

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Direktor: Herr Professor Dr. med. Markus Glatzel

Expression von CD34 und Doublecortin in Tumoren des Nervensystems

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Nora Christine Salein
aus Marktoberdorf

Hamburg, 2012

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 5.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Prof. Dr. Christian Hagel
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:	PD Dr. Jörg Flitsch
Prüfungsausschuss, dritter Gutachter:	Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fragestellung	1
1.2	Klassifikation von Hirntumoren	3
1.2.1	Historie	3
1.2.2	Grading versus Typing	4
1.2.3	WHO-Kriterien	5
1.2.4	Tumoren des zentralen Nervensystems	6
1.3	Gliome und glioneuronale Tumoren	8
1.3.1	Gliogenese	9
1.3.2	Pleomorphe Xanthoastrozytome	11
1.4	Tumordifferenzierung mittels Immunhistochemie	14
1.4.1	Antigene	15
1.4.1.1	CD34	15
1.4.1.1.1	Struktur des CD34-Moleküls	15
1.4.1.1.2	Histologischer Nachweis von CD34	16
1.4.1.1.3	Biologische Funktion von CD34	18
1.4.1.1.4	Referenzuntersuchung	20
1.4.1.2	Doublecortin	21
1.4.1.2.1	Struktur des Doublecortin-Moleküls	21
1.4.1.2.2	Nachweis von Doublecortin	21
1.4.1.2.3	Biologische Funktion von Doublecortin	23
1.4.1.2.4	Induktion der DCX-Expression	24
1.5	Arbeitshypothesen	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Tumorgewebeproben	28
2.1.2	Tissue Microarray	29
2.1.3	Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)	30
2.1.4	Antikörper	30
2.1.5	Lösungen	32
2.1.6	Verbrauchsmaterialien und Geräte	34
2.2	Methoden	36
2.2.1	Anfertigen der Schnitte und Vorbehandlung	36
2.2.2	Färbungen mit den CD34-Antikörpern	36
2.2.2.1	Düsseldorfer Färbeprotokoll (DDFP)	36

2.2.2.2	Hamburger Färbeprotokoll: ABC-Methode (HHFP-ABC).....	37
2.2.2.3	Hamburger Färbeprotokoll: AP-Methode (HHFP-AP-H und HHFP-AP-S).....	38
2.2.2.4	Methodenkombinationen bei CD34-Färbungen von PXA-Gewebeproben.....	39
2.2.3	Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Ergebnis I: Auswertung für CD 34.....	42
3.1.1	Sensitivität von CD34 für pleomorphe Xanthoastrozytome.....	42
3.1.2	Spezifität von CD34 für pleomorphe Xanthoastrozytome.....	44
3.1.3	Vergleich der verschiedenen Färbemethoden.....	46
3.2	Ergebnis II: Auswertung für Doublecortin.....	48
3.2.1	Nachweis von Doublecortin bei Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems.....	49
3.2.2	Nachweis von Doublecortin bei Geweben außerhalb des ZNS.....	53
3.3	Vergleich der Antikörper für CD34 und Doublecortin.....	54
4	Diskussion.....	56
4.1	CD34-Nachweis.....	56
4.2	Doublecortin-Nachweis.....	60
4.3	Das bessere Färbeprotokoll?.....	67
5	Zusammenfassung.....	68
6	Abkürzungsverzeichnis.....	69
7	Abbildungsverzeichnis.....	72
8	Verzeichnis der Grafiken und Tabellen.....	73
9	Literaturverzeichnis.....	74
10	Danksagung.....	88
11	Eidesstattliche Erklärung.....	89
12	Anhang: Rohdaten.....	90

Für Raoul und Tobias

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Eine der wesentlichen Aufgaben der Neuropathologie ist es, Tumoren des Nervensystems zu differenzieren und zu systematisieren. Diese Bestrebungen haben bislang noch keinen Abschluss gefunden und so werden vor allem durch die Weiterentwicklung der Untersuchungsmethoden immer wieder neue Unterformen der bekannten Tumoren beschrieben. Oftmals unterscheiden sich diese Unterformen trotz morphologisch ähnlicher Erscheinungsweise erheblich in ihrem histogenetischen Ursprung und in der für die Patienten wichtigen Prognose und Behandlungsform.

Eine Form der glialen Tumoren, bei deren Diagnose genau diese Schwierigkeiten auftreten und die sich nur ungenügend allein durch die Morphologie von anderen Gliomen unterscheiden lassen, sind die pleomorphen Xanthoastrozytome (PXA). Diese seltene Form der Astrozytome tritt vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und ist dort häufig Ursache einer chronisch fokalen Epilepsie. Gewöhnlich ist die Prognose gut mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 70 % (Giannini et al. 1999). Leider kann die pleomorphe Struktur der Tumoren dazu führen, dass PXA fehlerhaft als maligne astrozytische Gliome eingestuft werden, beispielsweise als anaplastische Astrozytome oder als Glioblastoma multiforme. Diese sind mit einer wesentlich schlechteren Prognose behaftet und bedürfen in der Regel einer anderen Therapie (Reifenberger et al. 2003). Obgleich es neben der klassischen Form auch eine anaplastische Variante der PXA (APXA) gibt, ist deren Prognose trotzdem deutlich besser (Kepes et al. 2000).

Reifenberger et al. konnten in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2003 zeigen, dass bei Tumorproben von PXA im Gegensatz zu diffusen Astrozytomen und Oligodendrogliomen die Tumorkonglomerate in bis zu 84 % der Fälle das CD34-Antigen exprimieren. CD34 ist ein transmembranöses Zelloberflächenprotein. Es findet sich üblicherweise in neuronalen Tumoren nur bei Schwannomen, Gangliogliomen und bei den sehr seltenen chordoidalen Gliomen des dritten Ventrikels. In normalem adultem oder sich entwickelndem Gehirn findet sich – außer in Gefäßendothelien – keine Immunoreaktivität für CD34 (Blümcke et al. 1999 und Reifenberger et al. 1999). Das

signifikant andere Nachweismuster für CD34-positive Tumorzellen in PXA kann folglich dazu dienen, diese Tumorart zuverlässiger von seinen diffusen maligneren Verwandten zu unterscheiden. Es schließt bei fehlender Reaktivität allerdings keineswegs ein PXA aus.

Das im Labor des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angewandte Färbeprotokoll zeigte bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit eine deutlich geringere Positivität für CD34 bei PXA-Tumorproben. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Färbeprotokolle zum Nachweis von CD34 bei PXA-Tumorproben miteinander verglichen. Zum einen sind dies die von Reifenberger et al. (2003) angewandte Methode sowie Varianten des Hamburger Protokolls mit verschiedenen Antikörpern und Detektionssystemen. Den Ursachen für mögliche Unterschiede im Färbeergebnis soll nachgegangen werden. Darüber hinaus werden andere Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) und peripheren Nervensystems (PNS) auf ihre CD34-Reaktivität untersucht, um die Spezifität der Expression dieses Antigens zu evaluieren.

Als mögliches weiteres Differenzierungsantigen glioneuronaler Tumoren soll darüber hinaus Doublecortin untersucht werden. Dafür werden Tumoren des ZNS und PNS sowie ein Tissue Microarray mit normalen, nicht neuronalen Geweben auf ihre Immunoreaktivität für Doublecortin untersucht. Doublecortin ist ein mikrotubuli-assoziiertes Protein und spielt eine Rolle in der zellulären Motilität bei der embryonalen Hirnentwicklung (Gleeson et al. 1999).

Aufgrund der zellulären Funktion von Doublecortin als einem wichtigen Baustein der Zellmigration besteht außerdem der Verdacht, dass insbesondere infiltrierende Tumoren verstärkt Doublecortin-positiv sein könnten. Molekulargenetische Untersuchungen zu Genexpression von Doublecortin schlagen diesen als prognostischen Marker für Glioblastome und Neuroblastome vor (Rich et al. 2005 und Oltra et al. 2005). Dieser Fragestellung soll in der vorliegenden Arbeit mit den Methoden der Immunhistochemie nachgegangen werden.

1.2 Klassifikation von Hirntumoren

1.2.1 Historie

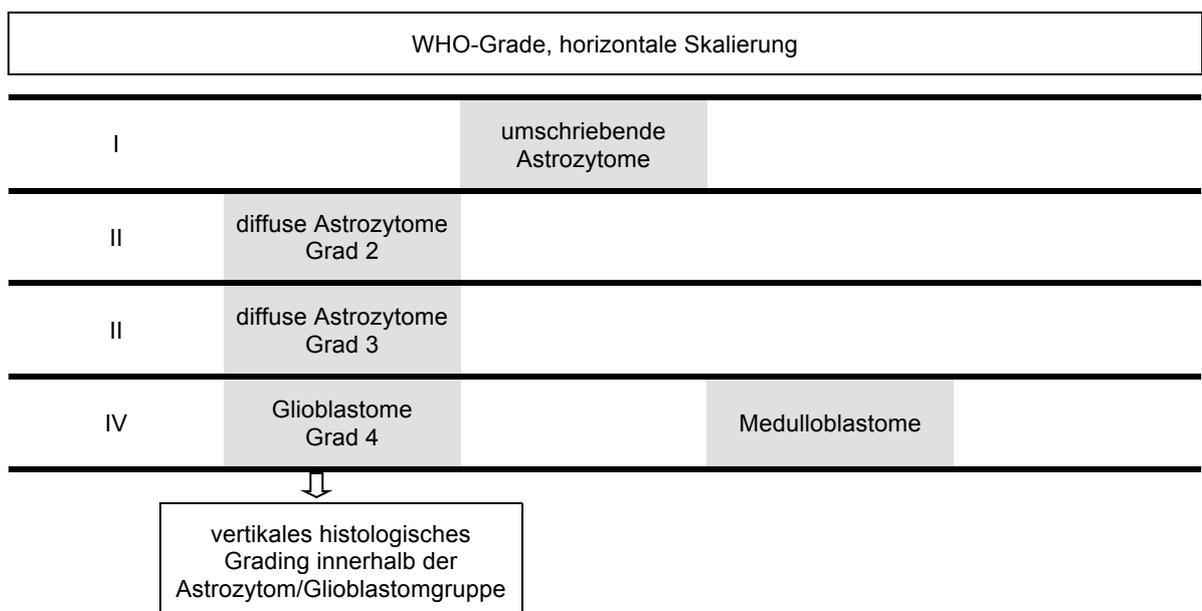
Zur Differenzierung von Hirntumoren gibt es eine Reihe von Systematisierungsbemühungen, von denen sich die WHO-Klassifizierung (aktuelle Fassung: Louis et al. 2007) als die gängigste durchgesetzt hat. Für die Behandlung und die Prognose der Patienten ist der histologisch ermittelte Anaplasiegrad eines Glioms neben der Größe und Lokalisation des Tumors bislang der wichtigste diagnostische Aspekt. Individuelle Therapieansätze erfordern eine immer differenziertere Diagnosestellung, in die mittlerweile auch molekulare Marker Einzug halten. Im Gegensatz zu allen anderen Tumorarten erfolgt kein Staging nach TNM-Richtlinien, da Hirntumoren vielfach diffus wachsen und üblicherweise keine Metastasen bilden (Kolles et al. 1998).

Rudolf Virchow hatte 1863 Gliome erstmalig beschrieben und nach ihrer Morphologie unterteilt, was lange die Basis für nachfolgende Einteilungen blieb. Nachfolgend wurden eine Reihe von Klassifikationssystemen entwickelt – beginnend mit einer ersten Einteilung von Gliomen durch Bailey und Cushing in den 1920er Jahren (Bailey und Cushing 1930). Die Neurochirurgen Harvey Cushing und Percival Bailey stellten in ihrer Arbeit systematisch sowohl die zytogenetischen Eigenschaften von Hirntumoren dar als auch die entsprechenden klinischen Verläufe und Überlebenstafeln. Ein biologisches Grading wurde Ende der 1940er Jahre von James Watson Kernohan vorgeschlagen, wobei dieser vier Malignitätsgrade definierte (Übersicht bei Koch 2007).

Nach langjähriger Forschungsarbeit am Collaborating Centre for Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung konnte unter dem Vorsitz von Klaus-Joachim Zülch 1979 die erste Version der mittlerweile allgemein anerkannten WHO-Klassifikation herausgegeben werden (Zülch 1979). In ihr wurden allen primären Hirntumoren Grade von I bis IV zugeordnet. In den Jahren 1993, 1997, 2000 und 2007 erschienen weitere Fassungen der WHO-Klassifikation, in denen jeweils neue Tumorunterarten bzw. -varianten beschrieben wurden (Kleihues et al. 1993, Kleihues 1997, Kleihues und Cavenee 2000, Louis et al. 2007).

1.2.2 Grading versus Typing

Die Schwierigkeit bei der Einteilung in vier Malignitätsgrade liegt darin, dass es keine Grading-Kriterien gibt, die auf alle Hirntumoren gleichermaßen anwendbar sind. Nicht jede Art von Hirntumor kommt in verschiedenen Anaplasie-Stufen vor und so gibt z.T. schon die Tumorart – also das Typing – die Prognose an, wie beispielsweise beim Medulloblastom WHO-Grad IV (Kolles et al. 1998). Dieses sogenannte „horizontale“ Grading von Zülch wurde bei der Neufassung der WHO-Kriterien 1993 (Kleihues et al. 1993) erweitert um eine „vertikale“ Klassifizierung von Astrozytomen (beruhend auf der Arbeit von Daumas-Duport et al. (1988) und zuvor schon Kernohan et al. 1949): Entsprechend dem Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Tumoreigenschaften (nukleäre Atypie, Mitose, Endothelproliferation, Nekrose) werden Punkte vergeben, deren Summe einem Tumor-Grad zugeordnet wird. Jedoch eignen sich längst nicht alle Tumoren des Nervensystems für ein vertikales Grading. Diesem Umstand wird in den letzten Fassungen der WHO-Klassifikation (Kleihues und Cavenee 2000 und Louis et al. 2007) Rechnung getragen. Dies resultiert aus der mittlerweile überkommenen Ansicht, dass sich Tumoren höheren Grades grundsätzlich aus Tumoren niedrigeren Grades entwickelt hätten. Umschriebene Astrozytome mit WHO-Grad I werden nunmehr deutlich unterschieden von diffusen Astrozytomen WHO-Grad II-IV, von denen sie *keine* Vorstufe darstellen.



Grafik 1.1: Vertikale und horizontale Gliederung des WHO-Klassifikationssystems (nach Feiden und Feiden 2008)

1.2.3 WHO-Kriterien

Die WHO-Kriterien basieren grundsätzlich auf histopathologischen Kriterien. Tumoren eines bestimmten Grades sind sich in ihrem biologischen Verhalten und der Morphologie in wenigen, aber essentiellen Aspekten ähnlich. Niedriggradige Gliome (bis Grad II) sind in der Regel besser differenziert, die Zelldichte ist geringer, zelluläre Anomalien und Atypien treten nur in geringerem Umfang auf und sie ähneln stark ihren nicht-neoplastischen Verwandten. Allerdings finden sich auch schon hier genetische Veränderungen. Diese können akkumulieren und so zu einer Progression der Malignität führen. Höhergradige Gliome (ab Grad III) zeigen anaplastische Zellen, Zeichen einer vermehrten Gefäßproliferation, eine deutlich gesteigerte Zahl von atypischen Zellen, eine gesteigerte Mitoserate und eine hohe Zelldichte (Übersicht bei Westphal und Lamszus 2010).

In ihrem allgemeinen Teil fasst sich die WHO-Klassifikation von 2007 zur Beschreibung der einzelnen Grade kurz:

- *Grad I*: Tumoren mit geringem proliferativen Potential, vollständige Heilung nur durch eine operative Tumorresektion möglich
- *Grad II*: Tumoren mit infiltrativem Wachstum, häufig Rezidive trotz niedriger Proliferationsrate, teilweise Progression zu malignen Tumoren
- *Grad III*: Tumoren mit eindeutigen Malignitätskriterien wie nukleärer Atypie und erhöhter mitotischer Aktivität, zusätzlich zur operativen Behandlung adjuvante Bestrahlung und/oder Chemotherapie
- *Grad IV*: Tumoren mit Malignitätszeichen wie erhöhter mitotischer Aktivität und Nekrose, rascher Krankheitsverlauf mit tödlichem Ausgang

Darüber hinaus gibt es keine allgemeingültigen, auf alle Tumoren anwendbaren histologischen Kriterien für die jeweiligen WHO-Grade (Feiden und Feiden 2008). Die Malignitätskriterien Kernpleomorphie, gesteigerte Zellularität, mitotische Aktivität und Nekrosen definieren bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen unterschiedliche Malignitätsgrade: Sind all diese Kriterien vorhanden, gilt der astrozytäre Tumor als Glioblastom, während der oligodendrogläre Tumor noch als anaplastischer Tumor eingestuft wird (Kolles et al. 1998). Auch das Vorkommen von Mitosen wird bei diesen Tumorentitäten unterschiedlich gewertet: Liegt beim Nachweis von Mitosen schon ein Astrozytom Grad III vor, wird das Oligodendrogliom noch als WHO-Grad II eingestuft (Feiden und Feiden 2008). Insgesamt sind und bleiben die Kriterien z.T. uneindeutig

und damit schlecht reproduzierbar, denn es gibt nur unzureichende Empfehlungen, ab welchem Ausprägungsgrad diese als signifikant angesehen werden können (Kolles et al. 1998, Feiden und Feiden 2008).

Dementsprechend wichtig ist zunächst die Klassifikation des Tumors. Erschwert wird diese dadurch, dass die Gewebeproben nicht zwingend repräsentativ für den Tumor sind und dass diffuse Gliome fast nie nur eine Differenzierungsrichtung der Tumorzellen zeigen. Beispielsweise sind Oligoastrozytome keine echten dualen Tumoren sondern meist Oligodendrogliome mit einem Anteil an astrozytär differenziertem Phänotyp (von Deimling et al. 1995, Feiden und Feiden 2008). Nachdem jedoch selbst diffus infiltrierende Oligodendrogliome mit einer deutlich besseren Prognose assoziiert sind als niedriggradige Astrozytome, ist hier eine exakte Diagnose insbesondere auch für die betroffenen Patienten von größter Wichtigkeit. Morphologische Kriterien – in diesem Falle ein helles bzw. optisch leeres Perikaryon bei hoher Zelldichte – stellten sich als unspezifisch heraus, da sie auch bei anderen Hirntumoren nachweisbar sind (Louis et al. 2007).

Die Immunhistochemie und auch die Molekulargenetik können weitere Hinweise zur Differentialdiagnose liefern. Vielfach sind die Färbungen auf einzelne Antikörper unspezifisch, lassen jedoch in der Kombination mit anderen Antikörpern gute Aussagen zur Tumorart zu. Um beim Beispiel der Oligodendrogliome zu bleiben: Eine positive MAP2-Färbung ist bei Gliomen unspezifisch, in Kombination mit einer fehlenden Positivität auf GFAP erhärtet sie den Verdacht für ein Oligodendrogliom. Und umgekehrt: GFAP-positive gliale Elemente mit diffuser Verzweigung zellulärer Ausläufer weisen auf astrozytäre Elemente hin (Blümcke et al. 2004).

1.2.4 Tumoren des zentralen Nervensystems

Grafik 1.2. zeigt die Einteilung der verschiedenen Tumorformen. An einigen Stellen wurden die zahlreichen Unterformen nicht mit aufgeführt. Die Einteilung folgt der WHO-Klassifikation von 2007 (Louis et al. 2007).



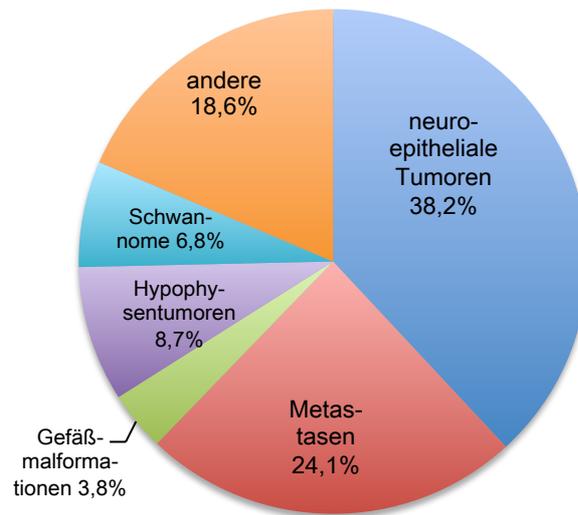
Grafik 1.2: WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS: Die hier aufgeführten Tumoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht untersuchte Tumorguppen nicht dargestellt.

1.3 Gliome und glioneuronale Tumoren

Bislang wurden über 120 Arten von primären Hirntumoren in die WHO-Klassifikation von Tumoren des Zentralen Nervensystems (aktuelle Fassung Louis et al. 2007) übernommen. In Deutschland liegt die Inzidenz der Hirntumoren bei 7,5 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro

Jahr (Ohgaki und Kleihues 2005). Die größte Gruppe der Hirntumoren umfasst die neuroepithelialen Tumoren (siehe Grafik 1.3). Die beiden anderen wichtigen Gruppen umfassen die gewöhnlich gutartigen Meningeome und die Metastasen. Die beiden größten Gruppen unter den neuroepithelialen Tumoren werden gebildet von den

Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen (56 %), gefolgt von den niedriggradigeren Astrozytomen mit 22 % (siehe Grafik 1.4). Der Anteil der anderen Formen (Oligodendrogliome, Ependymome, PNET, seltene Tumoren) ist mit 5-6 % jeweils etwa gleich groß. Die Verteilung im Kindesalter ist deutlich anders und der geringste Anteil mit 5 % entfällt hier auf die Glioblastome und anaplastischen Astrozytome (Ironsides et al. 2002).



Grafik 1.3: Hirntumoren, Häufigkeitsverteilung (nach Ironside et al. 2002)

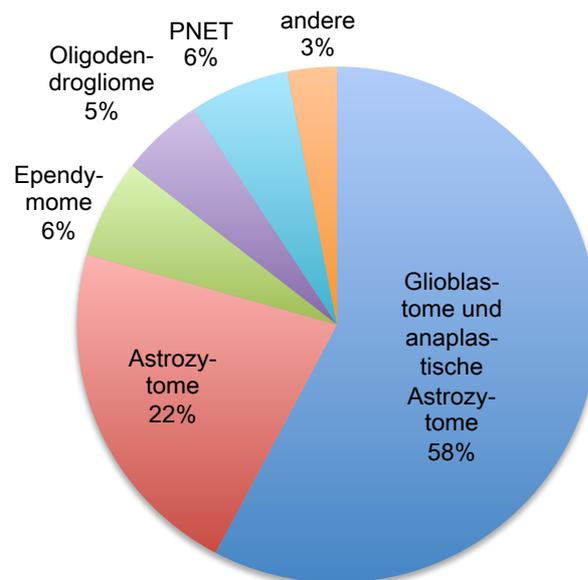


Abbildung 1.4: Neuroepitheliale Tumoren, Häufigkeitsverteilung (nach Ironside et al. 2002)

1.3.1 Gliogenese

Epidemiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die prophylaktische oder therapeutische Bestrahlung des Neurokraniums und seltene genetische Syndrome Risikofaktoren für die Entstehung von Hirntumoren sind (Preston-Martin et al. 2006). Allerdings treffen diese Umstände nur auf wenige Patienten zu. Bei Männern treten Gliome etwas häufiger auf als bei Frauen (Curado et al. 2009). Dementsprechend wurden epidemiologische Untersuchungen über weibliche Geschlechtshormone als Risikofaktor durchgeführt: Es konnte gezeigt werden, dass bei einer späten Menarche und Menopause ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Glioms auftritt, während das Risiko geringer wird bei einer Hormonersatztherapie und der Einnahme oraler Kontrazeptiva (Wang et al. 2011). Ein mögliches Risiko, das von Mobiltelefonen ausgeht, wurde in der Interphone-Studie untersucht (INTERPHONE Study Group 2010). Für die normale Nutzung eines Mobiltelefons konnte bislang kein erhöhtes Hirntumorrisiko gezeigt werden. Nur für die besonders häufige Mobiltelefonnutzung besteht möglicherweise eine erhöhte Tumorzinzidenz. Zur Klärung dieses Ergebnisses stehen allerdings noch weitere Untersuchungen aus (Cardis et al. 2011, Frei et al. 2011).

Als Ursprungszellen der Tumoren werden neurogliale Vorläuferzellen angenommen, die – wenn auch vereinzelt – auch außerhalb der üblichen Keimzentren der Neurogenese nachgewiesen wurden (Siebzehnrubl et al. 2011). Sie sind in unterschiedlichsten Differenzierungsstadien überall im zentralen Nervensystem verteilt, mit einem größeren Anteil in der weißen als in der grauen Substanz. In der weißen Substanz machen sie etwa 4 % der Zellen aus (Canoll und Goldman 2008). Nach der gemeinsamen Urzelle, der sogenannten „Apex-Zelle“, aus der sich alle Gliome entwickeln, wird weiter gesucht. Eine andere Entstehungshypothese ist, dass sich Gliome aus mehreren Gliomstammzellen entwickeln, die alle in die gleiche Krankheit münden (Venere et al. 2011).

In Mausmodellen konnte anhand der Aktivierung von Signalwegen wie EGFR oder PDGF oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gezeigt werden, dass in einer Vielzahl der Fälle die Stammzellen, die für eine Transformation in Gliomstammzellen empfänglich sind, aus der subventrikulären Zone stammen (Übersicht bei Westphal und Lamszus 2010 sowie Alcantara Llaguno et al. 2009 und Jacques et al. 2010). Die subventrikuläre Zone (SVZ) ist mit der subgranulären Zone des Gyrus dentatus eine der wenigen Regionen des Gehirns, in denen auch noch beim Erwachsenen Neurogenese stattfindet. Die Zellen der SVZ sind – obschon ebenfalls pluripotente Stamm- bzw.

Vorläuferzellen – nicht identisch mit den neuroglialen Stammzellen des Gyrus dentatus (welche unter anderem transient Doublecortin exprimieren, siehe hierzu Abschnitt 1.4.1.2.2) und werden daher anders bezeichnet (Kempermann et al. 2004). Neurogliale Stammzellen (Typ-B-Zellen) und vorübergehend vermehrungsfähige Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen) der SVZ scheinen am wahrscheinlichsten zu Gliomstammzellen werden zu können (siehe Abb. 1.1). Vermutlich findet diese Transformation recht früh in der Differenzierung von Stamm- oder Vorläuferzellen statt.

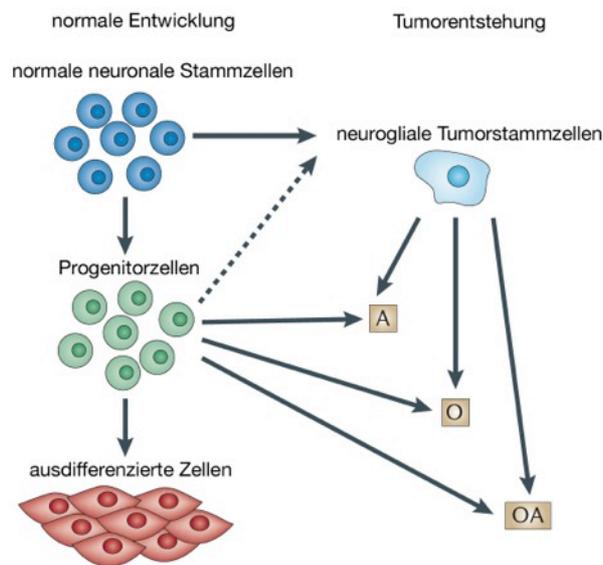


Abbildung 1.1: Modell der Gliogenese (aus Westphal und Lamszus 2010): Bei der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems entstehen reife Gliazellen aus Vorläuferzellen und diese wiederum aus neuroglialen Stammzellen. Tumoren könnten nun sowohl aus den Progenitorzellen entstehen oder über die Differenzierung in Tumorstammzellen. Je nach Differenzierungshintergrund können sich Astrozytome (A), Oligodendrogliome (O) oder Oligoastrozytome (OA) bilden. Die Tumorigenese aus reifen Gliazellen wird zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung als unwahrscheinlich angesehen.

Der Tumorphänotyp wird terminiert von der ausgehenden Zellart, dem zugrundeliegenden Gendefekt und dem lokalen Mikroumfeld (Canoll und Goldman 2008). Diese lokale Mikroumgebung wird wiederum bedingt durch Blutgefäße, die extrazelluläre Matrix und Wachstumsfaktoren und als Nische bezeichnet (Siebzehnruhl et al. 2011). Zur Identifizierung der Tumorstammzellen haben sich die Marker CD133 und Nestin durchgesetzt (Übersicht bei Dell’Albani 2008).

Am Anfang der Gliomentwicklung steht vermutlich eine Genmutation, zu der im Verlauf weitere hinzukommen und die so das Tumorstammwachstum mit zunehmender Anzahl der Mutationen beschleunigen und entdifferenzieren. Mit diesem Modell lässt

sich auch die morphologische Heterogenität der Tumoren erklären. In Abhängigkeit von der Mikroumwelt führen diese genetischen Läsionen nur teilweise zu veränderten Phänotypen (Siebzehnruhl et al. 2011, Adams und Strasser 2008).

Die Tumorentstehung wird weiter durch die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und die vermehrte Aktivierung der Signalwege befördert. Hervorzuheben ist dabei die Aktivierung von EGFR und PDGF als Ausgangspunkte von tumorrelevanten Signalwegen, die bei der Entstehung von Glioblastomen wohl eine wesentliche Rolle spielen (Dancey und Sausville 2003). Daneben kann die Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren dazu führen, dass die Zellen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen einnehmen, was wiederum bestimmten Tumoreigenschaften entspricht und nicht bei normalen glialen Zellen zu finden ist (Übersicht bei Rao et al. 2010b).

Die Fähigkeit von Gliomzellen zur Proliferation und Migration haben sie mit pluripotenten glioneuronalen Stammzellen und gering differenzierten Vorläuferzellen gemeinsam (Canoll und Goldman 2008). Dass Tumorzellen außerdem unterschiedliche Differenzierungsrichtungen eingeschlagen können (sogenanntes „lineage commitment“), stellt ebenfalls eine Vorläuferzellfähigkeit dar. Die zellulären Mechanismen der Migration ähneln sich dabei, beispielsweise die Veränderungen der zellulären Matrix, der Integrin-Signalweg, die Aktivierung von Neurotransmittern und von Wachstumsfaktoren. Die Migration und Infiltration von Tumorzellen erfolgt bevorzugt entlang der Bahnen und kann über Jahre asymptomatisch verlaufen (Cayre et al. 2009).

1.3.2 Pleomorphe Xanthoastrozytome

Pleomorphe Xanthoastrozytome (PXA) machen weniger als 1 % der Astrozytome aus (Kepes et al. 1997). Sie treten vor allem im Kindesalter und bei jungen Erwachsenen auf. Im Mittel sind die Betroffenen bei Diagnosestellung 22 Jahre alt. Einen Unterschied zwischen Frauen und Männern in der Auftretenshäufigkeit gibt es nicht (Giannini et al. 1999). Meist zeigen die Betroffenen vor Diagnosestellung Symptome wie epileptische Anfälle (71 %), oftmals über einen längeren Zeitraum. Unter den epilepsieverursachenden Tumoren ist der Anteil der PXA zwischen 1 und 7 % (Übersicht bei Wallace et al. 2011). In der Regel ist die Prognose gut, mit einer Überlebensrate von 70 % nach 10 Jahren (Giannini et al. 1999). Erstmalig wurden PXA 1993 in die WHO-Klassifikation aufgenommen. Sie entsprechen zumeist Grad II-Tumoren. Allerdings

gibt es auch pleomorphe Xanthoastrozytome mit anaplastischer Komponente WHO-Grad III (APXA) (Louis et al. 2007).

Fast immer sind PXA superfiziell im Großhirn gelegen und können die Meningen mit einbeziehen (Giannini et al. 1999). Am häufigsten sind sie im Temporallappen lokalisiert (49 %). In Einzelfällen wurde über PXA im Kleinhirn und Rückenmark sowie der Retina berichtet (Übersicht bei Giannini et al. 2007, Hamlat et al. 2007).

Makroskopisch imponieren die Tumoren relativ umschrieben und sind daher meist gut zu rezidieren (Pahapill et al. 1996, Kepes 1993). Regelmäßig weisen die PXA einen zystischen Anteil auf, von dem ein wandständiger Knoten ausgeht. In der T1-Gewichtung im MRT stellt sich dies häufig so auch dar und der Tumor ist Kontrastmittel anreichernd (Rao et al. 2010a). Üblicherweise findet sich kein perifokales Ödem, was auf ein langsames Wachstum hindeutet (Vu et al. 2012). Nur in Ausnahmefällen infiltrieren PXA die Dura, zeigen exophytisches Wachstum, mehrere Lokalisationen oder eine leptomeningeale Aussaat (Giannini et al. 2007).

In der Histologie finden sich pleomorphe Zellen mit xanthochromem, lipidreichem Zytoplasma. Neben spindelförmigen Zellen kommen plumpe, bizarre mehr- oder einkernige Riesenzellen vor. Weiter sind Kernatypien (stark variierende Größe und Anfärbbarkeit) und häufig Einschlüsse in den Zellkern zu erkennen. Im vakuolenreichen Zytoplasma finden sich granuläre Körper, die eosinophil oder blass angefärbt sein können. Manchmal sind die Zellen sehr dicht gepackt – ähnlich einem epitheloiden Wachstumsmuster. Oftmals finden sich Mitosen, die inhomogen im Tumorgewebe verteilt sind. Nekrosen sind relativ selten (11 % der Fälle). Perivaskulär finden sich teilweise Lymphozytenansammlungen (Giannini et al. 1999, Iwaki et al. 1987). Einzelne oder Cluster von neoplastischen Zellen werden von reichlich Retikulin-Fasern umhüllt. Daher rührt die ursprüngliche Ansicht, dass die Tumoren mesenchymaler Herkunft seien (Kepes 1993), zumal bei manchen PXA eine Basalmembran um einzelne Tumorzellen herum auftreten kann (Giannini et al. 2007). Allerdings führten immunhistologische und ultrastrukturelle Untersuchungen mittlerweile zu der Ansicht, dass die Tumorzellen neoplastische Astrozyten sind – oft mit Anteilen einer neuronalen Differenzierung (Giannini et al. 2002, Hirose et al. 2001).

Die Anzahl der Mitosen wurde als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert. Mehr als fünf Mitosen in zehn hochauflösenden Gesichtsfeldern sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Giannini et al. 1999 und Rao et al. 2010a).

15-20% der PXA-Rezidive PXA durchlaufen eine anaplastische Transformation. Sie präsentieren sich dadurch weniger pleomorph und eher diffus infiltrierend (Pahapill et al. 1996, Kepes 1993). In der Histologie finden sich die üblichen Zeichen der Anaplasie, wie erhöhte mitotische Aktivität, Nekrosen und gefäßendotheliale Proliferation (Giannini et al. 1999). Bei Zunahme der Malignität kann das Retikulin-Netzwerk nur noch bruchstückhaft vorkommen oder ganz verschwinden (Kepes et al. 1989). Trotzdem ist die Prognose besser als bei gewöhnlichen, fibrillären, rezidivierenden Astrozytomen (Macaulay et al. 1993, Pahapill et al. 1996). Möglicherweise liegt dies daran, dass die genetischen Abberationen in anaplastischen PXA nicht denen bei gewöhnlichen Astrozytomen entsprechen (Paulus et al. 1996).

Immunhistochemisch zeigen PXA eine starke Positivität für GFAP und Protein S-100 als Marker glialer Zellen (Giannini et al. 1999, Giannini et al. 2002). Daneben exprimieren sie aber auch neuronale Antigene: Neurofilament Protein, weniger häufig Synaptophysin, Chromogranin A, Klasse III β -Tubulin und MAP2 (Giannini et al. 2002, Powell et al. 1996, Hirose et al. 2008). Mitotische Zellen finden sich selten und die Proliferation ist gering (Ki67/MIB-1 und PCNA-Index $<1\%$) (Giannini et al. 1999, Macaulay et al. 1993). Seit einigen Jahren ist auch der regelmäßige Nachweis von CD34 bekannt (Reifenberger et al. 2003), welcher auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

Die Histogenese der PXA ist bislang noch nicht aufgeklärt. Derzeit wird angenommen, dass die Ursprungszellen subpiale astrozytäre Zellen sind, da die Tumoren eine superfizielle Lage und ultrastrukturelle Ähnlichkeiten zu diesen (wie eine Basallamina um einzelne Zellen herum) aufweisen (Giannini et al. 2007). Allerdings stellen die Expression von neuronalen Markern, CD34 und das gelegentliche Auftreten zusammen mit neuronalen Tumoren wie Gangliogliomen (Perry et al. 1997a) oder kortikalen Dysplasien diese Annahme in Frage. Möglicherweise ist die Herkunft der PXA komplexer und sie leiten sich von pluripotenten neuroektodermalen Vorläuferzellen oder aus einer vorbestehenden hamartösen Läsion ab (Im et al. 2004, Lach et al. 1996, Powell et al. 1996).

Differentialdiagnostisch müssen pleomorphe Neoplasien mit ebenfalls teilweise neuronalem Expressionsmuster in Betracht gezogen werden, wie desmoplastische Gangliogliome und dysembryoplastische neuroepitheliale Tumoren. Daneben kommen Tumoren mit einer uneindeutigen glioneuronalen Anfärbbarkeit, wie subependymale Riesenzell-Tumoren und Riesenzell-Glioblastome in Frage (Powell et al. 1996).

Wu et al. haben 2011 Diagnosekriterien für PXA WHO-Grad II vorgestellt, die insbesondere bei kleinen und möglicherweise nur bedingt aussagefähigen (stereotaktischen) Biopsien zur Geltung kommen sollten: Ein PXA liegt dann vor, wenn der Tumor eine superfizielle Lage mit bevorzugter Anlagerung an die Meningen aufweist und die Tumorzellen in mittelgradig zellulären kompakten Bündeln von Spindelzellen mit GFAP-Positivität und niedrigem Mitoseindex vorkommen (Wu et al. 2011).

1.4 Tumordifferenzierung mittels Immunhistochemie

Obschon in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht wurden in der Entwicklung molekulargenetischer Methoden, bleibt die histologische Aufarbeitung und Untersuchung der Goldstandard in der Diagnostik von Gliomen (Brat et al. 2008). Die bislang erschienenen WHO-Klassifikationen beruhen auf diesen Methoden. Dabei wird die konventionelle H&E-Färbung ergänzt durch immunhistochemische Färbungen und – je nach Fragestellung – um molekulargenetische Analysen erweitert.

Neben den grundsätzlichen histopathologischen Grading-Kriterien (Kernatypien, Mitosen, Gefäßendothelproliferation bzw. -hyperplasie und Nekrosen) gibt es eine Reihe von differentialdiagnostischen Aspekten, die unter Einbeziehung der Immunhistochemie und der Molekularbiochemie geklärt werden müssen (Übersicht bei Dunbar und Yachnis 2010):

- Liegt ein infiltratives oder fokales Wachstum vor?
- Ist der Tumor ein Gliom oder eine Raumforderung, die auf einer nichtneoplastischen Erkrankung (am häufigsten auf einer demyelinisierenden Erkrankung) beruht?
- Finden sich proliferierende Zellen und damit Mitosen?
- Liegt ein Gliom oder ein ähnlich dem Gliom differenzierter Tumor vor?
- Lassen sich Marker für eine bessere/schlechtere Prognose finden (z.B. MGMT-Promotor-Methylierung mit besserem Ansprechen auf die Therapie)?

1.4.1 Antigene

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen können insbesondere einzelne Zellen innerhalb wenig differenzierter cerebraler Tumoren genauer untersucht werden. CD34 und Doublecortin werden im Folgenden ausführlicher dargestellt.

1.4.1.1 CD34

1.4.1.1.1 Struktur des CD34-Moleküls

CD34 ist ein transmembranöses Typ I-Glycophosphoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa. Es gehört zur Familie der Sialomucine auf Zelloberflächen. Mit CD34 verwandte Sialomucine sind Podocalyxin, Endoglykan und CD43 (Krause et al. 1996, siehe Abb. 1.2[a]).

Das Rückgrat des Moleküls besteht aus einem 45kDa großen Anteil, der auf einer einheitlichen DNA-Sequenz basiert. Posttranslational wird der beträchtlichere Anteil des CD34-Moleküls durch N- oder O-Glykosylierung modifiziert, im Wesentlichen auf der Extrazellulärseite (Greaves et al. 1992). Die Glykanketten sind zudem stark sialysiert, was zusätzlich zu einer ausladenden Struktur des CD34-Moleküls beiträgt (Baumhueter et al. 1993). Für das murine CD34 gibt eine lange und eine gekürzte Form, die sich in ihrem phosphorylierten zytoplasmatischen Anteil unterscheiden (Krause et al. 1994, siehe Abb. 1.2 (b)). Gensequenzierungen von muriner und humaner CD34-DNA und dem Vergleich der erwartbaren Strukturen konnten starke Ähnlichkeiten und damit ähnliche Funktionen aufzeigen (Übersicht bei Fackler et al. 1995).

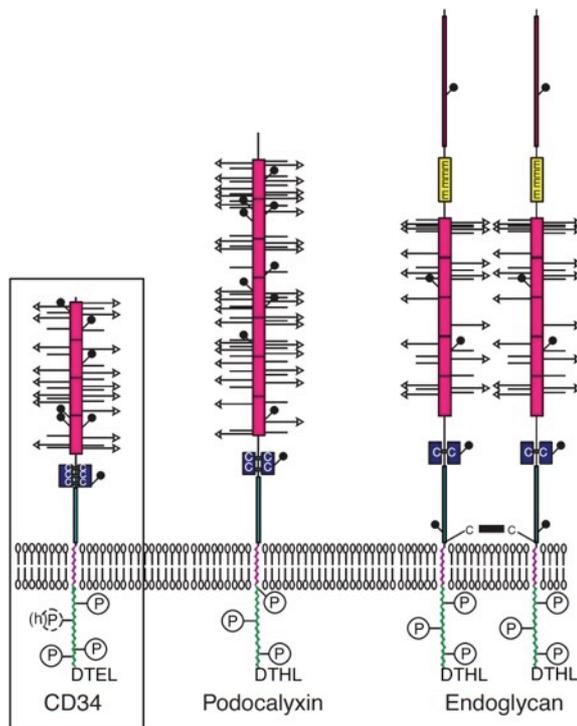
A

Abbildung 1.2(a): Proteinstruktur von humanem CD34, Podocalyxin und Endoglycan (nach Nielsen und McNagny 2009). Alle drei sind humane Typ I-transmembranöse Proteine. Sie sind alle stark glykosyliert (horizontale Streifen), sialyliert (Pfeilspitzen), haben ein Serin-Threonin reiches Rückgrat (pinker Balken) sowie Cystin reiche globuläre Region (dunkelblaue Markierung) und einen stängelförmigen Anteil (hellblauer Balken). Auf den einlagigen transmembranösen Anteil (violett) folgt ein kurzer zytoplasmatischer Schwanz (grün), der mögliche Phosphorylierungsstellen enthält und die C-terminale PDZ-Andock-Region (DTEL oder DTHL).

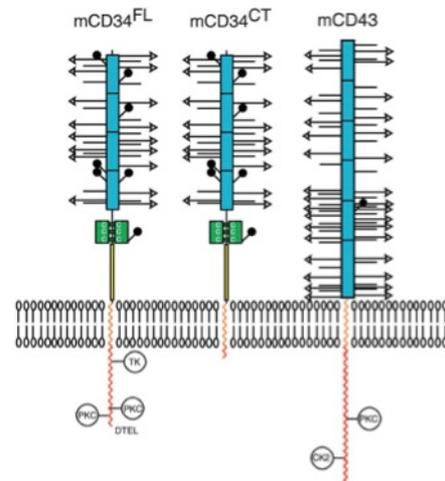
B

Abbildung 1.2(b): Struktur von murinem CD34 und CD43 (nach Drew et al. 2005b): mCD34FL (langes murines CD34-Molekül), mCD34CT (gekürztes murines CD34-Molekül), mCD43 (Modell des murinen CD43, basierend auf vorhergesagten Protein-Sequenzen). Blaue Boxen: Mucin-Anteile, grüne Boxen: Cystin reiche Anteile, schwarze Kreise: potentiell N-assoziierte Kohlenhydrate, horizontale Streifen: potentiell O-assoziierte Kohlenhydrate, PKC, CK2 und TK: potentiell phosphorylierte Stellen, DTEL: potentielle PDZ-Andock-Region.

1.4.1.1.2 Histologischer Nachweis von CD34

Üblicherweise wird CD34 als Marker für pluripotente hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen und Endothelien kleiner Gefäße eingesetzt. CD34 kann nicht nachgewiesen werden auf differenzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen (Fackler et al. 1995, Civin et al. 1984). Die klinische Anwendung für aus dem Blut oder Knochenmark angereicherte CD34-positive Stammzellen liegt in deren Einsatz bei Knochenmarkstransplantationen (Übersicht bei Krause et al. 1996, Nielsen und McNagny 2009). Entgegen dem bislang geltenden Dogma konnten Drew et al. 2002 die seit fast 30 Jahren

bekanntes CD34-positives Zellreihen erweitern und zeigen, dass auch reife murine Mastzellen positiv für CD34 sind (Drew et al. 2002, Drew et al. 2005a). Reife humane Mastzellen weisen hingegen keine CD34-Expression auf (Welker et al. 2000, Kirshenbaum und Metcalfe 2006). Mittlerweile ist auch bekannt, dass reife Eosinophile CD34 exprimieren (Rådinger et al. 2004). Im murinen Nervensystem kann CD34 in einer frühen fetalen Entwicklungsphase während der Anlage des Neuralrohres nachgewiesen werden, was eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems nahelegt (Lin et al. 1995).

CD34-positive Zellen finden sich auch bei einer Reihe von Tumoren diverser Gewebe: Naheliegender sind dies Tumoren aus hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzelllinien und Gefäßtumoren. Daneben ließ sich eine Immunreaktivität für CD34 auch bei solitären fibrösen Tumoren, GIS-Tumoren, Dermatofibrosarcoma protuberans, Spindelzell-Lipomen, epitheloiden Sarkomen, Myofibroblastomen sowie bei Neuroblastomen nachweisen (Übersicht bei Natkunam et al. 2000, Häfer et al. 1999). Es wird diskutiert, ob der Nachweis von CD34 bei so unterschiedlichen Tumoren daran liegen könnte, dass die Bindung des Antikörpers durch Kreuzreaktivität mit ähnlich strukturierten Zelloberflächenmolekülen zustande kommt. Für hämatopoetische Stammzellen und Endothelien wurde dem bereits nachgegangen. Es konnte gezeigt werden, dass die CD34-Gen-Expression übereinstimmt mit der Protein-Expression (Greaves et al. 1992, Fina et al. 1990). Weiterhin konnte in einer Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden, dass in Weichteiltumoren die immunhistologische Reaktivität übereinstimmt mit der Expression des CD34-Moleküls (Natkunam et al. 2000).

Bei Tumoren des Nervensystems wurde die Expression von CD34 nachgewiesen für Schwannome, solitäre fibröse Tumoren der Meningen, Subtypen von meningealen Hämangioperizytomen, fibrösen Meningeomen und Neuralrohr-ähnlichen Strukturen in einem unreifen Teratom (Weiss und Nickoloff 1993, Perry et al. 1997b, Blümcke et al. 1999). Außerdem fanden sich CD34-positive Zellen in Neoplasien und Malformationen aus Proben von Patienten mit chronischer Epilepsie, wie bei Gangliogliomen, niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen und bei chordoidalen Gliomen des 3. Ventrikels und den pleomorphen Xanthoastrozytomen (Blümcke et al. 1999, Reifenberger et al. 1999 und 2003). Im gesunden adulten menschlichen Gehirn ließ sich bislang keine Expression von CD34 auf Nervenzellen nachweisen, ebenso nicht in malignen

nen peripheren Nervenscheidentumoren (Blümcke et al. 1999, Weiss und Nickoloff 1993).

1.4.1.1.3 Biologische Funktion von CD34

Trotz großer Forschungsanstrengungen ist die Funktion von CD34 bislang noch unzureichend aufgeklärt. Untersuchungen an CD34-Knockout-Mäusen zeigten unspezifische und uneinheitliche Ergebnisse. In der Untersuchung von Cheng et al. (1996) lieferten diese Mäuse eine reduzierte Anzahl an hämatopoetischen Vorläuferzellen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch bei den adulten Mäusen, was auf eine Störung von Proliferation oder Differenzierung hindeuten könnte. Die Zahl der reifen Zellen blieb hingegen normal. In der Arbeit von Suzuki et al. (1996) fand sich lediglich eine geringere Migration Eosinophiler in die Lunge von Knockout-Mäusen nach Allergenexposition, möglicherweise als Ausdruck einer mangelnden Bindung von L-Selectin. Das Fehlen von CD34 führte in beiden Untersuchungen zu sehr milden Phänotypen, was möglicherweise daran liegt, dass CD34-ähnliche Proteine dessen Funktion übernehmen. Hierfür spricht die Beobachtung, dass die mit CD34 strukturell eng verwandten Oberflächenproteine Podocalyxin und Endoglykan das Fehlen von CD34 kompensieren können (Nielsen und McNagny 2009, Furness und McNagny 2006, Sasseti et al. 1998 und 2000). CD34 und seine verwandten Zelloberflächenproteine verhindern unspezifische Bindungen von hämatopoetischen Zellen an Endothelien und die Gewebsinfiltration der Leukozyten (Ardman et al. 1992, siehe auch Abb. 1.3).

Einen indirekten Hinweis auf die antiadhäsive Funktion von CD34 – bezogen auf Endothelien – gibt eine Untersuchung über den Zusammenhang der Expression von Adhäsionsmolekülen und CD34 (Delia et al. 1993). Es zeigte sich, dass endotheliale Zellen die Expression von CD34 herunterregulieren, wenn Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und ELAM-1 durch die Stimulation mit IL-1 hochreguliert werden. Zudem kann CD34 – wenn durch Phosphorylierung aktiviert – die Durchlässigkeit für transendotheliale Migration und die Metastasierung von Tumoren erleichtern (Nielsen et al. 2007) (siehe Abb. 1.3).

Aufschluss über die Rolle der langen versus kurzen Form des CD34-Moleküls konnte eine Untersuchung mit murinen Zellkulturen geben. Bei dieser zeigte sich, dass sich myeloische M1-Zellen mit dem langen CD34-Molekül unter Zugabe von Differenzierungsfaktoren wie IL-6 wenig und ohne Faktoren gar nicht differenzierten. M1-Zellen

mit der kurzen Form von CD34 dagegen differenzierten sich unter Zusatz derselben Faktoren in Makrophagen (Fackler et al. 1995). Üblicherweise wird sowohl auf den myeloischen als auch auf den epithelialen Zellen die lange Form von CD34 exprimiert (Krause et al. 1994, Nakamura et al 1993). Demzufolge scheint CD34 blockierend auf die Zelldifferenzierung zu wirken.

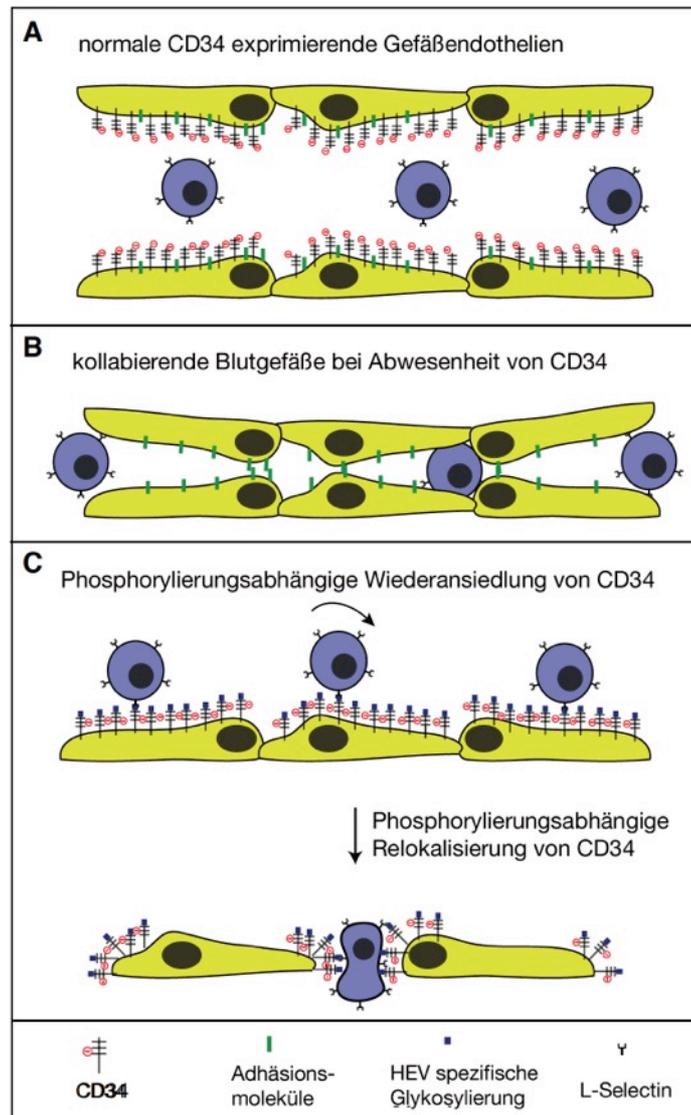


Abbildung 1.3: CD34 vermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktionen (nach Nielsen und McNagny 2009): (A) CD34 auf Gefäßendothelien wirkt abweisend auf zirkulierende Blutstammzellen. (B) Gegenüberliegende Gefäßwände kollabieren bei Fehlen von CD34. Ebenso kommt es zur unspezifischen Bindung von hämatopoetischen Stammzellen. (C) Die Glykosylierung von CD34 in postkapillären Venolen (HEV) erleichtert die Adhäsion von naiven Lymphozyten. Wird CD34 phosphoryliert, ändert es seine Lokalisation, wandert zu den Zellverbindungsstellen und erleichtert die transendotheliale Migration.

1.4.1.1.4 Referenzuntersuchung

Reifenberger et al. veröffentlichten 2003 erstmalig eine Arbeit, die den Nachweis von CD34 bei pleomorphen Xanthoastrozytomen führen konnte. Ausgangspunkt der Arbeit war die Beobachtung, dass sich PXA genetisch von anderen diffusen Gliomen unterscheiden (Giannini et al. 1999, Kaulich et al. 2002). Beispielsweise fehlen ihnen bestimmte Genalterationen, die bei anderen neuroepithelialen Tumoren regelmäßig auftreten. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass in neoplastischen Läsionen und Malformationen, die die Ursache für eine Epilepsie darstellen, eine vermehrte CD34-Expression nachweisbar ist (Blümcke et al. 1999). Reifenberger et al. (2003) gingen daher der Vermutung nach, dass PXA – die gewöhnlich ebenfalls epileptische Anfälle verursachen – sich durch immunhistologische Marker von anderen diffusen Gliomen unterscheiden lassen müssten und dass einer dieser Marker CD34 sein könnte.

Diese Vermutung bestätigte sich in einer großen Fallserie (Reifenberger et al. 2003): Von 60 Tumorproben waren 73 % CD34-positiv. PXA WHO-Grad II waren deutlich häufiger CD34-positiv (84 %) als anaplastische PXA WHO-Grad III (44 %). Der Anteil der CD34-positiven-Zellen am gesamten Tumor variierte in den untersuchten Proben von Fall zu Fall deutlich und die Tumorzellen waren innerhalb des Tumors regional uneinheitlich verteilt. Ebenso uneinheitlich waren die CD34-positiven Strukturen. CD34 wurde auf Membranen von Zellkörpern und Zellausläufern oder im Zytoplasma oder im perizellulären oder –lobulären Stroma (Retikulin-Netzwerk) gefunden. Außerdem wurden nicht-neoplastische, fleckförmig verzweigte Zellhaufen im Cortex außerhalb der PXA gefunden, die ebenfalls stark CD34-positiv waren. Aufgrund ähnlicher morphologischer Beobachtungen bei Gangliogliomen wird von den Autoren eine phänotypische Verwandtschaft zu diesen postuliert, zumal wiederholt in Fallberichten ein gemeinsames Auftreten der beiden Tumorarten berichtet wurde (Lindboe et al. 1992, Kordek et al. 1995, Evans et al. 2000).

Weiter wurde mithilfe der RT-PCR untersucht, welche der Isoformen des CD34-Moleküls in den PXA exprimiert wird. Es zeigte sich, dass sowohl die lange als auch die gekürzte Form gleichermaßen exprimiert werden (Reifenberger et al. 2003).

1.4.1.2 Doublecortin

1.4.1.2.1 Struktur des Doublecortin-Moleküls

Doublecortin (DCX) gehört zu der Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) und ist etwa 40 kDa schwer. Es besteht aus zwei funktionellen Einheiten: der aminoterminalen Anteil bindet an die Mikrotubuli und besteht aus zwei homologen kleineren Anteilen. Diese kleineren Anteile am N-terminalen Ende sind evolutionär konservierte Tandem-Repeats, sogenannte „DC-Repeats“ (Moore et al. 2004). Überwiegend finden sich die für die Lissenzephalie verantwortlichen Mutationen in diesen Repeats (Sapir et al. 2000). Das C-terminale Ende stellt dagegen die Bindungsstelle für Proteinkinasen dar. Posttranslational wird das DCX-Molekül durch diese phosphoryliert, was vermutlich ein Signal zur Kontrolle der neuronalen Zellmigration darstellt (des Portes et al. 1998, Gleeson et al. 1999). Das DCX-Molekül hat mit anderen bekannten MAPs keine Ähnlichkeit. In der Zellkultur von Neuronen konnte es am Rande des Zellkörpers ringförmig mit dem distanten Zellkern als Zentrum in fibrillären Strukturen nachgewiesen werden. DCX ist an die Protofilamente der Mikrotubuli assoziiert (Gleeson et al. 1999, Moore et al. 2004). Die Bindung von DCX an Mikrotubuli wird von einem System von Kinasen und Phosphatasen kontrolliert (LoTurco 2004).

1.4.1.2.2 Nachweis von Doublecortin

Die Expression von Doublecortin im humanen Gehirn ist in Neuroblasten während der Fetalperiode am größten, mit einem Höhepunkt um die 22. Gestationswoche. In der Kinderzeit nimmt die Expression ab (Gleeson et al. 1998). Im sich entwickelnden murinen Gehirn ist die Lokalisation weitgestreut aber auf bestimmte – migrierende – Zellen beschränkt: postmitotische cortikale Neurone, retinale Neurone der Ganglienzellschicht, Körnerzellen der äußeren cortikalen Körnerschicht, Körner- und Purkinje-Zellen des Cerebellums, Rückenmarksneurone sowie alle Elemente des peripheren Nervensystems, wie die Neurone der Spinalganglien, des Grenzstrangs und der Trigeminusganglien (Gleeson et al. 1999).

Im adulten murinen Gehirn persistiert die Expression von DCX in Regionen der Neurogenese wie dem rostralen migratorischen Strom, dem Bulbus olfactorius, der subventrikulären Zone (SVZ) und im Hippocampus (Eriksson et al. 1998, Brown et al. 2003, Jin et al. 2004, Übersicht bei von Bohlen und Halbach 2007). Daneben wurden

DCX-exprimierende Zellen auch nachgewiesen im Striatum, Corpus callosum, piriformem Cortex, der Amygdala und dem inferioren Temporalgyrus (ITG) verschiedener Tierarten (Übersicht bei Liu et al 2008).

Sowohl bei Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie als auch bei der gesunden Vergleichsgruppe konnten im Hippocampus DCX-positive Zellen nachgewiesen werden. Vermutlich sind dies postmitotische Neurone in der frühen Phase der neuronalen Entwicklung (Liu et al. 2008). Die Neurogenese im Hippocampus ist auf ein kleines Areal beschränkt: die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus (von Bohlen und Halbach 2011). Sie lässt sich in unterschiedliche Stadien einteilen, denen morphologische und immunhistochemische Charakteristika zugeordnet sind (Abb. 1.4).

DCX wird in der zentralen Phase der Neurogenese nachgewiesen, ab Stadium 2b bis zum Übergang von Stadium 4 zu 5 (Kempermann et al. 2004). Hierbei differenzieren sich die neu entstandenen Zellen und spreizen ihre dendritischen Ausläufer, um sich funktionell zu vernetzen. Diese gerade entstandenen Neurone exprimieren nur frühe neuronale Antigene und keine Antigene von glialen, undifferenzierten oder apoptotischen Zellen (Rao und Shetty 2004). In proliferierenden Zellen wird DCX üblicherweise nicht nachgewiesen (Friocourt et al. 2003).

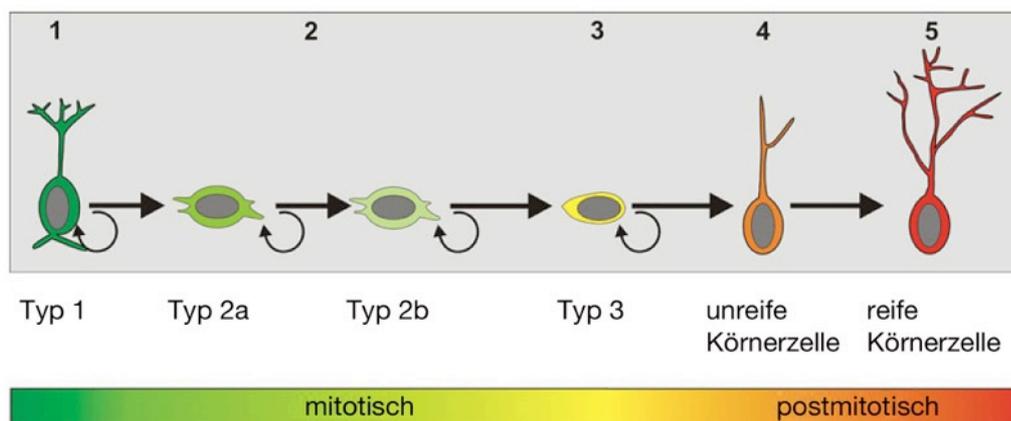


Abbildung 1.4: Fünf Stadien der Neurogenese im Gyrus dentatus (nach von Bohlen und Halbach 2011): Typ 1: mutmaßliche Stammzelle; Typ 2: Vorläuferzellen, die sich vorübergehend teilen können und differenzieren; Typ 3: Vorläuferzellen, die in die Körnerschicht des Gyrus dentatus migrieren; Typ 4 (unreife Körnerzelle): postmitotische Zellen, deren Dendriten elongieren und sich vernetzen; Typ 5 (reife Körnerzelle): funktionelle Integration der Körnerzellen in das hippocampale Netzwerk.

