 0,0405$), beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen WHO Grade gegeneinander jedoch, waren die Ergebnisse nicht mehr signifikant.

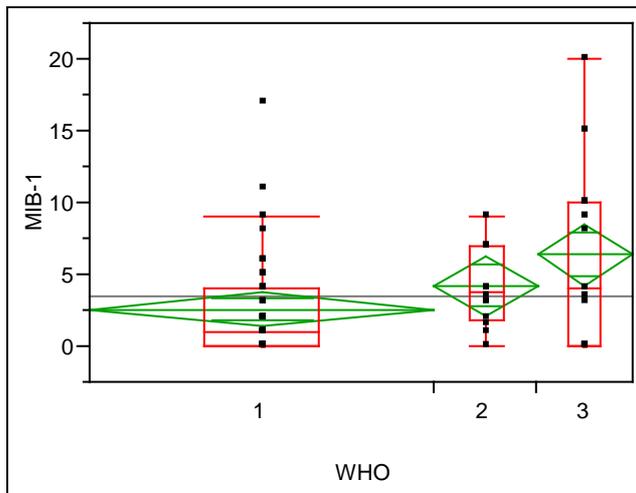


Abbildung 11: Die MIB-1 Expression in Abhängigkeit der WHO Grade

Korrelation von MIB-1 und einer Hirninfiltration

Es wurden 56 Fälle ohne und 16 mit Hirninfiltration untersucht. Hierbei hatte eine Hirninfiltration keinen signifikanten Einfluss auf das MIB-1 Expressionsmuster ($p = 0,7264$). Bei Tumoren ohne Hirninfiltration lag der Mittelwert bei 3,67 (95% CI: 2,50 bis 4,80). Bei Tumoren mit Hirninfiltration lag der Mittelwert bei 3,25 (95% CI: 1,14 bis 5,35). Im t-Test betrug die Differenz – 0,35.

Korrelation von MIB-1 und Meningeomen mit Rezidiv

Es wurden 12 Meningeome ohne Rezidiv und 17 Meningeome mit Rezidiv untersucht. Bei Tumoren ohne Rezidiv lag der Mittelwert der MIB-1 Expression bei 2,83 (95% CI: 0,44 bis 5,22) und war damit geringer als bei Tumoren mit Rezidiv. Hier lag der Mittelwert bei 3,82 (95% CI: 1,82 bis 5,83). Dies war aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,5199$).

Korrelation von MIB-1 und der Rezidivanzahl

Es wurden 21 Fälle untersucht dabei zeigte sich, dass Tumore mit einer höheren Rezidivanzahl MIB-1 signifikant häufiger exprimierten ($p = 0,0216$).

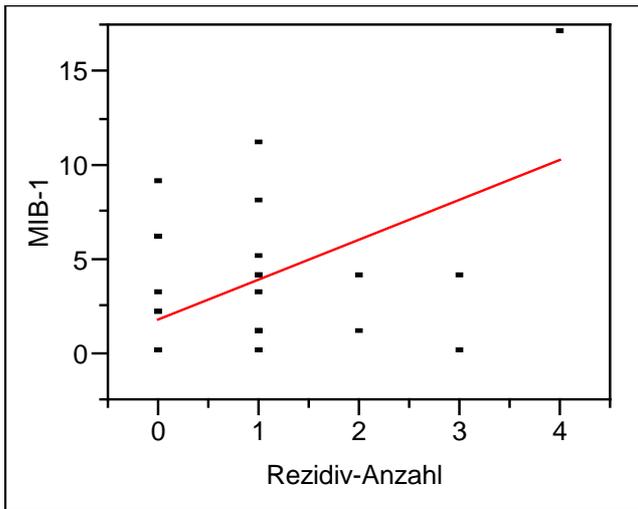


Abbildung 12: Die MIB-1 Expression in Korrelation mit der Rezidivanzahl

Korrelation des Alters mit einer Hirninfiltration

Es wurden 70 Fälle mit und 22 ohne Hirninfiltration untersucht. Das Alter von Patienten ohne Infiltration lag im Mittel bei 56,35 Jahren (95% CI: 52,60 bis 60,00). Das Alter von Patienten mit Infiltration lag im Mittel bei 62,81 Jahren (95% CI: 56,90 bis 68,60). Der p-Wert betrug in der Varianzanalyse 0.0809, im t-Test betrug die Differenz 1,765. Es zeigte sich ein Trend zu einer Hirninfiltration in höherem Alter, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

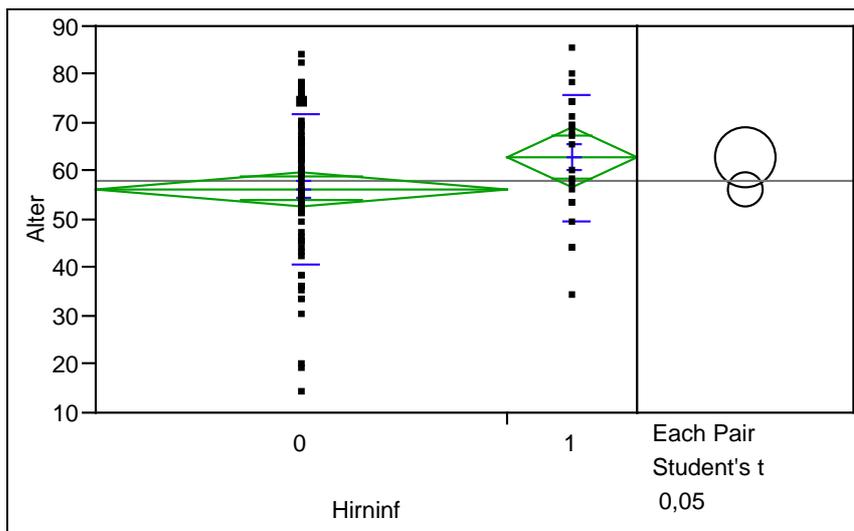


Abbildung 13: Hirninfiltration in Abhängigkeit des Alters

c. Ergebnisse des Western Blot

Der Western Blot zeigte für die 9 Tumorproben jeweils eine starke Bande um 60 kDa. Als Positivkontrolle wurde ein Wilms Tumor genommen, dessen Bande das stärkste Signal zeigte [Batra et al. 2003]. Zur Kontrolle wurde als „Housekeeping-Gene“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) gemessen. Ein Signal zeigte sich bis auf ein Sample bei allen Proben.

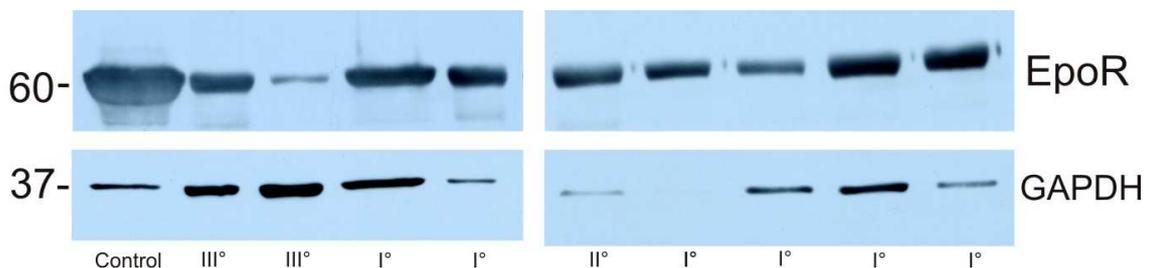


Abbildung 14: Immunoblot des EpoR mit Angabe der WHO Tumor Grade

- Lane 1: Probe 105, Wilms Tumor als Positivkontrolle;
- Lane 2: Probe 96, Meningeom WHO Grad III;
- Lane 3: Probe 95, Meningeom WHO Grad III;
- Lane 4: Probe 97, Meningeom WHO Grad I;
- Lane 5: Probe 103, Meningeom WHO Grad I;
- Lane 6: Probe 99, Meningeom WHO Grad II;
- Lane 7: Probe 100, Meningeom WHO Grad I; nicht auswertbar
- Lane 8: Probe 101, Meningeom WHO Grad I;
- Lane 9: Probe 102, Meningeom WHO Grad I,
- Lane 10: Probe 103, Meningeom WHO Grad I

d. Ergebnisse der RT-PCR

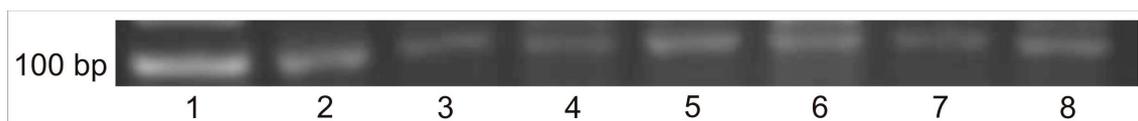


Abbildung 15: Die full length form EpoR-F bei 103 Basenpaaren.

- Lane 1: Marker
- Lane 2: Wilms Tumor als Positivkontrolle

Lane 3: Probe 97

Lane 4: Probe 100

Lane 5: Probe 101

Lane 6: Probe 103

Lane 7: Probe 104

Lane 8: Probe 102

Alles Meningeome des WHO Grad I.

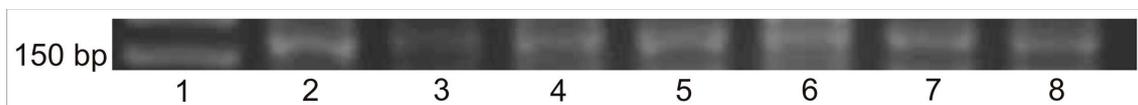


Abbildung 16: Die truncated Form EpoR-T bei 163 Basenpaaren

Lane 1: Marker

Lane 2: Wilms Tumor als Positivkontrolle

Lane 3: Probe 97

Lane 4: Probe 100

Lane 5: Probe 101

Lane 6: Probe 103

Lane 7: Probe 104

Lane 8: Probe 102

Alles Meningeome des WHO Grad I.

