

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Neuropathologie

**Immunhistochemische Studie von Hirntumorgewebe
mit spezifischen Antikörpern gegen GFAP, MAP – 2,
NOGO – A, OLIG – 2 und WT – 1**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schwab, David Emanuel

2017

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Schittenhelm
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. G. Lepski
Tag der Disputation:	01.04.2015

Widmung

Meiner Familie

Die Bibel: Psalm 111, Vers 10:

Die Furcht des HERRN ist der Weisheit Anfang: eine gute Einsicht für alle, die sie ausüben.

Die Bibel: 1. Petrus Kapitel 2, Vers 6:

Siehe, ich lege in Zion einen auserwählten, kostbaren Eckstein; und wer an ihn glaubt, wird nicht zuschanden werden.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Anaplastisches Astrozytom
AE	Anaplastisches Ependymom
AO	Anaplastisches Oligodendrogliom
AOA	Anaplastisches Oligoastrozytom
Ak	Antikörper
Bcl – xl	B – cell lymphoma – extra large
Bcl – 2	B – cell lymphoma 2
BRAF	V – raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CC1	Cell Conditioner Nr. 1
CC2	Cell Conditioner Nr. 2
DA	Diffuses Astrozytom
DNA	Desoxyribonucleic acid
E	Ependymom
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	Epitheliales Membranantigen
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystalline
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hämatoxylin – Eosin
IDH1	Isocitrate – Dehydrogenase 1
IDH1 R132H	Punktmutation R132H des Isocitratdehydrogenase 1 – Gens
IF	Intermediärfilament
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilo Dalton
Ki – 67	Kiel Antigen 67
Km	Michaeliskonstante
LCS	Liquid Cover Slip
LOH 10	Loss of heterozygosity on chromosome 10
M	Mol

MAP – 2	Mikrotubuli – assoziiertes Protein
ME	Myxopapilläres Ependymom
MIB – 1	Made in Borstel – 1
N	Grundgesamtheit
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NF1	Neurofibromatose 1
NOGO – A	Neurite outgrowth inhibitor
O	Oligodendrogliom
OLIG – 2	Oligodendrocyte transcription factor
Opti – View Biotin Ig	Biotin Immunglobulin
Opti – View Copper	Kupfer
Opti – View DAB	Diaminobenzidin
Opti – View H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Opti – View SA-HRP	Streptavidin – horseradish peroxidase
PA	Pilozytisches Astrozytom
PMA	Pilomyxoides Astrozytom
PCV	Therapieschema mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin
pH	Pondus Hydrogenii/Potentia Hydrogenii
P – Wert	Probability – value (p – value)
PXA	Pleomorphes Xanthoastrozytom
1p	kurzer Arm von Chromosom 1
17p	kurzer Arm von Chromosom 17
19q	langer Arm von Chromosom 19
RNA	Ribonucleic acid
SE	Subependymom
S100	Saures Calcium – bindendes Protein
TMA	Tissue Microarray
TP53	Tumor protein p53
WHO	World Health Organization
WT – 1	Wilms Tumor protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	8
1.1	GLIALE TUMORE	8
1.2	WHO GRADIERUNGEN	8
1.3	KLASSIFIKATION DER ASTROZYTOME	9
1.3.1	Pilozytisches Astrozytom	10
1.3.2	Pilomyxoides Astrozytom	11
1.3.3	Diffuses Astrozytom	11
1.3.4	Anaplastisches Astrozytom	13
1.3.5	Glioblastom	13
1.4	KLASSIFIKATION DER OLIGODENDROGLIOME	15
1.4.1	Oligodendrogliom	15
1.4.2	Anaplastisches Oligodendrogliom	16
1.4.3	Anaplastisches Oligoastrozytom	17
1.5	KLASSIFIKATION DER EPENDYMOME	17
1.5.1	Subependymom	18
1.5.2	Myxopapilläres Ependymom	18
1.5.3	Klassisches Ependymom	19
1.5.4	Anaplastisches Ependymom	20
1.6	ANTIKÖRPER	22
1.6.1	GFAP	22
1.6.2	MAP – 2	23
1.6.3	NOGO – A	24
1.6.4	OLIG – 2	25
1.6.5	WT – 1	26
1.7	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	27
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	AUSWAHL UND DEFINITION DER GEWEBEPROBEN	29
2.2	MIKROSKOPISCHE UND HISTOLOGISCHE BEURTEILUNG	33
2.3	DIE TISSUE MICROARRAY METHODE	33
2.4	KONSTRUKTION DES TISSUE MICROARRAYS	34
2.5	HERSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE	35
2.6	IMMUNHISTOCHEMIE	35
2.6.1	Theoretische Grundlagen	35
2.6.2	Auswahl der Kontrollen	36
2.6.3	Immunhistochemische Färbungen	37
2.6.3.1	Das optiView – Verfahren am Beispiel von GFAP	37
2.6.3.2	Das iView – Verfahren am Beispiel von NOGO – A	37
2.6.4	Materialien	39
2.6.4.1	Antikörper	39
2.6.4.2	Färbesubstanzen	40
2.7	LICHTMIKROSKOPISCHE BEGUTACHTUNG	41
2.8	STATISTIK	44

3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	GFAP	45
3.1.1	GFAP Intensität.....	45
3.1.2	GFAP Menge	48
3.1.3	GFAP Immunreaktiver Score	51
3.2	MAP – 2.....	56
3.2.1	MAP – 2 Intensität.....	56
3.2.2	MAP – 2 Menge	59
3.2.3	MAP – 2 Immunreaktiver Score	62
3.3	NOGO A.....	67
3.3.1	NOGO A Intensität	67
3.3.2	NOGO A Menge.....	70
3.3.3	NOGO A Immunreaktiver Score.....	73
3.4	OLIG 2.....	78
3.4.1	OLIG 2 Intensität.....	78
3.4.2	OLIG 2 Menge	81
3.4.3	OLIG 2 Immunreaktiver Score	84
3.5	WT 1.....	89
3.5.1	WT 1 Intensität.....	89
3.5.2	WT 1 Menge	92
3.5.3	WT 1 Immunreaktiver Score	95
4	DISKUSSION.....	100
4.1	VOR – UND NACHTEILE DER TMA METHODE	100
4.2	DISKUSSION DES GESAMTKOLLEKTIVES	102
4.3	DISKUSSION DER ANTIKÖRPER.....	103
4.3.1	GFAP	103
4.3.2	MAP – 2	106
4.3.3	NOGO – A.....	108
4.3.4	OLIG – 2	111
4.3.5	WT – 1	114
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	119
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	121
7	ANHANG	132
7.1	STATISTISCHE TABELLEN	132
7.2	DANKSAGUNGEN	138
7.3	LEBENS LAUF	139

1 Einleitung

1.1 Gliale Tumore

Gliome, besonders Astrozytome, machen die Mehrheit der intrakraniellen Neoplasien aus. Je nach Studie gehen 40 – 45% aller Hirntumore auf Gliome zurück. Diese Tumoren stammen aus dem Neuroektoderm und werden auf Basis des vorherrschenden Zelltyps klassifiziert, sie sind überwiegend von neuroglialer Abstammung (Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen). In gebräuchlicher Verwendung werden auch Tumore, die aus undifferenzierten Zellen, aus neuralen Elementen und Mischzellpopulationen bestehen, als Gliome bezeichnet (Zülch et al. 1986). Gliome sind bei Männern etwas häufiger als bei Frauen (m/w – Verhältnis 3:2). Die Inzidenz von glialen Tumoren ist bei Kindern höher als bei Erwachsenen; drei Fünftel aller primären intrakraniellen Neoplasien treten bei Kindern unter 15 Jahren auf. Bei Kindern treten Gliome häufiger infratentoriell im Cerebellum und Hirnstamm auf; bei Erwachsenen vorwiegend supratentoriell im Marklager. Die meisten Klassifizierungen von Gliomen basieren auf den Ursprungszellen (histogenetische Hypothese) und dem Wiedererkennen von Gemeinsamkeiten mit gesunden Zellen im reifen und sich entwickelnden Nervensystem (Nelson et al. 1993). In dieser Arbeit wurde die aktuelle WHO – Klassifikation verwendet (Louis et al. 2007). Differenzierungsgrade spiegeln sich im Inhalt von reifen und unreifen Zellformen wider. Die Besonderheiten von Gliomen bestehen darin, dass sie keine hämatogenen und lymphogenen Metastasen aufweisen und in der Regel diffus in angrenzendes Gewebe wachsen. Neoplasien aus mehr als einer Zelllinie sind nicht ungewöhnlich und resultieren aus gemischten Zellpopulationen (Mischgliomen; Hart et al. 1974).

1.2 WHO Gradierungen

WHO Grad I Läsionen beschreiben Gliome mit geringem Proliferationspotential und großen Heilungschancen nach alleiniger chirurgischer Entfernung. Grad I Gliome sind unter anderem Subependymome und myxopapilläre Ependymome,

pilozytisches Astrozytom und das subependymale Riesenzellastrozytom (Paulus et al. 2012a).

WHO Grad II Gliome weisen in der Regel eine geringe Proliferation auf, wachsen jedoch häufig infiltrierend und führen oft zu Rezidiven. Manche Gliome neigen dazu, eine Progression in höhergradige Gliome zu durchlaufen; dazu zählen insbesondere diffuse Astrozytome, Oligodendrogliome und Mischgliome. Das mediane Überleben ist typischerweise länger als fünf Jahre, bei Oligodendrogliomen sogar mehr als 10 Jahre (Kleihues et al. 2007a).

WHO Grad III Läsionen weisen nukleäre Atypien und rege mitotische Aktivität sowie eine deutlich erhöhte Zelldichte auf. Eine adjuvante Radiochemotherapie gehört zum Therapieschema nach chirurgischer Resektion. Das mittlere Überleben beträgt im Allgemeinen zwei bis drei Jahre (Kleihues et al. 2007).

WHO Grad IV Tumore sind durch mitotische Aktivität, Ausbildung von Nekrosen, zytologische Malignität sowie durch ein Fortschreiten nach Operation und schwerwiegende Prognose gekennzeichnet. Auch weitreichende Infiltration benachbarter Gewebe sowie die Tendenz zur leptomeningealen Absiedlung sind Merkmale von WHO Grad IV Gliomen (Kleihues et al. 2007a).

1.3 Klassifikation der Astrozytome

Astrozytome sind Tumore, in denen neoplastische Zellen astrozytische Differenzierungsmerkmale zeigen. Astrozytäre Tumore schließen die gewöhnlichen diffusen astrozytären Neoplasien genauso wie die weniger häufigen mehr umschriebenen Varianten ein. Obwohl es gelegentliche Überschneidungen zwischen diesen beiden Untergruppen gibt, sollten sie klinisch und biologisch voneinander getrennt werden. Diffuse astrozytäre Tumore sind biologisch verwandte, geringe bis hochgradige Neoplasien; sie werden durch den Grad ihrer Malignität aufgegliedert in diffuse Astrozytome (WHO Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und Glioblastome (WHO Grad IV) (Louis et al. 2007). Umschriebene Astrozytome sind

untereinander nicht eng verwandt, aber sie teilen generell einen indolenteren Verlauf. Zu ihnen zählen das pilozytische Astrozytom (mit pilomyxoidem Astrozytom), das pleomorphe Xanthoastrozytom (PXA) und das subependymale Riesenzell – Astrozytom, sowie das desmoplastisch infantile Astrozytom. Fokale neuronale Differenzierung ist in manchen Entitäten wie dem PXA und dem subependymalen Riesenzell – Astrozytom häufig und klar begrenzt. In diffusen astrozytären Tumoren hingegen ist die fokale neuronale Differenzierung ungewöhnlich und inkonsistent und ihre Signifikanz kontrovers (Zülch et al. 1986).

1.3.1 Pilozytisches Astrozytom

Pilozytische Astrozytome sind im Allgemeinen gut begrenzte, langsam wachsende Tumore, die gewöhnlich im Kinder- und jungen Erwachsenenalter auftreten. Sie machen 5 – 6% aller Gliome aus, mit einer Gesamtinzidenz von 0,37/100.000 Personen im Jahr; es konnte keine Geschlechtertendenz festgestellt werden. Als häufigstes Gliom im Kindesalter entsteht die Mehrheit (67%) oberflächlich im Kleinhirn. Histologisch stellen sie sich als biphasisches Gewebe dar, d.h. einerseits kompakte bipolare Zellen mit Rosenthal – Fasern, andererseits unstrukturierte multipolare Zellen mit Mikrozysten und granulierten Ablagerungen (Scheithauer et al. 2007). Daneben existiert noch eine Variante mit etwas ungünstigerem Verlauf, das pilomyxoide Astrozytom.

Pilozytische Astrozytome weisen nur geringe MIB 1 Expression (Mittelwert 1,1%) auf (Giannini et al. 1999). Pilozytische Astrozytome sind die bedeutendste Neoplasie des ZNS, welche mit Neurofibromatose 1 (NF 1) assoziiert ist. Schätzungsweise entwickeln 15% aller Patienten mit NF 1 ein pilozytisches Astrozytom, insbesondere am Nervus opticus; bei Vorliegen eines pilozytischen Astrozytoms am Sehnerv ist in einem Drittel der Fälle NF 1 als Grunderkrankung gegeben (Lewis et al. 1984; Garner et al. 1982). Pilozytische Astrozytome der ersten Lebensdekade weisen in der Mehrheit BRAF – KIAA1549 Fusionstranskripte auf, diese kommen mit zunehmendem Alter nur noch selten vor. Ihre klinische Bedeutung muss noch bestimmt werden (Hawkins et al. 2011; Hasselblatt et al. 2011).

Begünstigt durch geringe maligne Differenzierung und Rezidivierung weisen sie in der Regel eine lange Überlebenszeit (10 – Jahresüberlebensraten über 85%) auf (Paulus et al. 2012a). In seltenen Fällen konnten spontane Tumorrückbildungen beobachtet werden. Wiederkehrende Läsionen im Hirnstamm und Hypothalamus können letal sein, allerdings nur bei langwierigem Verlauf mit multiplen Rezidiven (Forsyth et al. 1993).

1.3.2 Pilomyxoides Astrozytom

Pilomyxoide Astrozytome sind eng mit pilozytischen Astrozytomen verwandt und sind histologisch durch monomorphe bipolare Tumorzellen, welche Rosenthal'sche Fasern aufweisen und sich um Gefäße ausrichten, mit myxoidem Stroma gekennzeichnet. Sie treten am meisten im Säuglingsalter auf und sind gewöhnlich im Hypothalamus lokalisiert. Pilomyxoide Astrozytome sind maligner als pilozytische Astrozytome, v.a. durch erhöhte Rezidivierung und Streuung über den Liquor (Tihan et al. 1999).

1.3.3 Diffuses Astrozytom

Diffuse Astrozytome zeichnen sich durch diffuse Infiltration ortsständigen ZNS – Gewebes aus; sie setzen sich histologisch aus einem locker strukturierten, des Öfteren mikrozystischen Stroma mit gut differenzierten fibrillären Astrozyten im Hintergrund zusammen. Sie machen zehn bis fünfzehn Prozent aller astrozytären Tumore aus, mit einer Inzidenz von 0,14/100.000 Personen im Jahr. Die Altersverteilung diffuser Astrozytome weist einen Mittelwert von 34 Jahren auf, mit einer gewissen männlichen Häufung (m/w – Verhältnis 1.18:1). In jeder Region des ZNS, besonders supratentoriell im Frontal – und Temporallappen sowie im Hirnstamm, sind diffuse Astrozytome lokalisiert. Klinisch können Krämpfe, Sprachveränderungen, Seh – bzw. motorische Einschränkungen sowie bei frontalen Tumoren Persönlichkeitsveränderungen Hinweis auf die Diagnose sein. Verglichen mit normalem Hirngewebe zeichnen sie sich mit einer gemäßigt erhöhten Zellzahl und gelegentlich auftretenden Zellkernpolymorphismen aus, allerdings fehlen Mitosen. Das Auftreten von

Nekrosen oder Gefäßinfiltration ist unvereinbar mit WHO Grad II Astrozytomen (Deimling et al. 2007). Unterarten diffuser Astrozytome sind das fibrilläre, protoplasmatische und gemistozytäre Astrozytom. Fibrilläre Astrozytome weisen als diagnostisches Kriterium nukleäre Atypien und faserförmige, gitterbildende neoplastische Astrozyten mit zystischen Hohlräumen auf. Nekrosen, Gefäßproliferate und Mitosen fehlen. Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 kommen in ca. 35% der Fälle vor, häufige IDH 1 – Mutationen und GFAP Expression sind charakteristisch (Paulus et al. 2012a). Gemistozytäre Astrozytome zeichnen sich durch kompaktes Tumorgewebe mit umfangreichem eosinophilem Zytoplasma und kurzen Zellfortsätzen aus. Ein Anteil von mindestens 20% „gemästetzelligen“ Tumorzellen ist zur Diagnose notwendig. Mutationen des TP53 Gens sind in mehr als vier Fünftel der Fälle zu finden (Paulus et al. 2012a).

Protoplasmatische Astrozytome sind sehr selten und von fibrillären und pilozytischen Astrozytomen schwierig abzugrenzen. Kleine Zellkörper mit wenigen schlaffen Fortsätzen sowie mikrozystische Auflockerungen mit geringer Zelldichte und fehlenden Mitosen sind im Idealfall vorhanden. Protoplasmatische Astrozytome sind Gliome des frühen Erwachsenenalters, meist frontal oder temporal lokalisiert und mit einer hohen Überlebenszeit assoziiert (Deimling et al. 2007; Paulus et al. 2012a; Prayson et al. 1996).

Die mittlere Überlebenszeit nach Resektion beträgt ungefähr sieben Jahre, wobei die gesamte Krankheitsdauer von der Malignisierung in höhergradige Astrozytome, d. h. in anaplastische Astrozytome und Glioblastome anhängt, die im Durchschnitt nach vier bis fünf Jahren auftritt (Deimling et al. 2007). Junges Alter zum Diagnosezeitpunkt, umfassende Resektion und Epilepsie als einziges Symptom haben sich als günstiger Faktor auf das Überleben herausgestellt (van Veelen et al. 1998). Große Tumormasse und das Auftreten neurologischer Ausfälle sind mit schlechterer Prognose assoziiert (Danks et al. 1995).

1.3.4 Anaplastisches Astrozytom

Anaplastische Astrozytome sind maligne, diffus infiltrierende Gliome, die sich histologisch durch gesteigerte Zellzahl, deutliche Kernanomalien und Mitosen (MIB 1 Expression 5 – 10%) auszeichnen. Sie treten im mittleren Erwachsenenalter (51 Jahre) auf und sind bei Männern tendenziell häufiger (m/w – Verhältnis 1.31: 1) (Central Brain Tumor Registry, 2006). Etwa 35% aller Astrozytome sind anaplastische Astrozytome (Kleihues et al. 2000). Sie repräsentieren einen Durchgangsstadium bei der Progression diffuser Astrozytome zu Glioblastomen und weisen ähnlich Grad II Tumoren viele TP53 – Mutationen auf. Allerdings wurden auch Primärentstehungen ohne Entwicklung aus diffusen Astrozytomen WHO Grad II beschrieben. Nekrosen sowie Gefäßproliferate schließen ein anaplastisches Astrozytom aus und sind Hinweis auf eine Progredienz zum Glioblastom WHO Grad IV (Kleihues et al. 2000), jedoch sind bereits partielle Anaplasiezeichen diagnoseführend. Die mittlere Fünf – Jahresüberlebensrate beträgt 15 – 25% (Kleihues et al. 2007b; Kleihues et al. 2000).

1.3.5 Glioblastom

Glioblastome sind die häufigsten Gehirntumore und machen schätzungsweise 12 – 15% aller intrakraniellen sowie 60 – 75% aller astrozytären Tumore aus (Lantos et al. 2002; Ohgaki et al. 2005). Die Inzidenz beträgt 3,5/100.000 Fälle pro Jahr (Lantos et al. 2002). Bevorzugt manifestieren sich Glioblastome bei Erwachsenen mit dem mittleren Alter von 61.3 Jahren und einem Geschlechtsverhältnis m/w 1.26: 1. Sie treten bevorzugt in der weißen Substanz der Temporal –, Parietal – sowie Frontallappen auf. Glioblastome infiltrieren häufig in die angrenzenden Bezirke und über das Corpus Callosum in die kontralaterale Hirnhemisphäre („Schmetterlingsgliom“). Klinische Anzeichen gestiegenen Hirndrucks wie Kopfschmerz und Übelkeit verbunden mit einem Papillenödem sind häufig; ein Drittel der Patienten erleidet einen epileptischen Anfall (Kleihues et al. 2007c). Trotz ihres schnellen infiltrierenden Wachstums tendieren Glioblastome nicht dazu, in den Subarachnoidalraum einzudringen,

so dass sie selten über den Liquor metastasieren (Giordana et al. 1995). Hämatogene Streuung in extraneurales Gewebe bei Patienten ohne vorherigen chirurgischen Eingriff stellte sich als sehr selten heraus (Pasquier et al. 1980). Biologisch und klinisch muss zwischen primären und sekundären Glioblastomen unterschieden werden. Die deutliche Mehrheit (>90%) aller Glioblastome entsteht sehr rasch mit kurzer klinischer Verlaufsgeschichte als so genannte primäre oder de novo Glioblastome. Sie treten typischerweise bei älteren Menschen (Durchschnittsalter 62 Jahre) auf (Ohgaki et al. 2004). Sekundäre Glioblastome entstehen aus diffusen Astrozytomen WHO Grad II oder anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III, sind wesentlich seltener (<10%) und ereignen sich in der Regel bei jüngeren Patienten (Durchschnittsalter 45 Jahre). Die Dauer der Progression von WHO Grad II zu WHO Grad IV Gliomen variiert beträchtlich und liegt im Mittel bei vier bis fünf Jahren (Ohgaki et al. 2005).

Histologisch stellen sich Glioblastome als anaplastische, zellreiche Gliome mit schwach differenzierten, häufig pleomorphen astrozytären Tumorzellen mit ausgeprägten Zellkernatypien und reger mitotischer Aktivität dar. Gefäßproliferate und/oder Nekrosen sind erforderliche Diagnoseeigenschaften (Burger et al. 1989). Auffallend ist, dass Glioblastome sich histologisch sehr variabel darstellen, d.h. sie können sowohl monomorphe als auch stark heterogene Areale mit mehrkernigen Riesenzellen und nukleären Polymorphismen aufweisen (Burger et al. 1989). Daneben existieren kleinzellige, epitheloide und sarkomatöse Varianten. Trotz Fortschritten in der chirurgischen, onkologischen und radiologischen Therapie bleibt das Überleben bei Patienten mit Glioblastom extrem kurz. So überleben weniger als 20% der Patienten mehr als ein Jahr, knapp drei Prozent leben länger als drei Jahre (Ohgaki et al. 2005). Das Patientenalter erwies sich als der signifikanteste Faktor im Bezug auf die Prognose. Junge Patienten (<50Jahre) wiesen eine signifikant bessere Prognose auf, ebenso wie sekundäre Glioblastome gegenüber primären Glioblastomen, wobei hier höchstwahrscheinlich das jüngere Gesamtkollektiv mehr als biologische Eigenschaften verantwortlich ist (Ohgaki et al. 2004). Verstärkte Anwesenheit und größeres Ausmaß von

Nekrosen sowie LOH 10 korrelieren mit kürzerer Überlebenszeit (Burger et al. 1987).

1.4 Klassifikation der Oligodendrogliome

Oligodendrogliome sind definiert als niedrig – bzw. – höhergradige diffus infiltrierende Gliome, die aus neoplastischen Zellen zusammengestellt sind. Morphologisch ähneln sie Oligodendrogliazellen und beherbergen oft eine Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q (Louis et al. 2008a).

1.4.1 Oligodendrogliom

Oligodendrogliome sind gut differenzierte Tumore, die ca. 5 – 6% aller Gliome ausmachen. Die Inzidenz wird auf 0,3/100.000 Personen pro Jahr geschätzt. Die Mehrheit der Oligodendrogliome entstehen bei Erwachsenen (Durchschnittsalter 40 – 45 Jahre) mit dem Geschlechtsverhältnis m/w 1.1:1 (Central Brain Tumor Registry, 2006). Im Frontallappen wurden über die Hälfte aller Oligodendrogliome lokalisiert, Beteiligung mehrerer Regionen ist üblich. Klinisch stellen sich Patienten mit Krampfanfällen, Kopfschmerzen sowie mit geistigen und mentalen Veränderungen vor (Lebrun et al. 2004). Histopathologisch stellen sich Oligodendrogliome mit monomorphen Zellen und runden, einheitlichen Zellkernen mit perinukleärem Spalt, durch die Paraffinbehandlung bedingt (Honigwabenstruktur), dar. Zusätzlich können Verkalkungsherde, zystische Veränderungen sowie ein dicht verzweigtes Kapillarsystem vorhanden sein. Mitotische Aktivität, deutliche Kapillarproliferationen und auffallende Nekrosen weisen auf eine Progression zum anaplastischen Oligodendrogliom WHO Grad III hin (Reifenberger et al. 2007a). Die Proliferation in Oligodendrogliomen ist gewöhnlich gering, die MIB 1 Expression liegt im Durchschnitt unter fünf Prozent. Gleichzeitige Deletion der chromosomalen Arme 1p und 19q stellt die charakteristische Veränderung bei Oligodendrogliomen in über 80% der Fälle dar (Jeuken et al. 2004), partielle Deletionen sind selten. Im Gegensatz zu Astrozytomen sind 17p Verlust oder TP 53 Mutationen selten.

Oligodendrogliome WHO Grad II sind typischerweise langsam wachsende Tumore mit langer Überlebenszeit. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 11,6 Jahre, wobei die Schätzungen stark schwanken (Ohgaki et al. 2005). Günstige prognostische Faktoren auf das Überleben sind junges Alter bei Operation, Lokalisation im Frontallappen, geringe Kontrastmittelanreicherung, komplette chirurgische Entfernung sowie der 1p/19q – Verlust (Schiffer et al. 1997; Shaw et al. 1992; Kros et al. 1994). Eine Therapie mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin (PCV – Therapie) zeigte bei 1p/19q – Verlust eine längere Überlebenszeit verglichen mit Patienten ohne chromosomalen Verlust (Cairncross et al. 2013). Höhere (mehr als fünf Prozent) MIB 1 Expression, das Auftreten von Nekrosen, erhöhte Zellzahl und Gefäßproliferate sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Kros et al. 1990).

1.4.2 Anaplastisches Oligodendrogliom

Anaplastische Oligodendrogliome machen näherungsweise 1,2% aller primären Hirntumore aus, die Inzidenz liegt bei 0,07 – 0,18/100.000 Fälle pro Jahr. Ungefähr 20 – 35% aller Oligodendrogliome sind anaplastische Oligodendrogliome. Das mediane Alter liegt bei 45 bis 50 Jahren, eine geringe männliche Präferenz wurde berichtet (Central Brain Tumor Registry 2006). Anaplastische Oligodendrogliome entstehen entweder de novo oder entwickeln sich aus Oligodendrogliomen WHO Grad II, wobei die Progression im Durchschnitt sechs bis sieben Jahre dauert (Ohgaki et al. 2005). Histopathologisch findet man einen zellreichen, diffus infiltrierenden Tumor, der beträchtliche morphologische Variationen aufweist. Mehrheitlich werden Eigenschaften gezeigt, die an oligodendrogliale Zellen erinnern, z.B. runder hyperchromatischer Zellkern, Honigwabenstruktur und wenig Zellausläufer. Die mitotische Aktivität ist gewöhnlich erhöht, vereinzelt werden deutliche zelluläre Polymorphismen mit mehrkernigen Riesenzellen oder auffallenden Spindelzellen beobachtet (Zulch et al. 1986). Darüber hinaus sind verzweigte Kapillarnetzwerke und Verkalkungen charakteristisch für anaplastische Oligodendrogliome. 1p/19q Verlust wird bei bis zu zwei Drittel aller Fälle beobachtet und damit etwas weniger als bei WHO Grad II Oligodendrogliomen

(Reifenberger et al. 2007b). Das mittlere Überleben beträgt etwa 3,5 Jahre, bei kombinierter Radiochemotherapie kann die Überlebenszeit auf 4 – 5 Jahre anwachsen. Auffallend längeres Überleben korreliert mit dem Allelverlust 1p/19q und beträgt über sieben Jahre; zusätzlich begünstigen junges Alter und weitreichende Exzision die Prognose (Cairncross et al. 2006).

1.4.3 Anaplastisches Oligoastrozytom

Anaplastische Oligoastrozytome sind seltene Tumore, die bei einem mittleren Alter von 44 Jahren verstärkt bei Männern auftreten (Miller et al. 2006) sowie in der Mehrheit im Frontallappen lokalisiert sind. Histopathologisch weisen sie anaplastische Kriterien, d.h. Zellpolymorphismen, erhöhte Zellzahl und Kapillarproliferation auf. Differentialdiagnostisch sollte man immer anaplastische Oligodendrogliome, anaplastische Astrozytome und Glioblastome in Betracht ziehen. Als Herausforderung stellt es sich, die astrozytäre Komponente zu identifizieren und herauszufinden, ob die Astrozyten reaktiv bzw. neoplastisch sind. Genetisch lassen sich 1p/19q – Verlust und TP 53 Mutationen nachweisen. Die Prognose bei anaplastischem Oligoastrozytom ist besser als bei Glioblastom WHO Grad IV. Das mediane Überleben beträgt 2,8 Jahre und die 5 – Jahresüberlebensrate liegt bei 36% bei Operation mit anschließender Radiotherapie (Shaw et al. 1994).

1.5 Klassifikation der Ependymome

Ependymome umfassen eine Gruppe von Neoplasien mit ependymalem Ursprung der Tumorzellen, die charakteristische Eigenschaften normaler Ependymzellen aufweisen können. Ependymome werden in klassisches Ependymom mit seinen Varianten, anaplastisches Ependymom, myxopapilläres Ependymom und Subependymom eingeteilt (Louis et al. 2008b).

1.5.1 Subependymom

Subependymome sind langsam wachsende, gutartige Neoplasien, die circa acht Prozent aller Ependymome ausmachen. Sie treten im mittleren Alter vorrangig bei Männern auf (m/w – Verhältnis 2,3:1). Mehrheitlich treten sie im IV. Ventrikel gefolgt vom lateralen Ventrikel auf (Fouladi et al. 2003). Klinisch fallen Subependymome durch Blockade des Ventrikelsystems und Zeichen von gesteigertem Hirndruck auf. Histopathologisch charakterisiert sich der Tumor durch Gruppen isomorpher Zellkerne, die von einer dichten fibrillären Matrix aus glialen Zellfortsätzen mit häufigen Zysten umgeben sind. Mitosen sind selten bzw. fehlen. Elektronenmikroskopisch zeigen Subependymome typische ependymale Eigenschaften wie Zilien und Mikrovilli, manchmal mit viel Intermediärfilament (Azzarelli et al. 1977). Subependymome besitzen eine gute Prognose, eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors ist gewöhnlich kurativ.

1.5.2 Myxopapilläres Ependymom

Myxopapilläre Ependymome sind langsam wachsende ependymale Tumore, die 9 – 13% aller Ependymome ausmachen. Sie treten verstärkt in der dritten Lebensdekade (Durchschnittsalter 36 Jahre), doppelt so häufig bei Männern auf (m/w – Verhältnis 2,2:1) (Cervoni et al. 1997). Myxopapilläre Ependymome treten fast ausschließlich im distalen Rückenmark (am Conus medullaris, der Cauda equina bzw. am Filum terminale) auf. Langanhaltende Rückenschmerzen stellen sich als Symptome dar. Histopathologisch zeigen myxopapilläre Ependymome kubisch – längliche Tumorzellen, die sich auf papilläre Weise an vaskularisiertem Stroma ausrichten. Die Proliferation ist gering (Prayson et al. 1997). Nach kompletter Resektion beträgt die Überlebensrate mehr als zehn Jahre (Sonneland et al. 1985). Bei inkompletter Resektion ist eine Streuung des Tumors nicht selten.

1.5.3 Klassisches Ependymom

Klassische Ependymome machen 2 – 9% aller neuroepithelialen Tumore aus, bei Kindern unter drei Jahren bis zu 30% (Duncan et al. 1995). Im Rückenmark sind Ependymome mit 50 – 60% die häufigsten Neoplasien. Infratentoriell gelegene Ependymome überwiegen bei Kindern (mittleres Alter 6,4 Jahre), im Rückenmark treten sie im Alter zwischen 30 und 40 Jahren auf. Prinzipiell können Ependymome überall im Ventrikelsystem entstehen, am häufigsten sind der IV. Ventrikel und das Rückenmark sowie Seitenventrikel und III. Ventrikel betroffen (Prayson et al. 1999). Klinische Symptome hängen von der Lokalisation ab. Infratentorielle Gliome können Kopfschmerzen, Hydrozephalus, Übelkeit sowie Schwindel verursachen. Supratentorielle Ependymome zeigen fokale neurologische Defekte, Krampfanfälle und Auswirkungen intrakranieller Hypertension (Duncan et al. 1995). Ependymome der hinteren Schädelgrube lassen sich in zwei klinisch, genetisch und molekular unterschiedliche Subgruppen unterscheiden. Die eine Tumorgruppe grenzt sich durch ein jüngeres Patientenalter, mehr lateral gelegene Tumore mit balanciertem Genom und durch erhöhte Rezidivneigung und Metastasierung mit kürzerem Überleben gegenüber der anderen Subgruppe ab (Witt et al. 2011). Histopathologisch findet man klassischerweise ein gut umschriebenes Gliom mit monomorphen Zellen, das rund – ovale Zellkerne mit geflecktem Chromatin („Salz und Pfeffer“) besitzt. Mitosen sind selten. Typisch ist außerdem Pseudorosettenbildung um Gefäße herum, die dadurch entstehen, dass Tumorzellen sich radiär um Blutgefäße mit ihren fibrillären Ausläufern ausrichten. Man kann WHO Grad II Ependymome noch in papilläre, klarzellige, zelluläre und tanzytische Ependymome unterscheiden (McLendon et al. 2007). Spinale Ependymome sind häufige Erscheinungsform bei Neurofibromatose Typ 2. Kinder (5 – Jahresüberlebensrate 50%) weisen durch das Auftreten von Tumoren in der hinteren Schädelgrube im Gegensatz zu Erwachsenen (5 – Jahresüberlebensrate 57%) mit spinaler Lokalisation eine schlechtere Prognose auf (Robertson et al. 1998; Kudo et al. 1990). Bei erhöhter Proliferation (Ki – 67 Expression größer 5%) ist das Überleben signifikant reduziert (Prayson et al. 1999).

1.5.4 Anaplastisches Ependymom

Anaplastische Ependymome sind maligne ependymale Gliome, die häufiger intrakranial, besonders in der hinteren Schädelgrube, als im Rückenmark auftreten (Central Brain Tumor Registry 2006). Histopathologisch weisen sie erhöhte Zelldichte, eine rege Mitoserate mit häufigen Gefäßproliferaten und Nekrosen sowie typische Pseudorosetten um Gefäße auf. Anaplastische Ependymome bleiben gut abgrenzbar, gelegentlich wachsen sie invasiv in benachbartes Gewebe ein (Kurt et al. 2006). Junges Alter (jünger als drei Jahre), anaplastische histologische Kennzeichen (hohe Mitoserate, Gefäßproliferate, Zellatypien), inkomplette Resektion sowie Metastasen im Liquor sind Anzeichen für eine schlechtere Prognose bei Kindern; bei intraspinalen Tumoren ist das Ausmaß der Resektion für das Überleben am signifikantesten (Jaing et al. 2004; Gomez et al. 2005).

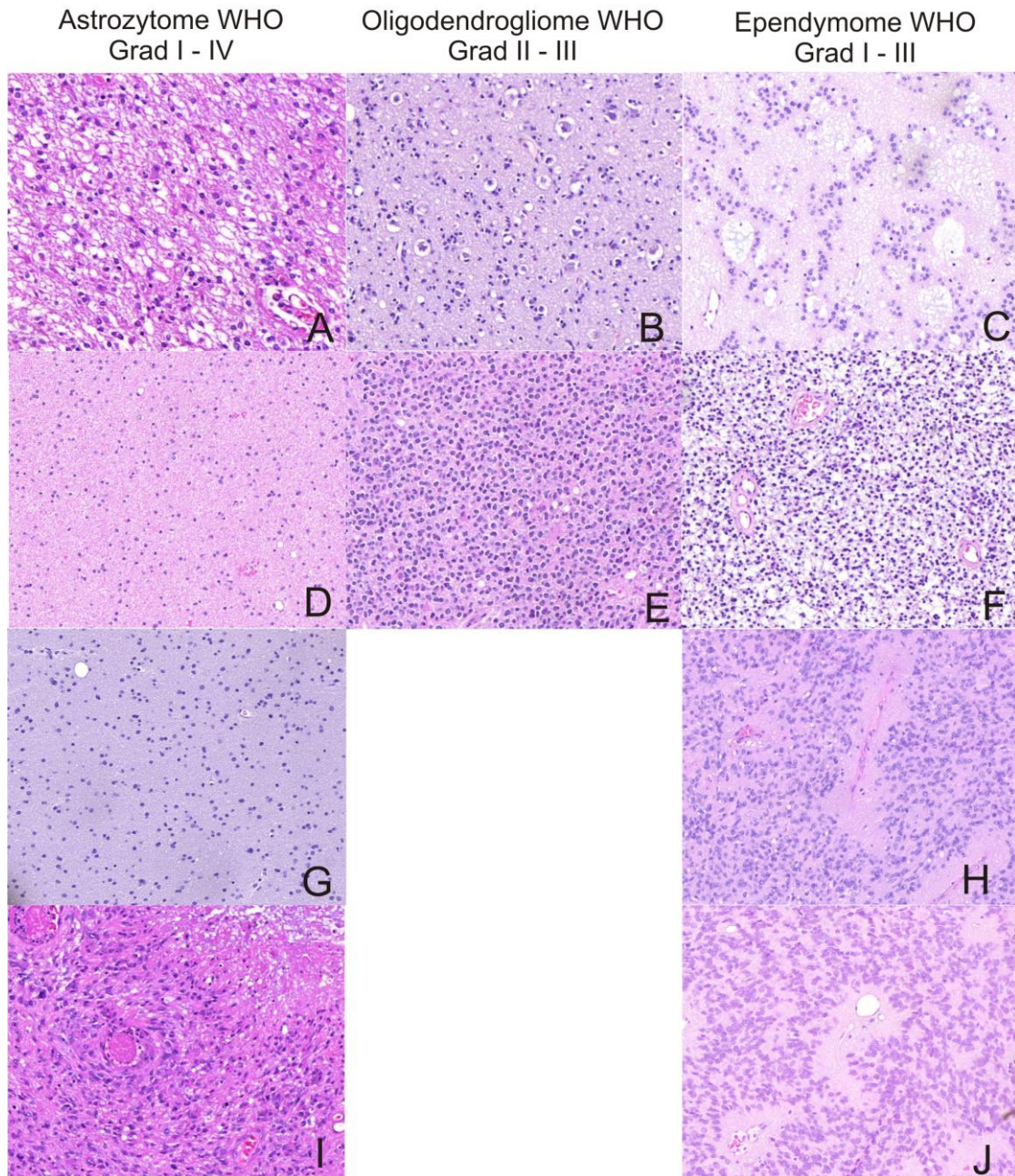


Abbildung 1: Hämatoxylin – Eosin – Färbung der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit bipolaren Zellen und Rosenthalfasern sowie Mikrozysten. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit runden Zellkernen mit perinukleärem Spalt (Honigwabenstruktur). C: Subependymom WHO Grad I gekennzeichnet durch Gruppen isomorpher Tumorzellen in der fibrillären Matrix. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit locker strukturiertem Stroma und fibrillären Astrozyten. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III gekennzeichnet durch oligodendroglialen Tumorzellen mit Polymorphismen und Anaplasiezeichen. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit kuboiden Tumorzellen in radiärer Ausrichtung um Gefäße. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit erhöhter Zellzahl und Kernanomalien. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit monomorphen Zellen und Pseudorosetten um Gefäße. I: Glioblastom WHO Grad IV mit Zellkernpolymorphismen, Gefäßproliferaten, Nekrosen und Pseudopalisaden. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit typischen Pseudorosetten, erhöhter Zellzahl und Kernanomalien. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

1.6 Antikörper

1.6.1 GFAP

Saures Gliafaserprotein (engl.: glial fibrillary acidic protein; GFAP) gehört zu den Intermediärfilamenten und wird von neuronalen Zellen des ZNS (Astrozyten, Ependymomen) exprimiert. Es wurde auch in Schwannzellen, enterischen Gliazellen, in der Hypophyse, im Knorpel, der Iris und den fettspeichernden Zellen der Leber (Leong et al. 2002) nachgewiesen. GFAP gehört zu der Typ III Subklasse der Intermediärfilamente und bildet sich auf dem Chromosom 17 (Lokus: 17q21) ab. Es besteht aus einer Amino – Kopfdomäne, einer zentralen Stabdomäne und einem Carboxyende. GFAP hat eine Molekularmasse von 50kD und steht im Gleichgewicht zwischen zusammengesetzten und zerlegten Filamenten. Wie bei anderen IF wird über Phosphorylierung an der Kopfdomäne die Anordnung von GFAP gemäß seiner Ladung reguliert (Inagaki et al. 1994). Die häufige Kopolymerisation von GFAP mit Vimentin unreifen bzw. reaktiven Gliazellen deutet auf eine gemeinsame Rolle im Aufbau der glialen Architektur hin (Inagaki et al. 1994). Bei der Verwendung monoklonaler Antikörper kann es zu Kreuzreaktionen mit Epitopen, die von anderen IF wie Neurofilament und Vimentin stammen, kommen. Immunhistochemische Färbung von GFAP hat sich bei der Identifizierung gutartiger Astrozyten und neoplastischer Zellen glialer Abstammung bewährt (Sillevis – Smitt et al. 1993). Tumore des Plexus choroideus und Ependymome exprimieren GFAP in Verbindung mit S100 und gelegentlich mit Zytokeratin und EMA. Im Fall vakuolärer klarzelliger Tumore im Retroperitoneum soll GFAP zur Identifizierung und Abgrenzung von Chordomen und Ependymomen gegenüber renalen und kolorektalen Karzinomen dienen (Coffin et al. 1993). Die histochemische Anwendung von GFAP in der Entwicklung des Nervensystems hat zum besseren Verständnis der Histogenese neuronalen Gewebes geführt, und seine Bestimmung in Neoplasien hat die Rolle von Astrozyten in diesen Prozessen besser verdeutlicht. Acht verschiedene Isoformen von GFAP wurden identifiziert, die von eigenständigen Subtypen der Astrozyten exprimiert werden. Hohes Alter,

neuronale Stammzellen, sowie der Beginn von Alzheimer werden mit diesen Isoformen in Verbindung gebracht (Middeldorp et al. 2011).

