

**Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie
der Universität Tübingen
Abteilung für Neuropathologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann**

**Expressionsanalyse von CD166 (ALCAM)
in glialen Tumoren des ZNS**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Olga Allmendinger
aus
Stuttgart- Bad Cannstatt**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Tatagiba

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	10
1.1. Gliale Tumore des zentralen Nervensystems	10
1.2. Klassifikation von Gliomen.....	10
1.2.1. WHO-Grad I.....	11
1.2.1.1. Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I.....	11
1.2.1.2. Subependymom WHO-Grad I	12
1.2.1.1. Myxopapilläres Ependymom WHO-Grad I.....	12
1.2.2. WHO-Grad II.....	13
1.2.2.1. Diffuses Astrozytom WHO-Grad II.....	13
1.2.2.2. Ependymom WHO-Grad II	13
1.2.2.3. Oligodendrogliom WHO-Grad II	14
1.2.3. WHO-Grad III.....	14
1.2.3.1. Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III.....	15
1.2.3.2. Anaplastisches Ependymom WHO-Grad III	15
1.2.3.3. Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III	16
1.2.4. WHO-Grad IV.....	16
1.2.4.1. Glioblastom WHO-Grad IV	16
1.3. Zelladhäsionsmoleküle	17
1.4. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und -wachstum	18
1.5. Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorentstehung und -wachstum.....	19
1.5.1. Das Aktivierte Leukozytenzelladhäsionsmolekül (ALCAM)	19
1.5.2. Zelladhäsionsmoleküle in der Entstehung und Progression	20
1.6. Molekulargenetische Veränderungen in Gliomen.....	22
1.7. Bedeutung der Immunhistochemie	23
1.8. Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden.....	26
2.1. Auswahl und Definition der Gewebeproben.....	26
2.2. Herstellung der histologischen Präparate.....	26
2.3. Die Tissue Microarray Methode.....	26
2.4. Konstruktion der Tissue Microarrays	27
2.5. Immunhistochemie	30

2.6.	ALCAM	31
2.7.	MIB-1	31
2.8.	Durchführung der immunhistochemischen Färbung per Hand	32
2.9.	Automatisierte immunhistochemische Färbung	33
2.10.	Lichtmikroskopische Auswertung von ALCAM	33
2.11.	Lichtmikroskopische Auswertung von MIB-1	37
2.12.	Erfassung der Patientendaten	37
2.13.	Statistische Auswertung	37
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Anzahl der ausgewerteten Tumoren	39
3.2.	Immunhistochemische Reaktivität von ALCAM in glialen Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS)	39
3.2.1.	Intensität von ALCAM in Astrozytomen	41
3.2.2.	Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Astrozytomen	41
3.2.3.	Intensität von ALCAM in Ependymomen	42
3.2.4.	Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Ependymomen	43
3.2.5.	Intensität von ALCAM in Oligodendrogliomen	44
3.2.6.	Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Oligodendrogliomen	44
3.3.	Immunhistochemische Analyse von ALCAM in Normalhirn	45
3.4.	ALCAM im Vergleich zum MIB-1-Proliferationsindex	46
3.5.	Kaplan-Meier-Analyse für ALCAM	47
4.	Diskussion	48
4.1.	Zellverbindungen und Zellmigration durch ALCAM	48
4.2.	Expressionsanalyse von ALCAM in Gliomen	50
4.3.	Überlebensanalyse und prognostische Aussage von ALCAM	53
4.4.	Kontroverse Daten in malignen, nicht hirneigenen Tumoren	54
4.5.	Die Prognose beeinflussende Faktoren	55
4.6.	Problematik der Gliomtherapie	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	60

7. Anhang.....	72
7.1. Tabellen.....	72
7.2. Veröffentlichung.....	84
7.3. Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
ANOVA	oneway analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata
Astro	Astrozytom
A I	Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I
A II	Diffuses Astrozytom WHO-Grad II
A III	Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRAF V600E	Punktmutation V600E des BRAF-Gens
CAM	Cellular adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CK	Zytokeratin
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor variant III
Engl.	Englisch
Epd'mom	Ependymom
Expr.	Expression
E I	Myxopapilläres Ependymom WHO-Grad I und Subependymom WHO-Grad I
E II	Ependymom WHO-Grad II
E III	Anaplastisches Ependymom WHO-Grad III
F(ab)	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystalline
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
G IV	Glioblastom WHO-Grad IV

HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hrsg.	Herausgeber
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ID	Identifikation
IDH	Isocitratdehydrogenase
IDH1 R132H	Punktmutation R132H des Isocitratdehydrogenase 1-Gens
IHC	Immunhistochemie
IgCAM	Immunoglobulin-related cell adhesion molecule
Ig-Sf	Immunglobulin-Superfamily
I-View Copper	Kupfer
I-View DAB	Diaminobenzidin
I-View H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I-View SA-HRP	Streptavidin-horseradish peroxidase
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	Kiel Antigen 67
LOH	Loss of heterozygosity
L1	Zelladhäsionsmolekül L1
membr.	membranös
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIB-1	Made in Borstel-1
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCAM	Neuralzelladhäsionsmoleküle
NH	Normalhirn
Oligo	Oligodendrogliom
O II	Oligodendrogliom WHO-Grad II
O III	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III
P	Primärtumor
1p	kurzer Arm von Chromosom 1
pH	Pondus Hydrogenii/Potentia Hydrogenii
P-Wert	Probability-value (p-value)
p53	Tumor suppressor gene 53 (protein of 53 kDa)
19q	langer Arm von Chromosom 19

R	Rezidivtumor
RNA	Ribonucleic acid
Subep.	Subependymom
S-100	Saures Calcium-bindendes Protein
TBS	Tris buffered saline
TBS/BSA	Tris buffered saline containing bovine serum albumin
TMA	Tissue Microarray
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Gliale Tumore des zentralen Nervensystems

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumore sind die am häufigsten auftretenden Tumore des zentralen Nervensystems. Diese werden als Gliome bezeichnet und leiten sich von den Gliazellen, zu denen Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und die Mikroglia zählen, ab. In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur werden zur Entstehung von Gliomen unter anderem stammzell-ähnliche Gliazellen, die entweder transformierte Gliazellen oder Stammzellen sind, diskutiert (Schiffer et al. 2010, Dietrich et al. 2010, Tabatabai et al. 2011).

Tumore des zentralen Nervensystems unterscheiden sich in einigen Aspekten von denen anderer Organe. So gelten die klassischen Merkmale der Malignität, das infiltrierende und destruierende Wachstum und die Metastasierung, nur eingeschränkt, da die Tumordinfiltration in der Regel auf das Hirnparenchym beschränkt bleibt und eine hämatogene Streuung in andere Organe äußerst selten stattfindet (Kleihues et al. 2004). Eine Metastasierung über den Liquor cerebrospinalis kommt allerdings bei einigen Tumoren, wie zum Beispiel den Medulloblastomen, vor (Kleihues et al. 2004). Gliome destruieren die präexistenten Hirnstrukturen relativ spät, da sie diese zunächst für ihre Ausbreitung nutzen. Das zeigt sich auch in einer erhöhten Wachstumspräferenz der Gliomen entlang der Bahnsysteme. Da das Gehirn durch den knöchernen Schädel begrenzt ist, führen alle Hirntumore zu Raumforderungen, die früher oder später zu einer lebensbedrohlichen Steigerung des Hirndrucks führen können (Kleihues et al. 2004).

1.2. Klassifikation von Gliomen

Die histopathologische Gradierung dieser Tumore erfolgt nach den Kriterien der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die insgesamt vier Grade umfasst und vorwiegend anhand histologischer Gewebemerkmale definiert ist (Louis et al. 2007). Neben konventionellen Färbemethoden, beispielsweise der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, sind immunhistochemische Färbungen bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der Paraffinschnitte von großer Bedeutung. Häufig eingesetzte immunhistochemische Marker sind das saure Gliafaserprotein (GFAP), das von astrozytären Tumoren meistens stärker als von Oligodendrogliomen

exprimiert wird, und das weniger spezifische Protein S-100. Histologisch zeigen maligne Tumore in unterschiedlicher Ausprägung einen Verlust der zellulären und geweblichen Ausreifung. Atypiezeichen wie Zell- und Kernpolymorphie und Mitoserate, aber auch die Endothelproliferation der Tumorgefäße und das Vorkommen von Nekrosen sind von entscheidender Bedeutung bei der Beurteilung (Louis et al. 2007). Die Aktivität des Tumorwachstums wird mittels Immunhistochemie durch den MIB-1-Antikörper, der das nur von teilenden Zellen exprimierte Antigen Ki-67 bindet, bestimmt (Kayaselçuk et al. 2002). Diese Untersuchung kann zum Beispiel bei der Differenzierung zwischen WHO-Grad II- und WHO-Grad III-Gliomen insbesondere bei kleineren Gewebeproben hilfreiche Zusatzinformationen liefern.

Sinn dieser WHO-Klassifikation ist die Vorhersage des mit gewissen morphologischen Mustern assoziierten, biologischen Verhaltens des Tumors, woraus im klinischen Dialog Therapieoptionen abgeleitet werden können. Auch ist durch den WHO-Grad ein Rückschluss auf die Prognose des Patienten möglich (Louis et al. 2007), wobei andere Kriterien wie Alter und Allgemeinzustand des Patienten oder die Lokalisation des Tumors miteinbezogen werden müssen. Auch bestimmte genetische Veränderungen können das biologische Verhalten der Tumore maßgeblich beeinflussen (Hartmann et al. 2010).

Die in dieser Arbeit untersuchten und nun im folgenden Abschnitt beschriebenen Tumore sind die am häufigsten auftretenden Gliome.

1.2.1. WHO-Grad I

Allgemein kann man festhalten, dass der WHO-Grad I einem gutartigen, langsam wachsenden Tumor mit günstiger Prognose und guter Heilungschance durch eine operative Tumorentfernung entspricht. Zu diesen Tumoren werden ependymale Tumore wie das Subependymom, das myxopapilläre Ependymom sowie das pilozytische Astrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom gezählt.

1.2.1.1. Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I

Das pilozytische Astrozytom WHO Grad I ist ein relativ umschriebener, langsam wachsender Tumor. Es ist das am häufigsten vorkommende Gliom im Kindesalter und macht 5-6 % aller Gliome aus (Central Brain Tumor Registry of the United States

2006). Histologisch kennzeichnend ist ein biphasisches Muster, das sich abwechselnd aus kompakten bipolarer Zellen mit Rosenthal'schen Fasern sowie mikrozystisch aufgelockerten multipolaren Zellverbänden mit rundlichen, eosinophilen Körperchen („eosinophilic granular bodies“) zusammensetzt (Louis et al. 2007). Pilozytische Astrozytome sind bei Kindern am häufigsten (67%) im Cerebellum gelegen (Ohgaki und Kleihues 2005a). Eine lange Überlebenszeit ist der Regelfall (Fernandez et al. 2003, Ohgaki und Kleihues 2005a). Sie zeichnen sich insbesondere durch genetische Veränderungen des BRAF-Protoonkogens aus (Jones et al. 2008).

1.2.1.2. Subependymom WHO-Grad I

Subependymome WHO Grad I sind langsam wachsende Tumore, die typischerweise der Wand des vierten Ventrikels anliegen (Jallo et al. 1996) und aus ependymalen Tumorzellverbänden in fibrillärer Matrix mit häufigen mikrozystischen Veränderungen bestehen (Louis et al. 2007). Meistens ist die Diagnose dieser Tumore ein Zufallsbefund, da die Erkrankung durch das langsame Wachstum des Tumors und der überwiegenden Lokalisation im vierten Ventrikel meistens asymptomatisch verläuft und zu keiner Liquorabflussstörung führt. Darum ist auch eine genaue Inzidenz nicht bekannt (Schiffer et al. 1991). Patienten im mittleren bis höheren Lebensalter erkranken am häufigsten. Die Prognose ist gut, da die komplette Resektion in der Regel kurativ ist (Waldron und Tihan 2003).

1.2.1.1. Myxopapilläres Ependymom WHO-Grad I

Myxopapilläre Ependymome WHO Grad I sind langsam wachsende Tumore der Ependymzellen, die meistens am Conus medullaris, Filum terminale und der Cauda equina lokalisiert sind (Nakama et al. 2005) und 9-13% aller Ependymome ausmachen (Schiffer et al. 1991). Histopathologisch finden sich kubische und elongierte Zellen in papillärer Anordnung um vaskularisiertes, myxoid aufgelockertes Stroma bei nur sehr geringer mitotischer Aktivität (Louis et al. 2007). Am häufigsten sind junge Erwachsene betroffen (Cervoni et al. 1997). Die Prognose ist bei kompletter oder inkompletter Tumorsektion mit einer Überlebensrate von mehr als 10 Jahren gut (Sonneland et al. 1985).

1.2.2. WHO-Grad II

WHO-Grad II-Tumore werde noch als gutartige Tumore eingestuft, die aber zur malignen Progression zum WHO-Grad III neigen. Nach der operativen Tumorentfernung besteht eine erhöhte Rezidivneigung. Strahlen- und/oder Chemotherapie werden in der Primärtherapie meistens nicht angewendet. Die meisten ependymalen und oligodendroglialen Tumoren sowie ein Teil der diffusen astrozytären Neoplasien werden als Grad II eingestuft.

1.2.2.1. Diffuses Astrozytom WHO-Grad II

Das diffuse Astrozytom ist ein langsam wachsender astrozytärer Tumor, der am häufigsten im Frontal- und Temporallappen lokalisiert ist und 10-15% aller astrozytären Tumore ausmacht (Davis et al. 1998). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 34 Jahren (Louis et al. 2007). In der Histologie lassen sich gut differenzierte fibrilläre, gemistozytische oder die selteneren protoplasmatische Astrozyten in einer aufgelockerten und häufig mikrozystischen Tumormatrix erkennen (Louis et al. 2007). Die Zelldichte ist im Vergleich zum Normalhirn nur mäßig erhöht und Kernpleomorphien nur gering ausgeprägt. Mitosen, Gefäßproliferation und Nekrosen dürfen nicht vorliegen. Das diffus infiltrierende Wachstum in benachbarte Strukturen macht eine komplette Resektion unmöglich und verursacht eine erhöhte Rezidivrate. Diese Rezidive tendieren nach einem mittleren Zeitintervall von 4 bis 5 Jahren zu anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III und letztendlich zu Glioblastomen WHO Grad IV fortzuschreiten (Louis et al. 2007). Die mittlere Überlebenszeit nach neurochirurgischer Intervention liegt bei den diffusen Astrozytomen bei 6 bis 8 Jahre und ist hauptsächlich durch die Dynamik der Tumorprogression beeinflusst (Ohgaki und Kleihues 2005a, Vertosick et al. 1991, Watanabe et al. 1997).

1.2.2.2. Ependymom WHO-Grad II

Ependymome WHO Grad II sind im Allgemeinen langsam wachsende Tumore, die aus neoplastischen Ependymzellen bestehen und 2-9% aller neuroepithelialer Tumore ausmachen (Duncan et al. 1995). Am häufigsten treten sie bei Kindern und jungen Erwachsenen, vornehmlich an den Wänden des vierten Ventrikels und im

Spinalkanal, gefolgt von den Seitenventrikeln und dem dritten Ventrikel (Prayson 1999, Schiffer et al. 1991) auf.

Histopathologisch fällt ein gut abgrenzbarer Tumor mit monomorphen Zellen mit runden bis ovalen Nuklei auf. Mitosen sind eher selten zu finden. Charakteristisch sind zudem perivaskuläre Pseudorosetten in denen die um Blutgefäße gelagerten Tumorzellen feine fibrilläre Fortsätze auf diese hin ausrichten (Louis et al. 2007). Ependymome des WHO-Grad II können durch ihre morphologischen Charakteristika in zelluläre, klarzellige, papilläre oder tanzytische Subtypen eingeteilt werden. Diese Einteilung hat jedoch keine prognostische Signifikanz (Louis et al. 2007). Die Prognose hängt von Alter (Horn et al. 1999), Resektionsausmaß (Jayawickreme et al. 1995, Pollack et al. 1995), histopathologischem Gradierung (Korshunov et al. 2004, Kurt et al. 2006, Schiffer und Giordana 1998) und Lokalisation (Ernestus et al. 1996) ab. Bei Kindern ist häufig die ungünstigere Lokalisation in der hinteren Schädelgrube für eine schlechtere Prognose als bei Erwachsenen mit überwiegend spinaler Lokalisation verantwortlich (Horn et al. 1999).

1.2.2.3. Oligodendrogliom WHO-Grad II

Oligodendrogliome WHO Grad II sind langsam diffus infiltrierende, gut differenzierte Tumore und machen 5-6% aller Gliome aus (Central Brain Tumor Registry of the United States 2006). Typischerweise sind sie in der Rinde und in der weißen Substanz der cerebralen Hemisphären gelegen (Kros et al. 1994, Shaw et al. 1992) und bestehen aus neoplastischen Zellen, die an Oligodendroglia erinnern. Sie kennzeichnet im Paraffinschnitt monomorphe Zellen mit einheitlichen runden Nuklei und perinukleären Halos. Zusätzlich finden sich Verkalkungen, aber keine Nekrosen und nur wenige Mitosen (Louis et al. 2007). Die WHO-Gradierung ist ein wichtiger prognostischer Faktor für das Überleben (Louis et al. 2007). Die mittlere Überlebenszeit beträgt 11.6 Jahre (Ohgaki und Kleihues 2005a).

1.2.3. WHO-Grad III

WHO-Grad III-Tumore sind aggressiv wachsende Tumore. Strahlen- und/oder Chemotherapie sind meistens nach der operativen Tumorentfernung notwendig, um die Prognose zu verbessern.

1.2.3.1. Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III

Das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III wächst diffus infiltrierend und machen 4% der malignen Hirntumore (ICD-O 191 und 192) aus (Percy et al. 1990). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 46 Jahren (Louis et al. 2007). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1.6:1) (Ohgaki und Kleihues 2005a). In der Histologie fallen im Vergleich zum diffusen Astrozytom WHO-Grad II eine erhöhte Zelldichte, vermehrte Mitosefiguren und Zellkernatypien auf. Gefäßproliferate und Nekrosen sprechen bei Astrozytomen bereits für eine Progression hin zum Glioblastom WHO-Grad IV (Louis et al. 2007). Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III können aus diffusen Astrozytomen WHO-Grad II oder aber auch de novo entstehen und neigen durchschnittlich innerhalb von 2 Jahren zur Progression zum sekundären Glioblastom WHO-Grad IV hin (Ohgaki et al. 2004). Sie unterscheiden sich jedoch genetisch stark von den primären Glioblastomen (Ohgaki et al. 2004).

1.2.3.2. Anaplastisches Ependymom WHO-Grad III

Anaplastische Ependymome WHO Grad III sind maligne, schnell wachsende Gliome mit ependymaler Differenzierung. Histologisch kennzeichnend sind eine erhöhte Zelldichte, eine hohe mitotische Aktivität, Gefäßproliferationen, perivaskuläre Pseudoreosetten und Nekrosen mit Pseudopallisaden (Korshunov et al. 2000, Kurt et al. 2006, Rawlings et al. 1988). Jedoch stellen die Ependymome WHO-Grad II und die anaplastischen Ependymome WHO-Grad III ein heterogenes histologisches Bild dar und die genannten Kriterien, wie z. B. die erhöhte Zelldichte, sind oft nur schwer zu interpretieren und erschweren eine genaue WHO-Gradierung (Zamecnik et al. 2003). Deshalb ist auch eine genaue Inzidenz der anaplastischen Ependymome WHO-Grad III nicht zu erheben. Bei Kindern tendieren die intrakranielle, vor allem in der hinteren Schädelgrube gelegenen, Ependymome häufiger zu anaplastischen Veränderungen als die bei Erwachsenen vornehmlich intraspinal gelegenen Ependymome (Central Brain Tumor Registry of the United States 2006). Die Prognose ist insgesamt ungünstig (Louis et al. 2007).

1.2.3.3. Anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III

Das anaplastische Oligodendrogliom WHO Grad III ist ein zellreicher, diffus infiltrierender Tumor, der beachtliche morphologische Variationen zeigen kann. Der überwiegende Anteil zeigt jedoch die an Oligodendroglia erinnernden Tumorzellen mit perinuklärem Halo, die mit erhöhter mitotischer Aktivität, Gefäßproliferaten und Nekrosen mit oder ohne Pseudopallisaden im Tumor einhergehen können (Louis et al. 2007). Anaplastische Oligodendroglione WHO-Grad III machen 1-2% aller primären Hirntumore aus (Central Brain Tumor Registry of the United States 2006). Mit einer mittleren Überlebenszeit von 3.5 Jahren ist die Prognose ungünstiger als bei Oligodendroglionen WHO Grad II (Ohgaki und Kleihues 2005a).

Gemischte Tumore mit astrozytären und oligodendroglialen Anteilen machen weniger als 2% aller Gliome aus (Central Brain Tumor Registry of the United States 2006). Die Prognose ist im Wesentlichen abhängig von dem Allelverlust auf den Chromosomen 1p und 19q und dem Vorliegen einer IDH-1-Mutation (Hartmann et al. 2009).

1.2.4. WHO-Grad IV

Der WHO-Grad IV entspricht einem bösartigen, sehr rasch wachsenden Tumor mit ungünstiger Prognose, der mit den gegenwärtig verfügbaren Behandlungsmethoden wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie meistens nicht heilbar ist.