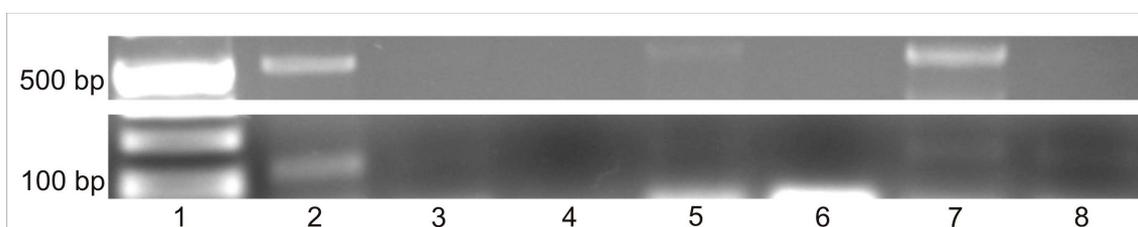


Abbildung 17: Die soluble Form EpoR-S bei 104 Basenpaaren als gesplice Isoform ohne Intron 4 und bei 482 Basenpaaren mit Intron 4.

Lane 1: Marker

Lane 2: Wilms Tumor als Positivkontrolle

Lane 3: Probe 97

Lane 4: Probe 100

Lane 5: Probe 101

Lane 6: Probe 103

Lane 7: Probe 104

Lane 8: Probe 102

Alles Meningeome des WHO Grad I.

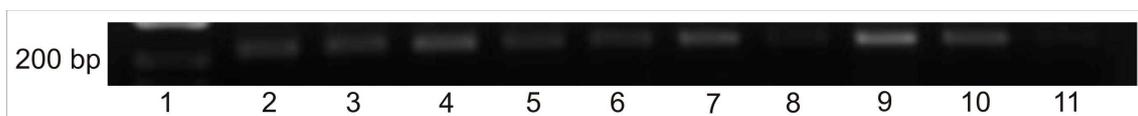


Abbildung 18: β -Actin als Kontrolle bei 209 Basenpaaren.

Lane 1: Marker

Lane 2: Probe 97

Lane 3: Probe 100

Lane 4: Probe 101

Lane 5: Probe 103

Lane 6: Probe 104

Lane 7: Probe 102

(Alles Meningeome des WHO Grad I)

Lane 8: Human Temporal Cortex

Lane 9: Glioblastom Positivkontrolle

Lane 10: Glioblastom Positivkontrolle

Lane 11: H₂O

Diskussion

e. Material und Methoden

Immunhistochemie

Zur Auswertung immunhistochemischer Färbungen gibt es in der Literatur keine einheitliche Vorgehensweise, denn eine einheitliche Auswertung ist aus folgenden Gründen nicht möglich: Die Immunhistochemie färbt je nach Primärantikörper unterschiedliche Strukturen - Zytoplasma, Kerne, Membranen – an, für die jeweils verschiedene Scores zur Auswertung notwendig sind. Desweiteren kann die Färbeintensität aufgrund der Fixationsdauer, der Schnittdicke und der Einbettung variieren. Somit muss für jeden Antikörper in Abhängigkeit der verwendeten Methoden die Auswertung individuell angepasst werden.

Für die nukleäre PgR- Färbungen finden sich teilweise semiquantitative Scores, wie beispielsweise in der Arbeit von Strik et al. die den prozentualen Anteil angefärbter Kerne, von 0 % bis > 50 % in einen gestuften Score mit Werten von 1 bis 4 einteilt, meistens wird jedoch der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Kerne direkt angegeben [Strik et al. 2002, Brandis et al. 1993, Hilbig et al. 1998, Khalid 1994, Nagashima et al. 1995]. Bei der nukleären MIB-1 Färbung hat sich eine prozentuale Angabe positiver Zellen bereits als Standard etabliert [Perry et al. 2007]. Für den EpoR hat sich aufgrund der diffus imponierenden zytoplasmatischen Anfärbung ein semiquantitativer Ansatz mit einem Score von 0 bis 3 für die Intensität der Färbung bewährt. Hierbei steht 0 für keine Färbung, 1 für eine schwache Färbung, 2 für eine moderate Färbung und 3 für eine intensive Färbung [Acs et al. 2003, Arcasoy et al. 2005, Mohyeldin et al. 2005]. Solch eines einfaches, reproduzierbares Scoringsystem für die Färbeintensität wurde in der aktuellen Arbeit ebenfalls eingesetzt. Dabei wurden die Präparate von mindestens zwei Beobachtern unabhängig ausgewertet und ein Mittelwert (Mean Score) gebildet, sofern die Abweichung nicht mehr als einen Scorepunkt überschritten wurde. Ein Mean Score von 3 steht hier für die stärkste mögliche Anfärbung, während ein Scorewert von 0 für negative Fälle vorgesehen ist. Da Meningeome ein pseudosyncytiales Zellmuster haben, stellte sich die Färbung

als überwiegend diffuses Muster mit vorwiegend zytoplasmatisch und membranöser Lokalisation des EpoR dar. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem in Literatur beobachteten Expressionsmustern [Yoshimura et al. 1990].

Verschiedene EpoR-Antikörper der Firma Santa Cruz wurden in einigen Publikationen als unspezifisch angesehen, da sie auch andere Proteine binden können, eines davon wurde mittels Sequenzanalyse als heat-shock protein 70 identifiziert [Elliott et al. 2006, Brown et al. 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein anderer monoklonaler Antikörper, sowohl für die Immunhistochemie als auch für den Western Blot, eingesetzt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale EpoR Antikörper, Klon 38409, der Firma R&D Systems verwendet. Mit dem monoklonalen EpoR Antikörper der Firma Upstate wurden für die Immunhistochemie zusätzlich Kontrollen gefärbt. Diese Kontrollen sahen mit den beiden Antikörpern gleich aus.

Western Blot

Die genaue Größe des EpoR bzw. seiner Isoformen sind derzeit noch Gegenstand der Diskussion. Mit einem Antikörper gegen den intracytoplasmatischen Carboxyterminalen Anteil des EpoR wurden 66 kDa große Banden detektiert. Der soluble EpoR wird von Arcasoy et al. als 26 kDa Bande beschrieben, in einer anderen Arbeit von Harris et al. wird dieser als 27 kDa groß angegeben. Der soluble EpoR-S wurde im ersten Falle in Überständen von Prostata- und Brustkrebszellen gefunden. Im zweiten Fall wurde er im Plasma eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden [Arcasoy et al. 2003, Harris et al. 1996, Jones et al. 1990].

Sawyer et al. vermuteten, dass alle EpoR Varianten durch unterschiedliche N-Glykolisierungen entstehen. Die funktionelle Form des EpoR schien in ihrer Arbeit ein 78 kDa großes Protein zu sein. Diese Form befand sich dabei in der Zellmembran, während die 62 bis 66 kDa Varianten cytoplasmatisch lokalisiert waren [Sawyer et al. 1993]. Der EpoR wird laut anderen Arbeiten in einer nicht glykolisierten 62 kDa Form und einer glykolisierten 64 kDa Form synthetisiert. Eine Fraktion der 64 kDa Variante werde zu einer 66 kDa Spezies prozessiert und nur wenig des EpoR auf der Zelloberfläche exprimiert [Yoshimura,

D'Andrea 1990]. Die 64 kDa und die 66 kDa Größenangaben wurden erst kürzlich mit dem gleichen Antikörper erneut angegeben [Verdier et al. 2000, Hamadmad et al. 2007].

Jedoch wurde die Spezifität der in den obigen Arbeiten verwendete Antikörper zum Teil angezweifelt. Zum einen wurde die kalkulierte Größe des Proteins bei 52.6 kDa berechnet [Sinclair et al. 2007], zum anderen wurden bei Verwendung eines anderen Antikörpers EpoR Peptid Sequenzen identifiziert, die ein 59 kDa großes Protein zeigten [Elliott et al. 2006, Brown et al. 2007], während in den 66 kDa-Varianten wohl eine Kreuzreaktivität mit HSP-70 stattfindet. Dementsprechend erfolgte die Auswahl des Antikörpers für den Western Blot in der aktuellen Arbeit, bei der eine Größe um 60 kDa gezeigt werden konnte. Es zeigten sich im Western Blot für alle Tumorproben jeweils eine Bande um 60 kDa, dabei war erwartungsgemäß die Bande für die Positivkontrolle am stärksten. Eine exakte Größenbestimmung des EpoR war mit unserem Blot nicht vorgesehen.

Sowohl die EpoR Isoform EpoR-F als auch die Isoform EpoR-T enthalten den extrazellulären Bereich, an den der Antikörper bindet der in der Immunhistochemie und im Immunoblot verwendet wurde [Nakamura et al. 1992]. Dies erklärt auch das Fehlen von zusätzlichen Banden für den EpoR-S im Immunoblot, dessen Größe wird zwischen 26 kDa und 27 kDa beschrieben ist [Arcasoy et al. 2003, Harris et al. 1996].

PCR

Um die Expression des EpoR auf RNA Ebene nachzuweisen wurde eine konventionelle RT-PCR von sechs exemplarischen Meningeomen des WHO Grades I gefahren. Dazu wurden, um alle drei bekannten Isoformen des Rezeptors, EpoR-F, EpoR-T und EpoR-S nachzuweisen, drei verschiedene Primerpaare konzipiert, welche in der Regel ein Intron umspannen, um eine mögliche Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass unterschiedliche Splicing-Formen mit den verwendeten Kombinationen auch unterschiedliche Fragmentgrößen ergeben, um diese auseinander halten zu können.

f. Progesteronrezeptor

Die Expression des PgR in Meningeomen ist in der Vergangenheit Gegenstand intensiver Untersuchungen gewesen. Die Zahl der PgR exprimierenden Meningeome reicht in immunhistochemischen Arbeiten von 58,3 bis 100 % [Brandis et al. 1993, Hilbig et al. 1998, Khalid 1994, Nagashima et al. 1995]. In unserer Arbeit konnte in 54,6% der Meningeome die Expression des PgR festgestellt werden.

Letztendlich ist die Bedeutung des PgR noch nicht endgültig geklärt, wenngleich vieles auf einen günstigen Effekt der Expression des PgR hindeutet: Demnach haben rezeptornegative Meningeome nach Brandis et al. eine schlechtere Prognose als PgR-positive Tumore. PgR-negative Tumore tendieren auch dazu größer zu sein [Brandis et al. 1993, Hsu et al. 1997]. Passend hierzu fehlt in anaplastischen Tumoren der PgR häufiger [Gabos et al. 1992]. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit:

Meningeome des WHO Grades I exprimierten hierbei in der aktuellen Studie den PgR signifikant häufiger als Meningeome des WHO Grades III ($p = 0,0169$), was für einen günstigen Effekt der Expression des PgR spricht. Es zeigte sich eine relativ gleichmäßige Abnahme über WHO Grad II Tumoren, bis hin zu den WHO Grad III Tumoren.