1.6.2 MAP – 2

Mikrotubuli – assoziiertes Protein (engl: microtubule – associated protein; MAP) gehört zur Familie Mikrotubuli bildender Proteine. MAP – 2 codiert auf dem Chromosom 2 (Lokus: 2q34 – q35). Es wird mit der Bildung des Mikrotubulusapparates und der Neurogenese assoziiert (NCBI Reference Sequence Database, 2010a). MAP – 2 dient außerdem zur Stabilisierung des Zytoskeletts durch Verknüpfung von Intermediärfilamenten mit Mikrotubuli. MAP – 2 Expression wird während der Entwicklung und Reifung des Gehirns präzise reguliert (Riederer et al. 1985). Im ausgewachsenen Gehirn werden sowohl Isoformen mit hohem (MAP2A – B) als auch mit niedrigem Molekulargewicht (MAP2 C – D) beobachtet. Die hochmolekularen Isoformen sind unerlässlich bei der Ausbildung der Dendriten bei Neuronen; Antikörper gegen sie dienen als Tumormarker für Neuronen. Den niedermolekularen Formen fehlt die zentrale Stelle der hochmolekularen Isoformen, dadurch ermitteln Antikörper, die gegen den N – bzw. C – Terminus von MAP – 2 gerichtet sind, alle MAP – 2 Isoformen (Tucker et al. 1988). Darüber hinaus werden die niedermolekularen Isoformen auch in Axonen und glialen Zellen gefunden. Die Stärke der Phosphorylierung von MAP – 2 ist mit der Kontrolle über die dynamische Instabilität und Abbau des Mikrotubulusapparates verbunden (Berling et al. 1994). Oligodendrogliale und astrozytäre Vorläuferzellen exprimieren vorübergehend eine alternativ gespleißte Isoform (MAP2E), was eher auf einen möglichen Ursprung neoplastischer glialer Zellen von unreifen Vorläuferzellen als von differenzierten Astrozyten bzw. Oligodendrozyten hindeutet (Shafit – Zagardo et al. 1999; Blümcke et al. 2001). MAP – 2 wird beim Menschen häufig in neoplastischen Zellen von Gliomen, im Besonderen bei Oligodendrogliomen, exprimiert (Blümcke et al. 2001). Auch in Medulloblastomen der D – 283 Zelllinie wurde MAP – 2 nachgewiesen (Vinores et al. 1994). In zentralen Neurozytomen und DNTs zeigte die klarzellige Komponente keine Immunreaktivität für MAP – 2, ausgenommen von neuropilen Inseln (Blümcke et al. 2001). In pleomorphen

Xanthoastrozytomen WHO Grad II sowie bei dem subependymalen Riesenzellastrozytom WHO Grad I wurde MAP – 2 in einigen wenigen Fällen nachgewiesen (Giannini et al. 2002; Lopes et al. 1996).

1.6.3 NOGO – A

NOGO – A (engl: Neurite outgrowth inhibitor) und seine Spleißvarianten NOGO – B und NOGO – C gehören zur Familie der Retikulonproteine, die alle einen gemeinsamen C – Terminus von 200 Basenpaaren besitzen. Sie kodieren auf Chromosom 2 (Lokus: 2p16.3) (NCBI Reference Sequence Database 2010) und werden mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert. NOGO – A verhindert axonale Regeneration und Kompensation nach Läsionen im ZNS. Antikörper gegen NOGO – A färben Myelinscheiden (innere und äußere Membran) im ZNS und Oligodendrozyten, allerdings keine Schwannzellen; eine Blockade von NOGO – A ermöglicht es eventuell, die neurale Integrität nach Rückenmarksschädigung oder neurodegenerativen Erkrankungen zu erhalten bzw. zu verbessern (Chen et al. 2000; GrandPre et al. 2000; Buss et al. 2005; Chong et al. 2012). NOGO – A wird in Oligodendrozyten bei demyelinisierenden Läsionen wie multipler Sklerose exprimiert (Kuhlmann et al. 2007). NOGO – A wird in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren prädominant exprimiert, in ependymalen Gliomen allerdings sehr gering. Er dient nicht als eindeutiger spezifischer Tumormarker für Oligodendrogliome und korreliert nicht signifikant mit einem 1p/19q – Verlust (Jung et al. 2011; Kuhlmann et al. 2008). Er wirkt außerdem negativ regulierend auf die Plastizität im Hippocampus (Schwab et al. 2010). Neueste Anzeichen deuten darauf hin, dass abweichende NOGO – A Expression ein erhöhtes Risiko für Schizophrenie darstellt (Willi et al. 2013). NOGO – B Expression wurde in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. Osteosarkomen, festgestellt (Oertle et al. 2003). Überexpression von NOGO – B und NOGO – C veranlasst Apoptose, und beide Varianten interagieren mit anderen apoptoseassoziierten Proteinen wie Bcl – 2, Bcl – xL und anderen (Chen et al. 2006). Die Funktion von NOGO – A in glialen Tumoren ist allerdings noch weitestgehend unbekannt.

1.6.4 OLIG – 2

OLIG – 2 (engl: Oligodendrocyte transcription factor) ist ein Helix – loop – helix Transkriptionsfaktor (engl: basic helix – loop – helix; BHLH), der auf dem Chromosom 21 (Lokus: 21q22.11) codiert. Er besteht aus 329 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 32kDa (Rowitch et al. 2004). OLIG – 2 wird in oligodendroglialen Tumoren, Astrozytomen und Oligoastrozytomen des ZNS exprimiert (Ligon et al. 2004). Das Protein hat wesentlichen Einfluss auf das Schicksal von Motoneuronen und Oligodendrozyten und entscheidet über neuronale Vorläuferzellen, ob diese proliferieren oder sich differenzieren (Gaber et al. 2011). Gesteuert wird dies über den Proliferationsstatus an zwei eigenständigen Motiven (dreifache Serin – Motive am Aminoterminus). Die Proliferationsfunktion von OLIG – 2 verhält sich gegensätzlich zum p53 Suppressorweg (Gaber et al. 2011). In multipotenten Vorläuferzellen des ZNS führt OLIG – 2 antineurale Funktionen (Verhinderung der Beendigung des Zellzyklus und somit Ausweitung des Reservoirs an neuronalen Vorläuferzellen), in Oligodendrozyten proneurale Funktionen (Beendigung des Zellzyklus, Spezifizierung und Differenzierung in Subtypen) aus. Im phosphorylierten Stadium unterstützt OLIG – 2 antineurale (d.h. proliferationsfördernde) Funktionen in Zellen von Gliomen (Sun et al. 2011). OLIG – 2 ist in einer chromosomalen Translokation t(14;21)(q11.2;q22) involviert, die mit akuter lymphatischer Leukämie assoziiert ist (NCBI Reference Sequence Database 2008; Wang J et al. 2000). Fälle von Überexpression von OLIG – 2 werden in einem weiten Spektrum verschiedener Tumorentitäten wie Leukämien, nicht – kleinzellige Bronchialkarzinomen, Melanomen, Mammakarzinomen und unkonventionellen Varianten des Glioblastoms (Gliosarkomen, kleinzelligen GBM, großzelligen GBM, granulärzelligen GBM etc.) beobachtet. OLIG – 2 wird auch mit entwicklungsbedingten Gehirnschäden bei Trisomie 21 in Verbindung gebracht (Chakrabarti et al. 2012). Bei akuten Gehirnverletzungen, z.B. Stichwunden, wurde eine starke Hochregulierung von OLIG – 2 festgestellt. Durch Antagonisierung von OLIG – 2 wurden vermehrt unreife Neuronen gebildet. Dies deutet darauf hin, dass OLIG – 2 ein Repressorgen bei der

Neurogenese in Verletzungen des Gehirns darstellt und eröffnet neue Ansätze, um endogene neuronale Reparaturen hervorzurufen (Buffo et al. 2005).

1.6.5 WT – 1

Wilms – Tumor – Protein ist ein Tumorsuppressorgen, das eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Urogenitalsystems spielt. WT – 1 wird in der fetalen Niere, dem Urogenitalsystem, der Milz, den auskleidenden Zellen des Zöloms einschließlich dem Mesothel exprimiert (Pritchard – Jones et al. 1990; Park et al. 1993). Es enthält ein Vier – Zinkfingermotiv am C – Terminus und eine Prolin/ Glutamin reiche DNA Bindungsdomäne am N – Terminus und besteht aus 80 Aminosäuren. Es codiert auf Chromosom 11 (Lokus: 11p13). WT – 1 ist bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit Wilms – Tumor (Nephroblastom) verändert (NCBI Reference Sequence Database, 2010b). Nephroblastome sind maligne, embryonale Nierentumore, die von Zellen des metanephrogenen Blastems stammen. Die Inzidenz liegt bei 1/10.000 Kindern und ein Gipfel ist im zweiten und dritten Lebensjahr zu verzeichnen. Es hat sowohl eine sporadische als auch eine hereditäre Ätiologie. WT – 1 bindet an regulatorische Einheiten der DNA und unterdrückt die Transkription von Wachstumsfaktoren. Bei Verlust der Allele kommt es zur unverminderten Expression der Wachstumsgene (Böcker et al. 2001). Darüber hinaus wurden bei Aniridie, Abnormalitäten im Genitalbereich und mentale Retardierung Deletionen von 11p13 beobachtet (Francke et al. 1979). Studien zeigten, dass charakteristische Unterschiede zwischen Mesotheliomen und Adenokarzinomen in der nukleären Anfärbung mit WT – 1 bestehen. In 75% der Mesotheliome wurde WT – 1 nachgewiesen, bei primären pulmonalen Adenokarzinomen fehlte die nukleäre Anfärbung, es bestand in 86% der Fälle eine zytoplasmatische Färbung (Foster et al. 2001). Infolgedessen zeigte sich, dass nukleäre Anfärbung spezifisch für Mesotheliome war und ein hilfreiches Argument zur Unterscheidung von Adenokarzinomen sein kann. WT – 1 Expression ließ sich beim serösen Ovarialkarzinom in 93% der Fälle nachweisen (Goldstein et al. 2001). Studien belegten WT – 1 Expression in Glioblastomen (Menssen et al. 2000) und niedergradigen Astrozytomen. Die Expression in neuroepithelialen Tumoren

stieg mit erhöhter Malignität an. WT – 1 wird eine wichtige Beteiligung bei der Tumorprogression und Genese von hirneigenen Gliomen beigemessen (Schittenhelm et al. 2009, Rushing et al. 2010). Es wurde außerdem WT – 1 Expression als prognostischer Wert nach Immuntherapie bei Glioblastomen festgestellt. Patienten mit Tumoren mit mittleren WT – 1 Expressionen hatten das längste progressionsfreie Gesamtüberleben (Chiba et al. 2010).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Im ZNS überschneiden sich häufig die morphologischen Eigenschaften von astrozytären Neoplasien mit reaktiver Gliose in oder um Hirnläsionen verschiedener Ätiologie. Besonders die Unterscheidung zwischen Astrogliose und niedriggradigen Astrozytomen oder dem Infiltrationsgebiet von höhergradigen Astrozytomen kann schwierig sein (Burger et al. 2002). So kommt es als Reaktion auf pathologische Veränderungen bei Tumoren und bei reaktiver Gliose zur Erhöhung der Zellzahl und Zellgröße; pleomorphe Zellkerne, die bei reaktiver Gliose beobachtet werden, können neoplastischen Tumorzellen ähneln (Burger et al. 2002; Schittenhelm et al. 2007).

Momentan ist noch kein Mittel verfügbar, um Gliazellen einer bestimmten Tumorentität sicher zuordnen zu können. IDH1 R132H beispielsweise unterscheiden nicht klar zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten. Dies ist allerdings von großer klinischer Relevanz, da z.B. Oligodendrogliome gegenüber Astrozytomen eine andere klinische Behandlung erfordern, sowie sich Verlauf und Rezidivverhalten grundsätzlich unterscheiden.

Die oben beschriebenen Antikörper haben inzwischen in die neuropathologische Routinediagnostik Einzug gefunden, da die Proteine, gegen die diese Antikörper gerichtet sind, alle von neuroepithelialen Tumoren auf verschiedene Weise exprimiert werden. Die einzelnen Antikörper wurden bereits teilweise auf hirneigenem Gewebe angewendet. Allerdings gibt es noch wenige verlässliche Studien bei Gliomen, in denen alle fünf Antikörper qualitativ (Intensität der Färbung) und quantitativ (Menge positiver Zellen) in den einzelnen Tumorentitäten detailliert verglichen werden.

Ziel der Arbeit soll es sein, das Expressionsverhalten aller fünf Antikörper bei Tumoren astrozytären, oligodendroglialen und ependymalen Ursprungs immunhistochemisch in denselben Tumoren zu beurteilen und zwischen den Tumorgruppen zu vergleichen. Darüber hinaus sollen mögliche signifikante Zusammenhänge der Antikörperexpressionen mit dem Patientenalter, dem Geschlecht, dem Tumorstatus (Primärtumor – Rezidivtumor), der Proliferation und dem Überleben statistisch festgestellt werden. Von Interesse ist es auch, ob es Unterschiede in der Lokalisation der Expression gibt, bzw. welcher Antikörper bei Ausfall eines bestimmten Antikörpers als Alternative in Frage kommt. Eine weitere wichtige Fragestellung besteht darin, welcher Antikörper in der Diagnostik welcher Tumorentität die besten Ergebnisse zu zeigen vermag. Anhand des Immunreaktiven Scores soll die diagnostische Relevanz der Antikörper auf den Prüfstand gestellt werden. In der pathologischen Routine ist es wichtig, bei noch unklarer Diagnose anhand starker/schwacher Färbung bzw. viel/wenig positiver Zellen sichere Hinweise und Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Tumorentität zu bekommen.

Schließlich sollen auch die jüngeren Antikörper OLIG – 2 und NOGO – A, über die bis jetzt noch äußerst wenige Daten zu Gliomen vorliegen, dahin untersucht werden, ob sie einen praktischen Mehrgewinn in der Diagnostik mit sich bringen.

Ziel ist es also, einen weiteren Schritt in Richtung der klareren Unterscheidung bei hirneigenen Gliomen durch die Immunhistochemie zu machen und die praktische Neuropathologie mit qualitativen und quantitativen Kriterien über die oben beschriebenen fünf Antikörper zu ergänzen.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl und Definition der Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorgewebsproben stammen von Patienten mit glialen Tumoren, die in den Jahren 1988 bis 2013 an der Universitätsklinik Tübingen in der neurochirurgischen Klinik operiert wurden; das Gewebe wurde anschließend zur neuropathologischen Begutachtung der Abteilung Neuropathologie der Universität Tübingen bereit gestellt und archiviert.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen hat der wissenschaftlichen Begutachtung der Paraffinproben für diese Studie zugestimmt (Projekt – Nummer: 022/2013BO2; 06.02.2013).

Insgesamt wurden 568 Tumorgewebsproben dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Tübingen entnommen. Bei ausreichend vorhandenem Gewebe wurde für die Tissue Microarrays von den 568 Paraffinblöcken eine doppelte Probe entnommen, so dass zusammen 963 Gewebestanden zur immunhistochemischen Verwendung bereit standen.

Beschreibung des Gesamtkollektives anhand der Tumorentitäten, Alter und Geschlecht

Das Gesamtkollektiv bestand aus 117 pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I (darunter ein anaplastisches pilozytisches Astrozytom WHO Grad III), 79 diffusen Astrozytomen WHO Grad II (darunter ein Astrozytom mit zum Teil protoplasmatischer, teilweiser fibrillärer Komponente WHO Grad II), 4 pilomyxoiden Astrozytomen WHO Grad II (darunter ein pilomyxoides Astrozytom mit Anaplasiezeichen WHO Grad III), 76 anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III, 148 Glioblastomen WHO Grad IV.

Von den Oligodendrogliomen wurden 16 klassische Oligodendrogliome WHO Grad II, 17 anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III und 3 anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III zur Beurteilung herangezogen.

Von der Tumorgruppe der Ependymome waren 23 myxopapilläre Ependymome WHO Grad I, 10 Subependymome WHO Grad I, 49 klassische Ependymome

WHO Grad II und 24 anaplastische Ependymome WHO Grad III im Gesamtkollektiv vertreten.

Es wurden außerdem zwei dysembryoblastische neuroepitheliale Tumore angefärbt, die jedoch keine weitere Betrachtung in der Studie finden.

Der Durchschnitt im Patientenalter lag bei pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I bei 21,84 Jahren (Min – Max: 1 – 78 Jahre). Die Männer waren im Durchschnitt mit 19,67 Jahren (Min – Max: 2 – 71 Jahre) etwas jünger als die Frauen mit durchschnittlich 24,35 Jahren (Min – Max: 1 – 78 Jahre). Das Verhältnis von Männern zu Frauen bei pilozytischen Astrozytomen in dieser Studie lag bei 1,15:1.

Das Durchschnittsalter bei diffusen Astrozytomen WHO Grad II lag bei 45,03 Jahren (Min – Max: 18 – 77 Jahre). Bei Männern traten sie früher auf, im Durchschnitt bei 43,68 Jahren (Min – Max: 18 – 70 Jahre); bei Frauen mit durchschnittlich 46,77 Jahren (Min – Max: 26 – 77 Jahre). Das Männer – Frauen Verhältnis lag bei 1,36:1.

Pilomyxoide Astrozytome WHO Grad II traten im Durchschnittsalter von 10,67 Jahren auf.

Das mediane Alter bei der Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III lag bei 47,32 Jahren (Min – Max: 10 – 77 Jahre). Männliche Patienten waren mit durchschnittlich 45,4 Jahren (Min – Max: 10 – 77 Jahre) etwas jünger als weibliche Patienten mit einem medianen Alter von 50,74 Jahren (Min – Max: 26 – 76 Jahre). Es lag eine Prädominanz für Männer gegenüber Frauen mit dem Verhältnis 1,78:1 vor.

Glioblastome wurden durchschnittlich im Alter von 59,7 Jahren diagnostiziert (Min – Max: 18 – 87 Jahre). Bei Männern traten sie mit dem Alter von 56,4 Jahren (Min – Max: 18 – 80 Jahre) gegenüber Frauen mit dem medianen Alter von 64,83 Jahren (Min – Max: 27 – 87 Jahre) deutlich früher auf. Das Verhältnis von Männern zu Frauen lag bei 1,55:1.

Myxopapilläre Ependymome WHO Grad I traten bei einem Durchschnittsalter von 36,61 Jahren (Min – Max: 17 – 75 Jahren) auf. Bei männlichen Patienten traten sie im Durchschnittsalter von 34,71 Jahren (Min – Max: 20 – 60 Jahre)

auf. Frauen erkrankten mit 42 Jahren (Min – Max: 17 – 75 Jahre) später. Das Verhältnis männlich zu weiblich mit 2,83:1 zeigte eine deutliche Präferenz für Männer.

Subependymome WHO Grad I manifestierten sich bei dem mittleren Alter von 54,7 Jahren (Min – Max: 44 – 75 Jahre). Männer waren bei Diagnosezeitpunkt klar älter (61,5 Jahre; Min – Max: 56 – 75 Jahre) als Frauen (44,5 Jahre; Min – Max: 44 – 45 Jahre). Das Verhältnis von Männern zu Frauen lag bei 1,5:1.

Klassische Ependymome wurden bei einem Durchschnittsalter von 44,17 Jahren (Min – Max: 2 – 82 Jahre) diagnostiziert. Männer erkrankten früher (mittleres Alter: 42,05 Jahre; Min – Max: 3 – 82 Jahre) als Frauen (mittleres Alter 46,81 Jahre; Min – Max: 2 – 79 Jahre). Die Geschlechtsverteilung ergab eine männliche Prädominanz (1,25:1).

Patienten mit anaplastischem Ependymom WHO Grad III waren im Durchschnitt 34,29 Jahre (Min – Max: 2 – 78 Jahre) alt. Bei Frauen wurde es früher diagnostiziert (Durchschnittsalter: 30,33 Jahre; Min – Max: 17 – 73 Jahre) als bei Männern (Durchschnittsalter: 36,67 Jahre; Min – Max: 2 – 78 Jahre).

Klassische Oligodendrogliome wurden im Durchschnittsalter von 42,13 Jahren (Min – Max: 27 – 61 Jahre) diagnostiziert. Frauen erkrankten mit 39,6 Jahren (Min – Max: 27 – 59 Jahre) früher als Männer mit 43,27 Jahren (Min – Max: 29 – 61 Jahre). Das Verhältnis von Männern zu Frauen lag bei 2,2:1.

Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III wurden im medianen Alter von 49,53 Jahren (Min – Max: 26 – 75 Jahre) diagnostiziert. Bei Männern wurde es im Alter von 45 Jahren (Min – Max: 26 – 75 Jahre), bei Frauen im mittleren Alter von 51,42 Jahren (Min – Max: 40 – 65 Jahre) diagnostiziert. Das Verhältnis von Männern zu Frauen lag bei 1:2,4.

Das mittlere Alter für anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III lag in dieser Studie bei 34,67 Jahren.

Beschreibung des Gesamtkollektives anhand des Primär – Rezidivstatus

Informationen über den Status der Gewebeproben wurde den Arztbriefen innerhalb des elektronischen Beauskunftungssystems der Pathologie Tübingen entnommen. Daten vor dem 01.01.2000 waren nicht verfügbar, so dass eine Beschreibung erst ab diesem Datum möglich ist.

Das Primär – Rezidivverhältnis lag insgesamt bei 4,1:1; 12 Fälle konnten nicht zugeordnet werden (siehe Tabelle 1).

WHO Grad	Diagnose	Anzahl einfach	Primärtumore	Rezidivtumore	unbekannt
Insgesamt		563	443	108	12
astrozytäre Tumore		421	340	72	9
1	pilozytisches Astrozytom	116	94	19	3
2	pilomyxoides Astrozytom	3	2	1	0
	diffuses Astrozytom	78	63	9	6
3	anaplastisches Astrozytom	76	61	15	0
4	Glioblastom	148	120	28	0
oligodendrogliale Tumore		36	24	12	0
2	Oligodendrogliom	16	13	3	0
3	anaplastisches Oligodendrogliom	17	9	8	0
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	2	1	0
ependymale Tumore		106	79	24	3
1	Subependymom	10	8	2	0
	Myxopapilläres Ependymom	23	15	8	0
2	Ependymom	49	44	4	1
3	anaplastisches Ependymom	24	12	10	2

Tabelle 1: Anzahl der Primär – und Rezidivtumore nach Tumorentität.

Beschreibung des Gesamtkollektives anhand der Tumorlokalisation

In 87 Fällen des Gesamtkollektives war die Lokalisation nicht genau angegeben und konnte nicht bestimmt werden. Vom Rest waren 83 Tumore temporal, 73 intraspinal, 69 frontal, 69 multilokulär (d.h. mindestens an zwei verschiedenen Bereichen des Nervensystems gleichzeitig), 53 im Kleinhirn, 39 intraventrikulär, 22 an anderen Lokalisationen (z.B. Hippocampus, Mittelhirn, Pinealisloge etc.), 17 parietal, 13 occipital, 11 im Zwischenhirn, 9 zentral (Sulcus centralis), 11 präzentral, 7 am Nervus opticus und 5 insulär lokalisiert (siehe Abbildung 2).

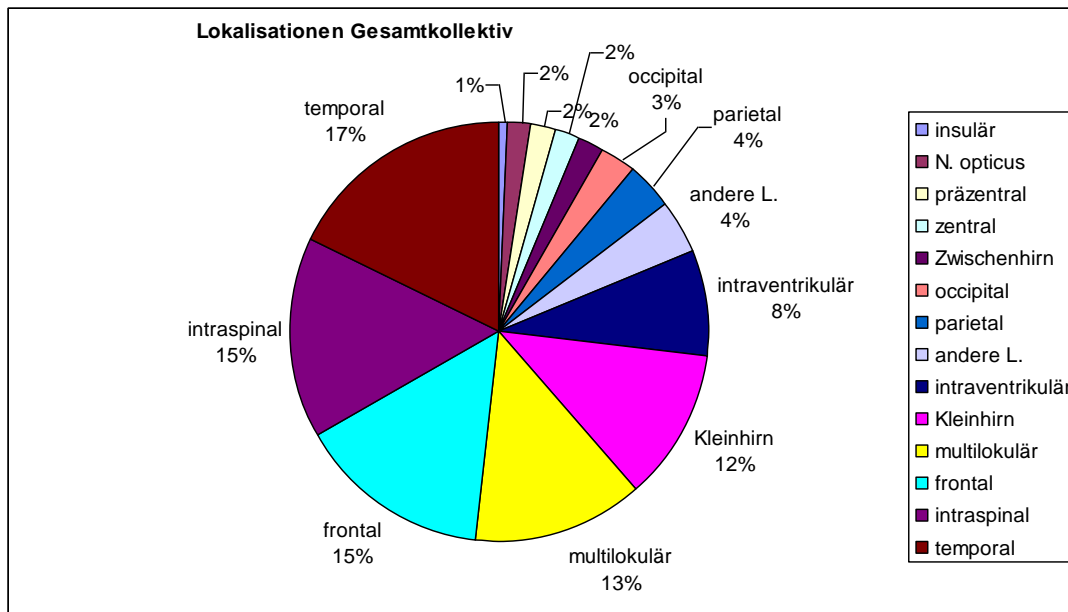


Abbildung 2: Lokalisationen des Gesamtkollektives von insgesamt 481 Tumoren.

2.2 Mikroskopische und histologische Beurteilung

Alle Tumorgewebsproben wurden von Neuropathologen des Universitätsklinikums Tübingen nach aktuellen WHO Kriterien (Louis et al. 2007) diagnostiziert. Einige Proben waren in das Deutsche Gliomverbundprojekt eingegliedert und zur referenzpathologischen Begutachtung in das Hirntumorreferenzzentrum nach Bonn geschickt worden. In dieser Studie wurden nur Tumore mit eindeutiger und übereinstimmender Diagnose zwischen dem Referenzzentrum und der Neuropathologie Tübingen verwendet.

2.3 Die Tissue Microarray Methode

Die Methodik des Tissue Microarrays wurde 1998 entwickelt (Kononen et al. 1998) und enthält einige Vorteile. So können bis zu 1000 zylindrische Gewebebiopsien von verschiedenen Tumoren auf einen einzigen Microarray, abhängig von dessen Größe, aufgebracht werden. Schnitte dieses Microarrays bieten Ziele für parallele Erkennung von DNA, RNA und Proteinen in situ in jeder Probe auf dem Array. Aufeinanderfolgende Schnitte erlauben die schnelle

Analyse hunderter molekularer Marker in derselben Zusammensetzung der Gewebeproben. Die einzelnen Biopsien bestehen gewöhnlich komplett aus Tumorgewebe und sind daher bei der Beurteilung meist homogen und zügig auszuwerten (Kononen et al. 1998).

2.4 Konstruktion des Tissue Microarrays

Insgesamt wurden drei Tissue Microarrays von pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I und pilomyxoiden Astrozytomen WHO Grad II angefertigt. Die anderen elf Microarrays wurden von anderen Doktoranden der Neuropathologie Tübingen in den Jahren 2008 bis 2012 konstruiert. Von den neu konstruierten Arrays enthielten zwei Paraffinblöcke jeweils 84 Stanzzyylinder, ein Block 81 Stanzzyylinder. In vielen Fällen wurden zwei Zylinder von demselben Tumor aufgetragen, damit ein umfangreicher Datensatz entsteht und Leerstanzen sowie mechanische Verluste vermieden werden. Als Kontrollgewebe wurden jeweils zwei Zylinder aus einem Paraffinblock des Normalhirngewebes sowie eines Paraffinblocks mit Mammakarzinom entnommen und zur Orientierung an der rechten Seite platziert.

Zur Auswahl geeigneter Donorblöcke wurden als erstes die entsprechenden HE – Färbungen mit dem Lichtmikroskop untersucht. Es wurden tumoröse Gebiete, die sich klar von nekrotischen, eingebluteten und verkalkten Arealen abgrenzten, ausgesucht und mit einem Stift markiert. Die markierten Stellen wurden im nächsten Schritt auf die deckungsgleichen Donorblöcke übertragen und dort ebenfalls markiert.

Die Tissue Microarrays wurden mit einer TMA – Maschine (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA; Model MTA – 1, Serial No: MTA1777) hergestellt. Es wurden dazu Löcher im gleichmäßigen Abstand von 2 mm in einen leeren Paraffinblock gestanzt und anschließend mit Tumorgewebe aus den Donorblöcken gefüllt. Es wurden Stanznadeln mit 0,6 mm Durchmesser ausgewählt und damit die Löcher gestanzt. Die exakte Justierung und Positionierung der Proben auf dem frischen Paraffinblock wurde anhand von Feststellschrauben, die auf den Mikrometer genau sind, durchgeführt. Um der Gefahr von Gewebeverlusten und Brüchen im Paraffin entgegenzuwirken,

wurde die Gesamtanzahl der Stanzzyylinder auf 84 (10 Reihen und 8 Spalten sowie 4 Kontrollen) begrenzt. Versiegelt wurden die Paraffinblöcke durch dreiminütiges Erwärmen auf 40°C mit anschließendem Flachdrücken durch einen Objektträger. Dies diente zur Vorbeugung eventueller Gewebsverluste beim Schneiden mit dem Mikrotom (Schulz 2010; Schwab 2011).

2.5 Herstellung der histologischen Präparate

Nach operativer Entnahme wurden die Tumore in 4% – igem Formalin in Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer fixiert (pH 7,4). Die Fixierung dient zur Konservierung, indem die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme und das Wachstum von Bakterien und Pilzen, die sonst die Verwesung einleiten, gestoppt wird. Darüber hinaus kommt es durch chemische Quervernetzungen zu Strukturverfestigungen der Proteine (Farmilo et al. 2003). Nach ausreichender Fixierung wurden die Proben in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 70%, 96%, 100%, 100%) überführt. Im Anschluss wurden die Gewebeproben in einem Gemisch aus 100% – igem Alkohol und Chloroform (1:1) sowie unverdünntem Chloroform zweimal entwässert. Dann wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden am Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Labor – u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen wurden. Vor einer weiteren Behandlung wurden die Objektträger bei 69°C im Wärmeschrank getrocknet (Schulz 2010; Schwab 2011).

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Theoretische Grundlagen

Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, in einem Gewebe bestimmte Proteine nachzuweisen, dadurch dass diese mit spezifischen Antikörpern reagieren. Möglich wird dies durch die Antigen – Antikörper – Reaktion, die anhand von ionischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und

Van – der – Waals – Kräften zustande kommt und aufrecht erhalten wird. Eine kovalente Bindung zwischen dem Antikörper und dem Epitop (spezifische Bindungsstelle auf dem Antigen) kommt nicht zustande (Boenisch 2003).

Zuerst binden Primärantikörper mit ihren Fab – Fragmenten an das Epitop der Zelle. Als nächstes bindet ein dazugegebener Sekundärantikörper an das freie Fc – Fragment des Primärantikörpers. Zur Verstärkung des Signals können nun noch multiple, ubiquitär verwendbare Tertiärantikörper eingesetzt werden, die an den Sekundärantikörper binden; dies ist dann sinnvoll, wenn Antigene mit wenigen Epitopen detektiert werden sollen. Durch die Kopplung von Sekundär – und Tertiärantikörper mit einem Enzym kommt es durch Substratumsatz zu einer Farbreaktion (Boenisch 2003).

Die spezielle Färbemethode in dieser Studie ist die Avidin – Biotin – Methode. Sie basiert auf einer starken Affinität von Streptavidin (stammt aus *Streptomyces avidinii*) sowie Avidin (Hühnereiweiß) zu Biotin (Vitamin B₇). Streptavidin und Avidin weisen beide vier Bindungsstellen für Biotin auf. Bei Avidin handelt es sich um ein Glykoprotein, welches bei physiologischem pH eine Affinität zu negativ geladenen Gewebeteilen besitzt. Der Färbevorgang beginnt mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der an das gewünschte Epitop bindet (z. B. GFAP). Im zweiten Schritt wird ein biotinmarkierter Sekundärantikörper dazugegeben. Nun wird der (Strept)Avidin – Biotin – Enzymkomplex oder enzymmarkiertes Streptavidin beigefügt, die an die biotinylierten Sekundärantikörper mit hoher Affinität ($K_m = 10^{-15}$ M) binden. Schlussendlich wird durch Zugabe des Farbstoffes 3,3' – Diaminobenzidin und anschließender Oxidation durch die Meerrettich – Peroxidase ein braunes, stark unlösliches Produkt hergestellt (Boenisch 2003; Schwab 2011).

2.6.2 Auswahl der Kontrollen

Als Positivkontrollen wurden bei GFAP, MAP – 2 und OLIG – 2 anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III ausgewählt. Für NOGO – A wurde Kleinhirngewebe, für WT – 1 Wilms – Tumor verwendet.

Endothelien eigneten sich bei GFAP, MAP – 2, NOGO – A und OLIG – 2 als interne Negativkontrollen.

2.6.3 Immunhistochemische Färbungen

2.6.3.1 Das optiView – Verfahren am Beispiel von GFAP

Der Objektträger wurde am Anfang auf 75°C aufgeheizt und 12 Minuten abwechselnd gewaschen, mit EZ Prep Volumen ausgeglichen und ein Coverslip zum Flüssigkeitsausgleich aufgetragen. Im zweiten Schritt wurde der Objektträger auf 76°C aufgeheizt, 8 Minuten inkubiert, gewaschen, mit einem Coverslip bedeckt und abschließend abgekühlt. Nun wurde der Cell Conditioner Nr. 1 aufgetragen, der Objektträger anschließend auf 100°C erwärmt. Nun folgte ein insgesamt 28 minütiges Auftragen von CC1 Puffer und Coverslip, unterbrochen von vierminütigem Inkubieren. Im Anschluss wird der Objektträger auf 37°C abgekühlt und gewaschen. Nun wurde ein Tropfen der Wasserstoffperoxidase aufgetragen und inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde der Primärantikörper erwärmt und ein Tropfen davon auf den Objektträger aufgetragen und acht Minuten mit Waschpuffer gewaschen und inkubiert. Jeweils ein Tropfen Optiview Universal Linker, ein Tropfen Optiview Multimer, ein Tropfen H₂O₂, ein Tropfen Optiview DAB, ein Tropfen Optiview Copper wurden der Reihe nach, von Waschphasen unterbrochen, aufgetragen. Am Ende wurde noch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin gemacht (Protokoll – Nr. 938: GFAP Ventana – Färbeautomat).

Die Färbungen für MAP – 2 und WT – 1 liefen in der Gesamtheit sehr ähnlich. Es wurde bei WT – 1 nach dem Aufwärmen auf 100°C 82 Minuten vorbehandelt und CC1 Puffer abwechselnd dazugegeben.

Bei der MAP – 2 Immunhistochemie wurde geringfügig kürzer im Vergleich zu GFAP vorbehandelt und inkubiert (siehe Tabelle 2).

2.6.3.2 Das iView – Verfahren am Beispiel von NOGO – A

Als erstes wurde der Objektträger auf 76°C erwärmt und 16 Minuten inkubiert, mit EZ Prep Volumen ausgeglichen, gewaschen und mit Coverslip übertragen. Nach dem Auftragen von CC1 Puffer wurde der Objektträger auf 95°C aufgeheizt und eine halbe Stunde inkubiert. Nun wurde bis 100°C erwärmt und

über eine Stunde abwechselnd inkubiert, CC1 Puffer und EZ Prep CC Volume Adjust dazugefügt.

Im Anschluss wurde das Gewebe auf 37°C abgekühlt, gewaschen und ein Tropfen Option 1 mit LCS aufgetragen und für 14 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Primärantikörper per Hand auf den Objektträger aufgetragen und für 32 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden nacheinander Blocker A und Blocker B aufgetragen und ein Coverslip aufgetragen. Anschließend wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper iView Biotin Ig aufgetragen, nach Waschen und Inkubieren nacheinander ein Tropfen iView SA – HRP, ein Tropfen iView DAB, iView H₂O₂ und ein Tropfen iView Copper. Zum Schluss wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt und LCS aufgetragen (Protokoll – Nr. 598: NOGO – A Ventana – Färbeautomat).

Die Immunfärbung von OLIG – 2 verlief auch mit dem iView – Verfahren, unterschied sich gegenüber NOGO – A durch eine kürzere Vorbehandlung mit CC2 Puffer und eine gering kürzere Inkubationszeit. Außerdem wurde der Objektträger nicht mit Option 1 behandelt (siehe Tabelle 2).

Antikörper gegen	GFAP	MAP - 2	NOGO - A	OLIG - 2	WT - 1
Spezifität	monoklonal	monoklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal
Konzentration	200 µg/ml	8,3 mg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Verdünnung	1:4000	1:2000	1:200	1:250	1:50
Inkubationszeit	8 Min	6 Min	32 Min	30 Min	30 Min
Sekundärantikörper	Anti - Hase IgG	Anti - Maus IgG	Anti - Hase IgG	Anti - Maus IgG	Anti - Hase IgG
Positivkontrolle	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III	Kleinhirn	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III	Wilms - Tumor
Negativkontrolle	Endothelien	Endothelien	Endothelien	Endothelien	Mamma - Karzinom
Protokoll/ Vorbehandlung	CC1 Puffer (60 Minuten Vorbehandlung)	CC 1 Puffer (44 Minuten Vorbehandlung)	CC1 Puffer (98 Minuten Vorbehandlung)	CC2 Puffer (38 Minuten Vorbehandlung)	CC1 Puffer (82 Minuten Vorbehandlung)

Tabelle 2: Details der Antikörperfärbungen von GFAP, MAP – 2, NOGO – A, OLIG – 2, WT – 1.

Nach Beendigung des automatischen Färbeproganges wurden die Objektträger unter fließendem Wasser mit Spülmittel vom Öl befreit und gereinigt. Anschließend wurden die Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 70%, 96%, 100%, 100%) und Xylol getaucht, damit dem Gewebe das Wasser

entzogen wurde. Schließlich wurden die Objektträger mit einem Deckglas und Eukitt eingedeckelt (Schwab 2011).

2.6.4 Materialien

2.6.4.1 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

- GFAP
Klon: GA – 5; Spezifität: monoklonaler Antikörper gegen glial fibrillary acidic protein, Inkubationszeit: 30 Minuten, Konzentration: 200µg/ml, Verdünnung: 1:4000, Positivkontrolle: Gehirn oder Astrozytom (Quelle: Thermo Fisher Scientific, Fremont CA, USA).
- MAP – 2
Klon: HM – 2, Spezifität: monoklonaler Antikörper gegen microtubule associated protein, Konzentration: 8,3 mg/ml, Verdünnung: 1:2000, Sekundärantikörper: Anti – Maus IgG, Positivkontrolle: Anaplastisches Oligodendrogliom (Quelle: Sigma – Aldrich, St. Louis MO, USA).
- NOGO – A
Klon: H – 300, Spezifität: polyklonaler Antikörper gegen Reticulon 4A, Konzentration: 200µg/ml, Verdünnung: 1:200, Sekundärantikörper: Anti – Hase IgG, Positivkontrolle: Kleinhirn (Quelle: Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA).
- OLIG – 2
Klon: AB9610, Spezifität: polyklonaler Antikörper gegen oligodendrocyte transcription factor 2, Verdünnung: 1:250, Positivkontrolle: Anaplastisches Oligodendrogliom (Quelle: Millipore Corporation, Temecula CA, USA).

- WT – 1
Klon: C – 19, Spezifität: polyklonaler Antikörper gegen Wilms' tumor nuclear protein, Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:50, Positivkontrolle: Wilms – Tumor (Quelle: Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA).

2.6.4.2 Färbesubstanzen

- Amplifier A: Vorverdünntes Kaninchen – Anti – Maus – IgG
- Amplifier B: Vorverdünntes Maus – Anti – Kaninchen – IgG
- Blocker A: Avidin (Hühnereiweiß)
- Blocker B: Freies Biotin
- CC1: Cell Conditioning Solution, enthält einen Tri – basierten Puffer EZ Prep CC Volume Adjust; Inhaltsstoffe: Gemisch aus 5 – Chlor – 2 – methyl – 2H – isothiazol – 3 – on und 2 – methyl – 2H – isothiazol – 3 – on (3:1) (Quelle: Roche Diagnostics GmbH)
- EZ PREP Solution: Gemisch aus 5 – Chlor – 2 – methyl – 2H – isothiazol – 3 – on und 2 – Methyl – 2H – isothiazol – 3 – on (Quelle: Roche Diagnostics Deutschland GmbH)
- Hämatoxylin (Quelle: ThermoShandon, Pittsburgh, USA)
- I – View Biotin Ig: Sekundärer biotinylierter Ig Antikörper, affinitätsgereinigtes Ziege – Anti – Maus IgG und IgM sowie Ziege – Anti – Kaninchen – IgG, jeweils <200µg/ml in einem Phosphatpuffer mit einem Konservierungsstoff
- I – View Copper: Kupfersulfat 5 g/l in Pufferlösung mit Konservierungsstoff
- I – View DAB: Diaminobenzidin, 2 g/l in stabilisierender Lösung mit Konservierungsstoff

- I – View H₂O₂: 0,04 bis 0,08% Wasserstoffperoxid in einer stabilisierenden Lösung
- I – View Inhibitor: 3% Wasserstoffperoxidlösung
- I – View SA – HRP: Konjugierte Meerrettich Peroxidase Lösung mit einem Proteinstabilisator und einem Konservierungsstoff
- LCS: Liquid Coverslip Solution
- Option 1: Gemisch aus Methanol und H₂O₂
- OptiView Universal Linker (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)
- OptiView Multimer (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)
- OptiView DAB (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)
- OptiView Copper (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)
- RB Reaction Buffer
- Wasserstoffperoxid

2.7 Lichtmikroskopische Begutachtung

Insgesamt 963 Tumorgewebsproben wurden mit einem Olympus – VANOX – AHBT3 Mikroskop begutachtet und in zweifacher und zehnfacher Vergrößerung quantitativ und qualitativ ausgewertet.

In die Bewertung gingen extrazelluläre Anfärbungen, Endothelien, Meningen, Nekrosen sowie verkalkte Areale, die nicht eindeutig auf das Zytoplasma sowie den Zellkern des Tumors zuzuordnen waren, nicht ein. Gefärbte Areale, die weniger als ein Prozent des Tumorgewebes ausmachten, wurden mit Intensität null und Menge null gewertet.

Die hier dargestellten Bilder wurden mit einem Mirax Scanner (Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Sie wurden mit dem Programm Mirax Viewer zugänglich gemacht und mit dem Grafikprogramm CorelDraw X3 Graphic bearbeitet.

Für die Intensität der Färbung aller fünf Antikörper wurden vier Grade verwendet. Score 0 bedeutet, dass keinerlei Anfärbung im gesamten Gewebezyylinder zu erkennen war. Score 1 steht für schwache Anfärbung, Score 2 für mittlere Färbung und Score 3 für starke Anfärbung des Tumorgewebes mit den Antikörpern (siehe Abbildung 3).

