



DIE EXPRESSION DES HUMANEN GRAF-PROTEINS
UND DER TYROSINKINASE FAK
IN SOLIDEN TUMOREN DES KINDESALTERS

RAMONA VERENA NEUTZNER

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



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2017

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 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

DIE EXPRESSION DES HUMANEN GRAF- PROTEINS
UND DER TYROSINKINASE FAK
IN SOLIDEN TUMOREN DES KINDESALTERS

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER MEDIZIN
DES FACHBEREICHS MEDIZIN
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN

VORGELEGT VON

RAMONA VERENA NEUTZNER

AUS
WETZLAR

GIEßEN
2015

Aus dem Institut für PATHOLOGIE
der JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN

Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. S. Gattenlöhner

Gutachter:

Prof. Dr. med. R. M. Bohle

Gutachter:

Prof. Dr. med. B. A. Neubauer

Tag der Disputation:

09.01.2017

Meinen Eltern
Monika und Harald Trinkner
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	13
1.1 MALIGNE ERKRANKUNGEN IM KINDES- UND JUGENDALTER	13
1.2 KLEIN-, RUND- UND BLAUZELLIGE TUMORE	13
1.2.1 Embryonale Tumore (Blastome).....	15
1.2.1.1 Nephroblastome.....	15
1.2.1.2 Neuroblastische Tumore	15
1.2.2 Sarkome im Kindes- und Jugendalter.....	17
1.2.2.1 Rhabdomyosarkome.....	17
1.2.2.2 Ewing- Sarkome und periphere neuroektodermale Tumore	17
1.3 GRUNDLAGEN DER TUMORENTSTEHUNG.....	18
1.3.1 Protoonkogene und Onkogene.....	19
1.3.2 Tumorsuppressorgene.....	19
1.4 SIGNALTRANSDUKTION.....	20
1.4.1 Fokale Adhäsionskinase	20
1.4.2 GTPase Regulator assoziiert mit FAK pp125.....	22
2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	25
3 MATERIAL & METHODE	27
3.1 MATERIAL	27
3.1.1 Untersuchungsgut.....	27
3.1.2 Klinisch- pathologische Befunde.....	28
3.1.2.1 Histologische Subtypisierung von NBL, EWS und RMS	28
3.1.2.2 Präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP.....	28
3.1.2.3 Rezidiv- und Überlebensanalyse	29

3.1.3	Antikörper	29
3.2	METHODE	29
3.2.1	Histopathologische Voruntersuchungen und Selektion	29
3.2.1.1	Gefriermaterial	30
3.2.1.2	Paraffinmaterial	31
3.2.2	Schnittherstellung an Gefrier- und Paraffinmaterial, sowie Multi- Tissue- Blockherstellung	31
3.2.2.1	Schnittherstellung an Gefriermaterial	31
3.2.2.2	Multi- Tissue- Blockherstellung und Schnittherstellung an Paraffinmaterial	32
3.2.3	Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung.....	32
3.2.3.1	Gefriermaterial	32
3.2.3.2	Vorbehandlung und Antigen-Retrieval am Paraffinmaterial	34
3.2.4	Immunhistochemie	34
3.2.4.1	Ablauf	34
3.2.4.2	Kontrollschnitte.....	35
3.2.4.3	Primärantikörper.....	36
3.2.4.4	Maus- Anti- Kaninchen- Antikörper (MAK).....	37
3.2.4.5	Brückenantikörper Kaninchen- Anti- Maus (KAM).....	38
3.2.4.6	APAAP- Komplex.....	38
3.2.4.7	Entwicklung	38
3.2.4.8	Kernfärbung und Eindeckung	38
3.2.5	Digitale Dokumentation	39
3.2.6	Mikroskopische Auswertung	39
3.2.7	Software und graphische Darstellung.....	40
3.2.8	Statistik.....	41
3.2.9	Reagenzien und weitere Materialien	42
3.2.10	Geräte	43
3.2.11	Ansätze der Gebrauchs- und Entwicklungslösungen.....	43
4	ERGEBNISSE	45
4.1	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV	45
4.1.1	Geschlecht	45
4.1.2	Alter	47
4.2	UNTERSUCHTE PROTEINE BZW. EPITOPE	47

4.3	GRAF- UND FAK- PROTEINEXPRESSION IN DEN TUMORGRUPPEN.....	48
4.3.1	Nephroblastome.....	48
4.3.2	Neuroblastome.....	52
4.3.3	Ewing- Sarkome und periphere neuroektodermale Tumore	55
4.3.4	Rhabdomyosarkome.....	58
4.3.5	Ganglioneurome	61
4.3.6	Paraffin- eingebettetes vs. kryokonserviertes Gewebe	61
4.4	WACHSTUMSFRAKTION (MIB-1)/ KI 67- INDEX IN DEN TUMORGRUPPEN.....	64
4.4.1	Mitoseraten und deren Korrelation zur Wachstumsfraktion (MIB-1) im Gesamtkollektiv	66
4.4.2	Wachstumsfraktion (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP	67
4.4.3	Wachstumsfraktion (MIB-1) im Vgl. zu FAK- Immunreaktivität	69
4.5	REZIDIV- UND ÜBERLEBENSANALYSE.....	70
4.5.1	Ereignis- freies Überleben und Gesamtüberleben	70
4.5.2	MIB-1 und Gesamtüberleben.....	73
5	DISKUSSION	74
5.1	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV	74
5.1.1	Geschlecht	75
5.1.2	Alter	75
5.2	ZIEL DER UNTERSUCHUNG.....	76
5.3	GRAF UND FAK IN SOLIDEN TUMOREN DES KINDESALTERS.....	76
5.3.1	GRAF	76
5.3.2	FAK	79
5.3.3	GRAF und FAK.....	81
5.3.3.1	ED 98015- vs. FAK- Immunreaktivität in den Haupttumorgruppen	82
5.3.3.2	Vergleich der FAK- Immunreaktivitäten in den Haupttumorgruppen.....	83
5.3.3.3	Paraffin- eingebettetes vs. kryokonserviertes Gewebe	83
5.4	WACHSTUMSFRAKTION (MIB-1)/ KI 67- INDEX IN DEN TUMORGRUPPEN.....	84
5.4.1	Mitoserate und deren Korrelation zur Wachstumsfraktion (MIB-1)	85
5.4.2	Wachstumsfraktion (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP.....	86

5.4.3	Wachstumsfraktion (MIB-1) im Vgl. zu FAK- Immunreaktivität	86
5.5	REZIDIV- UND ÜBERLEBENSANALYSE.....	87
5.5.1	Ereignis- freies Überleben und Gesamtüberleben	87
5.5.2	MIB-1 und Gesamtüberleben.....	88
5.6	KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODE	90
5.6.1	Immunhistochemie.....	90
5.6.2	GRAF	91
5.6.3	FAK	91
5.6.4	Multi- Tissue- Blöcke und Schnitte.....	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.1	ABSTRACT	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	99
8	ANHANG.....	109
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	109
	DANKSAGUNG.....	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACK	Engl.: "Activated Cdc42- kinase"
AK	Antikörper
Akt/PKB	Engl.: "Phosphatidylinositol 3- kinase/ Protein kinase B"
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti- Alkalische Phosphatase
Arf	Engl.: "ADP- ribosylation factor"
ARHGAP26	Engl.: " RhoGTPase- activating protein 26"
Arp 2/3	Engl.: "Actin- related protein 2/3 complex"
ASAP	Engl.: "Aspartyl aminopeptidase"
B-Raf	Engl.: " B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase"
bspw.	beispielsweise
BWK	Bundeswehrkrankenhaus
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cas	Engl.: "Crk- associated tyrosine kinase substrate"
CAKbeta	Engl.: "Cell adhesion kinase beta"
Cdc42	Engl.: "Cell division cycle 42"
COOH	Carboxylgruppe
Crk	Engl.: "CT (chicken tumor no.10) regulator of kinase"
C3G	Engl.: "Cyanidin- 3- glucoside"
DCC	Engl.: "DCC netrin 1 receptor"
def.	definitionsgemäß
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCK180	Syn. zu "DOCK1" von Engl.: "Dedicator of cytokinesis 1"
Engl.	Englisch bzw. in der englischen Sprache
et al.	Lateinisch: "et alia", meint: und andere

EWS	Ewing- Sarkom
EFS	Ereignis- freies Überleben von engl.: "Event- free survival"
ERK	Engl.: "Extracellular signal- related kinase"
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
Etk	Engl.: " Epithelial and endothelial tyrosine kinase"
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase/ engl.: "Focal adhesion kinase"
FAT	Engl.: "FA(K) targeting domain"
FERM	Engl.: "FAK consisting of ezrin, radixin, moesin domain"
GAP	GTPase aktivierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GN	Ganglioneurom
GNBL	Ganglioneuroblastom
GRAF	Engl.: "GTPase regulator associated with FAK pp125"
Grb	Engl.: "Growth factor receptor- bound protein"
GTP	Guanosintriphosphat
H&E	Hämatoxylin und Eosin (Routinefärbung)
HPF	Hochvergrößerungsfelder von engl.: "High Power Fields"
ICCC-3	„International Classification of Childhood Cancer, Third Edition“
ILK	Engl.: "Integrin- linked kinase"
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
JNK	Syn. für „MAPK(8)“
KAM	Kaninchen- Anti- Maus- Brückenantikörper
Kap.	Kapitel
kDa	Atomare Masseneinheit = Kilodalton
MAK	Maus- Anti- Kaninchen- Brückenantikörper
MAPK	Engl.: "Mitogen- activated protein kinase"
Mat.	Material
Max.	Maximum bzw. maximal

MHC	Engl.: "Major histocompatibility complex"
MEK	Engl.: "MAPK/ ERK kinase"
Min.	Minimum bzw. minimal
MKK4	Engl.: "Mitogen- activated protein kinase kinase 4"
MLCK	Engl.: "Myosin light chain kinase"
MLCP	Engl.: "Myosin light chain phosphatase complex"
MLK3	Engl.: "Mixed lineage kinase 3"
MLL	Engl.: "Mixed lineage leukemia"
MTA	Medizinisch- technische/r Assistent/in
MT	Engl.: "Multi- Tissue"
NBL	Neuroblastom
neg.	negativ
NEP	Nephroblastom (Syn.: Wilms-Tumor)
NH2	Aminogruppe
ns	nicht signifikant
OAS	Gesamtüberleben von engl.: "Overall survival"
o. g.	oben genannt
OPHN1L	Engl.: "Oligophrenin- 1- like protein"
OV	Originalvergrößerung
Pak	Engl.: "p21- activated kinase"
(p)PNET	(Peripherer) primitiver neuroektodermaler Tumor
(=MPNT)	Maligner peripherer neuroektodermaler Tumor
PIS	Prae- Immun- Serum
PI3K	Engl.: "Phosphatidyl- inositol 3- kinase"
PIX/COOL	Engl.: "Pak- interactive exchange factor/ Cloned out of library"
PKL/GIT1	Engl.: "Paxillin kinase linker/ G protein- coupled receptor kinase- interactor- 1"
PLC γ	Phospholipase C gamma
pos.	Positiv
PR1/ PR2	Engl.: "Prolin- rich" protein
PTEN	Engl.: "Phosphatase and tensin homolog"
p21	Syn. zu "CDKN1A" von Engl.: "Cyclin dependent kinase inhibitor 1a"

p130Cas	Engl.: "Crk- associated substrate"
p190RhoGAP	Engl.: "GTPase activating protein for RhoA"
Raf-1	Engl.: "Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase"
Ral	Syn. zu "RALA" von Engl.: "V-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)"
RLC	Engl.: "Regulatory light chain"
RMS	Rhabdomyosarkom
ROCK	Engl.: "Rho kinase"
RPTK	Engl.: "Receptor protein- tyrosine kinase"
R-RAS	Engl.: "RAS related protein"
s.	siehe
S.	Seite
SEER	„Data of Surveillance, Epidemiology and End Results“
SH3	Engl.: "Src Homology 3"
SIOP	„Stockholm Working Classification of Renal Tumors of Childhood“
SNS	Sympathisches Nervensystem
SOS	Engl.: "Son of Sevenless"- Protein
SRBCT	Klein-, rund- und blauzellige Tumore von engl.: "Small round blue cell tumors"
Src	Engl.: "Steroid receptor coactivators"
Sog.	so genannt (es/en)
s. u.	siehe unten
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	Waschpuffer
TM4SF	Engl.: "Transmembrane 4 superfamily"
u. a.	unter anderem
VASP	Engl.: "Vasodilator- stimulated phosphoprotein"
VEGFR-3	Engl.: "Vascular endothelial growth factor receptor-3"
Vgl.	Vergleich
vs.	gegenüber

WASP

Engl.: "Wiskott Aldrich syndrome protein"

ZNS

Zentrales Nervensystem

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Anzahl der an das Deutsche Kinderkrebsregister gemeldeten Fälle, Inzidenzraten und Überlebenswahrscheinlichkeiten von 2003-2012 (Jahresbericht 2012), sowie der Überlebenswahrscheinlichkeiten von 1980-2004 (Jahresbericht 2005).....	14
Tab. 2	Antikörper, Konzentrationen und Inkubationszeiten	30
Tab. 3	Zusammenhang zwischen ED 98015 und FAK C 903 in der Gruppe der Nephroblastome.....	50
Tab. 4	Vorzeichentest NEP	50
Tab. 5	Präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP	50
Tab. 6	Subtypisierung der untersuchten Fälle innerhalb der Gruppen der Neuroblastome, Ewing- Sarkome und Rhabdomyosarkome.....	53
Tab. 7	Vorzeichentest NBL.....	55
Tab. 8	Vorzeichentest EWS und PNET.....	57
Tab. 9	Vorzeichentest RMS.....	60
Tab. 10	Wilcoxon- Test der vier AK im Vergleich von kryokonserviertem mit Paraffin- eingebettetem Gewebe	64
Tab. 11	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Tumorguppen	65
Tab. 12	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in NEP kategorisiert für FAK C 903	69
Tab. 13	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in NBL kategorisiert für FAK C 20	69
Tab. 14	Lebensstatus in den Tumorguppen	70
Tab. 15	Ereignis- freies Überleben (Monate) in den Haupttumorguppen.....	70
Tab. 16	Mittelwerte für die berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten.....	73
Tab. 17	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Haupttumorguppen der Überlebensanalyse	73
Tab. 18	Log Rank- Werte der Haupttumorguppen beim Vergleich der Überlebensraten.....	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Vergleich der Erstdiagnosealter der verschiedenen Tumorgruppen	18
Abb. 2	FAK: Struktur, Phosphorylierungsstellen und assoziierte Proteine	22
Abb. 3	Integrin Signalgebung	22
Abb. 4	GRAF Domänstruktur.....	24
Abb. 5	Hypothetisches Modell zur Regulation des Zellzyklus durch GRAF.....	24
Abb. 6	Anzahl der untersuchten Primärtumorfälle in Paraffin- eingebettetem Gewebe	28
Abb. 7	Vimentin- Immunreaktivität.....	31
Abb. 8	Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt "RMS (Nr. 8)"	33
Abb. 9	Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt "NBL/ EWS (Nr. 12)"	33
Abb. 10	Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt „NEP (Nr. 18)".....	33
Abb. 11	Ösophagusgewebe: Exemplarische Darstellung	35
Abb. 12	Prostatagewebe: Exemplarische Darstellung	36
Abb. 13	Prozentualer Anteil der einzelnen Tumorgruppen in Bezug auf die Gesamtfallzahl.....	45
Abb. 14	Geschlechtsverteilung innerhalb der Tumorgruppen.....	46
Abb. 15	Altersverteilung innerhalb der Tumorgruppen.....	46
Abb. 16	Proteinexpression in der Gruppe der Neuroblastome	48
Abb. 17	FAK C 903- Proteinexpression in NEP	51
Abb. 18	FAK C 20- Proteinexpression in NEP	51
Abb. 19	FAK A 17- Proteinexpression in NEP.....	51
Abb. 20	ED 98015- Proteinexpression	52
Abb. 21	Proteinexpression in der Gruppe der Neuroblastome	53
Abb. 22	FAK C 903- Proteinexpression in NBL.....	54
Abb. 23	FAK C 20- Proteinexpression in NBL.....	54
Abb. 24	FAK A 17- Proteinexpression in NBL.....	55
Abb. 25	FAK C 903- Proteinexpression in Ewing-Sarkomen und peripheren neuroektodermalen Tumoren.....	56
Abb. 26	FAK C 20- Proteinexpression in EWS und PNET.....	57
Abb. 27	FAK A 17- Proteinexpression in EWS und PNET	57
Abb. 28	Proteinexpression in der Gruppe der EWS und PNET	58

Abb. 29	Proteinexpression in der Gruppe der Rhabdomyosarkome	59
Abb. 30	FAK C 903- Proteinexpression in RMS.....	60
Abb. 31	FAK C 20- Proteinexpression in RMS.....	60
Abb. 32	FAK A 17- Proteinexpression in RMS.....	61
Abb. 33	Proteinexpression in der Gruppe der Ganglioneurome	62
Abb. 34	Immunreaktivität von ED 98015 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung	63
Abb. 35	Immunreaktivität von FAK C 903 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung	63
Abb. 36	Immunreaktivität von FAK C 20 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung	64
Abb. 37	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Tumorguppen	65
Abb. 38	Korrelation zwischen Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) und Mitoserate im Gesamtkollektiv	66
Abb. 39	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie bei NEP	67
Abb. 40	Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1 Reaktion/ angefärbte Zellen) und Mitosen.....	68
Abb. 41	Ereignis- freies Überleben (Monate) in den Haupttumorgruppen.....	71
Abb. 42	Gesamtüberleben (Monate) in den Haupttumorgruppen.....	71
Abb. 43	Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in den Haupttumorgruppen	72

1 EINLEITUNG

1.1 MALIGNE ERKRANKUNGEN IM KINDES- UND JUGENDALTER

Maligne Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter umfassen ein sehr breites Spektrum. Zu den häufigsten zählen Leukämien, Lymphome und ZNS- Tumore. Es finden sich aber auch Tumore des sympathischen Nervensystems, der Nieren oder Leber, des Weichteilgewebes und der Knochen, sowie der Retina und der Keimzellen. Obwohl im Bezug auf die Gesamtbevölkerung nur 1-2% aller Malignome bei Kindern auftreten, sind sie dennoch die zweithäufigste Todesursache in dieser Altersklasse (1). **Tab. 1**, S. 14 gibt einen Überblick über Häufigkeit und Inzidenz der Malignome des Kindesalters in Deutschland für die Jahre 2003-2012, sowie deren 5- Jahres- Überlebensrate im gleichen Zeitraum und ergänzend von 1980-2004 (2), da während dieser Zeitspanne die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle diagnostiziert und behandelt wurden. Außerdem sind die in dieser Arbeit untersuchten Tumorgruppen in **Tab. 1**, S. 14 graphisch hervorgehoben. Tumore des Kindes- und Jugendalters unterscheiden sich von denen des Erwachsenenalters durch ihren Ursprung und den histologischen Subtyp. Untereinander lassen sich die einzelnen Tumorgruppen unter anderem durch ihr altersspezifisches Auftreten, sowie das Ansprechen auf Therapie und den damit verbundenen Behandlungserfolg, bzw. die Prognose voneinander abgrenzen (3).

1.2 KLEIN-, RUND- UND BLAUZELLIGE TUMORE

Klein-, rund- und blauzellige Tumore (engl.: „small round blue cell tumors“ (SRBCT)) bestehen aus vielen kleinen, runden Tumorzellen, die wenig Zytoplasma, aber dichte, chromatinreiche Kerne enthalten. Ihr Aussehen ähnelt den primitiven Vorläuferzellen (4). Die Morphologie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorgruppen entspricht im Wesentlichen dem Zelltyp der SRBCT. Es handelt sich bei den untersuchten embryonalen Tumoren im Einzelnen um Nephroblastome (NEP) und Neuroblastome (NBL), sowie einzelne Ganglioneurome (GN). Außerdem wurden Knochen- und Weichteilsarkome des Kindes- und Jugendalters untersucht. Dies waren Ewing- Sarkome (EWS) und (periphere) primitive neuroektodermale Tumore (pPNET), sowie Rhabdomyosarkome (RMS).

Tab. 1 Anzahl der an das Deutsche Kinderkrebsregister gemeldeten Fälle, Inzidenzraten und Überlebenswahrscheinlichkeiten von 2003-2012 (Jahresbericht 2012), sowie der Überlebenswahrscheinlichkeiten von 1980-2004 (Jahresbericht 2005)

Diagnosegruppe	Anzahl der Fälle in Deutschland 2003-2012	Prozentualer Anteil	Inzidenz pro 100.000 Kinder		5- Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit	
			Altersstandardisiert	Kumulativ	1980-2004	2003-2012
Leukämien	5989	34	5,6	80,7		
Lymphome	1964	11	1,6	25,1		
Tumore des ZNS	4254	24	3,8	56,5		
Tumore des SNS:	1232	7	1,4	17,5		
davon Neuroblastome	1222	7	1,3	17,4	67	79
Nierentumore:	965	5	1,0	13,4		
davon Nephroblastome	919	5	1,0	12,8	87	94
Weichteiltumore:	1029	6,0	0,9	13,7		
davon Rhabdomyosarkome	554	3	0,5	7,5	65	72
Knochentumore	778	4	0,6	9,8		
davon Ewing- Sarkome	349	2	0,3	4,4	64	70
Lebertumore	232	1	0,2	3,2		
Keimzelltumore	530	3,0	0,5	7,0		
Retinoblastome	370	2	0,4	5,3		
Karzinome	329	2	0,3	4,2		
Andere	25	0,0	0,0	0,3		
Gesamt	17697	100	16,3	236,8	75	84

Alterstandardisierte Inzidenz berechnet nach Segi World Standard Population: Jährliche Erkrankungsrate bezogen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahre aus der deutschen Wohnbevölkerung nach Diagnose auf Basis des ICC-3.

Kumulative Inzidenz: Wahrscheinlichkeit für ein Neugeborenes bis zum 15. Lebensjahr zu erkranken.

Datenquelle: www.kinderkrebsregister.de, Jahresbericht 2005 (entnommen aus Tab. 8) und Jahresbericht 2012 (modifiziert nach/ entnommen aus Tab. 1)

1.2.1 Embryonale Tumore (Blastome)

Hierunter fasst man Tumore zusammen, deren Entwicklung von der embryonalen Organ- und Gewebereifung ausgeht, und die daher morphologische Ähnlichkeiten mit dem Blastem des entsprechenden Organs aufweisen. Tumore, die aus diesen stark proliferierenden Zellen entstehen, enthalten mesenchymale und epitheliale Gewebekomponenten. Zu den embryonalen Tumoren zählen das Nephroblastom der Niere, sowie die neuroblastischen Tumore des sympathischen Nervensystems und das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS). Die embryonalen Tumore bilden eine wichtige Untergruppe der Tumore des Kindesalters und kommen beim Erwachsenen kaum vor (1).

1.2.1.1 Nephroblastome

Das NEP (Synonym: Wilms- Tumor) ist der häufigste primär maligne Nierentumor im Kindesalter und tritt vor allem zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr auf (s. **Abb. 1**, S. 18). Für einen Teil der NEP ist die Ursache auf genetisch bedingte Syndrome, wie z.B. das Beckwith-Wiedemann-Syndrom oder das Danys- Drash- Syndrom, zurückzuführen. Das NEP geht von den Zellen des metanephrogenem Blastems aus. Neben der typisch blastemischen SRBCT- Morphologie kommen häufig Zellen epithelialer und stromaler Differenzierung vor. In Anlehnung an die SIOP- NEP- Studien, in denen vor allem der histologische Typ, sowie Stadium und Tumorgröße als wichtigste Prognosefaktoren gefunden wurden (5), unterteilt man die NEP in drei (histologische) Risikogruppen: niedrige, intermediäre und hohe Malignität. Bei der Einteilung ist weiterhin zu berücksichtigen, sowie typischerweise als Behandlungsstrategie im Rahmen der SIOP- Studien favorisiert (6), ob es sich um eine Resektion nach präoperativ durchgeführter, so genannter neoadjuvanter Chemotherapie oder um eine primäre Resektion handelt. Bei den Tumoren niedriger Malignität unterscheidet man histologisch das mesoblastische, das zystische, das partiell differenzierte und das komplett nekrotische NEP. Standardrisiko gilt für epithelreiches, stromareiches, gemischtes und regressives NEP, sowie NEP mit fokaler Anaplasie. Zu den Tumoren hoher Malignität zählen das blastemreiche NEP, und das NEP mit diffuser Anaplasie (1, 3, 7).

1.2.1.2 Neuroblastische Tumore

Der häufigste extrakranielle solide Tumor bei Kindern ist das NBL (s. **Tab. 1**, S. 14). Als embryonaler Tumor tritt es in erster Linie im Säuglings- und Kleinkindalter auf. So sind ein Drittel aller im ersten Lebensjahr diagnostizierten Tumorfälle NBL. Eine genetische Prädisposition ist bisher nicht genau bekannt. Das bösartige und oft rasch progredient wachsende NBL entsteht aus

Zellen der Neuralleiste, die während der Ausbildung des sympathischen Nervensystems (Nebennierenmark, Grenzstrang) in einem unreifen Stadium verblieben sind. Entsprechend besteht ein NBL ganz überwiegend aus unreifen Neuroblasten. Eine zusätzliche Ausreifung in Ganglienzellen, die meist disseminiert im Tumorgewebe vorliegen, kann beobachtet werden. Beträgt dieser Differenzierungsanteil $<5\%$ spricht man von einem gering differenziertem NBL, bei $>5\%$ von einem differenzierten NBL. NBL kommen zu zwei Drittel im abdominellen Bereich vor, hier vor allem im Bereich der Nebennieren. Die nach der internationalen Neuroblastomklassifikation (INPC) empfohlene Einteilung beruht auf der Shimada-Klassifikation, erstmals von 1984. Hierbei werden u. a. der Differenzierungsgrad der Tumorzellen, der Gehalt an Schwann-Zellen, sowie die Proliferationsaktivität (Mitose-Karyorhexis-Index) ausgewertet und in Relation zum Alter des Patienten gesetzt, woraus sich eine günstige und ungünstige Prognosegruppe ergibt. Vor allem das Alter bei Diagnosestellung (**Abb. 1**, S. 18), aber auch der Nachweis bzw. das Fehlen molekulargenetischer Marker sind neben dem Erkrankungsstadium hilfreiche Parameter zur Prognoseeinschätzung. Innerhalb eines Stadiums bleibt der Alterseinfluss erhalten. Kinder unter einem Jahr haben eine deutlich bessere Prognose als ältere Kinder. Insgesamt können sehr variable Krankheitsverläufe auftreten. So besteht, vornehmlich bei Erkrankung im Säuglingsalter, die Möglichkeit der Spontanregression, selbst bei disseminierten Formen. Neben dieser Variante ist auch eine spontane Tumorausreifung möglich, dies jedoch hauptsächlich bei Erkrankungsbeginn nach dem ersten Lebensjahr. Die Therapie muss Risikoadaptiert und an die verschiedenen Verlaufsformen angepasst erfolgen. Es stehen neben operativer Therapie, verschiedene Chemotherapeutika, Strahlentherapie, sowie autologe Stammzellreinfusion, zur Verfügung. Auch eine Kombination der verschiedenen Therapieansätze wird durchgeführt (3, 7, 8).

Eine weitere Gruppe der neuroblastischen Tumore ist das Ganglioneuroblastom (GNBL). Es besteht aus einer Mischung von Neuroblasten, Schwannzellproliferaten und Ganglienzellen unterschiedlichen Reifegrades. Man unterscheidet die diffuse und noduläre Form, womit die Anordnung der neuroblastischen Herde im Tumorgewebe beschrieben wird. Beiden gleich ist definitionsgemäß die Bedingung, dass der ganglioneuromatös ausgereifte Anteil der Zellen des Tumorgewebes $> 50\%$ betragen muss (3, 7, 8).

GN sind die letzte Untergruppe, bzw. mögliche spontane Ausreifungsform der neuroblastischen Tumore. Das Tumorgewebe besteht ausschließlich aus ganglioneuromatösen reifen Strukturen, wie Ganglienzellen, Schwann-Zellen und Neurofibrillen, und ist im eigentlichen Sinn nicht mehr als maligne anzusehen (3, 7, 8).

1.2.2 Sarkome im Kindes- und Jugendalter

Die Sarkome im Kindes- und Jugendalter repräsentieren ungefähr 6% aller Malignome im Kindesalter (s. **Tab. 1**, S.14). Insgesamt handelt es sich um eine sehr inhomogene Krankheitsgruppe, zu der neben den Rhabdomyosarkomen, u. a. auch Fibrosarkome, (periphere) primitive neuroektodermale Tumore (pPNET) und Synovialsarkome zählen. Primäre maligne Knochentumoren sind, mit einem Anteil von ca. 0,5% an allen malignen Tumoren des Menschen, sehr selten. Betroffen sind jedoch vor allem Kinder und Jugendliche. Knochentumore machen ungefähr 4-5% aller Malignome des Kindes-, und vor allem Jugendalters aus. Hierzu zählen in erster Linie das Osteosarkom und das EWS (7).

1.2.2.1 Rhabdomyosarkome

Das RMS kommt beim Erwachsenen nur sehr selten vor, beim Kind macht es jedoch über 50% aller malignen Tumore des Weichgewebes aus (9). Beim RMS handelt es sich um einen hochmalignen Tumor, der von undifferenzierten, pluripotenten Mesenchymzellen ausgeht und verschieden starke, rhabdomyosarkomatöse Differenzierungen aufweist. Bevorzugte Lokalisation ist die Kopf- und Halsregion, sowie das Becken und der Urogenitaltrakt. Klassifiziert werden die RMS nach der internationalen RMS- Klassifikation von Newton aus 1995. Es werden 3 Gruppen mit unterschiedlicher Prognose voneinander abgegrenzt: Zu den RMS mit günstiger Prognose zählen die histologischen Subtypen spindelzelliger und botryoider Typ, intermediäre Prognose haben das klassische embryonale RMS (ERMS) und das pleomorphe RMS. Ungünstige Prognose gilt für das alveoläre RMS, welches aufgrund der deutlich unterschiedlichen Altersverteilung, dem überwiegenden Auftreten an den Extremitäten und durch eine charakteristische Translokation vom ERMS abgegrenzt werden muss. In mehr als zwei Drittel der Fälle handelt es sich hierbei um eine Translokation des PAX3- bzw. PAX7- Gens auf Chromosom 2 bzw. 1 mit dem FKHR- Gen auf Chromosom 13 (t (2; 13) oder t (1; 13)) (10). Bedeutend für die Prognose ist neben dem Tumorstadium und dem histologischen Subtyp auch das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (s. **Abb. 1**, S. 18). Diese wird oberhalb des 10. Lebensjahres insgesamt schlechter (1, 3, 7, 8, 11).

1.2.2.2 Ewing- Sarkome und periphere neuroektodermale Tumore

Man geht davon aus, dass die hierunter zusammengefassten Tumoren, neben histologischen und klinischen Kriterien, in der Mehrzahl der Fälle eine Translokation zwischen dem FLI1- Gen auf Chromosom 11 oder dem ERG- Gen auf Chromosom 21 mit dem EWSR1- Gen auf Chromosom 22 (t (11; 22) oder t (21; 22)) aufweisen (12). Morphologisch und immunhistochemisch

unterscheidet man das klassische und atypische EWS, sowie den (p)PNET, fort an nur noch PNET bezeichnet, welcher synonym für den malignen peripheren neuroektodermalen Tumor (MPNT) gebraucht wird und bei Lokalisation in der Thoraxwand als Askin- Tumor bekannt ist. Das EWS betrifft überwiegend Jugendliche in der ersten und zweiten Lebensdekade (**Abb. 1**, S. 18). Es manifestiert sich vorwiegend in den langen Röhrenknochen. Betroffen sind hier in erster Linie die Diaphysen von Femur, Tibia und Humerus, aber auch das Becken. Auch ein extraossäres Vorkommen ist möglich. Seinen Ausgang nimmt das EWS wahrscheinlich vom Neuroektoderm. Das histologische Bild der Ewing-Tumore imponiert mit monomorphen, rundlichen Zellen, die in dichten Rasen angeordnet sind. Die Prognose ist u. a. von der Lokalisation, sowie Größe des Tumors, ggf. bestehender Metastasierung und Alter des Patienten bei Diagnosestellung abhängig (3, 7, 8).

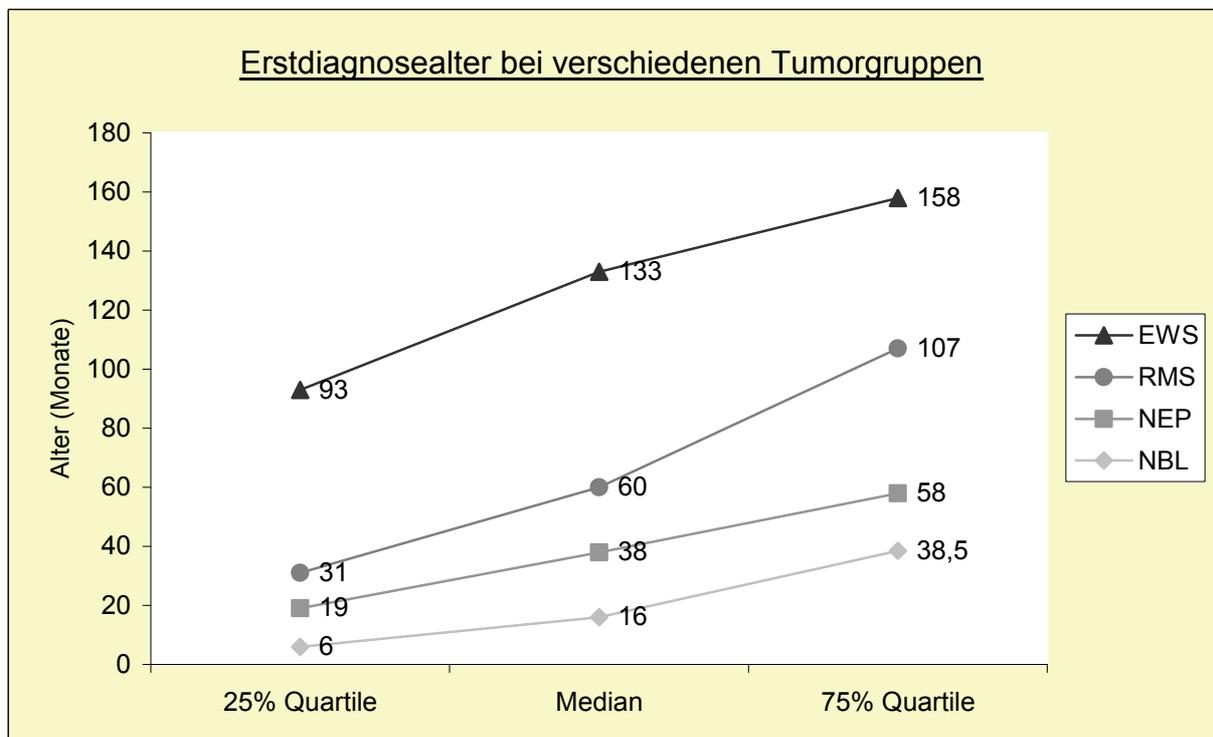


Abb. 1 Vergleich der Erstdiagnosealter der verschiedenen Tumorgruppen
Entnommen aus bzw. verändert nach (2); aus Jahresbericht 2012 (Daten von 1980-2012)

1.3 GRUNDLAGEN DER TUMORENTSTEHUNG

Die Tumorentstehung wird auf genetische Veränderungen der Zellen zurückgeführt. Hierfür kommen bspw. Deletionen, Punktmutationen oder epigenetische Veränderung in Frage, die zur pathologischen Aktivierung von Proto- Onkogenen im Sinne einer Transformation zu Onkogenen

oder zum Verlust und damit zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Als Folge resultiert eine veränderte Signaltransduktion, die zu pathologischer Proteinexpression und damit zu Veränderungen in den grundlegenden Zellprozessen, wie Zellteilung bzw. Zellzyklusregulation, Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und Invasion führen kann. Damit wird die Voraussetzung für unkontrolliertes und eigenständiges Zellwachstum über die normalen Grenzen der Gewebemöostase hinaus geschaffen (7).

1.3.1 Protoonkogene und Onkogene

Protoonkogene sind essentielle Gene für Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zellwachstum und kommen somit in jeder Zelle vor. Je nachdem für welche Proteine sie kodieren, kann man sie in verschiedene Gruppen einteilen, wie bspw. Wachstumsfaktor-Rezeptoren an der Zelloberfläche, Wachstumsfaktoren, G-Proteine, nukleäre Transkriptionsfaktoren oder Nicht- Rezeptor-Proteinkinasen, wie bspw. Tyrosinkinasen (7, 13). Prinzipiell können Protoonkogene durch Mutationen, Deletionen oder Überexpressionen so verändert und damit aktiviert werden, dass sie sich in Onkogene transformieren. Onkogene sind also, wie die Protoonkogene, Teil des Erbgutes der Zelle. Sie verhalten sich jedoch funktionell dominant gegenüber Protoonkogenen. Hierzu reicht bereits eine genetische Veränderung in nur einem der beiden funktionell wirkenden Allele aus. Es kommt in der Folge zu einer vermehrten Produktion und Expression der onkogenen Proteine und damit zur unphysiologisch gesteigerten oder fehlstrukturierten Signaltransduktion (14, 15). Beispielhaft kann hierfür die häufig in soliden Tumoren des Menschen, wie auch in ca. 20% der ERMS- Fälle, nachweisbare Mutation der RAS- Onkogene genannt werden (16).

1.3.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene sind physiologisch vorhandene, negative Regulatoren des Zellzyklus. Sie wirken negativ regulierend auf Proto- Onkogene. Im Unterschied zur “funktionell dominanten“ Aktivierung von Proto- Onkogenen zu Onkogenen, führt erst der Funktionsverlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens zur neoplastischen Transformation der Zelle. Dies geschieht typischerweise durch Punktmutationen oder Deletionen. Solange noch ein funktionstüchtiges Allel vorhanden ist, wird die Entwicklung eines Tumors unterdrückt (14, 15). Eines der am häufigsten in Tumoren mutierte Tumorsuppressorgen ist bspw. das p53-Gen (17). p53 übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Zellzykluskontrolle bei DNS-Schädigung (18). Es vermittelt die Arretierung in der G-Phase, damit die DNS-Schäden repariert werden können. Durch seine Aktivität als Transkriptionsfaktor oder auch die direkte Insertion in der mitochondrialen Membran ist es außerdem Ausgangspunkt für die Initiation von Apoptosesignalwegen, bspw. wenn eine Reparatur der geschädigten DNS nicht möglich ist (19). Auch wenn p53 bspw. in Neuroblastomen

nur selten in mutierter Form nachgewiesen wird, so ist es doch in den meisten Fälle funktionell inaktiviert, bspw. durch das negativ regulierende Protoonkogen MDM2, welches als Transkriptionsfaktor von N-MYC identifiziert wurde (20, 21). Für RMS, EWS und NBL wiederum wurde bspw. eine reduzierte bis fehlende Expression des p16INK4a- Tumorsuppressorgens beschrieben (7, 22).

1.4 SIGNALTRANSDUKTION

Als Signaltransduktion wird ein Prozess beschrieben, mittels dessen Zellen an ihrer Oberfläche Reize aufnehmen und sie kontrolliert an den Zellkern weiterleiten. Die extrazellulären Reize können bspw. mittels Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, der extrazellulären Matrix, Zytokinen oder Hormonen übermittelt werden, die an spezifischen Rezeptoren binden. Es handelt sich bei den Rezeptoren um Proteine in der Zellmembran bzw. innerhalb der Zelle. Man unterscheidet sie nach Lokalisation, Aufbau und Funktion in verschiedene Gruppen, wie zytosolische und membranständige Rezeptoren, Ionenkanäle, G-Protein- gekoppelte- Rezeptoren, sowie Enzym- gekoppelte Rezeptoren. Nach Bindung der Reize an die Rezeptoren wird in der Folge eine Aktivierung spezifischer Proteinsignalkaskaden und Effektorproteine innerhalb der Zelle hervorgerufen. Hieran sind, neben Enzymen und sekundären Botenstoffen auch häufig koordinierte Protein- Protein- Interaktionen beteiligt. Im Sinne der Verstärkung eines Signals können zwischengeschaltete Effektoren weitere Effektoren aktivieren, welche ihrerseits wieder mehrere Effektormoleküle aktivieren. Aber auch negative Rückkopplung, reduzierte Proteinexpression und damit reduzierte Aktivierung von Signaltransduktionsproteinen sind Teil der Regulationsvorgänge (23, 24). Störungen dieser physiologischen Prozesse durch aktivierte Onkogene bzw. inaktivierte Tumorsuppressorgene und der entsprechend beteiligten Proteine können zu unkontrollierter Zellproliferation und damit Tumorentstehung und Tumorwachstum führen (7).