1.2.4.1. Glioblastom WHO-Grad IV

Der häufigste Tumor unter den primären Hirntumoren ist das Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV, welches auch die größte Gruppe mit 60-75% unter den Astrozytomen darstellt und 12-15% aller intrakraniellen Neoplasien ausmacht (Lantos et al. 2002, Ohgaki und Kleihues 2005a). Das Glioblastom kann sich in jedem Alter manifestieren, tritt jedoch am häufigsten im Alter von 45 bis 75 Jahren auf (Ohgaki et al. 2004). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (M:F=1,28:1) (Ohgaki und Kleihues 2005b). Prädilektionsstelle des Glioblastoms ist die fronto-temporale, subkortikale weiße Substanz. Der Tumor infiltriert oft in die benachbarten kortikalen Areale und über den Balken in die kontralaterale Seite („Schmetterlingsgliom“). Ein multizentrisches Wachstum ist in 7.5 Prozent der Fälle zu beobachten (Barnard et al.

1987). Histologische Merkmale sind pleomorphe Zellen, Zellkernatypien, erhöhte mitotische Aktivität, Gefäßproliferate und strichförmige Nekrosen mit Pallisadenstellung der Tumorzellen im Randbereich (Louis et al. 2007). Der meistens (90%) der Glioblastome entstehen in weniger als 3 Monaten, ohne dass bereits bestehende niedriggradige Läsionen bekannt sind (primäre Glioblastome). Typischerweise entwickeln sich die de novo entstandenen primäre Glioblastome bei älteren Patienten (mittleres Erkrankungsalter: 62 Jahre) (Ohgaki et al. 2004, Ohgaki und Kleihues 2007). Sekundäre Glioblastome entwickeln sich langsam aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen. Charakteristischerweise sind hier jüngere Patienten betroffen (mittleres Erkrankungsalter: 45 Jahre) und das Progressionsintervall variiert beachtlich zwischen weniger als einem Jahr und 10 Jahren, im Durchschnitt sind es 4 bis 5 Jahre (Ohgaki und Kleihues 2005a). Wegen ihres invasiven Wachstums können Glioblastome, wie auch die Astrozytome WHO-Grad II und III, nicht komplett reseziert werden. Trotz Fortschritten in Strahlen- und Chemotherapie leben weniger als 20% der Patienten länger als ein Jahr (Ohgaki et al. 2004, Ohgaki und Kleihues 2005a), wobei ein höheres Erkrankungsalter einen bedeutend negativen prognostischen Faktor darstellt (Louis et al. 2007). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei weniger als 3% (Ohgaki und Kleihues 2005a).

1.3. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (engl. Cellular adhesion molecules= CAMs) sind für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Strukturen und Funktionen von unterschiedlichsten Gewebearten unverzichtbar (Aplin et al. 1998). Diese vielfältigen Aufgaben der Zelladhäsionsmoleküle sind nur durch eine heterogene Gruppe von verschiedenartigen Membranproteinen, zu denen Cadherine, Selektine, Integrine, Muzine und die Immunglobulin-Superfamilie zählen (Ofori-Acquah und King 2008, Weidle et al. 2010), zu bewältigen.

In der Regel bestehen Zelladhäsionsmoleküle aus einem intergralen Membranprotein mit intra- und extrazellulären Anteilen und tragen so zur mechanischen Bindung zwischen Zellen (Zell-Zell-Verbindungen) und Zellen und der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Verbindungen) bei. Des Weiteren nehmen sie über ihre intra- und extrazellulären Anteile Einfluss auf die Signaltransduktion, indem sie als Signaltransduktionsrezeptoren (Aplin et al. 1998, Kiryushko et al. 2007) fungieren

und Signale in und aus der Zelle modulieren können (Aplin et al. 1998, Cavallaro und Christofori 2004a). Diese Eigenschaften der Zelladhäsionsmoleküle sind nicht nur normalen Zellen vorbehalten, sondern auch maligne Tumorzellen machen sie sich in ihrer Entstehung (Weidle et al. 2010) und bei ihrem Wachstum (Ofori-Acquah und King 2008, Weidle et al. 2010) zu Nutzen.

1.4. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und -wachstum

Ein maligner Tumor entsteht dann, wenn die physiologischen Regelkreisläufe von Zellfunktionen, wie zum Beispiel die der Proliferation und Homöostase, gestört sind (Hanahan und Weinberg 2000). Dieses geschieht unter anderem durch Veränderungen von Genen, unter denen die Onkogene und Tumorsuppressorgene die bedeutendsten darstellen. Diese Gene und ihre Genprodukte sind normale zelluläre Gene, deren Zellprodukte das Tumorstadium von Zellen antagonistisch regulieren (Böcker et al. 2004). Durch Mutation des Onkogens kommt es zu einer gesteigerten, nicht mehr regulierten Funktion des Gens bzw. seines Produkts („gain of function“) (Hanahan und Weinberg 2000, Böcker et al. 2004). Bei mutierten Tumorsuppressorgenen hingegen kommt es durch keine oder nur fehlerhafte Bildung von Genprodukten zu einem Funktionsverlust („loss of function“) (Hanahan und Weinberg 2000, Böcker et al. 2004). Jede dieser genetischen Veränderungen stellt für sich gemäß der Darwin'schen Evolutionstheorie einen Selektionsvorteil dar und begünstigt die Umwandlung von normalen Zellen in Tumorzellen und somit die Verdrängung von normalen Zellen (Hanahan und Weinberg 2000). Damit jedoch ein maligner Tumor entsteht, benötigt es allerdings nicht eine einzige, sondern eine Vielzahl an genetischen Veränderungen, die dann ab einer kritischen Gesamtzahl aus normalen Zellen neoplastische Zellen entstehen lässt. Diese genetisch veränderten Tumorzellen haben Fähigkeiten erworben, die sie von normalen Zellen unterscheidet und wahrscheinlich allen malignen Tumoren zugrunde liegt (Hanahan und Weinberg 2000). Sie lassen sich in sechs verschiedene Hauptmechanismen einteilen (Hanahan und Weinberg 2000): autonomes Wachstum, Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen, Entzug der Apoptose, unbegrenztes Replikationspotenzial, Angiogenese, Invasion und Metastasierung. Seit kurzem werden auch chronische Entzündungen als Nährboden für maligne Tumorentstehung und -wachstum als siebter Mechanismus gehandelt (Calotta et al. 2009). An den

meisten diesen neu erworbenen Fähigkeiten sind Zelladhäsionsmoleküle beteiligt (Weidle et al. 2010) und es scheint nicht verwunderlich, dass Expressionsveränderungen dieser Moleküle oder ihre de novo-Expression bei einer malignen Zelltransformation, Tumorentstehung oder Tumorprogression eine entscheidende Rolle spielen (Johnson 1991).

1.5. Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorentstehung und -wachstum

1.5.1. Das Aktivierte Leukozytenzelladhäsionsmolekül (ALCAM)

Im Fokus dieser Arbeit steht ALCAM, das Aktivierte Leukozytenzelladhäsionsmolekül (engl. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), das auch als CD166 bekannt ist. ALCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül der heterogenen Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Sf), die IgCAMs genannt werden. Neben Zell-Zell-Verbindungen (Lunter et al. 2005) und Tumorzell-Endothelzell-Verbindungen ist ALCAM auch für Tumorzell-Matrix-Verbindungen (Ofori-Acquah und King 2008) mitverantwortlich. ALCAM bindet nicht nur schwach homotypisch (ALCAM-ALCAM), sondern geht darüber hinaus auch stärkere heterotypische Bindungen mit anderen Liganden ein, wie dem von T-Leukozyten exprimierten CD6 (Bowen et al. 1995, Ofori-Acquah und King 2008, Weidle et al. 2010). Die durch ALCAM homotypisch vermittelten Zellverbindungen sind aktiv durch das Aktinzytoskelett reguliert (Nelissen et al. 2000). ALCAM lässt sich im normalen humanen Gewebe im Knochenmark, in Hepatozyten, Thymusepithelzellen, Neuronen und autonomen Nervenzellen nachweisen (Mayer et al. 1990, Patel et al. 1995, Konno et al. 2001). Während der Embryonalentwicklung ist ALCAM in Stromazellen der hämatopoetischen Vorläuferzellen, Endothelzellen, mesenchymalen und intestinalen Stammzellen exprimiert (Uchida et al. 1997, Ohneda et al. 2001, Arai et al. 2002, Levin et al. 2010). Diese spezifische Zell- und Gewebeverteilung lässt auf eine Beteiligung ALCAMs in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen, der Immunantwort, der Neurogenese (Weiner et al. 2004) und der Hämatopoese (Ohneda et al. 2001) schließen. ALCAM ist zudem an physiologischen Prozessen wie der transendothelialen Migration beispielsweise von Monozyten beteiligt (Ikeda und Quertermous 2004, Masedunskas et al. 2006) und konnte unter anderem auch in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Cayrol et al. 2008, Lee und Imhof 2008). ALCAM

ist somit möglicherweise an der Leukozytenmigration in das zentrale Nervensystem beteiligt (Cayrol et al. 2008, Lee und Imhof 2008).

In malignen Tumoren ist ALCAM bereits in Neuroblastomen (Corrias et al. 2010), Melanomen (Johnson 1999, van Kempen et al. 2000, Lunter et al. 2005, Swart et al. 2005), Schilddrüsenkarzinomen (Miccichè et al. 2011), oralen Plattenepithelkarzinomen (Sawhney et al. 2008), Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Verma et al. 2005), in Karzinomen des Pankreas (Kahlert et al. 2009), des Ovars (Mezzanzanica et al. 2008) und der Mamma (King et al. 2004, Burkhardt et al. 2006, Jezierska et al. 2006a, King et al. 2010, Hein et al. 2010), der Prostata (Kristiansen et al. 2003 und 2005), der Harnblase (Tomita et al. 2003) und in kolorektalen Karzinomen (Weichert et al. 2004) nachgewiesen worden. Daten zur Expression in Gliomen liegen bislang nicht vor.

1.5.2. Zelladhäsionsmoleküle in der Entstehung und Progression

Das veränderte Expressionsmuster von ALCAM und anderen Zelladhäsionsmolekülen wurde in verschiedenen malignen Tumoren beschrieben. Vor allem Integrine waren bislang im Fokus der Forschung von Zelladhäsionsmolekülen (Juliano und Varner 1993, Varner und Cheresh 1996, Jin und Varner 2004, Garmy-Susini und Varner 2008), da sie ihren Subtyp ändern und sich so besser als andere Zelladhäsionsmoleküle an neue Umgebungsstrukturen anpassen und neuen Aufgaben übernehmen können (Hanahan und Weinberg 2000). So weiß man, dass Integrine zum einen als Wachstumsfaktor-Rezeptoren am autonomen Wachstum der Tumorzellen beteiligt sind (Hanahan und Weinberg 2000), dass aber auch Tumorzellen zugleich die Expression der Integrine so verändern können, dass diese bestimmte Wachstumssignale empfangen oder, falls es sich um antiproliferative Signale handelt, diese nicht empfangen können (Lukashev und Werb 1998, Giancotti und Ruoslahti 1999). Letzteres geschieht meistens durch eine Herunterregulation der Expression des spezifischen Integrins bzw. der Signal aussendenden Zelladhäsionsmoleküle (Hanahan und Weinberg 2000). Der Apoptose können sich Tumorzellen unter anderem durch integrinvermittelte intrazelluläre Signalkaskaden entziehen (Varner und Cheresh 1996). Ferner wirkt auch die integrinvermittelte Bindung adhärenter Zellen an Liganden der extrazellulären Matrix als Schutz gegen Apoptose. Auch ALCAM schützt beispielsweise Mamma-

Karzinomzellen durch das apoptosehemmende Bcl-2-Onkoprotein vor Apoptose und Autophagie (Jeziarska et al. 2006b). An der Angiogenese sind Zelladhäsionsmoleküle beteiligt, indem sie Zell-Endothelzell-Verbindungen und Zell-Matrix-Verbindungen ermöglichen (Hanahan und Weinberg 2000). Vor allem die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung ist letztlich nicht nur von einer veränderten Zelladhäsion (Ofori-Acquah und King 2008, Johnson 1991), sondern auch von einer veränderten Zellumgebung abhängig (Brábek et al. 2010). Damit sich Tumorzellen von ihrem Primärtumor lösen können, muss die Expression der Zelladhäsionsmoleküle herunterreguliert oder in ihrer Funktion gestört sein (Johnson 1991, Ofori-Acquah und King 2008). Bei einigen Tumoren, wie zum Beispiel dem Melanom oder dem Prostatakarzinom, konnte gezeigt werden, dass die fehlende Expression von E-Cadherin eine mögliche Ursache für die verminderte Zelladhäsion darstellt (Hanahan und Weinberg 2000, Tomita et al. 2000a und 2000b, Li und Herlyn 2000). Desweiteren ist auch von den zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörenden Neuralzelladhäsionsmolekülen (NCAMs) bekannt, dass diese in malignen Tumoren in einer veränderten Expressionsform vorliegen und dadurch an Zelladhäsionskraft verlieren (Johnson 1991). Damit sich aber aus den gelösten Tumorzellen wiederum an anderer Stellen abgesiedelte Zellverbände (Metastasen) entwickeln können, müssen diese erst durch das umliegende Gewebe und die extrazelluläre Matrix wandern, Anschluss an das Blut- und Lymphgefäßsystem finden und aus diesem an anderer Stelle in das umliegende Gewebe einwandern. Zelladhäsionsmoleküle sind an diesem Prozess wesentlich beteiligt. So ist bekannt, dass der Verlust von E-Cadherin in Tumorzellen in eine de novo-Expression von N-Cadherin und Cadherin-11 resultiert („cadherin switch“), die die Motilität und Migration von Tumorzellen gegensätzlich zu E-Cadherin fördern (Cavallaro und Christofori 2004a). Integrine können über Tumorzell-Matrix-Verbindungen und Tumorzell-Endothelzell-Verbindungen extrazelluläre proteolytische Enzyme, wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), binden (Varner und Cheresch 1996). Diese bauen in ihrer aktivierten Form die extrazellulären Matrix und die Basalmembran ab und ermöglichen so die Migration von Tumorzellen (Bourboulia und Stetler-Stevenson 2010). Auch ALCAM ist eng mit der Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) verknüpft, wobei es jedoch je nach Tumortyp zu einer Aktivierung (Lunter et al. 2005) oder aber zu einer Deaktivierung (Jeziarska et al. 2006b) der MMP-2 kommen kann. Im Rahmen von Entzündungsprozessen werden verschiedene

Zelladhäsionsmoleküle vermehrt gebildet, die Endothelzell-Leukozyten-Verbindungen herstellen und so über eine Liganden-Rezeptor-Erkennung Leukozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe rekrutieren können (Springer 1995). So regulieren beispielsweise proinflammatorische Zytokine die ALCAM-Expression in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Cayrol et al. 2008).

1.6. Molekulargenetische Veränderungen in Gliomen

Neben den seltenen hereditären Syndromen mit Neigung zur Entwicklung von Gliomen wie die Neurofibromatose-Typen I und II, dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Turcot-Syndrom können weitere molekulargenetische Veränderungen in Gliomen festgestellt werden. So findet sich bei der Mehrzahl der Oligodendrogliome ein Allelverlust (loss of heterozygosity, LOH) auf den Chromosomen 1p und 19q. Die hier vermuteten Tumorsuppressorgene konnten bislang nicht identifiziert werden (Kleihues et al. 2004). Der Allelverlust auf den Chromosomen 1p und 19q ist bei Patienten mit anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III mit längerer progressionsfreier und gesamter Überlebenszeit assoziiert (Cairncross et al. 1998 und 2006, Van den Bent 2006), da sie besser auf die Behandlung mit Chemotherapie ansprechen (Kleihues et al. 2004). Glioblastome WHO-Grad IV lassen sich auch molekulargenetisch in primäre und sekundäre Glioblastome einteilen. So sind in 40 Prozent der primären, de novo entstandenen Glioblastomen eine Amplifikation des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors und bei über 60 Prozent der primären entstandenen Glioblastomen Allelverluste auf den Chromosomen 10p und 10q zu finden (Ohgaki et al. 2004). In 65 Prozent der sekundären Glioblastome ist eine Mutation des p53-Tumorsuppressorgens nachweisbar, bei den primären Glioblastomen nur in 28 Prozent der Fälle. Primäre und sekundäre Glioblastome bilden somit von einander abgrenzbare Entitäten, die sich auf unterschiedlichen genetischen Pfaden entwickeln, verschiedene Expressionsmuster aufweisen und vermutlich verschieden auf Therapien reagieren (Louis et al. 2007). Seit dem Jahr 2006 werden Glioblastome auf eine Promoterhypermethylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens routinemäßig untersucht. Dieses Gen codiert für ein gleichnamiges DNA-Reparaturprotein, welches Alkylgruppen von der Position O6 des Guanins der DNA entfernt. Die Wirkung einiger Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Temozolomid, beruht auf Anfügen von

Alkylgruppen an diese Position O6. Glioblastom-Patienten, die eine kombinierte Radio-Chemo-Therapie erhalten haben, leben mit methyliertem MGMT-Promotor signifikant länger als solche ohne Methylierung (Hegi et al. 2005 und 2008). Erst kürzlich konnten in einer genomweiten Mutationsanalyse von Glioblastomen somatische Mutationen im Isocitratdehydrogenase (IDH)-Gen nachgewiesen werden (Parsons et al. 2008). Punktmutationen im IDH1-Gen treten bei ungefähr 70 Prozent der Oligodendrogliome, Astrozytome und sekundären Glioblastomen auf (Capper et al. 2009). In Ependymomen konnte jedoch bislang keine IDH1-Mutation nachgewiesen werden (Yan et al. 2009). Sowohl bei Glioblastomen WHO-Grad IV als auch bei anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ist die IDH1-Mutation mit einer besseren Prognose assoziiert (Hartmann et al. 2010). Zudem kann eine IDH1-Mutationsanalyse bei der Differenzialdiagnose von niedriggradigen Gliomen hilfreich sein (Korshunov et al. 2009, Hartmann et al. 2009).

1.7. Bedeutung der Immunhistochemie

In der Diagnostik von Gliomen erlangen, neben den altbewährten morphologischen Merkmalen in der HE-Färbung, gewebspezifische und molekularpathologische Marker mit Hilfe der Immunhistochemie immer größere Bedeutung. Neben den häufig angewandten immunhistochemische Antikörpern gegen GFAP, S-100 und p53, werden auch den Verlauf beurteilende, weiterführende Marker wie zum Beispiel Mib-1 oder mutationsspezifische Antikörper wie IDH1 R132H, EGFRvIII, BRAF V600E, die eine prognostische Aussage erlauben, eingesetzt (Capper et al. 2010, Kuan et al. 2000, Schindler et al. 2011). Ergänzend können auch molekulargenetische Analysen, wie zum Beispiel MGMT und 1p/19q, durchgeführt werden, die derzeit der Immunhistochemie noch überlegen sind.

Diese molekularpathologischen Merkmale reflektieren die Tumorbilologie besser als morphologische Merkmale. Auch wenn die Immunhistochemie innerhalb der Astrozytome, Ependymome und Oligodendrogliome momentan noch keine zuverlässige Unterscheidung untereinander oder zwischen den einzelnen WHO-Graden erlaubt, so lässt sich bei einem Gehirntumor beispielsweise mit Hilfe von CD20- und CD45-Antikörpern ein Lymphom des Zentralnervensystems oder mit Antikörpern gegen epitheliale Zytokeratine, wie zum Beispiel CK7 oder CK20, eine Karzinometastase sicher ausschließen.

Immunhistochemische Expressionsanalysen auf Proteinebene tragen zum Fortschritt des Verständnisses der molekularen Mechanismen in der glialen Tumorentstehung und -progression bei und erlauben eine Subgruppierung und Subtypisierung der Gliome mit einem ähnlichen genetischen Profil (Tabatabai et al. 2010). Diese Unterteilung in verschiedenen Subgruppen und -typen erlaubt neben prognostischen Aussagen auch gezieltere Therapien mit größerer Effizienz bei geringer Toxizität. So genannte „Biologicals“, die in zelluläre Signaltransduktionswege eingreifen, welche für das Wachstum und Überleben von Gliomzellen von großer Bedeutung sind, spielen in aktuellen Studien eine wichtige Rolle. Ein viel versprechendes Angriffspunkt stellt die Angiogenese der Gliomzellen dar, die über die Inhibition des VEGF (vascular endothelial growth factor)-Rezeptors, der ein parakriner Stimulator der Angiogenese ist (Fischer et al. 2005), gehemmt werden könnte. Im Rahmen von Phase-II-Studien wird der monoklonale Antikörper Bevacizumab, ein Inhibitor des VEGF-Rezeptors, in Kombination mit dem Zytostatikum Irinotecan getestet und erscheint als viel versprechende Therapieoption für rezidivierende Gliome (Vredenburgh et al. 2007, Poulsen et al. 2009). In einer multizentrischen Phase I/IIa-Studie konnte die Wirksamkeit und Sicherheit von Cilengtide, einem Integrin-Inhibitor, in Kombination mit Temozolomide und Strahlentherapie in Glioblastomen, bei denen eine MGMT-Promotormethylierung vorlag, gezeigt werden (Stupp et al. 2010).

1.8. Fragestellung

Da das diffus infiltrierende Wachstum in benachbarte Strukturen eine komplette Resektion der Gliome ab dem WHO-Grad II unmöglich macht und eine erhöhte Rezidivrate verursacht, die die Prognose maßgeblich negativ beeinflusst, ist es nicht verwunderlich, dass in der Gliomforschung vor allem gezielt die molekularpathologischen Veränderungen der Moleküle, die an diesem Wachstum beteiligt sind, untersucht werden. Matrixmetalloproteinasen und andere Proteasen, die den Tumorzellen ihren Weg durch die extrazelluläre Matrix bahnen, sowie Tumorzell-Matrix-Verbindungen werden als essentielle Mechanismen für das diffus infiltrierende Wachstum der Gliome angesehen (Giese und Westphal 1996). In der großen und ständig wachsenden Gruppe der Matrixmetalloproteinasen wurden bislang vor allem MMP-2 und MMP-9 näher in Gliomen untersucht (Sawaya et al.