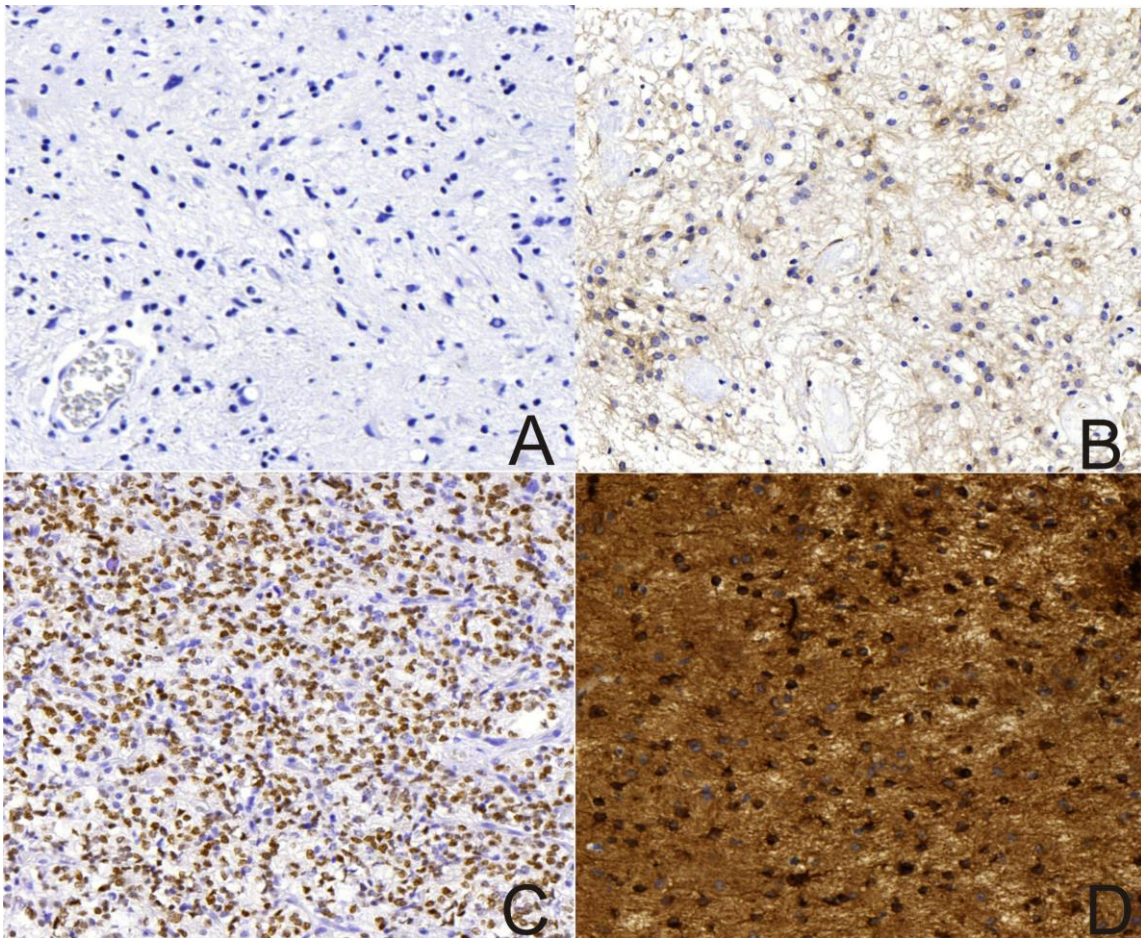


Abbildung 3: Intensitätsscores 0 bis 3. A: Score 0, keine Anfärbung der Zellen. B: Score 1, schwache zytoplasmatische Färbung am Beispiel von WT – 1. C: Score 2, mittlere nukleäre Färbung am Beispiel von OLIG – 2. D: Score 3, starke zytoplasmatische Anfärbung am Beispiel von NOGO – A. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

Die Menge der exprimierten Antikörper wurde mit fünf Graden bewertet. Score 0 wurde dann vergeben, wenn keine positiven Zellen vorhanden waren. Score 1 bei Positivität in weniger als 24% der Zellen, Score 2 bei AK – Positivität in 25% – 49% der Zellen, Score 3 in 50% – 74% der Zellen, Score 4 in über 75% aller Zellen (siehe Abbildung 4).

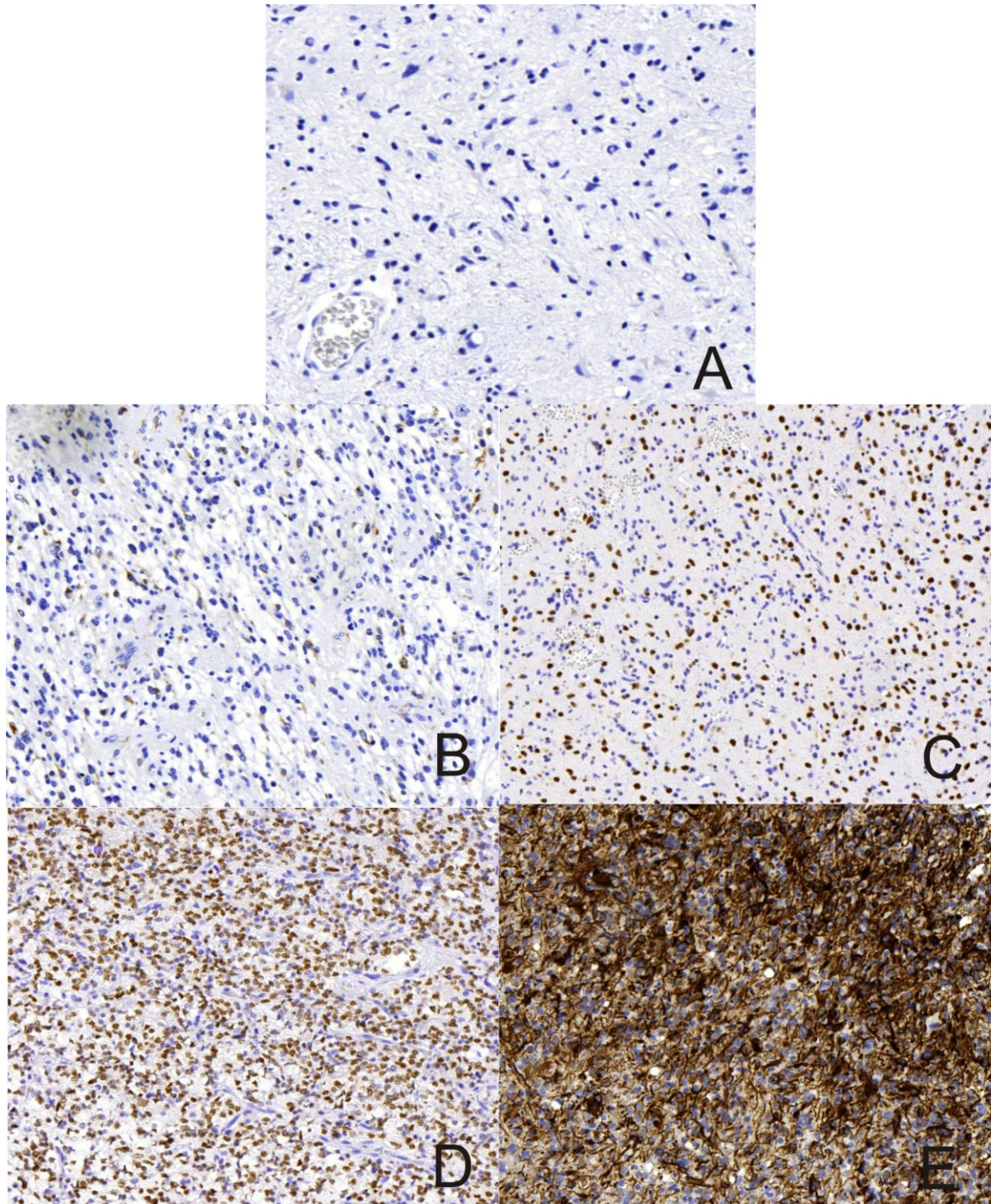


Abbildung 4: Mengenscores von 0 bis 4. A: Score 0, keine gefärbten Zellen. B: Score 1, weniger als 24% der Tumorzellen sind angefärbt (nukleär). C: Score 2, Anfärbung in 25% bis 49% der Fälle (nukleär). D: Score 3, Färbung in 50% bis 74% der Fälle (nukleär). E: Score 4: Färbung in mehr als 75% der Fälle (zytoplasmatisch). Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

2.8 Statistik

Für die statistischen Tests wurde das Programm JMP Version 6.0 (© 2005 SAS Institute Inc.; www.jmp.com) verwendet.

Eine univariante Varianzanalyse wurde bei allen Vergleichen der GFAP, MAP – 2, NOGO – A, OLIG – 2 und WT – 1 Expression der Tumorgruppen nach dem WHO Grad, Tumorstatus und dem Geschlecht verwendet. Bei Vergleichen mit der Proliferationsrate (MIB – 1 Expression) und dem Patientenalter wurde eine einfache logistische Regressionsanalyse herangezogen. Für Vergleiche der arithmetischen Mittel wurden die „oneway analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt von Student – t test herangezogen. Die Überlebensanalysen wurden nach der Methode von Kaplan – Meier durchgeführt und Gruppenvergleiche mittels Log – rank test durchgeführt.

Die Signifikanzwerte wurden folgendermaßen festgelegt: p – Werte $<0,0001$ wurden als hochsignifikant, p – Werte $<0,05$ als signifikant gewertet. Das Konfidenzintervall wurde bei 95% festgelegt. Der Pearson – Korrelationskoeffizient wurde der Likelihood Ratio in den Konfidenztafeln vorgezogen.

3 Ergebnisse

3.1 GFAP

Immunhistochemisch wird GFAP im Tumorgewebe zytoplasmatisch in normalen und neoplastischen Astrozyten exprimiert. In Gefäßendothelien, Neuronen, Oligodendroglia und Leptomeningen wurde, sofern keine Invasion des Tumors vorlag, keine Färbung beobachtet.

Insgesamt wurden 18 Objektträger (14 TMAs und 4 Flächenschnitte; insgesamt 766 Tumorgewebsproben) mit dem Antikörper angefärbt.

3.1.1 GFAP Intensität

Die Verteilung der zytoplasmatischen Intensität (0= negativ, 1= geringe, 2= mittlere, 3= starke Expression) war wie folgt: 18 negativ (2 %), 120 geringe (16%), 303 mittlere (40%) und 325 starke (42%) Expression (für die Verteilung innerhalb der einzelnen Tumorentitäten (siehe Tabelle 33 im Anhang).

Insgesamt wies das Gesamtkollektiv aus hirneigenen Tumoren glialen Ursprungs im Durchschnitt eine hohe Intensität für GFAP auf. Astrozytome imponierten mit deutlicher GFAP Intensität; besonders pilozytische und diffuse Astrozytome wiesen in der Mehrheit starke Intensitäten (Score 3) auf, während in den anderen Entitäten Score 3 nur in bis zu einem Drittel der Fälle beobachtet wurde (siehe Abbildung 5). Nur wenige Fälle (1,3%) waren negativ für GFAP.

Ependymome wiederum exprimierten GFAP durchschnittlich am schwächsten; mit zunehmendem WHO Grad nahm die Intensität geringfügig zu, zusätzlich stieg jedoch auch der Anteil negativer Fälle mit an.

Bei den Oligodendrogliomen ist bemerkenswert, dass kein negativer Fall für GFAP beobachtet werden konnte, wofür die geringe Fallzahl (N= 58) verantwortlich gemacht werden kann. Im Durchschnitt zeigte sich eine mittlere Intensität (Mittelwert 1,97).

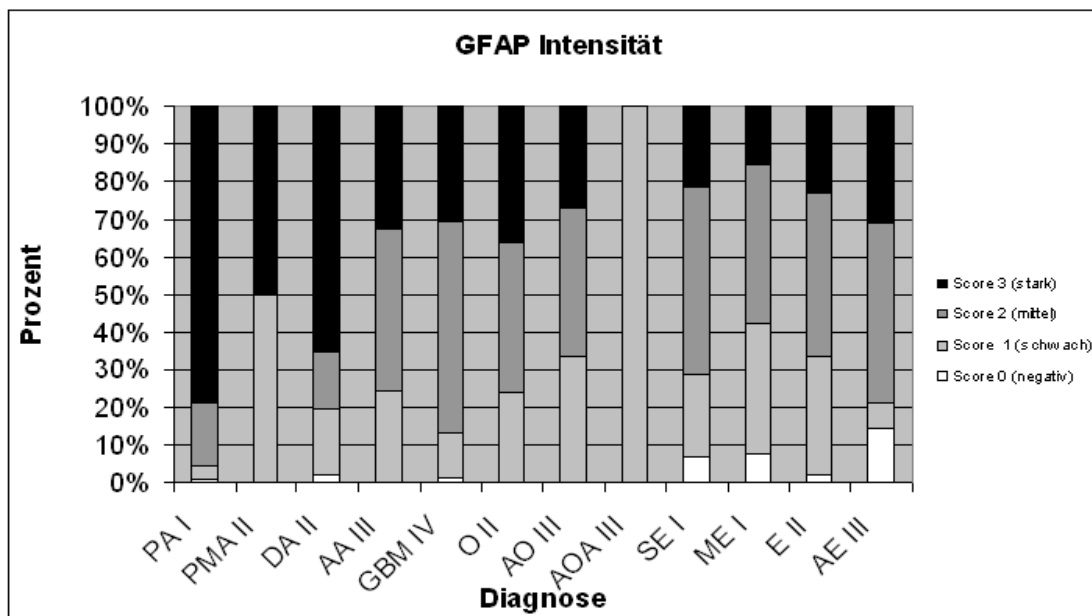


Abbildung 5: Balkendiagramm der GFAP Intensität, Score 0 – 3 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für GFAP Intensität

Es ließ sich zeigen, dass die Tumorgruppen der Astrozytome (pilozytische Astrozytome, pilomyxoide Astrozytome beide WHO Grad I, diffuse Astrozytome WHO Grad II und anaplastische Astrozytome WHO Grad III; p – Wert < 0,0001) und die Gruppe der Glioblastome (p – Wert = 0,0001) signifikant höhere Intensitätswerte als die Gruppe der Ependymome aufwiesen (siehe Tabelle 3). Die Glioblastome grenzten sich ebenfalls klar gegenüber niedriggradigeren Astrozytomen ab und zeigten eine hochsignifikant (p – Wert < 0,0001) niedrigere Expression. Oligodendrogliome grenzten sich sowohl gegenüber Glioblastomen (p – Wert = 0,0067) als auch Astrozytomen (p – Wert < 0,0001) mit einer signifikant geringeren Expression ab; sie ließen sich allerdings nicht von den Ependymomen unterscheiden (p – Wert = 0,1902).

GFAP Intensität p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Intensität
Glioblastom				2,157
Ependymom	0,0001			1,858
Astrozytom	<0,0001	<0,0001		2,547
Oligodendrogliom	0,0067	0,1902	<0,0001	2,018

Tabelle 3: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für GFAP Intensität. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen Oligodendrogliomen und Ependymomen; alle anderen Gruppen waren signifikant verschieden.

Vergleiche der GFAP Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“

Zur deutlicheren Unterscheidung zwischen Tumorpräparaten mit schwacher bzw. starker Intensität wurden die Gewebe mit Score eins und zwei als schwach exprimierend zusammengefasst. Schwache Intensität besaßen 441 (58%), starke jeweils 325 (42%) Gewebeproben (siehe Tabelle 4).

Die stärkste Intensität fand man bei niedriggradigen Astrozytomen WHO Grad I und II, die mehrheitlich starke GFAP Intensität besaßen.

GFAP Intensität schwach vs. stark				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			schwach	stark
	Insgesamt	766	441(57,6%)	325 (42,4%)
	astrozytäre Tumore	539	271 (50,3%)	268 (49,7%)
1	pilozytisches Astrozytom	178	38 (21,3%)	140 (78,7%)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	1 (50%)	1 (50%)
	diffuses Astrozytom	46	16 (34,8%)	30 (65,2%)
3	anaplastisches Astrozytom	58	39 (67,2%)	19 (32,8%)
4	Glioblastom	255	177 (69,4%)	78 (30,6%)
	oligodendrogliale Tumore	58	41 (70,7%)	17 (29,3%)
2	Oligodendrogliom	25	16 (64%)	9 (36%)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	22 (73,3%)	8 (26,7%)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	3 (100%)	0 (0%)
	ependymale Tumore	169	129 (76,3%)	40 (23,7%)
1	Subependymom	14	11 (78,6%)	3 (21,4%)
	Myxopapilläres Ependymom	26	22 (84,6%)	4 (15,4%)
2	Ependymom	87	67 (77%)	20 (23%)
3	anaplastisches Ependymom	42	29 (69%)	13 (31%)

Tabelle 4: GFAP Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“. Schwach: negative (Score 0), gering (Score 1) und mittel (Score 2) gefärbte Proben; Stark: kräftig (Score 3) gefärbte Proben. Astrozytome sind jeweils zur Hälfte, Oligodendrogliome und Ependymome in der Mehrheit schwach gefärbt.

GFAP Intensität nach WHO Grad

Innerhalb der WHO Grad I Tumore ließ sich die höchste Intensität bei den pilozytischen Astrozytomen zu 79%, bei Subependymomen mit 21% und bei myxopapillären Ependymomen in 15% nachweisen.

Das Vorliegen einer schwachen Intensität ließ zu hoher Wahrscheinlichkeit auf ein myxopapilläres Ependymom (84,6%) oder Subependymom (78,6%) schließen (siehe Tabelle 4).

Bei WHO Grad II Gliomen zeigten 65% der diffusen Astrozytome, die Hälfte der pilomyxoiden Astrozytome und geringere Mengen von Oligodendrogliomen und Ependymomen eine starke Intensität.

Im Fall einer schwach ausgeprägten Intensität sollte man zu 77% ein Ependymom, zu 64% ein Oligodendrogliom in Betracht ziehen.

WHO Grad III gliale Tumore wiesen in der Mehrheit eine schwache GFAP Intensität auf. Anaplastische Oligoastrozytome waren zu 100%, anaplastische Oligodendrogliome zu 73%, anaplastische Ependymome zu 69%, anaplastische Astrozytome zu 67% schwach angefärbt.

Die Tumore mit WHO Grad IV zeigten zu 69% eine schwache Intensität (siehe Tabelle 4).

3.1.2 GFAP Menge

Zusätzlich zur Färbeintensität erfolgte eine quantitative Auswertung der angefärbten Tumorzellen. Deren Verteilung (0= keine positiven Zellen, 1= 1 – 25%, 2= 26 – 50%, 3=51 – 75%, 4= 76 – 100% positive Zellen) im Gesamtkollektiv zeigte, dass ein Großteil des Tumorgewebes immunreaktiv für GFAP war. Die angefärbten Zellen verteilten sich wie folgt: Score null 18 (2%), Score eins 39 (5%), Score zwei 63 (8%), Score drei 78 (10%) und Score vier 568 (74%) der Fälle (für die Verteilung der einzelnen Tumorentitäten siehe Tabelle 34 im Anhang).

Tumore astrozytären Ursprungs wiesen in der absoluten Mehrheit (82,74%) große Mengen an GFAP auf, besonders die WHO Grade I bis III. Glioblastome exprimierten im Mittel (3,43) etwas geringere Mengen an GFAP.

Ependymales Tumorgewebe zeigte in den meisten Fällen (72%) Score drei und vier. Die Tumorgruppe der Oligodendrogliome besaß im statistischen Mittel die geringsten Mengen GFAP.

Insgesamt wurde GFAP in großen Mengen in den Tumorgeweben exprimiert, die geringsten Mengen fanden sich in oligodendroglialen Tumoren bzw. Mischgliomen mit oligodendroglialem Anteil (siehe Abbildung 6).

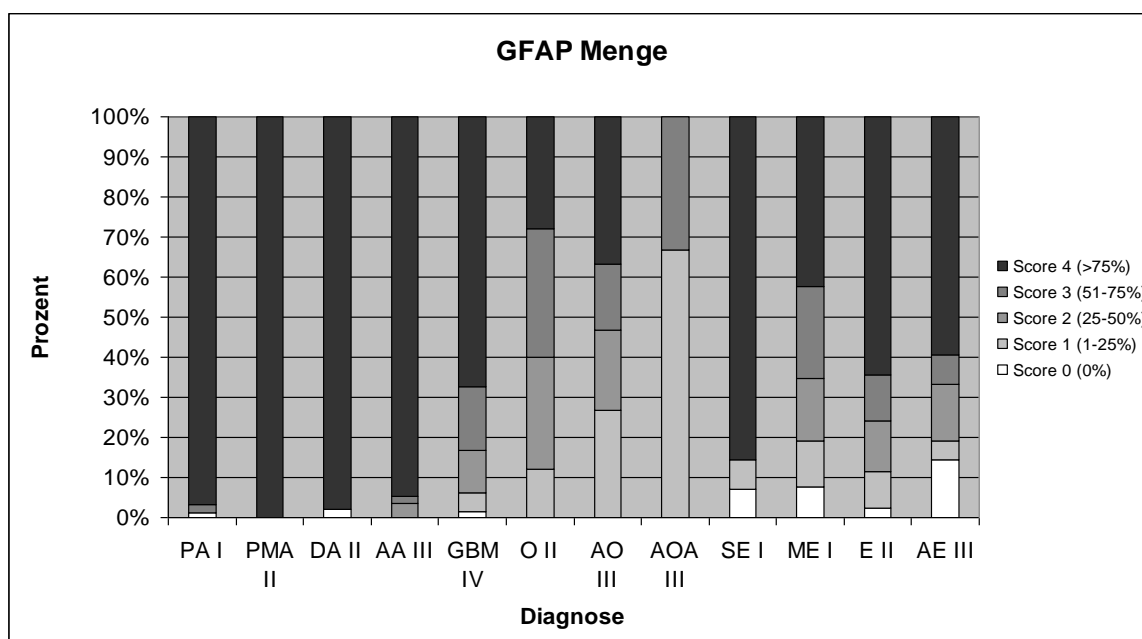


Abbildung 6: Balkendiagramm der GFAP Menge Score 0 – 4 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für GFAP Menge

Es wiesen die Astrozytome (p – Wert<0,0001) und Glioblastome (p – Wert= 0,0228) einen signifikant höheren, die Oligodendrogliome (p – Wert= 0,0005) einen signifikant niedrigeren Unterschied zu den Ependymomen auf. Glioblastome unterschieden sich hochsignifikant gegenüber Astrozytomen (p – Wert<0,0001) durch geringere GFAP Mengen. Oligodendrogliome wiesen zu Astrozytomen (p – Wert<0,0001) und Glioblastomen (p – Wert<0,0001) hochsignifikant geringere Mengen GFAP auf (siehe Tabelle 5).

GFAP Menge p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Menge
Glioblastom				3,427
Ependymom	0,0228			3,097
Astrozytom	<0,0001	<0,0001		3,927
Oligodendrogliom	<0,0001	0,0005	<0,0001	2,691

Tabelle 5: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für GFAP Menge. Alle Tumorgruppen waren signifikant unterschiedlich.

Vergleich der GFAP Menge „wenig“ vs. „viel“

Zur weiteren Differenzierung der Tumorproben in solche mit gering bzw. viel exprimierten Antikörpern wurden alle Proben, in denen weniger als 50% des Gewebes angefärbt wurde (d.h. Score 0 – 2), der Gruppe „wenig“ zugeteilt; bei Gewebe mit mehr als der Hälfte positive Zellen (d.h. Score 3 oder 4) in die Gruppe „viel“.

Wenige GFAP positive Zellen wurden in 120 (16%), große Mengen in 646 (84%) aller Tumorproben gefunden (siehe Tabelle 6).

Die meiste Antikörpermenge zeigten Astrozytome WHO Grad I – III. Glioblastome und Ependymome lagen im Mittelfeld. Oligodendrogliome zeigten die wenigsten positiven Zellen für GFAP.

GFAP Menge wenig vs. viel				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			wenig	viel
	Insgesamt	766	120 (15,67)	646 (84,33)
	astrozytäre Tumore	539	48 (8,9)	491 (91,1)
1	pilozytisches Astrozytom	178	2 (1,12)	176 (98,88)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	2 (100)
	diffuses Astrozytom	46	1 (2,17)	45 (97,83)
3	anaplastisches Astrozytom	58	2 (3,45)	56 (96,55)
4	Glioblastom	255	43 (16,86)	212 (83,14)
	oligodendrogliale Tumore	58	26 (44,8)	32 (55,2)
2	Oligodendrogliom	25	10 (40)	15 (60)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	14 (46,67)	16 (53,33)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	2 (66,67)	1 (33,33)
	ependymale Tumore	169	46 (27,2)	123 (72,8)
1	Subependymom	14	2 (14,29)	12 (85,71)
	Myxopapilläres Ependymom	26	9 (34,62)	17 (65,38)
2	Ependymom	87	21 (24,14)	66 (75,86)
3	anaplastisches Ependymom	42	14 (33,33)	28 (66,67)

Tabelle 6: GFAP Mengengruppen „wenig“ vs. „viel“. Wenig: 0% (Score 0), 1 – 24% (Score 1), 25 – 49% (Score 2) gefärbte Tumorzellen; Viel: 50 – 74% (Score 3) und 75 – 100% (Score 4) gefärbte Proben. Astrozytome, Ependymome und Oligodendrogliome exprimierten mehrheitlich viel GFAP.

GFAP Menge nach WHO Grad

Hirneigene Gliome des WHO Grad I besaßen in der Mehrheit viele (d.h. Score 3 oder 4) positive Tumorzellen für GFAP. Pilozytische Astrozytome wiesen zu 99%, Subependymome zu 86% und myxopapilläre Ependymome zu 65% der Fälle hohe GFAP Mengen auf.

Auch innerhalb des WHO Grad II wiesen die meisten glialen Tumore mehrheitlich viel GFAP auf: pilomyxoide Astrozytome mit 100%, diffuse Astrozytome zu 98%, Ependymome zu 76% und Oligodendrogliome zu 60%.

Größere Mengen an negativen Zellen bzw. Tumore mit „wenig“ GFAP sind somit ein Indiz für ein Oligodendrogliom.

Die Gruppe der WHO Grad III Gliome ist heterogener bezüglich der GFAP Expression: Zellen des anaplastischen Astrozytoms weisen zu 97%, des anaplastischen Ependymoms zu 67%, des anaplastischen Oligodendroglioms zu 53% und des anaplastischen Oligoastrozytoms zu 33% viel GFAP auf.

WHO Grad IV Tumore (d.h. Glioblastome) sind zu 83% der „viel“ – GFAP – Gruppe zuzuordnen und haben damit mehr Fälle mit „wenig“ GFAP als anaplastische Astrozytome.

3.1.3 GFAP Immunreaktiver Score

In der statistischen Auswertung des Immunreaktiven Scores (IRS, Intensität x Menge, Werte von 0 – 12) zeigten pilozytische Astrozytome (Mittelwert 10,9), diffuse Astrozytome (Mittelwert 9,7) und anaplastische Astrozytome (Mittelwert 8,2) die höchsten Mittelwerte für GFAP. Glioblastome (Mittelwert 7,6) wiesen einen höheren IRS auf als die Gruppe der Ependymome (Mittelwert 6,4), die mit steigendem WHO Grad höhere Immunreaktivität zeigte.

Am geringsten stellten sich Oligodendrogliome dar (Mittelwert 6,09; siehe Tabelle 7).

GFAP IRS						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Mittelwert IRS	MIB 1 Proliferationsrate	Tumorstatus	
				Mittelwert in %	p- Wert	p- Wert
Insgesamt		761	8,15	9,49	0,0007	0,1474
astrozytäre Tumore		537	8,94	11,47	<0,0001	0,5173
1	pilozytisches Astrozytom	178	10,89	1,95	0,3966	
2	diffuses Astrozytom	46	9,74	1,89	0,9299	
3	anaplastisches Astrozytom	58	8,22	8,68	0,6462	
4	Glioblastom	255	7,60	19,1	0,2753	0,5255
oligodendrogliale Tumore		55	6,09	6,70	0,3575	0,4908
2	Oligodendrogliom	25	6,4	4,23		
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	5,83	8,70		
ependymale Tumore		169	6,40	3,73	0,5631	0,0401
	Subependymom	14	7,21	1,83		0,0634
	Myxopapilläres Ependymom	26	5,11	2,03		0,1444
2	Ependymom	87	6,41	1,71		0,0165
3	anaplastisches Ependymom	42	6,90	9,83		0,3166

Tabelle 7: Mittelwerte GFAP Immunreaktiver Score sowie Vergleiche mit Proliferation (MIB 1 Expression) und Tumorstatus. Astrozytome, im Besonderen WHO Grad I und II, wiesen einen starken IRS auf, während Ependymome und Oligodendrogliome geringere Immunreaktivität besaßen. Steigende Proliferation führte zu signifikant höherer Immunreaktivität im Allgemeinen sowie bei Astrozytomen. Rezidivgewebe korrelierte signifikant mit erhöhtem IRS bei Ependymomen.

Vergleich der Tumorgruppen nach GFAP IRS

Es zeigten die Gruppen der Astrozytome (p – Wert<0,0001) und Glioblastome (p – Wert= 0,0085) einen signifikant höheren immunreaktiven Score gegenüber Ependymomen, während Oligodendrogliome (p – Wert<0,0001) eine hochsignifikant geringere Expression von GFAP nachwiesen. Glioblastome ließen sich hochsignifikant von der Gruppe der Astrozytome (p – Wert<0,0001) und Oligodendrogliome (p – Wert<0,0001) trennen. Astrozytome unterschieden sich hochsignifikant durch einen höheren IRS zu Oligodendrogliomen (p – Wert <0,0001; siehe Tabelle 8).

GFAP IRS p- Werte	Glioblastom	Ependymo	Astrozytom	Mittelwert
Glioblastom				7,604
Ependymom	0,0085			6,402
Astrozytom	<0,0001	<0,0001		10,15
Oligodendrogliom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	6,091

Tabelle 8: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für GFAP IRS. Alle Gruppen waren untereinander signifikant verschieden.

Korrelation nach Geschlecht, Tumorstatus, Alter und Proliferationsrate

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der GFAP Expression für die Geschlechter (p – Wert= 0,2318), weder im Gesamtkollektiv noch in den einzelnen Tumorgruppen (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Im Primär – bzw. Rezidivtumor ließ sich im Gesamtvergleich kein signifikanter Unterschied feststellen (p – Wert= 0,1474). Astrozytome und Oligodendrogliome ließen ebenfalls keine Unterschiede aufgrund des Tumorstatus erkennen (siehe Tabelle 7). Die Gruppe der Ependymome war heterogen, klassische Ependymome WHO Grad II wiesen einen signifikanten Unterschied bezüglich des Tumorstatus auf (p – Wert= 0,0165); Rezidivgewebe (Mittelwert 11; Standardabweichung 1,9) grenzte sich signifikant zu Primärgewebe (Mittelwert 5,9; Standardabweichung 3,4) durch erhöhte Expression ab. Dies hatte statistischen Einfluss auf die gesamte Tumorgruppe; auf die anderen ependymalen Tumore jeweils nicht.

Ein signifikanter Unterschied des IRS bestand beim Patientenalter (p – Wert= 0,0027), wobei der IRS mit zunehmendem Alter im Gesamtkollektiv abnahm. Die Astrozytome zeigten die gleichen signifikanten Unterschiede (p – Wert= 0,0004), die sich allerdings nicht anhand des WHO Grades begründen lassen (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Bei Oligodendrogliomen und Ependymomen hatte das Patientenalter keinen signifikanten Einfluss.

Die Proliferationsrate des Gesamtkollektives hatte signifikanten Einfluss auf den Immunreaktiven Score (p – Wert= 0,0007). Je höher die MIB 1 Rate, desto geringer war der GFAP IRS. Diese Tendenz blieb auch nach Stratifizierung der einzelnen Entitäten in der Tumorgruppe der Astrozytome signifikant (p – Wert<0,0001). Allerdings ließ sich dieser Zusammenhang nicht mit der WHO Gradierung begründen (siehe Tabelle 7). Auf die anderen Tumorentitäten hatte die Proliferation keine signifikanten Auswirkungen.

Lokalisationen

GFAP wurde am deutlichsten in den Tumoren intraspinal (Mittelwert 11,27), im Kleinhirn (Mittelwert 11,21) und intraventrikulär (Mittelwert 10,91) exprimiert. Am

Sulcus centralis (Mittelwert 6,08 sowie 7,56) und im Zwischenhirn (Mittelwert 8) jeweils am wenigsten (siehe Abbildung 25 im Anhang).

Überlebensvergleiche der Tumorentitäten

Bei der Überlebensanalyse nach Kaplan Meier von allen Gliomen mit mehr als 10 Patientenfällen zeigten sich Unterschiede zwischen Tumorproben, die einen geringeren bzw. stärkeren IRS als den jeweiligen Mittelwert der Tumorentität hatten. Bei myxopapillären Ependymomen (p – Wert= 0,0466; $N= 15$) und Oligodendrogliomen (p – Wert= 0,0423; $N= 12$) war ein überdurchschnittlicher GFAP IRS mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Zur weiteren Interpretation sollten allerdings Studien mit größeren Fallzahlen hinzugezogen werden.

Bei allen anderen Tumorentitäten ließ sich kein Einfluss der GFAP Expression auf das Überleben feststellen (siehe Abbildung 7).

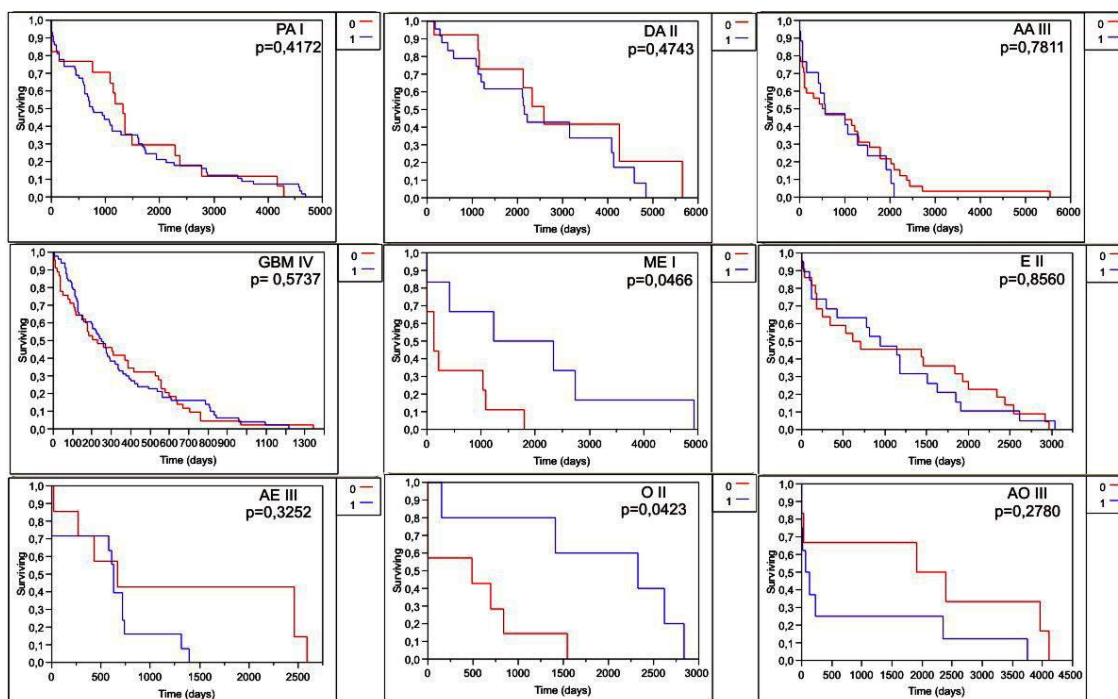


Abbildung 7: Kaplan – Meier Überlebenskurven verschiedener Tumorentitäten bei GFAP IRS unter dem Mittelwert („0“) bzw. Fälle mit größerem IRS als Mittelwert („1“) der Tumorentität. Tumorentitäten jeweils abgekürzt; Astrozytome WHO Grad I – IV (PA I, DA II, AA III und GBM IV) sowie Ependymome WHO Grad I – III (ME I, E II, AE III) und Oligodendrogliome WHO Grad II und III (O II, AO III). Es ließ sich nur bei ME I und O II ein signifikanter Unterschied feststellen. Überdurchschnittlicher GFAP IRS ging mit längerem Überleben einher.

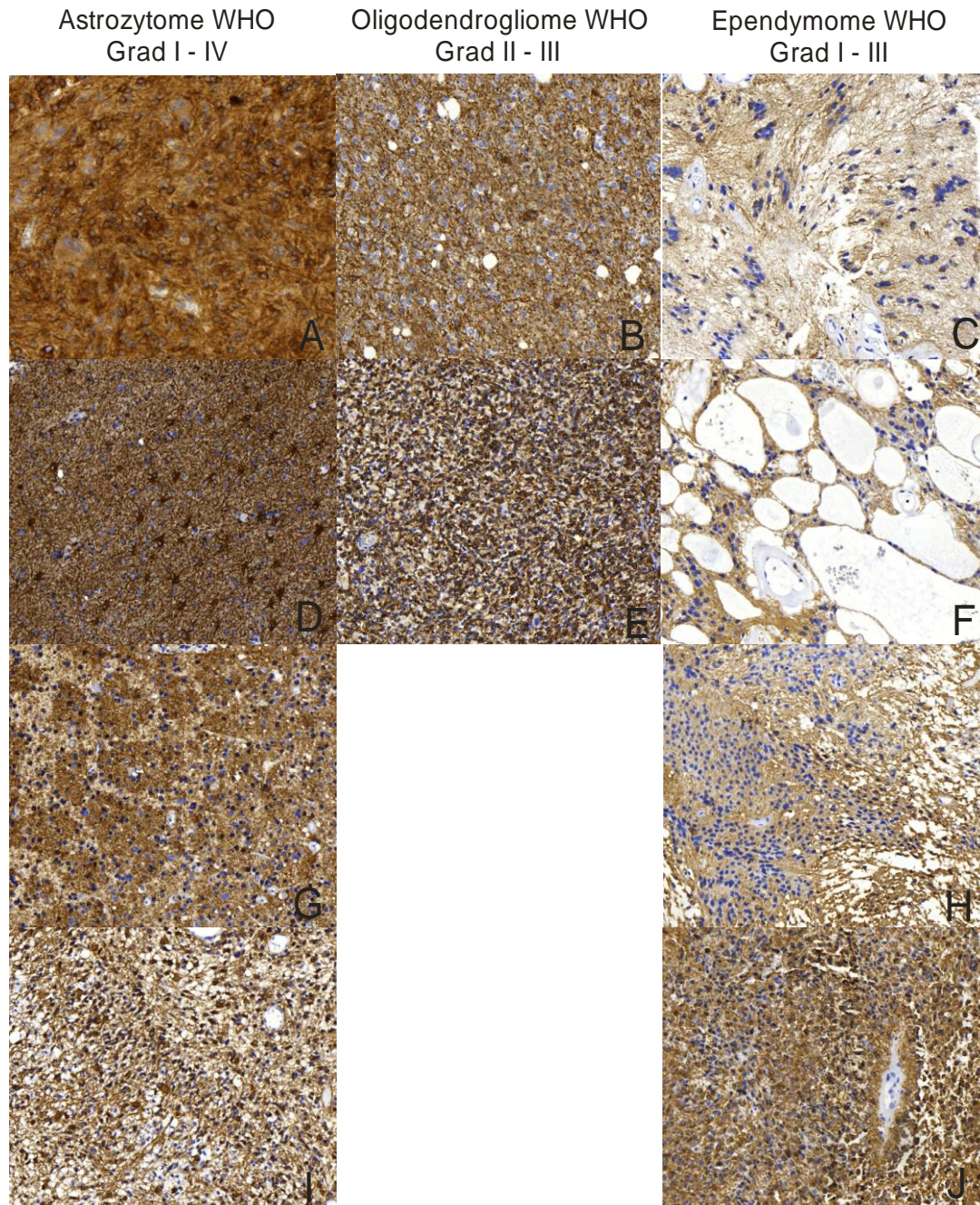


Abbildung 8: Immunhistochemische GFAP Expression der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit starker Expression. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit mittlerer Expression. C: Subependymom WHO Grad I mit mittlerer Expression. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit starker Expression. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit starker Expression. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit mittlerer Expression. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit starker Expression. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit mittlerer Expression. I: Glioblastom WHO Grad IV mit mäßig starker Expression. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit mäßig starker Expression. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

3.2 MAP – 2

Typisch ist die zytoplasmatische Expression in Neuronen in den Zellkörpern und Dendriten, sowie in Oligodendrogliazellen. Gelegentlich wurden auch intrazelluläre „dots“ und „rings“ ähnlich der bekannten EMA Immunreaktivität festgestellt, die kräftig positiv waren. Endothelien zeigten keine MAP 2 – Expression.

Insgesamt wurden 18 Objektträger (14 TMAs und 4 Flächenschnitte; insgesamt 745 Tumorgewebsproben) mit dem Antikörper angefärbt.

3.2.1 MAP – 2 Intensität

Bei Betrachtung der MAP 2 Intensität wiesen 175 Fälle Score 0 (negativ), 160 Score 1 (schwach), 287 Score 2 (mittel) und 123 Score 3 (stark) auf (siehe Tabelle 35 im Anhang).

Oligodendrogliome zeigten die stärksten Intensitäten (Mittelwert 1,86), wobei die höhergradigen oligodendroglialen Tumore stärkere Intensitäten besaßen.

Innerhalb der Tumorgruppe der Astrozytome (Mittelwert 1,76) besaßen die pilozytischen Astrozytome die kräftigsten Werte (Mittelwert 2,02).

Ependymome waren deutlich schwächer (Mittelwert 0,42) gefärbt, es ließ sich jedoch eine gewisse Zunahme mit steigendem WHO Grad feststellen (siehe Abbildung 9). Bemerkenswert ist, dass bei myxopapillären Ependymomen keine Fälle mit Score zwei und drei festgestellt werden konnten, wofür die geringe Fallzahl (N= 25) verantwortlich gemacht werden sollte.

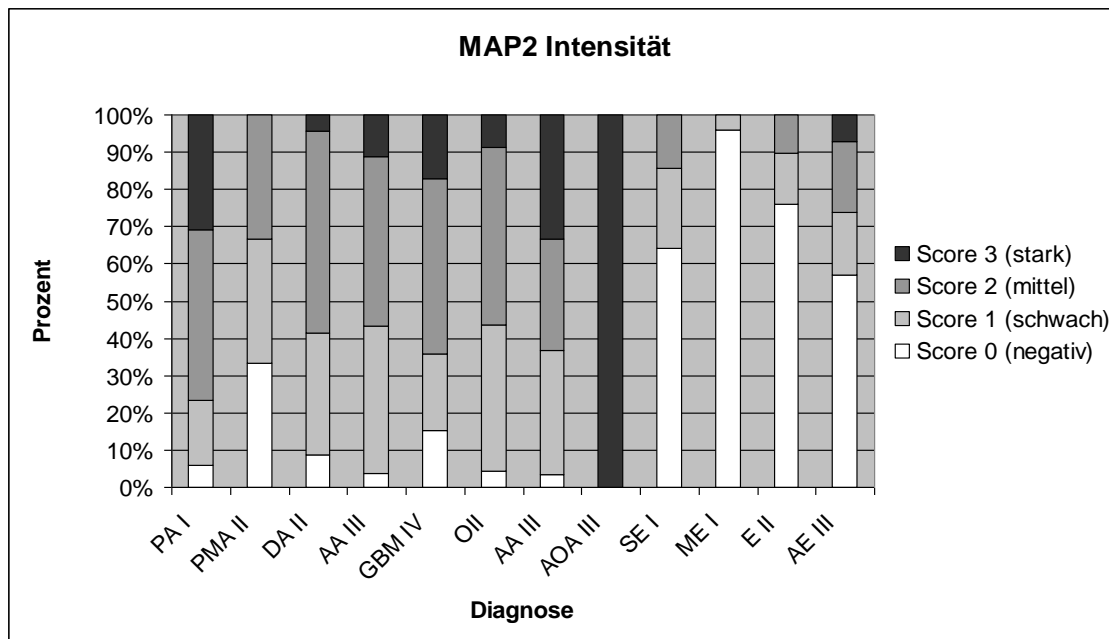


Abbildung 9: Balkendiagramm der MAP 2 Intensität, Score 0 – 3 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für MAP – 2 Intensität

Im statistischen Vergleich der Intensitäten zeigten die Gruppen der Oligodendrogliome (p – Wert<0,0001) und Glioblastome (p – Wert<0,0001) einen hochsignifikanten Unterschied durch stärkere Intensitäten gegenüber Ependymomen. Astrozytome ließen sich signifikant zu Ependymomen (p – Wert<0,0001) und Glioblastomen (p – Wert= 0,0035) durch kräftigere Intensitäten abgrenzen. Allerdings ließen sich Astrozytome nicht eindeutig von Oligodendrogliomen (p – Wert= 0,3104) unterscheiden. Glioblastome unterschieden sich wiederum signifikant von Oligodendrogliomen (p – Wert=0,0150) durch schwächere Expression (siehe Tabelle 9).

MAP2 Intensität p-	Glioblastom	Ependyomom	Astrozytom	Mittelwert Intensität
Glioblastom				1,663
Ependyomom	<0,0001			0,415
Astrozytom	0,0035	<0,0001		1,763
Oligodendrogliom	0,0150	<0,0001	0,3104	1,862

Tabelle 9: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für MAP 2 Intensität. Astrozytome zeigten keinen signifikanten Unterschied zu Oligodendrogliomen, alle anderen Tumorgruppen waren signifikant verschieden.

MAP – 2 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“

Zur Abgrenzung zwischen starker und schwacher Intensität wurden alle Fälle geringer und mittlerer Intensität (Score eins und zwei) der Gruppe „schwach“ zugeordnet. Es stellte sich heraus, dass 622 Gewebeprobe (83,5%) schwache und 123 (16,5%) starke Intensität zeigten.

Bei den Oligodendrogliomen hatten ein Viertel der Fälle (26,8%) starke Intensität, bei den astrozytären Gliomen ein Fünftel (19,9%).

Ependymome wiesen fast vollständig (98,1%) geringe MAP 2 Intensitäten auf (siehe Tabelle 10).

MAP 2 Intensität				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			schwach	stark
	Insgesamt	745	622 (83,49)	123 (16,51)
	astrozytäre Tumore	529	424 (80,15)	105 (19,85)
1	pilozytisches Astrozytom	172	119 (69,19)	53 (30,81)
2	pilomyxoides Astrozytom	3	3 (100)	0
	diffuses Astrozytom	46	44 (95,65)	2 (4,35)
3	anaplastisches Astrozytom	53	47 (88,68)	6 (11,32)
4	Glioblastom	255	211 (82,75)	44 (17,25)
	oligodendrogliale Tumore	56	41 (73,21)	15 (26,79)
2	Oligodendrogliom	23	21 (91,3)	2 (8,7)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	20 (66,67)	10 (33,33)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	3 (100)
	ependymale Tumore	160	157 (98,13)	3 (1,87)
1	Subependymom	14	14 (100)	0
	Myxopapilläres Ependymom	25	25 (100)	0
2	Ependymom	79	79 (100)	0
3	anaplastisches Ependymom	42	39 (92,86)	3 (7,14)

Tabelle 10: MAP 2 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“. Schwach: negative (Score 0), gering (Score 1) und mittel (Score 2) gefärbte Proben; Stark: kräftig (Score 3) gefärbte Proben. Alle Tumorentitäten, ausgenommen anaplastische Oligoastrozytome, wiesen in der Mehrheit schwache Intensitäten nach.

Tumorvergleiche nach WHO Grad

Beim Vorliegen eines WHO Grad I Glioms zeigten pilozytische Astrozytome am häufigsten starke MAP 2 Intensität (31%).

Ependymale WHO Grad I Tumore waren vollständig schwach gefärbt.

Gliale Tumore des WHO Grad II besaßen zu einem hohen Prozentsatz geringe MAP 2 Intensitäten, bei diffusen Astrozytomen ließ sich in 4% der Fälle starke Expression nachweisen.

Innerhalb des WHO Grad III wiesen anaplastische Oligoastrozytome vollständig, anaplastische Oligodendrogliome zu einem Drittel sowie anaplastische Astrozytome zu 11,3% starke Intensitäten auf.

Anaplastische Ependymome waren in deutlicher Mehrheit (93%) schwach gefärbt.

Glioblastome zeigten in 17% der Fälle stark gefärbte Zellkörper (siehe Tabelle 10).

3.2.2 MAP – 2 Menge

Das Gesamtkollektiv glialer Tumore enthielt 175 (23,49%) Fälle mit Score 0, 197 (26,44%) Fälle mit Score 1, 133 Fälle (17,85%) mit Score 2, 80 Fälle (10,74%) mit Score 3 und 160 (21,48%) Fälle mit Score 4.

Oligodendrogliale Tumore zeigten die höchste MAP 2 Menge (Mittelwert 2,5), gefolgt von Astrozytomen (Mittelwert 2,15). Diffuse (Mittelwert 2,8), pilozytische (Mittelwert 2,43) und anaplastische Astrozytome (Mittelwert 2,42) besaßen überdurchschnittliche Mengen an MAP 2.

Ependymome exprimierten nur geringe Mengen MAP 2 (Mittelwert 0,43; siehe Tabelle 36 im Anhang).

Insgesamt exprimierten weniger als die Hälfte der Zellen MAP 2 (Mittelwert 1,8).

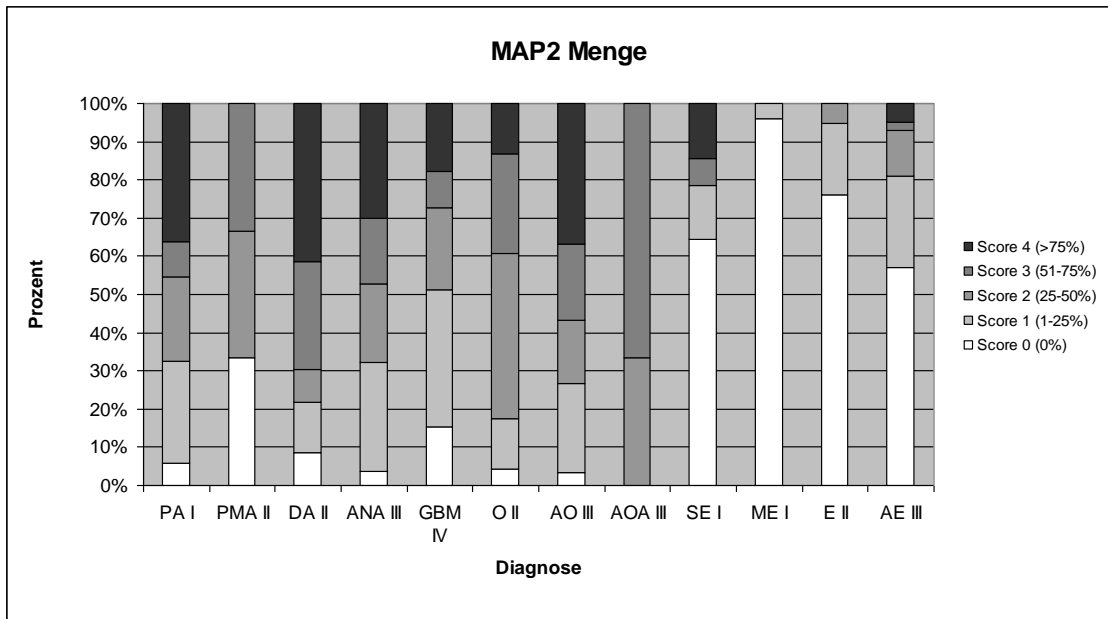


Abbildung 10: Balkendiagramm der MAP 2 Menge Score 0 – 4 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für MAP – 2 Menge

Hochsignifikante Unterschiede bei der MAP 2 Menge ließen sich zwischen den Oligodendrogliomen (p – Wert<0,0001), den Astrozytomen WHO Grad I – III (p – Wert<0,0001) und den Glioblastomen (p – Wert<0,0001) gegenüber der Gruppe der Ependymome, durch höhere Mengen feststellen. Glioblastome unterschieden sich zu Astrozytomen (p – Wert<0,0001) und Oligodendrogliomen (p – Wert=0,0019) durch geringere Mengen signifikant. Astrozytome waren von den Oligodendrogliomen (p – Wert=0,2037) nicht klar verschieden (siehe Tabelle 11).

MAP 2 Menge p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Menge
Glioblastom				1,784
Ependymom	<0,0001			0,3767
Astrozytom	<0,0001	<0,0001		2,498
Oligodendrogliom	0,0019	<0,0001	0,2037	2,490

Tabelle 11: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für MAP 2 Menge. Astrozytome ließen keinen signifikanten Unterschied zu Oligodendrogliomen erkennen. Alle anderen Tumorgruppen waren untereinander signifikant unterschiedlich.

Vergleich der MAP – 2 Mengen „wenig“ vs. „viel“

Bei der Unterscheidung zwischen geringen und großen Mengen MAP 2 zeigte sich, dass zwei Drittel der Tumorproben (505 Fälle) wenig und ein Drittel (240 Fälle) viel Antikörper exprimierte. Während astrozytäre Tumore mit 61,1% „wenig“ sowie 38,9% „viel“ Expression in etwa dem Durchschnitt entsprachen, zeigten Oligodendrogliome je zur Hälfte geringe bzw. große Mengen.

Ependymome zeigten in der klaren Mehrheit (96,3%) wenige positive Zellen für MAP 2 (siehe Tabelle 12).

MAP2 Menge wenig vs. viel				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			wenig	viel
Insgesamt		745	505 (67,79)	240 (32,21)
astrozytäre Tumore		529	323 (61,06)	206 (38,94)
1	pilozytisches Astrozytom	172	94 (54,65)	78 (45,35)
2	pilomyxoides Astrozytom	3	2 (66,67)	1 (33,33)
	diffuses Astrozytom	46	14 (30,43)	32 (69,57)
3	anaplastisches Astrozytom	53	28 (52,83)	25 (47,17)
4	Glioblastom	255	185 (72,55)	70 (27,45)
oligodendrogliale Tumore		56	28 (50)	28 (50)
2	Oligodendrogliom	23	14 (60,87)	9 (39,13)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	13 (43,33)	17 (56,67)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	2 (66,67)
ependymale Tumore		160	154 (96,25)	6 (3,75)
1	Subependymom	14	11 (78,57)	3 (21,43)
	Myxopapilläres Ependymom	25	25 (100)	0
2	Ependymom	79	79 (100)	0
3	anaplastisches Ependymom	42	39 (92,86)	3 (7,14)

Tabelle 12: MAP 2 Mengengruppen „wenig“ vs. „viel“. Wenig: 0% (Score 0), 1 – 24% (Score 1), 25 – 49% (Score 2) gefärbte Tumorzellen; Viel: 50 – 74% (Score 3) und 75 – 100% (Score 4) gefärbte Proben. Diffuse Astrozytome und anaplastische Oligoastrozytome exprimierten mehrheitlich viel MAP 2, alle anderen Tumorentitäten wiesen in der Mehrheit wenig MAP 2 Expression auf.

Tumorvergleiche nach WHO Grad

Innerhalb der WHO Grad I Gliome konnte bei den pilozytischen Astrozytomen zu 45,4% viel MAP 2 festgestellt werden.

Subependymom und myxopapilläres Ependymom exprimierten zu jeweils 78,6% bzw. 100% nur wenig MAP 2.

Im Falle eines glialen Tumors WHO Grad II mit viel MAP 2 Expression ist das diffuse Astrozytom zu 69,6% in Erwägung zu ziehen.

Oligodendrogliome wiesen zu 39,1% und pilomyxoide Astrozytome zu einem Drittel viel MAP 2 auf.

WHO Grad III Gliome stellten sich uneinheitlich dar: Anaplastische Oligoastrozytome exprimierten zu zwei Drittel, anaplastische Oligodendrogliome zu 56,7% MAP 2. Wenig MAP 2 zeigten anaplastische Astrozytome zu 52,8% und anaplastische Ependymome zu 92,9%.

Glioblastome exprimierten mehrheitlich (72,6%) wenig MAP 2 (siehe Tabelle 12).

3.2.3 MAP – 2 Immunreaktiver Score

Beim Vergleich des Immunreaktiven Scores imponierten Oligodendrogliome (Mittelwert 5,11), besonders anaplastische Oligodendrogliome (Mittelwert 5,93), mit überdurchschnittlicher MAP 2 Expression. Astrozytome (Mittelwert 4,48) wiesen mit steigendem WHO Grad abnehmende Immunreaktivität auf.

Die Tumorgruppe der Ependymome (Mittelwert 0,74) ließ nur in sehr geringem Maß MAP 2 Expression erkennen, Subependymome und anaplastische Ependymome zeigten die stärksten Werte (Mittelwert jeweils 1,5; siehe Tabelle 13).

MAP2 IRS						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Mittelwert IRS	MIB 1 Proliferationsrate	Tumorstatus	
				Mittelwert in %	p- Wert	p- Wert
	Insgesamt	739	3,72	9,49	0,0011	0,2040
	astrozytäre Tumore	526	4,48	11,47	0,9361	0,1460
1	pilozytisches Astrozytom	172	5,48	1,95		
2	diffuses Astrozytom	46	4,70	1,89		
3	anaplastisches Astrozytom	53	4,42	8,68		
4	Glioblastom	255	3,78	19,1	<0,0001	0,1017
	oligodendrogliale Tumore	53	5,11	6,70	0,4078	0,1624
2	Oligodendrogliom	23	4,04	4,23		
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	5,93	8,70		
	ependymale Tumore	160	0,74	3,73	<0,0001	0,0859
1	Subependymom	14	1,5	1,83	<0,0001	
	Myxopapilläres Ependymom	25	0,04	2,03	0,4314	
2	Ependymom	79	0,42	1,71	0,2328	
3	anaplastisches Ependymom	42	1,5	9,83	0,0182	

Tabelle 13: Mittelwerte MAP 2 Immunreaktiver Score sowie Vergleiche mit Proliferation (MIB1 Expression) und Tumorstatus. Oligodendroglione, am deutlichsten WHO Grad III Gliome, und niedriggradige Astrozytome besaßen die größte MAP 2 Immunreaktivität. Erhöhte MIB 1 Expression korrelierte signifikant mit erhöhtem IRS bei Glioblastomen und Ependymomen. Der Tumorstatus hatte auf den MAP 2 IRS keinen signifikanten Einfluss.

Vergleich der Tumorgruppen MAP – 2 IRS

Es konnte zwischen den Oligodendroglionen (p – Wert<0,0001), den Astrozytomen (p – Wert<0,0001) und den Glioblastomen (p – Wert<0,0001) durch höhere mittlere Immunreaktivität hochsignifikant zu den Ependymomen unterschieden werden.

Signifikanter Unterschied bestand ebenfalls zwischen den Glioblastomen und Astrozytomen (p – Wert= 0,0032), wobei Glioblastome niedrigere Werte zeigten (siehe Tabelle 14).

Glioblastome konnten zu den Oligodendroglionen (p – Wert=0,1181) nicht klar unterschieden werden. Astrozytome ließen sich von den Oligodendroglionen auch nicht signifikant trennen (p – Wert= 0,4394).

MAP 2 IRS p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert
Glioblastom				3,780
Ependymom	<0,0001			0,6424
Astrozytom	0,0032	<0,0001		5,064
Oligodendrogliom	0,1181	<0,0001	0,4394	5,113

Tabelle 14: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für MAP 2 IRS. Oligodendroglione sind gegenüber Glioblastomen und Astrozytomen nicht signifikant verschieden.

Korrelation nach Geschlecht, Tumorstatus, Alter und Proliferationsrate

Hinsichtlich des Primär- bzw. Rezidivstatus ließen sich weder im Gesamtkollektiv (p – Wert= 0,2040) noch in den jeweiligen Tumorgruppen signifikante Unterschiede erkennen (siehe Tabelle 13).

Das Geschlecht hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die MAP 2 Expression (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Signifikante Unterschiede traten beim Patientenalter auf. Bei der Gesamtheit der Tumorproben (p – Wert= 0,0027) zeigte sich, dass zunehmendes Alter mit einem abnehmenden IRS assoziiert ist. Dieser Sachverhalt stellte sich auch bei astrozytären Tumoren dar (p – Wert= 0,0004), setzte sich jedoch nicht in die einzelnen Entitäten fort. Oligodendrogliome und Ependymome zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Patientenalter (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Eine erhöhte Expression von MIB 1 hatte signifikante Auswirkungen auf den Immunreaktiven Score von MAP 2 beim Gesamtkollektiv (p – Wert= 0,0011) und ging mit dessen Erhöhung einher. Diese Korrelation blieb nach der Stratifizierung bei Glioblastomen (p – Wert<0,0001), ependymalen Tumoren (p – Wert<0,0001) wie Subependymomen (p – Wert<0,0001) hochsignifikant, bei höhergradigen Ependymomen WHO Grad III (p – Wert= 0,0182) ebenfalls signifikant. Niedriggradige Astrozytome und Oligodendrogliome ließen diesen Zusammenhang nicht erkennen (siehe Tabelle 13).

Lokalisationen

Höchste MAP 2 IRS Werte konnten im Zwischenhirn (Mittelwert 5,85), Kleinhirn (Mittelwert 5,6), occipital und zentral (Mittelwert jeweils 5,14) lokalisiert werden. In der Medulla spinalis (Mittelwert 1,42) und intraventrikulär (Mittelwert 1,14) wurde MAP 2 unterdurchschnittlich exprimiert (siehe Abbildung 25 im Anhang).

Überlebensvergleiche der Tumorentitäten

Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen über- bzw. unterdurchschnittlichem MAP 2 IRS bei allen glialen Tumoren feststellen (siehe Abbildung 11). Aufgrund geringer Fallzahlen bei Oligodendrogliomen WHO Grad II (N= 11) und Grad III (N= 14) sollten zur weiteren Diskussion Studien mit größerer Fallzahl einbezogen werden.

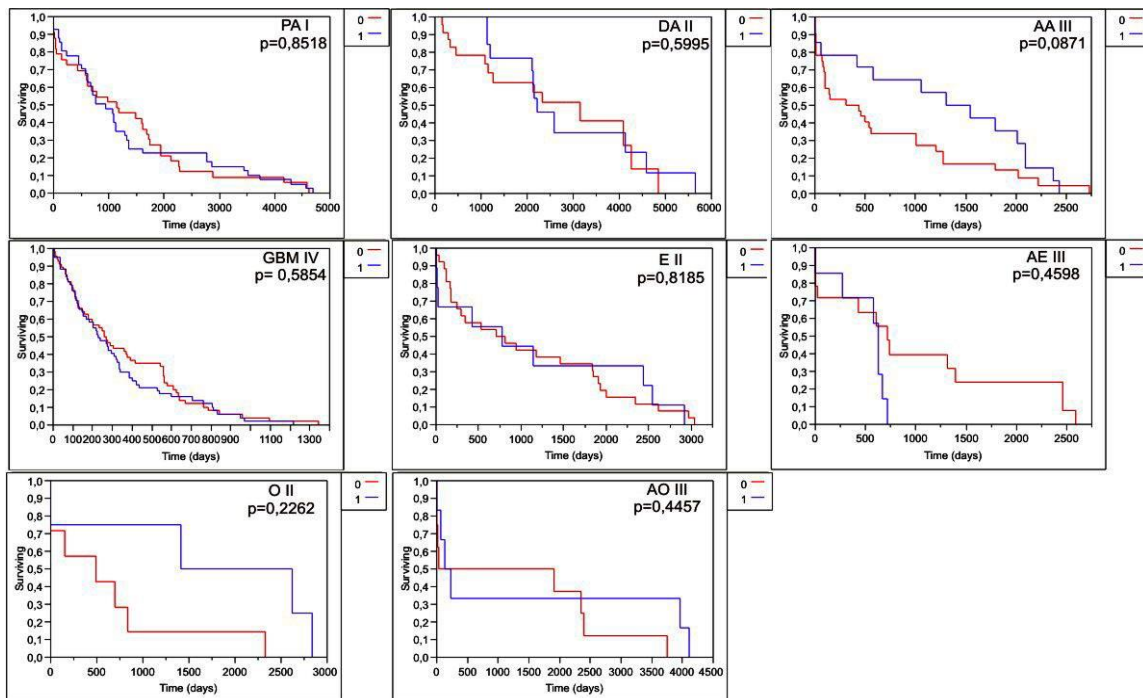


Abbildung 11: Kaplan – Meier Überlebenskurven verschiedener Tumorentitäten bei MAP 2 IRS unter dem Mittelwert („0“) bzw. Fälle mit größerem IRS als Mittelwert („1“) der Tumorentität. Tumorentitäten jeweils abgekürzt; Astrozytome WHO Grad I – IV (PA I, DA II, AA III und GBM IV) sowie Ependymome WHO Grad I – III (ME I, E II, AE III) und Oligodendrogliome WHO Grad II und III (O II, AO III). Die Expression von MAP 2 hatte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben.

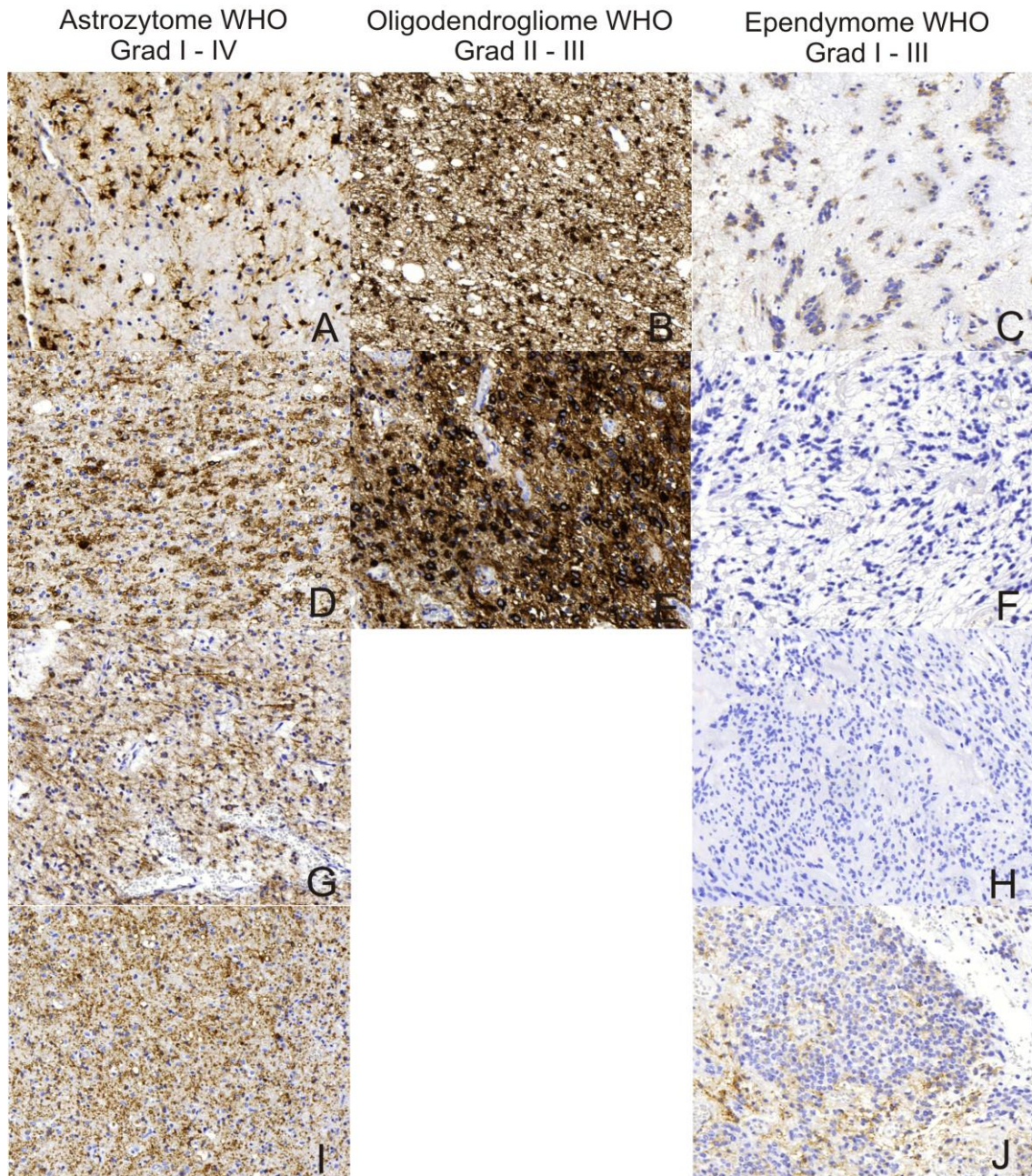


Abbildung 12: Immunhistochemische MAP 2 Expression der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit mittlerer Expression. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit mittlerer Expression. C: Subependymom WHO Grad I mit geringer Expression. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit mittlerer Expression. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit starker Expression. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit fehlender Expression. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit geringer Expression. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit fehlender Expression. I: Glioblastom WHO Grad IV mit geringer Expression. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit geringer Expression. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

3.3 NOGO A

Immunhistochemisch stellte sich der Antikörper in Oligodendrozyten, Astrozyten und dem Zytoplasma von Nervenzellen dar. Als interne Negativkontrolle waren Endothelien geeignet, die keine Expression des Antiköpers aufwiesen.

Insgesamt wurden 16 Objektträger (13 TMAs und 3 Flächenschnitte, insgesamt 739 Tumorgewebsproben) mit dem Antikörper angefärbt.

3.3.1 NOGO A Intensität

Beim quantitativen Vergleich der NOGO A Intensität wiesen 24 Proben (3,3%) Score 0, 202 Proben (27,3%) Score 1, 303 Proben (41%) Score 2 und 210 Proben (28,4%) Score 3 auf (siehe Tabelle 37 im Anhang).

Astrozytäre Tumore (Mittelwert 2,13), besonders pilozytische Astrozytome (Mittelwert 2,32) und Glioblastome (Mittelwert 2,17), zeichneten sich durch überdurchschnittlich hohe Intensitäten aus; Score 0 wurde nur in 1,2% der Fälle vergeben. Bemerkenswert ist, dass Astrozytome WHO Grad II und III keine negativen Fälle für NOGO A zeigten.

Oligodendrogliome (Mittelwert 1,73) wiesen mit steigendem WHO Grad anteilmäßig mehr Fälle mit einem Score 3, dementsprechend eine Abnahme von Score 1, auf (siehe Tabelle 37 im Anhang).

Ependymale Gliome (Mittelwert 1,46) besaßen unterdurchschnittlich schwache Intensitätswerte, allerdings nahm die Intensität bei klassischen Ependymomen WHO Grad II (Mittelwert 1,56) und anaplastischen Ependymomen (Mittelwert 1,62) gegenüber WHO Grad I Tumoren zu (siehe Abbildung 13).

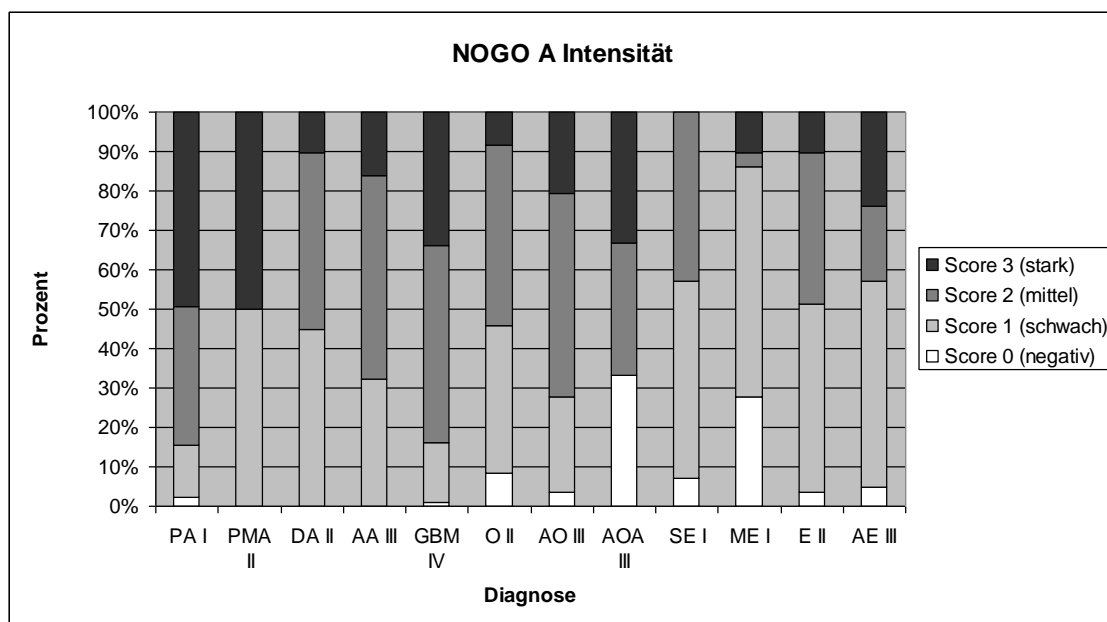


Abbildung 13: Balkendiagramm der NOGO A Intensität, Score 0 – 3 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für NOGO A Intensität

In der statistischen Auswertung der NOGO A Intensität zeigten sich zwischen den Tumorgruppen der Astrozytome (p – Wert<0,0001), der Oligodendrogliome (p – Wert=0,0168) und der Glioblastome (p – Wert=0,0011) signifikant höhere Intensitätswerte gegenüber den Ependymomen. Keinen signifikanten Unterschied konnte man zwischen Glioblastomen und Astrozytomen (p – Wert=0,0719) feststellen, allerdings wiesen Glioblastome signifikant stärkere Intensitäten als Oligodendrogliome (p – Wert= 0,0011) auf. Oligodendrogliome exprimierten eine signifikant schwächere NOGO A Intensität (p – Wert= 0,0082) als Astrozytome (siehe Tabelle 15).

NOGO A Intensität p-Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Intensität
Glioblastom				2,169
Ependymom	0,0011			1,465
Astrozytom	0,0719	<0,0001		2,106
Oligodendrogliom	0,0011	0,0168	0,0082	1,736

Tabelle 15: p – Werte von Tumorgruppenvergleiche für NOGO A Intensität. Glioblastome differenzierten sich nicht signifikant von Astrozytomen. Alle anderen Tumorgruppen waren untereinander signifikant verschieden.

Vergleich der NOGO A Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“

Die Gruppe mit schwachen NOGO A Intensitäten beinhaltete mit 529 Fällen (71,6%) gegenüber der Gruppe mit starken Intensitätswerten mit 210 Fällen (28,4%) die Mehrheit der Gewebeproben. Dies spiegelte sich in den Tumorgruppen wider, Ependymome wiesen zu 87,1%, Oligodendrogliome zu 83,9% und Astrozytome zu 65% niedrige NOGO A Intensitäten auf (siehe Tabelle 16).

NOGO A Intensität				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			schwach	stark
	Insgesamt	739	529 (71,58)	210 (28,42)
	astrozytäre Tumore	512	333 (65,04)	179 (34,96)
1	pilozytisches Astrozytom	174	88 (50,57)	86 (49,43)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	1 (50)	1 (50)
	diffuses Astrozytom	49	44 (89,8)	5 (10,2)
3	anaplastisches Astrozytom	56	47 (83,93)	9 (16,07)
4	Glioblastom	231	153 (66,23)	78 (33,77)
	oligodendrogliale Tumore	56	47 (83,93)	9 (16,07)
2	Oligodendrogliom	24	22 (91,67)	2 (8,33)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	29	23 (79,31)	6 (20,69)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	2 (66,67)	1 (33,33)
	ependymale Tumore	171	149 (87,13)	22 (12,87)
1	Subependymom	14	14 (100)	0
	Myxopapilläres Ependymom	29	26 (89,66)	3 (10,34)
2	Ependymom	86	77 (89,53)	9 (10,47)
3	anaplastisches Ependymom	42	32 (76,19)	10 (23,81)

Tabelle 16: NOGO A Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“. Schwach: negative (Score 0), gering (Score 1) und mittel (Score 2) gefärbte Proben; stark: kräftig (Score 3) gefärbte Proben. Alle Tumorentitäten wiesen schwache Expressionen auf.

NOGO A Intensität nach WHO Grad

Innerhalb des WHO Grad I wurden bei den pilozytischen Astrozytomen die meisten Fälle mit starker NOGO A Intensität festgestellt (49,4%).

Subependymome zeigten komplett, myxopapilläre Ependymome zu 89,7% eine schwache Expression von NOGO A.

Oligodendrogliome (91,7%) und Ependymome (89,5%) des WHO Grad II besaßen in der Mehrheit schwache Intensitätswerte.

WHO Grad III gliale Tumore besaßen in der Mehrzahl schwache Intensitäten: anaplastische Astrozytome zu 83,9%, anaplastische Oligodendrogliome zu 79,3% und anaplastische Ependymome zu 76,2%. Anaplastische

Oligoastrozytome wiesen in einem Drittel der Fälle starke Expression von NOGO A auf.

Glioblastome waren zu einem Drittel stark NOGO A positiv (siehe Tabelle 16).

3.3.2 NOGO A Menge

In der quantitativen Auswertung der NOGO A Menge wurden 24 Proben mit Score 0 (3,25%), 49 Proben mit Score 1 (6,63%), 63 Proben mit Score 2 (8,53), 51 Proben mit Score 3 (6,9) und 552 Proben mit Score 4 (74,7%) festgestellt.

Insgesamt waren mehr als die Hälfte aller Gewebeproben immunreaktiv für NOGO A (Mittelwert 3,43). Astrozytome exprimierten große Mengen an NOGO A (Mittelwert 3,59). Ependymome (Mittelwert 3,29) zeigten leicht unterdurchschnittliche NOGO A Mengen, wobei myxopapilläre Ependymome (Mittelwert 2,03) im Vergleich zu den restlichen ependymalen Tumorentitäten deutlich geringere Mengen exprimierten (siehe Tabelle 38 im Anhang).

Oligodendrogiales Tumorgewebe (Mittelwert 2,46) besaß die geringsten NOGO A Mengen (siehe Abbildung 14).

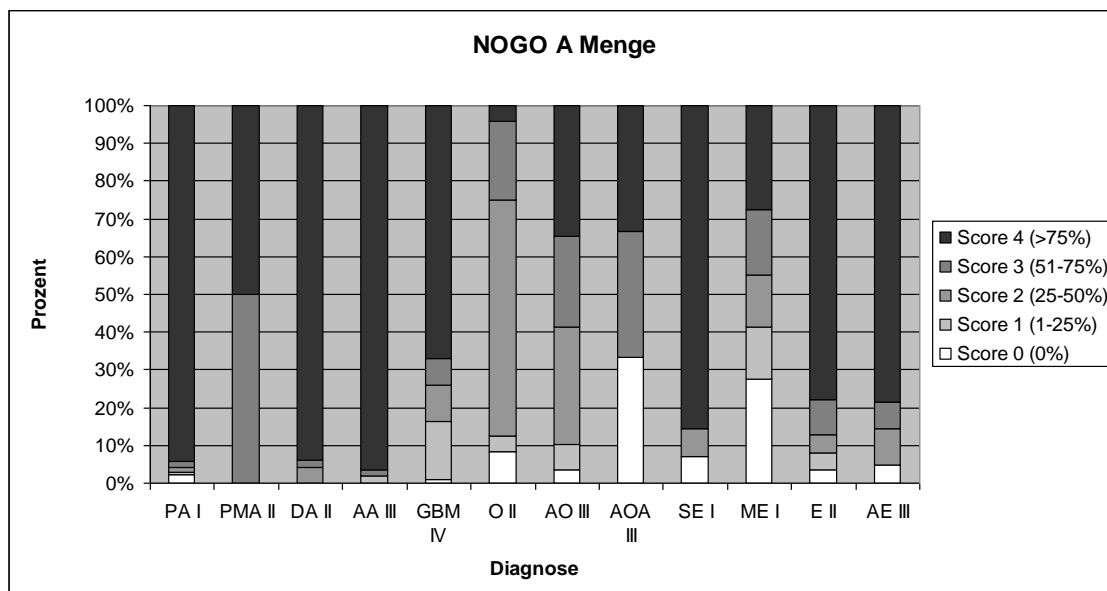


Abbildung 14: Balkendiagramm der NOGO A Menge. Score 0 – 4 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für NOGO A Menge

Es ergaben sich für die Astrozytome hochsignifikant größere NOGO A Mengen gegenüber den Ependymomen (p – Wert $<0,0001$), Glioblastomen (p – Wert $<0,0001$) und Oligodendrogliomen (p – Wert $<0,0001$). Glioblastome sind zu Oligodendrogliomen durch höhere Expression hochsignifikant unterschiedlich (p – Wert $<0,0001$).

Oligodendrogliome (p – Wert $<0,0001$) waren durch hochsignifikant geringere NOGO A Mengen zu den Ependymomen verschieden (siehe Tabelle 17).

Ependymome (p – Wert $<0,0001$; Standardabweichung 1,29) waren zu Glioblastomen (Standardabweichung 1,19) durch eine erhöhte Standardabweichung sowie durch das vermehrte Auftreten von Score – 0 – Fällen (8,19%) hochsignifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 17).

NOGO A Menge p-Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Menge
Glioblastom				3,238
Ependymom	$<0,0001$			3,261
Astrozytom	$<0,0001$	$<0,0001$		3,873
Oligodendrogliom	$<0,0001$	$<0,0001$	$<0,0001$	2,472

Tabelle 17: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für NOGO A Menge. Alle Gruppen waren hochsignifikant unterschiedlich.

Vergleich der NOGO A Gruppen „wenig“ vs. „viel“

In der dichotomen Aufteilung nach den NOGO A Mengen wies die Gruppe mit wenig Expression 18,4% der Fälle, die Gruppe mit viel Immunreaktivität 81,6% der Fälle auf. Astrozytäre Tumore exprimierten zu 86,3%, ependymale Tumore zu 79,5% in über der Hälfte ihres Gewebes NOGO A (d.h. „viel“).

Oligodendrogliales Tumorgewebe zeigte zu 55,4% in weniger als der Hälfte seiner Proben Expression von NOGO A (siehe Tabelle 18).

NOGO A Menge				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			wenig	viel
Insgesamt		739	136 (18,4)	603 (81,6)
astrozytäre Tumore		512	70 (13,67)	442 (86,33)
1	pilozytisches Astrozytom	174	7 (4,02)	167 (95,98)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	2 (100)
	diffuses Astrozytom	49	2 (4,08)	47 (95,92)
3	anaplastisches Astrozytom	56	1 (1,79)	55 (98,21)
4	Glioblastom	231	60 (25,97)	171 (74,03)
oligodendrogliale Tumore		56	31 (55,36)	25 (44,64)
2	Oligodendrogliom	24	18 (75)	6 (25)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	29	12 (41,38)	17 (58,62)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	2 (66,67)
ependymale Tumore		171	35 (20,47)	136 (79,53)
1	Subependymom	14	2 (14,29)	12 (85,71)
	Myxopapilläres Ependymom	29	16 (55,17)	13 (44,83)
2	Ependymom	86	11 (12,79)	75 (87,21)
3	anaplastisches Ependymom	42	6 (14,29)	36 (85,71)

Tabelle 18: NOGO A Mengengruppen „wenig“ vs. „viel“. Wenig: 0% (Score 0), 1 – 24% (Score 1), 25 – 49% (Score 2) gefärbte Tumorzellen; Viel: 50 – 74% (Score 3) und 75 – 100% (Score 4) gefärbte Proben. Im Allgemeinen wurde in der Mehrzahl, vor allem in Astrozytomen WHO Grad I – III, viel NOGO A exprimiert. Oligodendrogliome WHO Grad II und myxopapilläre Ependymome wiesen vornehmlich wenig NOGO A Expression auf.

NOGO A Menge nach WHO Grad

Die ependymalen Tumore WHO Grad I unterschieden sich deutlich in ihrer jeweiligen exprimierten Menge. Subependymome wiesen zu 85,7% viel NOGO A auf, während bei myxopapillären Ependymomen dies nur zu 44,8% der Fall war.

Pilozytische Astrozytome besaßen in der großen Mehrheit (96%) viel NOGO A. Die WHO Grad II Gruppe glialer Tumore hatte eine heterogene Verteilung: Pilomyxoide (100%), diffuse Astrozytome (95,9%) sowie Ependymome (87,2%) zeigten viel NOGO A, im Gegensatz zu Oligodendrogliomen, die in drei Viertel ihrer Gewebeproben wenig NOGO A darstellten.

WHO Grad III Gliome besaßen in der Mehrheit viel NOGO A: Anaplastische Astrozytome zu 98,2%, anaplastische Ependymome zu 85,7%, anaplastische Oligoastrozytome zu zwei Drittel sowie anaplastische Oligodendrogliome zu 58,6%.

Drei Viertel der Gewebeproben von Glioblastomen wiesen viel NOGO A nach (siehe Tabelle 18).

3.3.3 NOGO A Immunreaktiver Score

Im qualitativen Vergleich des IRS wurde bei den Astrozytomen (Mittelwert 7,85), besonders pilozytischen Astrozytomen (Mittelwert 9,18), ein überdurchschnittlicher IRS festgestellt. Diffuse Astrozytome (Mittelwert 6,41) besaßen die geringsten Werte.

Ependymale Tumore (Mittelwert 5,36) und Oligodendrogliome (Mittelwert 4,74) verzeichneten mit steigendem WHO Grad eine Zunahme des Immunreaktiven Scores. Myxopapilläre Ependymome (Mittelwert 3) stellten sich als Tumorentität mit den geringsten Werten heraus (siehe Tabelle 19).

NOGO A IRS						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Mittelwert IRS	MIB 1 Proliferationsrate	Tumorstatus	
				Mittelwert in %	p- Wert	p- Wert
	Insgesamt	734	7,04	9,49	0,0077	0,0014
	astrozytäre Tumore	510	7,85	11,47	0,6235	0,4817
1	pilozytisches Astrozytom	174	9,18	1,95		
2	diffuses Astrozytom	49	6,41	1,89		
3	anaplastisches Astrozytom	56	7,21	8,68		
4	Glioblastom	231	7,3	19,1		
	oligodendrogliale Tumore	53	4,74	6,70	0,0220	0,4533
2	Oligodendrogliom	24	3,58	4,23	0,7983	
3	anaplastisches Oligodendrogliom	29	5,69	8,70	0,1687	
	ependymale Tumore	171	5,36	3,73	0,0028	<0,0001
1	Subependymom	14	5,29	1,83	0,7218	0,7695
	Myxopapilläres Ependymom	29	3	2,03	0,0053	0,1441
2	Ependymom	86	5,74	1,71	0,6216	0,0773
3	anaplastisches Ependymom	42	6,21	9,83	0,0155	0,0033

Tabelle 19: Mittelwerte NOGO A Immunreaktiver Score sowie Vergleiche mit Proliferation (MIB 1 Expression) und Tumorstatus. Astrozytome, besonders pilozytische Astrozytome, wiesen die höchste Immunreaktivität für NOGO A auf; Ependymome und Oligodendrogliome exprimierten NOGO A unterdurchschnittlich. Bei signifikanten Unterschieden in der Proliferation korrelierte erhöhte Proliferation mit gesteigerter NOGO A Expression. Rezidivgewebe zeigte bei Ependymomen signifikant höhere Streuung als Primärgewebe.

Vergleich der Tumorgruppen nach NOGO A IRS

Beim Immunreaktiven Score von NOGO A zeigten sowohl die Gruppe der Astrozytome (p – Wert<0,0001) als auch der Glioblastome (p – Wert<0,0001) einen hochsignifikant höheren, die Oligodendrogliome (p – Wert< 0,0001) einen hochsignifikant niedrigeren Unterschied zu den Ependymomen. Glioblastome wiesen hochsignifikant (p – Wert<0,0001) niedrigere Werte gegenüber den Astrozytomen auf; zu den Oligodendrogliomen (p – Wert<0,0001) zeigten sie hochsignifikant höhere Werte. Astrozytome waren durch eine hochsignifikant

größere NOGO A Expression von Oligodendroglomen verschieden (p – Wert<0,0001; siehe Tabelle 20).

NOGO A IRS p-Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert
Glioblastom				7,299
Ependymom	<0,0001			5,263
Astrozytom	<0,0001	<0,0001		8,274
Oligodendroglom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	4,736

Tabelle 20: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für NOGO A IRS. Alle Tumorgruppen sind zueinander hochsignifikant unterschiedlich.

Korrelationen nach Geschlecht, Tumorstatus, Alter und Proliferationsrate

Das Geschlecht konnte nicht als ein signifikantes Unterscheidungskriterium, weder im Gesamtkollektiv (p – Wert=0,7259) noch in den Tumorgruppen, bestimmt werden (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Steigendes Patientenalter führte zu einer signifikanten Abnahme des IRS bei der Gesamtheit der Gewebeproben (p – Wert= 0,0027), sowie auch bei der Gruppe der Astrozytome (p – Wert= 0,0004); ließ sich in den verschiedenen astrozytären Tumorentitäten allerdings nicht feststellen. Bei Oligodendroglomen und Ependymomen führte das Patientenalter zu keinen Unterschieden im IRS (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Zwischen Primär- und Rezidivtumorgewebe ließen sich signifikante Unterschiede feststellen (p – Wert= 0,0014). Primärgewebe (Mittelwert 7,1; Standardabweichung 3,6) unterschied sich zu Rezidivgewebe (Mittelwert 6,8; Standardabweichung 4) durch einen höheren mittleren IRS und geringere Standardabweichung.

Hochsignifikant (p – Wert<0,0001) sind die Unterschiede beim Tumorstatus in der Gruppe der Ependymome. Primärtumore (Mittelwert 5,3; Standardabweichung 3,1) unterschieden sich zu Rezidivtumoren (Mittelwert 5,3; Standardabweichung 4,4) durch die geringere Standardabweichung.

Bei anaplastischen Ependymomen ließen sich im Tumorstatus signifikante Differenzen (p – Wert= 0,0033) nachweisen. Primäres Gewebe (Mittelwert 6,2; Standardabweichung 2,7) unterschied sich von Rezidivgewebe (Mittelwert 5,8; Standardabweichung 4,6) durch geringere Streuung des IRS; signifikante

Zusammenhänge konnten in den anderen glialen Tumorgewebsproben nicht festgestellt werden.

Erhöhte Proliferationsrate (MIB 1) führte zu einer signifikanten Erhöhung des NOGO A IRS im Gesamtkollektiv (p – Wert= 0,0077), bei oligodendroglialen Tumoren (p – Wert= 0,0220), myxopapillären (p – Wert= 0,0053) und anaplastischen Ependymomen (p – Wert= 0,0155; siehe Tabelle 19).

Lokalisationen

Die höchste Expression von NOGO A wurde im Kleinhirn (Mittelwert 9,52), Zwischenhirn (Mittelwert 8,91) und N. opticus (Mittelwert 8,5), die niedrigste intraventrikulär (Mittelwert 5,35) und parietal (Mittelwert 4,9) festgestellt (siehe Abbildung 25 im Anhang).

Überlebensvergleiche der Tumorentitäten

Über- bzw. unterdurchschnittliche NOGO A Expression hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben bei glialen Tumoren (siehe Abbildung 15). Allerdings wiesen Oligodendrogliome WHO Grad II (N= 11) und III (N= 14) nur geringe Fallzahlen auf, so dass Studien mit größeren Fallzahlen mit herangezogen werden sollten.

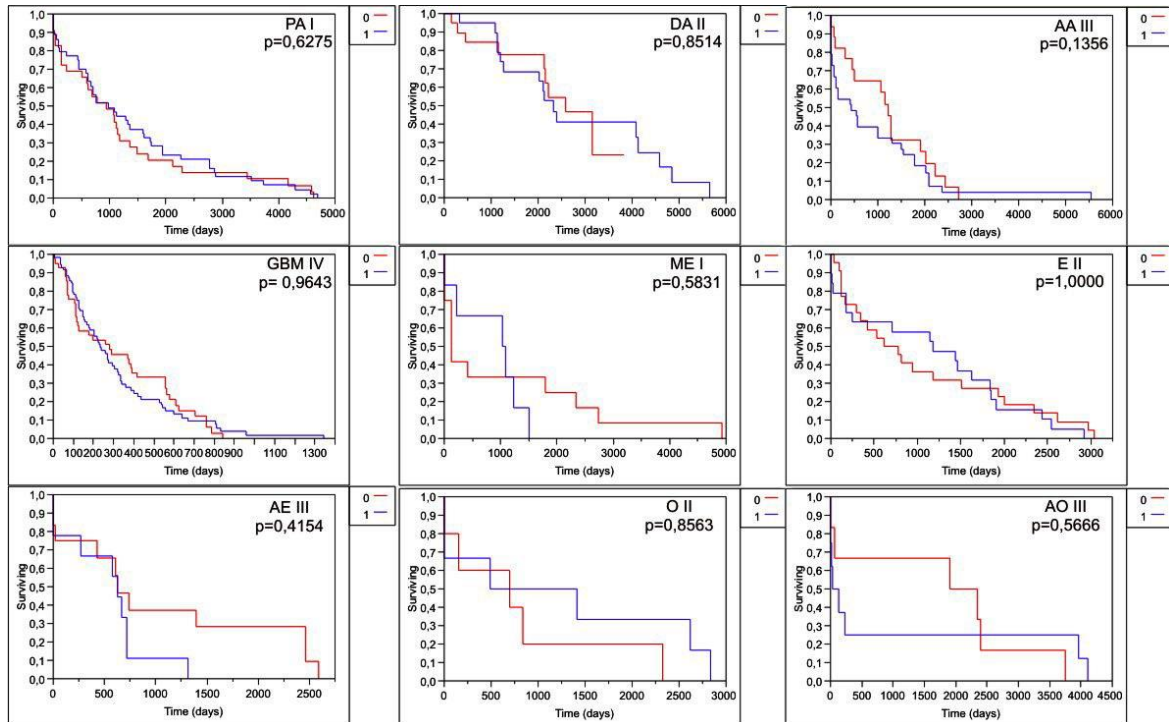


Abbildung 15: Kaplan – Meier Überlebenskurven verschiedener Tumorentitäten bei NOGO A IRS unter dem Mittelwert („0“) bzw. Fälle mit größerem IRS als Mittelwert („1“) der Tumorentität. Tumorentitäten jeweils abgekürzt; Astrozytome WHO Grad I – IV (PA I, DA II, AA III und GBM IV) sowie Ependymome WHO Grad I – III (ME I, E II, AE III) und Oligodendrogliome WHO Grad II und III (O II, AO III). Es ließen sich keine signifikanten Einflüsse von NOGO A auf das Überleben feststellen.

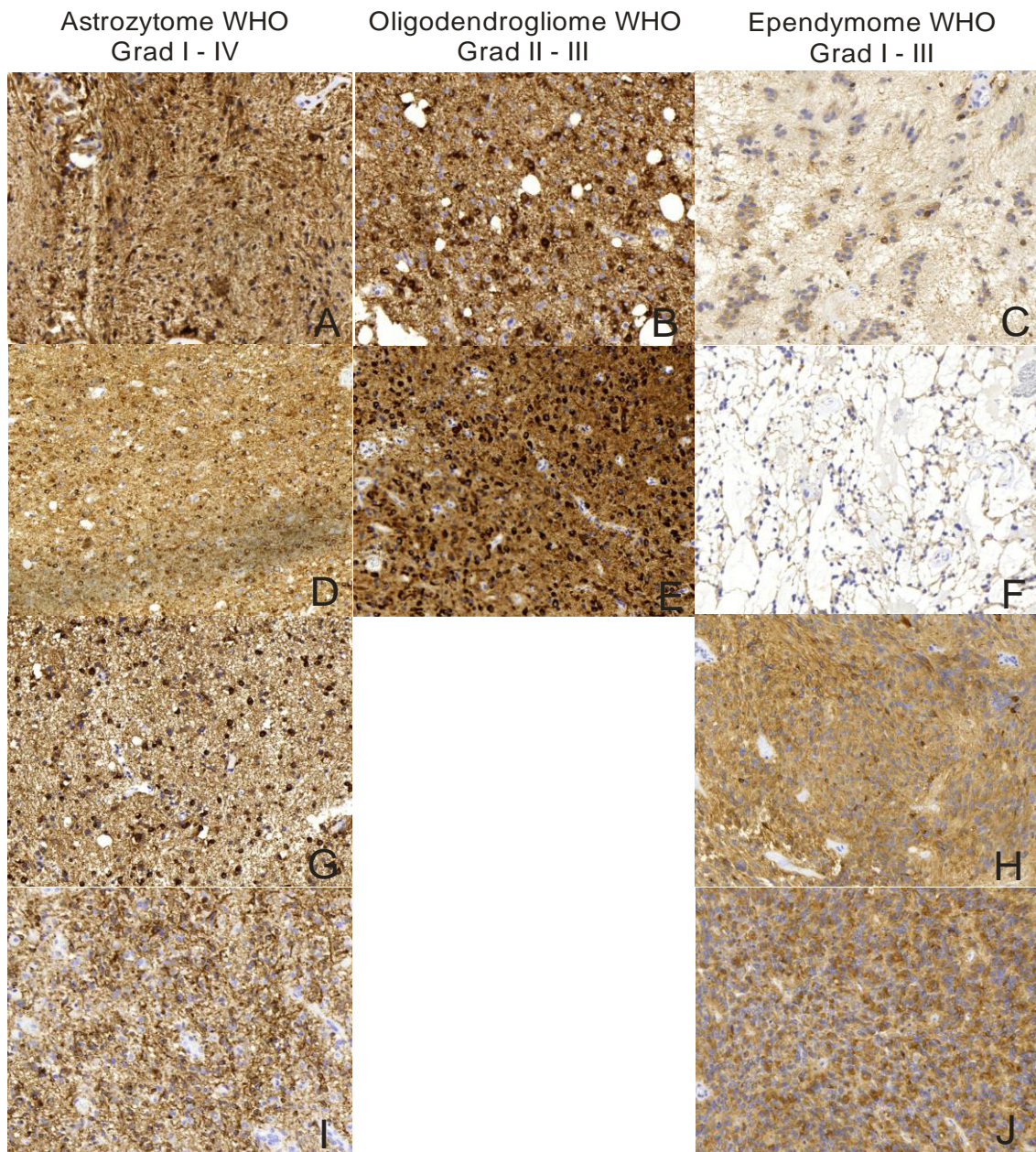


Abbildung 16: Immunhistochemische NOGO A Expression der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit starker Expression. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit starker Expression. C: Subependymom WHO Grad I mit geringer Expression. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit mittlerer Expression. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit starker Expression. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit geringer Expression. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit mittlerer Expression. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit mittlerer Expression. I: Glioblastom WHO Grad IV mit mittlerer Expression. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit mittlerer Expression. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

3.4 OLIG 2

Der Antikörper färbt Zellen oligodendroglialen Ursprungs bzw. neoplastisch veränderte Zellkerne von Gliomen. Der OLIG 2 ist nukleär lokalisiert. Als interne Negativkontrolle eignen sich Endothelien.

Insgesamt wurden 18 Objektträger (14 TMAs und 4 Flächenschnitte, insgesamt 752 Tumorgewebsproben) mit dem Antikörper markiert.

3.4.1 OLIG 2 Intensität

In der quantitativen Auswertung der OLIG 2 Intensität waren 188 Fälle (25%) negativ, 139 (18,48%) schwacher, 272 (36,17%) mittlerer und 153 (20,35%) Fälle starker Intensität (siehe Tabelle 39 im Anhang).

Astrozytäre Tumore (Mittelwert 1,81), im Besonderen pilozytische (Mittelwert 2,08) und pilomyxoide Astrozytome (Mittelwert 3), zeigten eine deutliche Immunreaktivität (siehe Abbildung 17).

Auffallend ist, dass in der Gruppe der oligodendroglialen Tumore (Mittelwert 1,43) keine Fälle mit starker Intensität festgestellt wurden. Zu einer klareren Interpretation sollte allerdings eine größere Fallzahl herangezogen werden. Mit steigendem WHO Grad nahm bei oligodendroglialen Tumoren die OLIG 2 Intensität zu.

Ependymome (Mittelwert 0,64) wiesen zu zwei Drittel, myxopapilläre Ependymome zu 89,7% Score 0 auf (siehe Abbildung 17).

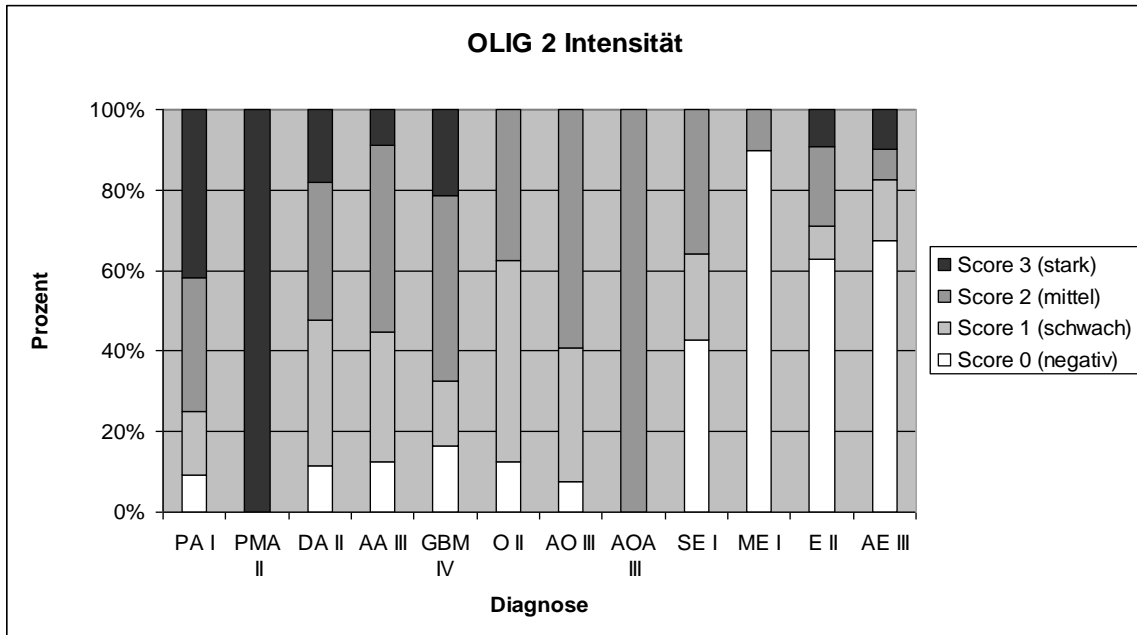


Abbildung 17: Balkendiagramm der OLIG 2 Intensität, Score 0 – 3 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für OLIG 2 Intensität

Bei der Tumorintensität unterschieden sich die Astrozytome (p – Wert<0,0001), die Glioblastome (p – Wert<0,0001) und die Oligodendrogliome (p – Wert<0,0001) hochsignifikant durch stärkere Intensitäten von den Ependymomen. Glioblastome ließen sich zusätzlich statistisch hochsignifikant (p – Wert<0,0001) von den Oligodendrogliomen durch höhere Expression unterscheiden; von den Astrozytomen dagegen durch eine signifikant geringere Intensität (p – Wert= 0,0010). Astrozytome exprimierten im Vergleich zu den Oligodendrogliomen hochsignifikant stärker (p – Wert<0,0001; siehe Tabelle 21).

OLIG 2 Intensität p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Intensität
Glioblastom				1,720
Ependymom	<0,0001			0,6129
Astrozytom	0,0010	<0,0001		1,903
Oligodendrogliom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1,373

Tabelle 21: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für OLIG 2 Intensität. Gliale Tumorgruppen waren signifikant unterschiedlich.

Vergleich der OLIG 2 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“

Eine schwache Intensität wurde in vier Fünftel (79,65%), eine starke Intensität in einem Fünftel (20,35%) aller Fälle festgestellt.

Astrozytome hatten den stärksten Anteil an starker Intensität (26,65%). Ependymome exprimierten zu 92,9%, Oligodendrogliome vollständig schwach (siehe Tabelle 22).

OLIG 2 Intensität				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			schwach	stark
Insgesamt		752	599 (79,65)	153 (20,35)
astrozytäre Tumore		529	388 (73,35)	141 (26,65)
1	pilozytisches Astrozytom	173	101 (58,38)	72 (41,62)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	2 (100)
	diffuses Astrozytom	44	36 (81,82)	8 (18,18)
3	anaplastisches Astrozytom	56	51 (91,07)	5 (8,93)
4	Glioblastom	254	200 (78,74)	54 (21,26)
oligodendrogliale Tumore		54	54 (100)	0
2	Oligodendrogliom	24	24 (100)	0
3	anaplastisches Oligodendrogliom	27	27 (100)	0
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	3 (100)	0
ependymale Tumore		169	157 (92,9)	12 (7,1)
1	Subependymom	14	14 (100)	0
	Myxopapilläres Ependymom	29	29 (100)	0
2	Ependymom	86	78 (90,7)	8 (9,3)
3	anaplastisches Ependymom	40	36 (90)	4 (10)

Tabelle 22: OLIG 2 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“. Schwach: negative (Score 0), gering (Score 1) und mittel (Score 2) gefärbte Proben; Stark: kräftig (Score 3) gefärbte Proben. Alle Tumorentitäten, außer pilomyxoide Astrozytome, zeigten mehrheitlich schwache Intensitäten. Oligodendrogliale Tumore waren vollständig schwach gefärbt.

OLIG 2 Intensität nach WHO Grad

WHO Grad I Ependymome wiesen gänzlich schwache Intensitäten auf, pilozytische Ependymome waren zu 41,6% stark gefärbt.

Innerhalb der WHO Grad II Gliome sollte bei starker Intensität ein pilomyxoides Astrozytom mit in Erwägung gezogen werden (siehe Tabelle 22). Diffuse Astrozytome (81,8%) und Ependymome (90,7%) waren überwiegend, Oligodendrogliome vollkommen schwach ausgeprägt.

Homogen verhielt sich auch die Gruppe glialer WHO Grad III Tumore: oligodendrogliale Tumore zeigten vollständig, anaplastische Astrozytome zu 91,1% und anaplastische Ependymome zu 90% schwache Intensitätswerte.

Astrozytome WHO Grad IV (d.h. Glioblastome) waren überwiegend schwacher Intensität (78,7%).

3.4.2 OLIG 2 Menge

Bei quantitativer Betrachtung der OLIG 2 Menge waren ein Viertel an Fällen (188) negativ, 26,46% besaßen Score 1, 21,81% Score 2, 14,49% Score 3 und 12,23% Score 4.

Oligodendrogliale Tumore exprimierten durchschnittlich die größten Mengen an OLIG 2 (Mittelwert 2,52), wobei eine Steigerung der exprimierten Antikörpermenge mit zunehmender WHO Gradierung vorgefunden wurde.

Niedriggradige Astrozytome, pilozytische (Mittelwert 2,09) und pilomyxoide Astrozytome (Mittelwert 2), exprimierten statistisch in fünfzig Prozent ihres Gewebes OLIG 2. Mit steigender Malignisierung stieg der relative Anteil negativer Fälle an (siehe Abbildung 18).

Deutlich geringere Mengen zeigten ependymale Tumore (Mittelwert 0,45), die in 113 Fällen (66,9%) keine Expression zeigten (siehe Tabelle 40 im Anhang).

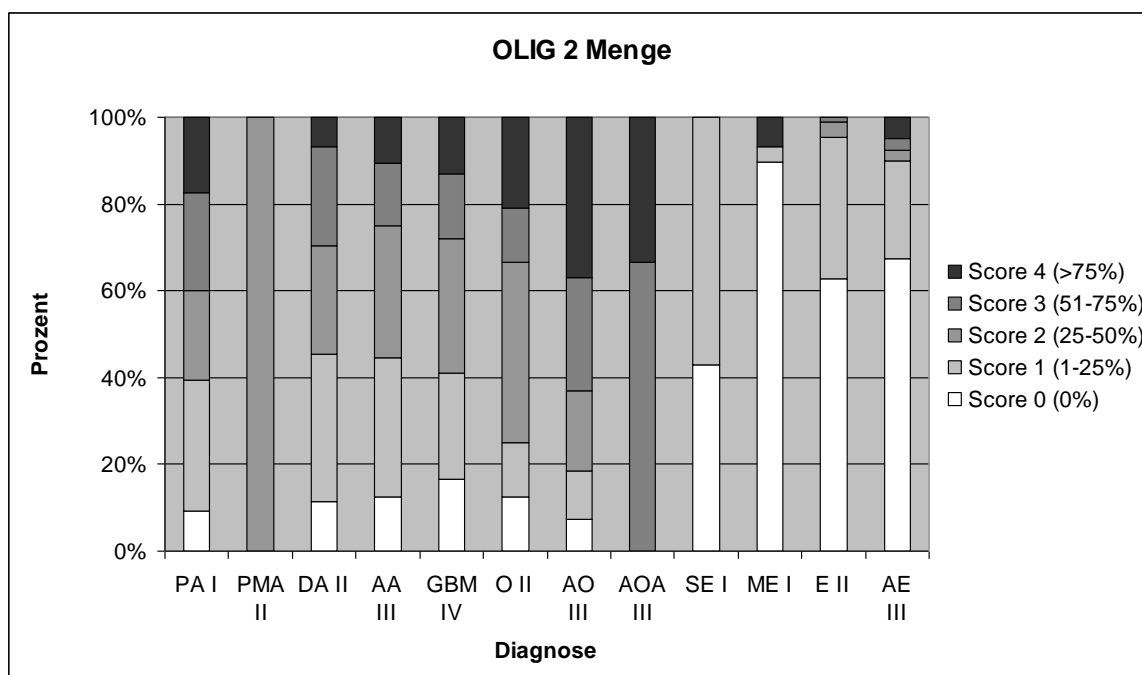


Abbildung 18: Balkendiagramm der OLIG 2 Menge Score 0 – 4 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für OLIG 2 Menge

Bei der exprimierten Antikörpermenge wiesen die Oligodendrogliome (p – Wert<0,0001), die Gruppe der Astrozytome (p – Wert<0,0001) und die Glioblastome (p – Wert<0,0001) eine hochsignifikante höhere Menge OLIG 2 auf als Ependymome. Mit einer signifikant höheren Anzahl OLIG 2 positiver Zellen unterschieden sich Astrozytome (p – Wert= 0,0195) und Oligodendrogliome (p – Wert= 0,0092) von den Glioblastomen. Astrozytäres Gewebe wies signifikant geringere Mengen OLIG 2 als oligodendrogliales Gewebe (p – Wert= 0,0085) auf (siehe Tabelle 23).

OLIG 2 Menge p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Menge
Glioblastom				1,835
Ependymom	<0,0001			0,439
Astrozytom	0,0195	<0,0001		1,993
Oligodendrogliom	0,0092	<0,0001	0,0085	2,490

Tabelle 23: p – Werte von Tumorgruppenvergleiche für OLIG 2 Menge. Alle Tumorgruppen unterschieden sich in der Menge positiver Zellen signifikant.

Vergleich der OLIG 2 Mengen „wenig“ vs. „viel“

Insgesamt exprimierte in 73,3% aller Fälle weniger als die Hälfte der Gewebeproben viel OLIG 2. Gegen diese Tendenz verstießen Oligodendrogliome, die in 51,9% mehrheitlich viel OLIG 2 zeigten. Ependymale Zellen stellten sich fast vollständig (96,5%) mit wenig OLIG 2 dar, lediglich sechs Fälle (3,6%) besaßen viel OLIG 2 (siehe Tabelle 24).

OLIG 2 Menge				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			wenig	viel
Insgesamt		752	551 (73,27)	201 (26,73)
astrozytäre Tumore		529	362 (68,43)	167 (31,57)
1	pilozytisches Astrozytom	173	104 (60,12)	69 (39,88)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	2 (100)	0
	diffuses Astrozytom	44	31 (70,45)	13 (29,55)
3	anaplastisches Astrozytom	56	42 (75)	14 (25)
4	Glioblastom	254	183 (72,05)	71 (27,95)
oligodendrogliale Tumore		54	26 (48,15)	28 (51,85)
2	Oligodendrogliom	24	16 (66,67)	8 (33,33)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	27	10 (37,04)	17 (62,96)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	3 (100)
ependymale Tumore		169	163 (96,45)	6 (3,55)
1	Subependymom	14	14 (100)	0
	Myxopapilläres Ependymom	29	27 (93,1)	2 (6,9)
2	Ependymom	86	85 (98,84)	1 (1,16)
3	anaplastisches Ependymom	40	37 (92,5)	3 (7,5)

Tabelle 24: OLIG 2 Mengengruppen „wenig“ vs. „viel“. Wenig: 0% (Score 0), 1 – 24% (Score 1), 25 – 49% (Score 2) gefärbte Tumorzellen; Viel: 50 – 74% (Score 3) und 75 – 100% (Score 4) gefärbte Proben. Ependymome und Astrozytome wiesen mehrheitlich wenig, Oligodendrogliome in der Mehrheit viel OLIG 2 auf.

OLIG 2 Menge nach WHO Grad

Viel OLIG 2 deutete noch am Ehesten auf ein pilozytisches Astrozytom (39,9%) hin. WHO Grad I Ependymome, Subependymome zu 0% und myxopapilläre Ependymome zu 6,9%, wiesen bloß wenig OLIG 2 auf.

Innerhalb des WHO Grad II exprimierten Oligodendrogliome zu 33,3% und diffuse Astrozytome zu 29,6% viel OLIG 2. Nahezu alle Ependymome (98,8%) zeigten wenig OLIG 2.

Ungleich war die Aufteilung in der Gruppe der WHO Grad III Gliome: Anaplastische Oligoastrozytome (100%) und anaplastische Oligodendrogliome (63%) enthielten viel exprimiertes OLIG 2, während anaplastische Astrozytome zu drei Viertel und anaplastische Ependymome zu 92,5% wenig OLIG 2 Expression erkennen ließen.

Glioblastome zeigten in 72,1% der Fälle wenige OLIG 2 positive Zellen und entsprachen damit in etwa dem Gesamtdurchschnitt (siehe Tabelle 24).

3.4.3 OLIG 2 Immunreaktiver Score

Bei der Auswertung des IRS zeigten Astrozytome den höchsten Mittelwert mit 4,16. Pilozytische Astrozytome, mit einem mittleren Wert von 4,96, wiesen eine überdurchschnittliche Expression von OLIG 2 nach.

Oligodendrogliale Tumore, mit einem Mittelwert von 3,98, ließen eine Steigerung in der OLIG 2 Manifestation mit zunehmender Anaplasie erkennen.

Die Gruppe der Ependymome hatte mit Abstand den geringsten IRS (siehe Tabelle 25).

OLIG 2 IRS						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Mittelwert IRS	MIB 1 Proliferationsrate Mittelwert in %	p- Wert	Tumorstatus p- Wert
Insgesamt		747	3,41	9,49	0,0014	0,0053
astrozytäre Tumore		527	4,16	11,47	0,8845	0,0356
1	pilozytisches Astrozytom	173	4,96	1,95		0,0059
2	diffuses Astrozytom	44	3,25	1,89		0,9338
3	anaplastisches Astrozytom	56	3,21	8,68		0,8852
4	Glioblastom	254	3,98	19,1	0,0053	0,2357
oligodendrogliale Tumore		51	3,98	6,70	0,4494	0,1393
2	Oligodendrogliom	24	3,13	4,23		
3	anaplastisches Oligodendrogliom	27	4,74	8,70		
ependymale Tumore		169	0,9	3,73	0,0097	0,0034
1	Subependymom	14	0,93	1,83	0,5724	0,3823
	Myxopapilläres Ependymom	29	0,62	2,03	0,0818	0,1350
2	Ependymom	86	0,9	1,71	0,0001	0,0020
3	anaplastisches Ependymom	40	1,1	9,83	0,2630	0,3355

Tabelle 25: Mittelwerte OLIG 2 Immunreaktiver Score sowie Vergleiche mit Proliferation (MIB 1 Expression) und Tumorstatus. Astrozytome, besonders WHO Grad I und IV, sowie Oligodendrogliome, speziell WHO Grad III, wiesen überdurchschnittliche Immunreaktivität auf. Ependymome besaßen kaum OLIG 2 Expression. Signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter Proliferation und erhöhter Immunreaktivität zeigten Glioblastome und Ependymome. Rezidivgewebe unterschied sich signifikant von Primärgewebe durch erhöhte Mittelwerte sowie Streuung des IRS bei Astrozytomen und Ependymomen.

Vergleich der Tumorgruppen nach OLIG 2 IRS

Bei der Analyse des Immunreaktiven Scores von OLIG 2 fiel auf, dass sich sowohl die Astrozytome (p – Wert < 0,0001), die Glioblastome (p – Wert < 0,0001) als auch die Oligodendrogliome (p – Wert < 0,0001) durch hochsignifikant größere Immunreaktivität von den Ependymomen unterschieden. Glioblastome unterschieden sich durch einen geringeren IRS von Astrozytomen (p – Wert = 0,0007); gegenüber Oligodendrogliomen (p – Wert = 0,0218) waren Glioblastome durch eine höhere Streuung signifikant unterschiedlich.

Hochsignifikant höher ist die OLIG 2 Expression bei Astrozytomen verglichen mit Oligodendrogliomen (p – Wert<0,0001; siehe Tabelle 26).

OLIG 2 IRS p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert
Glioblastom				3,982
Ependymom	<0,0001			0,897
Astrozytom	0,0007	<0,0001		4,399
Oligodendrogliom	0,0218	<0,0001	<0,0001	3,98

Tabelle 26: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für OLIG 2 IRS. Die Immunreaktivität war zwischen allen Gruppen signifikant unterschiedlich.

Korrelationen nach Geschlecht, Tumorstatus, Alter und Proliferationsrate

Das Geschlecht hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Immunreaktiven Score bei OLIG 2, weder insgesamt noch in den einzelnen Tumorgruppen (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Der Tumorstatus hatte signifikanten Einfluss auf den OLIG 2 IRS (p – Wert=0,0053). Primäres Gewebe (Mittelwert 3,4; Standardabweichung 3,22) unterschied sich in einem geringeren Mittelwert und kleinerer Streuung vom Rezidivgewebe (Mittelwert 3,6; Standardabweichung 3,81) beim Gesamtkollektiv.

Bei der Gruppe der Astrozytome ließ sich dieser signifikante Unterschied (p – Wert= 0,0356) zwischen Primär – (Mittelwert 4,16; Standardabweichung 3,24) und Rezidivstatus (Mittelwert 4,37; Standardabweichung 4), der sich auch bei pilozytischen Astrozytomen nachweisen ließ (p – Wert= 0,0059), bestätigen.

Auch die Gruppe ependymaler Tumore (p – Wert= 0,0034) ließ den sich im Gesamtkollektiv manifestierten signifikanten Unterschied zwischen Primärgewebe (Mittelwert 0,77; Standardabweichung 1,5) und Rezidivgewebe (Mittelwert 1,37; Standardabweichung 2,8), im Besonderen bei Ependymomen WHO Grad II (p – Wert=0,0020), erkennen (siehe Tabelle 25).

Signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter MIB 1 Expression und erhöhter OLIG 2 Expression zeigte sich bei der Tumorgruppe der Ependymome (p – Wert= 0,0097), mit erhöhter Signifikanz bei Grad II Ependymomen (p – Wert=0,0001), bei Glioblastomen (p – Wert= 0,0053) und im Gesamtkollektiv (p – Wert= 0,0014; siehe Tabelle 25).

Steigendes Alter führte zu einer signifikant geringeren Expression von OLIG 2 bei Astrozytomen (p – Wert= 0,0154). Dies ließ sich nicht an der WHO Gradierung nachvollziehen. Das Patientenalter hatte auf die anderen Tumorentitäten keinen signifikanten Einfluss (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Lokalisationen

Das Zwischenhirn (Mittelwert 6,5), das Kleinhirn (Mittelwert 5,33) sowie die Occipitalregion (Mittelwert 5,24) zeichneten sich durch eine hohe Immunreaktivität aus, intraspinal (Mittelwert 1,71) und intraventrikulär (Mittelwert 1,25) wurde in Tumoren kaum OLIG 2 exprimiert (siehe Abbildung 25 im Anhang).

Überlebensvergleiche nach Tumorentität

Eine große bzw. geringere OLIG 2 Expression hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben bei Gliomen. Allerdings sollten wegen der geringen Fallzahl bei myxopapillären (N= 18) und anaplastischen Ependyomen (N= 19) sowie bei Oligodendrogliomen WHO Grad II (N= 11) und Grad III (N= 13) bei Interpretationen des Überlebens Studien mit einer größeren Fallzahl hinzugezogen werden (siehe Abbildung 19).

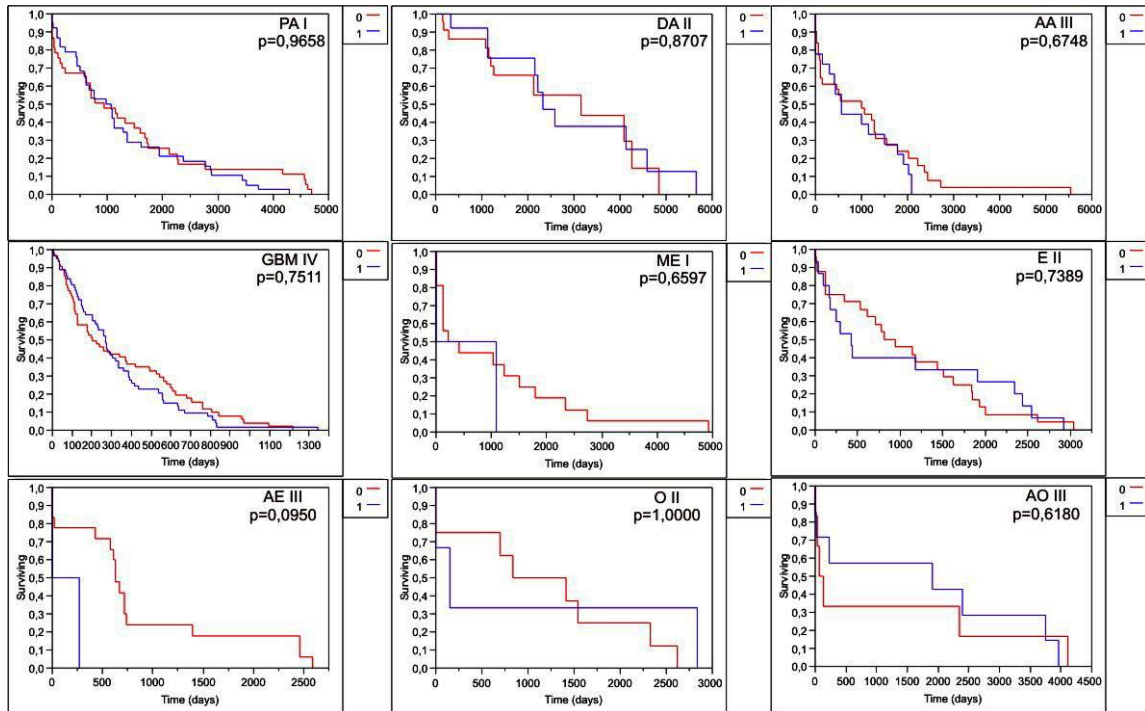


Abbildung 19: Kaplan – Meier Überlebenskurven verschiedener Tumorentitäten bei OLIG 2 IRS unter dem Mittelwert („0“) bzw. Fälle mit größerem IRS als Mittelwert („1“) der Tumorentität. Tumorentitäten jeweils abgekürzt; Astrozytome WHO Grad I – IV (PA I, DA II, AA III und GBM IV) sowie Ependymome WHO Grad I – III (ME I, E II, AE III) und Oligodendrogliome WHO Grad II und III (O II, AO III). Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Expression und Überleben festgestellt.

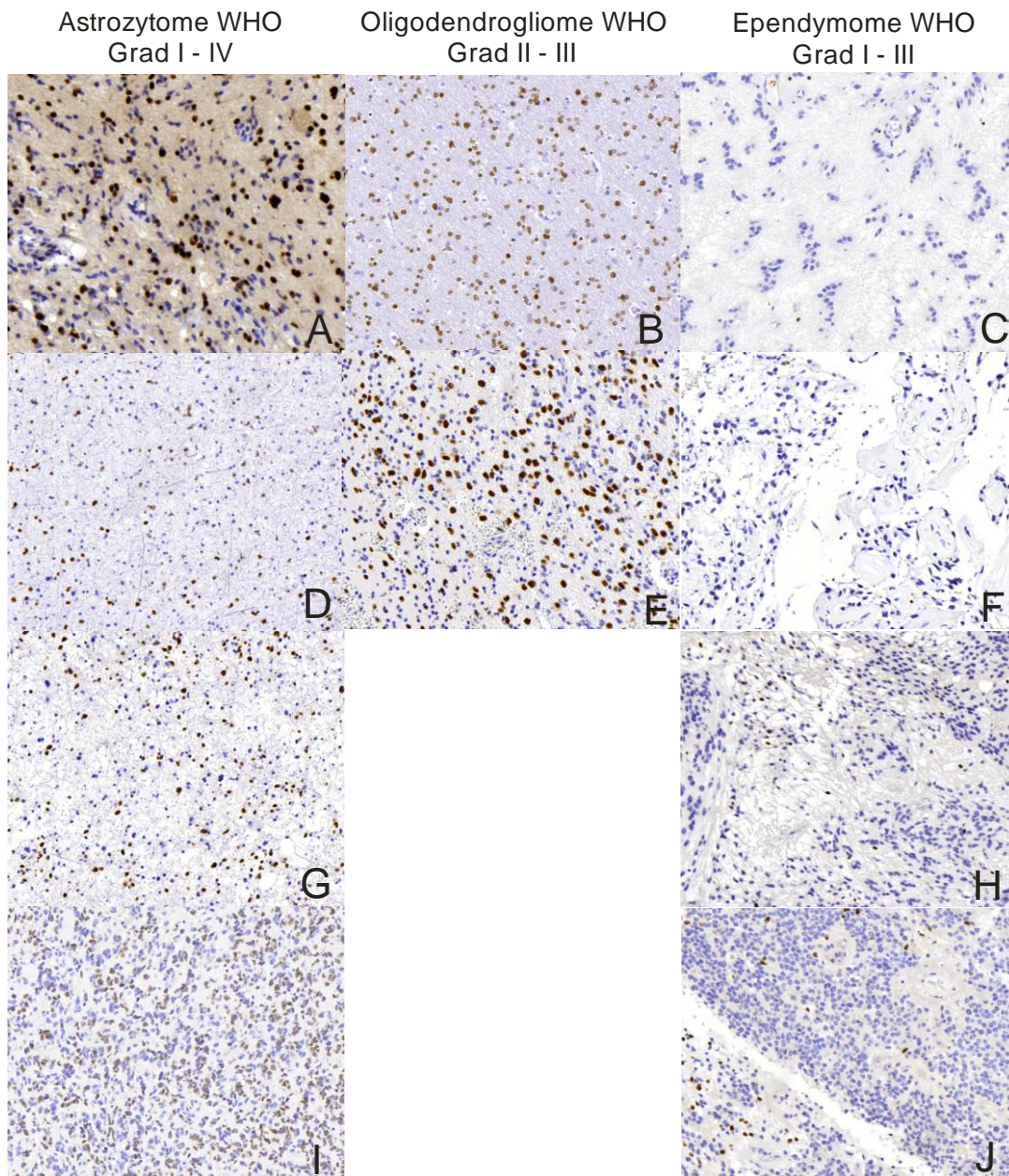


Abbildung 20: Immunhistochemische OLIG 2 Expression der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit mittlerer Expression. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit geringer Expression. C: Subependymom WHO Grad I mit fehlender Expression. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit geringer Expression. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit mittlerer Expression. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit fehlender Expression. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit geringer Expression. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit fehlender Expression. I: Glioblastom WHO Grad IV mit geringer Expression. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit geringer Expression. Fotografie Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

3.5 WT 1

Anfärbung des Zytoplasmas wurde bei Gefäßendothelien und höhergradigen astrozytären Tumorzellen festgestellt.

Es wurden 15 Objektträger (14 TMAs und ein Flächenschnitt; insgesamt 755 Tumorgewebsproben) mit dem Antikörper angefärbt.

3.5.1 WT 1 Intensität

Beim Vergleich der WT 1 Intensität wiesen 59 Fälle (7,81%) Score 0, 201 Fälle (26,62%) Score 1, 239 Fälle (31,66%) Score 2 und 256 Fälle (33,91%) Score 3 auf.

Astrozytäre Tumore (Mittelwert 2,17), besonders pilozytische (Mittelwert 2,43) und pilomyxoide Astrozytome (Mittelwert 2,5) sowie Glioblastome (Mittelwert 2,26), zeigten überdurchschnittlich starke Färbungen für WT 1.

Ependymale Gliome (Mittelwert 1,49) wiesen eine heterogene Intensität auf: WHO Grad I und II Tumore waren unterdurchschnittlich ausgeprägt, anaplastische Ependymome (Mittelwert 2,46) wiederum wiesen die kräftigsten Intensitätswerte aller Entitäten nach (siehe Tabelle 41 im Anhang).

Oligodendrogliome (Mittelwert 0,71) ließen nur schwache Intensitäten erkennen, anaplastische Oligoastrozytome (Mittelwert 2,33) ausgenommen (siehe Abbildung 21).

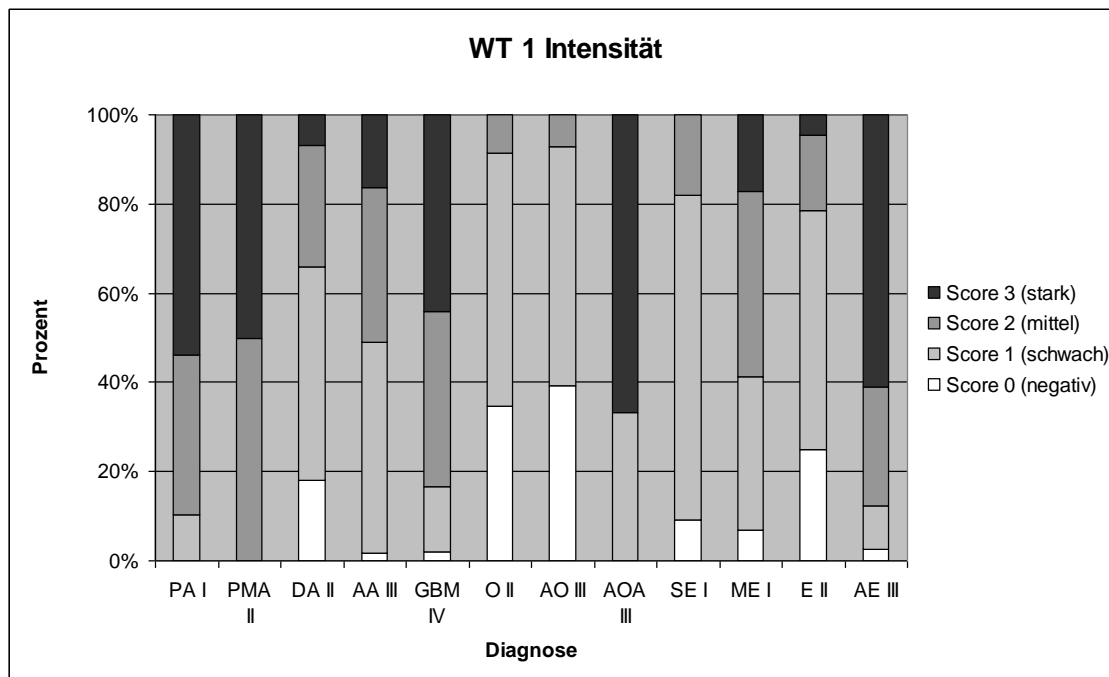


Abbildung 21: Balkendiagramm der WT 1 Intensität, Score 0 – 3 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für WT 1 Intensität

Die Intensität bei Glioblastomen (p – Wert<0,0001), Astrozytomen (p – Wert<0,0001) und Ependymomen (p – Wert<0,0001) war hochsignifikant stärker als bei Oligodendrogliomen. Ependymome waren jeweils zu Glioblastomen (p – Wert<0,0001) und Astrozytomen (p – Wert<0,0001) hochsignifikant schwächer angefärbt. Glioblastome wiesen einen mäßig signifikant höheren Unterschied zu der Gruppe der Astrozytome (p – Wert= 0,0259) bei der WT 1 Intensität auf (siehe Tabelle 27).

WT1 Intensität p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Intensität
Glioblastom				2,256
Ependymom	<0,0001			1,513
Astrozytom	0,0259	<0,0001		2,087
Oligodendrogliom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,706

Tabelle 27: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für WT 1 Intensität. Alle Gruppen zeigten in der Färbung mit WT 1 signifikante Unterschiede.

Vergleich der WT 1 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“

Nach der Aufteilung der Proben in die Gruppen schwacher sowie starker Intensität konnte man erkennen, dass insgesamt ein Drittel (33,91%) stark bzw. zwei Drittel (66,09%) schwach angefärbt waren.

Alle Tumorgruppen waren mehrheitlich schwach immunreaktiv; Oligodendrogliome zu 96,3%, Ependymome zu 79,88% und Astrozytome zu 58,65% (siehe Tabelle 28).

WT 1 Intensität				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			schwach	stark
Insgesamt		755	499 (66,09)	256 (33,91)
astrozytäre Tumore		532	312 (58,65)	220 (41,35)
1	pilozytisches Astrozytom	173	80 (46,24)	93 (53,76)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	1 (50)	1 (50)
	diffuses Astrozytom	44	41 (93,18)	3 (6,82)
3	anaplastisches Astrozytom	55	46 (83,64)	9 (16,36)
4	Glioblastom	258	144 (55,81)	114 (44,19)
oligodendrogliale Tumore		54	52 (96,3)	2 (3,7)
2	Oligodendrogliom	23	23 (100)	0
3	anaplastisches Oligodendrogliom	28	28 (100)	0
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	2 (66,67)
ependymale Tumore		169	135 (79,88)	34 (20,12)
1	Subependymom	11	11 (100)	0
	Myxopapilläres Ependymom	29	24 (82,76)	5 (17,24)
2	Ependymom	88	84 (95,45)	4 (4,55)
3	anaplastisches Ependymom	41	16 (39,02)	25 (60,98)

Tabelle 28: WT 1 Intensitätsgruppen „schwach“ vs. „stark“. Schwach: negative (Score 0), gering (Score 1) und mittel (Score 2) gefärbte Proben; Stark: kräftig (Score 3) gefärbte Proben. Insgesamt wurde WT 1 in zwei Drittel aller Fälle schwach exprimiert.

WT 1 Intensität nach WHO Grad

Innerhalb des WHO Grad I waren pilozytische Astrozytome zu 53,76% stark WT 1 positiv, während myxopapilläre Ependymome zu 82,76% und Subependymome vollständig schwache Intensitäten zeigten.

WHO Grad II Gliome mit starker WT 1 Intensität könnten in 50% der Fälle ein Hinweis auf ein pilomyxoides Astrozytom sein. Diffuse Astrozytome wiesen zu 93,18%, Ependymome zu 95,45% und Oligodendrogliome zu 100% schwache Immunreaktivität auf.

Starke Intensitäten innerhalb der WHO Grad III Tumore ließen sich bei anaplastischen Oligoastrozytomen zu zwei Drittel und anaplastischen

Ependymomen zu 60,98% nachweisen. Anaplastische Astrozytome waren zu 83,64%, anaplastische Oligodendrogliome vollständig schwach gefärbt.

Glioblastome zeigten zu 44,19% der Fälle starke WT 1 Intensitäten.

3.5.2 WT 1 Menge

Beim quantitativen Vergleich der exprimierten WT 1 Menge wurde Score 0 in 59 (7,81%), Score 1 in 124 (16,42%), Score 2 in 70 (9,27%), Score 3 in 66 (8,74%) und Score 4 in 436 (57,76%) aller Fälle nachgewiesen.

Astrozytome (Mittelwert 3,24), im Besonderen pilozytische Astrozytome (Mittelwert 3,49) und Glioblastome (Mittelwert 3,39), zeigten anteilmäßig die meiste WT 1 Expression; diffuse Astrozytome (Mittelwert 1,86) waren hingegen in mehr als der Hälfte (56,82%) ihrer Fälle Score 0 bzw. Score 1 (siehe Tabelle 42 im Anhang).

Bei den ependymalen Tumoren (Mittelwert 2,57) wiesen Subependymome (Mittelwert 3,36) und anaplastische Ependymome (Mittelwert 3,27) hohe Mengen, Ependymome WHO Grad II (Mittelwert 2,01) geringe Mengen auf.

Oligodendrogliome (Mittelwert 0,83) wiesen keinen Fall mit Score 4 auf, sie exprimierten spärlich WT 1 (siehe Abbildung 22).

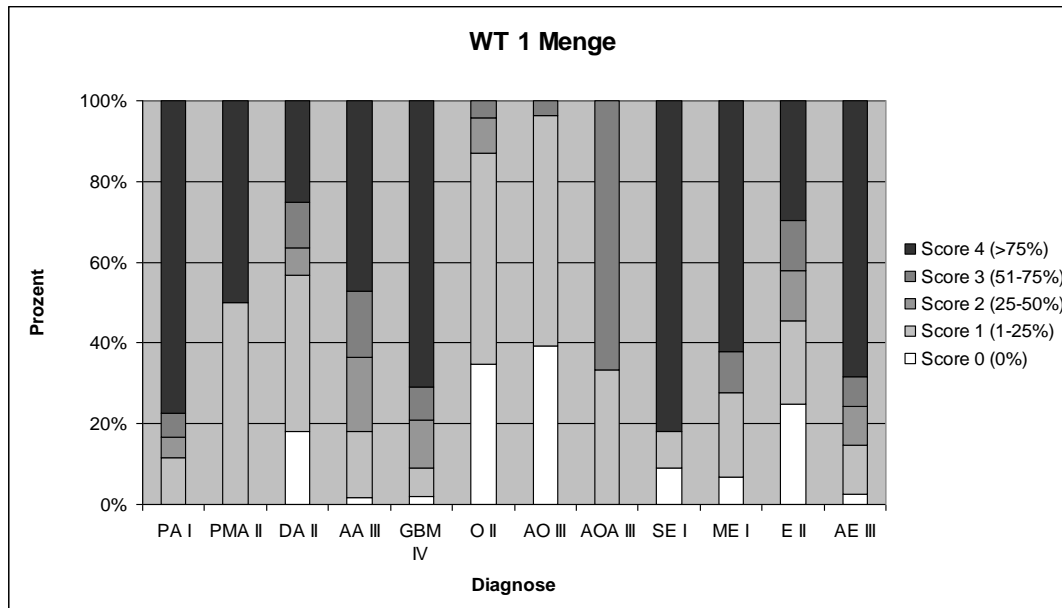


Abbildung 22: Balkendiagramm der WT 1 Menge Score 0 – 4 von Astrozytomen WHO Grad I – IV (PA I, PMA II, DA II, AA III, GBM IV), Oligodendrogliomen WHO Grad II und III (O II, AO III, AOA III) sowie Ependymomen WHO Grad I – III (SE I, ME I, E II, AE III).

Vergleich der Tumorgruppen für WT 1 Menge

Durch hochsignifikant größere exprimierte Antikörpermenge unterschieden sich Glioblastome (p – Wert<0,0001), Astrozytome (p – Wert<0,0001) und Ependymome (p – Wert<0,0001) von den Oligodendrogliomen. Hochsignifikant größere Mengen zeigten sich ebenfalls bei Glioblastomen (p – Wert<0,0001) bzw. Astrozytomen (p – Wert<0,0001) gegenüber Ependymomen. Glioblastome (p – Wert= 0,0047) wiesen signifikant höhere WT 1 Expressionen gegenüber Astrozytomen auf (siehe Tabelle 29).

WT1 Menge p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert Menge
Glioblastom				3,391
Ependymom	<0,0001			2,519
Astrozytom	0,0047	<0,0001		3,097
Oligodendrogliom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7451

Tabelle 29: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für WT 1 Menge. Signifikante Unterschiede in der exprimierten WT 1 Menge zeigten sich zwischen allen Tumorgruppen.

Vergleich der WT 1 Mengen „wenig“ vs. „viel“

Insgesamt wurde in zwei Drittel der Fälle viel, in einem Drittel der Tumorproben wenig WT 1 exprimiert. Astrozytome zeigten zu 75,2% und Ependymome zu 58% viel WT 1, während bei Oligodendrogliomen in 92,6% der Fälle spärliche Mengen an WT 1 zu finden waren (siehe Tabelle 30).

WT 1 Menge				
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Gruppe	
			wenig	viel
	Insgesamt	755	253 (33,51)	502 (66,49)
	astrozytäre Tumore	532	132 (24,81)	400 (75,19)
1	pilozytisches Astrozytom	173	29 (16,76)	144 (83,24)
2	pilomyxoides Astrozytom	2	1 (50)	1 (50)
	diffuses Astrozytom	44	28 (63,64)	16 (36,36)
3	anaplastisches Astrozytom	55	20 (36,36)	35 (63,64)
4	Glioblastom	258	54 (20,93)	204 (79,07)
	oligodendrogliale Tumore	54	50 (92,59)	4 (7,41)
2	Oligodendrogliom	23	22 (95,65)	1 (4,35)
3	anaplastisches Oligodendrogliom	28	27 (96,43)	1 (3,57)
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	2 (66,67)
	ependymale Tumore	169	71 (42,01)	98 (57,99)
1	Subependymom	11	2 (18,18)	9 (81,82)
	Myxopapilläres Ependymom	29	8 (27,59)	21 (72,41)
2	Ependymom	88	51 (57,95)	37 (42,05)
3	anaplastisches Ependymom	41	10 (24,39)	31 (75,61)

Tabelle 30: WT 1 Mengengruppen „wenig“ vs. „viel“. Wenig: 0% (Score 0), 1 – 24% (Score 1), 25 – 49% (Score 2) gefärbte Tumorzellen; Viel: 50 – 74% (Score 3) und 75 – 100% (Score 4) gefärbte Proben. Astrozytome und Ependymome exprimierten mehrheitlich viel, Oligodendrogliome in der Mehrheit wenig WT 1.

WT 1 Mengen nach WHO Grad

WHO Grad I Gliome wiesen in der Mehrheit viel WT 1 nach, im Detail pilozytische Astrozytome zu 83,24% der Fälle, Subependymome zu 81,82% sowie myxopapilläre Ependymome zu 72,41%.

Innerhalb des WHO Grad II wiesen die Tumore mehrheitlich nur wenig Expression auf: Oligodendrogliome zu 95,65%, diffuse Astrozytome zu 63,64%, Ependymome zu 57,95 sowie pilomyxoide Astrozytome zu 50%.

Heterogen stellten sich Gliome des WHO Grad III dar. Wenig WT 1 deutete zu 96,43% auf ein anaplastisches Oligodendrogliom hin. Anaplastische Oligoastrozytome exprimierten in zwei Drittel, anaplastische Astrozytome in 63,64% und anaplastische Ependymome in 75,61% der Fälle viel WT 1.

WHO Grad IV Gliome (d.h. Glioblastome) wiesen zu 79,07% viel WT 1 auf (siehe Tabelle 30).

3.5.3 WT 1 Immunreaktiver Score

Astrozytome imponierten durch überdurchschnittliche Immunreaktivität (Mittelwert 7,53), wobei pilozytische Astrozytome (Mittelwert 8,74) und Glioblastome (Mittelwert 8) hohe Expressionen von WT 1 zeigten, während diffuse Astrozytome (Mittelwert 2,95) eine deutlich verminderte Assoziation zu WT 1 erkennen ließen.

Ependymale Tumore (Mittelwert 4,7) wiesen sowohl einen niedrigen IRS bei klassischen Ependymomen WHO Grad II (Mittelwert 2,68) als auch hohe Immunreaktivität bei anaplastischen Ependymomen (Mittelwert 8,58) auf.

Oligodendrogliome (Mittelwert 0,88) exprimierten WT 1 sehr gering (siehe Tabelle 31).

WT 1 IRS						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Mittelwert IRS	MIB 1 Proliferationsrate	Tumorstatus	
				Mittelwert in %	p- Wert	p- Wert
	Insgesamt	750	6,44	9,49	<0,0001	0,4083
	astrozytäre Tumore	530	7,53	11,47	0,2860	0,0652
1	pilozytisches Astrozytom	173	8,74	1,95		
2	diffuses Astrozytom	44	2,95	1,89		
3	anaplastisches Astrozytom	55	5,13	8,68		
4	Glioblastom	258	8,00	19,1	0,2120	0,0282
	oligodendrogliale Tumore	51	0,88	6,70	0,0797	0,2744
2	Oligodendrogliom	23	1,04	4,23		
3	anaplastisches Oligodendrogliom	28	0,75	8,70		
	ependymale Tumore	169	4,70	3,73	<0,0001	<0,0001
1	Subependymom	11	4,09	1,83	0,3745	0,0117
	Myxopapilläres Ependymom	29	5,59	2,03	0,3745	0,1692
2	Ependymom	88	2,68	1,71	0,4554	<0,0001
3	anaplastisches Ependymom	41	8,58	9,83	0,0321	0,1951

Tabelle 31: Mittelwerte WT 1 Immunreaktiver Score sowie Vergleiche mit Proliferation (MIB 1 Expression) und Tumorstatus. Astrozytome, speziell WHO Grad I und IV Gliome, zeigten überdurchschnittliche Immunreaktivität. Ependymome, mit der Ausnahme von anaplastischen Ependymomen, zeigten unterdurchschnittliche Expression. Oligodendrogliome exprimierten marginal. Gesteigerte Proliferation führte bei Ependymomen zu signifikant gesteigerter Immunreaktivität. Bei Glioblastomen und Ependymomen unterschied sich Primärgewebe mit gesteigertem IRS signifikant von Rezidivgewebe; Ausnahme bildeten Ependymome WHO Grad II, hier zeigten Rezidive höheren IRS.

Vergleich der Tumorgruppen nach WT 1 IRS

Hochsignifikant größere Expression zeigten jeweils Glioblastome (p – Wert<0,0001), Astrozytome (p – Wert<0,0001) und Ependymome (p – Wert<0,0001) gegenüber den Oligodendroglomen. Hochsignifikant größer ist sowohl der Unterschied von Glioblastomen zu Ependymomen (p – Wert<0,0001) als auch von Astrozytomen zu Ependymomen (p – Wert<0,0001). Glioblastomen unterschieden sich von Astrozytomen (p – Wert= 0,0054) durch eine signifikant höhere Immunreaktivität (siehe Tabelle 32).

WT1 IRS p- Werte	Glioblastom	Ependymom	Astrozytom	Mittelwert
Glioblastom				8,004
Ependymom	<0,0001			4,688
Astrozytom	0,0054	<0,0001		7,058
Oligodendroglom	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8824

Tabelle 32: p – Werte von Tumorgruppenvergleichen für WT 1 IRS. Zwischen den Tumorgruppen ließen sich signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität erkennen.

Korrelation nach Geschlecht, Tumorstatus, Alter und Proliferationsrate

Das Geschlecht der Patienten hatte keinen erkennbaren Einfluss auf den WT 1 IRS sowohl beim Gesamtkollektiv (p – Wert= 0,2375) als auch in den Tumorgruppen.

Bei der Gruppe ependymaler Tumore führte steigendes Patientenalter zu einem signifikant geringeren Immunreaktiven Score (p – Wert= 0,0127). Dieser Zusammenhang ließ sich in den einzelnen WHO Graden nicht feststellen (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Der Tumorstatus hatte bei ependymalen Tumoren hochsignifikanten Einfluss auf die Immunreaktivität (p – Wert<0,0001). Rezidivgewebe (Mittelwert 8,1; Standardabweichung 4,2) unterschied sich durch einen höheren Mittelwert und größere Standardabweichung von Primärgewebe (Mittelwert 3,8; Standardabweichung 3,5). Bei klassischen Ependymomen WHO Grad II war Rezidivgewebe (Mittelwert 6; Standardabweichung 3,3) klar von Primärgewebe (Mittelwert 2,4; Standardabweichung 2,4) durch höhere WT 1 Expression und größere Streuung verschieden. Signifikanten Unterschied wiesen auch Subependymome auf; Primärgewebe (Mittelwert 4,4) zeigte höhere Immunreaktivität als Rezidivgewebe (Mittelwert 1).

Auf die Expression von WT 1 bei Glioblastomen hatte der Tumorstatus signifikanten Einfluss (p – Wert= 0,0282): Tumorrezidive (Mittelwert 6,4; Standardabweichung 4,1) wiesen eine geringere Assoziation zu WT 1 auf als Primärtumore (Mittelwert 8,4; Standardabweichung 3,5). Dieser Zusammenhang ließ sich in der Gruppe astrozytärer Tumore nicht bestätigen (p – Wert= 0,0652; siehe Tabelle 31).

Erhöhte Proliferation in Form einer erhöhten MIB 1 Expression führte zu hochsignifikant größerer (p – Wert<0,0001) WT 1 Expression. Dies zeigte sich auch in der Tumorgruppe der Ependymome (p – Wert<0,0001), insbesondere bei anaplastischen Ependymomen WHO Grad III (p – Wert=0,0321; siehe Tabelle 31).

Lokalisationen

Am Sulcus centralis (Mittelwert 9,71) und im Kleinhirn (Mittelwert 8,91) wurde WT 1 am deutlichsten exprimiert, während frontal (Mittelwert 4,97), intraspinal (Mittelwert 4,7) sowie occipital (Mittelwert 3,95) die geringste Immunreaktivität gefunden wurde (siehe Abbildung 25 im Anhang).

Überlebensvergleiche nach Tumorentität

Die Expression von WT 1 zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben bei allen Tumorentitäten (siehe Abbildung 23). Allerdings wiesen Oligodendrogliome WHO Grad II (N= 10) und anaplastische Oligodendrogliome (N= 13) nur geringe Fallzahlen auf, so dass zur weiteren Interpretation Kollektive mit größerer Fallzahl einbezogen werden sollten.

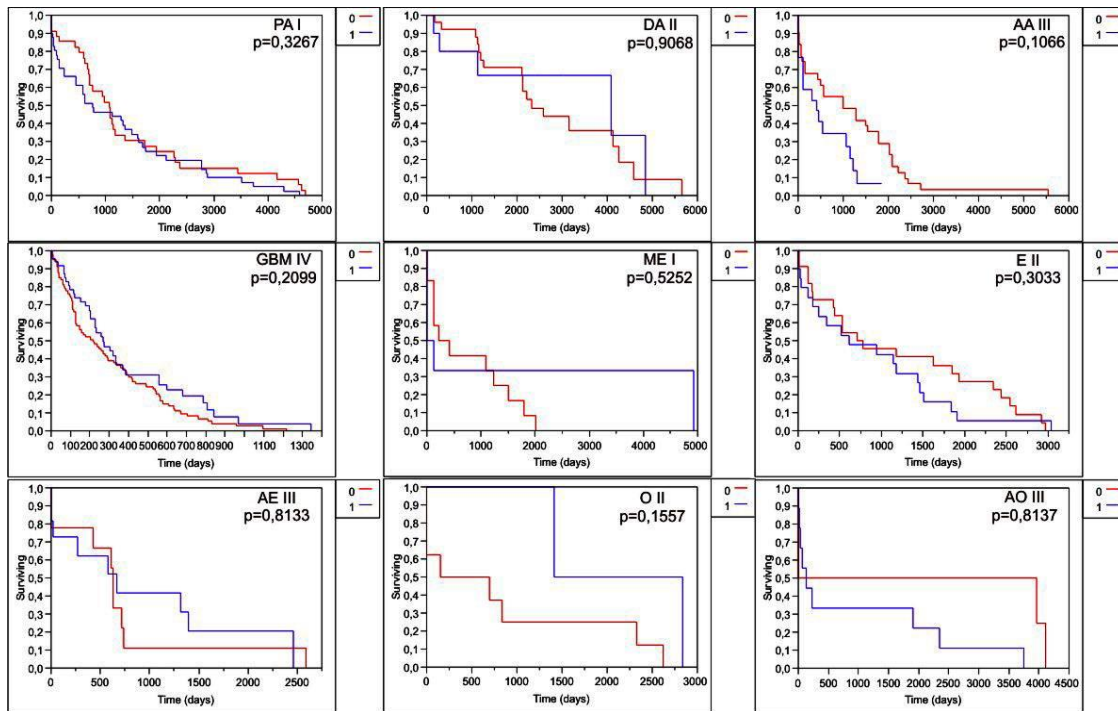


Abbildung 23: Kaplan – Meier Überlebenskurven verschiedener Tumorentitäten bei WT 1 IRS unter dem Mittelwert („0“) bzw. Fällen mit größerem IRS als Mittelwert („1“) der Tumorentität. Tumorentitäten jeweils abgekürzt; Astrozytome WHO Grad I – IV (PA I, DA II, AA III und GBM IV) sowie Ependymome WHO Grad I – III (ME I, E II, AE III) und Oligodendrogliome WHO Grad II und III (O II, AO III). Signifikanter Zusammenhang zwischen WT 1 Expression und dem Überleben wurde bei keiner Tumorentität festgestellt.

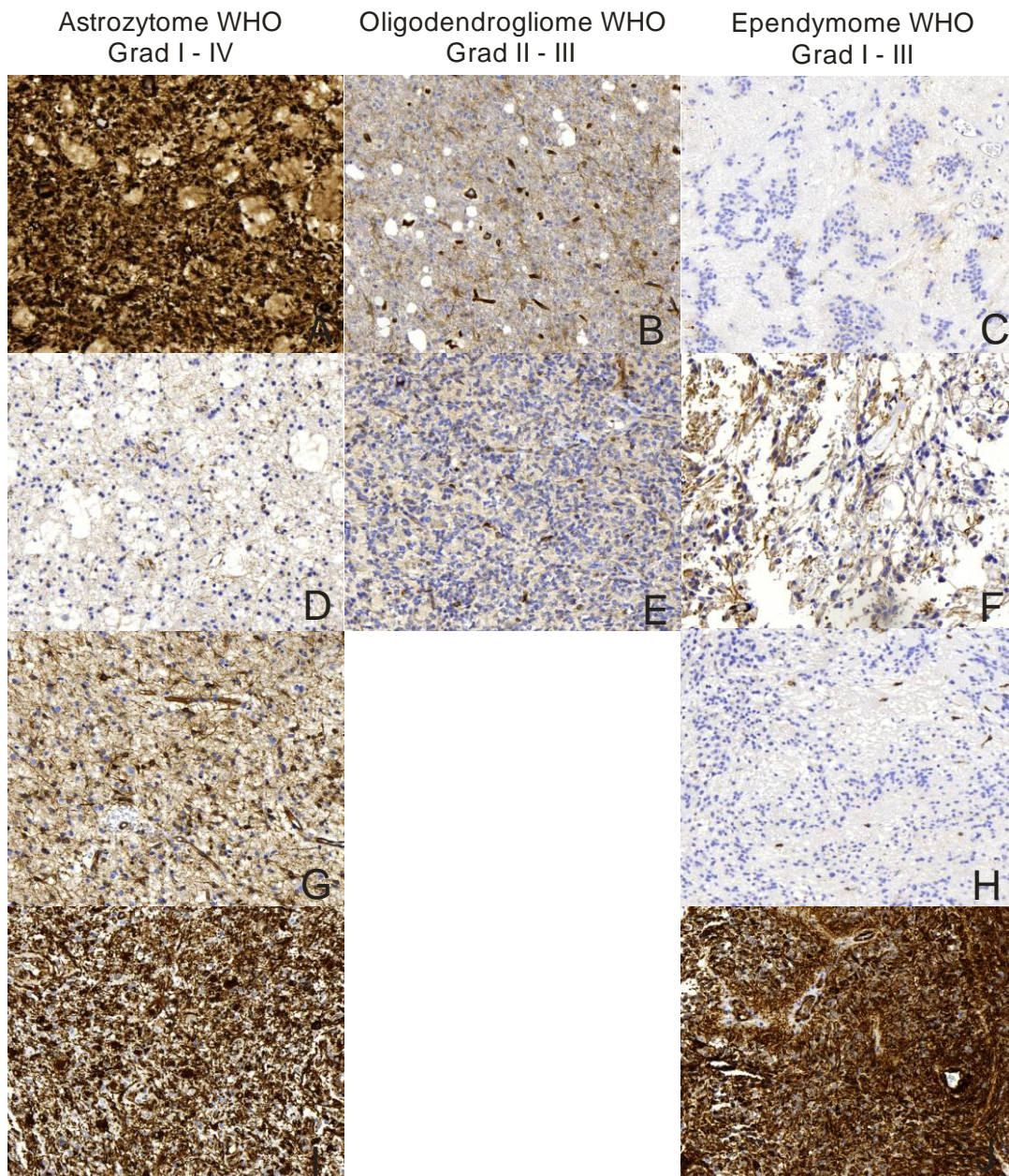


Abbildung 24: Immunhistochemische WT 1 Expression der Tumorentitäten. A: Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I mit starker Expression. B: Klassisches Oligodendrogliom WHO Grad II mit geringer Expression. C: Subependymom WHO Grad I mit geringer Expression. D: Diffuses Astrozytom WHO Grad II mit geringer Expression. E: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit geringer Expression. F: Myxopapilläres Ependymom WHO Grad I mit mittlerer Expression. G: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit mittlerer Expression. H: Klassisches Ependymom WHO Grad II mit geringer Expression. I: Glioblastom WHO Grad IV mit starker Expression. J: Anaplastisches Ependymom WHO Grad III mit starker Expression. Fotografie: Gudrun Albrecht, Neuropathologie Tübingen.

4 Diskussion

Zu Beginn der Diskussion werden die Vor – und Nachteile der TMA Methode skizziert. Anschließend erfolgt eine Einschätzung des Gesamtkollektives unter Berücksichtigung der WHO Klassifikation. Wichtigster Teil ist die Diskussion der einzelnen Antikörper; mit kurzen Schlussfolgerungen zu jedem Antikörper schließt die Diskussion.

4.1 Vor – und Nachteile der TMA Methode

Die Verwendung der Tissue – Microarray – Methode hat einige Vor – und Nachteile, die im Folgenden geschildert werden.

Ein großer Vorteil in der Methode besteht darin, dass abhängig von der Größe des Paraffinblocks bis zu 1000 Tumor – Gewebestücken in einem Microarray gebündelt werden können. In dieser Studie wurden insgesamt 968 Gewebeprobe gebündelt; maximal 98 Stützen pro TMA. Dadurch, dass viele einzelne Flächenschnitte vermieden werden, wird zeiteffizienter ein großes Gewebekollektiv aufgebaut und parallel mit diversen Antikörpern angefärbt. Dies hat zur Folge, dass weniger kostspielige Antikörpersubstanz verbraucht wird und somit Kosten gesenkt werden. Durch größere Fallzahlen können generell validere Ergebnisse hinsichtlich der Signifikanz gemacht werden. Darüber hinaus ist das gestanzte Gewebeareal begrenzt, wodurch in fast allen Fällen ausschließlich Tumorgewebe von normalem Hirngewebe separiert und erfolgreich aufgetragen wurde. Dies war besonders in Fällen, in denen tumorhaltiges Gewebe randständig bzw. in geringen Anteilen vorhanden war, von Vorteil. Bei wenig Ausgangsmaterial stellt sich der Microarray als materialschonendste Methode dar und ist für Gewebeprobe, die referenzpathologisch an andere Institute verliehen werden, zu empfehlen. Es können mit der TMA – Methode bis auf den Faktor 10^4 mehr Färbungen von begrenztem Gewebe gemacht werden, verglichen mit Flächenschnitten (Tissue Microarray Facility, Yale University; Jawhar 2009).

Durch den geringen Durchmesser der Stanzzylinder war ein objektives Auswerten in dieser Studie, auch ohne größere Einarbeitungszeit für eine

Probenfindung, gut durchführbar. Weiterer Vorteil bestand darin, dass alle Proben auf dem Microarray mit demselben Antikörperansatz und Färbeprotokoll gefärbt werden, wodurch eine gleichmäßige Anfärbung und Standardisierung gewährleistet wurde. Weiterhin lässt sich der TMA in verschiedenen Fragestellungen verwenden. Der Microarray kann ungefärbt unproblematisch verschiedenen Laboratorien zugestellt werden, die ihrerseits die Proben immunhistochemisch anfärben. Dies kann zu einer Erleichterung in der Standardisierung bei der Immunhistochemie, der In – situ – Hybridisierung und anderen molekularen Untersuchungen führen und Reproduzierbarkeit zwischen den Laboratorien erleichtern. In der Verwendung bei internen Qualitätskontrollen und der Optimierung von Reagenzien wird dem TMA noch weit mehr Potential eingeräumt, als in seiner momentanen Verwendung (Watanabe et al. 2005; Hsu et al. 2002).

Die Hauptkritik über den TMA bezieht sich auf die geringe Größe der Stanzzyylinder, die bei heterogenen Tumoren wie Prostata – oder Leberkarzinomen keine repräsentative Aussage erlauben. Allerdings haben Studien gezeigt, dass bei doppelter Stanzung des gleichen Tumorgewebes das Ergebnis des TMA mit dem Flächenschnitt nahezu übereinstimmt (Camp et al. 2000; Parker et al. 2002), weshalb in der aktuellen Arbeit, wann immer möglich, zwei Stenzen eines Falles ausgewertet wurden. In unserer Studie wurden in 395 Tumoren zwei Gewebezylinder untersucht, in 173 Tumoren nur ein einziger, so dass insgesamt ein Gesamtkollektiv von 963 Fällen erreicht wurde. Darüber hinaus ist als geringer Nachteile anzusehen, dass die Konstruktion des Microarrays in der mikroskopischen Auswahl, Markierung und dem Stanzen zeitaufwendig ist. Des Weiteren stellt das Schneiden des Paraffinblockes eine gewisse Herausforderung dar und es kann zu Gewebeverlust durch das Schneiden kommen. In dieser Studie kam es insgesamt zu einem Totalausfall (fehlender Zylinder oder minimales Restgewebe) von 138 von 959 (14,4%) Gewebestanzen. In wenigen Fällen kam es zu keiner komplett homogenen Anfärbung des Objektträgers. Die am Rand liegenden Zylinder wurden dabei geringer gefärbt. Ein Objektträger konnte wegen der längeren Lagerungszeit nicht vollständig entparaffiniert werden, so dass in diesem Fall die

Immunhistochemie entfiel. Dies kann jedoch durch Anfertigung frischer Schnitte von TMA – Blöcken umgangen werden.

Insgesamt hat sich die TMA – Methode trotz kleiner Schwächen in dieser Arbeit als außerordentlich praktikabel herausgestellt und bietet für zukünftige Forschungsarbeiten Potential, da die TMA – Blöcke ausreichend Material enthalten.

4.2 Diskussion des Gesamtkollektives

Bevor auf die speziellen Antikörper näher eingegangen wird, muss geklärt werden, inwiefern das Gesamtkollektiv mit den Ergebnissen aus der Literatur (WHO Klassifikation, Louis et al. 2007) übereinstimmt.

Beim Patientenalter entsprach die Tumorauswahl dieser Studie im Großen und Ganzen der Fachliteratur, allerdings lagen die diffusen Astrozytome WHO Grad II etwas über dem Durchschnitt, während die hier ausgewerteten anaplastischen Oligoastrozytome WHO Grad III ein unterdurchschnittliches Alter gegenüber der Norm aufwiesen. Beim Geschlechtsverhältnis wichen klassische Oligodendrogliome WHO Grad II mit deutlicher männlicher Präferenz von der in der Fachliteratur beschriebenen Gleichverteilung ab. Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III weisen nach der WHO Klassifikation statistisch eine geringe männliche Prädominanz auf, bei den hier verwendeten Fällen lag eine weibliche Dominanz vor. Alle anderen Entitäten lagen bezüglich der Geschlechterverteilung in der Norm. Da in der statistischen Auswertung der Antikörper keine relevanten Alters – und Geschlechtsunterschiede beobachtet wurden, sind die Abweichungen von der Literatur hier vernachlässigbar.

Bei der prozentualen Aufteilung der Tumorentitäten am Gesamtkollektiv waren Astrozytome (WHO Grad I bis IV) zu zwei Drittel und Oligodendrogliome (WHO Grad II und III) zu sechs Prozent vertreten und entsprachen damit der WHO Klassifikation. Ependymome (WHO Grad II und III) machten mit 19 Prozent in dieser Studie mehr als den doppelten Anteil an neuroepithelialen Tumoren in der Allgemeinheit aus. Auffallend ist, dass in dieser Studie pilozytische Astrozytome WHO Grad I ein Fünftel aller Fälle ausmachen und damit deutlich mehr als ihr statistischer Anteil (fünf Prozent) gemäß der WHO Richtlinien. Dies

ist dadurch zu erklären, dass extra für diese Studie drei neue TMA konstruiert wurden, um die in der Literatur fehlenden Informationen diesbezüglich zu erweitern und zu gewinnen. Während der Anteil diffuser Astrozytome WHO Grad II an den Astrozytomen realistisch dargestellt wurde, waren anaplastische Astrozytome WHO Grad III und Glioblastome WHO IV unterrepräsentiert. Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III waren mit 47 Prozent an den oligodendroglialen Tumoren deutlich überrepräsentiert im Vergleich zur WHO Norm (20 bis 35%). Myxopapilläre Ependymome WHO Grad I waren mit 22 Prozent Anteil an den Ependymomen deutlich überrepräsentiert, verglichen zur Norm (9 – 13%).

Die Anzahl der in dieser Studie ausgewählten Gliome stellt nicht eine statistisch repräsentative Auswahl dar. Allerdings war dies nicht primär die Absicht, sondern gerade seltenere Tumorentitäten wie pilozytische Astrozytome WHO Grad I, myxopapilläre Ependymome WHO Grad I und anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III wurden gezielt gebündelt, um statistisch aussagekräftige Daten für Gruppenvergleiche zu erhalten. Deshalb sind sie in dieser Studie numerisch überrepräsentiert. Dies trifft auch für das Patientenalter und Geschlechtsverhältnis zu; Fälle mit eindeutigen Tumormerkmalen und ausreichend Gewebe wurden priorisiert.

4.3 Diskussion der Antikörper

4.3.1 GFAP

In den letzten Jahren wurden generell nur noch extrem selten Übersichtsarbeiten über die GFAP Expression in neuroepithelialen Tumoren veröffentlicht. Die meisten Studien liegen mittlerweile Jahrzehnte zurück (Duffy et al. 1977; Rasmussen et al. 1980; Eng et al. 1978; Gullotta et al. 1985). In den wenigen Studien aus den letzten Jahren wurde GFAP stets in Verbindung mit anderen neuronalen Markern oder in Verbindung mit klinischer Therapie untersucht. Methodisch werden in der Immunhistochemie heute oft spezifischere monoklonale Antikörper, automatisierte Verfahren sowie neue

Detektionssysteme (Polymer –, DAB – Methode) verwendet. Diese Studie soll dem genannten Mangel beihelfen.

In der Literatur wird GFAP Expression durchweg in Astrozytomen beschrieben (Oh et al. 1999; Ikota et al. 2006; Jung et al. 2007; Rousseau et al. 2006; Rushing et al. 2009). In der Arbeitsgruppe Oh et al. waren alle (N=23) Glioblastome WHO Grad IV vollständig immunreaktiv, während Metastasen negativ waren. In einer anderen Studie wurden große Unterschiede in der GFAP Expression bei Glioblastomen festgestellt (Jung et al. 2007), von weniger als ein Viertel Anfärbung bis hin zu kompletter Antikörperexpression. In der Arbeitsgruppe Rushing et al. wurde GFAP bei GBM im Durchschnitt in der Hälfte der Tumorzellen exprimiert. Diese Unterschiede sind einerseits durch die verwendete Antikörperverdünnung von GFAP zu erklären. Die Studie Oh et al. verwendete eine 1:600 Verdünnung, wodurch sich eine vollständige Expression erklären lässt; die Arbeitsgruppe Rushing et al. hingegen eine hohe 1:8000 Verdünnung. In unserer Studie wurde eine Verdünnung von 1:4000 verwendet. Die in der Studie Jung et al. aufgetretenen Unterschiede lassen sich andererseits auch dadurch erklären, dass ein gewisser Anteil von stark proliferierenden Glioblastomen mit mehr undifferenzierten Astrozyten weniger GFAP Expression aufweist (Herpers et al. 1986).

In unserer Studie wurde GFAP in über zwei Drittel der Tumorzellen exprimiert. Es wurde keine große Streuung der Werte ermittelt; nur in 16 Prozent der Fälle wurde eine geringe Expression festgestellt (bevorzugt in anaplastischen Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen WHO Grad III). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den alten Studien, in denen GFAP vorgestellt wurde (Duffy et al. 1977; Rasmussen et al. 1980; Eng et al. 1978). In den anderen astrozytären Tumoren wurde eine durchgehend hohe GFAP Immunreaktivität beschrieben. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen dies; in 91 Prozent aller Astrozytome wird viel GFAP exprimiert. Eine Studie aus dem Jahr 1985 über 175 Hirntumore kommt zu dem Schluss, dass GFAP nicht ein spezifischer Astrozytenmarker, sondern vielmehr ein spezifisches Protein für Gliazellen ist. Dies wird dadurch unterstrichen, dass eine hohe Anzahl positiver

neoplastischer Zellen in Ependymomen und Oligodendrogliomen gefunden wurde (Gullotta et al. 1985).

In Oligodendrogliomen wurde in einer anderen Arbeitsgruppe bei 59 Prozent der Fälle Immunreaktivität für GFAP beschrieben (Wharton et al. 1998). In der Arbeitsgruppe Ikota et al. wurde bei Oligodendrogliomen in 54 Prozent der Fälle mehr als ein Viertel der Zellen positiv angefärbt. Darüber hinaus ist die Antikörperexpression zwischen der Tumorgruppe der Astrozytome und der Oligodendrogliome signifikant unterschiedlich (p – Wert=0,0012; Ikota et al. 2006). Auch die Arbeitsgruppe Rousseau et al. zeigte in ihren Ergebnissen 81 Prozent immunnegative Oligodendrogliome. Die frühe Studie von Eng et al. zeigte auf, dass Tumorzellen in Oligodendrogliomen immer negativ für GFAP waren. In der Tat sind zwar bei unseren Ergebnissen keine komplett negativen Fälle für GFAP gefunden worden, allerdings stellten nur 55 Prozent der Oligodendrogliome viel GFAP dar. Sie sind in unserer Auswertung, verglichen an den Immunreaktiven Scores, die schwächste Gruppe für GFAP. Die Expressionsunterschiede zwischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen werden in dieser Arbeit mit hochsignifikantem Niveau bestätigt. In der pathologischen Differentialdiagnostik sind neuroepitheliale Tumore, in denen weniger als 75 Prozent der Tumorzellen immunreaktiv für GFAP sind, schon verdächtig für Oligodendrogliome. Weniger als ein Drittel (31%) der Oligodendrogliome zeigten Mengenscore 4; im Gegensatz zu Astrozytomen (83%).

In Ependymomen wiederum wird eine hohe GFAP Expression in der Literatur durchweg skizziert (Rushing et al. 2009; Rasmussen et al. 1980; Eng et al. 1978). Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt; in 73 Prozent der Ependymome wurde viel GFAP exprimiert. Geringere quantitative Anfärbung von höhergradigen Ependymomen im Vergleich zu niedriggradigen Ependymomen wurde beschrieben (Figarella – Branger et al. 1991). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie.

In der Arbeitsgruppe Mokhtari et al. wurde das mediane Überleben einer GFAP exprimierenden Gruppe (diffuse und anaplastische Astrozytome WHO Grad II und III sowie anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III) einer GFAP –

negativen Gruppe (klassische Oligoastrozytome WHO Grad II) gegenübergestellt. Es wurde kein signifikanter Einfluss (p – Wert= 0,11) der Expression auf das Überleben festgestellt (Mokhtari et al. 2005). Dies wird in unserer Studie für Astrozytome bestätigt. Bei Oligodendrogliomen WHO Grad II wurde in unserer Studie allerdings eine erhöhte GFAP Expression mit einem signifikant längeren Überleben assoziiert (p – Wert= 0,0423). Möglicherweise enthielt das Gewebe mit überdurchschnittlicher GFAP Expression im Vergleich mehr reaktives ZNS – Gewebe statt Tumorgewebe. Darüber hinaus wäre auch ein verstärktes Auftreten von IDH 1 – positiven Fällen in dieser Gruppe eine Erklärung für die signifikant verlängerte Überlebenszeit (Hartmann et al. 2009). Dieses Ergebnis sollte dennoch aufgrund der geringen Fallzahl kritisch gesehen werden, weiterführende Studien mit größerer Fallzahl werden angeraten.

GFAP ist aus der neuropathologischen Diagnostik inzwischen nicht mehr wegzudenken. Besonders der Vorteil, dass durch die Expression Metastasen, Meningeome und Neurinome klar ausgeschlossen werden, unterstreicht die Anwendung (Zeltner 2010; Rasmussen et al. 1980). Potential besitzt der Antikörper im Ausschluss von Oligodendrogliomen, allerdings sollten zur klaren Diagnosefindung, besonders bei Entitäten mit astrozytärer Komponente oder zur Abgrenzung Astrozytom vs. Ependymom, weitere Hilfsmittel hinzugezogen werden.

4.3.2 MAP – 2

Betrachtet man die MAP – 2 Expression bei hirneigenen Gliomen im Allgemeinen, so wurde bei der Mehrzahl der Neoplasien in der Literatur eine Anfärbung gefunden. Bei einer Studie aus dem Jahr 2001 wiesen 85 Prozent aller Gliome, bei einer weiteren Studie des Jahres 2004 90,4 Prozent aller Gliome eine Immunreaktivität von MAP – 2 auf (Blümcke et al. 2001; Blümcke et al. 2004); allerdings gehen beide Studien weder auf die MAP – 2 Intensität noch auf den Immunreaktiven Score näher ein. Bei der Studie aus dem Jahr 2001 besaßen astrozytäre Gliome (diffuse Astrozytome WHO Grad II, anaplastische Astrozytome WHO Grad III und Glioblastome WHO Grad IV) einen moderaten Anteil (weniger als 50 Prozent) von Färbung für MAP – 2. Dies

deckt sich mit den Ergebnissen in dieser Studie, wo bei Astrozytomen in der Mehrheit (61 Prozent) weniger als die Hälfte des Tumorgewebes MAP – 2 exprimierte. Die Studie aus dem Jahr 2004 unterscheidet zwischen pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I und der Tumorgruppe diffuser Gliome. Erstere wiesen demnach nur in einer Subpopulation ihres Tumorgewebes MAP – 2 Expression auf und unterschieden sich morphologisch durch feine zelluläre Verzeigungen im Anfärbemuster. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen; pilozytische Astrozytome wiesen in der Mehrheit der Fälle (55%) wenig Expression auf, verglichen mit diffusen Astrozytomen WHO Grad II, die in 70 Prozent viel MAP – 2 exprimierten. Darüber hinaus wird die Auffassung der Studie des Jahres 2004 hinsichtlich des morphologischen Expressionsmusters bei malignen Gliomen WHO Grad III und IV, die in der Studie mit einer verschwommenen, unscharfen Anfärbung aufgrund ansteigender Färbung der Tumormatrix beschrieben werden, nur teilweise bestätigt. Zwar wurde auch in dieser Studie eine gewisse unscharfe Färbung mit MAP – 2 bestätigt, allerdings wiesen höhergradige Gliome einen niedrigeren Immunreaktiven Score als geringgradige Gliome auf und wiesen mehrheitlich wenig Antikörpermenge nach (Blümcke et al. 2004).

Bei Oligodendrogliomen (WHO Grad II und III) und Mischgliomen (WHO Grad II und III) wurde im Jahr 2001 in der Mehrheit der Menge des Gewebes Expression von MAP – 2 festgestellt (größer 50%), ebenso in der Studie aus dem Jahr 2004 (bei 99,6%). Dies wurde in dieser Studie bestätigt, nur in wenigen Fällen wurde kein MAP – 2 exprimiert (3,57%).

Bei den Ependymomen wurde bei der Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2001 (Blümcke et al. 2001) in keinem Tumor eine signifikante Fraktion an MAP – 2 Färbung festgestellt. Blümcke et al. aus dem Jahr 2004 stellten bei 30 Prozent der Ependymome eine Immunreaktivität dar. In dieser Studie waren knapp drei Viertel der Ependymome negativ für MAP – 2, lediglich vier Prozent der Fälle wiesen viel MAP – 2 auf; Daten aus den früheren Studien deckten sich bei dieser Tumorgruppe mit unserer Studie.

Es stellte sich die berechtigte Frage, ob MAP – 2, welches bei Oligodendrogliomen am stärksten exprimiert wurde, zur Differenzierung

gegenüber Astrozytomen oder Ependymomen als sinnvolles Mittel dient. In der Literatur wird MAP – 2 als erweitertes Hilfsmittel zur Unterscheidung zwischen einerseits prominent exprimierenden Entitäten wie Oligodendrogliomen und in abgeschwächter Form bei Astrozytomen gegenüber Tumoren, die fast vollständig negativ für MAP – 2 sind (Ependymome, gutartige glio – neuronale Tumore) in Betracht gezogen (Blümcke et al 2001/2004). Bei unserer Untersuchung erwies sich MAP – 2 als gutes Unterscheidungsmittel zwischen Ependymomen und anderen neuroepithelialen Tumoren. Zur Unterscheidung von Astrozytomen (WHO Grad I bis IV) gegenüber Oligodendrogliomen ist MAP – 2 durch ein ähnliches Expressionsmuster eher nicht geeignet. Mit dieser aktuellen Studie wurde somit erstmalig MAP – 2 in einem anderen Labor immunhistochemisch wissenschaftlich in einer Übersichtsarbeit bei neuroepithelialen Tumoren analysiert.

In unserer Studie korrelierte überdurchschnittliche MAP – 2 Expression nicht mit einer signifikant veränderten Überlebenszeit. Allerdings sollten, wegen geringer Fallzahlen, bei Oligodendrogliomen (WHO Grad II und III) Studien mit größeren Fallzahlen bei der Beurteilung dieser Fragestellung hinzugezogen werden. Überlebensanalysen wurden bisher mit MAP – 2 nicht gemacht, so dass diese Resultate neu sind und in anderen Studien noch validiert werden müssen. Erwähnenswert ist, dass eine klare MAP – 2 Expression in der neuralen Komponente von Gangliogliomen beobachtet wurde (Duggal et al. 2002).

Die in dieser Studie erbrachten Ergebnisse decken sich mit älteren Erkenntnissen und bestätigen, dass MAP – 2 Expression in Verbindung mit GFAP Expression als Ausschlusskriterium für Ependymome in Erwägung gezogen werden sollte.

4.3.3 NOGO – A

Eine zentrale Frage bezüglich des relativ jungen NOGO – A Antikörpers in der Literatur war, ob NOGO – A ein hilfreiches Instrument zur Diagnose bei Oligodendrogliomen und zur signifikanten Unterscheidung von anderen Gliomen ist (Marucci et al. 2011; Kuhlmann et al. 2008; Jung et al. 2011). In der Studie aus dem Jahr 2008 wurde bei der Mehrheit der Oligodendrogliome

(WHO Grad II 67% der Fälle, WHO Grad III 77% der Fälle) viel (>50% des Gewebes) NOGO – A nachgewiesen. Bei der Arbeitsgruppe Marucci et al. zeigte die Tumorgruppe der Oligodendrogliome dagegen mehrheitlich (66%) wenig Antikörpermenge. In der Studie des Arbeitskreises Jung 2011 wurde in einer gewissen Mehrheit der Oligodendrogliome (52,2% total, WHO Grad II 46,2%, WHO Grad III 60%) viel NOGO – A analysiert. Dieses heterogene Erscheinungsbild wird durch diese Studie bestätigt. Die Tumorgruppe der Oligodendrogliome exprimierte in 55 Prozent der Fälle wenig NOGO – A. Allerdings gibt es eine Tendenz zu gesteigerter Expression mit Zunahme des WHO Grades. Während klassische Oligodendrogliome WHO Grad II in drei Viertel der Fälle wenig NOGO – A exprimierten, zeigten anaplastische Oligodendrogliome (59%) und anaplastische Oligoastrozytome (66%) mehrheitlich viel NOGO – A. In unserer Studie wurde darüber hinaus ein signifikant unterschiedlicher Immunreaktiver Score in der Tumorgruppe der Oligodendrogliome hinsichtlich des MIB 1 Proliferationsindex festgestellt ($p=0,0220$), was ein weiterer Beleg für die divergierende Expression ist.

In Astrozytomen des WHO Grad II und III wurde im Jahr 2008 in allen Fällen wenig NOGO – A Expression gefunden. Die astrozytären Tumore der Arbeitsgruppe Marucci besaßen in 92 Prozent wenig NOGO – A; in der Studie von Jung et al. wurde wenig NOGO – A in 86 Prozent der Fälle beschrieben. Die Ergebnisse dieser Studie waren den Angaben aus der Literatur gegenläufig: bei der Tumorgruppe der Astrozytome wurde in der großen Mehrheit der Gewebeproben (86%) viel NOGO – A nachgewiesen. Bei den Glioblastomen wurde zwar bei Kuhlmann et al. in einigen Fällen (24%) über viel Antikörpermenge berichtet, in unseren Ergebnissen besaß hingegen eine deutliche Mehrheit (drei Viertel) der Glioblastome viel Expression.

Im Allgemeinen wurde NOGO – A in unserer Studie deutlich mehr in Astrozytomen als in Oligodendrogliomen exprimiert; in der Literatur wurde der opponierte Fall beschrieben.

In Ependymomen wurde in der Literatur wenig bis fehlende Expression von NOGO – A beschrieben; die größte Antikörpermenge wurde in anaplastischen Ependymomen WHO Grad III festgestellt (Marucci et al. 2011; Kuhlmann et al.

2011). In unserer Studie wurde in der Tumorgruppe der Ependymome in der großen Mehrheit (80%) viel NOGO – A Expression analysiert. Somit können die Ergebnisse älterer Studien nicht bestätigt werden. Möglicher Grund dafür ist in der niedrigen Fallzahl der Vergleichsstudien zu sehen. Während in dieser Studie insgesamt 568 neuroepitheliale Tumore untersucht wurden, lagen in den anderen Berichten 148, 98 sowie 58 Proben vor. Eine weitere Erklärung ist, dass im Vergleich zu unserer Studie (1:200) NOGO – A zu gering titriert war (Marucci 1: 500; Jung 1: 400; Kuhlmann 1: 750) und dadurch bei Astrozytomen und Ependymomen geringer exprimiert wurde.

Um auf den wesentlichen Gesichtspunkt, das Potential von NOGO – A zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Tumorgruppen, einzugehen, wurde NOGO – A in vorangegangenen Studien als zuverlässigster Antikörper zur Unterscheidung von Oligodendrogliomen zu Astrozytomen und Ependymomen gesehen (Marucci et al. 2011), allerdings korreliert die Expression nicht mit dem 1p/19q Status, weder in Oligodendrogliomen noch in Astrozytomen (Kuhlmann et al. 2008). Die Arbeitsgruppe Jung et al. kommt zu dem Schluss, dass NOGO – A nicht als spezifischer Marker für Oligodendrogliome dient. Die Ergebnisse unserer Untersuchung kommen, wie oben erläutert, zu einigen unterschiedlichen Ergebnissen, obwohl wir zustimmen, dass NOGO – A kein spezifischer Marker für Oligodendrogliome ist. In der Literatur wurde nur auf die exprimierte Antikörpermenge von NOGO – A eingegangen. Allerdings sollte man den Immunreaktiven Score, in den sowohl Menge als auch Intensität der Expression eingehen, als entscheidendes Kriterium zum Vergleich heranziehen. Demnach waren alle Tumorgruppen hochsignifikant zueinander unterschiedlich (p – Wert < 0,0001).

Die Stärke der NOGO – A Expression hatte nach unseren Ergebnissen keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Die Ergebnisse der Tumorgruppe der Oligodendrogliome sollten aufgrund geringer Fallzahlen mit Vorsicht gesehen werden. Zukünftige Studien mit größeren Kollektiven können in diesem Punkt weitere Erkenntnisse bringen.

NOGO – A kann in Zukunft zur groben Unterscheidung zwischen den Tumorgruppen dienen, sollte allerdings stets in Berücksichtigung weiterer

diagnostischer Marker verwendet werden, weil er nicht spezifisch für eine Tumorentität ist (Jung et al 2011).

4.3.4 OLIG – 2

OLIG – 2 wurde bereits als immunhistochemischer Marker für Zellen oligodendroglialen Ursprungs beschrieben, der in allen Gliomen des Erwachsenenalters exprimiert wird (Otero et al. 2011). Darüber hinaus deutet eine doppelte Immunfärbung von OLIG – 2 und EGFR auf glialen Ursprung der Tumorzellen hin; dies trat insbesondere bei proliferierenden Zellen von niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen auf (Burel – Vandenbos et al. 2011). Zentrale Fragestellung ist, inwiefern OLIG – 2 zur Diagnostik von anderen neuroepithelialen Tumoren dient und diese zu unterscheiden hilft.

In Oligodendrogliomen wurde in der großen Mehrheit viel OLIG – 2 exprimiert (Preusser et al. 2007; Ligon et al. 2004). So wiesen in der Studie der Arbeitsgruppe Preusser et al. und Ligon et al. 100 Prozent, in der Studie Marucci et al. allerdings nur 49 Prozent aller Oligodendrogliome viel OLIG – 2 auf. In unserer Studie wurde bei der Tumorgruppe der Oligodendrogliome viel OLIG – 2 Expression in einer leichten Mehrheit der Fälle (52%) festgestellt. Entgegen mehrerer früherer Studienergebnisse konnten wir eine deutliche Prädominanz von OLIG – 2 für Oligodendrogliome nicht feststellen. Eine Studie aus dem Jahr 2004, die Tumorentitäten mit einem Immunreaktiven Score (Multiplikation des Mengenscores 0 – 3 mit Intensitätsscores 0 – 3) bewertet, kommt zu dem Schluss, dass die Tumorgruppe der Oligodendrogliome am deutlichsten OLIG – 2 exprimiert. Sie unterscheidet sich signifikant (p – Wert=0,001) von der Gruppe der Astrozytome, die einen deutlich geringeren Wert aufweist (Yokoo et al. 2004). Verglichen mit den Ergebnissen unserer Studie stellte sich zwar auch ein hochsignifikanter Unterschied (p – Wert<0,0001) zwischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen heraus, allerdings begründete sich der signifikante Unterschied mit der unterschiedlichen Expression in den einzelnen Tumorentitäten.

Pilozytische Astrozytome WHO Grad I zeigten in 40 Prozent der Fälle viel OLIG – 2, gefolgt von diffusen Astrozytomen WHO Grad II und Glioblastomen WHO

Grad IV, im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III, die nur noch in 25 Prozent der Fälle viel OLIG – 2 vorwiesen. Im Vergleich besaßen Oligodendrogliome Grad II in einem Drittel der Gewebeproben viel OLIG – 2, während anaplastische Oligodendrogliome (63%) und Mischgliome (100%) in der Mehrheit viel OLIG – 2 exprimierten. Astrozytome exprimierten OLIG – 2 in der Summe nur geringfügig stärker als Oligodendrogliome. Eine Studie aus dem Jahr 2006 kommt zu dem Schluss, dass Oligodendrogliome und Astrozytome sich in der OLIG – 2 Expression nicht signifikant unterscheiden (Rousseau et al. 2006).

Dass OLIG – 2 abgeschwächt in Astrozytomen exprimiert wird, darüber sind sich weitgehend alle Studien einig. In der Arbeitsgruppe Marucci et al. exprimierten 58 Prozent der Astrozytome wenig OLIG – 2 (Marucci et al. 2011). Dies wird auch in einer anderen Studie bestätigt, in der sich zwar alle Astrozytome immunreaktiv darstellten, allerdings im Durchschnitt wenig OLIG – 2 exprimierten (Ligon et al. 2004).

Bei der Arbeitsgruppe Tanaka et al. wurde ein signifikanter Unterschied (p – Wert $<0,001$) in der OLIG – 2 Expression bei pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I gegenüber diffusen Astrozytomen WHO Grad II festgestellt. In dieser Studie zeigten pilozytische Astrozytome in 47 Prozent der Fälle, besonders Areale mit morphologischer oligodendroglialer Komponente, OLIG – 2 Expression, diffuse Astrozytome im Vergleich dazu in 13 Prozent (Tanaka et al. 2008).

Dieser klare Unterschied wurde in unserer Studie nicht bestätigt. Grad II Astrozytome (Mittelwert 1,8) exprimierten gering weniger als Grad I Astrozytome (Mittelwert 2,09).

In ependymalen Tumoren wurde eine geringe bzw. fehlende OLIG – 2 Expression beschrieben (Otero et al. 2011; Ligon et al. 2004). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen; zwei Drittel der Ependymome wies keine Immunreaktivität auf.

OLIG – 2 wird auch als nützlicher immunhistochemischer Marker zur Differentialdiagnose von klarzelligen primären Neoplasien des ZNS gesehen (Preusser et al. 2007). In den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Lu et al. wurde

kein signifikanter Unterschied zwischen Glioblastomen WHO Grad IV und Oligodendrogliomen festgestellt (Lu et al. 2001). In unserer Studie war der Wert des Immunreaktiven Scores bei der Tumorgruppe der Oligodendrogliome und bei Glioblastomen gleich. Der ermittelte signifikante Unterschied (p – Wert= 0,0218) zwischen diesen beiden Gruppen ist durch eine größere Streuung bei Oligodendrogliomen, bedingt durch den WHO Grad, zu erklären, obwohl beide den gleichen numerischen Score besitzen. Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse aus der oben genannten Studie (Lu et al. 2001) sollte daher OLIG – 2 nicht zur Unterscheidung zwischen GBM und Oligodendrogliomen verwendet werden.

Alle anderen Tumorgruppen (niedriggradige Astrozytome, Ependymome) sind voneinander und zu Oligodendrogliomen bei der Antikörperexpression hochsignifikant (p – Wert< 0,0001) unterschiedlich; dies wird in der Literatur bestätigt (Ligon et al. 2004).

In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2012 wird bei Glioblastomen WHO Grad IV mit überdurchschnittlicher OLIG – 2 Expression ein signifikant längeres Überleben (p – Wert= 0,0181) festgestellt. Diesem Subtyp wird eine Abstammung von oligodendroglialen Vorläuferzellen attestiert (Motomura et al. 2012). In dieser Studie lassen sich die genannten Erkenntnisse nicht bestätigen. Der Grad der OLIG – 2 Expression hatte bei keiner Tumorentität signifikanten Einfluss auf das Überleben. Eine weitere Studie, die sich mit der OLIG – 2 Expression und dem Überleben bei Ependymomen (WHO Grad II und III) befasst, ist mit unserer Studie im Einklang; es wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt (Zawrocki et al. 2011).

Somit sollte OLIG – 2 nicht als alleiniger spezifischer Marker für Oligodendrogliome verwendet werden, kann jedoch zur Abgrenzung gegenüber schwach OLIG – 2 exprimierenden Tumorentitäten (Ependymome, zentrale Neurozytome WHO Grad II, Meningeome etc.) herangezogen werden. Er sollte stets in Kombination mit weiteren Markern angewendet werden.

4.3.5 WT – 1

In früheren Studien wurde bei höhergradigen Astrozytomen (WHO Grad III und IV) eine gesteigerte Expression von WT – 1 gegenüber niedriggradigen Astrozytomen festgestellt (Rushing et al. 2009; Bourne et al. 2010; Hashiba et al. 2007; Oji et al. 2004; Schittenhelm et al. 2009). Während in normalem Hirngewebe WT – 1 ausschließlich auf Endothelzellen begrenzt war, wurde in der Studie Rushing et al. in allen Gliomen Antikörperexpression nachgewiesen. Glioblastome WHO Grad IV und anaplastische Astrozytome WHO Grad III zeigten eine signifikant stärkere Immunreaktivität als niedriggradige Astrozytome (WHO Grad I und II), bedingt durch gesteigerte Proliferation (Rushing et al. 2009). Auch in einer anderen Arbeitsgruppe wurden hohe Expressionen bei GBM und anaplastischen Astrozytomen nachgewiesen; ein hochsignifikanter Zusammenhang (p – Wert < 0,001) mit dem Maß der Proliferation (MIB 1 Anfärbung) wurde analysiert. Pilozytische Astrozytome und subependymale Riesenzellgliome WHO Grad I zeigten ein hohes Maß an WT – 1 Expression; allerdings wurden nur wenige Tumore untersucht (Hashiba et al. 2007). Auch in der Studie Oji et al. wurde vermehrte WT – 1 Expression mit höhergradigen Gliomen in Verbindung gebracht. Dies deckt sich im Groben mit den Ergebnissen unserer Studie. Der höchste Immunreaktive Score wurde bei der Tumorgruppe der Astrozytome (im Besonderen WHO Grad I und IV) festgestellt. Es gab darüber hinaus beträchtliche Unterschiede in der Immunreaktivität; pilozytische Astrozytome und GBM exprimierten signifikant mehr WT 1 als diffuse bzw. anaplastische Astrozytome. Ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate und der Antikörperexpression wurde bei neuroepithelialen Tumoren im Allgemeinen (p – Wert < 0,0001) und in der Tumorgruppe der Ependymome (p – Wert < 0,0001) festgestellt, bei Astrozytomen bestätigte sich keine Korrelation. Niedriggradige Astrozytome wurden besonders in der Arbeitsgruppe Schittenhelm aus dem Jahr 2009 untersucht. In pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I wurden in 67 Prozent, in diffusen Astrozytomen WHO Grad II in 53 Prozent der Fälle positive Zellen festgestellt. In dieser Studie wurde WT – 1 bei beiden Entitäten häufiger exprimiert.

In Oligodendrogliomen wurde WT – 1 bei unserer Auswertung in sehr geringen Mengen exprimiert. 35 Prozent aller Oligodendrogliome waren immunnegativ. Zwischen dem WHO Grad II und III konnte kein signifikanter Unterschied bzw. Zusammenhang mit der Proliferationsrate bemerkt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Schittenhelm et al. 2009. In den anderen Studien wurde meist eine zu geringe Fallzahl ($N < 10$) untersucht, um valide Daten zu erzielen. Die Arbeitsgruppe Hashiba et al. 2007 beschrieb moderate und starke Expression bei Oligoastrozytomen (WHO Grad II und III), wobei hierfür die astrozytäre Komponente verantwortlich gemacht werden sollte. Diese Tumorgruppe ließ sich durch die sehr geringe Färbung mit WT – 1 hochsignifikant zu Astrozytomen und Ependymomen abgrenzen.

Bei Ependymomen wurde in der Literatur ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression und Malignität beschrieben (Hashiba et al. 2007; Schittenhelm et al. 2009). Klassische Ependymome WHO Grad II zeigten gegenüber myxopapillären und anaplastischen Ependymomen den geringsten Score in der Klasse (Schittenhelm et al. 2007). Dies deckt sich mit den hier geschilderten Ergebnissen.

Eine Studie aus dem Jahr 2010 kommt zu dem Schluss, dass bei Glioblastomen WHO Grad IV eine hohe WT – 1 Expression nach Immunotherapie sowohl mit einem längeren Zeitraum ohne Progression (p – Wert= 0,022), als auch mit einem längeren Gesamtüberleben (p – Wert= 0,035) signifikant korreliert. Der MIB 1 Proliferationsindex besitzt keinen prognostischen Aussagewert (Chiba et al. 2010). Unsere Ergebnisse bestätigen nicht die Aussage der Arbeitsgruppe Chiba et al. Die WT – 1 Expression hatte keine signifikante Auswirkung auf das Überleben in allen Tumorentitäten.

WT – 1 wird also in Astrozytomen und Ependymomen im hochsignifikanten Zusammenhang mit der Proliferationsrate exprimiert und ist besonders als Hilfsmittel zum Ausschluss von Oligodendrogliomen geeignet. Zur Unterscheidung innerhalb der astrozytären Entitäten selbst ist WT – 1 nur eingeschränkt nutzbar, weitere immunhistochemische Marker wie MIB – 1 sind hier aussagekräftiger.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit den Resultaten dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass

1. GFAP die höchste Immunreaktivität bei allen hirneigenen Tumoren aufweist. Astrozytome, besonders pilozytische Astrozytome WHO Grad I, zeigen hohe Expressionswerte. Innerhalb der Tumorgruppe der Astrozytome korreliert die Antikörperexpression signifikant mit der Proliferationsrate; Glioblastome WHO Grad IV sind schwächer immunreaktiv als geringgradige Astrozytome. GFAP hat sich durch hohe Expression in Ependymomen und mittlere Anfärbung in Oligodendrogliomen als spezifischer Marker für Gliazellen, allerdings nicht für Astrozyten, aufs Neue bestätigt. GFAP lässt sich zur Abgrenzung gegenüber Metastasen, Meningeomen und z.B. Neurinomen verwenden. Es hat darüber hinaus ein gewisses Potential, Oligodendrogliome auszuschließen.
2. MAP – 2 sich durch bestenfalls moderate Immunreaktivität (mehrheitlich schwache Intensität und wenig Antikörpermenge) in Oligodendrogliomen als auch in Astrozytomen auszeichnet. In Oligodendrogliomen (besonders WHO Grad III) ist MAP – 2 am deutlichsten. Eine gewisse Ausnahme stellen diffuse Astrozytome WHO Grad II dar, sie zeigen viele MAP – 2 positive Zellen. Durch fehlende Expression in Ependymomen ist MAP – 2 ein guter glioneuronaler Marker zur Ausschlussdiagnostik. Astrozytome und Oligodendrogliome lassen sich allerdings in der pathologischen Diagnostik alleine auf Grund der MAP – 2 Expression nicht sicher trennen, hier ist die morphologische Beurteilung der MAP – 2 Verteilung in den Zellen relevant.
3. NOGO – A in allen drei Tumorgruppen, Astrozytome, Ependymome, Oligodendrogliome, absteigend in angegebener Reihenfolge exprimiert wird. In den beiden letzteren Gruppen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen gesteigerter NOGO – A Expression und

erhöhter Proliferationsrate analysiert. WHO Grad III Tumore sind demnach im Vergleich zu WHO Grad II immunreaktiver; dies sollte auch in der Diagnostik berücksichtigt werden. Eine Prädominanz von NOGO – A für Oligodendrogliome, wie in Vergleichsstudien beschrieben, konnte in unserer Studie nicht nachvollzogen werden. Astrozytome imponierten sogar als deutlichste Gruppe für NOGO – A. Somit hat NOGO – A kein eindeutiges Unterscheidungspotential und bringt, unserer Erkenntnis nach, bei der Verwendung in einem Immunhistochemie – Panel die wenigsten weiterführenden Erkenntnisse. Bei Anwendung sollte daher auf andere diagnostische Hilfsmittel zurückgegriffen werden.

4. OLIG – 2 von allen fünf Antikörpern generell den schwächsten Immunreaktiven Score in glialen Tumoren aufweist. Eine Prädominanz für Oligodendrogliome konnte in unserer Studie nicht festgestellt werden. Anaplastische Oligodendrogliome WHO Grad III und pilozytische Astrozytome WHO Grad I imponierten mit der kräftigsten Expression. Im Allgemeinen gestaltet sich eine Unterscheidung von Astrozytomen und Oligodendrogliomen, die ähnliches Immunverhalten zeigten, schwierig. Deutlich abgrenzen lassen sich hingegen Ependymome, die wie bei MAP – 2 auch fast durchgängig immunonegativ waren; dies stellt einen Vorteil von OLIG – 2 dar.
5. WT – 1 am deutlichsten in Astrozytomen, gefolgt von Ependymomen, exprimiert wird. Innerhalb dieser Tumorguppen gibt es deutliche Unterschiede. Pilozytische Astrozytome WHO Grad I und Glioblastome WHO Grad IV grenzten sich mit deutlich stärkerer Immunreaktivität gegenüber diffusen und anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad II und III) ab. In der Gruppe der Ependymome bestand signifikanter Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und WT – 1 Expression, so dass anaplastische Ependymome WHO Grad III sich mit aller Deutlichkeit von geringgradigen Ependymomen unterschieden.

Oligodendrogliome exprimierten sehr schwach und können mit WT – 1 leichter erkannt werden.

5 Zusammenfassung

Die Proteine GFAP, MAP – 2, NOGO – A, OLIG – 2 und WT – 1 werden von neuroepithelialen Tumoren in unterschiedlicher Stärke und Menge exprimiert. Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsverhalten mittels Antikörperexpression in den verschiedenen Tumorentitäten quantitativ und qualitativ zu vergleichen und zu beurteilen. Des Weiteren sollte der Neuropathologie im Hinblick der häufig schwierigen Unterscheidung zwischen den glialen Tumorentitäten ein solider Überblick über Potential und Differenzierung der Antikörper gegeben werden.

Diese vorliegende Studie untersuchte das Expressionsverhalten der Antikörper in Tumoren mit der Diagnose Glioblastom, Astrozytom, Oligodendrogliom oder Ependymom unterteilt nach den aktuellen WHO Graden.

Es wurde paraffineingebettetes Gewebe von 424 Astrozytomen (Grad I: 117 Fälle, Grad II: 83 Fälle, Grad III: 76 Fälle, Grad IV: 148 Fälle), 36 Oligodendrogliomen (Grad II: 16 Fälle, Grad III: 20 Fälle) sowie 106 Ependymomen (Grad I: 33 Fälle, Grad II: 49 Fälle, Grad III: 24 Fälle) immunhistochemisch untersucht.

Die Gewebeproben wurden auf 14 Tissue Microarrays gebündelt und mittels Immunhistochemie parallel angefärbt.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass GFAP von allen neuroepithelialen Tumoren exprimiert wird. In Astrozytomen und Ependymomen zeigte sich ein hohes, in Oligodendrogliomen ein mittleres Expressionsniveau. GFAP besitzt zwar die Kriterien eines spezifischen Markers für Gliazellen, wird allerdings nicht nur in Astrozyten exprimiert. GFAP eignet sich besonders, um Metastasen, Meningeome und Neurinome von hirneigenen Tumoren abzugrenzen.

MAP – 2 wird generell schwächer exprimiert, am deutlichsten in Oligodendrogliomen. Ependymome sind in der Mehrheit immunonegativ, so dass diese bei MAP – 2 Positivität klar ausgeschlossen werden können. Zur Unterscheidung zwischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen ist MAP – 2 alleine nicht geeignet.

NOGO – A wird von allen Tumorgruppen exprimiert, am deutlichsten von Astrozytomen. Dadurch, dass NOGO – A in dieser Studie kein überzeugendes Differenzierungspotential zwischen den Tumorentitäten aufwies, ist der diagnostische Einsatz in der Routine fraglich.

OLIG – 2 wird im Allgemeinen nur in mäßiger Stärke nukleär exprimiert. Eine Prädominanz für Oligodendrogliome wird nicht bestätigt. Astrozytome besitzen ein ähnliches Immunverhalten wie Oligodendrogliome, lassen sich allerdings eindeutig von immunonegativen Ependymomen abgrenzen.

Bei der WT – 1 Expression gibt es innerhalb der Tumorgruppe der Astrozytome (Grad I und IV: deutliche, Grad II und III: mäßige Immunreaktivität) und innerhalb der Gruppe der Ependymome (Grad III: deutliche, Grad I und II: mäßige Reaktivität) erkennbare Unterschiede. Oligodendrogliome waren schwach immunreaktiv und gut abgrenzbar.

Das Maß der Antikörperexpression hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten.

6 Literaturverzeichnis

- Azzarelli B, Rekate HL, Roessmann U (1977). „Subependymoma: a case report with immunohistochemical, ultrastructural and proliferation studies. *Acta Neuropathol* 40: S. 279 – 282.
- Berling B, Wille H, Roll B, Mandelkow EM, Garner C, Mandelkow E. „Phosphorylation of microtubule – associated proteins MAP2a, b and MAP 2c at Ser136 by proline – directed kinases in vivo and in vitro. *Eur J Cell Biol* 1994; 64: S. 120 – 130.
- Blümcke I, Müller S, Buslei R, Riederer BM, Wiestler OD. “Microtubule-associated protein-2 immunoreactivity: a useful tool in the differential diagnosis of low-grade neuroepithelial tumors.” *Acta Neuropathol.* 2004;108(2): S. 89 – 96.
- Blümcke I, Becker AJ, Normann S, Hans V, Riederer BM, Krajewski S, Wiestler OD, Reifenberger G (2001). „Distinct Expression Pattern of Microtubule – Associated Protein – 2 in Human Oligodendrogliomas and Glial Precursor Cells.“ *J Neuropathol Exp Neurol*;60; S. 984 – 993.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001). „Pathologie. Nephroblastom“ Urban & Fischer Verlag München. 2. Auflage; S. 899 – 900.
- Boenisch T (2003). „Handbuch Immunchemische Färbemethoden.“ Dako Cytomation GmbH. 3. Auflage.
- Bourne TD, Elias WJ, Lopes MBS, Mandell JW (2010). “WT1 Is Not a Reliable Marker to Distinguish Reactive from Neoplastic Astrocyte Populations in the Central Nervous System.” *Brain Pathology*; 20: S. 1090 – 1095.
- Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M (2005). "Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair.“ *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102(50); S. 18183 – 18188.
- Burel – Vandenbos F, Benchetrit M, Miquel C, Fontaine D, Auvergne R, Cebrun – Frenay C, Cardot – Leccia N, Michiels JF, Paquis – Fluchlinger V, Virolle T (2011). “EGFR immunolabeling pattern may discriminate low – grade gliomas from gliosis.” *J Neurooncol*; 102: S. 171 – 178.
- Burger PC, Kleihues P (1989). „Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer* 63: S. 2014 – 2023.
- Burger PC, Green SB (1987): “Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme”, *Cancer*; 59: S. 1617 – 1625.
- Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS (2002). „The brain – tumors.“ In: *Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings*, 4th edn. PC Burger, FC Vogel (eds), S. 160–378. Elsevier: Oxford.
- Buss A, Sellhaus B, Wolmsley J, et al. “Expression pattern of Nogo – A protein in the human nervous system. *Acta Neuropathol.* 2005; 110: S. 113 – 119.

- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachmann D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W (2006). "Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma": Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 24: S. 2707 – 2714.
- Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins E, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M (2013). "Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long – term results of RTOG 9402." *J Clin Oncol* 31(3); S. 337 – 343.
- Camp RL, Charette LA, Rimm DL. "Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma." *Lab Invest.* 2000;80: S.1943 – 1949.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (2006). <http://www.cbtrus.org>.
- Cervoni L, Celli P, Caruso R, Gagliardi FM, Cantore GP (1997). [Neuronimas and ependymomas of the cauda equine. A review of the clinical characteristics]. *Minerva Chir* 52: S. 629 – 633.
- Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RSE, Isaac JTR, Galdzicki Z, Haydar TF (2010). "Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome." *Nat. Neurosci.* 13(8); S. 927 – 934.
- Chen M, Huber AB, van der Haar M, et al. „Nogo – A is a myelin – associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN – 1. *Nature.* 2000;403: S. 434 – 439.
- Chen Y, Tang X, Cao X, et al. "Human Nogo – C overexpression induces HEK293 cell apoptosis via a mechanism that involves JNK – c – Jun pathway." *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348: S. 923 – 928.
- Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Rabo C, Oka Y, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. "Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients." *Brain Tumor Pathol.* 2010;27(1): S.29 – 34.
- Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, Zhao C, Shen YA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJ, Lu QR, Chan JR. "Neurite outgrowth inhibitor Nogo – A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(4): S.1299 – 304.
- Coffin CM, Swanson PE, Wick MR, Dehner LP (1993). "An immunohistochemical comparison of chordoma with renal cell carcinoma, colorectal adenocarcinoma, and myxopapillary ependymoma: a potential diagnostic dilemma in the diminutive biopsy." *Modern Pathology* 5: S. 531 – 538.
- Danks RA, Chopra G, Gonzales MF, Orian JM, Kaye AH (1995). "Aberrant p53 expression does not correlate with the prognosis in anaplastic astrocytoma." *Neurosurgery* 37: S. 246 – 254.
- Deimling von A, Burger PC, Nakazato Y, Ohgaki H, Kleihues P (in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK): "WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", 2007; 4, S. 25 – 29.

- Duffy PE, Graf L, Rapport MM (1977). "Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors." *J Neuropathol Exp Neurol*; Vol. 26: S. 645 – 652.
- Duggal N, Hammond RR (2002). "Nestin expression in Ganglioglioma." *Experimental Neurology*; 174: S. 89 – 95.
- Duncan JA, Hoffman HJ (1995). "Intracranial ependymomas. In: Brain Tumors. Kaye AH, Lows ER, Jr., eds. Churchill Livingstone: Edinburgh, pp. 493 – 504.
- Eng LF, Rubinstein LJ (1978). "Contribution of Immunohistochemistry of diagnostic problems of human cerebral tumors." *J Histochem Cytochem*; Vol. 26, No. 7: S. 513 – 522.
- Farmilo AJ, Ronald HS, Atwood KN (2003). "Fixierung." In: Boenisch T (2003). „Handbuch Immunchemische Färbemethoden.“ Dako Cytomation GmbH. 3. Auflage; S. 23 – 29.
- Forsyth PA, Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Layton DD, Jr., Katzmann JA (1993). "Supratentorial pilocytic astrocytomas. A clinicopathologic, prognostic, and flow cytometric study of 51 patients. *Cancer* 72: S. 1335 – 1342.
- Foster MR, Johnson JE, Olson SJ, Allred DC: "Immunohistochemical analysis of nuclear versus cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesotheliomas and primary pulmonary adenocarcinomas." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2001; 125: S. 1316 – 1320.
- Fouladi M, Helton K, Dalton J, Gilger E, Gajjar A, Merchant T, Kun L, Newsham I, Burger P, Fuller C (2003). "Clear cell ependymoma: a clinicopathologic and radiographic analysis of 10 patients. *Cancer* 98: S. 2232 – 2244.
- Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi VM (1979). „Aniridia – Wilm's tumor association: evidence for specific deletion of 11p13.“ *Cytogenet Cell Genet.* 24(3);S. 185 – 192.
- Gaber ZB, Novitch BG (2011). "All the embryo's a stage, and Olig2 in its time plays many parts." *Neuron*; 69: S. 833 – 835.
- Garner A, Klinworth GK (1982). "Tumors of the orbit, optic nerve and lacrimal sace." In: *Pathobiology of ocular disease. Pathobiology of ocular disease.* Marcel Dekker: New York, pp. 741.
- Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Christensen MR, Wollan PC, Sebo TJ, Forsyth PA, Hayostek CJ (1999). "Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas." *J Neuropathol Exp Neurol* 58: S. 46 – 53.
- Giannini C, Scheithauer BW, Lopes MB, Hirose T, Kros JM, Vandenberg SR. "Immunophenotype of pleomorphic xanthoastrocytoma." *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(4): S. 479 – 485.
- Giordana MT, Cavalla P, Chio A, Marino S, Soffietti R, Vigliani MC, Schiffer D: "Prognostic factors in adult medulloblastoma. A clinico-pathologic study", *Tumori*, 1995; 81(5), S. 338-346.
- Goldstein NS, Bassi D, Uzieblo A: WT1 is an integral component of an antibody panel to distinguish pancreaticobiliary and some ovarian epithelial neoplasms." *American Journal of Clinical Pathology* 2001; 116: S. 246 – 252.

- Gomez DR, Missett BT, Wara WM, Lamborn KR, Prados MD, Chang S, Berger MS, Haas – Kogan DA (2005). „High failure rate in spinal ependymomas with long – term follow – up. *Neuro – oncol* 7: S. 254 – 259.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. “Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature*. 2000;403: S. 439 – 444.
- Gullotta F, Schindler F, Schmutzler R, Weeks – Seifert A (1985). „GFAP in brain tumor diagnosis: possibilities and limitations.“ *Pathology – Research and Practice*; Vol. 180: S. 54 – 60.
- Hart MN, Petito CK, Earle KM (1974): “Mixed gliomas.” *Cancer* 33: S. 134.
- Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold – Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. “Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas.” *Acta Neuropathol*. 2009;118(4): S. 469 – 474.
- Hashiba T, Izumoto S, Kagawa N, Suzuki T, Hashimoto N, Maruno M, Yoshimine T (2007). “WT1 Is Not a Reliable Marker to Distinguish Reactive from Neoplastic Astrocyte Populations in the Central Nervous System.” *Neurol Med Chir (Tokyo)*; 47: S. 165 – 170.
- Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, Brentrup A, Stummer W, Albert FK, Sepehrnia A, Ebel H, Gerss J, Paulus W: “BRAF – KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults.” *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011; 37(7): S. 803 – 806.
- Hawkins C, Walker E, Mohamed N, Zhang C, Jacob K, Shirinian M, Alon N, Kahn D, Fried I, Scheinemann K, Tsangaris E, Dirks P, Tressler R, Bouffet E, Jabado N, Tabori U: “BRAF – KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low – grade astrocytoma.” *Clin Cancer Res*. 2011; 17(14): S. 4790 – 4798.
- Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. “Co expression of glial fibrillary acidic protein – and vimentin – type intermediate filaments in human astrocytomas.” *Acta Neuropathol*1986; 70: S. 333– 339.
- Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, van de Rijn M, Gilks CB. “Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry.” *Mod Pathol*. 2002;15(12): S. 1374– 1380.
- Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y (2006). “Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology.” *Acta Neuropathol*; 111: S. 475 – 482.
- Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M et al 1994. “Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation.” *Brain Pathology* 4: S. 239 – 243.

- Jaing TH, Wang HS, Tsay PK, Tseng CK, Jung SM, Lin KL, Lui TN (2004). "Multivariate analysis of clinical prognostic factors in children with intracranial ependymomas." *J Neurooncol* 68: S. 255 – 261.
- Jawhar NMT (2009). "Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool." *Ann Saudi Med.* 29(2); S. 123 – 127.
- Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P (2004). "Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors." *J Neurooncol* 70: S. 161 – 181.
- Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007). "Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme." *Brain*; 130: S. 3336 – 3341.
- Jung TY, Jung S, Lee KH, Cao VT, Jin SG, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim HS, Lee MC. "Nogo – A expression in oligodendroglial tumors." *Neuropathology* (2011); 31(1): S. 11 – 19.
- Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW: „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“, 2007a, 4. Auflage, S. 10.
- Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW: „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“, 2007b, 4. Auflage, S. 30 – 31.
- Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, Nakazato Y, Plate KH, Giangaspero F, von Deimling A, Ohgaki H, Cavenee WK, Fuller GN, Kros JM (in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK): "WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", 2007c, 4. Auflage, S. 33 – 52.
- Kleihues P, Ohgaki H (2000): "Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors." *Toxicol Pathol* 28: S. 164 – 170.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998). "Tissue microarrays for high – throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med* 4. Auflage (7); S. 844 – 847.
- Kros JM, Pieterman H, Van Eden CG, Avezaat CJ (1994). "Oligodendroglioma: the Rotterdam – Dijkzigt experience." *Neurosurgery* 34: S. 959 – 966.
- Kros JM, Van Eden CG, Stefanko SZ, Waayer – Van Batenburg M, van der Kwast TH (1990). "Prognostic implications of glial fibrillary acidic protein containing cell types in oligodendrogliomas." *Cancer* 66: S. 1204 – 1212.
- Kudo H, Oi S, Tamaki N, Nishida Y, Matsumoto S (1990). "Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery." *Childs Nerv Syst* 6: S. 375 – 378.
- Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, et al. "Nogo – A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions." *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007; 66: S. 238 – 246.
- Kuhlmann T, Gutenberg A, Schulten HJ, Paulus W, Rohde V, Bruck W. "Nogo – a expression in glial CNS tumors: a tool to differentiate

- between oligodendrogliomas and other gliomas?" *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(10): S. 1444 – 1453.
- Kurt E, Zheng PP, Hop WC, van der WM, Bol M, van den Bent MJ, Avezaat CJ, Kros JM (2006). „Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas." *Cancer* 106: S. 388 – 395.
 - Lantos PL, Louis, DN, Rosenblum MK, Kleihues P (2002). "Tumours of the Nervous System." Oxford University Press: London.
 - Lebrun C, Fontaine D, Ramaioli A, Vandebos F, Chanalet S, Lonjon M, Michiels JF, Bourg V, Paquis P, Chatel M, Frenay M (2004). "Long-term outcome of oligodendrogliomas. *Neurology* 62: S. 1783 – 1787.
 - Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM (2002). "Manuel of Diagnostic Antibodies for Immunohistology". Bookchase (UK) Ltd. S. 181 – 182.
 - Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP (1984). "von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata." *Ophthalmology* 91: S. 929 – 935.
 - Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH (2004). "The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol.* 63(5); S. 499 – 509.
 - Lopes MB, Altermatt HJ, Scheithauer BW, Shepherd CW, Vandenberg SR (1996). „Immunohistochemical characterization of subependymal giant cell astrocytomas." *Acta Neuropathol.* 91(4); S. 368 – 375.
 - Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK eds. "World Health Organisation classification of tumours of the central nervous system." Lyon: IARC Press, 2007.
 - Louis DN, Reifenberger G, Brat DJ, Ellison DW (2008a). „Tumours: introduction and neuroepithelial tumours." (in: Love S, Louis DN, Ellison DW. "Greenfield's Neuropathology.") 8. Auflage; S. 1865.
 - Louis DN, Reifenberger G, Brat DJ, Ellison DW (2008b). „Tumours: introduction and neuroepithelial tumours." (in: Love S, Louis DN, Ellison DW. "Greenfield's Neuropathology.") 8. Auflage; S. 1884.
 - Lu RQ, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, Alzamora MG, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH, Black PM (2001). "Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors." *PNAS*; Vol. 98; S. 10851 – 10856.
 - Marucci G, Di Oto E, Farnedi A, Panzacchi R, Ligorio C, Foschini MP (2011). "Nogo – A: a useful marker for the diagnosis of oligodendroglioma and for identifying 1p19q codeletion." *Human Pathology* 43; S. 374 – 380.
 - McLendon RE, Wiestler OD, Kros JM, Korshunov A, Ng HK: „Ependymoma"(in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK): „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", 2007, 4. Auflage, S. 74 – 78.
 - Menssen HD, Bertelmann E, Bartelt S, Schmidt RA, Pecher G, Schramm K, Thiel E (2000). „Wilms' tumor gene (WT1) expression in lung cancer,

- colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens." *J Cancer Res ClinOncol*;126: S. 226–232.
- Middeldorp J, Hol EM (2011). "GFAP in health and disease." *Prog. Neurobiol.* 93(3): S. 412 – 443.
 - Miller CR, Dunham CP, Scheithauer BW, Perry A. (2006). „Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: A clinicopathological and genetic study of 1093 newly – diagnosed high – grade gliomas. *J Clin Oncol* 24: S. 5419 – 5426.
 - Mokhtari K, Paris S, Aguirre – Cruz L, Privat N, Crinière E, Marie Y, Hauw JJ, Kujas M, Rowitch D, Hoang – Xuan K, Delattre JY, Sanson M (2005). "Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification." *Neuropathology and applied Neurobiology*; Vol. 31: S. 62 – 69.
 - Motomura K, Natsume A, Watanabe R, Ito I, Kato Y, Momota H, Nishikawa R, Mishima K, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Nakazato Y, Tashiro H, Takeuchi J, Mori T, Wakabayashi T (2012). "Immunohistochemical analysis – based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas." *Cancer Sci*; Vol. 103, No. 10: S. 1871 – 1879.
 - National Center for Biotechnology Information Reference Sequence Database (2010a). "MAP2 microtubule – associated protein 2 [Homo sapiens (human)]."
 - National Center for Biotechnology Information Reference Sequence Database (2010b). "WT1 Wilms tumor 1 [Homo sapiens (human)]."
 - National Center for Biotechnology Information Reference Sequence Database (2008). "OLIG2 oligodendrocyte lineage transcription factor 2 [Homo sapiens (human)]."
 - Nelson JS, Parisi JE, Schochet Jr. SS (1993). „Principles and practice of Neuropathology.“ *Mosby – Year Book, Inc.* S. 123 – 125.
 - Oertle T, Merkle D, Schwab ME. „Do cancer cells die because of Nogo – B?“ *Oncogene.* 2003; 22: S. 1390 – 1399.
 - Oh D, Prayson RA (1999). "Evaluation of Epithelial and Keratin Markers in Glioblastoma Multiforme." *Arch Pathol Lab Med*; Vol. 123: S. 917 – 920.
 - Ohgaki H, Kleihues P (2005). "Population – based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol* 64: S. 479 – 489.
 - Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst – Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P (2004): „Genetic pathways to glioblastoma: a population – based study“, *Cancer Res* 64: S. 6892 – 6899 .
 - Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, Abeno S, Tatsumi N, Yokota A, Aoyagi S, Nakazawa T, Ito K, Kanato K, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Katsuyuki A, Yoshimine T, Sugiyama H (2004). "Over expression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors." *Cancer Sci*; Vol. 95: S. 822 – 827.

