

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuronale Differenzierung in Oligodendroglomen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sönke Heide

aus Kiel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Andreas von Deimling
2. Prof. Dr. med. Iver Petersen
3. Priv.-Doz. Dr. med. Volkmar Hans

Datum der Promotion: 07.12.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	
1.1. Definition, Klassifikation, Häufigkeit	8
1.2. Klinische Merkmale	9
1.3. Bildgebung	9
1.4. Makroskopie	9
1.5. Histologie	10
1.6. Allelverlust LOH 1p/19q	11
1.7. Therapie und Prognose	11
1.8. Differentialdiagnosen	12
1.9. Immunhistochemie, neuronale Differenzierung	13
1.10. Pathogenese der Oligodendrogliome	15
1.11. Neuronale Marker	15
2. Aufgabenstellung	17
3. Material	
3.1. Geräte und Labormaterial	17
3.2. Chemikalien	19
3.3. Lösungen und Puffer	20
3.4. Antikörper, Tabelle 1: Antikörperverdünnungen	21
4. Methoden	
4.1. Tumorproben	22
4.2. Western-Blot (WB)	22
4.2.1. Proteinextraktion	22
4.2.2. Gießen der Acrylamid-Gele, Tabelle 2: Gießprotokoll	23
4.2.3. Elektrophorese, Transfer und Immundetektion	24
4.3. Immunhistochemie (IHC)	24
4.3.1. Anfertigung der Gewebeschnitte	24
4.3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung	25
4.3.3. Immunhistochemie mit dem Färbeautomat, DAKO TechMate™ 500 plus	25
5. Ergebnisse	26
5.1. Ergebnisse der Western-Blots	27
5.1.1. Auswertungskriterien	29
5.1.2. NSE	29
5.1.3. Synaptophysin	30
5.1.4. Neurofilament	30
5.1.5. GFAP	30
5.2. Ergebnisse der Immunhistochemie	31
5.2.1. Auswertungskriterien	34
5.2.2. NSE und Ncam	34
5.2.3. Synaptophysin und Neurofilament	35
a) Regelfall, repräsentativer Tumor A6	35
b) Ausnahmen, Tumore A1 und D7	35
5.3. Tabelle 3: Zusammenschau der Ergebnisse	37
5.4. Tabelle 4: Häufigkeiten der Western-Blot Expressionstypen	37

6. Diskussion	
6.1. Abweichende Ergebnisse in WB und IHC	38
6.2. Neuronale Differenzierung im WB	38
6.2.1. NSE im WB	39
6.2.2. Synaptophysin, Neurofilament und GFAP im WB	39
6.3. Immunhistochemie	40
6.3.1. NSE und Ncam in der IHC	40
6.3.2. Neuronale Differenzierung in der IHC	41
6.4. Klinik und Histologie der Tumore A1 und D7	42
6.5. Neuronal differenzierte Oligodendrogliome als Übergangsformen	44
6.6. Glioneuronale Vorläuferzellen	45
6.7. Aufdeckung des histogenetischen Ursprungs	45
7. Zusammenfassung	46
8. Literaturverzeichnis	48

Abkürzungen

A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
bFGF	“basic fibroblast growth factor”
BSA	Bovines Serum Albumin
° C	Grad Celsius
ddH ₂ O	destilliertes deionisiertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ECL™	Enzymatische Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-Ncam	“Embryonal form of neural cell adhesion molecule”
g	Gramm
GABA	“Gamma-aminobutyric-acid” (Gamma-Aminobuttersäure)
GAD	Glutamat Decarboxylase
GD	Gangliosid
GFAP	“Glial fibrillary acid protein” (saures Gliafaser-Protein)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO ₃	Salpetersäure
HP-BK	“Horseradish Peroxidase Blocking reagent”
HRP	“Horseradish Peroxidase” (Meerrettichperoxidase)
IHC	Immunhistochemie
IGF-I	“Insulin-like growth factor-I”
K	Kortex
kDa	Kilodalton
l	Liter
LOH	“Loss of heterozygosity”
M	Meningeom
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)

MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MSIP	“Microwave streptavidin immunoperoxidase protocol”
min	Minute
NaCl	Natrium-Chlorid
Ncam	“Neural cell adhesion molecule” (CD 56)
Neu-N	“Neuronal nuclei antigen” (Neuronales nukleäres Antigen)
NF	Neurofilament
NR1	“N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1”
NSE	Neuronen Spezifische Enolase
PDGF	“Platelet derived growth factor”
PCV	Procarbazin, CCNU, Vincristin
pi-cocktail	”Protease inhibitor- cocktail“
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate” (Na-Laurylsulfat)
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-TBS	“Tween®-20 in Tris Buffered Saline”
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot

1. Einleitung

1.1. Definition, Klassifikation, Häufigkeit

Oligodendrogliome sind hirneigene Neoplasien und werden zu den glialen Tumoren gezählt. Sie wachsen diffus infiltrierend und die Tumorzellen ähneln histologisch Oligodendrozyten, den markscheidenbildenden Gliazellen des Zentralnervensystems [1,2]. Der Begriff „Oligodendrogliom“ wurde von den Erstbeschreibern, Bailey und Bucy [2] allein aufgrund dieser morphologischen Ähnlichkeit geprägt.

Gemäß der WHO-Klassifikation werden Oligodendrogliome ausschließlich in niedrigmaligne Grad II-Tumore (gut differenziert) oder in Grad III-Tumore (anaplastisch) eingeteilt [1,3]. Andere Schemata, nach Smith [4] oder nach Kernohan und St. Anne-Mayo [5], unterscheiden bis zu vier Grade von niedrig- bis hochmaligne.

Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr mit einem Gipfel um das 45. Lebensjahr [6,7]. Bei unter 40-jährigen Patienten überwiegen WHO Grad II - Tumore, bei über 40-jährigen sind WHO Grad III- Tumore häufiger [8]. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen variiert von 1,5: 1 bis 2,1: 1. Männer sind also geringfügig häufiger betroffen [6,7]. Etwa 6% aller Oligodendrogliome treten im Kleinkindes- und Kindesalter auf [6].

Da auch Oligoastrozytome, Mischgliome mit einem Anteil astrozytärer Tumorzellen [9], vorkommen, ergibt sich bei der Diagnosestellung eine Unschärfe, weshalb die Häufigkeitsangaben schwanken.

Nach einer norwegischen Studie machen Oligodendrogliome weniger als 5 % aller Hirntumore aus. Andere Studien nennen Werte zwischen 8 % und 19 % [7,10]. Höhere Inzidenzen, in der Literatur finden sich Werte von bis zu 25 % aller Gliome [11], mögen auf eine gewisse Neigung zum Stellen dieser Diagnose zurückzuführen sein, die sich auf Fortschritte in der Behandlung von Oligodendrogliomen in den letzten Jahren begründet [12]. Der Anteil der anaplastischen Tumore von allen Oligodendrogliomen variiert in der Literatur zwischen Werten von 3,5 % [13], 20 % [14,15] und 50 % [1,5].

1.2. Klinische Merkmale

Oligodendrogliome entstehen vorzugsweise in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären und wachsen von dort in den Kortex [1]. Der Frontallappen ist in 50- 65 % der Fälle betroffen, die Häufigkeit nimmt von frontal über temporal und parietal nach okzipital, im Verhältnis von 3: 2: 2: 1, ab [16,17,18]. Seltenheitswert haben Lokalisationen im Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark [12].

Als besonders typisches klinisches Initialsymptom gilt der epileptische Anfall [5,8,14,18]. Das häufige Auftreten epileptischer Anfälle steht vermutlich mit der Tendenz zur Kortexinfiltration in Zusammenhang [1]. In Abhängigkeit von der Lokalisation können zudem die verschiedensten neurologischen Defizite induziert werden. Beispielsweise sind dies Sehstörungen, Paresen oder kognitive Störungen. Weitere Symptome sind Kopfschmerzen oder andere Zeichen der intrakraniellen Drucksteigerung wie Übelkeit, Erbrechen oder Vigilanzstörungen.

1.3. Bildgebung

In der Computertomographie erscheinen Oligodendrogliome in der Regel als gut abgrenzbare hypo- bis isodense Veränderungen. In der Tumorperipherie finden sich häufig hyperdense, bandartig gewundene Verkalkungsherde [12]. Die Läsionen erscheinen in der Magnetresonanztomographie in der T1-Wichtung hypointens und hyperintens in der T2-Wichtung. Meist zeigt sich nur ein gering ausgeprägtes perifokales Ödem [17].

1.4. Makroskopie

Oligodendrogliome erscheinen als weiche, bei fortgeschrittener mukoider Degeneration auch gallertartige Massen. Zum Marklager hin sind sie meist gut abgrenzbar, wohingegen der Kortex diffus infiltriert wird und aufgetrieben wirkt. Die Schnittflächen erscheinen grau bis rosafarben. Insbesondere im Tumorrandbereich und angrenzendem Kortex finden sich häufig Kalzifikationen, die im unfixierten Gewebe eine sandartige Konsistenz haben. Auch degenerative Zysten oder intratumorale Hämorrhagien können beobachtet werden. Oligodendrogliome sind in der Lage die Leptomeningen zu infiltrieren und an ihnen entlang zu wachsen [1,19].

1.5. Histologie

Normale Oligodendrozyten besitzen rundliche, chromatindichte Kerne und haben einen schmalen Zytoplasmasaum mit nur wenig Zellfortsätzen. Im Marklager liegen sie oft in Reihen zwischen den Nervenfasern und im Kortex liegen sie als Satellitenzellen in der Nähe der Neurone [2,20].

Oligodendrogliome (**Abb. 1**) sind mäßig zeldichte Tumore. Die Tumorzellen sind gut gegeneinander abgrenzbar und haben relativ isomorphe, rundliche, hyperchromatische Kerne mit gesprenkeltem Chromatin. Im Paraffinschnitt zeigt sich ein geschwollenes, klares, optisch leeres Zytoplasma. Dieses charakteristische Fixationsartefakt bewirkt das sogenannte „honigwaben- oder spiegeleiartige“ Erscheinungsbild und stellt ein wichtiges diagnostisches Kriterium dar. Das spiegeleiartige Bild ist im Gefrierschnitt nicht zu sehen und kann im schnell fixierten Gewebe fehlen. Der Tumorzellverband kann von einem astartig verzweigten, dünnwandigen kapillären Gefäßnetz durchzogen sein [1,19]. Im Kortex neigen die Tumorzellen zu perineuralen Satellitosen und bilden perivaskuläre oder subpiaie Ansammlungen. Mitosen sind selten oder fehlen ganz. Der Proliferationsindex MIB-1 (Ki-67) liegt gewöhnlich unter 5 %. Allerdings ist eine erhöhte Proliferation auch noch mit der Diagnose eines WHO Grad II Oligodendroglioms vereinbar. Als Zeichen regressiver Veränderungen finden sich neben Blutungen und Zystenbildungen typischerweise Mikroverkalkungen [2,3,19].

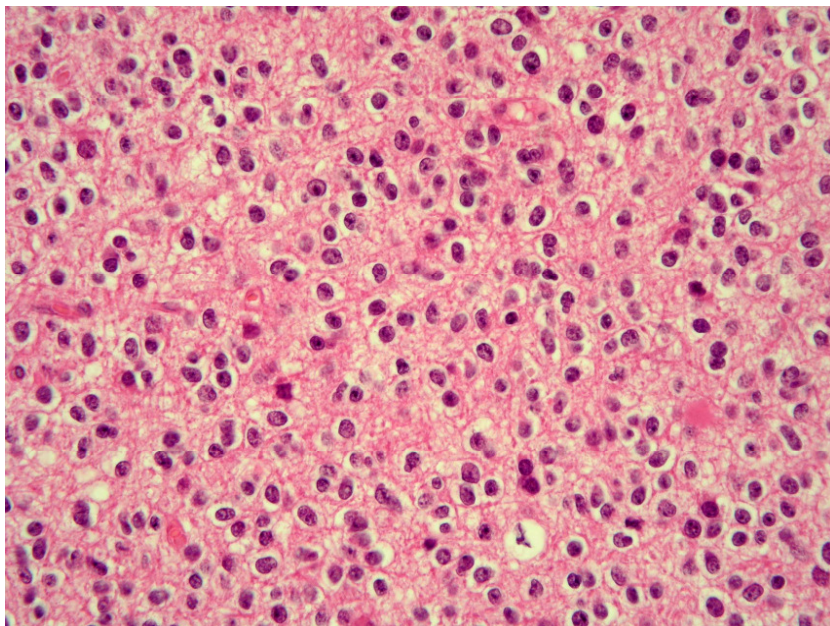


Abb. 1: Oligodendrogliom, HE-Färbung

Zur Diagnose eines anaplastischen Oligodendroglioms WHO-Grad III führen Kennzeichen erhöhter Malignität [1,19], wie: Vermehrte Zelldichte, Zell- oder Kernatypien, gesteigerte mitotische Aktivität, Vorkommen pleomorpher oder neoplastischer Zellen wie gliofibrilläre Oligodendrozyten oder Minigemistozyten, mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen. Nekrosen kommen nur in anaplastischen Oligodendrogliomen vor.

1.6. Allelverlust LOH 1p/19q

Molekulargenetisch weisen bis zu 90 % der WHO Grad II- Oligodendrogliome Allelverluste auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (1p) und dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q) auf [21,22,23,24,25]. Diese kombinierte 1p- und 19q- Deletion wird im weiteren Verlauf als „loss of heterozygosity 1p/19q“ oder abgekürzt „LOH 1p/19q“ bezeichnet. Der Verlust der auf diesen Chromosomenabschnitten befindlichen Tumorsuppressor-Genen wurde im Zusammenhang mit der malignen Zelltransformation gesehen [25,26,27]. Unter den WHO- Grad III Tumoren ist diese Deletion etwas weniger häufig. Diese Tumore weisen vielfältigere genetische Veränderungen auf [28]. Unter klinischen und prognostischen Gesichtspunkten stellt der LOH 1p/19q die bekannteste und bedeutsamste genetische Aberration dar. Oligodendrogliome mit nachgewiesenem LOH 1p/19q sind besonders sensibel für eine PCV- Chemotherapie [29,30,31]. Allerdings sind diese auch besonders strahlensensibel und haben per se eine bessere Prognose als Tumore ohne LOH [32,33].

Kürzlich fanden Jenkins et al. [34] heraus, dass dem kombinierten LOH 1p/19q eine Translokation des kurzen Arms von Chromosom 19 (19p) an den langen Arm von Chromosom 1 (1q) unter Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und des langen Arms von Chromosom 19 (19q) zugrunde liegt.