Bei Astrozyten des Neocortex konnte gezeigt werden, dass diese ebenfalls DCX exprimieren können (Verwer et al 2007). Dies wurde in einer weiteren Studie bestätigt, die die Untersuchung mit demselben Antikörper (AB5910, Chemicon) wiederholt hat. Allerdings wurde keine Reaktion bei der Färbung mit einem anderen Antikörper (C-18, Santa Cruz Biotechnology) nachgewiesen (Liu et al. 2008). Interessanterweise lässt sich DCX auch bei Neuroblastomen, einer Tumorerkrankung des peripheren autonomen Nervensystems nachweisen. Hier konnte gezeigt werden, dass sich DCX im Blut sehr gut als Verlaufsmarker für die Detektion von minimalen Tumorresiduen eignet (Oltra et al 2005). In einer aktuellen Arbeit von Nakagomi et al. (2012) wurden im murinen ZNS erstmalig nach Ischämie DCX-positive neuronale Stamm-/Progenitorzellen im betroffenen Cortex und der Pia mater gefunden.

1.4.1.2.3 Biologische Funktion von Doublecortin

Die Migration von Nervenzellen ist ein komplexer Prozess der zytoskeletalen Reorganisation, bei dem das Zellstroma akkordeonähnlich zwischen einer expandierenden und einer retrahierenden Bewegung wechselt, hauptsächlich ausgeübt durch die Lamellipodien, die dabei ein gekräuseltes Aussehen annehmen können. Die zytoskeletalen Veränderungen basieren auf einer Reorganisation von Aktin, Neurofilamenten und Mikrotubuli (Zusammenfassung bei Gleeson et al 1999). Mikrotubuli bilden eine Brücke zwischen der Zellmembran und dem Soma, kontrollieren so die Zellform (Gregory et al. 1988) und ziehen den Zellkern körbchenartig in der Zellmigration mit (Rivas und Hatten 1995). DCX lagert sich nun in vitro nicht nur an Mikrotubuli von Neuronen an, sondern fördert auch noch deren Polymerisation: Dabei stabilisiert und bündelt DCX die Mikrotubuli (Gleeson et al. 1999, Moores et al. 2004). Auf Zellebene führt ein Defekt der Doublecortin-Funktion dazu, dass die Transformation der neuronalen Zellen von einer multipolaren Form in eine migrierende Zelle mit einem sogenannten Wachstumskegel inhibiert ist (Bai et al. 2003). Es findet sich auch in den Neuriten nicht-migrierender unreifer Neurone, wobei es sowohl eine Rolle in der Stabilisierung der neuronalen Ausläufer spielt als auch in der Elongation der Axone und möglicherweise in der Zelladhäsion (Friocourt et al. 2010).

Die exakte Funktion von DCX wird jedoch weiter diskutiert, insbesondere da die bisherigen Ergebnisse überwiegend bei in vitro-Versuchen erzielt wurden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DCX über die Mikrotubuli-stabilisierende Funktion hinaus

noch andere Effekte auf die neuronale Migration hat: In der *in vitro* Kombination von neuronalen Migrations-Assays mit retroviraler Transduktion konnte demonstriert werden, dass DCX und LIS-1 zusammen mit Dynein die Bindung des Zentrosoms an den Zellkern vermitteln, was möglicherweise bei entsprechenden Gendefekten die Ursache für die Typ1-Lissenzephalie darstellt (Tanaka et al. 2004a). Weiter spielt DCX möglicherweise eine Rolle im intrazellulären Transport von Vesikeln in Neuronen (Deuel et al. 2006).

Ein genetischer Defekt von DCX führt bei Menschen zur X-chromosomalen Typ 1-Lissenzephalie, die bei männlichen Betroffenen zu einem schwerwiegenden Abbruch der neuronalen Migration mit einer letztlich rudimentären Entwicklung eines insgesamt verdickten, auf vier Schichten reduzierten und nahezu ungyrierten Cortex führt. Heterozygote weibliche Betroffene haben eine weniger ausgeprägte Form mit einem ebenfalls verdickten Doppelcortex und teilweise normal ausgebildeten Neuronen in einem pathologisch formierten 6-schichtigen Cortex (Berg et al. 1998, Übersicht bei Friocourt et al. 2003 und 2010). Weitere Gendefekte, die zu einem phänotypisch sehr ähnlichen Krankheitsbild führen und als Typ 1-Lissenzephalie (oder Agyrie-Pachygyrie) bezeichnet werden, betreffen die Gene für LIS-1, ARX, TUBA1A, VLDLR, RELN, WDR62 und die Deletion von Chromosom 17p13.3 (Übersicht bei Friocourt et al. 2010).

Klinisch zeigen die Betroffenen ein je nach Gendefekt unterschiedliches Muster mit mentaler Retardierung, Krampfanfällen, Organfehlbildungen bzw. -dysfunktionen und eine deutlich reduzierte Lebenserwartung (Gleeson et al. 1998, des Portes 1998). Allerdings wurde auch von einem Fall berichtet, bei dem zwar eine Genmutation auftrat, diese sich aber in keinem klinischen Symptom manifestiert hat (Demelas et al. 2001).

1.4.1.2.4 Induktion der DCX-Expression

DCX-positive unreife neuronale Vorläuferzellen können im Grenzbereich von geschädigten Hirnarealen nachgewiesen werden. Diese Schädigungen treten durch Ischämien, Verletzungen oder neurodegenerative Erkrankungen auf und führen zu Zelltod, glialer Aktivierung und Morbus-Alzheimer-Pathologien¹. Bisläng ist allerdings noch nicht geklärt, ob neuronale Vorläuferzellen auf eine proliferative Reaktion aus den Keimzellen hin zum beschädigten Hirnareal migrieren oder ob sie sich schon zuvor im Neo-

¹ Morbus-Alzheimer-Pathologien: Pathologische Anreicherung von Beta-Amyloid-Plaques und fibrillären Ablagerungen von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen.

cortex befunden haben und sich erst auf den Stimulus redifferenzieren und dabei DCX exprimieren (Übersicht bei Verwer et al. 2007, siehe auch Björklund und Lindvall 2000). Je nach Schädigung werden unterschiedliche Prozesse in Gang gesetzt, die mit einer DCX-Expression verbunden sind:

- Als Reaktion auf Hypoxie konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass DCX-/BrdU-positive-Zellen aus dem Gyrus dentatus in das meistgeschädigte CA1-Areal des Hippocampus migrieren (Zhou et al. 2004).
- Eine mechanische Schädigung – ebenfalls im Mausmodell untersucht – bewirkt die Migration von DCX-positiven Zellen via Striatum in das Randgebiet der Verletzungszone (Sundholm-Peters et al. 2005). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen lassen sich DCX-positive Zellen vermehrt in der subependymalen Schicht und im Gyrus dentatus nachweisen. Die Frage, ob die Immunoreagibilität für DCX von den neuronalen oder glialen Zellen ausgeht oder von beidem, wird weiter diskutiert.
- Bei Morbus Alzheimer zeigen die vorangegangenen Studien bereits ein differenziertes Bild: Während die Neurogenese bei dieser Erkrankung gesteigert ist und entsprechend auch die Doublecortin-Expression (Jin et al. 2004), konnten Verwer et al. zeigen, dass die Positivität von Astrozyten für DCX negativ korreliert mit lokalen Morbus-Alzheimer-Pathologien (Verwer et al. 2007).
- Die Streudepolarisation induziert ebenfalls eine neuronale Migration aus der SVZ ins Striatum und den geschädigten Cortex. Allerdings exprimieren die Neurone DCX nur solange, wie sie sich noch in der SVZ befinden (Yanamoto et al. 2005).

Ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen ist der Zusammenhang von Doublecortin-Expression und Epilepsie. Parent (2005) konnte nachweisen, dass epileptische Anfälle die neuronale Proliferation im adulten Rattenhirn verstärken und die Neuroblasten anschließend in den Cortex auswandern können. Liu et al. konnten erstmalig im humanen adulten Gehirn bei mesialer Temporallappenepilepsie (auch als Hippocampus-sklerose bezeichnet) DCX-positive Zellen im Temporallappen-Cortex nachweisen. Eine Subpopulation dieser Zellen koexprimierte auch NeuN (ein Marker für reife Neuronen) – ein Hinweis darauf, dass es im Rahmen der Epilepsie zur Neurogenese kommt (Liu et al. 2008).

Couillard-Despres et al. (2005) stellten die Veränderungen des Expressionsmusters von Zellmarkern bei neuronalen Stammzellen und reifen Zellen dar (Abb. 1.5). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Doublecortin-Expression nicht im Zusammenhang mit der Regeneration von Neuriten oder Gliogenesis auftritt.

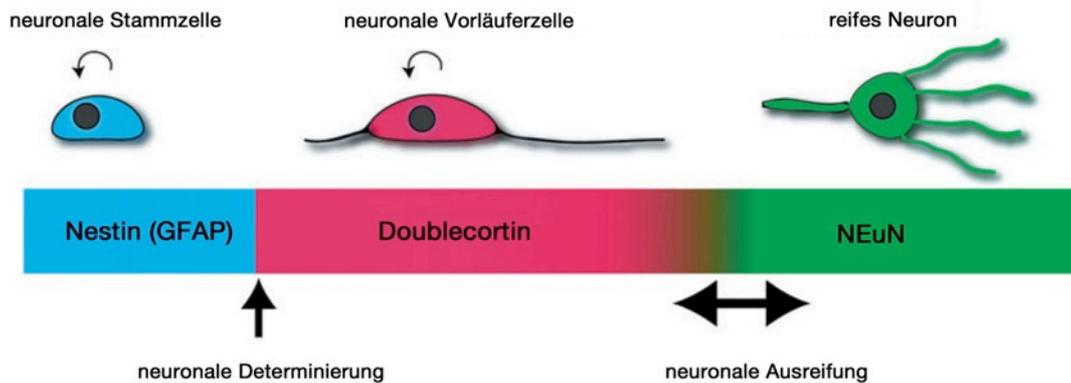


Abbildung 1.5: Veränderung der Expression von Zellmarkern: Die Expression von Nestin als Marker von neuronalen Stammzellen tritt nicht parallel zu der von Doublecortin auf. DCX wird neu exprimiert, wenn die Zellen als neuronale Vorläuferzellen vorliegen und wieder herunterreguliert, wenn aus der neuronalen Vorläuferzelle das reife Neuron wird. Dann exprimieren die reifen Neurone NeuN. (Abb. nach Couillard-Despres et al. 2005).

1.5 Arbeitshypothesen

Vor dem Hintergrund der referierten Zusammenhänge beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Thesen:

1. Die Sensitivität von CD34 für pleomorphe Xanthoastrozytome ist nicht so hoch wie bislang berichtet.
2. Die Expression von CD34 ist nicht spezifisch für pleomorphe Xanthoastrozytome.
3. Es gibt qualitativ unterschiedliche immunhistologische Färbemethoden.
4. Doublecortin ist bei Tumoren des zentralen Nervensystems nachweisbar.
5. Der Nachweis von Doublecortin ist spezifisch für bestimmte Tumorentitäten wie diffuse glioneuronale Tumoren.
6. Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems exprimieren ebenfalls Doublecortin, da Mikrotubuli assoziierte Proteine auch in anderen Geweben nachweisbar sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorgewebeprobe

Die in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeblöcke wurden aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen. Insgesamt wurden für die Analyse von CD34 187 Fälle aus den Jahren 1989 bis 2005 und für die Analyse von DCX 230 Fälle aus dem gleichen Zeitraum untersucht. Die Gewebeprobe wurden von zwei Neuropathologen gesehen und sind nach den aktuellen WHO-Kriterien klassifiziert worden. Für die Analyse lagen die Proben anonymisiert mit Angabe der Fallnummer, Diagnose, Alter und Geschlecht vor.

Im Einzelnen wurden Proben mit folgenden Diagnosen untersucht:

- 12 pilozytische Astrozytome WHO-Grad I
- 9 Astrozytome WHO-Grad II
- 19 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III
- 22 Glioblastome WHO-Grad IV
- 10 pleomorphe Xanthoastrozytome WHO-Grad II oder III
- 12 Ependymome WHO-Grad II
- 21 Oligodendrogliome WHO-Grad II
- 8 anaplastische Oligodendrogliome WHO-Grad III
- 5 Gangliozytome WHO-Grad I
- 8 Gangliogliome WHO-Grad I
- 16 Gangliogliome WHO-Grad II
- 2 Gangliogliome WHO-Grad III
- 10 Medulloblastome WHO-Grad IV
- 12 Teratome WHO-Grad I
- 22 Schwannome WHO-Grad I
- 4 maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST), WHO-Grad III
- 37 Neurofibrome WHO-Grad I (nur auf DCX-Expression untersucht).

2.1.2 Tissue Microarray

Ein Tissue Microarray (TMA) mit 592 Gewebeproben von normalem menschlichem Gewebe wurde freundlicherweise von Herrn Professor G. Sauter (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Der Array enthält jeweils 8 verschiedene Proben von 74 Gewebearten (in alphabetischer Reihenfolge):

Analkanal – Haut, Analkanal – Übergangsmukosa, Aorta – Endothel, Aorta – Media, Appendix – Mukosa, Appendix – Muskelschicht, Bronchien – Glandulae bronchioles, Bronchien – Schleimhaut, Brustdrüse, Colon – Muskelschicht, Colon descendens – Mukosa, Duodenum – Brunner Drüsen, Duodenum – Mukosa, Eileiter – Mukosa, Ektocervix, Endocervix, Fettgewebe, frühe Plazenta, frühe Plazenta – Dezidua, Gallenblase – Epithel, Glandula sublingualis, Glandula submandibularis, Glans penis – Corpus spongiosum, Großhirn – graue Substanz, Großhirn – weiße Substanz, Harnblase – Muskelschicht, Harnblase – Urothel, Haut, Haut – Haarfollikel und Talgdrüsen, Herzmuskel, Hoden, Hypophysenhinterlappen, Hypophysenvorderlappen, Ileum – Mukosa, Ileum – Muskelschicht, Kleinhirn – graue Substanz, Kleinhirnrinde, Leber, Lippe – kleine Speicheldrüsen, Lippe – orale Mukosa, Lunge, Lymphknoten, Magen – Antrum, Magen – Corpus, Magen – Muskelschicht, Milz, Mundhöhle, Nasennebenhöhlen, Nebenhoden, Nebenniere, Nebenschilddrüse, Niere – Mark, Niere – Rinde, Nierenbecken – Muskelwand, Nierenbecken – Urothel, Ösophagus – Muskelschicht, Ösophagus – Übergangsepithel, Ovar – Corpus luteum, Ovar – Graaf-Follikel, Ovar – Stroma ovarii, Pankreas, Parotis, Prostata, quergestreifte Muskulatur, reife Plazenta, Rektum – Mukosa, Samenblase, Schilddrüse, Thymus, Tonsille, Tonsille – Oberflächenepithel, Uterus – Myometrium, Zungenmuskulatur.

Um zufällige Fehler durch die kleine Größe der Gewebeprobe zu minimieren, enthält der TMA je Gewebeart acht Proben.

2.1.3 Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)

Antibody Diluent Reagent Solution	00-3218, Zymed, Paisley, UK
Aqua dest.	Apotheke UKE
Aquatex [®] -Eindeckmedium	108562, Merck KGaA, Darmstadt, D
Citronensäure-Monohydrat	100244, Merck KGaA, Darmstadt, D
DAB	D5637, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dako Pen	S2002, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D
Ethanol 100 % und 96 %	Apotheke UKE
Eukitt [®]	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
FastRed-Tabletten	11496549001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
H ₂ O ₂ (Perhydrol)	107209, Merck KGaA, Darmstadt, D
HCl 1N	109057, Merck KGaA, Darmstadt, D
HCl 2N	109063, Merck KGaA, Darmstadt, D
Mayer's Hämalan	100063, Merck KGaA, Darmstadt, D
TBS-Ready-to-use	S1968, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	106448, Merck KGaA, Darmstadt, D
Triton [®] X100 Heidelberg, D	37238, SERVA Electrophoresis GmbH,
Trizma [®] -Base Steinheim, D	T1503, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Xylol	0750021, SDS Peypin, F

2.1.4 Antikörper

a) Erstantikörper

- gegen *CD34-Epitope*: Es wurde der monoklonale Klasse II Maus-Anti-Mensch Antikörper-Klon QBEnd-10 von folgenden Herstellern verwendet:

- Biozol (Ref-Nr.: BZL03244, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, D)

- DAKO (Ref-Nr. M 7165, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D)
- Serotec (Ref-Nr. MCA547T, AbD Serotec, Puchheim, D)

- *gegen Doublecortin*: Es wurde der polyklonale Ziegen-Antikörper Doublecortin C-18 (Ref-Nr. sc-8066) der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D verwendet.

b) Zweitantikörper

Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG (H+L)	BA-9200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG (H+L)	BA-2000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Normales Kaninchenserum	X0902, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D
Normales Pferdeserum	S-2000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Normales Ziegenserum	X0907, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D

c) Visualisierungssysteme

Es wurden folgende Visualisierungssysteme verwendet:

Histofine [®] Simple Stain MAX PO (G) Universal Immuno-Peroxidase Polymer, Anti-Goat	414162F, Nichirei Biosciences, Inc. Tokyo, J
Histofine [®] Simple Stain AP (M)	I414241F, Nichirei Biosciences, Inc. Tokyo, J
StreptABComplex/AP	K0391, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D
StreptABComplex/HRP-Duett, Mouse/Rabbit	K0492, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, D
VECTASTAIN [®] ABC Kit (Standard)	PK-4000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

2.1.5 Lösungen

Blockierungslösung Ziege (BLZ):	9	ml	TRIS/Triton [®] -Puffer 0,05 M
	10	ml	Antibody Diluent Reagent Solution
	1	ml	Ziegenserum
Blockierungslösung Kaninchen (BLK): Solution	9	ml	TRIS/Triton [®] -Puffer 0,05 M
	10	ml	Antibody Diluent Reagent
	1	ml	Kaninchenserum
CD34-AK-Verdünnung I (1:10):	40	µl	AK
	360	µl	BLZ
CD34-AK-Verdünnung II (1:50):	8	µl	AK
	392	µl	BLZ
Citratlösung:	21,01	g	Citrat
	1000	ml	Aqua dest.
Citratpuffer (10 mM, pH 6,0):	9	ml	Citronensäure
	41	ml	Natriumcitratlösung
	450	ml	Aqua dest.
DAB-Reaktionslösung:	300	µl	DAB-Verdünnungslösung
	9	ml	TRIS-Puffer
	1	ml	DAB-Stammlösung
DAB-Stammlösung: (zweimal filtrieren nach Ansetzen)	200	mg	DAB
	40	ml	TBS/Triton [®]
DAB-Verdünnungslösung:	100	µl	H ₂ O ₂
	1	ml	TRIS-Puffer
DCX-AK-Lösung (für ca. 40 OT) 1:400:	25	µl	AK (DCX)
	9975	µl	BLK
Ethanol 50 %:	50	ml	Ethanol 100 %
	50	ml	Aqua dest.
Ethanol 70 %:	70	ml	Ethanol 100 %
	30	ml	Aqua dest.
Ethanol 80 %	80	ml	Ethanol 100 %
	20	ml	Aqua dest.

Ethanol 90 %:	90	ml	Ethanol 100 %
	10	ml	Aqua dest.
FastRed-Lösung:	1	Tbl.	Chromogen
	5	ml	TRIS-Puffer 0,1 M
Histofine [®] -Verdünnung:	1	ml	Histofine [®] -Lösung
	1	ml	TRIS-Puffer 0,1 M
Immunglobulin-Lösung (ca 40 OT):	40	µl	biotinylierter Zweitantikörper
	7960	µl	TRIS-Puffer 0,1 M
Natriumcitratlösung:	29,41	g	Natriumcitrat
	1000	ml	Aqua dest.
Normalserum vom Pferd 1 %: (für ca. 40 OT)	100	µl	Pferdeserum
	9900	µl	TRIS-Puffer
Peroxidase-Lösung (DDFP) 1 %:	145	ml	Methanol 100 %
	5	ml	H ₂ O ₂ 30 %
Peroxidase-Lösung (DCX) 0,3 %:	200	ml	Ethanol 100 %
	7,5	ml	H ₂ O ₂ 30 %
Peroxidase-Lösung (HHFP) 0,1 %:	245	ml	Ethanol 100 %
	5	ml	H ₂ O ₂ 30 %
Ready-to-use-AK-Lösung: (für ca. 40 OT)	800	µl	Ready-to-use-AK
	7200	µl	TRIS-Puffer 0,1 M
StreptABComplex/HRP-Zubereitung:	50	µl	Reagenz A
	50	µl	Reagenz B
	5	ml	TBS/Triton [®] -Puffer (0,05 M)
StreptABComplex/AP-Zubereitung:	50	µl	Reagenz A
	50	µl	Reagenz B
	5	ml	TBS/Triton [®] -Puffer (0,05 M)
TRIS-BSS (0,05 M, pH 7,6):	1225	ml	TRIS-Lösung 0,2 M
	207	ml	HCl 1N
	42,5	g	NaCl
	3568	ml	Aqua dest.

TRIS-Lösung (0,2 M, pH 7,5):	121,14 5	g l	Trizma [®] -Base Aqua dest.
TRIS-Puffer (0,1 M, pH 8,2):	12,114 30 970	g ml ml	Trizma-Base HCl 2M Aqua dest.
TRIS/Triton [®] -Puffer (0,05 M, pH 7,6):	5 5	l ml	TRIS-BSS (0,05 M) Triton [®] X-100
Vectastain [®] -ABC-Kit-Zubereitung:	100 100 10	µl µl ml	Reagenz A Reagenz B TRIS-Puffer 0,1 M
Zweit-AK-Verdünnung:	40 7960	µl µl	Horse Anti-Mouse IgG TRIS/Triton [®] -Puffer (0,05 M)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

a) Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24x50mm:	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Klingen:	R35, Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, J
Objektträger, beschichtet, 25x75x1,0 mm:	SuperFrost [®] und SuperFrost Ultra Plus [®] , Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Pipettenspitzen, Plastik, 10, 200, 1000µl:	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Safe Lock Eppendorf Tubes	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D

b) Geräte

Laborschüttler:	RK 10-VS, Heto Lab Equipment Gydevang, DK
Mikroliterpipetten:	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Mikroskope:	BX51, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D

Axiolab, Carl Zeiss AG, Oberkochen,
D

Mikrowellengerät:

Intellrowave, LG Electronics
Deutschland GmbH, Willich, D

Paraffin-Streckbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik,
Großburgwedel, D

Schlittenmikrotom:

HN 40, Reichert-Jung (jetzt Leica
Mikrosysteme Vertrieb GmbH,
Wetzlar, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigen der Schnitte und Vorbehandlung

Die Versuche und sämtliche Schritte erfolgten – wenn nicht anders angegeben – bei Raumtemperatur. Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden mit dem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in heißem Wasser gestreckt, auf einen Objektträger übertragen und getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte zunächst mittels Xylol für zweimal 10 Minuten. An diese schloss sich die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe an, beginnend mit Ethanol 100 % bis Ethanol 50 % für jeweils 30 Sekunden. Danach folgte ein Spülen in Aqua dest. (2 Minuten) und in TRIS/Triton[®]-Puffer für 10 Minuten.

2.2.2 Färbungen mit den CD34-Antikörpern

2.2.2.1 Düsseldorfer Färbeprotokoll (DDFP)

Dieses Färbeprotokoll wurde der Arbeit von Reifenberger et al. (2003) aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen und entspricht der ABC-Methode. In dieser Versuchsanordnung wurde als Erst-AK der monoklonale CD34-AK-Clon QBEnd von der Firma Serotec verwendet. Für eine Versuchsvariante der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der CD34-AK der Firma Serotec eingesetzt:

- Die Entparaffinierung erfolgte wie in Punkt 2.1.1. angegeben. An diese schloss sich die Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ 1 % für 30 Minuten an.
- Die OT wurden nun für 10 Minuten im TRIS/Triton[®]-Puffer auf dem Schüttler gespült.
- Darauf folgte die Umrandung der Gewebeproben mit dem Dako Pen und die Vorinkubation mit 1 % Normalserum vom Pferd, welches danach nur abgeschüttelt wurde.
- Der Erst-AK wurde nun in der Verdünnung 1:50 über Nacht inkubiert und anschließend für 10 Minuten im TRIS/Triton[®]-Puffer auf dem Schüttler ab gespült.
- Am folgenden Tag wurde der Zweit-AK (Biotinylated Horse-Anti-Mouse-IgG in der Verdünnung 1:200) aufgetragen.

- Nach erneuter Spülung im TRIS/Triton[®]-Puffer für 10 Minuten wurden die OT mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain[®]-ABC-Kit-Zubereitung) inkubiert. Anschließend wurden die OT wieder im TRIS/Triton[®]-Puffer für 10 Minuten gespült.
- Als Chromogen wurde frisch zubereitetes DAB aufgetragen und anschließend in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gespült. Als nächster Schritt folgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 30 Sekunden und anschließende Differenzierung mit fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.
- Nach 2-minütiger Spülung in Aqua dest. wurden die Gewebeproben in der aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 30 Sekunden dehydriert und zuletzt zweifach für je 10 Minuten in Xylol eingebracht. Schließlich wurden sie mit Eukitt[®] eingedeckt.

2.2.2.2 Hamburger Färbeprotokoll: ABC-Methode (HHFP-ABC)

Die Vorbereitung der Gewebeproben entsprach im Wesentlichen dem Procedere wie in Punkt 2.2.1 angegeben.

- Allerdings erfolgte während der Rehydrierung nach dem ersten Einbringen in Ethanol 100 % die Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ 0,6 % für 7 Minuten.
- Nach der Rehydrierung wurde der CD34-AK der Firma Biozol in der Verdünnung 1:50 aufgetragen und nach 1 – 1,5 Stunden abgeschüttelt und anschließend für 10 Minuten im TRIS/Triton[®]-Puffer gespült.
- Als Zweit-AK folgte Biotinylated Horse-Anti-Mouse-IgG in der Verdünnung 1:500 für 2 Stunden.
- Die OT wurden für 10 Minuten im TRIS/Triton[®]-Puffer auf dem Schüttler gespült.
- Anschließend wurde die SteptABCComplex/HRP-Lösung für 30 Minuten aufgebracht und erneut für 10 Minuten im TRIS/Triton[®]-Puffer gespült.
- Die Inkubation mit DAB, Gegenfärbung mit Hämalaun, Differenzierung in Leitungswasser, Spülung in Aqua dest. sowie Dehydrierung und das Eindecken waren im Ablauf identisch zur Düsseldorfer Methode.

2.2.2.3 Hamburger Färbeprotokoll: AP-Methode (HHFP-AP-H und HHFP-AP-S)

Das initiale Vorgehen entspricht Punkt 2.1.1.

- Nach Markierung des Gewebes mit dem Wachsstift wurde der CD34-AK in der Verdünnung 1:10 aufgebracht und für 1 – 1,5 Stunden belassen. Es wurden die CD34-AK der Hersteller Biozol und DAKO verwendet (zur Übersicht siehe Tabelle 2.2).
- Die OT wurden nun für 10 Minuten in TRIS/Triton[®]-Puffer auf dem Schüttler gespült.
- Danach wurde die Histofine[®]-Verdünnung aufgetragen und für 30 Minuten belassen (HHFP-AP-H). Alternativ wurde für die andere Versuchsanordnung (HHFP-AP-S) an dieser Stelle Biotinylated Goat-Anti-Mouse/Rabbit-IgG aufgetragen, für 30 Minuten belassen. Anschließend wurde StreptABCComplex/AP-Zubereitung aufgetragen. Nach jedem Zwischenschritt erfolgte die Spülung im TRIS/Triton[®]-Puffer für 10 Minuten auf dem Schüttler.
- Zur letztlichen Anfärbung wurde nun Fast-Red für 20 Minuten aufgetragen. Nach Spülung für 10 Minuten in fließendem Wasser wurde die Gegenfärbung mit Hämalun für 30 Sekunden durchgeführt und danach erneut für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser differenziert. Schließlich konnte nach 2-minütiger Spülung in Aqua dest. mit Aquatex[®] eingedeckt werden.

Zur besseren Übersicht findet sich in Tabelle 2.1 ein Vergleich der Methoden mit Angabe der jeweiligen Zeiten.

Düsseldorfer Färbeprotokoll DDFP	Hamburger Färbeprotokoll ABC-Methode HHFP-ABC	Hamburger Färbeprotokoll AP-Methode mit Histofine® HHFP-AP-H	Hamburger Färbeprotokoll AP-Methode mit StreptABComplex/AP HHFP-AP-S
Blockierung der endogenen Peroxidase mit H ₂ O ₂ 1 % nach der absteigenden Alkoholreihe für 30 Minuten	Blockierung der endogenen Peroxidase mit H ₂ O ₂ 0,6 % in der absteigenden Alkoholreihe für 7 Minuten	Keine Blockierung der endogenen Peroxidase, nur Rehydrierung	Keine Blockierung der endogenen Peroxidase, nur Rehydrierung
Inkubation mit 1 % Normalserum v. Pferd für 1 Stunde			
Inkubation mit dem AK über Nacht, Verdünnung 1:50	Inkubation mit dem AK für 1 - 1,5 Stunden, Verdünnung 1:50	Inkubation mit dem AK für 1 - 1,5 Stunden, Verdünnung 1:10	Inkubation mit dem AK für 1 - 1,5 Stunden, Verdünnung 1:10
Inkubation mit Biotinylated Horse-Anti-Mouse-IgG für 30 Minuten, Verdünnung 1:200	Inkubation mit Biotinylated Horse-Anti-Mouse-IgG für 2 Stunden, Verdünnung 1:500	Inkubation mit der Histofine®-Verdünnung für 30 Minuten	Inkubation mit Biotinylated Goat-Anti-Mouse/Rabbit-IgG für 30 Minuten
Inkubation mit der Vectastain®-ABC-Kit-Zubereitung für 30min	Inkubation mit StreptABComplex/HRP-Zubereitung für 30min		Inkubation mit StreptABComplex/AP-Zubereitung für 30min
Inkubation mit frisch zubereiteter DAB-Lösung für 7 Minuten	Inkubation mit frisch zubereiteter DAB-Lösung für 7 Minuten	Überschichten mit FastRed-Lösung für 20 Minuten	Überschichten mit FastRed-Lösung für 20 Minuten

Tabelle 2.1: Unterschiede der verschiedenen Methoden für den CD34-Nachweis: Äquivalente Zwischenschritte wie Spülschritte, Dehydrierung und das Eindecken werden in dieser Auflistung nicht erwähnt.

2.2.2.4 Methodenkombinationen bei CD34-Färbungen von PXA-Gewebeproben

Um schließlich verschiedene Färbemethoden vergleichen zu können, wurden die gleichen Gewebeproben der pleomorphen Xanthoastrozytome mit verschiedenen Antikörpersystemen gefärbt. Die Übersicht über die verwendeten Kombinationen findet sich in Tabelle 2.2.