1996, Forsyth et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass MMP-2 in Gliomen die Zellmigration beeinflusst (Deryugina et al. 1997) und mit dem infiltrierenden Wachstum korreliert (Guo et al. 2005). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine MMP-2-Inhibierung zu einem verminderten infiltrierenden Wachstum führt (Gabelloni et al. 2010). Die Konstellation, dass ALCAM die Aktivierung von MMP-2 beeinflusst (Lunter et al. 2005, Jezierska et al. 2006b) und Tumorzell-Matrix-Verbindungen eingehen kann (Ofori-Acquah und King 2008), macht ALCAM als möglichen Ansatzpunkt für Interventionen interessant.

ALCAM wurde zwar in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen, bislang jedoch nicht in glialen Tumoren des Zentralnervensystems untersucht. Es fällt auf, dass sich die verschiedenen Tumore hinsichtlich ihres ALCAM-Expressionsmusters unterscheiden und dass die Expression von ALCAM während der Entstehung und Progression eines Tumors je nach Stadium schwankt (Ofori-Acquah und King 2008). Ziel dieser Arbeit ist daher der immunhistochemische Nachweis von ALCAM in glialen Tumoren des Zentralnervensystems und im Normalhirn auf Proteinebene und eine weitergehende Analyse dieses immunhistochemischen Expressionsmusters auch in Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Routinediagnostik.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Auswahl und Definition der Gewebeproben

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeproben glialer Tumore des Zentralnervensystems aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen ausgesucht. Die Gewebeproben wurden zwischen 1988 und 2009 in den neurochirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums Tübingen und den ASKLEPIOS-Kliniken Schildautal in Seesen entnommen und an die Abteilung für Neuropathologie der Universität Tübingen zur neuropathologische Begutachtung eingesandt.

Es wurden nur nach der WHO-Klassifikation eindeutig klassifizierbare gliale Tumore für diese Arbeit berücksichtigt, die in der Regel von mindestens zwei, oft sogar drei Neuropathologen begutachtet wurden. In den meisten Fällen lag zudem im Rahmen des Gliomverbundprojektes eine referenzpathologische Bestätigung der Diagnose vor.

Für die Durchführung der Untersuchung im Rahmen der Doktorarbeit liegt eine Zustimmung durch die Ethikkommission der Universität Tübingen vor.

2.2. Herstellung der histologischen Präparate

Die Tumore wurden nach ihrer Entnahme in phosphatgepufferter 4,5%-iger Formaldehydlösung (pH 7,4) fixiert. Nach ausreichender Fixierung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%) und anschließend in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden am Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Deutschland) ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen.

2.3. Die Tissue Microarray Methode

Die Tissue Microarray (TMA) Methode bietet sich an, um zahlreiche Gewebeproben auf einem Schnitt zeit- und methodengleich immunhistochemisch zu untersuchen zu können (Kononen et al. 1998). Die Validität der TMA-Methode konnte in zahlreichen

Studien bestätigt werden, die eine gute Übereinstimmung zwischen den Großflächenschnitten und den Stanzproben hinsichtlich der Expression verschiedenster Proteine zeigten (Takei et al. 2007, Boone et al. 2008). Die TMA-Methode ist bereits zur Evaluierung von immunhistochemischen Antikörpern in Hirntumoren etabliert (Ikota et al. 2006).

2.4. Konstruktion der Tissue Microarrays

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt drei Tissue Microarrays von Ependymomen der WHO-Grade I bis III konstruiert.

Zur Herstellung der TMA-Paraffinblöcke wurden zunächst konventionelle HE-Färbungen von Flächenschnitten der in Frage kommenden Gewebeproben von Patienten mit diagnostizierten Ependymomen der WHO-Grade I bis III lichtmikroskopisch untersucht. Die Gradierung des Tumorgewebes erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der WHO zur Klassifizierung von Tumoren des Nervensystems (Louis et al. 2007). Geeignete Areale wurden auf dem Schnitt genau markiert, um später auf die Akzeptorblöcke übertragen werden zu können. Damit wurde sichergestellt, dass tatsächlich Tumorgewebe gestanzt wurde und um unerwünschte Gewebebezirke mit Nekrosen oder Einblutungen auszuschließen.

Bei 87 von 116 Patienten konnten aufgrund ausreichenden Biopsiematerials geeignete Gewebeproben ausgewählt und 194 Stenzen entnommen werden. Diese verteilten sich auf 15 Subependymome WHO-Grad I, 36 myxopapilläre Ependymome WHO Grad I, 98 Ependymomen WHO-Grad II und 45 anaplastische Ependymome WHO-Grad III.

Die Herstellung der Tissue Microarrays erfolgte mit dem Manual Tissue Microarrayer Model MTA-1 der Firma Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA, nach der Methode von Kononen (Kononen et al. 1998). Dazu wurden Löcher im Abstand von 2 mm in einen leeren Paraffinblock gestanzt und mit Gewebezyindern aus dem Donor-Paraffinblock gefüllt. Für alle Gewebezyindern des Donor-Paraffinblocks wurde ein Durchmesser von 0,6 mm gewählt. Die Tiefe der Stanze ist abhängig von der Gewebedicke im Donorblock, die üblicherweise etwa 0,5 cm beträgt, und bestimmt auch die Ausbeute der hinterher angefertigten Serienschnitte. Die exakte Ausrichtung der Stanzlöcher und das passgenaue Einsetzen der Proben wurde mittels Mikrometerschrauben und Einspannen des Akzeptorblocks gewährleistet. Um

die Gefahr von Gewebeerlusten bei der späteren Weiterverarbeitung der TMA-Blöcke zu minimieren, wurde die Anzahl auf 92 Gewebeproben pro TMA-Paraffinblock limitiert.

Zum Versiegeln der Paraffinblöcke wurden diese für 3 Minuten im Brutschrank bei 39 °Celsius erwärmt und die Oberfläche mit einem Objektträger flach gedrückt. So wurde ein späteres Herauslösen der Gewebezyylinder beim Schneiden am Mikrotom verhindert. Von diesen Paraffinblöcken wurde anschließend an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Deutschland) ca. 3,0 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Die Antrocknung der Paraffinschnitte erfolgte im Brutschrank bei 37°Celsius.

Auf die Tissue Microarrays der in dieser Arbeit behandelten weiteren Tumorentitäten sowie Normalhirn konnte aus dem Archiv des des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen zurückgegriffen werden.

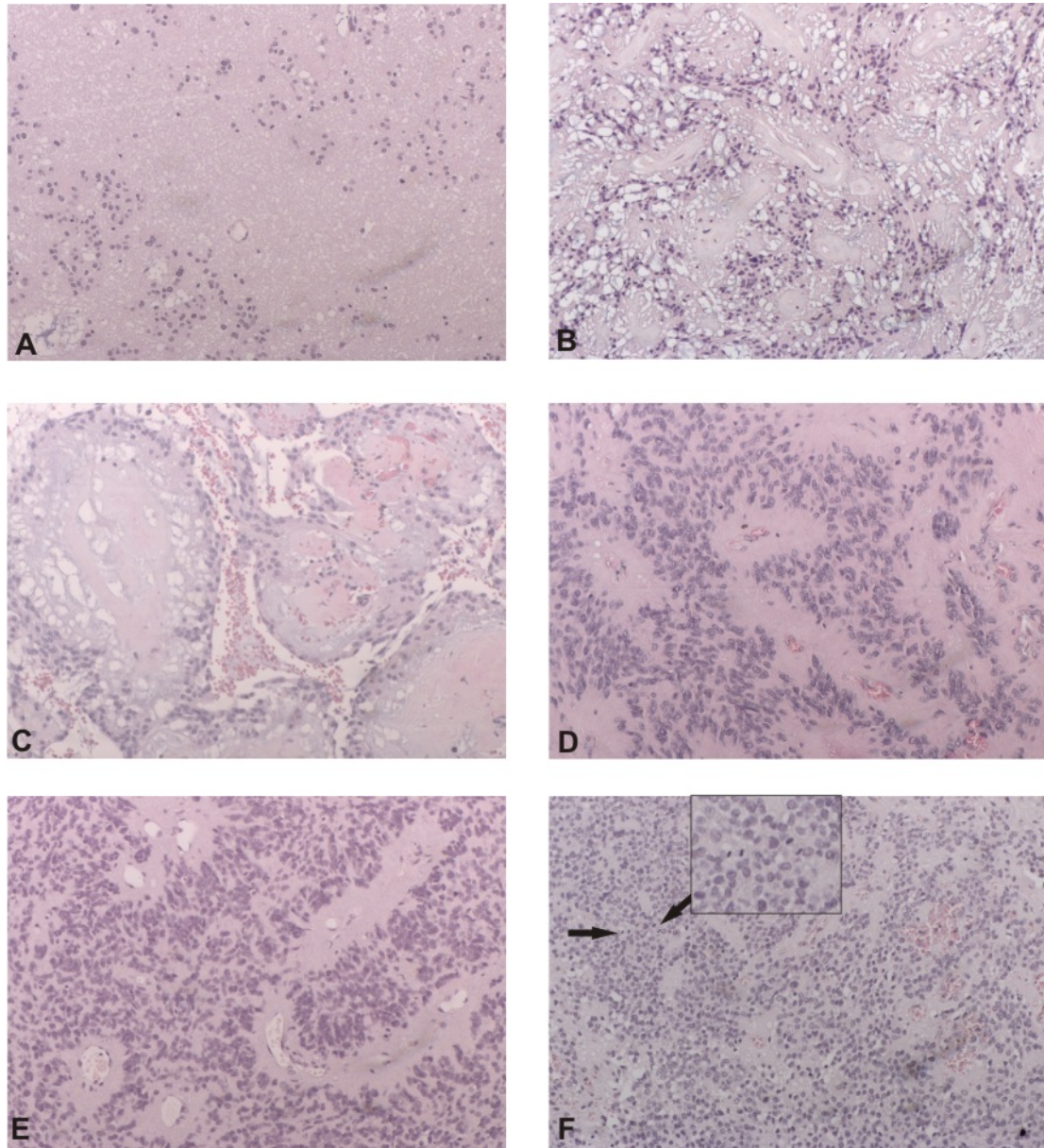


Abbildung 1: Repräsentative Histologie der in der TMA eingesetzten Ependymomen. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Subependymom WHO-Grad I (A, 100x Vergrößerung), myxopapilläres Ependymom WHO-Grad I (B, 100x), papillärer Anteil eines myxopapillären Ependymoms WHO-Grad I (C, 100x), Ependymom WHO-Grad II (D, 100x), anaplastisches Ependymom WHO Grad III (E, 100x) und anaplastisches Ependymom WHO-Grad III mit erhöhter mitotischer Aktivität (F, 100x, Inset mit Mitosen, 400x). HE-Färbung.

2.5. Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) ermöglicht dem Untersucher, bestimmte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Gewebe nachzuweisen. Die so genannten Primärantikörper binden dabei mit ihrem F(ab)-Fragment an bestimmte Proteinabschnitte (Epitope), die sich beispielsweise in der Zellmembran, im Zytoplasma oder auch im Kern befinden. Je nach Herstellungsart handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein für ihn spezifisches Epitop gerichtet ist, oder um einen polyklonalen Antikörper, der mehrere Epitope erkennen und binden kann. Im formalinfixiertem Gewebe entstehen kovalente Bindungen zwischen den Proteinen und dem Formalin, die zur Denaturierung der Proteine führt. Dadurch werden Zielproteine maskiert und stehen für eine Antikörperbindung nicht mehr zur Verfügung. Daher ist eine Antigendemaskierung durch thermische Vorbehandlung, beispielsweise in einem Pufferbad in der Mikrowelle, bei der die Proteine renaturiert und die maskierten Epitope freigelegt werden, notwendig. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-) Methode nach Hsu (Hsu 1981) verwendet, die sich die hohe Affinität zwischen Avidin und Biotin zu Nutze macht. So wird zur besseren Darstellung der Bindung des Primärantikörpers ein biotinylierter Sekundärantikörper auf den Objektträger pipettiert, der an den Fc-Abschnitt des Primärantikörpers bindet. Für eine erfolgreiche Färbereaktion ist die Interaktion des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers entscheidend. Der Enzymkomplex wird nach Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbstoff umgewandelt, der lichtmikroskopisch sichtbar ist.

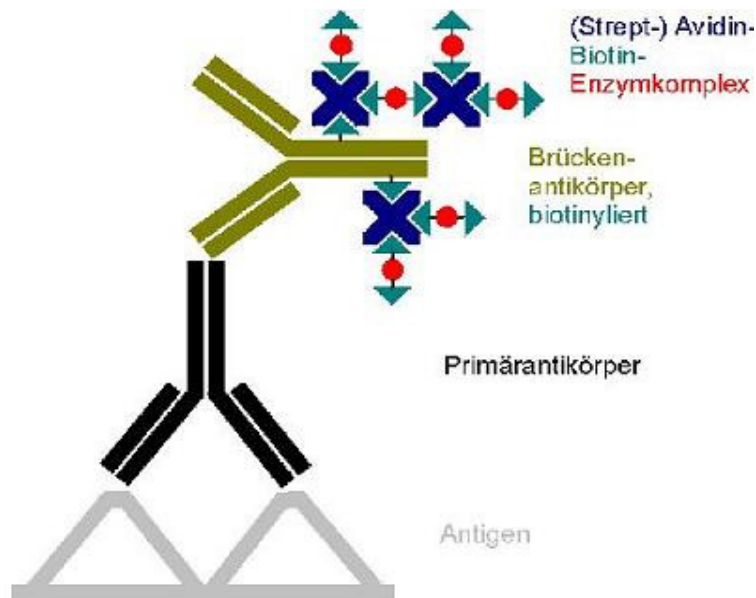


Abbildung 2: Avidin-Biotin-Methode (Abbildung modifiziert nach www.pathologie-online.de).

2.6. ALCAM

Der Antikörper gegen CD166, auch unter dem Namen Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) bekannt, ist ein monoklonales Immunglobulin der Superfamily (IgSF) (Bowen et al. 2000). Die Expression von ALCAM wurde erstmals bei aktivierten Leukozyten entdeckt (Bowen et al. 1995). Der in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper ab49496 aus dem Klon MOG/07 der Klasse IgG2a kappa der Firma Abcam, Cambridge, Großbritannien, stammt aus der Maus und ist gegen einen aus 200 Aminosäuren bestehenden Abschnitt des humanen CD166-Moleküls gerichtet.

2.7. MIB-1

Der MIB-1-Antikörper bindet an das nur von teilenden Zellen nukleär exprimierte Antigen Ki-67. Der in dieser Arbeit eingesetzte monoklonale Antikörper Ki-67 (Klon MIB-1) der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark stammt aus der Maus und reagiert mit einem Epitop des Ki-67-Gens (Key et al. 1993).

2.8. Durchführung der immunhistochemischen Färbung per Hand

Zuerst wurde die immunhistochemische Färbung einmalig per Hand als Verdünnungsreihe durchgeführt, um die optimale Primärantikörperkonzentration von ALCAM zu ermitteln. Hierzu wurden Glioblastom-Schnitte zur Entparaffinierung für 30 Minuten in ein Chloroformbad gelegt. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 100%, 96%, 70%, Aqua dest.) entwässert. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 1100 Watt für 15 Minuten. Danach wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt, in Aqua dest. und TBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte durch 3% H₂O₂ in 100% Methanol für 15 Minuten. Anschließend wurde in Aqua dest. und TBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 10% Schweineserum in TBS/BSA blockiert (Inkubationszeit 15 Minuten). Der Primärantikörper ALCAM wurde in einer Verdünnungsreihe (1:50, 1:100, 1:200, 1:400) mit TBS verdünnt und aufgetragen. Als negative Kontrolle erfolgte die Auftragung von reiner TBS-Lösung an Stelle des Primärantikörpers. Die Schnitte wurden über Nacht in einem Kühlraum bei 4 °C in einem geschlossenen Kasten inkubiert. Nach dem Spülen mit TBS für 5 Minuten wurde der Sekundärantikörper Anti-Mouse F(ab)₂ (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) 1:400 verdünnt und aufgetragen (30 Minuten Inkubationszeit). Nach einem weiteren Waschgang mit TBS wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) auf die Schnitte aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit TBS. Die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung wurde mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, Pf, Steinheim, Deutschland) als Chromogen angefärbt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde mit Hämalaun (50% in Wasser) gegengefärbt, gefolgt von einer kurzen Differenzierung in HCl-Alkohol (0,1%) und unter fließendem H₂O. Daraufhin wurde die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%, 100%) für jeweils 2 Minuten sowie 2 Mal für 5 Minuten in Xylol entwässert. Um eine längere Aufbewahrung zu ermöglichen, wurden die Schnitte mit Deckgläsern eingedeckelt und mit Eukitt versiegelt.

2.9. Automatisierte immunhistochemische Färbung

Durch die per Hand durchgeführten immunhistochemischen Färbereihen konnte die optimale Primärantikörperkonzentration von 1:50 für ALCAM ermittelt werden. Hierbei zeigte sich eine kontrastsreiche Darstellung positiver Strukturen bei minimaler Hintergrundfärbung. Die TMA-Schnitte wurden mit nach dem Standardprotokoll (CC1) mit Hilfe des BenchMark Immunohistochemistry Färbemoduls der Firma Ventana Medical Systems, Straßburg, Frankreich, in der Abteilung für Neuropathologie der Universität Tübingen automatisiert gefärbt. Hierbei erfolgten die Antigendemaskierung mittels Mikrowelle und einer auf EDTA basierender speziellen Cell Conditioning Pufferlösung und die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels des kommerziell erhältlichen I-VIEW-Inhibitors (Ventana). Nach Handauftrag des Primärantikörpers wurde dieser 30 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe eines Fixatives, die Signalverstärkung mittels zweier Amplifizierlösungen und Anwendung einer zweiseitigen Blockadelösung bevor der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Die Entwicklung erfolgte mittels Meerrettichperoxidase (I-VIEW-SA-HRP) und Diaminobenzidin (I-VIEW-DAB, I-VIEW- H₂O₂) und einem auf Kupferbasis arbeitenden Verstärker (I-VIEW-Copper) als Chromogen. Die Gegenfärbung erfolgte ebenfalls mit Hämalun. Die Negativkontrolle erfolgte durch Gabe von TBS anstatt des Primärantikörpers zum gleichen Protokollschritt. Als Positivkontrolle diente eine Hautprobe, bei der die epithelialen Strukturen im Gewebe eine kräftige membranöse Darstellung von ALCAM aufwiesen. Die immunhistochemische Färbung mit dem MIB-1-Antikörper des TMA-Schnittes von Glioblastomen WHO-Grad IV erfolgte in einer Primärantikörperkonzentration von 1:100 analog dem Standardprotokoll (CC1) mit Hilfe des BenchMark Immunohistochemistry Färbemoduls der Firma Ventana Medical Systems, Straßburg, Frankreich.

2.10. Lichtmikroskopische Auswertung von ALCAM

Die Auswertung wurde an einem Lichtmikroskop (Olympus, Vanox AHBT3, Hamburg, Deutschland) mit 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Zur Fotodokumentation wurde das angebrachte laseroptische Digitalkamerasystem ProgResC10 (Jenoptik, Jena) eingesetzt und die Bilder mit der Software Image Access Enterprise (Imagic, Glattbrugg, Schweiz) nach Adjustierung der Belichtung gespeichert.

Die TMA-Gewebebeobachten wurden semiquantitativ mit einer etablierten Scoring-Methode ausgewertet (Burkhardt et al. 2006, Schittenhelm et al. 2009). Nach histologisch orientierender Betrachtung wurde zunächst der Anteil der positiven Tumorzellen in Bezug auf den Gesamteindruck in 10er Prozentstufen geschätzt. Bei den positiven Zellen wurde dabei die Intensität der zytoplasmatischen und membranösen Expression, die nukleäre Expression und die membranöse Expression separat bewertet. Bei jeweils keiner, schwacher, mittlerer und starker Intensität wurde ein vierstufiger Score von 0 (negativ) bis 3 (stark) verwendet (siehe Abbildung 3). Es wurde des Weiteren bewertet, ob eine nukleäre Expression vorliegt oder nicht. Die membranöse Expression wurde mit einem fünfstufigen Score (0=0%, das heißt keine positiven Zellen, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positive Zellen mit membranöser Färbung, siehe Abbildung 4) bestimmt. Die Quantität der Tumorzellen, je nach Entität und WHO-Grad, in den einzelnen Stanzungen wurde beim Scoring berücksichtigt, um der Problematik direkt zu begegnen, dass einzelne Tumorzellen gegenüber einer Vielzahl an Tumorzellen schwächer/stärker exprimiert zu sein scheinen. Es wurden nur Gewebebeobachten, die noch mindestens 25 % des Stanzendurchmessers aufwiesen, in die Auswertung miteinbezogen.

In einigen Fällen lagen pro Patient und Tumor mehrere Proben vor, so dass diese zum einen zusammenfassend als eine Probe („gesamt“) betrachtet wurden und zum anderen der Durchschnittswert der ermittelten Werte pro einzelner Probe arithmetisch berechnet („gemittelt“) wurde. So wurde nur ein Wert pro Patient und Tumor in der Statistik berücksichtigt. Falls ein Rezidivtumor oder Primärtumor vorlag, wurden diese getrennt voneinander ausgewertet, um später diese miteinander vergleichen zu können.