1.7. Therapie und Prognose

Die Prognose ist in erster Linie abhängig von der Dignität des Tumors, desweiteren von seiner Lage und vom Ausmaß der Resektion. Wenn es die Lokalisation erlaubt, wird die Totalresektion angestrebt. Diese führt bei einem erhöhten intrakraniellen Druck zur Entlastung und ermöglicht in der Regel eine zuverlässige histologische und

molekulargenetische Diagnostik. Bei den niedriggradigen Tumoren (WHO Grad II) korreliert der Therapieerfolg in den meisten Fällen mit dem Ausmaß der Resektion. Eine adjuvante Therapie ist bei ihnen in der Regel nicht indiziert.

Adjuvante Maßnahmen kommen erst bei Progression (Rezidivbildung) oder bei anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO Grad III) in Betracht. Im allgemeinen rezidivieren Oligodendrogliome lokal. Progression niedrigmaligner Tumore in anaplastische Formen kommt zwar vor, ist jedoch seltener als bei Astrozytomen [1].

Bei jüngeren Patienten wird meist der PCV-Chemotherapie der Vorzug gegenüber einer Strahlentherapie gegeben. Die alleinige Behandlung mit einer PCV-Chemotherapie konnte die progressionsfreie Zeit bei WHO Grad III- Oligodendrogliomen um bis zu 25 Monate verlängern [31,37]. Die strahlentherapeutische Behandlung von Oligodendrogliomen wird kontrovers diskutiert. Befürworter erkennen einen klaren Nutzen [38], Gegner fanden keine Verlängerung der Überlebenszeit [39].

Mit der Therapieoptimierung von neu diagnostizierten anaplastischen Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen (WHO Grad III) befasste sich auch die EORTC 26951- Studie (EORTC= European Organisation for Research and Treatment of Cancer) [33]. Sie verglich die alleinige adjuvante Strahlentherapie mit der adjuvanten Strahlentherapie und nachfolgender PCV-Chemotherapie. Es wurde gezeigt, dass die adjuvante Strahlentherapie mit PCV-Chemotherapie zwar die progressionsfreie Zeit, aber nicht die mittlere Überlebenszeit verlängert [33].

In Abhängigkeit der jeweiligen Einschlusskriterien finden sich in der Literatur recht unterschiedliche Aussagen bezüglich der Prognose. Die mittlere postoperative Überlebenszeit bei allen Oligodendrogliome ohne Berücksichtigung des histologischen Tumorgrades beträgt zwischen 3 bis 5 Jahren [6,8,15,35]. Für WHO Grad II- Oligodendrogliome wurde eine mittlere postoperative Überlebenszeit von 4,4 Jahren angegeben. Die 5- bzw. 10- Jahres- Überlebensrate beträgt 38 % bzw. 19% [36].

1.8. Differentialdiagnosen

Bei den **nicht-neuroektodermalen Tumoren**, wie dem klarzelligen Nierenzellkarzinom oder dem seltenen klarzelligen Meningeom gelingt die differentialdiagnostische Abgrenzung in der Regel relativ problemlos durch den Einsatz zytokeratinspezifischer beziehungsweise vimentinspezifischer Antikörper.

Oligoastrozytome bedürfen bei differentialdiagnostischen Überlegungen besonderer Berücksichtigung. Als Oligoastrozytom werden Tumore bezeichnet, die neben den klassischen Oligodendrogliomzellen auch eine eindeutig astrozytäre Tumorzellpopulation aufweisen [9,39]. Für die Diagnosestellung gibt es unterschiedliche Empfehlungen, die sich nach dem Anteil der astrozytären Zellen richtet, die Grenzwerte reichen von 1 % [41] und 25 % [42] bis 50 % [40]. Morphologisch können zwei Grundtypen von Oligoastrozytomen unterschieden werden. Bei dem biphasischen Typ liegen beide Zellarten in voneinander abgegrenzten Zellkompartimenten vor. Bei dem diffusen Typ findet sich eine Durchmischung der Tumorzellen einschließlich ihrer Übergangsformen, die zwischen oligodendrogliomartiger und astrozytomartiger Erscheinung variieren [40]. Darüberhinaus ist die Unterscheidung astrozytärer und oligodendrogliomaler Tumorzellen anhand der GFAP-Expression mitunter erschwert, da neben den im Tumorgewebe liegenden reaktiven Astrozyten auch gliofibrilläre Oligodendrozyten und sogenannte Minigemistozyten GFAP exprimieren [43,44]. Besondere Aufmerksamkeit erfordern oligoastrozytäre Mischgliome im Zusammenhang mit stereotaktischen Biopsien, da die entnommenen Gewebeproben nicht unbedingt den gesamten Tumor repräsentieren.

Ein anderer **glialer Tumor** von differentialdiagnostischer Bedeutung ist das klarzellige Ependymom. Bei den **neuronalen Tumoren** sind insbesondere das zentrale Neurozytom und der dysembryoplastische neuroepitheliale Tumor (DNT) von Bedeutung. Diese Tumoren präsentieren sich wie Oligodendrogliome mit gleichförmigen, rundlichen Kernen und klaren, optisch leeren Zytoplasmata. Derartig erscheinende Zellen werden gelegentlich unter dem Begriff „oligodendroglial-like cells“ zusammengefasst. Das typische morphologische Bild ist also nicht allein kennzeichnend für Oligodendrogliome, sondern kann auch von anderen Tumorentitäten imitiert werden. Eine sichere Unterscheidung der genannten Tumorzellen kann manchmal nur mit immunhistochemischen oder elektronenmikroskopischen Zusatzuntersuchungen erfolgen [45, 46].

1.9. Immunhistochemie, neuronale Differenzierung

Bisher sind keine Proteine bekannt, die als verlässliche diagnostische Oligodendrogliom-Marker herangezogen werden könnten. Nur unregelmäßig

exprimieren die Tumorzellen Proteine, die als Marker für ausgereifte oder in Entwicklung befindliche Oligodendrozyten anerkannt sind. Oligodendrogliome können keine Markscheiden bilden und auch die Expression myelinassoziierter Proteine variiert in verschiedenen Studien sehr. Dies gilt beispielsweise für Basisches Myelin Protein (MBP) [47,48] oder Myelinassoziertes Glycoprotein (MAG) [49]. Auch das Enzym Karboanhydrase C gilt nicht als verwertbarer Marker [49]. Wie die meisten anderen neuroektodermalen Tumore exprimieren Oligodendrogliome das Protein S-100.

Immunhistochemisch können neuronale Marker, insbesondere zur Unterscheidung zwischen zentralen Neurozytomen und Oligodendrogliomen hilfreich sein. Jedoch darf eine Neuropil vermittelte Antikörperbindung, innerhalb eines in der weißen Substanz diffus infiltrierenden Oligodendroglioms, nicht mit einer echten Expression neuronaler Proteine durch neoplastische Zellen verwechselt werden.

Darüberhinaus wurde mehrfach nachgewiesen, dass auch bei typischen Oligodendrogliomen eine fokale Bindung von Antikörpern gegen ganz verschiedene neuronale Proteine vorkommen kann, wobei die Ursache dafür nicht bekannt ist:

Dehghani et al. [39] untersuchten über 80 Oligodendrogliome und fanden eine Expression von NSE und Synaptophysin in 28% beziehungsweise 18% der Fälle. Wolf et al. [50] zeigten, daß von 25 Oligodendrogliomen 8% Glutamat-Decarboxylase (GAD), 4% die α_1 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (GABAR), 52% die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Untereinheit 1 (NR1) und 60% embryonales Ncam (=E-Ncam) exprimieren. Wharton et al. [51] untersuchten 32 Oligodendrogliome; sie beobachteten eine Expression von Synaptophysin bei 6% und von nicht-phosphoryliertem Neurofilament bei 31% der Tumore. Perry et al. [52] berichten über 4 Oligodendrogliome die verschiedentlich mit Antikörpern gegen NSE, Synaptophysin und Neu-N reagierten.

Die Beobachtung, dass einige Oligodendrogliome neuronale Proteine exprimieren, ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung:

Zum einen erscheint es grundsätzlich möglich, sich diese Eigenschaft bei der Beantwortung differentialdiagnostischer Fragestellungen nutzbar machen zu können. Zum anderen könnten sich aus einem näheren Verständnis über das Zustandekommen dieser Eigenschaft Hinweise ergeben, die dazu beitragen, den pathogenetischen Ursprung von Oligodendrogliomen weiter aufzudecken.

1.10. Pathogenese

Die Pathogenese der Oligodendrogliome ist bislang nicht sicher geklärt. Die Ähnlichkeit mit Oligodendrozyten führte zur Annahme einer zytologischen Verwandtschaft und Oligodendrogliome wurden als Resultate einer abnormen Teilungsaktivität von Oligodendrozyten verstanden. Die Entstehung der Oligodendrogliome aus reifen Oligodendrozyten ist jedoch nicht beweisbar. Überdies sind auch keine anderen Tumore bekannt, die sich auf Oligodendrozyten zurückführen ließen.

Vieles weist darauf hin, daß Oligodendrogliome aus bestimmten glialen Vorläuferzellen entstehen, die über das Potential verfügen, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Es wurde festgestellt, dass Oligodendrogliome Proteine exprimieren, die als Marker von Vorläuferzellen von Oligodendrozyten gelten, beispielsweise das Gangliosid A2B5 oder das Proteoglycan NG2 [53,54].

Die Identifikation unterschiedlicher Vorläuferzellen erfolgt in erster Linie mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die an stadiumspezifische Oberflächenmarker binden. Als eine frühe Vorläuferzelle von Oligodendrozyten gilt die sogenannte „GD3+“ - Zelle, die an ihrer Oberfläche das Gangliosid GD3 exprimiert. „GD3+“ - Zellen, von Zellen aus dem Sehnerv der Ratte, erweisen sich in der Zellkultur als bipotent. Das heißt, sie können sich in entweder in Oligodendrozyten (= O) oder in Typ 2-Astrozyten (= 2A) entwickeln, wobei die Entwicklungsrichtung von den umgebenden Bedingungen abhängig ist. Aufgrund dieser Fähigkeit wurde dieser Zelltyp auch O-2A-Progenitor-Zelle genannt [55,56]. Ein entsprechender, zudem A2B5 exprimierender Zelltyp wurde auch beim Menschen nachgewiesen [57]. Es ist vorstellbar, dass maligne transformierte O-2A-Vorläuferzellen der Ursprung von Oligodendrogliomen, Astrozytomen und auch Oligoastrozytomen sind. In Oligoastrozytomen widerspiegelt sich gewissermaßen die bipotente Veranlagung der O-2A-Vorläuferzellen.

1.11. Neuronale Marker

Die oben genannten Studien über neuronal differenzierte Oligodendrogliome [39,50,51,52] unterscheiden sich in Hinblick auf ihre Fragestellungen und Intentionen. Daraus resultierten einige methodische Unterschiede, so dass die Ergebnisse nicht in allen Punkten vergleichbar sind. Außerdem wurde teilweise die Expression sehr

spezieller und wenig geläufiger neuronaler Marker untersucht. Als geläufige neuronale Marker gelten folgende Proteine:

Neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein dimeres glycolytisches Isoenzym, welches sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Zellen neuronalen und neuroendokrinen Ursprungs vorkommt. Auch wenn NSE kein exklusiver neuronaler Marker ist, kann es zur Identifikation neuronaler, neuroendokriner Tumoren und peripheren Nerven genutzt werden [58].

Synaptophysin ist ein Protein der präsynaptischen Vesikelmembran und wird in fast allen neuronalen Zellen exprimiert. Es wird als verlässlicher Marker für neuronale und neuroendokrine Neoplasien angesehen [59,60].

Neurofilament gehört zu den Strukturproteinen und ist an der Gestaltbildung der Nervenzelle beteiligt. Es ist ein Intermediärfilament und kommt in sehr hohen Konzentrationen im Axon vor [61]. Das Protein besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten mit einer Größe von 70, 160 und 200 kDa. Der in der vorliegenden Studie verwendete Antikörper reagiert mit der phosphorylierten Form der 70 kDa Untereinheit des Proteins.

Ncam (CD-56) ist ein membranständiges neuronales Protein, welches als Molekül wesentlich am Zustandekommen von Zellverbindungen beteiligt ist und die Adhäsion von Nervenzellen ermöglicht [62].

2. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie soll eine Gruppe von Oligodendroglomen mit Hilfe von Western-Blots und Immunhistologie auf die Expression neuronaler Proteinen untersucht werden. Gelingen soll der Nachweis einer neuronalen Differenzierung mit Hilfe von Antikörpern, die auch in der Routinediagnostik regelmäßig eingesetzt werden, nämlich Neuronenspezifische Enolase (=NSE), Synaptophysin und Neurofilament. Zusätzlich soll auch die GFAP-Expression untersucht werden, um zu erfahren, wie sich diese zu einer etwaigen neuronalen Differenzierung verhält. In der Immunhistochemie soll auch ein Antikörper gegen Ncam eingesetzt werden.

Im wesentlichen sollen bei der Untersuchung zwei Fragen beantwortet werden:

Wieviele der untersuchten Oligodendroglome zeigen eine echte neuronale Differenzierung ?

Stellen diese neuronal differenzierten Oligodendroglome eine eigenständige Gruppe bezüglich ihres biologischen Verhaltens dar ?