Tonn et al. wiesen zwischen Zellkulturen ohne PgR Expression und Zellen mit positiver Ki-67 Expression eine inverse Korrelation nach und folgerten, dass proliferierende Zellen kein PgR exprimieren [Tonn et al. 1997]. Dies würde mit einer Abnahme der PgR- Expression bei höhergradigen Tumoren bzw. Tumoren mit höherer Proliferationsrate in Einklang stehen. Die Größe des Tumors wurde bei unserer statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, so dass hierzu keine Aussagen gemacht werden können.

Viele Arbeiten beschäftigen sich mit einem möglichen Zusammenhang zwischen der Rezidivhäufigkeit und der PgR Expression in Meningeomen. PgR-positive Meningeome haben seltener ein Rezidiv [Fewings et al. 2000], bzw. Primärtumore des WHO Typ I mit einer reduzierten PgR Expression haben eine

signifikant höhere Chance für ein Rezidiv ($p = 0,01$) [Strik et al. 2002]. In unserer Arbeit konnten wir aufzeigen, dass die Rezidivanzahl mit stärkerer PgR Expression leicht, aber nicht signifikant sank ($p = 0,8461$), was tendenziell zu den Ergebnissen der Literatur passt.

Wir konnten in unserer Arbeit bezüglich der Frage, ob PgR positive Tumore häufiger ein Rezidiv haben, kein signifikantes Ergebnis nachweisen ($p = 0,5574$). Die Unterschiede lassen sich durch das heterogenere Patientenkollektiv erklären.

Die PgR Expression und die Proliferationsraten scheinen nicht altersabhängig zu sein [Roser et al. 2005]. Ähnliche Ergebnisse beobachteten wir in unserer Arbeit: Es zeigte sich zwar eine Tendenz, dass ältere Patienten eine höhere PgR-Expression aufwiesen, wenngleich die Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren ($p = 0,4103$). Damit deckt sich das Ergebnis mit den anderen Arbeiten. Zwischen einer Hirninfiltration des Tumors und der PgR Expression zeigte sich keine Korrelation ($p = 0,5574$). Somit scheint ein invasives Wachstum keinen Einfluss auf die Progesteronaktivität zu haben.

g. MIB-1

Da MIB-1 ein Wachstumsmarker ist, wird er bei vielen Tumoren als anerkannter Proliferationsmarker benutzt. Hsu et al. fanden heraus, dass eine MIB-1 Expression $> 3\%$ bei Meningeomen ein signifikanter Faktor für ein schlechteres Outcome ist. Bei Meningeomen des Grades I fanden sie einen MIB-1 Proliferationsindex von $0,75 \pm 0,21\%$, bei Tumoren des WHO Grades II von $3,2 \pm 0,57$ und beim WHO Grad III von $6,04 \pm 1,48$ [Hsu et al. 1998].

In der vorliegenden Arbeit wiesen die höheren WHO Grade deutlich mehr proliferative Zellen auf, als Meningiome mit WHO Grad I. Beim Vergleich aller WHO Grade mit der MIB-1 Expression zeigte sich eine schwache Signifikanz ($p = 0,0405$), beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen WHO Grade gegeneinander jedoch, waren die Ergebnisse nicht mehr signifikant. Der Mittelwert für WHO Grad I betrug $2,55$ (95% CI: 1,40 bis 3,70), für WHO Grad II $4,21$ (95% CI: 2,11 bis 6,31) und für den WHO Grad III betrug er $6,34$ (95% CI:

4,10 bis 8,52). Diese Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen aus der Literatur, die oben dargestellt wurden, gut vergleichbar.

Takeuchi et al. fanden eine statistisch signifikante Bedeutung der Ki-67 Expression für das Rezidivrisiko von benignen Meningeomen, wobei sie bei einem Proliferationsindex über 2 % eine postoperative Strahlentherapie empfehlen [Takeuchi et al. 1997]. Ein MIB-1 Index $\geq 4,2\%$ korrelierte stark mit einem abnehmenden Rezidivfreien Überleben [Perry et al. 1998]. Moeller et al. konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen rezidivierenden und nicht rezidivierenden Meningeomen beobachten, und messen daher Ki-67 in der Praxis einen geringen Stellenwert bei der prognostischen Aussage von Rezidiven bei Meningeomen zu [Moeller et al. 1997]. Vankalakunti et al. untersuchten 25 benigne rezidivfreie Meningeome und 15 benigne Rezidive. Der MIB-1 Index der rezidivfreien betrug $2.66 \pm 1.7\%$ war signifikant niedriger als der der Rezidive $4.21 \pm 2.78\%$ ($p = 0,0339$) [Vankalakunti et al. 2007]. Neben der Rezidivhäufigkeit wird die Ki-67 Expression von einzelnen Autoren auch für das Überleben relevant angesehen [Bruna et al. 2007]. In statistischen Analysen fanden Perry et al. eine prognostische Bedeutung für Ki-67 [Perry et al. 1999].

In unserer Arbeit zeigte sich, dass die MIB-1 Expression mit der Anzahl der Rezidive signifikant steigt ($p = 0,0216$). Im Vergleich zwischen Tumoren mit und Tumoren ohne Rezidiv, zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der MIB-1 Expression bei Tumoren mit Rezidiven, die aber nicht signifikant war ($p = 0,5199$). Bei Tumoren ohne Rezidiv lag der Mittelwert der MIB-1 Expression bei 2,83 (95% CI: 0,44 bis 5,22), bei Tumoren mit Rezidiv lag der Mittelwert bei 3,82 (95% CI: 1,82 bis 5,83). Weder eine Korrelation des MIB-1 mit dem Alter ($p = 0,9534$) noch mit einer Hirninfiltation ($p = 0,7264$) wurden in unseren Untersuchungen gesehen. Somit ist invasives Verhalten nicht durch die proliferative Aktivität des Tumors mitbestimmt.

Höhere MIB-1 Werte bei Meningeomen korrelieren demnach mit einem größeren Risiko für das Auftreten eines Rezidivs, wenngleich die Levels und verwendeten Zähltechniken zwischen den verschiedenen Studien beträchtlich variieren, [Louis et al. 2000], so dass Absolutwerte nur eine bedingte

Aussagekraft aufweisen und in den einzelnen Einrichtungen individuell ermittelt werden müssen.

Die Proliferationsrate hat allerdings bisher keinen Einfluss auf die WHO Gradierung, da die Streubreite der verschiedenen Arbeiten zu groß ist. Färbeergebnisse können von Institut zu Institut stark abweichen, da schon geringe Veränderungen der Vorbehandlungszeit in der Immunhistochemischen Färbung die Zahl der MIB-1 positiven Kerne variieren lässt. Deshalb ist bisher die zusätzliche Information des MIB-1 Wertes als gering einzustufen, wird jedoch in der Klinik im Zusammenhang mit Kontrolluntersuchungen bzw. vom Pathologen zur visuellen Bestätigung der histologischen Beurteilung eingesetzt.

Die signifikant häufigere Expression des PgR in Meningeomen des WHO Grades I verglichen mit dem WHO Grad III, als auch die stärkere Expression von MIB-1 in höhergradigen Meningeomen decken sich mit den Ergebnissen der Literatur, wie oben dargestellt. Dies weist darauf hin, dass sich mit den in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben valide und reliable Ergebnisse erzielen lassen und es lässt sich weiter die Schlussfolgerung daraus ableiten, dass die neu gewonnenen Ergebnisse unserer Arbeit bezüglich des Epo-Rezeptors (für die noch keine vergleichende Daten vorliegen) auch auf größere Tumorkollektive übertragbar sind.

h. Erythropoietinrezeptor

Obwohl 25 bis 30 % aller primären intrakraniellen Tumore zu den Meningeomen gehören [CBTRUS, 2007], gibt es bis jetzt keine Daten über die Expression des EpoR in Meningeomen. Wissenschaftliche Arbeiten zur Expression des Erythropoietinrezeptors in Meningeomen sind bislang auf einzelne Fallstudien beschränkt. Bruneval et al. entdeckten bei einem meningeotheliomathösen Meningeom, dass Epo von den Tumorzellen selbst produziert wird, während das Bindegewebe negativ blieb. Verwendet wurde eine Northern Blot Analyse mit Epo mRNA [Bruneval et al. 1993]. Einige wenige Fälle sind beschrieben, in denen Meningeome mit einer Erythrozythose assoziiert sind. Saint-Jean et al. wiesen dabei eine erhöhte Epo-Produktion in kultivierten Zellen des Tumors nach [Toyama et al. 1975, Saint-Jean et al. 1985, Sciborski et al. 1989].

Diese Erkenntnisse machen den EpoR auch für die neuropathologische Tumorforschung interessant. Informationen zu Expression des Erythropoetinrezeptors in vielen Neoplasien fehlen jedoch derzeit noch. So wurde in Meningeomen bisher weder in vitro, noch in vivo das Auftreten und die Bedeutung des EpoR untersucht.

Immunhistochemische Untersuchung des EpoR

In dieser Arbeit wurden erstmalig in vivo 94 Meningeome unterschiedlicher Dignitäten (WHO Grade I bis III), darunter Meningeome mit und ohne Hirninfiltrationen und Meningeome mit bekannten Tumorrezidiven auf ihre Expression des EpoR untersucht.

Immunhistochemisch zeigte sich in allen Meningeomen eine deutliche Expression des EpoR von unterschiedlicher Intensität. Vollständig negative Fälle, d.h. ein Fehlen einer EpoR Expression wurden nicht beobachtet.

Kollagenes Bindegewebe innerhalb des Tumors oder der Dura mater wurde ebenso wie Gefäßendothelien nicht mit angefärbt, was für eine Spezifität der verwendeten EpoR-Antikörper spricht. Auch lässt sich daraus ableiten, dass das Vorhandensein des EpoR auf ZNS Gewebe und die Tumorzellen beschränkt ist und von diesen aktiv generiert wird.