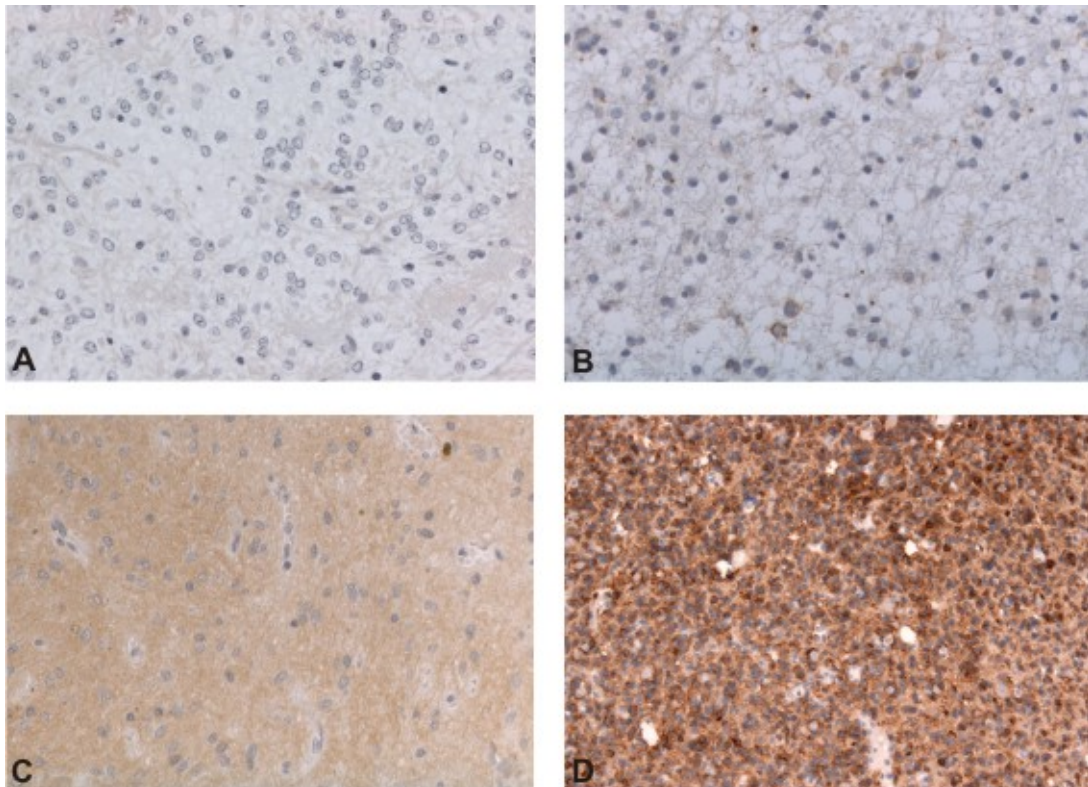


Abbildung 3: Intensitätsstufen der immunhistochemischen Färbung von ALCAM. Die Bilder stellen die repräsentative Einteilung des Intensitätsscores dar und sind wie folgt dargestellt: negative Expression, entsprechend Score 0 (A, 200x Vergrößerung), schwache Expression Score 1 (B, 200x), mittelstarke Expression Score 2 (C, 200x) und starke Expression Score 3 (D, 200x).

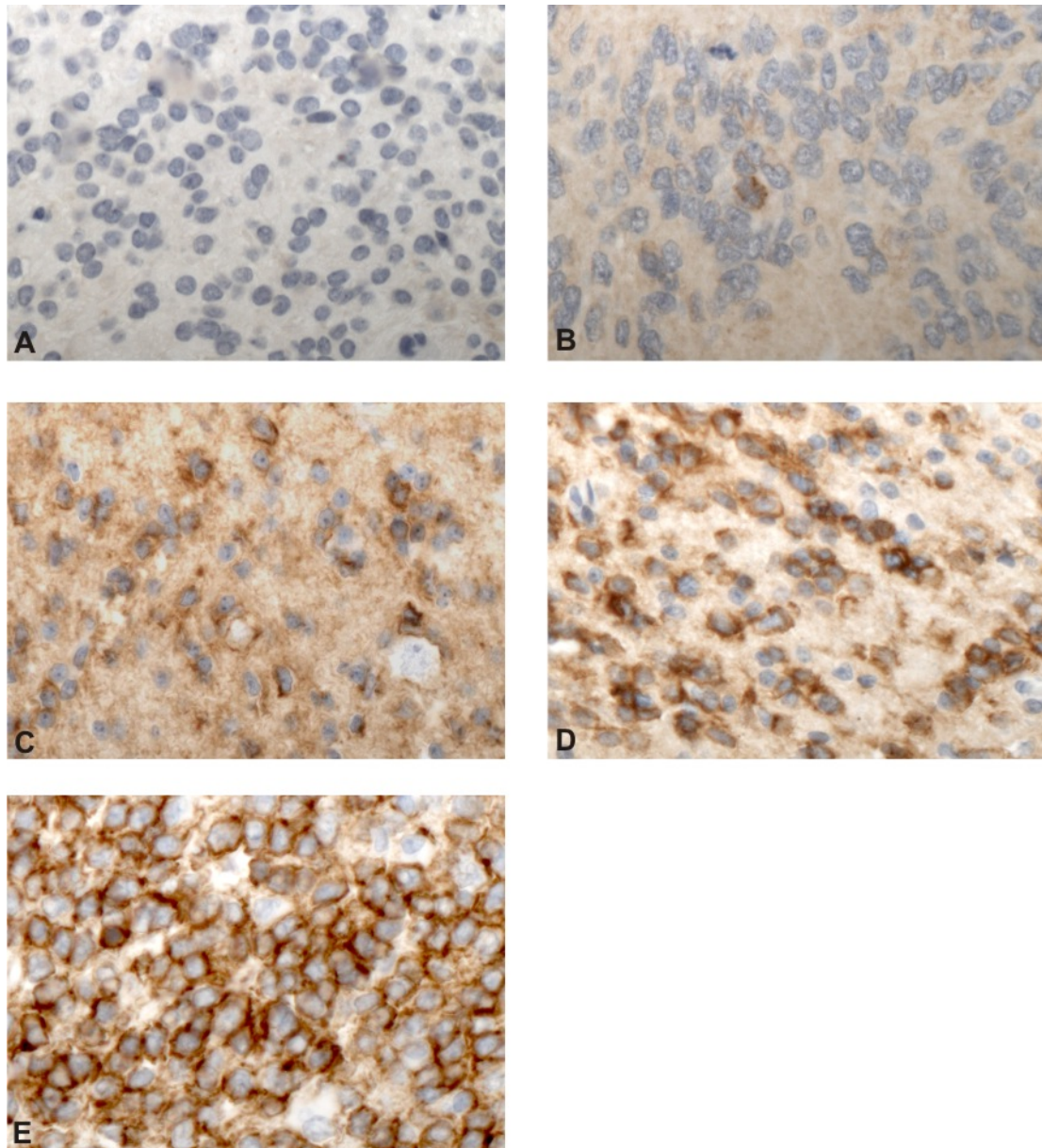


Abbildung 4: Semiquantitative Erhebung der membranösen Expression in der immunhistochemischen Färbung von ALCAM. Die Bildern sind wie folgt dargestellt: negative membranöse Expression Score 0 (A, 400x Vergrößerung), membranöse Expression in singulären Zellen: Score 1 (B, 400x), membranöse Expression in 25-49% der Zellen: Score 2 (C, 400x), membranöse Expression in 50-74% der Zellen: Score 3 (D, 400x) und in über 75% der Zellen: Score 4 (E, 400x).

2.11. Lichtmikroskopische Auswertung von MIB-1

Die quantitative Auswertung der MIB-1-Proliferationsaktivität wurde am Lichtmikroskop (Olympus, Vanox AHB3, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe eines Zähllokulars in 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurden von jeder TMA-Gewebeprobe die positiven Nuklei pro 100 Zellen in einem Kästchen gezählt und in Prozent angegeben. Zur Fotodokumentation wurde das angebrachte laseroptische Digitalkamerasystem ProgResC10 (Jenoptik, Jena) eingesetzt und die Bilder mit der Software Image Access Enterprise (Imagic, Glattbrugg, Schweiz) nach Adjustierung der Belichtung gespeichert.

2.12. Erfassung der Patientendaten

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Allgemeine Neurologie und den Abteilungen für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen sowie der ASKLEPIOS-Kliniken Schildautal in Seesen wurde die Erfassung der allgemeinen Patientendaten (Alter, Geschlecht, Überleben nach Zeitpunkt der Operation) durchgeführt.

Überlebensdaten für eine Kaplan-Meier-Analyse konnten von 50 an einem Glioblastom WHO-Grad IV, 35 an einem Ependyomom WHO-Grad II und 7 an einem anaplastischen Ependyomom WHO-Grad III erkrankten Patienten erhoben werden.

Von einigen Patienten ließen sich nach ihrer Operation aufgrund externer Nachsorge keine Daten ermitteln, so dass dieses Patientengut nicht in die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse miteinbezogen werden konnte.

2.13. Statistische Auswertung

Eine Kontingenzanalyse wurde sowohl für die Intensität als auch die membranöse Immunreaktivität von ALCAM durchgeführt. Dabei wurde anhand der erhobenen „gesamt“ Werte die Abhängigkeit bzw. die Unabhängigkeit der Expression von dem WHO-Grad der Tumore, Alter, Geschlecht, Primärtumor bzw. Rezidivtumor innerhalb einer Tumorentität mit dem Cochran-Mantel-Haenszel Test untersucht. Die Altersabhängigkeit von ALCAM wurde mithilfe einer logistischen Regressionsanalyse überprüft. Mit der „oneway analysis of variance“ (ANOVA) wurden die arithmetischen Mittel („gemittelten“ Werte) für die einzelnen WHO-Grade verglichen. Der Student's t-Test wurde zum individuellen, paarweisen Vergleich der einzelnen Grade

herangezogen. Die univariante Überlebensanalyse wurde anhand der Kaplan-Meier-Methode vorgenommen und signifikante Unterschiede bezüglich der Überlebenskurven mit dem Logrank-Test bestimmt (Kaplan und Meier 1958). Zudem wurde die membranösen und zytoplasmatischen Intensität und der membranösen Expression von ALCAM mit dem MIB-1-Proliferationsaktivität in Glioblastomen WHO-Grad IV in der „oneway analysis of variance“ (ANOVA) und im Student's t-Test verglichen.

Signifikante Unterschiede der p-Werte sind wie folgt festgelegt: $0.05 < p < 0.001$ gering signifikant, $0.001 < p < 0.0001$ moderat signifikant, $p \leq 0.0001$ hoch signifikant. Die rücktransformierten Mittelwerte werden zusammen mit ihrem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm JMP 7.0 (SAS Institute, Cary, NJ, USA).

3. ERGEBNISSE

3.1. Anzahl der ausgewerteten Tumoren

Es konnten 25 pilozytische Astrozytome WHO-Grad I, 69 diffuse Astrozytome WHO-Grad II, 58 anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III, 57 Glioblastome WHO-Grad IV, 7 Subependymome WHO-Grad I, 20 myxopapilläre Ependymome WHO-Grad I, 49 Ependymome WHO-Grad II, 22 anaplastische Ependymome WHO-Grad III, 15 Oligodendrogliome WHO-Grade II, 20 anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III und, um einen Vergleich zu gesundem Hirngewebe zu erhalten, 82 Normalhirnproben aus 9 Obduktionsfällen ausgewertet und für die statistische Analyse herangezogen werden.

3.2. Immunhistochemische Reaktivität von ALCAM in glialen Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS)

ALCAM ist in glialen Tumoren des ZNS sowohl membranös als auch zytoplasmatisch immunhistochemisch nachweisbar, jedoch liegt keine nukleäre Reaktivität vor (siehe Tabelle 1 im Anhang). Einige Tumore weisen eine heterogene ALCAM-Expression unabhängig von der Tumorzell-dichte oder der Zellpleomorphie auf. Die Immunreaktivität von ALCAM in Ependymomen hingegen ist homogen. Bei den meisten Tumoren ist das Neuropil mit Akzentuierung der perinukleären Zellmembran schwach gefärbt. Die Gefäßendothelien zeigen keine ALCAM-Expression. Bei den Ependymomen konnte in einigen Fällen ein punktförmiges Muster, das dem „perinuclear dot-like Pattern“ bei der EMA-Färbung (Hasselblatt und Paulus 2003) ähnelt, beobachtet werden. In Glioblastomen WHO-Grad IV ist ALCAM stärker in den Tumorzellen exprimiert, die die Pseudopalisaden um Nekrosen ausbilden. Bei einigen Astrozytomen und Ependymomen konnte eine verstärkte Expression in den perivaskulären Gliazellen festgestellt werden. Die deutlich stärkste Expression von ALCAM unter allen Tumorentitäten präsentieren die Oligodendrogliome WHO-Grad II und III.

ALCAM ist in höhergradigen Astrozytomen häufiger immunhistochemisch nachweisbar (91%, 105/115 Proben positiv) als in niedriggradigen Astrozytomen (74%, 70/94 Proben positiv). Im Gegensatz dazu sind die niedriggradigen Ependymome (88%, 67/76) häufiger ALCAM-positiv als die höhergradigen

Ependymome (68%, 15/22). Alle Oligodendrogliome zeigen eine mittelstarke immunohistochemische Reaktivität für ALCAM (Abbildungen 5 und 6). Negative Fälle lagen in diesem Kollektiv nicht vor.

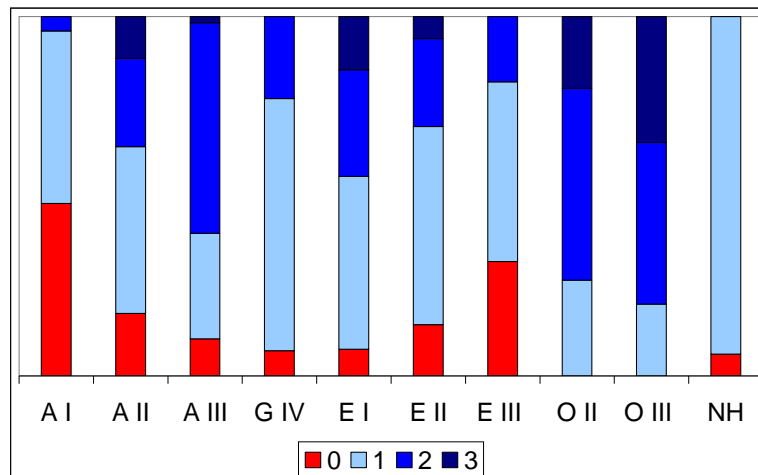


Abbildung 5: Intensitätsverteilung (Score 0-3) von ALCAM in Astrozytomen WHO-Grade I bis III (A I, A II, A III), Glioblastomen WHO-Grad IV (G IV), Ependymomen WHO-Grad I bis III (E I, E II, E III), Oligodendrogliomen WHO-Grad II und III (O II, O III) und im Normalhirn (NH) als Balkendiagramm.

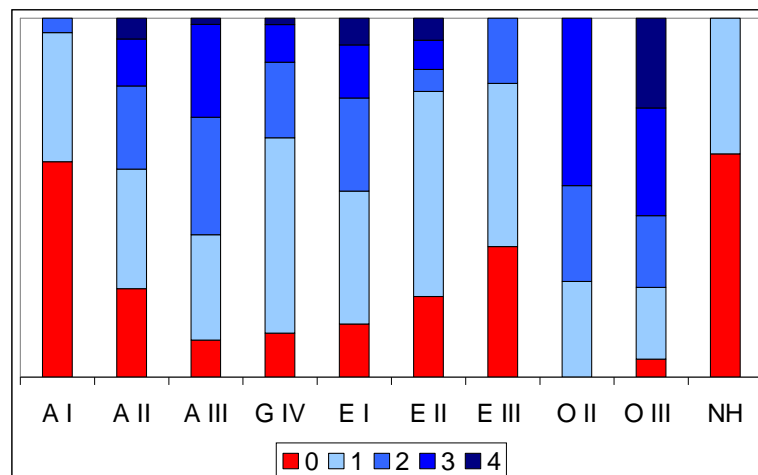


Abbildung 6: Membranöse Expressionsverteilung (Score 0-4) von ALCAM in Astrozytomen WHO-Grade I bis III (A I, A II, A III), Glioblastomen WHO-Grad IV (G IV), Ependymomen WHO-Grade I bis III (E I, E II, E III), Oligodendrogliomen WHO-Grad II und III (O II, O III) und im Normalhirn (NH).

3.2.1. Intensität von ALCAM in Astrozytomen

Die statistische Analyse des Mittelwerte der zytoplasmatischen und membranösen Intensität (0=negativ, 1=schwach positiv, 2=mittelstark positiv, 3=stark positiv) zeigt eine hoch signifikant höhere Expression von ALCAM in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II mit einem Mittelwert von 1.3 (p-Wert <0.0001, 95%-Konfidenzintervall (95% KI) 1.1-1.5), anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III mit einem Mittelwert von 1.5 (p<0.0001, 95% KI 1.3-1.7), und eine moderat signifikant höhere Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV mit einem Mittelwert von 1.1 (p=0.0011, 95% KI 1.0-1.3) im Vergleich zu pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von 0.6 (95% KI 0.3-0.8). Im Vergleich der WHO-Grade der diffusen Gliome zeigt sich, dass die Intensität in Glioblastomen WHO-Grad IV gegenüber den Astrozytomen des WHO-Grades II (p=0.1691) und WHO-Grades III (p=0.0057) reduziert ist, jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Die zytoplasmatische und membranöse Intensität von ALCAM in Astrozytomen ist unabhängig von Geschlecht und Alter der Patienten als auch dem Status, ob ein Primärtumor oder Rezidivtumor vorliegt (siehe Tabelle 1 im Anhang).

3.2.2. Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Astrozytomen

Die statistische Analyse der Mittelwerte der membranösen Expression (0=0%, das heißt keine positiven Zellen, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positive Zellen mit membranöser Färbung) ergibt eine hoch signifikant höhere Anzahl von Tumorzellen, die ALCAM membranös immunhistochemisch exprimieren, in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II mit einem Mittelwert von 1.4 (p<0.0001, 95 % KI 1.1-1.7), anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III mit einem Mittelwert von 1.8 (p<0.0001, 95% KI 1.5-2.0), und Glioblastomen WHO-Grad IV mit einem Mittelwert von 1.4 (p=0.0001, 95% KI 1.1-1.6) im Vergleich zu pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von 0.4 (95% KI 0.2-0.7). Die membranöse Expression von ALCAM in Astrozytomen ist unabhängig von Geschlecht und Alter der Patienten sowie dem Status, ob ein Primärtumor oder Rezidivtumor vorliegt (siehe Tabelle 1 im Anhang).

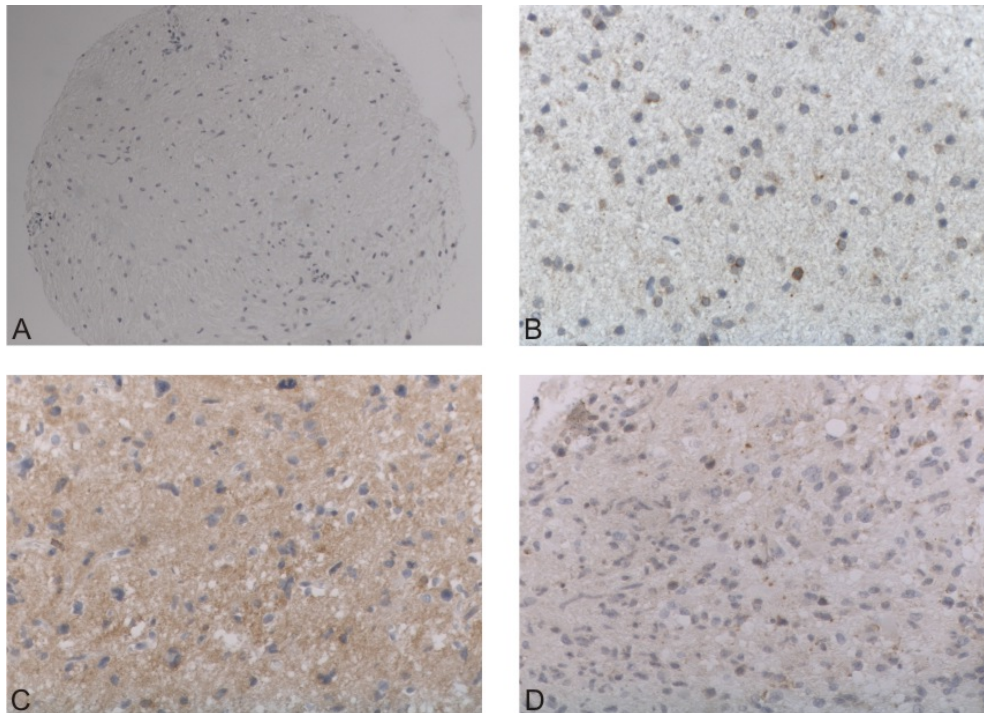


Abbildung 7: Repräsentative Auswahl von immunhistochemischen Färbungen von ALCAM in Astrozytomen. Während in einem pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (A, 100x Vergrößerung) und diffuses Astrozytom WHO-Grad II (B, 200x) nur geringe Färbeintensität beobachtet werden kann, fällt diese in anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (C, 200x) und Glioblastom WHO-Grad IV (D, 200x) stärker aus (insgesamt jedoch auf niedrigem Niveau).

