

Aus dem Med. Zentrum für Pathologie Abteilung für Neuropathologie
Direktor: Herr Prof.Dr.med.R.Moll

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Intermediärfilament- und GD₂-Expression in astrozytären Hirntumoren

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von
Barbara Lell, geb. Schneider aus Elz

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H.D. Mennel

1. Korreferent: Prof.Dr.R. Moll

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung und Problemstellung	1
I.1	Geschichtliche Entwicklung der Neuroonkologie und deren Problematik	2
I.2	Entdifferenzierung und Malignitätsbeurteilung bei Hirntumoren	5
I.3	Proliferationsmarker	7
I.4	Bedeutung und Bau der Ganglioside	9
I.5	Funktion der Ganglioside	11
I.6	Ziel der Arbeit	13
II.	Material und Methoden	15
II.1	Untersuchungsmaterial	15
II.2	Verwendete Reagenzien	17
II.3	Untersuchungsgang	18
II.4	Statistische Auswertung	21
III.	Ergebnisse	23
III.1	Beschreibung der GFAP und GD2 Expressionsmuster in den einzelnen astrozytären Hirntumoren	23
III.1.1	Astrozytom WHO Grad II	23
III.1.2	Astrozytom WHO Grad III	25
III.1.3	Glioblastoma multiforme	28
III.2	Statistische Darstellung der Ergebnisse	33
IV.	Diskussion	41
V.	Abbildungen und Abbildungslegenden	53
VI.	Zusammenfassung	58
VII.	Summary	60
VIII.	Anhang	62
IX.	Literaturverzeichnis	64

I. Einleitung und Problemstellung

Intrakranielle Tumoren sind zahlenmäßig bei den Krebserkrankungen gering vertreten. Ihr relativer Anteil an sämtlichen Tumoren beträgt bei Naffziger und Boldrey (1948) 2 %, in Untersuchungen von Ringertz et al. (1971) 3,2 % bzw. 3,1 % für Männer und Frauen in Schweden und bei Zülch und Mennel (1974) 1-2 %.

Die Inzidenz von Hirntumoren erweist sich in verschiedenen Studien als unabhängig von regionalen Bedingungen: aus „Cancer incidence in five continents (UICC 1966/1969)“ lassen sich für die einzelnen Kontinente verschiedene Inzidenzzahlen entnehmen (Zülch und Mennel 1974), die durch Unterschiede im Entwicklungsstand der jeweiligen Gesundheitssysteme bedingt sind. Auch die von Jänisch, Schreiber und Güthert (1988) aufgeführten Zahlen zur „Inzidenz primärer ZNS-Tumoren in verschiedenen Ländern“ schwanken zwischen 2,17 und 14,1 Neuerkrankungen pro 100 000 Personen im Jahr; in diesem Zusammenhang thematisieren die Autoren den Einfluß, den die Definition des Begriffs „primärer Tumor des ZNS“ auf die Inzidenz hat.

Trotz des insgesamt relativ niedrigen Anteils intrakranieller Tumoren an den Krebserkrankungen spielen sie aufgrund ihrer klinischen Malignität eine wichtige Rolle, da Hirntumoren jedweder Provenienz als wachsende Raumforderungen ohne Intervention zum Hirndruck und Hirntod führen.

Seitdem die Möglichkeiten bestanden, Tumoroperationen auch im intrakraniellen Raum erfolgreich durchzuführen, wurde deshalb die Beurteilung der Prognose für die Rechtfertigung der Eingriffe entscheidend. Die Beurteilung der Prognose bei Hirntumoren ging dabei im geschichtlichen Ablauf durch verschiedene Phasen: die konventionelle Histologie erlaubte eine Gewebebeschreibung, die mit den mittleren postoperativen Überlebensraten korreliert werden konnte. Die Entwicklung von neurohistologischen Spezialmethoden, Elektronenmikroskopie und weiteren morphologischen Methoden bis hin zur Immunhistochemie waren weitere Schritte, die für die Beurteilung der Wachstumstendenz und damit der Prognose von Hirntumoren bessere Definitionen erlaubten. Schließlich wurden mit dem Fortschreiten der molekularbiologischen Erkenntnisse und der Immunhistochemie Proliferationsmarker

definiert, die einen direkten Zugang zum „Proliferationsapparat“ und dessen Beurteilung möglich machten.

Neben den Mechanismen, die Ein- und Austritt in den Zellzyklus sowie dessen Ablauf bestimmen, waren aber als mögliche Proliferationsmarker doch prinzipiell solche Substanzen gefragt, die Proliferationssignale der Zelle von außen erhielten und umsetzten. Hierzu boten sich vor allem membranständige Proteine an, nicht zuletzt die große Gruppe der Ganglioside. Die hier vorgelegte Arbeit sucht in ihrer Zielsetzung, Ganglioside und Proliferation von gliösen Hirntumoren vergleichend zu untersuchen, kommt aber zu einem negativen Ergebnis bezüglich der Korrelation und Interaktion.

I.1 Geschichtliche Entwicklung der Neuroonkologie und deren Problematik

Eingriffe am Nervensystem setzen Grundkenntnisse in der Lokalisationslehre voraus: sobald die geschichtliche Entwicklung der Neurologie das Instrumentarium für die Lokalisation neurologischer Leistungen bereitstellen konnte, war die operative Entfernung intrakranieller Geschwülste prinzipiell möglich, wenn auch zunächst meist wenig erfolgreich (Bushe 1984, König 1984, Zülch 1984). Demgegenüber standen erste positive Ergebnisse wie etwa die gelungene Entfernung eines Rückenmarkstumors durch Victor Horsley 1887 in London (Gowers und Horsley 1888). Diese neurochirurgischen Eingriffe waren jedoch früher und sind zum Teil auch heute noch mit erheblichem Risiko für das Leben und die psychische und körperliche Integrität der Patienten verbunden. Dennoch fordert die klinische Malignität von ZNS-Tumoren die Intervention.

Die sich entwickelnde Neurochirurgie führte zur Notwendigkeit der Klassifikation und Prognosebeurteilung von intrakraniellen Tumoren. Wichtige Etappen waren die Zusammenarbeit von Harvey Cushing und Percival Bailey (Biencke 1982, Haymaker und Schiller 1970). Nach den Klassifikationsbemühungen Baileys, die unter Anlehnung an die spanische Schule von Santiago Ramon y Cajal erfolgten (Bailey und Cushing 1926) kam es relativ früh zu einer Zusammenarbeit des Neurochirurgen Cushing und des Neuropathologen Bailey, bei der die Prognoseeinschätzung eine wichtige Rolle spielte. Die Prognosen wurden anhand von Katamnesen als mittlere Überlebenszeiten konzipiert (Bailey und Cushing 1930). In der Folgezeit bestanden an allen neurochirurgischen Filialzentren (Stockholm, Köln, Vereinigte Staaten)

Bemühungen um vereinfachte Gradierungen (Zülch 1958). Bekannt geworden sind die Gradierungsschemata von Kernohan und Mitarbeitern (1949), Nils Ringertz (1950) und Zülch und Wechsler (1968). Die Vier-Grad-Einteilung von Kernohan et al. und die Drei-Grad-Einteilung von Ringertz beinhalten hinsichtlich der gliösen Tumoren bereits das Konzept eines fließenden Überganges von den gutartigen Formen zum Glioblastom. Das letzte Gradierungsschema von Zülch und Wechsler, das auf einer „horizontalen“ Viergradeinteilung der entsprechenden intrakraniellen Tumoren beruht, hat als Grundlage der Gradeinteilung der Klassifikation der WHO gedient (WHO 1979).

Dieser Gradeinteilung liegt folgende Überlegung zugrunde: die supratentoriellen Gliome des Erwachsenenalters (Astrozytom II, Oligodendrogliom II, Astrozytom III, Oligodendrogliom III und Glioblastom IV) bilden eine Entdifferenzierungsreihe. Vereinfacht gesagt sind supratentorielle Gliome der Gradierung II zellulär und geweblich isomorph, Gliome der Gradierung III zellulär polymorph, geweblich eher isomorph. Glioblastome sind zellulär und geweblich polymorph: man findet neben den unterschiedlichen Zell- und Zellkerngrößen sowie dem Auftreten von Riesenzellen Gefäß- und Bindegewebsproliferate und Nekrosen mit abortiven Reparationsvorgängen, den sogenannten Pseudopalisaden (Mennel 1988). Dabei scheint der Gefäßinduktion und Gefäßproliferation eine wichtige Rolle bei der Malignitätssteigerung zuzukommen (Scherer 1933). Diese Entdifferenzierungsreihe, die mit einer prognostischen Verschlechterung einhergeht, läßt sich zwanglos in drei Grade einteilen: bei den Gliomen II ist mit einer rezidivfreien Zeit von drei bis fünf Jahren zu rechnen, bei den Gliomen III von 1-3 Jahren und bei den Glioblastomen unter einem Jahr. Daraus ergibt sich eine vierte Gruppe von Tumoren, die nach vollständiger Entfernung nicht mehr oder erst nach mehr als fünf Jahren rezidivieren. Innerhalb dieser horizontalen Viergradeinteilung lassen sich dann empirisch nicht verwandte intrakranielle Tumoren vergleichen, die aufgrund ihrer inhärenten biologischen Benignität oder Malignität nach Entfernen nicht oder mit unterschiedlichen Zeitintervallen erneut wachsen.

Tabelle 1: Gradeinteilung und Prognose nach Zülch (1986)

Malignitätsstufe	Prognose	Tumoren extrazerebral	Tumoren intrazerebral
Grad I benigne	Heilung oder Überlebenszeit von fünf und mehr Jahren	Meningeome Neurinome Hypophysenadenome Kraniopharyngeome	Spongioblastome Ventrikelependymome Plexuspapillome temporobasale Gangliozytome Angioblastome
Grad II semibenigne	Überlebenszeit drei bis fünf Jahre		isomorphe Astrozytome isomorphe Oligo- dendrogliome Großhirnependymome übrige Gangliozytome
Grad III semimaligne	Überlebenszeit ein bis drei Jahre	Entartete Meningeome Entartete Neurinome	polymorphe Astrozytome Oligodendrogliome Ependymome Plexuspapillome Gangliozytome
Grad IV maligne	Überlebenszeit sechs bis zwölf Monate	Epidurale Retikulum- zellsarkome Fibrosarkome der Dura Arachnoidalsarkome des Kleinhirns	Medulloblastome (Retinoblastome) Glioblastome primäre Hirnsarkome

Die im Jahre 2000 neu aufgelegte WHO-Klassifikation behält dieses Schema einer Entdifferenzierung der supratentoriellen Gliome des Erwachsenenalters bei und belegt dies durch die eindrucksvollen molekulargenetischen Befunde, die bei diesen Tumoren im Wege der Entdifferenzierung erhoben werden. Ähnlich verfährt die neue WHO-Klassifikation tentativ auch mit den Meningeomen (Kleihues und Cavenee 2000). Damit beruht die morphologische Einschätzung der supratentoriellen Gliome des Erwachsenenalters auf der zunehmenden zellulären und geweblichen Entdifferenzierung. Die prognostische Einschätzung anderer Tumoren, die empirisch damit verglichen werden, stützt sich auf die Beurteilung des jeweiligen Gewebsbildes. Zelluläre und gewebliche Isomorphie oder Polymorphie spielen hier nicht unbedingt eine Rolle. Es gibt andere Kriterien wie beispielsweise die Mitoserate oder auch das Auftreten pathognomonischer Strukturen (z.B. Rosenthal'sche Fasern beim pilozytischen Astrozytom), die für die diagnostische und damit auch prognostische Einordnung entscheidend sind.

I.2 Entdifferenzierung und Malignitätsbeurteilung bei Hirntumoren

Immerhin steht somit die prognostische Einstufung bei den supratentoriellen Gliomen direkt und bei den anderen Tumoren eher indirekt mit dem Differenzierungsgrad in Verbindung. Differenzierungsstufen und Malignität stehen in der allgemeinen Pathologie in einem zwar losen aber immer angenommenen reziproken Verhältnis. Differenzierung bedeutet Ausbildung der zur Funktion nötigen genetischen Anlagen unter Verhinderung der übrigen genetisch gesteuerten Aktivitäten.

Entdifferenzierung bedeutet Lockerung der genetischen Festlegung auf die jeweils spezifischen Funktionen. Morphologisch entspricht der Differenzierung eine Organnähe, während eine Entdifferenzierung als morphologische Anaplasie bezeichnet wird: die Tumorzellen verlieren mehr und mehr die charakteristischen morphologischen Eigenschaften, an denen ihre Funktion festgemacht werden kann und gleichen dann eher zellulären Vorstufen oder ganz undifferenzierten embryonalen Zellen (Bailey 1932). Die reziproke Korrelation zwischen Proliferation und Differenzierung ist deshalb nur lose, weil der genetische Apparat der Zelle für die Proliferation (Zellteilung) und für die Differenzierung bzw. Entdifferenzierung getrennt gehalten werden muß. Dadurch kann sichergestellt werden, daß auch hoch differenzierte Zellen nötigenfalls relativ rasch proliferieren können (Darmepithel, Haut), während eine funktionelle Entdifferenzierung nicht in jedem Falle mit einer gesteigerten Proliferation einhergehen muß. Trotzdem stehen Proliferation und Entdifferenzierung in einem statistischen Zusammenhang, da im Verlauf der Anaplasie immer mehr genetische Loci aktiviert werden, unter denen statistisch gesehen proportional auch solche betroffen sind, die die Proliferation regeln.

Als Musterbeispiel einer solchen Entdifferenzierung können die gliösen Tumoren angesehen werden, die, wie schon erwähnt, die allgemeine Bezugsgröße für die von Zülch konzipierte und derzeit durch die Klassifikationsbemühung der WHO festgelegte Gradeinteilung darstellen. Bei den gliösen astrozytären Tumoren läßt sich bei den supratentoriellen Gliomen des Erwachsenenalters II-IV eine zunehmende Anaplasie histologisch begründen. Die Ergebnisse der letzten Jahre konnten diese schrittweise Zunahme an Malignität durch eine zunehmende Veränderung an molekularbiologischen Parametern belegen (Kleihues und Ohgaki 1997). Es hat sich zunächst gezeigt, daß die ältere Auffassung, nach der Glioblastome sowohl primär entstehen können als auch sekundär über Vorstufen relativ gutartiger Gliome auftreten, bestätigt werden konnte

(Watanabe et al 1996). Dabei zeigten sich bei diesen beiden unterschiedlichen Entwicklungsformen der Glioblastome verschiedene und sich möglicherweise ausschließende kinetische Veränderungen.

Bei der sekundären Glioblastomentwicklung scheint die Mutation des P-53 Tumorsuppressorgens zu Beginn der Entwicklung der noch niedermalignen Form eine entscheidende Rolle zu spielen (Nigro et al 1989). Das voll ausgeprägte sekundäre Glioblastom ist dann gekennzeichnet durch den Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 10 (von Deimling et al 1993). Als Genort für die maligne Entwicklung wurde das Gen PTEN (MMAC 1) identifiziert (Steck et al 1997). Allerdings weisen neuere Befunde darauf hin, daß dieses Ereignis häufiger in primären de novo Glioblastomen auftritt (Kleihues und Cavenee 2000). Dies schmälert jedoch nicht die Tatsache, daß bei der Entwicklung von gutartigen Gliomen WHO Grad II des Erwachsenenalters zum malignen Glioblastom eine ganze Kaskade von Veränderungen abläuft, die sowohl morphologisch fassbar ist als auch als schrittweise genetische Veränderung diesen morphologisch beschreibbaren Gewebs- und Zelleigenschaften zugrunde liegt. Hier besteht nur noch die entscheidende Lücke zwischen den genetischen Veränderungen und den phänotypischen Ausstattungen der entsprechenden Tumoren. Die Brücke zwischen dem, was passiert und dem, was man sieht, ist noch nicht geschlagen.

Genetische Veränderungen wirken sich sowohl auf die strukturelle Proteinausstattung der Zellengewebe, in unserem Fall der Tumoren, als auch auf deren Funktionen aus. Die wichtigste Funktion im Bereich des Tumorwachstums ist die Dynamik der Zellteilung. Es gab somit Bemühungen im Bereich der Proteinausstattung sowohl bei den Strukturproteinen als auch beim Reproduktionsapparat zu suchen.

Wesentliche Konstituenten astrozytärer Tumoren sind die astrozytären Intermediärfilamente, die im praktischen pathologisch-diagnostischen Vorgehen eine nicht mehr wegzudenkende Rolle bei der Identifikation astrozytärer Tumoren spielen (Eng et al 1971, Eng und Rubinstein 1978). Ein gewisser Zusammenhang zwischen der Ausbildung astrozytärer Intermediärfilamente aber auch des Vorläuferproteins Vimentin und der Malignität wurde gelegentlich berichtet (Morimura et al 1996). Er scheint jedoch nicht verlässlich zu sein. Eine geringgradige Verminderung der GFAP-Positivität

mit zunehmender Malignität geht auch aus einer neueren vergleichenden Untersuchung an Gliomen unterschiedlicher Grade hervor (Benes et al 2004).

Obwohl diese Untersuchungen an Strukturprotein keine durchgehend verlässliche Korrelation aufzeigen konnten, bleibt das Auffinden einer Interaktion zwischen genetischen Veränderungen und Strukturausstattung einer Tumorzelle ein Desiderat; zunächst aber zeigte sich eine mögliche Lösung auf einem anderen Wege.

I.3 Proliferationsmarker

Es war deshalb ein erheblicher Fortschritt, als morphologische Proliferationsmarker auf zytologischer Basis bekannt wurden: es sind im Kern oder Zytoplasma nachweisbare Proteine, die nur während eines Teils des Zellzyklus ihre Expression finden. Es handelt sich um Peptide, die nicht mit der Funktion der Zelle verknüpft sind, sondern nur mit den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Von diesen sogenannten Proliferationsmarkern sind vor allem bekannt geworden:

1. Das Protein Ki-67
2. PCNA (Proliferative cell nuclear antigen)
3. AgNOR

Gerdes et al. beschrieben 1983 den monoklonalen Antikörper Ki-67 der Maus als gegen ein in proliferierenden Zellen nachweisbares Kernantigen gerichtet, das bei Zellen in der Ruhephase nicht nachgewiesen werden konnte. Sie sicherten die Expression des Nucleoproteins Ki-67 in sämtlichen Zellzyklusphasen (G1, S, G2 und M-Phase) mit Ausnahme der Ruhephase G0 (Gerdes et al. 1984). In der Folge erwies sich der monoklonale Antikörper Ki-67 als geeigneter Proliferationsmarker in der Tumordiagnostik, auch in der Neuroonkologie; dort wurde eine enge Korrelation zwischen dem Ki-67 Markierungsindex, d.h. der Zahl positiv gefärbter Kerne zur Gesamtkernzahl, und der histologischen Malignität der untersuchten Hirntumoren gefunden (Burger et al. 1986, Giangaspero et al. 1987, Ostertag et al. 1987, Zuber et al. 1988). Bei Einsatz der immunhistochemischen Ki-67 Methode besteht jedoch insbesondere für die astrozytären Gliatumoren das Problem der Trennschärfe: unterschiedliche Malignitätsstufen zeigten überlappende Ergebnisse und innerhalb derselben Malignitätsstufe ergab sich eine große Ergebnisheterogenität (Deckert et al. 1989, Plate et al. 1990). Das Verfahren war lange Zeit nur für frische Gewebeproben

wie beispielsweise Gefrierschnitte oder Quetschpräparate geeignet. Inzwischen ermöglicht die Entwicklung der Antikörper MIB 1 und MIB 3 auch den Nachweis des Ki-67 Antigens an routinemäßig fixierten Paraffinschnitten nach kurzer Mikrowellenvorbehandlung (Cattoretti et al. 1992, Gerdes et al. 1992).

Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) ist ein saures, in seiner Expression zellzyklusabhängiges Nucleoprotein. Es erreicht seine höchste intranukleäre Konzentration während der späten G1 und der frühen S-Phase (Schwechheimer 1990), wobei ausreichend hohe Werte offensichtlich für die DNS-Synthese von Bedeutung sind. PCNA wird in geringen Mengen auch in anderen Phasen des Zellzyklus gefunden und kann sogar in ruhenden, teilungsfähigen Zellen nachgewiesen werden. Sein Einsatz als Proliferationsmarker beruht auf dem Anstieg kurz vor und während der DNS-Synthesephase, der mit einer Akkumulation der entsprechenden mRNA verbunden ist (Hall et al. 1990). Man nimmt an, dass PCNA und Cyclin identisch sind, da sie in verschiedenen Untersuchungen analoge Eigenschaften zeigten (Mathews et al. 1984). Unterschiedliche PCNA Antikörper ermöglichen seinen Nachweis an Gefrierschnitten und in paraffineingebettetem Gewebe.

Nucleolus organisierende Regionen (NORs) sind repetitive DNA-Abschnitte, die ribosomale RNA (rRNA) codieren und beim Menschen in den kurzen Armen der fünf akrozentrischen Chromosomen lokalisiert sind (Crocker 1990). Mit Hilfe einer Silber-Färbemethode lassen sich im Interphasekern NOR-assoziierte Proteine (AgNORs) nachweisen, deren Natur bisher noch ungeklärt ist (Crocker und Nar 1987). Da die Anfärbung dieser AgNORs jedoch an die aktive Transkription der rDNA Gene gebunden ist, besteht letztlich ein enger Zusammenhang zur nachfolgenden Ribosomenstruktur und Proteinsynthese. Daraus leitet sich die Eignung von Nucleolus organisierenden Regionen assoziiertem Protein als Proliferationsmarker ab, da das Ausmaß der AgNOR Anfärbung die zelluläre Aktivität und Proteinsynthese widerspiegelt.

Untersuchungen an primären und rezidivierenden Gliomen mittels der argyrophilen NOR Technik (Howell und Black 1980, Ploton et al. 1986) ergaben in den meisten Fällen eine positive Korrelation zwischen der AgNOR Anzahl und der Malignitätszunahme der primären Tumoren gemäß WHO-Gradierung (Kajiwara et al.

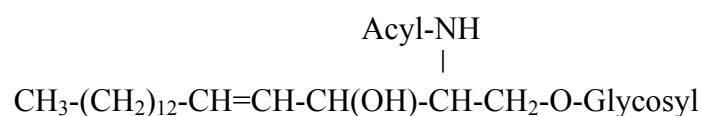
1990, Plate et al. 1990, Hara et al. 1991) sowie zusätzlich für die Rezidive mit wenigen Ausnahmen höhere AgNOR Werte als für die Primärtumoren (Engel et al. 1994).

Einzelne Studien weisen nur einen geringen positiven Zusammenhang aus (Maier et al. 1990). Das Problem der Trennschärfe zwischen den einzelnen Graden der Gliome durch überlappende AgNOR Werte in unterschiedlichen Malignitätsstufen zeigte sich sowohl bei der Auswertung von Quetschpräparaten als auch von paraffineingebettetem Gewebe, so daß der Einsatz dieser Methode im Einzelfall, analog dem Ki-67, begrenzt ist. Die grundsätzliche Eignung von AgNOR als Proliferationsmarker bestätigten Mennel und Rickert (1994) an einem experimentell erzeugten Proliferationsmodell von Nervengewebe.

I.4 Bedeutung und Bau der Ganglioside

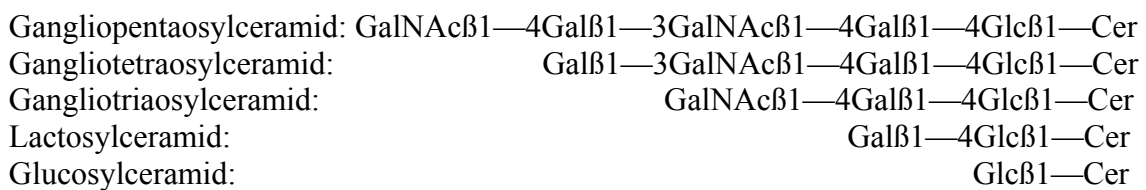
Die Ganglioside wurden 1936 erstmals von Ernst Klenk im Hirngewebe entdeckt. Er nahm eine fast ausschließliche Lokalisation dieser Glykosphingolipidgruppe im Nervengewebe an (Klenk und Langerbeins 1941). Inzwischen ist deren Vorkommen in sämtlichen Zellmembranen, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration, gesichert.

Ganglioside sind saure Glykosphingolipide, die aus einem Ceramid und einer Kohlenhydratkette mit wechselnder Zuckeranzahl und –zusammensetzung bestehen. Das Ceramid setzt sich aus einer Fettsäure und dem Aminoalkohol Sphingosin zusammen; die Kohlenhydratkette enthält eine oder mehrere Sialinsäuren (beim Menschen N-Acetylneuraminsäure oder 9-O-acetyl-N-Acetylneuraminsäure), woraus sich der Säurecharakter ergibt. Die Grundstruktur ist folgendermaßen:



Je nach Zusammensetzung der Kohlenhydratkette werden drei Gruppen höherer Ganglioside unterschieden, nämlich solche der Ganglio-, Globo- und Lactoreihe. Der Glycosylrest beginnt in allen drei Gruppen am Ceramid mit Glucose und daran anschließender Galaktose; in der Ganglioreihe setzt er sich, im Unterschied zu den beiden anderen Gruppen, bis zur 5-zuckerigen Kohlenhydratkette mit den Molekülen

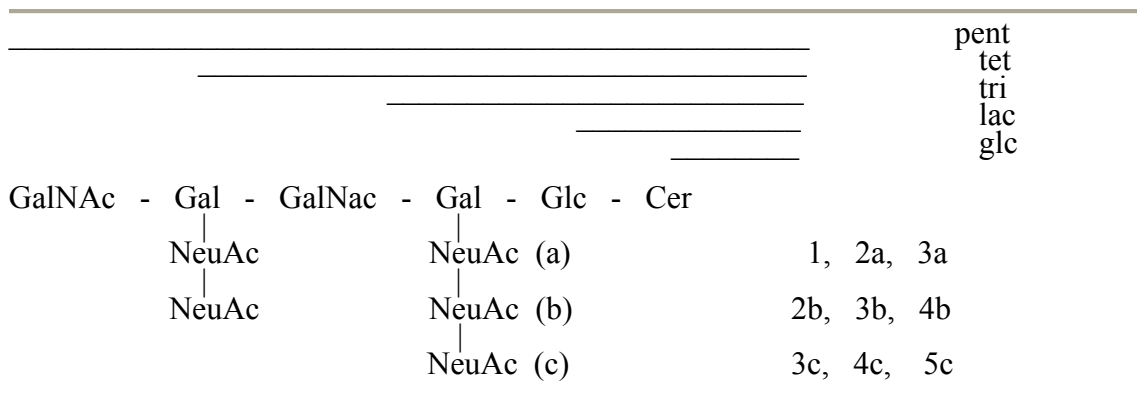
N-Acetylgalaktosamin, Galaktose und erneut N-Acetylgalaktosamin fort. An die Zucker können eine oder mehrere N-Acetylneuraminsäuren geknüpft sein. Diese sind bei der Galaktose an das 3-er, beim N-Acetylgalaktosamin an das 6-er Kohlenstoffatom gebunden. Ausgehend vom Pentahexosid ergibt sich folgende Abbaureihe der Gangliosidzuckerkette:



Entsprechend der Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Biochemistry (1977; siehe Svennerholm 1988) werden die Ganglioside unter Berücksichtigung des Sialinisierungsgrades als Y-sialo-Xosyl-ceramide bezeichnet. Y steht dabei für die Zahl der Sialinsäuren, X für die Gruppenzugehörigkeit und Länge der Kohlehydratkette. Demnach lauten die Bezeichnungen der Gangliogruppe Mono-, Di-, Tri- ... sialo-glucosylceramid, -lactosylceramid, -gangliotriaosylceramid, -gangliotetraosylceramid und -gangliopentaosylceramid. Die Nomenklatur der Globo- und Lactoreihe wird analog gebildet. Hier finden die Svennerholmschen Abkürzungen (1988) Verwendung.

Demgegenüber stehen folgende, von Wiegandt (1984) vorgeschlagene Abkürzungen:

G steht für die Zugehörigkeit zur Gangliogruppe, Gb zur Globo-, Lc zur Lacto- und nLc zur Lactoneoserie. Ein nachfolgender Index charakterisiert die neutrale Zuckerstruktur mit glc (Glucose), gal (Galaktose), lac (Laktose), tri (Triaose), tet (Tetraose) und pent (Pentaose). Daran schließt sich die Zahl der Sialinsäuren an (1-5) und eventuell a oder b zur Unterscheidung positioneller Sialinsäureisomere. Demnach zeigt die Gangliogruppe schematisch folgende Struktur, wobei der Sialinisierungsgrad variabel ist:



Svennerholm gibt zunächst die Gruppenzugehörigkeit (G, Gb, Lc, nLc) an; dann folgt ein Index, der mit M, D, T, Q, P die Zahl der Sialinsäuren (1-5), mit 1 bis 4 die

Abbaustufe der 5-er Zuckerkette (1 = tetraosyl, 2 = triaosyl, 3=lactosyl, 4=glucosyl) und mit a und b die Position der Sialinsäureisomere kennzeichnet.

Im Vergleich sind die hier relevanten Ganglioside folgendermaßen abgekürzt:

Wiegandt	Svennerholm
G _{lac} 1	GM ₃
G _{lac} 2	GD ₃
G _{tri} 1	GM ₂
G _{tri} 2	GD ₂
G _{tet} 1	GM ₁
G _{tet} 1a	GM _{1a}
G _{tet} 1b	GM _{1b}
G _{tet} 2a	GD _{1a}
G _{tet} 2b	GD _{1b}
G _{tet} 3a	GT _{1a}
G _{tet} 3b	GT _{1b}

I.5 Funktion der Ganglioside

Nach allgemeiner Anschauung sind Ganglioside überwiegend auf der Zellmembran, in geringen Mengen auch in intrazellulären Membranstrukturen lokalisiert. Die hydrophilen Zuckerketten ragen in das Interstitium während der hydrophobe Ceramidanteil in der äußeren Hälfte der Plasmamembran sitzt. Intrazelluläre Organellenmembranen bestehen aus einer Doppelschicht von Glykosphingolipiden, wobei die lipophilen Ceramidanteile einander zugewandt sind und die hydrophilen Kohlenhydratketten im wässrigen Äußeren bzw. Inneren der Organellen liegen (Hakomori 1986).

Die Funktion der Ganglioside auf der Zellmembran ist letztlich nicht geklärt. Sie gelten als entwicklungspezifisch im Bereich der Phylo- und Ontogenese (Wiegandt 1984). Ferner kommt ihnen Bedeutung bei der Charakterisierung der Organzugehörigkeit sowie bei Wachstum, Teilung und Differenzierung der Zelle zu (Hakomori 1981). Für die Funktion der Ganglioside an der Zellmembran ist ihr Sialinisierungsgrad bedeutsam, da mit wachsender Anzahl von negativ geladenen N-Acetylneuraminsäureresten die Polarität der Moleküle zunimmt und somit die Möglichkeit zur Interaktion mit Kationen (z.B. Ca⁺⁺) oder Polyelektrolyten.

Ganglioside treten an der Zelloberfläche mit verschiedenen biologisch wichtigen Substanzen in Wechselwirkung, z. B. Interferon, Interleukin und Glykoprotein-

hormonen. Sie stellen einen Angriffspunkt für Krankheitserreger bzw. deren Toxine dar, wie etwa das Sendai Virus oder Botulinus Toxin. Eine spezifische Rezeptorfunktion besitzt GM₁ für Cholera Toxin (Hakomori 1986).

Besonders komplexe Ganglioside sind in den Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems angereichert. Phylogenetisch geht die Entwicklung höherer Nervensysteme mit einer Konzentrationszunahme der Ganglioside einher. Für die funktionelle Neuronendifferenzierung sprechen Rahmann und Rahmann (1988) den Gangliosiden den Stellenwert von Markersubstanzen zu. Demnach sind die einzelnen Schritte der Neuronendifferenzierung mit bestimmten Mustern der Gangliosidbiosynthese verknüpft:

- „Die **Phase der Zellteilung und –wanderung**, vor allem der frisch gebildeten Neurone, ist charakterisiert durch eine besonders intensive Biosynthese des relativ einfach gebauten Disialogangliosids GD₃.
- Die **Phase des Faserwachstums, der Sprossung und Verzweigung der Neurone** ist verbunden mit der Bildung sehr polar gebauter Tetra- (GQ_{1b}), Penta- (GP_{1c}) und höher sialylierter Ganglioside.
- Die **Phase** des sogenannten **Wachstumsspurts** der Neurone ist verbunden mit der **Synapsenbildung**; sie wird angezeigt durch eine verstärkte Synthese vom Disialogangliosid GD_{1a} bei Säugern und Vögeln bzw. vom Trisialogangliosid GT_{1b} bei Fischen.
- Die die Neurogenese abschließende **Phase der Myelinisation**, also der Markscheidenausprägung, wird charakterisiert durch eine vermehrte Bildung von zwei relativ einfach gebauten Monosialogangliosiden (GM₁ und GM₄).
- Während der **Seneszenzphase** verschiebt sich schließlich bei Säugern das Gangliosidmuster in einzelnen Hirnregionen, z. B. in der Großhirnrinde (Cortex) wieder zugunsten polarer Fraktionen, was zustande kommt durch einen starken Abbau des GD_{1a}-Gangliosids.“ (Rahmann und Rahmann 1988, S.47-48)

Verschiedene in vitro Untersuchungen, z. B. an Motoneuronen der Ratte (Gorio et al. 1980), sensiblen Ganglienzellen von Kükenembryonen und einer Neuroblastomzelllinie (Roisen et al. 1981) zeigen, dass Ganglioside die axonale Aussprossung nach Nervenläsionen beschleunigen und verstärken; sie sind für die Ausbildung neuromuskulärer Verbindungen bedeutsam (Obata et al. 1977). Laut Rahmann und Rahmann (1988) führen exogen zugeführte Gangliosidgemische in primären Nervenzellkulturen unterschiedlicher Herkunft und in Kulturen von Neuroblastomzellen zu einer Verlängerung der Zellüberlebenszeit (neurotropher Effekt) und einer Verstärkung des Nervenfaserswachstums (neuritogener Effekt).

Eine Schlüsselstellung nehmen die Ganglioside mit großer Wahrscheinlichkeit als Neuromodulatoren bei der synaptischen Informationsübertragung (Frieder und Rapport 1981) und der längerfristigen Gedächtnisbildung ein. Aufgrund von in vitro Untersuchungen an künstlichen Membranen stellen Rahmann und Rahmann(1988) als Hauptmechanismus dieser Funktionen eine Interaktion zwischen Gangliosiden und Ca⁺⁺

an der Membranoberfläche im synaptischen Spalt heraus. In dem entwickelten Funktionsmodell kontrollieren Ca^{++} -Gangliosidkomplexe, die reichlich in der Synapsenmembran vorhanden sind, die Öffnung und Schließung von Ionenkanälen.

Aus den bisher beschriebenen Funktionen der Ganglioside leiten Rahmann und Rahmann deren Mitwirkung bei der längerfristigen Gedächtnisbildung zusammengefaßt wie folgt ab:

Tabelle: Übersicht über die Abfolge der wichtigsten an einer Gedächtnisbildung durch molekulare Bahnung in Synapsen mit Hilfe von Gangliosiden beteiligten Einzelschritte (Rahmann und Rahmann 1988, S. 283)

-
1. Adaptive Änderung der Biosynthese einzelner Ganglioside während charakteristischer Phasen der **Neuronendifferenzierung**
 2. Funktionelle Beteiligung von Gangliosiden bei der **Zell-zu-Zell-Erkennung** und beim **Zellkontakt**
 3. Bildung lokaler, noch labiler **Synapsen** unter funktioneller Beteiligung von Ca^{2+} -Gangliosid-Komplexen
 4. Bei Auftreten von elektrischen Erregungsimpulsen (= Änderung von elektrischen Feldstärken) erste Funktionsnahme (= **Transmission**) einer labilen Synapsenanlage durch Konformationsänderungen von Gangliosiden infolge der Dissoziation von Ca^{2+} von Gangliosidbindungsstellen, hierdurch u. a. Viskositätsänderungen sowie Aktivierungen von Kanal- und Rezeptormolekülen in den prä- und postsynaptischen Membranen
 5. Ausprägung eines **Kurzzeitgedächtnisses** durch wechselseitige Verstärkung der aktivitätsbedingten Konformationsänderungen der Ganglioside und der damit korrelierten Änderung von synaptischen Funktionsproteinen
 6. Nach wiederholter gleichartiger Stimulation Ausprägung eines **Langzeitgedächtnisses** in beteiligten neuronalen Bahnungsketten durch molekulare Rückkoppelung von den Synapsenmembranen zum Zellkörper mit Hilfe des retrograden Transports; im Zellkörper Aktivierung von Effektor- und Regulatorgenen zur Synthese solcher Substanzen, die mit Hilfe des anterograden Transports zur Synapse geschleust werden, um dort eine funktionelle Stabilisierung der Synapse zu gewährleisten bzw. die Effizienz von Funktionsproteinen (Ionenkanäle, Rezeptorproteine) zu steigern

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die Möglichkeit der Gangliosidzusammensetzung bei menschlichen Hirntumoren als Parameter ihres biologischen Verhaltens zu untersuchen. Zum Verständnis dieses Vorgehens mussten hier Bau und Funktion der Ganglioside besprochen werden.

I.6 Ziel der Arbeit

Die bis jetzt durchgeführte Klassifikation und Gradierung astrozytärer Hirntumoren nach histologischen Gesichtspunkten und empirischen Daten wird wohl zunehmend durch eine molekularbiologisch fundierte Einteilung abgelöst werden. Allerdings kann auch eine Einteilung, die ausschließlich den Genotyp der zugrunde liegenden Schädigung berücksichtigt, zu größeren Überlappungen führen. Der Weg von der

Genetik zur Funktion bzw. deren Störung ist teils unbekannt, teils störanfällig. Somit steht derzeit weniger das Genom als die Proteinausstattung im Zentrum des Interesses.

Sieht man von der direkten genetischen Steuerung der Proliferation ab, so kommen vor allem Substanzen als Proliferationsmarker infrage, die entweder in den Zellzyklus eingreifen oder mit der histomorphologischen Differenzierung und Entdifferenzierung parallel gehen.

Hier bieten sich im Wesentlichen zwei Klassen von Substanzen an:

1. Proteine, die strukturell eng mit der Differenzierung einer Zelle verbunden sind.
Dies sind bei Astrozyten die Strukturproteine die das Zytoskelett bilden und inzwischen auch zur diagnostischen Sicherung einer astrozytären Zelle herangezogen werden, wie das saure Gliafaserprotein. Es ist offenbar eines der Hauptbestandteile der astrozytenspezifischen Intermediärfilamente.
2. Stoffe, die für den Informationsfluss übergeordneter, die Proliferation und Zellausstattung regulierender Zentren verantwortlich sind. Hier kommen vor allem membranständige Rezeptoren und Modulatoren in Frage. Zur letzteren Gruppe werden die Ganglioside gezählt.

Somit war das Ziel der Arbeit, in der Ausstattung unterschiedlich gradierte Astrozytome bis hin zum Glioblastom mit Gangliosiden, hier am Beispiel des GD₂, und vergleichend mit Intermediärfilamenten zu untersuchen. Danach sollte eine mögliche Aussage getroffen werden, ob die Gangliosidausstattung mit dem Entdifferenzierungsgrad nach WHO, der immer noch – nach histomorphologischen Gesichtspunkten beurteilt – das Hauptkriterium der Tumorgradierung darstellt, zu korrelieren ist. Da es sich zeigte, dass die immunhistochemische Darstellung der Ganglioside in astrozytären Tumoren keineswegs auf die Zellmembran beschränkt war, war die naheliegende Frage zu stellen, ob Ganglioside mit Intermediärfilamenten colokalisiert sind und damit sowohl dem Verteilungsmuster an Intermediärfilamenten, wie dies oben schon dargestellt wurde, als auch dem der Ganglioside am Beispiel der GD₂-Expression eine Beziehung zur Malignität zukommt.

II. Material und Methoden

II.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 28 Tumoren untersucht, davon 6 Astrozytome WHO Grad II, 7 Astrozytome WHO Grad III und 15 Glioblastome. Die Geschlechtsverteilung Männer:Frauen war 17:11, das Durchschnittsalter 52,1 Jahre. Die Männer lagen mit einem Altersmittelwert von 49,8 Jahren 6 Jahre unter dem der Frauen mit 55,8 Jahren. Das älteste Stichprobenmitglied war eine 76-jährige Patientin mit einem supratentoriell gelegenen Astrozytom WHO Grad III, das jüngste ein 6-jähriger Junge mit einem supratentoriell gelegenen fibrillären Astrozytom WHO Grad II (in Verbindung mit einem Gangliogliom). Die größte Altersgruppe bildeten 10 Tumorträger zwischen 51 und 60 Jahren, die zweitgrößte 7 Tumorträger zwischen 61 und 70 Jahren. Die Lokalisation war in sämtlichen Fällen supratentoriell.

Die immunhistochemische Untersuchung der astrozytären Hirntumoren erfolgte von Oktober 1990 bis März 1991 am Zentrum für Pathologie, Abteilung Neuropathologie, der Universitätsklinik Marburg. Es wurden aus dem an der Abteilung vorhandenen Tumorregister sämtliche in chronologischer Reihenfolge gespeicherten Fälle astrozytärer Hirntumoren WHO-Grad II-IV der Jahre 1988-1990 einbezogen. Dabei handelte es sich zunächst um 71 Tumoren. Da die Diagnosestellung in einigen Fällen mittels Stereotaxie oder unter Verbrauch des gesamten bioptischen Materials erfolgt war, standen letztlich 34 Tumoren zur histologischen Bearbeitung zur Verfügung. Von diesen wurden 44 Präparateserien hergestellt. Nach Anlegen der methodischen Ausschlusskriterien (siehe S.17, letzter Abschnitt) bildeten letztlich 33 Präparateserien die Stichprobe; diese sind aus insgesamt 28 Tumoren hergestellt worden.

Die diagnostische Aufgliederung der Stichprobe ist folgendermaßen:

- Astrozytom WHO Grad II: 6 Präparateserien
- Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III: 7 Präparateserien
- Glioblastoma multiforme WHO Grad IV: 20 Präparateserien

Jede Präparateserie besteht aus 5 Präparaten, einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung, einer Negativkontrolle sowie den immunhistochemischen Darstellungen von saurem Gliafaserprotein (GFAP), Vimentin (Vim) und Glykosphingolipid GD₂.

In 21 Fällen wurden sämtliche Präparate einer Serie aus einem Gewebsblock, der nativ in 4%-igem, gepuffertem Formalin fixiert bzw. asserviert worden war, hergestellt.

In 12 Fällen war das Biopsiematerial aus technischen Gründen jeweils in 2 Blöcke geteilt worden:

- Der erste Gewebsblock wurde wie oben in 4%-igem, gepuffertem Formalin fixiert und anschließend zur Anfertigung der HE-Färbung, der Negativkontrolle und der GD₂-Färbung verwendet.
- Der zweite Gewebsblock wurde nativ eingefroren, zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut und zur Herstellung der GFAP- und Vimentin Präparate verwendet.

Natives oder aufgetautes Biopsiematerial wurde in gepuffertem 4 %-igem Formalin fixiert bzw. asserviert. Zur Weiterbearbeitung erfolgte Wässern unter fließendem Leitungswasser und anschließendes Entwässern über die aufsteigende Acetonreihe (Aceton 30 %: ½ Std.; Aceton 60 %: ½ Std.; Aceton 90 %: 1 Std.; Aceton 100 %: 1 Std.). Die 12 tiefgefrorenen Gewebsblöcke, die der späteren Herstellung von GFAP und Vimentin Präparaten dienten, wurden über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert (Alkohol 70 %: 5 min.; Alkohol 96 %: 10 min.; Alkohol 100 %: 10 min.), die übrige Gewebsbehandlung war gleich.