Die statistische Auswertung der ermittelten Expressionswerte zeigte eine signifikante negative Korrelation zwischen der EpoR Expression und Tumoren mit Rezidiv ($p = 0,0178$). Rezidivierende Tumore exprimierten den EpoR signifikant schwächer. Auch zwischen der Anzahl der Rezidive und der EpoR Expression wurde eine signifikante negative Korrelation beobachtet ($p = 0,0123$) je häufiger ein Tumor- Rezidiv vorkam, desto schwächer wurde der EpoR exprimiert. Somit könnte eine verminderte EpoR Expression ein Indiz dafür darstellen, dass die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv in diesem Fall höher einzustufen ist. Dass der EpoR sowohl in Meningeomen mit Rezidiv als auch mit steigender Anzahl von Rezidiven herunterreguliert wird, war zum Teil überraschend, da rhEpo in vitro für eine gesteigerte zelluläre Resistenz gegen Bestrahlung und Chemotherapie verantwortlich gemacht wird [Santucci et al.

1994, Belenkov et al. 2004]. Möglicherweise stellen diese Ergebnisse das in vivo Verhalten nicht gut genug dar oder zeigen ein gewebeabhängiges Expressionsverhalten des EpoR. Darauf deuten unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Tumorstudien zu EpoR hin. In Brustkrebs auslösenden Zellen wurde beobachtet, dass Epo- EpoR vermittelte Effekte das Tumorwachstum steigern [Phillips et al. 2007]. Ähnliches gilt für Kopf- Hals Tumoren. Obwohl statistisch nicht signifikant, war das Ergebnis in einer Placebo kontrollierten Gruppe abhängig vom Status der EpoR Expression und wurde von den Autoren auf unterschiedliche endogene Epo Level zurückgeführt [Henke et al. 2006]. Sartelet et al. zeigten in einer immunhistochemischen Untersuchung, dass eine stärkere EpoR Expression in Neuroblastomen mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben korreliert ($p = 0,03$), sie konnten aber ebensowenig eine Korrelation zwischen der EpoR Expression und dem WHO Tumor Grad finden, wie es auch in der aktuellen Arbeit beobachtet wurde Arbeit [Sartelet et al. 2007]. Auch papilläre Schilddrüsenkarzinome die den EpoR exprimierten waren mit einem besseren Ergebnis assoziiert, sie hatten seltener Rezidive ($p = 0.029$) [Eccles et al. 2003]. In unserer Arbeit zeigte sich weder eine Korrelation zwischen den WHO Tumorgraden und der EpoR Expression noch zwischen der EpoR Expression und einer Hirnfiltration ($p = 0,3722$). Die Expression des EpoR in Meningeomen war kein prognostisch positiver oder negativer Marker. Auch andere

Arbeiten die den EpoR in intracraniellen Tumoren untersuchten, wie die oben dargestellte von Sartelet et al., kamen zu dem Schluss, dass die Expression des EpoR in Neoplasien keine negativen Auswirkungen hat. In humanen Gliomen wurde beobachtet, dass die EpoR Expression mit stärkerer Malignität mit zunehmendem WHO Grad signifikant abfällt ($p = 0,0417$) und gleichzeitig positiv mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert [Mittelbronn et al. 2007]. Daher ist das Gesamtüberleben, das rezidivfreie Überleben und die Expression des EpoR gewebeabhängig und sollte für jeden Tumor individuell betrachtet werden.

Das Alter der Patienten und die EpoR Expression zeigten in dieser Arbeit keine Korrelation ($p = 0,95$). Obwohl Meningeome bei Frauen häufiger vorkommen

[Perry et al. 2007], ergab sich ebensowenig eine Korrelation zwischen der EpoR Expression und dem Geschlecht ($p = 0,3712$). Der Mittelwert des EpoR der männlichen Patienten betrug 2,10 (95% CI: 1,91 - 2,27). Bei den weiblichen Patienten betrug der Mittelwert 1,98 (95% CI: 1,83 - 2,13).

Untersuchung des EpoR mittels Western Blot

Um mit einer zusätzlichen Methode den EpoR auf Proteinebene nachzuweisen, wurde von 9 Meningeom-Tumorproben ein Western Blot durchgeführt. Alle untersuchten Proben zeigten eine deutliche Bande um 60 kDa. Die Expression in den Meningeomproben war schwächer im Vergleich zu einem Wilms Tumor, der als Positivkontrolle gewählt wurde, da der EpoR dort stark exprimiert wird [Batra et al. 2003, Kirschner et al. 2008]. Da die Fragestellung hierbei nur auf die Bestätigung der Expression an sich gezielt war, wurde hierzu keine statistische Auswertung durchgeführt.

Untersuchung des EpoR mittels PCR

Von EpoR sind derzeit 3 Isoformen bekannt. Die Full-length Form EpoR-F, die soluble Form EpoR-S und die truncated Form EpoR-T. Nach bisherigen Erkenntnissen ist EpoR-T die häufigste Form bei frühen erythroiden Vorläuferzellen, ihr fehlt der cytoplasmatische Rest. Die Isoformen EpoR-S und EpoR-T sind die im Knochenmark vorherrschenden Formen. Die soluble Isoform EpoR-S wird sezerniert und ist auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die Isoform EpoR-F ist auf Epo-abhängigen erythroleukemischen Zellen und in späten erythroiden Vorläuferzellen die vorherrschende Form [Nakamura et al. 1992, Boeckmann et al. 2003].

In unserer Arbeit konnten wir in Meningeomen mittels konventioneller PCR eine Expression von allen drei Isoformen des EpoR, EpoR-F, EpoR-T und EpoR-S beobachten. Dabei sahen wir prominente Banden bei 103 Basenpaaren für den EpoR-F. Ebenso beobachteten bei 163 Basenpaaren wir starke Banden für die truncated Form EpoR-T, während die Transkriptionsprodukte für den EpoR-S nur in zwei der sechs untersuchten Meningeome starke Banden zeigten. Die Banden erschienen bei 104 Basenpaaren als gesplicte Isoform ohne Intron 4

und zusätzlich wurde eine weitere Bande bei 482 Basenpaaren beobachtet, der Isoform mit Intron 4 entsprechend. Diese Ergebnisse passen zu der vornehmlich cytoplasmatischen und membranösen immunhistochemischen Lokalisation des Proteins.

Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigten die Reliabilität und die Validität der immunhistochemischen Ergebnisse. Sowohl der EpoR-F als auch der EpoR-T enthielten den extrazellulären Bereich, an den der Antikörper der in der Immunhistochemie und im Immunoblot verwendet wurde bindet [Nakamura et al. 1992].

Es wurde berichtet dass der soluble EpoR-S mit EpoR-F um Epo konkurrieren kann [Sakanaka et al. 1998]. Da wir EpoR-S Transkripte in Meningeomen mittels RT-PCR nachweisen konnten, kann spekuliert werden, dass der EpoR-S zu einer Tumor assoziierten Anämie beitragen könnte, die manchmal bei Patienten mit Meningeomen vorkommt., v.a. in Fällen mit Chordoiden Tumoren [Couce et al. 2000]. Ein sezernierter EpoR-S könnte prinzipiell Epo binden und somit regulierend in den Erythropoietinspiegel eingreifen, indem das EpoR-S-gebundene Epo nicht mehr für den Blutkreislauf zur Verfügung steht.

Auch andere Autoren dachten über die Auswirkungen des EpoR-S nach, so wäre es nach anderen Meinungen möglich, dass der soluble EpoR die Auswirkungen von exogenem rekombinanten humanen Epo beeinflusst [Arcasoy et al. 2003]. Die Injektion von solublen EpoR hemmt die Angiogenese und mindert das Tumorstadium [Hardee et al. 2007]. Bei Versuchen mit Gehirnen von Mäusen zeigte sich, dass der EpoR-S nach dreitägiger chronischer Hypoxie zu 62% herunterreguliert wird. Eine Infusion mit EpoR-S während der Hypoxie reduzierte die Konzentration von Epo im Gehirn [Soliz et al. 2007]. In einer Arbeit wurde beobachtet, dass die EpoR Expression in Lymphknotenmetastasen höher war als in primären Tumoren [Sartelet et al. 2007]. Hier wäre zu überlegen, ob hierbei der vom Primärtumor sezernierte EpoR-S eine Rolle spielen könnte.

Daraus ergeben sich interessanten Fragestellungen für nachfolgende Untersuchungen: Ist der EpoR-S im Serum vermehrt bei Patienten mit Anämie und ließe sich durch spezifische Rezeptorblockade des EpoR-S ein Rückgang einer Tumoranämie beobachten?

Desweiteren muss überlegt werden, in welchen Fällen EpoR-S hoch bzw. herunterreguliert wird. EpoR-S könnte vom Körper bei zuviel zirkulierendem Epo, sei es körpereigen oder exogen zugeführt, als Regulationsmechanismus hochreguliert werde. Dies wäre in einer klinischen Studie zu untersuchen bei einem Patientenkollektiv unter Epo Substitution.

Möglicherweise regulieren Erythrozytose assoziierte Tumore, wie das Meningeom, auch den EpoR-S hoch, um vor überschüssender Erythrozytose zu schützen.

In zukünftigen Arbeiten an Meningeom-Zellkulturen oder Tiermodellen wäre es daher interessant, zu untersuchen in wie weit exogen zugeführtes Epo mit allen drei Isoformen reagiert und wie der Einfluss des exogen zugeführten Epo auf das Expressionsmuster des Tumors ist. Das exogenen zugeführte Epo könnte, neben der folgenden gesteigerten Erythrozytose, vom solublen EpoR-S abgefangen werden und somit zum gewünschten Rückgang einer Anämie führen. Gleichzeitig könnte das exogene Epo an dem lokal exprimierten, zellulären EpoR-F oder EpoR-T wirken und dort eine Wirkung zeigen.