3. Material

3.1. Geräte und Labormaterial

Deckgläser	Menzel (Braunschweig)
Digital-Camera	C-5050 Zoom, Olympus (Hamburg)
Elektrophorese Kammer	“Mini Trans-Blott Cell“, Bio-Rad (München)
Eppendorf-Hütchen	“Safe-Lock Tubes“ (2ml), Eppendorf (Hamburg)
Faltenfilter	Machery-Nagel (Düren)
Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Gel-Gießgestell	“Casting Stand“, Bio-Rad (München)
Gel-Kämme	“combs“, Bio-Rad (München)
Glasplatten	“Outer“ 3/1mm, Bio-Rad (München)
	“Short“ 5, Mini PROTEAN 3, Bio-Rad (München)

Heizblock	SHT 100D, Bibby Stuart Scientific (Stone, GB)
Immunfärbeautomat	“Techmate™ 500 plus”, DAKO (Hamburg)
Kryo-Röhrchen	Cryovial 4 ml, Roth (Karlsruhe)
Kryostat	HM 560, MICROM (Walldorf)
Laborwaage	SBC 33, SCALTEC (Heiligenstadt)
Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark (USA)
Löffel und Spatel	Aesculap (Tuttlingen)
Magnetrührer	L32, LABINCO (Merseburg)
Mikrotom	HM 335, MICROM (Walldorf)
Mörser und Pistill	
Objektträger	“Capillary Gap Microscope Slides”, ChemMate™, DAKO (Hamburg) SuperFrost® Plus, Langenbrinck (Emmerdingen) SuperFrost® Color, MENZEL (Braunschweig)
pH-Meter	HI 9321, Hanna Innit (Kehl)
Photometer-Küvetten	“Cuvettes“, Sarstedt (Nümbrecht)
Pinzetten	Aesculap (Tuttlingen)
Pipettierhilfe	accu-jet®, BRAND (Wertheim)
Pipetten	P10, 20, 100, 200, 1000 Gilson (Bad Camberg) 0,5-10 µl, 5- 40 µl, 40-200 µl, Finnpipette®, Labsystems (Finnland) 5 ml, 10 ml, 25 ml serologisch, Falcon®, BD (USA) Einmal-Pasteurpipetten, Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Gilson (Bad Camberg)
Röntgenfilm	Lumi-Film “Chemoluminescent Detection Film”, Roche (Mannheim)
Röntgenfilm-Cassette	Cronex®, DuPont (Wilmington)
Röntgenfilmentwickler	45 compact, Protec (Oberstenfeld)
Schüttler	SM-30, Edmund Bühler (Hechingen)
Spannungsgerät	2x EPS 3501, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Stereomikroskop	Leica / Leitz DMRB (Bensheim) BX 50 F mit Fotoaufsatz, Olympus (Hamburg)

Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus (Hanau)
Ultraschall-Wasserbad	SONOREX RK31, Bandelin (Berlin)
UV Spectrophotometer	Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech (Freiburg)
Videobank mit Drucker	“Gel-Jet-Imager“, INTAS (Göttingen)
Vortexer	REAX top, Heidolph (Kelheim)

3.2. Chemikalien

Aceton	Merck (Darmstadt)
Antioxidant	Invitrogen (Leek, Niederlande)
BSA	Sigma (Deisenhofen)
Citronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
ChemMate™ System Kit	Peroxidase/DAB, DAKO (Hamburg)
Deoxycholat	USB (Bad Homburg)
ECL™	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Einbettmedium (Gefrierschnitt)	Jung, Leica (Nussloch)
Einschlussmittel	Vitro-Clud®, Langenbrinck (Emmerdingen)
Eosin	Chroma (Münster)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt)
HCl	Merck (Darmstadt)
Iso-Pentan	Sigma-Aldrich (Seelze)
LDS Sample Buffer (4x)	NUPAGE®, Invitrogen (Leek, Niederlande)
Marker Protein	“BenchMark™ prestained protein ladder“, Invitrogen (Leek, Niederlande)
	MagicMark™ Western Standard, Invitrogen (Leek, Niederlande)
	“Biotinylated SDS Molecular Weight Standard Mixtures“, Sigma (Deisenhofen)
Methanol	Sigma (Deisenhofen)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Nitrozellulose-Membran	Trans-Blot®, Bio-Rad (München)

Nonidet P-40	Boehringer (Mannheim)
Pi-cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Ponceau Rot	Merck (Darmstadt)
Sample Reducing Agent (10x)	NUPAGE®, Invitrogen (Leek, Niederlande)
SDS	Sigma (Deisenhofen)
Stickstoff	Linde Gas (Berlin)
Temed	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Trizma® Base, Sigma (Deisenhofen)
Tween®-20	Bio-Rad (München)
Xylol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

3.3. Lösungen und Puffer

30% Acrylamid/bis	(37, 5:1) 29,2 g Acrylamid + 0,8 g N,N'-bis-methylen-acrylamid, ad 100ml dH ₂ O
Blocking-Puffer	5 mg Milchpulver ad 100 ml T-TBS 0,5%
Citratpuffer	2,1 g Citronensäure-Monohydrat, pH 6 ad 1000 ml dH ₂ O
Ethanol, X%	X ml C ₂ H ₅ OH ad 100 ml ddH ₂ O.
Lysis-Puffer	0,315 g Tris HCl + 0,350 g NaCl + 0,4 g Nonidet P40 + Deoxycholat 0,2 g ad 40 ml ddH ₂ O, dazu 2 ml pi-cocktail
pi-cocktail	1 pi-Tablette in 2 ml ddH ₂ O
Lauf-Puffer	3,02 g Tris Base + 14,2 g Glycin + 1 g SDS, pH 8,3 ad 1000 ml dH ₂ O
SDS 10%	10 g SDS, ad 100 ml ddH ₂ O
Transfer-Puffer	3,0 g Tris Base + 14,3 Glycin + 200 ml Methanol, pH 8,3 ad 1000 ml dH ₂ O
TBS-Stammlösung (10x)	80g NaCl + 12,1 g Tris Base, pH 7,3 ad ddH ₂ O 1000 ml
Tris-HCL 1.5 M, pH 8,8	18,15 g Tris Base + 60 ml ddH ₂ O, pH-Einstellung mit HCl, ad 100 ml ddH ₂ O
Tris-HCL 0.5 M, pH 6,8	6 g Tris Base + 60 ml ddH ₂ O,

pH-Einstellung mit HCl ad 100 ml ddH₂O

T-TBS 0,5% (Wasch-Puffer) 500 µl Tween®-20 ad 1000 ml TBS

3.4. Antikörper

Primär- Antikörper

Anti- β-Actin	Sigma (Deisenhofen, A 5316 , LOT 22638B)
Anti- GFAP	DAKO (Hamburg, Z 0334, LOT 096(302))
Anti- Ncam (Anti-CD 56)	Serotec (Düsseldorf, MCA 591, LOT 211105)
Anti- Neurofilament	DAKO (Hamburg, M 0762, LOT 18100)
Anti- Neuronen Spezifische Enolase	DAKO (Hamburg, M 0873, LOT 17040)
Anti- Synaptophysin	DAKO (Hamburg, A 0010, LOT 25454)

Sekundär- Antikörper

Anti- Maus IgG-peroxidase	Amersham Biosciences (Freiburg, NA 931, LOT 332253)
Anti- Maus/ Kaninchen Gemisch	ChemMate™ System Kit, DAKO (Hamburg, K5001, LOT 22638B)

Tab. 1: Antikörper-Verdünnungen

1. Antikörper	Größe	Verdünnung		Vorbehandlung
	kDa	WB	IHC	
Anti- β-Actin	42	1: 6000	-	-
Anti- Synaptophysin	38	1: 1000	1: 100	-
Anti- Neurofilament	70/140/200	1: 500	1: 500	-
Anti- NSE	46	1: 1000	1: 500	Mikrowelle
Anti- GFAP	49	1: 500	-	-
Anti- Ncam	120,140,180	-	1: 200	Mikrowelle
2. Antikörper				
Anti- Maus	-	1: 2000	-	-
Anti- Maus/ Kaninchen	-	-	Kit (7 Tropfen)	-

4. Methoden

4.1. Tumorproben

Die untersuchten Oligodendrogliome stammten aus der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Charité. Die Proben wurden unmittelbar nach der neurochirurgischen Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei minus 80°Celsius in Kühltruhen gefrierarchiviert. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch Anteile normalen Hirngewebes wurden alle Gewebe am Gefrierschnitt kontrolliert, um ungeeignete Gewebeproben auszusortieren.

Die Gewebeschnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden aus den zugehörigen Paraffinblöcken und zum Teil aus dem Gefriermaterial gefertigt.

4.2. Western-Blot (WB)

4.2.1. Proteinextraktion

Zur Untersuchung im Western-Blot wurden aus 28 Oligodendrogliomen Proteine extrahiert. Desweiteren wurden für die Kontrollen Proteine aus Kortex und Meningeomen extrahiert.

Es wurde ein Proteinextraktionsprotokoll für Total-Lysate verwendet, das geeignet ist, Proteine aus sämtlichen Zellkompartimenten zu extrahieren. Zur Erhöhung der Proteinausbeute sieht dieses eine fraktionierte Extraktion mit zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten vor. Die Extraktion der Proteine aus den tiefgefrorenen Gewebeproben erfolgte unter Verwendung flüssigen Stickstoffs. Alle Hilfsmittel wurden vorgekühlt, um eine optimale Verarbeitung ohne Antauen des Gewebes zu gewährleisten. Die Tumorproben wurden in Mörsern zu Pulver zermahlen und 0,2 ml des Pulvers mit 2 ml Lysis-Puffer in 2 ml Eppendorf-Hütchen überführt. Die Proben wurden zur Homogenisierung mit Hilfe eines Vortexers geschüttelt, für 2 Minuten einem Ultraschall-Bad ausgesetzt und nochmals geschüttelt. Nach Zentrifugation (4°C, 10 Minuten, 10.000 G) wurde der Überstand abpipettiert und in auf Eis gelagerte Kryo-Röhrchen gefüllt. Das Pellet wurde mit 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert, wieder homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und in die Kryo-Röhrchen gefüllt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 µl Proteinlysat in 1,5 ml ddH₂O / Protein-assay-Gemisch (4:1) gegeben, mit Hilfe eines Vortexers geschüttelt und 15 Minuten stehen gelassen. 1 ml dieser Lösung wurde in Küvetten gefüllt und im Spectrophotometer im Absorptionsmodus bei einer Wellenlänge von 595 nm durchleuchtet. Anhand einer Eichkurve, die zuvor unter Verwendung einer Verdünnungsreihe mit BSA-Proteinlösungen erstellt wurde, wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

Da sich Bandenintensitäten im Western-Blot nur vergleichen lassen, wenn die zu vergleichenden Proben eine nahezu gleichgroße Menge an Protein enthalten, erfolgten zu Beginn Kontrollblots mit Antikörpern gegen das intrazelluläre, ubiquitäre Zytoskelett-Protein β-Actin.

4.2.2. Gießen der Acrylamid-Gele

Durch Zusammensetzen der mit gewöhnlicher Flüssigseife (Lifosan® soft) und 70%-igem Ethanol gereinigten Glasplatten entstanden die Gel-Kassetten, die in die Gel-Gießgestelle eingespannt wurden. Das Trenn-Gel wurde angesetzt (**Tab. 1**) und in eine Gel-Cassette bis zur Oberkante einer Klebebandmarkierung gegossen und mit dH₂O überlegt. Nach 45 min Polymerisationsdauer wurde das dH₂O abgegossen und das zubereitete Sammel-Gel (**Tab. 1**) über das fertige Trenn-Gel in die Cassette gefüllt. In das noch flüssige Sammel-Gel wurde zur Ausformung der Ladetaschen ein Gel-Kamm mit 10 Zähnen geschoben. Nach weiteren 30-45 min Polymerisation waren die Gele gebrauchsfertig.

Tab. 2: Gieß-Protokoll für WB-Gele

	Sammel-Gel	Trenn-Gel		
	4%	7,5%	12%	X%
30% Acrylamid	1,32 ml	2,5 ml	4,0 ml	0,33x X ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,52 ml	-	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
ddH ₂ O	6 ml	4,85 ml	3,35 ml	7,35 -(0,33x X) ml
TEMED	10 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

4.2.3. Elektrophorese, Transfer und Immundetektion

Die Proteinproben (Protein + 8µl Sample Buffer (4x) + 1µl Reducing Agent (10x) + dH₂O) wurden 10 Minuten bei 70°C denaturiert und in das zuvor gegossene für die Proteingröße adäquate Acrylamidgel (Tabelle 1) geladen.

Tabelle 2: Acrylamidanteil und Transferzeit sind abhängig von der Proteingröße

Protein	<60 kDa	12% Acrylamidgel	60 min Transfer
Protein	60 -140 kDa	10% Acrylamidgel	75 min Transfer
Protein	>140 kDa	7,5% Acrylamidgel	90 min Transfer

Die Elektrophorese wurde mit 100-115 mA pro Gel, 200 V und 100 W für 50 Minuten in Lauf-Puffer durchgeführt. Die Proteine wurden mit 170 mA, 35 V und 100 W in dH₂O + 500 µl Antioxidant in der inneren Kammer und Transfer-Puffer in der äußeren Kammer auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Der Transfererfolg wurde mit Ponceau-Rot geprüft.

Die Membrane wurde in dH₂O und T-TBS 0,5% gewaschen und 60 Minuten in Milchpulver-Pufferlösung blockiert. Danach wurden die Membrane mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und dann mit T-TBS 0,5% gewaschen. Alle Waschschrte wurden in T-TBS 0,5% (3x kurz, 2x10 Minuten) vollzogen. Die Membrane wurden mit dem zweiten Antikörper für 60 Minuten inkubiert und gewaschen. Wenn notwendig erfolgte ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit Extravidin. Zur Visualisierung wurde das ECL™-System (Amersham, Best.Nr.: RPN2106V1 und RPN2106V2) benutzt.

4.3. Immunhistochemie (IHC)

4.3.1. Anfertigung der Gewebeschnitte

Das Gewebe wurde am Mikrotom geschnitten und auf die Objektträger gezogen. Die Schnittstärke betrug 2-3 µm bei in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe und 4-6 µm bei gefrorenem Gewebe.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte erfolgte durch Erhitzen in einem Ofen bei 60°C für 60 min und Tauchen der Schnitte in Xylol (2x 10 Minuten), durch eine absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 96%, 80%, 70%) und in dH₂O.

4.3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die HE-Färbungen wurden nach folgendem Ablauf gefertigt: 5 min. färben in Hämatoxylin, spülen in dH₂O, differenzieren in 1%-iger HCl-Lösung, 5 min. bläuen unter fließendem Leitungswasser, 30 sec. färben in Eosin, entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 2x 100%), 2- 3x eintauchen in Xylol, Eindeckeln.

4.3.3. Immunhistochemie mit dem Färbeautomat, DAKO TechMate™ 500 plus

Zur Steigerung der Antigenität wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung für 2x 5 min mit Citratpuffer (pH 6) in einer Mikrowelle bei 800 W inkubiert.

Nach 20 Minuten Abkühlung wurden je zwei Schnitte beziehungsweise ein Schnitt und ein leerer Objektträger als Dummy mit dem Gewebe nach innen zu einem Paar aneinandergelegt und in senkrechter Position in dH₂O in die vorgesehene Haltevorrichtung des DAKO-Färbeautomaten eingelegt. Dann wurde mit dem entsprechenden Färbeprogramm (microwave streptavidin immunoperoxidase protocol = MSIP) begonnen, wobei das Dako ChemMate™ System Kit Peroxidase/DAB benutzt wurde. Es wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Synaptophysin, Neurofilament, Neuronen Spezifische Enolase und Ncam angefertigt.

Dako ChemMate™ Products:

- BUF1: Puffer 1, 20ml
- BUF2: Puffer 2, 20ml
- BUF3: Puffer 3, 20 ml
- dH₂O: "Waschwasser", 20 ml
- AB1: 1. Antikörper, 350 µl
- AB2: 2. Antikörper, 350 µl
- HP BK: Peroxidase blocking reagenz, 750 µl
- HRP: Streptavidin peroxidase, 350 µl
- CHROM: Chromogen substrate, 750 µl
- HEMA: Hämatoxylin, 350 µl

Tafel für Protokoll (MSIP)

BUF 1	BUF 2	BUF 3	dH ₂ O
PAD1	PAD2	PAD3	PAD4
	HP Block	CHROM	HEMA
	AB1	AB2	HRP

5. Ergebnisse

Es wurden 28 Oligodendrogliome, von 16 Männer und 12 Frauen, untersucht. Davon lagen 18 Tumoren frontal, 3 fronto-parietal, 1 fronto-temporal, 3 temporal, 2 temporo-occipital und 1 ponto-mesencephal.