- Otero JJ, Rowitch D, Vandenberg S (2011). "OLIG2 is differentially expressed in pediatric astrocytic and in ependymal neoplasms." *J Neurooncol* 104: S. 423 – 438.
- Park S, Schalling M, Bernard A, et al: "The Wilms tumor gene WT1 is expressed in murine mesoderm – derived tissues and mutated in a human mesothelioma." *Nature and Genetics* 1993; 4: S. 415 – 420.
- Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW, Cupples JB, Grant DR, Akbari M, Gilks CB. "Assessment of Interlaboratory Variation in the Immunohistochemical Determination of Estrogen Receptor Status Using a Breast Cancer Tissue Microarray." *Am J Clin Pathol.* 2002; 117(5): S. 723 – 728.
- Pasquier B, Pasquier D, Golet AN, Panh MH, Couderc P (1980). "Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of the literature." *Cancer* 45: S. 112 – 125.
- Paulus W, Schröder JM, Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W: „Pathologie, Neuropathologie“, Springer Verlag 2012a, 3. Auflage, S. 496 – 501.
- Prayson RA, Estes ML (1996) MIB1 and p53 immunoreactivity in protoplasmic astrocytomas. *Pathol Int* 46: 862 – 866.
- Prayson RA (1997). "Myxopapillary ependymomas: a clinicopathologic study of 14 cases including MIB – 1 and p53 immunoreactivity. *Mod Pathol* 10: S. 304 – 310.
- Prayson RA (1999): Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB – 1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol.* 3:S. 11 – 18.
- Preusser M, Budka H, Rössler K, Hainfellner JA (2007). "OLIG2 is a useful immunohistochemical marker in differential diagnosis of clear cell primary CNS neoplasms." *Histopathology* 50; S. 365 – 370.
- Pritchard – Jones K, Fleming S, Davidson D, et al. "The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development." *Nature* 1990; 345: S. 194 – 197.
- Rasmussen S, Bock E, Warecka K, Althage G (1980). „Quantitation of glial fibrillary acidic protein in human brain tumours.“ *Br. J. Cancer*; Vol. 41: S. 113 – 116.
- Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP: „Oligodendroglioma“ (in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“) 2007a, 4. Auflage, S. 54 – 59.
- Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP: „Anaplastic oligodendroglioma“ (in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“) 2007b, 4. Auflage, S. 60 – 62.
- Riederer B, Matus A. „Differential expression of distinct microtubule – associated proteins during brain development.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: S. 6006 – 6009.
- Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, Stanley P, Li H, Albright AL, McGuire-Cullen P, Finlay JL, Stevens KR,

- Jr., Milstein JM, Packer RJ, Wisoff J (1998). „Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children’s Cancer Group. J Neurosurg 88: S. 695 – 703.
- Rousseau A, Nutt CL, Betensky RA, Iafrate IA, Han M, Ligon KL, Rowitch DH, Louis DN (2006). “Expression of Oligodendroglial and Astrocytic Lineage Markers in Diffuse Gliomas: Use of YKL – 40, ApoE, ASCL1, and NKX2 – 2.” J Neuropathol Exp Neurol; Vol. 65: 1149 – 1156.
 - Rowitch D. OLIG2 (oligodendrocyte lineage transcription factor). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. May 2004. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/OLIG2ID236.html>.
 - Rushing EJ, Sandberg GD, Horkayne – Szakalyl.“ High – grade astrocytomas show increased Nestin and Wilms’s tumor gene (WT1) protein expression.” Int J Surg Pathol. 2010;18(4): S.255 – 259.
 - Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, Vandenberg SR, Burger PC: „Pilocytic astrocytoma“ (in: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK): „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“, 2007, 4. Auflage, S. 14 – 20.
 - Schiffer D, Dutto A, Cavalla P, Bosone I, Chio A, Villani R, Bellotti C (1997). “Prognostic factors in oligodendroglioma. Can J Neurol Sci 24; S. 313 – 319.
 - Schittenhelm J, Beschorner R, Simon P, Tabatabai G, Herrmann C, Schlaszus H, Capper D, Weller M, Meyermann R, Mittelbronn M (2009). “Diagnostic value of WT1 in neuroepithelial tumours.” Neuropathology and Applied Neurobiology;35: S. 69 – 81.
 - Schulz J: „Expressionsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 in Gliomen“, Inaugural-Dissertation, Tübingen, 2010.
 - Schwab EI: „ Immunhistochemische Expressionsanalyse von Hirntumorgewebe mit Integrin alpha – v – beta spezifischen Antikörpern und ihren Liganden.“ Inaugural – Dissertation, Tübingen, 2011.
 - Schwab ME (2010). “Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system.” Nat Rev Neurosci 11(12): S. 799 – 811.
 - Shafit – Zagardo B, Davies P, Rockwood J, et al (2000). “Novel microtubule – associated protein – 2 expressed early in human oligodendrocyte maturation. Glia 29: S. 233 – 245.
 - Shaw EG, Scheithauer BW, O’Fallon JR, David DH (1994). “Mixed oligoastrocytomas: a survival and prognostic factor analysis.” Neurosurg 34: S. 577 – 582.
 - Shaw EG, Scheithauer BW, O’Fallon JR, Davis DH (1992). “Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. J Neurosurg 76: S. 428 – 434.
 - Sillevs – Smitt PA, Van Der Loos C, De Jong VJM, Troost D (1993). “Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum. Acta Histochemia 95: S. 13 – 21.

- Sonneland PR, Scheithauer BW, Onofried BM (1985). „Myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic and immunocytochemical study of 77 cases.“ *Cancer* 56: S. 883 – 893.
- Sun Y, Dimphna H, Meijer, Alberta JA, Shwetal M, Kane MF, Tien AC, Fu H, Petryniak MA, Potter GB, Liu Z, Powers JF, Runquist IS, Rowitch DH, Stiles CD (2011). “Phosphorylation State of Olig2 Regulates Proliferation of Neural Progenitors.“ *Neuron* 69; S. 906 – 917.
- Tanaka Y, Sasaki A, Ishiuchi S, Nakazato Y (2008). “Diversity of glial cell components in pilocytic astrocytoma.“ *Neuropathology*; 28: S. 399 – 407.
- Tihan T, Fisher PG, Kepner JL, Godfraind C, McComb RD, Goldthwaite PT, Burger PC (1999). “Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome.“ *J Neuropathol Exp Neurol* 58: S. 1061 – 1068.
- „Tissue Microarray Facility“ Yale University CT, USA. Abgerufen 28.08.2013. <http://tissuearray.org/yale/tisarray.html>.
- Tucker RP, Binder LI, Viereck C, Hemmings BA, Matus AI. „The sequential appearance of low – and high – molecular – weight forms of MAP2 in the developing cerebellum. *J Neurosci* 1988;8: S. 4503 – 4512.
- Veelen van ML, Avezaat CJ, Kros JM, van Putten W, Vecht C: „Supratentorial low grade astrocytoma: prognostic factors, dedifferentiation, and the issue of early versus late surgery“, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998; 64 (5), S. 581-587.
- Vinores SA, Herman MM, Katsetos CD, May EE, Frankfurter A. “Neuron-associated class III beta – tubulin, tau, and MAP2 in the D-283 Med cell line and in primary explants of human medulloblastoma.“ *Histochem J*. 1994 Aug;26(8): S. 678 – 685.
- Wang J, Jani – Sait SN, Escalon EA, Carroll AJ, de Jong PJ, Kirsch IR, Aplan PD (2000). “The t(14;21)(q11.2;q22) chromosomal translocation associated with T – cell acute lymphoblastic leukemia activates the BHLHB1 gene.“ *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 97(7): S. 3497 – 3502.
- Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G. “Tissue microarrays: applications in genomic research.“ *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2): S. 171 – 181.
- Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR (1998). “Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study.“ *Neuropathology and applied Neurobiology*; Vol.24: S. 302 – 308.
- Willi R, Schwab ME (2013). “Nogo and Nogo receptor: Relevance to schizophrenia?“ *Neurobiol Dis*, 10.1016/j.nbd.2013.01.011.
- Witt H, Mack SC, Ryzhova M, Bender S, Sill M, Isserlin R, Benner A, Hielscher T, Milde T, Remke M, Jones DT, Northcott PA, Garzia L, Bertrand KC, Wittmann A, Yao Y, Roberts SS, Massimi L, Van Meter T, Weiss WA, Gupta N, Grajkowska W, Lach B, Cho YJ, von Deimling A, Kulozik AE, Witt O, Bader GD, Hawkins CE, Tabori U, Guha A, Rutka JT, Lichter P, Korshunov A, Taylor MD, Pfister SM (2011). “Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma.“ *Cancer Cell*; 20(2); S. 143 – 157.

- Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y (2004). "Anti – Human Olig2 Antibody as a Useful Immunohistochemical Marker of Normal Oligodendrocytes and Gliomas." American Journal of Pathology; 164: No.5.
- Zawrocki A, Izycka – Swieszewska E, Papierz W, Liberski P, Zakrewski K, Biernat W (2011). „Analysis of the prognostic significance of selected morphological and immunohistochemical markers in ependymomas, with literature review.” Folia Neuropathol; Vol.49: S. 94 – 102.
- Zeltner LM (2010). "Über die Reaktion von Astrozyten auf hirninvasive Meningeome." Inaugural – Dissertation der med. Fakultät der Eberhard – Karls – Universität Tübingen; Institut für Hirnforschung, Abteilung Hirnforschung.
- Zülch KJ (1986). "Brain Tumors. Their biology and pathology". Springer Verlag: Berlin Heidelberg.

7 Anhang

7.1 Statistische Tabellen

GFAP Intensität							
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert
			0	1	2	3	
	Insgesamt	766	18 (2,3%)	120 (15,7%)	303 (39,6%)	325 (42,4%)	2,22
	astrozytäre Tumore	539	7 (1,3%)	59 (10,9%)	205 (38%)	268 (49,7%)	2,36
1	pilozytisches Astrozytom	178	2 (1,1%)	6 (3,4%)	30 (16,8%)	140 (78,7%)	2,73
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	1 (50%)	0	1 (50%)	2
	diffuses Astrozytom	46	1 (2,2%)	8 (17,4%)	7 (15,2%)	30 (65,2%)	2,43
3	anaplastisches Astrozytom	58	0	14 (24,1%)	25 (43,1%)	19 (32,8%)	2,09
4	Glioblastom	255	4 (1,6%)	30 (11,8%)	143 (56,1%)	78 (30,5%)	2,16
	oligodendrogliale Tumore	58	0	19 (32,8%)	22 (37,9%)	17 (29,3%)	1,97
2	Oligodendrogliom	25	0	6 (24%)	10 (40%)	9 (36%)	2,12
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	0	10 (33,3%)	12 (40%)	8 (26,7%)	1,93
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	3	0	0	1
	ependymale Tumore	169	11 (6,5%)	42 (24,8%)	76 (45%)	40 (23,7%)	1,86
	Subependymom	14	1 (7,1%)	3 (21,4%)	7 (50%)	3 (21,5%)	1,86
1	Myxopapilläres Ependymom	26	2 (7,7%)	9 (34,6%)	11 (42,3%)	4 (15,4%)	1,65
2	Ependymom	87	2 (2,3%)	27 (31%)	38 (43,7%)	20 (23%)	1,87
3	anaplastisches Ependymom	42	6 (14,3%)	3 (7,1%)	20 (47,6%)	13 (31%)	1,95

Tabelle 33: Intensitätsverteilung von GFAP, Score 0 – 3. Score 0= negativ, Score 1= geringe, Score 2= mittlere, Score 3= starke Expression. Überdurchschnittliche Intensität in Astrozytomen, besonders Grad I und II. Oligodendroglione und Ependymome leicht unterdurchschnittliche Immunreaktivitäten von GFAP.

GFAP Menge								
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)					Mittelwert
			0	1	2	3	4	
	Insgesamt	766	18 (2,35)	39 (5,09)	63 (8,22)	78 (10,18)	568 (74,15)	3,49
	astrozytäre Tumore	539	7 (1,3)	12 (2,23)	29 (5,38)	45 (8,35)	446 (82,74)	3,69
1	pilozytisches Astrozytom	178	2 (1,12)	0	0	4 (2,25)	172 (96,63)	3,93
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	0	0	0	2 (100)	4
	diffuses Astrozytom	46	1 (2,17)	0	0	0	45 (97,83)	3,91
3	anaplastisches Astrozytom	58	0	0	2 (3,45)	1 (1,72)	55 (94,83)	3,91
4	Glioblastom	255	4 (1,57)	12 (4,71)	27 (10,59)	40 (15,69)	172 (67,45)	3,43
	oligodendrogliale Tumore	58	0	13 (22,41)	13 (22,41)	14 (24,14)	18 (31,04)	2,64
2	Oligodendrogliom	25	0	3 (12)	7 (28)	8 (32)	7 (28)	2,76
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	0	8 (26,67)	6 (20)	5 (16,67)	11 (36,67)	2,63
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	2 (66,67)	0	1 (33,33)	0	1,67
	ependymale Tumore	169	11 (6,51)	14 (8,28)	21 (12,43)	19 (11,24)	104 (61,54)	3,13
	Subependymom	14	1 (7,14)	1 (7,14)	0	0	12 (85,71)	3,5
1	Myxopapilläres Ependymom	26	2 (7,69)	3 (11,54)	4 (15,38)	6 (23,08)	11 (42,31)	2,81
2	Ependymom	87	2 (2,3)	8 (9,2)	11 (12,64)	10 (11,49)	56 (64,37)	3,26
3	anaplastisches Ependymom	42	6 (4,51)	2 (1,5)	6 (4,51)	3 (2,26)	25 (18,8)	2,93

Tabelle 34: Mengenverteilung von GFAP Score 0 – 4. Score 0= 0%, Score 1= 1 – 24%, Score 2= 25 – 49%, Score 3= 50 – 74%, Score 4= 75 – 100%. Astrozytome, besonders WHO Grad I – III, fast vollständig GFAP positiv. Ependymome, Subependymome ausgenommen, und Oligodendroglione wiesen unterdurchschnittliche GFAP Mengen auf.

MAP 2 Intensität							
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert
			0	1	2	3	
Insgesamt		745	175 (23,49)	160 (21,48)	287 (38,52)	123 (16,51)	1,48
astrozytäre Tumore		529	56 (10,59)	119 (22,49)	249 (47,07)	105 (19,85)	1,76
1	pilozytisches Astrozytom	172	10 (5,81)	30 (17,44)	79 (45,93)	53 (30,81)	2,02
2	pilomyxoides Astrozytom	3	1 (33,33)	1 (33,33)	1 (33,33)	0	1
	diffuses Astrozytom	46	4 (8,70)	15 (32,61)	25 (54,35)	2 (4,35)	1,54
3	anaplastisches Astrozytom	53	2 (3,77)	21 (39,62)	24 (45,28)	6 (11,32)	1,64
4	Glioblastom	255	39 (15,29)	52 (20,39)	120 (47,06)	44 (17,25)	1,66
oligodendrogliale Tumore		56	2 (3,57)	19 (33,93)	20 (35,71)	15 (26,79)	1,86
2	Oligodendrogliom	23	1 (4,35)	9 (39,13)	11 (47,83)	2 (8,7)	1,61
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	1 (3,33)	10 (33,33)	9 (30)	10 (33,33)	1,93
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	0	0	3 (100)	3
ependymale Tumore		160	117 (73,13)	22 (13,75)	18 (11,25)	3 (1,87)	0,42
	Subependymom	14	9 (64,29)	3 (21,43)	2 (14,29)	0	0,5
	Myxopapilläres Ependymom	25	24 (96)	1 (4)	0	0	0,04
2	Ependymom	79	60 (75,95)	11 (13,92)	8 (10,13)	0	0,34
3	anaplastisches Ependymom	42	24 (57,14)	7 (16,67)	8 (19,05)	3 (7,14)	0,76

Tabelle 35: Intensitätsverteilung von MAP 2, Score 0 – 3. Score 0= negativ, Score 1= geringe, Score 2= mittlere, Score 3= starke Expression. Oligodendrogliome, besonders WHO Grad III Gliome, und Astrozytome, im Besonderen WHO Grad I Tumore, zeigten die kräftigsten Färbungen. Ependymome zeigten schwache Intensitäten.

MAP2 Menge								
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert	
			0	1	2	3	4	
Insgesamt		745	175 (23,49)	197 (26,44)	133 (17,85)	80 (10,74)	160 (21,48)	1,80
astrozytäre Tumore		529	56 (10,59)	159 (30,06)	108 (20,42)	64 (12,10)	142 (26,84)	2,15
1	pilozytisches Astrozytom	172	10 (5,81)	46 (26,74)	38 (22,09)	16 (9,3)	62 (36,05)	2,43
2	pilomyxoides Astrozytom	3	1 (33,33)	0	1 (33,33)	1 (33,33)	0	1,67
	diffuses Astrozytom	46	4 (8,7)	6 (13,04)	4 (8,70)	13 (28,26)	19 (41,3)	2,80
3	anaplastisches Astrozytom	53	2 (3,77)	15 (28,3)	11 (20,75)	9 (16,98)	16 (30,19)	2,42
4	Glioblastom	255	39 (15,29)	92 (36,08)	54 (21,18)	25 (9,8)	45 (17,65)	1,78
oligodendrogliale Tumore		56	2 (3,57)	10 (17,86)	16 (28,57)	14 (25)	14 (25)	2,5
2	Oligodendrogliom	23	1 (4,35)	3 (13,04)	10 (43,48)	6 (26,09)	3 (13,04)	2,30
3	anaplastisches Oligodendrogliom	30	1 (3,33)	7 (23,33)	5 (16,67)	6 (20)	11 (36,67)	2,63
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	0	1 (33,33)	2 (66,67)	0	2,67
ependymale Tumore		160	117 (73,13)	28 (17,5)	9 (5,62)	2 (1,25)	4 (2,5)	0,43
	Subependymom	14	9 (64,29)	2 (14,29)	0	1 (7,14)	2 (14,29)	0,93
	Myxopapilläres Ependymom	25	24 (96)	1 (4)	0	0	0	0,04
2	Ependymom	79	60 (75,95)	15 (18,99)	4 (5,06)	0	0	0,29
3	anaplastisches Ependymom	42	24 (57,14)	10 (23,81)	5 (11,9)	1 (2,38)	2 (4,76)	0,74

Tabelle 36: : Mengenverteilung von MAP 2, Score 0 – 4. Score 0= 0%, Score 1= 1 – 24%, Score 2= 25 – 49%, Score 3= 50 – 74%, Score 4= 75 – 100%. Oligodendrogliome und Astrozytome zeigten, besonders diffuse Astrozytome, überdurchschnittlich hohe MAP 2 Mengen. Bei Ependymomen wurden nur kleine Mengen nachgewiesen.

		NOGO A Intensität					
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				
			0	1	2	3	Mittelwert
Insgesamt		739	24 (3,25)	202 (27,33)	303 (41)	210 (28,42)	1,95
astrozytäre Tumore		512	6 (1,17)	99 (19,33)	228 (44,53)	179 (34,97)	2,13
1	pilozytisches Astrozytom	174	4 (2,3)	23 (13,22)	61 (35,06)	86 (49,43)	2,32
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	1 (50)	0	1 (50)	2
	diffuses Astrozytom	49	0	22 (44,9)	22 (44,9)	5 (10,2)	1,65
3	anaplastisches Astrozytom	56	0	18 (32,14)	29 (51,79)	9 (16,07)	1,84
4	Glioblastom	231	2 (0,87)	35 (15,15)	116 (50,22)	78 (33,77)	2,17
oligodendrogliale Tumore		56	4 (7,14)	16 (28,57)	27 (48,21)	9 (16,08)	1,73
2	Oligodendrogliom	24	2 (8,33)	9 (37,5)	11 (45,83)	2 (8,33)	1,54
3	anaplastisches Oligodendrogliom	29	1 (3,45)	7 (24,14)	15 (51,72)	6 (20,69)	1,9
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	0	1 (33,33)	1 (33,33)	1,67
ependymale Tumore		171	14 (8,19)	87 (50,88)	48 (28,07)	22 (12,86)	1,46
	Subependymom	14	1 (7,14)	7 (50)	6 (42,86)	0	1,36
1	Myxopapilläres Ependymom	29	8 (27,59)	17 (58,62)	1 (3,45)	3 (10,34)	0,97
2	Ependymom	86	3 (3,49)	41 (47,67)	33 (38,37)	9 (10,47)	1,56
3	anaplastisches Ependymom	42	2 (4,76)	22 (52,38)	8 (19,05)	10 (23,81)	1,62

Tabelle 37: Intensitätsverteilung von NOGO A, Score 0 – 3. Score 0= negativ, Score 1= geringe, Score 2= mittlere, Score 3= starke Expression. Astrozytome, besonders WHO Grad I und IV, zeigten kräftige Intensitäten. Oligodendrogliome und Ependymome wiesen schwächere Intensitäten auf.

		NOGO A Menge						
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)					
			0	1	2	3	4	Mittelwert
Insgesamt		739	24 (3,25)	49 (6,63)	63 (8,53)	51 (6,9)	552 (74,7)	3,43
astrozytäre Tumore		512	6 (1,17)	38 (7,42)	26 (5,08)	22 (4,3)	420 (82,03)	3,59
1	pilozytisches Astrozytom	174	4 (2,3)	1 (0,57)	2 (1,15)	3 (1,72)	164 (94,25)	3,85
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	0	0	1 (50)	1 (50)	3,5
	diffuses Astrozytom	49	0	0	2 (4,08)	1 (2,04)	46 (93,88)	3,9
3	anaplastisches Astrozytom	56	0	1 (1,79)	0	1 (1,79)	54 (96,42)	3,93
4	Glioblastom	231	2 (0,87)	36 (15,58)	22 (9,52)	16 (6,93)	155 (67,1)	3,24
oligodendrogliale Tumore		56	4 (7,14)	3 (5,36)	24 (42,86)	13 (23,21)	12 (21,43)	2,46
2	Oligodendrogliom	24	2 (8,33)	1 (4,17)	15 (62,5)	5 (20,83)	1 (4,17)	2,08
3	anaplastisches Oligodendrogliom	29	1 (3,45)	2 (6,9)	9 (31,03)	7 (24,14)	10 (34,48)	2,79
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	1 (33,33)	0	0	1 (33,33)	1 (33,33)	2,33
ependymale Tumore		171	14 (8,19)	8 (4,68)	13 (7,6)	16 (9,36)	120 (70,17)	3,29
	Subependymom	14	1 (7,14)	0	1 (7,14)	0	12 (85,71)	3,57
1	Myxopapilläres Ependymom	29	8 (27,59)	4 (13,79)	4 (13,79)	5 (17,24)	8 (27,59)	2,03
2	Ependymom	86	3 (3,49)	4 (4,65)	4 (4,65)	8 (9,3)	67 (77,91)	3,53
3	anaplastisches Ependymom	42	2 (4,76)	0	4 (9,52)	3 (7,14)	33 (78,57)	3,55

Tabelle 38: Mengenverteilung von NOGO A, Score 0 – 4. Score 0= 0%, Score 1= 1 – 24%, Score 2= 25 – 49%, Score 3= 50 – 74%, Score 4= 75 – 100%. Astrozytome und Ependymome, mit der Ausnahme von myxopapillären Ependymomen, wiesen in ihrer Mehrheit Score 4 auf. Oligodendrogliome besaßen die wenigsten positiven Tumorzellen.

OLIG 2 Intensität							
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert
			0	1	2	3	
Insgesamt		752	188 (25)	139 (18,48)	272 (36,17)	153 (20,35)	1,52
astrozytäre Tumore		529	70 (13,24)	102 (19,28)	216 (40,83)	141 (26,65)	1,81
1	pilozytisches Astrozytom	173	16 (9,25)	27 (15,61)	58 (33,53)	72 (41,62)	2,08
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	0	0	2 (100)	3
	diffuses Astrozytom	44	5 (11,36)	16 (36,36)	15 (34,09)	8 (18,18)	1,59
3	anaplastisches Astrozytom	56	7 (12,5)	18 (32,14)	26 (46,43)	5 (8,93)	1,52
4	Glioblastom	254	42 (16,54)	41 (16,14)	117 (46,06)	54 (21,26)	1,72
oligodendrogliale Tumore		54	5 (9,26)	21 (38,89)	28 (51,85)	0	1,43
2	Oligodendrogliom	24	3 (12,5)	12 (50)	9 (37,5)	0	1,25
3	anaplastisches Oligodendrogliom	27	2 (7,41)	9 (33,33)	16 (59,26)	0	1,52
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	0	3 (100)	0	2
ependymale Tumore		169	113 (66,86)	16 (9,47)	28 (16,57)	12 (7,1)	0,64
	Subependymom	14	6 (42,86)	3 (21,43)	5 (35,71)	0	0,93
	Myxopapilläres Ependymom	29	26 (89,66)	0	3 (10,34)	0	0,21
2	Ependymom	86	54 (62,79)	7 (8,14)	17 (19,77)	8 (9,3)	0,76
3	anaplastisches Ependymom	40	27 (67,5)	6 (15)	3 (7,5)	4 (10)	0,6

Tabelle 39: Intensitätsverteilung von OLIG 2, Score 0 – 3. Score 0= negativ, Score 1= geringe, Score 2= mittlere, Score 3= starke Expression. Astrozytome zeigten die kräftigste Intensität. Oligodendrogliome wiesen keinen Fall für Score 3 auf, Ependymome waren mehrheitlich Score 0.

OLIG 2 Menge								
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert	
			0	1	2	3	4	
Insgesamt		752	188 (25)	199 (26,46)	164 (21,81)	109 (14,49)	92 (12,23)	1,63
astrozytäre Tumore		529	70 (13,23)	147 (27,79)	145 (27,41)	95 (17,96)	72 (13,61)	1,91
1	pilozytisches Astrozytom	173	16 (9,25)	52 (30,06)	36 (20,81)	39 (22,54)	30 (17,34)	2,09
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	0	2 (100)	0	0	2
	diffuses Astrozytom	44	5 (11,36)	15 (34,09)	11 (25)	10 (22,73)	3 (6,82)	1,8
3	anaplastisches Astrozytom	56	7 (12,5)	18 (32,14)	17 (30,36)	8 (14,29)	6 (10,71)	1,79
4	Glioblastom	254	42 (16,54)	62 (24,41)	79 (31,1)	38 (14,96)	33 (12,99)	1,83
oligodendrogliale Tumore		54	5 (9,26)	6 (11,11)	15 (27,78)	12 (22,22)	16 (29,63)	2,52
2	Oligodendrogliom	24	3 (12,5)	3 (12,5)	10 (41,67)	3 (12,5)	5 (20,83)	2,17
3	anaplastisches Oligodendrogliom	27	2 (7,41)	3 (11,11)	5 (18,52)	7 (25,93)	10 (37,04)	2,74
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	0	0	2 (66,67)	1 (33,33)	3,33
ependymale Tumore		169	113 (66,86)	46 (27,22)	4 (2,37)	2 (1,18)	4 (2,37)	0,45
	Subependymom	14	6 (42,86)	8 (57,14)	0	0	0	0,57
	Myxopapilläres Ependymom	29	26 (89,66)	1 (3,45)	0	0	2 (6,9)	0,31
2	Ependymom	86	54 (62,79)	28 (32,56)	3 (3,49)	1 (1,16)	0	0,43
3	anaplastisches Ependymom	40	27 (67,5)	9 (22,5)	1 (2,5)	1 (2,5)	2 (5)	0,55

Tabelle 40: Mengenverteilung von OLIG 2, Score 0 – 4. Score 0= 0%, Score 1= 1 – 24%, Score 2= 25 – 49%, Score 3= 50 – 74%, Score 4= 75 – 100%. Oligodendrogliome, besonders WHO Grad III, exprimierten die größten Mengen OLIG 2. Ependymome waren zu zwei Drittel negativ.

WT 1 Intensität							
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert
			0	1	2	3	
	Insgesamt	755	59 (7,81)	201 (26,62)	239 (31,66)	256 (33,91)	1,92
	astrozytäre Tumore	532	14 (2,64)	103 (19,36)	195 (36,65)	220 (41,35)	2,17
1	pilozytisches Astrozytom	173	0	18 (10,4)	62 (35,84)	93 (53,76)	2,43
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	0	1 (50)	1 (50)	2,5
	diffuses Astrozytom	44	8 (18,18)	21 (47,73)	12 (27,27)	3 (6,82)	1,23
3	anaplastisches Astrozytom	55	1 (1,82)	26 (47,27)	19 (34,55)	9 (16,36)	1,65
4	Glioblastom	258	5 (1,94)	38 (14,73)	101 (39,15)	114 (44,19)	2,26
	oligodendrogliale Tumore	54	19 (35,19)	29 (53,7)	4 (7,41)	2 (3,7)	0,71
2	Oligodendrogliom	23	8 (34,78)	13 (56,52)	2 (8,7)	0	0,74
3	anaplastisches Oligodendrogliom	28	11 (39,29)	15 (53,57)	2 (7,14)	0	0,68
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	1 (33,33)	0	2 (66,67)	2,33
	ependymale Tumore	169	26 (15,38)	69 (40,83)	40 (23,67)	34 (20,12)	1,49
1	Subependymom	11	1 (9,09)	8 (72,73)	2 (18,18)	0	1,09
	Myxopapilläres Ependymom	29	2 (6,9)	10 (34,48)	12 (41,38)	5 (17,24)	1,69
2	Ependymom	88	22 (25)	47 (53,41)	15 (17,05)	4 (4,55)	1,01
3	anaplastisches Ependymom	41	1 (2,44)	4 (9,76)	11 (26,83)	25 (60,98)	2,46

Tabelle 41: Intensitätsverteilung von WT 1, Score 0 – 3. Score 0= negativ, Score 1= geringe, Score 2= mittlere, Score 3= starke Expression. Astrozytome wiesen überdurchschnittliche Intensitäten auf. Ependymome, mit der Ausnahme WHO Grad III Gliome, und Oligodendrogliome, mit der Ausnahme von Mischgliomen, wiesen unterdurchschnittlich starke Färbungen auf.

WT 1 Menge								
WHO Grad	Diagnose	Anzahl	Score (Prozent)				Mittelwert	
			0	1	2	3		4
	Insgesamt	755	59 (7,81)	124 (16,42)	70 (9,27)	66 (8,74)	436 (57,76)	2,92
	astrozytäre Tumore	532	14 (2,63)	65 (12,22)	53 (9,96)	45 (8,46)	355 (66,73)	3,24
1	pilozytisches Astrozytom	173	0	20 (11,56)	9 (5,2)	10 (5,78)	134 (77,46)	3,49
2	pilomyxoides Astrozytom	2	0	1 (50)	0	0	1 (50)	2,5
	diffuses Astrozytom	44	8 (18,18)	17 (38,64)	3 (6,82)	5 (11,36)	11 (25)	1,86
3	anaplastisches Astrozytom	55	1 (1,82)	9 (16,36)	10 (18,18)	9 (16,36)	26 (47,27)	2,91
4	Glioblastom	258	5 (1,94)	18 (6,98)	31 (12,02)	21 (8,14)	183 (70,93)	3,39
	oligodendrogliale Tumore	54	19 (35,2)	29 (53,7)	2 (3,7)	4 (7,4)	0	0,83
2	Oligodendrogliom	23	8 (34,78)	12 (52,17)	2 (8,7)	1 (4,35)	0	0,83
3	anaplastisches Oligodendrogliom	28	11 (39,29)	16 (57,14)	0	1 (3,57)	0	0,68
	anaplastisches Oligoastrozytom	3	0	1 (33,33)	0	2 (66,67)	0	2,33
	ependymale Tumore	169	26 (15,38)	30 (17,75)	15 (8,88)	17 (10,06)	81 (47,93)	2,57
1	Subependymom	11	1 (9,09)	1 (9,09)	0	0	9 (81,82)	3,36
	Myxopapilläres Ependymom	29	2 (6,9)	6 (20,69)	0	3 (10,34)	18 (62,07)	3
2	Ependymom	88	22 (25)	18 (20,45)	11 (12,5)	11 (12,5)	26 (29,55)	2,01
3	anaplastisches Ependymom	41	1 (2,44)	5 (12,2)	4 (9,76)	3 (7,32)	28 (68,29)	3,27

Tabelle 42: Mengenverteilung von WT 1, Score 0 – 4. Score 0= 0%, Score 1= 1 – 24%, Score 2= 25 – 49%, Score 3= 50 – 74%, Score 4= 75 – 100%. Astrozytome zeigten in zwei Drittel der Fälle Score 4. Ependymome wiesen leicht unterdurchschnittliche WT 1 Mengen auf. Oligodendrogliome, mit keinem Score 4 Fall, exprimierten die geringsten WT 1 Mengen.

WHO Grad	Diagnose (abgek.)	Anzahl einfach	GFAP IRS		MAP2 IRS		NOGO A IRS		OLIG 2 IRS		WT 1 IRS	
			Geschlecht	Alter	Geschlecht	Alter	Geschlecht	Alter	Geschlecht	Alter	Geschlecht	Alter
Insgesamt			0,2318	0,0027	0,6729	0,0027	0,7259	0,0016	0,5164	0,0654	0,2375	0,3506
astrozytäre Tumore			0,6768	0,0004	0,8118	0,0004	0,7928	0,0002	0,6865	0,0154	0,2392	0,9365
1	PA	116		0,4975		0,8916		0,5663		0,1280		
2	DA	78		0,9538		0,2453		0,7351		0,5492		
3	AA	76		0,9579		0,1124		0,6764		0,8446		
4	GBM	148	0,4713	0,4456	0,3805	0,5628	0,5175	0,4659	0,1294	0,5227	0,7121	
oligodendrogliale Tumore			0,6456	0,1763	0,0948	0,9944	0,5181	0,9606	0,0547	0,4132	0,2323	0,5390
2	O	16										
3	AO	17										
ependymale Tumore			0,4401	0,8903	0,7982	0,9625	0,4406	0,8522	0,4992	0,3291	0,5020	0,0127
1	SE	10										0,2874
	ME	23										0,9366
2	E	49										0,1009
3	AE	24										0,5305

Tabelle 43: Geschlechts- und Altersvergleiche der IRS für GFAP, MAP 2, NOGO A, OLIG 2 und WT 1. Das Geschlecht hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression. Signifikant geringere Expression korrelierte mit gestiegenem Patientenalter.

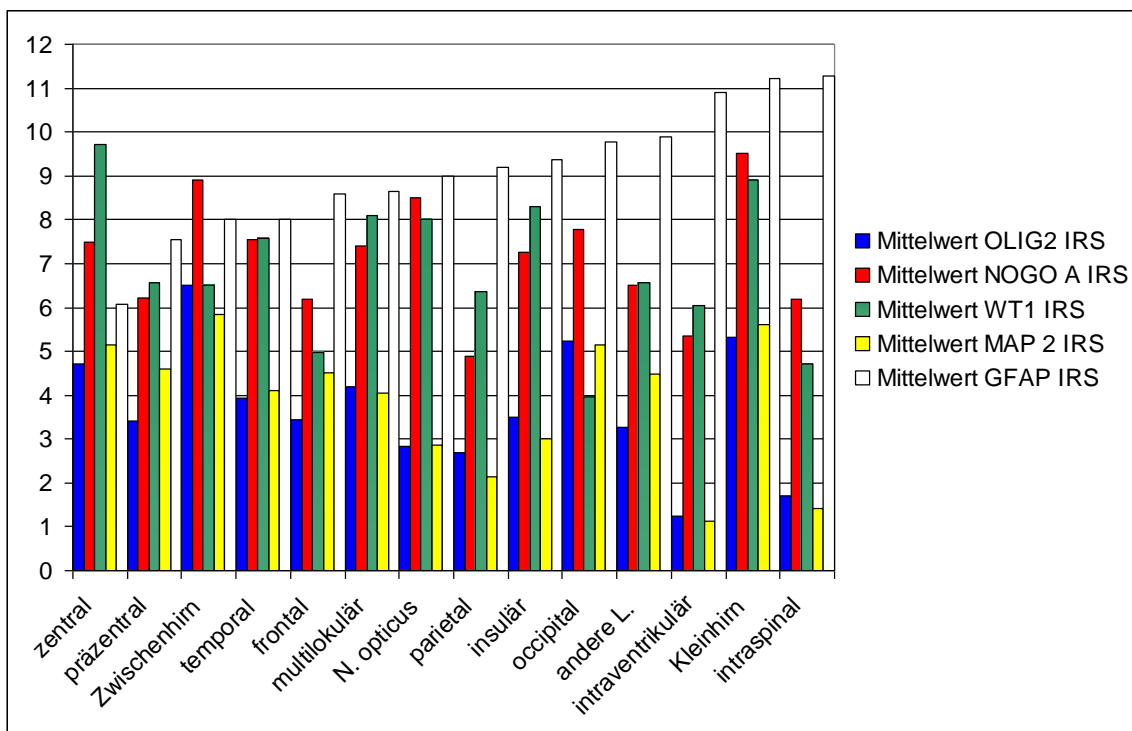


Abbildung 25: Expression von GFAP, MAP 2, NOGO A, OLIG 2 und WT 1 ihrer Lokalisation zugeordnet; aufsteigend nach dem IRS von GFAP geordnet.

7.2 Danksagungen

Folgenden Personen möchte ich bei der Anfertigung dieser Arbeit besonders danken:

- Jesus Christus, dem Sohn Gottes, von dem alle Weisheit ausgeht. ER hat mich mein ganzes Leben durchgetragen und IHM nachzufolgen war meine wichtigste Entscheidung im Leben. Möge mein ganzes Leben zu SEINER Ehre dienen, so dass auch meine Mitmenschen die rettende Botschaft des Evangeliums erfahren.
- Herrn Professor Dr. Jens Schittenhelm für die ausgezeichnete Betreuung, die großartige Hilfestellung und die tolle Motivation. Er war stets für Fragen und Wünsche erreichbar und hat bei mir das Interesse an pathologischer Forschung geweckt. Gerade auf meine besondere Situation als externer Doktorand ist er mit viel Flexibilität eingegangen. Ich wünsche ihm und seiner Familie von Herzen Gottes Segen und das Allerbeste.
- Dem gesamten Team des Labors des Neuropathologischen Instituts, v.a. Frau K. Trautmann, Frau N. Karpekin, Frau I. Kienzler, Herrn T. Nguyen, Frau I. Rau und Frau G. Albrecht für viel Unterstützung bei der Laborarbeit, sowie beim Erstellen der Fotografien.
- Meinen lieben Eltern, die mich als hervorragende Ärzte bei meiner Promotion mit viel Liebe unterstützt haben und mir das Studium erst ermöglicht haben.
- Meiner lieben Schwester, die mich immer mit aller Kraft motiviert hat. Ich wünsche ihr Gottes Segen in der praktischen ärztlichen Tätigkeit.
- Jedem Freund, der mich in dieser Phase meines Lebens im Gebet unterstützt hat.

7.3 Lebenslauf

10.05.1990	Geburt in Höxter
1996 – 2000	Grundschule Kulmbach – Burghaig
2000 – 2009	Casper – Vischer – Gymnasium Kulmbach
01.07.2009 – 30.09.2009	Allgemeine Grundausbildung Heer Gäubodenkaserne Feldkirchen
01.10.2009 – 31.03.2010	Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Krankenpflegepraktikum
Seit April 2010	Studium der Humanmedizin an der Friedrich – Alexander – Universität Erlangen – Nürnberg
März 2012	Erste Ärztliche Prüfung
August 2012	Famulatur Urologie in der Urologischen Praxis Dr. Schwab Kulmbach
März 2013	Beginn der Forschungen an der Doktorarbeit: „Immunhistochemische Studie von Hirntumorgewebe mit spezifischen Antikörpern gegen GFAP, MAP – 2, NOGO – A, OLIG – 2 und WT – 1“ am Institut für Pathologie und Neuropathologie Universität Tübingen