3.2.3. Intensität von ALCAM in Ependymomen

Die statistische Analyse des semiquantitativen Scorings der zytoplasmatischen und membranösen Intensität zeigt eine gering signifikant niedrigere Expression von ALCAM in anaplastischen Ependymomen WHO-Grad III mit einem Mittelwert von 0.8 (95% KI 0.5-1.1) im Vergleich zu Ependymomen WHO-Grad II mit einem Mittelwert von 1.2 ($p=0.048$, 95% KI 1.0-1.4) und myxopapillären Ependymomen WHO-Grad I und Subependymomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von 1.5 ($p=0.0016$, 95% KI 1.2-1.8). Die zytoplasmatische und membranöse Intensität von ALCAM in Ependymomen ist unabhängig von Geschlecht und Alter der Patienten sowie ob ein Primärtumor oder Rezidivtumor vorliegt (siehe Tabelle 1 im Anhang)

3.2.4. Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Ependymomen

Die Zahl der Tumorzellen, die ALCAM membranös exprimieren, ist in anaplastischen Ependymomen WHO-Grad III mit einem Mittelwert von 0.8 (95% KI 0.4-1.1) im Vergleich zu myxopapillären Ependymomen WHO-Grad I und Subependymomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von 1.6 ($p=0.0047$, 95% KI 1.2-2.1) gering signifikant verringert. In Ependymomen WHO-Grad II ist die membranöse Expression im Vergleich zu Ependymomen WHO-Grad III ($p=0.1456$), myxopapillären Ependymomen WHO-Grad I und Subependymomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von 1.1 ($p=0.0612$, 95% KI 0.8-1.5) nicht signifikant verändert. Alter, Geschlecht, Primärtumor oder Rezidivtumor haben keinen Einfluss auf die membranöse Expression von ALCAM in Ependymomen (siehe Tabelle 1 im Anhang).

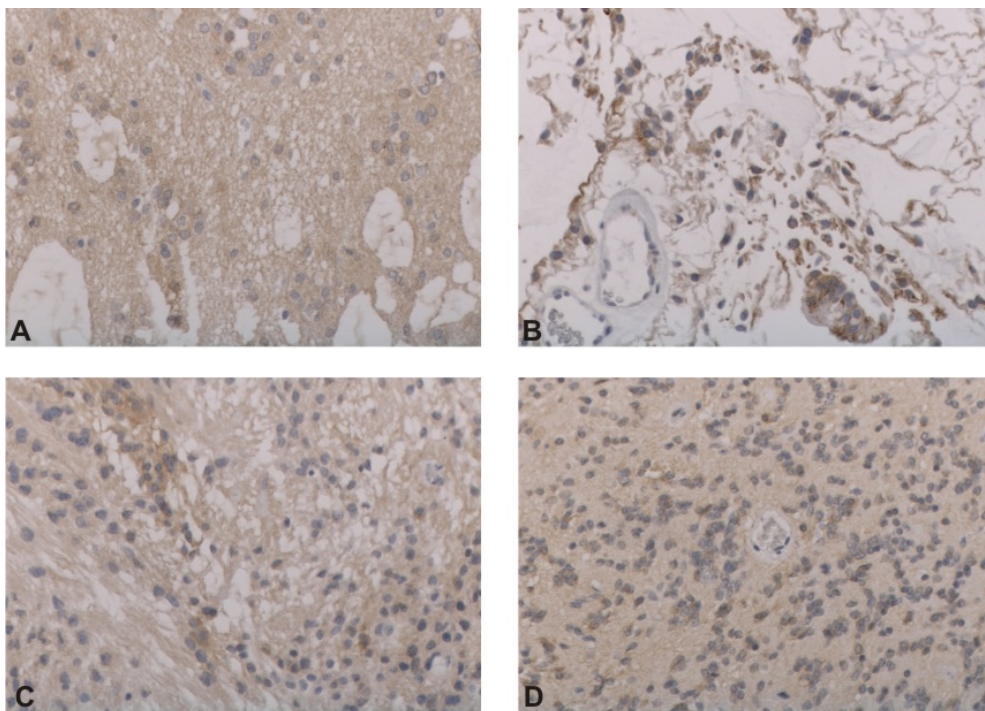


Abbildung 8: Repräsentative Auswahl von immunhistochemischen Schnitten von ALCAM in Ependymomen. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Subependymom WHO-Grad I (A, 200x Vergrößerung), myxopapilläres Ependymom WHO-Grad II (B, 200x), Ependymom WHO-Grad II (C, 200x) und anaplastisches Ependymom WHO-Grad III (D, 200x).

3.2.5. Intensität von ALCAM in Oligodendrogliomen

Für die zytoplasmatische und membranöse Intensität von ALCAM in Oligodendrogliomen WHO-Grad II ergibt sich ein Mittelwert von 1.9 (95% KI 1.5-2.2) und in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III ein Mittelwert von 2.1 (95% 1.8-2.4). Die Intensität von ALCAM ist in Oligodendrogliome WHO-Grad II im Vergleich zu Ependymomen WHO-Grad II ($p < 0.0001$) hoch signifikant und zu diffusen Astrozytomen WHO-Grad II ($p = 0.0048$) gering signifikant erhöht. Ebenfalls ist die Intensität von ALCAM in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III im Vergleich zu anaplastischen Ependymomen WHO-Grad III ($p < 0.0001$) hoch signifikant und zu anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ($p = 0.0005$) mäßig signifikant erhöht (siehe Tabelle 1 im Anhang).

3.2.6. Membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Oligodendrogliomen

Für die membranöse Immunreaktivität von ALCAM in Oligodendrogliomen WHO-Grad II ergibt sich ein Mittelwert von 2.2 (95% KI 1.6-2.8) und in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III ein Mittelwert von 2.5 (95% 2.0-3.0). Aufgrund der starken Überschneidung dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der Färbeintensität wurde hier auf weitergehende statistische Analysen verzichtet.

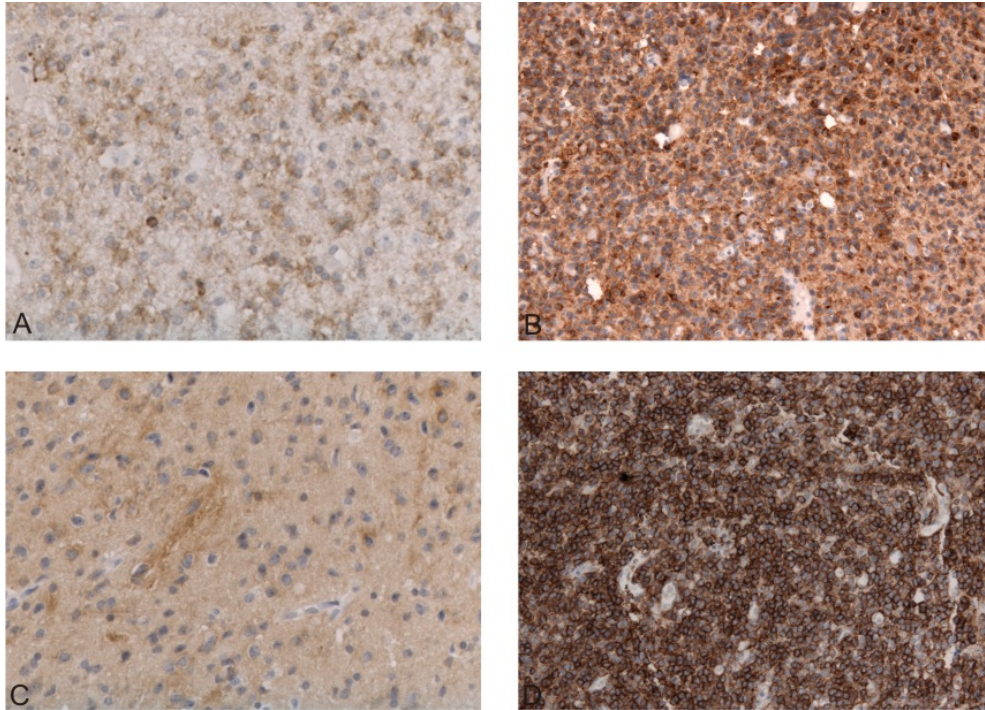


Abbildung 9: Repräsentative Auswahl von immunhistochemischen Schnitten von ALCAM in Oligodendrogliomen. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Oligodendrogliom WHO-Grad II (A und B, 200x Vergrößerung) und anaplastisches Oligodendrogliom WHO-Grad III (C und D, 200x).

3.3. Immunhistochemische Analyse von ALCAM in Normalhirn

Im Normalhirn ist ALCAM überwiegend schwach (Intensitätsscore 1) jedoch konstant exprimiert. (93%, 77/82 Proben). Eine diskrete membranöse Expression (Score 1) ist in 31 von 82 Normalhirnproben (37%) zu sehen. Höhere Intensitätswerte sowie membranöse Expressionswerte als der Score 1 sind in dieser Studie nicht vergeben worden. In den kortikalen Bereichen des Frontal- und Okzipitallappens sowie im Cerebellum ist überwiegend keine ALCAM-Expression vorhanden. Des Weiteren ist ALCAM selten im Hippocampus, Thalamus, Pallidum und Putamen exprimiert, jedoch zeigt sich eine diskrete Immunreaktivität der Neurone und umliegende Strukturen in pontinen Gebieten und der unteren Olive.

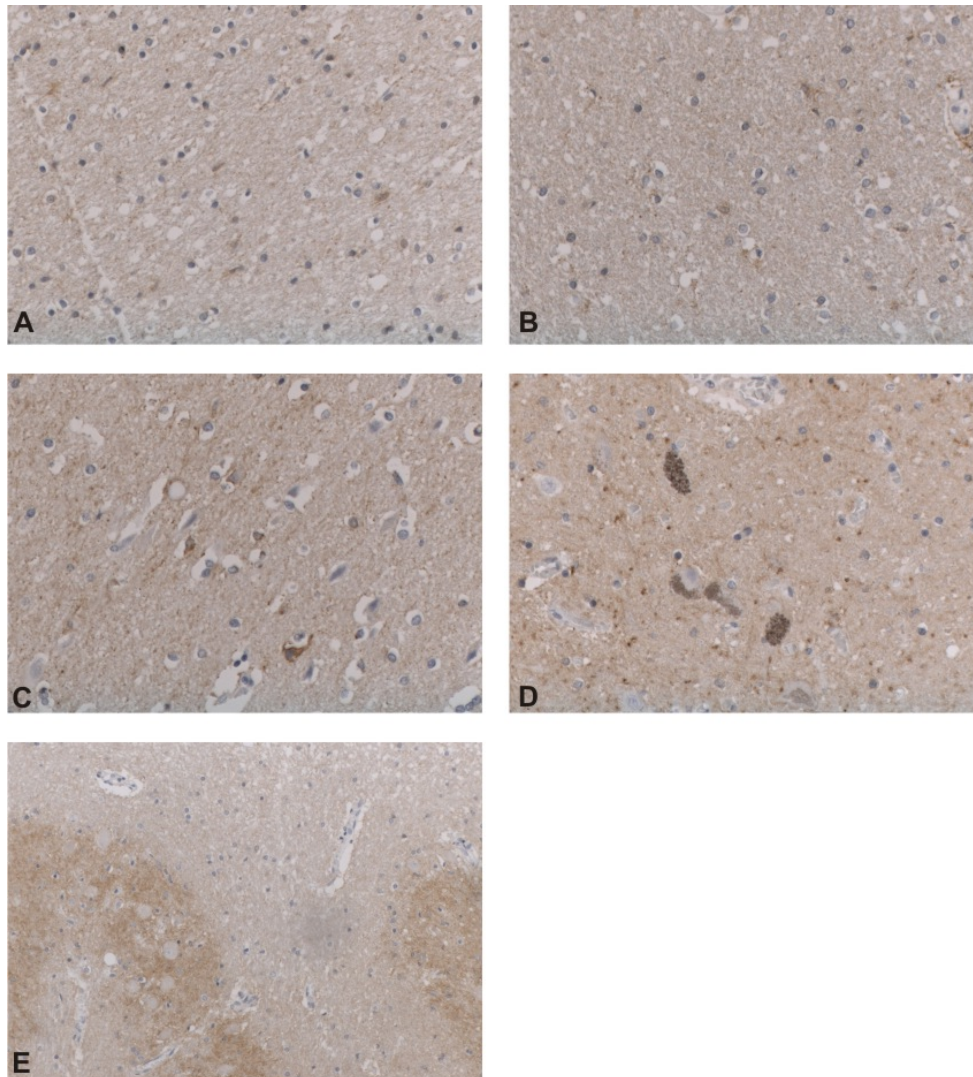


Abbildung 10: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von ALCAM in Normalhirngewebe. Die Bilder sind wie folgt dargestellt: frontales Hirngewebe (A, 200x Vergrößerung), okzipitales Hirngewebe (B, 200x), ventrikelnahes Hirngewebe (C, 200x), mediobasales Hirngewebe (D, 200x) und infratentorielles Hirngewebe (E, 100x).

3.4. ALCAM im Vergleich zum MIB-1-Proliferationsindex

Im statistischen Vergleich der Immunreaktivität von ALCAM mit dem MIB-1-Proliferationsindex in Glioblastomen WHO-Grad IV zeigt sich keine signifikante Abhängigkeit ($p > 0.05$).

3.5. Kaplan-Meier-Analyse für ALCAM

Die mittlere Überlebenszeit bei ALCAM-negativen Glioblastomen WHO-Grad IV beträgt 0.3 Jahre (4 Monate) und ist somit deutlich kürzer als das mittlere Überleben der 44 ALCAM positiven Glioblastome WHO-Grad IV mit 1.4 Jahren (16.8 Monate). Im Wilcoxon-Test ergibt sich somit ein gering signifikanter p-Wert von 0.009, der aber nicht durch den sensitiveren Logrank-Test bestätigt werden konnte ($p=0.067$). Für Astrozytome WHO-Grade I bis III sind keine Überlebensanalyse durchgeführt worden.

Die Immunreaktivität von ALCAM zeigt keinen Einfluss auf das Überleben der an einem Ependymom der WHO-Grade II oder III erkrankten 42 Patienten (Logrank-Test $p=0.35$).

Für Oligodendrogliome der WHO-Grade II und III sind keine Überlebensanalyse durchgeführt worden, da alle Tumore ALCAM exprimieren und somit keine Stratifizierung hinsichtlich positiver und negativer Fälle möglich ist.

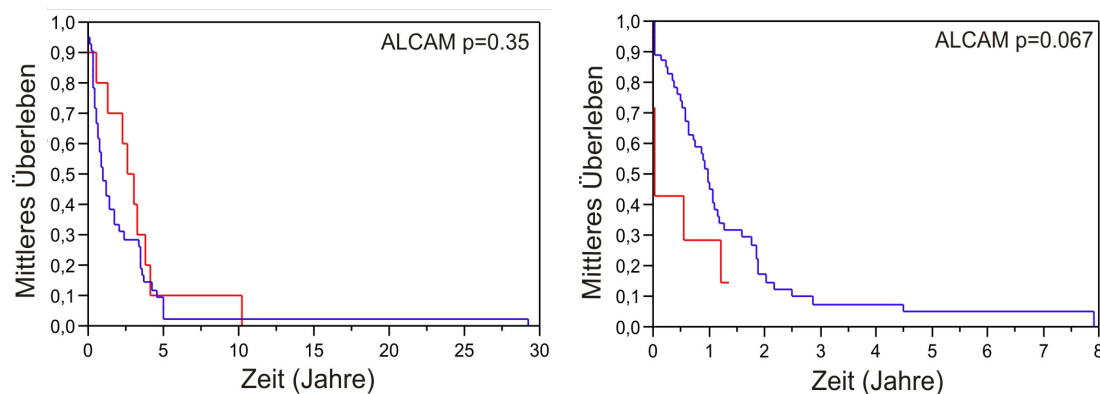


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven für ALCAM-positive (blau) bzw. negative (rot) Ependymome der WHO Grade II und III (links) und ALCAM-positive (blau) bzw. negative (rot) Glioblastome WHO-Grad IV (rechts).

4. DISKUSSION

Zelladhäsion und Zellmigration spielen nicht nur eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung normaler Gewebszellen, sondern sind auch relevant für das Überleben und die Metastasierung von Tumorzellen (Cavallaro und Christofori 2004b, Strizzi et al. 2005). Gliome, insbesondere Astrozytome ab dem WHO-Grad II, sind charakterisiert durch ein diffus infiltrierendes Wachstum unter Beibehaltung präexistenter Hirnstrukturen. Diese diffuse Invasion von ZNS-Gewebe wird durch komplexe molekularbiologische Abläufe verursacht, bei der eine veränderte Zelladhäsion ebenso wichtig ist wie der Abbau der extrazellulären Matrix durch proteolytischen Proteasen oder die Modifikation des Zytoskeletts (Lefranc et al. 2005). Das in dieser Arbeit untersuchte Zelladhäsionsmolekül ALCAM lässt aufgrund seiner spezifischen Zell- und Gewebeverteilung auf eine Beteiligung des Proteins in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen, der Neurogenese (Weiner et al. 2004), der Hämatopoese (Ohneda et al. 2001), der Immunantwort und Tumorprogression (Swart 2002) schließen und ist dadurch in den Fokus vieler Forschungsgruppen in der Onkologie gerückt.

Abgesehen von einer Studie, in der eine Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse von 3 Gliomzelllinien und eine Immunhistochemie bei 16 nicht näher beschriebenen Hirntumorproben durchgeführt wurden (Wiiger et al. 2010), ist diese Arbeit nach dem heutigem Kenntnisstand die erste, die die Expression von ALCAM in Gliomen *in vivo* untersucht hat. In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Reaktivität von ALCAM in Gliomen der WHO-Grade I bis IV sowie im tumorfreien ZNS-Gewebe analysiert und mit dem Überleben der Patienten korreliert. Dabei sollen die möglichen Eigenschaften von ALCAM, zu denen die Förderung der Zellmigration durch Aktivierung proteolytischer Proteasen (Lunter et al. 2005), aber auch die Zelladhäsion (Ofori-Acquah und King 2008) zählen, diskutiert werden und die Frage beantwortet werden, ob ALCAM Einfluss auf das Überleben der an einem Gliom erkrankten Patienten haben kann.

4.1. Zellverbindungen und Zellmigration durch ALCAM

Erst Änderungen der bestehenden Zelladhäsionen erlauben es Tumorzellen aus dem bestehenden Verbund auszubrechen, zu migrieren und an anderer Stelle Metastasen

zu bilden. Es ist jedoch zu beachten, dass in Gliomen das diffus infiltrierende und destruierende Wachstum, das in der Regel auf das Hirnparenchym beschränkt bleibt, im Vordergrund steht und eine Metastasierung nur äußerst selten stattfindet. Die Hypothese, dass Zelladhäsionsmoleküle und proteolytische Signalkaskaden molekulare Veränderungen bedingen, die den Übergang von Zelladhäsion hin zur Zellmigration steuern, ist nicht neu und bereits experimentell für andere Zelladhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel für das Zelladhäsionsmolekül L1 (Mechtersheimer et al. 2001), untersucht. Auch ALCAM stellt möglicherweise ein solches Molekül dar, das Zellverbindungen und Zellmigration steuern kann (Swart 2002). Die in unserer Arbeit beobachtete membranöse Expression von ALCAM in Tumorzellen lässt prinzipiell auch an eine solche Funktion in glialen Tumoren denken. Eine Möglichkeit, um die Tumorzellmigration zu fördern, besteht darin, die Zellverbindung der Tumorzellen untereinander durch ein externes Protein zu lösen. So stören proteolytische Proteasen, wie zum Beispiel die Disintegrin und Metalloproteinase ADAM17, ALCAM in seiner Zelladhäsionsfunktion (Bech-Serra et al. 2006, Rosso et al. 2007). Im Ovarialkarzinom bewirkt dieser molekulare Prozess, bei dem eine Ektodomäne von ALCAM proteolytisch abgespalten wird („Ectodomain-Shedding“), eine erhöhte Motilität und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen und trägt so zum invasiven Wachstum und der Metastasierung dieses Karzinoms bei (Rosso et al. 2007). Auch in Mammakarzinomzellen führt ein Verlust der durch ALCAM und E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion zu einer erhöhten MMP-2-Expression und zu einer erhöhten Metastasierungsrate (Jeziarska et al. 2009). Man könnte deshalb auch spekulieren, dass ALCAM durch seine homotypischen Zellbindungen die Motilität der Zellen einschränkt (Corrias et al. 2010) und dadurch zur Stabilität des Zellverbundes beiträgt.

Des Weiteren wird vermutet, dass ALCAM selbst die Zelldichte messen und über Signaltransduktion proteolytische Kaskaden steuern könnte (Rosso et al. 2007). Es wird beispielsweise angenommen, dass ALCAM in metastasierenden Melanomzellen über Zell-Zell-Verbindungen sowie Zell-Matrix-Verbindungen MMP2 aktiviert und so die Tumorzellmigration fördert (Lunter et al. 2005).

Die membranöse und zytoplasmatische Expression von ALCAM auf Proteinzebene wurde bereits in epithelialen und melanozytären Neoplasien beschrieben (van Kempen et al. 2000, King et al. 2004, Weichert et al. 2004, Kristiansen et al. 2005). Allerdings ist die molekularbiologische Relevanz dieser Expressionsmuster nach wie

vor nicht ausreichend geklärt (Weichert et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass die membranöse Expression von ALCAM im normalen Gewebe einer vermehrten zytoplasmatischen Expression in einigen malignen nicht hirneigenen Tumoren weicht (King et al. 2004, Verma et al. 2005, Burkhardt et al. 2006, Mezzanzanica et al. 2008, Sawheney et al. 2009, Kahlert et al. 2009). Dieser Wechsel im Expressionsmuster stützt die Hypothese, dass in diesen Neoplasien die Zelladhäsion durch den Verlust der membranösen ALCAM-Expression verloren geht und so die Motilität der Zellen erleichtert wird (Miccichè et al. 2011). Ein möglicher molekularbiologische Einfluss der zytoplasmatischen Akkumulation von ALCAM ist bislang kaum bekannt. In einer Studie zu oralen Plattenepithelkarzinomen (Sawheney et al. 2008) konnte jedoch gezeigt werden, dass das zytoplasmatische ALCAM an 14-3-3, ein Protein, das Signalkaskaden, Apoptose, Adhäsion, Zellproliferation- und differenzierung reguliert (Mhawech 2005), bindet und somit in diesen Tumoren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist.

In Gliomen ist nach Ergebnissen der aktuellen Arbeit die zytoplasmatische und membranöse Intensität sowie die membranöse Expression von ALCAM im Vergleich zum Normalhirn aufreguliert. Allerdings konnte kein Wechsel der membranösen Expression von ALCAM im Normalhirn hin zu einer zytoplasmatischen Akkumulation in Gliomen beobachtet werden. Ein möglicher Rückschluss daraus wäre, dass die Signalkaskaden, die eventuell durch das zytoplasmatisch exprimierte ALCAM vermittelt werden, in der Entstehung und Progression von Gliomen eine untergeordnete Rolle spielen.

Im nachfolgenden Abschnitt soll die Expression von ALCAM in den einzelnen Gliomen näher erläutert werden.

4.2. Expressionsanalyse von ALCAM in Gliomen

Die pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I grenzen sich sowohl durch eine schwächere Intensität der Tumorzellen als auch durch eine geringere membranösen Expression von ALCAM zu den diffus infiltrierenden Astrozytomen der WHO-Grade II und III sowie dem Glioblastom WHO-Grad IV ab. Dieses Expressionsverhalten lässt sich gut mit der bekannten Sonderstellung der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I, die nicht nur lokal begrenzt wachsen, sondern und auch genetisch verschieden zu den diffus infiltrierenden Astrozytomen sind (Jeuken und Wesseling 2011), erklären.

Zunächst nimmt in den diffusen Astrozytomen der WHO-Grade II bis III die Intensität wie auch die membranöse Expression von ALCAM im Mittelwert kontinuierlich zu. In Glioblastomen WHO-Grad IV allerdings zeigt sich ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Rückgang der Intensität wie auch der membranöse Expression im Mittelwert unter bzw. auf das Niveau der diffusen Astrozytome WHO-Grad II. Diese Herunterregulation der membranösen Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III könnte auf eine verminderte Zelladhäsion durch verloren gegangene Zell-Zell-Verbindungen hindeuten und so das diffus infiltrierende Wachstum dieser Tumore begünstigen. Es kann somit auch festgestellt werden, dass die ALCAM-Expression in Astrozytomen vom WHO-Grad abhängig ist. Eine Abhängigkeit der ALCAM-Expression vom Patientenalter hingegen konnte in der aktuellen Arbeit nicht nachgewiesen werden. Damit zeigt das hier beobachtete Expressionsverhalten von ALCAM in diffusen Astrozytomen eine Ähnlichkeiten zu einer Studie über die ALCAM-Expression in Prostatakarzinomen (Kristiansen et al. 2003). In dieser Studie konnte in Prostatakarzinomen mit einem hohen Gleason-Score ein Verlust der ALCAM-Expression nachgewiesen werden. Prostatakarzinome mit einem niedrigeren Gleason-Score hingegen wiesen eine erhöhte ALCAM-Expression auf.

In den Ependymomen hingegen zeigt sich eine umgekehrte Intensitäts- und membranöse Expressionsverteilung im Vergleich zu den Astrozytomen, da die Anzahl der Zellen, die ALCAM exprimieren, mit dem WHO-Grad abfällt. Da nur ein gering signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den WHO-Graden I und III bzw. II und III, jedoch nicht zwischen den WHO-Graden I und II statistisch nachzuweisen ist, lassen sich diese Ergebnisse nur schwer interpretieren. Ein Hauptproblem in der Expressionsanalyse von ALCAM in Ependymomen besteht sicherlich in der histopathologischen Gradierung der Ependymome in die WHO-Grade II und III. Die WHO-Kriterien der Ependymome WHO-Grad III, für die eine erhöhte Zelldichte, eine hohe mitotische Aktivität (normalerweise mehr als 6 Mitosen), Gefäßproliferationen, perivaskuläre Pseudoreosetten und ausgedehnte Nekrosen kennzeichnend sind, dürfen in WHO-Grad II-Tumoren nicht vorkommen. Allerdings spiegelt die Gradierungen nach diesen histopathologischen Kriterien oft nicht die individuelle Prognose wieder, die vor allem von der Lokalisation des Tumors (intrakraniell versus intraspinal) und dem Resektionsausmaß beeinflusst ist (Zamecnik et al. 2003, Boström et al. 2011, Koos et al. 2011). Des Weiteren stellen

Ependymome ein heterogenes histologisches Bild dar und gerade Kriterien, wie z. B. die erhöhte Zelldichte, sind nur schwer zu interpretieren, da sich Bereiche mit hoher und niedriger Zelldichte abwechseln können. Dieses heterogene histologische Bild bedingt auch die Intraobserver-Variabilität in der WHO-Gradierung (Zamecnik et al. 2003). Bislang konnte auch der Einsatz von immunhistochemischen Antikörpern das Dilemma einer reproduzierbaren Gradierung mit Trennung in WHO-Grad II und III nicht lösen (Godfraind et al. 2009). Auch ALCAM wird in der Routinediagnostik bei der Unterscheidung solcher Tumore somit nicht weiterhelfen können.

Insgesamt ist anzunehmen, dass ALCAM in der Tumorprogression der Ependymome nur eine untergeordnete Rolle spielt und in diesen Tumoren eher in seiner Eigenschaft als Zelladhäsionsmolekül fungiert. Dazu passt es auch, dass das diffus infiltrierende Wachstum in Ependymomen nicht die Hauptrolle spielt, da die Tumorzellmigration abhängig von der Primärlokalisierung auch über den Liquorfluss erfolgen kann.

Oligodendrogliome der WHO-Grade II und III weisen eine signifikante Aufregulierung von ALCAM im Vergleich zu den Astrozytomen und Ependymomen der WHO-Grade II und III auf. Es fällt auf, dass die membranöse Expression von ALCAM stärker als im Vergleich zu allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Gliomen ausgeprägt ist. Es ist hervorzuheben, dass kein einziger Tumor ALCAM-negativ war. Diese konstante Expression könnte ALCAM als diagnostischen Marker in der Routinepraxis, insbesondere in der oft schwierigen Unterscheidung zu den zentralen Neurozytomen (Maiuri et al. 1995), interessant machen. Die unter den Gliomen auffallende Expression von ALCAM in Oligodendrogliomen lässt sich möglicherweise durch die Wachstumseigenschaften dieser Tumore erklären. Oligodendrogliome wachsen zwar diskret infiltrierend, jedoch nicht ganz so diffus wie vergleichbare Astrozytome der WHO-Grade II und III. ALCAM vermittelt hier vielmehr Zellverbindungen zwischen den Tumorzellen und der extrazellulären Matrix als dass es Zellmigration fördert. Die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit zur ALCAM-Expression in Astrozytomen und Oligodendrogliomen werden auch durch eine DNA-Microarray-Studie, in der eine Aufregulierung der ALCAM-Expression auf mRNA-Ebene in anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III im Vergleich zu Glioblastomen WHO-Grad IV beschrieben ist (Shirahata et al. 2007), bestätigt.

In der wissenschaftliche Literatur ist beschrieben, dass MMP-2 in höhergradigen Gliomen aufreguliert ist und die Zellmigration beeinflusst (Deryugina et al. 1997), was

wiederum mit dem infiltrierenden Wachstum dieser Tumore korreliert (Guo et al. 2005). Umgekehrt führt eine MMP-2-Inhibierung zu einem verminderten infiltrierenden Wachstum (Gabelloni et al. 2010). Wenn man nun die Erkenntnis, dass ALCAM in metastasierenden Melanomzellen über Zell-Zell-Verbindungen sowie Zell-Matrix-Verbindungen MMP2 aktiviert und so die Tumorzellmigration fördert (Lunter et al. 2005), mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Kontext bringt, dann lässt sich vermuten, dass ALCAM in Ependymomen WHO-Grad I, diffusen Astrozytomen der WHO-Grade II und III und Oligodendrogliomen der WHO-Grade II und III eher in der Rolle als Zelladhäsionsmolekül fungiert und im Glioblastom-WHO-Grad IV und Ependymomen der WHO- Grade II und III, beispielsweise durch proteolytische Proteasen, in seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül gestört ist. Die genauen molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen dem Expressionsprofil von ALCAM auf Proteinebene in Gliomen und der funktionellen Rolle dieses Zelladhäsionsmoleküls im Rahmen der Migration und Invasion von Tumorzellen können anhand der erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dazu werden weiterführende Migrations- und Invasionsanalysen, wie zum Beispiel eine Zymographie und Slice-Kulturen, benötigt.

4.3. Überlebensanalyse und prognostische Aussage von ALCAM

Analysen der Immunreaktivität im Zusammenhang mit dem postoperativen Überleben sind für Glioblastome WHO-Grad IV und Ependymome der WHO-Grade II und III durchgeführt worden. Für Oligodendrogliome der WHO-Grade II und III wurde keine Überlebensanalyse durchgeführt, da alle Tumore ALCAM exprimierten und somit keine Stratifizierung hinsichtlich positiver und negativer Fälle möglich war.

Bei Ependymomen zeigt sich erwartungsgemäß keine signifikante Assoziation der ALCAM-Expression mit dem Überleben. Diese lässt sich gut durch die eingangs geschilderte Problematik der histologischen Diskriminationsunschärfe zwischen den WHO-Graden II und III erklären. Bei Glioblastomen WHO-Grad IV, die kein ALCAM exprimierten, zeigt sich eine gering signifikante Verkürzung des mittleren Überlebens. Daraus kann man ableiten, dass die ALCAM-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV ein protektiver Faktor, wie es für das Mammakarzinom bereits beschrieben ist (King et al. 2004, Jezierska et al. 2006a, King et al. 2010), darstellt, indem es durch seine Zellverbindungen zur Stabilität des Zellverbundes beiträgt. Eine erneute

Analyse mit einem größeren Patientenkollektiv würde sich jedoch empfehlen, um den signifikanten Einfluss von ALCAM auf das Überleben in einem unabhängigen Kollektiv bestätigen zu können.

Der Einfluss von ALCAM in malignen, nicht hirneigenen Tumoren auf das Überleben ist kontrovers. So ist in Melanomen eine erhöhte ALCAM-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert (van Kempen et al. 2000, Lunter et al. 2005, Swart et al. 2005). Auch in oralen und ösophagalen Plattenepithelkarzinomen (Sawhney et al. 2008, Verma et al. 2005), Pankreaskarzinomen (Kahlert 2009), kolorektalen Karzinomen (Weichert et al. 2004) und Neuroblastomen (Corrias et al. 2010) ist eine Aufregulierung der ALCAM-Expression als negativer Prognosefaktor angesehen. Für Prostatakarzinomen mit einem hohen Gleason-Score, der ein aggressives Wachstumsverhalten kennzeichnet und als Prognosefaktor anerkannt ist (Humphrey 2004), ist jedoch ein Verlust der ALCAM-Expression beschrieben (Kristiansen et al. 2003). Im Ovarialkarzinom ist eine Herunterregulation bzw. Verlust der membranösen ALCAM-Expression mit einer negativen Prognose assoziiert (Mezzanzanica et al. 2008). Zur ALCAM-Expression in Mammakarzinomen gibt es differierende Daten. In einigen Studien korreliert eine niedrige ALCAM-Expression mit Metastasierung und kürzerem Überleben (King et al. 2004, Jezierska et al. 2006a, King et al. 2010), jedoch gab es auch Studien mit dem Ergebnis, dass eine erhöhte ALCAM-Expression mit einem kürzerem Überleben einhergeht (Burkhardt et al. 2006, Hein et al. 2010). Als Fazit bleibt somit hervorzuheben, dass ALCAM für jeden Tumortyp individuell betrachtet und analysiert werden muss.

4.4. Kontroverse Daten in malignen, nicht hirneigenen Tumoren

Die kontroversen Expressionsergebnisse von ALCAM in malignen nicht hirneigenen Tumoren könnte zum einem durch eine individuelle Tumorbilologie bedingt sein (Kristiansen et al. 2003). Zum anderen könnten aber auch methodische Unterschiede zu diesen Ergebnissen führen. So wurde die Expression in einigen Studien auf RNA-Ebene und in anderen hingegen auf Proteinebene analysiert. Jedoch ist kürzlich in einer Studie eine positive Korrelation der ALCAM-Expression auf RNA- und Proteinebene im Mammakarzinom beobachtet worden (Ihnen et al. 2008). Daraus lässt sich schließen, dass die kontroversen Daten vermutlich nicht in allem Tumoren allein durch eine unterschiedliche ALCAM-Expression auf RNA- und Proteinebene zu

erklären sind. Die differierenden Ergebnisse immunhistochemischer Studien zu ALCAM in Mammakarzinomen (King et al. 2004, Burkhardt et al. 2006) lassen sich unter anderem möglicherweise durch eine unterschiedlichen Gewebefixierung (in Formaldehyd fixiert versus tief gefroren) erklären. Durch Formaldehyd kann es zu einer chemischen Alteration der Epitope kommen, die eine veränderte immunhistochemische Reaktivität zur Folge hat (Wiiger et al. 2010). Der Vergleich einzelner immunhistochemischer Studien ist des Weiteren durch die Verwendung von Antikörpern verschiedener Hersteller und unterschiedlich hohen Antikörperkonzentrationen erschwert. Zudem ist auch die Analyse des immunhistochemischen Expressionsmusters erschwert, da die molekularbiologische Relevanz der membranösen und zytoplasmatischen Expression nicht genau geklärt ist (Weichert et al. 2004) und die Expression in manchen Studien nicht einheitlich erhoben und ausgewertet wurde.

All diese genannten Faktoren tragen sicherlich zu den differierenden Ergebnissen bei. Um diese Problematik zu berücksichtigen, wurde in dieser Arbeit die membranöse Expression separat zur zytoplasmatischen und membranösen Färbeintensität durchgeführt und analysiert.

4.5. Die Prognose beeinflussende Faktoren

Der bedeutendste etablierte prognostische Faktor neben dem Alter des Patienten ist nach wie vor der WHO-Grad des Glioms zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Ohgaki und Kleihues et al. 2005b, Kallio et al. 1991). Zusätzlichen Einfluss auf die Prognose des Patienten haben der präoperative Aktivitätsindex nach Karnofsky und die Art der Behandlung durch Radio- bzw. Chemotherapie (Bussièrè et al. 2005). Des Weiteren wird der MIB-1-Proliferationsaktivität eine die Prognose beeinflussende Qualität zugeschrieben (Ralte et al. 2001, Neder et al. 2004). Es ergibt sich allerdings keine statistisch signifikante Assoziation der ALCAM-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV mit der MIB-1-Proliferationsaktivität. Es ist davon auszugehen, dass die Expression von ALCAM das Proliferationsverhalten dieser Tumore als Gesamtes nicht beeinflusst.

Sowohl bei Glioblastomen WHO-Grad IV als auch bei anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ist die kürzlich beschriebene IDH1-Mutation mit einer besseren Prognose hinsichtlich dem Überleben assoziiert (Hartmann 2 et al. 010). Da in dieser

Arbeit keine Daten zur IDH-1 Mutation erhoben wurden, da sich diese Arbeit auf ALCAM und Mib-1 beschränkt, wäre ein logischer nächster Schritt, diese mit der ALCAM-Expression zu vergleichen, um zu überprüfen, ob hinsichtlich der Prognose eine Korrelation besteht.

Glioblastom-Patienten, die eine kombinierte Radio-Chemo-Therapie erhalten haben, leben mit methyliertem MGMT-Promotor signifikant länger als solche ohne Methylierung (Hegi et al. 2005 und 2008). Für ALCAM konnte bereits im Mammakarzinom eine verminderte Expression bei Promotermethylierung beobachtet werden (King et al. 2010). So wäre es interessant zu überprüfen, ob in Glioblastomen eine Promotermethylierung von ALCAM vorliegt und ob die Möglichkeit besteht, diese Methylierung zu beeinflussen, um die protektive ALCAM-Expression wiederherzustellen.

4.6. Problematik der Gliomtherapie

Es gibt interessanterweise von Zelladhäsionsmolekülen ausgehende Signale, die Tumorzellen resistent gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (Cell Adhesion-mediated Radioresistance, Cell Adhesion-mediated Chemoresistance) machen. Diese sind auch in Glioblastomen beschrieben (Westhoff et al. 2008). In einer multizentrischen Phase I/IIa-Studie konnte die Wirksamkeit und Sicherheit von Cilengtide, einem Integrin-Inhibitor, in Kombination mit Temozolomide und Strahlentherapie in Glioblastomen, bei denen eine MGMT-Promotormethylierung vorlag, gezeigt werden (Stupp et al. 2010). Bislang gibt es keine Daten, ob auch ALCAM an diesen Mechanismen beteiligt ist. Es konnte bisher lediglich experimentell eine Beteiligung ALCAMs an dem erhöhten Metastasierungspotenzial von Fibrosarkomzellen nach inadäquater Chemotherapie gezeigt werden (Choi et al. 2000). Neben der erhöhten Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie der meisten höhergradigen Gliome, stellt die Blut-Hirn-Schranke ein leidiges Problem in der Chemotherapie wie auch in der zielgerichteten Therapie mit „Biologicals“ dar (Huse und Holland 2010). Der physiologische Aufbau und die Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke limitieren stark den Austausch von Stoffen zwischen dem Körperkreislauf und dem Gehirn. Zwar ist die Blut-Hirn-Schranke teilweise in Hirntumoren verändert, jedoch zeigt sich, dass ausgerechnet in den Infiltrationszonen eine intakte Blut-Hirn-Schranke vorliegt (de Vries et al. 2006).

Transportmechanismen, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit die Erfolgchancen von Chemotherapie wie auch der zielgerichteten Therapie mit „Biologicals“ verbessern, stellen einen Schwerpunkt in der Gliomforschung dar (de Vries et al. 2006, Laqintana et al. 2009). Ob ALCAM als Molekül für eine zielgerichtete Therapie geeignet ist, wurde in einer Studie untersucht, in der ein Immunotoxin, das an ein gegen ALCAM gerichtetes, humanes Antikörperfragment gekoppelt ist, über Liganden-induzierte Endozytose in ALCAM-positive Tumorzellen gelangen konnte und dort zytotoxisch wirkte (Piazza et al. 2005). Zwar lässt die ausreichend starke membranöse Expression von ALCAM in Astrozytomen und Oligodendrogliomen auf eine Eignung des Moleküls für eine zielgerichtete Therapie schließen, jedoch müssen erst noch die durch ALCAM vermittelten Signalwege in und aus der Zelle genauer untersucht werden, um mögliche nachteilige Wirkungen eines Eingreifens auszuschließen. Die Reaktivierung bzw. Förderung der ALCAM-Expression über Signalkaskaden, würde ein interessantes Therapieziel darstellen, da in dieser Arbeit der ALCAM-Expression protektive Eigenschaften in Gliomen zugeschrieben werden.

Diese Erkenntnisse jedoch unterstreichen die Bedeutsamkeit weiterer Grundlagenforschung auf dem Feld der Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere über ALCAM und der involvierten Signalkaskaden, in der Onkologie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit untersuchten Gliome sind die am häufigsten auftretenden Tumore des zentralen Nervensystems. Die immunhistochemische Expression von ALCAM (engl. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), das auch als CD166 bekannt ist, wurde in einer Vielzahl von Tumoren, jedoch bislang nicht in glialen Tumoren des Zentralnervensystems, nachgewiesen. Es fällt auf, dass sich die verschiedenen Tumore hinsichtlich ihres ALCAM-Expressionsmusters unterscheiden und dass die Expression von ALCAM während der Entstehung und Progression eines Tumors je nach Stadium verschieden ist (Ofori-Acquah und King 2008). Ziel dieser Arbeit war daher der immunhistochemische Nachweis von ALCAM in 342 glialen Tumoren des Zentralnervensystems und im Normalhirn auf Proteinebene und eine weitergehende Analyse dieses immunhistochemischen Expressionsmusters auch in Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Routinediagnostik. ALCAM wurde bereits in diversen malignen Tumoren, wie zum Beispiel dem Melanom (Johnson 1999, van Kempen et al. 2000, Lunter et al. 2005, Swart et al. 2005) und dem Mammakarzinom (King et al. 2004, Burkhardt et al. 2006, Jezierska et al. 2006a, King et al. 2010, Hein et al. 2010), hinsichtlich seiner Rolle in der Tumorentstehung und -progression untersucht und als die Prognose beeinflussenden Faktor bewertet. So ist beispielsweise eine erhöhte ALCAM-Expression im Melanom mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (van Kempen et al. 2000, Lunter et al. 2005, Swart et al. 2005). Daten zur ALCAM-Expression in Gliomen lagen bislang nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Expression von ALCAM in 25 pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I, 69 diffusen Astrozytomen WHO-Grad II, 58 anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III, 57 Glioblastomen WHO-Grad IV, 7 Subependymomen WHO-Grad I, 20 myxopapillären Ependymomen WHO-Grad I, 49 Ependymomen WHO-Grad II, 22 anaplastischen Ependymomen WHO-Grad III, 15 Oligodendrogliomen WHO-Grade II, 20 anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III und, um einen Vergleich zu gesundem Hirngewebe zu erhalten, in 82 Normalhirnproben untersucht und mit dem WHO-Grad und dem Überleben der Patienten korreliert.