Darunter befanden sich 11 WHO Grad II und 17 WHO Grad III Oligodendrogliome. Einen LOH 1p/19q wiesen 23 Oligodendrogliome auf, 5 waren ohne LOH. Es kamen 6 Rezidive, 1 Zweitrezidiv und 1 Drittrezidiv vor. Die Patienten waren zwischen 33 und 74 (Mittelwert= 50,1) Jahre alt.

5.1. Ergebnisse der Western-Blots

Für die Darstellung (**Abb. 2 und 3**) wurden Gele mit 10 Taschen verwendet. Auf jedem Gel wurden Protein-Marker, Positivkontrolle (Kortex) und Negativkontrolle (Meningeom) und 7 Oligodendrogliom-Extrakte aufgetragen. Die 28 Tumorproben wurden auf Sets von je 4 Gelen (A, B, C, D) aufgetragen. Für die gesamte Darstellung waren 20 Western-Blots erforderlich.

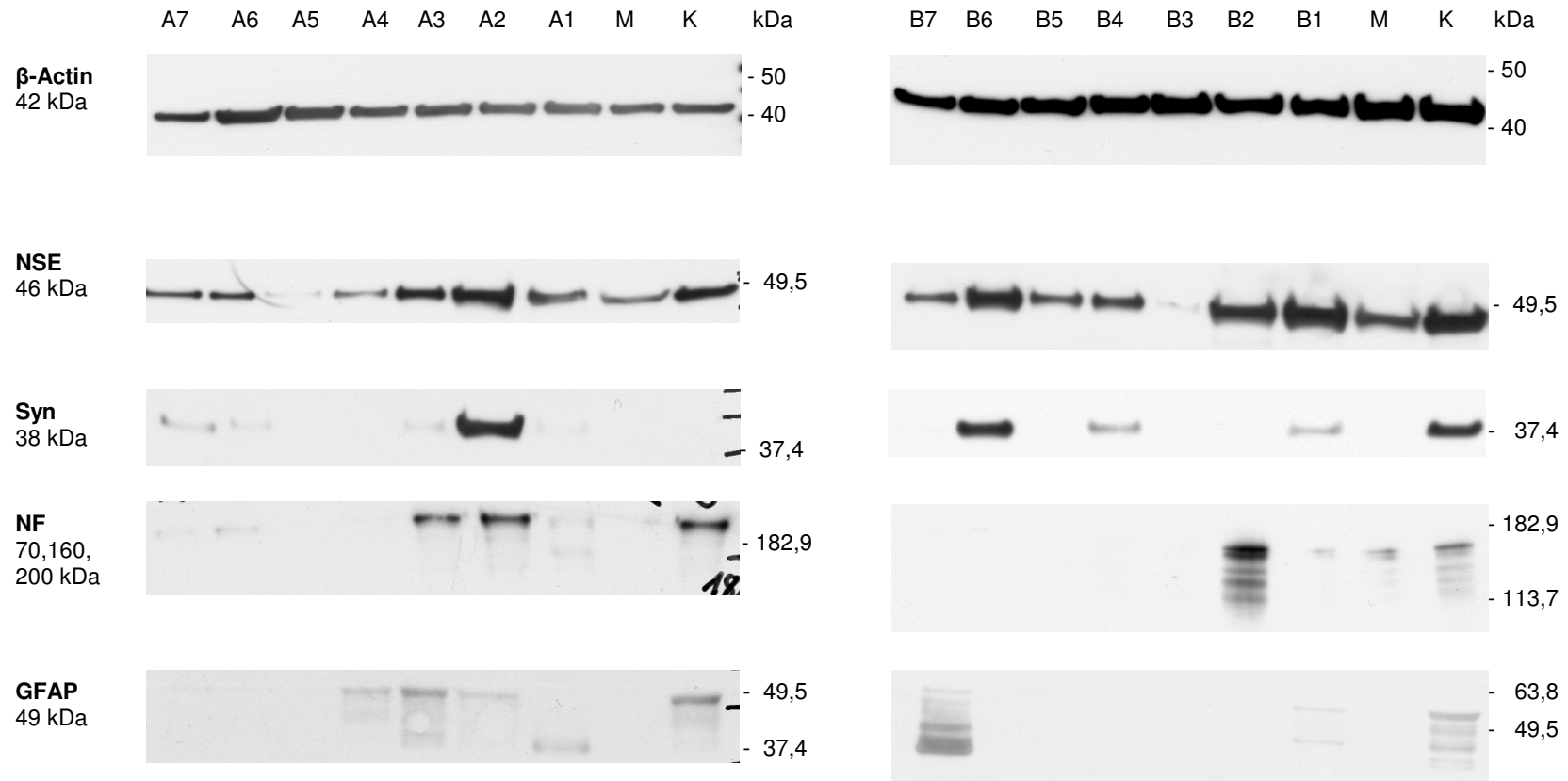


Abb. 2: Western-Blot Ergebnisse der Gruppen A und B

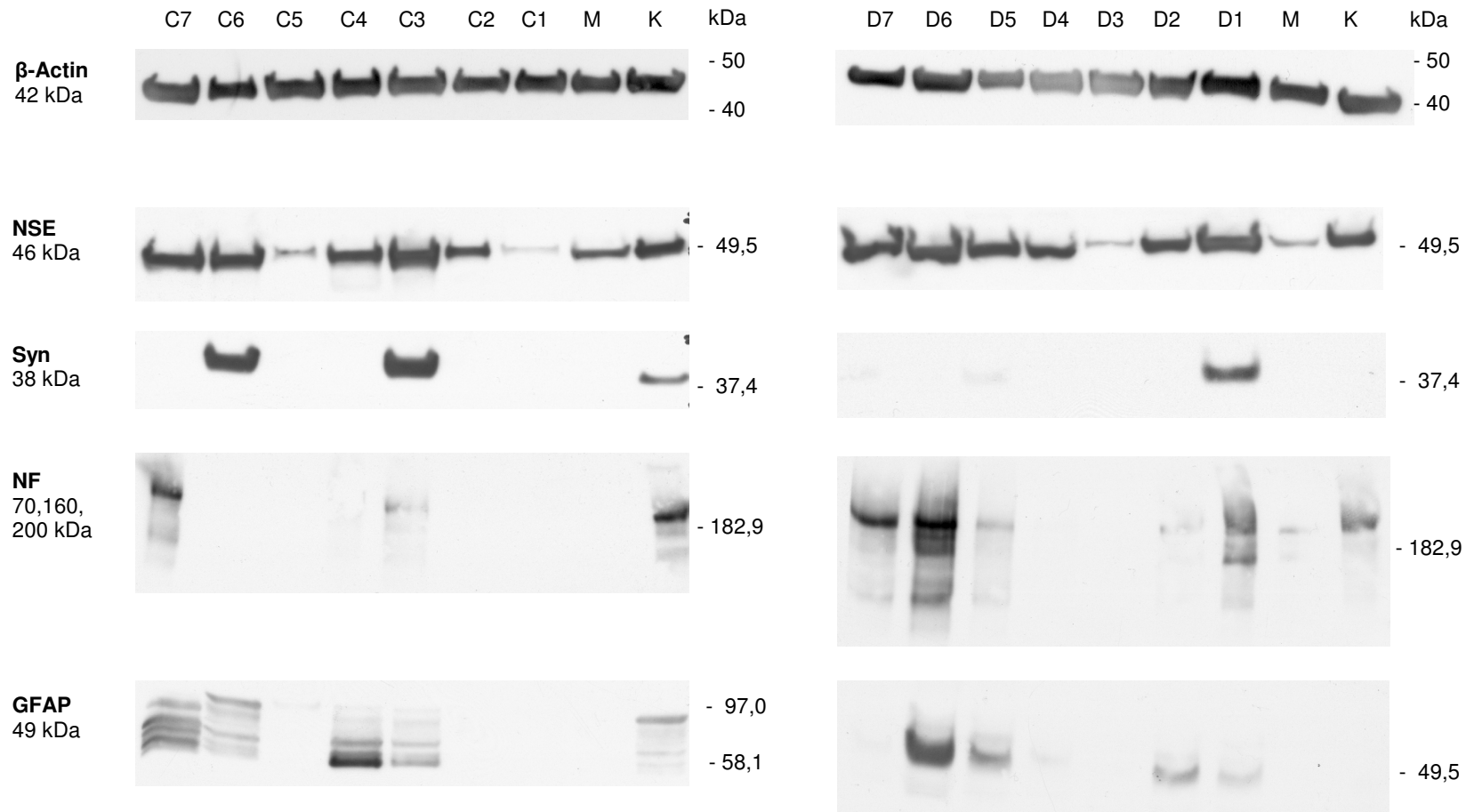


Abb. 3: Western-Blot Ergebnisse der Gruppen C und D

5.1.1. Auswertung der Western-Blots

In den Blots mit β -Actin-Antikörpern erkennt man, daß die Banden innerhalb der Gruppen A, B, C und D von nahezu gleicher Intensität sind. Dies bedeutet, daß die untersuchten Tumorslysate eine etwa gleich große Proteinkonzentration haben und somit der Vergleich der Banden-Intensitäten innerhalb einer Gruppe auch für die anderen verwendeten Antikörper gestattet ist. Im Vergleich der Gruppen untereinander sind die β -Actin-Banden von ähnlicher Intensität, weshalb auch der Vergleich der Banden unterschiedlicher Gruppen zulässig ist.

Für die Auswertung wurden die Banden in Abhängigkeit ihrer relativen Breite und ihres Kontrastes in Banden schwacher „+“, mittelgradiger „++“ und starker „+++“ Intensität (oder Ausprägung) unterteilt. Keine oder keine eindeutige Ausprägung wurde mit „-“ bezeichnet. Als grenzwertig nachweisbar „(+“ wurden Proben bezeichnet, die im Original so schwache Banden zeigten, dass diese in den Papierausdrucken nicht konstant reproduzierbar waren.

In der Gruppe C stellt sich die für die Positivkontrollen (K= Kortex) und Negativkontrollen (M= Meningeom), zu erwartende Bandenverteilung dar: Der Kortex zeigt eine Bande bei jedem der drei neuronalen Proteine und bei GFAP. Das Meningeom exprimiert NSE, ist aber weder positiv für Synaptophysin, Neurofilament oder GFAP. Unverständlich bleibt, weshalb sich in den Gruppen A und D bei den Positivkontrollen (K= Kortex) keine Synaptophysin-Banden finden, obwohl die Banden der Proben A3 und D1 das Funktionieren des Antikörpers im jeweiligen Blot dokumentieren.

5.1.2. NSE

Sämtlicher Proben exprimieren in unterschiedlicher Intensität NSE. Eine starke Expression zeigen die Proben A2, A3, B1, B2, B6, C3, C4, C6, C7, D1, D6 und D7. Mittelgradig ist die Expression bei den Proben A1, A6, A7, B4, B5, B7, C2, D2, D4, D5. Nur schwache NSE-Banden zeigen die Proben A4, A5, B3, C1, C5 und D3.

5.1.3. Synaptophysin

Eine starke Synaptophysin-Expression findet sich bei den Proben A2, B6, C3 und C6. Mittelgradig ist die Ausprägung bei D1 und mittelgradig bis schwach bei den Proben B1 und B4. Grenzwertig nachweisbar ist Synaptophysin bei A1, A3, A6, A7, D5 und D7. Die übrigen Proben exprimieren kein Synaptophysin.

5.1.4. Neurofilament

Die Expression von Neurofilament ist stark bei den Proben B2, C7 und D6. Eine mittelgradige Expression haben die Proben A2, A3, D1 und D7. Schwach fällt die Expression bei B1, C3, D2 und D5 aus. Grenzwertig nachweisbar ist Neurofilament bei A1, A6, A7 und nicht eindeutig bei C4. Bei den restlichen Proben ist keine Neurofilament-Expression nachzuweisen.

5.1.5. GFAP

Die Probe D6 exprimiert stark GFAP. Von mittelgradiger Intensität ist die GFAP-Expression bei B7, C4, C6, C7 und D5. Eine schwache Expression zeigen die Proben A1, A2 und A3, A4, B1, C3, C5, D1, D2, D4. Grenzwertig nachweisbar ist GFAP bei D7. Bei den übrigen Proben findet sich keine GFAP-Expression.