1.4.1 Fokale Adhäsionskinase

1991 wurde erstmals durch Guan und Kollegen ein 120 kDa- großes Protein mit dem Namen „pp120“ beschrieben, welches nach Bindung der Zelle an Fibronectin- beschichtete Oberflächen oder Anti- Integrin- Antikörper an seiner Tyrosinbindungsstelle phosphoryliert wird und in fokalen Kontaktstellen zusammen mit β 1- Integrienen lokalisiert vorliegt (25). Durch Schaller und Kollegen konnte fast zeitgleich in 1992 die cDNA einer zytoplasmatischen Protein- Tyrosinkinase von 125 kDa „pp 125“ in normalen Hühnerembryozellen, nach deren Transformation mit dem Rous-Sarcoma- Virus kodierenden Onkoprotein pp60v-src, isoliert werden (26). Es handelte sich hierbei um eines der am stärksten phosphorylierten Proteine innerhalb der Zellen, welches an fokalen

Adhäsionen lokalisiert vorlag und damit um das gleiche Protein, welches bereits Guan und Kollegen beschrieben hatten und welches in der Folge als fokale Adhäsionskinase (FAK) bezeichnet wurde (26). Die FAK ist eine Tyrosinkinase, die im Integrin- vermittelten Signalweg ein Schlüsselfunktion einnimmt (27). Kinasen binden auf der zytoplasmatischen Seite von Integrinen in Multiprotein-Komplexen, den sog. fokalen Adhäsions-Kontaktstellen, welche intrazelluläre Gerüststrukturen (Aktinzytoskelett) an die Plasmamembran bzw. die extrazelluläre Matrix (EZM) verknüpfen (28). FAK trägt sowohl in gesunden, aber auch und vor allem in Tumorzellen, entscheidend zur Übermittlung und Weiterleitung von Signalen nach intrazellulär und Aktivierung von unterschiedlichsten Signalkaskaden bei (27). So berichten Zhao und Kollegen u. a. über eine durch FAK induzierte Aktivierung des PI3K/ Akt- Signaltransduktionswegs durch Bindung von FAK über seine autophosphorylierte Y397- Bindungsstelle an die p85 Untereinheit von PI3K und die folgende Aktivierung der Akt Kinase, was zur Inhibierung der Apoptose und somit zur Tumorentstehung führen kann (27). Als wichtiger Bestandteil für die Aktivierung von FAK über die Y397- Bindungsstelle wurde kürzlich auch die spezifische Dimerisierung der FERM- Domäne beschrieben, die über eine Interaktion zwischen FERM- und FAT- Domäne stabilisiert wird (29). Durch eine Komplexbildung von FAK mit Src wird die Phosphorylierung von FAK an dessen Y925 Bindungsstelle ermöglicht und in der Folge die Interaktion mit Grb2, sowie die Aktivierung des RAS/ Erk- Signaltransduktionsweges eingeleitet. Dies stellt einen der möglichen Einflusswege von FAK auf die Regulation der Zellproliferation dar. Durch die genannte FAK/ Src- Komplexbildung kann es aber auch zur Phosphorylierung des Adaptormoleküles Cas kommen, was die Komplexbildung mit Crk ermöglicht. Der Cas/ Crk- Komplex hat über DOCK180 und Rac regulativen Einfluss auf die Zellmigration (27). Neben Rac ist auch für RhoA, einem weiteren Mitglied der Rho- GTPasen- Familie, ein Einfluss auf die Regulation und Organisation des Zytoskelett- Aufbaus, und damit der Migration, durch FAK belegt. Der strukturelle Aufbau der FAK, ihre Phosphorylierungsstellen und die beteiligten Proteine, auch im Bezug auf die vorher exemplarisch genannten Signalwege sind in **Abb. 2**, S. 22 dargestellt. Ergänzend hierzu gibt **Abb. 3**, S. 24 (30) einen Einblick in die Komplexität der Integrin Signalgebung und zeigt die zentrale Stellung von FAK und seinem Interaktionspartner GRAF, der im folgenden Kap. 1.4.2, S. 22, genauer beschriebenen werden soll. Es wird deutlich, wieso FAK entscheidenden Einfluss auf Zellüberleben und Apoptose, Zellzyklusprogression und Proliferation, sowie fokale Adhäsionen und Migration hat. Diese Funktionen sind für eine normale embryonale Entwicklung relevant, was auch erklärt, dass Veränderungen dieser essentiellen Funktionen maßgeblich an der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumoren beteiligt sein können (27).

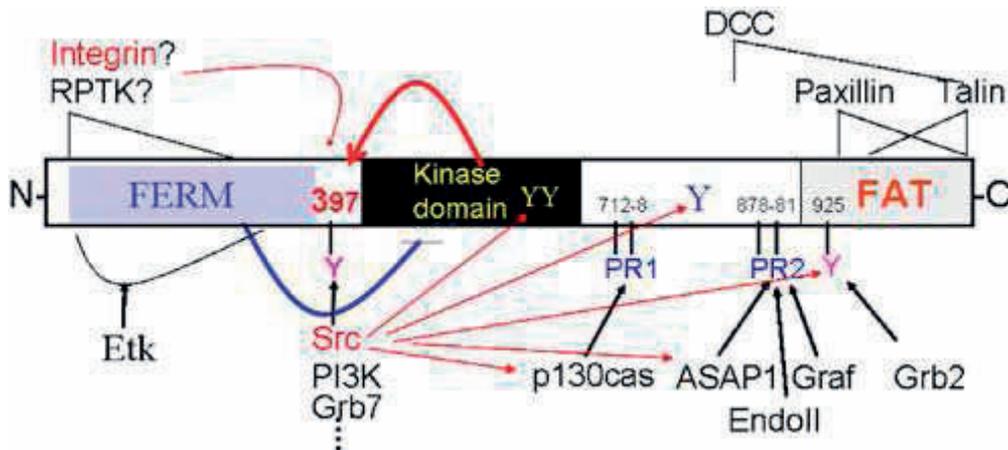


Abb. 2 FAK: Struktur, Phosphorylierungsstellen und assoziierte Proteine
Entnommen aus: (27)

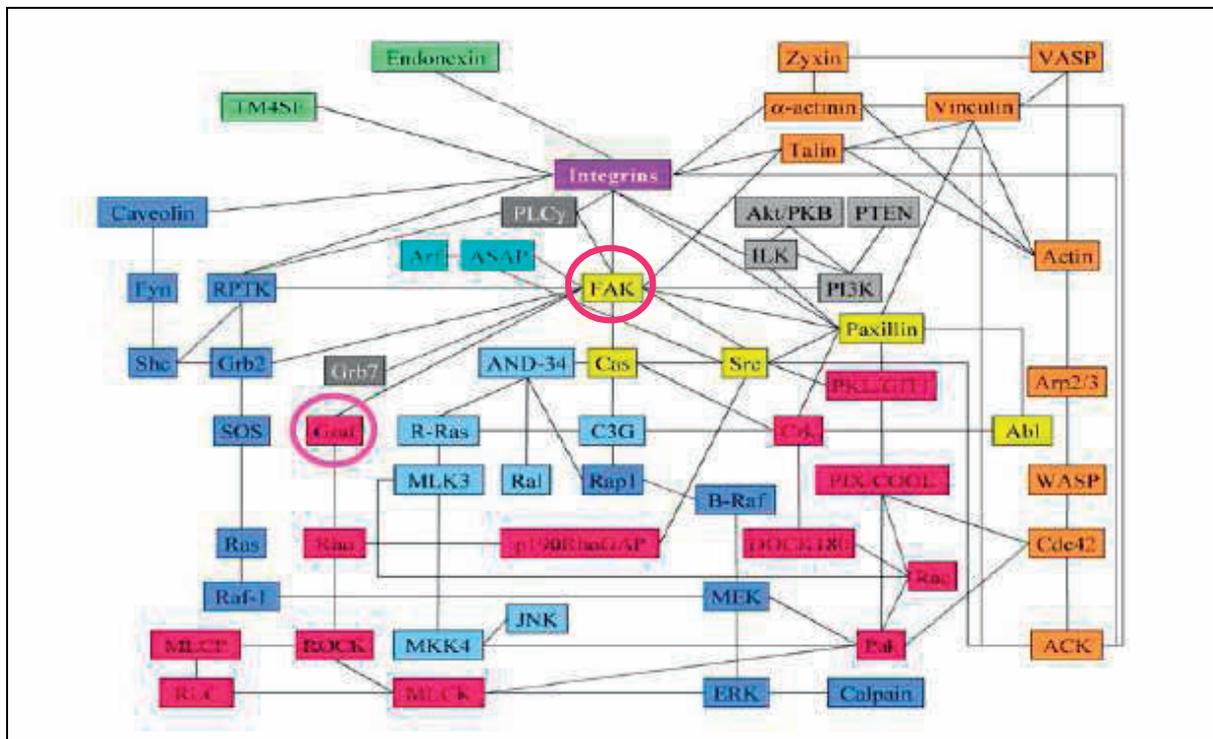


Abb. 3 Integrin Signalgebung
Entnommen aus: (15, 30)

1.4.2 GTPase Regulator assoziiert mit FAK pp125

Erstmals wurde das, für ein überwiegend zytoplasmatisch vorliegendes Protein namens „GTPase Regulator assoziiert mit FAK pp125“ (GRAF), kodierende Gen in embryonalen Zellen des Huhn nachgewiesen (31). Die Bezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass die Src Homology 3 (SH3) - Domäne des GRAF- Proteins beim Huhn ein Verbindungsglied zum C- terminalen Ende der fokalen Adhäsionskinase (pp125FAK) darstellt, s. auch **Abb. 4**, S. 24.

Als alternative Bezeichnungen sind weiterhin gebräuchlich „RhoGTPase-activating protein 26“ (ARHGAP26) und „Oligophrenin- 1- like protein“ (OPHN1L) (32). Borkhardt und Kollegen fanden im Jahr 2000 das Gen eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP) als mutmaßlichen Translokationspartner in einem Fall von Mixed Lineage Leukemia (MLL), welches nach Vergleich der cDNA bzw. Aminosäuresequenz zu fast 90% dem GRAF- Gen des Huhns entsprach und daher als humanes GRAF- Gen bezeichnet wurde (33). Auch konnten sie in insgesamt drei Fällen von myelodysplastischem Syndrom (MDS)/ akuter myeloischer Leukämie (AML) mit Deletion 5q eine Veränderung beider Allele des Gens zeigen (33). Unlängst wurde in einer Arbeit von Aly und Kollegen auch der prognostische Wert der GRAF- Expression als unabhängiger prognostischem Faktor bei Patienten mit AML beschrieben (34). Hier war die GRAF- Expression bei Patienten mit AML signifikant niedriger im Vgl. zur gesunden Kontrollgruppe. Es ergaben sich in der Kaplan- Meier- Analyse Hinweise für ein längeres Gesamtüberleben bei Patienten mit höherer GRAF- Expression (34). Das humane GRAF- Protein besteht aus mehreren Domänen, hierunter eine nukleäre Zielsequenz, eine Immunglobulinbindungssequenz, eine Guanosintriphosphat- aktivierende Domäne (GAP- Domäne) und eine SH3-Domäne am Carboxyterminus (33). Die Domänstruktur von GRAF ist in **Abb. 4**, S. 24 graphisch dargestellt. GRAF wird als spezifischer Regulator der Rho- GTPasen Aktivität in vivo vermutet und führte in Swiss T3T- Zelllinien (Zelltyp „Fibroblasten“) zu einer negativen Regulierung des GTP- bindenden Proteins RhoA, indem es dessen GTPase Aktivität stimulierte (35). Für die Gruppe der Rho GTPasen sind neben RhoA vor allem noch Rac und Cdc42 zu nennen, welche neben ihrem Einfluss auf das Aktinzytoskelett, allesamt in der Lage sind, den Übergang von Swiss T3T Zellen aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus zu induzieren (33). Inhibitoren dieser GTP- bindenden Proteine, wie dies für GRAF als potentielles Tumorsuppressorgen bei MDS und AML im Bezug auf RhoA vermutet wurde (33), könnten in der Folge über das inhibitorische Regulatorprotein p21 entsprechend blockierend auf die DNA- Synthese im Rahmen der Zellzyklusprogression wirken, wenn die Zelle durch Ras und in der Folge die Mitogen- aktivierte Protein- Kinase (MAPK) onkogen transformiert wird (36-39). Dies wird in **Abb. 5**, S. 24 graphisch verdeutlicht (33). Allerdings wurde im Gegensatz dazu auch eine verstärkende Wirkung von GRAF auf Rho- abhängige Effekte in PC12- Zelllinien (Zelltyp „Phäochromozytom“) nachgewiesen, was zu der Überlegung führte, dass GRAF in bestimmten Zelllinien als Effektor von Rho GTPasen wirken könnte (35). GRAF selbst wird vermutlich durch die MAPK phosphoryliert und somit wohl auch reguliert, woraus ein indirekter Einfluss der MAPK (oder ihrer verwandter Kinasen) auf die Rho- vermittelten Veränderungen des Zytoskeletts in PC12- Zelllinien, und vielleicht auch anderen Zellen, resultieren könnte (40). Borkhardt und Kollegen konnten mit auf Spezifität getesteten Anti- GRAF- Antiseren

immunhistochemisch eine deutliche Expression des GRAF- Proteins bei normalem, d. h. nicht maligne verändertem Gewebe des Menschen nachweisen. Dies vor allem in epithelialen Zellen, dem Stratum corneum der Haut, in Ganglienzellen, den Insulin- produzierenden β - Zellen der Langerhans-Inseln der Pankreas und in schwächerer Intensität im Brustdrüsengewebe. Keine Expression zeigte sich in den Lymphozyten und dem Keimzellzentrum der Lymphknoten, sowie in nicht vaskularisiertem Binde- und Stützgewebe mesenchymalen Ursprungs, weißem Fettgewebe, hyalinem Knorpelgewebe und den Bindegewebszellen der meisten Organe, sowie in myelo- und lymphopoetischen Zellen. In Northern Blot Analysen an Gewebeproben von gesunden menschlichen Organen zeigte sich GRAF mRNA in Hirn, Herz oder auch der Plazenta, während Lunge, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur nur eine sehr schwache oder gar keine GRAF-Transkription zeigten (33).

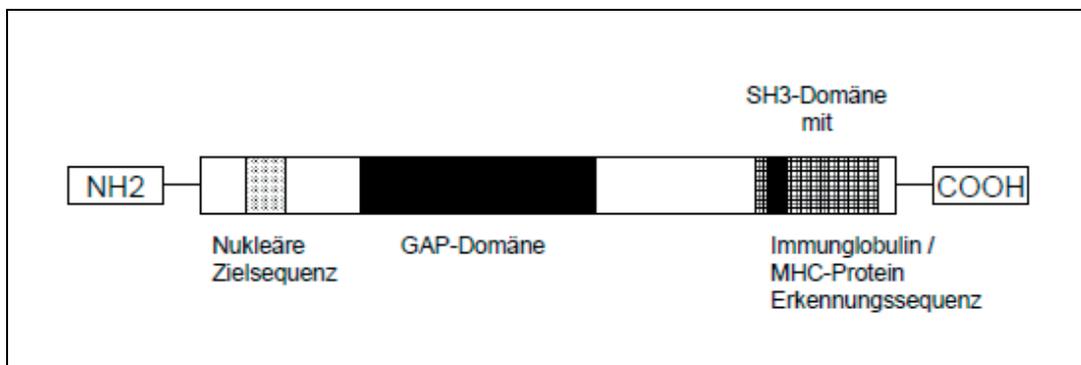


Abb. 4 GRAF Domänenstruktur

Entnommen aus bzw. modifiziert nach: (33)

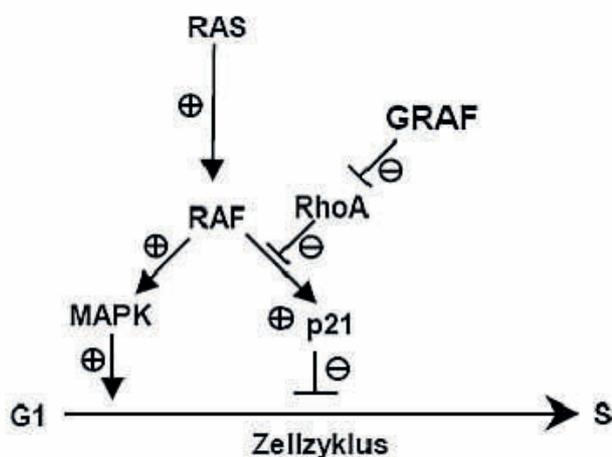


Abb. 5 Hypothetisches Modell zur Regulation des Zellzyklus durch GRAF

Entnommen aus: (33).

2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war es die auf GRAF und FAK bezogenen Signaltransduktionswege auf immunhistochemischer Ebene in soliden Tumoren des Kindesalters aufzuklären. Folgenden Fragen sollten durch diese Arbeit weiter geklärt werden:

- 1) Kann eine Expression der Signaltransduktionsproteine GRAF und FAK mittels immunhistochemischer Verfahren in den untersuchten Gruppen kindlicher Tumore (NEP, NBL und GNBL, RMS, EWS und PNET, sowie GN) nachgewiesen werden?
- 2) Welche Bedeutung bzw. welchen Einfluss kann dies auf die beteiligten Signaltransduktionswege und die Tumorentstehung in den untersuchten Tumorgruppen haben?
- 3) Gibt es innerhalb der Tumorgruppen Unterschiede oder Zusammenhänge in der Proteinexpression des zur Detektion verwendeten GRAF- mit den FAK- Antikörpern?
- 4) Gibt es Unterschiede oder Zusammenhänge beim Vergleich der Proteinexpression von GRAF und FAK an Paraffin- eingebettetem im Gegensatz zu kryokonserviertem Gewebe des jeweils identischen Tumorfalls?
- 5) Gibt es beim Vergleich der Immunreaktion der drei verschiedenen FAK- AK innerhalb der Tumorgruppen und im Hinblick auf die beiden Konservierungsformen Unterschiede oder sind diese gleichwertig einsetzbar?
- 6) Wie hoch ist die Wachstumsfraktion der untersuchten Tumorgruppen ermittelt anhand der Proteinexpression des Proliferationsmarkers MIB-1 (= Ki 67) und gibt es Unterschiede zwischen den Tumorgruppen?
- 7) Korrelieren die Wachstumsfraktion/ Ki 67 Index (MIB-1) und die Mitoserate im untersuchten Gesamtkollektiv miteinander?
- 8) Gibt es Unterschiede beim Vgl. der Wachstumsfraktion/ Ki 67 Index (MIB-1) beim Vgl. von NEP- Fällen mit präoperativ erfolgter Chemotherapie zu NEP- Fällen ohne präoperativ erfolgte Chemotherapie?
- 9) Gibt es Unterschiede oder Zusammenhänge beim Vgl. der Wachstumsfraktion (MIB-1/ Ki 67 Index) und der Immunreaktion der drei verschiedenen FAK- AK in den untersuchten Tumorgruppen?

10) Kann beim Vergleich der untersuchten Tumorgruppen ein Zusammenhang oder Unterschied für das Ereignis- freie Überleben und das Gesamtüberleben bzw. die berechnete Ereignis- freie und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden?

11) Kann ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsfraktion/ Ki 67 Index (MIB-1) und der Gesamt- Überlebenszeit (OAS= Over- all Survival) in den untersuchten Tumorgruppen gefunden werden?

3 MATERIAL & METHODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Untersuchungsgut

Es konnten initial 125 Fälle von Tumoren des Kindesalters zusammengestellt werden. Hierbei handelte es sich im Einzelnen um 30 Nephroblastome (NEP), 34 Neuroblastome (NBL) und Ganglioneuroblastome (GNBL), 25 Ewing- Sarkome (EWS) und periphere neuroektodermale Tumore (PNET), in Abbildungen nur als EWS bezeichnet, 29 Rhabdomyosarkome (RMS), allesamt maligner Dignität, sowie um 7 Ganglioneurome. Nach festgelegter Definition für das Untersuchungskollektiv durfte das Patientenalter der untersuchten Fälle bei Erstdiagnosestellung von Geburt bis zum vollendetem 18. Lebensjahr reichen. Zur Erhebung des Alters bei Erstdiagnosestellung und Sicherung der histopathologischen Diagnose (s. auch Kap. 3.1.2.1, S. 28) wurde zu allen Fällen der entsprechend archivierte pathologische Originalbefund gesichtet und Geburtsdatum, sowie Erstdiagnosezeitpunkt, als auch das Geschlecht der Patienten dokumentiert. Nach dieser ausführlichen Datenrecherche, sowie der in Kap. 3.2.1, S. 29 beschriebenen histopathologischen Voruntersuchung und Selektion mussten insgesamt 18 Fälle von den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden. Es verblieben insgesamt 107 Fälle, von denen 84 Fälle in Form von standardisiert Formalin- fixiertem Paraffin- eingebettetem Material (nachfolgend nur noch „Paraffin- eingebettetem Material“ genannt) vorlagen und somit in die Primärauswertung übernommen werden konnten (s. **Abb. 6**, S. 28). Im Einzelnen waren dies 23 NEP, 26 NBL und GNBL, 12 EWS und PNET und 18 RMS, sowie fünf Ganglioneurome (GN). Die Mehrzahl der untersuchten Fälle bzw. Gewebeproben stammten aus dem Einsendegut des Instituts für Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen aus den Jahren 1980-2004. Sie waren dort im Rahmen der Routinediagnostik untersucht und archiviert worden. Es handelte sich bei den Tumorfällen mehrheitlich um Primärtumoren und vereinzelt um Rezidivtumoren und Metastasengewebe. Teilweise lagen sowohl Primärtumorgewebe als auch Rezidiv- bzw. Metastasengewebe eines Falles vor, so dass dies ergänzend zum Primärtumorgewebe untersucht werden konnte. Auch diese Proben lagen überwiegend in Form von Paraffin- eingebettetem Material vor. Bei einem Teil der Fälle konnte nur kryokonserviertes Material, bzw. in einzelnen Fällen auch kryokonserviertes Gewebe im Doppel zu vorliegendem Paraffinmaterial des gleichen Falles untersucht werden. Zu Zwecken der Positivkontrolle wurden Normalgewebeproben von

Ösophagus (für den Anti- GRAF- AK ED 98015 und das Prae- Immun- Serum (PIS)) und Prostata (für alle 3 FAK- AK) verwendet.

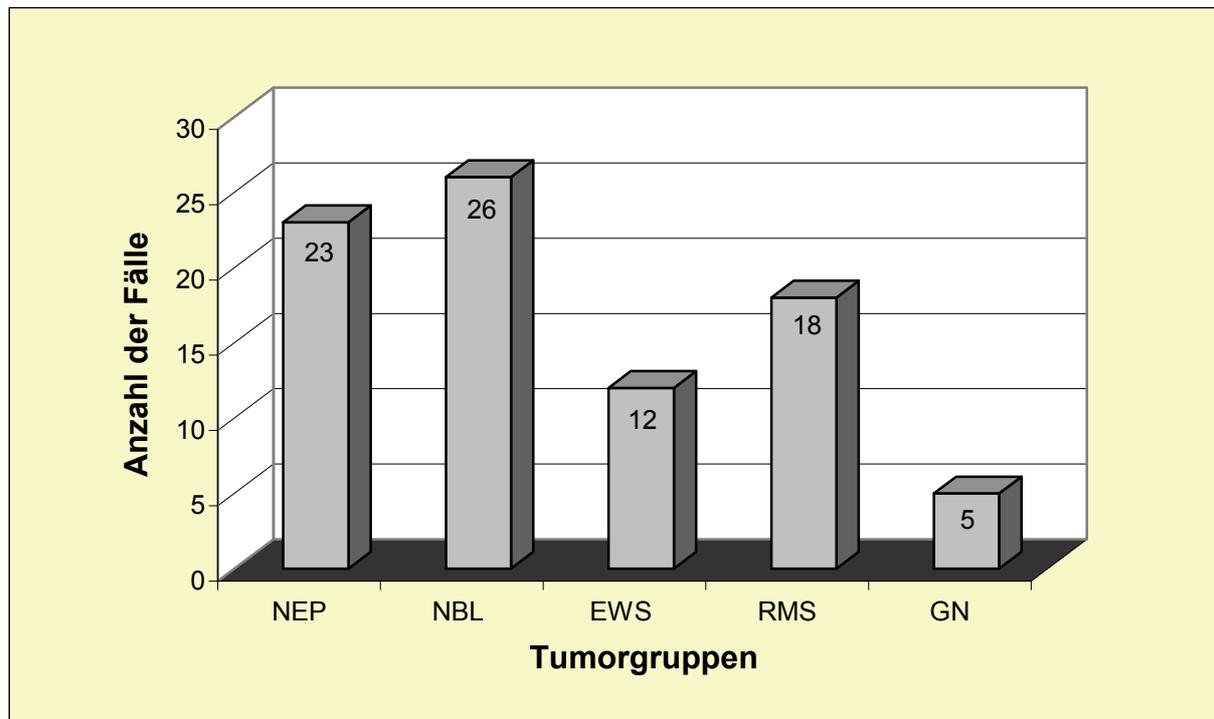


Abb. 6 Anzahl der untersuchten Primärtumorfälle in Paraffin- eingebettetem Gewebe

3.1.2 Klinisch- pathologische Befunde

3.1.2.1 Histologische Subtypisierung von NBL, EWS und RMS

Aus den histopathologischen Befunden konnte u. a. auch die Subtypisierung von NBL in NBL Grad 1 bis 3, sowie GNBL, sowie die Subtypisierung der Tumore der Ewing-Gruppe in EWS und PNET, als auch der RMS in RMS und embryonales RMS (ERMS) bzw. alveoläres RMS (ARMS) entnommen werden. Eine tabellarische Übersicht hierzu gibt **Tab. 6**, S. 53.

3.1.2.2 Präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP

In einem Teil der NEP- Fälle war es anhand der histopathologischen Originalbefunde möglich festzustellen, ob eine präoperative Chemotherapie erfolgt war. Eine Auflistung wird in **Tab. 5**, S. 50 gezeigt. Da die in dieser Arbeit untersuchten Fälle innerhalb eines Zeitraums von fast 25 Jahren diagnostiziert wurden, und zwischenzeitlich eine Veränderung der Therapieleitlinien erfolgt war, waren sowohl Fälle ohne, als auch mit präoperativ durchgeführter Chemotherapie im Untersuchungskollektiv vertreten. In einem geringen Teil der Fälle konnte anhand der

Befundunterlagen keine Information bzgl. einer präoperativ durchgeführten Chemotherapie erhoben werden.

3.1.2.3 Rezidiv- und Überlebensanalyse

Durch die in der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof. Dr. med. A. Reiter) des Universitätsklinikums Gießen archivierten Patientendaten war unter Mithilfe von Fr. S. Utsch eine Erhebung der Rezidiv- und Überlebensdaten im Großteil der Fälle möglich. Hierzu wurden zum Zeitpunkt der Datenerhebung folgende Differenzzeiträume in Monaten berechnet:

1. Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung bis zum Zeitpunkt des Auftretens eines Rezidives bzw. Rezidivfreiheit bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung entsprechen dem:
Rezidiv- freien Überleben/ „Event- free survival“ (EFS)
2. Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung bis zum Todeszeitpunkt bzw. Überleben bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung entsprechen dem:
Gesamtüberleben/ „Overall survival“ (OAS)

In einem kleinen Teil konnte der weitere Krankheitsverlauf bzw. der Verbleib der Patienten leider nicht aufgeklärt werden, da bspw. die Verlaufskontrolltermine nicht eingehalten wurden.

3.1.3 Antikörper

In dieser Arbeit wurden die in **Tab. 2**, S. 30 aufgeführten Antikörper (AK) eingesetzt.

Die Färbungen mit dem AK **MIB-1**, dem ersten paraffingängigen, Formalin- resistenten, monoklonalen AK- Klon, der dem nur an kryokonserviertem Nativgewebe nachweisbaren **Proliferationsmarkers Ki 67** entspricht, wurden im immunhistologischen Routinelabor des Institutes für Pathologie (damaliger Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz) durchgeführt.

3.2 METHODE

3.2.1 Histopathologische Voruntersuchungen und Selektion

Es wurden verschiedene Voruntersuchungen mit ggf. anschließend erforderlicher Selektion durchgeführt, um für die folgenden Untersuchungen eine optimale Immunreaktivität der Gewebeproben sicherzustellen.

3.2.1.1 Gefriermaterial

Zunächst wurde eine Auswahl der bereits mittels Routinediagnostik histopathologisch gesicherten Fälle entsprechend den zu untersuchenden Tumorgruppen des vorgenannten Diagnosezeitraums durchgeführt. Nachdem die archivierten Gewebeproben zusammengetragen waren, erfolgte die Schnittherstellung am kryokonservierten Material und Färbung in Hämatoxylin/ Hämalaun und Eosin (H&E). Mittels dieser Routinefärbung konnte eine Vorauswahl getroffen werden, in welchen Gewebeproben brauchbares und nicht durch autolytische Gewebeschäden beeinträchtigtes Tumormaterial vorhanden war. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Anti- Vimentin- AK (V9) im Sinne der „internen Kontrolle“ (41) der Immunreaktivität durchgeführt (**Abb. 7**, S. 31). Fälle mit schlechter oder fehlender Vimentin-Expression wurden nicht weitergehend untersucht.

Tab. 2 Antikörper, Konzentrationen und Inkubationszeiten

Antikörper ^{1 2}	Firma/Herkunft	Konzentration		t	Tier ³	s
		Kryo-Mat	Paraffin-Mat			
<i>Vimentin (V9), MK</i>	Dako, Hamburg	1:500	1:250	1/2 h	Maus	r, h, c
<i>ED 98015, PK</i>	Eurogentec, Brüssel	1:1000	1:250	1/2 h	Kaninchen	h
<i>FAK C 903, PK</i>	Santa Cruz, CA, USA		1:50	1 h	Kaninchen	m, r, h, z, x
<i>FAK C 20, PK</i>	Santa Cruz, CA, USA	1:500	1:250	1 h	Kaninchen	m, r, h, z, x, c
<i>FAK A 17, PK</i>	Santa Cruz, CA, USA	1:500	1:250	1 h	Kaninchen	m, r, h, c, x
<i>Ki 67, Clone MIB-1, MK</i>	Dako, Hamburg	-	1:50	Kit	Maus	h
<i>Prae- Immun- Serum (PIS)</i>	Eurogentec, Brüssel	1:1000	1:250	1/2 h	Kaninchen	h
MAK für ED 98015 und PIS	Dako, Hamburg		1:500	1/2 h	Maus	-
MAK für FAK C 903	Dako, Hamburg		1:250	1/2 h	Maus	-
MAK für FAK C 20	Dako, Hamburg	1:400	1:200	1/2 h	Maus	-
MAK für FAK A 17	Dako, Hamburg		1:400	1/2 h	Maus	-
KAM	Dako, Hamburg		1:40	1/2 h	Kaninchen	-
APAAP	Dako, Hamburg		1:50	1/2 h	Maus	-

¹ Kursiv geschriebene AK entsprechen den Primärantikörpern. t= Inkubationszeit in Stunden (h).
s= Spezifität. ² MK= monoklonal, PK= polyklonal. ³ m=Maus, r= Kaninchen, h= human, z= Zebrafisch,
x= Xenopus, c= Huhn.

3.2.1.2 Paraffinmaterial

Ausgehend von dem bereits untersuchten Gefriermaterial wurde eine erweiterte Fallauswahl, nunmehr in Form von Formalin- fixiertem, Paraffin- eingebettetem Gewebe, zusammengestellt. Auch an diesen Gewebeproben erfolgte nach Schnittherstellung zunächst die H&E- Färbung. Anhand dieser konnte brauchbares Tumormaterial in den Proben sichergestellt bzw. Tumoreareale gezielt ausgesucht und markiert werden, welche für die geplante Gewebestanz- Entnahme zur Multi- Tissue- (MT-) Blockherstellung geeignet war. Sowohl die später aus den MT- Blöcken hergestellten Schnitte, als auch die vereinzelt notwendigen Einzelgewebe- Schnitte, wurden vor den weiteren immunhistochemischen Färbungen ebenfalls mit V9 untersucht, um eine noch ausreichend vorhandene Immunreaktivität im Sinne der „internen Kontrolle“ (41) sicherzustellen (s. auch **Abb. 7**, S. 31). Zeigten sich in den Gewebeschnitten schlecht oder nicht reagierende Areale, wurden die entsprechenden Proben der MT- Schnitte in den weiteren immunhistochemischen Färbungen nicht ausgewertet bzw. die Einzelgewebeschnitte nicht für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen herangezogen.

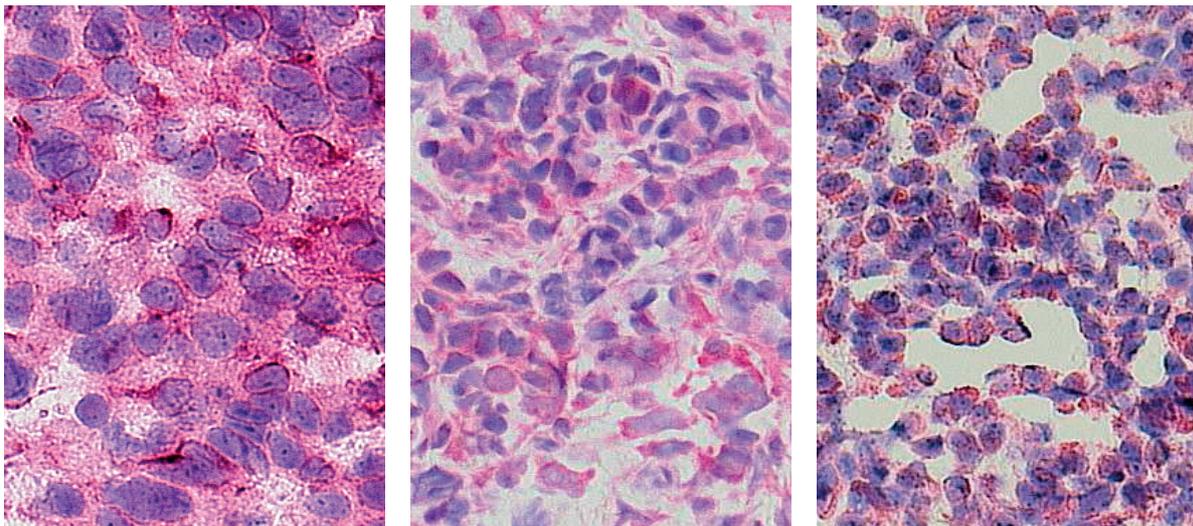


Abb. 7 Vimentin- Immunreaktivität

Exemplarische Darstellung an: Links: NBL; Mitte: NEP und Rechts: PNET.

3.2.2 Schnittherstellung an Gefrier- und Paraffinmaterial, sowie Multi- Tissue- Blockherstellung

3.2.2.1 Schnittherstellung an Gefriermaterial

Anteile der in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden im Kryostat (Fa. Leica, Typ Jung CM 3000) mittels Tissue Tek ® auf dem Gewebeaufnahme aufgetragen. Nach Erreichen des vollständig gefrorenen Zustands wurden daraufhin ca. 5 µm große Schnittpräparate

angefertigt und auf Superfrost® Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und dann bei - 80°C im Gefrierschrank eingelagert.

3.2.2.2 Multi- Tissue- Blockherstellung und Schnittherstellung an Paraffinmaterial

Nach Vorauswahl und Markierung des Tumorgewebes in den einzelnen Paraffinblöcken (s. Absatz 3.2.1.2, S. 30) wurden durch Hr. Liebertz im „Senckenbergischen Institut für Pathologie“ der Johann-Wolfgang von Goethe Universität in Frankfurt am Main insgesamt sechs MT- Blöcke mit jeweils bis zu 63 Gewebestanden hergestellt. Dabei wurden jeweils 3 Gewebestanden pro Fall bzw. aus einem Paraffinblock entnommen und gruppiert eingesetzt, so dass pro MT- Block bis zu 20 Einzelfälle zusammengesetzt vorlagen und in der Folge in einem Gewebeschnitt bzw. auf einem Objektträger gemeinsam untersucht werden konnten. Zu Kontrollzwecken wurden außerdem in jeden MT- Block drei Gewebestanden von Normalgewebe eingesetzt. Anhand von entsprechend erstellten Schemata wurde die Anordnung der einzelnen Fälle und der zugehörigen Gewebestanden, als auch der Kontrollstanzen, im MT- Block allgemein nachvollziehbar und damit zu jedem Zeitpunkt reproduzierbar, dokumentiert. Jede Gewebestanze hatte einen Durchmesser von ca. 1 mm. Die einzelnen Schnittpräparate aus den MT-Blöcken wurden bereits durch Hr. Liebertz angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Eine exemplarische Darstellung der MT-Schnitte zeigen **Abb. 8**, **Abb. 9** und **Abb. 10** auf S. 33. Die Einzelgewebeschnittpräparate wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica, Typ Jung SM2000R) angefertigt. Zur Glättung der Schnitte wurden sie in ein Wasserbad mit Aqua destillata (~48°C) überführt und anschließend auf Superfrost® Objektträger aufgebracht. Die Schnittdicke betrug ungefähr 3 µm. Nach 24 Stunden Lagerung im Brutschrank (37°C) konnten die hergestellten Schnitte bis zur weiteren Bearbeitung bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

3.2.3 Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung

3.2.3.1 Gefriermaterial

Die Schnitte wurden aufgetaut und für 10 Minuten in Aceton eingestellt. Danach konnten ohne weitere Zwischenschritte unmittelbar die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden.