Nach Ergebnissen der aktuellen Arbeit ist in Gliomen die immunhistochemische Expression von ALCAM im Vergleich zum Normalhirn sowohl an der Zellmembran

als auch im Zytoplasma aufreguliert. Eine nukleäre Expression findet nicht statt. Alle Oligodendrogliome zeigen eine mittelstarke immunhistochemische Reaktivität für ALCAM. In höhergradigen Astrozytomen ist ALCAM häufiger immunhistochemisch nachweisbar (91%, 105/115 Proben positiv) als in niedriggradigen Astrozytomen (74%, 70/94 Proben positiv). Im Gegensatz dazu sind die niedriggradigen Ependymome (88%, 67/76) häufiger ALCAM-positiv als die höhergradigen Ependymome (68%, 15/22). Bei Ependymomen zeigt sich keine signifikante Assoziation der ALCAM-Expression mit dem Überleben. Bei Glioblastomen WHO-Grad IV, die kein ALCAM exprimierten, zeigte sich eine gering signifikante Verkürzung des mittleren Überlebens.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass immunhistochemische Expression von ALCAM in Gliomen vom WHO-Grad abhängig ist. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Patienten als auch dem Status, ob es sich um ein Primär- oder Rezidivtumor handelte, beobachtet werden. Die ALCAM-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV stellt sich als ein das Überleben protektiv beeinflussenden Faktor dar, wie es im Mammakarzinom bereits beschrieben ist (King et al. 2004, Jezierska et al. 2006a, King et al. 2010), indem es durch seine Zellverbindungen zur Stabilität des Zellverbundes beiträgt und eine Zellmigration erschwert. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Expression von ALCAM das Proliferationsverhalten von Glioblastomen WHO-Grad IV nicht beeinflusst, da keine statistisch signifikante Assoziation der ALCAM-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV mit der MIB-1-Proliferationsaktivität festgestellt werden konnte. Es ist hervorzuheben, dass ALCAM durch die konstante immunhistochemische Expression in Oligodendrogliomen als diagnostischen Marker in der Routinepraxis, insbesondere in der oft schwierigen Unterscheidung zu den zentralen Neurozytomen (Maiuri et al. 1995), hilfreich sein könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):197-263, 321.
- Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med.* 2002;195(12):1549-63.
- Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B, Esselens C, Saftig P, Baselga J, Arribas J, Canals F. Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5086–95.
- Böcker W, Kleihues P, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R. Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.). *Pathologie.* 3. Auflage. Urban&Fischer Verlag, München, Deutschland. 2004;184-98.
- Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Offerhaus GJ, Rinkes IH, Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Virchows Arch.* 2008;452:507-14.
- Boström A, von Lehe M, Hartmann W, Pietsch T, Feuss M, Boström JP, Schramm J, Simon M. Surgery for spinal cord ependymomas: outcome and prognostic factors. *Neurosurgery.* 2011;68:302-9.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010;20(3):161-8.
- Bowen MA, Aruffo AA, Bajorath J. Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions. *Proteins.* 2000;40 (3):420-8.
- Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, Haynes BF, Aruffo A. Cloning, Mapping, and Characterization of Activated Leukocyte-Cell Adhesion Molecule (ALCAM), a CD6 Ligand. *J Exp Med.* 1995;181:2213-20.
- Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Vesely P, Fabry B. The role of tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal.* 2010;8:22.
- Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, Fritzsche F, Gansukh T, Pahl S, Weichert W, Denkert C, Guski H, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmatic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59:403-9.
- Bussièrè M, Hopman W, Day A, Pombo AP, Neves T, Espinosa F. Indicators of functional status for primary malignant brain tumour patients. *Can J Neurol Sci.* 2005;32:50-6.

- Cairncross JG, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Bruckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*. 2006;24:2707–14.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473-9.
- Calotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30:1073-81.
- Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jäger D, Ackermann U, Tessmer C, Korshunov A, Zentgraf H, Hartmann C, von Deimling A. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol*. 2010;20(1):245-54.
- Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004a;4(2):118-32.
- Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2004b;1014:58-66.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (2006). <http://www.cbtrus.org>.
- Cervoni L, Celli P, Caruso R, Gagliardi FM, Cantore GP. Neurinomas and ependymomas of the cauda equine. A review of the clinical characteristics. *Minerva Chir*. 1997; 52:629-33.
- Choi S, Kobayashi M, Wang J, Habelhah H, Okada F, Hamada J, Moriuchi T, Totsuka Y, Hosokawa M. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and annexin II are involved in the metastatic progression of tumor cells after chemotherapy with Adriamycin. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18:45–50.
- Corrias MV, Gambini C, Gregorio A, Croce M, Barisione G, Cossu C, Rossello A, Ferrini S, Fabbi M. Different subcellular localization of ALCAM molecules in neuroblastoma: Association with relapse. *Cell Oncol*. 2010;32(1-2):77-86.
- Davis FG, Preston-Martin S. Epidemiology: Incidence and Survival. In: Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM (Hrsg.). *Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*. 6th ed. Arnold, London, Großbritannien. 1998; 5-45.
- Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, Reisfeld RA, Strongin A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci*. 1997;110(19):2473-82.
- de Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W, van Tellingen O. Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 2006;6(8):1199-209.
- Dietrich J, Diamond EL, Kesari S. Glioma stem cell signaling: therapeutic opportunities and challenges. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(5):709-22.

- Duncan JA, Hoffman HJ (1995). Intracranial ependyomas. In: Kaye AH, Lows ER, Jr. (Hrsg.). *Brain Tumors: An Encyclopedic Approach*. Churchill Livingstone, Edinburgh, Schottland; 1995:493-504.
- Ernestus RI, Schroder R, Stutzer H, Klug N. Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs Nerv Syst*. 1996;12:522-6.
- Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Paz PA, Lena G. Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors-a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery*. 2003;53:544-53.
- Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*. 2005;15:297-310.
- Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer*. 1999;79(11-12):1828-35.
- Gabelloni P, Da Pozzo E, Bendinelli S, Costa B, Nuti E, Casalini F, Orlandini E, Da Settimo F, Rossello A, Martini C. Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *Neuroscience*. 2010;168(2):514-22.
- Garmy-Susini B, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol*. 2008;6:155-63.
- Giancotti FG, Ruoslati E. Integrin signalling. *Science*. 1999;285:1028-32.
- Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1996;39(2):235-2.
- Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, Jarzynka MJ, Tao HQ, Nishikawa R, Hirose T, Hu B, Cheng SY. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am J Pathol*. 2005;166(3):877-90.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010;120(6):707-18.
- Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009;118(4):469-74.
- Hasselblatt M, Paulus W. Sensitivity and Specificity of epithelial membrane antigen staining patterns in ependymomas. *Acta Neuropathol*. 2003;106(4):385-8.

- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997–1003.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4189-99.
- Hein S, Müller V, Köhler N, Wikman H, Krenkel S, Streichert T, Schweizer M, Riethdorf S, Assmann V, Ihnen M, Beck K, Issa R, Jänicke F, Pantel K, Milde-Langosch K. Biologic role of activated leukocyte cell adhesion molecule overexpression in breast cancer cell lines and clinical tumor tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct 23. Epub ahead of print.
- Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, Tomita T, Schomberg P, Ater J, Luchtman-Jones L, Rivlin K, Lamborn K, Prados M, Bollen A, Berger M, Dahl G, McNeil E, Patterson K, Shaw D, Kubalik M, Russo C. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999; 21:203-11.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotinperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577-80.
- Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2004;17(3):292-306.
- Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(5):319-31.
- Ikeda K, Quertermous T. Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. *J Biol Chem.* 2004;279(53):55315-23.
- Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol.* 2006;111 (5):475-82.
- Jäälinojä J, Herva R, Korpela M, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. *J Neurooncol.* 2000;46(1):81-90.
- Jallo GI, Zagzag D, Epstein F. Intramedullary subependymoma of the spinal cord. *Neurosurgery.* 1996;38:251-7.
- Jayawickreme DP, Hayward RD, Harkness WF. Intracranial ependymomas in childhood: a report of 24 cases followed for 5 years. *Childs Nerv Syst.* 1995;11:409-13.
- Jeuken JW, Wesseling P. MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; a novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. *J Pathol.* 2010;222(4):324-8.

- Jeziarska A, Olszewski WP, Pietruszkiewicz J, Olszewski W, Matysiak W, Motyl T. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit.* 2006a;12(7):BR245-56.
- Jeziarska A, Matysiak W, Motyl T. ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit.* 2006b;12(8):BR263-73.
- Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer.* 2004;90:561-5.
- Juliano RL, Varner JA. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:812-8.
- Johnson JP. Cell adhesion of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 1991;10:11-22.
- Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):345-57.
- Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008;68(21):8673-7.
- Kahlert C, Weber H, Mogler C, Bergmann F, Schirmacher P, Kenngott HG, Mattered U, Mollberg N, Rahbari NN, Hinz U, Koch M, Aigner M, Weitz J. Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *Br J Cancer.* 2009;101(3):457-64.
- Kallio M, Sankila R, Jääskeläinen J, Karjalainen S, Hakulinen T. A population-based study on the incidence and survival rates of 3857 glioma patients diagnosed from 1953 to 1984. *Cancer.* 1991;68:1394-400.
- Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc.* 1958;53:457-481.
- Kayaselçuk F, Zorludemir S, Gümürdühü D, Zeren H, Erman T. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol.* 2002;57(2):115-21.
- Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest.* 1993;68(6):629-36.
- King JA, Ofori-Acquah SF, Stevesn T, Al-Mehdi AB, Fodstad O, Jiang WG. Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res.* 2004;6(5):R478-87.
- King JA, Tan F, Mbeunkui F, Chambers Z, Cantrell S, Chen H, Alvarez D, Shevde LA, Ofori-Acquah SF. Mechanisms of transcriptional regulation and prognostic significance of activated leukocyte cell adhesion molecule in cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:266.

- Kiryushko D, Bock E, Berezin V. Pharmacology of Cell Adhesion Molecules of the Nervous System. *Curr Neuropharmacol*. 2007;5:253-67.
- Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD. Tumoren des Nervensystems. In Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.). *Pathologie*. 3. Auflage. Urban&Fischer Verlag, München, Deutschland. 2004;317-22.
- Konno A, Ahn JS, Kitamura H, Hamilton MJ, Gebe JA, Aruffo A, Davis WC. Tissue distribution of CD6 and CD6 ligand in cattle: expression of the CD6 ligand (CD166) in the autonomic nervous system of cattle and the human. *J Leukoc Biol*. 2001;69(6):944-50.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays für high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4:844-7.
- Koos B, Bender S, Witt H, Mertsch S, Felsberg J, Beschorner R, Korshunov A, Riesmeier B, Pfister S, Paulus W, Hasselblatt M. The Transcription Factor Evi-1 Is Overexpressed, Promotes Proliferation, and Is Prognostically Unfavorable in Infratentorial Ependymomas. *Clin Cancer Res*. 2011 May 10. Epub ahead of print.
- Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases. *J Neurol Sci*. 2000;177:72-82.
- Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Timirgaz V. The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. *Cancer*. 2004;100:1230-7.
- Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, Pfister S, von Deimling A, Hartmann C. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma *Acta Neuropathol*. 2009;118(3):401
- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Stephan C, Weissbach L, Loy V, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate*. 2003;54(1):34-43.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol*. 2005;205(3):359-76.
- Kros JM, Pieterman H, Van Eden CG, Avezaat CJ. Oligodendroglioma: the Rotterdam-Dijkzigt experience. *Neurosurgery*. 1994;34:959-66.
- Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy. *Brain Tumor Pathol*. 2000;17(2):71-8.
- Kurt E, Zheng PP, Hop WC, van der WM, Bol M, van den Bent MJ, Avezaat CJ, Kros JM. Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas. *Cancer*. 2006;106:388-95.

- Laquintana V, Trapani A, Denora N, Wang F, Gallo JM, Trapani G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(10):1017-32.
- Lee BP, Imhof BA. Lymphocyte transmigration in the brain: a new way of thinking. *Nat Immunol.* 2008;9(2):177-8.
- Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol.* 2005;23:2411-22.
- Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, Swain JR, Wong MH. Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2010;139(6):2072-2082.
- Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today.* 2000;6(4):163–9.
- Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998;8:437-41.
- Lunter PC, van Kilsdonk JWJ, van Beek H, Cornelissen IMHA, Bergers M, Willems PHGM, Goos NP, van Muijen GNP, Swart GWM. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel Actor in Invasive Growth, Controls Matrix Metalloproteinase Activity. *Cancer Res.* 2005;65:8801-8.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Hrsg.). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, Frankreich. 2007;10-47.
- Maiuri F, Spaziante R, De Caro ML, Cappabianca P, Giamundo A, Iaconetta G. Central neurocytoma: clinico-pathological study of 5 cases and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 1995;97(3):219-28.
- Masedunskas A, King JA, Tan F, Cochran R, Stevens T, Sviridov D, Ofori-Acquah SF. Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett.* 2006;580(11):2637-45.
- Mayer B, Funke I, Seed B, Riethmüller G, Weiss E. Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *J Neuroimmunol.* 1990;29(1-3):193-202.
- Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol.* 2001;155(4):661-73.
- Mezzanzanica D, Fabbi M, Bagnoli M, Staurengo S, Losa M, Balladore E, Alberti P, Lusa L, Ditto A, Ferrini S, Pierotti MA, Barbareschi M, Pilotti S, Canevari S. Subcellular Localization of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule is a Molecular Predictor of Survival in Ovarian Carcinoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14(6):1726-33.
- Mhawech P. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res.* 2005;15(4):228-36.

- Miccichè F, Da Riva L, Fabbi M, Pilotti S, Mondellini P, Ferrini S, Canevari S, Pierotti MA, Bongarzone I. Activated leukocyte cell adhesion molecule expression and shedding in thyroid tumors. *PLoS One*. 2011;6(2):e17141.
- Nakama S, Higashi T, Kimura A, Yamamuro K, Kikkawa I, Hoshino Y. Double myxopapillary ependymoma of the cauda equina. *J Orthop Sci*. 2005;10: 543-5.
- Neder L, Colli BO, Machado HR, Carlotti CG Jr, Santos AC, Chimelli L. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors - a clinicopathologic study. *Neuropathol*. 2004;23:262-70.
- Nelissen JMDT, Peters IM, de Grooth BG, Van Kooyk Y, Figdor CG. Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 2000;11:2057 – 68.
- Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res*. 2008;3:122-8.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64:6892-9.
- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005a;64:479-89.
- Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005b;109:93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170:1445-53.
- Ohneda O, Ohneda K, Arai F, Lee J, Miyamoto T, Fukushima Y, Dowbenko D, Lasky LA, Suda T. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood*. 2001;98(7):2134-42.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
- Patel DD, Wee SF, Whichard LP, Bowen MA, Pesando JM, Aruffo A, Haynes BF. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med*. 1995;181(4):1563-8.
- Percy C, Van Holten V, Muir C (Hrsg.) *International Classification of Diseases for Oncology.. 2nd ed.* World Health Organization, Genf, Schweiz. 1990.
- Piazza T, Cha E, Bongarzone I, Canevari S, Bolognesi A, Polito L, Bargellesi A, Sassi F, Ferrini S, Fabbi M. Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody. *J Cell Sci*. 2005;118:1515-25.

- Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, Janosky J, Deutsch M. Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. *Neurosurgery*. 1995;37:655-66.
- Poulsen HS, Grunnet K, Sorensen M, Olsen P, Hasselbalch B, Nelausen K, Kosteljanetz M, Lassen U. Bevacizumab plus irinotecan in the treatment patients with progressive recurrent malignant brain tumours. *Acta Oncol*. 2009;48:52-8.
- Prayson RA. Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol*. 1999;3:11-8.
- Ralte AM, Sharma MC, Karak AK, Mehta VS, Sarkar C. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. *Pathol Oncol Res*. 2001;7:267-78.
- Rawlings CE 3rd, Giangaspero F, Burger PC, Bullard DE. Ependymomas: a clinicopathologic study. *Surg Neurol*. 1988;29:271-281.
- Rosso O, Piazza T, Bongarzone I, Rossello A, Mezzanzanica D, Canevari S, Orengo AM, Puppo A, Ferrini S, Fabbi M. The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Res*. 2007;5:1246–53.
- Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN, McCutcheon IE, Stetler-Stevenson WG, Nicolson GL, Rao JS. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis*. 1996 Jan;14(1):35-42.
- Sawhney M, Matta A, Macha MA, Kaur J, DattaGupta S, Shukla NK, Ralhan R. Cytoplasmic accumulation of activated leukocyte cell adhesion molecule is a predictor of disease progression and reduced survival in oral cancer patients. *Int J Cancer*. 2009;124(9):2098-105.
- Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffietti R, Tribolo A. Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv syst*. 1991;7:177-82.
- Schiffer D, Giordana MT. Prognosis of ependymoma. *Childs Nerv Syst*. 1998;14:357-61.
- Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M. On the origin and growth of gliomas. *Anticancer Res*. 2010;30(6):1977-98.
- Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Hartmann C, Paulus W, Reifenberger G, von Deimling A. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2011 Mar;121(3):397-405.
- Schittenhelm J, Trautmann K, Tabatabai G, Hermann C, Meyermann R, Beschorner R. Comparative analysis of annexin-1 in neuroepithelial tumors shows altered expression with the grade of malignancy but is not associated with survival. *Mod Pathol*. 2009;22:1600-11.

- Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Tazelaar HD, Davis DH. Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J Neurosurg.* 1992;76:428-34.
- Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA, Kato K. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7341-56.
- Snuderl M, Chi SN, De Santis SM, Stemmer-Rachamimov AO, Betensky RA, De Girolami U, Kieran MW. Prognostic value of tumor microinvasion and metalloproteinases expression in intracranial pediatric ependymomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(9):911-20.
- Sonneland PR, Scheithauer BW, Onofrio BM. Myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic and immunocytochemical study of 77 cases. *Cancer.* 1985;56:883-93.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Ann Rev Physiol.* 1995; 57: 827–72.
- Strizzi L, Bianco C, Raafat A, Abdallah W, Chang C, Raafat D, Hirota M, Hamada S, Sun Y, Normanno N, Callahan R, Hinck L, Salomon D. Netrin-1 regulates invasion and migration of mouse mammary epithelial cells overexpressing Cripto-1 in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 2005;118:4633-43.
- Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2712-8.
- Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD 166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol.* 2002;81(6):313-21.
- Swart GW, Lunter PC, Kilsdonk JW, Kempen LC. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(2):223-36.
- Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):585-92. Epub 2010 Sep 23. Review.
- Tabatabai G, Weller M. Glioblastoma stem cells. *Cell Tissue Res.* 2011 Jan 21. Epub ahead of print.
- Takei H, Buckleair LW, Rivera A, Powell SZ. Brain tissue microarrays in neurodegenerative diseases: validation of methodology and immunohistochemical study of growth-associated protein-43 and calretinin. *Pathol Int.* 2007;57:775-83.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2000a;60(13):3650-4.

- Tomita K, van Bokhoven A, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000b;267(3):870-4.
- Tomita K, van Bokhoven A, Jansen CFJ, Kiemeneij LA, Karthaus HFM, Vriesema J, Bussemakers MJ, Witjes JA, Schalken JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) expression is associated with a poor prognosis for bladder cancer patients. *Urooncology.* 2003;3:121-9.
- Uchida N, Yang Z, Combs J, Pourquié O, Nguyen M, Ramanathan R, Fu J, Welply A, Chen S, Weddell G, Sharma AK, Leiby KR, Karagogeos D, Hill B, Humeau L, Stallcup WB, Hoffman R, Tsukamoto AS, Gearing DP, Péault B. The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood.* 1997;89(8):2706-16.
- van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2715-22.
- van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol.* 2000;156(3):769-74.
- Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:724-30.
- Verma A, Shukla NK, Deo SV, Gupta SD, Ralhan R. MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.* 2005;68(4-6):462-70.
- Vertosick FT Jr., Selker RG, Arena VC. Survival of patients with well-differentiated astrocytomas diagnosed in the era of computed tomography. *Neurosurgery.* 1991;28:496-501.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2007;25:4722-9.
- Waldron JS, Tihan T. Epidemiology and pathology of intraventricular tumors. *Neurosurg Clin N Am.* 2003;14:469- 82.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* 1997;3:523-30.
- Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol.* 2004;57(11):1160-4.

- Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, Swart GW. ALCAM/CD166: Cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010;7(5):231-44.
- Weiner JA, Koo SJ, Nicolas S, Fraboulet S, Pfaff SL, Pourquié O, Sanes JR. Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Sep;27(1):59-69.
- Westhoff MA, Zhou S, Bachem MG, Debatin KM, Fulda S. Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. *Oncogene*. 2008;27(39):5169-81.
- Wiiger MT, Gehrken HB, Fodstad Ø, Maelandsmo GM and Andersson Y. A novel human recombinant single-chain antibody targeting CD166/ALCAM inhibits cancer cell invasion in vitro and in vivo tumour growth. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:1665-74.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765–73.
- Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T, Chanova M, Hladikova M, Tichy M, Kodet R. Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. *Mod Pathol*. 2003;16(10):980-91.

7. ANHANG

7.1. Tabellen

Tabelle 1: Darstellung der ermittelten Rohdaten für ALCAM in glialen Tumoren des ZNS: ID: Patienten ID, Geschlecht (M: männlich, F: weiblich), Diagnose (Astro: Astrozytom, Oligo: Oligodendrogliom, Epd'mom: Ependymom, Subep: Subependymom), WHO-Grad: Tumor WHO-Grad, P: Primärtumor, R: Rezidivtumor, Expr.: Expression, membr.: membranöse, Intensität (0=keine, 1=schwach, 2=mittel, 3=stark), nukleäre Expression (0=keine, 1=ja) , membranöse Expression (0=0%, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76%-100%), Gesamt Intensität (0=keine, 1=schwach, 2=mittel, 3=stark), Gesamt nukleäre Expression (0=keine, 1=ja), Gesamt membranöse Expression (0=keine, 1=schwach, 2=mittel, 3=stark), Intensität gemittelt (Mittelwerte mehrerer Tumorproben desselben Patienten), Nukleäre Expression gemittelt (Mittelwerte mehrerer Tumorproben desselben Patienten), Membranöse Expression gemittelt (Mittelwerte mehrerer Tumorproben desselben Patienten).

