

EXPRESSION DER SIGNALTRANSDUKTIONSPROTEINE
GRAF UND FAK IN WEICHGEWEBSTUMOREN
ERWACHSENER - NEUE PROGNOSEINDIKATOREN?

JANINA MARIANNE CHERDRON

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Expression der Signaltransduktionsproteine GRAF und FAK
in Weichgewebstumoren Erwachsener –
neue Prognoseindikatoren?**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Janina Marianne Cherdron
aus Bruchsal

Gießen, 2010

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Kommissarischer Leiter:
Univ.-Prof. Dr. med. Roland Moll

Gutachter:
Prof. Dr. Bohle

Gutachter:
Prof. Dr. Middendorf

Tag der Disputation:
14.02.2011

Definitionen/ Glossar	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Diagrammverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Weichgewebstumore Erwachsener	1
1.2 Untersuchte Tumorarten	2
1.2.1 Tumore mit fibröser/ fibrohistiozytärer Differenzierung	2
1.2.2 Tumore mit neurolemmaler Differenzierung	3
1.2.3 Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung	4
1.2.4 Tumore mit adipozytärer Differenzierung	5
1.3 Übersicht über maligne Weichgewebstumore	6
1.3.1 Epidemiologische Daten	6
1.3.2 Grading	6
1.4 Tumorentstehung	7
1.5 Signaltransduktion	8
1.5.1 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren	8
1.5.2 Weiterleitung auf Ras und seine Kaskaden	8
1.5.3 GRAF - "GTPase Regulator Associated with FAK pp125"	9
1.5.4 Fokale Adhäsionskinase pp125 ^{FAK}	11
2 Fragestellung und Zielsetzung	12
3 Material und Methode	13
3.1 Material	13
3.1.1 Ausgangsmaterial und Vorgehen	13
3.1.1.1 Benigne Tumore	13
3.1.1.2 Maligne Tumore	14
3.1.2 Übersicht über durchgeführte Färbungen	14
3.1.3 Verwendete Antikörper	15
3.1.4 Verwendete Reagenzien und Lösungen	16
3.1.5 Sonstiges	18

3.2	Methode	18
3.2.1	Herstellung und Vorbereitung der Schnitte	18
3.2.1.1	Schnitte von Gefriermaterial	18
3.2.1.2	Schnitte von Paraffin-eingebettetem Material	19
3.2.2	Immunhistochemie	20
3.2.2.1	Prinzip und Technik	20
3.2.2.2	Allgemeines	21
3.2.2.3	Primärantikörper	21
3.2.2.4	Brückenantikörper	22
3.2.2.5	APAAP-Komplex	22
3.2.2.6	Entwicklung	22
3.2.2.7	Gegenfärbung und Eindeckung	23
3.2.2.8	Fotografische Dokumentation	23
3.3	Charakteristika der verwendeten Antikörper	23
3.3.1	Vimentin	23
3.3.2	GRAF und Präimmunsrum	23
3.3.3	FAK	24
3.3.4	MIB-1	24
3.3.5	Negativ- und Positivkontrolle	24
3.4	Mikroskopische Auswertung	25
3.4.1	Semiquantitative Auswertung	25
3.4.2	Wachstumsfraktion	25
3.4.3	Mitosezahl	26
3.5	Patientenbezogene Daten	26
3.6	Statistische Auswertung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Rahmenbedingungen	27
4.1.1	Vimentin	27
4.1.2	Positiv- und Negativkontrollen	27
4.1.3	Ausfallrate	28
4.2	Färbeergebnisse nach Tumorart	29
4.2.1	Tumore mit fibröser/ fibrozytärer Differenzierung	29

4.2.1.1	Voruntersuchung an Kryo-Material	29
4.2.1.2	Fibrome (Paraffin)	29
4.2.1.3	Benigne fibröse Histiozytome (Paraffin)	30
4.2.1.4	Maligne fibröse Histiozytome (Paraffin)	31
4.2.2	Tumore mit neurolemmaler Differenzierung	37
4.2.2.1	Voruntersuchung an Kryo-Material	37
4.2.2.2	Schwannome (Paraffin)	37
4.2.2.3	Zellreiche Schwannome (Paraffin)	38
4.2.2.4	Maligne periphere Nervenscheidentumore (Paraffin)	39
4.2.3	Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung	44
4.2.3.1	Voruntersuchung an Kryo-Material	44
4.2.3.2	Leiomyome (Paraffin)	44
4.2.4	Tumore mit adipozytärer Differenzierung	45
4.2.4.1	Voruntersuchung an Kryo-Material	45
4.2.4.2	Lipome (Paraffin)	45
4.2.5	Weiteres Vorgehen	46
4.3	Analyse der Daten für MFH	46
4.3.1	Immunreaktivität	46
4.3.2	Mitoserate und Wachstumsfraktion	47
4.3.3	Event-free survival und Überlebenszeit	48
4.3.4	Immunreaktivität versus Proliferationsmarker	48
4.3.5	Histologische Kriterien versus Überlebensdaten	49
4.4	Analyse der Daten für MPNST	50
4.4.1	Immunreaktivität	50
4.4.2	Mitoserate und Wachstumsfraktion	51
4.4.3	Event-free survival und Überlebenszeit	51
4.4.4	Immunreaktivität versus Proliferationsmarker	51
4.4.5	Histologische Kriterien versus Überlebensdaten	52
5	Diskussion	55
5.1	Bisherige Untersuchungsergebnisse in der Literatur	55
5.2	GRAF	55
5.2.1	GRAF in malignen fibrösen Histiozytomen	56

5.2.2	GRAF in malignen peripheren Nervenscheidentumoren	57
5.2.3	Abschließende Beurteilung von GRAF	57
5.3	Fokale Adhäsionskinase pp125 ^{FAK}	58
5.3.1	FAK in malignen fibrösen Histiocyten	58
5.3.2	FAK in malignen peripheren Nervenscheidentumoren	59
5.3.3	Abschließende Beurteilung von FAK	60
6	Zusammenfassung	61
6.1	Zusammenfassung auf deutsch	61
6.2	Zusammenfassung auf englisch/ Abstract	61
7	Abkürzungsverzeichnis	63
8	Anhang	65
8.1	Immunreaktivität von ED98015 in Normalgewebe	65
8.2	Färbeergebnisse nach Antikörper	69
8.2.1	GRAF	70
8.2.2	FAK-C-903	70
8.2.3	FAK-C-20	71
8.2.4	FAK-A-17	71
8.3	Proportionalität der Korrelationen	72
8.3.1	MFH	72
8.3.2	MPNST	73
	Literaturverzeichnis	74
	Erklärung	79
	Danksagung	80

Definitionen/ Glossar

- Grading** „Wird bei der histologischen und/ oder zytologischen Charakterisierung maligner Tumore verwendet. Numerische Einteilung des histologischen und/ oder zytologischen Differenzierungsgrades eines malignen Tumors, z.B. G1 bedeutet hochdifferenziert, G4 bedeutet niedrig differenziert“ (Böcker et al. 2004)
- Onkogen** „Gen, das über ein Protein das Tumorstadium induziert. Mutiertes oder dysreguliertes Allel von normalen zellulären Genen, die als Protoonkogene bezeichnet werden; wirkt meist dominant.“ (Böcker et al. 2004)
- Sarkom** „maligner Tumor, der aus Zellen mit mesenchymalem Phänotyp besteht“ (Böcker et al. 2004)
- Tumor** „Syn.: Geschwulst, Neoplasma, Neoplasie. Abnorme Gewebemasse, die durch unregulierte oder unvollständig regulierte und fortschreitende Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen (Tumorzellen) entstehen.“ (Böcker et al. 2004)
- Tumorsuppressorgen** „Gen, das an der Hemmung der Zellproliferation beteiligt ist. Bei Verlust beider Allele geht diese Kontrolle verloren. (...) Rezessives Verhalten.“ (Böcker et al. 2004)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Ras/ Raf/ MEK/ ERK-Kaskade.....	9
Abbildung 2 – Ras/ RhoA/ p 21-Kaskade	9
Abbildung 3 – Mögliche Position von GRAF	10
Abbildung 4 – Gewebeblock mit Stanze und Kolben.....	19
Abbildung 5 – Fertiger „multi-tissue“-Block.....	20
Abbildung 6 – Immunhistochemie.....	21
Abbildung 7 – Negativ- und Positivkontrolle	27
Abbildung 8 – MFH: HE-Färbung	33
Abbildung 9 – MFH: Vimentin-Färbung	34
Abbildung 10 – MFH: GRAF-Färbung	34
Abbildung 11 – MFH: FAK-C-903-Färbung.....	35
Abbildung 12 – MFH: FAK-C-20-Färbung	35
Abbildung 13 – MFH: FAK-A-17-Färbung.....	36
Abbildung 14 – MFH: MIB1-Färbung	36
Abbildung 15 – MPNST: HE-Färbung.....	40
Abbildung 16 – MPNST: Vimentin-Färbung.....	41
Abbildung 17 – MPNST: GRAF-Färbung.....	41
Abbildung 18 – MPNST: FAK-C-903-Färbung.....	42
Abbildung 19 – MPNST: FAK-C-20-Färbung.....	42
Abbildung 20 – MPNST: FAK-A-17-Färbung.....	43
Abbildung 21 – MPNST: MIB-1-Färbung.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Daten zu den malignen Weichgewebstumoren.....	6
Tabelle 2 – Durchgeführte Färbungen.....	14
Tabelle 3 – Primär- und erster Brückenantikörper.....	15
Tabelle 4 – Signifikantsniveau MFH I.....	48
Tabelle 5 – Signifikantsniveau MFH II.....	49
Tabelle 6 – Signifikantsniveau MPNST I.....	52
Tabelle 7 – Signifikantsniveau MPNST II.....	53
Tabelle 8 – Proportionalität MFH I.....	72
Tabelle 9 – Proportionalität MFH II.....	72
Tabelle 10 – Proportionalität MPNST I.....	73
Tabelle 11 – Proportionalität MPNST II.....	73

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 – Ausfallrate (Paraffinschnitte)	28
Diagramm 2 – Immunreaktivität der Fibrome (Paraffin)	30
Diagramm 3 – Immunreaktivität der BFH (Paraffin)	31
Diagramm 4 – Immunreaktivität der MFH für Präimmunserum.....	32
Diagramm 5 – Immunreaktivität der MFH (Paraffin)	32
Diagramm 6 – Immunreaktivität der Schwannome (Paraffin)	38
Diagramm 7 – Immunreaktivität der zellreichen Schwannome (Paraffin)	38
Diagramm 8 – Immunreaktivität der MPNST für Präimmunserum.....	39
Diagramm 9 – Immunreaktivität der MPNST (Paraffin)	40
Diagramm 10 – Immunreaktivität der Leiomyome (Paraffin).....	44
Diagramm 11 – Immunreaktivität der Lipome (Paraffin)	45
Diagramm 12 – Häufigkeitsverteilung.....	46
Diagramm 13 – Korrelation Färbeergebnis von GRAF vs. EFS (Monate) für MFH ..	50
Diagramm 14 – Korrelation zwischen Wachstumsfraktion und ÜLZ, MPNST.....	54
Diagramm 15 – Immunreaktivität für GRAF (Paraffin)	70
Diagramm 16 – Immunreaktivität für FAK-C-903 (Paraffin)	70
Diagramm 17 – Immunreaktivität für FAK-C-20 (Paraffin)	71
Diagramm 18 – Immunreaktivität für FAK-A-17 (Paraffin)	71

1 Einleitung

1.1 Weichgewebstumore Erwachsener

Zum Weichgewebe werden prinzipiell alle nichtepithelialen Gewebe gerechnet, die extraskelettal vorkommen. Hingegen werden Binde- und Stützgewebe parenchymatöser Organe, Gliagewebe und das mononukleäre phagozytische System nicht dazu gezählt. Folglich werden durch den Begriff „Weichgewebe“ Bindegewebe, Muskulatur und Fettgewebe umschrieben, einschließlich der darin enthaltenen kleinen Nerven und Gefäße. Die aus dem Weichgewebe hervorgehenden Tumore unterscheiden sich daher untereinander deutlich in ihrer Inzidenz und Geschlechterverteilung. Rund 97 % aller Weichgewebstumore sind gutartig. Im Allgemeinen sind diese benignen Weichgewebstumore wie z.B. das Lipom, recht häufig; zum Teil kann auch eine familiäre Disposition beobachtet werden. Bösartige Entartungen finden sich hingegen nur bei etwa 1 % aller Weichgewebstumoren; dies entspricht dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg zufolge einer Inzidenz von ca. 4,6 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner (www.dkfz-heidelberg.de). So werden in Deutschland jährlich etwa 2000 - 3000 neue Fälle von malignen Weichgewebstumoren, den Weichgewebssarkomen, diagnostiziert (www.sarkome.de). Sie verdanken ihren Namen ihrem oft fischfleischartigem Aussehen (griech.: sarx = Fleisch), wobei sich Ihre Nomenklatur via Suffix nach der zellulären Differenzierung richtet. Zu den häufigsten malignen Weichgewebstumoren des Erwachsenenalters zählen die sogenannten malignen fibrösen Histiozytome, die malignen peripheren Nervenscheidentumore, Leiomyosarkome und auch Liposarkome (www.aco.at). In den meisten Fällen entstehen diese Tumore nicht aus benignen Vorstufen, sondern spontan. Dabei bleibt die Ursache ihrer Entstehung fast immer ungeklärt. Lediglich in Einzelfällen kann ein Zusammenhang mit Chemikalien, radioaktiver Strahlung bzw. therapeutischer Bestrahlung, immunologischen Defekten, Infektionen oder genetischen Veränderungen gefunden werden, welche u.a. mit Alterationen an Tumorsuppressorgenen (siehe Kapitel 1.4) einhergehen können. So sind einige Sarkome wie z.B. das myxoide Liposarkom, das sogenannte synoviale Sarkom oder auch das alveoläre Rhabdomyosarkom durch tumorspezifische Translokationen gekennzeichnet (Borden et al. 2003).

Klinisch äußern sich Weichgewebstumore im Allgemeinen durch eine auffällige umschriebene Schwellung. So sind etwa $\frac{3}{4}$ der Tumore bei ihrer Entdeckung größer als 5 cm. Begleitend können lokal Schmerzen und mechanische Bewegungseinschränkung v.a. bei gelenknaher Lokalisation des Tumors auftreten. Außerdem können weitere Symptome durch Kompression großer Gefäße, Nerven und anderer Strukturen zustande kommen. Aufgrund eines zumeist hämatogenen Metastasierungsweges siedeln sich Filiae v.a. in der Lunge an, seltener finden sie sich in der Leber oder im Skelett. Wie bei den meisten Malignomen stehen als therapeutische Optionen in erster Linie die chirurgische Tumorentfernung sowie Radiatio und Chemotherapie zur Verfügung. Die größte Bedeutung kommt jedoch der operativen Therapie zu; neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie wie auch postoperative Radiatio stehen im Dienste der operativen Tumorresektion und werden vorwiegend zur Vermeidung lokaler Rezidive eingesetzt (Windham & Pisters 2005; Mankin & Hornicek 2005). Einen weiteren Ansatz stellt die „isolierte hypertherme Extremitätenperfusion mit TNF- α und Melphalan“ dar, wie Schlag & Tunn 2007 berichten: mit einer Gesamtansprechrate von mehr als 70 % sei dies das effektivste neoadjuvante Verfahren bei lokal fortgeschrittenen oder lokal rezidivierenden Weichgewebssarkomen. So könne eine Gliedmaßenamputation in etwa 80 % der Patienten vermieden werden.

(Siehe auch Clark et al. 2005, Brennan 2005, Böcker et al. 2004, Riede et al. 2004, Müller 2003)

1.2 Untersuchte Tumorarten

Im weiteren werden die einzelnen Tumorarten soweit nicht anderweitig angegeben unter Bezugnahme auf Böcker et al. 2004; Enzinger & Weiss 1995; Katenkamp & Stiller 1990; Riede et al. 2004 detaillierter dargestellt. Die jeweiligen Daten bezüglich Häufigkeit, mittlerem Alter bei Auftreten und Fünf-Jahres-Überlebensrate der malignen Entitäten sind der Übersicht wegen der Tabelle 1 in Kapitel 1.3 zu entnehmen.

1.2.1 Tumore mit fibröser/ fibrohistiozytärer Differenzierung

Das Fibrom als gutartige Tumorentität imponiert klinisch meist durch einen schmerzlosen Nodus von mehreren Zentimetern Durchmesser. Anhand der Induration dieses Nodus kann das Fibroma molle vom Fibroma durum abgegrenzt

werden. Makroskopisch lassen sich bei diesem ubiquitär und häufig vorkommenden gutartigen Tumor häufig faserige, weiße Knoten finden. Diese bieten histologisch ein Bild mit hochdifferenzierten Bindegewebszellen und kollagenen Fasern, welche die Härte des Tumors bestimmen .

Im Gegensatz hierzu erscheinen die Tumorzellen der fibrösen Histiozytome im Allgemeinen spindelzellig und besitzen Ähnlichkeit mit Fibroblasten und/ oder Histiozyten. Zu unterscheiden sind die benignen fibrösen Histiozytome (BFH) von den malignen fibrösen Histiozytomen (MFH). Dabei lässt sich bei den BFH in der Regel eine histiozytäre Differenzierung belegen. Die Diagnose eines MFH, nach der WHO-Klassifikation 2005 auch als pleomorphes Sarkom bezeichnet, erfolgt mangels Liniendifferenzierung erst nach Ausschluss anderer verdächtiger Tumorentitäten mit definierten Merkmalen.

Die BFH treten eher oberflächlich, gerne auch kutan, auf und neigen nach Exzision weniger zum Rezidiv. Die malignen fibrösen Histiozytome (MFH) manifestieren sich v.a. an den Extremitäten und im Retroperitoneum. Lichtmikroskopisch lassen sich meistens eine gemischt storiforme und pleomorphe Architektur sowie viele Mitosen und Nekrosen finden. Neben diesen storiform/ pleomorphen Tumore sind riesenzellige und inflammatorische MFH bekannt, die wie die storiform/ pleomorphen meist in der Tiefe, das heißt intra- oder subfascial bzw. in einer Körperhöhle, liegen. Das myxoide MFH (Syn.: Myxofibrosarkom) kann in bis zu 25 % der Fälle auch superfiziell auftreten, das angiomatoide MFH hingegen kommt fast ausschließlich dermal und subkutan vor. Bei der Therapie durch chirurgische Exzision kann es häufig zu lokalen Rezidiven kommen, da das MFH als eigentlich umschriebener Tumors gerne Ausläufer entlang von Faszien und zwischen Muskelfasern ausbildet, die nicht komplett ausgeräumt werden können. Zusätzlich kann eine Metastasierungsrate von bis zu 50 % beobachtet werden, wobei der Absiedlungsort zumeist die Lunge ist.

1.2.2 Tumore mit neurolemmaler Differenzierung

Diese Tumore leiten sich von den Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems ab. Die benignen Tumore stellen sich gekapselt und derb mit einer gelblichen Schnittfläche dar. Ihre Histologie setzt sich zusammen aus faserreichen Arealen mit länglichen Zellen (Antoni-A-Formation) und faserarmen Arealen mit retikulärer

Zeichnung (Antoni-B-Formation). Insgesamt sind Schwannome in immunhistologischer Färbung positiv für den Marker S-100.

Des Weiteren existiert die Variante der zellreichen Schwannome: das Verhältnis der Antoni-A- zu den Antoni-B-Arealen ist hier zugunsten der faserreichen Antoni-A-Areale verschoben, die mit bis zu 90 % der Schnittfläche dominieren. Außerdem können sie eine maligne Transformation aufweisen, die sich in Form von Knochendestruktion und hoher mitotischer Aktivität äußert.

Die seltenen malignen peripheren Nervenscheidentumore werden kurz als MPNST bezeichnet. Sie sind häufig mit einem Morbus Recklinghausen assoziiert und treten meist in tiefem Weichgewebe auf. Sofern sie nicht an einem größeren Nerven entstehen und somit ein örtlicher Bezug zu diesem erkennbar ist, unterscheiden sie sich makroskopisch nicht wesentlich von anderen Weichgewebssarkomen. Histologisch kann je nach Differenzierungsgrad die Diagnose oft nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen gestellt werden. Hierfür spielen u.a. Färbungen des S-100-Proteins und des Myelin-Basisproteins eine Rolle. Für diese Tumorentität finden sich lokale Rezidivraten von bis zu 65 % und Metastasen, vorwiegend pulmonal und ossär, in bis zu 68 % der Fälle.

1.2.3 Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung

Die gutartigen Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung, die Leiomyome (kurz LMO) lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen: kutane LMO mit pilarer oder genitaler Lokalisation und vaskuläre LMO, die jeweils von starkem Schmerz begleitet sein können. Als dritter Subtyp werden die seltenen, in tiefem Weichgewebe auftretenden LMO angesehen. Per definitionem dürfen in der Routinehistologie der LMO keine Mitosen enthalten sein.

Als Leiomyosarkome (LMS), die malignen Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung, werden zur Zeit etwa 15 % aller Weichgewebssarkome diagnostiziert, deren häufigste Lokalisation intraabdominal-retroperitoneal bzw. im tiefen Weichgewebe ist. Da sie entsprechend dieser Lage erst spät klinische Symptome verursachen, weisen sie bei Diagnose bereits häufig eine mittlere Größe von über 15 cm auf und sind somit schlecht bzw. nicht mehr resezierbar. Eine in 40 – 50 % der Fälle wahrscheinliche Metastasierung erfolgt vorzugsweise in Lunge und Leber. LMS können aber auch kutan auftreten und haben dann eine deutlich bessere Prognose, da sie aufgrund von begleitenden Hautveränderungen relativ früh

auffallen. Histologische Kennzeichen der LMS sind Spindelzellen, zelluläre Atypien und Mitosefiguren, wobei sich teilweise epitheloide, myxoide und auch entzündliche Veränderungen finden lassen. Ihre immunhistologische Eigenschaft, positiv für glattmuskuläres Aktin und das Intermediärfilament Desmin zu sein, kann zur Diagnosefindung hilfreich sein.

1.2.4 Tumore mit adipozytärer Differenzierung

Die benignen Lipome treten relativ häufig auf, wobei sie solitär oder multipel sowie kutan/ oberflächlich oder tief vorliegen können. Gebildet werden sie von adipozytären Zellen und besitzen außer bei intra- und intermuskulärer Lokalisation eine Kapsel. Mikroskopisch unterscheiden sie sich kaum von gesundem Fettgewebe.

Die Liposarkome (LPS) als maligne Vertreter der lipomatösen Tumore treten hauptsächlich in tiefem Gewebe auf und sind histologisch gekennzeichnet durch uni- und/ oder multi-vakuoläre Lipoblasten. Auch bei den LPS lassen sich einige Subtypen unterscheiden: gut differenzierte, undifferenzierte und myxoid-rundzellige Tumore.

1.3 Übersicht über maligne Weichgewebstumore

1.3.1 Epidemiologische Daten

<u>Tumor</u>	<u>Häufigkeit unter Sarkomen¹</u> [%]	<u>Medianes Alter bei Diagnose²</u> [Jahre]		<u>5-Jahres-Überlebensrate³</u> [%]	
		♂	♀	♂	♀
MFH	10,1	62	63	64,6	66,7
MPNST	1,9	50	45,5	> 80 ⁴	
LMS	17,4	59	63	47,8	47,0
LPS	8,4	58	60	85,6	78,3

1 Histology of Cancer – Incidence and Prognosis: SEER Population-Based Data, 1973 – 1987, S. 214, Tabelle 2;
 2 Histology of Cancer – Incidence and Prognosis: SEER Population-Based Data, 1973 – 1987, S. 224-225, Tabelle 8;
 3 Histology of Cancer – Incidence and Prognosis: SEER Population-Based Data, 1973 – 1987, S. 234, Tabelle 14;
 4 Böcker, Denk, Heitz (2004): „Pathologie“, 3. Auflage, Urban & Fischer Elsevier GmbH, S. 318, Tabelle 9-1.

Tabelle 1 – Daten zu den malignen Weichgewebstumoren

1.3.2 Grading

Zur Bestimmung des Differenzierungs-/ Malignitätsgrades bösartiger Tumore wurden bereits mehrere Systeme entwickelt. Beispielhaft soll an dieser Stelle dasjenige der Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), das auf Coindre et al. 1986 basiert, dargestellt werden.

Demnach haben drei Eigenschaften des Tumors Einfluss auf dessen Malignitätsgrad:

- Grad der Differenzierung:
 - 1 Punkt: gut differenziert
 - 2 Punkte: mäßig differenziert
 - 3 Punkte: undifferenziert/ zweifelhaft
- Anzahl der Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern (1 Gesichtsfeld = 0,1734 mm²):
 - 1 Punkt: 0–9 Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern
 - 2 Punkte: 10–19 Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern
 - 3 Punkte: ≥ 20 Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern
- Ausmaß der Nekrose:
 - 0 Punkte: keine Nekrose vorhanden
 - 1 Punkte: < 50 % Nekrose
 - 2 Punkte: ≥ 50 % Nekrose

Anschließend werden die vergebenen Punkte addiert und ergeben entsprechend einen Malignitätsgrad von

G1	bei	2 – 3 Punkten
G2	bei	4 – 5 Punkten
G3	bei	6 – 8 Punkten.

Mittlerweile hat sich das Grading maligner Weichgewebstumore Erwachsener als ein sehr wichtiger Prognoseparameter herausgestellt, was in multivariaten Analysen wie zum Beispiel bei Coindre et al. 2001 gezeigt wurde. Lediglich für maligne periphere Nervenscheidentumore konnte in dieser großen Studie mit insgesamt 1240 Patienten kein prognostischer Faktor eruiert werden. Wong et al. 1998 hingegen schrieben dem Grading auch für die MPNST eine wichtige Rolle zu, wobei sie mit 134 Fällen fast doppelt so viele MPNST wie Coindre et al 2001 untersuchten.