Die Klärung erfolgte in Xylol (16 Std.). Nach anschließender Paraffineinbettung wurden mittels Mikrotom 4µm dicke Schnitte hergestellt und auf mit Poly-L-Lysin vorbehandelte Objektträger aufgezogen. Nach Beschriftung der Präparate wurden folgende Färbungen pro Präparateserie durchgeführt:

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Immunhistochemische GFAP-Färbung mit der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Methode
- Immunhistochemische Vimentin-Färbung mit der PAP Methode
- Immunhistochemische Färbung von Glykosphingolipid GD₂ mit der Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode
- Negativkontrolle mit der APAAP Methode

II.2 Verwendete Reagenzien

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

- Entparaffinieren: Objektträger über Nacht bei 37°C im Brutschrank abschmelzen; zur Entfernung des Paraffins 10 min. in Xylol stellen
- Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (Alkohol 100 %:10 min.; Alkohol 96 %:10 min.; Alkohol 70 %:5 min.; spülen in aqua dest.)
- Objektträger 10 min. in Meyers Hämalaun stellen, kurz in aqua dest. spülen und 15 min. in Leitungswasser bläuen
- Objektträger 5 min. in Eosin stellen, spülen in aqua dest.
- Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe (Alkohol 70 %:5 min.; Alkohol 96 %:10 min.; Alkohol 100 %:10 min.) und 10 min. in Xylol stellen
- Eindecken mit Corbit Balsam

Immunhistochemische GFAP bzw. Vimentin Färbung mit der PAP Methode:

Verwendete Reagenzien:

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer):

Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8,00 g
aqua dest.	1000 ml
pH 7,3 einstellen	
- 3,3 Diamino-Benzidin (DAB)-Tetrahydrochlorid, reinst, 100 mg, Firma Serva
- Wasserstoffperoxid 30 %-ig (30 %-iges H₂O₂)
- Methanol
- Normalrinderserum (NRS) 100 ml, Firma Seromed; NRS wird im Wärmebad ½ Stunde bei 56°C inaktiviert
- 1 %-iges Normalrinderserum (1% NRS): NRS verdünnt mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:99

Antiseren:

Saures Gliafaserprotein Antikörper (GFAP-Ak): monoklonaler spezifischer Maus-anti-Human GFAP-Ak, Firma Dakopatts

- Maus IgG Konzentration in der handelsüblichen Lösung: 161 µg/ml
- verwendete Primärantikörperlösung: handelsübliche Lösung verdünnt 1:100 mit 1 % NRS

Vimentin Antikörper (Vim-Ak): spezifischer monoklonaler Maus-anti-Vimentin Antikörper; Firma boehringer mannheim

- handelsübliches Lyophilisat gelöst in 2 ml aqua dest. ergibt eine Antikörperkonzentration von 20 µg/ml
- verwendete Primärantikörperlösung: in 2 ml aqua dest. gelöstes Lyophilisat verdünnt 1:10 mit 1 % NRS

Erster Brücken-Antikörper: Kaninchen-anti-Maus IgG (polyklonal); Firma Dakopatts Nr. Z259

- verwendete Verdünnung 1:100 mit 1 % NRS

Zweiter Brückenantikörper: Schwein-anti-Kaninchen IgG (polyklonal); Firma Dakopatts Nr. Z196

- verwendete Verdünnung 1:50 mit 1 % NRS

Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex (PAP) vom Kaninchen (polyklonal); Firma Dakopatts Nr. Z113

- verwendete Verdünnung 1:50 mit 1 % NRS

II.3 Untersuchungsgang

Durchführung der PAP Methode:

- Ansetzen von 10l PBS-Puffer, pH 7,3
- Mitführen einer Negativkontrolle, d.h. anstelle des Primärantikörpers wird 1 % NRS aufgetropft und inkubiert; ansonsten ist die Durchführung gleich
- Abschmelzen der Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 37°C
- Entparaffinieren in: 2 x Xylol je 20 x schwenken; Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe: Alkohol 100 %, 96 %, 70 % je 10 x schwenken
- Herauslösen der endogenen Peroxidase durch ein Methanol H₂O₂-Gemisch: 200 ml eiskaltes Methanol + 2 ml eiskaltes H₂O₂ 30 %-ig; die Präparate für 20 min. hineinstellen
- 5 min. in PBS-Puffer spülen
- Objektträger einzeln dem Puffer entnehmen, auf der Unterseite und um den Schnitt herum trocken wischen
- Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung mit einer Mikropipette pro Präparat 100µl mit PBS-Puffer 1:5 verdünntes NRS auftropfen; 20 min. bei Zimmertemperatur inkubieren
- Nach Ende der Inkubationszeit Objektträger senkrecht stellen; überschüssiges NRS ablaufen lassen; nicht spülen
- Pro Präparat 100 µl GFAP- bzw. Vimentin Primärantikörperlösung auftropfen; Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. in PBS-Puffer spülen
- Erste Brücken-Ak-Lösung herstellen (Kaninchen-anti-Maus IgG 1:100 verdünnt mit 1 % NRS); von der Lösung 100 µl pro Präparat auftropfen und Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. in PBS-Puffer spülen
- Zweite Brückenantikörperlösung herstellen (Schwein-anti-Kaninchen IgG 1:50 verdünnt mit 1 % NRS); von der Lösung 100 µl pro Präparat auftropfen und Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. in PBS-Puffer spülen
- PAP-Komplex vom Kaninchen 1:50 mit 1 % NRS verdünnen; von der Lösung 100 µl pro Präparat auftropfen und Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. in PBS-Puffer spülen
- DAB-Reaktion:
Folgende Lösungen ansetzen:
Lsg. A: 5 mg DAB in Einmalgefäß abwiegen
+ 10 ml PBS-Puffer
Lsg. B: 100 µl 30 %-iges H₂O₂
+ 10 ml PBS-Puffer
- Die Präparate dem Puffer entnehmen und auf einer DAB Unterlage ausbreiten
- 100 µl von Lösung B in Lösung A geben und gut mischen
- Von der entstandenen Lösung mit der Pasteurpipette je 100 µl pro Präparat auftropfen; es entsteht ein brauner Farbstoff
- Nach 10 min. Reaktionszeit die Reaktion in aqua dest. stoppen; anschließend Objektträger 2 x in aqua dest. spülen
- Zur Kontrastbildung 20 min. mit Hämalaun gegenfärben
- 5 min. bläuen in Leitungswasser
- Dehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe: Alkohol 70 %, 90 % und 2 x 100 % je 10 x schwenken, 2 x Xylol je 20 x schwenken
- Eindecken mit Corbit Balsam

Immunhistochemische Färbung von Glykosphingolipid GD₂ mit der Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode mit Neufuchsin

Reagenzien:

- Tris/NaCl-Stammpuffer pH 7,4 (Trishydroxymethylaminomethan/Natriumchlorid):
167,2 g NaCl
24,2 g Tris/Base
ad 2 l aqua dest.
pH 7,4 einstellen mit HCl, bei Raumtemperatur lagern
- Tris/NaCl-Waschpuffer pH 7,4:
Tris/NaCl Stammpuffer 1:10 verdünnen in aqua dest., pH 7,4 einstellen mit HCl, bei Raumtemperatur lagern; anzusetzende Menge 10 l

- Tris/BSA (bovine serum albumin) pH 7,4:
1 g BSA in 100 ml Tris/NaCl-Waschpuffer lösen, pH 7,4 einstellen mit HCl, bei +4°C lagern
- Human-Serum pH 7,4:
Serum Blutgruppe AB 1:3 verdünnen in PBS pH 7,2; pH 7,4 einstellen mit HCl, bei -20°C lagern
- Propandiol-Puffer:
21 g 2-amino-2 methylpropan-1,3-diol in 1 l aqua dest. lösen, pH 9,7 einstellen mit HCl, bei Raumtemperatur lagern
- 5% Neufuchsin:
5 g Neufuchsin in 100 ml 2N HCl lösen, filtrieren, bei + 4°C lagern

Verwendete Antikörper:

Primärantikörper: spezifischer monoklonaler Maus-anti-GD₂ Antikörper der IgG Fraktion Nr. 704/152 , Behring Werke

- Verwendete Primärantikörperlösung: aus Lyophilisat und 1 ml PBS-Puffer wird eine Lösung mit der Antikörperkonzentration 11 µg/ml hergestellt und unverdünnt verwendet

Brücken-Antikörper: Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, Firma Dakopatts Nr. Z259

- Lösung zur Verdünnung des Brückenantikörpers: Tris/BSA/RPMI + Humanserum: Tris/BSA pH 7,4 + RPMI 10:1 wird mit Humanserum im Verhältnis 8:1 gemischt
- verwendete Verdünnungslösung des Brücken Ak: Tris/BSA/RPMI + Humanserum (s.o.): Brücken-Ak 50:1
- APAAP.Komplex: Maus-anti-Alkalische Phosphatase, Behringwerke H5/Schottler 1 ml

Durchführung der APAAP Methode mit Neufuchsin:

- Entparaffinieren: Objektträger 16 Stunden über Nacht bei 37°C im Brutschrank abschmelzen; danach 10 min. in Xylol stellen zur Herauslösung des Paraffins
- Rehydrieren über die absteigende Acetonreihe: Aceton 100 %, 90 %, 60 %, 30 % je 3min.
- Objektträger 5 min. waschen in Tris/NaCl-Waschpuffer pH 7,4
- 100 µl unverdünnte Primärantikörperlösung pro Schnitt auftragen und 40 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. waschen in Tris/NaCl-Waschpuffer pH 7,4
- 100 µl verdünnten Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus verdünnt 1:50 in Tris/BSA/RPMI + Humanserum) pro Schnitt auftragen und 30 min. bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger 5 min. waschen in Tris/NaCl-Waschpuffer pH 7,4
- Substratreaktion

Lösung 1 14,8 g NaCl+
 10,8 g Tris/Base in 300 ml aqua dest. lösen
 + 107,2 ml Propandiol-Puffer, pH 9,75 (einstellen mit HCl)
 + 171,6 mg Levamisol
 ergibt eine klare, farblose Lösung

Lösung 2: 85,6 mg Natriumnitrit in 2140 µl aqua dest. lösen
 ergibt eine klare, farblose Lösung

Lösung 3: 214 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 2568 µl Dimethylformamid (DMF) lösen
 ergibt eine klare, gelbliche Lösung

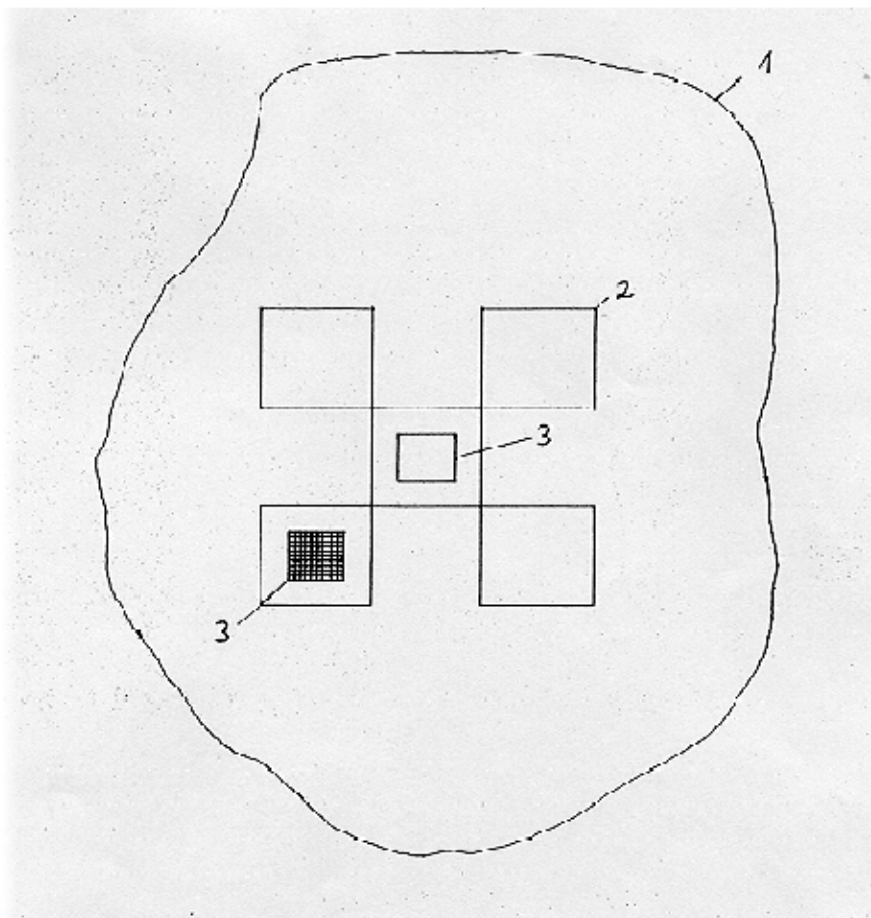
Reaktionsablauf:

- in Lösung 2 1472 µl 5%-ige Neufuchsinlösung geben und eine Minute reagieren lassen; es entsteht eine klare, braune Lösung
- die entstandene Lösung (Natriumnitrit mit Neufuchsin) und Lösung 3 in Lösung 1 geben; es entsteht eine klare, gelbliche Lösung
- pH 8,8 einstellen mit HCl: trübe gelbliche Lösung
- diese Lösung filtrieren, auf die Objektträger geben und 15 min. bei 37°C in den Brutschrank stellen: Lösung wird trüb
- Objektträger 10 min. waschen in Tris/NaCl-Waschpuffer pH 7,4
- Objektträger 10 min. waschen in aqua dest.
- Gegenfärben: Objektträger 3 min. in Hämalaun stellen, anschließend 15 min. in Leitungswasser bläuen
- Schnitt nass eindecken in Kaisers Glyzerinergelatine, die auf 56°C erwärmt ist

Zur Ermittlung der Expression von GFAP, Vimentin und GD₂ wurden die immunhistochemischen Präparate der einzelnen Serien folgendermaßen semiquantitativ lichtmikroskopisch untersucht:

- x 25: überblickartige Musterung und Einstellung der Tumormitte
 - x 250: Musterung des mittleren Feldes und 4 weiterer, jeweils an die Ecken des Mittelfeldes angrenzender Felder unter dem Gesichtspunkt der Expressionsintensität; aus diesen 5 Feldern Auswahl der beiden Felder mit der (nach Augenschein) höchsten Zahl positiv gefärbter Tumorzellen
 - x 400: Einbringen eines 10x10-Felder Rasters jeweils in die Mitte der beiden in 250-facher Vergrößerung ausgewählten Felder und anschließend Bestimmung folgender Parameter innerhalb jedes einzelnen Rasterfeldes:
 1. Gesamtzellzahl und Zahl positiv angefarbter Tumorzellen
 2. Färbintensität der Tumorzellkörper durch Einschätzung auf einer 5-stufigen Skala:
 - keine Anfärbung ; (+) vereinzelt angefarbte Tumorzellkörper; + schwache homogene Anfärbung der Tumorzellkörper; ++ mittelstarke homogene Anfärbung der Tumorzellkörper; +++ starke homogene Anfärbung der Tumorzellkörper
 3. Färbintensität der Tumorzellfortsätze auf einer 5-stufigen Skala:
 - keine Anfärbung; (+) vereinzelt positiv gefärbte Zellfortsätze; + schwache homogene Zellfortsatzfärbung; ++ mittelstarke homogene Zellfortsatzfärbung; +++ starke homogene Zellfortsatzfärbung
- Bei zerklüftetem Tumor wurde die Mitte des größten zusammenhängenden Tumorstücks eingestellt.
 - Befand sich in der nach obiger Vorgehensweise untersuchten Tumormitte eine Nekrosezone, Gefäßzone, Zyste oder normales Hirngewebe, konnte der Tumor nicht in die Stichprobe aufgenommen werden.

Gesamtpräparat



- 1 Gesamttumor x 25
- 2 5 Felder in der Tumormitte x 250
- 3 10 x 10 Felder Raster in der Mitte des Feldes mit der höchsten bzw. zweithöchsten Zahl angefärbter Tumorzellen x 400

II.4 Statistische Auswertung

An Rohwerten wurden im GFAP, Vimentin und GD₂ Präparat jeder Serie jeweils in 2 ausgewählten Untersuchungsfeldern (Auswahlverfahren vorausgehend beschrieben) die Gesamtzellzahl und die Zahl positiv angefärbter Tumorzellkörper ermittelt sowie die Farbeintensität der Zellkörper und die der Zellfortsätze auf der 5-stufigen Skala eingeschätzt. In einem der 33 Fälle konnte, bedingt durch die Größe des verwertbaren Tumormaterials, jeweils nur 1 Feld im GFAP, Vimentin und GD₂ Präparat ausgewertet werden.

Es folgten:

- Errechnung des prozentualen Anteils positiv angefarbter Tumorzellkörper an der Gesamtzellzahl für jedes Untersuchungsfeld
- Bestimmung des Untersuchungsfeldes mit dem höchsten und desjenigen mit dem zweithöchsten Prozentsatz positiv angefarbter Tumorzellkörper pro Präparat
- Bildung von 2 Gruppen für jedes untersuchte Antigen (GFAP: Gruppe 1+2; GD₂: Gruppe 3+4; Vimentin: Gruppe 5+6):
Gruppe 1 (bzw. **3, 5**) enthält aus jedem GFAP (bzw. GD₂, Vim.) Präparat das Untersuchungsfeld mit dem höchsten Prozentsatz positiv angefarbter Tumorzellkörper (n=33)^{1*}
Gruppe 2 (bzw. **4,6**) enthält aus jedem GFAP (bzw. GD₂, Vim.) Präparat das Untersuchungsfeld mit dem zweithöchsten Prozentsatz positiv angefarbter Tumorzellkörper (n=32)
- Die 5-stufige Einschätzung der Expressionsintensität in Zellkörpern bzw. Zellfortsätzen, ' keine Anfärbung -, vereinzelt Anfärbungen (+), schwache homogene Anfärbung +, mittelstarke homogene Anfärbung ++, starke homogene Anfärbung +++ ', wurde auf der Ordinalskala von 0 bis 4 codiert.

Den weiteren Rechengängen liegen demzufolge die in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Stichprobendaten zugrunde (siehe Anhang).

¹ In einer Präparateserie wurde pro Antigen nur 1 Untersuchungsfeld ausgewertet; diese Daten sind Gruppe 1 (bzw. 3,5) zugeordnet.

III. Ergebnisse

III.1 Beschreibung der GFAP und GD₂ Expressionsmuster in den einzelnen astrozytären Hirntumoren

Zur Ergänzung der weiteren Ausführungen siehe auch die Abbildungen und Abbildungslegenden (S.53-57)

III.1.1 Astrozytom WHO Grad II

1. Biologische Daten

Von 6 Astrozytomen WHO Grad II waren 3 fibrillär, eins protoplasmatisch, eins gemistozytisch und eins gemischt fibrillär/protoplasmatisch. Die Geschlechtsverteilung Männer:Frauen war 3:3, der Altersmittelwert 38,7 Jahre mit einem Durchschnittsalter der Männer von 29,3 und der Frauen von 48,0 Jahren.

2. GFAP bzw. GD₂ Expressionsmuster in den einzelnen Zell- bzw. Tumortypen

In sämtlichen histologischen Typen des isomorphen Astrozytoms ist eine GFAP und eine GD₂ Expression nachweisbar; im Einzelnen zeigt sich folgendes Bild:

2.1 Fibrilläres Astrozytom WHO Grad II

- GFAP Expression:

Von 6 untersuchten Feldern ist in 4 Feldern die GFAP Färbeintensität sowohl im perinukleären Protoplasma als auch in den Fortsätzen mittelstark; in 2 Fällen ist sie im Protoplasma mittelstark, in den Fortsätzen stark. Man sieht unterschiedlich große, meist runde Kerne, umgeben von einem mehr oder weniger stark angefärbten Protoplasmasaum, die in einem dichten Netzwerk aus feinen und groben Gliafasern liegen. Bei den Zellen mit stark GFAP positivem Zelleib handelt es sich um eingestreute protoplasmatische oder gemistozytische Astrozyten.

- GD₂ Expression:

Von 6 untersuchten Feldern war in drei Fällen die GD₂ Färbeintensität im Protoplasma und den Zellfortsätzen mittelstark, in 2 Fällen war sie im Protoplasma mittelstark, in den Fortsätzen stark und in einem Fall war sie im Protoplasma stark und in den Fortsätzen mittelstark. Vergleichbar der GFAP Färbung imponiert lichtmikroskopisch bei immunhistochemischer GD₂ Färbung die deutliche Darstellung des aus den Gliafortsätzen bestehenden Faserfilzes, in dem die

Zellkerne mit mehr oder weniger stark angefärbtem Zytoplasmasaum liegen (Abb.1).

2.2 Protoplasmatisches Astrozytom WHO Grad II

- GFAP Expression:

In zwei ausgewerteten Feldern eines Tumors war in beiden Fällen die GFAP Expression im Zytoplasma stark, in den Fortsätzen einmal stark und einmal mittelstark.

Lichtmikroskopisch sieht man ein in der Regel stark GFAP positives polygonales oder ovales Zytoplasma. Die vom Zelleib ausgehenden Gliafasern sind unterschiedlich stark GFAP positiv und weniger dicht als beim fibrillären Astrozytom (Abb.6).

- GD₂ Expression:

In beiden Feldern eines Tumors war die GD₂ Expression im Zytoplasma und in den Fortsätzen jeweils mittelstark.

Lichtmikroskopisch sieht man im vorliegenden Fall eine der GFAP Expression analoge homogene Zytoplasmafärbung von etwas geringerer Intensität bei unterschiedlich starker Anfärbung der Gliafasern (Abb.7).

2.3 Gemistozytisches Astrozytom WHO Grad II

- GFAP Expression:

In beiden Tumorfeldern wurde die GFAP Expressionsintensität des Zytoplasmas als mittelstark, die der Fortsätze als schwach eingeschätzt.

Lichtmikroskopisch imponieren Zellen mit meist einzelnen, manchmal aber auch mehreren runden oder ovalen randständigen Zellkernen; das im Vergleich zum protoplasmatischen Astrozytom volumenmäßig größere perinukleäre Zytoplasma ist, abweichend vom vorliegenden Fall, in der Regel stark GFAP positiv; einzelne grobe Gliafasern zeigen meist eine mittlere bis starke GFAP Expression (Abb.2; Abb.3, gleicher Fall, stärkere Vergrößerung).

- GD₂ Expression:

In den beiden Tumorfeldern war die GD₂ Expression des Zytoplasmas stark, der Fortsätze mittelstark.

Lichtmikroskopisch erkennt man die der üblichen GFAP Expression analoge GD₂ Verteilung mit stark angefärbten Zelleibern bei mittlerer bis starker Anfärbung grober Gliafasern (Abb. 4; Abb.5, gleicher Fall, stärkere Vergrößerung).

3. Zusammenfassung und Vergleich der GFAP bzw. GD₂ Expression im isomorphen Astrozytom

In sämtlichen Zelltypen des isomorphen Astrozytoms ist eine GFAP bzw. GD₂ Expression sowohl im Zytoplasma als auch in den Fortsätzen nachweisbar. Die Expressionsintensität beider Marker liegt zwischen mittel und stark; für jeden Marker differiert die Färbeintensität zwischen Zelleib und Zellfortsätzen in den einzelnen Feldern um maximal eine Stufe auf der 5-stufigen Einschätzungsskala.

Bei Untersuchung der einzelnen Tumoren beträgt die Differenz zwischen beiden Markern in der Einschätzung der Färbeintensität des Zytoplasmas bzw. der Fortsätze ebenfalls maximal eine Stufe. Die Expressionsmuster von GFAP und GD₂ im isomorphen Astrozytom entsprechen einander weitgehend, so daß von einer positiven Korrelation ausgegangen werden kann. Vom Aspekt her dominiert beim fibrillären Astrozytom die Fortsatzfärbung bei etwas schwächerer Zytoplasmadarstellung; beim protoplasmatischen und gemistozytischen Astrozytom steht die in der Regel stärker positive Anfärbung des Zelleibs im Vordergrund bei wechselnder mittlerer bis starker Fortsatzfärbung.

III.1.2 Astrozytome WHO Grad III

Entsprechend dem Konzept der polymorphen Tumoren, in welchem hinsichtlich der astrozytären Reihe ein mehr oder weniger kontinuierlicher Übergang vom Astrozytom WHO Grad II zum Glioblastoma multiforme konstatiert wird, bildet das Astrozytom WHO Grad III eine Zwischenstufe. Dementsprechend enthält es neben fibrillären, protoplasmatischen und gemistozytischen Astrozyten Zellelemente des Glioblastoms, d.h. fusiforme Zellen und Riesenzellen bei großer Variabilität von Zellgröße und Zellform.

1. Biologische Daten

Von 7 untersuchten Astrozytomen WHO Grad III waren 6 gemischt, eins fibrillär. Bei einem Verhältnis Männer zu Frauen von 5:2 lag der Altersmittelwert bei 54,3 Jahren.

Das Durchschnittsalter der Männer war 50,2 Jahre, das der Frauen 64,0 Jahre.

2. GFAP bzw. GD₂ Expressionsmuster in den einzelnen Zell- bzw. Tumortypen

In allen untersuchten Astrozytomen WHO Grad III war sowohl eine GFAP als auch eine GD₂ Expression nachweisbar. Da neben einem fibrillären Typ ausschließlich gemischte Formen vorkamen, sollen diese beiden Tumorarten hier beschrieben werden.

2.1 Fibrilläres Astrozytom WHO Grad III

- GFAP Expression

In zwei untersuchten Feldern ist die GFAP Anfärbung sowohl im perinukleären Protoplasma als auch in den Fortsätzen jeweils schwach positiv.

Lichtmikroskopisch ist im Vergleich zum fibrillären Astrozytom WHO Grad II eine Zunahme der zellulären Polymorphie zu beobachten; einzelne schwach GFAP positive fusiforme Zellen und stark angefärbte Gemistozyten sind eingestreut; die Grundstruktur von in einen GFAP positiven Faserfilz eingebetteten Zellkernen mit schmalen Zytoplasmasaum, der im vorliegenden Fall eine schwache GFAP Expression aufweist, ist erhalten.

- GD₂ Expression

In beiden untersuchten Feldern war die GD₂ Expression im perinukleären Zytoplasma mittelstark, in den Fortsätzen stark. Lichtmikroskopisch imponiert ein Netzwerk aus eher groben, stark GD₂ positiven Gliafasern, in das Zellen mit größerer Variabilität der Zellform als beim fibrillären Astrozytom WHO Grad II und unterschiedlich starker GD₂ Expression im Zelleib eingebettet sind.