Nach Versuchen mit erythroiden Progenitor Zellen wurde postuliert, dass Apoptose durch ein Aminosäurereste- vermitteltes Signal inhibiert werden könnte. Diese Aminosäurereste kommen in der cytoplasmatischen Region, die in der Isoform EpoR-F vorhanden ist vor, während sie in der EpoR-T Variante fehlen. Dort kann die Apoptose normal ablaufen [Nakamura et al. 1992]. Da Meningeome ohne Rezidiv in unserer Arbeit den EpoR stärker exprimieren, könnte dies auch durch eine apoptotische, protektive Funktion des EpoR-T bedingt sein. Dafür müssten in folgenden Untersuchungen die Mengen der vorhandenen Isoformen z.B. mittels einer RT-PCR verglichen werden, um herauszufinden, welche Anteile überwiegen und die Funktionalität der drei Isoformen untersucht werden.

Prognostische Relevanz der gewonnenen Ergebnisse und Bedeutung für die Klinik

Derzeit ist der Einfluß von erythropoietinhaltigen Arzneimitteln auf verschiedene Neoplasien Gegenstand der Forschung und der wissenschaftlichen Diskussion. Mehrere Studien fassten kürzlich die bisherigen Ergebnisse zur Gabe von rekombinanten Epo bei Tumoranämie zusammen: Einerseits verbessert sich dadurch eine Tumor-, Chemo- bzw. Radiotherapie-assoziierte Anämie und es werden seltener Bluttransfusionen mit all ihren potentiellen Risiken gebraucht. Die Lebensqualität verbesserte sich und Überlebenszeiten verlängerten sich, Patienten mit hohen Hämoglobinwerten und einer Radiotherapie haben eine verbesserte Überlebensprognose. Ebenso wurden verbesserte immunologische Funktionen unter einer Epotherapie beobachtet. Andererseits wurden bei Brustkrebspatientinnen unter Epo-Behandlung höhere Mortalitätsraten beobachtet. Studien diskutierten eine Tumorzell- proliferative, eine anti-apoptotische und eine stimulierende Wirkung auf die Invasion von Tumorzellen durch Epo. Auch das Risiko für thrombembolische Ereignisse stieg unter einer Epo Behandlung [Guan et al. 2008, Melosky 2008]. Mehrere klinische Studien mit rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEpo) beobachteten auch eine gesteigerte Tumormortalitätsrate- und Tumorprogression [Leyland-Jones et al. 2005, Wright et al. 2007, Smith et al. 2008]. Offenbar können medikamentös induzierte Hb-Werte über 12 g/dl bei Malignompatienten das Tumorwachstum fördern. Da einige Studien auf ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, sowie auf ein erhöhtes Mortalitätsrisiko bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz hinweisen, wird es für erythropoietinhaltige Arzneimittel zukünftig zusätzliche Warnhinweise geben [Siegmund-Schultze, 2007]. Sartelet et al. untersuchten in Neuroblastomen das Expressionsverhalten zwischen Epo und dem EpoR und fanden dabei keine signifikante Korrelation. Die Gabe von Epo veränderte in ihrer in vitro Untersuchung mit Zellkulturen die Proliferation nicht, es kam zu keiner Tumorzellproliferation durch Gabe von Epo. Daraus wurde geschlossen, dass Epo und der EpoR möglicherweise eine Rolle in der Tumor Differenzierung spielen könne, aber nicht für die Proliferation von

neuroblastischen Tumorzellen verantwortlich ist [Sartelet et al. 2007]. Auch andere Studien zeigten, dass exogenes Epo keine proliferativen Effekte auf EpoR positive Tumorzell-Linien hat [Westphal et al. 2002, Berdel et al. 1991]. Für einen protektiven Effekt von Epo spricht weiterhin, dass Epo über den EpoR vermittelten Weg die Bluthirnschranke gegen eine durch VEGF (vascular endothelial growth factor) induzierte Permeabilität schützt und Zellverbindungen wiederherstellt [Martinez-Estrada et al. 2003].

Für die Ergebnisse unserer Arbeit ergibt sich nun die neue Fragestellung, ob oder wie die Gabe von Epo das Expressionsmuster des EpoR verändert, da dies die Indikationsstellung für die Epo-Gabe beeinflussen könnte. Ggf. müssten dann bei Patienten mit Meningeomen die Überwachung und die klinische Nachsorge mittels regelmäßigen bildgebenden Kontrollen und Kontrollen auch der Blutwerte, des Hämoglobinwertes und des Hämatokrits modifiziert werden.

Der EpoR-S könnte für eine Tumoranämie mitverantwortlich sein. Deshalb sollte untersucht werden, welche Rolle der EpoR-S in Meningeomen, wenngleich hier die Tumoranämie eine untergeordnete Rolle hat und in anderen Tumoren bezüglich der Entstehung einer Tumoranämie spielt. Ein sehr starkes Auftreten könnte für ein schlechteres Outcome mitverantwortlich sein.

Bezüglich der Abschätzung des Rezidivrisikos von Meningeomen und dem Einfluss der EpoR Expression wären weitere Studien wünschenswert, um zu sehen ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit wiederholen lassen und das EpoR Expressionsverhalten mit in die Prognosedagnostik mit einfließen sollte.

4. Zusammenfassung

Meningeome gehören mit 24 bis 30% zu den häufigsten primären intrakraniellen Tumoren. Sie sind überwiegend langsam wachsende, zumeist benigne Tumoren, die von den Deckzellen der Arachnoidea ausgehen. Die WHO Klassifikation teilt sie in WHO Grad I bis III ein. Rezidive bei Meningeomen kommen relativ häufig vor, die Rezidivrate von benignen Meningeomen liegt bei 7 bis 20 %, die von atypischen bei 29 bis 40 % und die von anaplastischen sogar bei 50 bis 78 %.

Daher ist es von Interesse, potentielle prognostische rezeptorassoziierte Faktoren zu untersuchen, um bessere Vorhersagen über das Rezidivverhalten zu ermöglichen. Eventuell sind solche Faktoren auch therapeutisch nutzbar. In den vergangenen Jahren wurde der EpoR in verschiedenen tumorösen Geweben nachgewiesen, in Meningeomen wurde der EpoR bisher nicht analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der EpoR mittels Immunhistochemie in 94 Meningeomen untersucht. Bei der Auswahl wurden die Alters-, die Geschlechts- und die Verteilung nach den WHO-Graden nach WHO Statistiken berücksichtigt. Die Untersuchungen zeigten erstmalig die Expression des EpoR auf Meningeomen. Auf Proteinebene wurde das Vorkommen des EpoR mit einem Western Blot exemplarisch bestätigt. Molekulargenetisch wurden die drei bisher bekannten Isoformen des EpoR, die vollständige Form EpoR-F, die gekürzte („truncated“) Form EpoR-T und die lösliche („soluble“) Form EpoR-S mittels konventioneller RT-PCR nachgewiesen. Während EpoR-F und der EpoR-T in allen Tumoren nachweisbar war, scheint EpoR-S nur in einzelnen Tumorproben vorhanden zu sein.

Die statistische Auswertung zeigte erstmalig, dass die Expression des EpoR in Meningeomen mit Rezidiven signifikant herunterreguliert ist ($p=0,0168$), d.h. rezidivierende Tumore exprimierten den EpoR weniger stark. Auch zwischen der Anzahl der Rezidive und der EpoR Expression wurde eine signifikante negative Korrelation beobachtet ($p=0,0123$). Je häufiger ein Tumor rezidierte, desto schwächer wurde der EpoR exprimiert. Daher wäre es interessant zu

untersuchen, ob die Bestimmung des EpoR als sinnvoller Parameter bei der Abschätzung für die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven bei Meningeomen gewertet werden könnte.

Zwischen dem Expressionsverhalten des EpoR, dem Alter, dem Geschlecht, dem WHO Grad und einer Hirninfiltration konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

Die Rollen der verschiedenen Isoformen des EpoR sind unklar. Möglicherweise hat der soluble EpoR-S eine Funktion in der Entwicklung einer Tumor-assoziierten Anämie inne. Er könnte sezerniert werden und somit Erythropoietin in der Blutbahn abfangen. Dafür müsste der EpoR-S in Kulturüberständen bestimmt und die Verhältnisse der einzelnen Isoformen zueinander müssten untersucht werden.

5. Anhang

Tabelle 1: Patientennummer, Geschlecht, Alter, WHO Grad, Hirninfiltration (0: ohne, 1: mit), EpoR Scores der zwei Untersucher und MeanScore.

Nr.	Geschl.	Alter	WHO Grad	Hirninfiltration	EpoR Score Untersucher 1	EpoR Score Untersucher 2	MeanScore
1	m	55	1	0	1	2	1,5
2	w	63	1	0	1	1	1
3	w	30	1	0	1	1	1
4	m	47	1	0	1	1	1
5	m	63	1	0	1	2	1,5
6	m	53	1	0	2	2	2
7	w	35	1	0	2	2	2
8	m	51	1	0	2	3	2,5
9	w	60	1	0	1	1	1
10	w	44	1	1	2	2	2
11	w	61	1	0	2	2	2
12	w	19	1	0	2	2	2
13	w	36	1	0	2	2	2
14	w	74	1	0	2	2	2
15	m	59	1	0	3	3	3
16	w	51	1	0	2	2	2
17	m	60	1	1	2	2	2
18	m	65	1	0	2	2	2
19	w	43	1	0	1	2	1,5
20	m	66	1	0	1	1	1
21	m	45	1	0	2	2	2
22	m	56	1	0	2	2	2
23	m	45	1	0	3	3	3
24	w	49	1	0	2	2	2
25	w	64	1	0	2	2	2
26	m	65	1	0	3	3	3
27	m	74	1	0	2	3	2,5
28	w	56	1	0	1	2	1,5
29	m	58	1	1	2	3	2,5
30	w	33	1	0	3	2	2,5
31	w	69	1	0	2	2	2
32	m	82	1	0	2	3	2,5
33	m	54	1	0	3	2	2,5
34	w	62	1	0	2	2	2
35	w	44	1	0	2	2	2
36	w	57	1	0	2	2	2
37	w	58	1	0	2	2	2
38	w	38	1	0	2	2	2
39	w	38	1	0	3	3	3
40	w	66	1	0	1	1	1
41	w	20	2	0	2	2	2
42	w	67	1	0	1	2	1,5
43	w	84	2	0	2	2	2
44	w	77	1	0	3	3	3
45	w	56	1	1	2	2	2