Versuchs-anordnung	Methode	Erst-AK QBEnd	Zweit-AK	Detektions-system	Chromogen
I	HHFP-AP-H	Biozol BLZ 03244	Histofine [®]	Histofine [®]	Fast Red
II	HHFP-ABC	Biozol BLZ03244	Biotinylated Horse-Anti- Mouse-IgG (H+L)	StreptAB- Complex/HRP	DAB
III	HHFP-AP-S	DAKO M7165	Biotinylated Goat-Anti- Mouse/Rabbit IgG (H+L)	StreptAB- Complex/AP	FastRed
IV	HHFP-AP-H	DAKO M7165	Histofine [®]	Histofine [®]	FastRed
V	DDFP-ABC	Biozol BZL03244	Biotinylated Horse-Anti- Mouse-IgG (H+L)	Vectastain [®] - ABC-Kit	DAB
VI	DDFP-ABC	Serotec MCA547T	Biotinylated Horse-Anti- Mouse-IgG (H+L)	Vectastain [®] - ABC-Kit	DAB

Tabelle 2.2: Übersicht über die Kombinationen von Antikörper-Detektionssystemen

2.2.3 Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper

Das Anfertigen der Schnitte und die Vorbehandlung erfolgte weitgehend wie in Punkt 2.2.1 angegeben. Es wurden jedoch zwei weitere Zwischenschritte eingefügt:

- Nach der ersten Behandlung der Schnitte mit Ethanol 100 % im Rahmen der Rehydrierung wurde die endogene Peroxidase durch die Inkubation mit Peroxidase-Lösung (DCX) 0,3 % für 10 Minuten blockiert.
- Nach der Rehydrierung schloss sich zur Epitop-Demaskierung eine Behandlung im Citratpuffer bei 750 Watt in der Mikrowelle für 15 Minuten an.

Für die Markierung mit dem Doublecortin-AK (DCX-AK) und die anschließende Färbung wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Zunächst wurde der DCX-AK im Verhältnis 1:400 mit der Blockierungslösung verdünnt und davon jeweils ca. 150 µl auf die Gewebeproben auf den Objektträgern aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

- Am folgenden Tag wurden die Objektträger für 10 Minuten in TBS/Triton[®]-Puffer auf dem Schüttler gespült. Anschließend wurden die Proben 2 Stunden mit der Histofine[®]-Verdünnung inkubiert und erneut im TBS/Triton[®]-Puffer für 10 Minuten auf dem Schüttler gespült. Schließlich wurde auf die Objektträger die frisch zubereitete DAB-Reaktionslösung aufgetragen und für 7 Minuten inkubiert. Eine anschließende Spülung erfolgte für 10 Minuten unter fließendem Wasser. Eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 30 Sekunden schloss sich an, die danach in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten differenziert wurde.
- Schließlich wurden die Objektträger 2 Minuten in Aqua dest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 2 Minuten dehydriert; beginnend mit Ethanol 50 % und weiter über Ethanol 70 %, 96 % bis zum zweimaligen Schwenken in Ethanol 100 %. Zuletzt folgte ein zweimaliges Schwenken in Xylol für je 10 Minuten und das Eindecken mit Eukitt[®].

Die Anfärbung des TMA wurde ebenfalls wie hier dargelegt durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnis I: Auswertung für CD 34

Endotheliale Zellen weisen eine Immunreaktivität für CD34 auf (Miettinen et al. 1994). Daher diente in der vorliegenden Untersuchung die Anfärbung von Endothelien als interne Positivkontrolle für die Markierung von Tumorgewebe (siehe Abb. 3.1). Bei allen 187 untersuchten Gewebeproben waren die internen Kontrollen positiv.

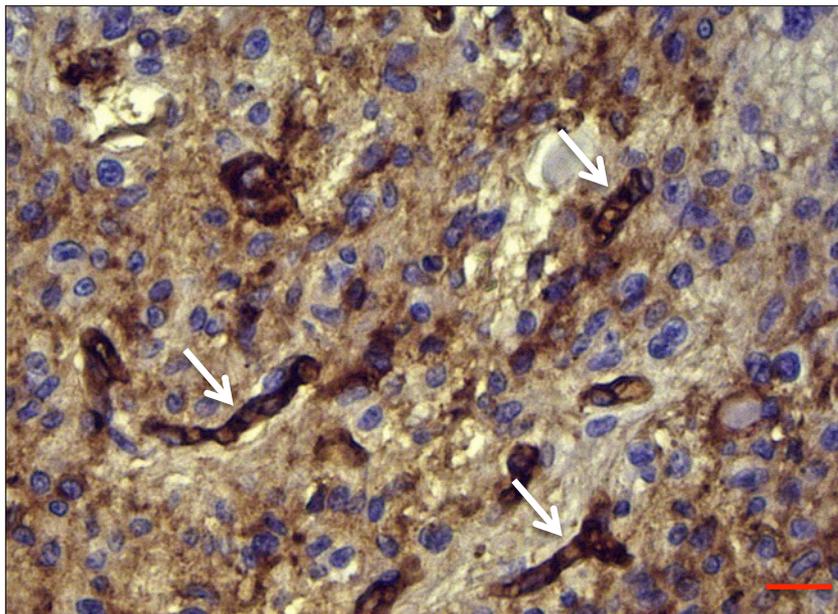


Abbildung 3.1: Interne Färbekontrolle für CD34: CD34-positive Endothelien (Pfeile) in der Färbung eines pleomorphen Xanthoastrozytoms (roter Balken: 30 μ m).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte semiquantitativ:

- 0: nur gefäßendotheliale Zellen sind CD34-positiv
- 1: einzelne CD34-positive Tumorzellen
- 2: Anteil der CD34-positiven Tumorzellen kleiner 50 % des Tumors
- 3: Anteil der CD34-positiven Tumorzellen größer als 50 % des Tumors.

3.1.1 Sensitivität von CD34 für pleomorphe Xanthoastrozytome

Das Alter der Patienten, bei denen die Tumorproben gewonnen wurden, lag zwischen 15 und 63 Jahren und im Durchschnitt bei 28,9 Jahren. Die Proben stammen zu je 50 % von weiblichen und von männlichen Patienten (je 5/10). 50 % der Proben (5/10) waren zuvor mit WHO-Grad II und 50 % (5/10) mit WHO-Grad III eingestuft worden.

In neun von zehn Proben (90 %) ließen sich CD34-positive Tumorzellen nachweisen. Der Anteil an CD34-positiven Zellen lag in 5/10 der untersuchten Proben bei mehr als der Hälfte der Tumorzellen. In 3/10 der PXA lag die Positivität für CD34 immerhin bei bis zu 50 %. Vereinzelte CD34-positive Zellen fanden sich in einer der Proben und eine der Proben wies keine Expression für CD34 auf (siehe Tabelle 3.1).

Laufende Nummer	Grading	Alter	Geschlecht	CD34-Intensität
1	2	37	2	3
2	2	17	1	2
3	2	15	2	2
4	2	22	1	3
5	3	16	1	3
6	3	26	2	0
7	3	27	2	3
8	2	24	2	1
9	3	63	1	2
10	3	42	1	3

Tabelle 3.1: Expression von CD34 bei PXA (Grading: WHO-Grad des PXA, Geschlecht: 1 – männlich, 2 – weiblich, CD34-Intensität: semiquantitative Auswertung des CD34-positiven Tumoranteils am gesamten Tumor).

Innerhalb der Tumoren fanden sich jeweils CD34-positive und negative Areale. Die zellulären Strukturen, die eine CD34-Expression aufwiesen, zeigten sich von Probe zu Probe unterschiedlich: Neben Zellmembranen und Zellausläufern stellte sich auch das Zytoplasma CD34-positiv dar. Extrazelluläre Fasern wiesen auch CD34-positive Anteile auf (vgl. Abb. 3.2).

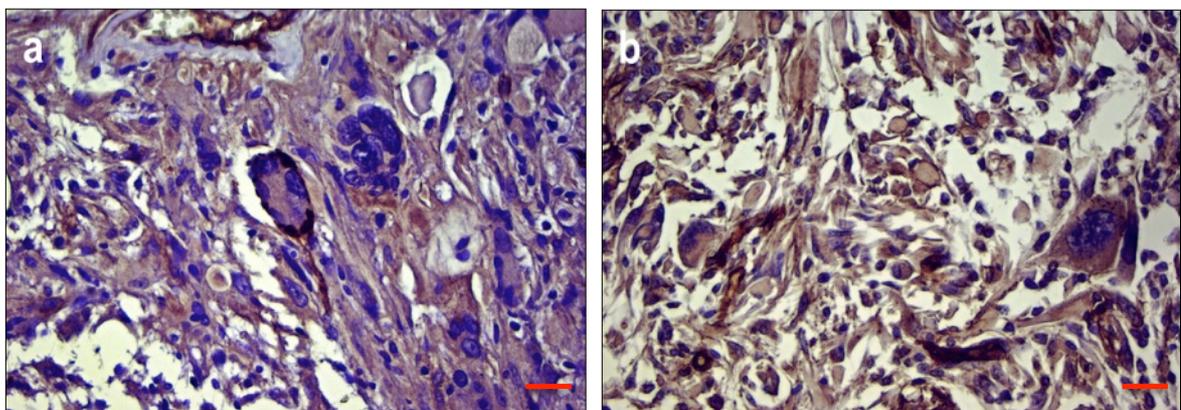
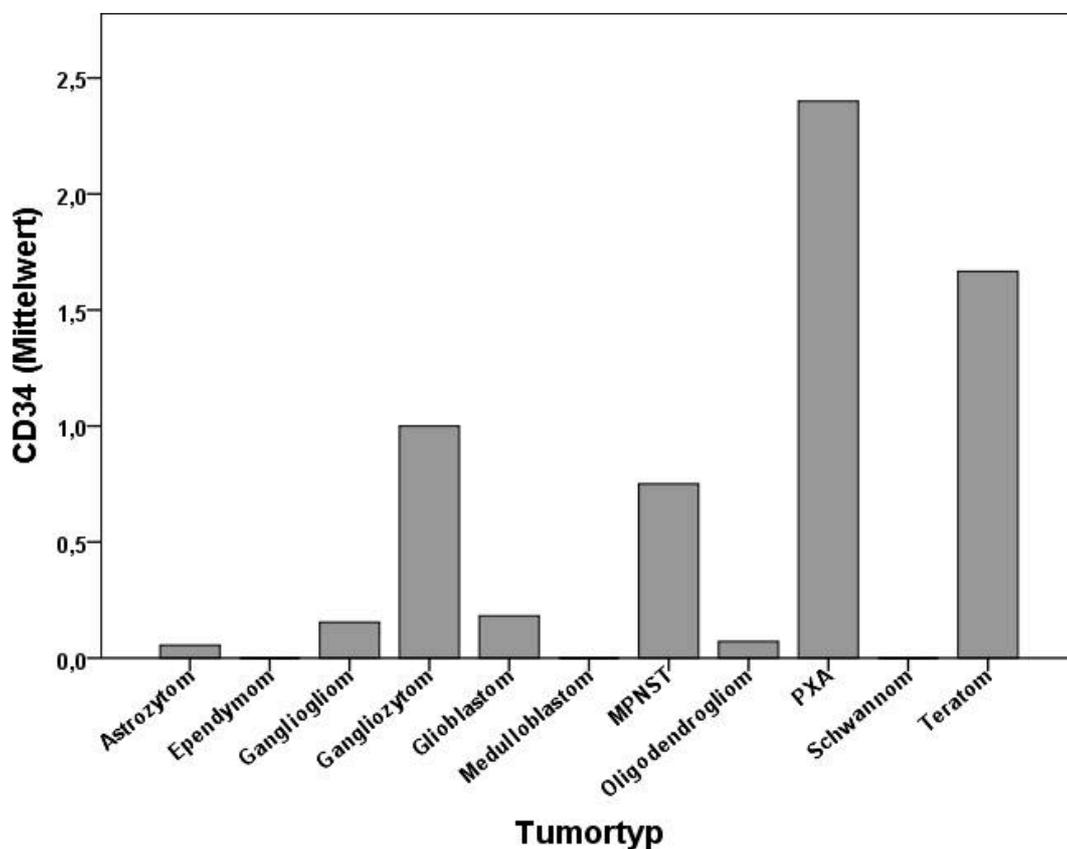


Abbildung 3.2: Exemplarische Darstellung CD34-positiver PXA (roter Balken: 30 μ m).

3.1.2 Spezifität von CD34 für pleomorphe Xanthoastrozytome

Insgesamt wurden 187 Tumorproben untersucht. Davon waren 149 als neuroepitheliale Tumoren klassifiziert worden, 26 als Tumoren kranialer oder paraspinaler Nerven (Schwannome und MPNST) und 12 als Keimzelltumoren (Teratome). Insbesondere in der Gruppe der neuroepithelialen Tumoren wurde CD34 fast ausschließlich in PXA exprimiert. Eine Ausnahme stellten die Gangliozytome dar, die regelhaft Areale mit einer niedrigen Anzahl an CD34-positiven Zellen aufwiesen. Gehäuft traten CD34-positive Tumoranteile außerdem bei Teratomen und malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) auf (siehe hierfür Grafik 3.1/Tabelle 3.2).



Grafik 3.1: Darstellung der Tumorentitäten versus der mittleren Färbeintensität für CD34

Im Vergleich der glialen Tumoren wurde CD34 überwiegend bei PXA exprimiert (9/10, mittlere Färbeintensität 2,4). Die Positivität für CD34 war in PXA WHO-Grad II (5/5) größer als in PXA WHO-Grad III (4/5), wobei die durchschnittliche Färbeintensität identisch war (mittlere Intensität jeweils 2,2). Alle anderen neuroepithelialen Tumoren wiesen fast keine CD34-positiven Tumorzellen auf. Bei Astrozytomen und Oligodendrogliomen fanden sich in jeweils zwei Proben CD34-positive Tumorzellen – allerdings nur vereinzelt über das Tumorgewebe verteilt. In einzelnen Glioblastom-

Proben zeigten sich CD34-positive Areale, wobei nur in einem Fall eine deutliche Anfärbung zu sehen war (3/22; mittlere Intensität bei 0,2). In Ependymomen fanden sich keine CD34-positiven Zellen.

In den weiteren Hirntumorarten fanden sich folgende Färbeergebnisse: In der Gruppe der glioneuronalen Tumoren wiesen alle Gangliozytome (5/5) – allerdings nur vereinzelt – CD34 exprimierende Zellen auf (mittlere Färbeintensität 0,5). Bis auf drei Proben waren alle Gangliogliome CD34-negativ (3/26), wobei sich nur eine Tumorprobe deutlich mit dem CD34-AK anfärben ließ. Medulloblastome wiesen keine CD34-positiven Zellen auf. MPNST zeigten zu 50 % (2/4) eine deutliche Expression von CD34, ebenso wie Teratome (8/12), die in 67 % der Fälle CD34-positive Areale aufwiesen und dies immerhin bei einer mittleren Intensität von 1,7.

Tumorentität	Grading	Intensität	%CD34-positiv
Gliale Tumoren			
Pleomorphe Xanthoastrozytome	II/III	2,4	90 (9/10)
Pilozytische Astrozytome	I	0,1	10 (1/10)
Diffuse Astrozytome	II	0,1	11 (1/9)
Anaplastische Astrozytome	III	0	0 (0/17)
Glioblastome	IV	0,2	14 (3/22)
Oligodendrogliome	II	0,05	5 (1/21)
Anaplastische Oligodendrogliome	III	0,1	14 (1/7)
Ependymome	II	0	0 (0/12)
Glioneuronale Tumoren			
Gangliogliome	I	0,4	25 (2/8)
Gangliogliome	II	0,06	6 (1/16)
Anaplastische Gangliogliome	III	0	0 (0/2)
Gangliozytome	I	0,5	100 (5/5)
Embryonale Tumoren			
Medulloblastome	IV	0	0 (10/10)
Tumoren kranialer und paraspinaler Nerven			
Schwannome	I	0	0 (0/22)
MPNST	IV	0,8	50 (2/4)
Keimzelltumoren			
Teratome	I	1,7	67 (8/12)

Tabelle 3.2: Expression von CD34 in Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems.
 Intensität: Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung mit der Skala von 0-3. %CD34-positiv: Prozentanteil der positiven Fälle für eine bestimmte Tumorentität, in Klammern sind die absoluten Zahlen aufgeführt.

Zwischen der Färbeintensität und dem WHO-Grad des Tumors konnte keine Korrelation gefunden werden. Dies galt auch für eine Korrelation mit dem Geschlecht oder dem Alter. Wurden diese Parameter ins Verhältnis bei PXA gesetzt, ergaben sich auch bei dieser Tumorentität keine Abhängigkeiten.

Eine exemplarische histologisch-immunhistochemische Übersicht über CD34-positive Tumorentitäten findet sich in Abbildung 3.3.

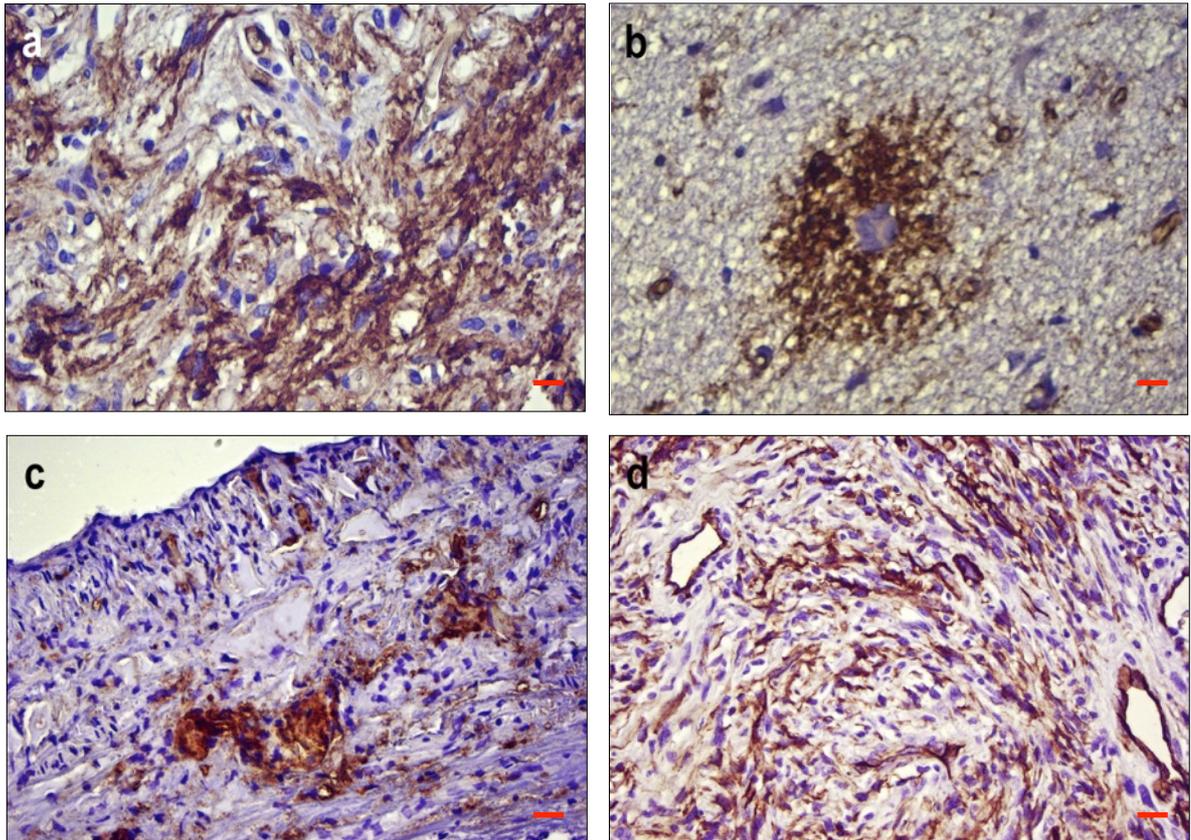


Abbildung 3.3: CD34-Nachweis bei nicht-glialen bzw. gemischt glial-neuronalen Tumoren des ZNS: (a) Gangliogliom, (b) Gangliozytom, (c) Teratom, (d) MPNST (*roter Balken: 30 μ m*).

3.1.3 Vergleich der verschiedenen Färbemethoden

Zum Vergleich der Methoden wurden drei Tumorproben von PXA, die sich in einer ersten Probefärbung als deutlich CD34-positiv gezeigt hatten, eingesetzt. Es wurden zunächst CD34-Antikörper des Antikörper-Clons QBEnd von zwei Anbietern getestet. Ausgehend vom Düsseldorfer Färbeprotokoll (DDFP) wurde dieses angewendet und mit dem Antikörper eines anderen Herstellers verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Nachweis-Intensität zwischen den Antikörpern von Biozol oder Serotec.

Nun wurde der im Düsseldorfer Protokoll angewendete Antikörper mit verschiedenen Zweitantikörpern und Detektionssystemen kombiniert: Zum einen kam das Histofine®-Kit mit anschließender FastRed-Färbung zum Einsatz. Zum anderen wurden biotinylierte Zweitantikörper mit verschiedenen Detektionssystemen zusammen eingesetzt und verglichen.

In einem dritten Schritt wurden nun eine bereits getestete Methode mit einem neueren „ready-to-use“ CD34-Antikörper der Firma DAKO kombiniert und dies mit einer weiteren Variante einer Färbemethode verglichen.

Eine Übersicht über die verschiedenen Methodenkombinationen bietet die Tabelle 2.2 (Kapitel 2.2.2.4, Seite 40). In der Auswertung zeigten alle Versuchsanordnungen identische Testergebnisse. CD34 konnte in allen Kombinationen der verschiedenen Reagenzien gleich gut nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Tabelle 3.3).

Versuchsanordnung	Färbeprotokoll	Antikörper (Hersteller)	CD34-Intensität : Präparat		
			A	B	C
I	HHFP-AP-H	Biozol	3	2	3
II	HHFP-ABC	Biozol	3	2	3
III	HHFP-AP-S	DAKO	3	2	3
IV	HHFP-AP-H	DAKO	3	2	3
V	DDFP-ABC	Biozol	3	2	nicht untersucht
VI	DDFP-ABC	Serotec	3	2	nicht untersucht

Tabelle 3.3: Auswertung des Färbemethodenvergleichs für CD34.

Außerdem wurden die Versuchsanordnungen I,II,V,VI an der gesamten Serie von PXA angewendet. Auch hier zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse bei den jeweiligen Methoden. Die Färbeintensität für die Tumorzellen war in dieser semiquantitativen Auswertung im Wesentlichen äquivalent.

3.2 Ergebnis II: Auswertung für Doublecortin

Nachdem sich Doublecortin insbesondere im sich entwickelnden Gehirn nachweisen lässt und dort eine wichtige Rolle in der Migration von proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen spielt, ist es naheliegend, die Expression von DCX in Hirntumoren zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden neben neuronalen und glioneuronalen Tumoren auch gliale und embryonale Tumoren sowie Keimzelltumoren untersucht. Insgesamt wurden 230 Tumorproben analysiert. Als interne Negativkontrolle wurden die Gefäße und das angrenzende Gewebe verwendet sowie Gewebsschnitte, die jeweils nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte wie bei der CD34-Färbung semiquantitativ (siehe Abschnitt 3.1).

Tumorentität	WHO-Grad	DCX-Intensität	% DCX-positiv
Glioneuronale Tumoren			
Gangliozytome	I	0,5	60 (3/5)
Gangliogliome	I	0,4	38 (3/8)
Gangliogliome	II	1,1	56 (9/16)
Anaplastische Gangliogliome	III	1,5	100 (2/2)
Gliale Tumoren			
Pilozytische Astrozytome	I	0,3	8 (1/12)
Diffuse Astrozytome	II	2,0	100 (10/10)
Anaplastische Astrozytome	III	1,9	89 (17/19)
Pleomorphe Xanthoastrozytome	II	1,1	64 (10/15)
Ependymome	II	0,4	33 (4/12)
Oligodendrogliome	II	2,9	100 (21/21)
Anaplastische Oligodendrogliome	III	3,0	88 (7/8)
Glioblastome	IV	1,5	77 (17/22)
Embryonale Tumoren			
Medulloblastome	IV	2,4	90 (9/10)
Tumoren kranialer und paraspinaler Nerven			
Schwannome	I	0	0 (0/22)
Neurofibrome	I	1,3	78 (29/37)
MPNST	IV	0,5	25 (1/4)
Keimzelltumoren			
Teratome	I	1,8	75 (9/12)

Tabelle 3.4: Expression von Doublecortin in menschlichen Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems. Intensität: Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung mit der Skala von 0-3. % DCX-positiv: Prozentanteil der positiven Fälle für eine bestimmte Tumorentität, in Klammern sind die absoluten Zahlen aufgeführt (Die hier präsentierten Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhoben und in Bernreuther et al. 2006 veröffentlicht.)

3.2.1 Nachweis von Doublecortin bei Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems

Doublecortin lässt sich in allen untersuchten Tumorentitäten nachweisen. Der Anteil der Zellen, deren Zytoplasma sich DCX-positiv darstellte, variierte allerdings stark. In allen Proben fanden sich auch atypische DCX-negative Zellen. Normales neuronales oder gliales Gewebe färbte sich nicht an. Innerhalb der Tumoren ließ sich kein Färbemuster wie beispielsweise vermehrte Anfärbung subpial, perivaskulär oder an den Infiltrationszonen der Tumoren finden.

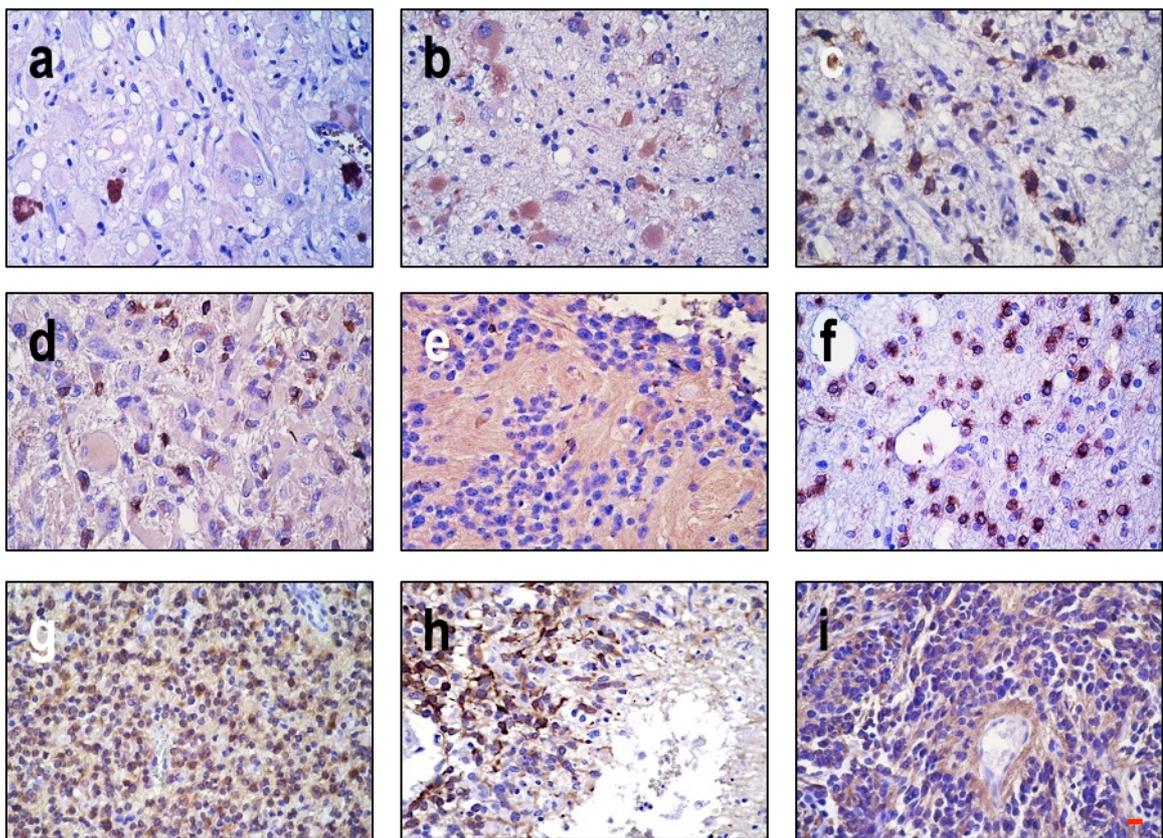
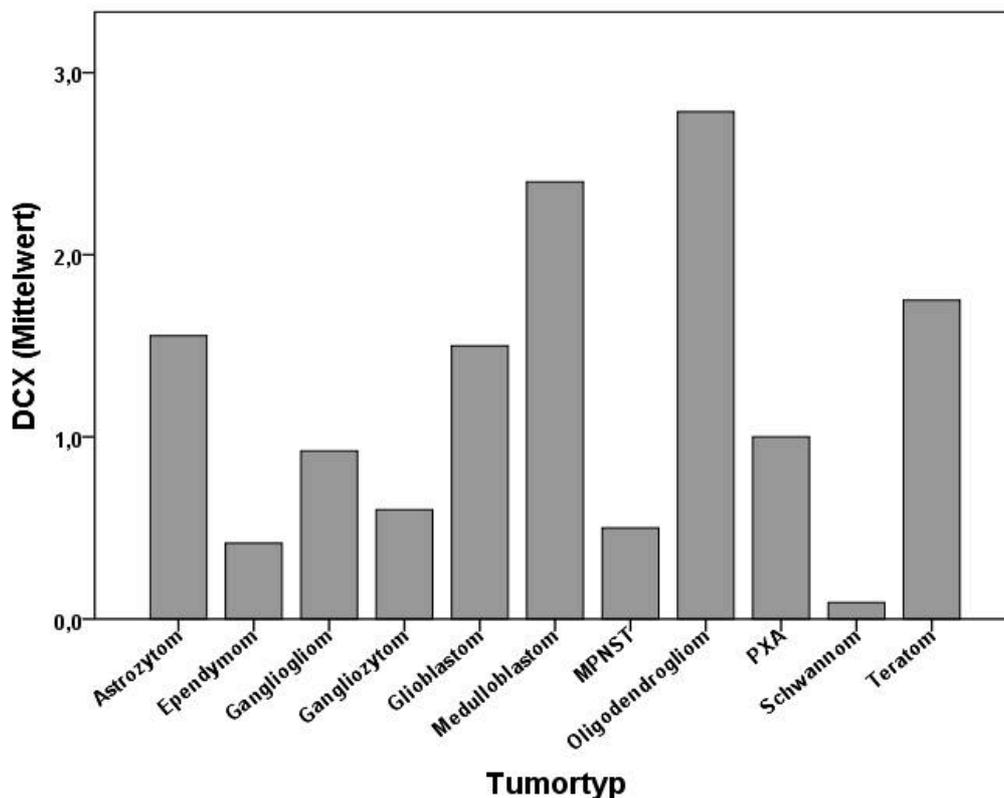


Abbildung 3.4: Färbungen von verschiedenen Tumoren des Nervensystems mit dem Doublecortin-Antikörper: (a) Gangliozytom, (b) Gangliogliom, (c) anaplastisches Astrozytom, (d) pleomorphes Xanthoastrozytom, (e) Ependymom, (f) Oligodendrogliom, (g) Oligodendrogliom, (h) Glioblastom, (i) Medulloblastom (roter Balken: 30µm).

Sowohl Gangliozytome als auch Gangliogliome zeigten sich in einem unterschiedlichen Ausmaß DCX-positiv (siehe Abb. 3.4a,b). In allen untersuchten glialen Tumorentitäten ließen sich ebenfalls DCX-positive Tumorareale finden (Abb. 3.4 c-i). In nahezu allen Oligodendrogliomen (WHO-Grad II: 21/21, WHO-Grad III: 7/8) konnten DCX-exprimierende Zellen gefunden werden. Die Färbeintensität zeigte sich hier überdurchschnittlich hoch mit im Mittel 2,85 bzw. 3).

Bei den glialen Tumoren zeigten die pilozytischen Astrozytome (1/12) und Ependymome (4/12) hingegen eine geringe Expression von DCX mit geringer Intensität (im Mittel 0,3 bzw. 0,4). DCX wurde in diffusen Astrozytomen, WHO-Grad II und -III (9/9 bzw. 17/19, mittlere Intensität bei 2 bzw. 1,9), pleomorphen Xanthoastrozytomen (10/15, mittlere Intensität 1,125) und Glioblastomen (17/22, mittlere Intensität 1,5) wiederum deutlich häufiger exprimiert. Die Intensität lag ebenfalls im Mittelfeld.

Medulloblastome als embryonale Tumoren, die vermutlich von undifferenzierten embryonalen Medulloblasten oder von subependymalen Matrixzellen abstammen, wiesen bis auf eine Ausnahme deutlich DCX-positive Tumorareale auf (mittlere Intensität 2,4). Zum Vergleich der Färbeintensitäten der verschiedenen Tumorarten siehe Grafik 3.2.

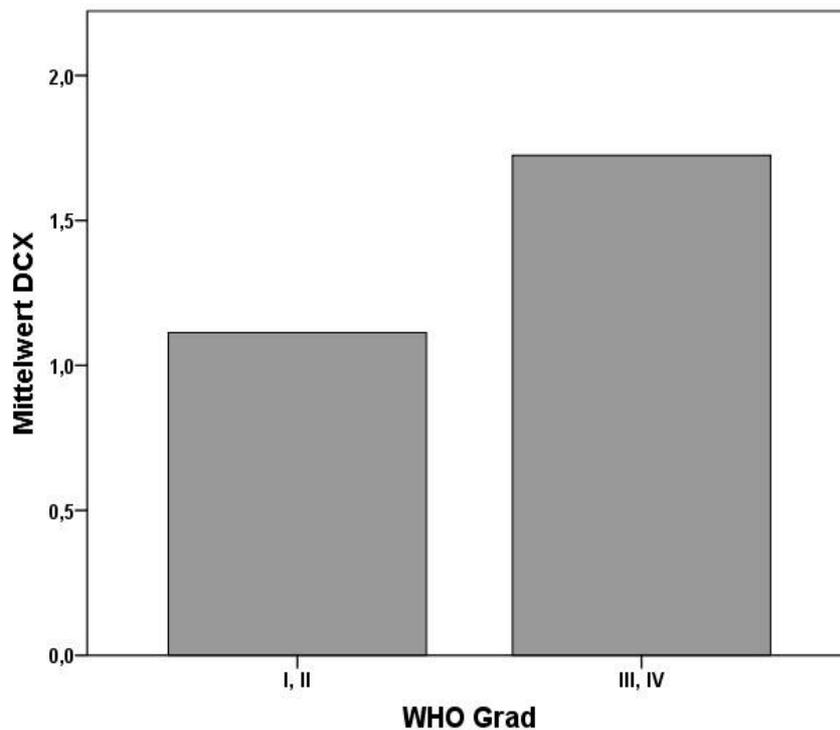


Grafik 3.2: Darstellung der mittleren Färbeintensitäten bei den verschiedenen Tumorentitäten

Für die statistische Auswertung wurden die Kruskal-Wallis one-way ANOVA und der Ranksummen-Test herangezogen. Bei glialen und glioneuronalen Tumoren konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumor-Grading und der Zahl der DCX-positiven Tumoren ($P < 0,001$, $N = 145$) gefunden werden. Ebenfalls stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem WHO-Grad und der Färbeintensität für DCX heraus ($P > 0,01$, $N = 145$) (siehe Grafik 3.3). In der Gruppe der glioneuronalen Tumoren

(Gangliozytome und Gangliogliome) war der Zusammenhang zwischen WHO-Grad und DCX-Expression ebenfalls hoch signifikant ($P < 0,001$, $N = 31$).

Geringer signifikant stellte sich dieser Zusammenhang bei astrozytären Tumoren heraus ($P < 0,05$, $N = 62$). Hier beruhte die Korrelation lediglich darauf, dass sich pilozytische Astrozytome bis auf eine Probe gar nicht mit DCX markieren ließen. Dagegen zeigten



Grafik 3.3: Korrelation des Malignitätsgrades (WHO-Grad) mit der mittleren Färbeintensität (Mittelwert DCX): Die Expression von DCX ist bei höhermalignen Tumoren größer als bei niedrigmalignen.

die diffusen und anaplastischen Astrozytome und die Glioblastome keinen Anstieg der DCX-Expression. Bei Oligodendrogliomen ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Malignität des Tumors und der Expression von DCX feststellen. Allerdings zeigte diese Tumorentität die stärkste und nahezu durchgängige Positivität für DCX.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse von glioneuronalen und glialen Tumoren lässt sich dementsprechend feststellen, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von DCX und der Malignität der Tumoren besteht. Als Marker für neuronale Differenzierung kann DCX jedoch nicht dienen.

Darüber hinaus wurden Tumoren des peripheren Nervensystems untersucht. Während Schwannome (Abb. 3.5a) keine DCX-Expression aufwiesen (0/22), fanden sich in Neurofibromen (Abb. 3.5b) meist moderate Anteile an DCX-positiven Arealen (29/37 Fälle, mittlere Intensität bei Neurofibromen 1,3). Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant ($P < 0,001$, $N = 61$). Eine Ausnahme bildeten zwei Fälle von Neurofibromen in Schwannomen. In zwei weiteren Fällen von dermalen Neurofibromen konnte eine DCX-Markierung in Drüsenepithelien gefunden werden – möglicherweise ein Hinweis darauf, dass DCX auch in Geweben außerhalb des Nervensystems nachweisbar ist. MPNST wurden ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen: In einem von vier Fällen konnte eine starke Positivität für DCX nachgewiesen werden.

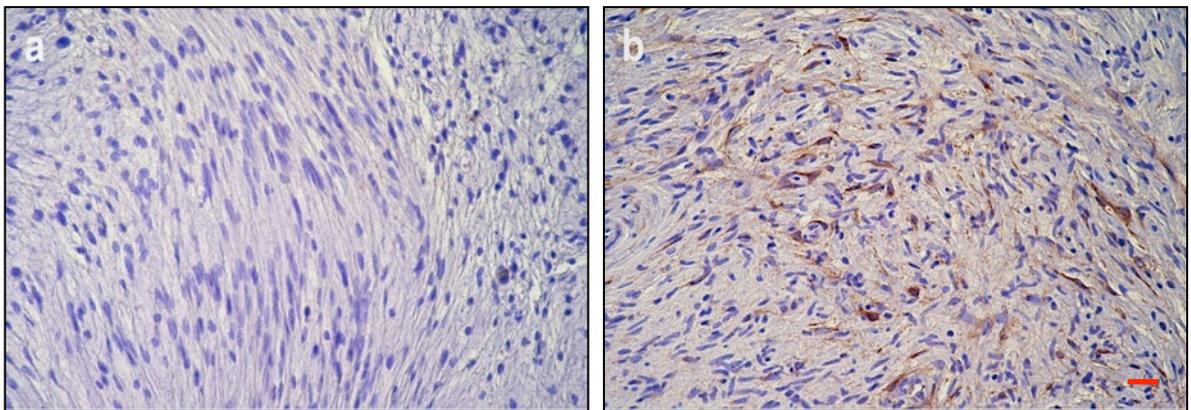


Abbildung 3.5: DCX-Färbung in Tumoren des peripheren Nervensystems: (a) Schwannom, DCX-negativ (b) Neurofibrom, DCX-positiv (roter Balken: $30\mu\text{m}$).

Einen weiteren Hinweis für eine mögliche Expression von DCX in nicht-neuronalem Gewebe bot die Markierung einer Gewebeserie von Teratomen (Abb. 3.6): Hier zeigte sich neben der moderaten bis starken Positivität für DCX in den meisten Fällen (9/12, mittlere Intensität 1,75) eine gute Anfärbbarkeit von epithelialen Zellen durch DCX.

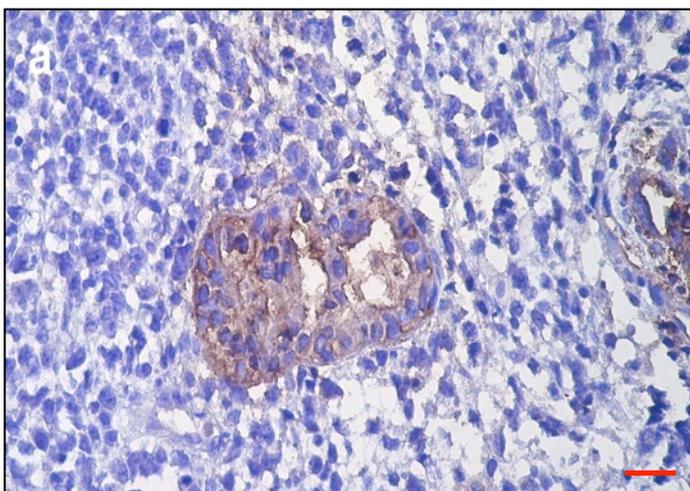


Abbildung 3.6: DCX-Expression in einer Teratom-Gewebeprobe (roter Balken: $30\mu\text{m}$).

3.2.2 Nachweis von Doublecortin bei Geweben außerhalb des ZNS

Zur Analyse einer DCX-Expression in nicht-neuronalen Geweben wurde ein TMA mit diversen normalen menschlichen Gewebeproben mit dem DCX-Antikörper gefärbt.

Gewebe	DCX-Positivität	Gewebe	DCX-Positivität
Analkanal – Haut	0/8	Kleinhirnrinde	0/8
Analkanal – Übergangsmukosa	0/8	Leber	8/8
Aorta – Endothel	0/8	Lippe – kleine Speicheldrüsen	2/8
Aorta – Media	0/8	Lippe – orale Mukosa	0/8
Appendix – Mukosa	0/8	Lunge	0/8
Appendix – Muskelschicht	0/8	Lymphknoten	8/8
Bronchien – Glandulae bronchioles	0/8	Magen – Antrum	0/8
Bronchien – Schleimhaut	0/8	Magen – Corpus	8/8
Brustdrüse	1/8	Magen – Muskelschicht	0/8
Colon – Muskelschicht	0/8	Milz	8/8
Colon descendens – Mukosa	1/8	Mundhöhle	0/8
Duodenum – Brunner Drüsen	2/8	Nasennebenhöhlen	0/8
Duodenum – Mukosa	4/8	Nebenhoden	8/8
Eileiter – Mukosa	8/8	Nebenniere	8/8
Ektocervix	0/8	Nebenschilddrüse	8/8
Endocervix	1/8	Niere – Mark	8/8
Endometrium	8/8	Niere – Rinde	8/8
Fettgewebe	0/8	Nierenbecken – Muskelschicht	0/8
Frühe Plazenta	6/8	Nierenbecken – Urothel	6/8
Frühe Plazenta – Dezidua	8/8	Ösophagus – Muskelschicht	0/8
Gallenblase – Epithel	5/8	Ösophagus - Übergangsepithel	0/8
Glandual sublingualis	0/8	Ovar – Corpus luteum	6/8
Glandula submandibularis	8/8	Ovar – Graaf-Follikel	6/8
Glans penis – Corpus spongiosum	0/8	Ovar – Stroma ovarii	0/8
Großhirn – graue Substanz	0/8	Pankreas	8/8
Großhirn – weiße Substanz	0/8	Parotis	4/8
Harnblase – Muskelschicht	0/8	Prostata	4/8
Harnblase – Urothel	2/8	Quergestreifte Muskulatur	0/8
Haut	0/8	Reife Plazenta	8/8
Haut – Haarfollikel und Talgdrüsen	0/8	Rektum – Mukosa	0/8
Herzmuskel	0/8	Samenblase	8/8
Hoden	8/8	Schilddrüse	0/8
Hypophysenhinterlappen	0/8	Thymus	0/8
Hypophysenvorderlappen	8/8	Tonsille	8/8
Ileum – Mukosa	2/8	Tonsille – Oberflächenepithel	0/8
Ileum – Muskelschicht	0/8	Uterus – Myometrium	0/8
Kleinhirn – graue Substanz	0/8	Zungenmuskulatur	0/8

Tabelle 3.5: Färbung eines TMA mit dem DCX-Antikörper – Auswertung: Für jedes Gewebe finden sich auf dem TMA 8 Proben. (DCX-Positivität: Anzahl der positiven Proben).

Eine starke Expression von DCX fand sich in bestimmten Anteilen des Magen-Darm-Traktes (Glandula submandibularis, Magen-Corpus, Leber, Gallenblasenepithel, Pankreas), den weiblichen Geschlechtsorganen (Eileitermukosa, Endometrium, Plazenta, Ovar), den männlichen Geschlechtsorganen (Hoden, Nebenhoden, Samenblase), in hormonproduzierenden Geweben (Hypophysenvorderlappen, Nebenniere, Nebenschilddrüse), Niere (Nierenmark, Nierenrinde, Urothel des Nierenbeckens) und in Organen der Immunabwehr (Lymphknoten, Tonsillen, Milz) (exemplarische TMA-Färbungen siehe Abb. 3.7).

In der Niere zeigte sich die Expression von DCX in den Tubuli und dem Epithel des Nierenbeckens, jedoch nicht in den Glomeruli. Bis auf den regelhaften Nachweis im Magen-Corpus konnte in den Geweben des Darms nur selten eine DCX-Expression nachgewiesen werden.

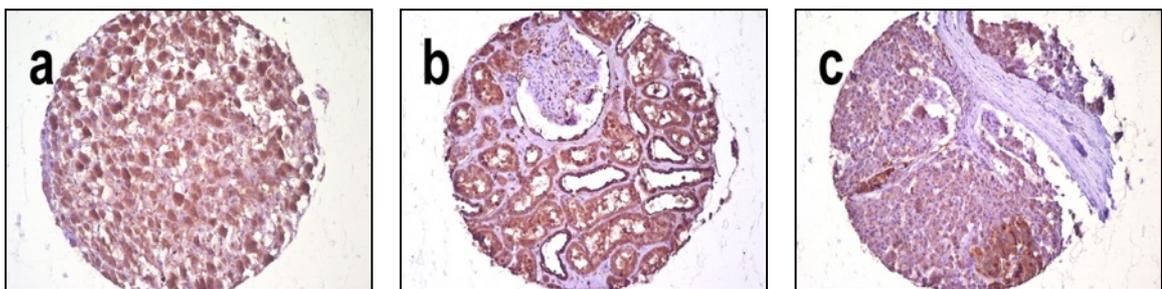


Abbildung 3.7: DCX-markierte TMA-Ausschnitte: (a) Leber (b) Niere (c) Pankreas (*Größe des TMA-Ausschnittes: 0,4 mm im Durchmesser*)

3.3 Vergleich der Antikörper für CD34 und Doublecortin

CD34 und Doublecortin werden beide von Tumoren des Nervensystems exprimiert. Allerdings ist die biologische Funktion völlig verschieden und so zeigt sich im Vergleich ein divergentes Muster der Markierung von Tumoren durch diese Antikörper.

Antikörper für CD34 markierten spezifisch und mit hoher Sensitivität pleomorphe Xanthoastrozytome. CD34 wurde nur zu einem geringen Anteil in anderen glialen Tumoren gefunden.

Doublecortin fand sich dagegen in einer Vielzahl glialer und neuronaler Tumoren und war nicht spezifisch für eine Tumorentität. Allerdings ließ sich anhand der untersuchten Proben feststellen, dass ein Zusammenhang zwischen der DCX-Expression und dem

WHO-Grad der Tumoren besteht: Je maligner die Tumorart ist, desto stärker war die DCX-Expression.

Eine mögliche CD34-Expression bei Neurofibromen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht: Ein Vergleich ist deshalb nicht möglich.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CD34 und Doublecortin an einem identischen Kollektiv von Tumoren des Nervensystems untersucht. Ziel der Arbeit war es, die jeweiligen Marker zur Tumor-Differenzierung genauer zu evaluieren. Der spezifische Nachweis von CD34 bei pleomorphen Xanthoastrozytomen war bereits durch die Arbeit von Reifenberger et al. (2003) erfolgt, zeigte aber bis zum Vorliegen der Ergebnisse dieser Arbeit im Institut für Neuropathologie in Hamburg keine eindeutige Spezifität. Eine systematische Suche nach der Expression von Doublecortin in Tumoren des Nervensystems lag in der Literatur noch nicht vor.

4.1 CD34-Nachweis

Nachdem bereits Brown et al. (1991) die Expression von CD34 in endothelialen und neuronalen Zelllinien nachweisen konnten, untersuchte die Arbeitsgruppe von Lin et al. (1995) die CD34-Expression auf Endothelzellen und auf neuronalen Zellen des fetalen und adulten Mäusegehirns. Weiss und Nickoloff (1993) wiesen CD34 auf peripheren Nerven und deren Tumoren nach. Auch im Rahmen der Erforschung der Angiogenese von neuroepithelialen Tumoren rückte CD34 als endothelialer Marker wiederholt ins Blickfeld (Goldbrunner et al. 1999, Vaquero et al. 2000, Grotzer et al. 2001). Im Zusammenhang mit degenerativen, entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen des Gehirns wurde die Expression von CD34 ebenfalls untersucht, jedoch ohne wegweisenden Befund (Kalaria und Kroon 1992, Allen et al. 1996, Sreenan und Prayson 1997).

Mit der Arbeit von Blümcke et al. (1999) wurde ein entscheidender Schritt zur weiteren Erforschung von CD34 bei Läsionen des Gehirns gemacht: Erstmals wurde die Expression von CD34 in einer großen Stichprobe von Tumoren und Fehlbildungen untersucht, die eine chronische fokale Epilepsie hervorgerufen hatten. Die Fragestellung war aufgrund von Ergebnissen zu NCAM aufgeworfen worden. NCAM spielt wie CD34 eine Rolle bei der Zelladhäsion und konnte bei entwicklungsbedingten Läsionen des Gehirns nachgewiesen werden (Wolf et al. 1995). Dem Nachweis von CD34 in epileptogenen Geweben folgte die Arbeit von Reifenberger et al. (2003). Inzwischen als neue Tumorentität in die WHO-Klassifikation von Tumoren des Nervensystems

aufgenommen (Kepes et al. 1997), waren PXA als regelhafte Quelle von chronischen Epilepsien bei jungen Patienten beschrieben worden. Dementsprechend wurde nun von Reifenberger et al. die Expression von CD34 bei PXA untersucht.

Durch die vorliegende Arbeit konnten die Ergebnisse von Reifenberger et al. (2003) bestätigt werden: Die überwiegende Zahl von PXA weisen CD34-positive Areale auf. Im Vergleich zu der genannten Arbeit fanden wir jedoch eine verhältnismäßig größere Anzahl positiver Tumorproben. Während sich in der Untersuchung von Reifenberger et al. (2003) 73 % der PXA für CD34 positiv zeigten, konnten wir in 90 % CD34-positive Areale nachweisen. Die Tumorproben wurden alle mit der von Reifenberger et al. (2003) beschriebenen Färbemethode untersucht, so dass das Färbeprotokoll nicht Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein kann. Allerdings führten Reifenberger et al. (2003) die Untersuchung an 60 Proben durch, wohingegen in der vorliegenden Arbeit nur zehn verschiedene Proben untersucht wurden. Möglicherweise könnten sich bei einer größeren Stichprobe die Ergebnisse dieser Studie denen von Reifenberger et al. (2003) annähern.

Die bislang vorliegenden Arbeiten evaluierten die Expression von CD34 in (oftmals kleinen) Stichproben einer Tumorentität (Carneiro et al. 1996, Reifenberger et al. 1999, Martin et al. 2001, Galloway 2010, Bisceglia et al. 2011) oder bei Epilepsie hervorrufenden Erkrankungen (Blümcke et al. 1999, Pasquier et al. 2002, Deb et al. 2006) sowie in diversen Fallberichten. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit ein großes Set von verschiedenen Tumoren des Nervensystems auf ihre Expression von CD34 verglichen. Gerade bei Tumorentitäten mit ähnlichen morphologischen Merkmalen muss die hohe Sensitivität von CD34 für PXA hervorgehoben werden. Selbst wenn sich bei anderen neuroepithelialen Tumoren in Einzelfällen CD34-positive Tumoranteile fanden, so zeigte sich doch die Färbintensität bei PXA am höchsten.

Ein pathophysiologischer Mechanismus, warum bestimmte Tumoren des ZNS CD34 exprimieren, wurde bislang nicht gefunden und kann auch nicht aus der vorliegenden Arbeit abgeleitet werden. Wiederholt wurde von PXA in räumlicher Assoziation mit Gangliogliomen berichtet und über den gemeinsamen glioneuronalen Ursprung dieser Tumoren spekuliert (Perry et al. 1997a, Sugita et al. 2009). Auch in der Arbeit von Reifenberger et al. (2003) wurde aufgrund des Nachweises von CD34 bei beiden Tumorentitäten auf einen möglichen Zusammenhang hingewiesen. Der Nachweis von CD34 in Läsionen des ZNS, die Epilepsien hervorgerufen hatten, führte zu ähnlichen

Vermutungen: Die CD34-positiven pathologischen Zellen aus dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren, Gangliogliomen und PXA stammen möglicherweise von den gleichen dysplastischen oder atypisch differenzierten pluripotenten *neuronalen* Vorläuferzellen ab (Blümcke et al. 1999, Pasquier et al. 2002, Deb et al. 2006). CD34-positiv-positive Zellen in Gangliogliomen weisen zudem aufgrund der Koexpression von Neurofilament – bei gleichzeitig fehlenden glialen Markern wie GFAP und MBP – neuronale Differenzierungsmuster auf (Fassunke et al. 2004). Bereits bekannt ist, dass Tumorzellen in PXA neben den glialen Markern GFAP und S100 auch neuronale Marker wie Synaptophysin, Neurofilament Protein und Klasse-III-beta-Tubulin exprimieren (Giannini et al. 2002 und Marton et al. 2007).

Allerdings konnten wir in unserer Arbeit die häufige Expression von CD34 bei Gangliogliomen nicht bestätigen: Zwar konnte CD34 bei einigen wenigen Gangliogliomen nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich vor allem die Gangliozytome zu 100 % (5/5) positiv für CD34. Unsere Ergebnisse von 11 % CD34-positiver Gangliogliome kontrastieren die Arbeit von Blümcke und Wiestler (2002) bzw. Blümcke et al. (1999), die bei diesen Tumoren eine Rate von fast 80 % positiver Tumorproben fanden. Fasst man allerdings die hier als Gangliozytome geführten Tumoren mit den Gangliogliomen zusammen, so ergeben sich gleichartige Ergebnisse wie bei vorgenannten Arbeiten.

Die Proben für die vorliegende Untersuchung rekrutierten sich aus dem Archiv des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg und umfassen 10 PXA-Proben aus den Jahren 1990 bis 2004. Dies spiegelt die Seltenheit dieses Tumors wieder, der in der Literatur mit weniger als ein Prozent der astrozytären Tumoren angegeben wird (vgl. Yang et al. 2012). Seit 1979 wurde in der Fachliteratur insgesamt von ca. 330 PXA-Fällen berichtet. Neben der typischen superfiziellen Lage im Temporalappen wurden PXA in Einzelfällen auch an anderen Stellen des ZNS einschließlich des Rückenmarks gefunden (Übersicht bei Vu et al. 2012). Sogar ein disseminiertes Auftreten mit mehreren gleichzeitigen Tumorlokalisationen ist in zwei Fällen beschrieben (McNatt et al. 2005, Saikali et al. 2005).

Typische immunhistochemische Marker der PXA sind GFAP und S100 – entsprechend der astrozytären Herkunft der Tumoren. Neuronale Marker werden oftmals auch exprimiert. In einer Fallserie konnten so gefunden werden: Neurofilament Protein (78 %), Synaptophysin (40 %) und Chromogranin A (60 %) (Hirose et al. 2008). Der

Proliferationsmarker Ki67 wird überwiegend gering exprimiert (Übersicht bei Vu et al. 2012).

Zu den Prognose bestimmenden Faktoren gehört der Nachweis oder das Fehlen von CD34 innerhalb der Gruppe der PXA nicht. Hierfür sind bislang bekannt: Ausmaß der Tumorresektion, morphologische Aspekte wie der Mitoseindex, anaplastische Transformation, Nekrosen und lymphozytäre Infiltration (Übersicht bei Rickert und Paulus 2005). Dem Nachweis von CD34 kommt jedoch eine wichtige Rolle zu bezüglich der Abgrenzung von PXA zu diffusen Astrozytomen. Dies ist wichtig, da PXA eine wesentlich bessere Prognose aufweisen mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 81-85,7 % (Giannini et al. 1999 und Rao et al. 2010a) bzw. 70 % nach 10 Jahren (Giannini et al. 1999). Für Glioblastoma multiforme gibt es je nach Behandlungsprotokoll unterschiedliche Zahlen, denen jedoch die jeweils schlechte Prognose gemeinsam ist. Die zuletzt veröffentlichte Studie von Demirci et al. (2012) beispielsweise gibt die mittlere Überlebenszeit von Glioblastomen mit 16 Monaten an und die 3-Jahres-Überlebensrate mit 18,2 %.

Obschon die Prognose bei PXA überwiegend gut ist, gibt es in dieser Tumorentität auch aggressivere Formen: Dies sind zum einen PXA mit anaplastischen Anteilen (APXA) mit WHO-Grad III. Zum anderen können selten initial als PXA WHO-Grad II eingestufte Tumoren bei einem Rezidiv als malignere Formen wieder auftreten und sich im Verlauf in WHO-Grad IV-Gliome entarten. Entsprechend deutlich schlechter ist bei diesen Tumorentitäten die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate für APXA von 50 % bzw für maligne transformierte PXA mit 44,8 % (Übersicht bei Vu et al. 2012). Aufgrund des sehr seltenen Auftretens konnten außer dem Ausmaß der Tumorresektion bislang noch keine histologischen oder immunhistochemischen Marker bestimmt werden, die die Prognose besser eingrenzen könnten.

Reifenberger et al. (2003) konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass die maligneren APXA seltener positiv für CD34 sind (PXA: 84 % positiv, APXA 44 % positiv). In der vorliegenden Arbeit fanden sich zwar unterschiedliche Werte, die allerdings aufgrund der geringen Fallzahl als nicht repräsentativ anzusehen sind. CD34 als prognostischen Faktor bezüglich der Malignität von PXA einzusetzen, kommt aufgrund dieser Beobachtung sicherlich nicht in Frage. Allerdings bedeutet der fehlende Nachweis von CD34 auch nicht, dass *kein* PXA vorliegt.

4.2 Doublecortin-Nachweis

Während der Entwicklung des Gehirns migrieren neuronale Vorläuferzellen aus den periventriculären Regionen nach außen in die kortikalen Schichten. Es stellte sich heraus, dass Doublecortin als Mikrotubuli-assoziiertes Protein hierbei eine wichtige Rolle spielt. Am stärksten ist die DCX-Expression im ersten Drittel der Fetalperiode (9.-22. Gestationswoche). Als ein Marker für Neurogenese fällt DCX anschließend ab und ist im Erwachsenenalter nur noch in einigen wenigen Arealen der adulten Neurogenese nachweisbar. Es stellte sich inzwischen heraus, dass die Migration von Gliomzellen in das gesunde Hirngewebe ähnlichen Prozessen unterliegt wie die Migration von normalen neuronalen Progenitorzellen (Farin et al. 2006). Zudem legen verschiedene Studien den Verdacht nahe, dass sich Gliome aus neuronalen Stammzellen oder glialen Vorläuferzellen entwickeln und nicht aus fehlentwickelten reifen glialen Zellen (Singh et al. 2003, Galli et al. 2004, Yuan et al. 2004). So konnte beispielsweise die Arbeit von Mao et al. (2007) zeigen, dass bei Astrozytomen der vermehrte Nachweis von „Tumorstammzellen“ mit der Malignität der Tumoren korreliert. Die Identifizierung möglicher Tumorstammzellen erfolgte mittels Markern der Neurogenese: Nestin, TUC-4, beta-III-Tubulin und DCX sowie dem Proliferationsmarker Ki67.

Die These, dass DCX eine Rolle in der Tumorgenese spielt, wird weiter unterstützt von den Befunden von Rich et al. (2005), die DCX als einen von drei molekularen Markern identifizierten, die an der Invasion von Glioblastomen beteiligt sind. Wenn das für Doublecortin codierende Gen Doublecortex zusammen mit den Genen Osteonectin und Semaphorin3B hochreguliert wird, ist dies mit einer schlechteren Prognose des Glioblastoms assoziiert. Allerdings gilt dies nur, wenn alle drei Gene vermehrt exprimiert werden. Sie kodieren für Proteine, die bei der Regulation der Zellmotilität eine Rolle spielen und können so möglicherweise die letztendliche Determinierung eines sich bereits entwickelten Glioblastoms befördern. Die vorliegende Arbeit geht der These nach, dass Doublecortin als wichtiger Faktor der Migration von neuronalen Vorläuferzellen diese Funktion ebenfalls in neuroepithelialen Tumoren ausübt und daher deren migratorische und infiltrierende Aktivität anzeigen könnte.

Erstmalig wurde ein breites Spektrum von Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems (230 Proben) auf ihre DCX-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die DCX-Expression mit der Malignität des Tumors zunimmt und am

stärksten in High-Grade-Gliomen (WHO-Grad III-IV) auftritt. Dies entspricht den Ergebnissen von Daou et al. (2005), die jedoch eine weitaus kleinere Tumorsammlung (69 Proben) untersuchten. Auch dort war die Positivität für DCX in invasiven Hirntumoren signifikant größer als in umschriebenen nicht-invasiven Gliomen.

Im Unterschied jedoch zu der Arbeit von Daou konnte in dieser Arbeit *keine* Expression von Doublecortin in Schwannomen festgestellt werden. In den beiden Fällen, in denen sich Schwannome in der hier vorliegenden Arbeit positiv färbten, zeigte eine genauere histologische Evaluation, dass diese Tumoren als Neurofibrome einzustufen waren. Daou et al. (2005) konnten die Ergebnisse der Immunhistochemie für Schwannome zudem in der Northern und Western Blot Analyse nicht bestätigen: Bei den untersuchten Schwannom-Proben ließ sich keine DCX-mRNA bzw. kein DCX-Protein nachweisen.

Regelhaft konnte in der vorliegenden Arbeit DCX mit hoher Intensität in Oligodendrogliomen nachgewiesen werden. Dies reiht sich in die Befunde weiterer Arbeiten ein, die ebenfalls neuronale Marker/Merkmale bei Oligodendrogliomen zeigen konnten: Ng et al. (1994) konnten als erste eine neuronale Differenzierung in Oligodendrogliomen nachweisen, indem sie dünne Neuriten-Fortsätze mit longitudinalen Mikrotubuli, einige wenige neurosekretorische Granula und synapsenähnliche Zellverbindungen in der ultrastrukturellen Untersuchung sowie die Expression von neuronalen Markern (NSE⁺: 79 %, Synaptophysin⁺: 54 %) fanden. Wharton et al. (1998) zeigten später, dass weitere neuronale Marker von Oligodendrogliomen exprimiert werden: 31 % der untersuchten Oligodendrogliome exprimierten als neuronale Marker nichtphosphoryliertes Neurofilament und 6 % Synaptophysin. Vyberg et al. (2007) wiesen ebenfalls neuronale Marker bei Oligodendrogliomen nach: Synaptophysin und Synapsin I waren in allen der untersuchten 41 Fälle positiv, wohingegen Neurofilament Protein und NeuN in allen Fällen negativ war.

Für das neuronale Antigen Neurofilament konnte kürzlich gezeigt werden, dass sein Nachweis in Glioblastomen mit einer besseren Prognose – einem längeren Überleben als auch längerem rezidivfreiem Intervall – verbunden ist (Pallud et al. 2012). Die Neurofilament-positive Gruppe kann aufgrund der Morphologie und dem biologischen Verhalten einer neu beschriebenen Gruppen von malignen glioneuronalen Tumoren zugeordnet werden, bei denen die Herkunft aus einer transformierten neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle naheliegt (Varlet et al. 2004, Verhaak et al. 2010).