2.2 Gemischtes Astrozytom WHO Grad III

- GFAP Expression

In 11 untersuchten Feldern war die GFAP Expression im Protoplasma 4 x stark, 7 x mittelstark; die GFAP Fortsatzfärbung wurde 2 x stark, 3 x mittelstark und 6 x schwach eingeschätzt. Die maximale Differenz der Färbeintensität von Zellen und Fortsätzen betrug 2 Stufen auf der Einschätzungsskala (in 2 Fällen); in 4 Fällen differierte die Färbeintensität von Protoplasma und Zellfortsätzen um 1 Stufe, 5 x war sie in beiden Zellarealen gleich stark. Lichtmikroskopisch steht die zelluläre Polymorphie im Vordergrund; es finden sich neben stark GFAP positiven

Gemistozyten und protoplasmatischen Astrozyten fibrilläre Astrozyten sowie fusiforme Zellen mit geringerer GFAP Färbeintensität (Abb. 8; Abb.9, gleicher Fall, stärkere Vergrößerung).

- GD₂ Expression

Die GD₂ Expressionsintensität wurde in 11 untersuchten Feldern im perinukleären Zytoplasma 3 x stark, 8 x mittelstark eingeschätzt, in den Zellfortsätzen war sie 7 x mittelstark, 4 x schwach. In 7 Fällen lag die Färbeintensität der Zellfortsätze 1 Stufe niedriger als im perinukleären Zytoplasma, in 4 Fällen war sie in beiden Zellarealen gleich. Lichtmikroskopisch sieht man analog zum GFAP Präparat ein gemischtes Zellbild mit mittelstarker GD₂ Expression (Abb.10; Abb.11, gleicher Fall, stärkere Vergrößerung). Die 500-fache Vergrößerung zeigt ein stark GD₂ positives gemistozytisches Areal. Im zweiten Beispiel sind zelluläre Variabilität und hohe Zelldichte besonders eindrucksvoll. Neben stark GD₂ positiven Gemistozyten prägen fusiforme Zellen mit mittelstarker oder schwacher GD₂ Expression das Bild (Abb.12; Abb.13, gleicher Fall, stärkere Vergrößerung).

3. Vergleich GFAP bzw. GD₂ Expression im Astrozytom WHO Grad III

Aus 7 Astrozytomen WHO Grad III wurden je 13 Felder auf ihre GFAP bzw. GD₂ Expression untersucht. In allen Untersuchungsfeldern war sowohl im perinukleären Zytoplasma als auch in den Zellfortsätzen eine positive GFAP bzw. GD₂ Expression nachweisbar. Dabei traten für jeden der beiden Marker Expressionsintensitäten von schwach, mittel und stark auf. Die maximale Differenz zwischen Zelleib- und Zellfortsatzfärbung betrug 2 Stufen auf der Einschätzungsskala. Für GFAP war die Expressionsintensität in den Zellfortsätzen entweder gleichstark wie im perinukleären Zytoplasma (in 7 Fällen) oder schwächer (4 x um 1 Stufe; 2 x um 2 Stufen). Die GD₂ Expressionsintensität der Zellfortsätze lag in den beiden Untersuchungsfeldern des fibrillären Astrozytoms WHO Grad III um 1 Stufe höher als im perinukleären Zytoplasma. In den restlichen 11 Untersuchungsfeldern war sie entweder in beiden Zellarealen gleichstark (4 x) oder in den Zellfortsätzen um 1 Stufe schwächer als im perinukleären Zytoplasma (7 x).

Im Vergleich beider Marker stimmt die Expressionsintensität im perinukleären Zytoplasma 8 x überein, 5 x differiert sie um 1 Stufe (3 x GD₂>GFAP; 2 x GFAP>GD₂). In den Zellfortsätzen sind GFAP und GD₂ 7 x gleichstark exprimiert, 4 x

unterscheiden sie sich um 1 Stufe (2 x GFAP>GD₂; 2 x GD₂>GFAP), 2 x um 2 Stufen (2 x GD₂>GFAP).

Bei den untersuchten Astrozytomen WHO Grad III findet sich, analog den isomorphen Astrozytomen WHO Grad II, eine gleichsinnige Expression von GFAP und GD₂. Die etwas größere Schwankungsbreite der Expressionsintensitäten ist mit der zunehmenden zellulären Polymorphie gegenüber den astrozytären Tumoren WHO Grad II vereinbar. Auf zellulärer Ebene zeigen sich für beide Malignitätsstufen einander entsprechende Verteilungsmuster: Gemistozyten und protoplasmatische Astrozyten weisen in der Regel stark GFAP bzw. GD₂ positive Zelleiber und eine mittlere bis starke Zellfortsatzfärbung auf. Bei den fibrillären Astrozyten dominiert entweder die Fortsatzfärbung gegenüber dem etwas schwächer angefärbten perinukleären Zytoplasma oder es besteht eine homogene, im mittleren Bereich liegende GFAP bzw. GD₂ Expression im gesamten Zytoplasma. Die im Astrozytom WHO Grad III vorkommenden fusiformen Astrozyten zeigen eine schwache bis mittelstarke homogene GFAP bzw. GD₂ Expression.

III.1.3 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist im Konzept eines mehr oder weniger kontinuierlichen Übergangs von den isomorphen über die anaplastischen zu den malignen Gliomen Ausdruck einer zunehmenden Entdifferenzierung. Dem entspricht als Hauptcharakteristikum die zytologische und histologische Polymorphie des Glioblastoms: Neben niederdifferenzierten globuliformen Rundzellen, bipolaren fusiformen Zellen und Riesenzellen gehören reife protoplasmatische oder gemistozytische Astrozyten zum Zellbild. Die gewebliche Vielgestaltigkeit zeigt sich in Nekrosen mit Pseudopalisaden, pathologischer Vaskularisation und vermehrter Bindegewebsproliferation.

1. Biologische Daten

Die Glioblastome stellen mit 15 Tumoren den größten Teil des Untersuchungskollektivs dar. Sämtliche Glioblastome haben eine supratentorielle Lokalisation. Das Verhältnis Männer: Frauen ist 9:6, das Durchschnittsalter 56,5 Jahre. Die Altersmittelwerte der Männer von 56,2 Jahren und der Frauen von 57,0 Jahren liegen dicht beieinander.

Bei 3 Tumoren wurden jeweils 2 verschiedene Tumorgebiete, bei einem weiteren Tumor 3 unterschiedliche Tumorgebiete untersucht, so daß die Glioblastome mit 20 Fällen ins Gesamtkollektiv eingehen.

2. GFAP bzw. GD₂ Expressionsmuster in den einzelnen Zell- bzw. Tumortypen

Da gemischte und globuliforme Felder in der Stichprobe vorkamen, sollen diese beiden Typen, die auch Bestandteile desselben Tumors sein können, hier dargestellt werden. Die GFAP bzw. GD₂ Expression schwankte je nach der Zellzusammensetzung der untersuchten Areale bis hin zum völligen Fehlen in einigen globuliformen Feldern. Im Einzelnen zeigte sich folgendes Bild:

2.1 Glioblastoma multiforme, gemischter Typ

- GFAP Expression

28 untersuchte Felder wiesen in Protoplasma bzw. Fortsätzen folgendes GFAP Expressionsmuster auf:

GFAP Expression	Protoplasma	Zellfortsätze
Stark	7	-
Mittel	18	11
Schwach	1	11
Vereinzelt	-	4
Keine	2	2
Gesamt	28	28

Die GFAP Expressionsintensität in Zelleib und -fortsätzen der einzelnen Felder war entweder gleichstark (10 x) oder im Protoplasma stärker als in den Fortsätzen (12 x um 1 Stufe, 5 x um 2 Stufen und 1 x um 3 Stufen auf der 5-stufigen Einschätzungsskala). Lichtmikroskopisch steht die zelluläre Heterogenität im Vordergrund. Sie zeigt sich im Nebeneinander unterschiedlichster Zytoplasmaformen mit großer Variabilität von Kerngröße und -gestalt. Es finden sich kleine globuliforme Rundzellen mit eher geringer, teilweise auch ganz fehlender GFAP Expression neben bipolaren fusiformen Zellen, die eine mittelstarke bis schwache GFAP Färbeintensität aufweisen und mittel bis stark GFAP positive protoplasmatische bzw. gemästete Astrozyten (Abb.14 und Abb.15).

- GD₂ Expression

In 26 * untersuchten Feldern zeigten Protoplasma bzw. Zellfortsätze folgendes GD₂ Expressionsmuster:

GD ₂ Expression	Protoplasma	Zellfortsätze
Stark	3	-
Mittel	17	6
Schwach	4	14
Vereinzelt	-	2
Keine	2	4
Gesamt	26	26

* Bei einem gemischten Glioblastoma multiforme zeigte das Tumorstück zur GFAP Bestimmung ein gemischtes Zellbild, das Tumorgebiet zur GD₂ Bestimmung war globuliform. Dies verursacht die Fallzahldifferenz in der Untersuchung von GFAP bzw. GD₂ Expression, da die beiden GFAP Untersuchungsfelder dieses Tumors beim gemischten Typ, die beiden GD₂ Untersuchungsfelder beim globuliformen Typ subsumiert sind.

Analog der GFAP Expression war die GD₂ Färbeintensität in Protoplasma und Zellfortsätzen entweder gleichstark (10x) oder in den Fortsätzen geringer als im Protoplasma (11x um 1 Stufe, 3x um 2 Stufen und 2x um 3 Stufen). Lichtmikroskopisch ist erneut die zelluläre Heterogenität mit unterschiedlichsten Kernformen und -größen zu beobachten. Mittelstark bis schwach GD₂ positive fusiforme Zellen liegen neben eher schwach angefärbten globuliformen Zellen und einzelnen stärker GD₂ positiven gemästeten Astrozyten (Abb.16 und Abb.17).

2.2 Glioblastoma multiforme, globuliformer Typ

- GFAP Expression

In 12 Untersuchungsfeldern war die GFAP Expression im Protoplasma 2x mittelstark, 10x schwach; in 2 Feldern wurden, bedingt durch eingestreute gemästete Astrozyten, einzelne GFAP positive Fortsätze gefunden, in den übrigen 10 Feldern war keine GFAP Fortsatzfärbung vorhanden.

Lichtmikroskopisch sieht man kleine Rundzellen mit schwacher oder fehlender GFAP Expression im Zytoplasmasaum. Einzelne gemästete Astrozyten zeigen eine starke, das Gefäßbindegewebe eine mittlere Färbeintensität.

- GD₂ Expression

In 14 untersuchten Feldern wurde die GD₂ Expression im Protoplasma 1x mittelstark, 9x schwach und 4x als fehlend eingeschätzt. In einem Fall zeigte sich aufgrund eingestreuter gemästeter Astrozyten eine schwache Fortsatzfärbung, in den übrigen 13 Fällen war keine Fortsatzfärbung vorhanden.

Lichtmikroskopisch sieht man kleine Rundzellen mit schwach GD₂ positivem Zytoplasmasaum oder ohne GD₂ Expression im Zytoplasma (Abb.18).

3. Zusammenfassung und Vergleich der GFAP und GD₂ Expression im Glioblastoma multiforme

Von 15 Glioblastomen wurde in 40 Feldern pro Marker die GFAP bzw. GD₂ Expression festgestellt.

Beim gemischten Tumortyp lag die Expressionsintensität für GFAP und GD₂ im Protoplasma schwerpunktmäßig im mittleren Bereich, die GFAP Fortsatzfärbung im mittleren bis schwachen und die GD₂ Fortsatzfärbung im schwachen Bereich. Felder mit homogener starker Fortsatzfärbung waren nicht vorhanden, in einem Tumor fehlten GFAP und GD₂ Expression völlig. GFAP war in Zelleib und -fortsätzen entweder gleichstark exprimiert oder die Fortsatzfärbung war schwächer; GD₂ hatte ein ähnliches Verteilungsmuster mit gleichstarker Expression in beiden Zellarealen oder schwächerer Fortsatzfärbung gegenüber dem Protoplasma.

Zwischen den Markern war die Expressionsintensität im Protoplasma 19 x gleichstark, 9 x differierte sie (6x GFAP +1>GD₂; 2x GFAP +4>GD₂; 1x GD₂ +1>GFAP). Die Expression von GFAP und GD₂ in den Fortsätzen stimmte 11x überein, 17x wich sie voneinander ab (7x GFAP +1>GD₂; 2x GFAP +3>GD₂; 2x GFAP +4>GD₂; 6x GD₂ +1>GFAP).

Beim globuliformen Tumortyp waren GFAP und GD₂ im Protoplasma überwiegend schwach exprimiert. Wenige Fortsatzfärbungen kamen durch eingestreute gemästete Astrozyten zustande. In 9 Fällen fand sich im perinukleären Zytoplasma eine Übereinstimmung der GFAP und GD₂ Expressionsintensität, 3 x war die GFAP Expression stärker (1x GFAP +1>GD₂; 2x GFAP +2>GD₂).

Wie beim Astrozytom WHO Grad III zeigt sich auch bei den Glioblastomen in der überwiegenden Zahl der Fälle eine gleichsinnige Expression von GFAP und GD₂ im perinukleären Zytoplasma und den Zellfortsätzen. Gegenüber den benigneren Tumorformen tritt bei einigen Glioblastomen eine größere Differenz der Expressionsintensitäten sowohl für jeden einzelnen Marker in den verschiedenen Zellarealen als auch im Vergleich von GFAP und GD₂ auf: Bei etwa einem Viertel der gemischten Glioblastome besteht für GFAP und genauso häufig für GD₂ zwischen Zelleib und –fortsatzfärbung eine Differenz von 2 Stufen und mehr.

In einem gemischten Glioblastom war die GFAP Expression im gemistozytischen Untersuchungsfeld mit globuliformer Beimischung in den Zelleibern stark, in den Zellfortsätzen mittelstark. Im rein globuliformen Untersuchungsfeld desselben Tumors war keine GD₂ Expression nachweisbar, so daß im Vergleich des perinukleären Protoplasmas die Färbeintensität der beiden Marker um 4 Stufen, bei der Fortsatzfärbung um 3 Stufen auf der Einschätzungsskala differierte.

Es wird deutlich, daß die größere Schwankungsbreite der Expressionsintensitäten von GFAP und GD₂ im Glioblastom gegenüber den Astrozytomen WHO Grad II und III ursächlich mit der zunehmenden zellulären Inhomogenität in diesem malignen Tumor zusammenhängt.

Auf zellulärer Ebene findet sich folgendes Expressionsmuster beim Glioblastom: GFAP und GD₂ sind, wie bei den gutartigen Tumorformen, in den protoplasmatischen bzw. gemistozytischen Astrozyten eher stark exprimiert bei mittlerer bis starker Fortsatzfärbung; die fusiformen Zellen zeigen eine mittlere bis schwache Expressionsintensität beider Marker und die globuliformen Zellen eine schwache oder gar keine.

Betrachtet man sämtliche Malignitätsstufen der astrozytären Hirntumoren, so entsteht der Eindruck, daß mit zunehmender zellulärer Entdifferenzierung – von den fibrillären über die fusiformen zu den globuliformen Zellelementen – eine Abnahme der GFAP und GD₂ Expressionsintensität einhergeht, möglicherweise in Zusammenhang mit einer steigenden Teilungsrate und kürzeren Generationszeit. Protoplasmatische und gemistozytische Astrozyten haben in sämtlichen Malignitätsstufen, eventuell als reaktive Leistung, eine mittlere bis starke GFAP und GD₂ Expression.

III.2 Statistische Darstellung der Ergebnisse

Um die Frage eines Zusammenhanges der Expressionsmuster von GFAP und GD₂, GFAP und Vimentin sowie GD₂ und Vimentin zu überprüfen, wurden die Produktmomentkorrelationskoeffizienten (r) für jeweils zwei Marker errechnet und mittels t-Test auf ihre statistische Signifikanz geprüft; ferner erfolgte die Bestimmung der die Verteilung charakterisierenden Regressionsgeraden.

Als Datengrundlage dienten die Prozentsätze positiv gefärbter Tumorzellen aus 65 untersuchten Feldern pro Marker (Anhang, S.62-63, Tabellen 1 und 2). Die Berechnungen im Einzelnen ergaben:

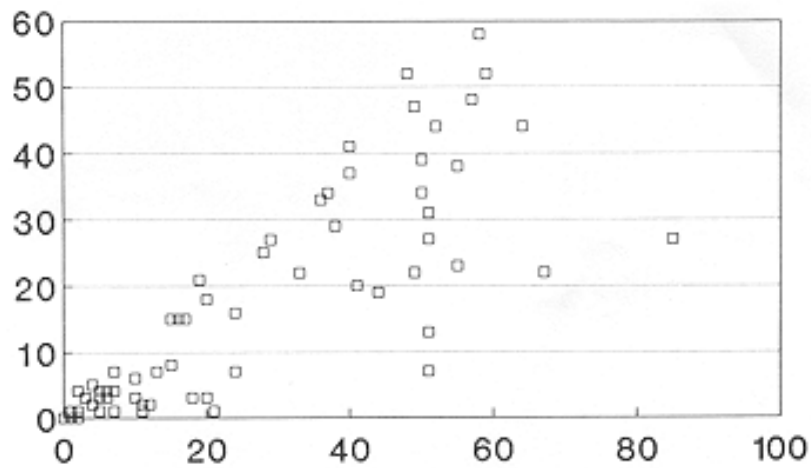
- GFAP (X) / GD₂ (Y)

Der Korrelationskoeffizient ist $r = 0,88$; der t-Test bestätigt mit einem Wert von $t = 14,71$ bei $t_{(60; 0,9995)} = 3,460$ die hohe Signifikanz der Korrelation auf dem 1-‰ Niveau.

Die beiden Regressionsgeraden sind $Y = 0,74 X + 0,84$ und $X = 1,04 Y + 5,24$.

Grafisch stellt sich die Verteilung folgendermaßen dar:

%GD₂ pos.Zellen



% GFAP pos.Zellen

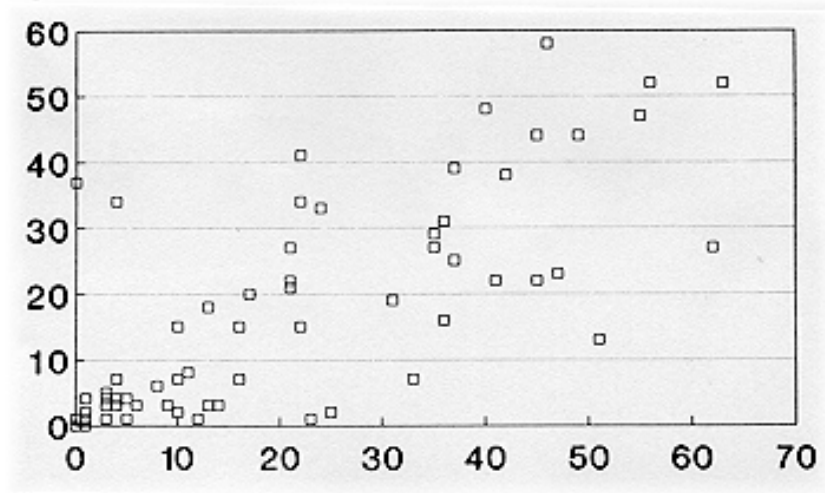
- GFAP (X) / Vimentin (Y)

Der Korrelationskoeffizient ist $r = 0,82$, die Korrelation ist mit $t = 11,37$ bei $t_{(60; 0,9995)} = 3,460$ hochsignifikant auf dem 1-%o Niveau.

Die Regressionsgeraden sind $Y = 0,63 X + 0,21$ und $X = 1,08 Y + 8,25$.

Grafisch ergibt sich folgendes Bild:

% Vim.pos. Zellen



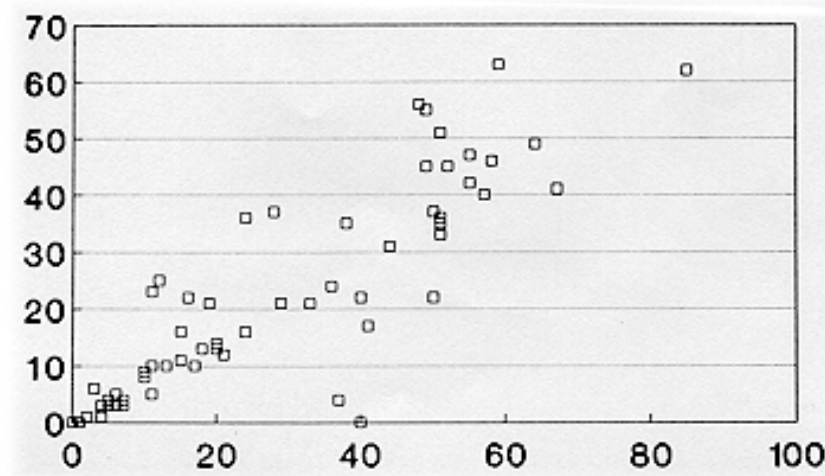
% GFAP-pos.Zellen

- GD₂ (X) / Vimentin (Y)

Der Korrelationskoeffizient ist $r = 0,75$; die Korrelation ist mit $t = 9$ bei $t_{(60; 0,9995)} = 3,460$ hochsignifikant auf dem 1-%o Niveau.

Die Regressionsgeraden $Y = 0,67 X + 3,21$ und $X = 0,83 Y + 6,42$ charakterisieren die grafische Darstellung folgendermaßen:

% Vim.pos.Zellen



% GD₂ pos. Zellen

Die errechneten Korrelationskoeffizienten für GFAP/GD₂, GFAP/Vimentin und GD₂/Vimentin kennzeichnen einen hohen linearen Zusammenhang in der Expression der drei Parameter, so dass die bereits im deskriptiven Teil beschriebene Koexpression von GFAP und GD₂ sowie von GFAP und Vimentin bzw. GD₂ und Vimentin ihre statistische Absicherung findet.

Die Regressionsgeraden ermöglichen die grafische Darstellung der Art des korrelativen Zusammenhanges und die Vorhersage der wahrscheinlichen Größe eines Parameters bei Kenntnis des anderen.

Bei bekanntem Prozentsatz positiver Tumorzellen für GFAP liegt der für alle Tumoren als wahrscheinlich vorhergesagte Prozentsatz für GD₂ um ca. ein Viertel, für Vimentin etwa um ein Drittel niedriger. Soll bei bekanntem GD₂ die Vimentinexpression geschätzt werden, so beträgt diese ca. 70 % des GD₂-Wertes.

Dienen GD₂ oder Vimentin zur Vorhersage von GFAP, spielt eine relativ hohe additive Komponente eine Rolle. Das heißt, im unteren Expressionsbereich treten Differenzen stärker zu Tage, aber mit steigender Expression der einzelnen Marker in einem Tumor nähern sich die Prozentsätze positiv gefärbter Tumorzellen deutlich an.

Zur Beurteilung eines Zusammenhanges der Expressionsintensitäten von GFAP/GD₂, GFAP/Vimentin und GD₂/Vimentin in den Tumoren sollen die für jeden Marker in 65 Untersuchungsfeldern eingeschätzten Färbeintensitäten im perinukleären Protoplasma verglichen werden. Bei den von 0 (keine Anfärbung) bis 4 (starke homogene Anfärbung) codierten Färbeintensitäten handelt es sich um eine jeweils fünffach gestufte Verteilung von Ordinaldaten, bei denen das Verfahren von der Testung von Unterschiedshypothesen wie auch bei Nominaldaten anhand von Mehrfeldertafeln durchgeführt wurde. Bei diesem Verfahren, das auf der Abweichung der beobachteten Häufigkeit von der erwarteten Häufigkeit in jedem Tafelfeld fußt, kommt entsprechend dem Verfahren bei Varianzanalysen die Chiquadratmethode zur Anwendung.