5.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

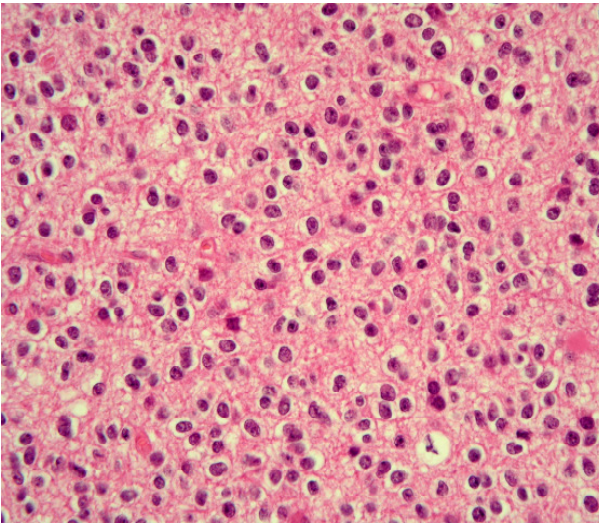


Abb. 4a: repräsentativer Tumor A6, HE

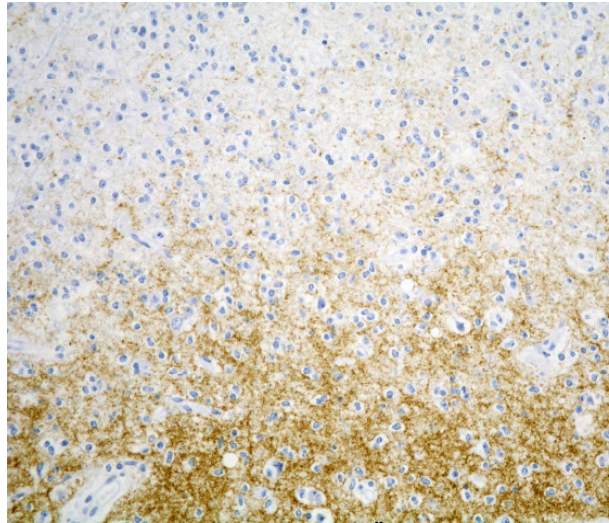


Abb. 4b: A6, Synaptophysin (Übergangszone)

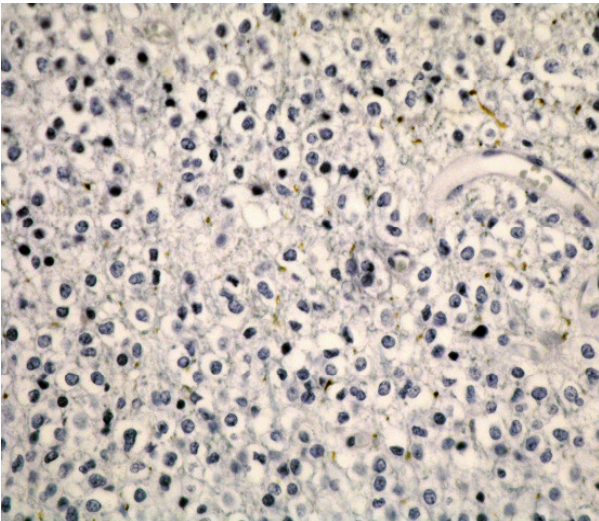


Abb. 4c: A6, NF (Tumorzellen negativ)

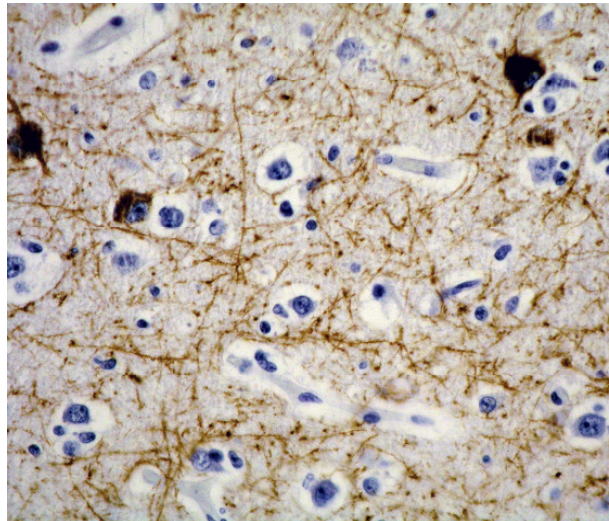


Abb. 4d: A6, NF (Axonfasern, ortsständige Neurone)

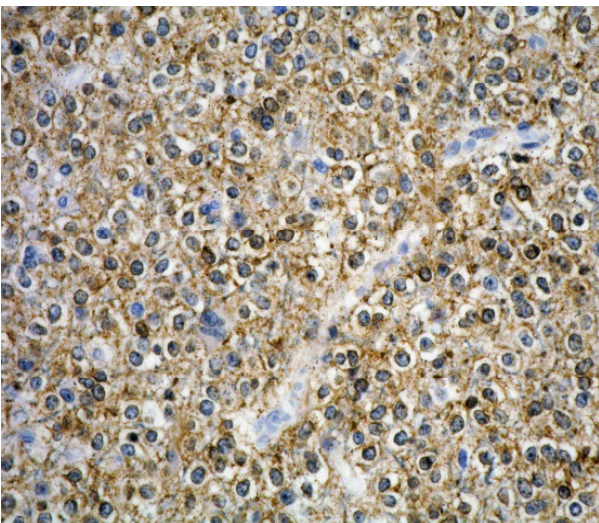


Abb. 4e: A6, NSE (positiv)

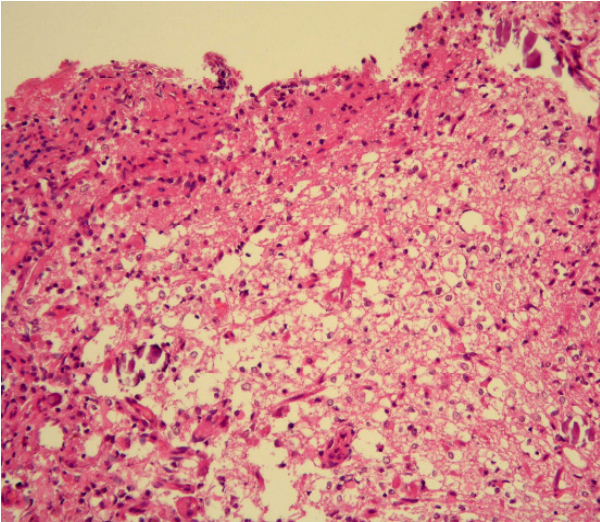


Abb. 5a: Tumor A1, HE

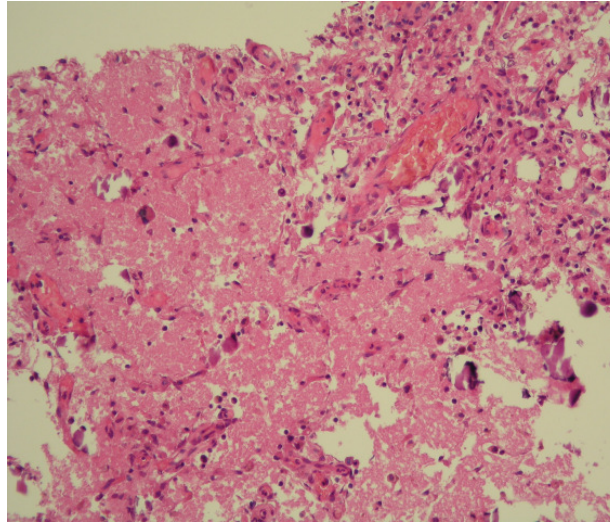


Abb. 5b: A1, HE (Nekrosen, Gefäßwände)

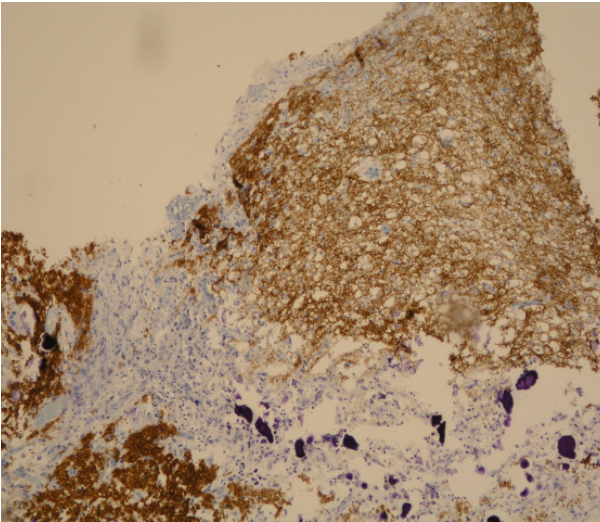


Abb. 5c: A1, Synaptophysin (positive Areale)

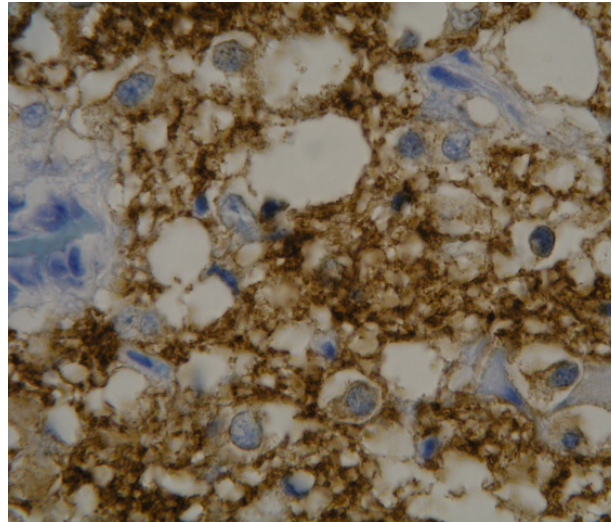


Abb. 5d: A1, Synaptophysin (positive Zellen)

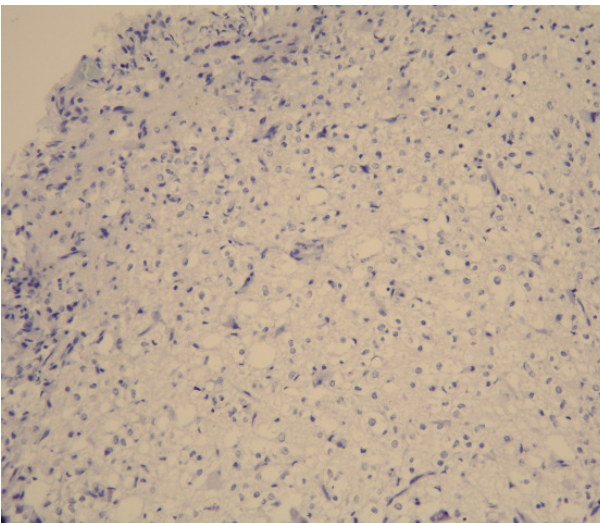


Abb. 5e: A1, NF (negativ)

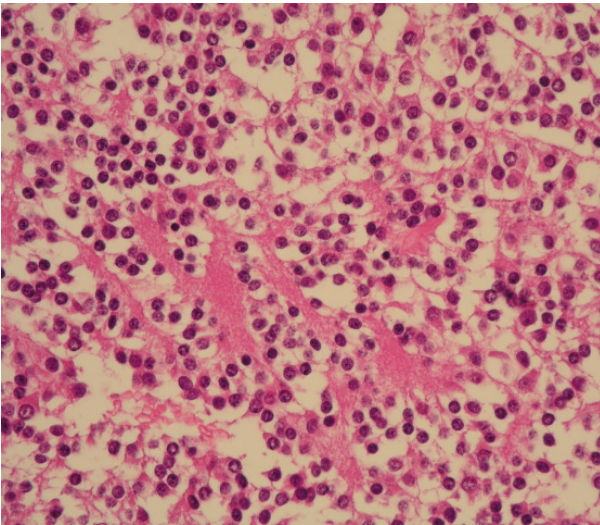


Abb. 6a: Tumor D7, HE

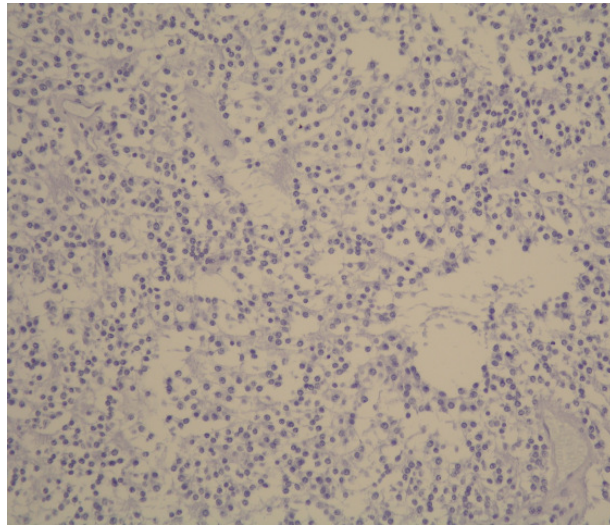


Abb. 6b: D7, NF (negativ)

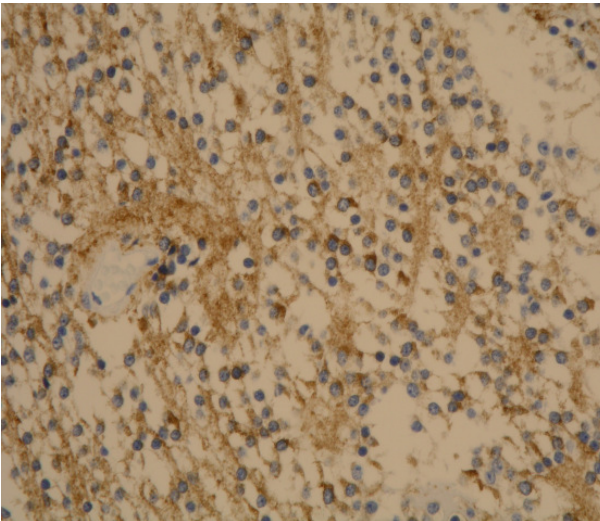


Abb. 6c : D7, Synaptophysin (positive Matrix)

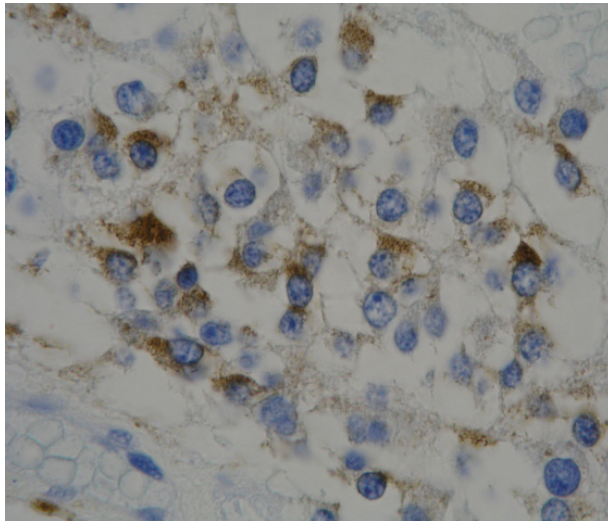


Abb. 6d: D7, Synaptophysin (positive Zellen)

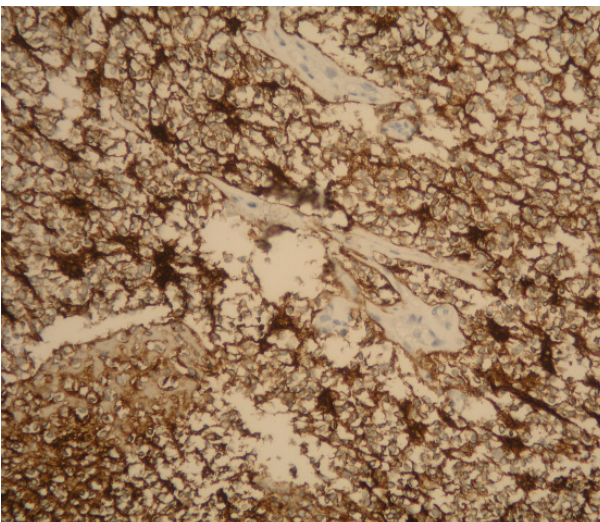


Abb. 6e : D7, Ncam (positiv)

Abgesehen vom Tumor A5, von dem kein geeignetes Material mehr zur Verfügung stand, konnten von allen Proben Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin und immunhistochemische Färbungen angefertigt werden. Ersatzweise wurde der Tumor A8 verwendet, um wie im Western-Blot 28 Proben zu untersuchen. Eine Auswertung der Schnitte des Tumors D3 war aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes des Gewebes nicht mehr möglich, weshalb schließlich nur 27 Tumore zur Auswertung gelangten.