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
218	21	M	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	16	F	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
220	12	M	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	8	M	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	1	F	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	14	F	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229	15	M	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
230	3	F	Astro	1	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
231	26	M	Astro	1	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
235	28	M	Astro	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
236	39	M	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
237	18	M	Astro	1	P	0	0	0						
238	27	M	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
239	55	F	Astro	1	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
245	26	F	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
246	9	M	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
247	32	M	Astro	1	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
249	3	F	Astro	1	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
250	20	F	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
255	34	F	Astro	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	25	F	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
257	26	M	Astro	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	11	M	Astro	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
258	29	F	Astro	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
266	16	M	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
267	57	M	Astro	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
27	47	M	Astro	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
140	30	F	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	34	M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	65	M	Astro	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
144	25	M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
145	58	M	Astro	2	P	3	0	3	3	0	3	3	0	3
146	39	M	Astro	2	R	3	0	3	3	0	3	3	0	3
147	29	M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
148	54	F	Astro	2	P	3	0	3	3	0	3	3	0	3
149	54	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
150	47	M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
279	36	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
151	27	M	Astro	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
153	51	M	Astro	2	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
154	33	F	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	35	M	Astro	2	P	3	0	2	3	0	2	3	0	2
156	35	M	Astro	2	P	3	0	2						
157	51	F	Astro	2	R	3	0	4	3	0	4	3	0	4
158	27	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
159	45	F	Astro	2	P	2	0	1	2	0	2	2	0	2
159	34	F	Astro	2	P	2	0	3						
160	48	M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
161	63	M	Astro	2	R	3	0	4	3	0	4	3	0	4
162	58	M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	71	F	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	45	M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
165	45	M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
165	25	M	Astro	2	P	2	0	2						
166	70	M	Astro	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
167	70	M	Astro	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
168	34	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
169	37	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
170	42	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
171	33	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
174	67	F	Astro	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	51	M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	62	F	Astro	2		1	0	1	1	0	1	1	0	1
178	47	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
179		F	Astro	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
180	50	M	Astro	2		1	0	1	1	0	1	1	0	1
181	63	M	Astro	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
182	18	M	Astro	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
183	31	F	Astro	2	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
184	54	F	Astro	2	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
185		M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
186	38	M	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
187	42	F	Astro	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188	51	F	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
189	40	M	Astro	2	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
190	39	M	Astro	2	P	3	0	3	3	0	3	3	0	3
191		M	Astro	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
192	29	F	Astro	2		2	0	3	2	0	3	2	0	3
193	27	M	Astro	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
194	32	F	Astro	2	P	2	0	0	2	0	0	2	0	0
195	27	F	Astro	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
196	57	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
179	57	M	Astro	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
179		M	Astro	2	P	1	0	0						
197	28	M	Astro	2		1	0	1	1	0	1	1	0	1
198	28	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
198	60	F	Astro	2	P	1	0	1						
199	60	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
199		F	Astro	2	P	1	0	1						
200	72	F	Astro	2		2	0	2	2	0	2	2	0	2
201	27	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
155	42	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
202	26	F	Astro	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
203	38	M	Astro	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
204	57	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
205	65	M	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
206	34	F	Astro	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
207	68	F	Astro	2	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
208	38	M	Astro	2	R	1	0	2	1	0	2	1	0	2
209	39	M	Astro	2	P	2	0	4	2	0	4	2	0	4
211	44	F	Astro	2	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
212	45	F	Astro	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
74	70	F	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
76	67	F	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
77	34	M	Astro	3	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
78	54	F	Astro	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	41	M	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
80	26	F	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
82	49	F	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
83	72	M	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
84	35	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
85	34	M	Astro	3	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
86	35	M	Astro	3	R	2	0	2	2	0	1	1.5	0	1.5
86	35	M	Astro	3	P	1	0	1						
88	69	M	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
89		F	Astro	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	39	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
91	48	M	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
92	26	F	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
93	44	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
95	24	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
98	73	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
99	43	M	Astro	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
100	50	F	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
101	47	M	Astro	3	R	2	0	3	2	0	3	2	0	3
98	73	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
102	44	F	Astro	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
103	67	F	Astro	3	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
104	51	M	Astro	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	23	M	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
106	56	M	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
109	29	F	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
110	46	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
111	10	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
111	10	M	Astro	3		2	0	2						
112	56	M	Astro	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	74	F	Astro	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
115	76	M	Astro	3	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
116	49	M	Astro	3	R	2	0	1	2	0	1	2	0	1
114	42	F	Astro	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
117	76	F	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
33	53	M	Astro	3	R	2	0	1	2	0	1	2	0	1
33	53	M	Astro	3	R	2	0	1						

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
118	41	M	Astro	3	R	2	0	2	2	0	2	1.5	0	1
118	41	M	Astro	3	R	1	0	0						
121	77	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
122	42	F	Astro	3	R	2	0	3	2	0	3	2	0	3
123	37	F	Astro	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124	29	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
124	29	M	Astro	3	P	2	0	3						
125	51	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
126	18	M	Astro	3	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
127	34	M	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
128	48	F	Astro	3	R	2	0	3	2	0	3	2	0	3
129	67	F	Astro	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
129	67	F	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
130	30	F	Astro	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
132	34	M	Astro	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	27	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
134	31	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
135	38	M	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
136	40	M	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
137	68	F	Astro	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
138	70	F	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
139	20	M	Astro	3	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
1	70	F	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
2	59	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
2	59	M	GBM	4	P	1	0	1						
3	35	M	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
4	70	M	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
6	39	M	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
8	54	M	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
9	63	F	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
10	68	F	GBM	4	P	2	0	2	1	0	2	1.3	0	2
10	68	F	GBM	4	P	1	0	2						
10	68	F	GBM	4	P	1	0	2						
11	70	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
12	71	F	GBM	4	R	1	0	3	1	0	3	1	0	3
15	66	M	GBM	4	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
16	60	F	GBM	4	R									
17	63	F	GBM	4	R	1	0	2	1	0	2	1	0	2
18	59	M	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
19	42	M	GBM	4	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
21	48	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
22	71	M	GBM	4	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
24	59	M	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
26	46	M	GBM	4	R	2	0	4	2	0	4	2	0	4
28	85	F	GBM	4	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
29	69	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
30	64	M	GBM	4	P	0	0	0	2	0	1	1	0	1
30	64	M	GBM	4	P	2	0	2						
31	61	M	GBM	4	R	2	0	2	2	0	1	1.5	0	1.5
31	61	M	GBM	4	R	1	0	1						
32	37	F	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
35	28	M	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
35	28	M	GBM	4	P	1	0	2						
29	69	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
36	80	F	GBM	4	P									
37	50	M	GBM	4	P									
38	61	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
39	70	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
40	71	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
41	58	F	GBM	4	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
41	58	F	GBM	4	P									
42	80	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
43	41	F	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
44	78	F	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
45	73	M	GBM	4	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
46	61	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
48	39	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
49	65	M	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
50	67	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
51	49	M	GBM	4	R	1	0	2	1	0	2	1	0	2
52	77	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
53	45	M	GBM	4	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
54	48	M	GBM	4	R	1	0	1	2	0	1	1.5	0	1.5
54	48	M	GBM	4	R	2	0	2						
55	69	M	GBM	4	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	45	F	GBM	4	P	2	0	4	2	0	3	2	0	3
56	45	F	GBM	4	P	2	0	2						
57	68	M	GBM	4	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
58	53	F	GBM	4	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
59	56	F	GBM	4	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
60	46	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
61	50	M	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
62	46	F	GBM	4	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
63	48	F	GBM	4	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
65	48	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
65	49	F	GBM	4	R	1	0	1						
66	67	M	GBM	4	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	58	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
71	32	F	GBM	4	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
72	32	F	GBM	4	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
73	49	M	GBM	4	R	1	0	0	1	0	0	1	0	0
280	56	M	Subep	1	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
280	61	M	Subep	1	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
324	19	F	Epd'mom	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
324	19	F	Epd'mom	1	P	0	0	0						
325	46	M	Epd'mom	1	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
327	28	M	Epd'mom	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
327	30	M	Epd'mom	1	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
327	30	M	Epd'mom	1	R	2	0	2						
328	30	M	Epd'mom	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
328	30	M	Epd'mom	1	R	1	0	1						
328	44	M	Epd'mom	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
328	44	M	Epd'mom	1	R	1	0	1						
328	30	M	Epd'mom	1	P	1	0	1						
328	44	M	Epd'mom	1	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
329	40	M	Epd'mom	1	P	3	0	3	3	0	3	3	0	3
330	36	M	Epd'mom	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
331	58	M	Subep	1	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
332	48	F	Epd'mom	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
332	48	F	Epd'mom	1	P	1	0	1						
333	20	M	Epd'mom	1	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
333	21	M	Epd'mom	1	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
334	59	M	Subep	1	P	0	0	0	1	0	0	0.5	0	0
334	59	M	Subep	1	P	1	0	0						
335	37	M	Epd'mom	1	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
335	37	M	Epd'mom	1	P	2	0	2						
336	58	F	Epd'mom	1	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
337	21	M	Epd'mom	1	P	3	0	3	3	0	3	3	0	3
337	21	M	Epd'mom	1	P	3	0	3						
338	35	F	Epd'mom	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
339	17	F	Epd'mom	1	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
340	60	M	Epd'mom	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
341	44	F	Subep	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
341	44	F	Subep	1	P	1	0	1						
342	75	F	Epd'mom	1	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
342	75	F	Epd'mom	1	P	2	0	2						

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
344	45	F	Subep	1	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
344	45	F	Subep	1	P	1	0	1						
345	75	M	Subep	1	P	1	0	0	1	0	1	1	0	0.5
345	75	M	Subep	1	P	1	0	1						
346	38	M	Epd'mom	1	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
281	63	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
282	61	F	Epd'mom	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	72	F	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	1.5	0	1
283	72	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
284	3	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
284	3	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
285	33	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
285	33	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
286	21	F	Epd'mom	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
286	21	F	Epd'mom	2	P	2	0	3						
287	33	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
288	29	F	Epd'mom	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
289	64	M	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	1.5	0	0.5
289	64	M	Epd'mom	2	P	1	0	0						
290	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
290	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
291	59	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
291	59	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
292	40	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
292	40	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
293	68	F	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	1.5	0	1
293	68	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
294	50	M	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
294	50	M	Epd'mom	2	P	2	0	1						
295	55	M	Epd'mom	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	55	M	Epd'mom	2	P	0	0	0						
296	38	F	Epd'mom	2	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
297	71	M	Epd'mom	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
297	71	M	Epd'mom	2	P	1	0	0						
298	24	F	Epd'mom	2	P	0	0	0	1	0	1	0.5	0	0.5
298	24	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
299	68	F	Epd'mom	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	68	F	Epd'mom	2	P	0	0	0						
300	60	F	Epd'mom	2	P	3	0	4	3	0	4	3	0	4
300	60	F	Epd'mom	2	P	3	0	4						
301	64	M	Epd'mom	2	R	2	0	1	2	0	1	2	0	1
301	64	M	Epd'mom	2	R	2	0	1						

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
303	40	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
303	40	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
303	40	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
304	29	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
304	29	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
305	61	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
305	61	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
306	79	F	Epd'mom	2	P	2	0	3	2	0	3	2	0	3
306	79	F	Epd'mom	2	P	2	0	3						
307	70	M	Epd'mom	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
308	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
308	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	0						
309	51	M	Epd'mom	2	P	2	0	1	1	0	1	1.5	0	1
309	51	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
310	40	M	Epd'mom	2	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
310	40	M	Epd'mom	2	P	1	0	0						
311	54	M	Epd'mom	2	P	2	0	2	3	0	3	2.5	0	2.5
311	54	M	Epd'mom	2	P	3	0	3						
312	55	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
312	55	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
313	63	F	Epd'mom	2	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
313	63	F	Epd'mom	2	R	1	0	1						
314	54	M	Epd'mom	2	P	2	0	4	2	0	4	2	0	4
315	66	F	Epd'mom	2	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
316	20	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
316	20	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
317	47	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
317	47	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
318	19	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
319	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
319	37	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
320	64	F	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
321	29	M	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
321	29	M	Epd'mom	2	P	1	0	1						
322	64	M	Epd'mom	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	2	F	Epd'mom	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	2	F	Epd'mom	2	R	0	0	0						
323	3	F	Epd'mom	2	R	1	0	0	1	0	0	1	0	0
323	3	F	Epd'mom	2	R	1	0	0						
366	35	F	Epd'mom	2	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
366	35	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
367	44	M	Epd'mom	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
367	44	M	Epd'mom	2	P	0	0	0						
367	44	M	Epd'mom	2	P	0	0	0						
368	69	F	Epd'mom	2	P	1	0	0	1	0	1	1	0	0.5
368	69	F	Epd'mom	2	P	1	0	0						
368	69	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
368	69	F	Epd'mom	2	P	1	0	1						
369	42	M	Epd'mom	2	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
369	42	M	Epd'mom	2	P	0	0	0						
369	42	M	Epd'mom	2	P	0	0	0						
343	82	M	Epd'mom	2	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2
343	82	M	Epd'mom	2	P	2	0	2						
358	44	F	Epd'mom	2	P	2	0	1	2	0	1	2	0	1
347	61	M	Epd'mom	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
347	61	M	Epd'mom	3	R	1	0	1						
348	78	M	Epd'mom	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
349	21	M	Epd'mom	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	1
349	21	M	Epd'mom	3	P	1	0	1						
349	21	M	Epd'mom	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
350	28	F	Epd'mom	3	P	1	0	2	1	0	2	1	0	2
350	28	F	Epd'mom	3	P	1	0	2						
351	17	F	Epd'mom	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
351	17	F	Epd'mom	3	R	0	0	0						
351	17	F	Epd'mom	3	R	0	0	0						
351	17	F	Epd'mom	3	R	0	0	0						
351	17	F	Epd'mom	3	P	1	0	1	1	0	1	0.5	0	0.5
351	17	F	Epd'mom	3	P	0	0	0						
352	62	M	Epd'mom	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
354	2	M	Epd'mom	3	P	1	0	0	1	0	1	1	0	0.6
354	2	M	Epd'mom	3	P	1	0	1						
354	2	M	Epd'mom	3	P	1	0	1						
354	3	M	Epd'mom	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
354	3	M	Epd'mom	3	R	2	0	2						
355	27	F	Epd'mom	3	P	1	0	0	1	0	0	1	0	0
355	27	F	Epd'mom	3	P	1	0	0						
355	27	F	Epd'mom	3	P	1	0	0						
355	27	F	Epd'mom	3	P	1	0	0						
356	26	F	Epd'mom	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0
357	60	M	Epd'mom	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0
357	60	M	Epd'mom	3		0	0	0						
359	67	F	Epd'mom	3	P	1	0	1	1	0	1	1	0	0.5
359	67	F	Epd'mom	3	P	1	0	0						
360	41	F	Epd'mom	3	P	2	0	2	2	0	2	2	0	2

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
360	41	F	Epd'mom	3	P	2	0	2						
361	29	M	Epd'mom	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	29	M	Epd'mom	3	R	0	0	0						
361	30	M	Epd'mom	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
361	30	M	Epd'mom	3	R	0	0	0						
362	31	M	Epd'mom	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
362	31	M	Epd'mom	3	R	1	0	1						
363	36	M	Epd'mom	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
363	36	M	Epd'mom	3	R	1	0	1						
364	59	M	Epd'mom	3	R	2	0	2	2	0	1	1.5	0	1.5
364	59	M	Epd'mom	3	R	1	0	1						
364	55	M	Epd'mom	3	P	2	0	2	2	0	2	1.5	0	1.5
364	55	M	Epd'mom	3	P	1	0	1						
365	73	F	Epd'mom	3	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
370	54	M	Oligo	2		2	0	3	2	0	3	2	0	3
370	54	M	Oligo	2		2	0	3						
371	37	M	Oligo	2		1	0	1	1	0	1	1	0	1
371	37	M	Oligo	2		1	0	1						
372	49	F	Oligo	3		3	0	4	3	0	4	3	0	4
372	49	F	Oligo	3		3	0	4						
373	42	M	Oligo	3		2	0	3	2	0	3	2	0	3
373	42	M	Oligo	3		2	0	3						
374	41	M	Oligo	3		1	0	0	1	0	0	1	0	0
374	41	M	Oligo	3		1	0	0						
378	75	M	Oligo	3		1	0	1	1	0	1	1	0	1
378	75	M	Oligo	3		1	0	1						
379	57	F	Oligo	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
379	57	F	Oligo	3	R	2	0	2						
380	35	M	Oligo	2		2	0	2	2	0	2	2	0	2
380	35	M	Oligo	2		2	0	2						
381	61	M	Oligo	2		3	0	4	3	0	3	3	0	3.5
381	61	M	Oligo	2		3	0	3						
382	46	F	Oligo	3		3	0	4	3	0	4	3	0	4
382	46	F	Oligo	3		3	0	4						
383	50	F	Oligo	3		2	0	3	2	0	2	1.5	0	2
383	50	F	Oligo	3		1	0	1						
384	52	F	Oligo	3	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
384	52	F	Oligo	3	R	2	0	2						
385	50	M	Oligo	2		2	0	2	2	0	3	2	0	2.5
385	50	M	Oligo	2		2	0	3						
386	40	F	Oligo	3	R	3	0	3	3	0	3	3	0	3
386	40	F	Oligo	3	R	3	0	3						

Anhang

ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	WHO-Grad	Rezidiv	Intensität	Nukleäre Expression	Membranöse Expression	Gesamt Intensität	Gesamt nukleäre Expr.	Gesamt membr. Expression	Intensität gemittelt	Nukleäre Expr. gemittelt	Membr. Expr. gemittelt
387	34	F	Oligo	2		2	0	1	2	0	1	2	0	1
387	34	F	Oligo	2		2	0	1						
388	59	F	Oligo	2	R	2	0	1	2	0	1	1.5	0	1
388	59	F	Oligo	2	R	1	0	1						
389	26	M	Oligo	3		2	0	3	2	0	3	2	0	3
389	26	M	Oligo	3		2	0	3						
390	27	F	Oligo	2		3	0	3	3	0	3	3	0	3
391	49	F	Oligo	2		1	0	2	1	0	2	1	0	2
391	49	F	Oligo	2		1	0	2						
392	29	F	Oligo	2		2	0	3	2	0	3	2	0	3
392	29	F	Oligo	2		2	0	3						
393	38	M	Oligo	2		1	0	2	1	0	2	1	0	2
393	38	M	Oligo	2		1	0	2						
394	54	F	Oligo	3	R	2	0	1	2	0	1	2	0	1
396	44	F	Oligo	3	R	1	0	2	1	0	2	1	0	2
396	44	F	Oligo	3	R	1	0	2						
397	40	M	Oligo	2		2	0	3	2	0	3	2	0	3
398	40	F	Oligo	3	R	1	0	1	1	0	1	1	0	1
398	40	F	Oligo	3	R	1	0	1						
399	30	F	Oligo	3	R	3	0	4	3	0	4	3	0	4
399	30	F	Oligo	3	R	3	0	4						
400	32	F	Oligo	3		2	0	3	2	0	3	2	0	3
400	32	F	Oligo	3		2	0	3						
401	35	M	Oligo	2		3	0	3	3	0	3	2.5	0	2.5
401	35	M	Oligo	2		2	0	2						
402	39	M	Oligo	2	R	2	0	2	2	0	2	2	0	2
402	39	M	Oligo	2	R	2	0	2						
403	65	F	Oligo	3		3	0	4	3	0	4	3	0	4
404	29	M	Oligo	2		1	0	1	1	0	1	1	0	1
404	29	M	Oligo	2		1	0	1						
405	42	F	Oligo	3		3	0	4	3	0	3	3	0	3.5
405	42	F	Oligo	3		3	0	3						
406	65	F	Oligo	3		2	0	2	2	0	3	2	0	2.5
406	65	F	Oligo	3		2	0	3						
407	55	F	Oligo	3		3	0	4	3	0	4	3	0	4
407	55	F	Oligo	3		3	0	4						
408	38	M	Oligo	3	P	1	0	0	2	0	1	1.5	0	0.5
408	38	M	Oligo	3	P	2	0	1						

7.2. Veröffentlichung

Teile dieser Dissertation wurden zur Veröffentlichung angenommen.

Allmendinger O, Trautmann K, Mittelbronn M, Waidelich J, Meyermann R, Tatagiba M, Schittenhelm J. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule is expressed in neuroepithelial neoplasms and decreased with tumor malignancy, Matrix Metalloproteinase 2 expression, and absence of IDH1R132H mutation. Hum Pathol. 2011.

7.3. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Meyermann für die Überlassung des Promotionsthemas, die großzügige Benutzungserlaubnis des Instituts und die Berichterstattung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Jens Schittenhelm für die zuverlässige, stets kompetente und freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Unter seiner hervorragenden Anleitung ist mein Interesse am histopathologischen und wissenschaftlichen Arbeiten und für das Fach Neuropathologie intensiviert worden. In bester Erinnerung ist auch die gemeinsame Fahrt zum Internationalen Kongress für Neuropathologie nach Salzburg und die dortige Posterpräsentation.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Caroline Zug für die Einführung in die immunhistochemischen Färbetechniken und bei Frau Katrin Trautmann für das aufwendige Schneiden der TMA-Blöcke.

Frau Daniela Stoll, Frau Ines Kienzler und Herrn Thai Dung Nguyen gilt mein Dank für die freundliche und stets hilfsbereite Unterstützung während der Laborarbeiten.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Neuropathologie möchte ich mich für die sehr nette Aufnahme und kollegiale Atmosphäre bedanken.

Bei meiner Familie, die mit regem Interesse den Verlauf meiner Doktorarbeit verfolgt hat, möchte ich mich herzlichst für ihre Unterstützung bedanken.