In jeweils fünf Stufen wurden die Farbintensitäten der drei Reaktionen GD₂-Vimentin, GD₂-GFAP und GFAP-Vimentin in den Zellkörpern (Anhang: Tabellen 1 und 2; n=65) verglichen. Dabei war vom Vergleich GFAP-Vimentin von einer gleichsinnigen Entwicklung auszugehen; dieser Test diente also weitgehend als Kontrolle.

Für GD₂-Vimentin ergab sich folgende Tabelle:

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GD ₂ ⇔					Summen
	0	1	2	3	4	
0	3	0	1	0	0	4
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	10	7	3	21
3	0	0	2	30	6	38
4	2	0	0	0	0	2
Summen	6	0	13	37	9	65

Die entsprechenden Tabellen für die Verteilungen von GD₂/GFAP und GFAP/Vimentin sind im Folgenden dargestellt:

Färbeintensität GFAP ↓	Färbeintensität GD ₂ ⇔					Summen
	0	1	2	3	4	
0	2	0	0	0	0	2
1	0	0	0	0	0	0
2	2	0	9	2	0	13
3	0	0	4	26	5	35
4	2	0	0	9	4	15
Summen	6	0	13	37	9	65

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GFAP ⇔					Summen
	0	1	2	3	4	
0	2	0	2	0	0	4
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	11	9	1	21
3	0	0	0	26	12	38
4	0	0	0	0	2	2
Summen	2	0	13	35	15	65

Es zeigt sich schon bei unvoreingenommener Betrachtung der Werteverteilung, dass keine diffuse Zufallsverteilung vorliegt, sondern dass hohe Ordinalwerte einer Variablen mit hohen Werten der anderen Variablen verknüpft sind. Hohe Werte sind jeweils für beide Variablen in den Stufen 2, 3 und in einem Fall auch 4 zu finden.

Die entsprechenden Erwartungswerte (Zeilensumme x Spaltensumme, geteilt durch n) für die einzelnen absoluten Häufigkeiten sind in den folgenden Tabellen unter den ermittelten Werten eingetragen. Dabei ergeben sich für kleinere Häufigkeiten aufgrund der Rundungen gelegentlich Abweichungen von den Randsummen.

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GD₂ ⇔					<i>Summen</i>
	0	1	2	3	4	
0	3 0,37	0 0,00	1 0,80	0 2,28	0 0,55	4
1	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0
2	1 1,94	0 0,00	10 4,20	7 11,95	3 2,91	21
3	0 3,51	0 0,00	2 7,60	30 21,63	6 5,26	38
4	2 0,18	0 0,00	0 0,40	0 1,14	0 0,28	2
<i>Summen</i>	6	0	13	37	9	65

Färbeintensität GFAP ↓	Färbeintensität GD₂ ⇔					<i>Summen</i>
	0	1	2	3	4	
0	2 0,18	0 0,00	0 0,40	0 1,14	0 0,28	2
1	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0
2	2 1,20	0 0,00	9 2,60	2 7,40	0 1,80	13
3	0 3,23	0 0,00	4 7,00	26 19,92	5 4,85	35
4	2 1,38	0 0,00	0 3,00	9 8,54	4 2,08	15
<i>Summen</i>	6	0	13	37	9	65

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GFAP ⇔					Summen
	0	1	2	3	4	
0	2 0,12	0 0,00	2 0,80	0 2,15	0 0,92	4
1	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0 0,00	0
2	0 0,65	0 0,00	11 4,20	9 11,31	1 4,85	21
3	0 1,17	0 0,00	0 7,60	26 20,46	12 8,77	38
4	0 0,06	0 0,00	0 0,40	0 1,08	2 0,46	2
Summen	2	0	13	35	15	65

Die Differenzen zwischen den tatsächlich gefundenen Werten und den kalkulierten Werten, aus denen die Chi-Quadratschätzung dann erfolgen soll, sind in den drei nachfolgenden Tabellen angegeben:

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GD ₂ ⇔					
	0	1	2	3	4	
0	2,63	0,00	0,20	-2,28	-0,55	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	-0,94	0,00	5,80	-4,95	0,09	
3	-3,51	0,00	-5,60	8,37	0,74	
4	1,82	0,00	-0,40	-1,14	-0,28	

Färbeintensität GFAP ↓	Färbeintensität GD ₂ ⇔					
	0	1	2	3	4	
0	1,82	0,00	-0,40	-1,14	-0,28	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	0,80	0,00	6,40	-5,40	-1,80	
3	-3,23	0,00	-3,00	6,08	0,15	
4	0,62	0,00	-3,00	0,46	1,92	

Färbeintensität Vimentin ↓	Färbeintensität GFAP ⇨				
	0	1	2	3	4
0	1,88	0,00	1,20	-2,15	-0,92
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	-0,65	0,00	6,80	-2,31	-3,85
3	-1,17	0,00	-7,60	5,54	3,23
4	-0,06	0,00	-0,40	-1,08	1,54

Für die Chi-Quadratstestung wurde für die Tafeln jeweils die Nullhypothese getestet, bei der eine Zufallsverteilung der Werte vorausgesetzt wird. Für die Tabelle GD₂-Vimentin ergab sich ein Chi-Quadratwert von 63,29. Für die vorliegenden Freiheitsgrade $f = 16$ ist der Grenzwert 26,3 bei $\alpha = 0,05$. Dieser Wert ist weit überschritten, so dass die Nullhypothese zurückzuweisen und die alternative Hypothese anzunehmen ist. Damit ist ein statistisch erheblicher Zusammenhang der Expressionsstärke GD₂ mit der Stärke der Vimentin- Expression anzunehmen. Für die Felderordnung GD₂-GFAP ist der entsprechende Wert der Chi-Quadratberechnung 53,69, was ebenfalls den Grenzwert für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% weit überschreitet, wenn auch nicht so stark, wie das für den Vergleich GD₂-Vimentin gilt. Für die Felderordnung GFAP-Vimentin ergab die Berechnung des Chi-Quadratwertes mit 67,67 den höchsten Wert.

Auffällig in der oben gewählten Bildung von Rängen ist, dass der zweite Rang durchgehend nicht besetzt ist. Offenbar hätte eine Einteilung in vier Expressionsstufen dem zu prüfenden Sachverhalt besser entsprochen. Durch Entfernung der zweiten Spalte und Zeile wird die tabellarische Darstellung vereinfacht. Die weitere rechnerische Behandlung ergibt dieselben Werte wie bei der 5x5 Feldertafel, allerdings verringern sich die Freiheitsgrade auf 9. Dadurch erniedrigt sich auch der Grenzwert für die 5%-ige Irrtumswahrscheinlichkeit auf 16,9. Diese Darstellung mit einer 4x4 Feldertafel scheint die Verhältnisse besser wiederzugeben und pointiert den hochsignifikanten Zusammenhang der Expressionsintensitäten der untersuchten Marker; die entsprechenden Kontingenzkoeffizienten mit jeweils $K=0,70$ für GD₂/Vimentin, $K=0,67$ für GD₂/GFAP und $K=0,71$ für GFAP/Vimentin bestätigen den Zusammenhang. Allerdings wird das Ergebnis gegenüber der 5x5 Feldertafel grundsätzlich nicht verändert.

Als Gesamtergebnis der statistischen Auswertung kann somit für die untersuchten Tumoren eine Ko-Expression von GFAP, GD₂ und Vimentin bei mittlerer bis hoher Übereinstimmung der Expressionsintensitäten festgestellt werden.

IV. Diskussion

In einer Vorgängerarbeit wurde die Verteilung von GD₂ in normalem Hirn und in Hirntumoren sowie reaktivem astrozytärem Gewebe untersucht. Die Untersuchung wurde mit immunhistochemischen Mitteln durchgeführt und ergab ein deutliches Vorkommen von GD₂ in ganz bestimmten Strukturen des Hirns, obwohl GD₂ normalerweise in Homogenaten biochemisch nicht zu entdecken ist. Gleichzeitig wurde GD₃ in normalem Hirn immunhistochemisch nicht entdeckt. Dieses scheint jedoch deutlich in gleichmäßiger Weise im Hirn verteilt zu sein, so dass sich eine recht klare Unterscheidung immunhistochemischer und biochemischer Verhältnisse zeigt (Mennel et al. 2000).

Weitere Untersuchungen zum Gangliosidgehalt von Gliomen ergaben die interessante Beobachtung, daß Gangliosidprofile für die pilozytischen Astrozytome in ähnlicher Weise wie für Glioblastome gefunden wurden. In der oben erwähnten Arbeit wurde eine gewisse Korrelation der Zunahme einfacher lactathaltiger Ganglioside im Verhältnis zu mehrzugigen Gangliosiden gefunden, die mit einem zunehmenden Malignitätsgrad (Gliome II, III, IV) korreliert waren. Ein entsprechender Quotient zeigt einen quantitativ gleichsinnigen Verlauf mit zunehmender Malignität.

Zusätzlich wurden noch charakteristische Unterschiede des Gangliosidgehaltes zwischen weißer und grauer Substanz im normalen menschlichen Hirn gefunden (Wagener et al. 1999).

Die im ZNS von Säugern besonders stark angereicherten Ganglioside gehören überwiegend zur Gangliogruppe. Hauptkomponenten der grauen Substanz sind GM₁ (G_{tet1}), GD_{1a} (G_{tet2a}), GD_{1b} (G_{tet2b}) und GT_{1b} (G_{tet3b}); die weiße Substanz enthält zusätzlich unterschiedliche Mengen G_{gal1} sowie GM₃ (G_{lac1}), GD₃ (G_{lac2}) und GM₂ (G_{tri1}). In reifen Neuronen sind typischerweise GM₁ (G_{tet1}), GD_{1a} (G_{tet2a}), GD_{1b} (G_{tet2b}) und GT_{1b} (G_{tet3b}) vertreten; G_{gal1} ist in ihnen und auch in Astrozyten wahrscheinlich nicht vorhanden, sondern stellt einen Bestandteil der Oligodendroglia dar (Wiegandt 1984).

Untersuchungen der Gangliosidmuster von Svennerholm et al. (1989) an menschlichem Hirngewebe der 10. Gestationswoche bis zum 80. Lebensjahr wiesen ebenfalls GM₁, GD_{1a}, GD_{1b} und GT_{1b} als Hauptkomponenten aus. Sie zeigten typische

entwicklungsbedingte Konzentrationsschwankungen der Gangliosidmuster in Abhängigkeit von Schwangerschaftswoche, Geburt und Lebensalter. Dabei ähneln sich die Kurvenverläufe von GM₁ und GD_{1a} sowie diejenigen der b-Serien Ganglioside GD_{1b}, GT_{1b}, GQ_{1b}, GM₃ und GD₂.

Jennemann et al. (1990) fanden in der grauen Substanz von Autopsiematerial folgende prozentuale Verteilung der einzelnen Gangliosidkomponenten:

GM ₁	27,2	GM ₃	4,6
GD _{1a}	22,2	GD ₃	5,0
GD _{1b}	19,2	GM ₂	3,2
GT _{1b}	13,5	GD ₂	4,8

Die Biosynthese höher sialylierter Ganglioside des ZNS geht vom Lactosylceramid aus und erfolgt durch schrittweise Übertragung einzelner Monosaccharide auf die wachsende Zuckerkette; steuernde Enzyme dieses Prozesses sind die Glykosyltransferasen, bei denen es sich vermutlich um Multienzymkomplexe handelt. Die Bindung von Sialinsäuren vermitteln Sialyltransferasen (Wiegandt 1984, Rahmann und Rahmann 1988).

Gut untersucht ist die Abbaureihe der Ganglioside in den Neuronen und deren Störungen. Die Abbauschritte der Ganglioside wurden aufgrund der entsprechenden Speicherkrankheiten (Lake 1992, Beck 1992) erforscht. Bei den auf Störungen des Gangliosidabbaus beruhenden Gangliosidosen kommt es durch genetisch bedingte lysosomale Enzymdefekte zum unvollständigen Abbau der Gangliosidmoleküle und zur Speicherung unterschiedlicher Zwischenprodukte, je nachdem auf welcher Stufe der Defekt lokalisiert ist. Eine Übersicht dazu findet sich bei Crome und Stern (1976). Charakteristische klinische Symptome der lysosomalen Speicherkrankheiten sind bei Cantz und Gehler (1992) tabellarisch dargestellt.

Die bisher beschriebenen Funktionen der Ganglioside, wie etwa die reifungsbedingten Veränderungen ihrer Zusammensetzung im ZNS sowie die Ergebnisse aus Untersuchungen isolierter und kultivierter Astrozyten und Neuronen verschiedener Tierspezies sprechen für einen Zusammenhang von Zelldifferenzierung bzw. Zellendifferenzierung und vorherrschendem Gangliosidmuster. Aus diesem Grund beschäftigt sich die Hirntumorforschung mit der Frage einer möglichen Zuordnung

bestimmter Gangliosidmuster zu den verschiedenen Tumorarten und deren einzelnen Malignitätsstufen. Hier sollen diesbezügliche Untersuchungen für astrozytäre Gliome dargestellt werden, die alle mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurden:

1966 erfasste Seifert das GD₃ als „ein weiteres hirntumorcharakteristisches Gangliosid“, nachdem er in vorausgegangenen Arbeiten GM₃ als Hauptgangliosid der Meningeome beschrieben hatte. Er wies GD₃ in einem atypischen Meningeom nach, aber auch als regelmäßigen Bestandteil vieler anderer Hirntumoren wie Gliome, Ependymome und Medulloblastome (Seifert und Uhlenbruck 1965). Erwähnenswert ist seine Beobachtung, daß „makroskopisch normales Gewebe in der Nachbarschaft infiltrierend wachsender Tumoren ebenfalls pathologische Ganglioside zeigte.“

Kostic und Buchheit (1970) analysierten die Gangliosidzusammensetzung von 3 cerebellären Astrozytomen (1x Grad II, 2x Grad III) und 4 cerebralen Gliomen (1x Grad II, 1x Grad III und 2x Grad III-IV nach Kernohan) sowie in einzelnen Fällen von an den Tumor angrenzendem Gewebe und fanden folgende Verteilung:

Gangliosidmuster in 3 **cerebellären** Tumoren (in Prozent der gesamten lipidgebundenen Sialinsäure).

Normalwerte cerebellum
(Suzuki 1965)

44 Jahre	73 Jahre	Grad	II	angrenzendes Gewebe	III	III
L 639	666	TOTAL NANA	503	605	186	268
R 663		<u>µg/g Naßgewicht</u>				
L<1;R1,0	<1	GM ₂	2,0	0,6	4,5	3,4
L7,7;R6,0	7,7	GM ₁	10,1	8,9	17,8	18,5
L15,6;R14,4	13,9	GD _{1a} +GD ₃	17,4	16,3	28,3	29,5
		GD ₂	8,2	7,6	10,8	10,6
L25,8;R25,9	24,6	GD _{1b}	20,3	20,7	15,3	14,1
L41,6;R43,8	49,0	GT ₁	35,4	37,2	23,4	24,1
L8,8;R8,5	4,1	GQ ₁ -	5,0	8,2	6,2	5,1
		origin	2,3	1,4	1,7	2,2

L = linke Seite, R = rechte Seite des cerebellums; TOTAL NANA = Gesamtgehalt lipidgebundener Sialinsäure

Die Autoren beziehen sich auf Normalwerte aus Untersuchungen regionaler Gangliosidmuster in cerebralem und cerebellärem Autopsiematerial einer 44 und 73 Jahre alten Person von Suzuki (1965). In diesen Ergebnissen existiert noch keine

chromatographische Trennung von GD_{1b} und GD₂ sowie von GD_{1a} und GD₃; wegen der geringen Konzentration konnte GM₃ nicht bestimmt werden. Die ursprünglich verwandte Nomenklatur von Korey und Gonatas (1963) wurde in der Tabelle in die Nomenklatur von Svennerholm übertragen.

Prozentuale Gangliosidverteilung in 4 **cerebralen** Gliomen (als Anteil der gesamten lipidgebundenen Sialinsäure):

Normalwerte gyrus postcentralis (Suzuki 1965)			Grad II	angr. Gewebe	Grad III	angr. Gewebe	Grad III-IV	Grad III-IV
44 Jahre	73 Jahre							
L906;R1013	930	TOTAL NANA µg/g Naßgew.	407	940	344	780	102	153
L1,1;R<1	1,2	GM ₂	2,3	1,1	3,3	2,0	3,0	5,6
L10,6;R9,7	12,3	GM ₁	11,2	10,3	18,5	11,5	19,0	21,3
L21,5;R22,2	20,2	GD _{1a} +GD ₃	0,1	20,7	26,4	18,2	32,2	29,6
		GD ₂	4,3	8,0	12,4	30,7	14,1	9,7
L30,3;R30,3	28,5	GD1b	27,9	19,9	17,1		12,7	13,7
L30,9;R31,0	31,5	GT1	29,5	24,6	17,1	33,1	12,9	12,9
L5,5;R5,6	5,9	GQ1- origin	3,3 1,6	4,6 2,7	2,6 1,5	5,2 2,0	3,3 1,7	2,4 2,0

L = linke Seite, R = rechte Seite des gyrus postcentralis; TOTAL NANA = Gesamtgehalt lipidgebundener Sialinsäure

Kostic und Buchheit fanden in allen untersuchten Tumoren eine Verminderung des sialinsäurehaltigen Gesamtlipids, wobei die Grad II Tumoren nah an die Normalwerte heranreichen während mit zunehmendem Malignitätsgrad eine Abnahme des Gesamtgangliosidgehalts einhergeht, so daß die Grad III-IV Gliome den niedrigsten Spiegel aufweisen. Bezogen auf die Referenzwerte steigt mit höherer Malignität in den cerebralen und cerebellären Gliomen Grad III und III-IV der Anteil von GM₁ sowie GD_{1a} und GD₃ (die chromatographisch nicht aufgetrennt werden konnten) bei gleichzeitiger Abnahme der höher polaren Ganglioside GT_{1b} und GD_{1b}.

Bemerkenswert ist eine Erhöhung der GD₂ Fraktion in unterschiedlichem Ausmaß (zwischen 7,6 % und 30,7 %) in den gliösen Tumoren Grad III bzw. III-IV und dem untersuchten angrenzenden Gewebe. Auch ein cerebelläres Astrozytom Grad II weist mit 8,2 % der Gesamtganglioside einen etwas höheren Spiegel auf. Die Normalwerte für GD₂ in der grauen Substanz liegen in verschiedenen Studien unter 5 % (Suzuki 1967; Jennemann et al. 1990).

Yates et al. (1979) analysierten die Gangliosidzusammensetzung in zwei differenzierten Astrozytomen, zwei anaplastischen Astrozytomen und drei Glioblastomen. Sie fanden in allen Tumoren einen höheren Wasser- und einen niedrigeren Gesamtlipidgehalt als in der weißen oder grauen Substanz von Normalhirn. Der Gesamtgehalt sialinsäurehaltiger Lipide lag mit 0,33-0,60 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht näher an dem der weißen (0,36 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht) als demjenigen der grauen Substanz (2,6 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht). Die prozentuale Gangliosidverteilung in den einzelnen astrozytären Tumoren war folgendermaßen:

Verteilung in % von sialinhaltigen Gangliosiden in primitiven neuroektodermalen und astrozytischen Tumoren^a

	G0	G1	G2	G2a	G3	G4	G5	G6
		(GT)	(GD1b)	(GD2)	(GD1a &GD3)	(GM1)	(GM2)	(GM3)
Primitive neuroektodermale Tumoren	14.9	8.8	8.6	28.0	18.1	5.9	7.4	8.6
Neuroblastome	8.9	8.7	6.2	15.2	13.3	6.2	17.8	23.8
Medulloblastom	13.3	4.2	7.7	ND	17.9	4.0	51.1	2.1
cerebraler nicht klassifizierter Tumor	5.2	10.1	7.0	ND	31.6	23.6	11.0	11.7
Astrozytäre Tumoren differenziert	10.0	16.4	15.6	12.0	31.3	5.5	4.7	4.9
	8.5 ^c	8.7	5.8	9.7	43.3	6.6	13.8	3.9
anaplastisch	2.2	3.4	3.2	ND	42.6	6.7	8.0	34.1
	5.9	18.2	2.6	21.2	42.0	4.2	14.8	9.3
Glioblastome	7.5	3.9	4.3	12.6	21.3	12.0	24.9	13.8
	5.8	3.5	3.6	2.5	13.9	5.6	21.5	43.8
	3.7 ^c	7.6	7.1	4.1	23.5	12.3	10.0	31.4
Graue Substanz ^b	3.9	19.7	16.7	3.0	40.0	14.2	1.7	1

a) Werte sind % der totalen Sialinsäuren, die von der Platte in jedem Band erhalten werden.

b) Werte sind von Suzuki 1976

c) Tumoren wurden in der Folge kultiviert.

Im Vergleich mit normaler grauer Substanz wiesen alle Tumoren höhere Anteile von GM₂ und GM₃ und niedrigere Konzentrationen von GT_{1b} und GD_{1b} auf. Mit zunehmender Malignitätsstufe stieg der prozentuale Gangliosidgehalt von GM₂ und GM₃ an und sank derjenige von GD_{1b} und GT_{1b} ab, so daß die differenzierten Astrozytome innerhalb der untersuchten Tumoren den höchsten Anteil komplexer und den niedrigsten Anteil an Monosialogangliosiden besaßen, während es bei den Glioblastomen umgekehrt war.

Die Werte für GD_{1a} und GD₃, die chromatographisch nicht getrennt werden konnten, lagen für die Astrozytome Grad II und III im Normbereich und waren in den Glioblastomen erniedrigt; GM₁ war in den Astrozytomen Grad II und III erniedrigt und näherte sich für die Glioblastome dem Normalwert an, so daß sich für diese Fraktionen die Ergebnisse von Kostic und Buchheit nicht bestätigten. Für GD₂ besteht in allen Astrozytomen und einem Glioblastom eine deutliche Erhöhung auf das 3-4-fache des Normalwertes ohne dass sich eine tendenzielle Beziehung zur Tumorgradierung abzeichnet. Die beiden anderen Glioblastome schwanken mit 2,5 % bzw. 4,1 % GD₂ um den Normalwert von 3 %.

In einer Studie von 20 astrozytären Gliomen Grad I-IV nach Kernohan wiesen Traylor und Hogan (1980) ebenfalls eine Verminderung des Gesamtgehaltes sialinsäurehaltiger Lipide im Vergleich zur grauen Substanz des Normalhirnes nach. Die Abnahme des durch diesen Wert repräsentierten Gesamtgangliosids korreliert mit dem Stadium der Tumoranaplasie. Sie war in den 13 Glioblastomen am stärksten und in 5 der 7 Astrozytome Grad I-III ebenfalls deutlich ausgeprägt. Prozentual stellte sich die Aufschlüsselung der Ganglioside in den Tumoren im Vergleich zu normaler grauer und weisser Substanz wie folgt dar:

Gangliosidzusammensetzung in menschlichen cerebralen Astrozytomen (Kernohan Grad I-IV) in % der gesamten lipidgebundenen N-Acetylneuraminsäure ± Standardabweichung (Traylor und Hogan 1980):

	Kontrollhirn ¹		Astrozytome Grad I-III	Astrozytome Grad IV	peritumorales Gewebe
	graue Substanz	weisse Substanz			
Patientenanzahl	2	2	7	13	2
Niederpolare Bande	8	13	13,9±10,2	8,1±6,4	5
GM ₂	2	1	4,6±3,6	8,2±5,3	4
GM ₁	10	14	13,1±4,5	9,9±3,2	10
GD ₃	5	4	14,0±4,9	19,6±6,2	11
GD _{1a}	18	20	15,0±5,3	16,5±9,9	11
GD ₂	0	0	0,8±1,5	5,4±7,1	18
GD _{1b}	23	17	15,1±6,5	14,3±4,7	8
GT _{1b}	25	22	15,0±5,8	11,1±3,1	25
GQ	8	9	12,6±9,1	7,6±5,0	8
Totale LBSA	748	323	309,0±172	207,0±150	312

Totale LBSA = gesamte lipidgebundene N-Acetylneuraminsäure in µg/g Frischgewicht.
¹ Die Kontrollwerte stammen aus Untersuchungen im eigenen Labor der Autoren.