5.2.1. Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung der Histologie wurde der Anteil der für den jeweiligen Antikörper positiven Zellen geschätzt. Dabei bedeutet:

- (negativ) = keine Zellen angefärbt
- + (leicht positiv) = bis 1/3 der Zellen angefärbt,
- ++ (mittelgradig positiv) = bis 2/3 der Zellen angefärbt und
- +++ (stark positiv) = mehr als 2/3 der Zellen angefärbt.

Die Färbeintensitäten blieben bei der Auswertung unberücksichtigt, da es zum einen keine allzu gravierenden Abweichungen gab und zum anderen gewisse Ungleichmäßigkeiten durch den Färbvorgang zu erklären sind.

5.2.2. NSE und Ncam

Sämtliche untersuchten Tumore waren positiv für NSE (Beispiel **Abb. 4e**) und Ncam (Beispiel **Abb. 6e**), die Ausprägung war bei beiden Antikörpern mehrheitlich mittelgradig bis stark. Die NSE-Antikörper färbten insbesondere die Matrix, aber auch die meisten der Tumorzellen und bildeten oftmals einen kräftigen Farbsaum um die Kerne aus. Bei den Ncam-Färbungen bot sich ein ähnliches Bild, wobei die Tumormatrix im Vergleich zu den NSE-Färbungen noch intensiver reagierte.

5.2.3. Synaptophysin und Neurofilament

a) Regelfall, repräsentativer Tumor A6:

Die weit überwiegende Anzahl der Tumore, 25 (93%) von 27 Proben, präsentierten in Hinblick auf die Ausprägung von Synaptophysin und Neurofilament ein gleichartiges Bild. Diese am häufigsten gefundenen Charakteristika werden von dem Tumor A6 gut repräsentiert.

In der HE-Färbung des Tumors A6 (**Abb. 4a**) kann man das typische histologische Bild eines Oligodendroglioms (vgl. Einleitung) gut erkennen. In **Abb. 4c** ist zu sehen, daß die Antikörper gegen Neurofilament nicht an die Tumorzellen binden. Lediglich vereinzelte Axonfasern und die von Tumorgewebe eingeschlossene Nervenzellen, sogenannte entrapped neurons, sind positiv: **Abb. 4d** zeigt die intensive zytoplasmatische Färbung der Neuronen-Perikarya und die zugehörigen Axonen.

Im Bereich von Tumor-Übergangszonen (**Abb. 4b**) läßt sich das Synaptophysin-Bindungsverhalten des Gewebes gut erkennen. Die Positivität des gesunden Gehirngewebes verliert sich zum Tumorareal hin vollständig: Man sieht das allmähliche Schwinden der fein granulären Braunfärbung in der unteren rechten Bildhälfte in Richtung oberer linker Bildhälfte.

Bei der Auswertung der Immunhistochemie wurde streng darauf geachtet, daß es sich bei einer Farbreaktion um eine echte Tumorzell-Antikörperbindung und nicht um eines der zuvor beschriebenen Phänomene handelt. Nur eine echte Bindung wurde als positiv bewertet.

b) Ausnahmen:

Die Tumoren A1 und D7 bilden Ausnahmen, sie weisen andere, als die durch den Tumor A6 repräsentierten Eigenschaften aus.

Tumor A1:

In der HE Färbung (**Abb. 5a**) ist A1 als Oligodendrogliom erkennbar. In **Abb. 5c** fallen umschriebene Synaptophysin-positive Areale auf, insbesondere ein nahezu dreieckiges Areal im oberen rechten Bildausschnitt. Der Übergang von Synaptophysin-positiven zu Synaptophysin-negativen Zellen vollzieht sich im Vergleich zum oben beschriebenen Tumor A6 (vgl. **Abb. 4b**) relativ abrupt. In der Vergrößerung erkennt man eine intensive,

fein granuläre Anfärbung der Zellmatrix und der Zytoplasmata der darin gelegenen Zellen, wobei deren prominente Nukleoli ausgespart bleiben (**Abb. 5d**).

In **Abb. 5b** sieht man in der Bildmitte und links davon schollig imponierendes Gewebe ohne erkennbare Zellgrenze, offenbar ein Nekroseareal, welches in der Synaptophysin-Färbung negativ bleibt (**Abb. 5c**).

Die Neurofilament-Färbung des Tumors A1 fällt negativ aus (**Abb. 5e**), diesbezüglich unterscheidet sich der Tumor A1 nicht von den anderen Tumorproben.

Tumor D7:

Abb. 6a zeigt das Oligodendrogliom D7 in der HE-Färbung. Wie bei den anderen Proben ist auch bei D7 die Neurofilament-Färbung negativ (**Abb. 6b**). Innerhalb einer netzartigen synaptophysin-positiven Tumor-Matrix (**Abb. 6c**) befindet sich ein Gebiet mit vereinzelt, besonders gut angefärbten Zellen (**Abb. 6d**). Insbesondere das Zytoplasma dieser Zellen ist intensiv gefärbt.

5.3.

Tab. 3: Zusammenschau der Ergebnisse

	Western-Blot				Immunhistochemie			
	NSE	Synapto- physin	NF	GFAP	NSE	Synapto- physin	NF	CD-56
A1	++	(+)	(+)	+	+++	+++	-	+++
A2	+++	+++	++	+	++	-	-	++
A3	+++	(+)	++	+	+	-	-	+++
A4	+	-	-	+	+++	-	-	+++
A5	+	-	-	-	kein Material			
A6	++	(+)	(+)	-	+++	-	-	+++
A7	++	(+)	(+)	-	+++	-	-	+
A8	entfällt				++	-	-	+++
B1	+++	++	+	+	+++	-	-	+++
B2	+++	-	+++	-	++	-	-	+++
B3	+	-	-	-	+	-	-	+
B4	++	++	-	-	++	-	-	++
B5	++	-	-	-	++	-	-	+++
B6	+++	+++	-	-	++	-	-	+++
B7	++	-	-	++	++	-	-	+++
C1	+	-	-	-	+	-	-	++
C2	++	-	-	-	+++	-	-	++
C3	+++	+++	+	+	++	-	-	+++
C4	+++	-	-	++	++	-	-	+++
C5	++	-	-	+	++	-	-	++
C6	+++	+++	-	++	+++	-	-	+++
C7	+++	-	+++	++	++	-	-	++
D1	+++	++	++	+	+++	-	-	+++
D2	++	-	+	+	++	-	-	+++
D3	+	-	-	-	nicht beurteilbar			
D4	++	-	-	+	+	-	-	+++
D5	++	(+)	+	++	++	-	-	+++
D6	+++	-	+++	+++	++	-	-	++
D7	+++	(+)	++	(+)	++	+	-	+++

5.4.

Tab. 4: Häufigkeiten der Western-Blot Expressionstypen

Proben	Ausprägungstyp				Anzahl
A1,A2,A3,B1, C3,D1,D5,D7	NSE	Syn	NF	GFAP	8
A6,A7	NSE	Syn	NF	-	2
C6	NSE	Syn	-	GFAP	1
B4,B6	NSE	Syn	-	-	2
C7,D2,D6	NSE	-	NF	GFAP	3
B2	NSE	-	NF	-	1
A4,B7,C4, C5,D4	NSE	-	-	GFAP	5
A5,B3,B5,C1, C2,D3	NSE	-	-	-	6

6. Diskussion

6.1. Abweichung der Ergebnisse von Western-Blot und Immunhistochemie

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse (**Tab. 3**) lässt sich erkennen, dass die Expressionsmuster des Western-Blots denen der Immunhistochemie nicht entsprechen. Die Abweichungen können verschiedene Ursachen haben und sind zum Teil sicherlich methodisch bedingt. Eine absolute Übereinstimmung ist ohnehin nicht zwangsläufig zu erwarten, da die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar sind.

Im Western-Blot ist die Antigenität des Gewebes aufgrund der aufwendigeren Prozessierung gegenüber der Immunhistochemie wesentlich gesteigert. Diese Eigenschaft verleiht dem Western-Blot eine höhere Sensibilität, was bedeutet, dass potentiell mehr positive Ergebnisse aufgedeckt werden.

Gleichzeitig hat der Western-Blot aber den Nachteil, dass eine Unterscheidung zwischen einer echten, auf Tumorzellen zurückzuführende, und einer nicht echten, Nervengewebe geschuldetem Protein-Expression unmöglich ist, da sie sich optisch nicht zuordnen lässt. Im Western-Blot erscheinen alle Proteine als Bande, die in einer hinreichenden Menge im Gewebe vorkommen. Beispielsweise kann nicht gesagt werden, ob eine Synaptophysin-Bande von normalem Hirngewebe im Tumorrandbereich herrührt oder ob sie Ausdruck einer echten Tumorzell-Expression ist. Trotz größter Sorgfalt bei der Auswahl der Tumorproben für den Western-Blot ist eine Kontamination mit autochthonem Nervengewebe nahezu unvermeidbar, da die Tumore zu einem diffus infiltrierenden Wachstum neigen und typischerweise Übergangszonen vorkommen. Während der Auswertung der Immunhistochemie zeigte sich, dass in fast allen Tumorproben Areale mit autochthonem Nervengewebe nachweisbar sind. Deshalb ist zu vermuten, dass einige Banden des Western-Blots falsch positive Ergebnisse darstellen.

6.2. Neuronale Differenzierung im Western-Blot

Die Ergebnisse der Western-Blots erwecken für sich betrachtet den Anschein, als zeige eine große Anzahl der Oligodendrogliome eine neuronale Differenzierung:

In allen Proben wurde die Expression von neuronenspezifischer Enolase (NSE) nachgewiesen, 10 (36%) der Oligodendrogliome zeigten eine Expression von Synaptophysin und Neurofilament, 3 (11%) exprimierten nur Synaptophysin und 4 (14%) nur Neurofilament.

Häufigkeitsangaben über den Nachweis von neuronalen Proteine im Western-Blot finden sich in der Literatur nicht. Verglichen mit den Häufigkeitsangaben, die in den genannten immunhistochemischen Studien [39,50,51] gefunden wurden, erscheinen die oben genannten Werte als zu hoch.

6.2.1. NSE im WB

Im Western-Blot sind alle Proben NSE-positiv, wobei Unterschiede im Ausprägungsgrad der Banden erkennbar sind (**Abb. 2 und 3**, S. 26/27). Die Proben mit der stärksten NSE-Ausprägung innerhalb einer Gruppe sind diejenigen, die auch mindestens einen weiteren neuronalen Marker exprimieren.

In der Gruppe A gilt dies zum Beispiel für die Tumoren A2, mit einer Koexpression von Synaptophysin und Neurofilament, und A3, mit einer Koexpression von Neurofilament. Entsprechend verhält es sich mit den Proben B1, B2, B6, B4 sowie C3, C6, C7 und D1, D6, D7. Tumore mit schwächerer NSE-Bande zeigen in der Regel keine Koexpression eines anderen neuronalen Proteins.

Eine intensive oder intensivierete Expression von NSE bei gleichzeitigem Nachweis anderer neuronaler Proteine ist plausibel, eine isolierte NSE-Bande ohne weitere Banden anderer neuronaler Proteine dagegen nicht. Am einfachsten wäre eine isolierte NSE-Bande durch unspezifische Bindungen zu erklären. Das heißt, die NSE-Antikörper hätten an nicht-neuronale Strukturen gebunden und würden auf diese Weise falsch positive Ergebnisse erzeugen. Beweisen lässt sich diese Annahme im Western-Blot allein jedoch nicht. Aufgrund einer verbleibenden Unsicherheit kann NSE bei der Auswertung des Western-Blots nur eine nachrangige Bedeutung zukommen.

6.2.2. Synaptophysin, Neurofilament und GFAP im WB

Ohne Berücksichtigung der NSE-Ausprägung exprimieren im Western-Blot noch 17 (61%) Oligodendrogliome ein oder zwei neuronale Proteine, 12 (43%) davon exprimieren zusätzlich GFAP (**Tab. 4**).

Einerseits könnte nun in Kenntnis der Ergebnisse der Immunhistochemie argumentiert werden, dass die gemeinsame Expression von neuronalen Proteinen und GFAP Ausdruck einer Kontamination mit ortsständigem Nervengewebe ist. Diese dürfte deshalb nicht als echt gewertet werden, weshalb nur noch 5 (18%) mutmaßlich neuronal differenzierte Oligodendrogliome verblieben, nämlich A6, A7, B2, B4 und B6. Andererseits wäre dann noch zu erklären, weshalb die Proben B4, B6 und C6 nur Synaptophysin, aber kein Neurofilament und die Proben A3, B2, C7 und D6 zwar Neurofilament, aber kein Synaptophysin exprimieren.

Möglicherweise hängt die unterschiedliche Expression von Synaptophysin und Neurofilament mit der ursprünglichen Entnahmelokalisation des Tumorgewebes zusammen. Bei den Synaptophysin exprimierenden Tumoren könnte es sich um Gewebe mit vorwiegendem Bezug zum Kortex handeln, wohingegen die Neurofilament exprimierenden Tumore hauptsächlich aus der weissen Substanz stammen könnten.

In Anlehnung an die im Kapitel 6.3.2. noch genauer diskutierte immunhistochemische Studie von Wharton et al. [51] wäre zudem eine weitere Deutung möglich: Die Tumore, die im Western-Blot zwar Neurofilament, aber kein Synaptophysin exprimieren (A3, B2, C7 und D6), exprimieren ein unreifes (nicht-phosphoryliertes) Neurofilament. Möglicherweise kann der verwendete Antikörper, der in der Immunhistochemie nur an phosphoryliertes Neurofilament bindet, im Western-Blot auch die nicht-phosphorylierte Form erkennen.

6.3. Immunhistochemie

6.3.1. NSE und Ncam in der IHC

Da auch in der Immunhistochemie alle Proben NSE positiv sind, stimmt die Expression von NSE in beiden Untersuchungsgängen überein. In der Immunhistochemie ist erkennbar, daß die NSE-Antikörper die Matrix sämtlicher Oligodendrogliome anfärben (**Abb. 4e**). Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Ncam-Färbungen, unabhängig von ihrem sonstigen Expressionsverhalten reagierte bei allen Proben insbesondere die Tumormatrix stark positiv (**Abb. 6e**). Aufgrund dieses Bindungsverhaltens erscheinen NSE noch Ncam als weniger spezifische und kaum geeignete Marker zur Diskrimination einer neuronalen Differenzierung bei Oligodendrogliomen.

6.3.2. Neuronale Differenzierung in der IHC

Eine echte neuronale Differenzierung konnte in der Immunhistochemie nur bei 2 (7%) Tumoren, nämlich A1 und D7, bestätigt werden. Beide Tumore exprimieren Synaptophysin. Im Western-Blot erzeugen A1 und D7 nur sehr schwache Synaptophysin-Banden, was einen sehr geringen Synaptophysin-Anteil am Gesamtproteingehalt vermuten lässt. Eine Neurofilament-Expression konnte bei überhaupt keinem Tumor nachgewiesen werden.