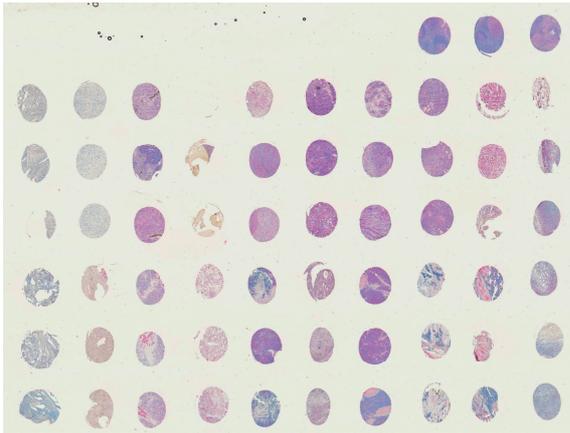


Abb. 8 Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt "RMS (Nr. 8)"

Links: Färbung mit Antikörper FAK C 20, Rechts: Färbung mit Antikörper FAK C 903

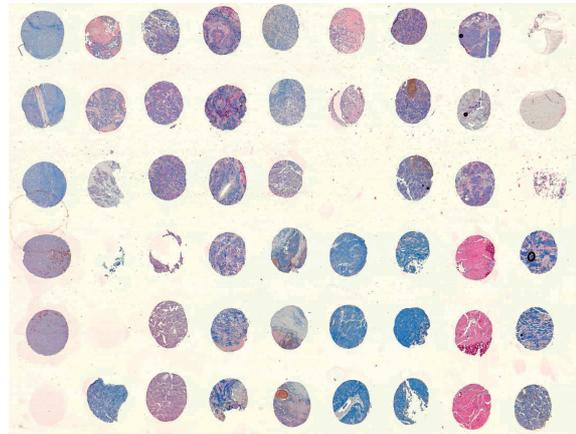
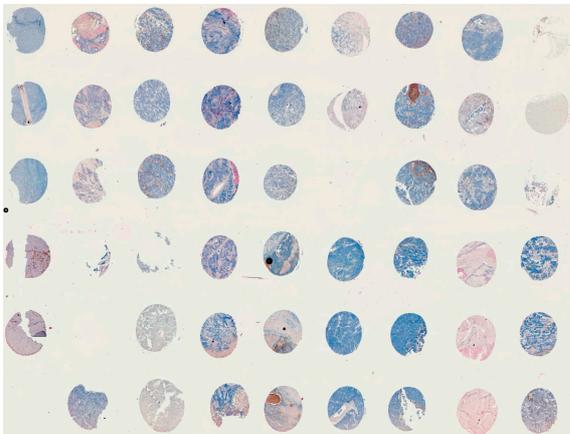


Abb. 9 Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt "NBL/ EWS (Nr. 12)"

Links: Färbung mit Antikörper ED 98015, Rechts: Färbung mit Antikörper FAK C 903

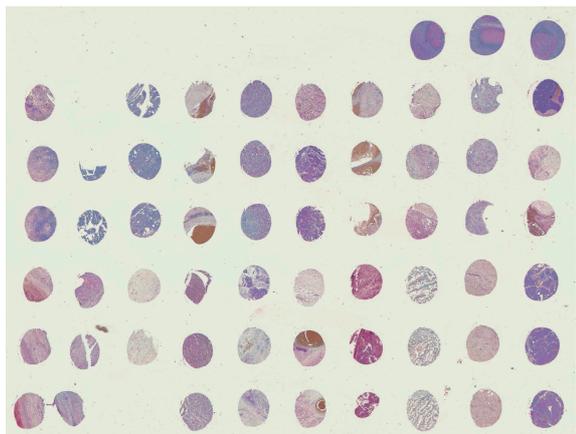
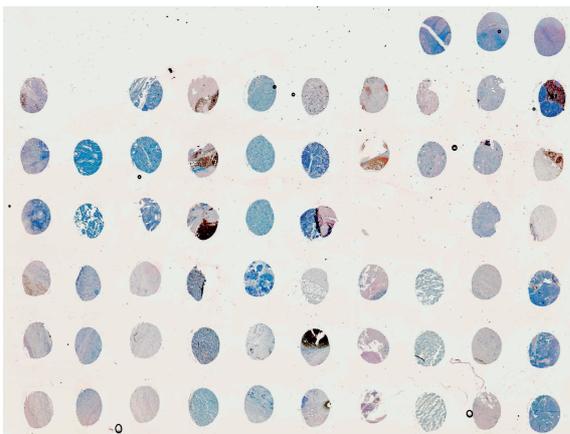


Abb. 10 Exemplarische Darstellung des MT- Schnitt „NEP (Nr. 18)"

Links: Färbung mit Antikörper ED 98015, Rechts: Färbung mit Antikörper FAK A 17

3.2.3.2 Vorbehandlung und Antigen-Retrieval am Paraffinmaterial

Als Vorbehandlung, zeitlich direkt vor den immunhistochemischen Färbungen, mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden sie nacheinander jeweils für die Dauer von 10 Minuten in die folgenden Lösungen eingestellt:

1. Xylol, 2. Aceton und 3. Gemisch von Aceton und Waschpufferlösung (TBS) im Verhältnis 1:1. Anschließend erfolgte zwei Mal vorsichtiges Spülen der Schnitte in TBS. Zu Zwecken des Antigen-Retrieval wurden die Schnitte anschließend in Kunststoffküvetten mit Citratpufferlösung (siehe Kap. 3.2.10, S. 43) eingesetzt, und in einem 98°C heißen Wasserbad für 40 Minuten erhitzt. Nach 20 minütiger Abkühlung erfolgte erneut vorsichtiges Spülen in TBS. Nun konnte mit den weiteren immunhistochemischen Färbungen begonnen werden.

3.2.4 Immunhistochemie

3.2.4.1 Ablauf

Zunächst wurden die verschiedenen Antikörper mit Antibody Diluent auf ihre jeweilige Antikörperkonzentration verdünnt (s. **Tab. 2**, S. 30). Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden vor Beginn der Färbung mit dem Cytomation Pen® umrandet, um ein späteres Abfließen der Antikörperlösung zu verhindern. Die Schnitte durften für die Dauer der Färbung nie austrocknen, was während den Inkubationszeiten mittels Aufbewahrung in einer „feuchten Kammer“ erreicht wurde. Vor Beginn der Inkubation wurden alle Objektträger auf ihrer Rückseite sorgfältig abgetrocknet und auf den Boden der feuchten Kammer, in Form einer Lochplatte, gelegt. Pro Einzelgewebeschnitt wurden ca. 100 µl und pro MT- Schnitt ca. 300 µl Antikörperlösung auf die Objektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden für die dem jeweiligen AK entsprechende Zeit (s. **Tab. 2**, S. 30) mit den aufgetragenen Lösungen inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit konnte die Antikörperlösung durch Aufstellen der Objektträger abfließen, und die anschließend notwendige zweimalige Spülung mit TBS erfolgen. V9 benötigte, als einziger verwendeter monoklonaler Maus-AK, keinen Maus- Anti- Kaninchen (MAK-) Brückenantikörper. Hier wurde direkt der Kaninchen- Anti- Maus (KAM) AK als erste Brücke eingesetzt. Bei den übrigen polyklonalen Kaninchen- AK diente MAK als erster, und KAM als zweiter Brückenantikörper. Nach KAM erfolgte dann in beiden Fällen die Inkubation mit dem Alkalische Phosphatase und Maus monoklonale Anti- Alkalische Phosphatase (APAAP)- Komplex, bestehend aus intestinaler alkalischer Phosphatase und einem monoklonalem Maus- AK (42).

3.2.4.2 Kontrollschnitte

Pro Färbevorgang wurde je eine Negativ-, und eine Positivkontrolle mitbehandelt. Bei der Negativkontrolle entfiel der Primärantikörper und wurde durch reines Diluent ersetzt. Für die Positivkontrollen wurde bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Primärantikörper ED 98015 Normalgewebe des Ösophagus genutzt. Dieses wurde ausgewählt, da die in den Wandschichten enthaltenen Ganglienzellen in der Arbeit von Borkhardt und Kollegen (33) eine deutlich positive Reaktion in der immunhistochemischen Färbung mit dem AK ED 98015 gezeigt hatten. Weiterhin wurde pro Färbedurchgang mit dem Primärantikörper ED 98015 auch ein Positiv- Kontrollschnitt Ösophagusgewebe mit PIS behandelt bzw. mitgefärbt, in dem sich entsprechend keine Reaktion bzw. Färbeintensität zeigen durfte (siehe auch Kap. 3.2.4.3, S. 36). Für die Positivkontrollen der FAK- AK wurde Normalgewebe der Prostata genutzt, da für die Basalschicht des Prostataepithels von Rovin und Kollegen eine starke Färbeintensität bzw. positive Immunreaktivität im Hinblick auf FAK nachgewiesen worden war (43). Reagierten bei einem Färbevorgang die Negativkontrollen fälschlicherweise mit, oder die Positivkontrolle nicht adäquat positiv, so wurde der gesamte Färbevorgang wiederholt, um potentielle Verfahrensfehler, die auch zu verfälschten Ergebnissen der untersuchten Proben hätten führen können, auszuschließen.

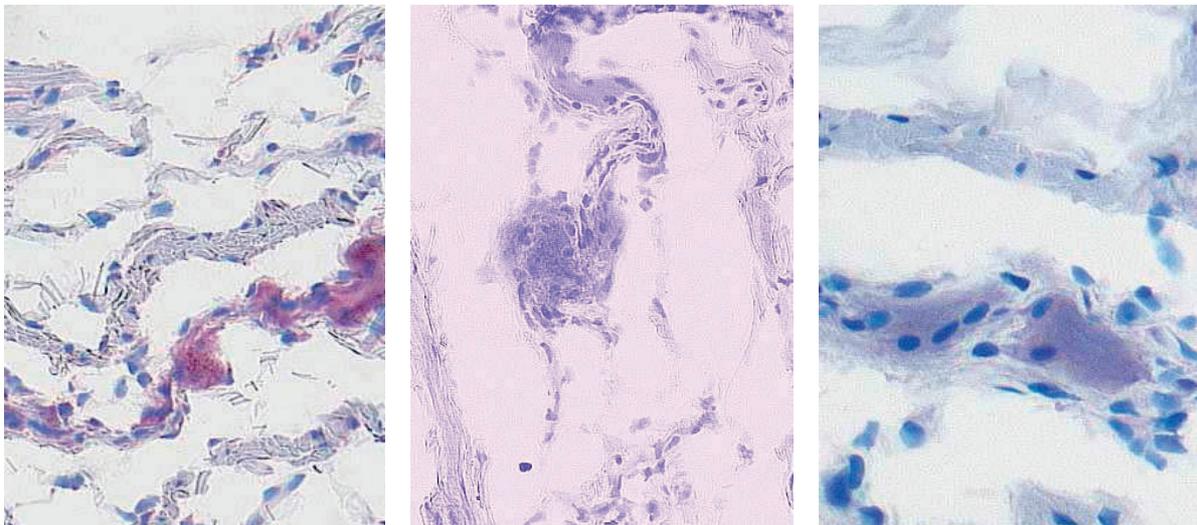


Abb. 11 Ösophagusgewebe: Exemplarische Darstellung

Links: Positivkontrolle ED 98015 (OV x 10); Mitte: Negativkontrolle (OV x 10); Rechts: Kontrolle PIS (OV x 20)

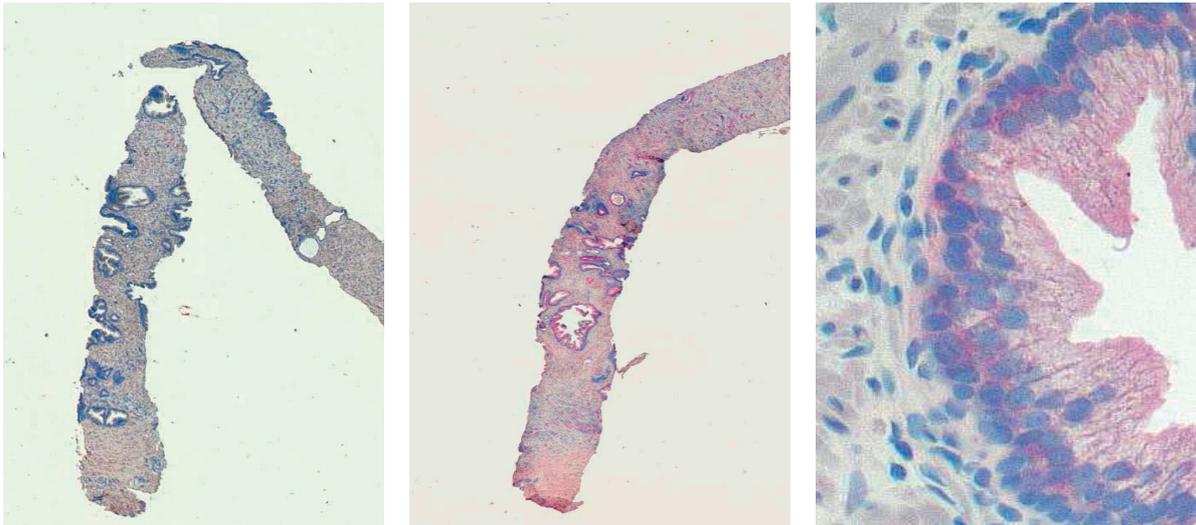


Abb. 12 Prostatagewebe: Exemplarische Darstellung

Links: Negativkontrolle; Mitte: Positivkontrolle FAK C 903 (Übersichts- OV); Rechts: Positivkontrolle FAK A 17 (OV x 20)

3.2.4.3 Primärantikörper

Vimentin (V9)

Bei V9 handelt es sich um einen monoklonalen Maus- AK. Dieser AK erkennt ein Intermediärfilamentprotein, das von glatter Muskulatur, mesenchymalen Zellen und Fibrozyten exprimiert wird. Eingesetzt wird er als Routinemarker in pathologischen Laboren, bspw. um den histogenetischen Ursprung von Tumoren zu ermitteln (44). Auch bei Feinnadelgewebeproben von undifferenzierten SRBCT wurde bereits ein Einsatz beschrieben (45). In dieser Arbeit wurde der AK V9 als immunhistochemischer Marker im Sinne eines „Haushaltsprotein“ zur Bestimmung der Immunreaktivität des Tumorgewebes, wie in Kap. 3.2.1, S. 29 beschrieben, eingesetzt.

ED 98015 und Prae- Immun- Serum (PIS)

Für die kommerzielle Herstellung des polyklonalen, gegen den Carboxyterminus des humanen GRAF- Protein gerichteten ED 98015- AK wurde ein synthetisches Protein (genannt ED 98015) bestehend aus den Aminosäuren 659-672 des humanen GRAF- Gens als Antigen benutzt. Von den hiermit beimpften Kaninchen (Firma Eurogentec, Brüssel) wurde vor deren Immunisierung PIS entnommen. Um die Spezifität einer positiven Reaktion auf den ED 98015- AK zu belegen, wurde das PIS anstelle eines Primärantikörpers u. a. an den verwendeten Positivkontrollschnitten (Ösophagus), sowie exemplarisch an einigen Schnitten mit positiver ED 98015- Proteinexpression eingesetzt. Hier sollte keine Reaktivität nachweisbar sein.

FAK C 903

Es handelt sich bei FAK C 903, um einen affinitätsgereinigten, polyklonalen Kaninchen- AK, gerichtet gegen ein Peptid (bestehend aus den Aminosäuren 903-1052) am Carboxy- Terminus von Maus- FAK.

FAK C 20

FAK C 20 (sc-558) ist ein affinitätsgereinigter, polyklonaler Kaninchen- AK, gerichtet gegen ein Peptid am Carboxy- Terminus von humanem FAK.

FAK A 17

Auch bei FAK A 17 (sc-557) handelt es sich um einen affinitätsgereinigten, polyklonalen Kaninchen- AK, welcher gegen ein Peptid am Amino- Terminus von humanem FAK gerichtet ist.

MIB-1 (Ki 67)

Bei dem von uns verwendeten MIB-1 AK handelt es sich um den ersten paraffingängigen, Formalin- resistenten, monoklonalen AK- Klon, der das „Methylation- inhibited binding protein 1“ erkennt (14) und praktisch dem nur an kryokonserviertem Nativgewebe nachweisbaren Zellproliferationsmarker Ki 67- Antigen entspricht (46). Seigneurin und Kollegen beschrieben u. a., dass alle mit MIB-1 anfärbbaren Tumorzellen als Wachstumsfraktion bezeichnet werden. Anfärbbar waren bzw. sind alle Zellen, die sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden, also in der G1-, S-, G2- und Mitose (M)-Phase des Zellzyklus. Nach ihren Untersuchungen war die Menge an nachweisbarem Ki 67- Antigen von der G1- bis zur M- Phase angestiegen und Ki 67, nach zunächst nur nukleolärer Lokalisation in der G1- Phase, mit der G2- Phase auch im Karyoplasma nachweisbar (47). Durch eine immunhistochemische Anfärbung der nukleären Zellstrukturen mit MIB-1 kann somit genauer, als durch das reine Auszählen von nativ sichtbaren Mitosen, bestimmt werden, welche Zellen sich in der aktiven (Reproduktions-) Phase des Zellzyklus befinden. Die Färbungen an den von uns untersuchten Gewebeproben wurden im Routinelabor mit handelsüblichen Kits durchgeführt.

3.2.4.4 Maus- Anti- Kaninchen- Antikörper (MAK)

Der von der Maus stammende, gegen Kaninchenantikörper gerichtete, monoklonale AK MAK wurde als erster Brückenantikörper bei allen von uns eingesetzten, vom Kaninchen stammenden, polyklonalen Primärantikörpern gebraucht. Damit wurde die Grundvoraussetzung für eine Anbindung dieser an KAM und den nachfolgenden APAAP- Komplex geschaffen.

3.2.4.5 Brückenantikörper Kaninchen- Anti- Maus (KAM)

Der vom Kaninchen stammende, gegen Mausantikörper gerichtete, Antikörper KAM wurde bei allen immunhistochemischen Färbungen eingesetzt. Er diente der Verbindung des monoklonalen Primärantikörpers V9 oder des monoklonalen Brückenantikörpers MAK mit dem APAAP-Komplex.

3.2.4.6 APAAP- Komplex

Der APAAP- Komplex diente als Detektionssystem, und bestand aus einem monoklonalen Maus-anti-alkalische Phosphatase- Antikörper. Dieser konnte zum einen die intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb binden und damit das Verbindungsglied zu den, in der Entwicklungslösung (siehe Kap. 3.2.4.7, S. 38) enthaltenen chromogenen Bestandteilen (hexazotiertes Neufuchsin als Kupplungssalz und Naphthol- As- Bi-Phosphat als Substrat), die an den Stellen des gesuchten Antigens in einem unlöslichen, hellroten Farbniederschlag resultierten, schaffen. Andererseits konnte der APAAP- Komplex selbst weiterhin von KAM gebunden werden, wodurch die Verbindung zu den vorgeschalteten AK möglich wurde (42).

3.2.4.7 Entwicklung

Die nach der Inkubation mit dem APAAP- Komplex zehn Mal vorsichtig in TBS gespülten Schnitte wurden in eine Küvette mit Entwicklungslösung (siehe Kap. 3.2.10, S. 43) gegeben, und für ca. 25 Minuten auf einen Kombischüttler (Fa. Bühler Swip, Typ KL-2) gestellt. Anschließend erfolgte erneut eine zehnmahlige Spülung in TBS.

3.2.4.8 Kernfärbung und Eindeckung

Im Anschluss an die oben beschriebene Entwicklung erfolgte die Kern-, bzw. Gegenfärbung mit Hämalaun, was unter dem Mikroskop als Blaufärbung der Zellkerne imponierte. Dazu wurden die Schnitte 30 Sekunden in Hämalaun eingestellt und anschließend dreimal in Leitungswasser gespült. Das Eindecken mit handelsüblichen Deckgläsern erfolgte mittels im Wasserbad erhitztem Glycergel Mounting Medium.

Bei den H&E- Färbungen, sowie den immunhistochemischen Färbungen mit V9 erfolgte das Eindecken nach der Gegenfärbung zunächst über das Einstellen der Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol, bevor die Deckgläser mittels Pertex® fixiert wurden.

3.2.5 Digitale Dokumentation

Die digitale Dokumentation erfolgte zeitnah zu den immunhistochemischen Färbungen, wodurch die Farbqualität der Färbungen gewährleistet blieb und fotografisch dokumentiert wurde.

Die Dokumentation wurde bei den normalen Einzelgewebeschnitten aus Gefrier-, und Paraffinmaterials mittels Fotografie durch eine Digitale Camera (Typ KY-F75U) der Firma JVC über ein Lichtmikroskop/ Axioskop der Fa. Zeiss durchgeführt, und mittels der Software: DISKUS 32 Vers. 4.50 bearbeitet und abgespeichert.

Bei den MT-Schnitten erfolgte die Fotodokumentation mittels eines Scanners: Super Cool Scan 2000 der Firma Nikon und der Software Nikon Scan 4.0. Anschließend wurden aussagekräftige Areale in größerer Auflösung mit o. g. digitaler Camera der Firma JVC und das beschriebene Lichtmikroskop vorgenommen.

3.2.6 Mikroskopische Auswertung

Semiquantitative Auswertung der immunhistologischen Färbeintensität

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Präparate mit den AK ED 98015, FAK C 903, FAK C 20 und FAK A 17 einer statistischen Auswertung zugänglich zu machen, werteten wir diese in Anlehnung an den Immun Reactivity Score (IRS) aus. Dieser wurde erstmals von Remmele und Stegner (48) zur Auswertung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren bei Mamma-Karzinomen beschrieben bzw. zur Ermittlung der Färbeintensität an den Gewebepreparaten angewandt. In leicht modifizierter Form haben wir den IRS übernommen und folgenden Score der Reaktivität bzw. Färbeintensität zu Grunde gelegt:

„keine Färbung“ entsprach	0
„schwache Färbeintensität“ entsprach	0,5 - 1,0
„starke Färbeintensität“ entsprach	1,5 - 3,0

Die Bestimmung unterliegt der subjektiven Schätzung durch den Untersucher und erfolgte in der vorliegenden Arbeit an jedem einzelnen Präparat mittels eines Lichtmikroskops mit Diskussionsbrücke zusammen mit Prof. Dr. Bohle. Die Färbeintensität wurde unter verschiedenen Vergrößerungen ermittelt.

Da innerhalb der MT- Blöcke bis zu drei Einzelgewebeproben pro Fall parallel bzw. gleichzeitig untersucht wurden, konnte die Auswertung zunächst auch bis zu drei einzelne Werte der

Färbeintensitäten erbringen. Bei voneinander abweichenden Färbeintensitäten der Einzelwerte wurde der Mittelwert gebildet. Falls notwendig erfolgte anschließend eine mathematische Rundung, die eine Zuteilung in die einzelnen Gruppen, entsprechend des genannten Scores, ermöglichte.

Wachstumsfraktion und Mitoserate

Zwei Parameter wurden zur Auswertung der Tumorproliferationskapazität erfasst. Zum einen wurde die Anzahl der in Mitose befindlichen Tumorzellen pro 10 Hochvergrößerungsfelder (Engl.: "High Power Fields" = HPF) bestimmt, wobei die durch Coindre und Kollegen (49) festgelegten Maße zum histopathologischen Grading von Weichgewebstumoren beachtet wurden. Demnach entspricht ein HPF einer Fläche von 0,1734 mm². Die Quantifizierung erfolgte in Tumorarealen mit Eindruckmäßig höchster Mitoserate. In den gleichen Tumorarealen wurde die Ermittlung der Wachstumsfraktion (MIB-1-Reaktivität) mit Hilfe eines Okulargitters bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Hierzu wurde an jeweils 200 Tumorzellen der prozentuale Anteil der positiv reagierenden Tumorzellen ausgezählt.

3.2.7 Software und graphische Darstellung

Bei der Textverarbeitung wurde das Programm „Word“ in „Office XP“ (Microsoft Corporation, U.S.A.) verwendet. Für das Literaturverzeichnis und die Zitationen wurde das Programm „End Note“, Version 6.0.2, der Firma Thomson ISI ResearchSoft genutzt. Die Fotos wurden mit Hilfe von „IrfanView“, Version 3.98, für Windows bearbeitet und ggf. maßstabgetreu angepasst. Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm „Excel“ in „Office XP“ (Microsoft Corporation, U.S.A.) archiviert und mittels „SPSS“ für Windows, Version 18.0 (SPSS Inc., U.S.A.) statistisch ausgewertet. Die Darstellung von Streumaßen erfolgte mittels Standardabweichung und Quartile, während bei den kontinuierliche Variablen Mittelwert und Median genutzt wurden. Graphische Darstellungen wurden sowohl mittels „Excel“ in „Office XP“ (Microsoft Corporation, U.S.A.), als auch mit „SPSS“ für Windows, Version 18.0, (SPSS Inc., U.S.A.) erstellt. Für die graphische Veranschaulichung kategorisierter Daten wurden Kreis- und Balkendiagramme genutzt. Quartilen und Mediane wurden durch „Box Plots“ veranschaulicht. In den Boxen werden Median als auch 25. bis 75. Perzentile dargestellt. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und größten Wert, insofern keine extremen Werte bzw. Ausreißer vorkommen. Ausreißer liegen 1,5 bis 3 Boxlängen außerhalb der Box und werden als Kreis angezeigt, während Extremwerte als Kreuze dargestellt werden und mehr als 3 Boxlängen außerhalb liegen.

3.2.8 Statistik

Die Überprüfung der kontinuierlichen Variablen auf Normalverteilung erfolgte mittels des „Kolmogorov- Smirnov- Tests“. Da die ausgewerteten Variablen keine Normalverteilung aufwiesen („Kolmogorov- Smirnov- Test“: $p < 0,05$) wurden in der Folge beim Vergleich der Stichproben nur nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen.

Für den Vergleich von zwei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der „Mann- Whitney- U- Test“ durchgeführt. Lagen mehr als zwei unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben vor, kam der „H -Test nach Kruskal und Wallis“ zur Anwendung. Der „Wilcoxon- Test“ wurde bei zwei verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben zur Überprüfung signifikanter Unterschiede durchgeführt.

Für den Vergleich des Anfärbeverhaltens bei Verwendung verschiedener AK wurde der „Vorzeichentest“ genutzt. Er vergleicht 2 verbundene Stichproben. Im Gegensatz zum „Wilcoxon- Test“ werden jedoch nur die positiven und negativen Differenzen ausgezählt. Hiermit konnten Änderungen der Klassifikationen wie bspw. „schwach“ und „stark“ direkt im Verlauf überprüft werden.

Eine Korrelation zwischen 2 Parametern wurde mittels des „Korrelationskoeffizienten nach Spearman- Rho“ berechnet. Nach folgender Einteilung wurde der berechnete Koeffizient bewertet:

sehr geringe Korrelation	→ $r < 0,2$
geringe Korrelation	→ $r = 0,2 - 0,5$
mittlere Korrelation	→ $r = 0,5 - 0,7$
hohe Korrelation	→ $r = 0,7 - 0,9$
sehr hohe Korrelation	→ $r = > 0,9$

Ein „p- Wert“ $< 0,05$ wurde für alle statistischen Tests als statistisch signifikant angenommen.

Zur Berechnung der Überlebensstatistiken wurden „Kaplan- Meier- Analysen“ durchgeführt. Durch Kategorisierung der kontinuierlichen Daten konnte ein Vergleich der Mortalität in beiden Gruppen erfolgen. Für den Vergleich der Überlebensraten wurde der „Log Rank“ angewandt.

Die vorgenannten statistischen Berechnungen und in Teilen auch die Graphikerstellung mittels SPSS wurden in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. med. T. Kottmann durchgeführt.

3.2.9 Reagenzien und weitere Materialien

Levamisol Naphthol-AS-Bi-Phosphat Tris-HCl	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid Tris-Base	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Propandiol Neufuchsin Natriumnitrit Dimethylformamid Citronensäure-Monohydrat Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Aceton Alkohol (70%, 96%, 100%) Xylol Eosin Gebrauchslösung 0,5% wässrig	Fa. Merck, Darmstadt
Hämalaun (2E 038, 10 Liter)	Fa. Waldeck, Münster
Cytomation Pen® Chem Mate™ Antibody Diluent Glycergel Mounting Medium	Fa. Dako, Carpinteria, CA, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Fa. Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Pertex®	Fa. Medite, Burgdorf
Superfrost® Plus Objektträger	Fa. Langenbrink, Teningen
Objektträger (25 x 75 x 0,1 mm) Deckgläser (24 x 36 mm)	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig
Küvetten Bechergläser (200-2000ml)	Fa. Schott, Mainz
Reaktionsgefäße (0,2 – 2,0 ml) Pipetten (1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Fa. Fisher, Schwerte
Mikrotom-Messer	Fa. Feather, Köln

3.2.10 Geräte

pH-Meter CG 820	Fa. Schott, Mainz
Kryoaufbewahrungsröhrchen	Fa. Nalgene, USA
Rotationsmischer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Mischer REAX 2000	Fa. Heidolph, Schwabach
Waage PM 480 DeltaRange®	Fa. Mettler, Giessen
Brutschrank	Fa. Memmert, Schwabach
Wasserbad MEDAX	Fa. Nagel, Kiel
Schlittenmikrotom Jung SM 2000R	Fa. Leica, Bensheim
Cryotom Jung CM 3000	
Mikrowelle 600 Watt	Fa. Bosch, Giessen
Mikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop (Axioskop)	Fa. Zeiss, Oberkochen
Digitalkamera JVC KY-F75 U	Fa. JVC, Hitachi, Japan

3.2.11 Ansätze der Gebrauchs- und Entwicklungslösungen

Waschpuffer/ TBS :

(Ansatz für 20 Liter Gebrauchslösung)

Tris-Base	18 g
Tris-HCl	+137 g
NaCl	+ 175,6 g
Aqua dest.	+2500 ml

Kontrolle und Einstellung des pH-Wertes auf 7,4-7,6, sowie anschließendes Auffüllen der konzentrierten Stammlösung auf 20 Liter. Lagerung bei Raumtemperatur.

Propandiol-Lösung:

Propandiol	21 g
Aqua dest.	+ 1000 ml

Aufbewahrung der Lösungen jeweils in einer dunklen Flasche im Kühlschrank (4°C).

Entwicklungspuffer:

Tris-Base	49 g
Tris-HCl	+15 g
NaCl	+ 87 g
Aqua dest.	+ 1750 ml

Aufbewahrung der Lösung erfolgt in einer dunklen Flasche.

Neufuchsin-Ansatz:

Neufuchsin	5 g
2 NHCl	+ 100 ml

Citratpuffer:Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure	21,01 g
Aqua dest.	+ 1000 ml

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat	29,41 g
Aqua dest.	+ 1000 ml

Gebrauchtsfertige Citratpufferlösung (pH 6, 10 mM):

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	+41 ml
Aqua dest.	+ 450 ml

Aufbewahrung der Stammlösungen im Kühlschrank (4°C).

Entwicklerlösung (Menge für 2 Küvetten):

Entwicklungspuffer	70 ml
Propandiol	25 ml
Levamisol	40 mg
Natriumnitrit	20 mg
Aqua dest	500 µl
Naphtol	50 mg
Dimethylformamid	600 µl
Neufuchsin	200 µl

Lösung A:

Entwicklungslösung in ein Becherglas mit Rührfloh geben und dort mit Propandiol mischen, auf pH 9,75 einstellen und anschließend Levamisol zugeben.

Lösung B:

Natriumnitrit in Aqua dest. auflösen und Neufuchsin zugeben.

Lösung C:

Naphthol mit Dimethylformamid auflösen.

Lösung B in Lösung A geben. Nach guter Durchmischung dann Lösung C hinzufügen und auf pH 8,8 einstellen. Fertige Lösung vor Einfüllen in die Küvette durch einen Faltenfilter filtrieren.

4 ERGEBNISSE

4.1 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV

In der vorliegenden Arbeit wurden primär die vier Tumorgruppen der NEP, NBL, EWS und PNET, in Abbildungen nur als EWS bezeichnet, sowie RMS untersucht. Weiterhin wurde noch eine kleine Gruppe von gutartigen GN ergänzt. Bei den in die Hauptauswertung einbezogenen 84 Fällen handelte es sich ausschließlich um Primärtumore in Form von Formalin- fixiertem, Paraffin- eingebettetem Gewebe in Archiv-Blockmaterial. Im Einzelnen waren dies 23 NEP, 26 NBL, 12 EWS und PNET, 18 RMS und 5 GN, s. hierzu auch **Abb. 6**, S. 28. Eine prozentuale Aufteilung der einzelnen Tumorgruppen in Bezug auf das Gesamtkollektiv ist in **Abb. 13**, S. 45 dargestellt. Knapp ein Drittel aller Fälle betraf die NBL, etwas mehr als ein Viertel entfiel auf die Gruppe der NEP und knapp ein Viertel auf die Gruppe der RMS. Mit ca. 15% der Fälle machte die Gruppe der EWS den zweitkleinsten Anteil, neben der Minderheit an untersuchten GN aus.

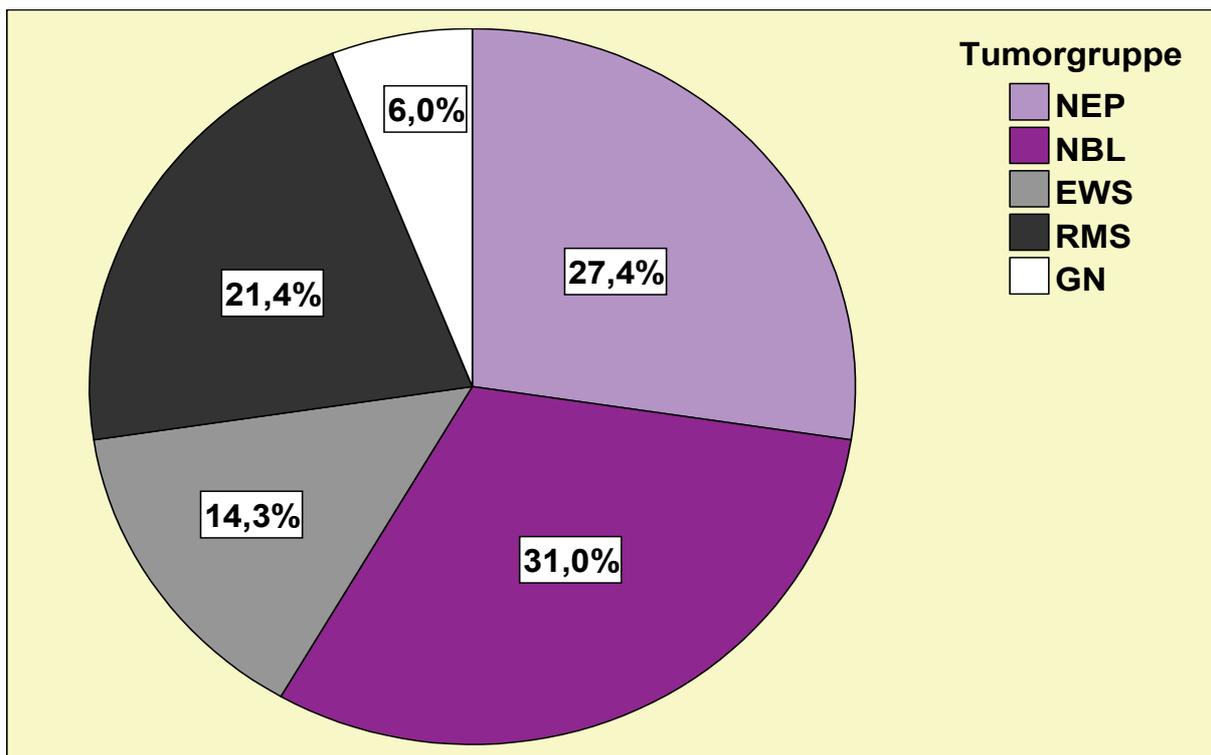


Abb. 13 Prozentualer Anteil der einzelnen Tumorgruppen in Bezug auf die Gesamtfallzahl

4.1.1 Geschlecht

Die Geschlechtsaufteilung innerhalb der einzelnen Tumorgruppen kommt in **Abb. 14**, S. 46 zur Darstellung. Für die Gruppe der NEP zeigte sich ein etwas häufigeres Auftreten beim weiblichen Geschlecht (Geschlechterverhältnis männlich/ weiblich, engl.: Sex ratio 0,8), wohingegen bei den

untersuchten NBL beide Geschlechter gleich häufig betroffen waren (Sex ratio 1,0). In der Gruppe der EWS und PNET, bzw. der RMS war ein häufigeres Auftreten beim männlichen Geschlecht zu verzeichnen (Sex ratio je 1,6).

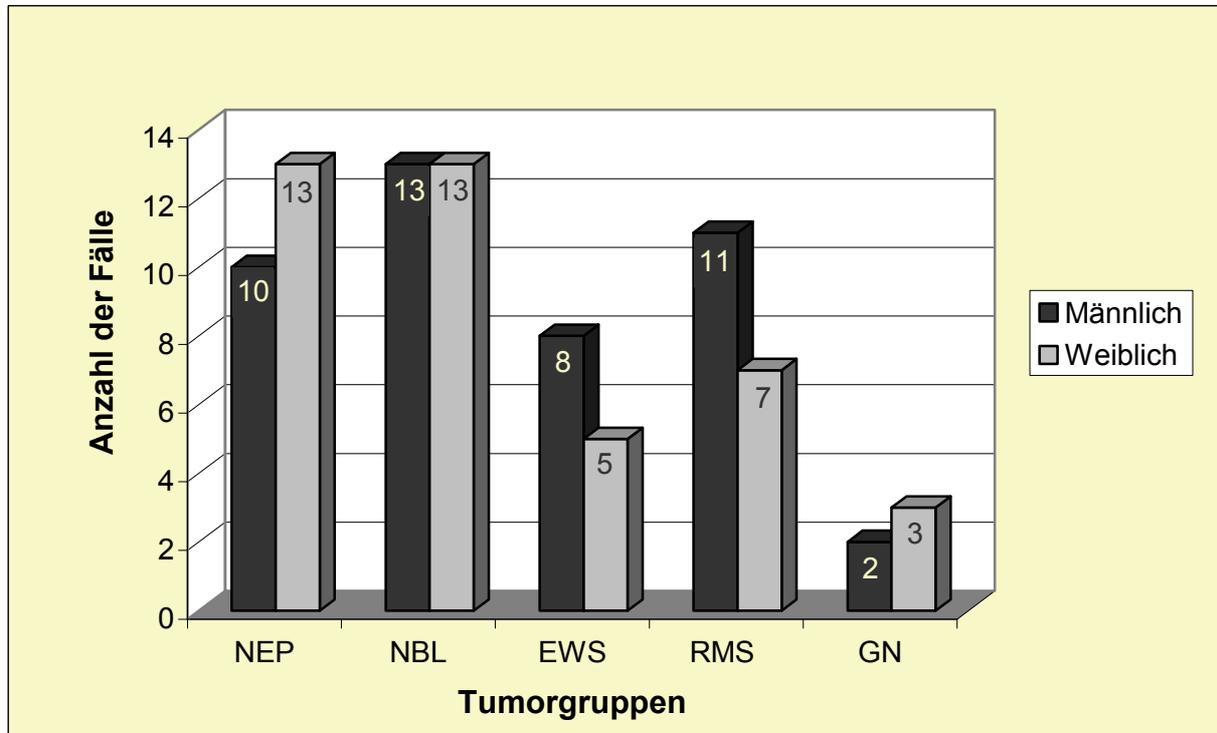


Abb. 14 Geschlechtsverteilung innerhalb der Tumorgruppen

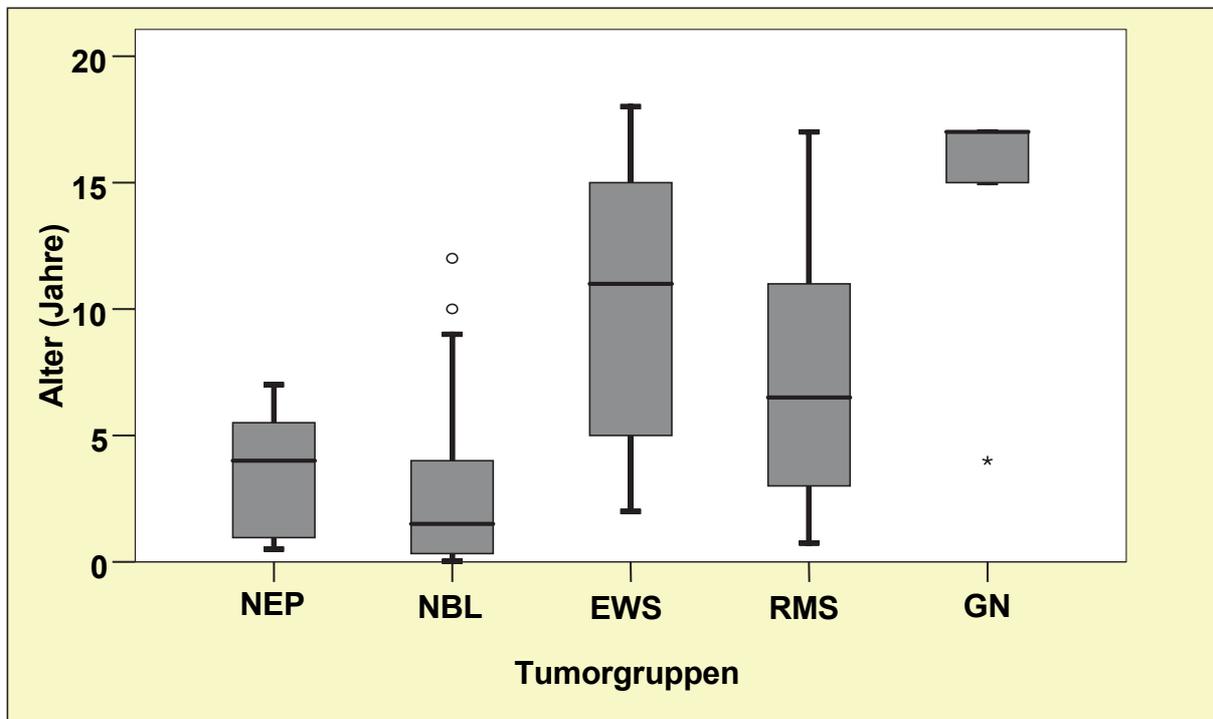


Abb. 15 Altersverteilung innerhalb der Tumorgruppen

4.1.2 Alter

In den Box Plots der **Abb. 15**, S. 46 ist das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung für die einzelnen Tumorgruppen dargestellt. Der Median bei den NEP lag bei einem Alter von 4 Jahren, bei den NBL bei 1,5 Jahren und in der Gruppe der EWS und PNET bei 11 Jahren. Für die Gruppe der RMS ergab sich ein medianes Alter von 6,5 Jahren, wobei sich die größte Altersspannweite und damit Ausdehnung der Box Plots für die Gruppe der EWS und RMS zeigte. In der statistischen Auswertung konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters der verschiedenen, hier untersuchten Tumorgruppen nachgewiesen werden ($p= 0,000$ im H-Test nach Kruskal und Wallis).

4.2 UNTERSUCHTE PROTEINE BZW. EPITOPE

An den Gewebeproben der verschiedenen Tumorgruppen wurde die Immunreaktivität folgender Epitope mittels der entsprechenden Antikörper untersucht:

- ED 98015 am bzw. für das Signaltransduktionsprotein GRAF
- FAK C 903 am bzw. für das Signaltransduktionsprotein FAK
- FAK C 20 am bzw. für das Signaltransduktionsprotein FAK
- FAK A 17 am bzw. für das Signaltransduktionsprotein FAK
- MIB-1 am bzw. für das Protein/ den Proliferationsmarker Ki 67
- Weiterhin wurde die Anzahl der in Mitose befindlichen Zellen (Mitoserate) pro 10 HPF, wie in Kap. 3.2.6, S. 39 beschrieben, ermittelt.

4.3 GRAF- UND FAK- PROTEINEXPRESSION IN DEN TUMORGRUPPEN

4.3.1 Nephroblastome

Es wurden zunächst 30 Fälle von NEP im Rahmen der Voruntersuchung histologisch untersucht. Vier Fälle mussten von den weiteren immunhistologischen Untersuchungen ausgeschlossen werden. Zwei Fälle zeigten eine nicht ausreichende Immunreaktivität in der „internen Kontrolle“ mit V9 (43), bei einem weiteren Fall fiel im Rahmen der parallel durchgeführten Datenrecherche ein zu hohes Patientenalter (oberhalb des definierten Kollektiv) bei Erstdiagnosestellung auf, und im vierten Fall musste die initiale Diagnose eines Nephroblastoms in Nephroblastomatose revidiert werden. Von den noch verbliebenen 26 Fällen wurden weitere drei aus der Hauptauswertung ausgeschlossen, da es sich bei zwei der Fälle um kryokonservierte Primärtumore, sowie in einem Fall um einen Paraffin- eingebetteten Rezidivtumor handelte. Abschließend konnten somit 23 Fälle in die Hauptauswertung eingeschlossen werden. In **Abb. 16**, S. 48 sind die Ergebnisse der Proteinexpression in der Gruppe der NEP graphisch dargestellt. Die einzelnen Säulen des Diagramms repräsentieren die vier untersuchten Primärantikörper. Die untersuchten 23 Fälle werden in jeder Säule mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Abschnitte der Säule sind farblich unterteilt und stellen prozentual die drei Kategorien „fehlende“, „schwache“ und „starke“ Färbeintensität dar, die analog dem in Kap. 3.2.6, S. 39 beschriebenen Vorgehen ausgewertet/ zugeteilt wurden.

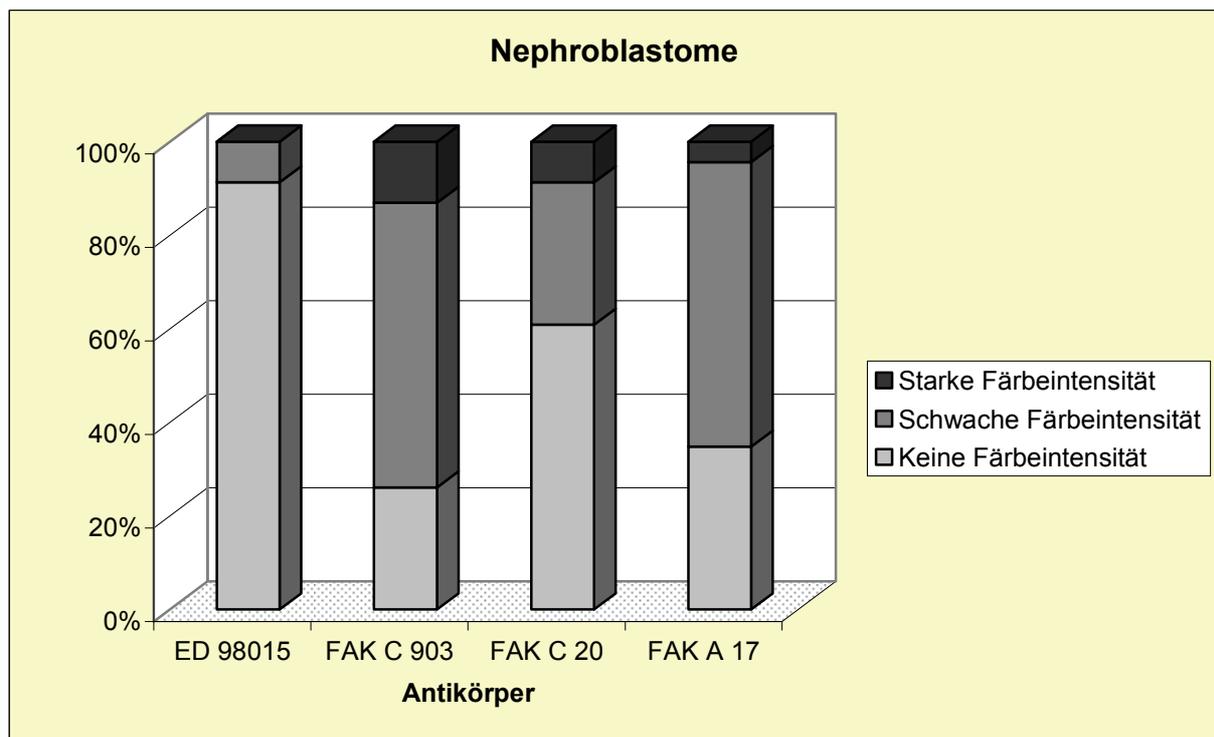


Abb. 16 Proteinexpression in der Gruppe der Nephroblastome

In der Gruppe der NEP zeigte sich in mehr als 80% der NEP- Fälle keine Färbeintensität bzw. Immunreaktivität mit dem AK ED 98015. Im Detail wiesen nur zwei Fälle in der gesamten NEP-Gruppe eine (schwache) Färbeintensität für ED 98015 auf, alle übrigen Fälle zeigten keinerlei Reaktion. Eine exemplarische fotografische Darstellung der verschiedenen Färbeintensitäten von ED 98015, an immunhistologisch gefärbten, mikroskopischen Schnittbildern aus vier verschiedenen Tumorgruppen, ist in **Abb. 20**, S. 52 dargestellt. In ca. 60% der untersuchten NEP-Fälle war eine schwache Färbeintensität und in knapp 20% ein starke Färbeintensität bei der immunhistochemischen Färbung mit FAK C 903 nachweisbar (Abb. 17, S. 51). Hingegen zeigte sich für FAK C 20 in etwas mehr als 50% der Fälle keine und in nur knapp 30% der Fälle eine schwache Färbeintensität. Eine starke Färbeintensität für FAK C 20 war nur in ca. 10% der Fälle (s. Abb. 18, S. 51) vorhanden. Die Färbeintensität des Antikörpers FAK A 17 zeigte eine ähnliche Reaktion wie zuvor FAK C 903. Bei fast 60% der Fälle war eine schwache und in weniger als 10% der Fälle eine starker Färbeintensität nachweisbar (s. Abb. 19, S. 51). Insgesamt zeigten in der gesamten Gruppe drei Fälle keine Reaktion mit allen drei FAK- AK. Alle anderen Fälle zeigten für mindestens einen der drei angewandten AK eine schwache Färbeintensität. Zur weiteren statistischen Auswertung erfolgte zunächst eine Kategorisierung der einzelnen AK innerhalb jeder einzelnen Tumorgruppe mit anschließender Erfassung in Tabellenform. Darauf aufbauend konnten die Fallzahlen der kategorisierten AK- Werte pro Tumorgruppe in Relation zueinander betrachtet werden, und zwar jeweils jeder AK gegen jeden. Hierfür wurden die Werte in Kreuztabellen, analog dem in **Tab. 3**, S. 50 dargestellten Bsp., übertragen. In der genannten „Beispiel“ - Tabelle ist der Zusammenhang von ED 98015 und FAK C 903 in der Gruppe der NEP dargestellt. Hierbei finden sich die Fallzahlen bzw. prozentualen Anteile der kategorisierten Färbeintensität von ED 98015 in den beiden Spalten und somit senkrecht angeordnet, während die entsprechenden Fallzahlen von FAK C 903 in Zeilen und damit horizontal angeordnet sind. Nach Anwendung des Vorzeichentests zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der (Immun-) Reaktion bzw. kategorisierten Färbeintensität bzw. Proteinexpression zwischen FAK C 903 und ED 98015, FAK C 20 und ED 98015, sowie FAK A 17 und ED 98015 in der Tumorgruppe der NEP (s. S. 50), allerdings kein signifikanter Unterschied beim Vgl. der FAK- AK untereinander. Innerhalb der Gruppe der NEP konnte anhand der histopathologischen Befunde zwischen NEP- Fällen ohne und mit präoperativ erfolgter Chemotherapie differenziert werden. Die absolute und prozentuale Häufigkeit hierfür ist in **Tab. 5**, S. 50 dargestellt.

Tab. 3 Zusammenhang zwischen ED 98015 und FAK C 903 in der Gruppe der Nephroblastome

			ED 98015		Gesamt
			keine Reaktion	schwache Reaktion	keine Reaktion
FAK C 903	keine Reaktion	Anzahl	6	0	6
		% von FAK C 903	100,0%	0%	100,0%
		% von ED 98015	28,6%	,0%	26,1%
	schwache Reaktion	Anzahl	13	1	14
		% von FAK C 903	92,9%	7,1%	100,0%
		% von ED 98015	61,9%	50,0%	60,9%
starke Reaktion	Anzahl	2	1	3	
	% von FAK C 903	66,7%	33,3%	100,0%	
	% von ED 98015	9,5%	50,0%	13,0%	
Gesamt	Anzahl	21	2	23	
	% von FAK C 903	91,3%	8,7%	100,0%	
	% von ED 98015	100,0%	100,0%	100,0%	

Tab. 4 Vorzeichentest NEP

	FAK C 903 - ED 98015	FAK C 20 - ED 98015	FAK A 17 - ED 98015	FAK C 20 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,008	,000	,065	,727	,125

Tab. 5 Präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP

	Häufigkeit	Prozent
nicht bekannt	4	17,4
ja	13	56,5
nein	6	26,1
Gesamt	23	100,0

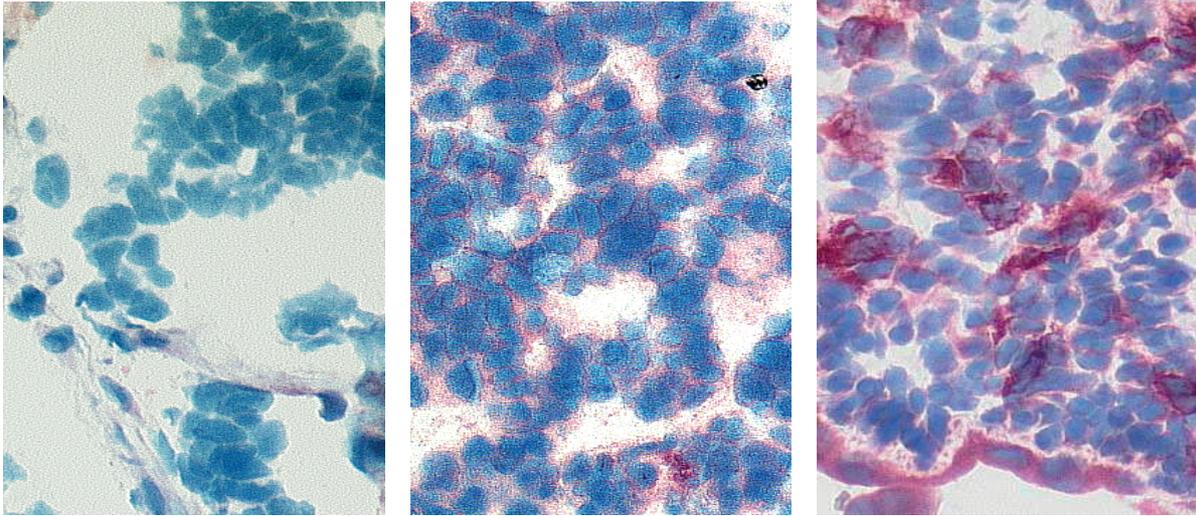


Abb. 17 FAK C 903- Proteinexpression in NEP

Links: fehlende (Immun-) Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

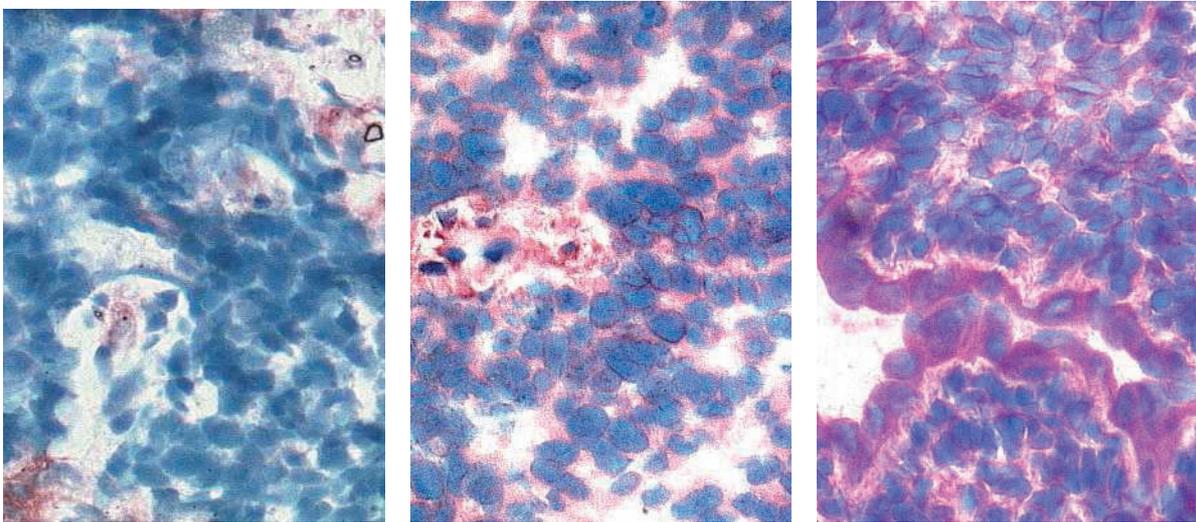


Abb. 18 FAK C 20- Proteinexpression in NEP

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

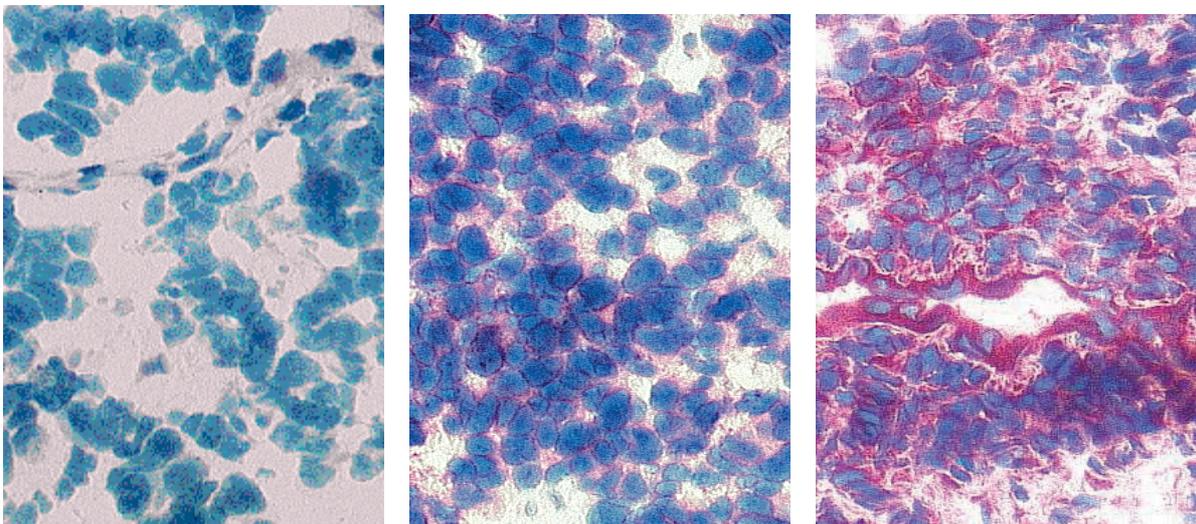


Abb. 19 FAK A 17- Proteinexpression in NEP

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

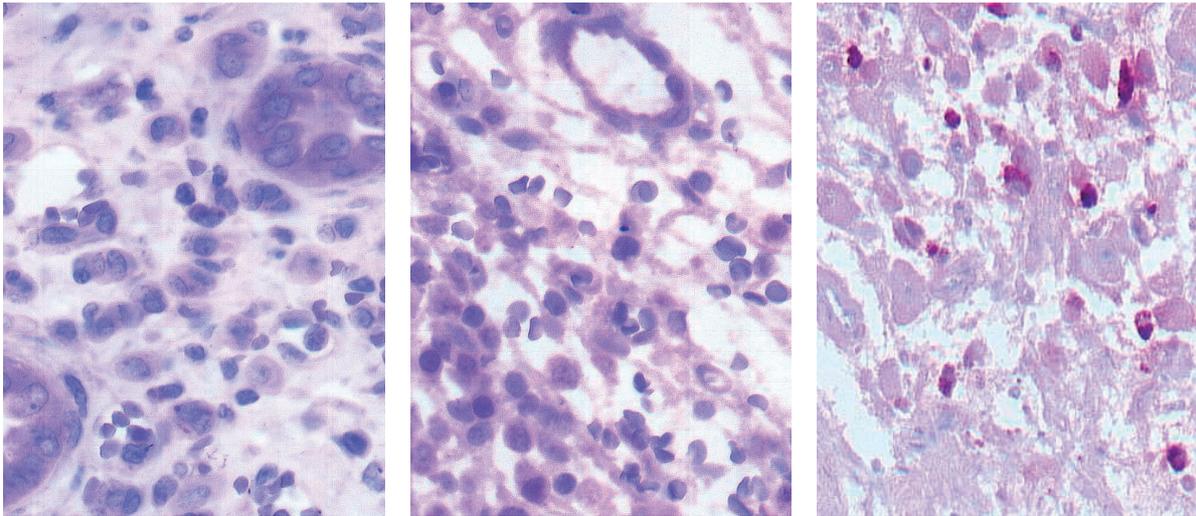


Abb. 20 ED 98015- Proteinexpression

Links: Fall eines NEP mit fehlender Reaktion, Mitte: Fall eines NEP mit schwacher Reaktion, Rechts: Fall eines RMS mit starker Reaktion.

4.3.2 Neuroblastome

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden zunächst 35 Fälle von NBL und GNBL untersucht. Hiervon musste ein Fall wegen fehlender Immunreaktivität mit dem „Haushaltsprotein“ Vimentin, ein Fall aufgrund nicht sicher belegbarer Identität und damit unklarem Alter bei Erstdiagnosestellung, und ein Fall wegen Revision der initialen Diagnose eines Neuroblastoms in ein Ästhesioneuroblastom, im Rahmen der parallel durchgeführten Datenrecherche, von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Von den verbliebenen 32 Fällen mussten weitere sechs Fälle aus der Hauptauswertung ausgeschlossen werden, da es sich hier um Paraffin-eingebettete Rezidivtumoren bzw. Metastasengewebe handelte. Es konnten letztendlich 26 Fälle (23 NBL und 3 GNBL) in die Hauptauswertung eingeschlossen werden. Eine Übersicht über die Subtypisierung innerhalb der Gruppe der NBL zeigt **Tab. 6** auf S. 53. Die Subtypisierung konnte anhand der histopathologischen Routinebefunde ermittelt werden. In **Abb. 21**, S. 53 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit den vier Primärantikörpern analog dem voraus gegangenen Kap. 4.3.1, S. 48 dargestellt. Auch bei den NBL konnte in über 90% der Fälle keine Färbeintensität bzw. Immunreaktivität mit dem Antikörper ED 98015 nachgewiesen werden. Es zeigte lediglich ein einziger Fall eine (starke) Färbeintensität mit ED 98015. Eine deutliche Reaktion zeigte sich für FAK C 903 mit knapp 60% der Fälle schwacher und knapp 30% der Fälle mit starker Färbeintensität. FAK C 20 zeigte in etwas mehr als 50% der Fälle ein schwache und in etwas weniger als 20% der Fälle eine starke Färbeintensität. Bei der Färbung mit FAK A 17 konnte ähnlich zu FAK A 17 in der NEP- Gruppe in etwas mehr als 60% der Fälle eine schwache und in weniger als 10% der Fälle eine starke Färbeintensität nachgewiesen werden. Insgesamt zwei Fälle

aus der Gruppe der NBL zeigten mit keinem der drei FAK- AK eine Reaktion. Photographisch sind die histologischen Schnitte der Gruppe der NBL für die AK FAK C 903, C 20 und A 17 und deren mögliche Färbeintensitäten in den **Abb. 22**, **Abb. 23** und **Abb. 24** auf S. 54 und S. 55 dargestellt.

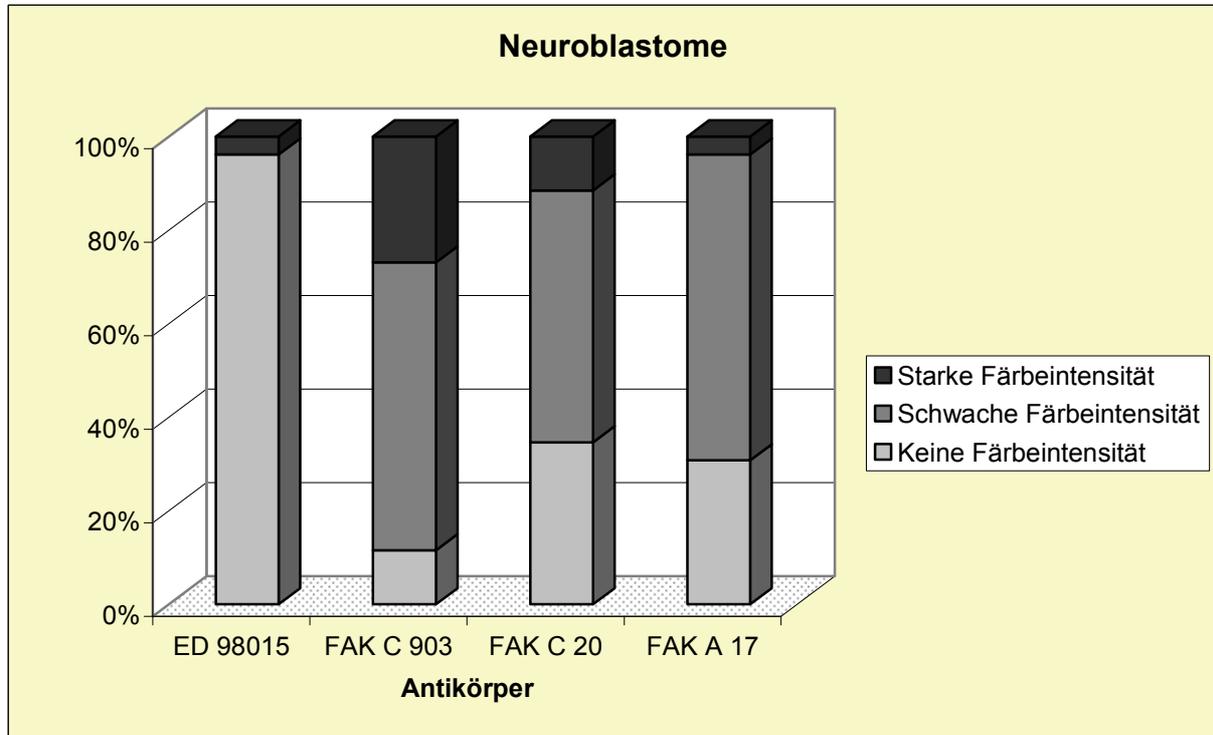


Abb. 21 Proteinexpression in der Gruppe der Neuroblastome

Tab. 6 Subtypisierung der untersuchten Fälle innerhalb der Gruppen der Neuroblastome, Ewing- Sarkome und Rhabdomyosarkome

Tumorgruppe und Subtypisierung/ Grad		Anzahl der untersuchten Fälle
NBL	NBL	23
	<i>Grad 1</i>	7
	<i>Grad 2</i>	11
	<i>Grad 3</i>	5
	GNBL	3
EWS	EWS	7
	PNET	5
RMS	RMS u. ERMS	13
	ARMS	5

Entsprechend der Beschreibung zu den NEP des vorhergehenden Kap. 4.3.1, S. 48 wurden auch für die Tumorgruppe der NBL die bereits kategorisierten AK in insgesamt sechs Kreuztabellen übertragen, indem jeder der vier AK gegen jeden eingesetzt wurde. Anschließend konnte mittels Vorzeichentest der p- Wert für die entsprechenden AK- Paare berechnet werden. Hierbei ergab sich entsprechend **Tab. 7**, S. 55 ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der kategorisierten Färbeintensität bzw. Immunreaktion und damit Proteinexpression bei allen AK- Kombinationen außer beim Vgl. von FAK C 20 mit FAK A 17.

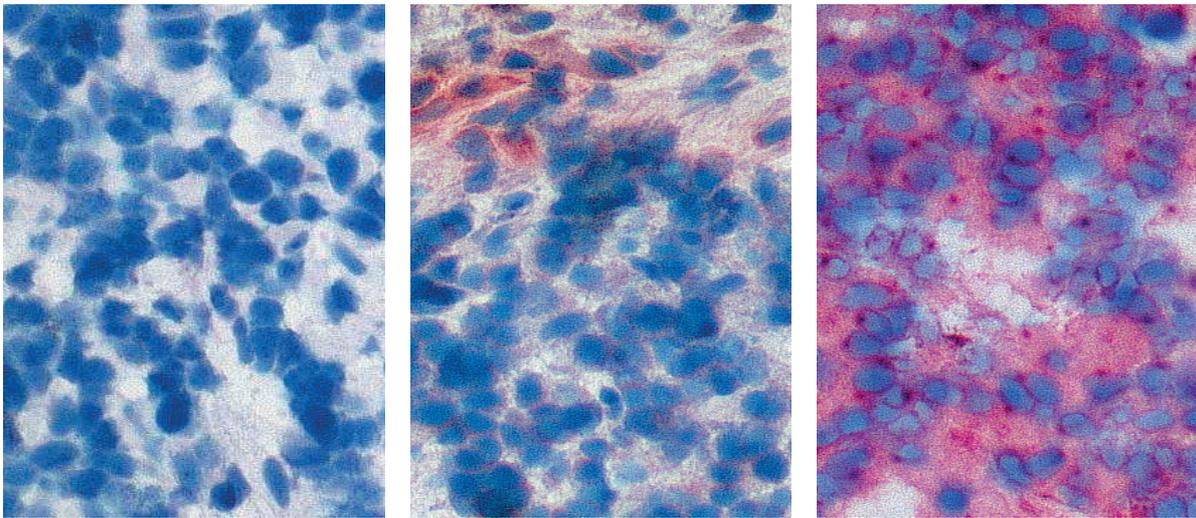


Abb. 22 FAK C 903- Proteinexpression in NBL

Links: fehlende (Immun-) Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

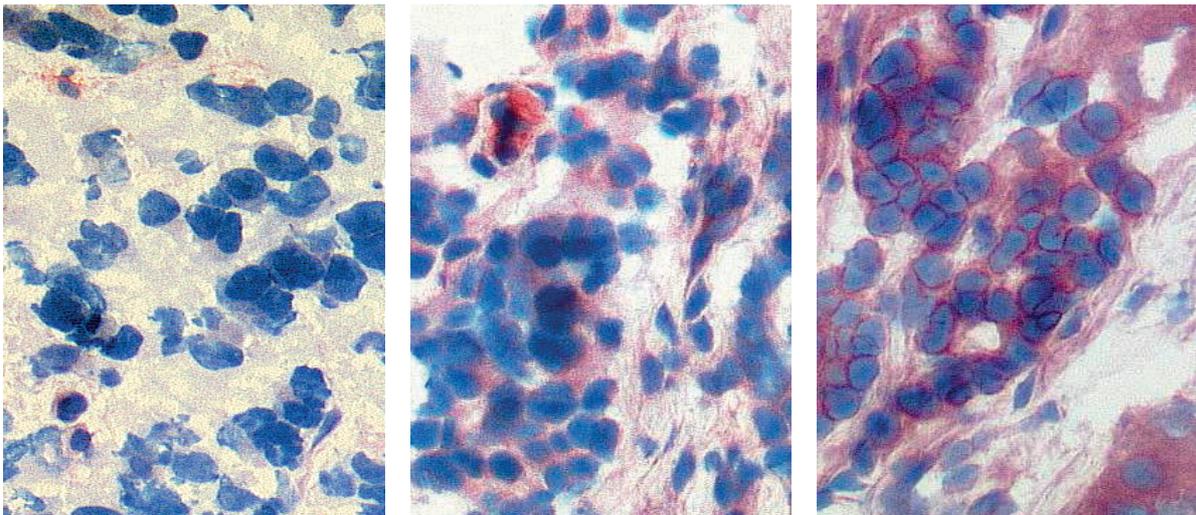


Abb. 23 FAK C 20- Proteinexpression in NBL

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

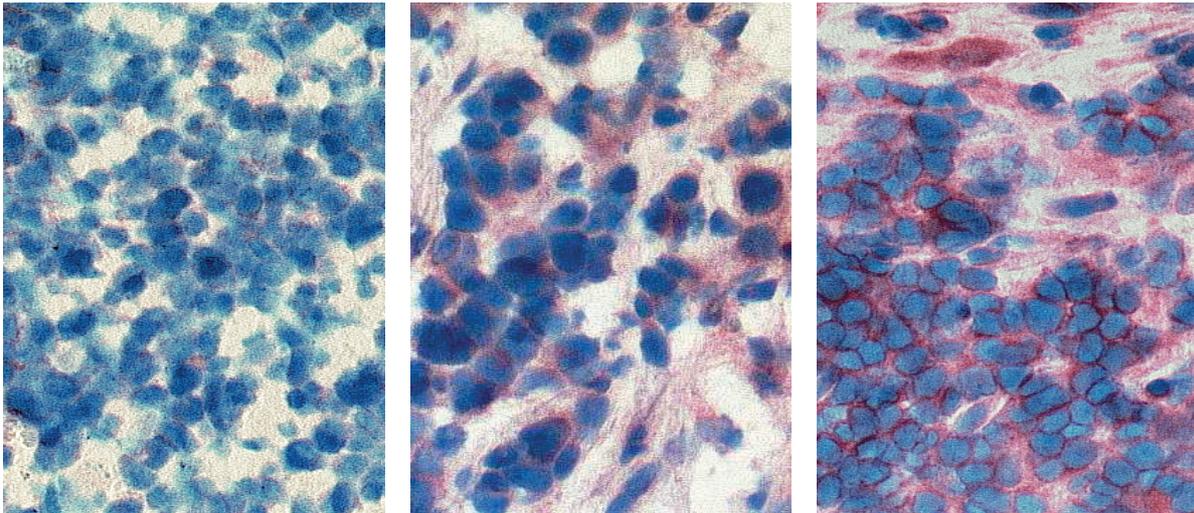


Abb. 24 FAK A 17- Proteinexpression in NBL

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

Tab. 7 Vorzeichentest NBL

	FAK C 903 - ED 98015	FAK C 20 - ED 98015	FAK A 17 - ED 98015	FAK C 20 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	,013	,003	1,000

4.3.3 Ewing- Sarkome und periphere neuroektodermale Tumore

Initial wurden 25 Fälle von Ewing- Sarkomen (EWS) und peripheren neuroektodermalen Tumoren (PNET) voruntersucht. Hiervon mussten 4 Fälle wegen zu hohen Alters der Patienten (oberhalb des definierten Kollektivs) bei Erstdiagnosestellung und ein Fall aufgrund insuffizienter Identitäts- bzw. Diagnosesicherung im Rahmen der Datenrecherche von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Von den verbliebenen 20 Fällen konnten 12 (Subtypisierung siehe **Tab. 6**, S. 53) in die Hauptauswertung eingeschlossen werden. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Paraffin- eingebettete Primärtumoren. Bei den ausgeschlossenen acht Fällen, lag in drei Fällen kryokonserviertes Primärtumorgewebe und in einem Fall kryokonserviertes Rezidivtumorgewebe, sowie in vier Fällen Paraffin- eingebettetes Rezidiv- bzw. Metastasengewebe vor. Anhand der graphischen Darstellung der Färbeintensitäten bzw. Immunreaktivität der AK in **Abb. 28**, S. 58 kann man erkennen, dass auch in dieser Tumorgruppe in ca. 80% der Fälle keine Reaktion bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Primärantikörper ED 98015 nachgewiesen werden konnte. Lediglich in zwei Fällen war eine (schwache) Färbeintensität zu verzeichnen. Bei der Färbung mit dem Primärantikörper FAK C 903

zeigten fast 70% der Fälle ein schwache, und etwas mehr als 10% der Fälle eine starke Färbeintensität. Das Ergebnis der Reaktion bei FAK C 20 erhöhte sich leicht, bei ähnlichem prozentualem Anteil an schwacher Färbeintensität, jedoch ca. 20%igem Anteil der Fälle mit starker Färbeintensität. Besonders hoch war die Reaktion bei der Färbung mit FAK A 17, bei dem in 100% der Fälle eine Färbeintensität nachweisbar war, hiervon 80% der Fälle mit schwacher und 20% der Fälle mit starker Färbeintensität. Alle Fälle zeigten bei mindestens einem der drei FAK-AK eine schwache oder starke Färbeintensität bzw. Proteinexpression. Fotografisch sind die histologischen Schnitte der Gruppe der EWS für die AK FAK C 903, C 20 und A 17 und deren Intensität der Färbung bzw. Proteinexpression in den **Abb. 25**, **Abb. 26** und **Abb. 27** auf S. 56 und S. 57 dargestellt. Auch für die Gruppe der EWS wurden die Fallzahlen der bereits kategorisierten AK in insgesamt sechs Kreuztabellen eingetragen, in denen jeweils jeder der vier AK gegen jeden eingesetzt wurde. Mittels des anschließend durchgeführten Vorzeichentest zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der AK- Reaktivität bzw. kategorisierten Färbeintensität von FAK C 903 mit ED 98015, FAK C 20 mit ED 98015, sowie FAK A 17 mit ED 98015 in der Tumorgruppe der EWS (s. **Tab. 8**, S. 57), allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich aller FAK- Antikörper untereinander. Dieses Ergebnis war mit dem des Vorzeichentests für die Gruppe der NEP identisch.

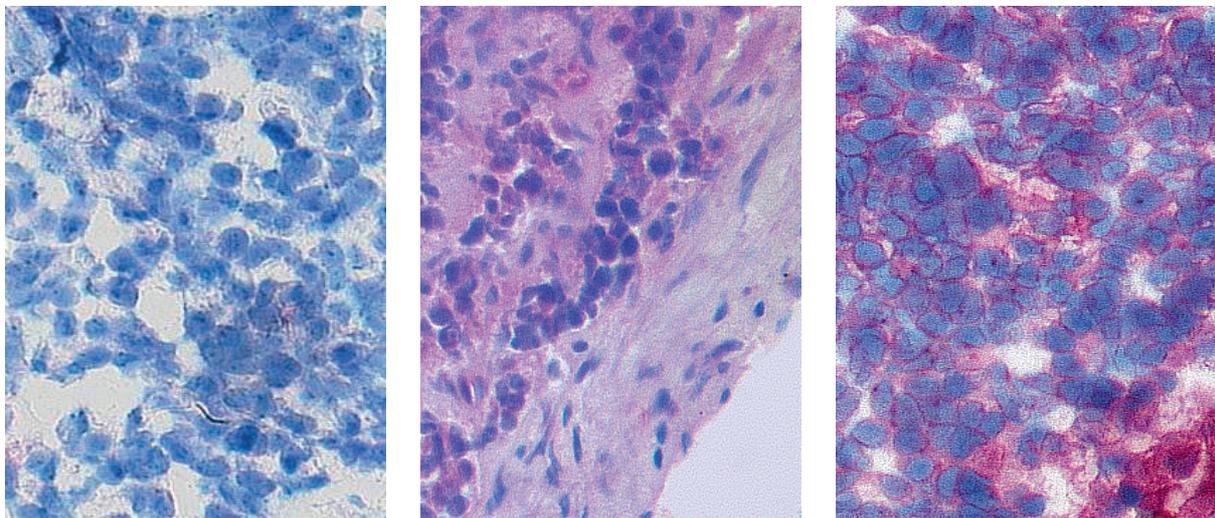


Abb. 25 FAK C 903- Proteinexpression in Ewing-Sarkomen und peripheren neuroektodermalen Tumoren

Links: fehlende (Immun-) Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

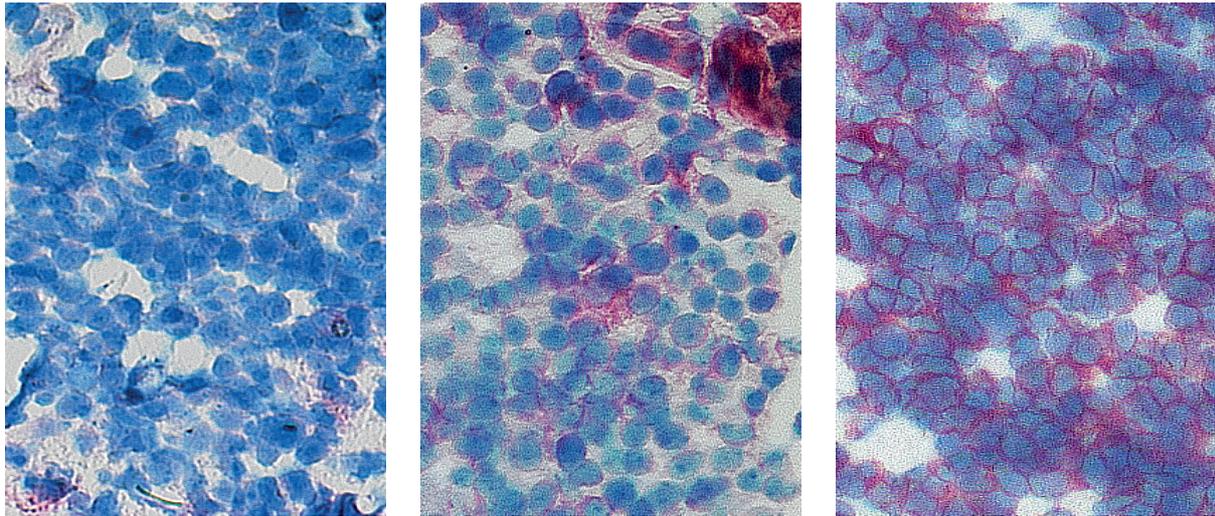


Abb. 26 FAK C 20- Proteinexpression in EWS und PNET

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

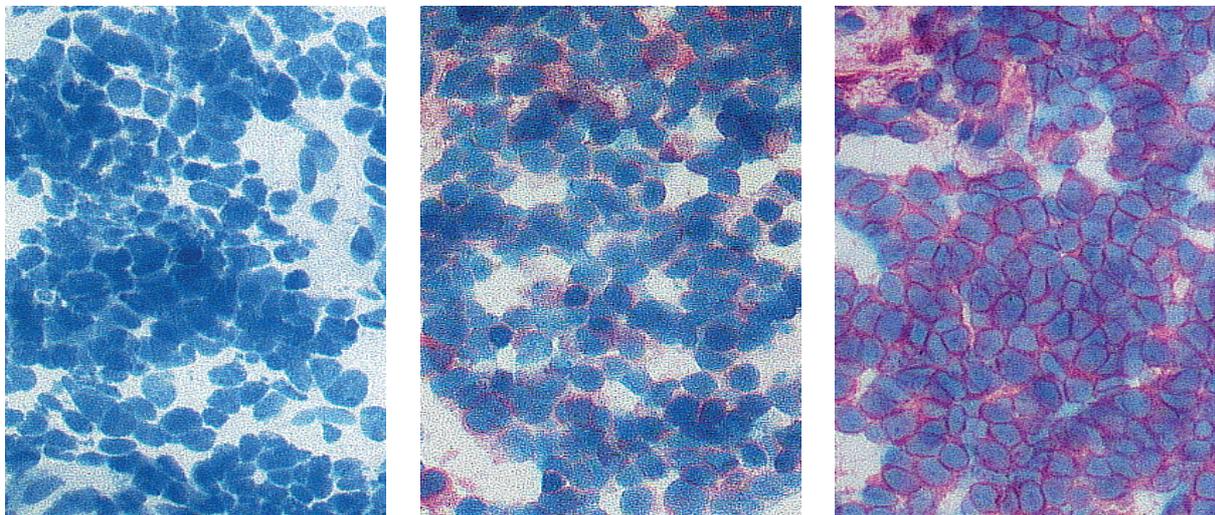


Abb. 27 FAK A 17- Proteinexpression in EWS und PNET

Links: Negativkontrollschnitt, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

Tab. 8 Vorzeichentest EWS und PNET

	FAK C 903 - ED 98015	FAK C 20 - ED 98015	FAK A 17 - ED 98015	FAK C 20 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,008	,008	,002	1,000	,375	,625

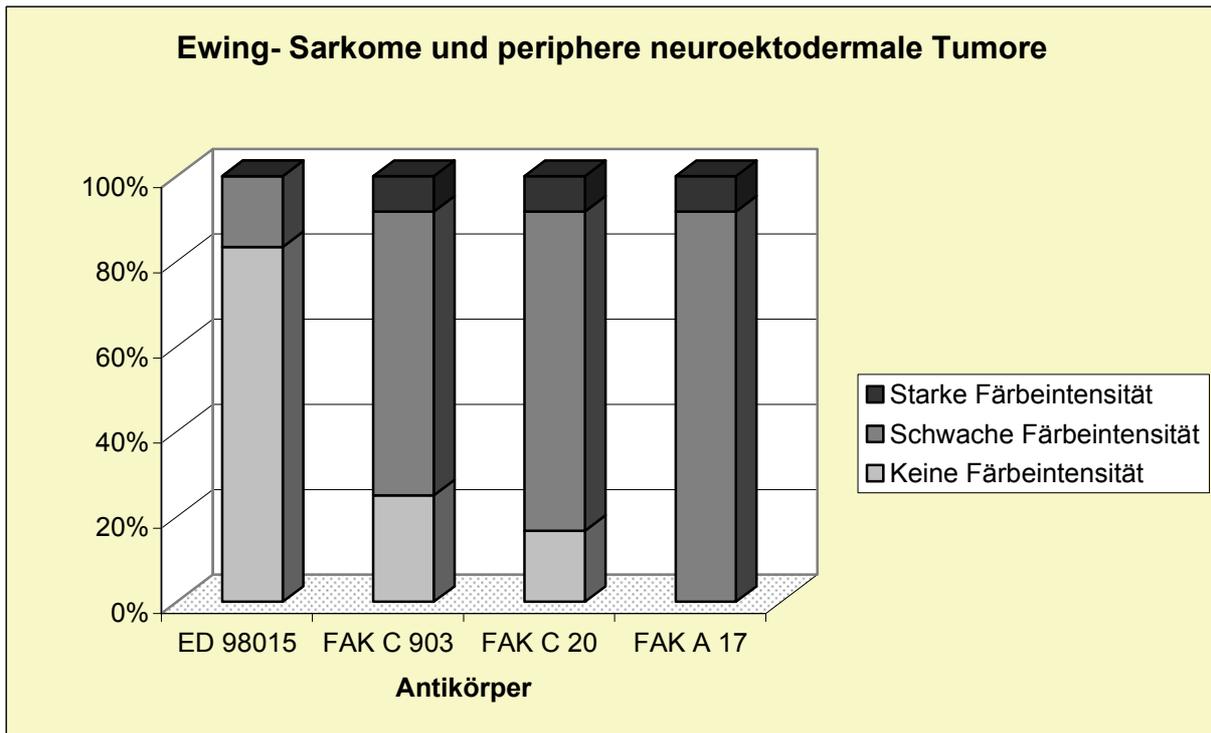


Abb. 28 Proteinexpression in der Gruppe der EWS und PNET

4.3.4 Rhabdomyosarkome

Anfänglich wurden 29 Fälle von RMS voruntersucht. Aufgrund einer unzureichenden Immunreaktivität bei der „internen Kontrolle“ mit Vimentin (43) musste ein Fall, und wegen eines zu hohen Alters der Patienten bei Erstdiagnosestellung (oberhalb des definierten Kollektivs) drei weitere Fälle, von den folgenden Untersuchung ausgeschlossen werden. Außerdem wurde ein Fall wegen nicht suffizient auflärbarer Identität bzw. Diagnose im Rahmen der parallel durchgeführten Datenrecherche ausgeschlossen. Bei den verbliebenen 24 Fällen handelte es sich in vier Fällen um Paraffin- eingebettete Rezidivtumore bzw. Metastasengewebe und bei zwei Fällen um kryokonservierte Primärtumore. Somit konnten zuletzt insgesamt 18 Paraffin- eingebettete Primärtumorfälle in die Hauptauswertung eingeschlossen werden, die analog der **Tab. 6**, S. 53 subtypisiert werden konnten. **Abb. 29**, S. 59 stellt die Färbeintensitäten bzw. Immunreaktivität der Primärantikörper bei Paraffin- eingebetteten Primärtumoren der Gruppe der RMS graphisch dar. Bei den RMS zeigte sich ebenfalls in über 90% der Fälle keine Reaktion bei der Untersuchung mit dem AK ED 98015. Ein Fall aus der Gruppe der RMS zeigte eine (starke) Färbeintensität für ED 98015. Bei der Untersuchung mit dem Antikörper FAK C 903 war in fast 60% der Fälle keine, in ca. 30% eine schwache und in weniger als 10% eine starke Färbeintensität nachweisbar. FAK C 20 zeigte in fast 40% der Fälle ein schwache und in mehr als 40% der Fälle eine starke Färbeintensität. Für FAK A 17 zeigte sich in unter 20% der Fälle eine schwache und in einem sehr

hohen Anteil von knapp 65% eine starke Färbeintensität. Nur zwei Fälle aus der RMS- Gruppe zeigten keinerlei Reaktion mit allen drei FAK- AK. Fotografisch sind die histologischen Schnitte der Gruppe der RMS für die AK FAK C 903, C 20 und A 17 und deren mögliche Färbeintensitäten in den **Abb. 30, Abb. 31** und **Abb. 32** auf S. 60 und S. 61 dargestellt. Die für die Tumorgruppe der RMS kategorisierten AK wurden entsprechend der jeweiligen Fallzahlen in insgesamt sechs Kreuztabellen aufgetragen. Es wurde analog zu dem bereits bei den anderen Haupttumorgruppen angewandten Vorgehen erneut jeder der vier AK gegen jeden eingesetzt. Im durchgeführten Vorzeichentest ergab sich das in **Tab. 9**, S. 60 dargestellte Ergebnis. So konnte ein signifikanter Unterschied bei Vgl. der AK- Reaktion bzw. kategorisierten Färbeintensität zwischen FAK C 20 und ED 98015, FAK A 17 und ED 98015, FAK C 20 und FAK C 903, sowie FAK A 17 und FAK C 903 in der Tumorgruppe der RMS festgestellt werden. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der AK- Reaktion von FAK C 903 und ED 98015, sowie FAK A 17 und FAK C 20. Bei letztgenanntem Vergleich zwischen FAK A 17 und FAK C 20 hatte sich bisher in keiner der vier Haupttumorgruppen (NEP; NBL, EWS und RMS) ein signifikanter Unterschied im Vorzeichentest gezeigt.

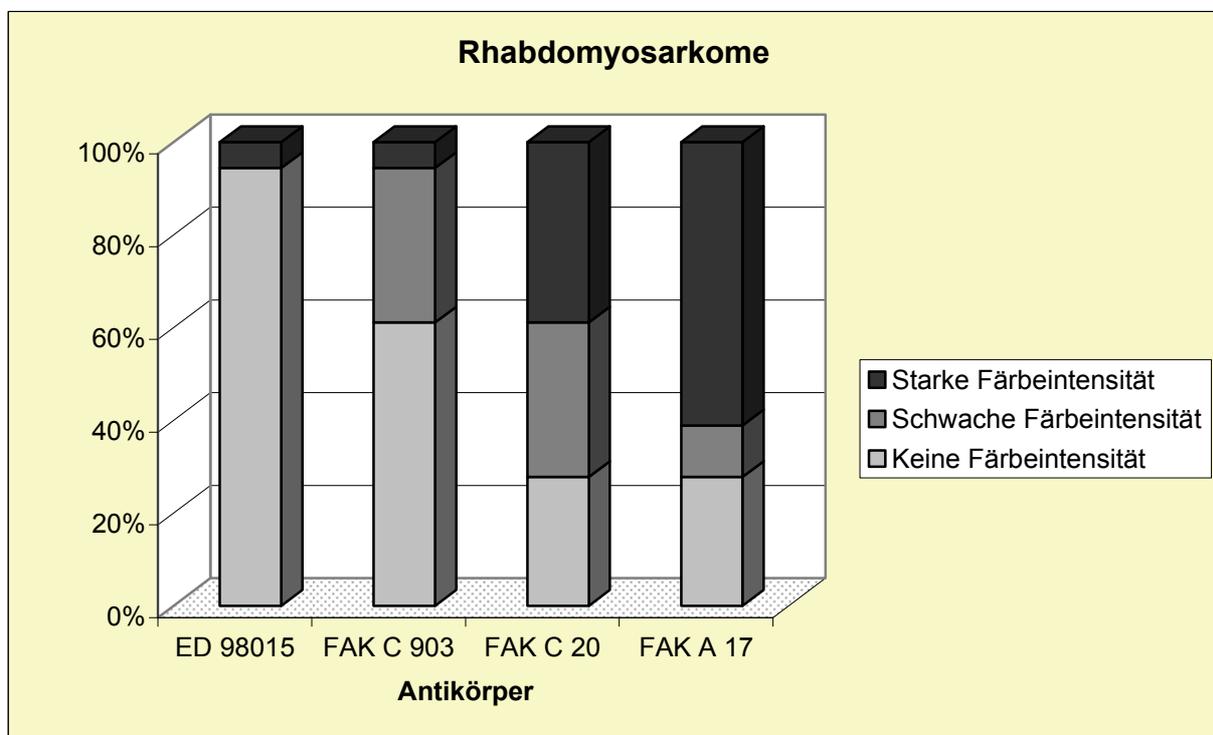
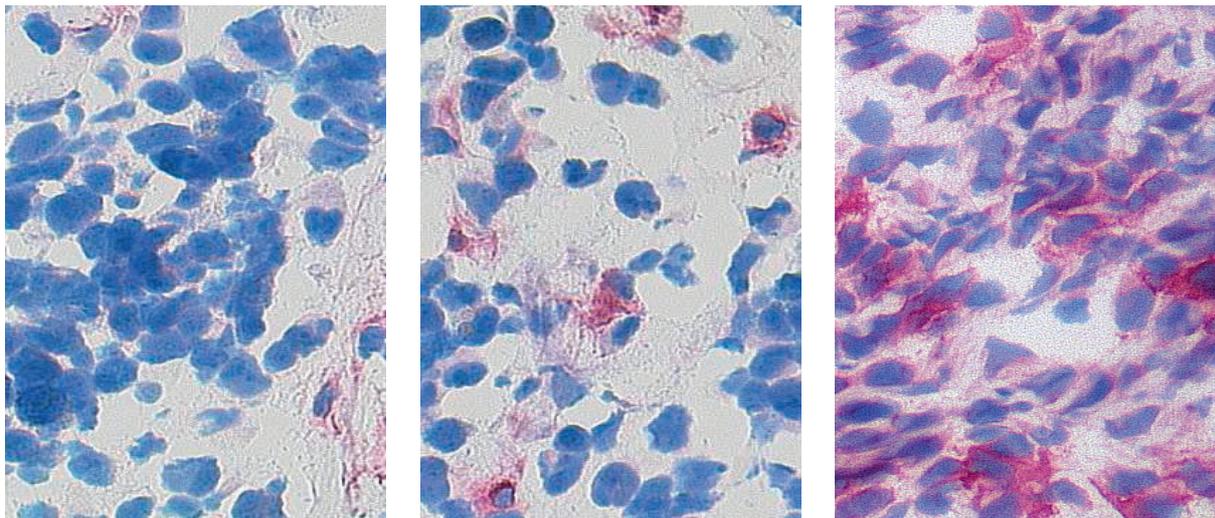


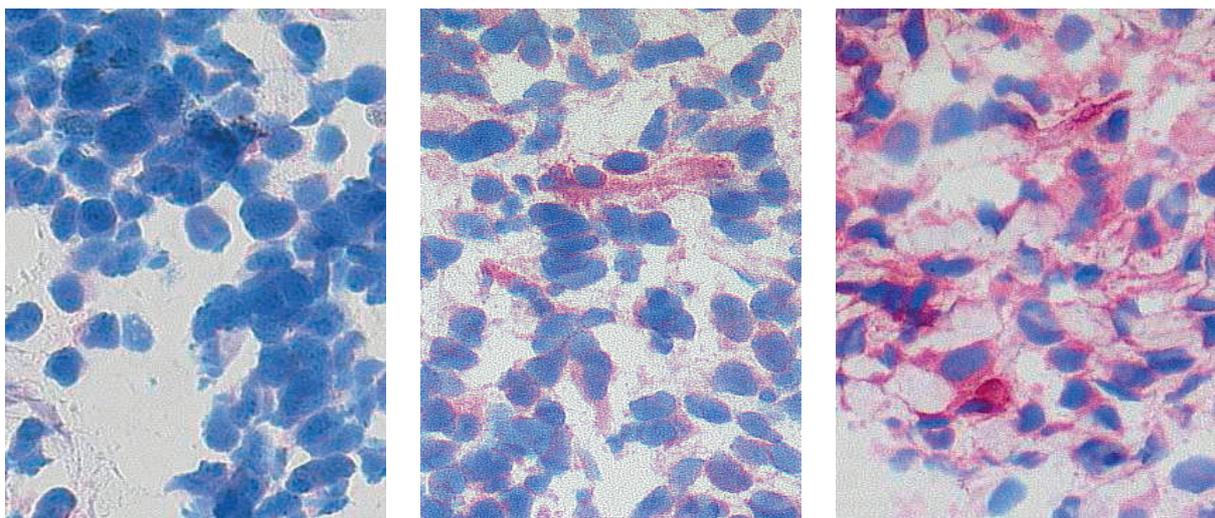
Abb. 29 Proteinexpression in der Gruppe der Rhabdomyosarkome

Tab. 9 Vorzeichentest RMS

	FAK C 903 - ED 98015	FAK C 20 - ED 98015	FAK A 17 - ED 98015	FAK C 20 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 903	FAK A 17 - FAK C 20
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,125	,002	,003	,022	,006	,180

**Abb. 30** FAK C 903- Proteinexpression in RMS

Links: fehlende (Immun-) Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

**Abb. 31** FAK C 20- Proteinexpression in RMS

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

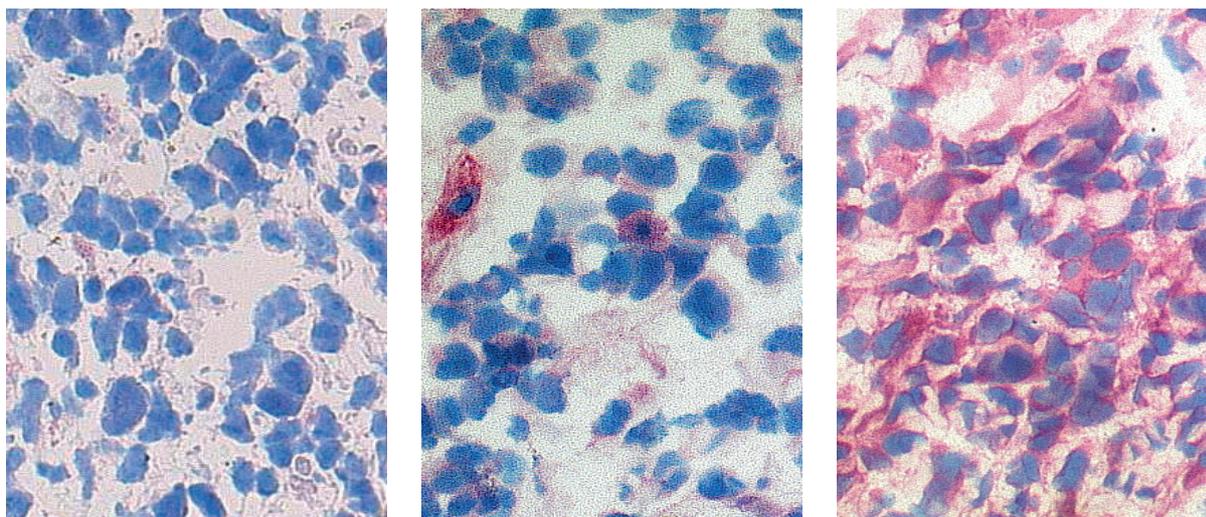


Abb. 32 FAK A 17- Proteinexpression in RMS

Links: fehlende Reaktion, Mitte: schwache Reaktion, Rechts: starke Reaktion.

4.3.5 Ganglioneurome

Die vorliegenden Fälle aus der Gruppe der GN wurden in Ergänzung zu den vier primär untersuchten, vorgenannten Tumorgruppen untersucht. Es handelt sich um eine sehr kleine Gruppe von fünf Paraffin- eingebetteten Primärtumorfällen. Zwei von initial sieben Fällen wurden wegen zu hohem Alter der Patienten bei Erstdiagnosestellung von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Es zeigte sich keine Färbeintensität bzw. Immunreaktivität bei der immunhistochemischen Färbung mit ED 98015. Bei FAK C 903 war in allen Fällen eine Reaktion nachweisbar, davon in zwei Fällen mit schwacher und in drei Fällen mit starker Färbeintensität. Für FAK C 20 zeigten alle fünf Fälle eine schwache Färbeintensität. In der immunhistochemischen Färbung mit FAK A 17 war in drei Fällen keine und in zwei Fällen eine schwache Färbeintensität nachweisbar. Entsprechend den vorhergehenden Abbildungen zu den vier primär untersuchten Tumorgruppen zeigt **Abb. 33**, S. 62 eine graphische Darstellung der Färbeintensitäten der verschiedenen AK in der Gruppe der GN.

4.3.6 Paraffin- eingebettetes vs. kryokonserviertes Gewebe

In Ergänzung zur Hauptauswertung wurde in der Gruppe der NEP zu sechs Paraffin- eingebetteten Primärtumorfällen bzw. einem Paraffin- eingebetteten Rezidivtumor vergleichend auch das entsprechend gleiche, kryokonservierte Gewebe des jeweiligen Falls mit den Primärantikörpern untersucht. In der Gruppe der NBL handelte es sich um sechs Paraffin- eingebettete Primärtumorfälle und zwei Paraffin- eingebettete Rezidivtumore, die analog in kryokonservierter Form untersucht wurden. Sowohl in der Tumorgruppe der EWS, als auch in der Gruppe der RMS, war es bei je zwei Primärtumorfällen möglich zusätzlich zum Paraffin-

eingebetteten Material, das entsprechende kryokonservierte Gewebe mit den Primärantikörpern zu untersuchen. In der Gruppe der GN lag ein Primärtumor in beiden Konservierungsformen vor. Im Bezug auf das Gesamtkollektiv, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorfälle, konnten somit 20 Fälle vergleichend im Sinne einer verbundenen Stichprobe untersucht werden. Bei drei der 20 Fälle handelte es sich um Rezidivtumorfälle. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Test für nicht normal verteilte, verbundene Stichproben sind in **Tab. 10**, S. 64 aufgeführt. Es konnte, außer für den AK FAK C 20, ein signifikanter Unterschied für die ermittelten Färbeintensitäten der jeweiligen AK im Vgl. von kryokonserviertem zu Paraffin- eingebettetem Gewebe festgestellt werden. Dabei lag jedoch für die AK FAK C 903 und A 17 der Median der Färbeintensität bei Paraffin- eingebettetem Gewebe im Bereich schwacher und bei kryokonserviertem Gewebe im Bereich starker Färbeintensität, was anhand der graphischen Darstellung in den **Abb. 34** und **Abb. 35**, S. 63, sowie **Abb. 36**, S. 64 in den Boxplots nachzuvollziehen ist. (Der AK FAK A 17 wurde wegen deutlicher Ähnlichkeit zur Abbildung von FAK C 903 graphisch nicht dargestellt.) Aufgrund der insgesamt etwas besseren Reaktion des AK ED 98015 an kryokonserviertem Gewebe im Vgl. zum Paraffin- eingebettetem Gewebe ergab sich rechnerisch ein noch signifikanter Unterschied im Wilcoxon- Test, trotz der insgesamt sehr schlechten Immunreaktion dieses AK und einem bei Null liegenden Median für beide Konservierungsformen.

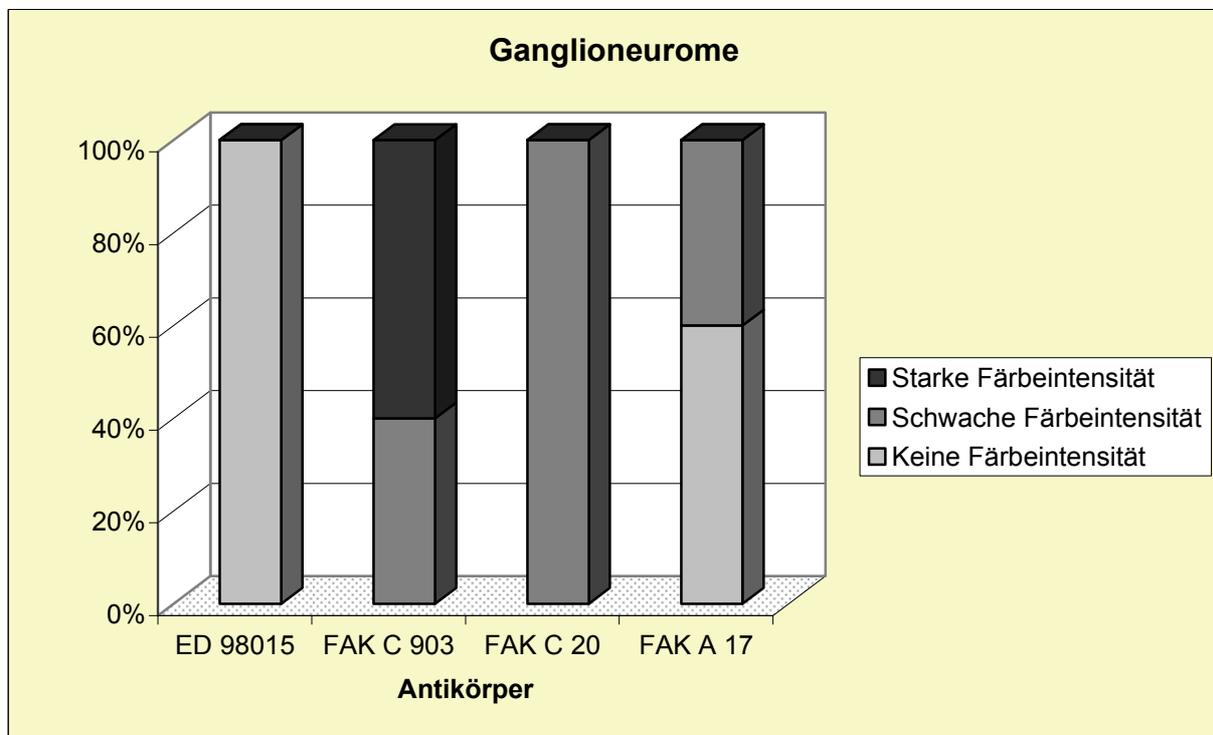


Abb. 33 Proteinexpression in der Gruppe der Ganglioneurome

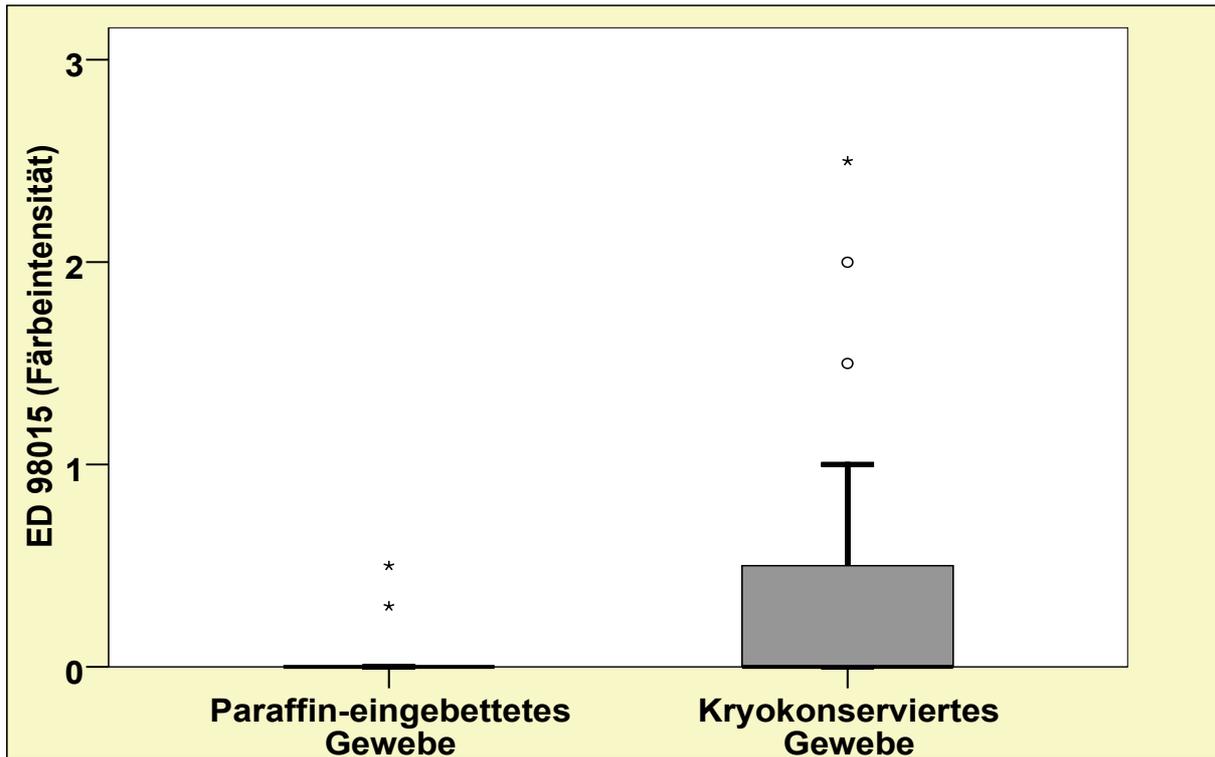


Abb. 34 Immunreaktivität von ED 98015 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung

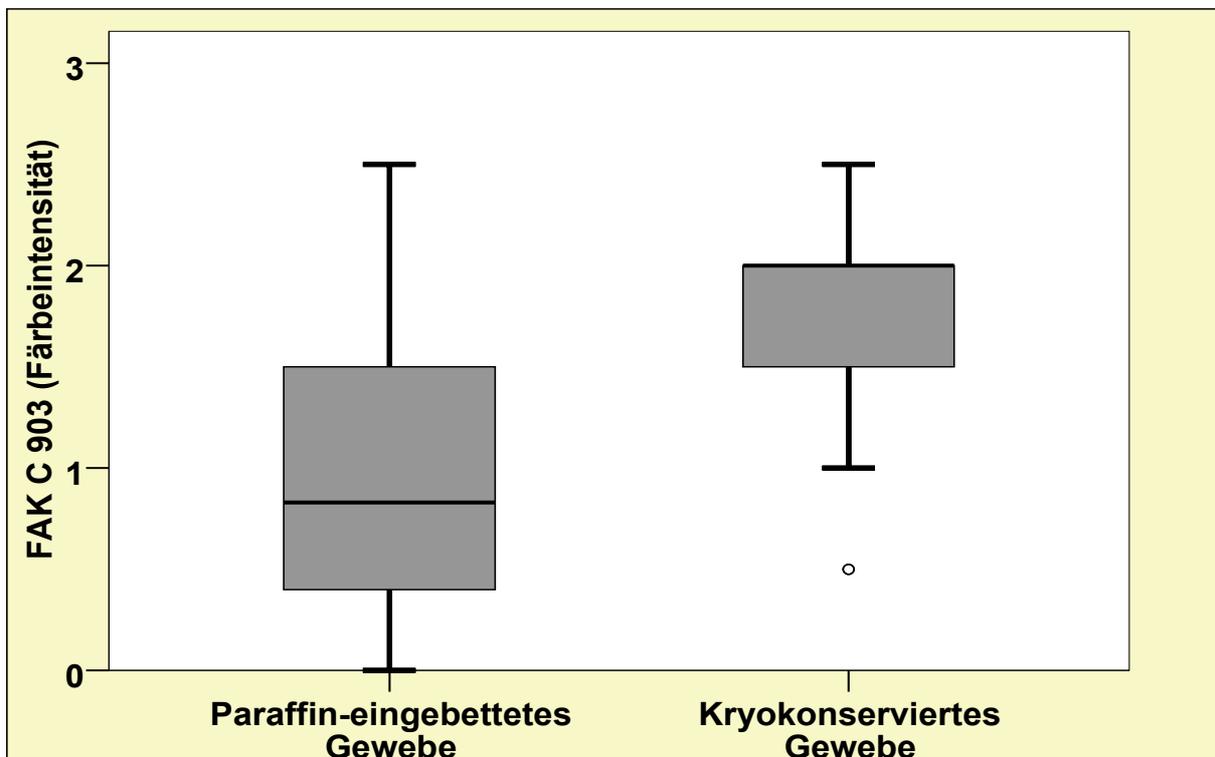


Abb. 35 Immunreaktivität von FAK C 903 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung

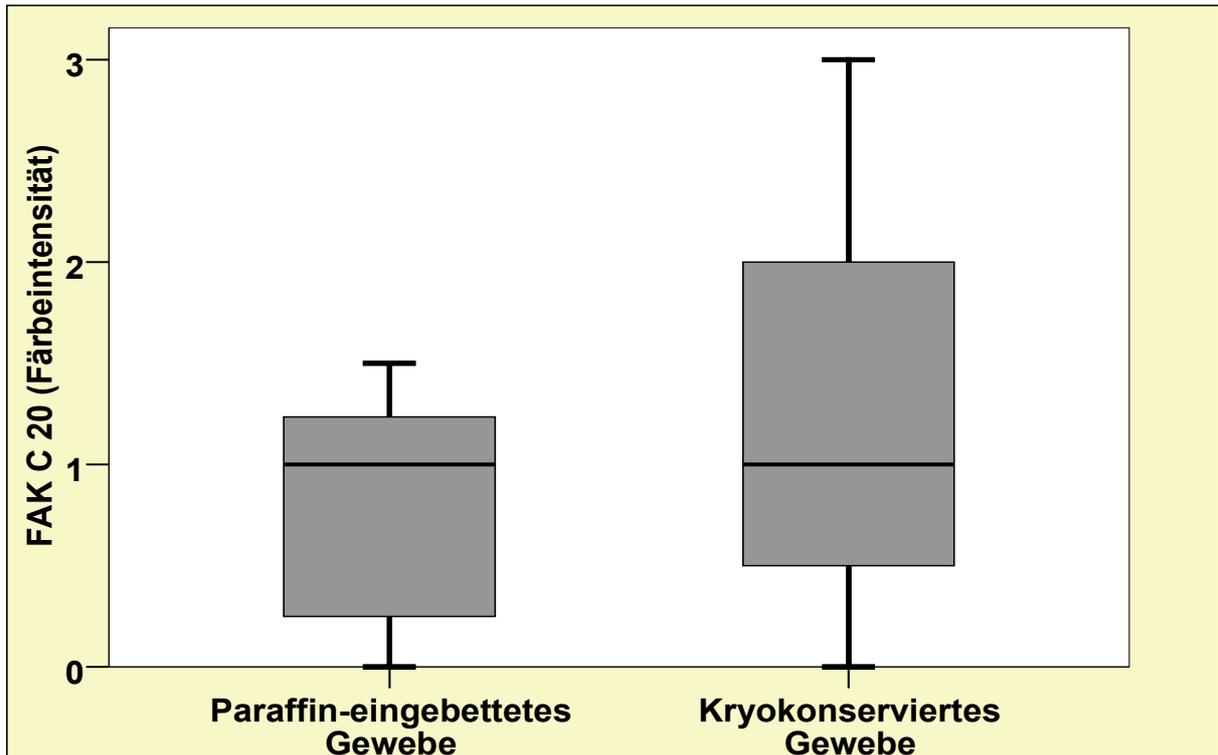


Abb. 36 Immunreaktivität von FAK C 20 bei unterschiedlicher Gewebekonservierung

Tab. 10 Wilcoxon- Test der vier AK im Vergleich von kryokonserviertem mit Paraffin-eingebettetem Gewebe

	ED 98015 Kryo – ED 98015 Paraffin	FAK C 903 Kryo – FAK C 903 Paraffin	FAK C 20 Kryo – FAK C 20 Paraffin	FAK A 17 Kryo– FAK A 17 Paraffin
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,041	,001	,264	,000

4.4 WACHSTUMSFRAKTION (MIB-1)/ KI 67- INDEX IN DEN TUMORGRUPPEN

Zur Untersuchung der Wachstumsfraktion wurde in den untersuchten Tumorgewebeprobe eine immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker MIB-1 (entspricht Ki 67) durchgeführt und der prozentuale Anteil an positiv gefärbten Zellen (nukleäre Rotfärbung) von jeweils insgesamt 200 ausgewerteten Zellen bestimmt. In den Gewebeprobe aller untersuchten Tumorgruppen war eine Spanne der Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1 Reaktivität) von 0 bis 38% nachweisbar. Beim Vgl. des stetigen Parameters der Wachstumsfraktion (MIB-1 Reaktion) zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Tumorgruppen ($p=0,036$ im H-Test nach Kruskal und Wallis). Graphisch dargestellt wird dies in den Box Plots der **Abb. 37**, S. 65. Vor allem Mittelwert und Median der Wachstumsfraktion (MIB-1 Reaktion)

der RMS lagen oberhalb der Werte der übrigen Gruppen (s. **Tab. 11**, S. 65). Die GN zeigten praktisch keinerlei MIB-1 Reaktivität. Eine exemplarische fotografische Darstellung unterschiedlich starker Wachstumsfraktionen (MIB-1 Reaktivitäten), als auch Mitoseraten, an verschiedenen Gewebeproben der untersuchten Tumorgruppen ist in **Abb. 40**, S. 68 dargestellt.

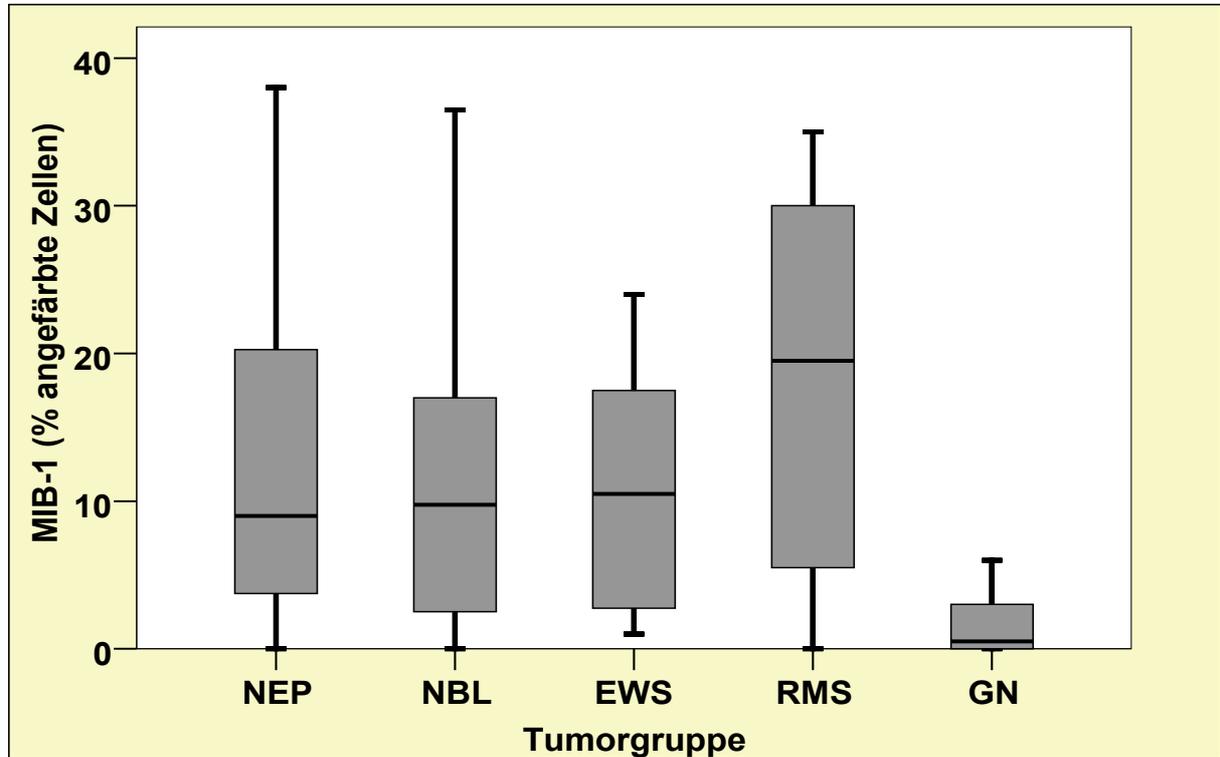


Abb. 37 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Tumorgruppen

Tab. 11 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Tumorgruppen

Tumorgruppe	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.	N
NEP	13,26	11,284	9,00	0	38	23
NBL	11,56	10,224	9,75	0	37	26
EWS	10,75	8,484	10,50	1	24	12
RMS	18,36	13,424	19,50	0	35	18
GN	1,90	2,608	,50	0	6	5
Insgesamt	12,79	11,271	9,75	0	38	84

4.4.1 Mitoseraten und deren Korrelation zur Wachstumsfraktion (MIB-1) im Gesamtkollektiv

Es wurde die Anzahl der in Mitose befindlichen Zellen in 10 HPF bestimmt. In den untersuchten Gewebeproben der verschiedenen Tumorgruppen war eine Spanne der Mitoserate von 0 bis maximal 34 zu verzeichnen. Beim Vgl. der Mitoserate der verschiedenen Tumorgruppen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (graphisch nicht dargestellt). Weiterhin wurden die Wachstumsfraktionen (MIB-1) mit den Mitoseraten im Bezug auf das Gesamtkollektiv aller Tumorgruppen miteinander korreliert. Hier ergab sich in der Rangkorrelation nach Spearmans Rho ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,396$, was für eine geringe Korrelation spricht, welche jedoch auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig) war. Eine graphische Darstellung der Korrelation zeigt die folgende **Abb. 38**.

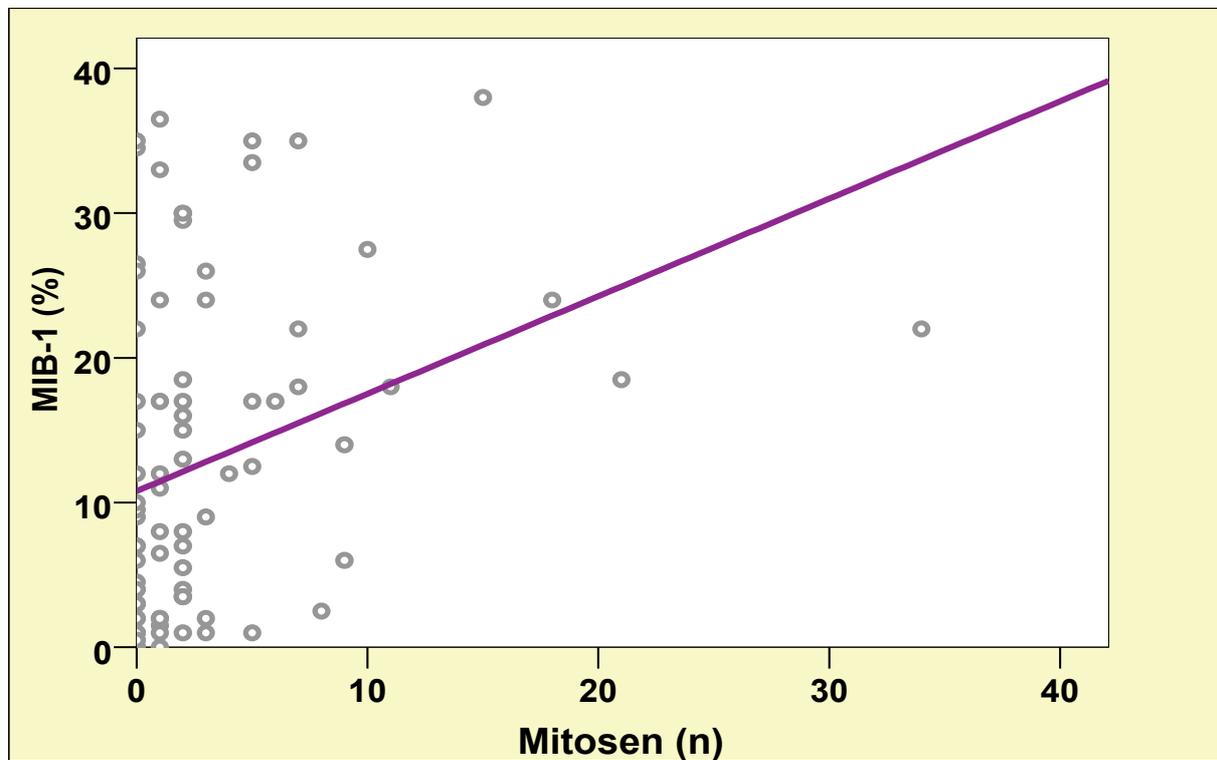


Abb. 38 Korrelation zwischen Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) und Mitoserate im Gesamtkollektiv

4.4.2 Wachstumsfraktion (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP

Innerhalb der Gruppe der NEP konnte anhand der histopathologischen Befunde eine Unterscheidung getroffen werden, ob präoperativ eine Chemotherapie erfolgt war oder nicht. Eine Übersicht über die Aufteilung der untersuchten 23 Fälle gibt **Tab. 5**, S. 50. Es handelt sich bei allen untersuchten Gewebeproben um das Resektatgewebe und nicht um präoperativ zur Diagnostik entnommenes Biopsiegewebe. Beim Vgl. der Gruppenvariablen „mit und ohne präoperativ erfolgte Chemotherapie“ ergab sich im Hinblick auf die Wachstumsfraktion (MIB-1 Reaktivität) kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ($p=0,814$). In der graphischen Darstellung (s. **Abb. 39**, S. 67) zeigte sich im Verhältnis der beiden Gruppen zueinander dennoch ein niedrigerer Median, sowie eine größere Spannweite der Box für die Gruppe mit präoperativ erfolgter Chemotherapie. Die Fälle mit unbekanntem Status wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

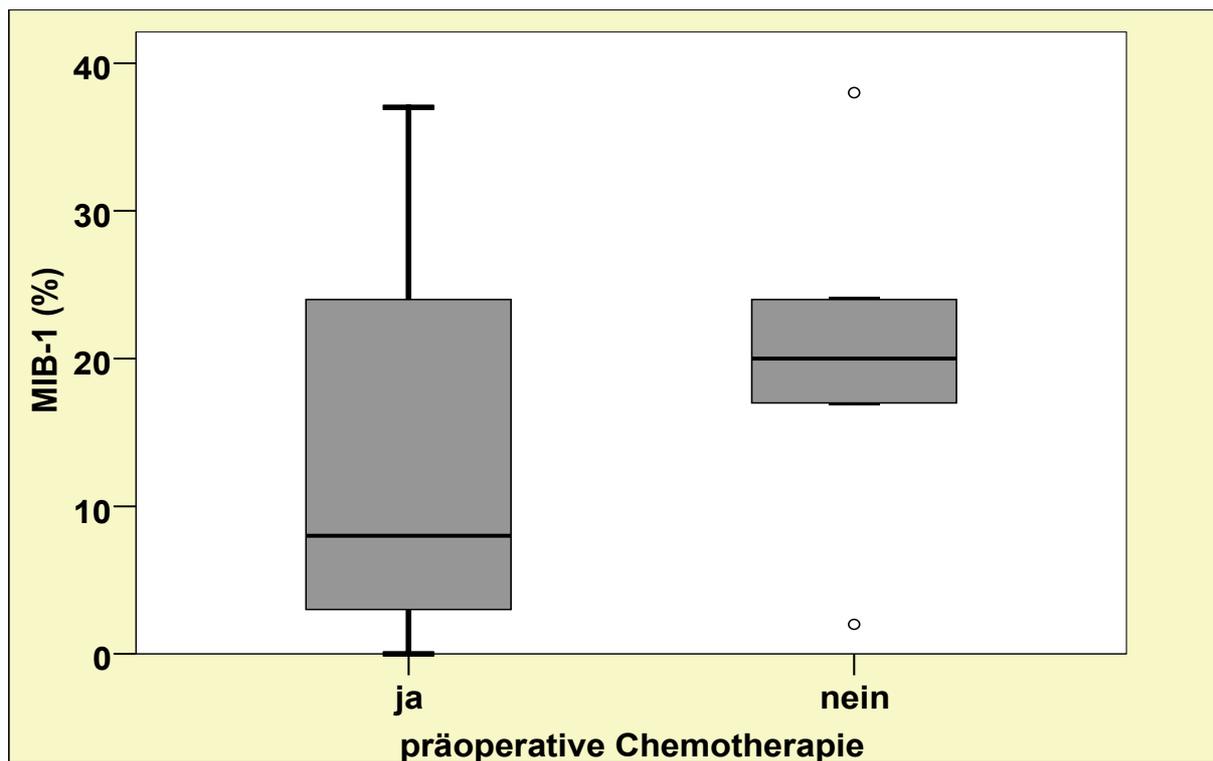


Abb. 39 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie bei NEP

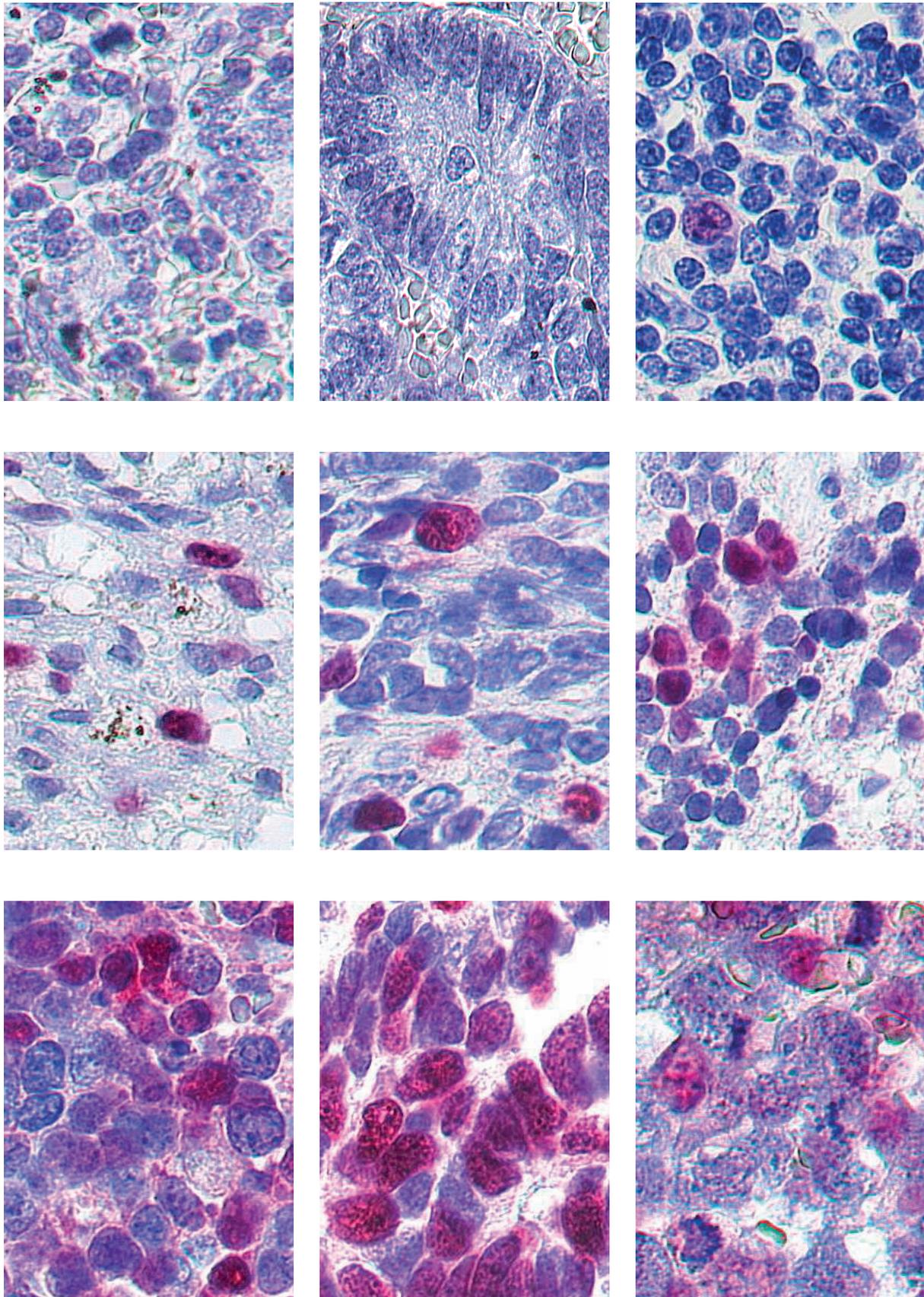


Abb. 40 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1 Reaktion/ angefärbte Zellen) und Mitosen

Exemplarische Darstellung:

Obere Reihe: keine (bis einzelne) angefärbte Zelle(n), einzelne Mitosen (im linken Ausschnitt);

Mittlere Reihe: mehrere angefärbte Zellen, vereinzelt Mitosen;

Untere Reihe: viele angefärbte Zellen, mehrere Mitosen (im rechten Ausschnitt)

4.4.3 Wachstumsfraktion (MIB-1) im Vgl. zu FAK- Immunreaktivität

Ausgehend von der in Kap. 4.3, S. 48 beschriebenen Kategorisierung nach der Färbeintensität bzw. Immunreaktivität der einzelnen FAK- AK (FAK C 903, FAK C 20 und FAK A 17) in fehlende, schwache und starke Immunreaktivität, jeweils für jede der vier Haupttumorgruppen, wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median der prozentualen Wachstumsfraktion (MIB-1 Reaktivität) der so kategorisierten Fälle berechnet, wie dies exemplarisch in **Tab. 12**, S. 69 für FAK C 903 in NEP und in **Tab. 13**, S. 69 für FAK C 20 in NBL dargestellt ist. Bereits beim rein deskriptiven Vgl. der so berechneten Mittelwerte, als auch der Standardabweichungen, der Wachstumsfraktion (MIB-1) zeigten sich für alle Tumorgruppen und für alle drei FAK- AK sehr ähnliche bzw. überlappende Werte. Ergänzend dazu wurde, soweit es die Stichprobengröße zuließ, mittels eines nicht parametrischen Test für unabhängige, nicht normal verteilte Stichproben (Mann-Whitney- U- Test, zweiseitig) untersucht, ob ein statistischer signifikanter Unterschied beim Vgl. der Wachstumsfraktionen (MIB-1 Reaktivität) zwischen den Kategorien fehlender mit schwacher, schwacher mit starker, sowie fehlender mit starker FAK- Immunreaktivität nachweisbar war. Dies erfolgte erneut getrennt für die vier Haupttumorgruppen und die drei FAK- AK. Die so berechneten Signifikanzen (p-Wert) lagen zwischen 0,59 und 1,0, und damit alle deutlich oberhalb des angenommenen Signifikanzniveaus von $p=0,05$.

Tab. 12 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in NEP kategorisiert für FAK C 903

Tumorgruppe: NEP	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.	N
FAK C 903						23
Fehlende Immunreaktivität	13,58	13,15	8,5	2	38	6
Schwache Immunreaktivität	11,96	10,99	7	1	34,5	14
Starke Immunreaktivität	12,63	11,53	17	0	22	3

Tab. 13 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in NBL kategorisiert für FAK C 20

Tumorgruppe: NBL	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.	N
FAK C 20						26
Fehlende Immunreaktivität	15,67	12,16	11	1	37	9
Schwache Immunreaktivität	12,68	10,74	9,5	0,5	33,5	14
Starke Immunreaktivität	17,78	18,17	17	1	36,5	3

4.5 REZIDIV- UND ÜBERLEBENSANALYSE

4.5.1 Ereignis- freies Überleben und Gesamtüberleben

In die Überlebensanalyse konnten 71 der insgesamt 84 Fälle aus der Hauptauswertung eingeschlossen werden. Nicht eingeschlossen wurden einerseits die 5 Fälle aus der Gruppe der GN, sowie je ein Fall aus der Gruppe der NEP und EWS, 2 Fälle aus der Gruppe der NBL und vier Fälle aus der Gruppe der RMS, zu denen keine Überlebensdaten generiert werden konnten. Innerhalb der Tumorgruppen stellten sich die Häufigkeiten für die möglichen Ereignisse: „verstorben“, „am Leben“ und „nicht bekannt“, entsprechend der **Tab. 14**, S. 70 dar. 17 der 71 Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht mehr am Leben, so dass das prozentuale Gesamtüberleben in den vier Haupttumorgruppen (NEP, NBL, EWS und RMS) bei zusammen 76,1% lag. Sowohl hinsichtlich des Ereignis- freien Überlebens (engl.: Event- free survival), als auch des Gesamtüberlebens (engl.: Overall survival) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Haupttumorgruppen festgestellt werden ($p= 0,908$ und $p= 0,959$ im H-Test nach Kruskal und Wallis). Das Ereignis- freie Überleben in den Haupttumorgruppen (**Tab. 15**, S. 70) ist anhand der Box Plots in **Abb. 41**, S. 71 graphisch dargestellt. **Abb. 42**, S. 71 zeigt das Gesamtüberleben in den vier untersuchten Haupttumorgruppen.

Tab. 14 Lebensstatus in den Tumorgruppen

Häufigkeit	NEP	NBL	EWS	RMS	GN
verstorben	6	4	3	4	0
am Leben	16	20	8	10	0
nicht bekannt	1	2	1	4	5
Gesamt	23	26	12	18	5

Tab. 15 Ereignis- freies Überleben (Monate) in den Haupttumorgruppen

Tumorgruppe	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.	N
NEP	50,90	44,649	36,50	0	143	22
NBL	52,33	40,020	53,00	0	159	24
EWS	39,00	33,079	38,00	0	98	11
RMS	57,00	55,763	36,00	0	164	14
Insgesamt	50,74	43,457	40,00	0	164	71

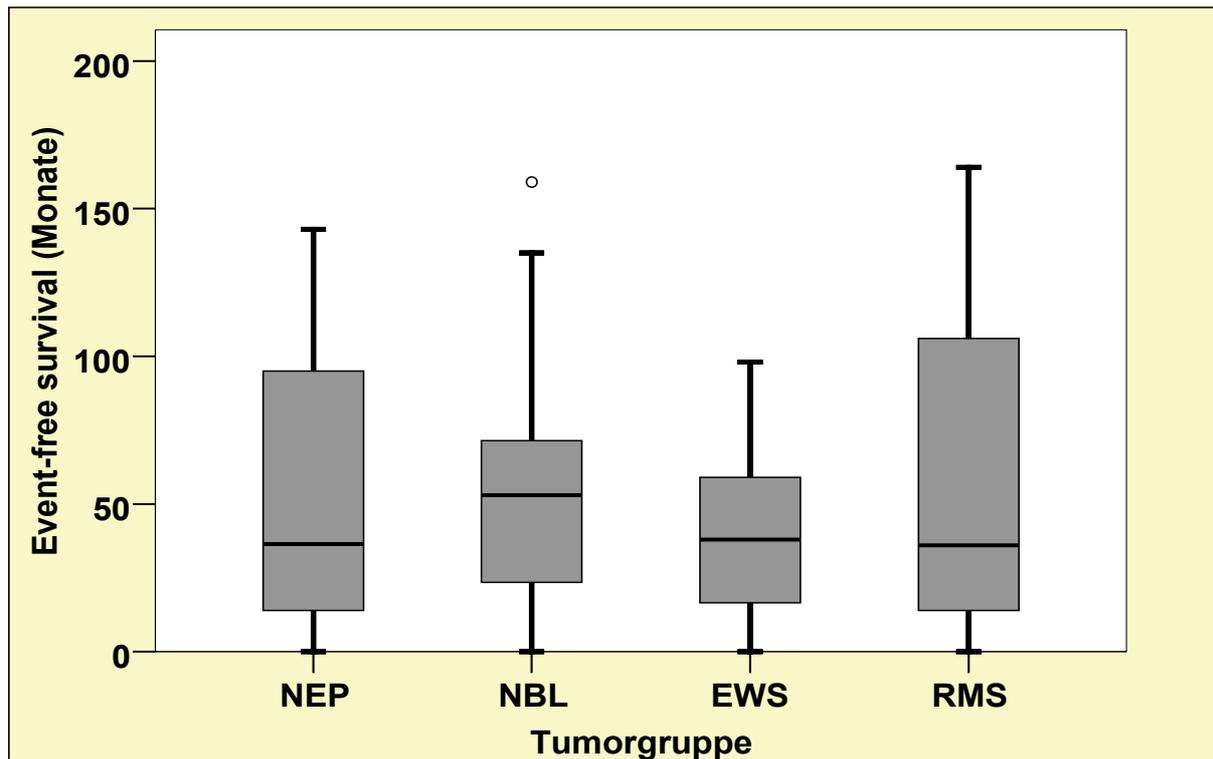


Abb. 41 Ereignis- freies Überleben (Monate) in den Haupttumorgruppen

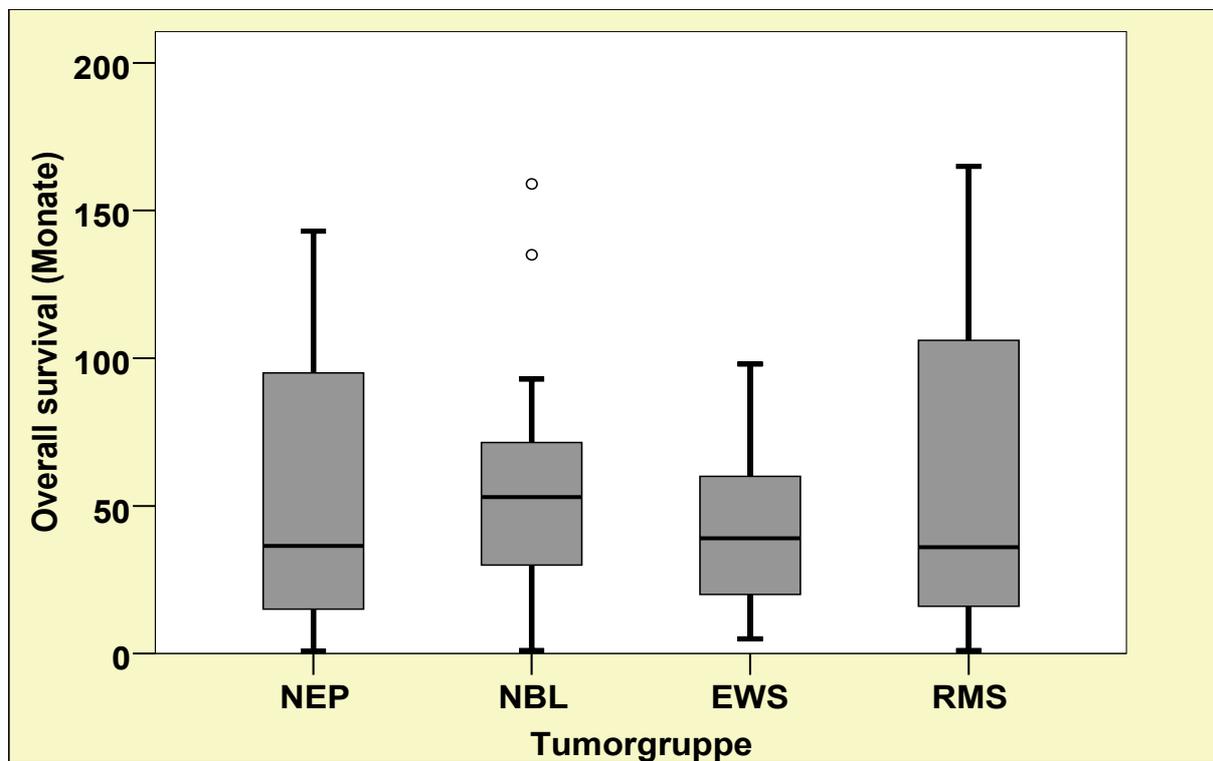


Abb. 42 Gesamtüberleben (Monate) in den Haupttumorgruppen

Das 95%- Konfidenzintervall der berechneten Mittelwerte für die Überlebenszeit der Gesamtgruppe betrug 108 bis 141 Monate in der Kaplan-Meier-Analyse (Tab. 16, S. 73). Die mittels Kaplan-Meier-Analysen berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten der einzelnen Tumorgruppen sind in Abb. 43, S. 72 graphisch dargestellt. Hierbei zeigte sich, im Vgl. aller vier Haupttumorgruppen, die geringste berechnete Überlebenswahrscheinlichkeit für EWS und RMS, während die NEP gering bessere, und die NBL die besten Überlebenswahrscheinlichkeiten aufwiesen. Der graphisch angedeutete Unterschied der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit zwischen den verschiedenen Tumorgruppen konnte mittels statistischer Berechnung im Log Rank Test nicht bestätigt werden ($p= 0,771$). Ebenso ergab sich für die Ereignis- freie Überlebenswahrscheinlichkeit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumorgruppen im Log Rank Test ($p= 0,799$) (graphisch nicht dargestellt). Analog der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit zeigten sich auch bei der Ereignis- freien Überlebenswahrscheinlichkeit für die Gruppe der EWS und RMS annähernd gleiche bzw. im Vgl. der vier Gruppen miteinander die niedrigsten Werte. Diese wurden gefolgt von der Gruppe der NEP. Die beste Ereignis- freie Überlebenswahrscheinlichkeit ergab sich für die Gruppe der NBL.

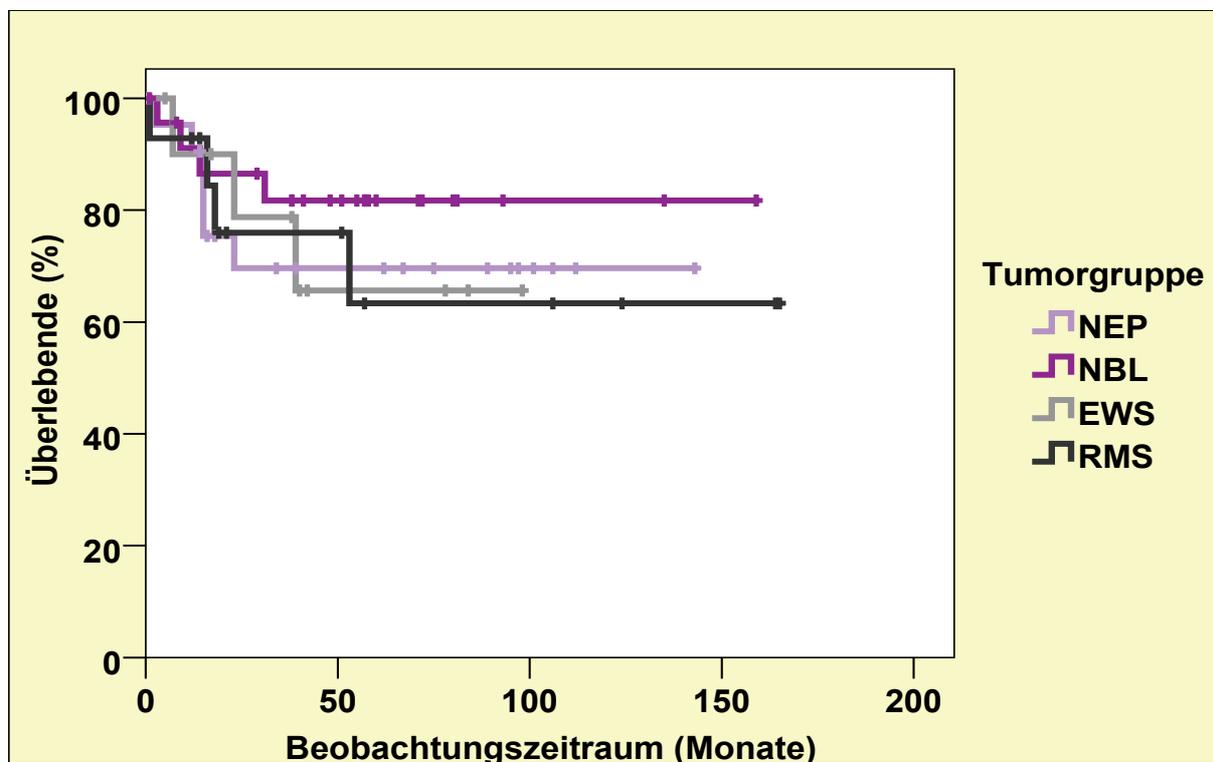


Abb. 43 Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in den Haupttumorgruppen

Tab. 16 Mittelwerte für die berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten

Tumorgruppe	Mittelwert			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
NEP	103,786	13,449	77,426	130,147
NBL	132,626	11,958	109,189	156,064
EWS	72,719	12,041	49,118	96,319
RMS	114,117	20,808	73,333	154,901
Gesamt	124,386	8,471	107,784	140,989

4.5.2 MIB-1 und Gesamtüberleben

Die MIB-1 Reaktivität der in die Überlebensanalyse eingeschlossenen 71 Fälle der vier Haupttumorgruppen ist in **Tab. 17**, S. 73 dargestellt. Der anhand der Summe aller vier Haupttumorgruppen errechnete Median von 12% wurde zur Klassierung der vorliegenden kontinuierlichen Daten für jede einzelne Tumorgruppen herangezogen. Dadurch konnte ein Vergleich der Mortalität in den beiden Untergruppen durch Berechnung der Mittelwerte der geschätzten Überlebenswahrscheinlichkeiten entsprechend der Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt werden. Der Vgl. der Überlebensraten pro Tumorgruppe erfolgte mit dem Log Rank- Test. Hier ergab sich für keine der vier Tumorgruppen ein signifikanter Unterschied der Überlebensraten (s. **Tab. 18**, S. 73) bei durch den Median der Wachstumsfraktion (prozentuale MIB-1 Reaktivität) kategorisierten Gruppen (Schwellenwert = 12%).

Tab. 17 Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1) in den Haupttumorgruppen der Überlebensanalyse

Tumorgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
NEP	12,86	11,384	8,50	0	38	22
NBL	12,35	10,243	11,00	0	37	24
EWS	10,36	8,787	7,00	1	24	11
RMS	21,14	13,331	26,75	1	35	14
Insgesamt	13,94	11,446	12,00	0	38	71

Tab. 18 Log Rank- Werte der Haupttumorgruppen beim Vergleich der Überlebensraten

Log Rank	NEP	NBL	EWS	RMS
Signifikanz	0,743	0,992	0,394	0,107

5 DISKUSSION

5.1 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV

Zunächst darf noch einmal darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den einzelnen, in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen solider Tumore des Kindesalters um Tumore unterschiedlichen Gewebeansprungs handelt, trotz der Tatsache, dass die untersuchten Tumore zum allergrößten Teil nur im Kindes- und Jugendalter auftreten und sich deren Zellmorphologie sehr ähnelt. Insgesamt sind maligne Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter sehr selten (1, 50). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorgruppen kommen nur zu einem relativ geringen Anteil im Bezug auf die Gesamtzahl maligner Erkrankungen im Kindesalter vor (s. hierzu auch **Tab. 1**, S. 14). Dies erschwert das Generieren großer Stichprobengrößen. Um vor allem im Hinblick auf EWS und RMS eine je größtmögliche Stichprobengröße zu erreichen, wurde die Altersspanne des Untersuchungskollektivs bei Erstdiagnosestellung maximal groß gewählt. Ungeachtet der Tatsache, dass nach epidemiologischen Daten von Gatta und Kollegen für die embryonalen Tumore in Europa über 90% vor dem 15. Lebensjahr auftreten (50), wurde in der vorliegenden Arbeit das vollendete 18. Lebensjahr als Obergrenze gewählt. Dennoch musste im Bezug auf das Gesamtkollektiv, aus den unterschiedlichsten Gründen, fast ein Drittel der potentiellen Fälle von den weiteren Untersuchungen bzw. Auswertungen ausgeschlossen werden. Ursächlich waren zum einen ein zu hohes Alter bei Erstdiagnosestellung, aber auch in einigen Fällen eine fehlende Immunreaktivität bei der Färbung mit dem „Haushaltsmarker“ Vimentin zur „internen Kontrolle“ (43). Außerdem lag in manchen Fällen nur kryokonserviertes Probengewebe vor oder es handelte sich um Rezidivtumorgewebe bzw. die Kombination aus den beiden genannten Einschränkungen. In der Hauptauswertung der Tumorgruppen wurde letztendlich, zur Erzielung bestmöglicher Vergleichbarkeit, nur standardisiert Formalin- fixiertes und Paraffin- eingebettetes Gewebe von Primärtumoren betrachtet. Vor allem für die Gruppe der EWS konnte nur eine relativ kleine Stichprobengröße generiert werden. Dennoch entspricht die Anzahl der in die Hauptauswertung eingegangenen Fälle des Untersuchungskollektivs einer repräsentativen Auswahl. In der Mehrzahl wurden NBL, gefolgt von NEP, sowie RMS und EWS untersucht (s. **Abb. 13**, S. 45). Dies entspricht der Auftretenshäufigkeit bzw. den Inzidenzraten der einzelnen Tumorgruppen, die für Deutschland bzw. Europa in der Literatur angegeben werden (2, 50).

5.1.1 Geschlecht

Das Geschlechterverhältnis (männlich/ weiblich, engl.: Sex ratio) innerhalb der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorgruppen (s. **Abb. 14**, S. 46) entspricht für die NEP, RMS und EWS inhaltlich den durch das „Deutsche Kinderkrebsregister“ veröffentlichten Daten (2). Auch Ferrari und Kollegen fanden in ihrer Arbeit an Weichteilsarkomen, zu unserer Beobachtung für die Gruppe der RMS passend, ein gering häufigeres Auftreten für das männliche Geschlecht (51). Lediglich für die Gruppe der NBL konnte keine direkte Übereinstimmung gefunden werden, da vom „Deutschen Kinderkrebsregister“ ein gering häufigeres Auftreten für das männliche Geschlecht angegeben wird, während in der hier vorliegenden Arbeit kein Unterschied im Geschlechterverhältnis gefunden werden konnte. Dies lässt sich sehr wahrscheinlich mit den hier untersuchten relativ kleinen Stichprobengrößen der einzelnen Tumorgruppen im Vgl. zu verhältnismäßig großen Fallzahlen des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ erklären. Allerdings konnten bspw. auch Rabinowicz und Kollegen in ihrer Arbeit zu Inzidenz und Überlebensraten bei kindlichen Malignomen für das Auftreten im ersten Lebensjahr keine statistisch signifikanten, unterschiedlichen Auftretenshäufigkeiten im Hinblick auf das Geschlecht feststellen (52), wobei die größte Gruppe der Studienpopulation aus NBL bestand, gefolgt von Leukämien, Lymphomen und ZNS-Tumoren.

5.1.2 Alter

Die Altersverteilung innerhalb der Tumorgruppen entspricht im Wesentlichen den als Referenz herangezogenen Daten aus den Veröffentlichungen des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ (2). Im Jahresbericht 2012 wird die folgende Auftretenshäufigkeiten beschrieben, die den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten (s. **Abb. 15**, S. 46) inhaltlich sehr ähnlich sind. Für die Gruppe der NBL wurden 90% der Fälle bis zum vollendeten 4. Lebensjahr diagnostiziert, hiervon mehr als die Hälfte bereits im ersten Lebensjahr. Für die Gruppe der NEP wurden knapp 60% zwischen erstem und vierten Lebensjahr festgestellt, im ersten Lebensjahr 15% und vom fünften bis zum neunten Lebensjahr 22% aller Fälle, jedoch ab dem zehnten Lebensjahr nur noch sehr wenige Fälle. RMS wurden zu mehr als zwei Dritteln zwischen dem ersten und neunten Lebensjahr diagnostiziert, sowie zu 20% zwischen dem zehnten bis zum vierzehnten Lebensjahr, allerdings nur selten vor dem ersten Geburtstag. EWS traten zu 90% ab dem fünften bis zum vierzehnten Lebensjahr auf, davon sogar zu mehr als zwei Drittel erst ab dem zehnten Lebensjahr und extrem selten vor dem ersten Geburtstag (2).

5.2 ZIEL DER UNTERSUCHUNG

Bei der vorgelegten Arbeit handelt es sich um die ersten Untersuchungen an soliden Tumoren des Kindesalters, bei denen im direkten Vergleich sowohl die Expression des Signaltransduktionsproteins GRAF, als auch die Expression seines Interaktionspartner, des Signaltransduktionsproteins FAK, auf immunhistochemischer Ebene untersucht wurde. Zweifelsohne kommt der Untersuchung kindlicher Tumore im Hinblick auf diese beiden Proteine eine besondere Bedeutung zu, handelt es sich doch bei Tumorerkrankungen im Kindesalters um Erkrankungen die sich vor allem durch ihren Gewebe- bzw. Zellursprung, aber natürlich auch dem fast obligatorisch jungen Alter bei Erkrankungsbeginn, von denen des Erwachsenenalters unterscheiden. Gerade da es sich bei den Erkrankten um noch sehr junge Menschen handelt, spielt die Aufklärung der Regulationsvorgänge und der Expression der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine im Hinblick auf die Tumorentstehung und Progression eine wichtige Rolle. Auch kann hieraus möglicherweise langfristig eine Therapie- und Prognoseoptimierung resultieren, wie dies unlängst von Megison und Kollegen für die therapeutische Inhibierung von FAK bei aggressiven Neuroblastomen, besonders bei gleichzeitig bestehender N-MYC Überexpression (53) oder auch für seltene kindliche renale Tumore, wie das extraossäre Ewing- Sarkom (54), aber auch in einer Arbeit von Gillory und Kollegen an Hepatoblastomzelllinien (55), beschrieben wurde. FAK- Inhibitoren werden bereits in der Frühphase klinischer Studien zur Therapie von Malignomen des Erwachsenenalters genutzt und deren Einsatz scheint auch für Ewing- Sarkome viel versprechend, was Crompton und Kollegen in der Arbeit an Ewingsarkom- Zelllinien belegen konnten (56). Nicht zuletzt der therapeutische Einsatz von kurzen, nicht kodierenden RNA-Strängen, s. g. MicroRNA, welche regulierenden Einfluss auf die Genexpression durch Bindung an nicht übersetzte Regionen der mRNA haben, wurde kürzlich erstmals von Golubovskaya und Kollegen zur Regulierung der FAK Expression beschrieben (57).

5.3 GRAF UND FAK IN SOLIDEN TUMOREN DES KINDESALTERS

5.3.1 GRAF

Das GTPase- aktivierende Protein GRAF wurde erstmals beim Huhn nachgewiesen (31). Einige Jahre später konnte das humane GRAF- Gen in einem Fall von MLL bei einem 4- jährigen Jungen identifiziert werden (33). Das GRAF- Protein liegt überwiegend zytoplasmatisch vor. Mit seiner GAP- Domäne scheint es regulativen Einfluss auf RhoA, eine GTPase der Rho- Familie (35) zu nehmen, welches wiederum regulativ auf p21 wirkt. P21 ist entscheidend an der Regulation des Zellzyklus, bei durch das Ras- Protein transformierten Zellen, beteiligt. (39). In den auf GRAF untersuchten Gewebeproben der vier Haupttumorgruppen war insgesamt keine relevante

Färbeintensität in den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem AK ED 98015 und damit keine Expression von GRAF auf Proteinebene nachweisbar. Lediglich einzelne Fälle, wie zwei NEP mit schwacher, ein NBL mit starker, ein EWS mit schwacher und ein RMS mit starker Färbeintensität, zeigten eine Expression (s. auch **Abb. 16**, S. 48, **Abb. 21**, S. 53, **Abb. 28**, S. 58 und **Abb. 29**, S. 59). Hierfür wären zwei Erklärungen denkbar. Entweder konnte GRAF mittels der angewandten immunhistochemischen Methoden aus bestimmten Gründen auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden oder es wurde in den untersuchten Tumorgruppen tatsächlich nicht exprimiert bzw. war pathologisch herunter reguliert. Als Ursachen für den fehlenden Nachweis kämen zum einen methodische Fehler, aber auch eine abweichende bzw. veränderte Proteinstruktur, die durch den angewandten AK ED 98015 nicht detektiert wurde, in Frage. Methodische Fehler ließen sich aufgrund der in Kap. 5.6, S. 90 beschriebenen Kontrollmaßnahmen weitestgehend ausschließen. Auch die Reaktivität des angewandten AK ED 98015, der bereits in der Arbeit von Borkhardt und Kollegen (33) zur Untersuchung an Normalgewebe und Tumorzellen des myeloischen Ursprungs erfolgreich genutzt wurde, bzw. dessen Spezifität, welche mittels Praeimmunserum- Kontrollschnitten überprüft wurde, war sichergestellt. Eine Strukturveränderung des Proteins, die ggf. sogar dessen Funktion beeinträchtigen könnte, wäre jedoch prinzipiell denkbar gewesen und wurde bereits in der Arbeit von Borkhardt und Kollegen (33) als mögliche Erklärung eines Expressionsverlustes diskutiert. In zwei von drei der untersuchten MDS bzw. AML- Fällen mit Mutation in beiden Allelen des GRAF- Gens war die Detektion des GRAF- Proteins mit dem AK ED 98015 nicht möglich gewesen, was auf eine durch die Mutation bedingte Veränderung der Proteinstruktur am Carboxyterminus des GRAF- Proteins zurückgeführt wurde, an dem der verwendete AK seine spezifische Bindung eingeht (33). Wenn auch in den hier untersuchten kindlichen Tumoren eine entsprechende Mutations- bedingte Veränderung vorläge, könnte damit der fehlende Nachweis von GRAF mit dem verwendeten AK ED 98015 erklärt werden. Prinzipiell wäre auch ein durch eine Mutation bedingter „kompletter Verlust“ des Proteins denkbar und mit dem fehlenden Nachweis vereinbar. Taylor und Kollegen beschrieben erstmals, dass GRAF vermutlich durch die MAPK phosphoryliert und damit reguliert wird (40). Die Phosphorylierung hat jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Proteins, also seine GAP- Domäne, sondern vielmehr auf die Fähigkeit von GRAF über seine SH3- Domäne mit Bindungspartnern zu interagieren (40). Die Interaktion über die SH3- Domäne ist zum einen für die intrazelluläre Zielerkennung eines Proteins von großer Bedeutung, damit wäre aber auch eine veränderte Proteinstruktur am Carboxyterminus denkbar, die ebenfalls nicht durch den verwendeten AK ED 98015 detektiert werden könnte, bzw. die physiologische Interaktion mit FAK verhindert. Um also weitere Klarheit zu erhalten, ob das GRAF- Protein überhaupt exprimiert wird, ob es in regelrechter Proteinstruktur oder durch

Mutation bzw. regulative Vorgänge verändert vorliegt, wären weitere Untersuchungen des GRAF-Gens auf molekularer Ebene in den untersuchten Gruppen kindlicher Tumore notwendig. Hierfür käme bspw. eine Analyse der Menge (und auch Sequenz) von GRAF- Gen- Transkripten in Frage. Eine Arbeit zur Quantifizierung der Menge an GRAF- Transkripten wurde von Qian und Kollegen an mehreren Fällen von MDS, AML und CML, als auch bei einer Gruppe von AML-Fällen im Vgl. zu einer Kontrollgruppe durchgeführt (58, 59). Es zeigte sich ein signifikant erniedrigter bzw. herunter regulierter Gehalt an GRAF- Gen- Transkripten im Vgl. zur Kontrollgruppe, aber auch im Vgl. von AML- Fällen mit anomal methyliertem GRAF- Promotor zu AML- Fällen mit nicht methyliertem GRAF- Promotor. In der Hypermethylierung des GRAF-Promotors bzw. der erniedrigten Menge an GRAF- Transkripten wurde eine mögliche Ursache für die Tumorentstehung gesehen (59). Eine signifikant erniedrigte Menge an Transkripten müsste folglich auch zu erniedrigten Mengen an Protein führen. Wenn nur wenig oder gar kein Protein vorhanden ist, kann dieses auch nur schwer bzw. möglicherweise gar nicht mit den angewandten immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden. Analog zu diesen Ergebnissen könnte auch der fehlende Nachweis des GRAF- Proteins bei den untersuchten Tumorgruppen in der vorgelegten Arbeit als Erklärung dienen.

Der fehlende Nachweis von GRAF könnte auch mit dem Gewebeansprung bzw. Zelltyp der jeweiligen Tumorgruppen zusammenhängen. So war GRAF in normalem Gewebe des Menschen vor allem im Zytoplasma der Zellen des epithelialen Gewebes vieler Organe nachweisbar, allerdings praktisch nicht in stromalem Gewebe bzw. Gewebe mesenchymalem Ursprungs (33). In den durchgeführten Northern Plots war keine mRNA- Expression von GRAF in gesundem Lungen-, Leber-, Nieren- und Skelettmuskelgewebe nachweisbar. Auch immunhistochemisch zeigte sich nur eine minimale bzw. meist fehlende Proteinexpression in allen drei Muskelzelltypen und den peripheren Nervenzellen. Nun handelt es sich bei den Sarkomen des Kindes- und Jugendalters und speziell bei der Gruppe der RMS und EWS um Tumore mit mesenchyalem Gewebeansprung, bei denen man aufgrund der Expressionsergebnisse in gesundem Gewebe physiologischerweise nicht zwingend einen Nachweis von GRAF erwarten würde. Die NEP bestehen jedoch sowohl aus epithelialen, als auch aus mesenchymalen Gewebekomponenten. Und die NBL bzw. die GNBL nehmen eine „besondere Stellung“ ein, da sie zu einem bestimmten Anteil Ganglienzellen enthalten, in denen, in den Untersuchungen von Borkhardt und Kollegen, eine starke Expression des GRAF- Proteins nachweisbar gewesen war (33). Man hätte also bei den NEP und noch mehr bei den NBL eine GRAF- Expression erwarten können. Dabei muss jedoch die Tatsache beachtet werden, dass das normale Nierengewebe des Erwachsenen, sowie die peripheren Nervenzellen keine physiologische GRAF- Expression gezeigt hatten. Könnte aus dieser Betrachtungsweise der fehlende Nachweis von GRAF in den hier

untersuchten Tumorgruppen möglicherweise darauf hinweisen, dass GRAF gar keine Bedeutung für die Zellzyklusprogression in den untersuchten Tumorgruppen hat und deshalb nicht nachgewiesen werden konnte? Oder ist die geringe bis fehlende Expression des GRAF- Proteins mit der Hypothesen von Taylor und Kollegen zu vereinbaren, die in ihrer Arbeit nachwiesen, dass GRAF spezifisch die Aktivität von Rho reguliert und damit möglicherweise sowohl eine Signal-terminierende Wirkung, als auch eine Signal- übermittelnde Wirkung haben kann (35)? Sie zeigten, dass GRAF in Swiss 3T3 Zelllinien (Zelltyp „Fibroblasten“) die Rho- Aktivität herunter reguliert, hingegen in PC12 Zelllinien (Zelltyp „Phäochromozytom“) die Rho- Aktivität weiter verstärkt. Es wurde vermutet, dass dies mit den unterschiedlichen endogenen Mengen an GRAF- Protein in den Zelllinien zusammenhängt. So wurde keine nachweisbare Expression von GRAF in Swiss 3T3 Zellen (und anderen Fibroblasten) gefunden, während es in PC12 Zelllinien eine hohe Expression zeigte (35). Würde man also davon ausgehen, dass GRAF in physiologischer Weise nicht bzw. nur in geringen endogene Mengen in den sich transformierenden Zellen der untersuchten kindlichen Tumorgruppen vorliegt, könnte dies, entsprechend dem Ansatz von Taylor und Kollegen bedeuten, dass auch Rho vermehrt herunter reguliert wäre. Dadurch würde der vermeintliche Einfluss von RhoA auf p21 und dessen regulativer Einfluss auf die Progression des Zellzyklus, wie im Modell von Borkhardt et al (**Abb. 5**, S. 24) dargestellt, nicht mehr ausgeübt werden könnten, was zur Zellproliferation und Tumorentwicklung beitragen würde. Damit würde die Theorie, dass es sich um ein Tumorsuppressorgen handelt, welches in seiner Struktur und Funktion so verändert ist, dass es seine physiologische Funktion nicht mehr erfüllen kann, weiter gestützt.

5.3.2 FAK

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) bindet zusammen mit vielen verschiedenen Adapter- und Strukturproteinen in fokalen Adhäsionen auf der zytoplasmatischen Seite von transmembranären Proteinen. Nach extrazellulärer Stimulation ist es an der Signalweiterleitung nach intrazellulär beteiligt (60). FAK hat daher sowohl Relevanz bei der Ausbildung und Verankerung des Zytoskeletts an die Plasmamembran und extrazelluläre Matrix (EZM) und somit den Vorgängen bei Adhäsion und Migration, aber auch auf Proliferation und Apoptose (61). In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen kindlicher Tumore konnte in fast allen Fällen mittels immunhistochemischer Färbungen eine Expression von FAK mit mindestens einem der verwendeten drei AK nachgewiesen werden. Insgesamt unterstreicht dies die zentrale Bedeutung dieser Tyrosinkinase sowohl im Sinne eines physiologischen Zellwachstums, aber auch bei der Tumorentstehung in den untersuchten Tumorgruppen kindlicher Tumore. FAK beeinflusst verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden durch Interaktion mit verschiedenen Signalproteinen. Dabei haben Phosphorylierungen an verschiedenen Stellen von FAK eine entscheidende

Bedeutung für seine Aktivierung und Funktion. So wird durch Phosphorylierung am Tyrosinrest 397, der als Autophosphorylierungsstelle identifiziert wurde, die Bindung mit der Src-Kinase ermöglicht (62). Liegen beide Kinasen dann in einem aktivierten Komplex vor, kommt es sowohl zu Phosphorylierungen an anderen Stellen von FAK, als auch zur Bindung an andere Proteine, wie bspw. Paxillin und p130Cas, die wiederum über Adapterproteine wie Crk zu einer Aktivierung des MAPK- Wegs führen können (63). Der Komplex aus aktiviertem FAK und Src begünstigt auch die Bindung an das Adapterprotein Grb2 nach Tyrosinphosphorylierung an Position 925, wodurch in Abhängigkeit von bestehender Zelladhäsion erneut eine Aktivierung bzw. Regulation, des MAPK- Weg ermöglicht wird (63). An diversen malignen Tumoren des Menschen konnte die Bedeutung von FAK für die Tumorgenese und Tumorprogression belegt werden (43, 64-70). Viele der untersuchten Tumoren zeigten eine Überexpression von FAK (57). Sowohl die Tumorprogression von epithelialen, als auch von mesenchymalen Tumoren wurde von einer erhöhten FAK- Expression begleitet, was zu der Vermutung führte, dass die FAK- Expression als Marker für das invasive Potential eines Tumors herangezogen werden kann (71). Bei Mamma und Colon Karzinomen konnte eine Überexpression von FAK mRNA nachgewiesen werden, für die in erster Linie eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 verantwortlich gemacht wurde (72, 73). Auch für die Gruppe der NBL wurde bereits mehrfach eine FAK- Überexpression beschrieben. In diesem Kontext wurde die Bedeutung der Autophosphorylierung und Komplexbildung mit der Src- Kinase als wesentlich für den Schutz der Tumorzellen vor Apoptose nachgewiesen (74). Von Beierle und Kollegen konnte letzthin die Interaktion von FAK mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor 3 (VEGFR-3) als entscheidend für das Überleben von menschlichen Neuroblastom- Zelllinien beschrieben werden (75), weshalb in der Unterbrechung dieser Interaktion ein möglicher neuer bzw. weiterer Ansatz für die Therapie von NBL gefunden wurde (76). Aber auch regulative Einflüsse an FAK durch das Onkogen N-MYC scheinen im Hinblick auf Zellinvasion, Migration und Metastasierung an der Tumorentstehung und Progression beteiligt zu sein (53, 77). Weiterhin ist für die Gruppe der EWS eine FAK- Überexpression beschrieben worden, gemeinsam mit einer Überexpression von C-MYC, dem in diesen Fällen ein entsprechender regulativer Einfluss auf FAK zugeschrieben wurde (78). Ebenso konnte ein direkter Einfluss von FAK auf die Regulation von Rho- GTPasen nachgewiesen werden. So wird FAK eine Vermittlerfunktion bei der lokal und zyklisch ablaufenden Aktivierung von Guanin- Nukleotid Austauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) zugeschrieben. GEF aktivieren Rho GTPasen, während GAP sie deaktivieren (79). Damit hat FAK eine entscheidende Rolle, sowohl bei der Beeinflussung der Rho- GTPasen, als auch bei verschiedenen Stufen, die für die gerichtete Zellmigration von Bedeutung sind (79).

5.3.3 GRAF und FAK

Das GRAF- Protein bindet mit seiner carboxyterminalen SH3-Domäne an der prolinreichen Sequenz des Carboxyterminus seines Interaktionspartners FAK pp125 (31). Bei GRAF handelt es sich um ein vermeintliches Tumorsuppressorgen mit negativ regulierendem Einfluss auf RhoA (33). In der Folge käme es physiologischerweise zu einer gehemmten Zellzyklusprogression. Da sich in den untersuchten Tumorgruppen durchweg so gut wie keine Expression des GRAF-Proteins nachweisen ließ, im Vgl. dazu allerdings eine deutliche, wenn auch nicht immer homogen ausgeprägte Expression von FAK, könnte es zum einen sein, dass FAK in seiner Funktion bei der Tumorentstehung der untersuchten soliden Tumore des Kindesalters nicht auf die Anwesenheit von GRAF angewiesen ist, da es selbst direkten regulativen Einfluss auf die Rho- GTPasen Aktivität nehmen und gleichzeitig die gerichtete Zellmigration modulieren kann (79). Andererseits wäre es denkbar, dass gerade durch das Fehlen von GRAF, dem Interaktionspartner von FAK, die onkogene Transformation der Zellen durch FAK begünstigt wird. Die nicht vorhandene GRAF-Protein- Expression könnte ein maßgeblicher Faktor bei der Tumorentstehung sein. So wurde bspw. in einer Untersuchung von Einzelfällen von MDS und CML (58) und an einer Gruppe von AML- Fällen im Vgl. zu nicht neoplastischen hämatologischen Erkrankungen (59), eine herunter regulierte Expression von GRAF- Gen- Transkripten festgestellt und darin eine mögliche Rolle für die Leukämogenese vermutet. Auch könnte man vermuten, dass durch die regulativ wirkende Phosphorylierung der SH3- Domäne des GRAF- Proteins durch die MAPK (40) ein verändertes Bindungsverhalten an FAK resultiert, wodurch GRAF möglicherweise Bindungen mit anderen Proteinen als FAK eingeht und damit nicht mehr seine physiologische Funktion erfüllen kann bzw. eine die Zellzyklusprogression begünstigende Wirkung hat. So wurde bereits über eine Bindung von GRAF an die Tyrosinkinase „Zelladhäsionskinase Beta“ (CAKbeta) berichtet, die über eine ihrer beiden Prolin- reichen Sequenzen eine Bindung an die SH3- Domäne von GRAF mit wesentlich höherer Spezifität aufwies, als dies für die Bindung der Prolin- reichen Sequenz von FAK der Fall ist (80). Die das GRAF- Protein vermeintlich regulierende MAPK kann wiederum über mindestens zwei Signalwege durch FAK beeinflusst werden. Zum einen über die aktivierende Komplexbildung mit der Src- Kinase, zum anderen über das Protein Grb2 (s. Kap. 5.3.2, S. 79). Käme es über diesen Signalweg zu einer vermehrten Aktivierung bzw. Expression von FAK könnte daraus möglicherweise auch eine vermehrte MAPK- Aktivität resultieren. Durch vermehrte MAPK- Aktivität könnte u. a. GRAF vermehrt phosphoryliert und damit, wie von Taylor und Kollegen beschrieben (40), reguliert werden. Die dadurch veränderte Struktur des GRAF- Proteins könnte eine veränderte intrazelluläre Zielerkennung, sowie ein verändertes Bindungsverhalten an FAK bewirken. Durch diese regulativen Vorgänge auf Proteinebene wäre daher sowohl eine veränderte Funktion bzw. ein Funktionsverlust des GRAF- Proteins denkbar, als auch der

immunhistochemische Nachweis erschwert bzw. unmöglich. Für die beschriebenen regulativen Veränderungen des GRAF- Proteins wäre somit nicht zwingend eine Mutation des GRAF- Gens selbst, mit daraus resultierender veränderter Proteinexpression ursächlich notwendig. Eine vermehrte FAK- Aktivierung bzw. Überexpression und deren regulativer Einfluss ist insofern möglich und denkbar, als dass bereits bei vielen Tumoren des Menschen eine FAK- Überexpression beschrieben wurde (s. auch Kap. 5.3.2, S. 79) und als ursächlich mit der malignen Transformation, allerdings weniger dem invasiven Potential, der Tumorzellen in Verbindung gebracht wurde (81). Zwischen einer normalen Expression bzw. Überexpression von FAK konnte in dieser Arbeit keine genaue quantitative Unterscheidung erfolgen. Einerseits müssten hierzu vergleichende Untersuchungen zum FAK- Nachweis auf Proteinebene an dem entsprechenden nicht- malignen Gewebe erfolgen. Vor allem wären jedoch vergleichende Untersuchungen der Menge von FAK- Transkripten auf molekularer Ebene notwendig, wie dies bspw. in einer Arbeit von Weiner und Kollegen erfolgte (82), die fast keine Expression von FAK mRNA in Normalgewebe, jedoch eine deutliche Expression in Tumor- und Metastasengewebe zeigen konnten. Dies führte zu der Annahme, dass eine FAK Überexpression Signaltransduktionswege begleitet, die an der Tumorzellinvasion beteiligt sind. Zur weiteren Aufklärung der Regulation und des Zusammenspiels von GRAF und FAK und ihren Einfluss auf Tumorentstehung und Wachstum, müssen ergänzende Untersuchungen zur Expression der an der Signaltransduktion mitbeteiligten Proteine, sowohl auf molekulargenetischer als auch auf Proteinebene erfolgen. Hierzu könnten bspw. das durch FAK aktivierte Protein Grb2 bzw. die durch FAK aktivierte und komplexierte Src- Kinase, aber auch weitere Interaktionspartner von GRAF, wie CAKbeta oder das durch GRAF regulierte RhoA, sowie das mögliche Verbindungsglied zwischen FAK und GRAF, die MAPK, weiteren Aufschluss geben.

5.3.3.1 ED 98015- vs. FAK- Immunreaktivität in den Haupttumorgruppen

Sowohl für die Tumorgruppe der NEP, als auch für die Tumorgruppe der NBL und die Tumorgruppe EWS und PNET zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vgl. der Färbeintensität bzw. Immunreaktivität zwischen dem AK ED 98015 und jedem der drei FAK- AK. Dies lässt sich in erster Linie auf der praktisch fehlenden Reaktion bei der immunhistochemischen Färbung mit dem AK ED 98015, einer jedoch deutlichen Reaktion bei der immunhistochemischen Färbung mit allen drei FAK- AK begründen. Für die Tumorgruppe der RMS kann diese Beobachtung bzw. Begründung analog auch für den signifikanten Unterschied beim Vgl. der Färbeintensität zwischen dem AK ED 98015 zu den AK FAK C 20 und FAK A 17 angewandt werden. Lediglich bedingt durch die relative schwache bzw. fehlende Färbeintensität von FAK C 903 in dieser Tumorgruppe, und die bekanntermaßen fehlende bis

schwache Färbeintensität von ED 98015 in allen Tumorgruppen, zeigte sich im Vgl. dieser AK zueinander kein signifikanter Unterschied.

5.3.3.2 Vergleich der FAK- Immunreaktivitäten in den Haupttumorgruppen

Beim Vgl. aller drei FAK- AK- Immunreaktivitäten untereinander ergab sich kein signifikanter Unterschied für die Tumorgruppe der NEP und die Tumorgruppe der EWS und PNET, was darauf schließen lässt, dass sowohl der Carboxy-, als auch der Aminoterminus von FAK mit den drei angewandten AK detektiert werden konnte. Zum anderen waren damit für die Gruppe der NEP und die Gruppe der EWS und PNET alle drei AK gleichermaßen gut zur Untersuchung der FAK- Proteinexpression anwendbar. In der Tumorgruppe der NBL war ebenso kein signifikanter Unterschied beim Vgl. der Immunreaktivität von FAK C 20 mit FAK A 17 nachweisbar, die beide eine schwache Immunreaktivität zeigten. Jedoch war beim Vgl. von FAK C 20 und FAK A 17 mit dem insgesamt etwas stärker reagierenden FAK C 903 AK ein signifikanter Unterschied nachweisbar. So erscheint in der Tumorgruppe der NBL am besten für den Nachweis von FAK geeignet zu sein, gleichwohl es keinen Unterschied beim Vgl. von FAK C 20 und FAK A 17 gab, die beide ebenfalls eine gute, aber insgesamt schwächere Reaktion als FAK C 903 zeigten. Für die Tumorgruppe der RMS war erneut kein signifikanter Unterschied beim Vgl. der Immunreaktivität von FAK C 20 mit FAK A 17 nachweisbar, dies aufgrund der guten bzw. deutlichen Färbeintensität beider AK. Auch hier ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede beim Vgl. der Immunreaktivität von FAK C 20 und FAK A 17 jeweils mit FAK C 903. Dies war für die Gruppe der RMS durch die schwache bis fehlende Immunreaktivität von FAK C 903 begründet. So wären für die Tumorgruppe der RMS FAK C 20 und FAK A 17 gleichermaßen gut zum Nachweis von FAK geeignet und der AK FAK C 903 sollte nur nachrangig zur Anwendung kommen. Zusammenfassend war in allen vier Tumorgruppen kein Unterschied in der immunhistochemischen Reaktion zwischen FAK C 20 und FAK A 17 nachweisbar. Jedoch erscheint, trotz der besseren Immunreaktivität von FAK C 903 in der Tumorgruppe der NBL, aber auch deutlich schlechteren Immunreaktivität von FAK C 903 in der Tumorgruppe der RMS, und unter Beachtung des im folgenden Kap. 5.3.3.3, S. 83 erläuterten Vgl. zwischen Paraffin- eingebettetem mit kryokonserviertem Gewebe, insgesamt der AK FAK C 20 am besten für den immunhistochemischen Nachweis von FAK geeignet zu sein.

5.3.3.3 Paraffin- eingebettetes vs. kryokonserviertes Gewebe

Ein Vergleich der AK- Färbeintensitäten bzw. Immunreaktivität von Paraffin- eingebettetem zu kryokonserviertem Gewebe in Form verbundener Stichproben, war nur im Bezug auf das Gesamtkollektiv, also unter Einbeziehung aller in dieser Arbeit untersuchten Tumorgruppen

möglich. Somit sind keine spezifischen Aussagen bzgl. des Verhaltens innerhalb der einzelnen Tumorgruppen möglich, und auch insgesamt ist die Aussagekraft dieser Auswertung eingeschränkt, da zusammengefasst nur 20 Fälle betrachtet werden konnten. Für den AK ED 98015 lag der Median in beiden Gewebekonservierungsformen bei Null und somit in der Gruppe „fehlende Färbeintensität“, ungeachtet der Tatsache, dass im Wilcoxon-Test rechnerisch noch knapp ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war. Dies scheint für die Praxis jedoch aufgrund der global sehr schlechten immunhistochemischen Reaktion bzw. Färbeintensität von ED 98015 in beiden Konservierungsformen keine Relevanz zu haben. Für die AK FAK C 903 und FAK A 17 ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Gewebekonservierungsformen, wobei hier jedoch keine Relevanz für die Gruppe der fehlenden Färbeintensität festgestellt werden konnte, sondern lediglich eine Differenz der Mediane, die bei Paraffin- eingebettetem Gewebe im Bereich schwacher Färbeintensität und für das kryokonservierte Gewebe im Bereich starker Färbeintensität lagen. Die Tatsache, dass mit den FAK- AK C 903 und A 17 ein Nachweis des Proteins in beiden Gewebekonservierungsformen möglich war, sollte beachtet werden. Somit ist keiner der beiden AK gänzlich ungeeignet, wie man dies für einen signifikanten Unterschied bspw. beim Vgl. von fehlender zu nachweisbarer immunhistochemischer Reaktion/ Färbeintensität, und zwar unabhängig von einer Abstufung in schwache oder starke Färbeintensität, annehmen müsste. Für die Betrachtung einer möglichen Überexpression wäre allerdings eine optimale Färbeintensität wünschenswert, unabhängig davon in welcher Gewebekonservierungsform das Material vorliegt. Daher sollte diese Beobachtung in zukünftigen Untersuchungen weiter verfolgt werden und bei Bestätigung des sich abzeichnenden Trends konsequenterweise eine Methodenverbesserung oder bspw. die ausschließliche Untersuchung von kryokonserviertem Gewebe angestrebt werden. Für den AK FAK C 20 war kein signifikanter Unterschied nachweisbar, wobei der Median beider Gewebekonservierungsformen im Bereich schwacher Färbeintensität lag. FAK C 20 scheint also bei den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren am homogensten zu reagieren und ist damit am ehesten zu favorisieren um FAK, unabhängig von der Gewebekonservierungsform, zu detektieren.

5.4 WACHSTUMSFRAKTION (MIB-1)/ KI 67- INDEX IN DEN TUMORGRUPPEN

Der statistisch signifikante Unterschied beim Vgl. der Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) hinsichtlich der verschiedenen Tumorgruppen ließ sich in dieser Arbeit wahrscheinlich in erster Linie durch eine leicht erhöhte MIB-1 Immunreaktivität in der Tumorgruppe der RMS und eine deutlich geringere bis fehlende Reaktivität bei den wenigen, mit in die Berechnung einbezogenen GN erklären, war doch für die Tumorgruppen der NEP, NBL, bzw. EWS und PNET kein deutlicher Unterschied der Mittelwerte und Mediane (s. **Tab. 11**, S. 65)

nachweisbar. Die fast fehlende Reaktion in der Tumorgruppe der GN konnte erwartet werden, da es sich bei den GN doch um praktisch ausdifferenzierte und im eigentlichen Sinne nicht mehr maligne Tumore handelt, die damit auch keine erhöhte Proliferationsrate mehr aufweisen sollten. Unterschiedliche Mediane bzw. Mittelwerte, aber auch die Spannweite von minimaler bis maximaler Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) innerhalb der einzelnen Tumorgruppen erschienen aufgrund des unterschiedlichen Gewebeerstoffs der Tumore möglich und wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben (83-86). So gaben de Alava und Kollegen in Ihrer Arbeit zu EWS ein Mittelwert von 21% und einen Median von 14% positiv reagierender Tumorzellen bei der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis des Ki 67 Antigens an (83). Die Arbeit von San Miguel- Fraile und Kollegen (86) berichtet über eine Spannweite von 0 bis 42%, bei einem Mittelwert von 18% positiv reagierender RMS- Tumorzellen bei der immunhistochemischen Färbung mit MIB-1. In der Arbeit von Rudolph und Kollegen wurde ein Grenzwert bzw. Schwellenwert der prozentualen Ki- S5 Reaktivität in NBL von 25% positiv reagierender Zellen für die weitere statistische Auswertung herangezogen (85). Ki-S5 ist ebenfalls ein für Untersuchungen an Formalin- fixiertem, Paraffin- eingebettetem Gewebe geeigneter Antikörper, der ähnlich dem MIB-1 Antikörper, das Ki 67 Antigen nachweist. In einer Arbeit von Ghanem und Kollegen wurden nur NEP- Fälle untersucht, die eine präoperative Chemotherapie erfahren hatten. Über die übliche Auswertung hinaus wurde innerhalb der Gruppe der NEP eine statistisch signifikante, unterschiedliche MIB-1 Immunreaktivität für die epithelialen Zellen im Vgl. mit den Blastemzellen des Tumorgewebes nachgewiesen (84). Auch durch Juric und Kollegen wurde ein statistisch signifikanter und höherer Ki 67 Proliferationsindex für den epithelialen im Vgl. zum blastemalen Gewebeanteil der NEP festgestellt, bei einem Mittelwert von 21% zu 12% positiv reagierender Zellen (87). Eine entsprechende Unterscheidung und Auswertung der einzelnen Gewebekompartimente innerhalb des NEP- Kollektivs/ NEP- Tumorgewebes wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht vorgenommen. Auch wurden sowohl Fälle ohne, als auch mit präoperativ erfolgter Chemotherapie untersucht. Vergleicht man die vorgenannten Arbeiten mit den untersuchten Tumorgruppen dieser Arbeit muss beachtet werden, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um deutlich kleinere Stichprobengrößen handelt, als dies in den zitierten Arbeiten, in denen nur je eine einzige Tumorgruppe mit allerdings größeren Fallzahlen untersucht wurde, der Fall war.

5.4.1 Mitoserate und deren Korrelation zur Wachstumsfraktion (MIB-1)

Im Vgl. aller Tumorgruppen miteinander konnte kein signifikanter Unterschied bzgl. der Anzahl der Mitosen gefunden werden, was sich vor allem daraus erklärt, dass in allen Gruppen insgesamt nur eine relativ geringe Anzahl an Mitosen nachweisbar war, bei einem von Mittelwert 2,98 und

einem Median von nur 1,0 Mitose(n). In der Tumorgruppe der Ganglioneurome waren keinerlei Mitosen mehr nachweisbar. Beim Vgl. der Mitoserate mit der Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktion) zeigten sich erwartungsgemäß deutlich höhere Werte für die prozentuale Anzahl an positiv reagierenden Zellen in der immunhistochemischen Färbung mit MIB-1. Dies erklärt sich durch die Spezifität des AK, der alle Zellen, die sich nicht in der Ruhephase des Zellzyklus befinden, nachweist. Insgesamt war dennoch eine geringe Korrelation zwischen der MIB-1 Immunreaktivität und der Anzahl der Mitosen nachweisbar, mit einem Korrelationskoeffizient von $r= 0,396$ nach Spearmans Rho (s. **Abb. 38**, S. 66).

5.4.2 Wachstumsfraktion (MIB-1) mit vs. ohne präoperative Chemotherapie in der Gruppe der NEP

In der Gruppe der NEP konnte beim Vgl. der Fälle mit vs. der Fälle ohne präoperativ durchgeführte Chemotherapie im Hinblick auf die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Dies war wahrscheinlich in erster Linie auf die zwei relativ kleinen Teilgruppen zurückzuführen, die miteinander verglichen wurden. Wie anhand der graphischen Darstellung **Abb. 39**, S. 67 ersichtlich, könnte man dennoch einen Trend dahingehend vermuten, dass die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) durch die präoperativ erfolgte Chemotherapie reduziert wird, da in dieser Gruppe der Median geringer war, bei insgesamt jedoch größerer Spannweite der Einzelwerte, so dass kein statistischer Unterschied nachgewiesen werden konnte. Auch in diesem Fall muss wohl am ehesten die Stichprobengröße als ursächlicher Faktor angesehen werden. Unabhängig von der Stichprobengröße wäre eine Überprüfung der Wachstumsfraktion (prozentuale MIB-1 Immunreaktivität) an verbundenen Stichproben wünschenswert, d.h. im gleichen Fall anhand des Biopsiegewebes vor, bzw. dem Resektatgewebe nach, erfolgter Chemotherapie. Analog dem in der NEP- Gruppe vermuteten Trend sollte man eine Reduktion der Wachstumsfraktion (prozentuale MIB-1 Immunreaktivität) im Resektatgewebe nach präoperativ erfolgter Chemotherapie erwarten können, so es sich um eine effektive bzw. wirksame Therapie handelt, die zu einer Reduktion der Wachstumsfraktion der Tumorzellen führt, wie dies bspw. für das Mamma- Karzinom bereits beschrieben wurde (88). Um dies zu belegen, wären weitere Untersuchungen an größeren und verbundenen Stichprobengrößen notwendig.

5.4.3 Wachstumsfraktion (MIB-1) im Vgl. zu FAK- Immunreaktivität

Bereits beim rein deskriptiven Vgl. der berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) zeigten sich in allen Tumorgruppen und für alle drei FAK- AK getrennt kategorisiert in fehlende, schwache und starke FAK- Immunreaktivität, sehr

ähnliche bzw. überlappende Werte. Aufgrund der im Verhältnis kleinen Stichprobengrößen konnte man daher bereits davon ausgehen, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied beim Vgl. der Höhe der Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) im Hinblick auf die Stärke der Immunreaktivität bzw. Proteinexpression von FAK gibt. Die ergänzend berechneten Signifikanzen überstiegen deutlich das Signifikanzniveau von $p=0,05$ und belegten damit zusätzlich diese Annahme. Die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) muss im Fall der untersuchten soliden Tumoren des Kindesalters sehr wahrscheinlich als unabhängiger prognostischer Faktor gewertet werden.

5.5 REZIDIV- UND ÜBERLEBENSANALYSE

5.5.1 Ereignis- freies Überleben und Gesamtüberleben

Die Tatsache, dass zwischen den vier untersuchten Tumorgruppen kein signifikanter Unterschied bzgl. der EFS und des OAS festzustellen war, könnte zum einen durch die zur statistischen Auswertung in dieser Arbeit vorliegenden, kleinen Stichprobengröße der einzelnen Gruppen erklärt werden (s. Kap. 4.5.1, S. 70). Zur Problematik der kleinen Stichprobengrößen kommt noch erschwerend hinzu, dass es sich um eine große Zeitspanne von fast 25 Jahren handelt, in der die Erstdiagnosestellung erfolgte. In dieser Zeitspanne lagen sowohl prognostisch ungünstigere Zeiträume, wie bspw. die 80er Jahre mit im Verhältnis noch eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten, als auch prognostisch günstigere Zeiträumen ab dem Jahr 2003. Beide Zeiträume gingen je nach Anzahl an vorliegenden Fällen und Verlaufsdaten, und somit zufällig, in die Gesamtauswertung ein. Eine Aufteilung nach prognostisch bzw. therapeutisch unterschiedlichen Zeiträumen und im Folgenden getrennte statistische Auswertung wäre jedoch aufgrund der damit noch kleineren Einzelfallzahlen nicht sinnvoll gewesen. Die berechnete Ereignis- freie und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit für die in dieser Arbeit untersuchten Fälle war bei der Gruppe der NBL am günstigsten, gefolgt von den bereits schlechteren Chancen der Gruppe der NEP. Die EWS und RMS zeigten die niedrigsten und praktisch identischen Werte der berechneten Gesamtüberlebens- und Ereignis- freien Überlebenswahrscheinlichkeiten auf. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse entsprachen somit nicht den Daten die für die 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit durch das „Deutsche Kinderkrebsregister“ sowohl im Jahresbericht 2005, als auch im Jahresbericht 2012 veröffentlicht wurden. Dies kann sowohl im Bezug auf die aktuellsten Daten zu den Erkrankungsfällen von 2003-2012, als auch in Bezug auf die zusätzlich angefügten, früheren Daten des Beobachtungszeitraums von 1980-2004, welcher nahezu identisch mit dem Erstdiagnosezeitraum der in dieser Arbeit untersuchten Fälle ist, festgehalten werden (s. auch **Tab. 1**, S. 14). Wurde nach

den neueren Daten doch die beste 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit den NEP zugesprochen (94%), gefolgt von den NBL (79%), und den sich praktisch entsprechenden Angaben zu RMS (72%) und EWS (70%), welche im Vgl. zu den NEP bereits deutlich schlechter ausfielen. Allerdings ergab sich auch bei den Daten der 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ für die Gruppen der NBL, EWS und RMS kein statistisch signifikanter Unterschied der Tumorgruppen zueinander. Dennoch muss beachtet werden, dass die Erfassung des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ fast 95% aller Erkrankungsfälle Deutschlandweit erfasst und über einen Zeitraum von vielen Jahren, seit dem Gründungsjahr 1980, generiert wurde (2), wodurch es sich um eine wesentlich größere Einzelgruppen- bzw. Gesamtstichprobengröße handelt. Bei den in der vorgelegten Arbeit ausgewerteten Fällen lag sowohl innerhalb der Tumorgruppen, als auch insgesamt eine größere Variabilität der Nachbeobachtungsdaten vor. Bspw. verfügten Fälle die in den 80er Jahren diagnostiziert wurden über einen längeren Nachbeobachtungszeitraum, als Fälle die in 2003 und 2004 diagnostiziert wurden und daher weniger sichere, weil hochgerechnete Verlaufsdaten lieferten. Die untersuchten Fälle waren außerdem nicht gleichmäßig auf die einzelnen Jahre innerhalb des Gesamt Diagnosezeitraums verteilt, wie die genannten Vergleichsdaten des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ dies naturgemäß und mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit waren. Durch den insgesamt langen Gesamt Diagnosezeitraum könnten auch Wechsel von Therapieschemata innerhalb der einzelnen Tumorgruppen die erhobenen Daten und statistischen Berechnungen im Hinblick auf Gesamtüberleben und Ereignis- freiem Überleben, sowie den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten, beeinflusst haben, wobei diese Einflussfaktoren jedoch in gleicher Weise auch für die Daten des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ gelten. Ein Zusammenspiel der genannten Faktoren könnte somit die Abweichung der berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten dieser Arbeit im Vgl. zu den hier exemplarisch gewählten Referenzdaten des „Deutschen Kinderkrebsregisters“ erklären.

5.5.2 MIB-1 und Gesamtüberleben

Es konnte bei keiner der vier untersuchten Tumorgruppen ein signifikanter Einfluss der Wachstumsfraktion (MIB-1) auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Zur Klassierung der Wachstumsfraktion wurde als Schwellenwert der Gesamtmedian (12%) der MIB-1 Immunreaktivität (s. **Tab. 17**, S. 73) herangezogen, da für jede Tumorgruppe einzeln bestimmte Schwellenwerte aufgrund der kleinen Fallzahlen für die statistische Auswertung nicht mehr sinnvoll erschienen. In einer Arbeit zu NBL konnten Rudolph und Kollegen, jedoch bei einem angewandten Schwellenwert von 25% Ki-S5 Reaktivität, eine signifikante Korrelation der Proliferationskapazität (= Wachstumsfraktion) der untersuchten NBL mit dem nach Kaplan-Meier

berechneten kumulativen krankheitsfreien Überleben zeigen. Auch wurde in der multivariaten Analyse die anhand der Ki-S5 Reaktivität ermittelte Proliferationskapazität als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bestätigt (85). Nach deren Erfahrung konnte bei Färbung an den gleichen Proben eine identische Immunreaktivität mit Ki-S5 und MIB-1 im Hinblick auf den Nachweis des Ki 67 Antigens erzielt werden, wobei je nach Antikörperkonzentration MIB-1 eine nicht-spezifische, zytoplasmatische Kreuzreaktivität zeigte, welche bei Ki-S5 nicht erfolgte. Außerdem sei die Proliferationskapazität als prognostischer Faktor weniger von der Auswertungsmethode, sondern vielmehr von der adäquaten Festsetzung des Schwellenwerts abhängig. Weiterhin zeigten die NBL je nach histologischer bzw. histopathologischer Einteilung, sowie im Hinblick auf eine bereits präoperativ durchgeführte Chemotherapie eine unterschiedliche Proliferationskapazität. In einer Arbeit zu 48 NEP- Fällen wurde ebenfalls die Proliferationskapazität in den einzelnen histologischen Kompartimenten bestimmt (87). Hier ergaben sich signifikant höhere Werte für die epithelialen Zellen im Vgl. zum blastemischem Tumoranteil. Weiterhin zeigte sich für die Tumorstadien I und II ein signifikant höherer Proliferationsindex. Es wurde gefolgert, dass es sich bei Ki 67 um einen guten Marker zur Bestimmung der Proliferationsaktivität bei NEP handelt, der bei NEP jedoch als klinisch- prognostischer Marker weniger geeignet zu sein scheint. Aufgrund der geringeren Stichprobengrößen der einzelnen Tumorgruppen konnte bzw. wurde in der vorliegenden Arbeit keine statistische Auswertung unter Berücksichtigung von histologischer bzw. histopathologischer Subtypisierung im Hinblick auf die Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1 Immunreaktivität/ Proliferationskapazität) und deren Einfluss auf das Gesamtüberleben vorgenommen. Weiterhin wurde für alle vier Gruppen in der vorgelegten Arbeit ein Schwellenwert von 12% angenommen. Ähnliche Schwellenwerte wurde bei Untersuchungen an EWS (Schwellenwert 15%) (83) und RMS (Schwellenwert 15%) (89) beschrieben. Für die NBL wurde jedoch bspw. durch Rudolph und Kollegen (85) ein Schwellenwert von 25%, bzw. bei den NEP ein Schwellenwert von nur 5% (84) angewandt. Trotz des in der vorgelegten Arbeit fehlenden bzw. nicht nachweisbaren Einflusses der Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) auf das Gesamtüberleben liefert die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) nachgewiesenermaßen bei einer Vielzahl von Tumoren nützliche Informationen über deren Wachstumskapazität und damit oftmals auch prognostische Informationen. So konnten Stabiano und Kollegen (90) an Untersuchungen zu orbitalen RMS feststellen, dass Tumore mit günstigem Verlauf eine MIB-1 Überexpression zeigten, ebenso wie bei Fällen mit Rezidiv- freiem Verlauf eine statistisch signifikant höhere MIB-1 Reaktivität nachweisbar war. Dies wurde auf ein möglicherweise besseres Ansprechen der Tumore mit höherer Proliferationskapazität auf die Pharmakotherapie zurückgeführt. Auch wurde in einer Arbeit zum Mammakarzinom die Proliferationskapazität des Tumorgewebes anhand der MIB-1 Immunreaktivität erfolgreich als Marker für das Ansprechen

auf Chemotherapie nachgewiesen (88). Nach Meinung der Autoren der genannten Arbeit unterstreicht dies die Notwendigkeit, Proliferationsmarker am Biopsiegewebe vor und Resektatgewebe nach präoperativ erfolgter Chemotherapie durchzuführen und deren Wert als prognostische Marker zu nutzen. Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit orientierend durchgeführten Untersuchungen müssen weitere Untersuchungen vor allem an größeren Kollektiven für jede einzelne Tumorgruppe folgen. So wird eine separate Schwellenwertermittlung pro Tumorgruppe möglich. Aber auch histologische und histopathologische Unterteilung, vergleichende Untersuchungen von MIB-1 und Ki-67, der mögliche Einfluss von neoadjuvanter Chemotherapie durch Untersuchung von Gewebe vor und nach erfolgter Therapie, sollten beachtet werden und in Zusammenschau mit Ereignis- freiem und Gesamtüberleben weiteren Aufschluss über den prognostischen Wert der Wachstumsfraktion/ Ki 67- Index (MIB-1 Immunreaktivität/ Proliferationskapazität) in soliden Tumoren des Kindesalters geben.

5.6 KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODE

5.6.1 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie und dem Einsatz spezifischer Proteine (Antikörper) können verschiedene Proteine identifiziert und sichtbar gemacht werden. Generell muss hierfür sichergestellt sein, dass die Proteine nicht durch Autolyse bei inadäquater Konservierung oder die Fixierung in Formalin so verändert oder denaturiert werden, dass sie für eine immunhistochemische Untersuchung und verlässliche Auswertung nicht mehr zur Verfügung stehen (91). Das in dieser Arbeit zur Untersuchung vornehmlich genutzte bzw. vor allem für die Primärauswertung relevante Gewebe aus den verschiedenen Tumorgruppen lag in Form von standardisiert Formalin- fixierten und Paraffin- eingebetteten Proben vor. Zahlreiche zelluläre Proteine, die morphologisch durch den Einsatz von mono- oder polyklonalen AK detektierbar sind, werden durch die Fixierung in Formalin maskiert und können daher in diesem Gewebe nur nach Anwendung des Mikrowellen- vermittelten Antigen- Retrieval und unter Verwendung spezieller Inkubationslösungen wiederhergestellt bzw. sichtbar gemacht werden (92, 93). Dies hat sich in manchen Fällen als Vorteil erwiesen, z. B. um genauere Resultate bei der Detektion von streng nukleär lokalisierten Proteinen zu erzielen, wie bspw. dem Proliferationsmarker Ki 67, der in dieser Arbeit mit dem Paraffin- gängigen Klon MIB-1 untersucht wurde. Alle untersuchten Proben wurden vor den entscheidenden immunhistochemischen Untersuchungen zunächst mit H&E angefärbt, um autolytische und denaturierte Proben aussortieren zu können. Weiterhin wurde mittels immunhistochemischer Färbung zur Detektion von Vimentin die vorhandene Immunreaktivität überprüft (41). Um falsch positive Reaktionen der im immunhistochemischen

Färbeprozess beteiligten AK bzw. positive Reaktionen durch die endogene alkalische Phosphatase auszuschließen, wurde bei allen Färbevorgängen eine Negativkontrolle mitbehandelt. Sobald sich an diesem Präparat fälschlicherweise eine Reaktion zeigte, wurden die Färberesultate der anderen Proben wegen fehlender spezifischer Immunreaktivität aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Es wurden neue Schnittpräparate der gleichen Gewebeproben in weiteren Färbedurchgängen untersucht und erst dann, wenn eine falsch positive Reaktion des Negativkontrollschnittes ausblieb, ausgewertet. Eine solche negative Selektion wegen methodischem Fehler war jedoch nur ein einziges Mal erforderlich. Bei den Färbevorgängen mit dem Primärantikörper ED 98015 wurde analog zum Negativkontrollschnitt ein zusätzlicher Kontrollschnitt (Ösophagusgewebe mit Ganglienzellschnitten) mit Prä- Immun- Serum mitbehandelt. Auch hier durfte keine falsch positive Reaktion nachweisbar sein. Neben den Negativkontrollschnitten wurde bei jedem Färbevorgang auch ein Positivkontrollschnitt mitgefärbt, auf den in den beiden folgenden Absätzen genauer eingegangen werden soll.

5.6.2 GRAF

Der zur Detektion des GRAF- Proteins verwendete AK ED 98015 war identisch mit dem bereits in der Arbeit von Borkhardt und Kollegen verwendetem AK (33), welcher in dieser Arbeit zur Untersuchung an MDS/AML- Krankheitsfällen, sowie an Normalgewebeproben des Menschen genutzt wurde. Die Spezifität des ED 98015 AK war ebenfalls in dieser Arbeit an Zelllinien mit „künstlich“ erzeugter GRAF- Überexpression positiv belegt und bestätigt worden. Auch im untersuchten Normalgewebe hatte sich, vor allem im Zytoplasma epithelialer Zellen, eine positive Reaktion, also der Nachweis von vorhandenem GRAF- Protein erbringen lassen. Weiterhin wurden zur Sicherstellung der Immunreaktivität des AK bzw. des immunhistochemischen Färbevorgangs Positivkontrollschnitte mitbehandelt. Hierfür kam gesundes Ösophagusgewebe zur Anwendung, da für die in den Wandschichten enthaltenen Ganglienzellen in der Arbeit von Borkhardt und Kollegen (33) eine besonders deutlich positive Reaktion auf den ED 98015- AK gezeigt worden war.

5.6.3 FAK

Die Immunreaktivität der zum Nachweis des FAK- Proteins verwandten Antikörper FAK C 903, FAK C 20 und FAK A 17, als auch der regelrechte Ablauf des immunhistochemischen Färbevorgangs wurde durch den Einsatz von Positivkontrollschnitten bestätigt bzw. sichergestellt. Zur Anwendung kam hierfür Normalgewebe der Prostata in Form von Prostatastanzengewebe. Für die Basalzellschicht des Prostataepithels war von Rovin und Kollegen eine starke immunhistochemische Reaktion bzw. Proteinexpression für FAK beschrieben worden (43).

5.6.4 Multi- Tissue- Blöcke und Schnitte

Mit dem Einsatz von MT- Blöcken wurde eine relativ neue und effiziente Technik zur gleichzeitigen immunhistochemischen Untersuchung zahlreicher Gewebeproben angewandt. In dieser Arbeit konnten bis zu 60 Gewebeproben pro Schnitt/ Objektträger untersucht werden. Damit ergab sich durch die Reduzierung der Anzahl von immunhistochemischen Färbungen eine deutliche Zeitersparnis. Allerdings war hierzu eine detaillierte und aufwendige Vorarbeit notwendig. Es mussten die im Rahmen der Routinediagnostik hergestellten und archivierten H&E-Schnitte ihrem jeweiligen Paraffinblöcken zugeordnet bzw. vereinzelt neu erstellt werden, um die Areale zur folgenden Entnahme der Gewebestanden selektieren bzw. markieren zu können. Notwendigerweise musste weiterhin eine genaue Dokumentation der Position der einzelnen Fälle bzw. ihrer zugehörigen Gewebeproben im MT- Block erfolgen. Die histologische Auswertung am Mikroskop, sowie die digitale Dokumentation der einzelnen Gewebeproben erforderte in der Folge ein sehr konzentriertes Vorgehen um ein Verrutschen innerhalb der Spalte oder Zeile und damit falsche Auswertungsergebnisse und Dokumentation auszuschließen. Hierdurch wurde ein Teil der Zeitersparnis wieder aufgebraucht. Zur detaillierten Dokumentation der Färbintensitäten der einzelnen Gewebeproben war ein „reines“ Einscannen der MT- Schnitte mit dem Super Cool Scan 2000 nicht ausreichend. Auch durch eine digitale Nachbearbeitung mittels (Irfan View) Fotosoftware war aufgrund der zu geringen Auflösung/ Pixelanzahl der Scans eine Vergrößerung und damit die Qualität, die in einzelnen Fotografien mit der digitalen JVC Kamera erzielt werden konnte, nicht zu erreichen. Da pro untersuchten Fall insgesamt drei Gewebeproben/ Gewebestanden in den jeweiligen MT- Block eingesetzt wurden, konnte für die mikroskopische Auswertung sichergestellt werden, dass zumindest eine der drei Stenzen, besser allerdings alle drei, auswertbar waren. Dies war vor allem unter dem Aspekt von Bedeutung, dass im Rahmen der MT-Schnittherstellung vereinzelt in den Schnitten Gewebeproben „verloren“ gingen bzw. nicht adäquat auf den Objektträger aufgebracht werden konnten. Dies ist wohl am ehesten als technische Herausforderung im Rahmen der Komplexität einer Schnittherstellung an bis zu 60 Gewebeproben in einem Schnitt zu sehen. Die bei der Schnittherstellung aufzuwendende Kraft sollte aufgrund verschiedener Gewebekonsistenzen nicht unterschätzt werden und erfordert Übung und Geschick. In einzelnen Fällen war auch ein Verlust von einzelnen Stanzanschnitten im Rahmen der immunhistochemischen Färbung zu verzeichnen. In den meisten Fällen konnten jedoch 3 Gewebeproben pro Fall untersucht und ausgewertet werden. Vereinzelt wurden unterschiedliche Färbintensitäten in den Gewebeproben zu einem Tumorfall festgestellt. Dies erklärt sich möglicherweise durch unterschiedliche Tumorgewebebestandteile der Stenzen, die gegebenenfalls trotz genauer Markierung auf dem Objektträger bzw. Paraffinblock, kleinsten Verschiebungen bei der Entnahme aus dem Original- Paraffinblock unterworfen wurden. Um ein

möglichst einheitliches und vergleichbares Ergebnis zu erhalten wurde der mathematische Mittelwert aus den Einzelintensitäten gebildet und anschließend entsprechend der semiquantitativen Auswertung den drei Gruppen der Farbeintensität zugeteilt (s. auch Kap. 3.2.6, S. 39).

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Signaltransduktionsprotein GRAF und dessen Interaktionspartner FAK mittels immunhistochemischer Methoden an soliden Tumoren des Kindesalters untersucht. Es handelt sich hierbei um die ersten Untersuchungen zu GRAF an soliden Tumoren des Kindesalters. Zum Nachweis von FAK wurden analog drei verschiedene Antikörper angewendet. Primär wurden 23 Fälle zu Nephroblastomen, 26 Fälle zu Neuroblastomen, 12 Fälle zu Ewing- Sarkomen und peripheren neuroektodermalen Tumoren, 18 Fälle zu Rhabdomyosarkomen und ergänzend fünf Ganglioneurome vorliegend in Form von Formalin- fixierten, Paraffin- eingebetteten Gewebeproben in Multi- Tissue Schnitten untersucht bzw. ausgewertet. Weiterhin erfolgten im direkten Fallvergleich auch Untersuchungen beider Proteine an 20 kryokonservierten Tumorgewebeproben. Außerdem wurde in den genannten Tumoren die Wachstumsfraktion mit Hilfe des MIB- 1 AK (Ki 67 Protein) untersucht und im Vgl. bei präoperativ chemotherapierten zu nicht chemotherapierten Fällen von NEP, bzw. im Vgl. zur ermittelten Mitoserate im Gesamtkollektiv und zur FAK- Expression in den verschiedenen Tumorgruppen, als auch in Bezug auf die ermittelten Überlebensdaten, ausgewertet.

Zu den Fragen 1) und 2)

In allen Tumorgruppen konnte keine relevante Expression von GRAF auf Proteinebene nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Literatur sind hierfür ursächlich sowohl regulative bzw. die Proteinstruktur verändernde Mechanismen, wie im Rahmen der Signaltransduktion, als auch erniedrigte bis fehlende oder fehlerhafte Expression bedingt durch molekulargenetische Veränderungen, denkbar. Im fehlenden Nachweis von GRAF, welches als potentiell Tumorsuppressorgen vermutet wurde, könnte ein die Tumorentwicklung begünstigender Einfluss liegen. FAK war in praktisch allen untersuchten Tumorfällen mit mindestens einem der verwendeten drei AK nachweisbar, was die in der Literatur bereits beschriebene zentrale Bedeutung von FAK bei der Tumorentwicklung erneut und damit auch noch einmal für die hier untersuchten kindlichen Tumore bestätigt.

3) Die in den untersuchten Tumorgruppen bestehenden signifikanten Unterschiede bei nahezu allen Vergleichen der Immunreaktion des GRAF- AK mit jeweils einem der drei FAK- AK sind am ehesten durch den insgesamt fehlenden Nachweis des GRAF- Proteins bedingt.

4) An kryokonserviertem Material war GRAF vereinzelt schwach nachweisbar, so dass sich beim Vgl. der Proteinexpression von GRAF an identischen Tumorgewebeproben in den beiden unterschiedlichen Konservierungsformen rechnerisch ein eben noch signifikanter Unterschied

ergab, obwohl die Immunreaktion mit dem GRAF- AK im Gesamtkollektiv nahezu fehlte. Beim Vergleich der Immunreaktion der drei verschiedenen FAK- AK in beiden Konservierungsformen ergab sich ein signifikanter Unterschied für die AK FAK C 903 und FAK A 17.

5) Zusammenfassend für alle untersuchten Tumorgruppen, als auch bei verschiedenen Gewebekonservierungen, zeigte der FAK C 20- AK die homogensten Ergebnisse bzgl. der FAK-Proteinexpression. Im Einzelfall wäre für die Neuroblastome der AK FAK C 903 zu bevorzugen, während für die Rhabdomyosarkome die Anwendung von FAK C 20 oder FAK A 17 günstiger erscheint.

6) Die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) für die untersuchten Tumorgruppen lag insgesamt zwischen 0 und 38%. Beim Vgl. der Wachstumsfraktionen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorgruppen, wobei sich vor allem für die Gruppe der RMS deutlich höhere Werte ergaben.

7) Im Bezug auf das Gesamtkollektiv war nur eine geringe Korrelation zwischen Wachstumsfraktion und Mitoserate nachweisbar, was sich am ehesten aus der erwartungsgemäß niedrigeren Mitoserate im Verhältnis zum umfangreicheren Detektionsrahmen des MIB-1 AK ergibt.

8) Beim Vgl. der NEP- Fälle mit den Fällen ohne präoperativ durchgeführte Chemotherapie war im Hinblick auf die Wachstumsfraktion (MIB-1) kein signifikanter Unterschied nachweisbar, was wahrscheinlich in erster Linie auf die zwei relativ kleinen Teilgruppen bzw. Stichprobengrößen zurückzuführen ist.

9) Beim Vgl. der Höhe der Wachstumsfraktion (MIB-1) im Hinblick auf die Stärke der Immunreaktivität von FAK war in allen vier Tumorgruppen und für alle drei FAK- AK kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Wachstumsfraktion (MIB-1) muss im Fall der untersuchten soliden Tumoren des Kindesalters sehr wahrscheinlich als unabhängiger prognostischer Faktor gewertet werden.

10) Zwischen den Tumorgruppen fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. dem Ereignis- freien Überleben und dem Gesamtüberleben, sowie der berechneten Ereignis- freien Überlebenswahrscheinlichkeit und der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit.

11) Es konnte für die einzelnen Tumorgruppen kein signifikanter Zusammenhang der Wachstumsfraktion (MIB1- Reaktion) mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden.

Um weiteren Aufschluss über den Regulationsmechanismus von GRAF und das Zusammenspiel mit FAK und anderen an der Signaltransduktion beteiligten, regulativen Proteinen, wie bspw. der MAPK, im Hinblick auf die Tumorentstehung zu erhalten, müssen nun weitere Untersuchungen dieser Proteine an größeren Stichprobengrößen pro Tumorgruppe folgen. Weiterhin sind vergleichende Untersuchungen an entsprechendem nicht malignem Gewebe, sowohl auf Proteinebene als auch auf molekularer Ebene notwendig. Im Hinblick auf die Wachstumsfraktion (MIB-1 Immunreaktivität) könnten dann individuell ermittelte Schwellenwerte und eine Korrelation mit der Expression von GRAF und FAK, sowie klinischen Parametern (Tumorstadium und -grad) genauere Aussagen im Hinblick auf Prognose, Ansprechen auf Therapie und Überlebenschancen ermöglichen.

6.1 ABSTRACT

In the current study pathologic sections of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissues of childhood tumors were analyzed immunohistochemically. In detail 23 Nephroblastomas, 26 Neuroblastomas, 12 Ewing sarcomas and 18 Rhabdomyosarcomas and additionally five Ganglioneuromas were investigated in multi- tissue sections at the protein level.

Three different antibodies against the signal transduction protein FAK and one against the human GRAF protein were used to perform immunohistochemical staining. For comparison the investigation was also done on some frozen sections. Another antibody against the Ki- 67 protein was used to analyse the proliferation index of the tumors. Additionally mitosis counts were done in the same tumor sections. The results of proliferation index were compared to mitosis counts, FAK- Expression and survival data, as well as between Nephroblastomas with and without preoperatively performed chemotherapy.

The immunohistochemical analysis of the human GRAF protein is the first analysis to be done in these childhood tumors. We could not show a relevant expression of GRAF in any of the four examined tumor groups. Considering current literature, possible reasons could be regulative influences in the signaling transduction process changing the protein structure, like down regulated, incorrect or missed protein expression due to molecular changes of GRAF which was already suspected to have tumor suppressor properties. Therefore the absent expression of the human GRAF protein could possibly further the tumorigenic process.

FAK expression could be detected in almost all the tumors examined, which underlines the already well-known importance of pathogenesis of many cancers and also the analysed childhood tumors of this study. Comparing the results of three different antibodies used on all sections of the four tumor groups and considering the different fixations of the tissue overall the FAK C 20 antibody is the most homogenous one to show FAK expression. FAK C 903 antibody should be preferred by immunohistochemical analysis only for Neuroblastomas, whereas for Rhabdomyosarcomas the use of FAK C 20 or FAK A 17 antibody is favourable.

The proliferation index showed significant statistical differences between the tumor groups examined. Also a slight correlation between mitosis counts und proliferation index could be seen. Focusing on proliferation index there was no significant statistical difference between Nephroblastoma with and without preoperatively performed chemotherapy and no influence on survival data overall. By comparing the proliferation index with FAK- expression no significant statistical correlation could be found, suggesting that the proliferation index is an independent

prognostic factor concerning the examined childhood tumors. Between the four tumor groups there was no significant statistical difference either regarding event- free and overall survival data.

To more information about the regulatory pathomechanisms and the interaction of GRAF, FAK and other proteins of Integrin signaling transduction pathway, like MAPK, and their influence on tumor pathogenesis, further studies on these proteins in bigger sample sizes per group are recommended. Especially in comparison with the results of non- malignant sections and in looking at protein levels as well as at molecular changes. Furthermore with regard to the proliferation index individual cut offs could be determined and correlated with GRAF and FAK expression, as well as clinical parameter such as tumor staging and grade, and might give evidence on prognosis, response to therapy and survival odds.

7 LITERATURVERZEICHNIS

(Zitierweise entspricht den Richtlinien des Journals "Cancer Research")

1. Böcker, W., Stallmach, T., and Katenkamp, D. Nomenklatur der Tumoren (Kap. 6.7), Tumoren im Kindesalter (Kap. 40.7) und Tumoren des Weichgewebes (Kap. 45.2). *In: H. Moch (ed.), Pathologie, 4. Auflage. München: Urban & Fischer, Verlag der Elsevier GmbH, 2008.*
2. Deutsches-Kinderkrebsregister: Übersicht, Jahresbericht 2005 und 2012.
www.kinderkrebsregister.de.
3. Bouffet, E., Hodgson, D. C., and Koh, E.-S. Chapter 45: Pediatric Cancer. *In: L. H. Sobin (ed.), Prognostic Factors in Cancer, 3rd edition: Wiley-Liss, Inc., 2006.*
4. Osai, W. E., Demicco, E. G., and Pagliaro, L. C. Malignant Small Round Blue Cell Tumor of the Kidney Without EWSR1 Rearrangement: Report of a Case and Review of the Literature. *Clin Genitourin Cancer, Volume 10: 63-65, 2012.*
5. Graf, N., van Tinteren, H., Bergeron, C., Pein, F., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Sandstedt, B., Schenk, J. P., Godzinski, J., Oldenburger, F., Furtwangler, R., and de Kraker, J. Characteristics and outcome of stage II and III non-anaplastic Wilms' tumour treated according to the SIOP trial and study 93-01. *Eur J Cancer, 48: 3240-3248, 2013.*
6. Reinhard, H., Semler, O., Burger, D., Bode, U., Flentje, M., Gobel, U., Gutjahr, P., Leuschner, I., Maass, E., Niggli, F., Scheel-Walter, H. G., Stockle, M., Thuroff, J. W., Troger, J., Weirich, A., von Schweinitz, D., Zoubek, A., and Graf, N. Results of the SIOP 93-01/GPOH trial and study for the treatment of patients with unilateral nonmetastatic Wilms Tumor. *Klin Padiatr, 216: 132-140, 2004.*
7. Kaatsch, P., Debatin, K.-M., Schmidt, D., Ladenstein, R., Graf, N., Treuner, J., and Jürgens, H. Sektion III: Allgemeine pädiatrische Onkologie. Epidemiologie, Ätiologie, Prävention (Kap. 41), Zellbiologie (Kap. 43), Pathologie (Kap. 46), Neuroblastome (Kap. 68), Nierentumoren (Kap. 69), Weichteilsarkome (Kap. 70) und Ewing-Tumoren (Kap. 72). *In: J. Ritter (ed.), Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006.*

8. Deckert, M., Reifenberger, G., Schlote, W., Thal, D. R., Riede, U.-N., Walch, A., and Wiestler, O. D. Autonomes Wachstum (Kap. 7.2), Neoplastische Läsionen von peripherem Nervensystem, Skelettmuskulatur und Knochengewebe (Kap. 19.2.3, 20.1.6 und 20.2.6). *In*: H.-E. Schaefer (ed.), *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2004.
9. Miller, R. W., Young, J. L., Jr., and Novakovic, B. Childhood Cancer. *Cancer*, *75*: 395-405, 1995.
10. Gil-Benso, R., Lopez-Gines, C., Carda, C., Lopez-Guerrero, J. A., Ferrer, J., Pellin-Perez, A., and Llombart-Bosch, A. Cytogenetic and molecular findings related to rhabdomyosarcoma. An analysis of seven cases. *Cancer Genet Cytogenet*, *144*: 125-133, 2003.
11. Weiss, S. W., Sobin, L. H., and Enzinger, F. M. Skeletal muscle tumours - Malignant (Chapter 5.2). *In*: WHO International histological classification of tumours: Histological Typing of Soft Tissue Tumours, 2nd edition: Springer-Verlag, 1994.
12. Gamberi, G., Cocchi, S., Benini, S., Magagnoli, G., Morandi, L., Kreshak, J., Gambarotti, M., Picci, P., Zanella, L., and Alberghini, M. Molecular diagnosis in Ewing family tumors: the Rizzoli experience--222 consecutive cases in four years. *J Mol Diagn*, *13*: 313-324, 2011.
13. Passarge, E. Tumorerkrankungen - Einführung aus genetischer Sicht. *In*: K. Ruckpaul (ed.), *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*. Softcover reprint of the original 1st ed. 2001: Springer-Verlag, 2012.
14. Bohle, R. M. Onkogene und Onkoproteine in malignen fibrösen Histiozytomen - Biomarker oder molekulare Prognosefaktoren?, *Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen* edition, 1998.
15. Fuchs, U. Charakterisierung der 11q23/ MLL- Fusionpartnergene GRAF und FBP 17. *Inauguraldissertation*, 2002.
16. Martinelli, S., McDowell, H. P., Vigne, S. D., Kokai, G., Uccini, S., Tartaglia, M., and Dominici, C. RAS signaling dysregulation in human embryonal Rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, *48*: 975-982, 2009.

17. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, *408*: 307-310, 2000.
18. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, *358*: 15-16, 1992.
19. Levine, A. J. and Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, *9*: 749-758, 2009.
20. Tweddle, D. A., Pearson, A. D., Haber, M., Norris, M. D., Xue, C., Flemming, C., and Lunec, J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*, *197*: 93-98, 2003.
21. Petroni, M., Veschi, V., Gulino, A., and Giannini, G. Molecular mechanisms of MYCN-dependent apoptosis and the MDM2-p53 pathway: an Achille's heel to be exploited for the therapy of MYCN-amplified neuroblastoma. *Front Oncol*, *2*: 141, 2012.
22. Obana, K., Yang, H. W., Piao, H. Y., Taki, T., Hashizume, K., Hanada, R., Yamamoto, K., Tanaka, Y., Toyoda, Y., Takita, J., Tsuchida, Y., and Hayashi, Y. Aberrations of p16INK4A, p14ARF and p15INK4B genes in pediatric solid tumors. *Int J Oncol*, *23*: 1151-1157, 2003.
23. Krauss, G. Basics of Cell Signaling. *In: Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5th edition: Wiley-VCH, 2014.
24. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. Allgemeine Grundlagen der zellulären Signalübertragung. *In: J. Graw (ed.), Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, 4. Auflage edition: Wiley-VCH, 2012.
25. Guan, J. L., Trevithick, J. E., and Hynes, R. O. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul*, *2*: 951-964, 1991.
26. Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., and Parsons, J. T. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*: 5192-5196, 1992.
27. Zhao, J. and Guan, J. L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *28*: 35-49, 2009.

28. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 4: 487-525, 1988.
29. Brami-Cherrier, K., Gervasi, N., Arsenieva, D., Walkiewicz, K., Boutterin, M. C., Ortega, A., Leonard, P. G., Seantier, B., Gasmi, L., Bouceba, T., Kadare, G., Girault, J. A., and Arold, S. T. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *Embo J*, 33: 356-370, 2014.
30. Martin, K. H., Slack, J. K., Boerner, S. A., Martin, C. C., and Parsons, J. T. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*, 296: 1652-1653, 2002.
31. Hildebrand, J. D., Taylor, J. M., and Parsons, J. T. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, 16: 3169-3178, 1996.
32. Jarius, S., Martinez-Garcia, P., Hernandez, A. L., Brase, J. C., Borowski, K., Regula, J. U., Meinck, H. M., Stocker, W., Wildemann, B., and Wandinger, K. P. Two new cases of anti-Ca (anti-ARHGAP26/GRAF) autoantibody-associated cerebellar ataxia. *J Neuroinflammation*, 10: 7, 2013.
33. 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. 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: 9168-9173, 2000.
34. Aly, R. M. and Ghazy, H. F. High expression of GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase (GRAF) is a favorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 2014.
35. Taylor, J. M., Macklem, M. M., and Parsons, J. T. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J Cell Sci*, 112 (Pt 2): 231-242, 1999.
36. Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 269: 1270-1272, 1995.

37. Cai, K. and Dynlacht, B. D. Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 12254-12259, 1998.
38. Mercer, W. E. Checking on the cell cycle. *J Cell Biochem Suppl*, *30-31*: 50-54, 1998.
39. Olson, M. F., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature*, *394*: 295-299, 1998.
40. Taylor, J. M., Hildebrand, J. D., Mack, C. P., Cox, M. E., and Parsons, J. T. 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*: 8063-8070, 1998.
41. Battifora, H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol*, *96*: 669-671, 1991.
42. Boenisch, T., Farmilo, A. J., Stead, R. H., Key, M., Welcher, R., Harvey, R., and Atwoud, K. N. *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*, Vol. 3. Carpinteria, CA, USA: DAKO Cytomation Corp., 2003.
43. Rovin, J. D., Frierson, H. F., Jr., Ledin, W., Parsons, J. T., and Adams, R. B. Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate*, *53*: 124-132, 2002.
44. Osborn, M., Debus, E., and Weber, K. Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur J Cell Biol*, *34*: 137-143, 1984.
45. Pettinato, G., Swanson, P. E., Insabato, L., De Chiara, A., and Wick, M. R. Undifferentiated small round-cell tumors of childhood: the immunocytochemical demonstration of myogenic differentiation in fine-needle aspirates. *Diagn Cytopathol*, *5*: 194-199, 1989.
46. McCormick, D., Chong, H., Hobbs, C., Datta, C., and Hall, P. A. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology*, *22*: 355-360, 1993.
47. Seigneurin, D. and Guillaud, P. [Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker]. *Pathol Biol (Paris)*, *39*: 1020-1028, 1991.

48. Remmele, W. and Stegner, H. E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, *8*: 138-140, 1987.
49. 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. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer*, *58*: 306-309, 1986.
50. Gatta, G., Ferrari, A., Stiller, C. A., Pastore, G., Bisogno, G., Trama, A., and Capocaccia, R. Embryonal cancers in Europe. *Eur J Cancer*, *48*: 1425-1433, 2012.
51. Ferrari, A., Sultan, I., Huang, T. T., Rodriguez-Galindo, C., Shehadeh, A., Meazza, C., Ness, K. K., Casanova, M., and Spunt, S. L. Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database. *Pediatr Blood Cancer*, *57*: 943-949, 2011.
52. Rabinowicz, R., Barchana, M., Liphshiz, I., Linn, S., Futerman, B., and Ben-Arush, M. W. Cancer incidence and survival among infants in Israel, 1998-2007. *Pediatr Hematol Oncol*, *30*: 646-654, 2013.
53. Megison, M. L., Stewart, J. E., Nabers, H. C., Gillory, L. A., and Beierle, E. A. FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis*, *30*: 555-568, 2013.
54. Megison, M. L., Gillory, L. A., Stewart, J. E., Nabers, H. C., Mroczek-Musulman, E., and Beierle, E. A. FAK inhibition abrogates the malignant phenotype in aggressive pediatric renal tumors. *Mol Cancer Res*, *12*: 514-526, 2014.
55. Gillory, L. A., Stewart, J. E., Megison, M. L., Nabers, H. C., Mroczek-Musulman, E., and Beierle, E. A. FAK Inhibition Decreases Hepatoblastoma Survival Both In Vitro and In Vivo. *Transl Oncol*, *6*: 206-215, 2013.
56. Crompton, B. D., Carlton, A. L., Thorner, A. R., Christie, A. L., Du, J., Calicchio, M. L., Rivera, M. N., Fleming, M. D., Kohl, N. E., Kung, A. L., and Stegmaier, K. High-throughput tyrosine kinase activity profiling identifies FAK as a candidate therapeutic target in Ewing sarcoma. *Cancer Res*, *73*: 2873-2883, 2013.

57. Golubovskaya, V. M., Sumbler, B., Ho, B., Yemma, M., and Cance, W. G. MiR-138 and MiR-135 directly target focal adhesion kinase, inhibit cell invasion, and increase sensitivity to chemotherapy in cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*, *14*: 18-28, 2014.
58. Qian, Z., Qian, J., Lin, J., Yao, D. M., Chen, Q., Ji, R. B., Li, Y., Xiao, G. F., and Li, J. Y. GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase (GRAF) transcript was down-regulated in patients with myeloid malignancies. *J Exp Clin Cancer Res*, *29*: 111, 2010.
59. Qian, J., Qian, Z., Lin, J., Yao, D. M., Chen, Q., Li, Y., Ji, R. B., Yang, J., Xiao, G. F., and Wang, Y. L. Abnormal methylation of GRAF promoter Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, *35*: 783-786, 2011.
60. Cary, L. A. and Guan, J. L. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci*, *4*: D102-113, 1999.
61. Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*: 56-68, 2005.
62. Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, *15*: 954-963, 1995.
63. Guan, J. L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, *29*: 1085-1096, 1997.
64. Schneider, G. B., Kurago, Z., Zaharias, R., Gruman, L. M., Schaller, M. D., and Hendrix, M. J. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer*, *95*: 2508-2515, 2002.
65. Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A. G., Begin, L. R., Chapdelaine, A., and Chevalier, S. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int J Cancer*, *68*: 164-171, 1996.
66. Miyazaki, T., Kato, H., Nakajima, M., Sohda, M., Fukai, Y., Masuda, N., Manda, R., Fukuchi, M., Tsukada, K., and Kuwano, H. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, *89*: 140-145, 2003.

67. Livasy, C. A., Moore, D., Cance, W. G., and Lininger, R. A. Focal adhesion kinase overexpression in endometrial neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *12*: 342-345, 2004.
68. Lark, A. L., Livasy, C. A., Calvo, B., Caskey, L., Moore, D. T., Yang, X., and Cance, W. G. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res*, *9*: 215-222, 2003.
69. Kornberg, L. J. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, *20*: 745-752, 1998.
70. Giaginis, C. T., Vgenopoulou, S., Tsourouflis, G. S., Politi, E. N., Kouraklis, G. P., and Theocharis, S. E. Expression and clinical significance of focal adhesion kinase in the two distinct histological types, intestinal and diffuse, of human gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*, *15*: 173-181, 2009.
71. Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T., and Cance, W. G. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, *55*: 2752-2755, 1995.
72. Golubovskaya, V. M., Finch, R., Kweh, F., Massoll, N. A., Campbell-Thompson, M., Wallace, M. R., and Cance, W. G. p53 regulates FAK expression in human tumor cells. *Mol Carcinog*, *47*: 373-382, 2008.
73. Golubovskaya, V. M. and Cance, W. Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer. *Front Biosci*, *15*: 901-912, 2010.
74. Beierle, E. A., Ma, X., Trujillo, A., Kurenova, E. V., Cance, W. G., and Golubovskaya, V. M. Inhibition of focal adhesion kinase and src increases detachment and apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Mol Carcinog*, *49*: 224-234, 2010.
75. Beierle, E. A., Ma, X., Stewart, J. E., Megison, M., Cance, W. G., and Kurenova, E. V. Inhibition of the focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor receptor-3 interaction leads to decreased survival in human neuroblastoma cell lines. *Mol Carcinog*, *53*: 230-242, 2014.

76. Stewart, J. E., Ma, X., Megison, M., Nabers, H., Cance, W. G., Kurenova, E. V., and Beierle, E. A. Inhibition of FAK and VEGFR-3 binding decreases tumorigenicity in neuroblastoma. *Mol Carcinog*, 2013.
77. Beierle, E. A., Ma, X., Stewart, J., Nyberg, C., Trujillo, A., Cance, W. G., and Golubovskaya, V. M. Inhibition of focal adhesion kinase decreases tumor growth in human neuroblastoma. *Cell Cycle*, 9: 1005-1015, 2010.
78. Moritake, H., Sugimoto, T., Kuroda, H., Hidaka, F., Takahashi, Y., Tsuneyoshi, M., Yoshida, M. A., Cui, Q., Akiyoshi, K., Izumi, T., and Nuno, H. Newly established Askin tumor cell line and overexpression of focal adhesion kinase in Ewing sarcoma family of tumors cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 146: 102-109, 2003.
79. Tomar, A. and Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, 21: 676-683, 2009.
80. Ohba, T., Ishino, M., Aoto, H., and Sasaki, T. Interaction of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase beta with SH3 domains of p130Cas-related proteins and a GTPase-activating protein. *Graf. Biochem J*, 330 (Pt 3): 1249-1254, 1998.
81. Oktay, M. H., Oktay, K., Hamele-Bena, D., Buyuk, A., and Koss, L. G. Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas. *Hum Pathol*, 34: 240-245, 2003.
82. Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J., and Cance, W. G. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 342: 1024-1025, 1993.
83. de Alava, E., Panizo, A., Antonescu, C. R., Huvos, A. G., Pardo-Mindan, F. J., Barr, F. G., and Ladanyi, M. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am J Pathol*, 156: 849-855, 2000.
84. Ghanem, M. A., Van der Kwast, T. H., Sudaryo, M. K., Mathoera, R. B., van den Heuvel, M. M., Al-Doray, A. A., Nijman, R. M., and van Steenbrugge, G. J. MIB-1 (KI-67) proliferation index and cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein expression in nephroblastoma. *Clin Cancer Res*, 10: 591-597, 2004.
85. Rudolph, P., Lappe, T., Hero, B., Berthold, F., Parwaresch, R., Harms, D., and Schmidt, D. Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma. *Am J Pathol*, 150: 133-145, 1997.

86. San Miguel-Fraile, P., Carrillo-Gijon, R., Rodriguez-Peralto, J. L., and Badiola, I. A. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in childhood rhabdomyosarcoma. *Am J Clin Pathol*, *121*: 358-365, 2004.
87. Juric, I., Pogorelic, Z., Kuzmic-Prusac, I., Biocic, M., Jakovljevic, G., Stepan, J., Zupancic, B., Culic, S., and Kruslin, B. Expression and prognostic value of the Ki-67 in Wilms' tumor: experience with 48 cases. *Pediatr Surg Int*, *26*: 487-493, 2010.
88. Sharma, S., Saboorian, H. M., Frawley, W. H., Frenkel, E. P., Haley, B. B., and Ashfaq, R. MIB1 labeling index as an indicator of chemoresponse in carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *12*: 290-295, 2004.
89. Diniz, G., Aktas, S., Ortac, R., Erbay, A., Vergin, C., and Ergin, M. Alternative prognostic factors in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma: Nm23 expression, proliferative activity and angiogenesis. *Turk J Pediatr*, *46*: 239-244, 2004.
90. Staibano, S., Franco, R., Tranfa, F., Mezza, E., Lo Muzio, L., Strianese, D., Errico, M. E., Bufo, P., Ferrara, G., Somma, P., Mansueto, G., Greco, I., Fiorillo, A., Bonavolonta, G., and De Rosa, G. Orbital rhabdomyosarcoma: relationship between DNA ploidy, p53, bcl-2, MDR-1 and Ki67 (MIB1) expression and clinical behavior. *Anticancer Res*, *24*: 249-257, 2004.
91. Valnes, K., Brandtzaeg, P., and Rognum, T. O. Sensitivity and efficiency of four immunohistochemical methods as defined by staining of artificial sections. *Histochemistry*, *81*: 313-319, 1984.
92. Shi, S. R., Key, M. E., and Kalra, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, *39*: 741-748, 1991.
93. Merz, H., Rickers, O., Schrimel, S., Orscheschek, K., and Feller, A. C. Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffin-embedded material. *J Pathol*, *170*: 257-264, 1993.

8 ANHANG

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Ich danke im Besonderen meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle, leitender Oberarzt des „Instituts für Pathologie“ am Universitätsklinikum Gießen bis März 2006, seither Geschäftsführender Direktor des „Instituts für Pathologie“ der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar, für die Überlassung des Themas, die Nutzung des Labors und sämtlicher zur Verfügung gestellter Materialien, sowie seiner Hilfe und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Weiterhin danke ich herzlich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Esther Kuhlmann-Farahat und Frau Marlene Stein für die Einarbeitung vor und Betreuung während des praktischen Teils der Arbeit.

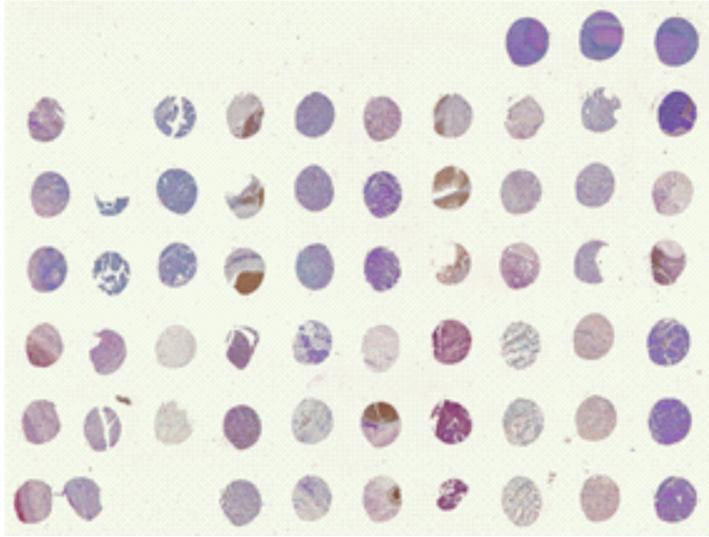
Für die freundliche Unterstützung bei der digitalen Dokumentation der Schnitte und in Computerbelangen danke ich Frau Gudrun Jurat und Herrn Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm am „Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen“.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. L. Hansmann und Herrn Liebertz aus dem „Senckenbergischen Institut für Pathologie“ der Johann- Wolfgang v. Goethe Universität in Frankfurt a. M. für die Herstellung der MT- Blöcke und -schnitte, sowie Herrn Prof. Dr. med. A. Borkhardt und Frau S. Utsch für Ihre Unterstützung bei der Patientendokumentation und Datenrecherche.

Auch möchte ich mich bei Fr. Dr. med. Tanja Kottmann für die statistische Beratung und Hilfestellung bei der Datenauswertung und Grafikerstellung bedanken.

Vielen Dank noch an meine Eltern Monika und Harald Trinkner und meine Schwiegereltern Angelika und Heiko Neutzner für Ihre Hilfe bei der Kinderbetreuung, ohne die ich kaum die nötige Zeit gefunden hätte die Arbeit fertig zu stellen.

Aus tiefem Herzen möchte ich mich insbesondere noch bei meinem Ehemann Dipl.-Ing. (FH) René Neutzner für seine immerwährende Unterstützung und Liebe bedanken.



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: 978-3-8359-6533-1



9 783835 196533 1