In allen Tumoren bestand eine Zunahme der strukturell einfachen (GD_3 , GM_2 , GD_2) bei gleichzeitiger Abnahme der komplexeren (GD_{1b} , GT_{1b}) Ganglioside mit deutlichster Ausprägung bei den Glioblastomen. GD_3 war in den Glioblastomen auf das Vierfache (ca. 20 %), in den Astrozytomen etwa auf das Dreifache (14 %) erhöht. GM_2 und GD_2 wiesen ebenfalls erhöhte Werte auf, in den Glioblastomen (GM_2 : 8,2 %, GD_2 : 5,4 %) stärker als in den Astrozytomen (GM_2 : 4,6 %; GD_2 : 0,8 %). Gleichzeitig waren GD_{1b} und GT_{1b} auf zwei Drittel bis die Hälfte der Normalwerte erniedrigt.

Das in zwei Fällen untersuchte peritumorale, histologisch normale Gewebe eines Glioblastoms ähnelte in seinem Gangliosidmuster eher dem Tumor- als dem Normalgewebe, wobei als markanteste Veränderung ein GD_2 Anteil von 18 % vorlag.

In einer Tumorstudie von Eto und Shinoda 1982, die mindestens sechs astrozytäre Gliome umfasste, war der Gesamtgangliosidgehalt in zwei differenzierten Astrozytomen Grad I-II mit 119 bzw. 311 μg NANA/g Frischgewebe und in vier Astrozytomen Grad III-IV mit Werten von 169-588 μg NANA/g Frischgewebe wie in vorausgehenden Arbeiten gegenüber grauer Substanz des Normalhirnes erniedrigt. Eine Beziehung zum Malignitätsgrad wurde jedoch nicht gefunden.

Die Tumoranzahl in den einzelnen Malignitätsstufen geht aus dem Text nicht hervor. Die eigene Ergebnisdarstellung der Autoren ist wie folgt: In Gliomen war GD_3 mit einem Anteil von 33-55 % der Gesamtganglioside ein Hauptbestandteil. Gliome Grad III-IV enthielten nur 2-7 % GD_{1b} , 7-11 % GT_{1b} und 2-7 % GD_2 bei höheren Anteilen von GD_3 (49-56 %) und $GD_{1a}\text{-galNAc}$ (11-14 %). Dagegen enthielten Gliome niedriger Gradierung geringere Prozentsätze von GD_3 (34-37 %), $GD_{1a}\text{-galNAc}$ (nicht vorhanden) und GT_{1a} mit höheren Anteilen von GD_{1b} (7-12 %) und GT_{1b} (11-17 %).

Zusammengefasst zeichnet sich mit zunehmender Tumoranaplasie eine Zunahme von GD_3 bei gleichzeitiger Verminderung von GT_{1b} und GD_{1b} ab. Ferner tritt in den Astrozytomen Grad III-IV eine größere Menge $GD_{1a}\text{-galNAc}$ auf.

Berra et al. 1985 bestätigen in einer Untersuchung von 38 menschlichen astrozytären Tumoren (Grad I:3; Grad II:5; Grad III:17; Grad IV:13) einen GD_3 Anstieg gegenüber Normalhirngewebe im statistisch signifikanten Bereich, während sich die einzelnen Malignitätsstufen nicht signifikant voneinander unterschieden. Ferner beschrieben sie

eine Abnahme polysialilierter Ganglioside (GT_{1b}, GD_{1b}, GD_{1a}) mit zunehmender Tumoranaplasie. Sie fanden mit steigender histologischer Gradierung eine Zunahme des DNA-Gehaltes/g Frischgewebe bei gleichzeitiger Abnahme des Gesamtgangliosidgehaltes (bezogen auf mg DNA). Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine statistisch signifikante Beziehung zwischen DNA- und prozentualem GD₃ Gehalt in den Tumoren, so daß der GD₃ Prozentsatz als möglicher diagnostischer Marker diskutiert wird.

Fredman et al. (1988) untersuchten 26 Gliome Grad I-IV auf ihren Gangliosidgehalt; diagnostisch handelte es sich um 12 Glioblastome, 9 anaplastische Astrozytome, 4 Astrozytome Grad II und 1 pilozytisches Astrozytom. Die Methode beinhaltete die Untersuchung jeweils eines zentralen und eines peripheren Tumorstücks sowie eines makroskopisch normalen Gewebstücks der Tumorumgebung. Vergleichswerte lieferten sieben Fälle von normalem cerebralem Cortex.

Der Gesamtgangliosidgehalt (in μmol lipidgebundener Sialinsäure/g Frischgewebe) war in den zentralen Tumoranteilen auf ca. ein Viertel ($0,82 \pm 0,48$), im peripheren Tumorgewebe geringfügig darüber ($0,99 \pm 0,51$) und im Umgebungsgewebe auf etwa die Hälfte ($1,78 \pm 0,91$) des Normalwertes ($3,43 \pm 0,30$) reduziert. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen Malignität und Gangliosidgehalt.

Im zentralen Tumorgewebe der zehn Gliome Grad II-IV bildete GD₃ mit 28 % den Hauptbestandteil, GD₂ war mit ca. 10 % deutlich, GM₃ mit etwa 6 % gering erhöht. Gleichzeitig bestand eine Verringerung der Gangliotetraosylceramide GT_{1b}, GD_{1b}, GD_{1a} und GM₁. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Gangliosidmuster und Tumormalignität wurde nicht gefunden. Im peritumoralen Gewebe war die Abnahme der Gangliotetraosylceramidfraktionen und die Zunahme von GD₃ geringer ausgeprägt; GM₃ und GD₂ lagen im Normbereich.

Neben obigen Veränderungen fanden sich in der Dünnschichtchromatographie Gangliosidfraktionen, die im Normalhirn nicht vorkommen. Davon wurde Sialyllactotetraosylceramid 3' iso LM1 mittels eines monoklonalen Antikörpers in allen Fällen von 14 untersuchten Gliomen Grad III-IV in nennenswerten Mengen nachgewiesen, aber nur in einem von vier Gliomen Grad II. Ferner wanderten zwischen GD_{1a} und GD_{1b} mindestens drei Gangliosidfraktionen, von denen das üblicherweise dort

lokalisierte GD₂ ca. 75 % ausmachte. Die beiden anderen Fraktionen wurden mit LD1 (Disialolactotetraosylceramid) und Gal-NAcGD_{1a} identifiziert.

Aus den vorgestellten Arbeiten kristallisieren sich folgende Veränderungen der Gangliosidzusammensetzung astrozytärer Tumoren gegenüber grauer Substanz des Normalhirns heraus: Der Gesamtgangliosidgehalt ist in allen Fällen auf die Hälfte bis ein Viertel erniedrigt, wobei einige Autoren einen Zusammenhang zu steigender Tumormalignität sehen (Kostic und Buchheit 1970; Traylor und Hogan 1980; Berra et al. 1985), andere nicht (Eto und Shinoda 1982; Fredman et al. 1988).

In allen Untersuchungen wird, bezogen auf die Gesamtgangliosidkonzentration, eine prozentuale Abnahme komplexer polysialinierter Ganglioside, vor allem der Tetraosylgruppe, bei gleichzeitiger Zunahme der einfacher strukturierten Mono- und Disialoganglioside beschrieben. Übereinstimmend sind GT_{1b} und GD_{1b} in allen Ergebnissen auf zwei Drittel bis die Hälfte erniedrigt, GD₃ ist in der überwiegenden Zahl der Fälle stark erhöht (15-50 % des Gesamtgangliosids). Einige Studien stellen einen positiven Zusammenhang zwischen dem Grad der Tumoranaplasie und der Abnahme von GT_{1b} bzw. GD_{1b} her (Kostic und Buchheit 1970; Yates et al. 1979; Eto und Shinoda 1982; Berra et al. 1985) sowie zwischen steigender Tumormalignität und prozentualer Zunahme von GD₃ (Traylor und Hogan 1980; Eto und Shinoda 1982). Andere Untersuchungen bestätigen diese Beziehungen nicht (Berra et al. 1985; Fredman et al. 1988).

Für GM₃ und GM₂ wurden teilweise Normal-, teilweise erhöhte Werte gefunden. GD₂ weist in den untersuchten Tumoren ohne sichere Beziehung zum Malignitätsgrad neben Normalwerten auch auf das Doppelte bis Vierfache (10-20%) erhöhte Werte auf.

Bemerkenswert sind in einigen Fällen hohe GD₂ Konzentrationen im untersuchten peritumoralen Gewebe mit Spitzen von 30 % im Umgebungsgewebe eines cerebralen Astrozytoms Grad III-IV bei Kostic und Buchheit (1970) und 18 % in zwei Fällen des peritumoralen Gewebes eines Glioblastoms (Traylor und Hogan 1980). GD_{1a} und GM₁ sind in der Regel normal oder erniedrigt. Nur Kostic und Buchheit (1970) konstatieren für GM₁ eine Erhöhung, die sich in späteren Studien nicht fand.

Zwei Untersuchungen wiesen in malignen Gliomen Grad III und IV Ganglioside nach (3'-iso LM1; LD1; Gal-NacGD_{1a}), die im Normalhirn nicht oder nur in Spuren vorkommen (Eto und Shinoda 1982; Fredman et al. 1988).

Im peritumoralen Gewebe schwankten die Gangliosidmuster von tumoranalogen Veränderungen, vor allem der Abnahme von GT_{1b} und GD_{1b} und Zunahme von GD₃ und GD₂ bis zur Annäherung an die Normalhirnverteilung.

Obige Ergebniszusammenfassung stellt eine Tendenz dar, wobei zwischen den einzelnen Arbeiten erhebliche quantitative Schwankungen für die untersuchten Gangliosidfraktionen bestehen und darüberhinaus mehr oder weniger große Differenzen bei den als Bezugsgrößen verwandten jeweiligen Normalwerten. In den einzelnen Studien zeigt sich aber auch, dass für die gleichen Malignitätsstufen zwischen den untersuchten Tumoren eine große Variabilität hinsichtlich der Gangliosidkonzentrationen einzelner Fraktionen besteht. Dieser Sachverhalt hängt möglicherweise mit der zellulären und geweblichen Polymorphie zusammen, die bei den astrozytären Gliomen auch innerhalb der einzelnen Malignitätsstufen stark ausgeprägt ist. Diese Heterogenität ist gut bekannt und gilt sogar als Charakteristikum des Glioblastoms, der malignen Form astrozytärer Gliome, in einem Maße, dass sie namensprägend war: Buntes Gliom, glioblastoma multiforme (Virchow 1863; Lipka 2001). Die Heterogenität hat unter verschiedenen Bezeichnungen auch Eingang gefunden in die Begriffsbildung der zunehmenden Malignisierung der Gliome: Gewebliche und zelluläre Polymorphie (Zülch und Mennel 1974), Pleomorphie (Zülch und Wechsler 1968), zunehmende Anaplasie und nicht zuletzt als Parallelsetzung zu den unterschiedlichen genetischen Veränderungen im Verlauf der primären und sekundären Entwicklung des Glioblastoms (Mennel 1996). Diese Heterogenität beruht bezüglich ihrer zellulären Ausprägung auf der Beteiligung ganz unterschiedlicher astrozytärer Zellformen am Tumorwachstum. Im Glioblastom sind typische sternförmig, eher protoplasmatische, gemästete, aber auch bipolare und globuliforme Zellen anzutreffen, darüberhinaus werden Riesenzellen in unterschiedlichem Ausmaße gebildet.

Man kann annehmen, dass im Zuge der zunehmenden Entdifferenzierung eine der wichtigen Aufgaben der Astroglia, die Stabilisierung des feingeweblichen Raumes, zunehmend verlorenght. Dafür würde auch die grössere Beteiligung einfacher Zellen

an Glioblastomen sprechen. Allerdings würde sich dadurch das Auftreten gemistozytischer Astrozytome und die Beteiligung gemistozytischer Zellen am Glioblastom, die reich an Organellen, vor allem Intermediärfilamenten sind, nicht erklären. Offenbar ist dies ein ephemer auftretender „progressiver“ Vorgang, der vermutlich eine genetische Basis hat, eine mehr oder weniger häufig auftretende, aber letztendlich zufällige Entwicklung.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für die Tatsache, dass ein durchgehendes Muster der Korrelation zwischen Gangliosidverteilung und Malignitätsstufe nicht gefunden werden konnte, kann in den vielfachen Funktionen der gangliosidären Sphingolipide gesehen werden. Zu den vielen schon angesprochenen, teilweise auch hypothetischen Funktionen wurden in den letzten Jahren neue durch weitere Untersuchungen hinzugefügt: So wird eine gewisse Assoziation von Gangliosiden mit Tyrosinkinase Rezeptoren für PDGF- β diskutiert, allerdings für Neurone (Oblinger et al. 2003). Eine Erhöhung von Gangliosiden wurde in einer ganzen Reihe von Tumoren beschrieben (Kloppel et al. 1977). Einige sezernieren diese Ganglioside offenbar ins Gewebe (Black 1980). Bekannt ist ein erhöhter Gangliosidgehalt insbesondere für Neuroblastome, Melanome und Nierenzellkarzinome (Ritter und Livingstone 1991), die ja alle eine gewisse Verwandtschaft zu zentralnervösen Tumoren aufweisen. Weiterhin spielen Ganglioside offenbar eine Rolle bei Immunprozessen, die im Verlaufe des Tumorwachstums ablaufen (Heitger und Ladisch 1996). In Zelllinien von Nierenzellkarzinomen wurde für Ganglioside auch eine Apoptose – induzierende Funktion beschrieben (Kudo et al. 2003). Auch wurden erneut unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Hirntumoren von der eigenen Arbeitsgruppe erhoben (Becker et al. 2000, Jennemann et al. 1994, Sung et al. 1994). Eine Beziehung zur Tumorangiogenese wurde von Manfredi et al. (1999) hergestellt. Weitere Funktionen im Tumorwachstum werden diskutiert (Deng et al. 2000, El Abbadi et al. 2001).

Es ist anzunehmen, dass bei der Fülle bekannter und diskutierter Stoffwechselereignisse, auf die Ganglioside Einfluss nehmen können, diejenigen, die die Tumorprogression betreffen, nur einen kleinen Anteil ausmachen und somit ebenfalls statistischen Zufällen unterworfen sind, die sich bei der zu erwartenden Diversifizierung der Funktionsbläue dann nicht gesetzmäßig ausdrücken können.

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Ergebnisse zeigen nun, dass eine Assoziation zumindest des Gehaltes an GD₂ mit dem progressiven Verhalten gliöser Tumoren, der Bildung von Intermediärfilamenten auf subzellulärer Ebene und dem Auftreten von Gemistozyten auf zellulärer Ebene, besteht. Die GD₂ Expression entspricht somit der Expression von GFAP, für welches die Korrelation mit Malignitätsstufen ebenfalls ganz unterschiedlich beurteilt wird. Man findet im Allgemeinen eine gewisse Tendenz zur Abnahme GFAP exprimierender Zellen mit zunehmender Malignität (Schwechheimer 1990), jedoch gibt es auch Berichte, die überhaupt keinen Zusammenhang annehmen (Gulotta et al. 1985; Pasquier et al. 1983; Pasquier et al. 1983). Für Vimentin kann man eine noch schwächere Assoziation zur Tumorprogression annehmen (Reifenberger et al. 1987).

Die vorgelegten Ergebnisse weisen auf eine positive Korrelation von GD₂ zu GFAP, eine (bekannte) Korrelation von GFAP zu Vimentin und eine weitere positive Korrelation von GD₂ zu Vimentin in abnehmender Stärke hin. Damit besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression eines Gangliosids mittleren Reifungsgrades und dem Intermediärfilamentgehalt astrozytärer Zellen. Offenbar sind alle diese Eigenschaften nur lose mit der Entdifferenzierung gekoppelt. – Ob der Zusammenhang mit den Gemistozyten nur die Bildung der Intermediärfilamente betrifft oder Ausdruck einer prinzipiellen Stoffwechselintensität dieser Zellen ist, muss weiter untersucht werden.

V. Abbildungen und Abbildungslegenden

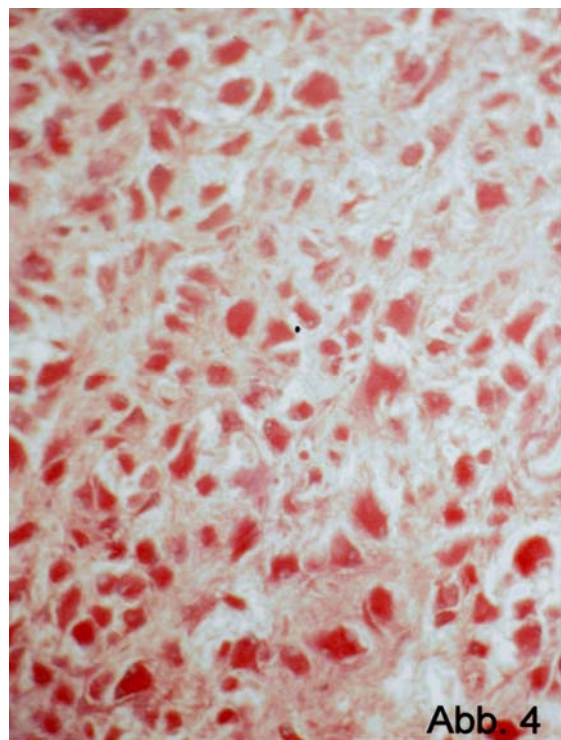
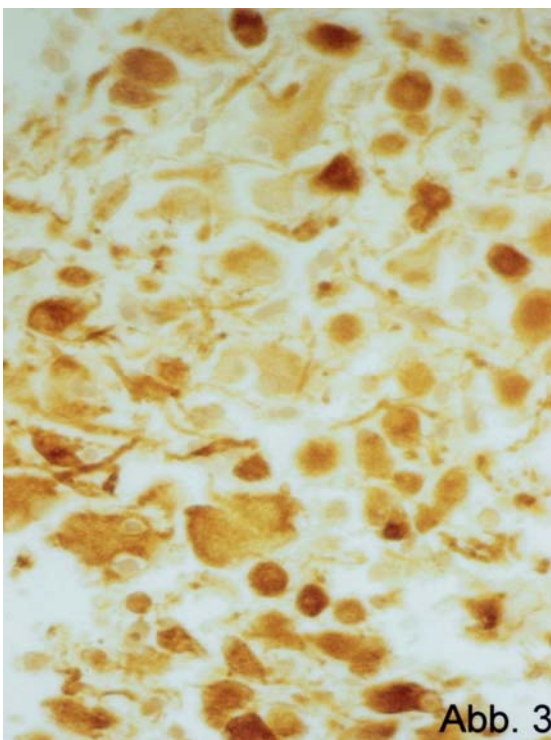
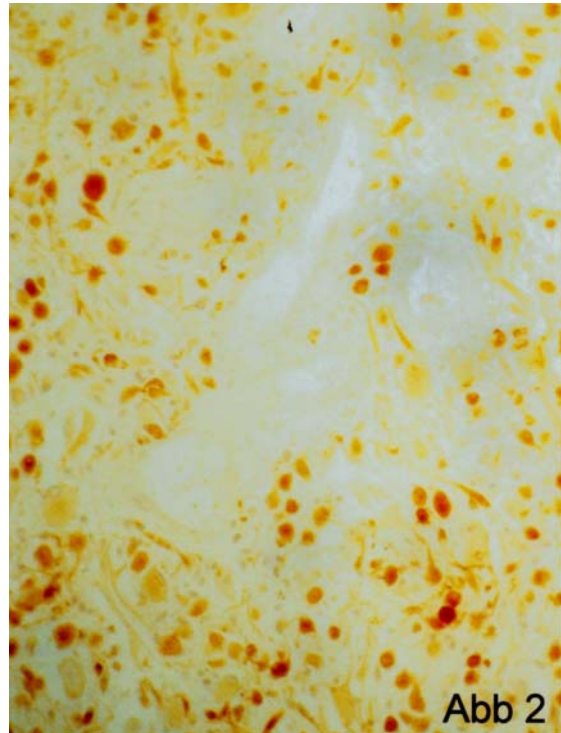
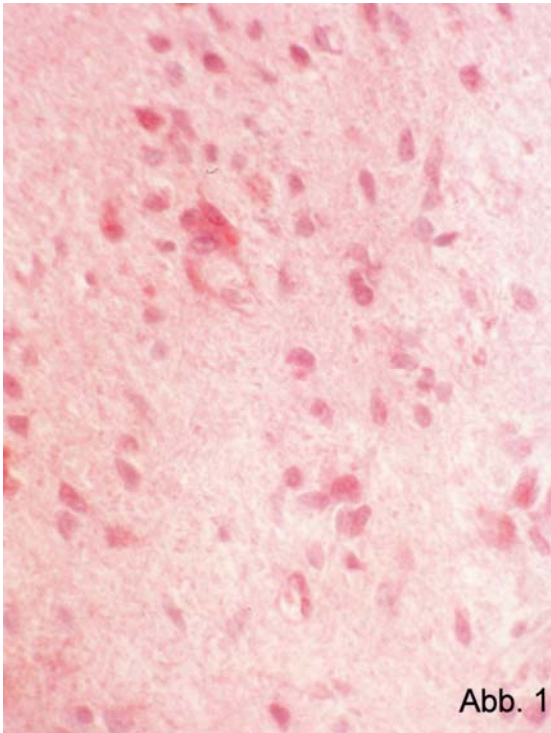


Abbildung 1: Fibrilläres Astrozytom, WHO II, GD₂: Deutliche Darstellung GD₂-positiver Astrozyten; einzelne Somata sind angefärbt, vor allem aber das fibrilläre Netzwerk der Zellfortsätze. APAAP, x 500.

Abbildung 2: Gemistozytisches Astrozytom, WHO II, GFAP, Übersicht: Die positiven Zelleiber heben sich aus einer eher gering gefärbten Matrix deutlich ab. PAP, x 125.

Abbildung 3: Gemistozytisches Astrozytom, WHO II, GFAP, stärkere Vergrößerung: Man erkennt nun neben der starken Darstellung polygonaler Zelleiber auch die astrozytären, kürzeren und plumpen Fortsätze. PAP, x 500.

Abbildung 4: Gemistozytisches Astrozytom, WHO II, GD₂, Übersicht: In durchgehend gemistozytischen Zellpopulationen findet man eine Anfärbung in allen Perikarya und auch zwischen den Zellen. APAAP, x 250.