1.4 Tumorentstehung

Damit es zur Bildung eines Tumors kommt, muss sich das Gewebe im zellulären Ungleichgewicht befinden: Wachstum und Differenzierung sind gesteigert, Zellverlust in Form von Apoptose hingegen ist verringert. Diese Zellfunktionen werden in gesunden Zellen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen reguliert. Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel das Retinoblastom-Gen oder p53 hemmen unter anderem Wachstum ihrer Zellen und können die Induktion von Mitosen verhindern. Kommt es durch Schädigung dieser Gene zum Wegfall oder Funktionsausfall ihrer Produkte, so fehlen folglich auch deren inhibierende Eigenschaften. Es folgt „ungebremste“ Proliferation. Bei den Protoonkogenen verhält es sich genau entgegengesetzt: ihre Genprodukte ermöglichen und fördern kontrolliert Wachstum und Differenzierung. Durch Mutation können auch sie einen Funktionsverlust erleiden, was in den meisten Fällen die Apoptose der jeweiligen Zelle zur Folge hat. Allerdings können ebenfalls Onkogene entstehen, die für Proteine kodieren, die per se aktiv sind und ihre wachstumsfördernde Wirkung ohne Zutun z.B. eines Wachstumsfaktors erreichen. Eine weitere Möglichkeit stellt die gesteigerte Expression eines normalen Protoonkogenproduktes dar, die wieder in gesteigertem Wachstum resultiert.

Entsprechend ihrer Effekte lassen sich verschiedene Onkogene finden, zu denen neben autokriner Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren auch Proteine der Signaltransduktionskette gezählt werden (Böcker et al. 2004).

1.5 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion ist elementarer Bestandteil der Interaktion des Zellkerns mit der „Außenwelt“. Sie ermöglicht über ein komplexes Zusammenspiel unzähliger „Mitspieler“ Reaktionen der Zelle auf extrazelluläre Stimuli, wie sie nicht nur von Wachstumsfaktoren ausgeübt werden.

1.5.1 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Die im Organismus vielfältig vorkommenden Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor) oder EGF (epidermal growth factor) besitzen auf den Zellen für sie spezifische Rezeptoren. Diese Rezeptoren durchziehen die komplette Zellmembran, wodurch sie in einen extrazellulären, einen transmembranären und einen intrazellulären Abschnitt unterteilt werden. Durch das Binden der Wachstumsfaktoren an den extrazellulären Abschnitt, werden die zytosolisch gelegenen Tyrosinkinasen der Rezeptoren aktiviert, was zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptor selbst führt.

1.5.2 Weiterleitung auf Ras und seine Kaskaden

Neben vielen anderen Variationen der Signalweiterleitung und zahlreichen Querverbindungen zwischen unterschiedlichen Kaskaden, ermöglicht eine SH2-Domäne dem Adapter-Molekül Grb2 die Bindung an eben jene phosphorylierten Tyrosinreste. Über eine SH3-Domäne, die Grb2 ebenfalls besitzt, nimmt es Kontakt zu SOS (Son of Sevenless) auf, welches die Funktion eines GEF (guanine exchange factor) ausfüllt. Der GEF wiederum ermöglicht die Aktivierung einer „kleinen GTPase“, wie zum Beispiel von Ras aus der Ras-Großfamilie, welches in über 40 % aller menschlicher Krebserkrankungen als Onkogen vorzuliegen scheint (Finkel & Gutkind 2003, S. 72). Dieser Schritt erfolgt via Austausch des von der kleinen GTPase gebundenen GDP durch GTP. Für die Deaktivierung der kleinen GTPasen sind „GTPase activating proteins“ (GAP) verantwortlich, die die Hydrolyse des GTP zu GDP und P initiieren. Die GTP-aktivierte kleine GTPase wirkt anschließend unter anderem auf c-Raf, eine Serin-Threonin-Protein-Kinase, welches das Signal über MEK 1 und MEK 2 (je eine MAPK-Kinase) die beiden MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2 erreichen lässt. Diese beeinflussen letztendlich den Zellkern und somit auch Gen-Expression,

Differenzierung und Zellwachstum, wie in Abbildung 1 vereinfacht veranschaulicht wird.

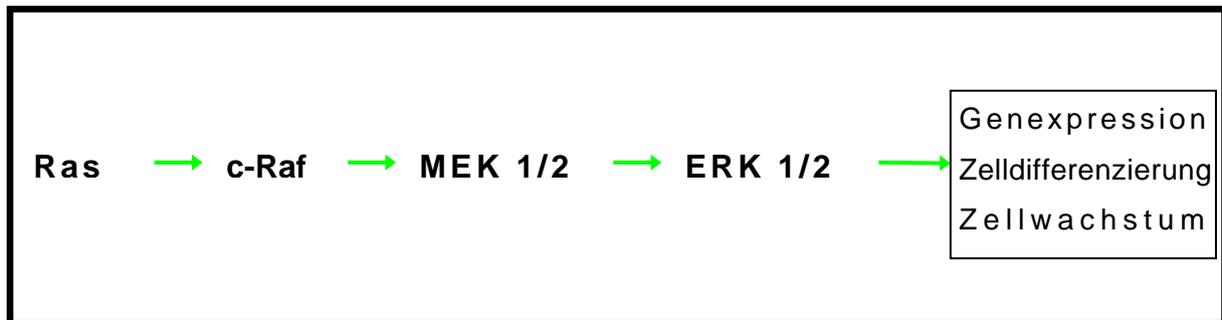


Abbildung 1 – Ras/ Raf/ MEK/ ERK-Kaskade

grün = Aktivierung

Ras besitzt neben diesen Wirkungen aber auch Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus. So bewirkt Ras die Induktion einer weiteren kleinen GTPase, nämlich von RhoA aus der Rho-Familie. Wie Olson et al. 1998 herausfanden, wird durch RhoA mit p21 ein weiterer wichtiger „Mitspieler“ für die Zellteilung gehemmt: p21 selbst weiß den Zellzyklus zu hemmen. Dadurch entsteht eine doppelte Inhibition des Zellzyklus, wie Abbildung 2 zeigt:

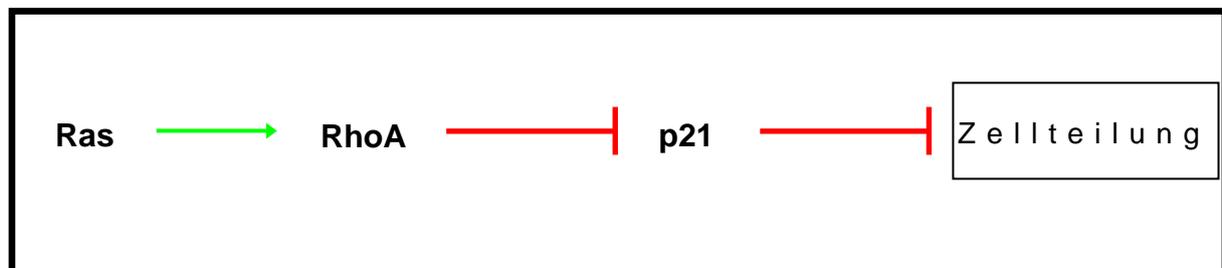


Abbildung 2 – Ras/ RhoA/ p 21-Kaskade

grün = Aktivierung, rot = Hemmung

1.5.3 GRAF - “GTPase Regulator Associated with FAK pp125”

Ein möglicher Angriffspunkt in diesem komplexen Netzwerk stellt die Inhibition von RhoA dar. RhoA bindet in Abhängigkeit seiner eigenen GTPase-Aktivität GTP oder GDP, worüber sein Aktivitätsstatus definiert wird. Um das Vorliegen von RhoA in seiner inaktiven GDP-bindenden Form zu erreichen, muss seine GTPase-Aktivität hochreguliert werden. Der “GTPase Regulator Associated with FAK pp125” (GRAF) scheint diese Aufgabe im Sinne eines „GTPase activating protein“ (GAP) zu

übernehmen, wie Borkhardt et al. 2000 es in ihrer Arbeit beschrieben. Sie fanden des weiteren auf genetischer Ebene einen Zusammenhang zwischen GRAF und akuter myeloischer Leukämie bzw. dem myelodysplastischen Syndrom.

GRAF stellt das menschliche Homologon eines zunächst in Vogel-DNA gefundenen Genabschnittes dar. Seine Lokalisation im menschlichen Genom wird bei Borkhardt et al. 2000 mit 5q31 angegeben. Es kodiert laut Taylor et al. 1998 für ein Protein von 95 kDa, welches ubiquitär exprimiert wird. Dabei lässt sich ein hohes Expressionslevel u.a. in Drüsenepithel der Prostata und in Ganglienzellen des Gastrointestinaltraktes finden (siehe Kapitel 3.3.2). GRAF besitzt eine zentrale GAP-Domäne, mit der es die GTPase-Aktivität von z.B. RhoA zu beeinflussen scheint. Es konnte auch eine peripher gelegene SH3-Domäne nachgewiesen werden, die wohl der Bindung an FAK, einer Tyrosinkinase, dient (vgl. Hildebrand et al. 1996 und folgendes Kapitel). Dieses gleichzeitige Vorliegen einer GAP-Domäne und einer FAK-Bindungsdomäne liefert starke Hinweise, dass GRAF in die Verbindung zwischen Tyrosinkinasen wie FAK und kleinen GTPasen involviert ist.

GRAF scheint also als GAP von RhoA dieses negativ zu regulieren. Der Effekt: der negative Einfluss von RhoA auf p21 wird vermindert. Folglich wird p21 um so höher exprimiert. Ein hohes p21-Expressionslevel wiederum vermittelt im Zellzyklus einen G₂-Arrest und hemmt so die Zellteilung. Wie Abbildung 3 darstellt, bewirkt GRAF also über mehrere Zwischenschritte eine Senkung der Proliferation. So könnte es tatsächlich als Tumorsuppressor bezeichnet werden, wie dies in Finkel & Gutkind 2003 (S. 97) ansatzweise getan wurde. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass ein Mangel bzw. eine Funktionsstörung von GRAF mit erhöhter Proliferation einhergeht. Die Regulation von GRAF selbst scheint gemäß Taylor et al. 1998 wiederum von MAP-Kinasen übernommen zu werden.

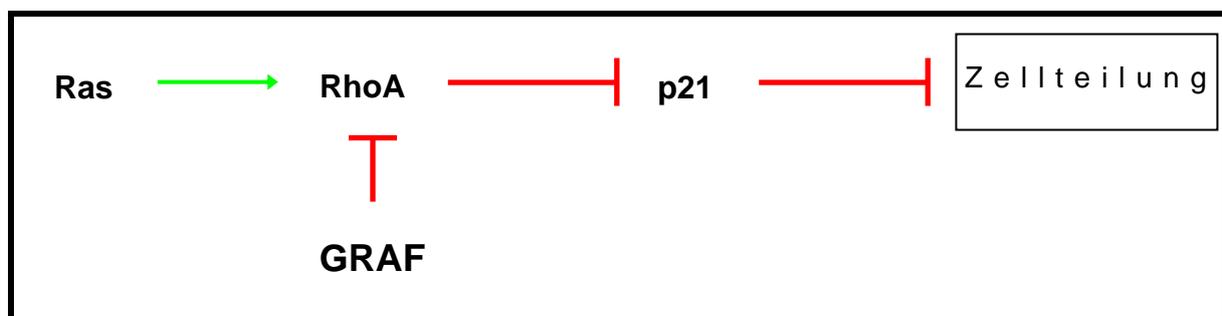


Abbildung 3 – Mögliche Position von GRAF

grün = Aktivierung; rot = Hemmung

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass ein mit GRAF verwandtes Protein gefunden wurde, welches GRAF 2 getauft wurde, jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. GRAF 2 wird verstärkt in Skelettmuskulatur exprimiert (Shibata et al. 2001).

1.5.4 Fokale Adhäsionskinase pp125^{FAK}

Bei der Fokalen Adhäsionskinase, deren exakte Bezeichnung pp125^{FAK} ist, handelt es sich um eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die weder transmembranär noch membranassoziiert lokalisiert ist, sondern sich im Zytoplasma aufhält. Sie ist mit ihrer Fähigkeit der Autophosphorylierung zum Beispiel in die Integrin-vermittelte Zelladhäsion, deren Umbauvorgänge und somit in Vorgänge der Zellmotilität involviert. Auch wird eine Beteiligung an Apoptose- und Zellzykluskontrolle vermutet (Rodriguez-Fernandez 1999, Juliano 2002). Hierfür besitzt sie eine zentrale Domäne mit Kinaseaktivität. Außerdem kann sie an viele Signal- und Strukturproteine binden, unter denen sich auch GRAF findet (Juliano 2002). Somit scheint sie ein wichtiger Dreh- und Angelpunkt für essenzielle zelluläre Vorgänge zu sein. Laut McLean et al. 2005 ist FAK zudem involviert in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und Zellwachstum. In Anbetracht dessen ist es wenig überraschend, dass FAK auch in der Entwicklung von Malignomen eine Rolle zu spielen scheint. So berichten Owens et al. 1995 von einem Zusammenhang zwischen einem Progress epithelialer und mesenchymaler Tumore (Colon- und Mamma-Karzinom, „high-grade“ Sarkome) und erhöhter pp125^{FAK} – Expression. Signifikante Korrelationen zwischen FAK-Überexpression und Tumorinvasionstiefe, Lymphknotenmetastasen und verringerter Überlebensrate fanden Miyazaki et al. 2003 bei Ösophagus-Karzinomen. Bei McLean et al. 2004 wird FAK nach Versuchen mit *fak*-knock-out-Mäusen als „determinant of malignant behavior“ bezeichnet. Somit scheint die Fokale Adhäsionskinase pp125^{FAK} bezüglich GRAF konträre Einflüsse auf zelluläres Verhalten zu besitzen.

Klinisch interessante Ansätze liefert diesbezüglich das Beatson Institute for Cancer Research in Schottland: so kann man Frame 2004 entnehmen, dass es sich bei einer FAK-abhängigen Signaltransduktionskaskade um ein „valuable anti-cancer target“ handeln könnte.

2 Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen bezüglich Weichgewebstumoren des Erwachsenenalters, insbesondere der malignen fibrösen Histiozytome (MFH) und malignen peripheren Nervenscheidentumore (MPNST), untersucht werden:

1. Lassen sich "GTPase Regulator Associated with FAK pp125" (GRAF) und/oder Fokale Adhäsionskinase pp125^{FAK} in Weichgewebstumoren (Fibrom, benignes fibröses Histiozytom, malignes fibröses Histiozytom, Schwannom, zellreiches Schwannom, maligner peripherer Nervenscheidentumor, Leiomyom, Leiomyosarkom, Lipom, Liposarkom) immunhistologisch nachweisen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von GRAF und pp125^{FAK} und den Überlebensdaten der Patienten?
Eignen sich GRAF und pp125^{FAK} aufgrund dieser Zusammenhänge als Prognoseindikatoren?
3. Wie lassen sich diese Ergebnisse in Zusammenschau mit etablierten Prognosefaktoren, hier immunhistologisch ermittelte Mitoserate und Wachstumsfraktion (Ki67 positiv), interpretieren?

Ziel der Untersuchungen soll sein, die mögliche Aussagekraft von GRAF und pp125^{FAK} als Prognosemarker zu prüfen.

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Ausgangsmaterial und Vorgehen

Untersucht wurden insgesamt 236 verschiedene Gewebeproben von Weichgewebstumoren Erwachsener unterschiedlicher Altersklassen. Hiervon waren 100 benigne Tumore und 136 maligne Tumore. Grundsätzlich handelte es sich um Primärtumore; Rezidivtumore wurden nicht untersucht. Das Gewebe stammte aus dem Einsendegut des Institutes für Pathologie am Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurde meist in den dortigen Routineuntersuchungen diagnostiziert.

Zunächst wurde kryo-asserviertes Gewebe von fast jeder der 11 Tumorgruppen untersucht. Zur Überprüfung, ob die Immunreaktivität der Archivgewebe erhalten war, wurde eine Vimentin-Färbung genutzt. Zeigten die einzelnen Sarkomgruppen im weiteren Hinweise auf eine intakte GRAF-Genprodukt-Immunreaktivität (Färbung mit Anti-ED98015-Ak), wurden sie einer „Downstream“-Analyse auf Proteinebene zugeführt und mittels verschiedener Antikörper gegen die Fokale Adhäsionskinase untersucht. Das gleiche Vorgehen wurde anschließend bei Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe angewendet.

Des weiteren wurde Normalgewebe zu Test- und Kontrollzwecken verwendet (siehe Kapitel 3.1.3, 3.3.2 und 3.3.3).

3.1.1.1 Benigne Tumore

Aus der Gruppe der gutartigen Weichgewebstumore wurden folgende Gewebe untersucht:

Fibrome	n = 14
benigne fibröse Histiocytozytome (BFH)	n = 19
Schwannome	n = 17
zellreiche Schwannome (ZS)	n = 10
Leiomyome (LMO)	n = 19
Lipome	n = 9.

3.1.1.2 Maligne Tumore

An bösartigem Gewebe wurden untersucht:

maligne fibröse Histiocyto (MFH)	n = 75
maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)	n = 35
Leiomyosarkome (LMS)	n = 12
Liposarkome (LPS)	n = 11.

3.1.2 Übersicht über durchgeführte Färbungen

<u>Tumorart</u>	Kryo/ Paraffin [n = Anzahl]	Anti- ED98015	AntiFAK-C903 AntiFAK-C20 AntiFAK-A17
Fibrom	K n=5	✓	✗
	P n=9	✓	✓
BFH	K n=3	✓	✓
	P n=16	✓	✓
MFH	K n=13	✓	✓
	P n=62	✓	✓
Schwannom	K n=9	✓	✓
	P n=8	✓	✓
ZS	K n=0	✗	✗
	P n=10	✓	✓
MPNST	K n=0	✗	✗
	P n=35	✓	✓

<u>Tumorart</u>	Kryo/ Paraffin [n = Anzahl]	Anti- ED98015	AntiFAK-C903 AntiFAK-C20 AntiFAK-A17
LMO	K n=10	✓	✗
	P n=9	✓	✓
LMS	K n=12	✓	✗
	P n=0	✗	✗
Lipom	K n=0	✗	✗
	P n=8	✓	✓
LPS	K n=11	✓	✗
	P n=0	✗	✗

Tabelle 2 – Durchgeführte Färbungen

✓ = durchgeführte Färbungen, ✗ = nicht durchgeführte Färbungen

3.1.3 Verwendete Antikörper

Die zum Einsatz gekommenen Primärantikörper sind in Tabelle 3 unterteilt nach Kryo- und Paraffinschnitten mit Angabe der Inkubationszeiten, der jeweiligen Konzentrationen, der Konzentrationen des ersten Brückenantikörpers MAK (Maus-anti-Kaninchen) und ihrer Herkunft/ ihres Herstellers tabellarisch aufgeführt.

Antikörper	Kryo/ Paraffin	Inkubationszeit [min]	Konz. des Primär-Ak [1/x]	Konz. des 1. Brücken-Ak [1/x]	Hersteller/ Herkunft des Primär-Ak
Anti-Vimentin V9 (monoklonal, aus der Maus)	K	30	500	entfällt, da monoklonal	DAKO, Glostrup, Dänemark
	P		250		
Anti-ED98015 (polyklonal, aus Kaninchen)	K	30	1000	500	Eurogentec, Brüssel (Borkhardt et al. 2000)
	P		250	500	
Präimmunserum (polyklonal, aus Kaninchen)	K	30	1000	500	
	P		250	500	
Anti-FAK-C-903 (polyklonal, aus Kaninchen)	K	60	50	250	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
	P		50	250	
Anti-FAK-C-20 (polyklonal, aus Kaninchen)	K	60	500	400	
	P		250	200	
Anti-FAK-A-17 (polyklonal, aus Kaninchen)	K	60	500	400	
	P		250	400	
MIB-1 (monoklonal, aus der Maus)	K	diese Färbung erfolgte im Routinelabor des Institutes			
	P				

Tabelle 3 – Primär- und erster Brückenantikörper

Die optimalen Gebrauchskonzentrationen der Primärantikörper Anti-ED98015, Anti-FAK-C-903, Anti-FAK-C-20 und Anti-FAK-A-17 sowie des ersten Brückenantikörpers MAK wurden an adäquatem Normalgewebe (Ösophagus, Prostata) experimentell ermittelt.

Der erste Brückenantikörper MAK (Maus-anti-Kaninchen, monoklonal) stammte von DAKO, Glostrup, Dänemark, M 0737.

Als zweiter Brückenantikörper wurde der Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (KAM) von DAKO, Glostrup, Dänemark, Z 0259, in einer Konzentration von 1:40 verwendet.

Wiederum von DAKO, Glostrup, Dänemark, wurde das Detektionssystem APAAP (D 0651) bezogen und auf 1:50 verdünnt.

Die Inkubationsdauer für MAK, KAM und APAAP betrug je 30 min.

Sämtliche Antikörper wurden in Chem Mate™ Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark, verdünnt.

3.1.4 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Im Zuge der Immunhistochemie wurden folgende Reagenzien verwendet:

Aceton, Alkohole (70-, 96-, 100 %), Dimethylformamid, Natriumchlorid, Natriumcitrat-Dihydrat, Natriumnitrit, Natronlauge, Neufuchsin, Salzsäure, Xylol, Zitronensäure-Monohydrat (je von Merck KgAa, Darmstadt, Deutschland, bezogen);

Tris-Base, Tris-HCl, Naphthol AS-Bi-Phosphat, Levamisol, Poly-L-Lysin (je von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, bezogen);

Hämalaun von Waldeck GmbH & CoKG, Münster, Deutschland.

Daraus wurden zum Teil folgende Lösungen hergestellt:

<u>Waschpuffer:</u>	Tris-Base	18,0	g
	Tris-HCl	137,0	g
	NaCl	175,6	g
	Aqua destillata	2500,0	ml

Nach Einstellung auf pH 7,4 – 7,6 erfolgte die Verdünnung auf 20 l.

Citratpuffer:

Stammlösung A:	Zitronensäure - Monohydrat 0,1 M	21,0	g
	Aqua destillata	1000,0	ml

Stammlösung B:	Natriumcitrat - Dihydrat 0,1 M	29,4	g
	Aqua destillata	1000,0	ml
Gebrauchslösung:	Stammlösung A	9,0	ml
	Stammlösung B	41,0	ml
	Aqua destillata	450,0	ml
	(10 mM mit pH 6,0)		

Aufbewahrung der Stammlösungen im Kühlschrank bei 4 °C.

Entwicklungslösung:

Entwicklungspuffer:	Tris-Base	49,0	g
	Tris-HCl	15,0	g
	Natriumchlorid	87,0	g
	Aqua destillata	1750,0	ml
	(Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur.)		

Propandiol-Lösung:	Propandiol	21,0	g
	Aqua destillata	1000,0	ml
	(Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei 4 °C.)		

Neufuchsin-Lösung:	Neufuchsin	5,0	g
	HCl 2N	100,0	ml
	(Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei 4 °C).		

Lösung I:	Entwicklungspuffer	70,0	ml
	Propandiol	25,0	ml
	auf pH 9,75 einstellen, dann hinzugeben:		

	Levamisol	40,0	mg
Lösung II:	Natrium-Nitrit	20,0	mg
	in Aqua dest.	500,0	µl
	Neufuchsinlösung	200,0	µl
Lösung III:	Naphthol	50,0	mg
	Dimethylformamid	600,0	µl

Lösung II zu Lösung I geben, danach Lösung III zugeben; auf pH 8,8 einstellen und mittels Papier-Faltenfilter filtrieren (Mengenangaben für zwei Küvetten).

Eosin-Lösung:

Stammlösung:	Eosin	2,0	g
	96 %-iger Alkohol	100,0	ml
Gebrauchslösung:	Stammlösung mit 70 %-igem Alkohol in gleichen Teilen mischen;		
	pro 100 ml Lösung 5 Tropfen Eisessig hinzufügen.		
	Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur.		

3.1.5 Sonstiges

Um das Gefriermaterial im Kryostaten CM 3000, Leica, Wetzlar, Deutschland, zu schneiden, wurde es in Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound, Sakura Finetek Europe B.V., eingebettet. Als Objektträger wurden Super Frost[®] plus-Objektträger von Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland, verwendet.

Zum Schneiden der Paraffin-Blöcke wurde das Schlittenmikrotom SM 2000R, Leica, Deutschland genutzt.

Die für Paraffinschnitte bestimmten Objektträger wurden zuvor mit 10-%igem Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) beschichtet.

Zum Umranden der Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurde der Cytomation Pen[®] von DAKO, Glostrup, Dänemark angewendet.

Eingedeckt wurden die gefärbten Gefrier- und Paraffin-Schnitte mit Glycergel[®], DAKO, Glostrup, Dänemark. Glycergel[®] wurde vor Gebrauch im Wasserbad bei circa 60° C erhitzt und verflüssigt. Verwendet wurden handelsübliche Deckgläschen.

3.2 Methode

3.2.1 Herstellung und Vorbereitung der Schnitte

3.2.1.1 Schnitte von Gefriermaterial

Kryo-asserviertes Gewebe wurde mittels Tissue-Tek[®] auf Gewebeträger des Kryostaten aufgebracht. Es wurden jeweils circa 5 µm dicke Schnittpräparate hergestellt. Die einzelnen Schnitte wurden auf vorbeschriftete Objektträger aufgezogen und bei Zimmertemperatur für 12 Stunden getrocknet. Anschließend wurden sie entweder zur Färbung direkt weiterverwendet oder bei –20 °C eingelagert.

Vor dem Färbevorgang mussten die Schnitte ggf. auftauen und kurz antrocknen, bevor sie 10 min in Aceton vorbehandelt wurden. Nachdem sie danach wieder getrocknet waren, wurde das Gewebeobjekt mit dem Cytomation Pen[®] umrandet und die Primärantikörperlösung mittels Pipette aufgetragen.

3.2.1.2 Schnitte von Paraffin-eingebettetem Material

Paraffin-Schnittpräparate wurden sowohl von gewöhnlichen Paraffin-Blöcken mit je einem Gewebestückchen („single-tissue-section“), wie auch von Gewebe-sparenden, selbst hergestellten „multi-tissue“-Blöcken („multi-tissue-section“) angefertigt. Die Herstellung dieser Blöcke erfolgte in Anlehnung an Pan et al. 2004 und Battifora 1986.

Zunächst wurden „multi-tissue“-Rohlinge hergestellt. Hierzu wurden aus Paraffin leere Blöcke gegossen. In asymmetrischer Anordnung wurden hieraus mittels eines Edelstahl-Röhrchens (Außendurchmesser 4,0 mm, Wandstärke 0,1 mm, eine Endseite scharfkantig angeschragt) mehrere Paraffin-Stanzen entnommen.

Das Paraffin-eingebettete Gewebe wurde zunächst an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparaten mikroskopisch auf Repräsentativität und qualitativer Eignung hin kontrolliert. Anschließend wurden an geeigneter Stelle mit oben beschriebenem Röhrchen Gewebestanzen entnommen und mittels passendem Kolben (Edelstahl-Rundmaterial) in die vorbereiteten „multi-tissue“-Rohlinge eingearbeitet.

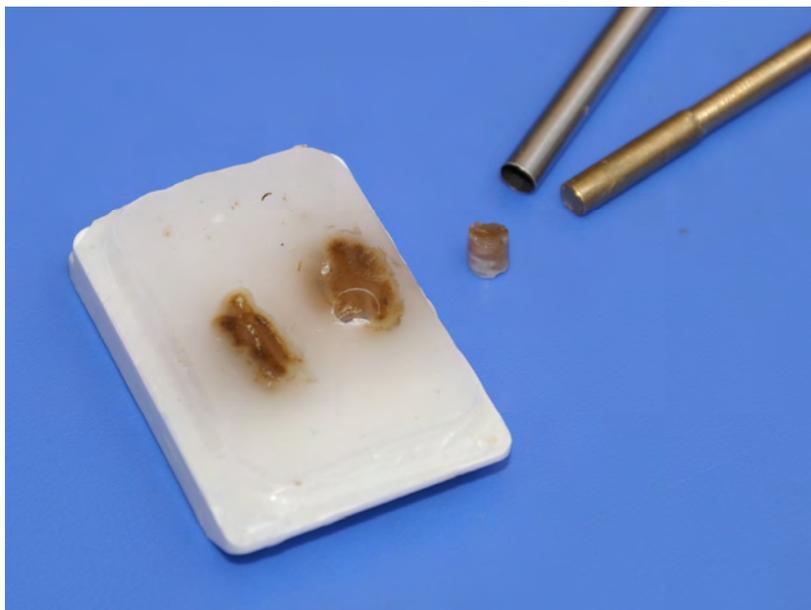


Abbildung 4 – Gewebeblock mit Stanze und Kolben



Abbildung 5 – Fertiger „multi-tissue“-Block

Nach Einpassung der Stanzzyylinder wurden die beladenen „multi-tissue“-Blöcke im Wärmeschrank für 15 min bei 60 °C erwärmt, um die Verbindung der eingelassenen Stanzzyylinder mit dem umgebenden Paraffinmaterial zu verbessern und damit das anschließende Schneiden zu erleichtern.

Zum Schneiden der Blöcke mit dem Schlittenmikrotom, Leica, wurden diese erst bei -20 °C gekühlt. Die angefertigten Schnitte wurden dann via Wasserbad auf die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht (vgl. Kapitel 3.1.5). Nach 20 min bei 60 °C und anschließend mindestens 40 min bei 40 °C im Wärmeschrank kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur ab.

Nach Entparaffinierung (je 10 min in Xylol, Aceton, Aceton-Waschpuffer 1:1, Waschpuffer), „Antigen-Retrieval“ (40 min in mit Zitratpuffer [vgl. Kapitel 3.1.4] gefüllten Plastikküvetten im Wasserbad mit 97 °C, anschließend 20 min Auskühlen bei Raumtemperatur) und Umrandung des Gewebes mit Cytomation Pen[®], DAKO, konnte mit der Färbung begonnen werden.

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1 Prinzip und Technik

Grundlegendes Prinzip der immunhistologischen Färbung ist die farbliche Markierung eines Antigens mittels eines Antikörper-gebundenen Detektionssystems. Dabei müssen die Gewebeschnitte nacheinander mit diversen Antikörpern inkubiert

werden, wie folgende schematische Darstellung zeigt und im Folgenden erläutert wird:

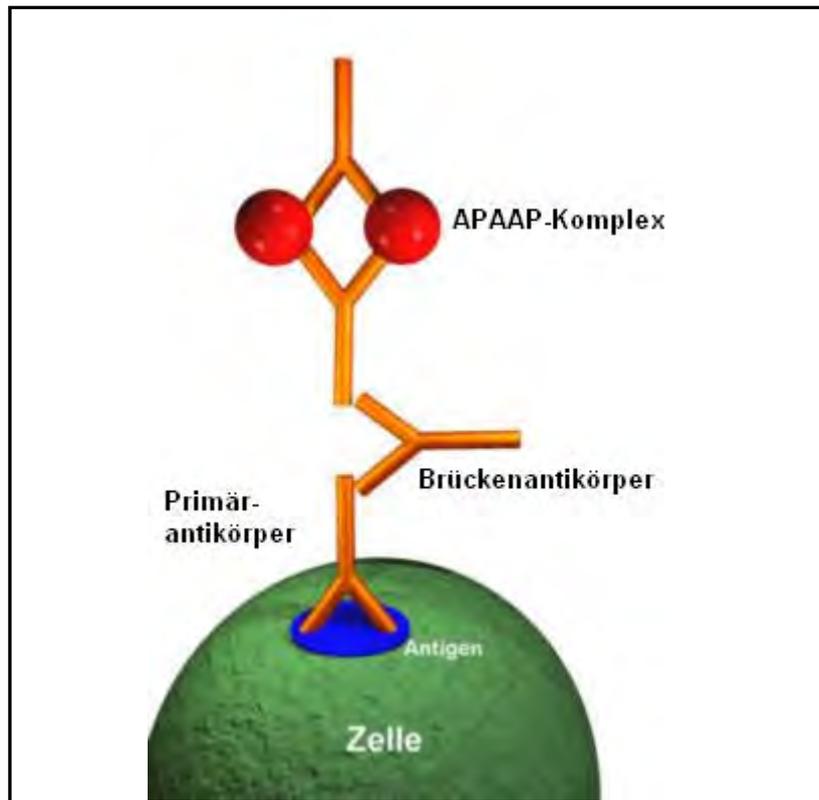


Abbildung 6 – Immunhistochemie

IHC mit monoklonalem Primärantikörper;
Quelle: Labor für Tumorimmunologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München; geändert übernommen.

3.2.2.2 Allgemeines

Die Inkubationsschritte erfolgten immer bei Raumtemperatur und unter Verwendung einer „feuchten Kammer“, um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Auf die „single-tissue-sections“ wurden jeweils 100 µl der Antikörperverdünnungen aufpipettiert, auf die „multi-tissue-sections“ je 150 µl, da deren Schnittfläche insgesamt größer war.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte in Glasküvetten gestellt und mit Waschpuffer gespült. Die Anzahl der Spülungen hing vom inkubierten Antikörper ab (s.u.).

3.2.2.3 Primärantikörper

Die Primärantikörper sind gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet. Sie werden entweder von einem einzelnen Zellklon (monoklonal, meist in der Maus) oder

polyklonal (meist im Kaninchen) gebildet, was Konsequenzen für die weiteren Schritte hat.

Die Inkubationsdauer für die jeweiligen Primärantikörper ist Tabelle 3 (Seite 15) zu entnehmen.

Nach Ablauf der Inkubation wurde dreimal gespült.

3.2.2.4 Brückenantikörper

Die Brückenantikörper dienen der Verbindung des Primärantikörpers mit dem Antikörper des Detektionssystems, welcher bei APAAP von der Maus stammt. Ist der Primärantikörper monoklonal, also auch von der Maus, so bedarf es lediglich eines Brückenantikörpers, nämlich des KAM (gegen Maus-Antigen gerichtet). Bei polyklonalen Primärantikörpern hingegen wird zusätzlich ein „Adapter“ benötigt: hier dient MAK (Maus-anti-Kaninchen) als erster Brückenantikörper, den dann in einem nächsten Schritt KAM als zweiter Brückenantikörper binden kann.

Die Inkubationsdauer betrug jeweils 30 min. Nach der Inkubation mit MAK und KAM wurde jeweils dreimal gespült.

3.2.2.5 APAAP-Komplex

Der APAAP-Komplex besteht zum einen aus einem monoklonalen Antikörper von der Maus, der gegen alkalische Phosphatase gerichtet ist, zum anderen aus alkalischer Phosphatase selbst. Der Antikörper wird an seinem unspezifischen Fc-Stück von KAM gebunden und das Enzym ist für die Farbreaktion verantwortlich.

Mit APAAP wurden die Schnitte ebenfalls für 30 min inkubiert. Nach der APAAP-Inkubation waren die Schnitte zehnmals zu spülen.

3.2.2.6 Entwicklung

Die alkalische Phosphatase sorgt für die Umsetzung des Naphthol-AS-Bi-Phosphats aus der Entwicklungslösung. Es werden Phenolkomponenten und Phosphate frei. Dabei sind die Phenolanteile für die Bindung der Farbstoffe aus der Entwicklungslösung (hier: Neufuchsin) verantwortlich, was letztendlich die Antigen-spezifische Färbung des Gewebes bewirkt (Boenisch et al. 2003). Für den Entwicklungsvorgang wurden die Schnitte in mit Entwicklungslösung befüllte Glasküvetten gestellt und 20 min lang mäßig schnell gerüttelt (Kombischüttler Swip KL-2, Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland). Anschließend erfolgte ein einmaliges Spülen in Waschlösung.

3.2.2.7 Gegenfärbung und Eindeckung

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun (vgl. Kapitel 3.1.4), in das die Schnitte für 45 Sekunden eingebracht wurden. Dem Bläuen in zweimal ausgewechseltem Leitungswasser folgte das Eindecken mit Glycergel®.

3.2.2.8 Fotografische Dokumentation

Mit der digitalen Kamera Typ KY-F75U der Firma JVC wurden innerhalb der ersten vier Wochen nach Färbung aussagekräftige Schnitte über ein Lichtmikroskop/Axioskop der Firma Zeiss fotografiert. Die Bearbeitung ermöglichte die Software Diskus 32 Version 4.5.

3.3 Charakteristika der verwendeten Antikörper

3.3.1 Vimentin

Vimentin zählt zu den Intermediärfilamenten und befindet sich generell im Stroma von Tumoren und in zahlreichen Sarkomen. Daher eignet es sich hervorragend als Marker einer intakten Immunreaktivität des zu untersuchenden Gewebes (Battifora 1991). Vor weiteren immunhistologischen Analysen wurde an den Schnitten grundsätzlich zuerst Färbungen für Vimentin vorgenommen. Immun-negative oder schwach-positive Fälle wurden von den weiteren Färbungen ausgeschlossen.

3.3.2 GRAF und Präimmunserum

Der polyklonale Anti-GRAF-Antikörper (auch Anti-ED98015-Ak genannt) wurde kommerziell hergestellt (Eurogentec, Brüssel, Belgien). Seine Immunreaktivität für Gefrier- und Paraffinschnitte ist in der Arbeitsgruppe Borkhardt/ Bohle seit Ende der 90er Jahre gut bekannt. Die Resultate sind publiziert (siehe „supplemental data“ bei Borkhardt et al. 2000) und im Anhang einsehbar (siehe Kapitel 8.1). In der vorliegenden Untersuchung diente Normalgewebe des Ösophagus als Positivkontrolle.

Zur Überprüfung der Antikörper-Spezifität wurden vor allem bei Gewebe mit hoher GRAF-Immunreaktivität „Negativ-Kontrollen“ mit dem Original-Präimmunserum durchgeführt und vergleichend analysiert.

3.3.3 FAK

Tumorgruppen, die zumindest heterogen positiv für ED98015 waren, wurden auch auf die Fokale Adhäsionskinase pp125^{FAK} hin untersucht. Es wurden hierfür 3 verschiedene Antikörper verwendet. Diese richteten sich gegen Abschnitte der FAK am:

- Carboxy-Ende: FAK-C-903 und FAK-C-20,
- Amino-Ende: FAK-A-17.

Diese Antikörper sind jeweils polyklonal und entstammen dem Kaninchen. Das entsprechende Kontrollgewebe stammte von der Prostata (Rovin et al. 2002).

3.3.4 MIB-1

Der MIB-1-Antikörper richtet sich gegen den Proliferationsmarker Ki67, welcher während des Zellzyklus hauptsächlich in der S-, G₂- und M-Phase exprimiert wird (Gerdes et al. 1984, Cattoretti et al. 1992). Daher werden sich in Teilung befindliche Zellen angefärbt (vgl. Wachstumsfraktion), was Aussagen über das Tumorstadium erlaubt und zum Beispiel bei Skytting et al. 1999 als unabhängiger Prognosefaktor bei synovialen Sarkomen beschrieben wurde. Heslin et al. 1998 bestätigte die prognostisch starke Aussagekraft des Ki67-Scores mit Vorhersagevermögen bezüglich Fernmetastasen und Tumor-Mortalität bei high-grade STS, Hasegawa et al. 2002 betonten die sehr starke prognostische Aussagekraft des MIB-1-Scores bei Patienten mit STS.

Außerdem wurde anhand der MIB-1-gefärbten Gewebeschnitte die Mitosezahl bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.4.3).

Um einen eventuellen Einsatz der erhobenen Resultate auch in der Routine-Diagnostik zu gewährleisten, wurde zur MIB-1-Immunhistochemie im Routinelabor das dort etablierte Färbeprotokoll genutzt.

3.3.5 Negativ- und Positivkontrolle

Bei den immunhistologischen Färbungen wurden jeweils Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt; lediglich bei den Färbungen der Vimentinfilamente beschränkten wir uns auf Negativkontrollen. Es wurden Gewebe genutzt, von denen bekannt war, dass sie das entsprechende Antigen besitzen (vgl. Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Bei der Negativkontrolle wurde statt des in Chem Mate™ Antibody Diluent, DAKO, verdünnten Primärantikörpers das Chem Mate™ Antibody

Diluent, DAKO, alleine aufgetragen, sodass das Färbeergebnis negativ sein musste. Die Positivkontrolle wurde wie alle anderen Schnitte gefärbt und musste adäquat positiv reagieren. War dies nicht der Fall, wurden die Ergebnisse relativiert oder die komplette Färbereihe wurde verworfen. Sämtliche Antikörper waren aus zum Teil eigenen Voruntersuchungen hinsichtlich ihrer Spezifität und Reagibilität gut charakterisiert (außerdem: Borkhardt et al. 2000).

3.4 Mikroskopische Auswertung

Zunächst wurde anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) und der Anti-Vimentin-Färbungen der Schnitte mikroskopisch sichergestellt, dass sie auch das entsprechende Tumorgewebe enthielten (vgl. Kapitel 3.3.1).

Anschließend folgte die Begutachtung der immunhistologisch gefärbten Schnitte mittels semiquantitativer Auswertung (s.u.). Des Weiteren wurden wie nachfolgend erläutert die Wachstumsfraktion und die Mitosezahl bestimmt.

3.4.1 Semiquantitative Auswertung

Hierbei wurde die Immunreaktivität der Tumorzellen bei immunhistologischer Färbung anhand der Färbeintensität in 0,5er-Schritten beurteilt. Dabei ließen sich die Ergebnisse nach folgendem Schema zusammenfassen:

Färbeindex 0	keine Färbung
Färbeindex 0,5 - 1	„schwache Färbung“
Färbeindex 1,5 - 3	„starke Färbung“.

Der maximal vergebene Punktwert lag bei 3. Dabei mussten bei einem positiven Färbeergebnis mindestens 10 % der Tumorzellen gefärbt sein.

3.4.2 Wachstumsfraktion

Die Bestimmung der Wachstumsfraktion erfolgte durch Auszählen der Ki67-positiven Tumorzellen auf insgesamt 200 Tumorzellen bei 40-facher Vergrößerung. Hierzu wurde ein Okulargitter verwendet. Der entsprechende Wert wurde in Prozent angegeben.

3.4.3 Mitosezahl

Zur Bestimmung der Mitosehäufigkeit wurden gemäß den Vorgaben der FNCLCC (Weiss & Sobin 1999) 1,734 mm² der Schnitte bei 40-facher Vergrößerung begutachtet. Dies entspricht 10 HPF (HPF = high-power field) nach Coindre (Coindre et al. 1986). Die Angabe der Mitoseanzahl erfolgte in Mitosen pro 10 HPF.

3.5 Patientenbezogene Daten

Durch Auswertung der Patientenunterlagen aus dem Archiv des Universitätsklinikum Gießen und dem Instituts-eigenen Archiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums der JLU Gießen, sowie durch Recherche bei behandelnden Ärzten konnten das Event-free survival/ Ereignis-freie Überleben (EFS) sowie die Überlebenszeit (ÜLZ) bestimmt werden. Hierbei ist das EFS definiert als Zeit zwischen Erstdiagnose und Rezidiv, die ÜLZ wiederum stellt die Differenz zwischen Sterbedatum und Datum der Erstdiagnose dar. Die Bestimmung erfolgte jeweils monatsgenau.

3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte zum einen mit dem Microsoft-Programm Excel[®] sowie mit dem Statistik-Programm SPSS[®] für Windows (Version 16.0).

Die Berechnungen der relativen Häufigkeiten wurden mit einer Genauigkeit von 2 Dezimalstellen durchgeführt. Zum Zwecke der graphischen Darstellung wurden die jeweiligen Werte anschließend auf ganze Zahlen bzw. auf 0,5 gerundet, da in diesem Falle eine Angabe mit Dezimalstellen keine neuen Erkenntnisse gebracht und zusätzlich den Lesefluss gestört hätte.

Die Proportionalität von Korrelationen wurde auf Basis der Steigung m der Ausgleichsgeraden ermittelt. So liegt bei positiver Steigung der Ausgleichsgeraden ($m > 0$) ein proportionaler Zusammenhang vor; $m < 0$ beschreibt eine negative Steigung und somit einen antiproportionalen Zusammenhang.

4 Ergebnisse

4.1 Rahmenbedingungen

4.1.1 Vimentin

Wie in Abschnitt 3.3 bereits erläutert wurde, wurde die immunhistochemische Anfärbung der Vimentinfilamente zur Feststellung der erhaltenen Immunreaktivität des Gewebes genutzt. Nur Gewebe, welches hierbei ein stark positives Färbeergebnis (1,5 – 3 Punkte) zeigte, wurde auch auf das GRAF-Antigen und die drei verschiedenen FAK-Antigene hin untersucht und konnte somit in die Auswertung genommen werden. Letztendlich fand sich eine qualitativ ausreichend erhaltene Vimentin-Immunreaktivität in allen untersuchten Geweben.

4.1.2 Positiv- und Negativkontrollen

Entsprechend Kapitel 3.3.5 wurden bei jedem immunhistochemischen Färbevorgang Kontrollschnitte mitbearbeitet. Die Ergebnisse sowohl der Positiv- wie auch der Negativkontrollen entsprachen jeweils unseren Vorgaben (≥ 2 Punkte bei den Positivkontrollen, 0 Punkte bei den Negativkontrollen), sodass sämtliche Färbungen in die Auswertung einbezogen werden konnten.

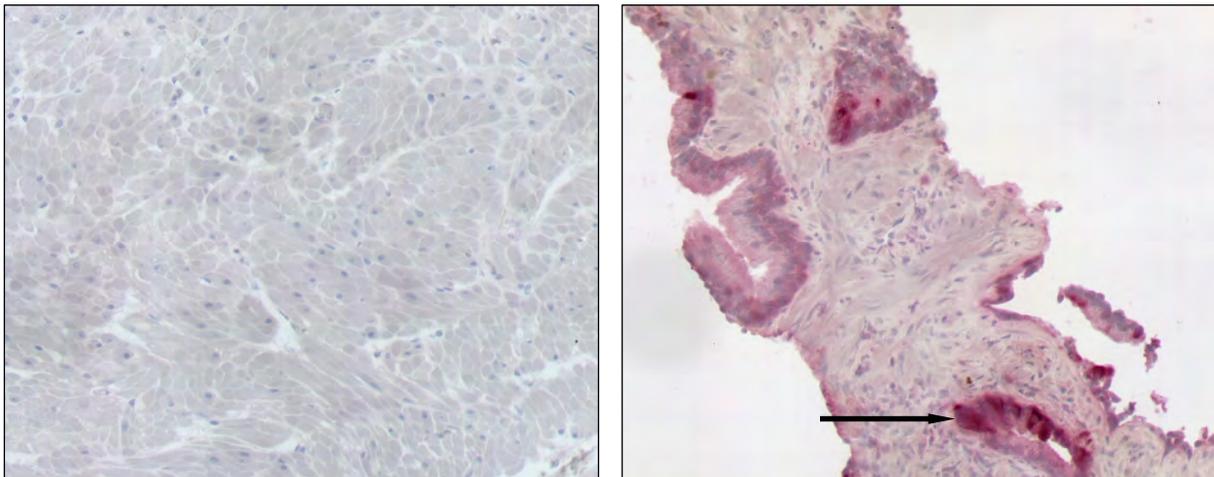


Abbildung 7 – Negativ- und Positivkontrolle

links: Negativkontrolle für GRAF-Färbung (Ösophagus, keine Färbung);
rechts: Positivkontrolle für FAK-Färbung (Prostata, starke Färbung, Pfeil markiert positive Zelle)

4.1.3 Ausfallrate

Trotz Verwendung der Super Frost® plus-Objektträger und zusätzlicher Beschichtung mit Poly-L-Lysin konnte nicht verhindert werden, dass einige Schnitte während des immunhistochemischen Färbeprozesses abschwemmen und somit nicht ausgewertet werden konnten. Vor allem Paraffinschnitte von kleinen Gewebestücken und von Multi-Tissue-Blöckchen waren betroffen. Die abgeschwemmten und auch bei Wiederholung nicht auswertbaren Schnitte wurden bei den relativen Darstellungen der Färbegergebnisse ausgenommen, sofern nur das Ergebnis eines Antikörpers (ausgenommen Vimentin) fehlte. Waren mehr als 2 Schnitte verschiedener Färbungen eines Falles nicht auswertbar, wurde dieser Fall komplett aus der Wertung genommen. Somit verblieb eine repräsentative Restmenge.

Die Ausfallrate lag für Gefrierschnitte durchgehend bei 0 % außer bei den BFH-Schnitten; hier waren rund $\frac{1}{3}$ der Schnitte nicht verwertbar.

Die Auswertbarkeit der Paraffinschnitte schwankte zwischen 0 % und rund 12 %, bei den BFH allerdings wieder erhöht bei 25 %, was tumorartbedingt zu sein scheint.

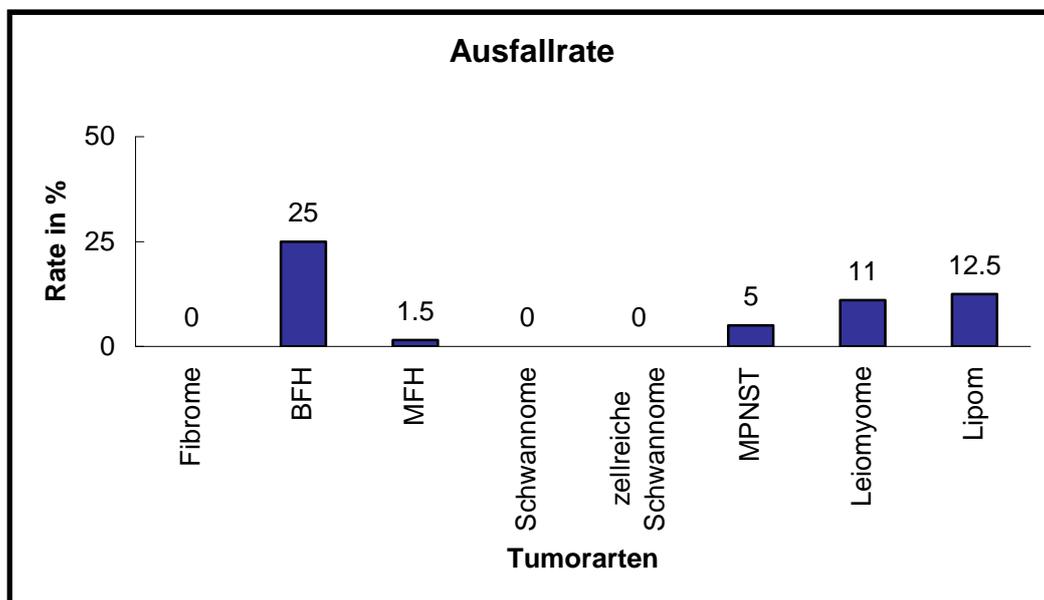


Diagramm 1 – Ausfallrate (Paraffinschnitte)

Insgesamt fielen 14 Fälle gänzlich aus der Wertung, da entweder zu viele ihrer Schnitte die mehrstufigen FärbeprozEDUREN nicht überstanden oder in den jeweiligen neu angefertigten Schnitten kein Tumorgewebe nachzuweisen war.

4.2 Färbeergebnisse nach Tumorart

4.2.1 Tumore mit fibröser/ fibrozytärer Differenzierung

4.2.1.1 Voruntersuchung an Kryo-Material

Es wurden 5 Fibrome, 3 BFH- und 13 MFH-Fälle an Gefriermaterial untersucht. Sämtliche Fibrome reagierten mit dem Anti-GRAF-Antikörper negativ. Daher erfolgten keine FAK-Färbungen an kryo-asserviertem Fibromgewebe.