Nr.	Geschl.	Alter	WHO Grad	Hirnf	EpoR Score Untersucher 1	EpoR Score Untersucher 2	MeanScore
46	w	34	1	1	3	2	2,5
47	w	65	1	0	2	1	1,5
48	w	60	1	0	3	2	2,5
49	m	62	1	0	3	3	3
50	m	77	1	0	3	2	2,5
51	m	52	1	0	2	1	1,5
52	w	55	1	0	2	3	2,5
53	m	65	2	1	3	3	3
54	w	63	2	0	2	2	2
55	m	33	1	0	2	2	2
56	w	59	1	0	2	2	2
57	m	53	2	0	3	2	2,5
58	w	42	2	0	2	3	2,5
59	m	36	2	0	3	2	2,5
60	m	67	1	1	1	1	1
61	w	71	1	1	2	2	2
62	m	78	1	1	1	1	1
63	m	49	1	1	2	2	2
64	m	53	1	1	2	2	2
65	w	44	1	1	1	1	1
66	w	68	1	1	3	3	3
67	w	69	1	1	1	2	1,5
68	w	80	1	1	1	2	1,5
69	w	74	1	1	2	2	2
70	w	74	1	1	2	3	2,5
71	w	74	1	1	2	2	2
72	w	85	1	1	2	2	2
73	w	59	2	0	2	2	2
74	w	14	2	0	1	2	1,5
75	m	76	2	0	2	3	2,5
76	w	64	2	0	2	2	2
77	w	76	2	0	2	2	2
78	m	36	2	0	1	1	1
79	m	68	2	0	1	2	1,5
80	w	66	2	0	2	3	2,5
81	w	76	2	0	3	3	3
82	m	78	3	0	2	1	1,5
83	w	57	3	1	1	1	1
84	m	64	3	0	2	2	2
85	m	64	3	k.A.	2	2	2
86	m	17	3	k.A.	2	2	2
87	m	70	3	0	3	3	3
88	m	69	3	0	3	2	2,5
89	m	62	3	0	2	3	2,5
90	w	78	3	0	2	2	2
91	m	69	3	1	2	2	2
92	m	46	3	0	1	2	1,5
93	w	53	3	1	2	2	2
94	w	52	3	0	3	3	3

Tabelle 2: Patientennummer, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Operation, WHO Grad, prozentualer Anteil PgR- und MIB-1-positiver Tumorzellen.

Nr.	Geschl.	Alter	WHO Grad	PgR (%)	MIB-1 (%)
1	m	55	1	66	1
2	w	63	1	45	3
3	w	30	1	15	0
4	m	47	1	0	4
5	m	63	1	14	8
6	m	53	1	0	4
7	w	35	1	0	5
8	m	51	1	14	17
9	w	60	1	0	1
10	w	44	1	14	11
12	w	19	1	1	1
16	w	51	1	k.A.	1
17	m	60	1	1	0
18	m	65	1	60	0
19	w	43	1	52	1
20	m	66	1	5	4
23	m	45	1	0	0
24	w	49	1	1	2
25	w	64	1	0	6
26	m	65	1	33	0
27	m	74	1	0	6
28	w	56	1	0	9
29	m	58	1	0	0
30	w	33	1	0	0
31	w	69	1	79	3
34	w	62	1	0	0
36	w	57	1	33	6
39	w	38	1	42	2
41	w	20	2	0	7
42	w	67	1	0	2
43	w	84	2	9	3
44	w	77	1	36	2
45	w	56	1	k.A.	0
46	w	34	1	0	5
47	w	65	1	50	1
48	w	60	1	74	1
49	m	62	1	13	1
50	m	77	1	21	3
51	m	52	1	27	1
52	w	55	1	0	1
53	m	65	2	0	3
54	w	63	2	58	4
55	m	33	1	0	2
56	w	59	1	5	2
57	m	53	2	0	7
58	w	42	2	0	9
59	m	36	2	4	4
60	m	67	1	k.A.	1
61	w	71	1	5	k.A.

Nr.	Geschl.	Alter	WHO Grad	PgR (%)	MIB-1 (%)
62	m	78	1	30	k.A.
63	m	49	1	40	1
64	m	53	1	40	2
65	w	44	1	100	k.A.
66	w	68	1	15	k.A.
68	w	80	1	0	0
70	w	74	1	52	0
71	w	74	1	24	0
72	w	85	1	0	0
73	w	59	2	5	1,5
74	w	14	2	5	3,5
76	w	64	2	10	1
77	w	76	2	0	2
79	m	68	2	0	0
80	w	66	2	40	7
81	w	76	2	0	7
82	m	78	3	0	10
83	w	57	3	17	0
84	m	64	3	0	10
85	m	64	3	0	0
86	m	17	3	5,5	4
87	m	70	3	0	0
88	m	69	3	0	8
89	m	62	3	0	15
90	w	78	3	0	3
91	m	69	3	0	20
92	m	46	3	0	0
93	w	53	3	0	9
94	w	52	3	10	3,5

Tabelle 3: Prozentsatz MIB-1 positiver Tumorzellen

Nr.	Gesichtsfeld 1	Gesichtsfeld 2	Gesichtsfeld 3	MIB-1
2	2	5	1	3
3	0	0	0	0
4	4	7	0	4
5	8	10	5	8
6	7	0	4	4
7	8	0	7	5
8	8	16	27	17
10	13	8	11	11
20	8	0	5	4
23	0	0	0	0
24	3	0	2	2
25	0	10	9	6
27	4,5	9	3,5	6
28	9	6	11	9
29	0	1	0	0
30	0	0	0	0
31	3	4	1	3
34	0	0	0	0
36	9	8	1	6
39	3	2	1	2
41	8,5	7	5	7
42	1,3	2	2	2
43	2,8	2,5	3,2	3
44	0,87	1,5	2,8	2
45	0	0	0	0
46	3,5	10,7	1,1	5
47	2,5	1,7	0	1
48	1	1	1	1
49	1,2	1,2	1,5	1
50	2	4,5	2	3
51	2	0	0	1
52	1,8	1,5	0	1
53	5	2,5	1,1	3
54	4,3	5,5	2	4
55	1,4	1,7	1,5	2
56	2	3,5	0	2
57	5,5	5,1	10	7
58	7	12	9,3	9
59	4,1	6,1	1,1	4
68	0	0	0	0
70	0	0	0	0
71	1	0	0	0
72	0	0	0	0
76	2	0	1	1
77	3,6	1,3	0	2
79	0	0	0	0
83	0	0	0	0
84	11	8	10,8	10
85	0	0	0	0
86	6	2	5	4

Nr.	Gesichtsfeld 1	Gesichtsfeld 2	Gesichtsfeld 3	MIB-1
87	0	0	0	0
88	10	13	2	8
90	8	0	0,5	3
92	0	0	0	0
93	8,6	10,5	9	9

Tabelle 4: Prozentsatz PgR positiver Tumorzellen

Nr.	Gesichtsfeld 1	Gesichtsfeld 2	Gesichtsfeld 3	PgR
1	70	79	51	66
2	41	58	37	45
3	34	12	0	15
4	0	0	0	0
5	31	7	5	14
6	0	0	0	0
8	15	24	3	14
10	24	16	2	14
18	75	40	64	60
19	50	54	53	52
20	14	0	1	5
23	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	38	18	43	33
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	77	78	81	79
36	21	56	23	33
39	58	24	43	42
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	13,3	2,5	11,8	9
44	36	53	18	36
46	0	0	0	0
47	59	43	50	50
48	55	82	85	74
49	11,1	16	13	13
50	30	7,5	25	21
51	12,1	33,3	34,3	27
52	0	0	0	0
53	0	0	0	0
54	66,6	57,4	50	58
55	0	0	0	0
57	0	0	0	0
58	0	0	0	0
59	2,8	8,9	0	4
68	0	0	0	0
70	51,6	70,1	34,1	52
71	36	23	13	24
72	0	0	0	0
82	0	0	0	0

Nr.	Gesichtsfeld 1	Gesichtsfeld 2	Gesichtsfeld 3	PgR
83	52	0	0	17
84	0	0	0	0
85	0	0	0	0
86	16,3	0	0	5,5
87	0,5	0	0	0
88	0	0	0,5	0
89	0	0	0	0
90	0	0	0	0
92	0	0	0	0
93	0	0	0	0

Tabelle 5: Patientennummer, WHO Tumor Grad, EpoR Score, Rezidiv (0: Kein Rezidiv, 1: Rezidiv), Rezidivanzahl.

Nr.	WHO Grad	EpoR MeanScore	Rezidiv	Rezidiv-Anzahl
1	1	1,5	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	3
4	1	1	1	2
5	1	1,5	1	1
6	1	2	1	3
7	1	2	1	1
8	1	2,5	1	4
9	1	1	1	2
10	1	2	1	1
11	1	2	1	1
12	1	2	1	1
13	1	2	1	1
14	1	2	1	1
15	1	3	1	1
16	1	2	1	1
17	1	2	1	1
18	1	2	1	1
19	1	1,5	1	1
20	1	1	1	1
21	1	2	0	0
22	1	2	0	0
23	1	3	0	0
24	1	2	0	0
25	1	2	0	0
26	1	3	0	0
27	1	2,5	0	0
28	1	1,5	0	0
29	1	2,5	0	0
30	1	2,5	0	0
31	1	2	0	0
32	1	2,5	0	0
33	1	2,5	0	0
34	1	2	0	0
35	1	2	0	0
36	1	2	0	0
37	1	2	0	0
38	1	2	0	0
39	1	3	0	0
40	1	1	0	0
59	2	2,5	1	1

Tabelle 6: Meningeome und Wilms Tumor (Positivkontrolle) die für den Western Blot verwendet wurden.

Nr.	Konz. Prot.	Menge benötigt für 20 µg	WHO Grad	Hirninfl	Rezidiv	Geschl	Alter	Subtyp
95	3,66	5,46	3	k.A.	1	m	49	Rhadoid
96	4,19	4,77	3	k.A.	0	m	51	Rhabdoid
97	2,24	8,91	1	k.A.	1	w	64	Angiomatös
98	4,43	4,52	1	0	0	w	41	Meningeotheliomathös
99	5,11	3,91	2	1	0	m	54	Atypisch
100	3,43	5,83	1	0	0	w	50	Meningeotheliomathös
101	5,95	3,36	1	k.A.	k.A.	w	79	Meningeotheliomathös
102	6,79	2,94	1	k.A.	0	w	72	Meningeotheliomathös
103	4,13	4,85	1	k.A.	0	w	56	Angiomatös
105	1,78	11,24	Wilms Tumor					

Tabelle 7: Meningeome die für die konventionelle RT-PCR verwendet wurden

Nr.	cDNA ng/µl	Ratio 260/280
97	55,1	1,97
100	57	1,74
101	316,4	1,93
103	136,5	1,92
104	248,5	1,9
102	177,8	1,94

Tabelle 8: Meningeome die für die Real Time RT-PCR verwendet wurden

Nr.	cDNA ng/µl	Ratio 260/280
41	555,5	1
42	30,5	1,32
43	26,4	1,37
44	90,5	1,35
45	241	1,68
46	39,5	1,27
47	295	1,59
48	84,5	1,29
49	23,5	1,22
50	48,5	1,3
51	27,5	1,36
52	45	1,29
53	432,5	1,05
54	48,8	1,34
55	30	1,32
56	29	1,32
57	70	1,37
58	79	1,3
59	575	1,04

6. Literaturverzeichnis

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

Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. 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.* 2003;162(6):1789-1806.

Adebite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg.* 1983;58(1):51-6.

Ammarguella F, Gogusev J, Drueke TB. Direct effect of erythropoietin on vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:687-692.

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3974-3978.

Arcasoy MO, Amin K, Vollmer RT, Jiang X, Demark-Wahnefried W, Haroon ZA. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human prostate cancer. *Mod Pathol.* 2005;18(3):421-430.

Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 8;307(4):999-1007.

Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest.* 2003;83(10):1477-1487.

Berdel WE, Oberberg D, Reufi B, Thiel E. Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro. *Ann Hematol.* 1991;63(1):5-8.

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

Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Counoyer D, Belzile JP, Souhami L, Devic S, Chow T Y.K. Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2004; 3(12):1525-32.

Bianchi, R., Brines, M., Lauria, G., Savino, C., Gilardini, A., Nicolini, G., Rodriguez-Menendez, V. et al., Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental Cisplatin peripheral neurotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 2006. 12:2607-2612.

Black P, Carroll R, Zhang J. The molecular biology of hormone and growth factor receptors in meningiomas. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;65:50-53.

Blankenstein MA; Verheijen FM, Jacobs JM, Donker TH, van Duijnhoven MW, Thijssen JH. Occurrence, regulation, and significance of progesterone receptors in human meningioma. *Steroids.* 2000; 65(10-11):795-800.

Boenisch T, Herausgeber. Handbuch Immunchemische Färbemethoden. Dako Deutschland GmbH, Hamburg 2006.

Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. The Swiss-Prot Protein Knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* 31:365-370(2003). The UniProt Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 35:D193-D197(2007).

Bondy M, Ligon BL. Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: a review. *J Neurooncol.* 1996; 29(3):197-205.

Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptor in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery.* 1993; 33:212-217.

Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR. Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cells.* 2007; 25(3):718-722.

Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology.* 2007;27(2):114-20.

Bruneval P, Sassy C, Mayeux P, Belair MF, Casadevall N, Roux FX, Varet B, Lacombe C. Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningeoma associated with erythrocythosis. *Blood* 1993;81:1593-1597.

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993; 1312-1316.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1992; 168 (4): 357-63.

Central Brain Tumor Register of the United States (2007): <http://www.cbtrus.org/reports//2007-2008/2007report.pdf>. Daten vom 14. August 2008.

Couce ME, Aker FV, Scheithauer BW. Chordoid meningioma: a clinicopathologic study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 899-905.

Cushing. The meningiomas (dural endotheliomas): Their source and favoured seats of origin. *Brain* 1922: 45: 282-316.

Cushing H, Eisenhardt L. Meningiomas: Their classification, regional behavior, life history and surgical results. Thomas Springfield (1938).

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

Donnell MS, Meyer GA, Donegan WL. Estrogen-receptor protein in intracranial meningiomas. *J Neurosurg.* 1979; 50(4):499-502.

Eccles TG, Patel A, Verma A, Nicholson D, Lukes Y, Tuttle RM, Francis GL. Erythropoietin and the erythropoietin receptor are expressed by papillary thyroid carcinoma from children and adolescents. Expression of erythropoietin receptor might be a favorable prognostic indicator. *Ann Clin Lab Sci.* 2003;33(4):411-422.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002;8(8):495-505.

Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood.* 2006 ;107(5):1892-1895.

Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist.* 2004;9 (Suppl. 5):18-30.

Fewings PE, Battersby RD, Timperley WR. Long term follow up of progesterone receptor status in benign meningioma: a prognostic indicator of recurrence? *J Neurosurg.* 2000; 92:401-405.

Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991;11(2):476-7.

Fritz J, Roser F, Tatagiba M, Bornemann A. The basement membrane at the tumour-brain interface of brain-invasive grade I meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31(3):339-342.

Gabos S, Berkel J. Meta-analysis of progestin and estrogen receptors in human meningiomas. *Neuroepidemiology.* 1992; 11:255-260.

Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 2004;1000(1-2):19-31.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-1715.

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med.* 2002;8:718-724.

Guan X, Chen L. Role of erythropoietin in cancer-related anaemia: a double-edged sword? *J Int Med Res.* 2008;36(1):1-8.

Hamadmad SN, Hohl RJ. Lovastatin suppresses erythropoietin receptor surface expression through dual inhibition of glycosylation and geranylgeranylation. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(4):590-600.

Hamed, S., Barshack, I., Luboshits, G., Wexler, D., Deutsch, V., Keren, G. and George, J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur. Hear. J.* 2006. 27: 1876–1883.

Hardee ME, Cao Y, Fu P, Jiang X, Zhao Y, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Arcasoy MO. Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. *PLoS ONE.* 2007;2(6):e549.

Harris KW, Winkelmann JC. Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma. *Am J Hematol.* 1996;52(1):8-13.

Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP. Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg.* 1991; 75:564-574.

Henke M, Mattern D, Pepe M, Bézay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F. Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4708-4713

Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arg Neuropsiquiatr.* 1998;56(2):193-199.

Hsu DW, Efid JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg.* 1997; 86:113-120.

Hsu DW, Efid JT, Hedley-Whyte ET. MIB-1 (Ki-67) index and transforming growth factor-alpha (TGF alpha) immunoreactivity are significant prognostic predictors for meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24(6):441-52.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-580.

Hug EB, Devries A, Thornton AF, Munzenrider JE, Pardo FS, Hedley-Whyte ET, Bussiere MR, Ojemann R. Management of atypical and malignant meningiomas: role of high-dose, 3D-conformal radiation therapy. *J Neurooncol.* 2000;48(2):151-160.

Jääskeläinen J. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol.* 1986;26(5):461-469.

Jääskeläinen J, Haltia M, Laasonen E, Wahlström T, Valtonen S. The growth rate of intracranial meningiomas and its relation to histology. An analysis of 43 patients. *Surg Neurol.* 1985; 24:165-172.

W. Jelkmann. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.* 72 (1992) 449– 489.

Jones S, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood.* 1990;76(1):31-35.

Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathl.* 1999; 2: 148-158.

Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K, Toshima M, Ando T, Koizumi K, Endoh T, Sawada K, Momoi M, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood.* 2000;96:941-949.

Khalid H. Immunohistochemical study of estrogen receptor-related antigen, progesterone and estrogen receptors in human intracranial meningiomas. *Cancer.* 1994;74(2):679-85.

Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, Ballmaier M, Scholz H, Dame C. The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *FASEB J.* 2008; 22: 2690-2701.

Knabe W, Knerlich F, Washausen S, Kietzmann T, Sirén AL, Brunnett G, Kuhn HJ, Ehrenreich H. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anat Embryol (Berl).* 2004;207(6):503-12.

Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, Zang KD, Feiden W. Triple approach for diagnostics and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien).* 1995; 137:174-181.

Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res.* 1993;609(1-2):29-35.

Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 1999;72(6):2565-2572.

Kostron H, Daxenbichler G, Maier H. Steroid receptors and atypical histology as prognostic parameters in meningioma. *Wien Klin Wochenschr.* 1990 ;102:525-528.

Ku H, Hirayama F, Kato T, Miyazaki H, Aritomi M, Ota Y, D'Andrea AD, Lyman SD, Ogawa M. Soluble thrombopoietin receptor (Mpl) and granulocyte colony-stimulating factor receptor directly stimulate proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice in synergy with steel factor or the ligand for Flt3/Flk2. *Blood.* 1996;88(11):4124-4131.

Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, Kim HY, Yoon DY, Hong JT. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(4):1087-1095.

Lekanne D, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeyer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJ, Kley N. Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet.* 1994; 54:1022-1029.

Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. 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.* 2005; 23: 5960-5972

Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie, Kapitel 4: Bioenergetik und Enzymologie, Kapitel 7: Replikation und Gentechnik, Kapitel 25: Enzyme, Kapitel 28: Endokrine Funktionen II: Zytokine, Kapitel 30: Endokrine Funktionen IV: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgebiet, Kapitel 31: Funktion der Nieren und Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2003.

Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A. Meningiomas. In: P. Kleihues, P.C. Burger, B.W. Scheithauer, eds. World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System.* Lyon, France: IARC Press 2007 pp. 164–171.

Mack EE, Wilson CB. Meningiomas induced by high-dose cranial irradiation. *J Neurosurg*. 1993; 79:28-31.

Mahmood A, Qureshi NH, Malik GM. Intracranial meningiomas: analysis of recurrence after surgical treatment. *Acta Neurochir (Wien)*. 1994;126(2-4):53-58.

Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classical, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg*. 1992; 77:616-623.

Martinez-Estrada OM, Rodriguez-Millan E, Gonzalez-De Vicente E, Reina M, Vilaro S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci*. 2003;18(9):2538-2544.

Melamed S, Sahar A, Beller AJ. The recurrence of intracranial meningiomas. *Neurochirurgia*. 1979; 22: 47-51.

Melosky BL. Erythropoiesis-stimulating agents: benefits and risks in supportive care of cancer. *Curr Oncol*. 2008;15(Supplement 1):S10-5.

Milosevic MF, Frost PJ, Laperriere NJ, Wong CS, Simpson WJ. Radiotherapy for atypical or malignant intracranial meningioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;34(4):817-22. Review.

Mittelbronn M, Capper D, Bunz B, Dietz K, Goeppert B, Ajaaj R, Tabatabai G, Stubenvoll F, Schlaszus H, Merseburger AS, Becker R, Freudenstein D, Wick W, Weller M, Meyermann R, Simon P. De novo erythropoietin receptor (EPO-R) expression in human neoplastic glial cells decreases with grade of malignancy but is favourable associated with patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33:299-307.

Mittelman M, Zeidman A, Kanter P, Katz O, Oster H, Rund D, Neumann D. Erythropoietin has an anti-myeloma effect - a hypothesis based on a clinical observation supported by animal studies. *Eur J Haematol*. 2004. 72: 155–165.

Moeller ML, Braendstrup O. No prediction of recurrence of meningiomas by PCNA and Ki-67 immunohistochemistry. *J Neurooncol*. 1997;34(3):241-246.

Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, Lai SY, Cohen N, Acs G, Verma A. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2005;7(5):537-43.

Müller M. Chirurgie für Studium und Praxis. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste 8. Auflage 2006.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

Musa BS, Pople IK, Cummins BH. Intracranial meningiomas following irradiation-a growing problem? *Br J Neurosurg.* 1995; 9:629-637.

Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *JNeuropathol Exp Neurol.* 2001;60:386-392.

Nagashima G, Aoyagi M, Wakimoto H, Tamaki M, Ohno K, Hirakawa K. Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Neurosurgery.* 1995;37(3):478-82; discussion 483.

Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science.* 1992;257(5073):1138-1141.

Neumann D, Wikstrom L, Watowich SS, Lodish HF. Intermediates in degradation of the erythropoietin receptor accumulate and degraded in lysosomes. *J Biol Chem.* 1993;268:13639-13649.

Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem.* 2000;275:39754-39761.

Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, Bigozzi U. Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet.* 1995; 95: 347-351.

Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI, Bouzas EA, Pikus A, Patronas N. Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1994;52(4):450-461.

Perry A. Meningiomas. In: R.E. McLendon, M.K. Rosenblum, D.D. Bigner, eds. *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System.* 7. ed. - London : Hodder Arnold, 2006.

Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW. Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer.* 1996; 77:2567-2573.

Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC. „Malignancy“ in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer.* 1999; 85:2046-2056.

Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21:1455-1465.

Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer*. 1998;82(11):2262-9.

Phillips TM, Kim K, Vlashi E, McBride WH, Pajonk F. Effects of recombinant erythropoietin on breast cancer-initiating cells. *Neoplasia*. 2007;9(12):1122-1129

Rades D, Golke H, Schild SE, Kilic E. 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*. 2008; 71: 152-159

Rausing A, Ybo W, Stenflo J. Intracranial meningioma – a population study of ten years. *Acta Neurol Scand*. 1970; 46:102-110.

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

Roser F, Nakamura M, Ritz R, Bellinzona M, Dietz K, Samii M, Tatagiba MS. Proliferation and progesterone receptor status in benign meningiomas are not age dependent. *Cancer*. 2005;104(3):598-601.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86.

Saint-Jean O, Boffa GA, Bouchon JP, Verret J. Secondary polycythemia with hypererythropoietinemia. Supratentorial meningioma. *Rev Neurol (Paris)*. 1985;141:143-145.

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

Santucci MA, Pierce JH, Zannini S, Fortuna A, Frezza G, Babini L, Rosenstein MM, Greenberger JS. Erythropoietin increases the radioresistance of a clonal hematopoietic progenitor cell line expressing a transgene for the erythropoietin receptor. *Stem Cells*. 1994;12(5):506-513.

Sartelet H, Fabre M, Castaing M, Bosq J, Racu I, Lagonotte E, Scott V, Lecluse Y, Barette S, Michiels S, Vassal G. Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas. *Cancer*. 2007;110(5):1096-1106.

Sawyer ST, Hankins WD. The functional form of the erythropoietin receptor is a 78-kDa protein: correlation with cell surface expression, endocytosis, and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(14):6849-6853.

Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood*. 1989;74:103-109.

Schittenhelm J, Beschorner R, Simon P, Tabatabai G, Herrmann C, Schlaszus H, Capper D, Weller M, Meyermann R, Mittelbronn M. Diagnostic value of WT1 in neuroepithelial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008.

Schneider BF, Shashi V, von Ka-herr C, Golden WL. Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas. A comparative study of fluorescence in situ hybridisation (FISH) and standard cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 85:101-104.

Schoenberg BS, Christine BW, Whisnant JP. Nervous system neoplasms and primary malignancies of other sites. The unique association between meningiomas and breast cancer. *Neurology*. 1975;25:705-712.

Schrell UM, Nomikos P, Schrauzer T, Anders M, Marschalek R, Adams EF, Fahlbusch R. Hormonal dependency of cerebral meningiomas. *Acta Neurochir Suppl*. 1996;65:54-57. Review.

Sciborski R, Gabryś K. [Secondary erythrocytosis in 3 cases of neoplastic disease] *Pol Arch Med Wewn*. 1989;81(2):114-119.

Selzer E, Wacheck V, Kodym R et al. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res*. 2000;10:421-426.

Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*. 1999; 274: 22165-22169.

Siegmund-Schultze N. Neue Warnhinweise für Epo. (*Deutsches Aerzteblatt* 2007, Heft 51-52, p. 3000, 2007 Dec 24)

Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):22-39.

Sinclair AM, Todd MD, Forsythe K, Knox SJ, Elliott S, Begley CG. Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer*. 2007;110(3):477-488. Review.

Smith RE Jr, Aapro MS, Ludwig H, Pintér T, Smakal M, Ciuleanu TE, Chen L, Lillie T, Glaspy JA. Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with active cancer not receiving chemotherapy or radiotherapy: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 1040-1050.

Soliz J, Gassmann M, Joseph V. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol.* 2007;583(Pt 1):329-36. Epub 2007 Jun 21. Erratum in: *J Physiol.* 2007 Oct 15;584(Pt 2):709.

Southern EM, Mitchell AR. Chromatography of nucleic acid digests on thin layers of cellulose impregnated with polyethyleneimine. *Biochem J.* 1971;123(4):613-617.

Strik HM, Strobelt I, Pietsch-Breitfeld B, Iglesias-Rozas JR, Will B, Meyermann R. The impact of progesterone receptor expression on relapse in the long-term clinical course of 93 benign meningiomas. *In Vivo.* 2002;16(4):265-270.

Stuben G, Thews O, Pottgen C, Knuhmann K, Sack H, Stuschke M, Vaupel P. Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. *Strahlenther Onkol.* 2003;179(9):620-625.

Takeuchi H, Kubota T, Kabuto M, Kitai R, Nozaki J, Yamashita J. Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg Neurol.* 1999;48(5):501-506.

Tonn JC, Ott MM, Bouterfa H, Kerkau S, Kapp M, Müller-Hermelink HK, Roosen K. Inverse correlation of cell proliferation and expression of progesterone receptors in tumor spheroids and monolayer cultures of human meningiomas. *Neurosurgery.* 1997 Nov;41(5):1152-1159.

Toyama K, Fujiyama N, Chen TP, Nazazawa K, Suzuki H, Hasegawa M, Ueda M, Toya S: Erythrocytosis associated with various tumors: With a case report of meningioma associated with erythrocytosis, In Nakao K, Fisher JW, Takaku F (eds): Erythropoiesis. Proceedings of the Fourth International Conference on Erythropoiesis. Tokyo, Japan, University of Tokyo, 1975, p 435.

Tasi PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci.* 2006;26(4):1269-1274.

Vankalakunti M, Vasishta RK, Das Radotra B, Khosla VK. MIB-1 immunolabeling: a valuable marker in prediction of benign recurring meningiomas. *Neuropathology.* 2007;27(5):407-412.

Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem.* 2000 ;275(24):18375-18381.

Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the

neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol.* 1995; 146:827-832.

Weller M, Bamberg M, Belka C, Bornemann A, Brugger W, Demuth K, Ernemann U, Ganswindt U, Handgretinger R, Herrlinger U, Honegger J, Hopf N, Huss G, Kaminsky J, Paulsen F, Ritz R, Schabet M, Schmidt B, Scheel-Walter H-G, Söklér M, Steinbach JP, Tatagiba M, Wick W, Wilhelm H. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Primäre Hirntumoren und ZNS-Metastasen. Südwestdeutsches Tumorzentrum 2006; 32-34.

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

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

Wright JR, Ung YC, Julian JA, Pritchard KI, Whelan TJ, Smith C, Szechtman B, Roa W, Mulroy L, Rudinskas L, Gagnon B, Okawara GS, Levine MN. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1027-1032

Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J.* 2003; 17: 1754-1755.

Yet MG, Jones SS. The extracytoplasmic domain of the erythropoietin receptor forms a monomeric complex with erythropoietin. *Blood.* 1993;82(6):1713-1719.

Yoshimura A, D'Andrea AD, Lodish HF. Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4139-4143.

Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT, Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development.* 2002;129(2): 505–516.

Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 1982; 6:249-274.

Zankl H, Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in humane meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetic.* 1972; 14:167-169.

Danksagungen

Mein Dank gilt ..

..Herrn Prof. Dr. med. R. Meyermann für die Überlassung des Themas, die beispielhaften Arbeitsbedingungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut für Hirnforschung,

..meinem Betreuer Dr. med. Jens Schittenhelm, für die exzellente Betreuung, die methodischen Einführungen, die vielen Gespräche, seinen Rat, seine Geduld, seine Freundschaft und für seine große Unterstützung nicht nur bei der Doktorarbeit sondern auch darüber hinaus!

..Herrn PD Dr. med. Michel Mittelbronn,

..Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon,

..Herrn PD Dr. med. Rudi Beschorner,

..Frau Dr. med. Ghazaleh Tabatabai,

..Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dietz,

..Herrn Dr. med. David Capper,

..Herrn Dr. med. Georgios Pantazis,

..Frau Prof. Dr. med. Antje Bornemann,

..Herrn Thomas Beiter,

..Frau Caroline Herrmann.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Hirnforschung, darunter besonders Katrin Trautmann, Thai Dung Nguyen, Wilma Ott und Gudrun Albrecht.