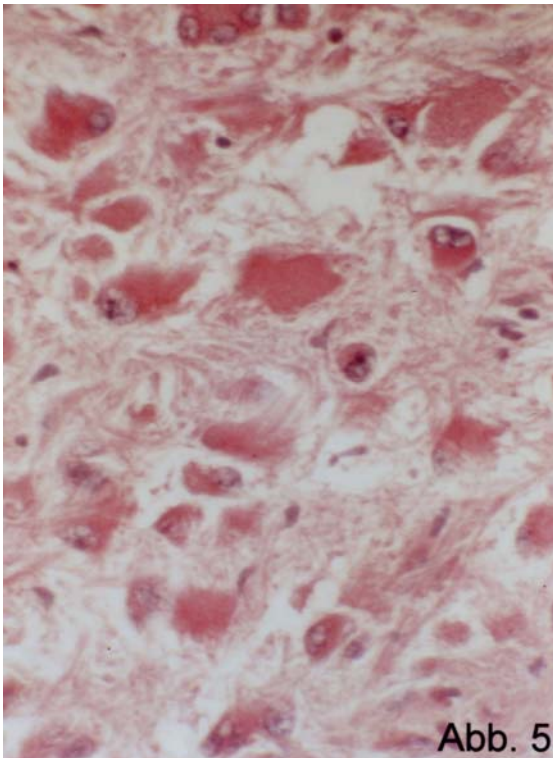


Abb. 5

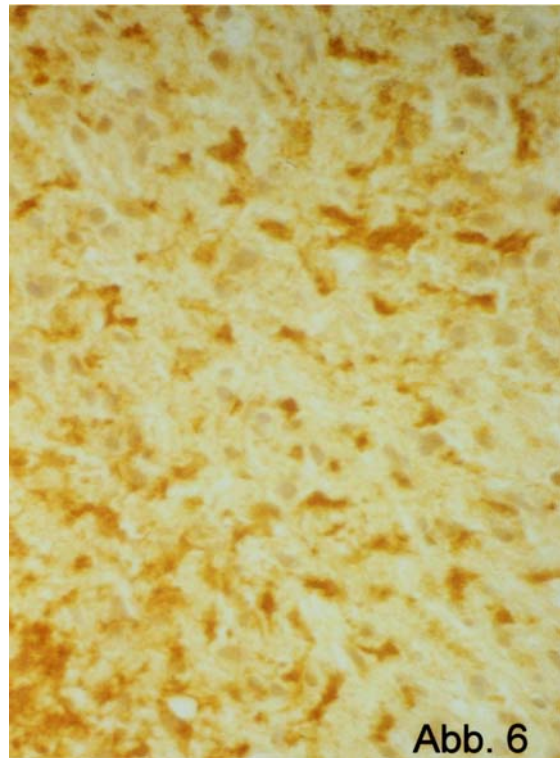


Abb. 6

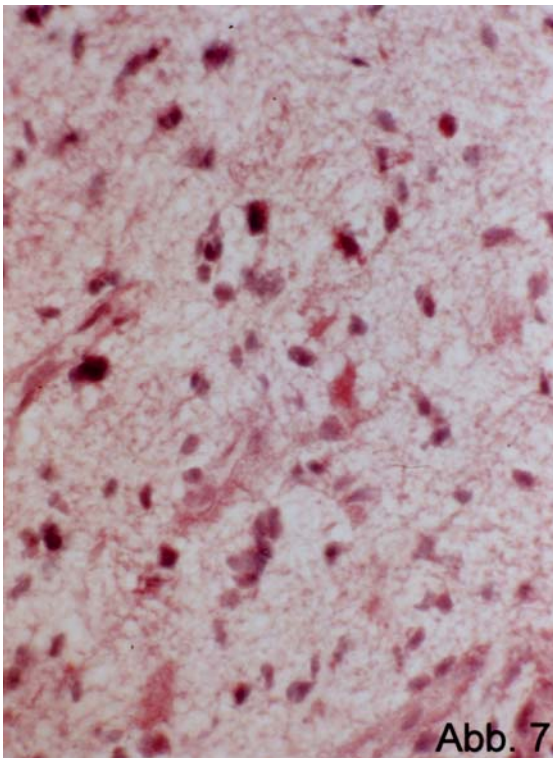


Abb. 7



Abb. 8

Abbildung 5: Gemistozytisches Astrozytom, WHO II, GD₂, stärkere Vergrößerung: Es zeigt sich, dass die GD₂ Expression sowohl im perinukleären Zytoplasma als auch in den Fortsätzen vorhanden ist. APAAP, x 500.

Abbildung 6: Gemistozytisches/protoplasmatisches Astrozytom, WHO II, GFAP: Die protoplasmatischen sternförmig oder mehr bipolar gebauten Zellen exprimieren im Zytoplasma kräftig saures Gliafaserprotein. Einige der Fortsätze dürften analog den Rosenthal'schen Fasern anzusehen sein. PAP, x 250.

Abbildung 7: Gemistozytisches/protoplasmatisches Astrozytom, WHO II, GD₂ : Entsprechende Darstellung der GD₂ Expression im selben Präparat. APAAP, x 250.

Abbildung 8: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GFAP, Übersicht: Durchgehende GFAP Expression im gemischten Astrozytom Grad III. PAP, x 250.

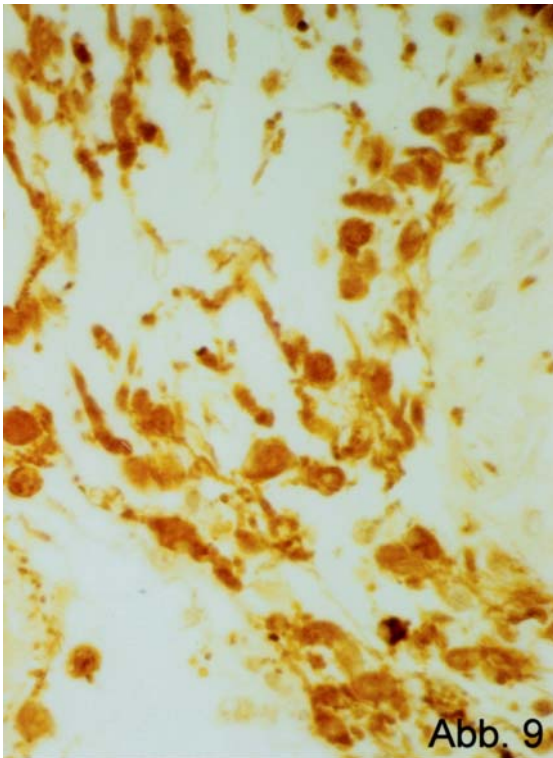


Abb. 9

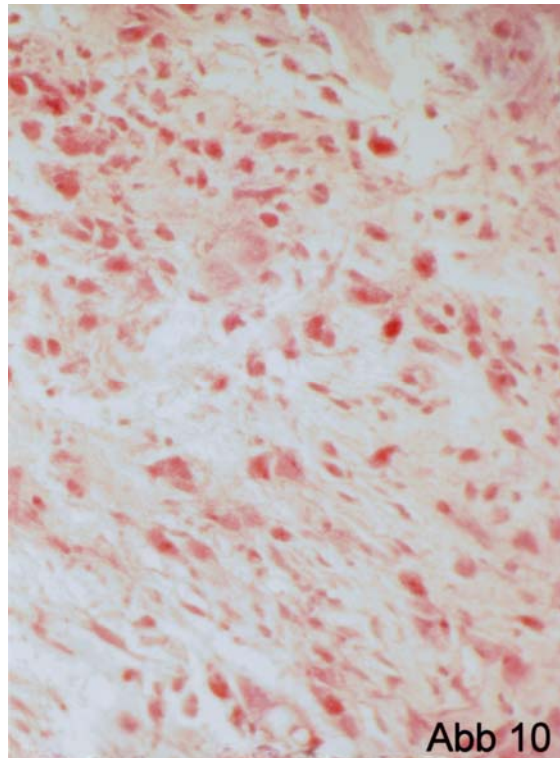


Abb 10

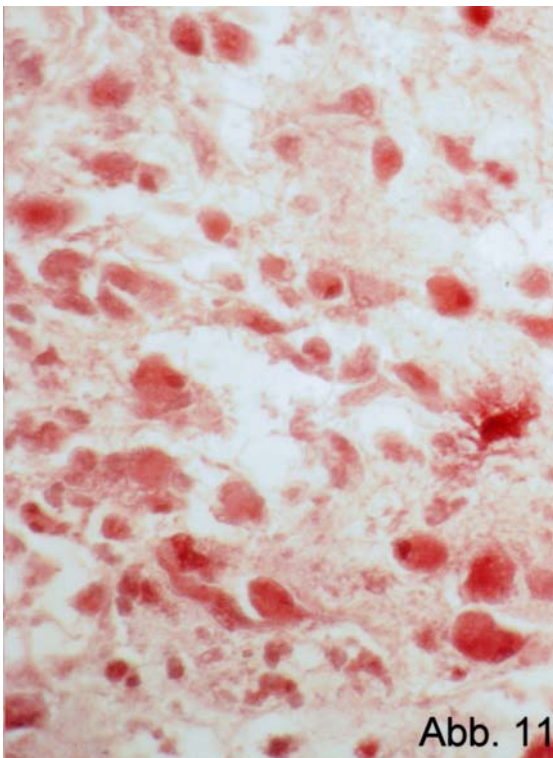


Abb. 11

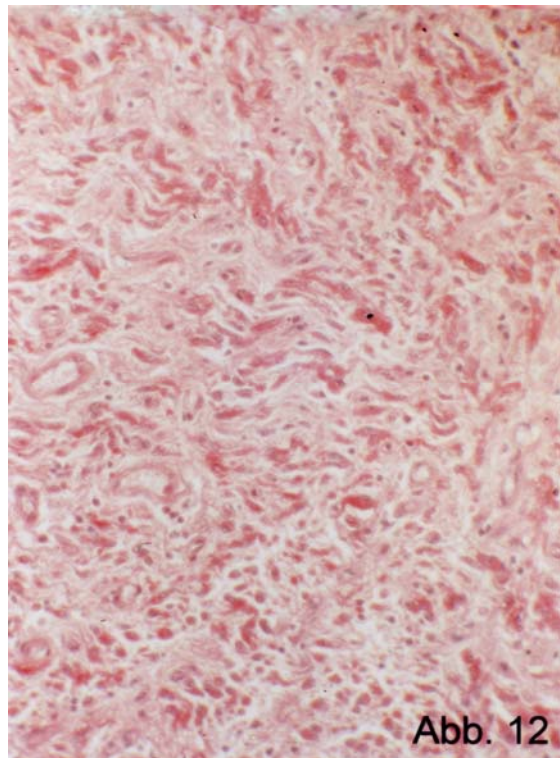


Abb. 12

Abbildung 9: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GFAP, stärkere Vergrößerung: Es zeigt sich im gemischten Astrozytom Grad III die Polymorphie der hier immer noch durchgehend GFAP positiven Tumorzellen. PAP, x 500.

Abbildung 10: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GD₂, Übersicht: Hier erkennt man unterschiedliche Zellformen. Die schon bipolaren Zellen (unterer Bildrand) sind weniger stark gefärbt als die voluminösen protoplasmatisch/gemistozytischen Zellen. APAAP, x 250.

Abbildung 11: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GD₂, stärkere Vergrößerung: Sie zeigt die Bestätigung der GD₂ Expression in den voluminösen Astrozyten bzw. Gemistozysten und einzelnen Fortsätzen. APAAP, x 500.

Abbildung 12: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GD₂, Übersicht: Im gemischten, schon deutlich polymorphen Astrozytom III herrscht eine unterschiedlich starke Expression von GD₂. Beachte die reichlich vorhandenen Gefäße als Ausdruck der beginnenden geweblichen Polymorphie. APAAP, x 250.

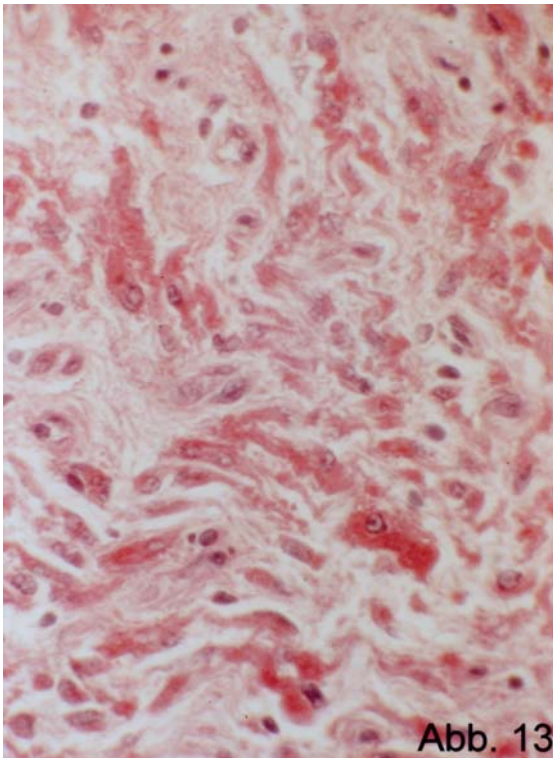


Abb. 13

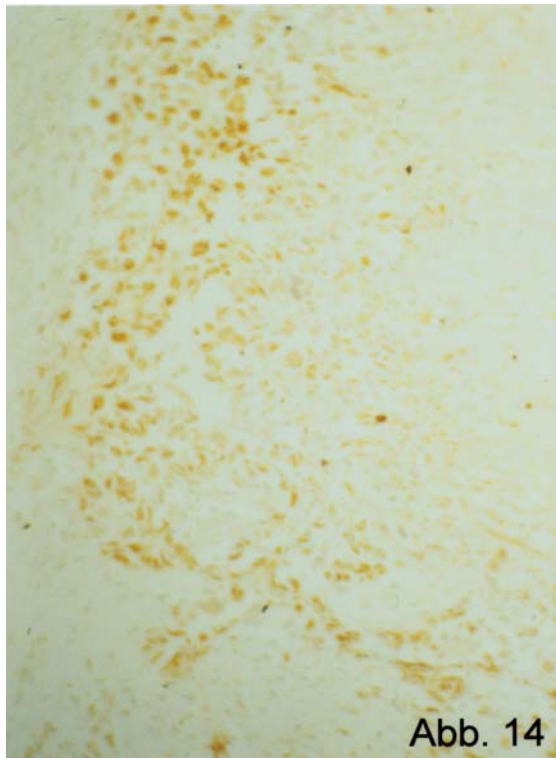


Abb. 14

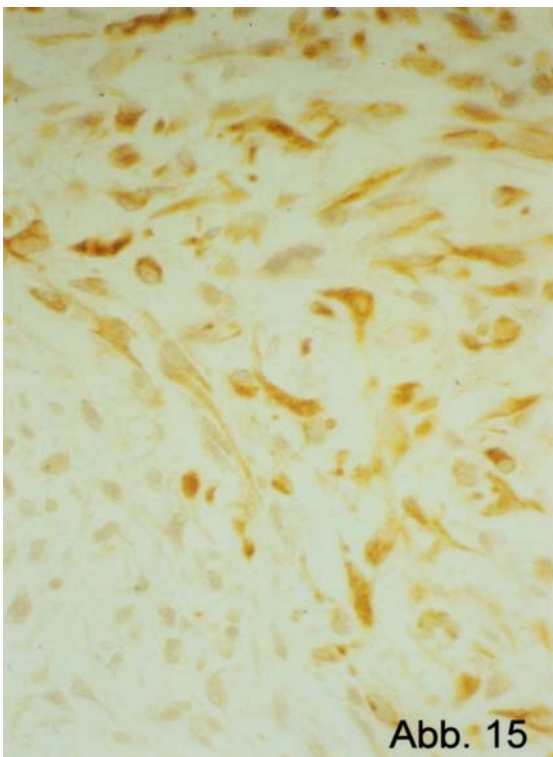


Abb. 15

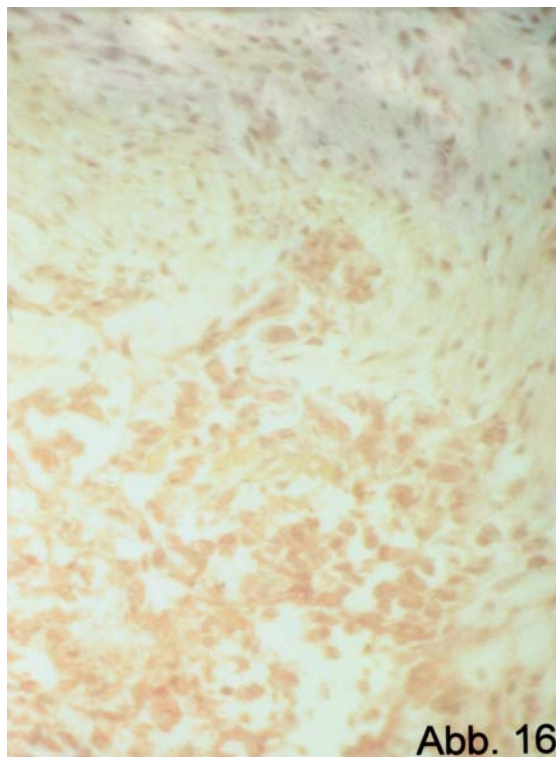


Abb. 16

Abbildung 13: Gemischtes Astrozytom, WHO III, GD₂, stärkere Vergrößerung: Sie ergibt, dass ein Teil der Tumorzellen GD₂ schwach exprimiert. APAAP, x 500.

Abbildung 14: Glioblastoma multiforme, GFAP, Übersicht: Im Glioblastom findet man oft nur begrenzte Bezirke mit deutlicher Expression von GFAP. Obwohl der Nachweis diagnostisch wichtig ist, ist die Anfärbung nur eines Teiles der – dann allerdings als solche erkennbaren – Tumorzellen nicht ungewöhnlich. PAP, x 125.

Abbildung 15: Glioblastoma multiforme, GFAP, stärkere Vergrößerung: Lediglich die bipolaren Zellen im oberen Bildteil sind positiv. PAP, x 250.

Abbildung 16: Glioblastoma multiforme, GD₂: Geringe, teilweise nur angedeutete GD₂ Anfärbung im Glioblastom. APAAP, x 250.

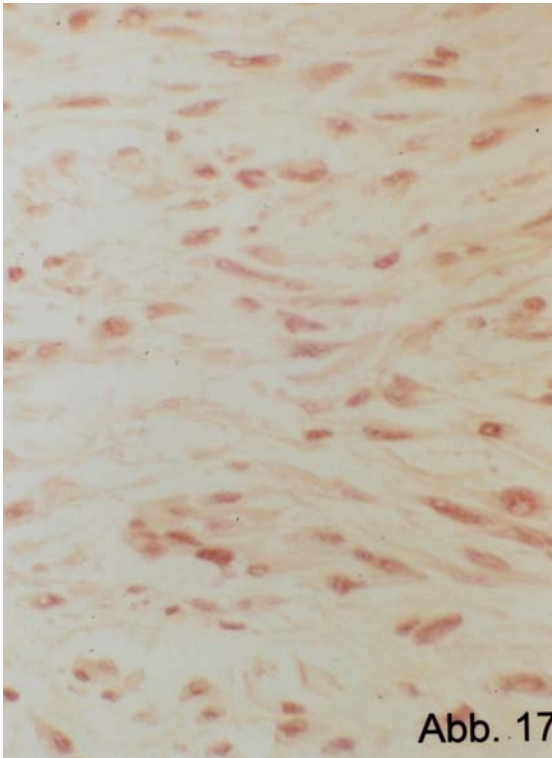


Abb. 17

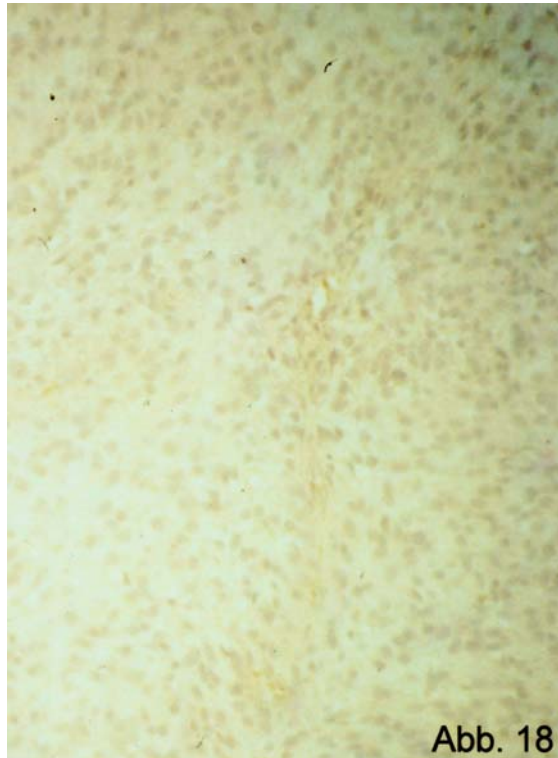


Abb. 18

Abbildung 17: Glioblastoma multiforme, GD₂: In manchen Glioblastomen sind neben den protoplasmatischen und gemistozytischen Zellen noch bipolare Elemente signalintensiv. APAAP, x 250.

Abbildung 18: Glioblastoma multiforme, globuliformes Areal, GD₂: Die GD₂ Expression in globuliformen Anteilen maligner Glioblastome ist kaum mehr zu erfassen. APAAP, x 250.

VI. Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben sich immunhistochemische Gewebs- und Proliferationsmarker in der Pathologie als außerordentlich geeignet erwiesen, um die Gewebszugehörigkeit und die Proliferation von Tumoren zu beurteilen. Besonders interessant sind Antigene, die sowohl gewebs- und/oder proliferationspezifisch sind als auch Angriffsflächen für eventuelle therapeutische Maßnahmen bieten. Hier kommen vor allem membranständige Proteine in Frage.

Eine nicht proteinartige Substanzgruppe, die jedoch Antigeneigenschaften besitzt, sind die Ganglioside. Sie können mit mehreren spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden und gelten als membranständige Moleküle. Ganglioside kommen vor allem in Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems vor; es besteht wohl eine gewisse Beziehung zwischen der Komplexität der Gangliosidstruktur und der phylo- und ontogenetischen Entwicklungsstufe.

Da die Ganglioside vor allem im Nervensystem vorkommen, lag es nahe, nach dem Gangliosidgehalt von Hirntumoren zu fragen. Hierzu gibt es relativ ausgiebige Vorbefunde. Es zeigte sich, dass Ganglioside in Hirntumoren vorhanden sind. Zur Art und Menge gibt es jedoch in der Literatur widersprüchliche Befunde.

Voruntersuchungen, die nunmehr auf einem standardisierten Klassifikations- und Graduierungsschema beruhen, zeigten Unterschiede der Gangliosidexpression in den astrozytären Tumoren, die von der Aggressivität, die in klinischen Graden ausgedrückt wird, abhängig waren. Als ein Nebenbefund ergab sich eine besonders deutliche Expression verschiedener Ganglioside in protoplasmatisch-gemistozytischen Astrozytomen. Diese bestehen aus Zellen, die intermediärfilamentreich sind.

Somit stellte sich die Frage, ob in gliösen Hirntumoren eine Assoziation zwischen Intermediärfilament- und Gangliosidexpression besteht. Dies wurde für das Gangliosid GD₂ in der vorliegenden Arbeit getestet. Dabei wurden intermediärfilamentspezifische immunhistochemische Marker in Tumoren unterschiedlicher Malignitätsstufen verglichen mit dem Gehalt an GD₂. Eine semiquantitative Auswertung wurde mit folgender Fragestellung durchgeführt: Findet sich eine statistische Korrelation der Expressionsstärke von GD₂ mit erstens GFAP und zweitens Vimentin. Als gleichsam

innere Kontrolle wurde die Korrelation von Vimentin zu GFAP bestimmt. Von beiden Intermediärfilamentproteinen ist bekannt, dass sie in astrozytären Zytoskelettstrukturen in unterschiedlicher Weise bei der Entdifferenzierung der Tumoren ihre Expression finden.

Dabei ergab sich jeweils eine positive Korrelation sowohl von GD₂ zu GFAP als auch von GD₂ zu Vimentin. Die Korrelationskoeffizienten sind ähnlich; zwischen beiden Korrelationskoeffizienten liegt der Koeffizient für die korrelierte Expression von GFAP und Vimentin.

Damit kann ausgesagt werden, dass astrozytäre Tumoren in gleichsinniger Weise sowohl Intermediärfilamentproteine als auch GD₂ exprimieren. Es kann weiter vermutet werden, dass eine Co-Lokalisation vorhanden ist, das heißt, dass GD₂ auch auf Intermediärfilamenten lokalisiert ist. Dies würde die durchgehende zytoplasmatische Expression aller drei Marker jeweils erklären. Wie weit die Befunde einander bedingen und warum, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

VII. Summary

Immunohistochemical markers of tissues and proliferation were extraordinarily suitable to analyze tumors concerning their tissue of origin and their proliferation rates. Antigens that exhibit both characteristics and that may be targets for human therapy are especially interesting for clinical and pathology use. This holds true in the first line for antigens that are membrane bound.

One group of substances that is not of protein origin but is fully antigenic are gangliosides. They may be detected with different specific antibodies and are in fact localized in the cell membrane. They can be found in all structures of the central and peripheral nervous system and there is a certain correlation to phylo- and ontogenetic steps of evolution.

Since gangliosides are primarily localized within the nervous system, it was reasonable to ask whether they are represented within brain tumors also. However, different findings were reported concerning this topic in the literature.

Earlier investigations that were based upon the schemes of classification and grading that are used nowadays, show differences in the expression of gangliosides in astrocytic tumors, depending on the grades of aggressivity. There was however an additional result in so far as different gangliosides had an special strong expression in gemistocytic and protoplasmic astrocytomas. In these tumors cells with a high amount of intermediary filaments are found.

Therefore the question arose, whether or not in glial brain tumors an association between intermediary filaments and expression of gangliosides exists. This has been tested for the ganglioside GD₂ in the investigation presented here.

Immunohistochemical markers specific for intermediary filaments have been compared with the amount of GD₂ within tumors of different grades of malignancy. The following questions were tested by semi quantitative analysis:

Is there or is there not a statistic correlation of the range of expression of GD₂ with first GFAP and second Vimentin. As internal control the correlation of Vimentin and GFAP was investigated. It is known, that both intermediate filaments are expressed in different

manner within the astrocytic cytoskeleton during the different steps of ongoing loss of differentiation in tumors.

A positive correlation both of GD₂ versus GFAP and GD₂ versus Vimentin was found. Correlation coefficients are similar; in between both values the coefficient of the correlative expression of GFAP and Vimentin is positioned.

This leads to the conclusion, that astrocytic tumors express in a similar way as well intermediary filament as GD₂. It may be conjectured, that a co-localization takes place, i.e. that the GD₂ may be found even on constituents of the intermediary filaments. This would explain the consequent cytoplasmic expression of all three markers. The question whether or not these findings are interdependent and the reason why must remain open.

VIII. Anhang

Tabelle 1: Färbeintensität von GFAP, GD2 und Vimentin in Zellkörpern bzw. Zellfortsätzen in den Untersuchungsfeldern mit der höchsten Zahl positiv Gefärbter Tumorzellen, n = 33

Nr.	%pos. Zellen			Färbeintensität Zellkörper			Färbeintensität Zellfortsätze		
	GFAP	GD2	Vim	GFAP	GD2	Vim	GFAP	GD2	Vim
1	44	31	19	3	3	2	2	3	1
2	38	35	29	4	3	3	2	3	1
3	48	56	52	3	4	3	1	2	1
4	7	3	1	2	2	2	0	0	0
5	19	21	21	3	3	3	2	2	3
6	50	22	34	3	3	3	3	2	2
7	6	5	4	2	2	2	1	0	0
8	21	12	1	2	3	2	2	4	0
9	55	42	38	4	3	3	2	3	2
10	58	46	58	3	3	3	2	2	1
11	41	17	20	3	3	3	3	3	2
12	18	13	3	3	3	2	4	4	2
13	51	51	13	3	4	2	3	3	2
14	59	63	52	3	4	3	2	3	2
15	5	4	3	3	3	3	4	3	2
16	85	62	27	4	4	3	4	3	3
17	57	40	48	3	3	3	2	2	2
18	12	25	2	3	3	3	3	3	2
19	40	0	37	4	0	4	3	0	3
20	51	36	31	4	3	3	4	4	2
21	2	1	0	2	2	2	0	0	0
22	1	0	1	2	0	2	0	0	0
23	64	49	44	4	3	3	4	3	2
24	4	1	2	2	2	2	0	0	0
25	15	11	8	3	2	3	3	2	3
26	7	4	7	3	3	3	0	2	1
27	20	14	3	3	3	3	3	2	0
28	13	10	7	3	2	2	3	2	2
29	28	37	25	3	3	3	2	2	1
30	55	47	23	4	4	3	3	3	2
31	20	13	18	4	3	3	2	0	2
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	7	4	4	3	3	3	1	1	1

Tabelle 2: Färbeintensität von GFAP, GD2 und Vimentin in Zellkörpern bzw. Zellfortsätzen der Untersuchungsfelder mit der zweithöchsten Zahl positiv gefärbter Tumorzellen, n = 32

Nr.	%pos. Zellen			Färbeintensität Zellkörper			Färbeintensität Zellfortsätze		
	GFAP	GD2	Vim	GFAP	GD2	Vim	GFAP	GD2	Vim
1	16	22	15	3	3	2	2	3	1
2	33	21	22	3	3	2	2	3	1
3	36	24	33	3	3	3	1	2	2
4	5	3	1	2	2	2	0	0	0
5	15	16	15	3	3	3	2	2	3
6	29	21	27	3	3	3	3	2	2
7	5	3	4	2	2	2	1	0	0
8	11	5	1	2	3	2	2	4	0
9	51	33	7	4	3	3	2	3	1
10	40	22	41	3	3	3	2	2	1
11	24	16	7	3	3	3	3	3	1
12	10	9	3	3	4	2	3	3	1
13	49	55	47	3	4	3	2	3	2
14	2	1	2	3	3	3	3	3	2
15	67	41	22	4	4	2	4	3	2
16	50	37	39	3	3	3	2	2	2
17	11	23	1	3	3	3	3	4	2
18	37	0	34	4	0	4	3	0	3
19	51	35	27	4	3	3	4	4	2
20	2	1	0	2	2	0	0	0	0
21	1	0	0	2	0	0	0	0	0
22	52	45	44	4	3	3	3	3	2
23	2	1	1	2	2	2	0	0	0
24	3	6	3	2	2	2	2	2	1
25	4	3	5	3	2	3	0	0	2
26	11	10	2	3	3	3	3	2	1
27	10	8	6	3	2	2	3	2	2
28	24	36	16	3	3	2	2	2	1
29	49	45	22	4	4	3	3	3	2
30	17	10	15	3	3	3	2	0	2
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	6	3	3	4	3	3	1	1	1

IX. Literaturverzeichnis

- Bailey P, Cushing H (1926) A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis. Lippincott, Philadelphia
- Bailey P, Cushing H (1930) Die Gewebsverschiedenheit der Gliome und ihre Bedeutung für die Prognose. Fischer, Jena
- Bailey P (1932) Cellular types in primary tumors of the brain. In: Penfield W (ed) Cytology and cellular pathology of the nervous system. Hoeber, New York, pp 905-995
- Beck M (1992) Stoffwechselbedingte und dystrophische Krankheitsprozesse. Primär metabolisch (genetisch) bedingte Erkrankungen mit Beteiligung des Nervensystems. GM₃-N-Acetylgalaktosaminyltransferasedefekt. Morbus Gaucher. In: Hopf CH, Poeck K, Schliack H (Hrsg) Neurologie in Praxis und Klinik. Band II. Georg Thieme Stuttgart New York
- Becker R, Rohlf J, Jennemann R, Wiegandt H, Mennel HD, Bauer BL (2000) Glycosphingolipid component profiles of human gliomas – correlation to survival time and histopathological malignancy grading. *Clinical Neuropathology* 19:119-125
- Benes L, Kappus C, McGregor GP, Bertalanffy H, Mennel HD, Hagner S (2004) The immunohistochemical expression of calcitonin receptor like-receptor (CRLR) in human gliomas. *J Clin Pathol* 57:172-176
- Berra B, Gaini SM, Riboni L (1985) Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. *Int J Cancer* 36:363-366
- Biencke P (1982) Die großen Ärzte. Lindlar, Zürich
- Black PH (1980) Shedding from the cell surface of normal and cancer cells. *Adv Cancer Res*, 32: 75-199
- Burger PC, Shibata T, Kleihues P (1986) The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: Application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 10:611-617
- Bushe KA (1984) Ein Blick in die Geschichte der Neurochirurgie. In: Mälzer G (Hrsg) Anatomie und Chirurgie des Nervensystems. Ihre Entwicklung in historischen Dokumenten, Bd 3. Kleine Drucke der Universitätsbibliothek Würzburg, S. 1-21
- Cantz M, Gehler J (1992) Vorbemerkungen zu den lysosomalen Speicherkrankheiten. In: Hopf CH, Poeck K, Schliack H (Hrsg) Neurologie in Praxis und Klinik. Band II. Georg Thieme Stuttgart New York
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-363

Crocker J (1990) Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE (ed) Current topics in pathology 82. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong

Crocker J, Nar P (1987) Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151:111-118

Crome L, Stern J (1976) Inborn lysosomal enzyme deficiencies. In: Blackwood W, Corsellis JAN (eds) *Greenfield's Neuropathology*. 3rd ed. Edward Arnold London

Deckert M, Reifenberger G, Wechsler W (1989) Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol* 115:179-188

Deng W, Li R, Ladisch S (2000) Influence of Cellular Ganglioside Depletion on Tumor Formation. *Journal of the National Cancer institute* 92:912-917

El-Abbadi M, Seyfried TN, Yates AJ, Orosz C, Lee MC (2001) Ganglioside composition and histology of a spontaneous metastatic brain tumour in the VM mouse. *British Journal of Cancer* 85(2):285-292

Eng LF, Anderhaegen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28:351-354

Eng LF, Rubinstein LJ (1978) Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* 26:513-522

Engel U, Plate K, Jänisch W, Mennel HD (1994) Nucleolar organizer regions (AgNORs) in primary and recurrent gliomas. *Zentralbl Pathol* 140:73-81

Eto Y, Shinoda S (1982) Gangliosides and neutral glycosphingolipids in human brain tumors: specificity and their significance. *Adv Exp Med Biol* 152:279-290

Fredman P, von Holst H, Collins VP, Granholm L, Svennerholm L (1988) Sialyllactotetraosylceramide, a ganglioside marker for human malignant gliomas. *J Neurochem* 50(3):912-919

Frieder B, Rapport M (1981) Enhancement of depolarization-induced release of aminobutyric acid from brain slices by antibodies to ganglioside. *J Neurochem* 37(3):634-639

Gerdes J, Becker MHG, Key G (1992) Letters to the editor. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168:85-87

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20

Giargaspero F, Doglioni C, Rivano MT, Pileri S, Gerdes J, Stein H (1987) Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol (Berl)* 74:179-182

Gorio A, Carmignoto G, Facci L, Finesso M (1980) Motor nerve sprouting induced by ganglioside treatment. Possible implications for gangliosides on neuronal growth. *Brain Research* 197:236-241

Gowers WR, Horsley V (1888) A case of tumour of the spinal cord: Removal: Recovery. *Trans Roy Med Chir Soc (London)* 71:379

Gulotta F, Schindler F, Schmutzler R, Weeks-Seifert A (1985) GFAP in brain tumor diagnosis: possibilities and limitations. *Pathol Res Pract* 180:54-60

Hakomori S (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Ann Rev Biochem* 50:733-764

Hakomori S (1986) Glykosphingolipide. *Spektrum der Wissenschaft* 1986, pp90-100

Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Campjohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294

Hara A, Hirayama H, Sakai N, Yamada H, Tanaka T, Mori H (1991) Nucleolar organizer region score and Ki-67 labelling index in high-grade gliomas and metastatic brain tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 109:37-41

Haymaker B, Schiller F (1970) *The founders of neurology*. Thomas, Springfield

Heitger A, Ladisch S (1996) Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1303: 161-168

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a prospective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 36:1014

Jänisch W, Schreiber D, Güthert H (1988) *Neuropathologie – Tumoren des Nervensystems*. Gustav Fischer, Stuttgart New York

Jennemann R, Rodden A, Bauer BL, Mennel HD, Wiegandt H (1990) Glycosphingolipids of human gliomas. *Cancer Research* 50:7444-7449

Jennemann R, Mennel HD, Bauer BL, Wiegandt H (1994) Glycosphingolipid Compound Profiles of Human Gliomas Correlate with Histological Tumour Types: Analysis of Inter-Individual and Tumour-Regional Distribution. *Acta Neurochir (Wien)* (1994) 126:170-178

- Kajiwara K, Nishizaki T, Orita T, Nakayama H, Aoki H, Ito H (1990) Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J Neurosurg* 73:113-117
- Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ, Adson AW (1949) A simplified classification of the gliomas. Symposium on a new simplified concept of gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24:71-75
- Kleihues P, Cavenee WK (eds) (2000) *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System* IARC Press Lyon
- Kleihues P, Ohgaki H (1997) Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol* 7:1131-1136
- Klenk E und Langerbeins H (1941) Über die Verteilung der Neuraminsäure im Gehirn. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie* 270
- Kloppel TM, Keenan TW, Freeman MJ, Morre DJ (1977) Glycolipid-bound sialic acid in serum; increased levels in mice and humans bearing mammary carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 3011-3013
- König F (1984) Die Einführung der neuzeitlichen Gehirnchirurgie in deutschen Anstalten. In: Mälzer G (Hrsg) *Anatomie und Chirurgie des Nervensystems. Ihre Entwicklung in historischen Dokumenten*, Bd 3. Kleine Drucke der Universitätsbibliothek Würzburg, S. 22-26
- Korey SR, Gonatas J (1963) Separation of human brain gangliosides. *Life Sci* 5:296-302
- Kostic D, Buchheit F (1970) Gangliosides in human brain tumors. *Life Sci* 9:589-596
- Kudo D, Rayman P, Horton C, Cathcart MK, Bukowski RM, Thornton M, Tannenbaum C, Finke JH (2003) Gangliosides Expressed by the Renal Cell Carcinoma Cell line SK-RC-45 are Involved in Tumor-induced Apoptosis of T Cells. *Cancer Res* 63, 1676-1683
- Lake BD (1992) Lysosomal and peroxisomal disorders. In: JH Adams, LW Duchon (eds) *Greenfield's Neuropathology*. -5th ed. Edward Arnold London Melbourne Auckland
- Lipka N (2001) Die Entwicklung des Gliombegriffes – unter besonderer Berücksichtigung der Begriffsbildung Spongioblastom – von Virchow bis zur Molekulargenetik. Dissertation, Marburg
- Maier H, Morimura T, Öfner D, Hallbrucker C, Kitz K, Budka H (1990) Argyrophilic nucleolar organizer region proteins (AgNORs) in human brain tumours: relations with grade of malignancy and proliferation indices. *Acta Neuropathol* 80:156-162
- Manfredi MG, Lim S, Claffey KP, Seyfried TN (1999) Gangliosides influence Angiogenesis in an Experimental Mouse brain Tumor. *Cancer Res* 49:5392-5397
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR jr, Garrels JI (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309:374-376

Mennel HD (1988) Geschwülste des zentralen und peripheren Nervensystems. In: Doerr W, Seifert G (Hrsg) Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie Band 13/III Pathologie des Nervensystems III. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo

Mennel HD (1996) Hirn- und Rückenmarkstumoren – ein Überblick. In: Huffmann G, Braune HJ (Hrsg) Zerebrale und spinale Prozesse. Einhorn Presse Verlag

Mennel HD, Bosslet K, Geissel H, Bauer BL (2000) Immunohistochemically visualized localisation of gangliosides G_{lac}2 (GD₃) and G_{tri}2 (GD₂) in cells of human intracranial tumors. *Exp Toxic Pathol* 52:277-285

Mennel HD, Rickert D (1994) AgNOR content and PCNA expression in transplanted malignant neurinoma in rats. *Path Res Pract* 190:423-428

Morimura T, Maier H, Budka H (1996) Intermediate filament protein expression in gliomas: Correlation with proliferation rate. *Virchows Arch*

Naffziger HC, Boldrey EB (1948) Cancer of the nervous system (brain, spinal cord and peripheral nerves). *JAMA* 136:96-103

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705-708

Obata K, Oide M, Handa S (1977) Effects of glycolipids on in vitro development of neuromuscular junction. *Nature* 266:369-371

Oblinger JL, Boardman CL, Yates AJ, Burry RW (2003) Domain-Dependent Modulation of PDGFR β by Ganglioside GM1. *Journal of Molecular Neuroscience* 20:103-113

Ostertag CB, Volk B, Shibata T, Burger PC, Kleihues P (1987) The monoclonal antibody Ki-67 as a marker for proliferating cells in stereotactic biopsies of brain tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 89:117-121

Pasquier B, Lachard A, Pasquier D, Couderc P, Delpech B, Courel M-N (1983) Proteine gliofibrillaire acide (GFA) et tumeurs nerveuses centrales. Étude immunohistochimique d'une série de 207 cas. I^{te} partie: Astrocytomes. Glioblastomes. Ependymomes. Papillomes des plexus chorioides. *Ann Pathol* 3:127-135

Pasquier B, Lachard A, Pasquier D, Couderc P, Delpech B, Courel M-N (1983) Proteine gliofibrillaire acide (GFA) et tumeurs nerveuses centrales. Étude immunohistochimique d'une série de 207 cas. II^e partie: Médulloblastomes. Hémangioblastomes. Autres tumeurs. Discussion. *Ann Pathol* 3:203-211

Plate KH, Rüschoff J, Behnke J, Mennel HD (1990) Proliferative potential of human brain tumours as assessed by nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki67-immunoreactivity. *Acta Neurochir (Wien)* 104:103-109

- Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Adnett JJ (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at optimal level. *Histochem J* 18:5-14
- Rahmann H, Rahmann M (1988) *Das Gedächtnis. Neurobiologische Grundlagen.* JF Bergmann München
- Reifenberger G, Szymas J, Wechsler W (1987) Differential expression of glial- and neuronal associated antigens in human brain tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta neuropathol (Berl)* 74:105-123
- Ringertz N (1950) Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand* 27:51-64
- Ringertz N, Ericsson J, Mattsson B (1971) Cancer incidence in Sweden 1959-1965. National Board of Health and Welfare, Cancer Registry, Stockholm
- Ritter G, Livingston PO (1991) Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 2: 401-409
- Roisen FJ, Bartfeld H, Nagele R, Yorke G (1981) Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. *SCIENCE* 214:577-578
- Scherer HJ (1933) Gliomstudien: Die Bedeutung des Mesenchyms in Gliomen. *Virchows Arch A* 291:321-340
- Schwechheimer K (1990) Pathologie des Nervensystems IV. Spezielle Immunmorphologie neurogener Geschwülste. In: Doerr W, Seifert G (Hrsg) *Spezielle Pathologische Anatomie, Bd 13/IV.* Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong
- Seifert H (1966) Über ein weiteres hirntumorcharakteristisches Gangliosid. *Klin Wochenschr* 44:469-470
- Seifert H, Uhlenbruck G (1965) Über Ganglioside in Hirntumoren. *Naturwissenschaften* 52:190
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet* 15: 356-362
- Sung CC, Pearl DK, Coons SW, Scheithauer BW, Johnson PC, Yates AJ (1994) Gangliosides as Diagnostic Markers of Human Astrocytomas and Prmitive Neuroectodermal Tumors. *CANCER* 74:3010-3022
- Suzuki K (1965) The pattern of mammalian brain gangliosides-III. Regional and developmental differences. *J Neurochem* 12:969-979
- Suzuki, K. (1967) In: Aronson, S.M., Volk, B.W. (Edts) *Inborn disorders of sphingolipid metabolism.* Pergamon Press, Oxford

Suzuki K (1976) Chemistry and metabolism of brain lipids. In: Siegal GI, Albers RW, Katzman R, Agranoff BW (eds) *Basic Neurochemistry*. Little Brown & Co. Boston, MA.

pp 308-328

Svennerholm L (1988) Immunological and tumoral aspects of gangliosides. In: Ledeen RW, Hogan EL, Tettamani G, Yates AJ, Yu RK (eds) *New trends in ganglioside Research*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Svennerholm L, Bostroem K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM (1989) Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochimica et Biophysica Acta* 1005:109-117

Traylor TD, Hogan EL (1980) Gangliosides of human cerebral astrocytomas. *J Neurochem* 34(1):126-131

Unio Internationalis Contra Cancrum (1966/1969) *Cancer incidence in five continents*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Virchow R (1863) *Die krankhaften Geschwülste*. Hirschwald, Berlin

von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, Wiestler OD, Seizinger BR (1993) Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 86:81-85

Wagener R, Röhn G, Schillinger G, Schröder R, Kobbe B, Ernestus RI (1999) Ganglioside Profiles in Human Gliomas: Quantification by Microbore High Performance Liquid Chromatograph and Correlation to Histomorphology and Grading. *Acta Neurochir (Wien)* 141:1339-1345

Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-224

WHO (1979) Zülch KJ (ed) *Histological typing of brain tumors*. WHO, Genf

Wiegandt H (1984) Gangliosides. In: Wiegandt H (ed) *Glycolipids*. Elsevier Science Publishers BV

Yates AJ, Thompson DK, Boesel CP, Albrightson C, Hart RW (1979) Lipid composition of human neural tumors. *J Lipid Res* 20:428-436

Zuber P, Hamou MF, de Tribolet N (1988) Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery* 22:364-368

Zülch KJ (1958) *Die Hirngeschwülste in biologischer und morphologischer Darstellung*, third edition. Joh. Ambr. Barth, Leipzig

Zülch KJ (1986) *Brain tumors. Their biology and pathology*. 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo

Zülch KJ (Hrsg) (1984) Tönnis W: Jahre der Entwicklung der Neurochirurgie in Deutschland. Erinnerungen Wilhelm Tönnis 1898-1978, bearbeitet und ergänzt von Klaus-Joachim Zülch. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo

Zülch KJ, Mennel HD (1974) The biology of brain tumors. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds) Tumors of the brain and skull. North Holland, Amsterdam/Elsevier, New York (Handbook of clinical neurology, vol 16, part 1, pp 1-55)

Zülch KJ, Wechsler W (1968) Pathology and classification of gliomas. Prog Neurol Surg 2:1-84

Meine akademischen Lehrer waren:

Altaras, Altland, Bauer, Baumann, Barth, Bayindir, Beck, Beckmann, Benedum, Bhakdi, Breithaupt, Brück, Degkwitz, Dorndorf, Dreyer, Dudeck, Duncker, Ebner, Ecke, Federlin, Fleischer, Friis, Fuhrmann, Gerhardt, Gierhake, Glossmann, Graef, Grebe, Grote, Gundlach, Hager, Hartwig, Heerd, Hehrlein, Heising, Hempelmann, Herget, Hundeiker, Illig, Jacobi, Jessen, Kaluza, Klapp, Klenk, Knorpp, Kracht, Krause, Künzel, Kunze, Lammers, Lampert, Lange, Lasch, Laube, Lumper, Matthes, Meyhöfer, Möhring, Möller, Müller, Müller-Berghaus, Müller-Braunschweig, Mueller-Eckhardt, Neubüser, Neuhäuser, Neuhof, Oehmke, Oksche, Paul, Peters, Pia, Prüll, Rautenburg, Rettig, Richter, Róka, Rothauge, Schatz, Scheer, Schiefer, Schmidt, Schütterle, Schulze, Schumacher, Schuster, Schwemmle, Sigfrid, Stirm, Teschemacher, Vahrson, Vogel, Weis, Weise, Wellensiek, Woitowitz, Wolf, Zeisberger in Gießen

Mennel in Marburg

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.D. Mennel danke ich für die Überlassung des Themas und seine anhaltende und freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung und Abfassung der Arbeit.

Frau Heike Geißel danke ich für ihre stete und geduldige Hilfe bei technischen Problemen.