Die BFH hingegen wurden – wenn auch an sehr kleiner Fallzahl – bezüglich GRAF-Immunreaktivität mit 0,5 Punkten, 1 und 1,5 Punkten positiv bewertet. Auch die MFH fielen in 9 Fällen positiv aus: 4-mal schwach positiv, 5-mal stark positiv. Die anschließenden FAK-Färbungen dieser beiden Untergruppen zeigten ebenfalls positive Ergebnisse: alle 3 BFH waren auf alle 3 FAK Typen zumindest schwach positiv, bei den MFH waren je FAK-Typ 10 der untersuchten Fälle positiv. Dabei sind fast alle FAK-negativen Fälle gleich für alle 3 FAK-Typen negativ und auch GRAF-negativ. Aufgrund der positiven Ergebnisse unter den BFH und MFH entschieden wir uns, Paraffingewebe aller drei Entitäten, also auch von Fibromen, zu untersuchen.

4.2.1.2 Fibrome (Paraffin)

Wie auch schon im Gefriergewebe reagierten die meisten in Paraffin gebetteten Fibrom-Gewebe negativ, sowohl für Anti-GRAF-Antikörper, als auch für die 3 Anti-FAK-Antikörper. Mit den Anti-FAK-Antikörpern ließen sich lediglich bei 11 % bzw. 33 % der Fälle positive Färbungen erreichen, wenn auch zumeist nur schwache. Einzig bei Färbungen des GRAF-Antigens konnten stark positive Ergebnisse gefunden werden: für 2 der 9 untersuchten Fibrome konnten $\geq 1,5$ Punkte vergeben werden, was 22 % der Fälle entspricht. Die Färbeergebnisse sind in dem folgenden Diagramm dargestellt:

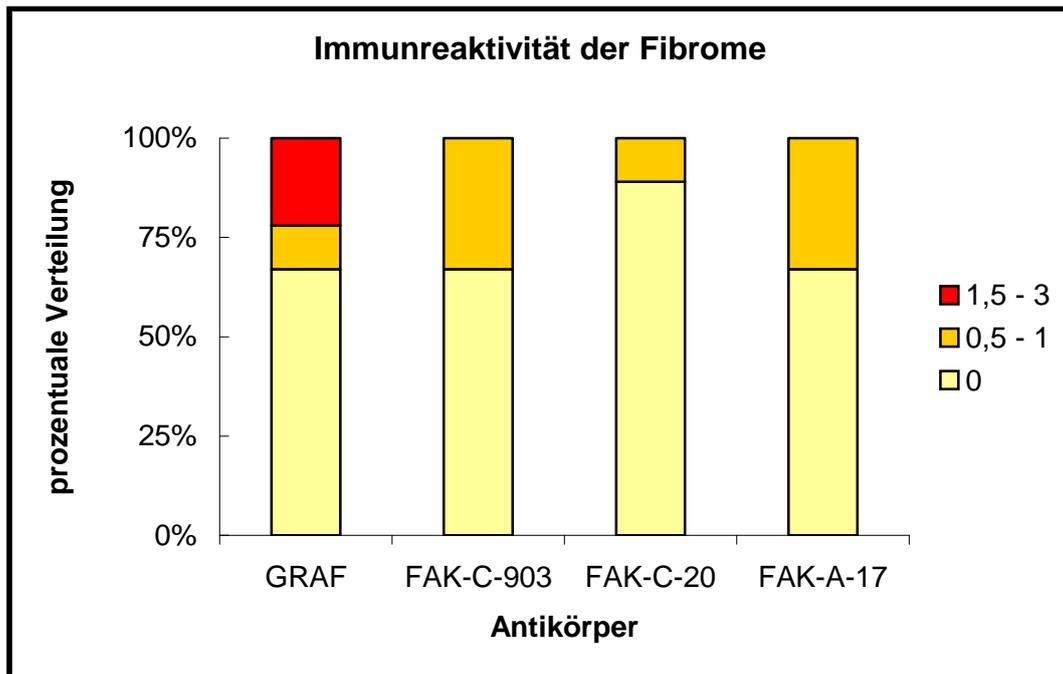


Diagramm 2 – Immunreaktivität der Fibrome (Paraffin)

4.2.1.3 Benigne fibröse Histozytome (Paraffin)

Im Gegensatz zu BFH-Gefrierewebe fand sich in den 16 Paraffinmaterialien kein Gewebe, das für GRAF positiv war. Die weiteren Untersuchungen mittels der verschiedenen Anti-FAK-Antikörper zeigten ein heterogen eher negatives Bild: kein Gewebe färbte sich stark positiv; die relative Häufigkeit der schwach positiven Färbung schwankte je nach Anti-FAK-Antikörpertyp zwischen 7 % und 54 %, was folgendes Diagramm veranschaulicht:

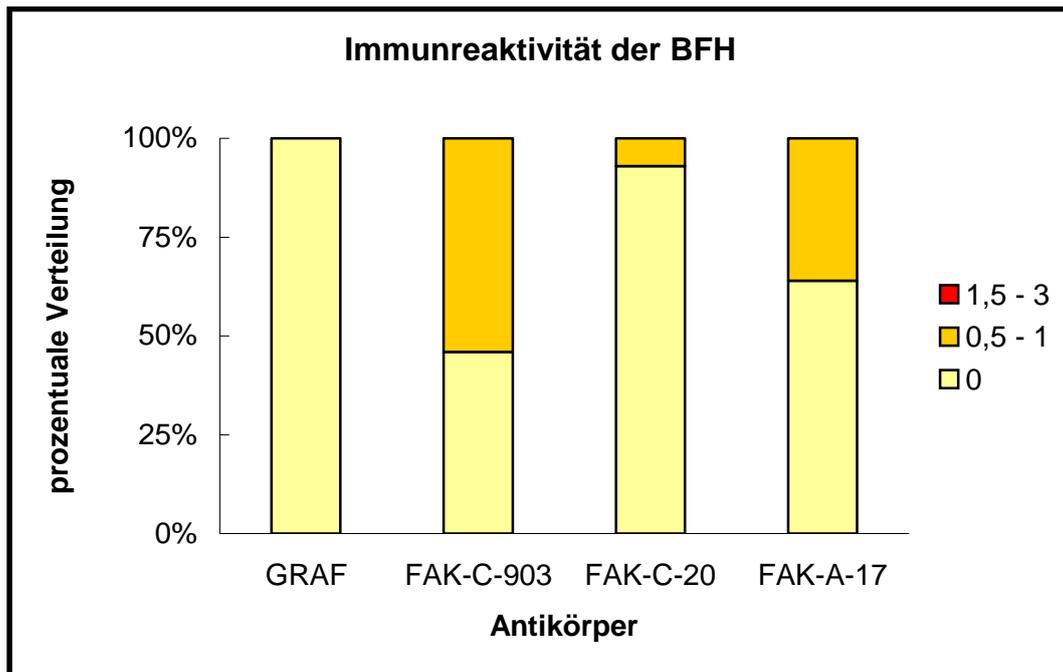


Diagramm 3 – Immunreaktivität der BFH (Paraffin)

4.2.1.4 Maligne fibröse Histiozytome (Paraffin)

Unter den 61 untersuchten Fällen von malignen fibrösen Histiozytomen fanden sich für das GRAF-Antigen und auch für die 3 FAK-Antigene zahlreiche stark positive Tumore: mit dem Anti-GRAF-Antikörper ließen sich insgesamt 88,5 % anfärben, davon konnten 36 % der Schnitte als stark positiv beurteilt werden. Aufgrund der starken Positivität dieser Ergebnisse wurde zusätzlich die Färbung aller Gewebe mit Präimmunserum durchgeführt, um mangelnde Spezifität der Anti-GRAF-Antikörper bei dieser Tumorentität auszuschließen. In der Tat zeigten 18 von 43 Schnitten auch nach Inkubation mit Präimmunserum eine leichte Färbung (0,5 Punkte: n = 14; 1 Punkt: n = 4; siehe Diagramm 4). Der entsprechende Punktwert wurde vom ursprünglichen GRAF-Wert subtrahiert, um dieser unspezifischen Färbung Rechnung zu tragen. In keinem Fall jedoch musste ein Gewebe bezüglich seiner Immunreaktivität von stark positiv zu schwach positiv oder von schwach positiv zu negativ herabgestuft werden.

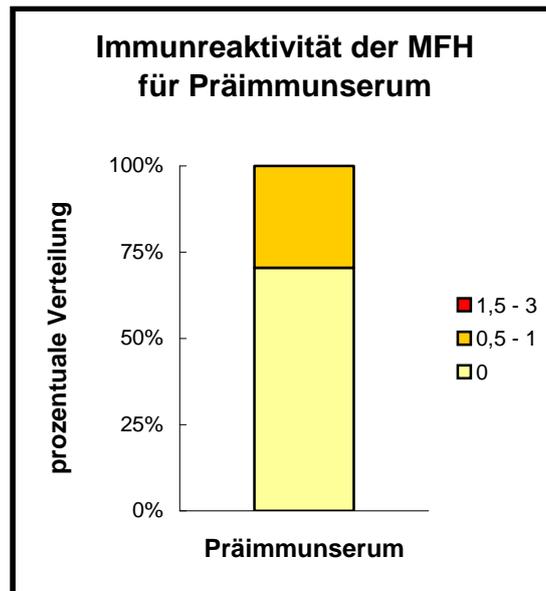


Diagramm 4 – Immunreaktivität der MFH für Präimmunserum

Auch die Anti-FAK-Antikörper waren bei den MFH-Tumoren häufig reaktiv. Sowohl bei FAK-C-903 wie auch bei FAK-A-17 waren mehr als die Hälfte der Fälle stark positiv. Zwar waren auch mit FAK-C-20 75 % sichtbar positiv; hier konnten aber nur 29 % aller gefärbten Schnitte mit 1,5 – 3 Punkten und somit als stark positiv beurteilt werden:

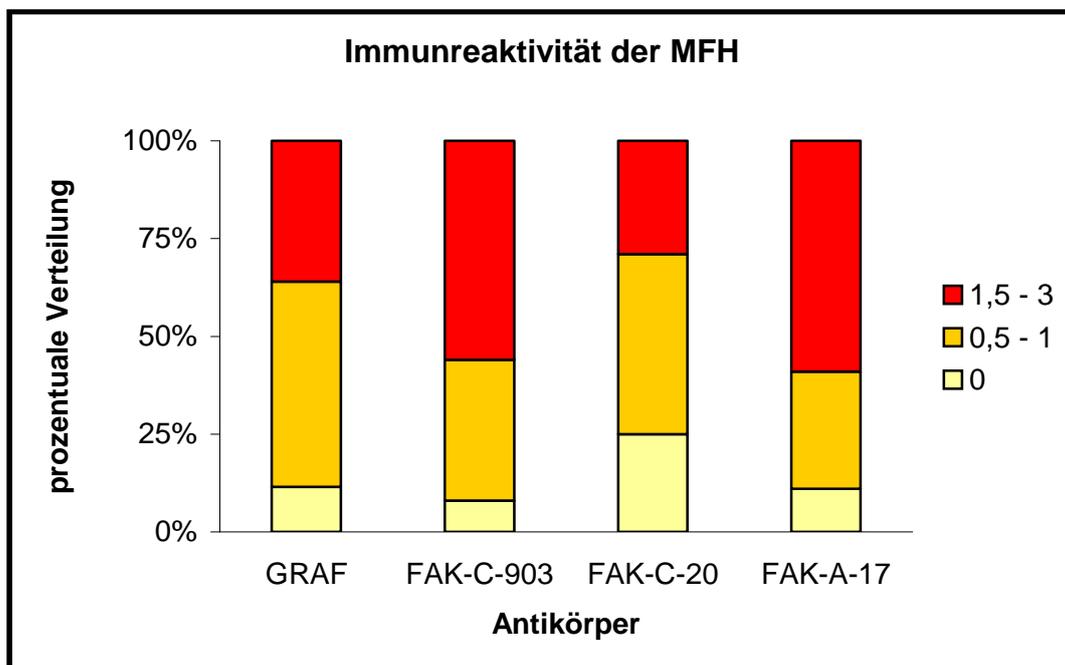


Diagramm 5 – Immunreaktivität der MFH (Paraffin)

Die Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 mittels des MIB-1-Antikörpers zeigte ein recht heterogenes Verhalten der Tumorgruppe. So variierten die gefundenen Wachstumsfraktionen zwischen 1 % und 56 %.

Die erhobenen Mitoseraten schwankten ebenfalls beträchtlich: es ließen sich 1 bis 27 Mitosen in 10 HPF finden.

Im Folgenden sind beispielhaft Mikrofotografien von HE- und immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparaten maligner fibröser Histiozytome abgebildet. Es sind jeweils die entsprechende Vergrößerung und die in der mikroskopischen Auswertung bestimmte Intensität der Immunreaktivität mitangegeben (nicht bei der HE-Färbung).

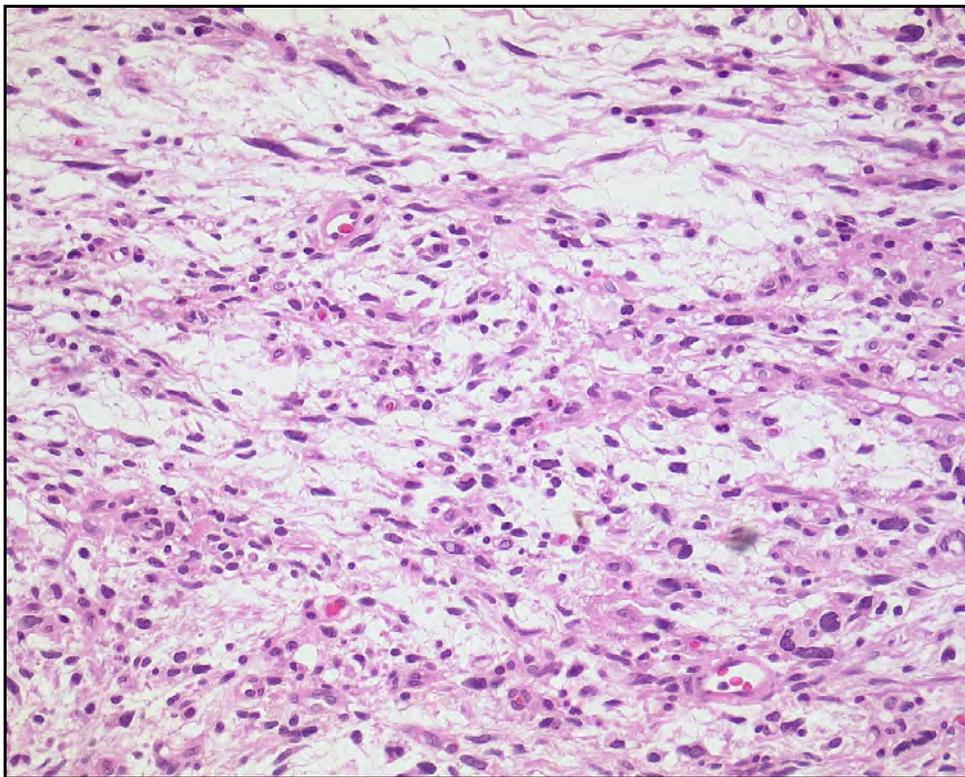


Abbildung 8 – MFH: HE-Färbung
(20x Objektiv)

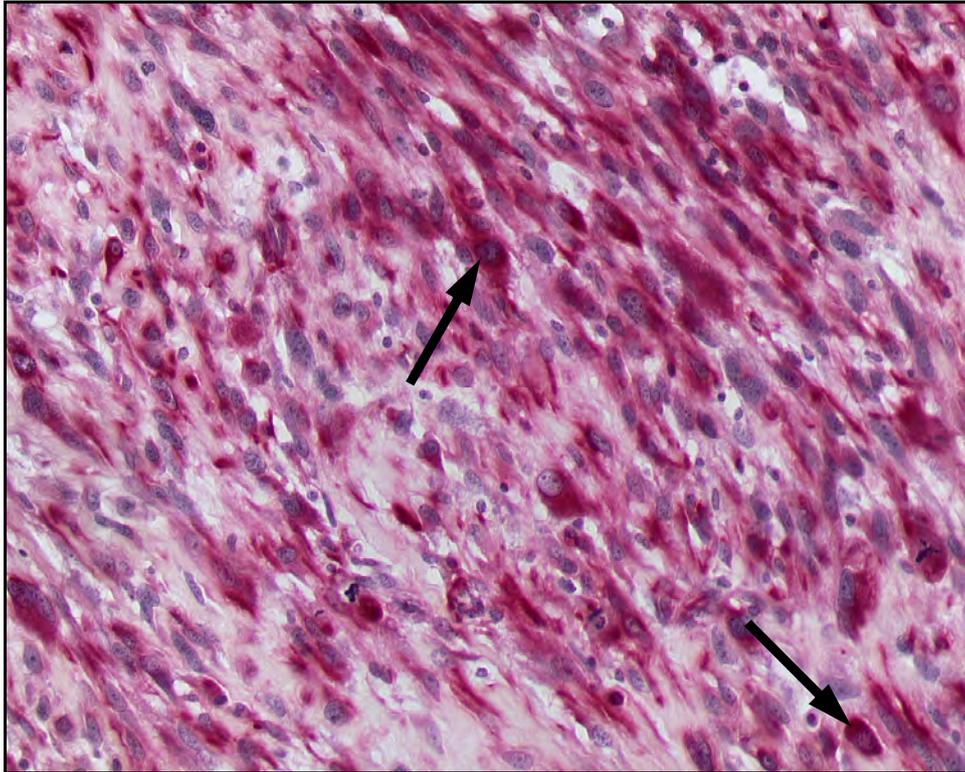


Abbildung 9 – MFH: Vimentin-Färbung
(20x Obj., starke Färbung, Pfeile markieren positive Zellen)

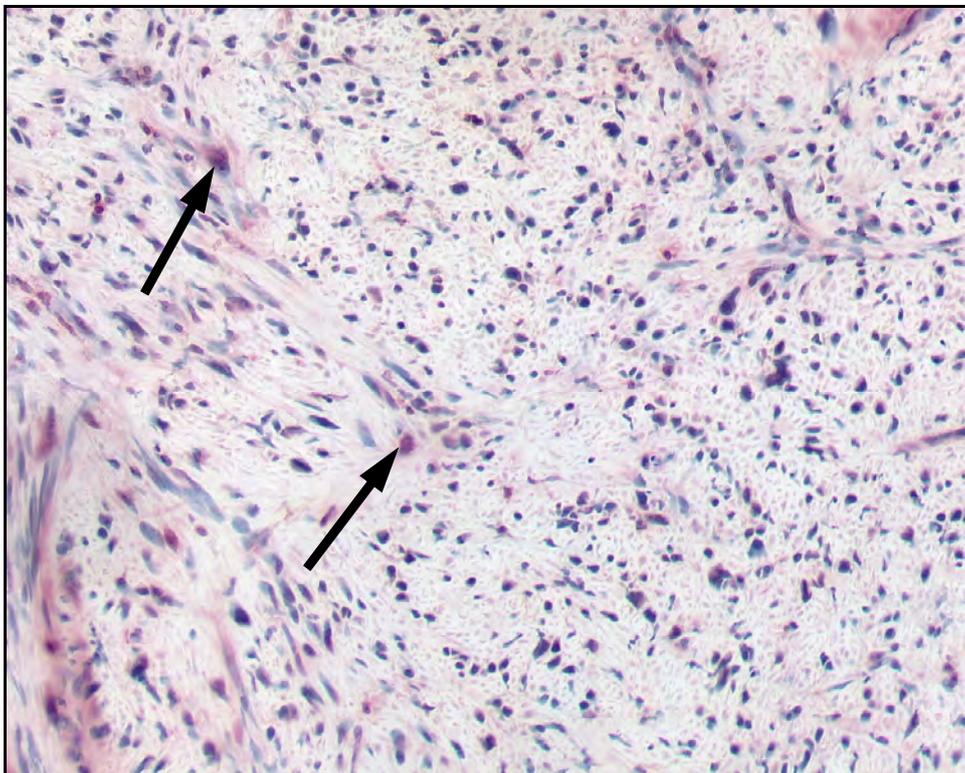


Abbildung 10 – MFH: GRAF-Färbung
(20x Obj., schwache Färbung, Pfeile markieren positive Zellen)

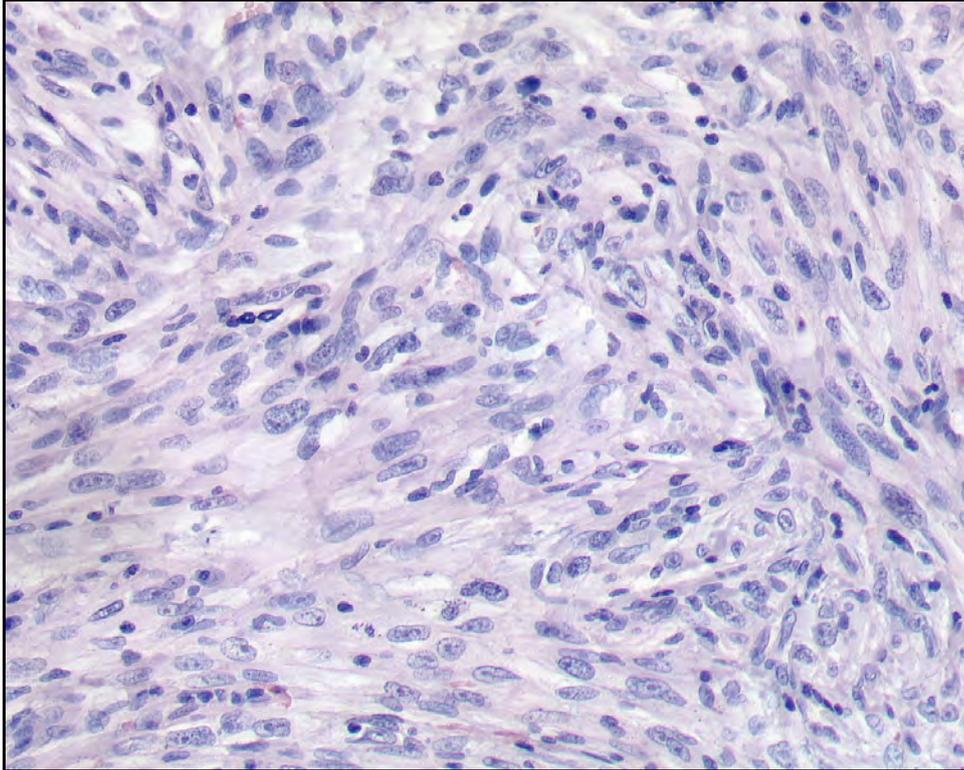


Abbildung 11 – MFH: FAK-C-903-Färbung
(20x Obj., keine Färbung vorhanden)

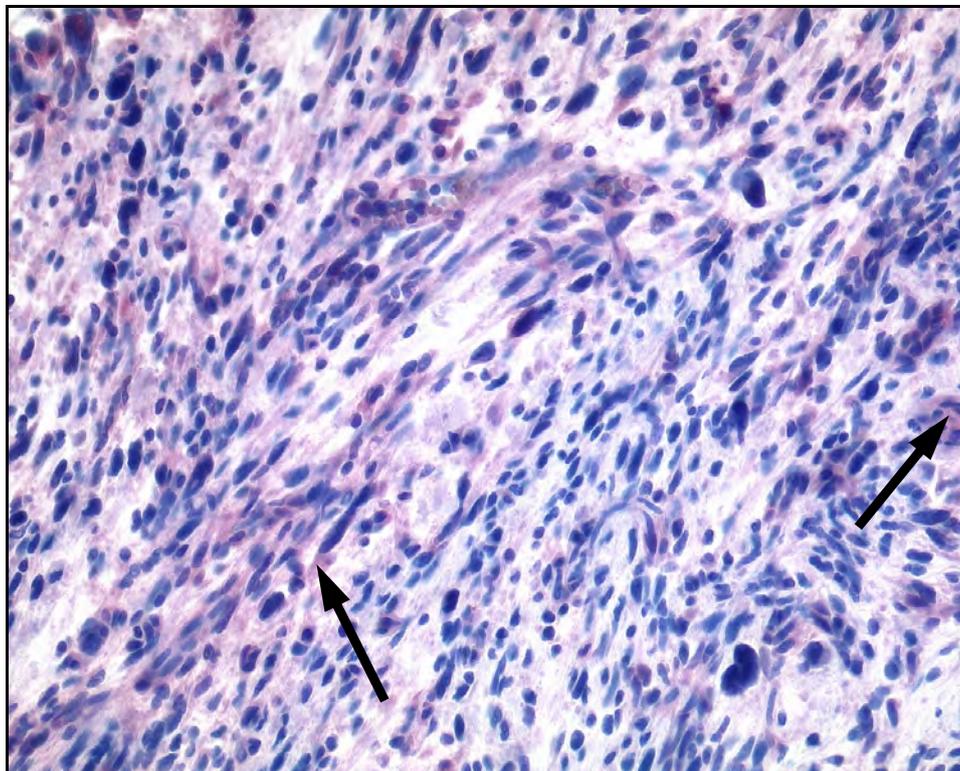


Abbildung 12 – MFH: FAK-C-20-Färbung
(20x Obj., Färbeindex 1,5 [vgl. Kap. 3.4.1], Pfeile markieren positive Zellen)

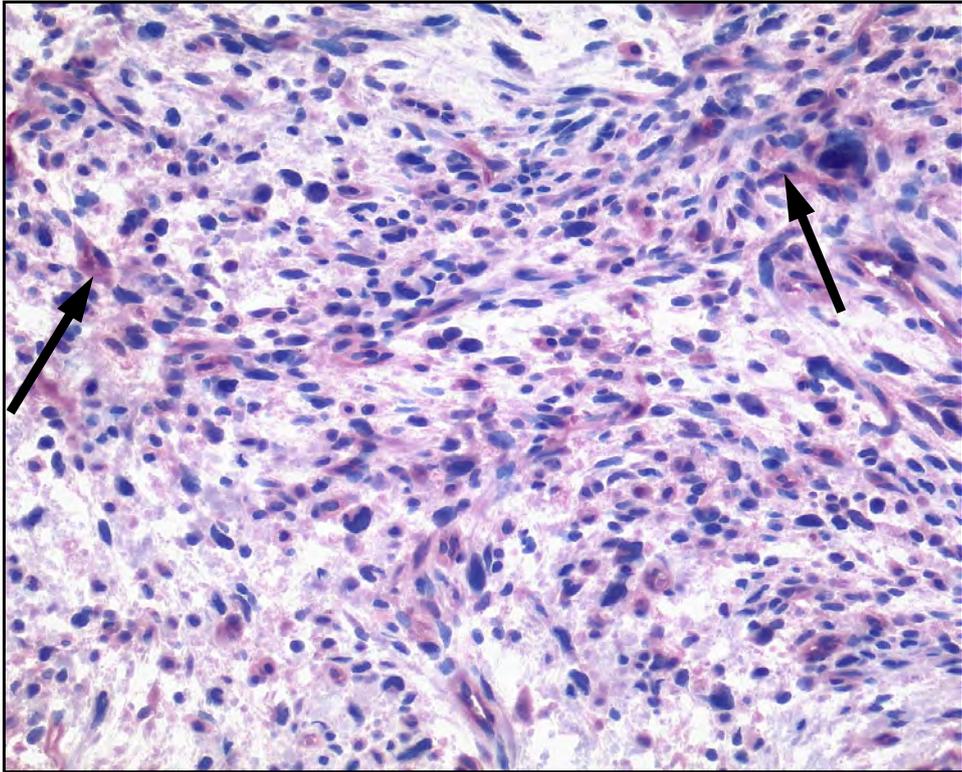


Abbildung 13 – MFH: FAK-A-17-Färbung
(20x Obj., Färbindex 2 [vgl. Kap. 3.4.1], Pfeile markieren positive Zellen)

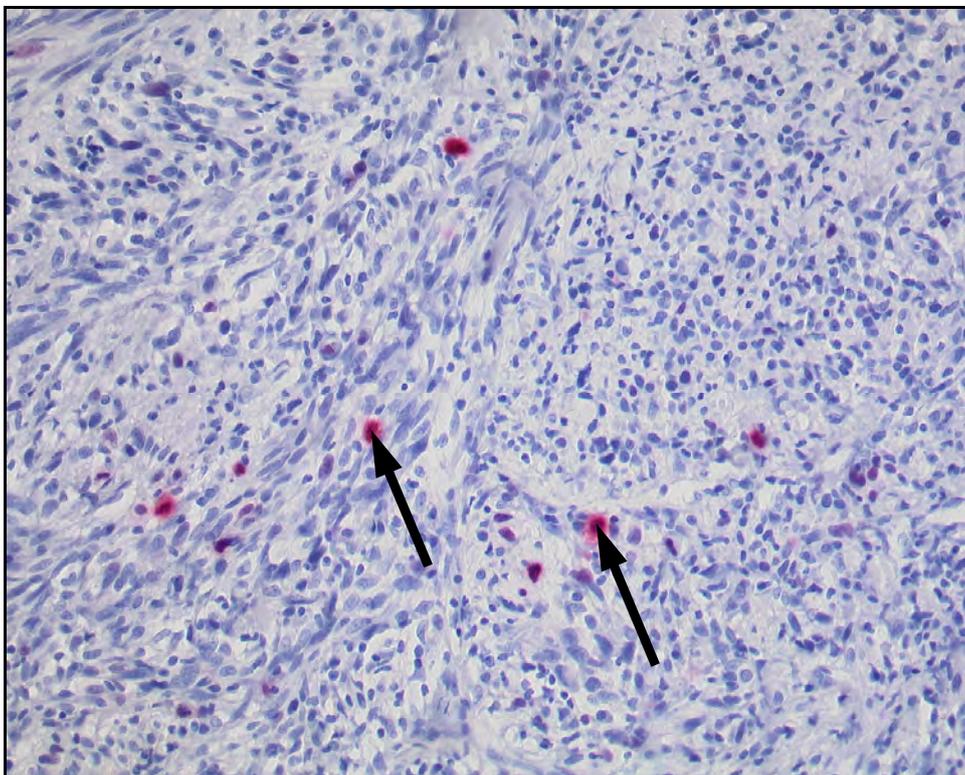


Abbildung 14 – MFH: MIB1-Färbung
(20x Objektiv; Pfeile markieren positive Zellen)

4.2.2 Tumore mit neurolemmaler Differenzierung

4.2.2.1 Voruntersuchung an Kryo-Material

Für das GRAF-Antigen waren zahlreiche Schwannome im Gefriermaterial stark positiv. So zeigten 7 der 9 Schwannom-Fälle eine starke Färbung; die übrigen 2 Fälle waren schwach positiv bzw. negativ.

Auch die verschiedenen FAK-Antigene ließen sich gut detektieren: 6 der 9 Fälle reagierten für FAK-C-903 positiv (2 Fälle stark positiv), für FAK-C-20 und FAK-A-17 jeweils 5 von 9 Fällen (je 1 stark positives Ergebnis).

Aufgrund dieser durchweg positiven Färbereigenschaften entschlossen wir uns, zellreiche Schwannome und maligne periphere Nervenscheidentumore in die Untersuchungen zu integrieren; diese wurden an paraffineingebettetem Gewebe untersucht.

4.2.2.2 Schwannome (Paraffin)

Auch im Paraffingewebe zeigten die Schwannome ein kräftiges Färbeverhalten: 5 der 8 untersuchten Schwannome zeigten ein stark positives Ergebnis, 2 waren schwach positiv und lediglich bei einem Schwannom ließ sich kein GRAF nachweisen. Somit besaßen insgesamt 87,5 % unserer Schwannome das entsprechende Antigen.

Die Immunreaktivität bezüglich der FAK-Antigene war hingegen geringer. Keines der Schwannome zeigte eine stark positive Reaktion; die Häufigkeit der schwach positiven Schnitte schwankte zwischen 12,5 % für FAK-C-20 und 62,5 % für FAK-C-903.

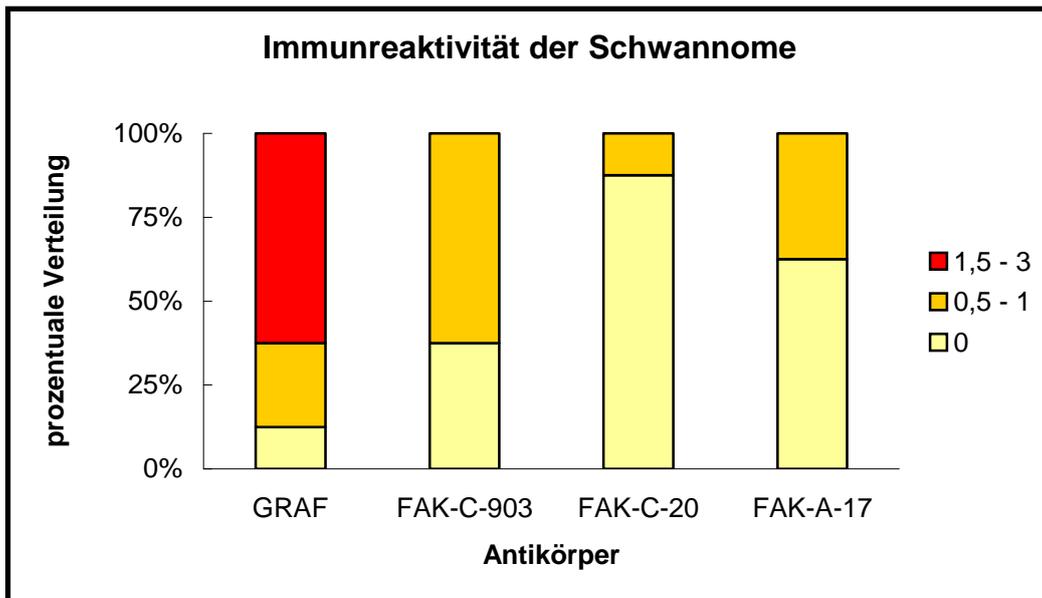


Diagramm 6 – Immunreaktivität der Schwannome (Paraffin)

4.2.2.3 Zellreiche Schwannome (Paraffin)

Im Gegensatz zu den Schwannomen zeigte keines der 10 zellreichen Schwannome ein stark positives Färbeverhalten mit dem Anti-GRAF-Antikörper. Trotzdem waren mit 60 % schwach positiven Fällen insgesamt mehr Fälle positiv als negativ.

Die FAK-Untersuchungen jedoch fielen deutlich zu Gunsten eines positiven Ergebnisses aus, wie das folgende Diagramm veranschaulicht:

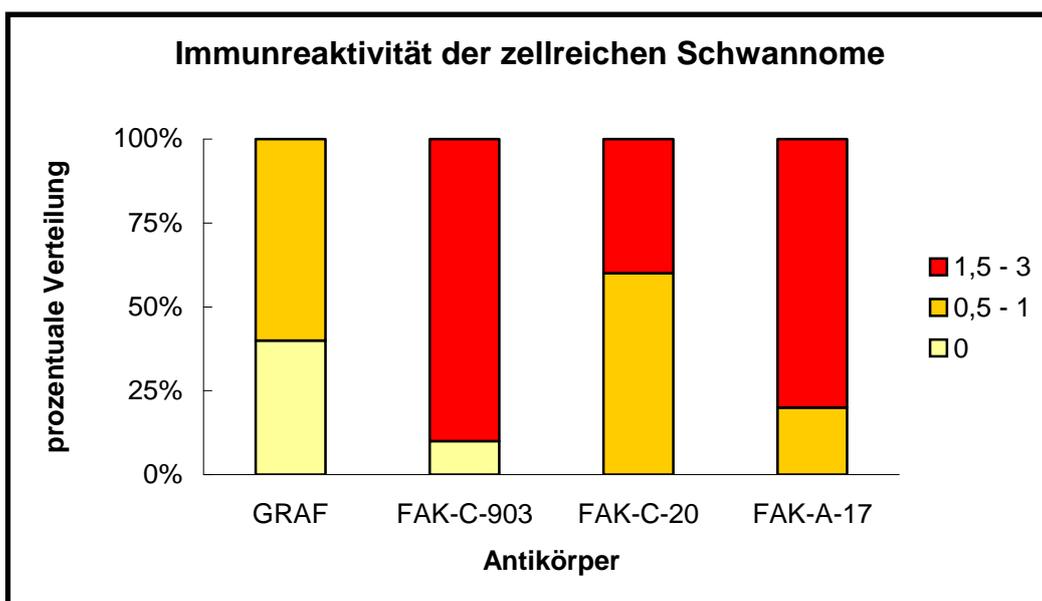


Diagramm 7 – Immunreaktivität der zellreichen Schwannome (Paraffin)

Insgesamt waren über 90 % der Anti-FAK-gefärbten Schnitte positiv. Von diesen waren für FAK-C-903 alle stark positiv; unter den FAK-A-17-Positiven waren 80 % stark positiv, bei FAK-C-20 traf dies für 40 % der positiven Proben zu.

4.2.2.4 Maligne periphere Nervenscheidentumore (Paraffin)

Auch diese neurolemmale Entität zeigte deutlich positive Resultate. So waren in allen immunhistologischen Färbungen mit Anti-GRAF- und den Anti-FAK-Antikörpern durchweg mehr als die Hälfte der 35 paraffineingebetteten Gewebe stark positiv für das jeweilige Antigen. Bei Färbung mit dem Anti-GRAF-Antikörper blieben lediglich 4 Fälle negativ, 13 waren schwach positiv und 18 stark positiv. Bei dieser bösartigen Tumorart haben wir wie auch schon bei den malignen fibrösen Histiocyten zur Kontrolle eine Färbung mit Präimmunserum durchgeführt. Auch hier banden ähnlich den MFH einzelne Gewebeschnitte den Farbstoff (6 von 35 Fälle); die Ergebnisse lagen zwischen 0 und 1 Punkt (0,5 Punkte: n=5; 1 Punkt: n=1; siehe Diagramm 8) und wurden in Relation zu dem GRAF-Färbeergebnis bewertet.

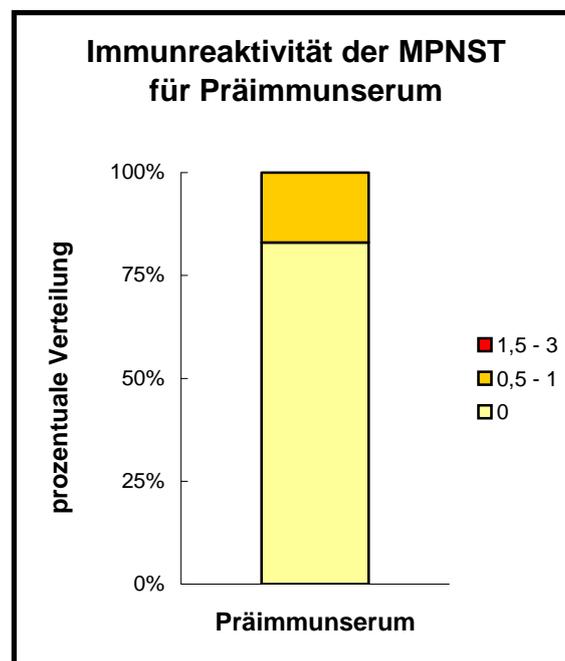


Diagramm 8 – Immunreaktivität der MPNST für Präimmunserum

Die Anzahl der stark positiven Schnitte für die FAK-Antigene variierte zwischen 18 von 35 Schnitten für FAK-C-20 und 23 von 35 Schnitten für FAK-C-903.

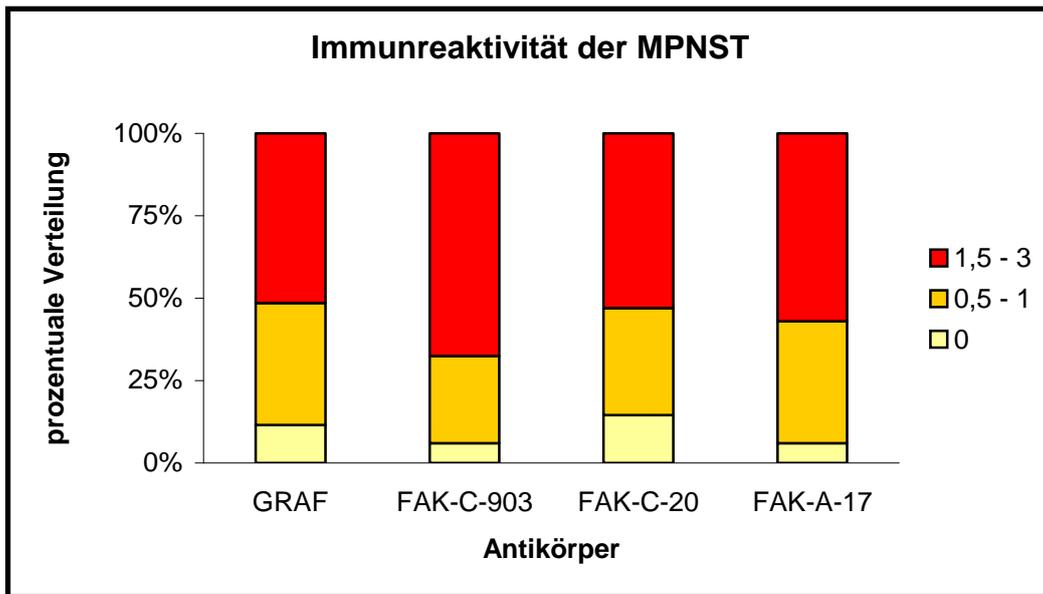


Diagramm 9 – Immunreaktivität der MPNST (Paraffin)

Bei den MPNST schwankten die Wachstumsfraktion zwischen 1 % und 70 %, die Mitoserate zwischen 3 und 79 Mitosen pro 10 HPF.

Auch für die Gruppe der MPNST sind Fotografien der Schnittpräparate zur Veranschaulichung abgebildet:

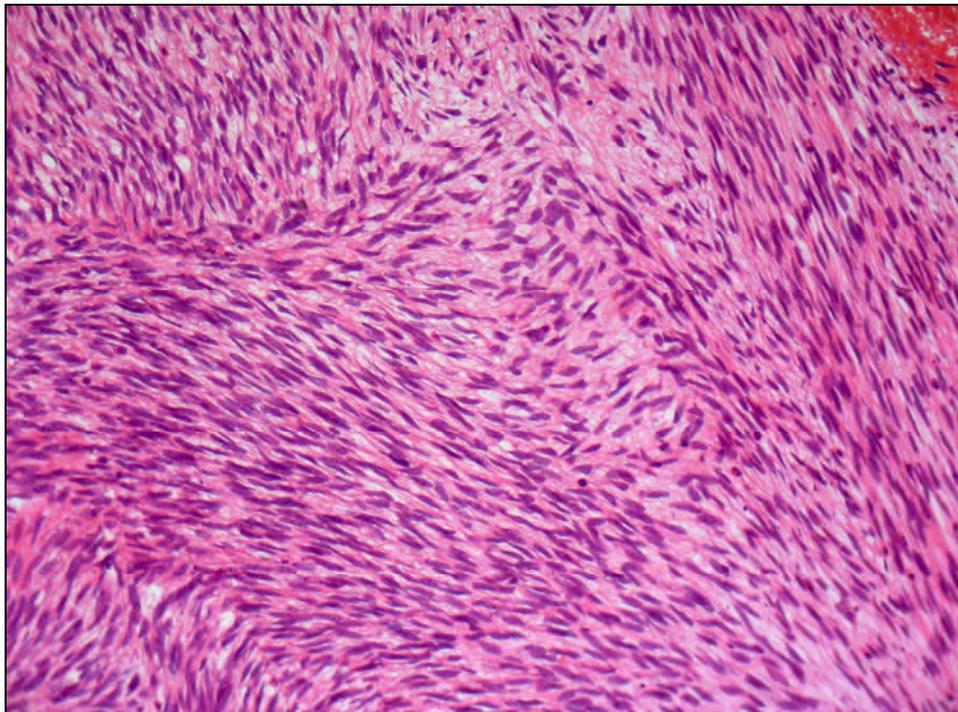


Abbildung 15 – MPNST: HE-Färbung
(20x Objektiv)

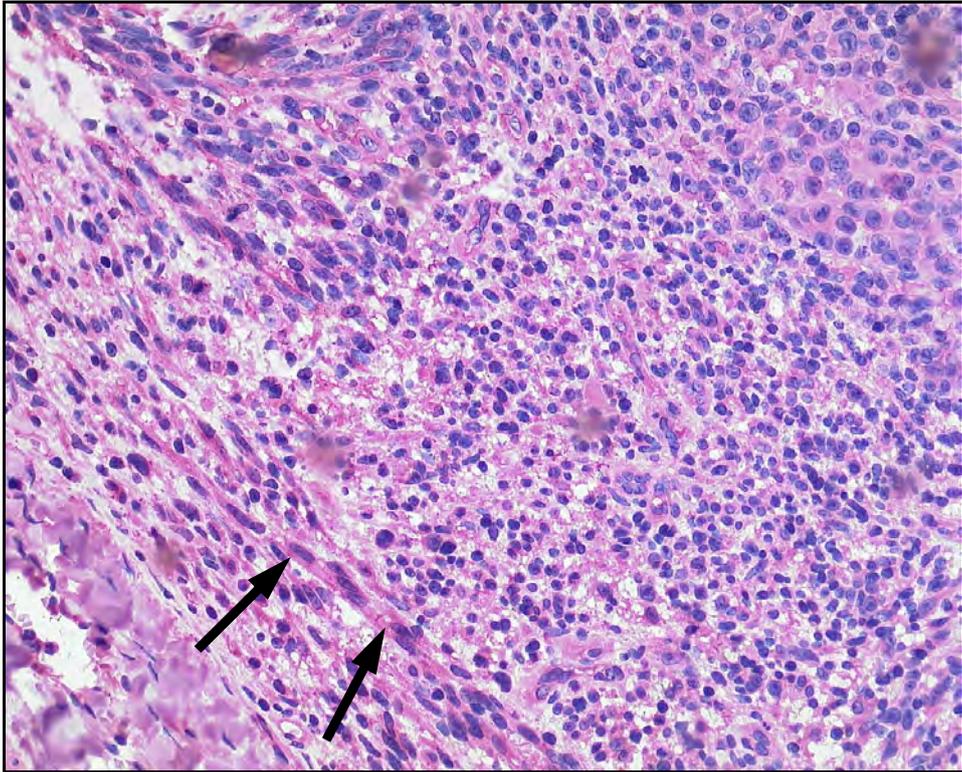


Abbildung 16 – MPNST: Vimentin-Färbung
(20x Obj., starke Färbung, Pfeile markieren positive Zellen)

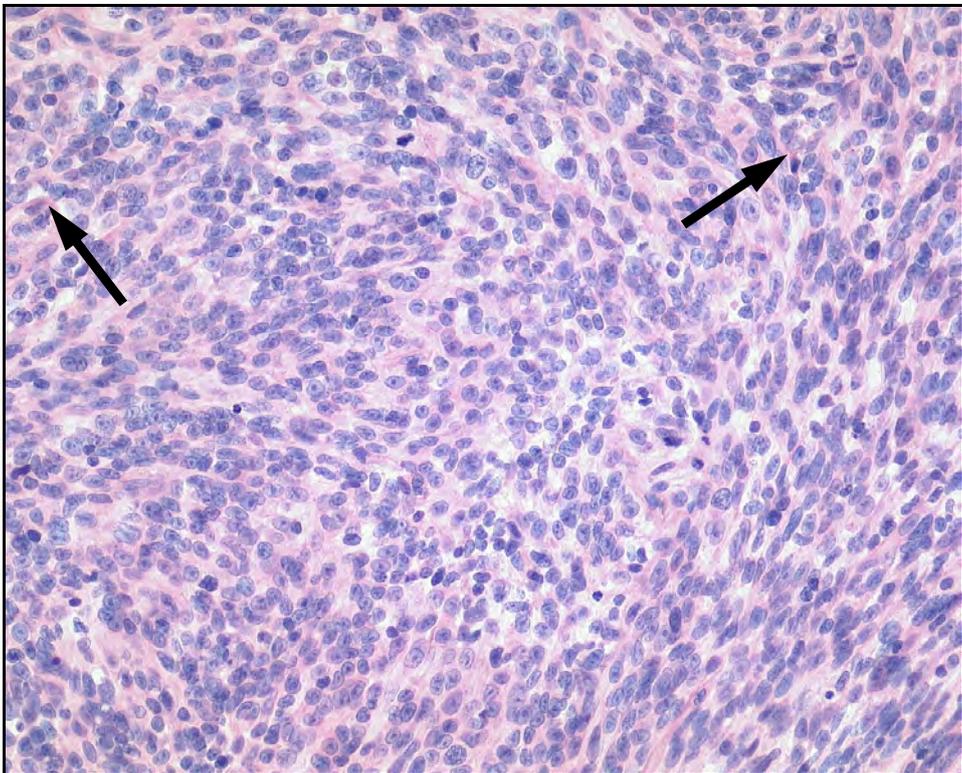


Abbildung 17 – MPNST: GRAF-Färbung
(20x Obj., Färbindex 1,5 [vgl. Kap. 3.4.1], Pfeile markieren positive Zellen)

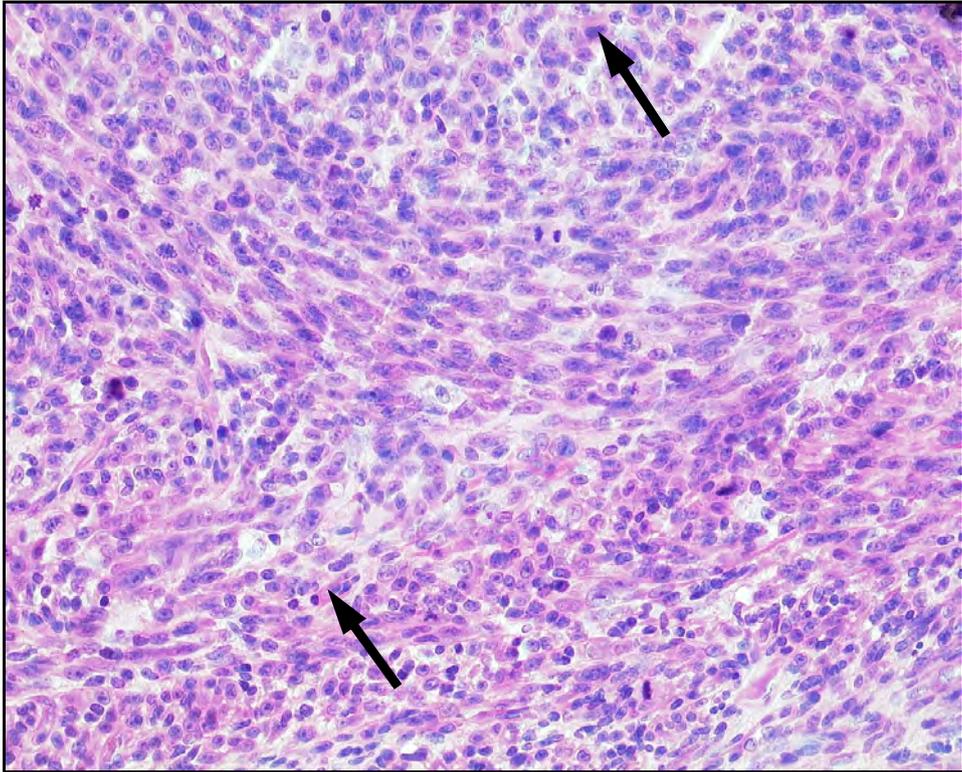


Abbildung 18 – MPNST: FAK-C-903-Färbung
(20x Obj., starke Färbung, Pfeile markieren positive Zellen)

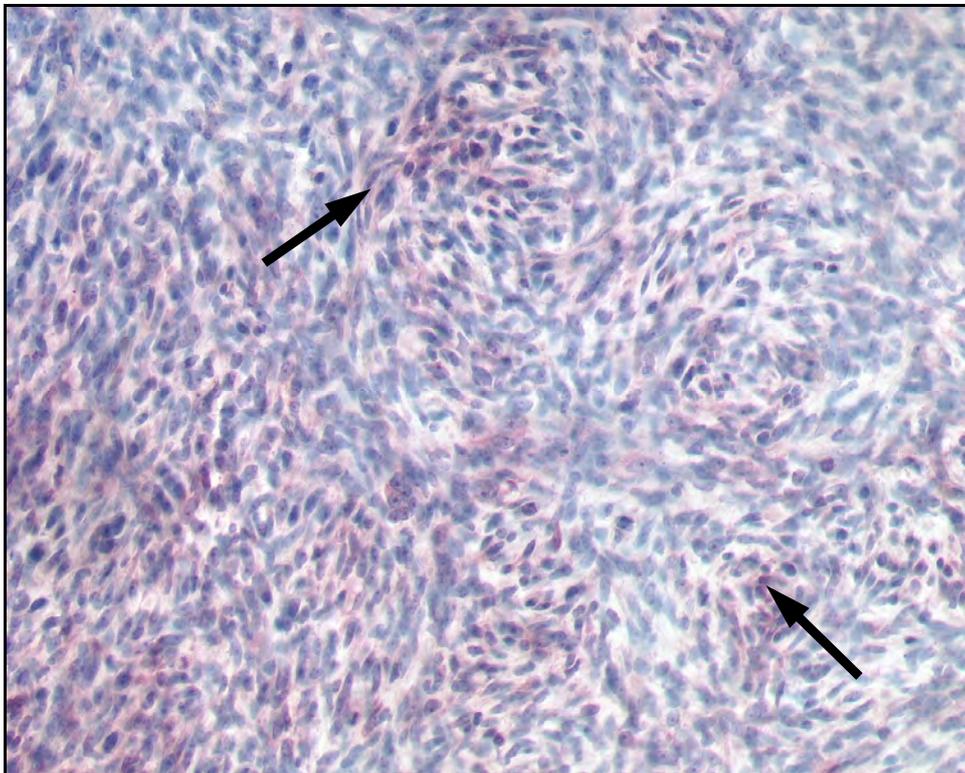


Abbildung 19 – MPNST: FAK-C-20-Färbung
(20x Obj., schwache Färbung, Pfeile markieren positive Zellen)

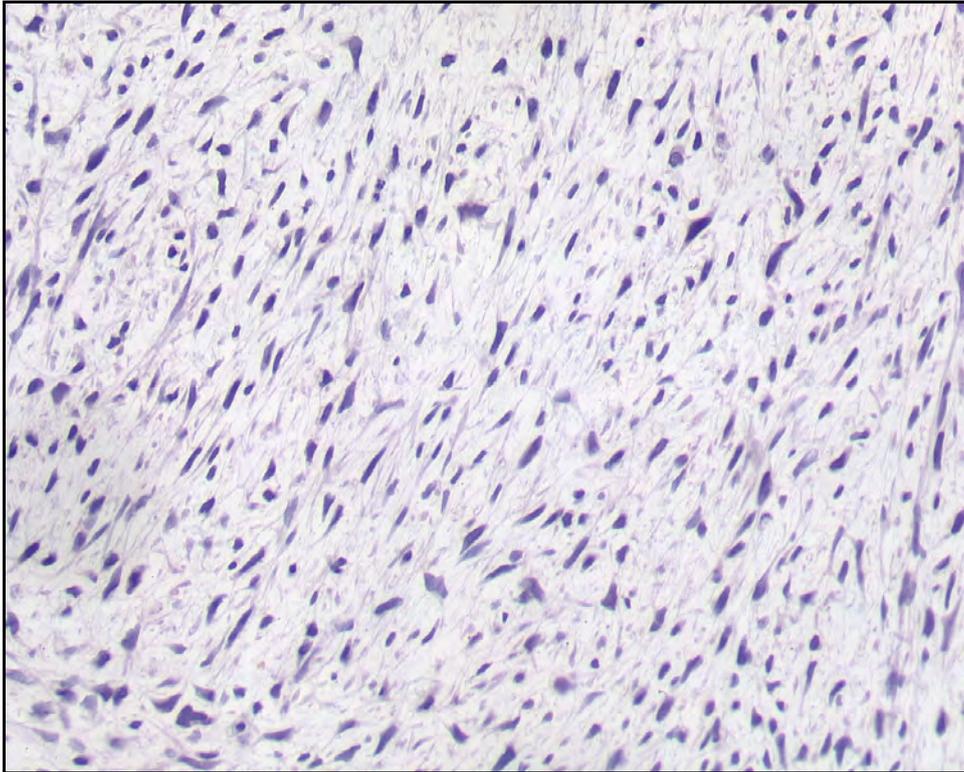


Abbildung 20 – MPNST: FAK-A-17-Färbung
(20x Obj., keine Färbung vorhanden)

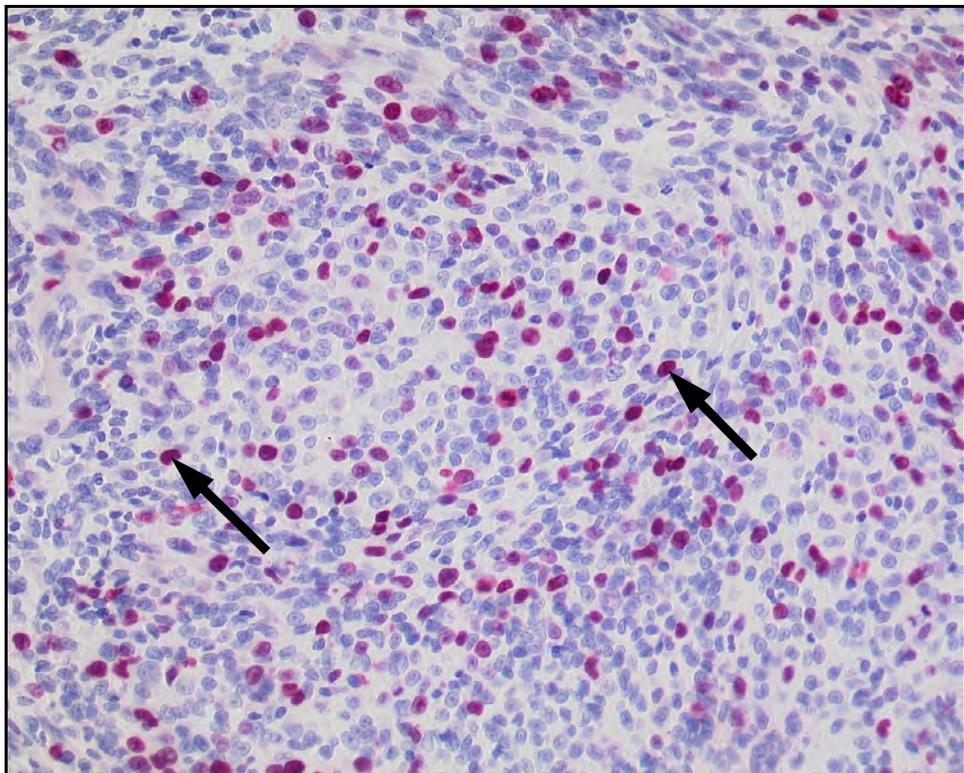


Abbildung 21 – MPNST: MIB-1-Färbung
(20x Objektiv, Pfeile markieren positive Zellen)

4.2.3 Tumore mit glattmuskulärer Differenzierung

4.2.3.1 Voruntersuchung an Kryo-Material

Sowohl unsere 10 Leiomyome wie auch die 12 Leiomyosarkome zeigten nur spärliche Färbintensitäten. 7 der Leiomyome waren GRAF-negativ, die übrigen 3 Gewebe wurden mit zweimal 0,5 Punkten und einmal 1 Punkt als schwach positiv eingestuft. Aufgrund dieser tendenziell negativen Ergebnisse wurde auf FAK-Färbungen an Kryo-Material gänzlich verzichtet.

Die Leiomyosarkome reagierten noch weniger: 11 von ihnen waren für GRAF negativ; der einzig positive Schnitt war etwas heterogen angefärbt und wurde mit Punktwerten von 0,5 und 1 als schwach positiv beurteilt. Da die LMS also fast komplett GRAF-negativ waren, sahen wir hier von FAK-Färbungen und Untersuchungen an Paraffinmaterial ab.

4.2.3.2 Leiomyome (Paraffin)

Die GRAF-negative Tendenz der Gefrierschnitte bestätigte sich in den insgesamt 9 Paraffin-Geweben, denn 100 % der Schnitte waren sowohl für GRAF wie auch für FAK-C-20 negativ; für FAK-C-903 und FAK-A-17 ließ sich jeweils 1 schwach positiver Schnitt finden, sodass hier je 89 % negativ waren.

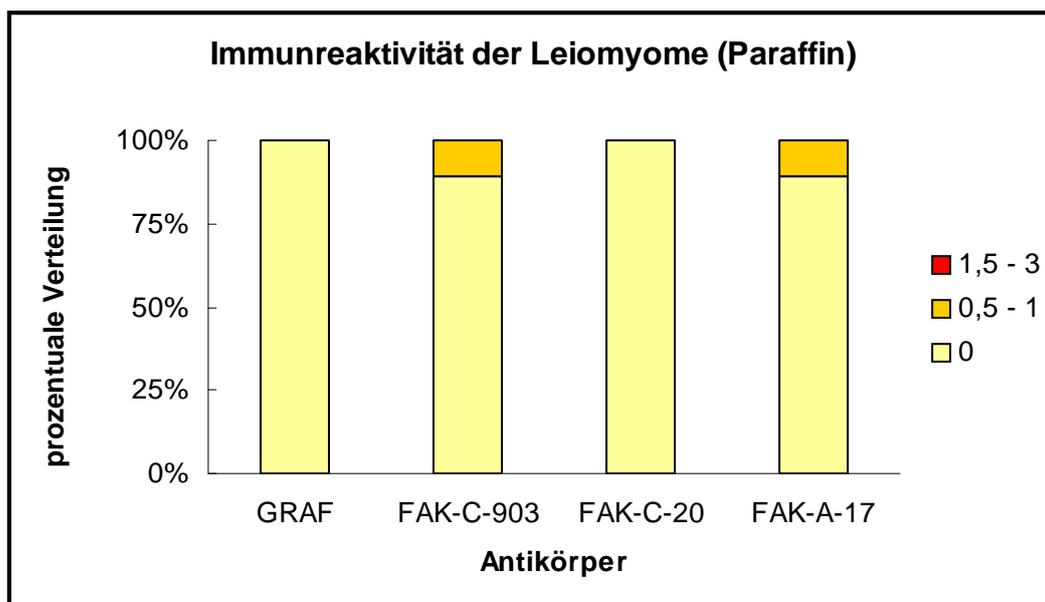


Diagramm 10 – Immunreaktivität der Leiomyome (Paraffin)

4.2.4 Tumore mit adipozytärer Differenzierung

4.2.4.1 Voruntersuchung an Kryo-Material

Hier bereiteten die Lipome Probleme: nicht nur das Anfertigen der Schnitte von kryo-asserviertem Lipomgewebe erwies sich als technisch schwierig. Auch die Adhäsivität der primär gelungenen Schnitte während der immunhistochemischen Prozedur war eingeschränkt, sodass wir daher keine Auswertungen an Kryo-Lipomen vornehmen konnten und uns hier nur auf Paraffinschnitte beziehen konnten.

Die 11 Liposarkome hingegen waren problemlos handhabbar. Da sie aber zu 91 % negative Resultate nach GRAF-Färbung zeigten, verzichteten wir wie bei den Leiomyosarkomen auf FAK- und Paraffin-Untersuchungen.

4.2.4.2 Lipome (Paraffin)

In keinen der durchgeführten Färbungen an den 8 Lipomen konnte ein stark positives Ergebnis (1,5 - 3) erreicht werden. Relativ am meisten schwach positive Fälle (0,5 -1) gab es mit 37,5 % bei Anwendung des Anti-GRAF-Antikörpers. Mit den Anti-FAK-Antikörpern ließen sich maximal 29 % der Schnitte anfärben.

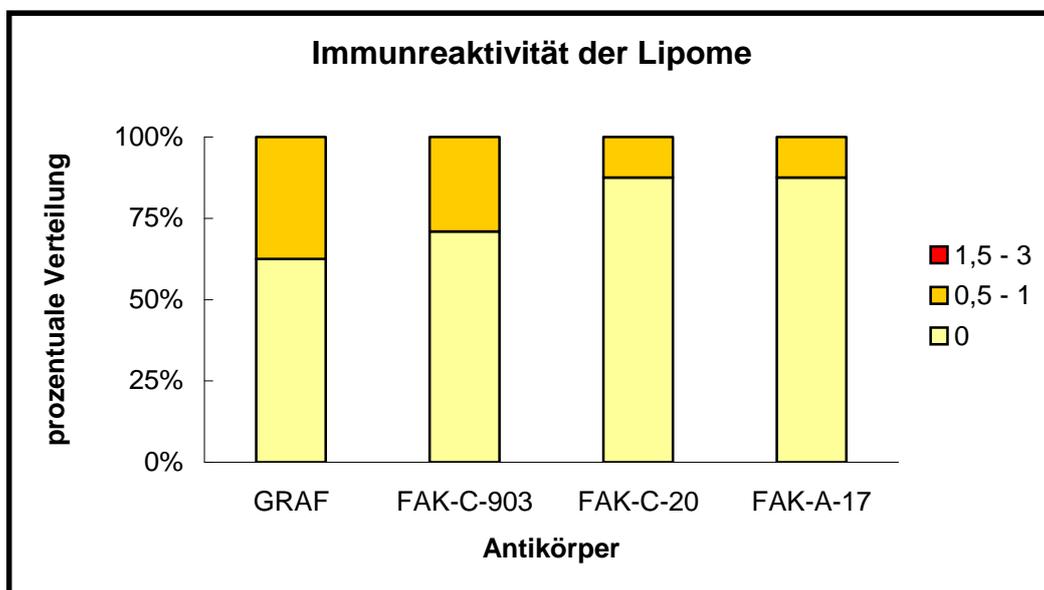


Diagramm 11 – Immunreaktivität der Lipome (Paraffin)

4.2.5 Weiteres Vorgehen

Aufgrund der homogenen Färbeergebnisse für MFH und MPNST bezüglich der Antikörper gegen GRAF und der drei FAK-Varianten wurden diese Tumorarten in größeren Fallzahlen weiteruntersucht, um sie einer statistischen Analyse zukommen zu lassen.

4.3 Analyse der Daten für MFH

4.3.1 Immunreaktivität

Bevor die Daten einer intensiveren statistischen Analyse unterzogen wurden, wurde die Verteilungsart der Daten in Augenschein genommen. Es stellte sich heraus, dass die Daten der Färbeergebnisse nicht normalverteilt sind. Beispielhaft ist die Häufigkeitsverteilung der Färbeergebnisse mit dem Antikörper gegen FAK-C-20 dargestellt:

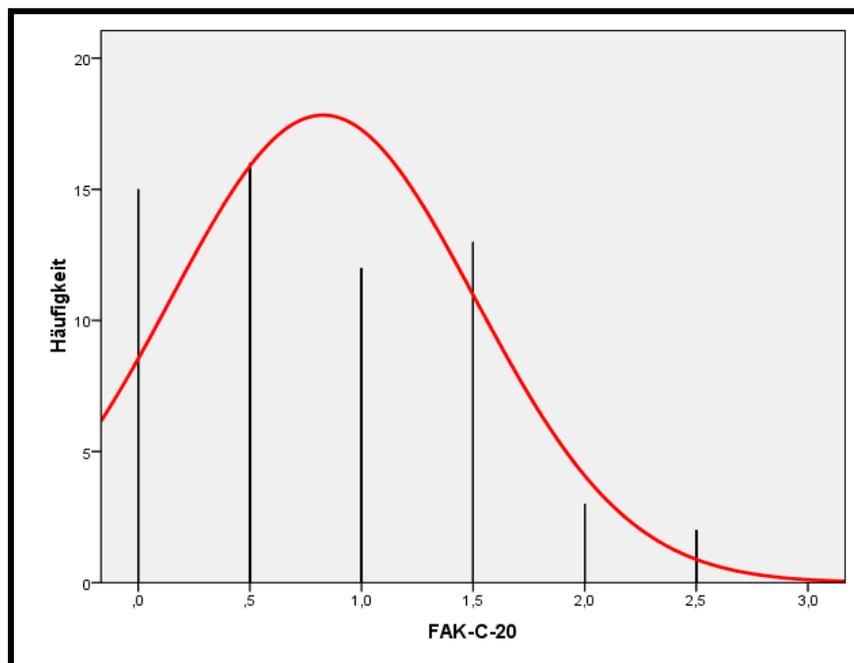


Diagramm 12 – Häufigkeitsverteilung

Häufigkeitsverteilung der Färbeergebnisse bei Verwendung des Anti-FAK-C-20-Antikörpers als Beispiel für fehlende Normalverteilung

Weitergehende Untersuchungen der nicht-parametrischen Einzeldaten wären an dieser Stelle nicht zielführend.

Es wurden deshalb im Weiteren die Färbeergebnisse der einzelnen Antikörper (Anti-ED98015, Anti-FAK-C-903, Anti-FAK-C-20, Anti-FAK-A17) untereinander verglichen, um etwaige Unterschiede bezüglich der Nachweisempfindlichkeit aufzudecken. Hierfür bedienten wir uns der Parameter R^2 sowie der Steigung m der Regressionsgeraden aus der linearen Regression:

GRAF	vs.	FAK-C-903	$R^2 = 0,146$
GRAF	vs.	FAK-A-17	$R^2 = 0,034$
GRAF	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,264$
FAK-C-903	vs.	FAK-A-17	$R^2 = 0,410$
FAK-C-903	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,272$
FAK-A-17	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,275.$

Hierbei würde ein theoretischer R^2 -Wert von 1,0 ausdrücken, dass die Werte genau auf der Regressionsgeraden zu liegen kämen.

Betrachtet man nun zusätzlich noch die Steigung m ($m = \Delta y / \Delta x$) der Regressionsgeraden, so lassen sich unter der Prämisse zufriedenstellender R^2 -Werte Rückschlüsse über Ähnlichkeiten des Färbeverhaltens der einzelnen Antikörper ziehen. So würde eine Steigung von $m = 1$ bei $R^2 = 1$ bedeuten, dass die Werte exakt identisch wären. Eine „flache“ Steigung ($m < 1$) käme dementsprechend dadurch zustande, dass Werte der x-Achse empfindlicher auf Änderungen der y-Werte reagieren. Mit Hilfe der Steigungswerte m ließen sich also diejenigen Antikörper auswählen, die sensibler reagieren als andere und folglich zu exakteren Ergebnissen führen.

4.3.2 Mitoserate und Wachstumsfraktion

Bei den untersuchten malignen fibrösen Histiocyten fanden sich Mitoseraten zwischen 1 und 27 Mitosen je 10 HPF (Median: 8). Die Klassierung erfolgte in Anlehnung an Coindre et al. 1986 in die Gruppen 0 - 9, 10 - 19 und > 20 Mitosen je 10 HPF.

Die Größe der Wachstumsfraktion (Ki67 positiv) variierte zwischen 1 % und 56 % (Median: 8 %). Üblicherweise wird hier eine Klassierung in zwei Gruppen vorgenommen, wobei als Grenzwert ≥ 40 % dient.

Eine Korrelation dieser beiden Proliferationsmarker erbrachte ein knapp unzureichendes Signifikantsniveau unter Verwendung der absoluten Zahlen ($p = 0,057$); erfolgte diese Korrelation mit den entsprechend klassierten Daten, ergab sich ein Signifikantsniveau von $p = 0,002$, was auf einen statistischen Zusammenhang hindeutet. Dieser zeigte im entsprechenden Punktediagramm einen proportionalen Trend.

4.3.3 Event-free survival und Überlebenszeit

Bei der Auswertung der Patientenakten von MFH-Erkrankten konnten Daten für das Ereignis-freie Überleben EFS zwischen einem und 234 Monaten ermittelt werden. Dabei lag der Median bei 15 Monaten.

Bezüglich der Gesamt-Überlebenszeit ÜLZ fand sich ein Minimum von einem Monaten und ein Maximum von 247 Monaten bei einem Median von 41 Monaten.

4.3.4 Immunreaktivität versus Proliferationsmarker

Im Nachfolgenden wurde geprüft, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Färbeergebnissen mit den Antikörpern Anti-GRAF, Anti-FAK-C-903, Anti-FAK-A-17 und Anti-FAK-C-20 und den Daten für Mitoserate bzw. Wachstumsfraktion vorliegt.

	Korrelation mit:	
	Mitoserate	Wachstumsfraktion
GRAF	$p = 0,028$	$p = 0,770$
FAK-C-903	$p = 0,101$	$p = 0,450$
FAK-A-17	$p = 0,809$	$p = 0,105$
FAK-C-20	$p = 0,108$	$p = 0,719$

Tabelle 4 – Signifikantsniveau MFH I

Signifikantsniveau der Korrelation von Färbeergebnis je Antikörper mit Proliferationsmarkern bei MFH

Einzig die Korrelation der Färbeergebnisse unter Verwendung des Anti-GRAF-Antikörpers mit den Daten zur Mitoserate erbrachte ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Aus den weiteren gewonnenen p-Werten als Maß für die Signifikanz geht

hervor, dass für die Daten der anderen Korrelationspaarungen, die Tabelle 4 zu entnehmen sind, zumindest kein *signifikanter* Zusammenhang vorzuliegen scheint.

In der Annahme, dass der Mangel an Signifikanz durch den geringen Datenumfang mindestens mitbegründet ist, erfolgte trotz der in Tabelle 4 dargestellten, eigentlich unzureichenden Signifikanzniveaus die Überprüfung der Korrelationspaarungen bezüglich des Vorliegens einer Proportionalität bzw. Antiproportionalität. Auch mit dieser Methode ließ sich jedoch kein weiterer Zusammenhang außer die Proportionalität zwischen GRAF-Immunreaktivität und der Mitoserate finden (siehe hierzu Tabelle 8 in Kapitel 8.3).

4.3.5 Histologische Kriterien versus Überlebensdaten

Vergleichbar mit Kapitel 4.3.4 wurden Zusammenhänge zwischen den histologischen Kriterien der Tumore, nämlich der Immunreaktivität der einzelnen Antikörper (Anti-GRAF, Anti-FAK-C-903, Anti-FAK-A-17 und Anti-FAK-C-20) sowie der Proliferationsmarker (Apoptose, Wachstumsfraktion) und den Patientendaten für die Dauer des ereignisfreien Überlebens (EFS) bzw. des gesamten Überlebens (ÜLZ) untersucht.

In dieser Untersuchung (siehe Tabelle 5) erbrachte lediglich die Korrelation für das GRAF-Färbeergebnis ein ausreichendes Signifikanzniveau, hier in Abhängigkeit vom ereignisfreien Überleben.

	Korrelation mit:	
	EFS	ÜLZ
GRAF	p = 0,029	p = 0,140
FAK-C-903	p = 0,246	p = 0,324
FAK-A-17	p = 0,257	p = 0,291
FAK-C-20	p = 0,266	p = 0,058
Mitoserate, absolut	p = 0,449	p = 0,263
Wachstumsfraktion, abs.	p = 0,940	p = 0,950

Tabelle 5 – Signifikanzniveau MFH II

Signifikanzniveau der Korrelation von Färbeergebnis je Antikörper bzw. Proliferationsmarkern mit Event-free-survival bzw. Überlebenszeit bei MFH

Bemerkenswert ist in diesem Fall, dass die Regressionsgerade der Korrelation GRAF vs. EFS eine negative Steigung aufweist und somit ein antiproportionaler Zusammenhang vorliegt, wie in Diagramm 13 gut zu erkennen ist.

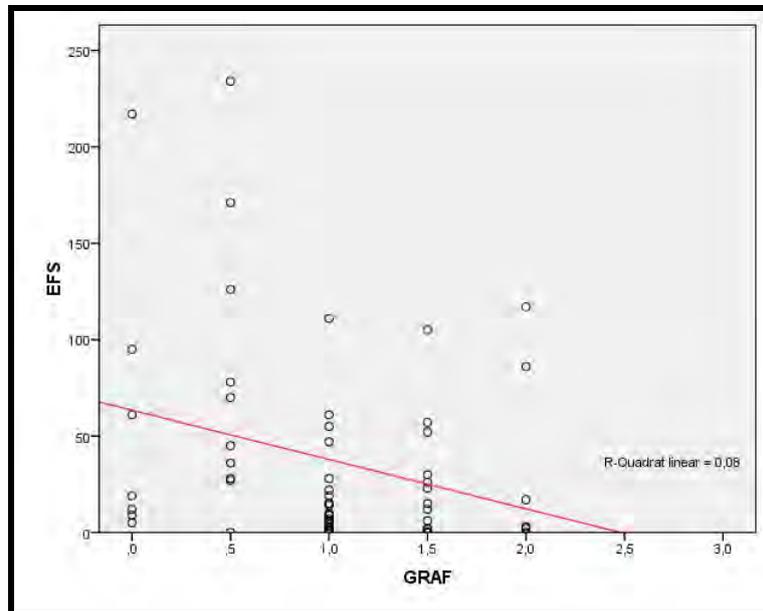


Diagramm 13 – Korrelation Färbeergebnis von GRAF vs. EFS (Monate) für MFH

Auch die in Tabelle 5 aufgeführten, vermeintlich nicht signifikanten Korrelationen wurden hinsichtlich der Anti-/ Proportionalität weiter begutachtet. Dabei fielen antiproportionale Zusammenhänge exponentieller Art zwischen den Proliferationsindikatoren Mitoserate und Wachstumsfraktion und den Überlebenszeiten EFS und ÜLZ auf (siehe Tabelle 9 auf Seite 72).

4.4 Analyse der Daten für MPNST

4.4.1 Immunreaktivität

Wie schon in Kapitel 4.3 beschrieben, handelt es sich auch bei den Färbeintensitäten der malignen peripheren Nervenscheidentumore um Datensätze, die keiner Normalverteilung unterliegen.

Analog zu den MFH-Daten wurden auch hier die Färbeergebnisse der Antikörper untereinander verglichen. Im Unterschied zu den R^2 -Werten bei den MFH-Fällen nähern sich bei den MPNST-Fällen die Werte $R^2 = 1$:

GRAF	vs.	FAK-C-903	$R^2 = 0,379$
GRAF	vs.	FAK-A-17	$R^2 = 0,272$
GRAF	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,412$
FAK-C-903	vs.	FAK-A-17	$R^2 = 0,602$
FAK-C-903	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,453$
FAK-A-17	vs.	FAK-C-20	$R^2 = 0,034.$

Auch bei Betrachtung der Regressionsgeradensteigung m der oben genannten Korrelationen kommen die MPNST-Datensätze zu deutlicheren Ergebnissen als die MFH-Fälle.

4.4.2 Mitoserate und Wachstumsfraktion

Es fanden sich Mitoseraten zwischen 2 und 79 pro 10 HPF mit einem Median von 9 Mitosen pro 10 HPF. Bezüglich der Wachstumsfraktion ergaben sich Werte von 1 % bis 70 % (Median: 8,5 %).

Die entsprechenden Korrelationsanalysen ergaben ein Signifikantsniveau von $p = 0,02$ für die absoluten Werte und $p = 0,008$ für die klassierten Daten (vgl. Kapitel 4.3.2). Hierbei ist im Punktdiagramm ein eindeutiger proportionaler Zusammenhang erkennbar, die Güte der Ausgleichsgeraden ist mit einem R^2 von 0,19 zufriedenstellend.

4.4.3 Event-free survival und Überlebenszeit

Auch bei den MPNST-Erkrankten wurden EFS und ÜLZ ermittelt. Das EFS lag zwischen einem und 259 Monaten (Median: 17,5 Monate), die ÜLZ ebenfalls zwischen einem und 259 Monaten; als Median ergaben sich 43 Monate.

4.4.4 Immunreaktivität versus Proliferationsmarker

Entsprechend dem Vorgehen bei den malignen fibrösen Histiocyten fanden sich bei den malignen peripheren Nervenscheidentumoren folgende Signifikantsniveaus:

	Korrelation mit:	
	Mitoserate	Wachstumsfraktion
GRAF	p = 0,134	p = 0,566
FAK-C-903	p = 0,527	p = 0,812
FAK-A-17	p = 0,410	p = 0,068
FAK-C-20	p = 0,533	p = 0,217

Tabelle 6 – Signifikanzniveau MPNST I

Signifikanzniveau der Korrelation von Färbeergebnis je Antikörper mit Proliferationsmarkern bei MPNST

Erfüllen diese auch nicht die Vorgabe $p < 0,05$, so liefern die dazugehörigen Diagramme mit den entsprechenden Ausgleichsgeraden vereinzelt zusätzliche Hinweise bezüglich der Art des Zusammenhanges. So zeigen sich für die Korrelationen der Immunreaktivitäten der MPNST von FAK-C-903 und FAK-A-17 ein proportionaler Zusammenhang mit der Wachstumsfraktion (vgl. Tabelle 10, Seite 73).

4.4.5 Histologische Kriterien versus Überlebensdaten

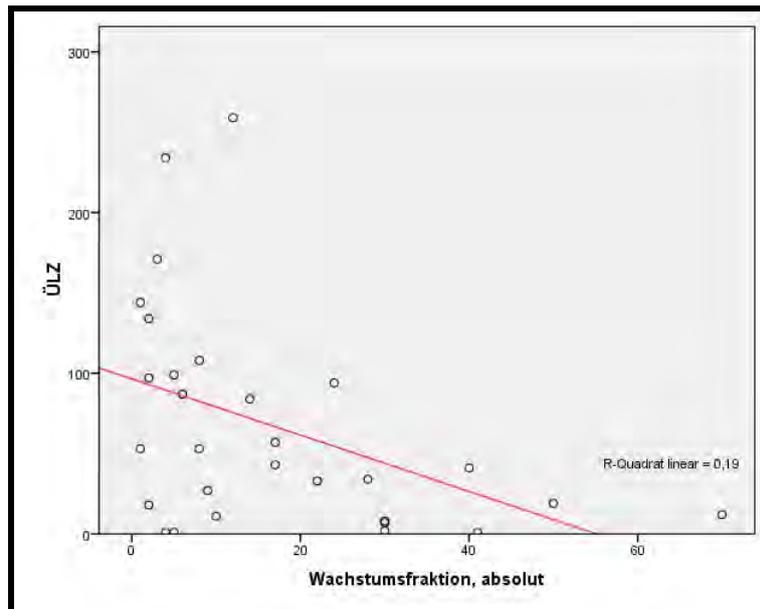
Bei den malignen peripheren Nervenscheidentumoren konnte lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen histologischen Kriterien und Überlebenszeiten gefunden werden: einzig für die Korrelation Wachstumsfraktion (absolute Zahlen) versus Überlebenszeit fand sich ein p-Wert von $p < 0,05$.

	Korrelation mit:	
	EFS	ÜLZ
GRAF	p = 0,780	p = 0,963
FAK-C-903	p = 0,887	p = 0,991
FAK-A-17	p = 0,617	p = 0,335
FAK-C-20	p = 0,579	p = 0,292
Mitoserate, absolut	p = 0,171	p = 0,263
Wachstumsfraktion, abs.	p = 0,099	p = 0,018

Tabelle 7 – Signifikantsniveau MPNST II

Signifikantsniveau der Korrelation von Färbeergergebnis je Antikörper bzw. Proliferationsmarkern mit Event-free survival (EFS) bzw. Überlebenszeit (ÜLZ) bei MPNST

Die bildliche Darstellung der Korrelation der Wachstumsfraktion versus ÜLZ in Diagramm 14 verdeutlicht einen antiproportionalen Zusammenhang, der sich in der negativen Steigung der Regressionsgeraden widerspiegelt. Mit einem R^2 von 0,19 repräsentiert die Regressionsgerade den Trend recht zuverlässig.



**Diagramm 14 – Korrelation zwischen Wachstumsfraktion
und ÜLZ, MPNST**

(Wachstumsfraktion in absoluten Zahlen;
ÜLZ in Monaten)

Unter den nicht-signifikanten Korrelationspaarungen aus Tabelle 7 finden sich zwei weitere antiproportionale Zusammenhänge. Neben des Verhältnisses von Wachstumsfraktion zu ÜLZ sind auch diejenigen zwischen Mitoserate und ÜLZ sowie zwischen Wachstumsfraktion und EFS antiproportional (s. Tabelle 11 auf Seite 73).

5 Diskussion

5.1 Bisherige Untersuchungsergebnisse in der Literatur

In der jüngeren wie auch älteren Vergangenheit wurden zahlreiche Studien bezüglich der Etablierung von Prognoseparameter bei Weichgewebstumoren durchgeführt. Diese zeigten und zeigen methodische Schwierigkeiten. Zunächst wird die Rekrutierung des Patientenkollektives dadurch erschwert, dass – wie bereits in der Einleitung erwähnt – diese Tumorerkrankungen mit 2000 – 3000 neuen Fällen pro Jahr in Deutschland relativ selten auftreten. Im Vergleich dazu lag die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an kolorektalen Karzinomen laut Angaben des Robert-Koch-Institutes für die Jahre 2003/ 2004 bei ca. 73000 für beide Geschlechter zusammen (Robert-Koch-Institut 2008). Des Weiteren haben sich die Diagnosekriterien der einzelnen Sarkom-Entitäten im Zuge sich weiterentwickelnder WHO-Klassifikationen verändert und die immunhistochemischen Möglichkeiten entwickelten sich weiter, sodass sich Ergebnisse früherer Untersuchungen nicht zwangsläufig mit aktuellen Studien vergleichen lassen. V.a. bezüglich der malignen fibrösen Histiozytomen herrschte und herrscht auch heute noch eine gewisse diagnostische Unsicherheit.

Nichtsdestotrotz hat sich vor allem der Grad der Ki67-Expression schon mehrfach als verlässlicher Prognoseindikator herauskristallisiert: sowohl generell für die Gruppe der Weichgewebstumore, wie in Heslin et al. 1998 und Hasegawa et al. 2002 beschrieben, als auch für MFH (Bohle 1998) und MPNST (Watanabe et al. 2001) im Speziellen.

5.2 GRAF

Bislang dominierte in der Literatur die Annahme, dass GRAF anti-proliferative bzw. Tumor-supprimierende Eigenschaften besäße, v.a. über Hemmung des Signaltransduktionsweges via RhoA und p21 (vgl. Kapitel 1.5.3). Dies zeigten mehrere Untersuchungen und die entsprechenden Theorien wurden in Veröffentlichungen wie zum Beispiel bei Finkel & Gutkind 2003 (Seite 97) und Borkhardt et al. 2000 geäußert.

Bei unseren Untersuchungen jedoch lassen sich Hinweise auf konträre Auswirkungen finden.

5.2.1 GRAF in malignen fibrösen Histiozytomen

Bei der Korrelation der Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der MFH bezüglich GRAF mit der im entsprechenden Gewebe vorliegenden Mitoseanzahl findet man einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,028$. Hierbei ist der Zusammenhang entgegen der durch die Literatur beeinflussten Erwartungen proportional. Dies bedeutet, dass eine stärkere Expression des „GTPase Regulator Associated with FAK pp125“, kurz GRAF, tendenziell mit einer erhöhten Mitoseanzahl einhergeht. Da jedoch zahlreiche Mitosefiguren im Allgemeinen (siehe u.a. Böcker et al. 2004, Seite 169 ff.) wie auch im Speziellen (z.B. Bohle 1998, Seite 61) als ein wichtiges Malignitätskriterium bzw. als Überlebenszeit-limitierender Faktor angesehen wird, drängt sich die Schlussfolgerung auf, dass auch GRAF mit Malignität verknüpft sein könnte. Hinzu kommt, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen eine starke GRAF-Expression für eine geringe Ereignis-freie Zeit prädisponierte, wie in Diagramm 13 an der negativen Steigung der Korrelationsgeraden zu erkennen ist.

So liefern die Untersuchungen im Vergleich zur bisherigen, allerdings relativ spärlichen Datenlage in der Literatur konträre Ergebnisse, sind aber in sich konsistent. Dies zeigt die Korrelation der Mitoserate mit der Ereignis-freien Überlebenszeit: eine hohe Mitosezahl geht – wie aufgrund des aktuellen Wissensstandes zu erwarten – mit einer geringeren Ereignis-freien Überlebenszeit einher. Ebenso erfüllen folgende Korrelationen die Erwartungen aus der Literatur mit einem antiproportionalen Zusammenhang: Mitosezahl – ÜLZ, Wachstumsfraktion – EFS und Wachstumsfraktion – ÜLZ.

Auch wenn für die MFH-Fälle ein proportionaler Zusammenhang zwischen Mitoserate und Wachstumsfraktion vorliegt, so gelingt kein Nachweis eines statistischen Zusammenhanges zwischen dem Grad der GRAF-Expression und der Wachstumsfraktion. Das gleiche gilt für die Korrelation GRAF versus Überlebenszeit, für die ein streng linearer Zusammenhang mit dem Event-free survival besteht.

Eine weitere Bestätigung der oben genannten Schlussfolgerungen liefern die immunhistologischen Untersuchungen der benignen fibrösen Histiozytome. Hier konnte in den Paraffin-eingebetteten Geweben im Gegensatz zu den malignen

fibrösen Histiocyten keine GRAF-Expression nachgewiesen werden, wie in Diagramm 3 ersichtlich ist. Sollte GRAF hauptsächlich proliferationshemmende Eigenschaften aufweisen, so wäre bei den BFH als gutartige Tumorentität ein starker Nachweis von GRAF zu erwarten gewesen – zumindest stärker als bei den MFH.

5.2.2 GRAF in malignen peripheren Nervenscheidentumoren

Bei den Weichgewebstumoren mit neurolemmaler Differenzierung sieht das Bild etwas anders aus als bei den fibrösen Histiocyten. 62,5 % der Schwannome reagierten stark positiv bei der Anwendung des Anti-GRAF-Antikörpers. Die entsprechende maligne Entität, die MPNST, zeigten bei 18 von 35 untersuchten Gewebeschnitten eine stark positive Reaktion, entsprechend 51,4 %. Hier würde also die in Kapitel 5.2.1 geäußerte Annahme, dass ein proliferationshemmendes, „protektives“ GRAF vor allem in benignen Weichgewebstumoren exprimiert werden müsste, bestätigt werden – im Gegensatz zu den BFH und MFH. Vergleicht man nun Schwannome und MPNST bezüglich einer insgesamt positiven Immunreaktion (Punktwerte 0,5 – 3 der semiquantitativen Auswertung) bei der immunhistochemischen Untersuchung auf GRAF, so verhalten sich die beiden Untergruppen mit 87,5 % zu 88,6 % bei vernachlässigbarer Differenz ähnlich.

Setzt man den Grad der GRAF-Expression auch hier in Korrelation mit der Mitosehäufigkeit, so bleibt man einen eindeutigen Zusammenhang schuldig, sowohl bezüglich des Signifikanzniveaus dieser Korrelation wie auch „optisch“ im Diagramm. Ähnlich verhält es sich mit den weiteren Korrelationen der GRAF-Expression: GRAF – EFS und auch GRAF – ÜLZ lassen keinen klaren Zusammenhang erkennen.

Ganz im Gegenteil dazu erscheint die Gegenüberstellungen der Proliferationsmarker mit den Überlebenszeiten. Diese bestätigen den antiproportionalen Zusammenhang zwischen den Malignitätskriterien einer hohen Mitoseanzahl bzw. einer großen Wachstumsfraktion und den patientenbezogenen Daten EFS und ÜLZ.

5.2.3 Abschließende Beurteilung von GRAF

Aufgrund der inhomogenen Ergebnisse für maligne fibröse Histiocyten und maligne periphere Nervenscheidentumore erscheint die Vergleichbarkeit dieser beiden Datensätze eingeschränkt, zumal die Daten aus den MPNST-Untersuchungen nur

wenige statistisch verwertbare Ansätze liefern. Augenscheinlich ist jedoch die Diskrepanz zwischen der GRAF-Expression in benignen fibrösen Histozytomen und den Schwannomen. Aufgrund der starken Expression in Schwannomen könnte man zu der Vermutung gelangen, dass GRAF in neurolemmalen Tumoren eine gewichtige Bedeutung habe. Leider bestätigen die weiteren Untersuchungsergebnisse dies nicht – wohl auch aufgrund des geringen Stichprobenumfanges.

Die oben erläuterten Ergebnisse dieser Arbeit für MFH sind zwar in sich konsistent, was den Untersuchungsaufbau bestätigt, widersprechen jedoch in ihren Hauptaussagen dem aktuellen Stand der Literatur. Daher müssen sowohl für MFH wie auch für MPNST weitere, größer angelegte Studien durchgeführt werden, um die interessante Rolle des „GTPase Regulator Associated with FAK pp125“ genauer zu eruieren und die vielversprechende Chance zu nutzen, seine prognostische Aussagekraft zu differenzieren.

5.3 Fokale Adhäsionskinase pp125^{FAK}

Aufgrund der relativ geringen Datenbasis für MFH und MPNST (61 bzw. 35 Fälle) ist es nicht überraschend, dass die statistische Signifikanz leidet. Daher haben wir mit der Regressionsgeraden und ihrer Steigung zwei weitere Parameter zur Beurteilung der Daten hinzugezogen.

Vergleicht man die Färbeintensität der drei Varianten der Anti-FAK-Antikörper untereinander, so liefert der R^2 -Wert eine Aussage über die Ähnlichkeit der Färbeergebnisse.

5.3.1 FAK in malignen fibrösen Histozytomen

Bei den malignen fibrösen Histozytomen kommen aufgrund der R^2 -Werte die Antikörper-Subtypen gegen FAK-C-903 und FAK-A-17 in die engere Auswahl als geeignete Antikörper. Bei Steigungswerten m von 0,52 bzw. 0,79 erscheinen beide Antikörper ähnlich reaktiv. Dies wird durch einen niedrigen p -Wert ($p = 0,01$) aus der Korrelation FAK-C-903 versus FAK-A-17 bestätigt.

Hierbei legt das Nichtvorhandensein einer Normalverteilung (vgl. Kapitel 4.3.1 und 4.4.1) eine ungefähre Gleichverteilung der Daten nahe, was für ein spezifisches Verhalten der Antikörper spricht.

Jedoch fanden sich für MFH bei der Korrelation der FAK-bezogenen Färbeergebnisse mit den bereits etablierten histologischen Prognoseparametern

Mitoserate und Wachstumsfraktion (gemäß FNCLCC, vgl. Coindre et al. 1986) sowie mit Event-free survival bzw. Überlebenszeit keine plausiblen statistischen Ergebnisse, sodass die Aussagekraft der Untersuchung bezüglich der prognostischen Bedeutung der FAK-Immunreaktivität bei MFH stark eingeschränkt ist.

Nichtsdestotrotz findet sich gemäß Diagramm 2, Diagramm 3 und Diagramm 5 aus dem Ergebniskapitel 4.2.1 eine deutliche Diskrepanz zwischen der FAK-Expression in benignen und malignen Tumoren mit fibröser/ fibrozytärer Differenzierung. Mit stark positiven Immunreaktivitäten in über 50 % der untersuchten MFH findet sich unter den malignen Tumoren eine deutliche Überexpression der FAK, was die bereits in der Einleitung vermutete Rolle von FAK hinsichtlich malignen Verhaltens bestätigt.

5.3.2 FAK in malignen peripheren Nervenscheidentumoren

Bei den Untersuchungen an den malignen peripheren Nervenscheidentumoren fällt im Vergleich zu den malignen fibrösen Histiozytomen auf, dass die R²-Werte deutlich höher ausfallen als bei den MFH-Fällen. Dies bedeutet, dass bei MPNST-Gewebe die drei Antikörper-Subtypen zum einen ähnlicher reagieren als bei den MFH, zum anderen sich untereinander in ihrer Reaktivität ähneln. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Qualität und Verwendbarkeit der benutzten Antikörper für diese Untersuchungen.

Im Hinblick auf mögliche prognostische Aussagen kann – im Gegensatz zu den über die MFH getroffenen Aussagen – für die MPNST festgestellt werden, dass die hier untersuchten Immunreaktivitäten in zwei Fällen statistisch interessante Verhältnisse zu den patientenbezogenen Daten aufweisen. So zeigen die Färbeergebnisse für FAK-C-903 wie auch für FAK-A-17 ein proportionales Verhalten zur Größe der Wachstumsfraktion (in absoluten Zahlen), die selbst hochsignifikant mit der Überlebenszeit korreliert ($p = 0,018$). Liegen auch die entsprechenden p-Werte deutlich (FAK-C-903, $p = 0,812$) bzw. nur knapp (FAK-A-17, $p = 0,068$) über dem Grenzwert $p < 0,05$, so lassen die Punktdiagramme mit Regressionsgerade diese Zusammenhänge bildlich gut erkennen. Somit finden sich für die MPNST Ergebnisse, wie sie aufgrund der Studienlage zu erwarten gewesen sind. Neben zahlreichen Veröffentlichungen bezüglich des Mitwirkens der FAK an Signaltransduktion, Zellmotilität und Apoptosekontrolle (z.B. Rodriguez-Fernandez 1999, Juliano 2002), fanden Dunty & Schaller 2002 ein FAK-abhängiges Fortschreiten des Zellzyklus in

die Ki67-positive S-Phase, welche bekanntlich als Synthese-/ Replikationsphase entscheidend für Zellteilung und Tumor-/ Wachstum ist. Dies findet Bestätigung im Vergleich der hier nachgewiesenen FAK-Expression in Schwannomen und der malignen Form der MPNST. So reagierten die Schwannome für sämtliche Anti-FAK-Antikörper niemals stark positiv; die MPNST hingegen erreichten bis zu 65 % stark positiver Immunreaktivität (vgl. Kapitel 4.2.2.2 und 4.2.2.4).

5.3.3 Abschließende Beurteilung von FAK

Aufgrund der oben erläuterten wenigen, jedoch vielversprechenden statistischen Zusammenhänge müssen die Bedeutungen der Fokalen Adhäsionskinase pp125^{FAK} bezüglich Sarkogenese und prognostischer Aussagekraft bei Weichgewebstumoren noch genauer untersucht werden. In der Literatur lassen sich bereits zahlreiche Hinweise auf eine onkogene Rolle der pp125^{FAK} finden: Owens et al. 1995 untersuchten unter anderem Colon- und Mamma-Karzinome sowie auch „high-grade“ Sarkome, Miyazaki et al. 2003 widmeten sich Ösophagus-Karzinomen, Slack et al. 2001 führten Untersuchungen an Prostata-Gewebe durch. Sie alle kommen zu dem Ergebnis, dass eine FAK-Überexpression u.a. verantwortlich ist für gesteigerte Tumor-Invasivität, Metastasierung und verringerte Überlebensraten. Bei McLean et al. 2004 wird FAK zusammenfassend als „mitentscheidend für malignes Verhalten“ bezeichnet.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung auf deutsch

In der vorliegenden Arbeit wurden Weichgewebssarkome Erwachsener bezüglich der Signaltransduktionsproteine GRAF (GTPase Regulator Associated with FAK pp125) und FAK (pp125^{FAK}) immunhistochemisch untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf den malignen fibrösen Histiocyten (MFH) und malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST). Die Ergebnisse wurden mit den Überlebensdaten des Patientenkollektivs verglichen, um etwaiges Potential von GRAF und FAK als Prognosemarker aufzudecken.

Hierbei fanden sich bezüglich der MFH Hinweise, dass GRAF entgegen der bisherigen Annahmen auch für malignes Verhalten von Zellen/ Tumoren verantwortlich sein könnte. So fand sich ein antiproportionaler Zusammenhang zwischen der GRAF-Expression und dem Ereignis-freien Überleben sowie ein proportionaler Zusammenhang zwischen GRAF und dem bekannten Malignitätskriterium der Mitosezahl ($p = 0,028$). Für die Fokale Adhäsionskinase konnten keine Zusammenhänge aufgefunden werden.

Bei den Untersuchungen der MPNST zeigte sich für GRAF ein von anderen Parametern unabhängiges Verhalten. Die FAK-Färbeergebnisse korrelierten teilweise mit der Wachstumsfraktion (proportional), was für ein malignes Einwirken der FAK spricht.

Inwiefern sich GRAF und FAK tatsächlich als Prognosemarker dieser Tumorentitäten eignen, muss durch weitere und v.a. größer angelegte Untersuchungen inklusive Multivarianz-Analysen eruiert werden.

6.2 Zusammenfassung auf englisch/ Abstract

In this investigation soft tissue sarcomas of the adult were analysed by immunohistochemistry with regard to the signal transduction proteins GRAF (GTPase Regulator Associated with FAK pp125) and FAK (pp125^{FAK}). Particularly we were interested in malignant fibrous histiocytoma (MFH) and malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNST). Additionally these results were compared with the patients' survival data, investigating if GRAF and FAK can predict the prognosis of survival.

Contrary to today's knowledge, we found evidence that in MFH GRAF could be responsible for malignant behaviour of cells or tumours. There was an inversely proportional correlation between expression of GRAF and the event-free survival as well as a proportional correlation between expression of GRAF and the mitotic rate ($p = 0.028$) which is a known sign for malignancy. There was no correlation found concerning the FAK.

In MPNST expression of GRAF seems to have no predictive value for the survival rate. In contrast expression of FAK seems to indicate a tendency for malignant behaviour because of its proportional correlation with the growth fraction of Ki67-stained tissue slices.

Future studies including multivariate analysis will have to investigate if GRAF and FAK can be useful instruments for prediction of the clinical outcome of MFH and MPNST patients.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Anm.	Anmerkung
APAAP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase und <u>A</u> nti- <u>a</u> lkalische- <u>P</u> hosphatase
BFH	<u>b</u> enignes <u>f</u> ibröses <u>H</u> istiozytom
Bsp.	Beispiel
EFS	<u>E</u> vent- <u>f</u> ree <u>s</u> urvival/ Ereignis-freies Überleben
FAK	<u>f</u> ocal <u>a</u> dhesion <u>k</u> inase / <u>F</u> okale <u>A</u> dhäsions <u>k</u> inase
FNCLCC	<u>F</u> édération <u>N</u> ationale des <u>C</u> entres de <u>L</u> utte <u>C</u> ontre le <u>C</u> ancer
GAP	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein / <u>G</u> TPase <u>a</u> ktivierendes <u>P</u> rotein
GDP	<u>G</u> uanosin <u>d</u> iphosphat
GEF	<u>g</u> uanine <u>e</u> xchange <u>f</u> actor / Guanin-Austausch-Faktor
GRAF	<u>G</u> TPase <u>R</u> egulator <u>A</u> ssociated with <u>F</u> AK pp125
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	<u>h</u> igh- <u>p</u> ower <u>f</u> ield
JLU	<u>J</u> ustus- <u>L</u> iebig- <u>U</u> niversität
k.A.	keine Angabe
KAM	<u>K</u> aninchen- <u>a</u> nti- <u>M</u> aus
Kap.	Kapitel
Ki	Kiel
Konz.	Konzentration
LMO	Leiomyom
LPS	Liposarkom
LMS	Leiomyosarkom
MAK	<u>M</u> aus- <u>a</u> nti- <u>K</u> aninchen
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
MFH	<u>m</u> alignes <u>f</u> ibröses <u>H</u> istiozytom
MIB	<u>M</u> ade <u>i</u> n <u>B</u> orstel
min	Minute(n)
MPNST	<u>m</u> aligner <u>p</u> eripherer <u>N</u> ervens <u>s</u> cheident <u>u</u> mor
MTA	<u>m</u> edizinisch- <u>t</u> echnische <u>A</u> ssistentin
Obj.	Objektiv

P	<u>P</u> hosphat(rest)
S.	<u>S</u> eite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SEER	<u>S</u> urveillance, <u>E</u> pidemiology and <u>E</u> nd <u>R</u> esults
STS	<u>S</u> oft <u>t</u> issue <u>s</u> arcoma
SOS	<u>S</u> on <u>o</u> f <u>S</u> evenless
Syn.	Synonym
ÜLZ	Überlebenszeit
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZS	<u>z</u> ellreiches <u>S</u> chwannom

8 Anhang

8.1 Immunreaktivität von ED98015 in Normalgewebe

Auszug aus den „Supplemental Data“ von Borkhardt et al. 2000:

Tissue	Protein expression	
	cytopl.	nucl.
Circulatory system		
Heart		
Myocardium		
Cardiomyocytes	+	–
Capillaries	–	–
Endocardium	–	–
Vessels (in all tissues examined)		
Endothelium	v-/+	–
Media	v-/+	–
Adventitia	–	–
Capillaries	–	–
Respiratory system		
Trachea/ main bronchus		
Respiratory epithelium	+	s+
Submucosal glands		
Serous	++	s+
Mucous	–	–
Hyaline cartilage	–	–
Lung		
Respiratory epithelium	+	s+
Alveolar epithelium	+	–
Alveolar macrophages	+	–
Alveolar septae	–	–

Gastrointestinal tract

Submandibular gland

Acinar cells mucous	–	–
Acinar cells serous	v-/+	–
Intercalated ducts	++	–
Ducts	+	–

Esophagus

Epithelium basal layer	–	–
Epithelium squamous layer	v+/++	s+
Muscularis	+	–
Submucosal glands mucous	–	–
Submucosal glands serous	++s	+
Enteric ganglia	v++/+++	–

Stomach

Epithelium superficial	–	–
Epithelium foveolar	–	–
Epithelium fundic glands	v+/++	–
Muscularis	v-/+	–
Enteric ganglia	++	–

Small intestine

Epithelium	–	–
Muscularis	v-/+	–
Enteric ganglia	++	–
Lymphoid tissue	–	–

Colon

Epithelium superficial	++	–
Epithelium crypts	–	–
Muscularis	v-/+	–
Enteric ganglia	+++	–
Lymphoid tissue	–	–

Liver

Hepatocytes	v+/++	–
Bile ducts	+	–
Portal veins	–	–

Pancreas			
	Islet of Langerhans		
		Insulin-producing cells	+++ -
		Glucagon-producing cells	- -
	Acinar cells		- -
	Ducts		- -
Urinary system			
	Kidney		
		Glomerulus	- -
		Proximal tubules	+ -
		Distal tubules	+ -
		Collecting tubules	- -
	Urinary bladder		
		Urothelium	++ S+
		Smooth muscle	- -
Reproductive system			
	Testis		
		Seminiferous tubules	+ -
		Leydig's cells	++ -
	Epididymis		
		Epithelium	++ -
		Muscularis	- -
	Prostate		
		Glandular epithelium	++ -
		Myoepithelial cells	- -
		Stroma	- -
	Ovary		
		Granulosa cells	+ -
		Granulosa cells luteinized	++ -
		Theca cells	+ -
		Stroma	- -
	Fallopian tube		
		Epithelium	+++ -
		Stroma	- -

Portio/cervix			
	Epithelium squamous	v+/++	s+
	Epithelium mucous	-	-
Endometrium			
	Epithelium	+	-
	Stroma	-	-
Mammary gland			
	Ducts		
	Epithelial cells	++	s+/++
	Myoepithelial cells	-	-
	Acini		
	Epithelial cells	++	-
	Myoepithelial cells	-	-
	Stroma	-	-
Endocrine glands			
Adrenal			
	Zona glomerulosa	+	-
	Zona fasciculata	-	-
	Zona reticularis	+	-
	Medulla	-	-
Thyroid			
	Follicular epithelium	+	-
Lymphatic/hematopoetic tissues			
Lymph node			
	Germinal center	-	-
	Lymphocytes	-	-
	T-cell region		
	High endothelial venules	-	-
	Sinus cells	-	-
Spleen			
	White pulp lymphocytes	-	-
	Red pulp	-	-

Tonsil			
	Epithelium basal layer	-	-
	Epithelium squamous layer	v+/++	-
	Follicules	-	-
Bone marrow			
	Erythropoiesis cells	++	-
	Myelopoiesis cells	-	-
	Megakaryocytes	+	-
Skin			
	Epidermis	-	-
	Basal layer	+	-
	Squamous layer	++	-
	Cornified layer	-	-
Sebaceous glands			
Sweat glands			
Other mesenchymal tissues			
Supporting/ connective tissue			
Adipose tissue			
	White	++	s+/++
	Brown	-	-
Muscle			
	Striated muscle cells	-	-
	Smooth muscle cells	+	-
Peripheral nerves			

-, No staining; +, low staining; ++, moderate staining; +++, high staining in the vast majority of cells, staining only in scattered cells; v, staining varying within one tissue sample or within different samples examined. © by the National Academy of Sciences.

8.2 Färbeergebnisse nach Antikörper

Dargestellt sind die Antikörper-bezogenen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte, bzw. bezüglich der GRAF-Aktivität der Leiomyosarkome (LMS) und Liposarkome (LPS) die Ergebnisse der Gefrierschnitte.

8.2.1 GRAF

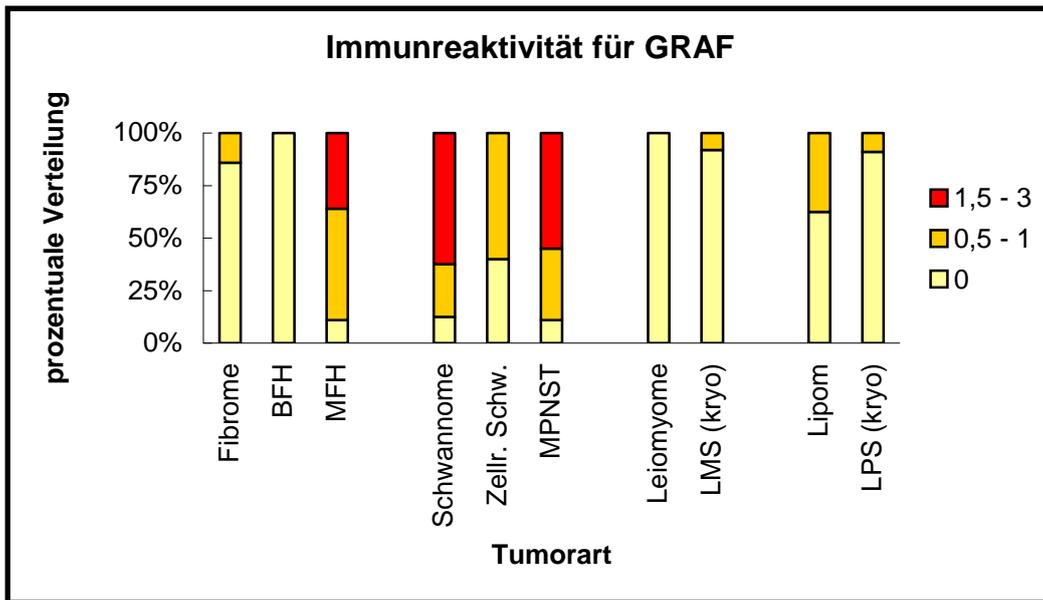


Diagramm 15 – Immunreaktivität für GRAF (Paraffin)

8.2.2 FAK-C-903

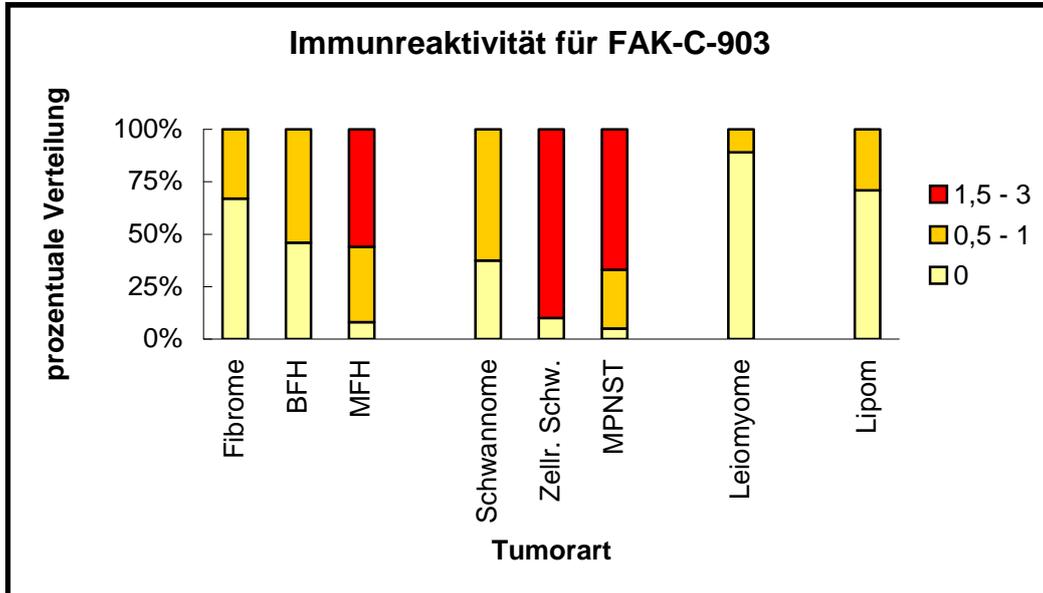


Diagramm 16 – Immunreaktivität für FAK-C-903 (Paraffin)

8.2.3 FAK-C-20

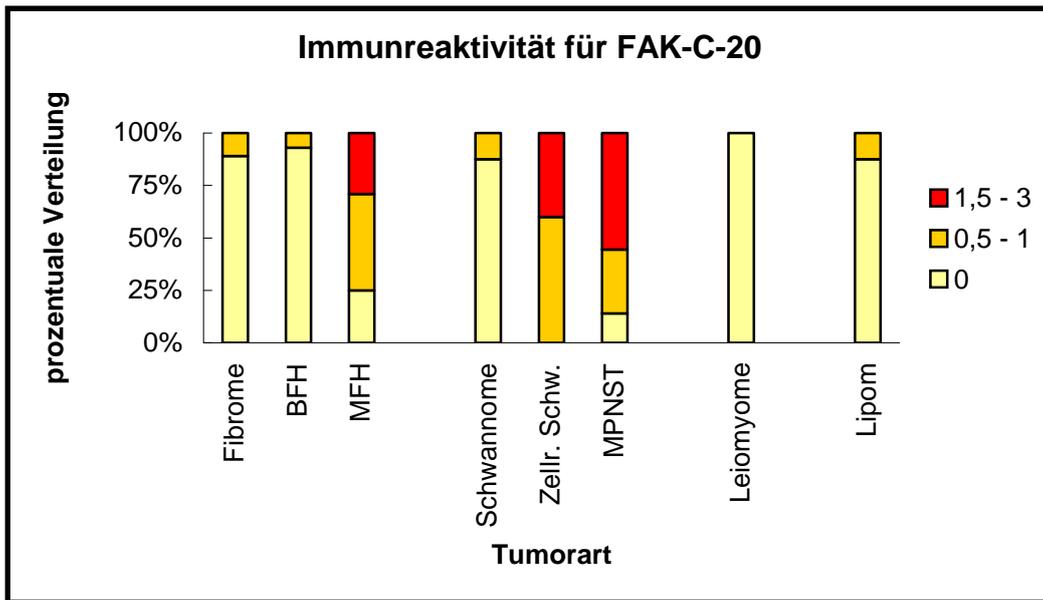


Diagramm 17 – Immunreaktivität für FAK-C-20 (Paraffin)

8.2.4 FAK-A-17

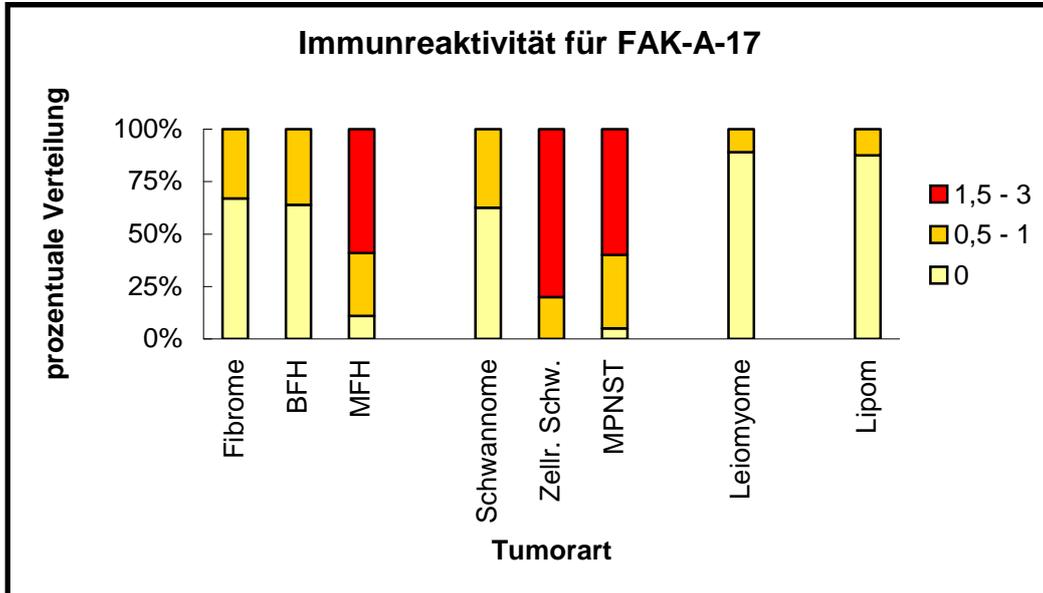


Diagramm 18 – Immunreaktivität für FAK-A-17 (Paraffin)

8.3 Proportionalität der Korrelationen

8.3.1 MFH

	Proportionalität der Korrelation mit:	
	Mitoserate	Wachstumsfraktion
GRAF	proportional ($m=0,025$)	k.A.
FAK-C-903	k.A.	k.A.
FAK-A-17	k.A.	k.A.
FAK-C-20	k.A.	k.A.

Tabelle 8 – Proportionalität MFH I

Proportionalität der Korrelationen GRAF bzw. FAK versus Mitoserate und Wachstumsfraktion für MFH anhand der Steigung m der Ausgleichsgeraden; k.A. = keine Angabe (im Falle ungenügender Werte für R^2 oder bei fehlender Abhängigkeit)

	Proportionalität der Korrelation mit:	
	EFS	ÜLZ
GRAF	antiproportional ($m=-0,026$)	k.A.
FAK-C-903	k.A.	k.A.
FAK-A-17	k.A.	k.A.
FAK-C-20	k.A.	k.A.
Mitoserate	antiproportional ($m=-0,11$)	antiproportional ($m=-0,13$)
Wachstumsfraktion	antiproportional ($m=-0,018$)	antiproportional ($m=-0,02$)

Tabelle 9 – Proportionalität MFH II

Proportionalität der Korrelationen histologischer Faktoren versus Patienten-bezogene Daten für MFH anhand der Steigung m der Ausgleichsgeraden; k.A. = keine Angabe (im Falle ungenügender Werte für R^2 oder bei fehlender Abhängigkeit)

8.3.2 MPNST

	Proportionalität der Korrelation mit:	
	Mitoserate	Wachstumsfraktion
GRAF	k.A.	k.A.
FAK-C-903	k.A.	proportional (m=0,002)
FAK-A-17	k.A.	proportional (m=0,05)
FAK-C-20	k.A.	k.A.

Tabelle 10 – Proportionalität MPNST I

Proportionalität der Korrelationen GRAF bzw. FAK versus Mitoserate und Wachstumsfraktion für MPNST anhand der Steigung m der Ausgleichsgeraden; k.A. = keine Angabe (im Falle ungenügender Werte für R² oder bei fehlender Abhängigkeit)

	Proportionalität der Korrelation mit:	
	EFS	ÜLZ
GRAF	k.A.	k.A.
FAK-C-903	k.A.	k.A.
FAK-A-17	k.A.	k.A.
FAK-C-20	k.A.	k.A.
Mitoserate	k.A.	antiproportional (m=-0,04)
Wachstumsfraktion	antiproportional (m=-0,08)	antiproportional (m=-0,11)

Tabelle 11 – Proportionalität MPNST II

Proportionalität der Korrelationen histologischer Faktoren versus Patienten-bezogene Daten der MPNST anhand der Steigung m der Ausgleichsgeraden; k.A. = keine Angabe (im Falle ungenügender Werte für R² oder bei fehlender Abhängigkeit)

Literaturverzeichnis

Battifora, H. (1986). The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55(2): 244-48.

Battifora, H. (1991). Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 96(5): 669-71.

Böcker, Denk and Heitz (2004). *Pathologie*. 3. Auflage. Urban & Fischer Elsevier GmbH, München.

Boenisch, T., Farmilo, A. J., Stead, R. H., Key, M., Welcher, R., Harvey, R. and Atwood, K. N. (2003). *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. 3. Auflage. DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA.

Bohle, R. M. (1998). *Onkogene und Onkoproteine in malignen fibrösen Histiozytomen*. Institut für Pathologie, JLU Gießen, Habilitationsschrift.

Borden, E. C., Baker, L. H., Bell, R. S., Bramwell, V., Demetri, G. D., Eisenberg, B. L., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A., Ladanyi, M., Meltzer, P., O'Sullivan, B., Parkinson, D. R., Pisters, P. W., Saxman, S., Singer, S., Sundaram, M., van Oosterom, A. T., Verweij, J., Waalen, J., Weiss, S. W. and Brennan, M. F. (2003). Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin Cancer Res* 9(6): 1941-56.

Borkhardt, A., Bojesen, S., Haas, O. A., Fuchs, U., Bartelheimer, D., Loncarevic, I. F., Bohle, R. M., Harbott, J., Repp, R., Jaeger, U., Viehmann, S., Henn, T., Korth, P., Scharr, D. and Lampert, F. (2000). The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9168-73.

Brennan, M. F. (2005). Soft tissue sarcoma: advances in understanding and management. *Surgeon* 3(3): 216-23.

Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. and Gerdes, J. (1992). Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168(4): 357-63.

Clark, M. A., Fisher, C., Judson, I. and Thomas, J. M. (2005). Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* 353(7): 701-11.

Coindre, J. M., Terrier, P., Guillou, L., Le Doussal, V., Collin, F., Ranchere, D., Sastre, X., Vilain, M. O., Bonichon, F. and N'Guyen Bui, B. (2001). Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer* 91(10): 1914-26.

Coindre, J. M., Trojani, M., Contesso, G., David, M., Rouesse, J., Bui, N. B., Bodaert, A., De Mascarel, I., De Mascarel, A. and Goussot, J. F. (1986). Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 58(2): 306-9.

Dunty, J. M. and Schaller, M. D. (2002). The N termini of focal adhesion kinase family members regulate substrate phosphorylation, localization, and cell morphology. *J Biol Chem* 277(47): 45644-54.

Enzinger, F. M. and Weiss, S. W. (1995). *Soft Tissue Tumors*. 4th edition. The Mosby Company, St.Louis, Washington D.C., Toronto.

Finkel, T. and Gutkind, J. S. (2003). *Signal Transduction and Human Disease*. 1st edition. John Wiley & Sons, Inc., Southern Gate, Chichester, West Sussex.

Frame, M. C. (2004). Cell Adhesion-linked kinases. Beatson laboratories scientific report 2004.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U. and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 133(4): 1710-15.

Hasegawa, T., Yamamoto, S., Yokoyama, R., Umeda, T., Matsuno, Y. and Setsuo Hirohashi (2002). Prognostic significance of grading and staging systems using MIB-1 score in adult patients with soft tissue sarcoma of the extremities and trunk. *Cancer* 95(4): 843-51.

Heslin, M. J., Cordon-Cardo, C., Lewis, J. J., Woodruff, J. M. and Brennan, M. F. (1998). Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer* 83(3): 490-97.

Hildebrand, J. D., Taylor, J. M. and Parsons, J. T. (1996). An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 16(6): 3169-78.

Juliano, R. L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 283-323.

Katenkamp, D. and Stiller, D. (1990). *Weichgewebstumoren: Pathologie, histologische Diagnostik und Differentialdiagnose*. Leipzig.

Mankin, H. J. and Hornicek, F. J. (2005). Diagnosis, classification, and management of soft tissue sarcomas. *Cancer Control* 12(1): 5-21.

McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G. and Frame, M. C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 5(7): 505-15.

McLean, G. W., Komiyama, N. H., Serrels, B., Asano, H., Reynolds, L., Conti, F., Hodivala-Dilke, K., Metzger, D., Chambon, P., Grant, S. G. and Frame, M. C. (2004). Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev* 18(24): 2998-3003.

Miyazaki, T., Kato, H., Nakajima, M., Sohda, M., Fukai, Y., Masuda, N., Manda, R., Fukuchi, M., Tsukada, K. and Kuwano, H. (2003). FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89(1): 140-45.

Müller, M. (2003). *Chirurgie für Studium und Praxis*. 7. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.

Olson, M. F., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394(6690): 295-99.

Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T. and Cance, W. G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 55(13): 2752-55.

Pan, C. C., Chen, P. C. and Chiang, H. (2004). An easy method for manual construction of high-density tissue arrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12(4): 370-72.

Riede, U.-N., Werner, M. and Schaefer, H.-E. (2004). *Allgemein und Spezielle Pathologie*. 5. überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart.

Robert-Koch-Institut (2008). *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends*. 6. überarbeitete Auflage. Berlin.

Rodriguez-Fernandez, J. L. (1999). Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? *Bioessays* 21(12): 1069-75.

Rovin, J. D., Frierson, H. F., Jr., Ledin, W., Parsons, J. T. and Adams, R. B. (2002). Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate* 53(2): 124-32.

Schlag, P. M. and Tunn, P.-U. (2007). Isolierte hypertherme Extremitätenperfusion mit TNF- α ; und Melphalan: Eine Alternative zur Amputation bei lokal fortgeschrittenen Weichgewebssarkomen. *Dtsch Arztebl* 104(33): 2268-73.

Shibata, H., Oishi, K., Yamagiwa, A., Matsumoto, M., Mukai, H. and Ono, Y. (2001). PKN β interacts with the SH3 domains of Graf and a novel Graf related protein, Graf2, which are GTPase activating proteins for Rho family. *J Biochem (Tokyo)* 130(1): 23-31.

Skytting, B. T., Bauer, H. C., Perfekt, R., Nilsson, G. and Larsson, O. (1999). Ki-67 is strongly prognostic in synovial sarcoma: analysis based on 86 patients from the Scandinavian sarcoma group register. *Br J Cancer* 80: 1809-14.

Slack, J. K., Adams, R. B., Rovin, J. D., Bissonette, E. A., Stoker, C. E. and Parsons, J. T. (2001). Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene* 20(10): 1152-63.

Taylor, J. M., Hildebrand, J. D., Mack, C. P., Cox, M. E. and Parsons, J. T. (1998). Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(14): 8063-70.

Watanabe, T., Oda, Y., Tamiya, S., Kinukawa, N., Masuda, K. and Tsuneyoshi, M. (2001). Malignant peripheral nerve sheath tumours: high Ki67 labelling index is the significant prognostic indicator. *Histopathology* 39: 187-97.

Weiss, S. W. and Sobin, L. H. (1999). *Histological Typing of Soft Tissue Tumours*. 2. Auflage. WHO - International Histological Classification of Tumours, Springer Verlag, Berlin.

Windham, T. C. and Pisters, P. W. (2005). Retroperitoneal sarcomas. *Cancer Control* 12(1): 36-43.

Wong, W. W., Hirose, T., Scheithauer, B. W., Schild, S. E. and Gunderson, L. L. (1998). Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 351-60.

Internetrecherche:

<http://lti.klinikum.uni-muenchen.de>

(Homepage des Labors für Tumormimmunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München)

<http://www.aco.at>

(Homepage der Arbeitsgemeinschaft für chirurgische Onkologie in Österreich).

<http://www.dkfz-heidelberg.de>

(Homepage des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg).

<http://www.sarkome.de>

(Homepage herausgegeben von Univ.-Prof. Dr. med. Peter Hohenberger, Chirurgisches Universitätsklinikum Mannheim, OA Dr. Peter Reichardt und Dr. Daniel Pink, beide Robert Rössle Klinik Berlin).

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Janina M. Cherdron

Danksagung

Ich danke besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle, leitender Oberarzt am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bis März 2006, anschließend Leiter des Institutes für Pathologie der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar, für die Bereitstellung des Themas, die verständnisvolle Betreuung und die tatkräftige Unterstützung zu allen Zeitpunkten der Arbeit.

Außerdem danke ich den MTAs Esther Kuhlmann-Farahat und Marlene Stein aus dem Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität für die Einarbeitung und geduldige Hilfe beim praktischen Teil der Arbeit.

Des Weiteren sei aus dem Institut für Pathologie Dr. Jochen Wilhelm für die ausführliche Hilfestellung im Computer- und Statistik-Bereich, Frau Hahn-Kohlberger für die Hilfestellung bei kniffligen Problemen und ihre guten Tipps, Frau Gudrun Jurat für die Hilfe bei der fotografischen Dokumentation und dem Team des Routinelabors für die MIB-1-Färbungen gedankt.

Insbesondere danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung und liebevolle Begleitung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5741-1



9 783835 199741