Auch für das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP-2e als Marker glialer Vorläuferzellen konnte bereits gezeigt werden, dass dessen Vorkommen in Gliomen die Infiltration des Tumors in das angrenzende gesunde Gewebe anzeigt (Suzuki et al. 2002). In einer weiteren Arbeit (Masui et al. 2008) wurde ein weites Spektrum von glialen Tumoren mit Antikörpern gegen DCX und MAP-2e gefärbt. Es zeigte sich – in Übereinstimmung zur vorliegenden Arbeit – dass DCX in low- und high-grade Gliomen exprimiert wird, wobei die Positivität bei infiltrierenden Tumoren zunimmt. Gerade der Nachweis von DCX in niedrigmalignen Tumoren jedoch könnte die infiltrative Aktivität dieser Tumoren anzeigen. Damit könnte mit DCX ein Marker zur Verfügung stehen, der infiltrierende Tumorzellen anzeigt.

In gewissem Widerspruch hierzu stehen die Befunde von Santra et al. (2006). So konnte gezeigt werden, dass die de-novo-Expression von DCX (mittels Transfektion) zu einem Stop des Tumorwachstums von Gliomen führt. Es wurden dabei Tumorzelllinien in vitro als auch durch Implantation einer der Zelllinien in Mäusegehirne in vivo untersucht. Kein Tumorwachstum war zu beobachten bei Mäusen, in die mit DCX transfizierte Tumorzelllinien implantiert wurden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass DCX-exprimierende neuronale Vorläuferzellen in Gliom befallenen Mäusen zu einer Angleichung der Lebenserwartung an die der gesunden Mäuse führte. Wird die Expression von DCX aber durch entsprechende siRNA unterbrochen, wächst die Tumorzelllinie wieder weiter. Durch Transfektion des PTEN-Gens konnte darüber hinaus die Expression von DCX ausgelöst werden mit den bereits genannten Folgen für das Tumorwachstum. Dementsprechend wurde von den Autoren postuliert, dass DCX als Wachstumssuppressor von Gliomen anzusehen sei und möglicherweise in der Gliombehandlung einsetzbar sein könnte. Allerdings wurden in den Versuchen Gliomzelllinien verwendet, die vor Beginn der Versuche regelhaft keine DCX-Expression aufwiesen.

2009 veröffentlichte die Forschungsgruppe um Santra eine weitere Arbeit in Fortführung der oben genannten (Santra et al. 2009). Es wurden nun zusätzlich eine Reihe von glialen Tumoren mit dem Antikörper C-18 der Firma Santa Cruz Biotechnology gefärbt, der auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Weniger als die Hälfte (14/37) der Proben zeigten lediglich in der peritumorösen Region eine DCX-Expression, was deutlich von den hier vorgestellten Ergebnissen abweicht. Allerdings

unterscheidet sich das Färbeprotokoll von dem hier angewendeten und mag zu diesen abweichenden Ergebnissen geführt haben.

Als weiteres Argument dafür, dass die Differenz der Ergebnisse nicht in den verwendeten Antikörpern begründet ist, mag hier die Arbeit von Liu et al. (2008) angeführt werden, bei der die DCX-Expression im epileptischen versus normalen adulten Gehirn evaluiert wurde. Es wurden im Rahmen der Arbeit mehrere DCX-Antikörper verglichen: Die Klone C-18 und N-19 der Firma Santa Cruz Biotechnology, die sich beide gegen das Carboxyl- und Amino-Ende des DCX-Proteins richten sowie der 4604-Antikörper der Firma Cell Signaling Technology, der die Aminosäuresequenz 40-70 und 350-410 der DCX-Moleküls detektiert. Gerade der C-18-Antikörper konnte am deutlichsten und intensivsten die DCX-Expression zeigen. Als weiteren Beweis für die Spezifität von C-18 für DCX führten die Autoren Western Blot Analysen mit frisch gefrorenem humanem epileptischen Temporallappengewebe durch, die das erwartete Band bei 40 kDa zeigten, wenn die Proben mit dem DCX-Antikörper konjugiert wurden.

Das bestätigt auch die Ergebnisse, die in der Fortführung dieser Arbeit durch Bernreuther et al. (2006) gewonnen wurden: Ebenfalls an Gefriergewebe konnte DCX mittels RT-PCR nachgewiesen werden – konkordant zu den Befunden der Immunhistochemie. Auch in der Arbeit von Daou et al. (2005) zeigte sich kein Unterschied in der Färbequalität im Vergleich der Antikörper C-18 und N-19. Allerdings konnten Liu et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass sich das Expressionsmuster von DCX verändert, wenn die Proben nicht sofort mit Formalin fixiert werden. Wenn die Proben länger als eine Stunde aus dem lebenden Gewebe entfernt und erst danach fixiert wurden, fand sich eine schwächere DCX-Expression in den Zellausläufern. Die Markierung der Zellkerne blieb jedoch unverändert, selbst wenn die Proben bei Raumtemperatur für 12 Stunden gelagert wurden.

Im Zusammenhang mit Doublecortin jedoch spielen auch die Proteine eine Rolle, die die Aktivität von Doublecortin regulieren wie beispielsweise PTEN und SOX4 (Schaar et al. 2004, Cheung et al. 2000). Das für PTEN kodierende Gen liegt auf Chromosom 10 und supprimiert Doublecortin auf Protein-Niveau in subventrikulären Vorläuferzellen. Die häufigste genetische Alteration in High-Grade-Gliomen ist wiederum die Deletion von Teilen oder des ganzen Chromosoms 10. In 75-90 % der invasiven Gliome wurde dieser Verlust der Heterozygotie beobachtet (Lang et al. 1994, von Deimling et al. 1993). PTEN als Tumorsuppressor inhibiert die Zellproliferation, induziert Apoptose

und vermindert die Motilität von Zellen (Furnari et al. 1998, Myers et al. 1998, Liliental et al. 2000). Insbesondere bei Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone erhöht die verminderte Expression von PTEN in haploid insuffizienten Mäusen bei Funktionsausfall eines Allels die Zellmotilität und Apoptoseresistenz (Li et al. 2002).

Die tumorsupprimierende Wirkung von PTEN kommt auf molekularer Ebene auf mehreren Wegen zustande: PTEN inaktiviert die G-Proteine Cdc42 und Rac und damit die Migration und Invasion von Gliomen. Außerdem hemmt es die Proteolyse der extrazellulären Matrix durch MMPs (Furukawa et al. 2006). Des Weiteren hemmt PTEN den PI3K-Signalweg, der im ZNS an der Modulation von Proliferation, Migration, Zellgröße, der synaptischen Übertragung und Plastizität mitwirkt (Chalhoub et al. 2009). Jedoch führt eine hereditäre PTEN-Mutation nicht zwangsläufig zur Entwicklung von Tumoren, sondern in erster Linie zur neurologischen Defiziten wie Autismus, Lernschwierigkeiten und mentaler Retardierung (Übersicht bei Sperow et al. 2012).

Li et al. (2003) konnten zeigen, dass eine der zahlreichen Wirkungen von PTEN die Regulation von DCX in bestimmten Arealen der Neurogenese ist – sowohl die Hochregulation in der einen Region (Bulbus olfactorius) als auch die Suppression in der anderen (subventrikuläre Zone). PTEN fungiert dabei gewissermaßen als Gegenspieler der Kinasen Cdk5, MARK, Proteinkinase A und JNK, dephosphoryliert DCX und sorgt so für die Bindung von DCX an die Mikrotubuli. Für die genannten Kinasen konnte in vitro nachgewiesen werden, dass sie DCX wiederum an verschiedenen Orten der neuronalen Vorläuferzelle phosphorylieren und so dessen Bindung an Mikrotubuli reduzieren (Schaar et al. 2004, Tanaka et al. 2004b). Die Aktivität von DCX in postmitotischen migrierenden Neuroblasten wird gesteuert durch sich abwechselnde Phasen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung (Übersicht bei Reiner et al. 2004). Santra et al. (2006) konnten zeigen, dass in Tumoren überwiegend die phosphorylierte Form von DCX vorkommt, während in normalem Hirngewebe das dephosphorylierte DCX überwiegt.

In Weiterführung der vorliegenden Arbeit wurden durch Bernreuther et al. (2006) die hier gefärbten Gewebsschnitte mit neuronalen (Neurofilament) und glialen (GFAP, Protein S100) Antikörpern doppelmarkiert. So konnte gezeigt werden, dass in Ganglioglytomen Zellen mit neuronaler Morphologie teilweise positiv für Neurofilament und DCX sind (Abb. 4.1a). Gangliogliome wiesen andererseits Zellen auf, die DCX und

Neurofilament exprimieren sowie Tumorareale mit Expression von DCX und den glialen Markern (Abb.4.1b).

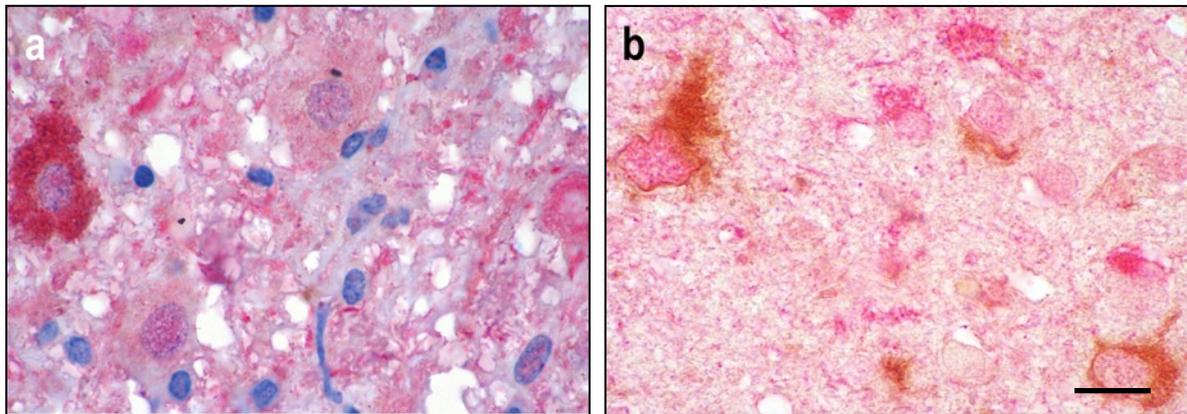


Abbildung 4.1: Doppelmarkierung von neuroglialen Tumoren: (a) Gangliocytom: Zellen mit neuronaler Morphologie zeigen sich hier positiv für DCX (braun) und NF (rot); (b) Gangliogliom: gleichzeitige Expression von DCX (braun) und S100 (rot) (*schwarzer Balken: 30 μ m*). Die Bilder sind aus der gemeinsamen Arbeit Bernreuther et al. 2006 entnommen.

Auch Santra et al. (2010) konnten zeigen, dass in DCX-exprimierenden Gliomzellen in vivo die GFAP-Synthese hochreguliert ist. Bereits Yasui et al. (1998) wiesen nach, dass GFAP eine wichtige Rolle in der Zellteilung beim Übergang von der Metaphase zur Anaphase spielt. Santra et al. (2010) vermuten, dass die Hochregulation von DCX und damit die vermehrte Expression von GFAP zu einer Reduktion der Zellteilung in Gliomen führt.

Weiter konnte auch in Gliomen gezeigt werden, dass diese DCX zusammen mit glialen Markern exprimieren (Abb. 4.2). In normalem erwachsenem Hirngewebe lässt sich dies nicht nachweisen: DCX-Expression ist hier nur im rostralen migratorischen Strom, dem Bulbus olfactorius, der subventrikulären Zone und im Hippocampus bekannt (Übersicht bei von Bohlen und Halbach 2007). Zu bemerken sind hierbei die Befunde von Liu et al. (2008), die für astrozytäre Marker keine Doppelmarkierungen von Zellen in – allerdings epileptischem – Gewebe darstellen konnten. Untersucht wurden dabei die Marker GFAP, GS, und CR3/43.

Die Befunde aus Teratomen – in denen sich epitheliale Gewebe DCX-positiv zeigten – ließen nun die Frage nach einer DCX-Expression in nicht-neuronalen Geweben aufkommen. Hierfür untersuchten wir einen Tissue Microarray mit 74 unterschiedlichen Geweben. Eine DCX-Expression konnte in Geweben des Magen-Darm-Traktes (Magen, Leber, Pankreas u.a.), der Niere, in männlichen und weiblichen

Geschlechtsorganen, in hormonproduzierenden Geweben und schließlich in Organen der Immunabwehr gefunden werden.

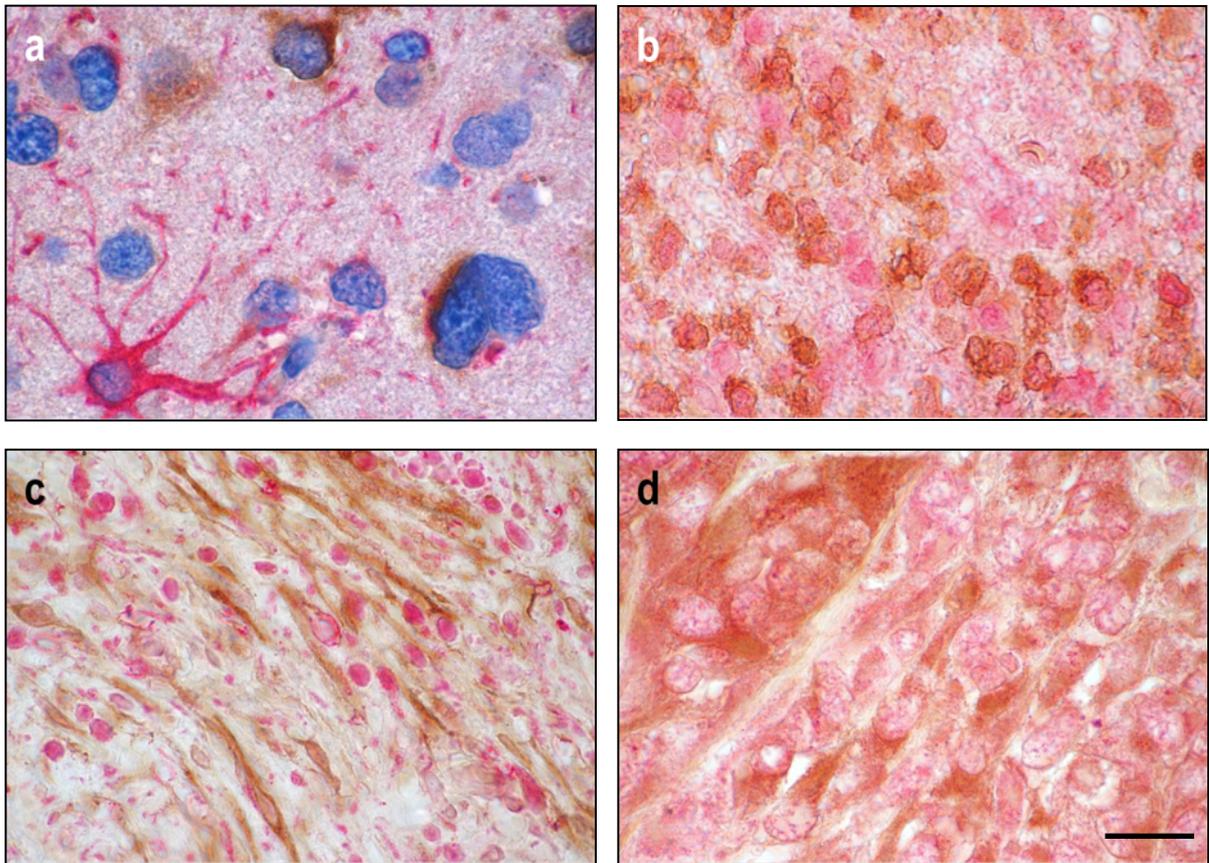


Abbildung 4.2: Doppelmarkierung von glialen Tumoren und Tumoren des PNS: (a) anaplastisches Astrozytom (DCX/GFAP), Markierung der reaktiven Astroglia nur vom GFAP-Antikörper; (b) Oligodendrogliom (DCX/S100); (c) Neurofibrom (DCX/S100); (d) MPNST (DCX/S100); DCX: in allen Schnitten braun, GFAP/S100: jeweils rot (*schwarzer Balken: 30 µm*). Die Bilder sind aus der gemeinsamen Arbeit Bernreuther et al. 2006 entnommen.

Normalerweise finden sich DCX-positive Zellen nur in bestimmten Hirnregionen und weisen nur bis zum Ende der Zellteilung die DCX-Expression auf. Mit dem Beginn der Differenzierung und dem Auftreten des neuronalen Markers NeuN wird DCX supprimiert (Brown et al. 2003). In verschiedenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Differenzierung und Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen gesteigert werden kann durch Reize wie neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Ischämie und Epilepsie (Jin et al. 2004 und 2006, Liu et al. 2008). Durch den pathologischen Reiz werden die Zellen aktiviert und proliferieren, wobei sie die Expression verschiedener Marker hochregulieren, unter anderem auch DCX. Möglicherweise liegen also DCX-positive Zelle in verschiedenen Differenzierungsstadien vor. In reifen Neuronen findet sich allerdings keine Expression von DCX (Couillard-Despres et al. 2005). Auf

Tumoren übertragen, könnte das heißen: DCX wird als Proliferationsfaktor bereits in einem ganz frühen Stadium der Tumorzellendifferenzierung exprimiert und ist konstituierendes Element der Tumorprogression.

Um diese These genauer zu untersuchen, müsste die Gewebeserie mit weiteren neuronalen Markern gefärbt werden, damit die DCX-positiven Zellen genauer differenziert werden können: In welchem Entwicklungsstadium liegen die Zellen vor? Sind sie neu generiert oder residuell vorhanden? Als interessante Marker kommen hierfür infrage:

- PTEN Tumorsuppressor, zentraler Mechanismus der Gliogenese
- PCNA Marker für proliferierende Zellen
- PSA-NCAM Marker für Neuroblasten
- TuJ1 Marker für frühe neuronale Zellen
- NeuN Marker für reife neuronale Zellen
- NeuroD Marker für terminale neuronale Differenzierung
- TUNEL Marker für Apoptose an und damit das transiente Auftreten von Zellen
- CD90, CD44, CXCR4, Msi 1, Melk Marker von neuronalen Stammzellen

Dies sollte in einem weiteren Untersuchungsschritt in Bezug zur Malignität des Tumors und damit der Prognose gesetzt werden.

4.3 Das bessere Färbeprotokoll?

Wie wir in unseren Ergebnissen zeigen konnten, unterscheiden sich die verschiedenen Färbemethoden und die verschiedenen Antikörper zum Nachweis des CD34-Epitopes qualitativ nicht. Je nachdem, wie viele Zwischenschritte in den Versuchen notwendig sind, sind die Methoden jedoch unterschiedlich zeit- und arbeitsaufwändig. Werden „ready-to-use“-Kits verwendet, sparen diese zwar Zeit, erhöhen aber auch die Materialkosten je Versuch. Andererseits steigt mit ihnen die Sicherheit des Versuchsablaufes, da insgesamt weniger Fehlerquellen bestehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der diagnostische Wert der immunhistochemischen Darstellung von CD34 in Tumoren des Nervensystems evaluiert. Dabei zeigte sich:

- Pleomorphe Xanthoastrozytome exprimieren in der überwiegenden Zahl CD34. Der Anteil von CD34 exprimierenden PXA ist mit 90 % sogar noch höher als in der Literatur bislang berichtet.
- Im Vergleich der neuroepithelialen Tumoren konnte gezeigt werden, dass CD34 überwiegend von PXA exprimiert wird. Bei entsprechenden zusätzlichen klinischen und morphologischen Kriterien kann von einem solchen Tumor ausgegangen werden.
- Einige andere Tumoren nicht-glialen Ursprungs exprimieren ebenfalls in einem hohen Prozentsatz CD34. Sie lassen sich aber aufgrund eindeutiger morphologischer Kriterien sicher von PXA unterscheiden.
- Alle getesteten Färbemethoden und Antikörper sind gleichermaßen für den Nachweis von CD34 geeignet. Sie unterscheiden sich jedoch in der Handhabung und im Preis.

Im zweiten Teil der Arbeit gingen wir dem Verdacht nach, dass sich Doublecortin als Marker von Neuroblasten auch im proliferierenden Gewebe von Hirntumoren nachweisen lässt. Außerdem sollte die Expression von Doublecortin in nicht-neuronalen Geweben untersucht werden. Es ergaben sich folgende Resultate:

- In höhermalignen Tumoren des ZNS wird Doublecortin signifikant mehr exprimiert als in niedrigmalignen Tumoren.
- Nahezu alle untersuchten Tumorproben exprimierten Doublecortin. Selten bzw. gar nicht fand sich Doublecortin bei pilozytischen Astrozytomen und Schwannomen.
- Außerhalb des ZNS exprimieren Gewebe ebenfalls Doublecortin: Gewebe des Gastrointestinaltraktes, der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane, Organe der Immunabwehr, hormonproduzierende Gewebe und die Niere.

Die Ergebnisse zu Doublecortin wurden vorab veröffentlicht: Bernreuther C, Salein N, Matschke J, Hagel C (2006) Expression of doublecortin in tumours of the central and peripheral nervous system and in human non-neuronal tissues. *Acta Neuropathol.* 111(3):247-254.

6 Abkürzungsverzeichnis

AB	Avidin-Biotin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
APXA	pleomorphe Xanthoastrozytome mit anaplastischen Anteilen
ARX	aristaless-related homeobox gene
BLK	Blockierungslösung Kaninchen
BLZ	Blockierungslösung Ziege
BrdU ⁺	Bromdesoxyuridin-positiv
BSS	Basislösung
C	Kohlenstoff
CA1	Cornu ammonis (Ammonshorn) Gebiet 1
CAM 5.2	Anti-Cytokeratin Antikörper
Cdc42	cell division controll protein
CK2	Proteinkinase CK2
CR3/43	Marker für MHC class II auf aktivierter humaner Microglia
CXCR4	C-X-C-chemokine receptor 4
D	Deutschland
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCX	Doublecortin
DCX-AK	Doublecortin-Antikörper
DDFP	Düsseldorfer Färbeprotokoll
dest.	Destillata
DK	Dänemark
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELAM-1	endothelial-leukocyte adhesion molecule 1
EMA	epithelial membrane antigen
F	Frankreich
g	Gramm
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GIS	gastrointestinales Stroma
h	Stunden
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid/Perhydrol
HCl	Salzsäure
HHFP	Hamburger Färbeprotokoll
HHFP-ABC	Hamburger Färbeprotokoll, ABC-Methode

HHFP-AP-H	Hamburger Färbeprotokoll, APAAP-Methode mit Histofine®
HHFP-AP-S	Hamburger Färbeprotokoll, APAAP-Methode mit StreptABCComplex/AP
HRP	horseradish peroxidase/Meerrettich-Peroxidase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IDH-1	isocitrate dehydrogenase 1
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
ITG	inferiorer Temporalgyrus
J	Japan
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton (Einheit des Molekulargewichts)
Ki67	zellulärer Proliferationsmarker
l	Liter
LAB	Labeled Avidin Binding Assay
LIS-1	Lissenzephalie 1 Gen/Protein
M	molare Masse [g/mol]
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MARK	MAP/Mikrotubuli-Affinitäts-regulierende Kinase
MBP	Myelin-basisches Protein
Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase
MGMT	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
MHC class II	major histocompatibility complex class II, auf Zelloberflächen präsentierte Antigene
MIB-1	Antikörper gegen Ki67
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	matrix metalloproteinase
MPNST	maligne periphere Nervenscheidentumoren
MRT	Magnetresonanztomografie
Msi 1	musashi homolog 1
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	Neuronal nuclear protein
NSE	Neuronen spezifische Enolase
OT	Objektträger
p53	Protein p53
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PDZ	post synaptic density-95, D Drosophila disc large tumor suppressor, Zona occludins-1

pH	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKC	Proteinkinase C
PNET	primitiv neuroektodermaler Tumor
PNS	peripheres Nervensystem
PSA-NCAM	polysialisiertes (embryonales) neuronales Adhäsionsmolekül
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PXA	pleomorphe Xanthoastrozytome
Rac 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ref-Nr.	Referenznummer
RELN	Reelin
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
sec	Sekunden
siRNA	small interferric ribonucleic acid
SOX4	SRY related HMG box 4
SRY	sex determining region Y
SVZ	subventrikuläre Zone
Tbl.	Tablette
TBS	tris buffered saline
TK	Thymidin-Kinase
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen; Stadieneinteilung von malignen Tumoren
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUBA1A	Tubulin Alpha 1 A-Gen
TUC-4	TOAD/Ulip/CRMP-4, früher Marker für neuronaler Differenzierung
UK	United Kingdom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	United States of America
VLDLR	very-low-density-lipoprotein receptor
WDR	mit Tryptophan (W) und Aspartat (D) endende Aminosäuren-Repeats in Proteinen
WDR62	WD repeat-containing domain 62,
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1:	Modell der Gliogenese	10
Abbildung 1.2(a):	Proteinstruktur von humanem CD34, Podocalyxin und Endoglycan	16
Abbildung 1.2(b):	Struktur von murinem CD34 und CD43	166
Abbildung 1.3:	CD34 vermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktionen	19
Abbildung 1.4:	Fünf Stadien der Neurogenese im Gyrus dentatus.....	22
Abbildung 1.5:	Veränderung der Expression von Zellmarkern	26
Abbildung 3.1:	Interne Färbekontrolle für CD34	42
Abbildung 3.2:	Exemplarische Darstellung CD34-positiver PXA	43
Abbildung 3.3:	CD34-Nachweis bei nicht-glialen bzw. gemischt glial-neuronalen Tumoren des ZNS	46
Abbildung 3.4:	Färbungen von verschiedenen Tumoren des Nervensystems mit dem Doublecortin-Antikörper.....	49
Abbildung 3.5:	DCX-Färbungen in Tumoren des peripheren Nervensystems	52
Abbildung 3.6:	DCX-Expression in einer Teratom-Gewebeprobe.....	52
Abbildung 3.7:	DCX-markierte TMA-Ausschnitte	54
Abbildung 4.1:	Doppelmarkierung von neuroglialen Tumoren.....	65
Abbildung 4.2:	Doppelmarkierung von glialen Tumoren und Tumoren des PNS....	66

8 Verzeichnis der Grafiken und Tabellen

Grafik 1.1:	Vertikale und horizontale Gliederung des WHO-Klassifikationssystems	4
Grafik 1.2:	WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS	7
Grafik 1.3:	Hirntumoren, Häufigkeitsverteilung.....	8
Grafik 1.4:	Neuroepitheliale Tumoren, Häufigkeitsverteilung.....	8
Grafik 3.1:	Darstellung der Tumorentitäten versus der mittleren Färbeintensität für CD34.....	44
Grafik 3.2:	Darstellung der mittleren Färbeintensitäten bei den verschiedenen Tumorentitäten	50
Grafik 3.3:	Korrelation des Malignitätsgrades (WHO-Grad) mit der mittleren Färbeintensität	51
Tabelle 2.1:	Unterschiede der verschiedenen Methoden für den CD34-Nachweis:.....	39
Tabelle 2.2:	Übersicht über die Kombinationen von Antikörper-Detektionssystemen	40
Tabelle 3.1:	Expression von CD34 bei PXA	43
Tabelle 3.2:	Expression von CD34 in Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems.....	45
Tabelle 3.3:	Auswertung des Färbemethodenvergleichs für CD34.....	47
Tabelle 3.4:	Expression von Doublecortin in menschlichen Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems.....	48
Tabelle 3.5:	Färbung eines TMA mit dem DCX-Antikörper – Auswertung.....	53

9 Literaturverzeichnis

Adams JM, Strasser A (2008) Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68(11):4018-4021.

Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell.* 15(1):45-56.

Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Crangle K, McConnell R (1996) The expression of the endothelial cell antigen CD34 in demyelinating disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22(2):101-107.

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ (2003) RNAi reveals doublecortin is required für radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci.* 6(12):1277-1283.

Bailey P, Cushing H (1930) Gewebs-Verschiedenheit der Hirngliome und ihre Bedeutung für die Prognose. Fischer, Jena.

Berg MJ, Schifitto G, Powers JM, Martinez-Capolino C, Fong CT, Myers GJ, Epstein LG, Walsh CA (1998) X-linked female band heterotopia-male lissencephaly syndrome. *Neurology.* 50(4):1143-1146.

Bernreuther C, Salein N, Matschke J, Hagel C (2006) Expression of doublecortin in tumours of the central and peripheral nervous system and in human non-neuronal tissues. *Acta Neuropathol.* 111(3):247-254.

Bisceglia M, Galliani C, Giannatempo G, Lauriola W, Bianco M, D'angelo V, Pizzolitto S, Vita G, Pasquinelli G, Magro G, Dor DB (2011) Solitary fibrous tumor of the central nervous system: a 15-year literature survey of 220 cases (August 1996-July 2011). *Adv Anat Pathol.* 18(5):356-392.

Björklund A, Lindvall O (2000) Self-repair in the brain. *Nature.* 405(6789):892-895.

Blümcke I, Giencke K, Wardelmann E, Beyenburg S, Kral T, Sarioglu N, Pietsch T, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (1999) The CD34 epitope is expressed in neoplastic and malformative lesions associated with chronic, focal epilepsies. *Acta Neuropathol.* 97(5):481-490.

Blümcke I, Müller S, Buslei R, Riederer BM, Wiestler O (2004) Microtubule-associated protein-2 immunoreactivity: a useful tool in the differential diagnosis of low-grade neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol.* 108(2):89-96.

Blümcke I, Wiestler OD (2002) Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(7):575-584.

- Brat DJ**, Prayson RA, Ryken TC, Olson JJ (2008) Diagnosis of malignant glioma: role of neuropathology. *J Neuro-Oncol.* 89(3):287–311.
- Brown J**, Greaves MF, Molgaard HV (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol.* 3(2):175-184.
- Brown JP**, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.* 467(1):1-10.
- Canoll P, Goldman JE** (2008) The interface between glial progenitors and gliomas. *Acta Neuropathol.* 116(5):465–477.
- Cardis E**, Armstrong BK, Bowman JD, Giles GG, Hours M, Krewski D, McBride M, Parent ME, Sadetzki S, Woodward A, Brown J, Chetrit A, Figuerola J, Hoffmann C, Jarus-Hakak A, Montestrucq L, Nadon L, Richardson L, Villegas R, Vrijheid M (2011) Risk of brain tumours in relation to estimated RF dose from mobile phones: results from five Interphone countries. *Occup Environ Med.* 68(9):631-640.
- Carneiro SS**, Scheithauer BW, Nascimento AG, Hirose T, Davis DH (1996) Solitary fibrous tumor of the meninges: a lesion distinct from fibrous meningioma. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 106(2):217-224.
- Cayre M**, Canoll P, Goldman JE (2009) Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 88(1):41-63.
- Cheng J**, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA (1996) Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin, CD34. *Blood.* 87(2):479-490.
- Cheung M**, Abu-Elmagd M, Clevers H, Scotting PJ (2000) Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res Mol Brain Res.* 79(1-2):180-191.
- Civin CI**, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis III: A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 133(1):157-165.
- Couillard-Despres S**, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 21(1):1-14.
- Curado MP**, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P (Hrsg.) (2009) Cancer incidence in five continents. 9. Auflage, IARC scientific publication Band 160, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Dancey J, Sausville EA** (2003) Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature Rev Drug Discov.* 2(4):296-313.
- Daou MC**, Smith TW, Litofsky NS, Hsieh CC, Ross AH (2005) Doublecortin is preferentially expressed in invasive human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 110(5):472-480.

- Daumas-Duport C**, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 62(10):2152-2165.
- Deb P**, Sharma MC, Tripathi M, Sarat Chandra P, Gupta A, Sarkar C (2006) Expression of CD34 as a novel marker for glioneuronal lesions associated with chronic intractable epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32(5):461-468.
- Delia D**, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF (1993) CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 81(4):1001-1008.
- Dell'Albani P** (2008) Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res*. 33(12):2407-2415.
- Demelas L**, Serra G, Conti M, Achene A, Mastropaolo C, Matsumoto N, Dudlicek LL, Mills PL, Dobyns WB, Ledbetter DH, Das S (2001) Incomplete penetrance with normal MRI in a woman with germline mutation of the DCX gene. *Neurology*. 57(2):327-330.
- Demirci U**, Buyukberber S, Coskun U, Akmansu M, Yaman E, Baykara M, Yamac D, Uner A, Benekli M. (2012) Long term experience in high grade glial tumors with temozolomide. *J BUON*. 17(2):357-362.
- Des Portes V**, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala C, Kahn A, Beldjord C, Chelly J (1998) Identification of a novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell*. 92(1):51-61.
- Deuel TA**, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron*. 49(1):41-53.
- Drew E**, Huettner CS, Tenen DG, McNagny KM (2005a) CD34 expression by mast cells: of mice and men. *Blood*. 106(5):1885-1887.
- Drew E**, Merkens H, Chelliah S, Doyonnas R, McNagny KM (2002) CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Exp Hematol*. 30(10):1211-1218.
- Drew E**, Merzaban JS, Seo W, Ziltener HJ, McNagny KM (2005b) CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity*. 22(1):43-57.
- Dunbar E, Yachnis AT** (2010) Glioma Diagnosis: Immunohistochemistry and beyond. *Adv Anat Pathol*. 17(3):187-201.
- Eriksson PS**, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4(11):1313-1317.
- Evans AJ**, Fayaz I, Cusimano MD, Laperriere N, Bilbao JM (2000) Combined pleomorphic xanthoastrocytoma-ganglioglioma of the cerebellum. *Arch Pathol Lab Med*. 124(11):1707-1709.

Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS (1995) Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood*. 85(11):3040-3047.

Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P (2006) Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*. 53(8):799-808.

Fassunke J, Majores M, Ullmann C, Elger CE, Schramm J, Wiestler OD, Becker AJ (2004) In situ-RT and immunolaser microdissection for mRNA analysis of individual cells isolated from epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Lab Invest*. 84(11):1520-1525.

Feiden S, Feiden W (2008) WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren. *Pathologe*. 29(6):411-421.

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 75(12):2417-2426.

Frei P, Poulsen AH, Johansen C, Olsen JH, Steding-Jessen M, Schüz J (2011) Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. *BMJ*. [Online im Internet] URL: <http://www.bmj.com/content/343/bmj.d6387?view=long&pmid=22016439> [Stand: 12.08.2012, 14:00].

Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Faucherau F, Chelly J, Francis F (2003) Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex*. 13(6):620-626.

Friocourt G, Marcorelles P, Saugier-veber P, Quille ML, Marret S, Laquerrière A (2010) Role of cytoskeletal abnormalities in the neuropathology and pathophysiology of type I lissencephaly. *Acta Neuropathol*. 121(2):149-170.

Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK (1998) The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res*. 58(22):5002-5008.

Furness SG, McNagny KM (2006) Beyond mere markers: Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res*. 34(1):13-32.

Furukawa K, Kumon Y, Harada H, Kohno S, Nagato S, Teraoka M, Fujiwara S, Nakagawa K, Hamada K, Ohnishi T (2006) PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules. *Int J Oncol*. 29(1):73-81.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 64(19):7011-7021.

Galloway M (2010) CD34 expression in glioblastoma and giant cell glioblastoma. *Clin Neuropathol*. 29(2):89-93.

- Giannini C**, Paulus W, Louis DN, Liberski P (2007) Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: WHO Classification of tumours of the central nervous system. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 4. Auflage, IARC 2007, Lyon, 22-24.
- Giannini C**, Scheithauer BW, Burger PC, Brat DJ, Wollan PC, Lach B, O'Neil BP (1999) Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it? *Cancer*. 85(9):2033-2045.
- Giannini C**, Scheithauer BW, Lopes MB, Hirose T, Kros JM, VandenBerg SR (2002) Immunophenotype of pleomorphic xanthoastrocytoma. *Am J Surg Pathol*. 26(4):479-485.
- Gleeson JG**, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross MH, Walsh CA (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 92(1):63-72.
- Gleeson JG**, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 23(2):257-271.
- Goldbrunner RH**, Pietsch T, Vince GH, Bernstein JJ, Wagner S, Hageman H, Selby DM, Krauss J, Soerensen N, Tonn JC (1999) Different vascular patterns of medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Int J Dev Neurosci*. 17(5-6):593-599.
- Greaves MF**, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR (1992) Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia*. 6(Suppl 1):31-36.
- Gregory WA**, Edmondson JC, Hatten ME, Mason CA (1988) Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci*. 8(5):1728-1738.
- Grotzer MA**, Wiewrodt R, Janss AJ, Zhao H, Cnaan A, Sutton LN, Rorke LB, Phillips PC (2001) High microvessel density in primitive neuroectodermal brain tumors of childhood. *Neuropediatrics*. 32(2):75-79.
- Häfer R**, Voigt A, Gruhn B, Zintl F (1999) Neuroblastoma cells can express the hematopoietic progenitor cell antigen CD34 as detected at surface protein and mRNA level. *J Neuroimmunol*. 96 (2):201-206.
- Hamlat A**, Le Strat A, Guegan Y, Ben-Hassel M, Saikali S (2007) Cerebellar pleomorphic xanthoastrocytoma: case report and literature review. *Surg Neurol*. 68(1):89-95.
- Hirose T**, Giannini C, Scheithauer BW (2001) Ultrastructural features of pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative study with glioblastoma multiforme. *Ultrastruct Pathol*. 25(69):469-478.
- Hirose T**, Ishizawa K, Sugiyama K, Kageji T, Ueki K, Kannuki S (2008) Pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative pathological study between conventional and anaplastic types. *Histopathology*. 52(2):183-193.

Im SH, Chung CK, Kim SK, Cho BK, Kim MK, Chi JG (2004) Pleomorphic xanthoastrocytoma: a developmental glioneuronal tumor with prominent glioproliferative changes. *J Neurooncol.* 66(1-2):17-27.

INTERPHONE Study Group (2010) Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol.* 39(3):675-694.

Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO (2002) An introduction to tumours of the central nervous system. In: *Diagnostic pathology of nervous system tumours.* Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO (Hrg.) Churchill Livingstone, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 1-16.

Iwaki T, Fukui M, Kondo A, Matsushima T, Takeshita I (1987) Epithelial properties of pleomorphic xanthoastrocytoma determined in ultrastructural and immunohistochemical studies. *Acta Neuropathol.* 74(2):142-150.

Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh Z, O' Malley C, Naumann H, Alvarez-Buylla A, Brandner S (2010) Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J.* 9(1):222-235.

Jin K, Peel AL, Ou Mao X, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(1):341-347.

Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(35):13198-13202.

Kalaria RN, Kroon SN (1992) Expression of leukocyte antigen CD34 by brain capillaries in Alzheimer's disease and neurologically normal subjects. *Acta Neuropathol.* 84(6):606-612.

Kaulich K, Blaschke B, Nümann A, von Deimling A, Wiestler OD, Weber RG, Reifenberger G (2002) Genetic alterations commonly found in diffusely infiltrating cerebral gliomas are rare or absent in pleomorphic xanthoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(12):1092-1099.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenburg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27(8):447-452.

Kepes JJ (1993) Pleomorphic xanthoastrocytoma: the birth of a diagnosis and a concept. *Brain Pathol.* 3(3):269-274.

Kepes JJ, Louis DN, Giannini C, Paulus W (2000) Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: *Pathology and genetics of tumours of the central nervous system.* Kleihues P, Cavenee WK (Hrg.) IARC Press, Lyon, 52-54.

- Kepes JJ**, Louis DN, Paulus W (1997) Pleomorphic xanthoastrocytoma. In: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Kleihues P, Cavenee WK (Hrsg.) International Agency for Research on Cancer, Lyon, 34-36.
- Kepes JJ**, Rubinstein LJ, Ansbacher L, Schreiber DJ (1989) Histopathological features of recurrent pleomorphic xanthoastrocytomas: further corroboration of the glial nature of this neoplasm. A study of 3 cases. *Acta Neuropathol.* 78(6):585-593.
- Kernohan JW**, Mabon RF, Svien HJ, Adson AW (1949) A simplified classification of gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 24(3):71-75.
- Kirshenbaum AS, Metcalfe DD** (2006) Growth of human mast cells from bone marrow and peripheral blood-derived CD34+ pluripotent progenitor cells. *Methods Mol Biol.* 315:105-112.
- Kleihues P** (Hrsg.) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World Health Organization classification of tumours. International Agency Research on Cancer 1997, Lyon.
- Kleihues P**, Burger PC, Scheithauer BW (Hrsg.) Histological typing of tumours of the central nervous system. WHO international classification of tumours, 2nd ed. Springer-Verlag 1993, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kleihues P**, Cavenee WK (Hrsg.) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World Health Organization classification of tumours. IARC Press 2000, Lyon.
- Koch, Godehard** (2007) Bildmorphologische Parameter präoperativer MR-Tomographie und Überlebenszeiten von Patienten mit malignen Gliomen. Medizinische Dissertation, Universitätsmedizin Berlin.
- Kolles H**, Niedermayer I, Feiden W (1998) Grading von Astrozytomen und Oligodendrogliomen. *Pathologe.* 19(4):259-268.
- Kordek R**, Biernat W, Sapieja W, Alwasiak J, Liberski PP (1995) Pleomorphic xanthoastrocytoma with a gangliogliomatous component: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol.* 89(2):194-197.
- Krause DS**, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood.* 87(1):1-13.
- Krause DS**, Ito T, Fackler MJ, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 84(3):691-701.
- Lach B**, Duggal N, DaSilva VF, Benoit BG (1996) Association of pleomorphic xanthoastrocytoma with cortical dysplasia and neuronal tumors. A report of three cases. *Cancer.* 78(12):2551-2563.
- Lang FF**, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW (1994) Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg.* 81(3):427-436.

- Li L**, He F, Litofsky NS, Recht LD, Ross AH (2003) Profiling of genes expressed by PTEN haploinsufficient neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci.* 24(4):1051-1061.
- Li L**, Liu F, Salmonsens RA, Turner TK, Litofsky NS, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Jones SN, Recht LD, Ross AH (2002) PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci.* 20(1):21-29.
- Liliental J**, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H (2000) Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol.* 10(7):401-404.
- Lin J**, Zhang XM, Yang JC, Ye YB, Luo SQ (2010) γ -secretase inhibitor-I enhances radiosensitivity of glioblastoma cell lines by depleting CD133+ tumor cells. *Arch Med Res.* 41(7):519-529.
- Lindboe CF**, Cappelen J, Kepes JJ (1992) Pleomorphic xanthoastrocytoma as a component of a cerebellar ganglioglioma: case report. *Neurosurgery.* 31(2):353-355.
- Liu YWJ**, Curtis MA, Gibbons HM, Mee EW, Bergin PS, Teoh HH, Connor B, Dragunow M, Faull RLM (2008) Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain. *Eur J Neurosci.* 28(11):2254-2265.
- LoTurco J** (2004) Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron.* 41(2):175-177.
- Louis DN**, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Hrsg.) WHO Classification of tumours of the central nervous system. 4. Aufl. IARC 2007, Lyon.
- Macaulay RJB**, Jay V, Hoffman HJ, Becker LE (1993) Increased mitotic activity as a negative prognostic indicator in pleomorphic xanthoastrocytoma. *J Neurosurg.* 79(5):761-768.
- Mao Y**, Zhou L, Zhu W, Wang X, Yang G, Xie L, Mao X, Jin K (2007) Proliferative status of tumor stem cells may be correlated with malignancy grade of human astrocytomas. *Front Biosci.* 12:2252-2259.
- Martin AJ**, Fisher C, Igbasimokumo U, Jarosz JM, Dean AF (2001) Solitary fibrous tumours of the meninges: case series and literature review. *J Neurooncol.* 54(1):57-69.
- Marton E**, Feletti A, Orvieto E, Longatti P (2007) Malignant progression in pleomorphic xanthoastrocytoma: personal experience and review of the literature. *J Neurol Sci.* 252(2):144-153.
- Masui K**, Mawatari SY, Suzuki SO, Iwaki T (2008) Evaluation of sensitivity and specificity of doublecortin immunostaining for the detection of infiltrating glioma cells. *Brain Tumor Pathol.* 25(1):1-7.
- McNatt SA**, Gonzalez-Gomez I, Nelson MD, McComb JG (2005) Synchronous multicentric pleomorphic xanthoastrocytoma: case report. *Neurosurgery.* 57(1):E191.

Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A (1994) Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody H- and Y-antigens – evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol.* 7(1):82-90.

Moore CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA (2004) Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol Cell.* 14(6):833-839.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK (1998) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13513-13518.

Nakagomi T, Molnár Z, Taguchi A, Nakano-Doi A, Lu S, Kasahara Y, Nakagomi N, Matsuyama T (2012) Leptomeningeal-derived doublecortin-expressing cells in poststroke brain. *Stem Cells Dev.* [Online im Internet] URL: http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/5150_0/online.liebertpub.com/action/doSearch?searchText=leptomeningeal&categoryId=1048&btnSearch=SEARCH [Stand: 12.08.2012, 14:00]

Nakamura Y, Komano H, Nakauchi H (1993) Two alternative forms of cDNA encoding CD34. *Exp Hematol.* 21(2):236-242.

Natkunam Y, Rouse RV, Zhu S, Fisher C, Van de Rijn M (2000) Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. *Am J Pathol.* 156(1):21-27.

Ng HK, Ko HC, Tse CC (1994) Immunohistochemical and Ultrastructural Studies of Oligodendrogliomas revealed features of neuronal differentiation. *Int J Surg Pathol.* 2(1):47-56.

Nielsen JS, Graves ML, Chelliah S, Vol AW, Roskelley CD, McNagny KM (2007) The CD34-related molecule podocalyxin is a potent inducer of microvillus formation. *PLoS ONE* 2:e237.

Nielsen J, McNagny KM (2009) CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation.* 16(6):487-496.

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(6):479-89.

Oltra S, Martinez F, Orellana C, Grau E, Fernandez JM, Canete A, Castel V (2005) The Doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol.* 14(1):53-57.

Pahapill PA, Ramsay DA, Del Maestro RF (1996) Pleomorphic xanthoastrocytoma: case report and analysis of the literature concerning the efficiency of resection and the significance of necrosis. *Neurosurgery.* 38(4):822-829.

Pallud J, Dezamis E, Audureau E, Devaux B, Souillard-Scemama R, Sanai N, Page P, Beuvon F, Koziak M, Oppenheim C, Dhermain F, Schlienger M, Meder JF, Roux FX, Varlet P (2012) Neuronal immunoreexpression and a distinct subtype of adult primary supratentorial glioblastoma with a better prognosis. *J Neurosurg.* [Online im Internet] URL: <http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/7521/thejns.org/doi/full/10.3171/2012.5.JNS111670?prevSearch=&searchHistoryKey=> [Stand: 12.08.2012, 14:00]

Parent JM (2002) The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.* 50(1-2):179-189.

Pasquier B, Péoc'H M, Fabre-Bocquentin B, Bensaadi L, Pasquier D, Hoffmann D, Kahane P, Tassi L, Le Bas JF, Benabid AL (2002) Surgical pathology of drug-resistant partial epilepsy. A 10-year-experience with a series of 327 consecutive resections. *Epileptic Disord.* 4(2):99-119.

Perry A, Giannini C, Scheithauer BW, Roijani AM, Yachnis AT, Seo IS, Johnson PC, Kho J, Shapiro S (1997a) Composite pleomorphic xanthoastrocytoma and ganglioglioma: report of four cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 21(7):763-771.

Perry A, Scheithauer BW, Nascimento AG (1997b) The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: a comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am J Surg Pathol.* 21(11):1354-1360.

Powell SZ, Yachnis AT, Rorke LB, Roijani AM, Eskin TA (1996) Divergent differentiation in pleomorphic xanthoastrocytoma. Evidence for a neuronal element and possible relationship to ganglion cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 20(1):80-85.

Preston-Martin S, Munir R, Chakrabarti I (2006) Nervous system. In: *Cancer epidemiology and prevention.* Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (Hrg.) Oxford University Press, New York, 1173-1195.

Rådinger M, Johansson AK, Sitkauskienė B, Sjöstrand M, Lotvall J (2004) Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 113(6):1109-1116.

Rao AA, Laack NN, Giannini C, Wetmore C (2010a) Pleomorphic xanthoastrocytoma in children and adolescent. *Pediatr Blood Cancer.* 55(2):290-294.

Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 19(2):234-246.

Rao SK, Edwards J, Joshi AD, Siu IM, Riggins GJ (2010b) A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol.* 96(2):169-179.

Reifenberger G, Kaulich K, Wiestler OD, Blümcke I (2003) Expression of the CD34 antigen in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Acta Neuropathol.* 105(4):358-364.

- Reifenberger G**, Weber T, Weber RG, Wolter M, Brandis A, Kuchelmeister K, Pilz P, Reusche E, Lichter P, Wiestler OD (1999) Chordoid glioma of the third ventricle: immunohistochemical and molecular genetic characterization of a novel tumor entity. *Brain Pathol.* 9(4):617-626.
- Reiner O**, Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapoznik S, Nir R, Sapir T (2004) DCX's phosphorylation by not just another kinase (JNK). *Cell Cycle.* 3(6):747-751.
- Rich JN**, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Ahmed Rasheed BK, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M (2005) Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 65(10):4051-4058.
- Rickert CH und Paulus W** (2005) Prognosis-related histomorphological and immunohistochemical markers in central nervous system tumors of childhood and adolescence. *Acta Neuropathol.* 109(1):69-92.
- Rivas RJ, Hatten ME** (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15(2):981-989.
- Saikali S**, Le Strat A, Heckly A, Stock N, Scarabin JM, Hamlat A (2005) Multicentric pleomorphic xanthoastrocytoma in a patient with neurofibromatosis type 1. Case report and review of the literature. *J Neurosurg.* 102(2):376-381.
- Santra M**, Santra S, Robert C, Zhang R, Chopp M (2009) Doublecortin induces mitotic microtubule catastrophe and inhibits glioma cell invasion. *J Neurochem.* 108(1):231-245.
- Santra M**, Zhang X, Santra S, Jiang F, Chopp M (2006) Ectopic doublecortin gene expression suppresses the malignant phenotype in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 66(24):11726-11735.
- Santra M**, Zheng X, Roberts C, Santra S, Lu M, Panda S, Jiang F, Chopp M (2010) Single doublecortin gene therapy significantly reduces glioma tumor volume. *J Neurosci Res.* 88(2):304-314.
- Sapir T**, Horesh D, Caspi M, Atlas R, Burgess HA, Wolf SG, Francis F, Celly J, Elbaum M, Pietrokovski S, Reiner O (2000) Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet.* 9(5):703-710.
- Sassetti C**, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD (1998) Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med.* 187(12):1965-1975.
- Sassetti C**, Van Zante A, Rosen SD (2000) Identification of endoglykan, a member of the CD34/podocalyxin family of sialomucins. *J Biol Chem.* 275(12):9001-9010.
- Schaar BT**, Kinoshita K, McConnell SK (2004) Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron.* 41(2):203-213.
- Siebzehnrbul FA**, Reynolds BA, Vescovi A, Steindler DA, Deleyrolle LP (2011) The origins of glioma: e pluribus unum? *Glia.* 59(8):1135-1147.

- Singh SK**, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63(18):5821-5828.
- Sperow M**, Berry RB, Bayazitov IT, Zhu G, Baker SJ, Zakharenko SS (2012) Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effect on neuronal morphology and migration. *J Physiol.* 590(4):777-792.
- Sreenan JJ, Prayson RA** (1997) Gliosarcoma. A study of 13 tumors, including p53 and CD34 immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 121(2):129-133.
- Sugita Y**, Irie K, Ohshima K, Hitotsumatsu T, Sato O, Arimura K (2009) Pleomorphic xanthoastrocytoma as a component of a temporal lobe cystic ganglioglioma: a case report. *Brain Tumor Pathol.* 26(1):31-36.
- Sundholm-Peters NL**, Yang HKC, Goings GE, Walker AS, Szele PG (2005) Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64(12):1089-1100.
- Suzuki A**, Andrew DP, Gonzalo JA, Fukumoto M, Spellberg J, Hashiyama M, Takimoto H, Gerwin N, Webb I, Molineux G, Amakawa R, Tada Y, Wakeham A, Brown J, McNiece I, Ley K, Butcher EC, Suda T, Gutierrez-Ramos JC, Mak TW (1996) CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel cross-reactive 90-kD protein. *Blood.* 87(9):3550-3562.
- Suzuki SO**, Kitai R, Llana J, Lee SC, Goldman JE, Shafit-Zagardo B (2002) MAP-2e, a novel MAP-2 isoform, is expressed in gliomas and delineates tumor architecture and patterns of infiltration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(5):403-12.
- Tanaka T**, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG (2004a) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol.* 165(5):709-721.
- Tanaka T**, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG (2004b) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron.* 41(2):215-227.
- Vaquero J**, Zurita M, Coca S, Oya S, Morales C (2000) Prognostic significance of clinical and angiogenesis-related factors in low-grade oligodendrogliomas. *Surg Neurol.* 54(3):229-234; discussion 234.
- Varlet P**, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C (2004) New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery.* 55(6):1377-1392.
- Venere M**, Fine HA, Dirks PB, Rich JN (2011) Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia.* 59(8):1148-1154.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17(1):98-110.

Verwer R, Sluiter A, Balesar R, Baayen J, Noske D, Dirven C, Wouda J, van Dam A, Lucassen P, Swaab D (2007) Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin. *Brain*. 130(12):3321-3335.

Von Bohlen und Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 329(3):409-420.

Von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tiss Res*. 345(1):1-19.

Von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD (1995) Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia*. 15(3):328-338.

Von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN (1993) Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol*. 3(1):19-26.

Vu TM, Liubinas SV, Gonzales M, Drummond KJ (2012) Malignant potential of pleomorphic xanthoastrocytoma. *J Clin Neurosci*. 19(1):12-20.

Vyberg M, Uhløi BP, Teglbaerg PS (2007) Neuronal features of oligodendrogliomas – an ultrastructural and immunohistochemical study. *Histopathology*. 50(7):887-896.

Wallace DJ, Byrne RW, Ruban D, Cochran EJ, Roh D, Whisler WW (2011) Temporal lobe pleomorphic xanthoastrocytoma and chronic epilepsy: long-term surgical outcomes. *Clin Neur Neurosurg*. 113(10):918-922.

Wang SS, Hartge P, Yeager M, Carreón T, Ruder AM, Linet M, Inskip PD, Black A, Hsing AW, Alavanja M, Beane-Freeman L, Safaiean M, Chanock SJ, Rajaraman P (2011) Joint associations between genetic variants and reproductive factors in glioma risk among women. *Am J Epidemiol*. 174(8):901-908.

Weiss SW, Nickoloff BJ (1993) CD34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors and related lesions. *Am J Surg Pathol*. 17(10):1039-1045.

Welker P, Grabbe J, Zuberbier T, Guhl S, Henz BM (2000) Mast cell and myeloid marker expression during early in vitro mast cell differentiation from human peripheral blood mononuclear cells. *J Invest Dermatol*. 114(1): 44-50.

Westphal M, Lamszus K (2010) The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci*. 12(9):495-508.

- Wharton SB**, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR (1998) Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 24(4):302-308.
- Wolf HK**, Wellmer J, Müller MB, Wiestler OD, Hufnagel A, Pietsch T (1995) Glioneuronal malformative lesions and dysembryoplastic neuroepithelial tumors in patients with chronic pharmaco-resistant epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54(2):245-254.
- Wu X**, Bandopadhyay P, Ng J, Ashley D, Chow CW (2011) The evolution of the histology in pleomorphic xanthoastrocytomas in children: a study of 15 cases. *Pathology.* 43(1):9-16.
- Yanamoto H**, Miyamoto S, Tohnia N, Nagata I, Xue JH, Nakano Y, Nakajo Y, Kikuchi H (2005) Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putamen and cortex. *Stroke.* 36(7):1544-1550.
- Yang MM**, Singhal A, Rassekh SR, Yip S, Eydoux P, Dunham C (2012) Possible differentiation of cerebral glioblastoma into pleomorphic xanthoastrocytoma: an unusual case in an infant. *J Neurosurg Pediatr.* 9(5):517-523.
- Yasui Y**, Amano M, Nagata K, Inagaki N, Nakamura H, Saya H, Kaibuchi K, Inagaki M (1998) Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. *J Cell Biol.* 143(5):1249-1258.
- Yuan X**, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 23(58):9392-9400.
- Zhou L**, Del Villar K, Dong Z, Miller CA (2004) Neurogenesis response to hypoxia-induced cell death: map kinase signal transduction mechanisms. *Brain Res.* 1021(1):8-19.
- Zülch KJ** (1979) *Histological typing of tumours of the central nervous system.* WHO, Genf.

10 Danksagung

Bei den folgenden Personen, die für die Entstehung dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag geleistet haben, möchte ich mich auf das Herzlichste bedanken:

Herrn Professor Dr. Christian Hagel, meinem Doktorvater, bin ich für die andauernd geduldige, sehr hilfsbereite, freundliche und kompetente Unterstützung besonders dankbar. Diese Arbeit könnte sicherlich nicht vorliegen ohne die beispielhafte Betreuung durch Prof. Hagel.

Herrn Prof. Dr. Markus Glatzel danke ich für die Möglichkeit, im Labor des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf meine Versuche durchführen zu dürfen.

Den Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie gilt ebenfalls mein großer Dank: Herrn Dr. Christian Bernreuther für seine Hilfsbereitschaft und für die Weiterentwicklung meiner Arbeit. Yvonne Pulkenat, Ulrike Rumpf und Martin Haberkorn für die tägliche Unterstützung bei der praktischen Umsetzung meiner Versuche.

Herrn Professor Dr. Guido Sauter danke ich für die freundliche Überlassung des Tissue Microarrays.

Herrn Professor Dr. Alwin Goetz gilt mein Dank für die Unterstützung auf meinem beruflichen Weg und die kontinuierlichen Ermunterungen zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Einen wesentlichen Beitrag zum Entstehen dieser Arbeit hat meine Familie geleistet: Mein Mann Tobias und mein Sohn Raoul, die mir die Zeit im Labor und am Schreibtisch ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Meine Eltern Gudrun und Georg Salein, die mich immer auf meinem Weg begleitet und mir – ebenfalls wann immer es erforderlich war – den Rücken für meine persönlichen oder beruflichen Anforderungen freigehalten haben.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

12 Anhang: Rohdaten

- a) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Methodenvergleich
- b) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Übersichtstabelle
- c) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Einzelauswertung
- d) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, Übersichtstabelle
- e) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, Einzelauswertung
- f) Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, TMA

a) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Methodenvergleich:

Antikörper und Färbemethoden: siehe Tabelle 2.2 in Abschnitt 2.2.2.4

Untersuchtes Material: drei PXA-Proben (E226-90 als Positiv-Kontrolle)

		Färbeintensität nach Versuchsanordnung					
		I	II	III	IV	V	VI
(Präparat) Block- nummer	(A) E226-90	3	3	3	3	3	3
	(B) E842-04	3	3	3	3	3	3
	(C) E890-04	3	3	3	3	nicht untersucht	nicht untersucht
Antikörper		Biozol	Biozol	DAKO	DAKO	Biozol	Serotec
Färbeprotokoll		HHFP- AP-H	HHFP- ABC	HHFP- AP-S	HHFP- AP-H	DDFP	DDFP

Vergleich der Färbemethoden anhand aller eingesetzter PXA-Fälle:

Laufende Nummer	Blocknummer	Alter	Geschlecht	Versuchsanordnung			
				I	II	V	VI
1	E138-91	37	2	3	3	3	3
2	E069-92	17	1	2	2	2	2
3	E092-93	15	2	2	2	2	2
4	E509-95	22	1	3	3	3	3
5	E045-97	16	1	3	3	3	3
6	E036-98	26	2	0	0	0	0
7	E450-98	27	2	3	3	3	3
8	E420-02	24	2	1	1	1	1
9	E842-04	63	1	3	3	3	3
10	E890-04	42	1	3	3	nicht untersucht	nicht untersucht

Laufende Nummer: Nummerierung zur zusätzlichen Anonymisierung

Blocknummer: Codierung der Zuordnung der Proben

Geschlecht: 1 – männlich, 2 – weiblich

semiquantitative Auswertung: 0 – nur gefäßendotheliale Zellen sind CD34-positiv; 1 – einzelne CD34-positive Tumorzellen; 2 – Anteil der CD34-positiven Tumorzellen kleiner 50% des Tumors; 3 – Anteil der CD34-positiven Tumorzellen größer als 50% des Tumors

b) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Übersichtstabelle:

Antikörper: CD34-AK-Clon QBEnd, Firma Serotec

untersuchtes Material: gesamtes Hirntumoren-Kollektiv

Färbemethode: Düsseldorfer Färbeprotokoll (DDFP)

Tumorentität	Anzahl der Proben	Färbeintensität 0	Färbeintensität 1	Färbeintensität 2-3
Astrozytome	36	34	2	0
Ependymome	11	11	0	0
Gangliozytome	5	0	5	0
Gangliogliome	26	23	2	1
Glioblastome	22	19	2	1
Medulloblastome	10	10	0	0
MPNST	4	2	1	1
Oligodendrogliome	28	26	2	0
PXA	11	1	1	9
Schwannome	22	22	0	0
Teratome	12	4	1	7

c) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem CD34-Antikörper, Einzelauswertung:

Antikörper: CD34-AK-Clon QBEnd, Firma Serotec

untersuchtes Material: gesamtes Hirntumoren-Kollektiv

Färbemethode: Düsseldorfer Färbeprotokoll (DDFP)

Tumorentität	Blocknummer	Grading	Alter	Geschlecht	Färbeintensität	Bemerkungen
Astrozytom	E0001-05	1,00	16,00	1,00	0	
Astrozytom	E0003-04	1,00	5,00	1,00	0	
Astrozytom	E0075-04	1,00	5,00	2,00	0	
Astrozytom	E0160-05	1,00	19,00	2,00	0	
Astrozytom	E0238-04	1,00	40,00	1,00	1	
Astrozytom	E0429-04	1,00	21,00	2,00	0	
Astrozytom	E0433-04	1,00	69,00	1,00	0	
Astrozytom	E0586-04	1,00	35,00	2,00	0	
Astrozytom	E0715-04	1,00	8,00	2,00	0	
Astrozytom	E0847-04	1,00	3,00	1,00	0	
Astrozytom	E0094-05	2,00	2,00	2,00	1	
Astrozytom	E0128-04	2,00	34,00	1,00	0	
Astrozytom	E0234-04	2,00	36,00	1,00	0	
Astrozytom	E0339-04	2,00	56,00	1,00	0	
Astrozytom	E0359-04	2,00	37,00	2,00	0	
Astrozytom	E0405-04	2,00	39,00	2,00	0	
Astrozytom	E0498-04	2,00	29,00	2,00	0	
Astrozytom	E0677-04	2,00	33,00	1,00	0	
Astrozytom	E0807-04	2,00	40,00	2,00	0	
Astrozytom	E0004-04	3,00	56,00	1,00	0	
Astrozytom	E0059-04	3,00	67,00	1,00	0	
Astrozytom	E0077-05	3,00	30,00	2,00	0	
Astrozytom	E0155-04	3,00	49,00	1,00	0	
Astrozytom	E0159-05	3,00	40,00	1,00	0	
Astrozytom	E0172-05	3,00	56,00	2,00	0	
Astrozytom	E0196-04	3,00	41,00	2,00	0	
Astrozytom	E0286-04	3,00	69,00	2,00	0	
Astrozytom	E0438-04	3,00	58,00	2,00	0	
Astrozytom	E0478-04	3,00	65,00	2,00	0	
Astrozytom	E0597-04	3,00	46,00	2,00	0	
Astrozytom	E0604-04	3,00	48,00	1,00	0	
Astrozytom	E0608-04	3,00	46,00	1,00	0	
Astrozytom	E0653-04	3,00	56,00	1,00	0	
Astrozytom	E0657-04	3,00	49,00	2,00	0	

Astrozytom	E0757-04	3,00	30,00	2,00	0	
Astrozytom	E0789-04	3,00	68,00	2,00	0	
Ependymom	E040-04	2,00	55,00	2,00	0	
Ependymom	E055-04	2,00	70,00	2,00	0	
Ependymom	E069-04	2,00	37,00	1,00	0	
Ependymom	E142-05	2,00	5,00	2,00	0	
Ependymom	E262-04	2,00	37,00	2,00	0	
Ependymom	E430-04	2,00	37,00	2,00	0	
Ependymom	E445-05	2,00	51,00	2,00	0	
Ependymom	E702-04	2,00	29,00	1,00	0	
Ependymom	E710-04	2,00	41,00	1,00	0	
Ependymom	E832-04	2,00	42,00	2,00	0	
Ependymom	E123-05	3,00	4,00	2,00	0	
Ependymom	E135-04	3,00	3,00	2,00	0	
Gangliogliom	E0116-04	1,00	61,00	2,00	2	
Gangliogliom	E013-97	1,00	18,00	1,00	1	
Gangliogliom	E157-00	1,00	22,00	1,00	0	
Gangliogliom	E283-95	1,00	29,00	2,00	0	
Gangliogliom	E320-91	1,00	33,00	2,00	0	
Gangliogliom	E371-95	1,00	10,00	2,00	0	
Gangliogliom	E401-95	1,00	22,00	2,00	0	
Gangliogliom	E421-98	1,00	29,00	2,00	0	
Gangliogliom	E0131-05	2,00	21,00	1,00	0	
Gangliogliom	E0180-04	2,00	10,00	1,00	1	
Gangliogliom	E0180-04	2,00	10,00	1,00	0	
Gangliogliom	E0255-02	2,00	14,00	1,00	0	
Gangliogliom	E0264-04	2,00	32,00	1,00	0	
Gangliogliom	E0428-03	2,00	41,00	2,00	0	
Gangliogliom	E052-01	2,00	48,00	2,00	0	
Gangliogliom	E065-90	2,00	49,00	2,00	0	
Gangliogliom	E180-99	2,00	38,00	1,00	0	
Gangliogliom	E180-99	2,00	38,00	1,00	0	
Gangliogliom	E185-92	2,00	1,00	1,00	0	
Gangliogliom	E186-93	2,00	27,00	1,00	0	
Gangliogliom	E431-94	2,00	41,00	2,00	0	
Gangliogliom	E449-98	2,00	46,00	2,00	0	
Gangliogliom	E457-00	2,00	65,00	1,00	0	
Gangliogliom	E547-01	2,00	14,00	1,00	0	
Gangliogliom	E672-97	3,00	38,00	2,00	0	
Gangliogliom	E800-00	3,00	57,00	2,00	0	
Gangliozytom	E0249-02	1,00	15,00	1,00	0,5	
Gangliozytom	E147-98	1,00	17,00	1,00	0,5	
Gangliozytom	E153-91	1,00	24,00	1,00	0,5	
Gangliozytom	E220-92	1,00	25,00	2,00	0,5	
Gangliozytom	E371-05	1,00	28,00	1,00	0,5	
Glioblastom	E0025-05	4,00	58,00	2,00	1	

Glioblastom	E0037-05	4,00	49,00	2,00	0	
Glioblastom	E0050-05	4,00	52,00	2,00	0	
Glioblastom	E0069-05	4,00	65,00	1,00	0	
Glioblastom	E0086-05	4,00	54,00	1,00	0	
Glioblastom	E0099-04	4,00	46,00	2,00	0	
Glioblastom	E0100-05	4,00	66,00	2,00	2	
Glioblastom	E0112-05	4,00	60,00	2,00	0	
Glioblastom	E0130-05	4,00	84,00	2,00	0	
Glioblastom	E0133-05	4,00	44,00	1,00	0	
Glioblastom	E0138-05	4,00	57,00	1,00	0	
Glioblastom	E0140-05	4,00	62,00	1,00	0	
Glioblastom	E0151-05	4,00	81,00	1,00	0	
Glioblastom	E0167-05	4,00	45,00	2,00	0	
Glioblastom	E0783-04	4,00	64,00	1,00	1	
Glioblastom	E0790-04	4,00	25,00	1,00	0	
Glioblastom	E0884-04	4,00	48,00	1,00	0	
Glioblastom	E0892-04	4,00	57,00	2,00	0	
Glioblastom	E0980-04	4,00	73,00	2,00	0	
Glioblastom	E0993-04	4,00	53,00	2,00	0	
Glioblastom	E1006-04	4,00	61,00	2,00	0	
Glioblastom	E1025-04	4,00	57,00	2,00	0	
Medulloblastom	E037-02	4,00	2,00	1,00	0	
Medulloblastom	E158-05	4,00	14,00	1,00	0	
Medulloblastom	E241-02	4,00	7,00	1,00	0	
Medulloblastom	E267-03	4,00	11,00	2,00	0	
Medulloblastom	E424-04	4,00	42,00	1,00	0	
Medulloblastom	E551-03	4,00	4,00	1,00	0	
Medulloblastom	E554-02	4,00	7,00	1,00	0	
Medulloblastom	E651-02	4,00	4,00	1,00	0	
Medulloblastom	E885-03	4,00	2,00	1,00	0	
Medulloblastom	E949-02	4,00	42,00	1,00	0	
MPNST	E0289-04	3,00	26,00	2,00	0	
MPNST	E0534-04	3,00	41,00	1,00	2	
MPNST	E0607-03	3,00	39,00	2,00	1	
MPNST	E0884-03	3,00	1,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0007-04	2,00	71,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0033-03	2,00	39,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0049-04	2,00	44,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0057-05	2,00	50,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0085-03	2,00	30,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0108-03	2,00	46,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0135-03	2,00	32,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0145-04	2,00	38,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0207-03	2,00	44,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0277-03	2,00	32,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0313-03	2,00	47,00	2,00	0	

Oligodendrogliom	E0330-04	2,00	33,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0565-04	2,00	70,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0667-03	2,00	51,00	1,00	1	
Oligodendrogliom	E0675-03	2,00	46,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0795-03	2,00	26,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0847-03	2,00	44,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0878-04	2,00	48,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0891-04	2,00	48,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0934-04	2,00	54,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0941-04	2,00	36,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0009-03	3,00	64,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0073-03	3,00	33,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0421-04	3,00	57,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0614-03	3,00	66,00	1,00	1	
Oligodendrogliom	E0616-04	3,00	52,00	1,00	0	
Oligodendrogliom	E0698-04	3,00	47,00	2,00	0	
Oligodendrogliom	E0936-04	3,00	60,00	1,00	0	
PXA	E0420-02	2,00	24,00	2,00	1	
PXA	E069-92	2,00	17,00	1,00	2	
PXA	E092-93	2,00	15,00	2,00	2	
PXA	E138-91	2,00	37,00	2,00	3	
PXA	E509-95	2,00	22,00	1,00	3	
PXA	E036-98	3,00	26,00	2,00	1	
PXA	E045-97	3,00	16,00	1,00	3	
PXA	E450-98	3,00	27,00	2,00	3	
PXA	E842-04	3,00	63,00	1,00	3	
PXA	E890-04	3,00	42,00	1,00	3	
Schwannom	E0119-05	1,00	61,00	1,00	0	
Schwannom	E0136-05	1,00	33,00	1,00	0	
Schwannom	E0179-05	1,00	30,00	2,00	0	
Schwannom	E0362-04	1,00	25,00	1,00	0	
Schwannom	E0408-04	1,00	30,00	1,00	0	Schwann- Zellen positiv
Schwannom	E0413-04	1,00	50,00	1,00	0	
Schwannom	E0473-04	1,00	20,00	1,00	0	
Schwannom	E0474-04	1,00	20,00	1,00	0	positiv in retikulären Partien
Schwannom	E0487-04	1,00	63,00	2,00	0	
Schwannom	E0615-04	1,00	66,00	1,00	0	
Schwannom	E0635-04	1,00	44,00	2,00	0	
Schwannom	E0664-04	1,00	69,00	1,00	0	
Schwannom	E0697-04	1,00	70,00	1,00	0	
Schwannom	E0729-04	1,00	44,00	2,00	0	
Schwannom	E0742-04	1,00	54,00	1,00	0	
Schwannom	E0752-04	1,00	44,00	2,00	0	

Schwannom	E0754-04	1,00	66,00	1,00	0	
Schwannom	E0803-04	1,00	56,00	1,00	0	
Schwannom	E0806-04	1,00	55,00	2,00	0	
Schwannom	E0829-04	1,00	53,00	1,00	0	Neuro- fibroma in Schwannoma Neurofibrom positiv, Schwannom negativ
Schwannom	E0971-04	1,00	64,00	2,00	0	
Schwannom	E0999-04	1,00	58,00	2,00	0	
Teratom	E161-04	1	1,00	2,00	3	
Teratom	E183-04	1	0,60	2,00	2	
Teratom	E234-89	1	38,00	2,00	3	
Teratom	E634-97	1	26,00	1,00	3	
Teratom	E827-04	1	53,00	1,00	3	
Teratom	E072-98	2	51,00	2,00	0	
Teratom	E327-90	2	12,00	1,00	0	
Teratom	E443-01	2	17,00	1,00	2	
Teratom	E781-02	2	17,00	1,00	0	
Teratom	E810-03	2	0,30	2,00	1	
Teratom	E261-92	4	17,00	1,00	3	
Teratom	E392-98	4	37,00	1,00	0	Ependymom

Blocknummer: Codierung der Zuordnung der Proben

Geschlecht: 1 – männlich, 2 – weiblich

semiquantitative Auswertung: 0 – nur gefäßendotheliale Zellen sind CD34-positiv; 1 – einzelne CD34-positive Tumorzellen; 2 – Anteil der CD34-positiven Tumorzellen kleiner 50% des Tumors; 3 – Anteil der CD34-positiven Tumorzellen größer als 50% des Tumors

d) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, Übersichtstabelle:

Antikörper: Anti-Doublecortin C-18, Firma Santa Cruz Biotechnology

untersuchtes Material: gesamtes Hirntumoren-Kollektiv

Tumor	WHO-Grad	Doublecortin-Intensität	Positive Proben in %
Astrozytome	I	0,3	8,3
Astrozytome	II	2	100
Astrozytome	III	1,9	89,5
Ependymome	II	0,33	33,3
Gangliogliome	I	0,375	37,5
Gangliogliome	II	1,1	56,25
Gangliogliome	III	1,5	100
Gangliozytome	I	0,5	60
Glioblastome	IV	1,5	77,3
Medulloblastome	IV	2,4	90
MPNST	III	0,5	25
Neurofibrome	I	1,26	78,4
Oligodendrogliome	II	2,85	100
Oligodendrogliome	III	3	100
PXA	II/III	1,125	64,3
Schwannome	I	0	0
Teratome	I	1,75	81,8

e) Semiquantitative Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, Einzelauswertung:

Antikörper: Anti-Doublecortin C-18, Firma Santa Cruz Biotechnology

untersuchtes Material: gesamtes Hirntumoren-Kollektiv

Tumorentität	Blocknummer	Grading	Alter	Geschlecht	Färbeintensität	Bemerkungen
Astrozytom	E001-05	1,00	16,00	1,00	0,00	
Astrozytom	E003-04	1,00	5,00	1,00	0,00	
Astrozytom	E075-04	1,00	5,00	2,00	0,00	
Astrozytom	E160-05	1,00	19,00	2,00	0,00	
Astrozytom	E238-04	1,00	40,00	1,00	0,00	
Astrozytom	E429-04	1,00	21,00	2,00	0,00	
Astrozytom	E433-04	1,00	69,00	1,00	0,00	
Astrozytom	E586-04	1,00	35,00	2,00	2,00	
Astrozytom	E715-04	1,00	8,00	2,00	0,00	
Astrozytom	E847-04	1,00	3,00	1,00	0,00	
Astrozytom	E094-05	2,00	2,00	2,00	1,00	
Astrozytom	E128-04	2,00	34,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E234-04	2,00	36,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E339-04	2,00	56,00	1,00	1,00	
Astrozytom	E359-04	2,00	37,00	2,00	2,00	
Astrozytom	E405-04	2,00	39,00	2,00	3,00	
Astrozytom	E498-04	2,00	29,00	2,00	3,00	
Astrozytom	E677-04	2,00	33,00	1,00	2,00	
Astrozytom	E807-04	2,00	40,00	2,00	1,00	
Astrozytom	E004-04	3,00	56,00	1,00	1,00	
Astrozytom	E059-04	3,00	67,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E077-05	3,00	30,00	2,00	2,00	
Astrozytom	E155-04	3,00	49,00	1,00	2,00	
Astrozytom	E159-05	3,00	40,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E172-05	3,00	56,00	2,00	2,00	
Astrozytom	E196-04	3,00	41,00	2,00	1,00	
Astrozytom	E286-04	3,00	69,00	2,00	1,00	
Astrozytom	E438-04	3,00	58,00	2,00	0,00	
Astrozytom	E478-04	3,00	65,00	2,00	1,00	diffus
Astrozytom	E597-04	3,00	46,00	2,00	3,00	
Astrozytom	E604-04	3,00	48,00	1,00	1,00	
Astrozytom	E608-04	3,00	46,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E653-04	3,00	56,00	1,00	3,00	
Astrozytom	E657-04	3,00	49,00	2,00	3,00	
Astrozytom	E757-04	3,00	30,00	2,00	3,00	
Astrozytom	E789-04	3,00	68,00	2,00	3,00	

Ependymom	E040-04	2,00	55,00	2,00	0,00	
Ependymom	E055-04	2,00	70,00	2,00	0,00	
Ependymom	E069-04	2,00	37,00	1,00	0,00	
Ependymom	E142-05	2,00	5,00	2,00	2,00	
Ependymom	E262-04	2,00	37,00	2,00	1,00	
Ependymom	E430-04	2,00	37,00	2,00	0,00	
Ependymom	E445-05	2,00	51,00	2,00	0,00	
Ependymom	E702-04	2,00	29,00	1,00	1,00	
Ependymom	E710-04	2,00	41,00	1,00	1,00	
Ependymom	E832-04	2,00	42,00	2,00	0,00	
Ependymom	E123-05	3,00	4,00	2,00	0,00	
Ependymom	E135-04	3,00	3,00	2,00	0,00	
Gangliogliom	E013-97	1,00	18,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E116-04	1,00	61,00	2,00	1,00	
Gangliogliom	E157-00	1,00	22,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E283-95	1,00	29,00	2,00	0,00	
Gangliogliom	E320-91	1,00	33,00	2,00	1,00	
Gangliogliom	E371-95	1,00	10,00	2,00	1,00	diffus
Gangliogliom	E401-95	1,00	22,00	2,00	0,00	
Gangliogliom	E421-98	1,00	29,00	2,00	0,00	
Gangliogliom	E052-01	2,00	48,00	2,00	2,00	
Gangliogliom	E065-90	2,00	49,00	2,00	2,00	
Gangliogliom	E131-05	2,00	21,00	1,00	2,00	
Gangliogliom	E180-04	2,00	10,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E180-04	2,00	10,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E180-99	2,00	38,00	1,00	1,00	
Gangliogliom	E180-99	2,00	38,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E185-92	2,00	1,00	1,00	2,50	
Gangliogliom	E186-93	2,00	27,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E255-02	2,00	14,00	1,00	2,00	
Gangliogliom	E264-04	2,00	32,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E428-03	2,00	41,00	2,00	0,00	
Gangliogliom	E431-94	2,00	41,00	2,00	2,00	
Gangliogliom	E449-98	2,00	46,00	2,00	2,00	
Gangliogliom	E457-00	2,00	65,00	1,00	0,00	
Gangliogliom	E547-01	2,00	14,00	1,00	2,00	
Gangliogliom	E672-97	3,00	38,00	2,00	2,00	
Gangliogliom	E800-00	3,00	57,00	2,00	1,00	
Gangliozytom	E147-98	1,00	17,00	1,00	0,00	
Gangliozytom	E153-91	1,00	24,00	1,00	0,50	
Gangliozytom	E220-92	1,00	25,00	2,00	1,00	
Gangliozytom	E249-02	1,00	15,00	1,00	0,00	
Gangliozytom	E371-05	1,00	28,00	1,00	1,00	
Glioblastom	E006-04	4,00	61,00	2,00	2,00	
Glioblastom	E025-05	4,00	58,00	2,00	1,00	
Glioblastom	E037-05	4,00	49,00	2,00	3,00	

Glioblastom	E050-05	4,00	52,00	2,00	3,00	
Glioblastom	E069-05	4,00	65,00	1,00	2,00	kaum Tumor, fortsatzbezogene Färbung
Glioblastom	E086-05	4,00	54,00	1,00	1,00	
Glioblastom	E099-04	4,00	46,00	2,00	3,00	
Glioblastom	E100-05	4,00	66,00	2,00	0,00	
Glioblastom	E1025-04	4,00	57,00	2,00	1,00	
Glioblastom	E112-05	4,00	60,00	2,00	2,00	
Glioblastom	E130-05	4,00	84,00	2,00	2,00	
Glioblastom	E133-05	4,00	44,00	1,00	1,00	
Glioblastom	E138-05	4,00	57,00	1,00	0,00	
Glioblastom	E140-05	4,00	62,00	1,00	3,00	positive Pseudopallisaden
Glioblastom	E151-05	4,00	81,00	1,00	2,00	
Glioblastom	E167-05	4,00	45,00	2,00	1,00	
Glioblastom	E783-04	4,00	64,00	1,00	1,00	einzelne Zellen, z.T. fragl. ortsständig mit langen Ausläufern
Glioblastom	E790-04	4,00	25,00	1,00	3,00	Tumor randbetont
Glioblastom	E884-04	4,00	48,00	1,00	0,00	
Glioblastom	E892-04	4,00	57,00	2,00	0,00	
Glioblastom	E980-04	4,00	73,00	2,00	0,00	
Glioblastom	E993-04	4,00	53,00	2,00	2,00	
Medulloblastom	E037-02	4,00	2,00	1,00	2,00	
Medulloblastom	E158-05	4,00	14,00	1,00	0,00	
Medulloblastom	E241-02	4,00	7,00	1,00	3,00	
Medulloblastom	E267-03	4,00	11,00	2,00	3,00	
Medulloblastom	E424-04	4,00	42,00	1,00	2,00	
Medulloblastom	E551-03	4,00	4,00	1,00	3,00	
Medulloblastom	E554-02	4,00	7,00	1,00	3,00	
Medulloblastom	E651-02	4,00	4,00	1,00	2,00	
Medulloblastom	E885-03	4,00	2,00	1,00	3,00	
Medulloblastom	E949-02	4,00	42,00	1,00	3,00	
MPNST	E289-04	3,00	26,00	2,00	0,00	
MPNST	E534-04	3,00	41,00	1,00	0,00	
MPNST	E607-03	3,00	39,00	2,00	0,00	
MPNST	E884-03	3,00	1,00	2,00	2,00	
Neurofibrom	E092-94	1	3	1	2	plexiform
Neurofibrom	E123-02	1	16	1	1	fokal 1
Neurofibrom	E130-01	1	24	2	0	
Neurofibrom	E144-99	1	13	1	1	
Neurofibrom	E145-97	1	26	1	1,5	
Neurofibrom	E197-00	1	26	1	0,5	plexiform
Neurofibrom	E209-95	1	15	2	0	
Neurofibrom	E214-97	1	33	1	1	Nervenfasern?
Neurofibrom	E224-02	1	36	1	2	

Neurofibrom	E227-99	1	32	1	0	
Neurofibrom	E237-97	1	23	1	1	randbetont
Neurofibrom	E249-97	1	12	2	0,5	
Neurofibrom	E268-97	1	30	2	2	randbetont
Neurofibrom	E277-97	1	29	1	2,5	FOTO
Neurofibrom	E280-97	1	30	1	2	randbetont
Neurofibrom	E295-97	1	9	2	3	Drüsen positiv
Neurofibrom	E323-00	1	34	1	1,5	
Neurofibrom	E328-94	1	20	1	1,5	fokal 1-2
Neurofibrom	E353-01	1	50	2	1	
Neurofibrom	E394-99	1	30	1	0	
Neurofibrom	E457-99	1	41	2	1,5	
Neurofibrom	E472-99	1	14	2	0	
Neurofibrom	E487-01	1	50	1	1	
Neurofibrom	E534-96	1	11	2	2	Zellfortsatz- bezogen
Neurofibrom	E539-96	1	5	1	1	
Neurofibrom	E547-95	1	16	2	2	
Neurofibrom	E593-99	1	47	1	2	
Neurofibrom	E602-99	1	30	2	1,5	
Neurofibrom	E616-98	1	49	1	0	
Neurofibrom	E661-97	1	35	1	2	fokal 2, Pseudo- Meissner, positiv um Gefäße
Neurofibrom	E682-00	1	3	1	2	
Neurofibrom	E711-98	1	11	2	1	plexiform
Neurofibrom	E788-99	1	21	2	2	
Neurofibrom	E863-00	1	25	2	1,5	
Neurofibrom	E864-97	1	60	2	3	plexiform
Neurofibrom	E869-00	1	15	1	0	plexiform
Neurofibrom	E949- 01/16	1	59	2	0	plexiform
Oligodendrogliom	E007-04	2,00	71,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E033-03	2,00	39,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E049-04	2,00	44,00	2,00	2,00	
Oligodendrogliom	E057-05	2,00	50,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E085-03	2,00	30,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E108-03	2,00	46,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E135-03	2,00	32,00	1,00	2,00	Astrozytom?
Oligodendrogliom	E145-04	2,00	38,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E207-03	2,00	44,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E277-03	2,00	32,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E313-03	2,00	47,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E330-04	2,00	33,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E565-04	2,00	70,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E667-03	2,00	51,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E675-03	2,00	46,00	1,00	3,00	

Oligodendrogliom	E795-03	2,00	26,00	2,00	2,00	
Oligodendrogliom	E847-03	2,00	44,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E878-04	2,00	48,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E891-04	2,00	48,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E934-04	2,00	54,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E941-04	2,00	36,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E009-03	3,00	64,00	1,00	0,00	Astrozytom?
Oligodendrogliom	E073-03	3,00	33,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E421-04	3,00	57,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E614-03	3,00	66,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E616-04	3,00	52,00	1,00	3,00	
Oligodendrogliom	E698-04	3,00	47,00	2,00	3,00	
Oligodendrogliom	E936-04	3,00	60,00	1,00	3,00	
PXA	E069-92	2,00	17,00	1,00	1,00	diffus
PXA	E092-93	2,00	15,00	2,00	1,00	diffus
PXA	E138-91	2,00	37,00	2,00	3,00	
PXA	E420-02	2,00	24,00	2,00	1,00	diffus
PXA	E509-95	2,00	22,00	1,00	0,00	
PXA	E036-98	3,00	26,00	2,00	2,00	
PXA	E045-97	3,00	16,00	1,00	0,00	einzelne Zellen positiv
PXA	E450-98	3,00	27,00	2,00	0,00	
PXA	E842-04	3,00	63,00	1,00	1,00	
PXA	E890-04	3,00	42,00	1,00	1,00	
Schwannom	E119-05	1,00	61,00	1,00	0,00	
Schwannom	E136-05	1,00	33,00	1,00	0,00	
Schwannom	E179-05	1,00	30,00	2,00	0,00	
Schwannom	E362-04	1,00	25,00	1,00	0,00	
Schwannom	E408-04	1,00	30,00	1,00	0,00	
Schwannom	E413-04	1,00	50,00	1,00	0,00	
Schwannom	E473-04	1,00	20,00	1,00	1,00	plexiformes Neurofibrom: fokal einfach positiv im Bereich von Pseudo-Meißner-Körperchen; positiv in Schweißdrüsen, oberflächlich luminal; Tumor negativ
Schwannom	E474-04	1,00	20,00	1,00	0,00	
Schwannom	E487-04	1,00	63,00	2,00	0,00	
Schwannom	E615-04	1,00	66,00	1,00	0,00	
Schwannom	E635-04	1,00	44,00	2,00	0,00	
Schwannom	E664-04	1,00	69,00	1,00	0,00	
Schwannom	E697-04	1,00	70,00	1,00	0,00	
Schwannom	E729-04	1,00	44,00	2,00	0,00	
Schwannom	E742-04	1,00	54,00	1,00	0,00	

Schwannom	E752-04	1,00	44,00	2,00	0,00	
Schwannom	E754-04	1,00	66,00	1,00	0,00	
Schwannom	E803-04	1,00	56,00	1,00	0,00	
Schwannom	E806-04	1,00	55,00	2,00	0,00	
Schwannom	E829-04	1,00	53,00	1,00	1,00	Neurofibroma in Schwannoma: Neurofibrom-Anteile sind positiv, schwannomatöse Anteile negativ
Schwannom	E971-04	1,00	64,00	2,00	0,00	
Schwannom	E999-04	1,00	58,00	2,00	0,00	
Teratom	E161-04	1	1,00	2,00	2,00	
Teratom	E183-04	1	0,60	2,00	1,00	
Teratom	E234-89	1	38,00	2,00	0,00	
Teratom	E634-97	1	26,00	1,00	3,00	Anfärbung der luminalen Seite der Epithelien, gliöses Gewebe diffus positiv
Teratom	E827-04	1	53,00	1,00	2,00	Epithelien angefärbt
Teratom	E072-98	2	51,00	2,00	2,00	
Teratom	E327-90	2	12,00	1,00	0,00	
Teratom	E443-01	2	17,00	1,00	3,00	
Teratom	E781-02	2	17,00	1,00	3,00	
Teratom	E810-03	2	0,30	2,00	2,00	
Teratom	E261-92	4	17,00	1,00	3,00	Anfärbung von Drüseneithelien
Teratom	E392-98	4	37,00	1,00	0,00	Ependymom

Blocknummer: Codierung der Zuordnung der Proben

Geschlecht: 1 – männlich, 2 – weiblich

semiquantitative Auswertung: 0 – keine Doublecortin-positiven Zellen; 1 – einzelne Doublecortin-positive Tumorzellen; 2 – Anteil der Doublecortin-positiven Tumorzellen kleiner 50% des Tumors; 3 – Anteil der Doublecortin-positiven Tumorzellen größer als 50% des Tumors

f) Auswertung der Färbung mit dem Doublecortin-Antikörper, TMA:

Antikörper: Anti-Doublecortin C-18, Firma Santa Cruz Biotechnology

untersuchtes Material: TMA mit Normalgewebe

Gewebe	DCX-Positivität	Bemerkungen
Analkanal – Haut	0/8	
Analkanal – Übergangsmukosa	0/8	
Appendix – Mukosa	0/8	nur Zellen in der submukösen Schicht gefärbt (Plasmazellen?)
Appendix – Muskelschicht	0/8	
Aorta – Endothel	0/8	
Aorta – Media	0/8	
Bronchien – Glandulae bronchioles	0/8	nur Zellen des Interstitiums gefärbt (Plasmazellen?)
Bronchien – Schleimhaut	0/8	nur Zellen des Interstitiums gefärbt (Plasmazellen?)
Brustdrüse	1/8	in einer Probe positive Tubuli
Colon – Muskelschicht	0/8	
Colon descendens – Mukosa	1/8	nur Zellen in der submukösen Schicht gefärbt (Plasmazellen?)
Duodenum – Brunner Drüsen	2/8	nur Tubuli positiv, keine Acini
Duodenum – Mukosa	4/8	
Eileiter – Mukosa	8/8	
Ektocervix	0/8	
Endocervix	1/8	
Endometrium	8/8	
Fettgewebe	0/8	
Frühe Plazenta	6/8	
Frühe Plazenta – Dezidua	8/8	
Gallenblase – Epithel	5/8	
Glandula sublingualis	0/8	
Glandula submandibularis	8/8	nur Tubuli positiv, keine Acini
Glans penis – Corpus spongiosum	0/8	
Großhirn – graue Substanz	0/8	
Großhirn – weiße Substanz	0/8	
Harnblase – Muskelschicht	0/8	
Harnblase – Urothel	2/8	
Haut	0/8	
Haut – Haarfollikel und Talgdrüsen	0/8	
Herzmuskel	0/8	schwache Anfärbung der Muskelfasern

Hoden	8/8	nur Epithelien und Sperma positiv
Hypophysenhinterlappen	0/8	
Hypophysenvorderlappen	8/8	
Ileum – Mukosa	2/8	
Ileum – Muskelschicht	0/8	
Kleinhirn – graue Substanz	0/8	
Kleinhirnrinde	0/8	
Leber	8/8	
Lippe – kleine Speicheldrüsen	2/8	nur Tubuli positiv, keine Acini
Lippe – orale Mukosa	0/8	
Lunge	0/8	
Lymphknoten	8/8	diffuse schwache Anfärbung mit einigen prominenten Zellen (Plasmazellen?)
Magen – Antrum	0/8	
Magen – Corpus	8/8	
Magen – Muskelschicht	0/8	
Milz	8/8	diffuse schwache Anfärbung mit einigen prominenten Zellen (Plasmazellen?)
Mundhöhle	0/8	
Nasennebenhöhlen	0/8	nur Zellen des Interstitiums gefärbt (Plasmazellen?)
Nebenhoden	8/8	nur Epithelien und Sperma positiv
Nebenniere	8/8	
Nebenschilddrüse	8/8	
Niere – Mark	8/8	
Niere – Rinde	8/8	nur Tubuli positiv, keine Glomeruli
Nierenbecken – Muskelschicht	0/8	
Nierenbecken – Urothel	6/8	
Ösophagus – Muskelschicht	0/8	
Ösophagus – Übergangsepithel	0/8	
Ovar – Corpus luteum	6/8	
Ovar – Graaf-Follikel	6/8	
Ovar – Stroma ovarii	0/8	
Pankreas	8/8	einige Zellinseln mit stärkerer Färbung
Parotis	4/8	nur Tubuli positiv, keine Acini
Prostata	4/8	
Quergestreifte Muskulatur	0/8	
Statistische Auswertung: Zungenmuskulatur	0/8	
Reife Plazenta	8/8	

Rektum – Mukosa	0/8	nur Zellen in der submukösen Schicht gefärbt (Plasmazellen?)
Samenblase	8/8	nur Epithelien und Sperma positiv
Schilddrüse	0/8	
Thymus	0/8	
Tonsille	8/8	diffuse schwache Anfärbung mit einigen prominenten Zellen (Plasmazellen?)
Tonsille – Oberflächenepithel	0/8	
Uterus – Myometrium	0/8	