Diese Zahlen sind mit den Ergebnissen der Studie von Wharton et al. [51] vereinbar. In deren Studie exprimierten 6% der Tumore Synaptophysin und ebenso war phosphoryliertes Neurofilament in allen Fällen negativ. Allerdings waren 31% der Tumore, darunter auch die Synaptophysin-positiven, positiv für nicht-phosphoryliertes Neurofilament. In der vorliegenden Studie wurde ein geläufiger Neurofilament-Antikörper verwendet, der nur an phosphoryliertes Neurofilament bindet, so daß über nicht-phosphoryliertes Neurofilament keine Aussage getroffen werden kann.

Die unterschiedliche Expression von nicht-phosphoryliertem und phosphoryliertem Neurofilament werten Wharton et al. [51] unter Bezugnahme auf eine Studie von Nixon [63]. Nach Nixon [63] stellt die Phosphorylation von Neurofilament eine Modifizierung dar, die in bestimmten Funktionszustände des Proteins auftritt, zum Beispiel während seines axonalen Transportes oder während seines Einbaus in das Zytoskelett. Wharton et al. [51] halten nicht-phosphoryliertes Neurofilament für eine von Tumorzellen gebildete, unausgereifte und nicht voll funktionsfähige Vorstufe des Proteins. Zudem denken sie, daß es im Vergleich zu der phosphorylierte Form den immunhistochemisch sensibleren Marker darstellt.

Ähnlich wie Wharton et al. [51] mutmaßten auch Wolf et al. [50], daß Oligodendrogliome zum Teil unausgereifte neuronale Strukturen ausbilden. Auf der Suche nach einem geeigneten immunhistochemischen Marker zur Differentialdiagnose von Oligodendrogliomen und dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren (DNT) entdeckten sie bei 52% aller Oligodendrogliome die Expression der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Untereinheit 1 (NR1). Sie interpretierten dies als Ausdruck einer frühen Form neuronaler Differenzierung.

DNT sind WHO Grad I Tumore des Kindes- und Jugendalters und treten klinisch durch fokale, medikamentös schwer therapierbare epileptische Anfälle in Erscheinung [64,65].

Der Kortex ist verbreitert und zeigt histologisch das sogenannte spezifische glioneuronale Element, eine Ansammlung von senkrecht zur Hirnoberfläche verlaufenden säulenartigen Komplexen [1, 66]. Diese bestehen aus Neuronen, an deren Axonbündel sich oligodendrogliale und astrozytäre Zellen aufreihen [1, 66].

NR1 könnte nach Wolf et al. [50] mit der Entstehung von Aktionspotentialen bei Oligodendrogliomen in Zusammenhang stehen, die erstmals von Patt et al. [67] beschrieben wurden. Diese Fähigkeit könnte wiederum das hohe epileptogene Potential von Oligodendrogliomen erklären. Grundsätzlich aber ließe das Vorkommen von NR1 sowohl auf eine Abstammung von der neuronalen als auch von der glialen Zelllinie schließen.

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen der Studie von Dehghani et al. [39] ergeben sich Unterschiede. Bei Dehghani et al. [39] waren nicht alle, sondern nur 28% der Oligodendrogliome positiv für NSE, dafür zeigten aber 18% eine Synaptophysin-Expression. Wie bereits vorherige Studien [49,58] zeigen, variiert die NSE-Positivität, was zumindest durch eine unzureichende Spezifität der Antikörper erklärbar wäre. In Zusammenschau der vorliegenden und genannten fremden Ergebnisse, kann der Anteil der Synaptophysin exprimierenden Oligodendrogliome an allen Oligodendrogliomen allenfalls grob geschätzt werden. Vermutlich ist der Anteil kleiner als 20 %.

6.4. Klinik und Histologie der Tumore A1 und D7

Der **Tumor A1** stammt von einem 33-jährigen, männlichen Patienten, lag links frontal und wurde histologisch als anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III eingestuft. Ein LOH 1p/19q ließ sich nicht nachweisen.

In der Routinediagnostik fielen reichlich Mitosen und Apoptosen auf, der Proliferationsindex (MIB-1) erreichte fokal bis zu 20%. Es kamen Areale mit Minigemistozyten sowie strich- und landkartenartigen Nekrosen vor. Einige Gefäße erscheinen besonders dickwandig (vgl. **Abb. 5b**).

Klinisch und morphologisch weist dieser Tumor gewisse Ähnlichkeiten mit den sogenannten papillären glioneuronalen Tumoren (PGNT) auf. Diese treten vorzugsweise als zystische Tumoren der Großhirnhemisphären bei Jugendlichen oder jüngeren Erwachsenen auf [68,69]. Mikroskopisch bilden sie pseudopapilläre Texturen

mit hyalinisierten Blutgefäßen aus, die von kuboidalen GFAP-positiven Gliazellen und vielgestaltigen neuronalen Zellen eingefärbt sind [68,69]. Ishizawa et al. [70] beschrieben einen PGNT, der zudem durch Areale besonderer, proliferierender Minigemistozyten gekennzeichnet war. Der Proliferationsindex (MIB-1 = Ki-67) lag bei 10 %. Diese Minigemistozyten wurden als Teil einer oligodendroglialen Differenzierung angesehen [69].

Der **Tumor D7** stammt von einem 62-jährigem, männlichen Patienten, war links temporo-occipital lokalisiert und wurde histologisch als Oligodendrogliom WHO Grad II klassifiziert. Ein LOH 1p/19q wurde molekulargenetisch nachgewiesen.

Auffällig ist der lange klinische Verlauf: Die Erstdiagnose wurde bereits im Alter von 25 Jahren gestellt. Wegen Rezidiven erfolgten weitere Operationen mit 48, 50 und 62 Jahren. Nach der Entfernung des Zweitrezidivs im Alter von 50 Jahren erhielt der Patient eine Strahlentherapie. Die molekulare Diagnostik erfolgte im Anschluß an die Operation im Alter von 62 Jahren.

Das frühe Erkrankungsalter und der lange klinische Verlauf sind für ein Oligodendrogliom eher ungewöhnlich. Ebenso ungewöhnlich ist für ein Oligodendrogliom die Synaptophysin-Positivität der Tumormatrix (vgl. **Abb. 6c**). Auch Wolf et al. [50] haben dies schon einmal beobachtet und erkannten darin eine frühe neuronale Struktur.

Lange Krankheitsverläufe kommen typischerweise bei Gangliogliomen vor. Gangliogliome sind glioneuronale Mischtumore, die zumeist bei jungen Patienten (Mittelwert 10-20 Jahre) auftreten und initial durch epileptische Anfälle auffällig werden [1,71]. Bevorzugt treten sie im mediobasalen Temporallappen auf [1,71]. Im Unterschied zu Oligodendrogliomen erscheint die gliale Zellkomponente fast regelmäßig wie ein fibrilläres oder pilozytisches Astrozytom, andere Gliakomponenten sind äußerst selten [1,71]. Zudem sind die Nervenzellen im glialen Fasernetz ungeordnet verstreut und wirken desorientiert, Form und Größe sind oft atypisch [1,71]. Quinn [72,73] fand häufiger als bei normalen Neuronen eine intensive perizelluläre oder zytoplasmatische Immunreaktivität für Synaptophysin.

Im vorliegenden Fall sind die Synaptophysin-positiven Zellen nicht als atypische Neurone zu identifizieren, sie weisen aber ein ähnliches Färbeverhalten auf (vgl. **Abb. 6d**). In Zusammenschau sprechen oligodendrogliale Aspekte und der LOH 1p/19q gegen ein Gangliogliom.

6.5. Neuronal differenzierte Oligodendroglione als Übergangsformen

Festzuhalten bleibt, dass die in der vorliegenden Studie gefundenen neuronal differenzierten Oligodendroglione klinische und morphologische Ähnlichkeiten mit Tumoren aufweisen, die jeweils der glioneuronalen Gruppe zugeordnet werden. Es finden sich also zwei unterschiedliche neuronale differenzierte Oligodendroglione.

Aufgrund dieser Unterschiede, stellt sich die Frage, ob neuronal differenzierte Oligodendroglione nicht grundsätzlich einer heterogenen Gruppe von Tumoren angehören, die lediglich die Eigenschaft teilen, neuronale Proteine zu exprimieren. Bei neuronal differenzierten Oligodendroglionen könnte es sich möglicherweise um bestimmte Ausprägungsvarianten oder Übergangsformen handeln, die zwischen den bisher bekannten neuronalen, glioneuronalen und glialen Tumoren vorkommen können. Schlüssig erscheint diese Annahme insbesondere dann, wenn man von einem kontinuierlich verlaufendem Reifungsprozess der Vorläuferzellen ausgeht, bei dem es zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung zu einer neoplastischen Entgleisung kommen kann. In der Gesamtheit der resultierenden Tumore wäre dann gewissermaßen ein Abbild dieser Entwicklungsreihe erkennbar.

Im Rahmen eines solchen Verständnisses würden Anpassungen der herkömmlichen Begrifflichkeit sinnvoll erscheinen, um diesem einen besseren Ausdruck zu verleihen. In erster Linie sollte nicht mehr die Einordnung in eine bestimmte Tumorgruppe angestrebt werden, sondern noch mehr als bisher die vorkommenden Zellkomponenten für die Benennung maßgeblich sein. Die Begriffe glial und neuronal könnten gewissermaßen als extreme Ausprägungsvarianten eines weit gefächerten, mehr oder weniger übergangslosen Spektrums neuroepithelialer Tumore verstanden werden.

Ähnliche Überlegungen finden sich im Prinzip bereits bei Perry et al. [52]. Nach deren Meinung könnten neuronal differenzierte Oligodendroglione ebenfalls eine eigenständige Art glioneuronaler Neoplasmen darstellen, die eine histogenetische Überschneidung von Oligodendroglionen und neuronalen Tumoren, insbesondere dem extraventrikulären Neurozytom vermuten lassen.

6.6. Glioneuronale Vorläuferzellen

Als unstrittig gilt, dass die Ätiologie einer neuronalen Differenzierung bei Oligodendrogliomen in einem engen Zusammenhang mit der Neuro- und Gliogenese zu sehen ist. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei glioneuronale Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen tragen Anlagen der glialen und der neuronalen Entwicklungslinie in sich und sind in der Lage sich in beide Richtungen zu differenzieren [74].

Es ist denkbar, dass Vorläuferzellen im Falle einer malignen Zelltransformation, in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums Zellanlagen ausbilden, deren Expression während eines regulären Entwicklungsverlaufs unterdrückt worden wären. Auf diese Weise würden Zellen entstehen, die Merkmale unterschiedlicher Zelltypen in sich vereinen und die darüber hinaus auch noch unausgereift sein könnten. So wäre beispielsweise das von Wharton et al. [51] beschriebene Vorkommen von nicht-phosphoryliertem Neurofilament in Oligodendrogliomen erklärbar.

In Analogie zu der Annahme, dass Oligoastrozytome von O2-A-Vorläuferzellen abstammen, käme für die neuronal differenzierten Oligodendrogliome die sogenannte N-O-Vorläuferzelle als Ursprungszelle in Betracht. N-O-Vorläuferzellen wurden von Williams et al. [74] aus dem Kortex von Ratten isoliert. Diese Zellen sind in der Lage sich sowohl in Neurone (N) als auch in Oligodendrozyten (O) zu entwickeln [74]. Es wird angenommen, dass ein entsprechender Zelltyp auch beim Menschen existiert.

Von den differentialdiagnostisch bedeutsamen Neurozytomen wird angenommen, dass sie von Vorläuferzellen abstammen, die mit den mutmaßlichen Ursprungszellen der neuronal differenzierten Oligodendrogliome entweder nahe verwandt oder sogar identisch sind [45,54,75,76]. Allerdings unterscheiden sich Neurozytome genetisch von Oligodendrogliomen, was die Vermutung einer Identität nicht unbedingt stützt. Zum Beispiel findet sich bei Neurozytomen in der Regel kein LOH 1p/19q [77], wenngleich dieser auch bei Neurozytomen vorkommen kann [78].

6.7. Aufdeckung des histogenetischen Ursprungs

Bisher ist es nicht gelungen, die Abstammung der Oligodendrogliome sicher zu klären. Ein Abstammungsnachweis kann nicht morphologisch oder ultrastrukturell, sondern nur genetisch erfolgen, worauf der Begriff vom histogenetischen Ursprung hinweist. Der

histogenetischer Vergleich von Tumorzellen und mutmaßlicher Ursprungszelle setzt jedoch voraus, dass die in Betracht zu ziehende Zelle überhaupt bekannt ist. Das war lange Zeit nicht der Fall war. Bis heute wurden nicht alle glialen, glioneuronalen oder neuronalen Vorläuferzellen, die tierexperimentell entdeckt wurden, auch beim Menschen nachgewiesen. Zudem ist nicht bekannt, ob bislang schon sämtliche Stadien einer Entwicklungslinie identifiziert werden konnten beziehungsweise überhaupt mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden identifiziert werden können. Falls die neuronal differenzierten Oligodendrogliome, wie in der vorliegenden Studie angenommen, tatsächlich eine heterogene Gruppe von Tumoren bilden, wäre der Nachweis des histogenetischen Ursprungs aufgrund der Heterogenität um so schwerer.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie sollten Oligodendrogliome auf die Expression neuronaler Proteinen untersucht und auf das Vorhandensein weiterer gemeinsamer Eigenschaften geprüft werden.

Oligodendrogliome sind gliale Tumore, deren Pathogenese bislang nicht sicher geklärt ist. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass in Oligodendrogliomen verschiedene neuronale Proteine vorkommen können, wobei die Gründe dafür nicht genau bekannt sind. Eine tiefergehende Kenntnis der Ursachen könnte einerseits einen nützlichen Beitrag zu differentialdiagnostischen Fragestellungen liefern und andererseits helfen, den pathogenetischen Ursprung von Oligodendrogliomen besser zu verstehen. Innerhalb der Neuro- und Gliogenese offenbarte sich mit der Entdeckung gemeinsamer pluri- beziehungsweise bipotenter Vorläuferzellen ein enges Verwandtschaftsverhältnis zwischen neuronalen und glialen Zellen. Derzeit wird angenommen, dass Oligodendrogliome von einer neoplastisch entarteten glioneuronalen Vorläuferzelle abstammen.

Zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von Proteinen wurden angewandt, der Western-Blot und die Immunhistochemie. Der Western-Blot ist der Immunhistochemie aufgrund einer höheren Antigenität des lysierten Gewebes an Sensibilität überlegen. Es zeigte sich aber, dass der Western-Blot allein nicht geeignet ist, um eine neuronale Differenzierung bei Oligodendrogliomen zuverlässig nachzuweisen, da falsch positive

Ergebnisse unentdeckt bleiben. Der Western-Blot kann als Screening-Methode dienen, der sich eine immunhistochemische Untersuchung anschließt. Wenn möglich sollten beide Methoden miteinander kombiniert werden.

Nicht alle verwendeten Antikörper waren von Nutzen. Neuronenspezifische Enolase (NSE) erwies sich weder im Western-Blot noch in der Immunhistochemie als ein geeigneter Marker zum Nachweis einer neuronalen Differenzierung bei Oligodendrogliomen. Die Antikörper verfügen offenbar nicht über eine hinreichende Spezifität, denn sie reagierten unabhängig von einer neuronalen Differenzierung mit sämtlichen Oligodendrogliomen. Das gleiche gilt für den ausschließlich in der Immunhistochemie verwendete Antikörper Ncam (CD-56), sämtliche Oligodendrogliome waren in der Untersuchung Ncam positiv.

Die Ergebnisse von Western-Blot und Immunhistochemie weichen voneinander ab. Die Abweichungen lassen sich methodisch begründen. Der Anteil neuronal differenzierter Oligodendrogliome ist im Western-Blot höher, er beträgt 5 (18%) von 28. Davon exprimieren 2 Tumore Synaptophysin und Neurofilament, 2 Tumore nur Synaptophysin und 1 Tumor nur Neurofilament. In der Immunhistochemie exprimieren 2 andere Tumore (7%) von 27 allein Synaptophysin, dieser Wert ist mit den Ergebnissen vorheriger Studien vergleichbar.

Die in der Immunhistochemie neuronal differenzierte Oligodendrogliome unterschieden sich. In einem Fall zeigten sich klinische und histologische Gemeinsamkeiten mit einem PGNT, in dem anderen Fall mit einem Gangliogliom. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass neuronal differenzierte Oligodendrogliome grundsätzlich eine heterogene Gruppe bilden, die bei vordergründiger Betrachtung lediglich die Eigenschaft teilen, neuronale Proteine zu exprimieren. Neuronale differenzierte Oligodendrogliome könnten möglicherweise bestimmte Ausprägungsvarianten glioneuronaler Mischtumore oder gewissermaßen Übergangsformen darstellen, die innerhalb eines Spektrums von glialen und neuronalen Tumoren vorkommen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen die Annahme, dass neuronal differenzierte Oligodendrogliome von glioneuronalen Vorläuferzellen abstammen, da bei ihnen Charakteristika gefunden wurden, die auch bei neuronalen und glioneuronalen Tumoren vorkommen. In Zukunft sind weitere Erkenntnisse über die Glio-, Neuro- und Tumorigenese eher aufgrund der Entwicklung molekulargenetischer Methoden zu erwarten.

8. Literaturverzeichnis

1. Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2nd edition ed. IARC Press, Lyon
2. Bailey P, Bucy P (1929) Oligodendrogliomas of the brain. *J Pathol Bacteriol* 32: 735-54
3. Bailey P, Cushing H (1926) A Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic basis with a Correlation Study of Prognosis. Lippincott, Philadelphia
4. Smith MT, Ludwig CL, Godfrey AD, Armbrustmacher VW (1983) Grading of oligodendrogliomas. *Cancer* 52: 2107-14
5. Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Tazelaar HD, Davis DH (1992) Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J Neurosurg* 76: 428-34
6. Mork SJ, Lindegaard KF, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, Harvei S, Ganz J (1985) Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. *J Neurosurg* 63: 881-9
7. Zulch K (1986) Brain tumours. Their biology and pathology. 3rd ed. Springer, Berlin
8. Ludwig CL, Smith MT, Godfrey AD, Armbrustmacher VW (1986) A clinicopathological study of 323 patients with oligodendrogliomas. *Ann Neurol* 19: 15-21
9. Zulch K (1981) Historical development of the classification of brain tumors and the new proposal of the World Health Organization. *Neurosurg Rev* 4: 123-27
10. Helseth A, Mork SJ (1989) Neoplasms of the central nervous system in Norway. III. Epidemiological characteristics of intracranial gliomas according to histology. *Apmis* 97: 547-55
11. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK (1997) Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 79: 1381-93
12. Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Well RO (2002) Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours. Churchill Livingstone, London
13. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG (1989) Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 71: 487-93
14. Nijjar TS, Simpson WJ, Gadalla T, McCartney M (1993) Oligodendroglioma. The Princess Margaret Hospital experience (1958-1984). *Cancer* 71: 4002-6
15. Celli P, Nofrone I, Palma L, Cantore G, Fortuna A (1994) Cerebral oligodendroglioma: prognostic factors and life history. *Neurosurgery* 35: 1018-34; discussion 1034-5
16. Tice H, Barnes PD, Goumnerova L, Scott RM, Tarbell NJ (1993) Pediatric and adolescent oligodendrogliomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 14: 1293-300
17. Lee YY, Van Tassel P (1989) Intracranial oligodendrogliomas: imaging findings in 35 untreated cases. *AJR Am J Roentgenol* 152: 361-9
18. Chin HW, Hazel JJ, Kim TH, Webster JH (1980) Oligodendrogliomas. I. A clinical study of cerebral oligodendrogliomas. *Cancer* 45: 1458-66
19. Paulus W in Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.) (2002) Neuropathologie, 3rd. ed. Springer, Berlin: 356-57

20. Wolburg H in Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.) (2002) *Neuropathologie*, 3rd. ed. Springer, Berlin: 15
21. Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestana A, Rey JA (1994) Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 57: 172-5
22. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA (1995) Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 64: 207-10
23. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 91-5
24. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145: 1175-90
25. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 52: 4277-9
26. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-3
27. Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K (2003) Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer* 97: 2254-61
28. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 111-26
29. Cairncross JG, Macdonald DR (1988) Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol* 23: 360-4
30. Levin VA, Edwards MS, Wright DC, Seager ML, Schimberg TP, Townsend JJ, Wilson CB (1980) Modified procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV 3) combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Treat Rep* 64: 237-44
31. Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schodl C, Jr., et al. (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 12: 2013-21
32. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, et al. (2006) Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 24: 2707-14
33. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al. (2006) Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 24 (18): 2715-22
34. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC (2006) A t(1;19)(q10;p10)

- Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Res.* 66 (20): 9852-61
35. Bullard DE, Rawlings CE, Philips B, Cox EB, Schold SC, Jr., Burger P, Halperin EC (1987) Oligodendroglioma. An analysis of the value of radiation therapy. *Cancer* 60: 2179-88
 36. Heegaard S, Sommer HM, Broholm H, Broendstrup O (1995) Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry of oligodendrogliomas with special reference to prognosis. *Cancer* 76: 1809-13
 37. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90: 1473-9
 38. Allison RR, Schulsinger A, Vongtama V, Barry T, Shin KH (1997) Radiation and chemotherapy improve outcome in oligodendroglioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37: 399-403
 39. Dehghani F, Schachenmayr W, Laun A, Korf HW (1998) Prognostic implication of histopathological, immunohistochemical and clinical features of oligodendrogliomas: a study of 89 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 95: 493-504
 40. Hart MN, Petito CK, Earle KM (1974) Mixed gliomas. *Cancer* 33: 134-40
 41. Kim L, Hochberg FH, Thornton AF, Harsh GR 4th, Patel H, Finkelstein D, Louis DN (1996) Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for grade III and grade IV oligoastrocytomas. *J Neurosurgery* 85: 602-7
 42. Mork SJ, Halvorsen TB, Lindegaard KF, Eide GE (1986) Oligodendroglioma. Histologic evaluation and prognosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 45: 65-7
 43. Herpers MJ, Budka H (1984) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendroglial tumors: gliofibrillary oligodendroglioma and transitional oligoastrocytoma as subtypes of oligodendroglioma. *Acta Neuropathol* 64 (4): 265-72.
 44. Matyia E, Taraszewska A, Zabek M (2001) Phenotypic characteristics of GFAP-immunopositive oligodendroglial tumours Part I: immunohistochemical study. *Folia Neuropathol* 39 (1): 19-2
 45. von Deimling A, Kleihues P, Saremaslani P, Yasargil MG, Spoerri O, Südhof, TC, Wiestler OD (1991) Histogenesis and differentiation potential of central neurocytomas. *Lab Invest* 64 (4): 585-91
 46. Cenacchi G, Giangaspero F, Cerasoli S, Manetto V, Martinelli GN (1996) Ultrastructural characterization of oligodendroglial-like cells in central nervous system tumors. *Ultrastruct Pathol* 20 (6): 537-47
 47. Tanaka J, Hokama Y, Nakamura H (1988) Myelin basic protein as a possible marker for oligodendroglioma. *Acta Pathol Jpn* 38: 1297-303
 48. Kashima T, Tiu SN, Merrill JE, Vinters HV, Dawson G, Campagnoni AT (1993) Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res* 53: 170-5
 49. Nakagawa Y, Perentes E, Rubinstein LJ (1986) Immunohistochemical characterization of oligodendrogliomas: an analysis of multiple markers *Acta Neuropathol (Berl)* 72 (1): 15-22
 50. Wolf HK, Buslei R, Blümcke I, Wiestler OD, Pietsch T (1997) Neural antigens in oligodendrogliomas and dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 94 (5): 436-43

51. Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR (1998) Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24 (4): 302-8.
52. Perry A, Scheithauer BW, Macaulay RJ, Raffel C, Roth KA, Kros JM (2002) Oligodendrogliomas with neurocytic differentiation. A report of 4 cases with diagnostic and histogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 61 (11): 947-55
53. de la Monte SM (1989) Uniform lineage of oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 135: 529-40
54. Shoshan Y, Nishiyama A, Chang A, Mork S, Barnett GH, Cowell JK, Trapp BD, Staugaitis SM (1999) Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10361-6
55. Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-6
56. Noble M, Wren D, Wolswijk G (1992) The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin Cell Biol* 3: 413-22
57. Scolding NJ, Rayner PJ, Compston DA (1999) Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter. *Neuroscience* 89: 1-4
58. Cras P, Martin JJ, Gheuens J (1988) Gamma-enolase and glial fibrillary acidic protein in nervous system tumors. An immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 75 (4): 377-84
59. Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41(3): 1017-28
60. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE (1986) Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (10): 3500-4
61. Schlaepfer WW (1987) Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46 (2): 117-29
62. Bourne SP, Patel K, Walsh F, Popham CJ, Coakham HB, Kemshead JT (1991) A monoclonal antibody (ERIC-1), raised against retinoblastoma, that recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM) expressed on brain and tumours arising from the neuroectoderm. *J Neurooncol* 10 (2): 111-9
63. Nixon RA (1993) The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 3 (1): 29-38
64. Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Chodkiewicz J-P, Laws ER Jr, Vedrenne C (1988) Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases. *Neurosurgery* 23 (5): 545-5
65. Daumas-Duport C (1993) Dysembryoplastic neuroepithelial tumours. *Brain Pathol* 3 (3): 283-95
66. Paulus W in Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.) (2002) *Neuropathologie*, 3rd. ed. Springer, Berlin: 364-365
67. Patt S, Labrakakis C, Bernstein M, Weydt P, Cervós-Navarro J, Nisch G, Kettenmann H (1996) Neuron-like physiological properties of cells from human oligodendroglial tumors. *Neuroscience* 71 (2): 601-11

68. Paulus W in Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.) (2002) *Neuropathologie*, 3rd. ed. Springer, Berlin: 363-364
69. Komori T, Scheithauer BW, Anthony DC, Rosenblum MK, McLendon ME, Scott RM, Okazaki H, Kobayashi M (1998) Papillary glioneuronal tumor: a new variant of mixed neuronal-glial neoplasm. *Am J Surg Pathol* 22 (10): 1171-83
70. Ishizawa T, Komori T, Shibahara J, Ishizawa K, Adachi J, Nishikawa R, Matsutani M, Hirose T (2006) Papillary glioneuronal tumor with minigemistocytic components and increased proliferative activity. *Hum Pathol* 37 (5): 627-30
71. Paulus W in Peiffer J, Schröder JM, Paulus W (Hrsg.) (2002) *Neuropathologie*, 3rd. ed. Springer, Berlin: 363
72. Quinn B (1998) Diagnosis of ganglioglioma. *J Neurosurg* 88 (5): 935-7
73. Quinn B (1999) Synaptophysin staining for ganglioglioma. *AJNR Am J Neuroradiol* 20 (3): 526-9
74. Williams BP, Read J, Price J (1991) The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell. *Neuron* 7 (4): 685-93
75. Makuria AT, Henderson FC, Rushing EJ, Hartmann DP, Azumi N, Ozdemirli M (2006) Oligodendroglioma with neurocytic differentiation versus atypical extraventricular neurocytoma: a case report of unusual pathologic findings of a spinal cord tumor. *J Neurooncol* 13
76. Zhang X, Cai J, Klueber KM, Guo Z, Lu C, Qiu M, Roisen FJ (2005) Induction of oligodendrocytes from adult human olfactory epithelial-derived progenitors by transcription factors. *Stem Cells* 23 (3): 442-53
77. Fujisawa H, Marukawa K, Hasegawa M, Tohma Y, Hayashi Y, Uchiyama N, Tachibana O, Yamashita J (2002) Genetic differences between neurocytoma and dysembryoplastic neuroepithelial tumor and oligodendroglial tumors. *J Neurosurg* 97 (6): 1350-5
78. Mrak RE, Yasargil MG, Mohapatra G, Earel J Jr, Louis (2004) Atypical extraventricular neurocytoma with oligodendroglioma-like spread and an unusual pattern of chromosome 1p and 19q loss. *Hum Pathol* 35 (9): 1156-9

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Andreas von Deimling für die freundliche Überlassung des Themas und die Zurverfügungstellung von Räumlichkeiten, Gerätschaften und Material.

Herrn Dr. med. Christian Hartmann für die detaillierten theoretischen Einführungen in die Thematik.

Frau Xiudan Xu und *Frau María Isis Atallah González* für die Heranführung an die allgemeine Laborarbeit und an die Technik des Western-Blots.

Frau Dorothea Kruppke und *Frau Kathrein Stichling* für die kenntnisreiche Anleitung bei der Anfertigung der Gewebeschnitte und der Immunhistochemie.

Herrn Matthias Könniker und *Herrn Dr. med. Ali-Fuat Okuducu* für die wertvollen Hinweise bei der Auswertung der Mikroskopie.

Frau Dr. rer. nat. Nikola Holtkamp und *Frau Prof. Dr. med. Gisela Stoltenburg* für die anregenden Diskussionen.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Sönke Heide, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „*Neuronale Differenzierung in Oligodendroglionen*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift