

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Paulus -

**Evaluation von Antikörpern gegen ependymale Proteine
auf ihre Eignung als diagnostische Marker für
Ependymome**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Anne - Katrin Stein

aus Essen

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Hasselblatt

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Wassmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neuropathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Paulus-
Referent: Prof. Dr. Martin Hasselblatt
Koreferent: Univ.- Prof. Dr. H. Wassmann

Zusammenfassung

Stein, Anne-Katrin

Evaluation von Antikörpern gegen ependymale Proteine auf ihre Eignung als diagnostische Marker für Ependymome

Ependymome sind Tumore des zentralen Nervensystems, die sich durch charakteristische histologische Eigenschaften, wie ependymale Rosetten und perivaskuläre Pseudorosetten, von anderen glialen Tumoren unterscheiden. Mittels immunhistochemischer Verfahren konnten bisher nur weitestgehend unspezifische Antikörper zur Diagnostik ependymaler Tumore etabliert werden. Hierzu zählen das epitheliale Membranantigen (EMA), das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) und das S100-Protein. Im Rahmen dieser Studie wurde eine Auswahl an Antikörpern, deren Antigene zuvor im Ependym als hochreguliert dargestellt werden konnten, auf ihre Spezifität gegenüber Ependymomen im Vergleich zu anderen glialen Tumoren untersucht.

Zur Verfügung standen Antikörper gegen die Proteine RGS1, GLUT10, GalNac, FATP6, CD36, Kir5.1, SPAG6, hOPG, Annexin und Spa17. Ihre Immunreaktivität wurde auf den Schnitten zweier, zuvor aus dem Gewebe von insgesamt 90 ependymalen und 133 glialen Tumoren hergestellten Tissue Arrays, verglichen.

Ausschließlich die Antikörper GalNac, FATP6, SPAG6, hOPG, Annexin und Spa17 zeigten sowohl auf nicht-neoplastischem, als auch auf dem Tissue Array der Ependymome eine erhöhte Sensitivität. Ihre jeweilige Spezifität war jedoch nur gering. Zwar ergab sich für anti - Spa17 eine signifikant erhöhte mediane Färbungsintensität ependymaler Tumore, jedoch rechtfertigt die, im Vergleich zu dem etablierten Marker EMA, schlechtere Spezifität nicht den Einsatz des Antikörpers als diagnostischen Marker für Ependymome. Dennoch konnte eine erhöhte Affinität des anti-Spa17 an zilienbesetzten Tumorzellen des Ependyms dargestellt werden.

Zur genaueren Untersuchung dieses Aspektes bedarf es weiterführender experimenteller Ansätze.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2009

Für Hajo

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Klinische Symptomatik.....	1
1.3. Histologie	2
1.4. Immunhistochemie	5
1.5. Identifizierung von im Ependym spezifisch exprimierten Genen	7
1.6. Zielsetzung.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1. Patienten.....	9
2.1.1. Ependymome	9
2.1.2. Gliale Tumore	10
2.2. Tissue MicroArrays.....	12
2.2.1. Der Tissue Arrayer.....	12
2.2.2. Design des Tissue Arrays	14
2.2.3. Spenderblock und Objektträger	16
2.2.4. Empfängerblock	17
2.2.5. Arbeitsschritte.....	17
2.2.5.1 Paraffinentnahme aus dem Empfängerblock.....	17
2.2.5.2 Gewebeentnahme aus dem Spenderblock	18
2.2.5.3 Einsetzen des Gewebes in den Empfängerblock	19
2.2.5.4 Schneiden des Tissue Arrays	20
2.3. Physiologisches Hirngewebe.....	21
2.4. Antikörper und Immunhistochemie.....	21
2.4.1. Etablierte diagnostische Marker.....	21
2.4.2. Antikörper gegen Produkte von im Ependym differentiell exprimierten Genen	23

2.4.3. Antigendemaskierung	26
2.4.4. Färbeprotokoll	27
2.4.5. Antikörperkontrolle und Konzentrationsbestimmung	29
2.4.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	31
2.5. Statistik.....	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Patientenanalyse.....	33
3.1.1. Lokalisation	34
3.1.2. Altersverteilung.....	36
3.1.3. Geschlechterverteilung	38
3.2. Immunreaktivität etablierter diagnostischer Marker auf den Tissue Arrays.....	39
3.2.1. EMA.....	40
3.2.2. GFAP	40
3.2.3. S100	40
3.3. Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse potentieller diagnostischer Marker	41
3.3.1. Kir 5.1	42
3.3.2. CD36.....	45
3.3.3. Glut 10.....	47
3.3.4. RGS1.....	49
3.3.5. Anti-hOPG.....	51
3.3.6. Annexin	55
3.3.7. FATP6.....	57
3.3.8. GalNac.....	60
3.3.9. SPAG6	62
3.3.10. Spa17.....	66
3.3.10.1 Gebrauchskonzentration anti- Spa17 (1:4000).....	67
3.3.10.2 Gebrauchskonzentration anti- Spa17 (1:8000).....	68
3.3.10.3 Gebrauchskonzentration anti- Spa17 (1:5000).....	69

3.3.10.4 Gegenüberstellung der Versuchsansätze des anti- Spa17.....	72
3.4. Statistische Auswertung der anti-Spa17-Färbungsergebnisse	75
3.5. Zusammenfassung der Färbungsergebnisse	76
4. DISKUSSION.....	79
4.1. Klinische Daten.....	79
4.2. Kritische Bewertung von Material und Methoden.....	80
4.2.1. Färbungsergebnisse der Antikörper.....	80
4.2.2. Screening-Verfahren	81
4.2.3. Heterogenität ependymaler Tumore.....	84
4.2.4. Ursachen mangelnder Spezifität.....	85
4.3. Spa17-Antikörper als potentieller diagnostischer Marker ependymaler Tumore	88
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
6. LITERATURVERZEICHNIS	92
7. DANKSAGUNG	106
8. LEBENSLAUF.....	107
9. ANHANG	I
9.1. Abkürzungsverzeichnis.....	I
9.2. Abbildungsverzeichnis.....	II
9.3. Tabellenverzeichnis	III
9.4. Diagrammverzeichnis	III

1. EINLEITUNG

Ependymome sind Tumore glialen Ursprungs, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Ependymzellen, welche die inneren Flüssigkeitsräume des zentralen Nervensystems auskleiden, aufweisen und ganz überwiegend einen engen räumlichen Bezug zu den Wänden des Ventrikelsystems und des Zentralkanals besitzen (*Dohrmann et al., 1976*).

1.1. Epidemiologie

In den Vereinigten Staaten stellen Ependymome 2,3% aller primärer Tumore des zentralen Nervensystems dar (*CBTRUS 2005*). Ependymome kommen neben den Astrozytomen und Medulloblastomen am häufigsten im Kindes- und jugendlichen Erwachsenenalter vor (*Agaoglu et al., 2005; Peris-Bonet et al., 2006*). Im Alter zwischen 0 und 14 Jahren bezeichnet ihr Anteil 7% aller primären Hirntumore (*CBTRUS, 2005*). In Deutschland liegt dieser Wert mit 10,4% nur unwesentlich höher (*Kaatsch et al., 2001*). Die Inzidenz beträgt etwa 0,30/100000 Kinder in den USA (*CBTRUS, 2005*) bzw. 0,34/100.000 Kinder in Europa (*Peris-Bonet et al., 2006*). Im Kindesalter sind ependymale Tumore überwiegend intrakranial lokalisiert (*Matthew et al., 2000*). Bei Erwachsenen treten sie meist spinal auf und verzeichnen einen Anteil von 37-47% aller intramedullärer Tumore in neurochirurgischen Patientenserien (*Guidetti et al., 1981; Cooper et al., 1989*). Wie bei anderen glialen Tumoren, ist die Inzidenz von Ependymomen bei Männern gegenüber der bei Frauen leicht erhöht (0,29 vs. 0,22), woraus sich ein Verhältnis männlicher zu weiblichen Patienten von 1,3:1 ergibt (*Farwell et al., 1977*).

1.2. Klinische Symptomatik

Die klinische Symptomatik ist wesentlich abhängig von der Lokalisation. Infratentorielle Ependymomen, die im Bereich der hinteren Schädelgrube lokalisiert sind, können mit Störungen der Funktion von Kleinhirn und Hirnstamm einhergehen. Typisch ist die

Entwicklung eines Hydrozephalus mit intrakraniellm Druckanstieg, der mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen einhergeht (*Hendrick et al., 1989*). Bei supratentorieller Lokalisation kommen zudem fokale neurologische Defizite und Anfallsereignisse hinzu (*Burger et al., 2002, Duncan et al., 1995, Zülch et. al., 1986*). Rückenschmerzen sowie motorische und sensorische Störungen im Sinne einer radikulären Symptomatik durch Nervenwurzelkompressionen, aber auch Miktionsstörungen und Beeinträchtigungen der langen Bahnen mit Querschnittssymptomatik aufgrund einer strukturellen Schädigung des Rückenmarks, können bei spinal lokalisierten Ependymomen auftreten (*Schiffer et al., 1991*). Intraoperativ erscheinen Ependymome häufig vom umgebenden Gewebe relativ scharf abgegrenzt, was eine vollständige Resektion begünstigt. Ependymome, die mit einer Lokalisation im IV. Ventrikel oder supratentoriell einhergehen, sind prognostisch ungünstiger einzuschätzen, da eine komplette Resektion in den meisten Fällen nicht erreicht werden kann (*Deutsche Krebsgesellschaft E.V.; Ernesust et al., 1996*).

1.3. Histologie

Nach der WHO-Klassifikation werden ependymale Tumore als Grad I-, Grad II- oder Grad-III-Tumore eingeteilt.

Als WHO – Grad I-Tumore werden die myxopapillären Ependymome bezeichnet, die überwiegend im Bereich des lumbosakralen Übergangs lokalisiert sind (*Wiestler et al., 2000*). Sie sind gekennzeichnet durch hochdifferenzierte, sehr langsamwachsende Zellen, die nur wenig mitotische Aktivität besitzen. Diese kubischen Tumorzellen werden durch eine niedrige Zelldichte, ein perivakuoläres Zytoplasma und eine myxoide Struktur charakterisiert (*Matthew et al., 2000*). Die myxoide Struktur basiert auf mikrozystischen Degenerationen und muzinöser Sekretion der Tumorzellen.

Dem WHO - Grad II wird das Ependymom mit seinen Subtypen (zellulär, papillär, klarzellig, tanyzytisch) zugeordnet. Es ist ein Tumor mit geringer Wachstumstendenz und mäßiger mitotischer Aktivität (*Wiestler et al., 2000*).

Das anaplastische Ependymom ist ein Grad-III-Ependymom. Es ist gekennzeichnet durch deutlich erhöhte mitotische Aktivität, erhöhte Zelldichte und Nekrosen mit perifokaler Zelldichtesteigerung (*Wiestler et al., 2000*).

EXKURS: Historisch sind ependymale Tumore unter zahlreichen Bezeichnungen beschrieben worden. So betitelte man sie als Ependymoblastome (*Langford et al., 1986*) Ependymogliome und Ependymozytome. Weitere Synonyme sind Gliependymom, Ependymoepitheliom und Neuroepithelioma gliomatosum (*Muthmann und Sauerbeck, 1903*). Das Konzept der Einteilung ependymaler Tumore wurde durch Bailey und Cushing modifiziert, die Ependymoblastome von Ependymomen unterschieden, und die bessere klinische Prognose der Ependymome herausstellten (*Bailey and Cushing, 1926*). 1935 unterteilten *Kernohan und Fletcher-Kernohan* epitheliale, zelluläre und myxopapilläre Untergruppen der Ependymome. *Ringertz et al.* (1950) schlug eine Drei-Grad-Einteilung glialer Tumore vor. Dabei hatte er die Arbeit von Kernohan (1949) aufgegriffen und erweitert. Zülch konzipierte 1962 eine Vier-Gradeinteilung (*Zülch, 1962*), die sich in Anlehnung an Bailey und Cushing nach den mittleren postoperativen Überlebenszeiten richtete. Dieses Konzept machte eine Graduierung aller glialen Tumore möglich und mündete in die WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems (*Zülch, 1979*).

Die Unterscheidung ependymaler Tumore von anderen Tumoren des neuroepithelialen Gewebes im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik hat entscheidende Bedeutung und beruht zunächst auf morphologischen Merkmalen. Charakteristische histologische Merkmale von Ependymomen sind ependymale Rosetten (Abbildung 1), sowie perivaskuläre Pseudorosetten (Abbildung 2). In „echten“ ependymalen Rosetten sind die Tumorzellen säulenartig um ein zentrales Lumen ausgerichtet und bilden so (an das nicht-neoplastische Ependym erinnernd) Oberflächen von kugeligen oder tubulären Räumen aus. Obwohl ependymale Rosetten sehr spezifisch für Ependymome sind, treten sie nur selten auf (*Matthew et al., 2000*) und stellen folglich keinen sensitiven diagnostischen Marker für ependymale Tumore dar.

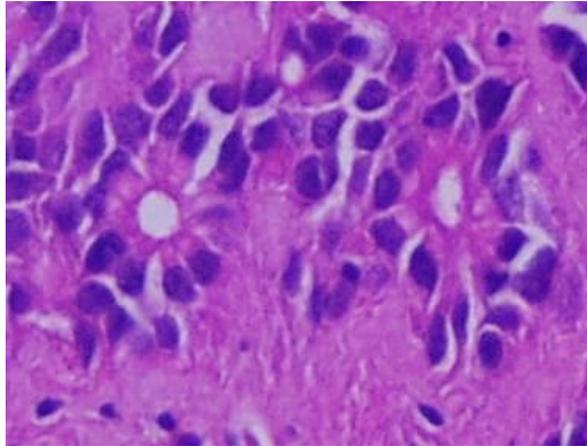


Abbildung 1: Ependymale Rosetten.

Ependymom, dessen Tumorzellen sich säulenartig so zueinander anordnen, dass sie kugelige bis tubuläre Räume bilden und so die oberflächenbildende Eigenschaft des Ependyms imitieren.

Häufiger sind sogenannte perivaskuläre Pseudorosetten. Hierbei ordnen sich Tumorzellen um ein zentrales Blutgefäß an und hüllen dieses mit ihren Zellfortsätzen in einen fibrillären, kernfreien Strahlenkranz ein (McLendon *et al.*, 2007, Guccion *et al.*, 1991).

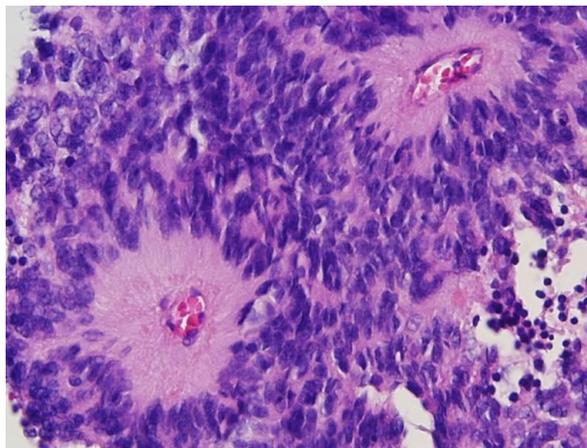


Abbildung 2: Perivaskuläre Pseudorosetten.

Anaplastisches Ependymom mit zwei kernfreien, durch Zellfortsätze der Tumorzellen gebildete Strahlenkränze, die in ihrem Zentrum je ein Blutgefäß einschließen.

Die Eigenschaft von Ependymomzellen Oberflächen auszubilden, setzt sich auch auf elektronenmikroskopisch sichtbarer Ebene fort, nämlich mit der Ausbildung sogenannter intrazytoplasmatischer Mikrolumina (ICL). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden zwei Arten von ICL unterschieden (*Ho et al., 1994*): Der eine Typ zeichnet sich durch die zum Lumen hin angeordneten Mikrovilli und Zilien aus, während der zweite Typ ausschließlich Mikrovilli besitzt. Zilienbesetzte ICL kommen insbesondere in Grad-II-Ependymomen vor, wurden aber auch in anaplastischen Ependymomen beschrieben (*Wang et al., 2005, Kawano et al., 2000*), während nicht-zilienbesetzte intrazytoplasmatische Mikrolumina häufiger in myxopapillären Ependymomen auftreten (*Ho et al., 1994*). Da zilienbesetzte intrazytoplasmatische Mikrolumina ausschließlich in Ependymomen beschrieben wurden, könnten sie ein charakteristisches ultrastrukturelles Merkmal von Ependymomen darstellen (*Ho et al., 1994*). Bereits auf lichtmikroskopischer Ebene werden die Mikrolumina in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung gelegentlich als rundliche, scharf begrenzte und homogen eosinophil angefärbte Einschlüsse erkennbar (*Kawano et al., 2000*).

1.4. Immunhistochemie

Auch wenn die diagnostischen Kriterien der WHO-Klassifikation weiterhin allein auf dem histologischen Bild beruhen, eine Diagnose formal also keiner weiterführenden immunhistochemischen oder molekulargenetischen Untersuchungen bedarf, hat die Immunhistochemie in den letzten zwanzig Jahren einen wichtigen Raum zur Absicherung der Diagnose in der Routinediagnostik eingenommen und kommt bei Tumoren zur Anwendung, deren histologisches Bild nicht eindeutig einer bestimmten Entität zugeordnet werden kann. Insbesondere bei anaplastischen Ependymomen (WHO-Grad III) ist eine Abgrenzung gegenüber astrozytären Tumoren wichtig, da sie bei fehlendem Nachweis einer ependymalen Differenzierung und beim Vorliegen von Tumornekrosen als Glioblastom (WHO- Grad IV) eingeordnet werden müssten.

Ependymome weisen wie andere gliale Tumore eine positive Immunreaktivität gegenüber dem glialen fibrillären sauren Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) auf (*Deck et al.,*

1978), wobei sich insbesondere Tumorzellen der perivaskulären Pseudorosetten anfärben (Duffy et al., 1979; Haustein et al., 1987; Miettinen et al., 1986). Ebenso zeigen Ependymome eine positive Reaktivität gegenüber Vimentin und S100 (Kimura et al., 1986; Vege et al., 2000). Auch eine Immunreaktivität für Zytokeratine ist in Ependymomen beschrieben worden (Maaoui et al., 1988), wird jedoch gelegentlich auch in astrozytären Tumoren beobachtet (Cosgrove et al., 1993).

Im Gegensatz zu Antikörpern gegen die oben genannten Antigene haben sich Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) als bisher diagnostisch wertvollstes Werkzeug zur Unterscheidung zwischen Ependymomen und anderen glialen Tumoren herausgestellt (Cruz - Sanchez et al., 1998; Hasselblatt et al., 2003; Uematsu et al., 1989; Vege et al., 2000). EMA ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, das im oberflächlichen Bereich von Epithelzellen lokalisiert ist. Eine Immunreaktivität für EMA findet sich sowohl in epithelialen Geweben, als auch in neoplastischen Geweben mit epithelialelem Ursprung und wird auch in der Pathologie als Marker für eine epitheliale Differenzierung eingesetzt (Sloane et al., 1981). Im Bereich des zentralen Nervensystems färbt EMA nicht nur die Leptomeningen, sondern auch die Oberflächen des nicht-neoplastischen Ependyms kräftig an (Uematsu et al., 1989).

In Ependymomen können die Oberflächen ependymaler Rosetten, aber auch die bereits erwähnten, für Ependymome typischen intrazytoplasmatischen Mikrolumina markiert werden, die sich als punkt- oder ringförmige Färbung darstellen (Abbildung 3). Diese distinkte punkt- oder ringförmige EMA-Färbung findet sich in der überwiegenden Zahl der Ependymome, nicht aber in anderen glialen Tumoren. Die Spezifität und Sensitivität des punkt- oder ringförmigen EMA-Färbemusters für die Diagnose eines Ependymoms sind hoch (Hasselblatt et al., 2003). Gleichwohl dient EMA lediglich als Marker für epitheliale Differenzierung (Sloane et al., 1981). Die Entdeckung weiterer spezifischer, ausschließlich im Ependym exprimierter Antigene wäre darum von großem diagnostischem Interesse.

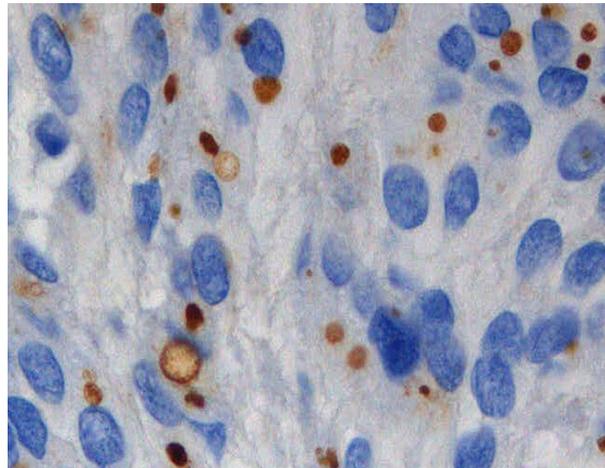


Abbildung 3: Epitheliales Membranantigen (EMA) in Ependymomen.
Punkt- und ringförmige EMA-Immunreaktivität in einem Ependymom (WHO-Grad II).

1.5. Identifizierung von im Ependym spezifisch exprimierten Genen

Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sind globale Genexpressionsprofile von laser-mikrodissezierten humanen Ependymzellen aus Autopsiegewebe unter Verwendung von cDNA-Mikroarrays (*DeRisi et al., 1996; Sallinen et al., 2000*) generiert worden (*Hasselblatt et al., 2005*). Beim Vergleich der Genexpressionsdaten mit denen von nicht-lasermikrodisseziertem humanem Hirngewebe des Hippokampus hatten sich hier 52 Gene ergeben, die in Ependymzellen mehr als zehnfach überexprimiert wurden (Abbildung 4). 48 Gene wurden im Ependym, nicht aber im hippokampalen Hirngewebe exprimiert.

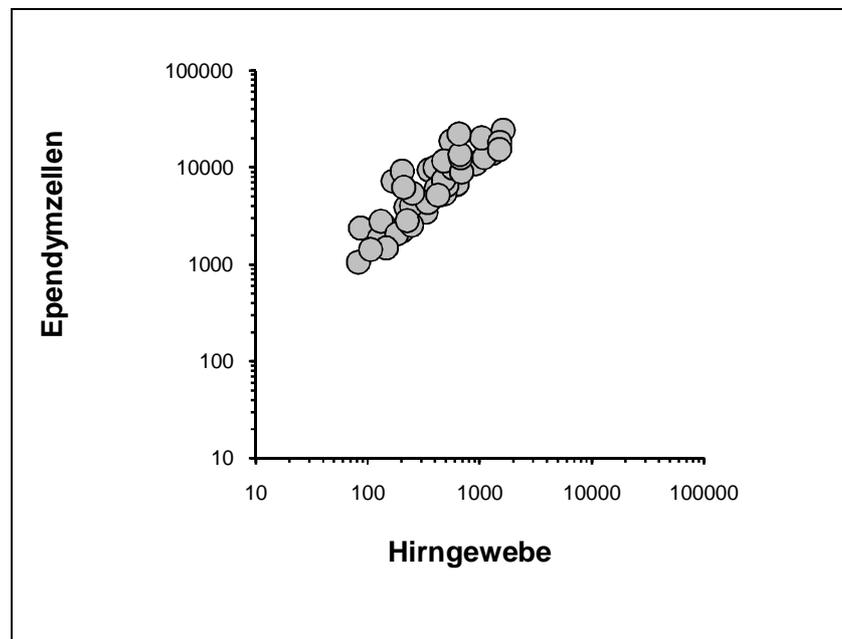


Abbildung 4: Microarray-Analyse.

Expressionswerte (arbiträre Einheiten) von differentiell exprimierten Genen in lasermikrodissezierten Ependymzellen im Vergleich zum nicht-lasermikrodissezierten Hirngewebe des Hippokampus (*Hasselbalt et al., 2005*).

1.6. Zielsetzung

Angesichts des weitestgehenden Fehlens spezifischer und sensitiver Marker zur Diagnostik von Ependymomen und zur Abgrenzung gegenüber anderen glialen Tumoren, sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Antikörpern auf ihre Eignung als diagnostische Marker evaluiert werden. Konnte immunhistochemisch eine Überexpression auf Proteinebene in nicht-neoplastischem Ependym bestätigt werden, wurde deren Spezifität und Sensitivität für die Diagnose von Ependymomen auf Tissue Arrays, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden und eine große Anzahl von Ependymomen und andere gliale Tumoren repräsentieren, erörtert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten

2.1.1. Ependymome

Für die Herstellung des Tissue-Arrays aus ependymalem Tumorgewebe (EP-TA) wurde die Datenbank des Instituts für Neuropathologie der Universität Münster zunächst nach Fällen durchsucht, bei denen zwischen den Jahren 1998 bis 2005 erstmals die Diagnose eines Ependymoms gestellt worden war. Von den 140 identifizierten Fällen standen letztlich 90 repräsentative Paraffinblöcke mit den zugehörigen Gewebeschnitten für die Herstellung des Tissue Arrays zur Verfügung. Entsprechend der WHO- Klassifikation handelte es sich hierbei um 15 myxopapilläre Ependymome (WHO - Grad I), 55 Ependymome (WHO - Grad II), davon 2 papilläre Ependymome (WHO - Grad II), 2 tanzytische Ependymome (WHO - Grad II) und 0 klarzellige Ependymome sowie 16 anaplastische Ependymome (WHO - Grad III) (Tabelle 1). Klinische Angaben zum Alter, Geschlecht und zur Lokalisation (spinal, infratentorial, supratentorial) der Tumore wurden dokumentiert.

Ependymale Tumore	Potentielle Fälle	Verfügbare Fälle
Ependymom (Grad II WHO)	78	55
klarzelliges Ependymom (Grad II WHO)	4	0
papilläres Ependymom (Grad II WHO)	3	2
tanzytisches Ependymom (Grad II WHO)	2	2
anaplastisches Ependymom (Grad III WHO)	30	16
myxopapilläres Ependymom (Grad I WHO)	23	15
Gesamt	140	90

Tabelle 1: Ependymome.

Neben den 140 potentiell vorhandenen Patientenfällen konnten 90 Fälle zur Herstellung des Tissue Arrays ausgewählt werden.

2.1.2. Gliale Tumore

Zur Erstellung eines Tissue-Arrays, welches das Gewebe von nicht-ependymalen, glialen Tumoren (AS-TA) aufweist, wurde die Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Universität Münster nach Fällen durchsucht, bei denen zwischen den Jahren 1998 bis 2005 die Diagnose eines glialen Tumors gestellt worden war. Repräsentatives Paraffinmaterial von 133 Fällen wurde ausgewählt (Details siehe Tabelle 2).

Gliale Tumore	Potentielle Fälle	Verfügbare Fälle
fibrilläres Astrozytom (Grad II WHO)	230	13
gemästetzelliges Astrozytom (Grad II WHO)	8	5
anaplastisches Astrozytom (Grad III WHO)	316	17
Glioblastom (Grad IV WHO)	>1000	24
Riesenzellglioblastom (Grad IV WHO)	4	3
Gliosarkom (Grad IV WHO)	43	17
pilozytisches Astrozytom (Grad I WHO)	120	27
Subependymales Riesenzellastrozytom (Grad I WHO)	3	3
Pleomorphes Xanthoastrozytom (Grad II WHO)	4	2
Oligodendrogliom (Grad II WHO)	14	10
Anaplastisches Oligodendrogliom (Grad III WHO)	36	12
Gesamt	778	133

Tabelle 2:**Gliale Tumore.**

Auflistung der Diagnosen glialer Tumore, deren Summe die Auswahl von 133 Fällen zur Erstellung des Tissue-Arrays ergibt. Potentiell standen 778 gliale Tumorfälle zur Auswahl.

2.2. Tissue MicroArrays

Die Tissue Microarrays (TMA) Technologie (*Kononen et al., 1998*) birgt den Vorteil, dass der Verbrauch von Gewebematerial sehr gering gehalten wird, denn jeder Gewebeprobe werden nur 0,6 mm kleine Stanzen entnommen. Weiterhin besteht die Möglichkeit eine große Anzahl verschiedener Tumore gleichzeitig zu färben. Dieses macht eine rasche und kostengünstige Auswertung möglich (102).

2.2.1. Der Tissue Arrayer

Zur Herstellung der Tissue Arrays dient ein manuell zu bedienendes Laborgerät der Firma Beecher Industries, das es ermöglicht, bis zu 1000 Gewebeproben in einem einzigen Paraffinblock zu vereinen. Dazu besitzt das Gerät zwei Stanzen (103) aus rostfreiem Stahl mit einem Durchmesser von 0,6 mm, deren Schneiden ein hohes Maß an Schärfe vorweisen müssen (Abbildung 5 (3)). Mit der rot markierten Stanze (Recipient) entnimmt man in regelmäßigen Abständen, je nach Einstellung, Paraffin aus dem sogenannten Empfängerblock, so dass eine zylindrische Aushöhlung in diesem entsteht. Die blau markierte Stanze (Donor) ermöglicht die präzise Entnahme eines entsprechenden Gewebestücks an einem vorher selektierten Bereich auf dem sogenannten Spenderblock. Sie besitzt einen Innendurchmesser, der dem Außendurchmesser des Recipient entspricht, so dass der Stanzkern des Spendergewebes exakt in die Vorbohrung des Empfängerblockes passt. Mittels zweier Einstellschrauben (Abbildung 5 (5)) werden die XY- Koordinaten in Mikrometereinheiten festgelegt, über welche die Abstände zwischen den einzelnen Entnahmestellen genau eingestellt werden. Es ist zu beachten, dass jedes von den Stanzen verursachte Negativ einen Kreisdurchmesser von 0,6 mm besitzt und der Abstand zwischen den Tangenten zweier Probestanzen mindestens 0,2 mm betragen sollte (das entspricht 0,8 mm von Mitte zu Mitte zweier Stanzen mit einem 0,6 mm Durchmesser), um die Stabilität des Tissue Arrays zu gewährleisten. Weitere Bestandteile des Tissue Arrayers sind die Basisplatte (Abbildung 5 (1)), ein Halter (2), in den der Empfängerblock unverschiebbar fixiert werden kann, eine Brückenplatte (Abbildung 8) für den Spenderblock, die über den

fixierten Empfängerblock gelegt wird, wenn Gewebe aus dem Spenderblock entnommen werden soll, sowie eine Schraube (Abbildung 5 (6)) zur Einstellung der vertikalen Führung des Schwingkopfes (Abbildung 5 (4)).

Des Weiteren sind die Stanzen an einem Schwingkopf (4) befestigt, der zum Umschalten zwischen den beiden Stanzen und zur XY-Präzisionsführung dient. Gleichzeitig lässt sich der Schwingkopf manuell senkrecht nach unten führen und verursacht so das Ausstanzen des Gewebes über die Stanzen. Während der Drehung an den Mikrometerschrauben, bewegt sich der Schwingkopf koordinatengenau.

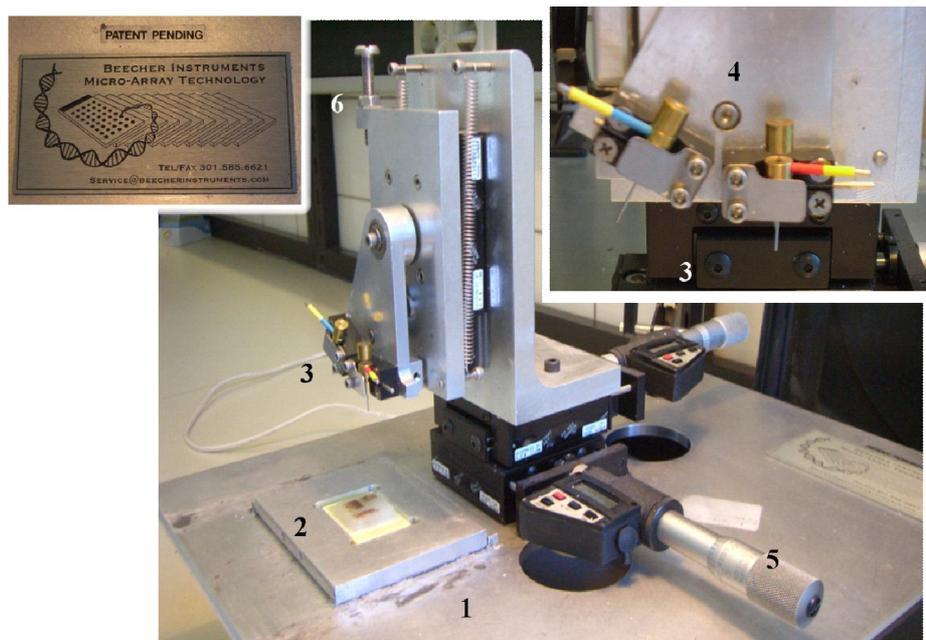


Abbildung 5: Bestandteile des Tissue-Arrayers (Beecher Instruments). Er besteht aus (1) der Basisplatte, (2) dem Halter für den Empfängerblock, (3) einer roten und blauen Stanze, die am (4) Schwingkopf befestigt sind. Über (5) die Mikrometerschrauben wird das Gerüst des Gerätes und mit ihm die Stanzen in horizontaler Richtung bewegt. Durch Einstellung der Tiefenschraube (6) kann das Ausmaß einer vertikalen Bewegungsrichtung der Stanzen und des Schwingkopfes festgelegt werden.

2.2.2. Design des Tissue Arrays

Der Herstellung des eigentlichen Arrays muss die sorgfältige Auswahl eines geeigneten Spenderblocks vorausgehen. Desweiteren muss im Vorfeld festgestellt werden, wie viele Blöcke zur Verfügung stehen, um die Konstruktion des Arrays planen zu können. Zu entscheiden ist hier, ob zum Beispiel eine letztlich rechteckige Form durch Anordnung der Gewebeproben entstehen soll, oder ob der Empfängerparaffinblock in Abhängigkeit zur Anzahl der vorhandenen Gewebeproben ausreichend Platz bietet, um alle Proben auf dem einen Block zu vereinen. Diese Arbeitsschritte sind notwendig, um ein strukturiertes Koordinatensystem aus den gewählten Gewebelöcken herstellen zu können.

Zunächst wird die genaue Anzahl der vorhandenen Spenderblöcke festgelegt. Um für die spätere histologische Auswertung der Gewebeschnitte eine höhere Erfolgsgarantie zu gewährleisten, ist es sinnvoll, von jedem Gewebe zwei Stanzproben in den Empfängerblock zu integrieren und diese hinter- bzw. nebeneinander im Koordinatensystem zu organisieren (farblich markiert in Abbildung 6). Diese Methode hat den Vorteil, dass, sollte eines der beiden Gewebeproben nur unvollständig erfasst worden sein, zumindest eine Beurteilung der zweiten Probe möglich ist. Neben der unabdingbar präzisen und fehlerfreien Einhaltung der im Koordinatensystem festgelegten Reihenfolge der Spendergewebe, wurden zwei Methoden eingesetzt, um die Orientierung zu erleichtern: Eine Methode zielt darauf ab, den Anfangspunkt des Koordinatensystems festzulegen, um die sofortige Orientierung auf dem Tissue Array zu gewährleisten. Dies geschieht durch eine Markierung, die in konventioneller Art und Weise mittels der beiden Nadeln in den Block gestanzt wird. Hierzu entnimmt man aus einem beliebigen Spenderblock an einer nicht relevanten Stelle ein Gewebestück und setzt diesen in den Empfängerblock an die Position vor der ersten relevanten Gewebeprobe ein. Man muss zusätzlich festlegen, ob dieser Marker auf der X- oder Y-Achse manifestiert sein soll, womit man gleichzeitig die Leserichtung des Tissue Arrays festlegt. Da das Tissue Array im Rahmen dieser Studie paarweise entlang der X-Achse gelesen werden soll, wurde auch die Markierung im Bezug zur X-Achse ausgerichtet (Abbildung 6).

Eine zweite Methode, um eine gezielte Orientierung auf dem Tissue Array zu erhalten, basiert darauf, mit den zur Verfügung stehenden Gewebeproben auf einem Block zwei Koordinatensysteme aufzubauen. Eines besteht aus 10 x 10 Probenstanzen und hebt sich optisch durch seine quadratische Form von dem zweiten, rechtwinklig aufgebauten Design ab (Abbildung 7). So kann auf den ersten Blick entschieden werden, welchem Feld die tabellarisch festgehaltenen Kennnummern der Patienten zuzuordnen sind. Das zusätzliche Markierungsgewebe setzt den Startpunkt. Von hier aus wird entlang der X-Achse paarweise das Spendergewebe in Anlehnung an die Aufzeichnungen mikroskopiert. Verwechselungen zweier Felder sind aufgrund der unterschiedlichen geometrischer Formen ausgeschlossen.

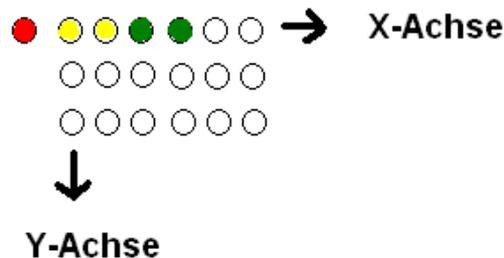


Abbildung 6: Tissue Array Design. Schematische Darstellung der Markierung (○) zur Orientierung auf dem TA, sowie paarweise Anordnung (gelb bzw. grün gekennzeichnet) der jeweiligen Gewebeproben.

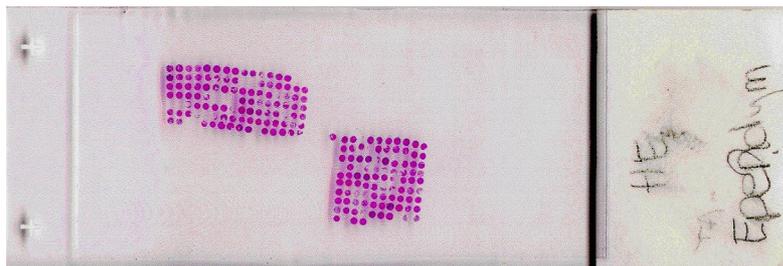


Abbildung 7: Orientierung des Tissue Arrays. Paraffinschnitt des Tissue Arrays ependymaler Tumore (EP-TA) mit zwei unterschiedlichen Gewebeprobenanordnungen (rechtwinklig und quadratisch); HE-Färbung (0,1%, Hämatoxylin nach Meyer).

2.2.3. Spenderblock und Objektträger

Zur Übertragung repräsentativer, zuvor farblich gekennzeichnete Tumorareale, positioniert man vor jeder Gewebsentnahme aus dem Spenderblock den entsprechenden Objektträger schablonenartig auf dem zugehörigen Paraffinblock, um die Entnahmestelle möglichst präzise auf dem Block lokalisieren zu können. Somit dient der jeweils verwendete HE-Schnitt als Übersicht, um die richtige Entnahmestelle festzulegen (siehe Abbildung 8). Für die Entnahme des Spendergewebes wird der Block auf der Überbrückungsplatte platziert. Diese Überbrückungsmethode gewährleistet, dass einerseits Paraffin aus dem Empfängerblock entnommen werden kann, andererseits die Gewebeprobe in den Empfängerblock übertragen werden kann ohne dabei die Positionen der Stanzen verändern zu müssen.



Abbildung 8: Markierung der Entnahmestelle.

Vor der Gewebsentnahme aus dem Spenderblock werden auf den zugehörigen Schnitten möglichst tumorzellreiche Areale markiert. Der entsprechende Gewebebereich wird durch Anlegen des Schnittes auf den Block identifiziert und anschließend gestanzt. Das Spendergewebe wird hierfür auf der Brückenplatte positioniert.

Quelle: Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer (103).

2.2.4. Empfängerblock

Der leere Paraffinblock stellt das Medium für den Empfang der Gewebeproben dar. Er wird auf herkömmliche Weise durch das Aufschmelzen von Paraffin (55-58°C) und Gießen des Blocks in eine entsprechende Form hergestellt. Als Halter dient hierbei eine Kunststoffplatte. Nach Abkühlung des Blocks muss man sich vergewissern, dass keine eingeschlossenen Luftblasen enthalten sind. In einem solchen Fall ist der Block zu verwerfen, da das Material in sich zu instabil sein könnte und während des Stanzens möglicherweise Bruchgefahr bestünde.

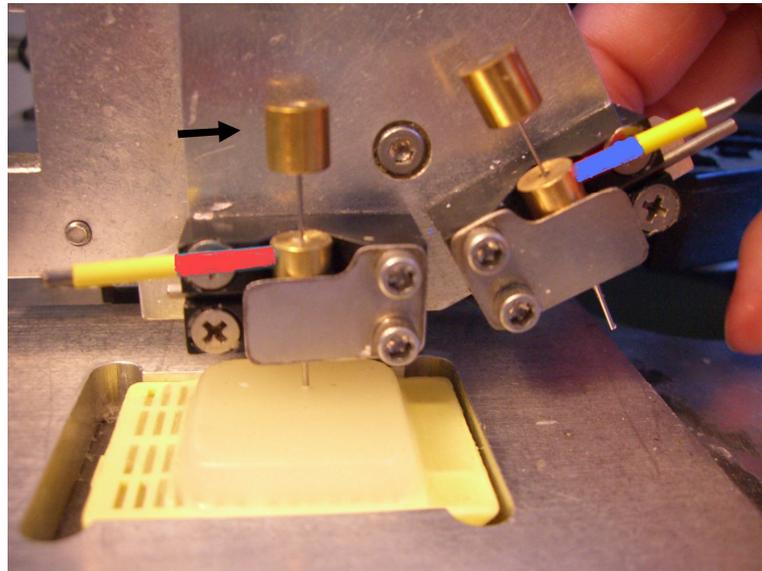
Die Form des Empfängerblocks richtet sich nach dem erforderlichen Platzbedarf. Will man ein großes Array oder mehrere Arrays auf einen Block herstellen, empfiehlt es sich, eine entsprechend große Paraffinfläche auf dem Kunststoffplättchen zur Verfügung zu haben. Die Höhe des Blocks sollte 5-10 mm nicht unterschreiten, da flache Gewebeproben auch dementsprechend weniger Informationsgehalt liefern. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Einstellung der Schraube zur Regulation der Einstechtiefe in den Empfängerblock erfolgt. Dadurch wird gewährleistet, dass jeder Stanzvorgang exakt dieselbe Tiefe im Block erreicht.

2.2.5. Arbeitsschritte

Die drei Arbeitsschritte - Paraffinentnahme aus dem Empfängerblock, Gewebeentnahme aus dem Spenderblock und Einsetzen des Gewebes in den Empfängerblock - wiederholen sich für jede Gewebeprobe.

2.2.5.1. *Paraffinentnahme aus dem Empfängerblock*

Der erste Schritt besteht darin, in den Empfängerblock, der fest in den für ihn vorgesehenen Halter eingespannt ist und nicht mehr bewegt werden sollte, mittels der rotmarkierten Stanze ein zylindrisches Loch zu erzeugen. Hierzu bewegt man die Stanze abwärts, bis die Bewegung durch die Tiefeneinstellung blockiert wird. Der entnommene Paraffinzyylinder wird durch einen Stößel aus der Stanze entfernt und verworfen.

**Abbildung 9:****Paraffinentnahme aus dem Empfängerblock.**

Die rote Stanze erzeugt einen zylindrischen Hohlraum in dem Empfängerblock, dessen Durchmesser dem des Spendergewebes entspricht. Durch den Stößel (siehe Pfeil) wird das Paraffin aus der Stanze entfernt.

2.2.5.2. Gewebeentnahme aus dem Spenderblock

Nachdem man durch Umstellung des Schwingkopfes auf die blau markierte Stanze gewechselt hat, platziert man nun die Arbeitsbrücke über dem Empfängerblockhalter. Auf diesem bringt man den Spenderblock mittels HE – Schnitt in die richtige Position. Um die gewünschte Probe zu entnehmen wird anschließend die blaue Stanze tiefgeführt. Zu beachten ist, dass hier die Tiefeneinstellung nicht wirksam wird, da der Spenderblock auf der Arbeitsbrücke deutlich höher steht als der Empfängerblock in seinem Halter, und so die Stanze tiefer eindringen kann. Zu vermeiden ist allerdings, dass die Spendergewebeprobe länger ist als die Tiefe der Vorbohrung, da beim Einbringen in den Empfängerblock ein Teil des Gewebes oberhalb der Blockoberfläche überstehen würde. Dieses Gewebe müsste abgetrennt werden, um eine für die Schnittführung notwendige, plane Oberfläche zu erhalten. Da diese Region aber die relevanten histologischen Areale besitzt und diese in jedem Fall erhalten bleiben müssen, ist zwingend darauf zu achten, dass das Spendergewebe maximal die gleiche Länge besitzt wie die Tiefe der Bohrung im Empfängerblock. Von

Vorteil ist es, wenn man die Stanze nur so tief in den Spenderblock versenkt, dass das Gewebe kürzer als die Bohrtiefe im Empfängerblock ist. So würden zwar die ersten Schnitte kein Gewebe enthalten, man stellt aber sicher, dass kein relevantes Gewebe verloren geht.

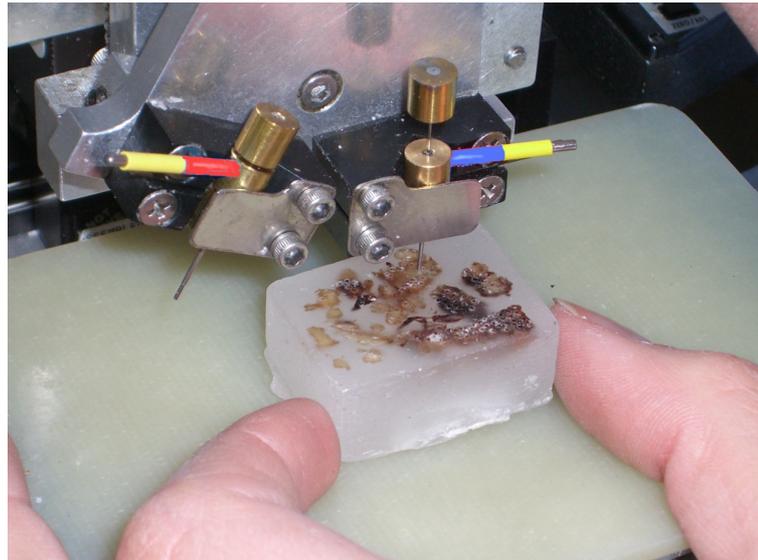


Abbildung 10: Gewebeentnahme aus dem Spenderblock.

Der Spenderblock wird auf der Überbrückungsplatte so unterhalb der blauen Stanze platziert, dass die vorher im Schnitt markierte Gewebestelle durch Tiefführen der Stanze erfasst wird.

2.2.5.3. Einsetzen des Gewebes in den Empfängerblock

Nach Entnahme aus dem Spenderblock wird nun die Brücke entfernt und die blaue Stanze, die das zu untersuchende Paraffinmaterial enthält, tiefgeführt. Über einen in der Stanze befindlichen Stößel und bei exakter Justage der Stanzen, kann das Gewebe präzise in die Vorbohrung des Empfängerblockes überführt werden, allerdings nur soweit, dass das obere Ende leicht herauschaut. Der überstehende Gewebezylinder wird manuell soweit eingeschoben, dass er mit der Oberfläche bündig abschließt. Es ist wichtig, das Gewebe nicht zu tief einzubringen, um die Anzahl an Schnitten zu maximieren, auf denen alle relevanten Gewebeproben zu finden sind.

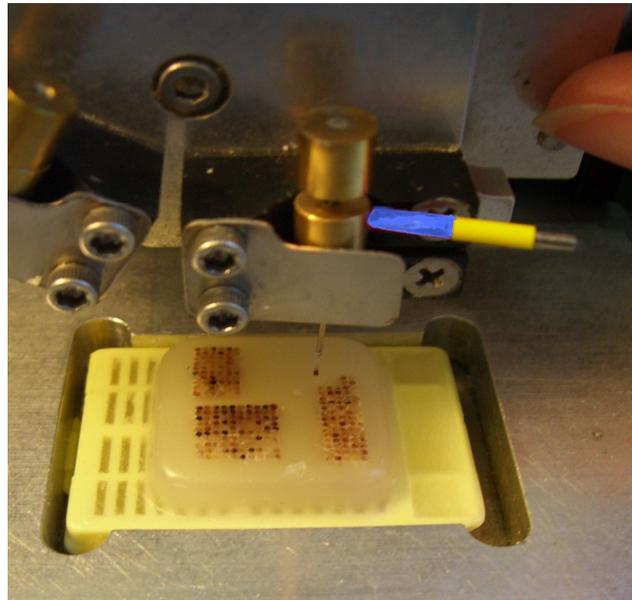


Abbildung 11: Einsetzen des Gewebes in den Empfängerblock.
Durch Tiefführung der blauen Stanze und Ausstoßen des Gewebes mittels des Stößels kann der Paraffinzylinder bei korrekter Justage exakt in dem vorgeformten Negativ des Empfängerblocks platziert werden.

Das erste Gewebestück ist platziert und die Mikrometerschrauben können in ihre nächste Position gedreht werden. Da die Leserichtung in der X-Achse verläuft, dreht man nur an der Schraube, die die Stanzen in der X-Achse verschiebt. Der Abstand wird auf 1,0 mm weiter gestellt und die Arbeitsschritte wiederholen sich entsprechend mit dem nächsten Spenderblock.

2.2.5.4. *Schneiden des Tissue Arrays*

Die in den Empfängerblock gestanzten Gewebeproben müssen zunächst, bevor das eigentliche Schneiden stattfinden kann, mit dem umgebenen Paraffinblock verbunden werden. Dies geschieht, indem man den Block für 15-20 Minuten in einen 37°C warmen Ofen legt. Anschließend muss die Oberfläche des Arrays geglättet werden. Dieses kann mittels eines Objektträgers geschehen. Dieser wird flach auf die Oberfläche des Blocks aufgelegt. Mit gleichmäßigem Druck auf den Objektträger werden so alle Gewebestanden auf dieselbe Höhe gebracht. Diese Methode trägt dazu bei, dass die Zahl an

Gewebeschnitten, die alle Gewebeproben des Arrays beinhalten, maximiert wird. Anschließend kann das Tissue Array mittels eines Mikrotoms auf herkömmliche Weise geschnitten werden (*Butler et al.*, 1997). 2-3 µm dicke Schnitte werden auf Dako REAL™ Capillary Gap Microscope Slide Objektträgern aufgebracht und mindestens 12 Stunden bei 37°C getrocknet.

2.3. Physiologisches Hirngewebe

Bevor die Untersuchung der Antikörper auf den Tissue Arrays erfolgen konnte, musste ihre Funktionalität auf neuropathologisch unauffälligem Hirngewebe, im Sinne einer Positivkontrolle, getestet werden. Hierfür wurde fixiertes Gewebe verwendet, welches neben Ependym auch Plexus Choroideus und Hippocampus aufwies. Die Fixierung erfolgte in gepufferter 4%iger Formalinlösung über mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gewebe zur weiteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet.

Das Schneiden des Gewebeblocks entspricht der in 2.2.5.4 beschriebenen Vorgehensweise.

2.4. Antikörper und Immunhistochemie

2.4.1. Etablierte diagnostische Marker

Neben der Untersuchung einer Reihe von Antikörpern gegen Produkte von im Ependym differentiell exprimierten Genen auf deren diagnostische Sensitivität und Spezifität, wurde die Expression von drei etablierten diagnostischen Markern untersucht (siehe Tabelle 3). Das Verteilungsmusters für EMA, S100 und GFAP (*Figarella-Branger et al. 1991; Rezay et al. 2005; Uematsu et al.1989*) im Ependym und in ependymalen Tumoren wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Im Rahmen dieser Studie erfolgt die Beurteilung der unterschiedlichen Expressionsmuster auf den Tissue Arrays durch eine „positive“ bzw. „negative“ Bezeichnung. Auch Angaben über die Expression dieser etablierten Marker in anderen glialen Tumoren und Karzinomen ist methodisch relevant, um ihre Spezifität und Sensitivität gegenüber ependymalen Tumoren herauszustellen. Tabelle 4 zeigt eine

Übersicht über die allgemein gültige EMA-, GFAP- und S100-Expression in Ependymomen, glialen Tumoren und Karzinomen (Ang et al., 1990; Goswami et al., 2007; Hasselbaltt et al., 200; Landriscina et al., 2007; Takeuchi et al., 2002; Vege et al., 2000; Van der Vegt et al., 2007).

Antikörper	Quelle, Spezies Konzentration	Beschreibung
EMA	Dako (Code: M613) Monoklonal Maus 1:200	<i>Mehrfach glycolysiertes Transmembranprotein und der standardisierte Marker für epitheliale Differenzierung. Ependymale Tumorzellen reagieren entlang apikaler Zellfortsätze auf EMA-Färbung positiv. Ein weiteres Merkmal der immunhistochemischen EMA-Färbung von Ependymomen sind einerseits die punktförmigen intracytoplasmatischen, oft perinukleäre angefärbten Lumina (IEI) andererseits die ringförmigen intracytoplasmatischen Färbemuster (Hasselblatt et al., 2003).</i>
GFAP	Dako (Code: Z334) Polyklonal Rabbit 1:4000	<i>Das gliale fibrilläre, saure Protein ist ein Protein, welches als intermediäres Filament im Zytoplasma von reifen Gliazellen des Zentralnervensystems vorkommt. Charakteristischer Weise reagieren die Tumorzellfortsätze von Ependymomen GFAP-positiv.</i>
S100	Dako (Code:Z311) Polyklonal Rabbit 1:12000	<i>Calciumbindendes-Protein, welches an verschiedenen calciumvermittelten Zellfunktionen beteiligt ist. Darunter fallen der Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Zellwanderung, sowie die Signal-Transduktion der Zellen. S100 ist in vielen humanen Tumoren überexprimiert und soll beteiligt sein an Tumorentstehung, sowie an Tumorwachstum (Yong HY, Moon A, 2007).</i>

Tabelle 3: Etablierte Marker ependymaler Tumore.

Angaben über die Quelle, Spezies und Gebrauchskonzentration, sowie eine kurze Beschreibung der etablierten Marker EMA, GFAP und S100 und der Funktion der entsprechenden Antigene.

Antikörper	Ependymome	Astrozytome	Karzinome
EMA	+	-	+
GFAP	+	+	-
S100	+	+	-

Tabelle 4: Immunreaktivität etablierter ependymaler Tumore.

Vergleich der allgemein zusammenfassbaren Immunreaktivität der etablierten Marker EMA, GFAP und S100 gegen Ependymome, Astrozytome und Karzinome; Bewertung mit positiv (+) oder negativ (-).

(Ang et al., 1990; Goswami et al., 2007; Hassellblatt et al., 2006; Landriscina et al., 2007; Takeuchi et al., 2002; Vege et al., 2000; Van der Vegt et al., 2007).

2.4.2. Antikörper gegen Produkte von im Ependym differentiell exprimierten Genen

Eine Auswahl von zehn Antikörpern gegen Produkte, von im Ependym differentiell exprimierten Genen, konnte im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht werden. Eine Übersicht über die Antikörper sowie eine kurze Zusammenfassung der Funktion der entsprechenden Genprodukte gibt Tabelle 5.

RGS1	<p>Kaninchen-Antiserum; Quelle: Abcam (100) (http://marketing.abcam.com/index.html?datasheet=22102)</p> <p><i>RGS1 kodiert für ein Mitglied der G-Protein-Familie, die an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert sind. Das Protein hat die Funktion die Signalaktivität von G-Proteinen zu vermindern, indem es an eine aktivierte GTP gekoppelte α-Untereinheit bindet und so wie ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) wirkt (Watson et al., 1996). Damit verbunden ist die verstärkte Umwandlung von GTP zu der inaktiven Form, dem GDP. Die Hydrolyse zu GDP wiederum ermöglicht nun die Anlagerung von β- und γ- Untereinheiten an die α- Einheit. Dies bildet die inaktive Form des G-Proteins und damit verbunden das Signalende.</i></p>
------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

FATP6	<p>Kaninchen-Antiserum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Stahl, Stanford University School of Medicine, USA</p> <p><i>Fettsäure-Transport-Proteine (FATP) sind Transmembranproteine, die die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Zelle fördern. Die menschlichen FATPs stellen eine Familie aus sechs homologen Proteinen dar. Diese Proteine sind in jedem Gewebe bzw. Zellen vorhanden, welche sich Fettsäuren zu Nutze machen. FATP6 wird hauptsächlich in kardialen Zellen gebildet. FATP6 mRNA wird insbesondere von Herzmuskelzellen exprimiert und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese kardialer Erkrankungen. (Gimeno et al., 2003)</i></p>
CD 36	<p>Monoklonaler Antikörper (Klon B325 (1A7), Quelle: Acris Antibodies(101) (http://www.acris-antibodies.com/sheets/DM3038.pdf))</p> <p><i>CD36 ist ein Glycoprotein, welches auf der Basalmembran von Thrombozyten lokalisiert ist. Hier dient es als Rezeptor für Thrombospondin, ein extrazelluläres Glykoprotein, welches für die Zell-Zell- oder Zell-Matrix Kommunikation verantwortlich ist. CD36 spielt hierbei eine wichtige Rolle als ein Zelladhäsionsmolekül. Es bindet an Kollagen, Thrombospondin, anionische Phospholipide und Lipoproteine. Zusätzlich bindet es an langkettige Fettsäuren und fungiert so direkt bei dem Transport und /oder als Regulator des Transports von langkettigen Fettsäuren. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=gene&list_uids=948)</i></p>
GLUT 10	<p>Kaninchen-Antiserum; Quelle: Novus Biologicals (104) über Acris Antibodies (http://www.acris-antibodies.com/sheets/NB100-490.pdf)</p> <p><i>GLUT 10 (SLC2A10) ist ein Glucosetransporter der unter anderem mit der Entwicklung des nicht-insulinabhängigen Diabetes (NIDDM) in Verbindung gebracht worden ist (Dawson et al., 2001).</i></p>
Osteoprotegerin	<p>1.) Kaninchen-Antiserum Quelle: Acris Antibodies (101) (http://www.acris-antibodies.com/sheets/PP1107P.pdf)</p> <p>2.) Monoklonaler Antikörper (Klon 69127); Quelle: R&D Systems (105) (http://www.rndsystems.com/pdf/mab805.pdf)</p> <p><i>Osteoprotegerin ist ein sekretorisches Glycoprotein, welches zu der Familie der TNF-Rezeptoren gehört. Es fungiert als löslicher Faktor bei der Regulation der Knochenbildung. Hierbei beeinflusst OPG die Osteoklastenformation und -funktion als Antagonist zu RANKL-induzierte Osteoklastogenese und Knochenresorption (Simonet et al., 1997).</i></p>
GalNac	<p>Kaninchen-Antiserum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Kimitoshi Kohno, Kitakyushu Medical School, Japan</p> <p><i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-3. GalNac ist ein Glycan, welches einen ersten Schritt bei der O-Glycosylierung darstellt. Hierbei wird GalNac enzymatisch durch die Familie der GalNac-Transferasen an Serin- oder Threoninreste angehängt. Diese Biosynthese von O-gebundenen Glycanen an Proteine sichert die Aufrechterhaltung von Zelloberflächen.</i></p>

Kir5.1	<p>Kaninchen-Antiserum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Rüdiger Veh, Institut für Integrative Neuroanatomie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin</p> <p><i>Kir5.1 ist ein Mitglied der einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal-Familie. Eine Expression von Kir 5.1 ist in Gliazellen (Hibino et al., 2004), aber auch im Hoden nachgewiesen worden (Salvatore et al., 1999).</i></p>
SPAG 6	<p>Kaninchen-Antiserum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Jerry Strauss, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, USA</p> <p><i>Eine Expression von Sperm-associated-antigen 6 (SPAG6) findet sich insbesondere im Bereich des Hodens. Möglicherweise ist in geringem Maße eine Expression von SPAG6 auch in anderen zilienbesetzten Zellen zu erwarten (Sapiro et al., 2000).</i></p>
SPA17	<p>Kaninchen-Antiserum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Michael G. O'Rand; University of North Carolina, Chapel Hill, USA</p> <p><i>Spa17 (sperm autoantigenic protein 17) ist auf der Zelloberfläche von Spermien lokalisiert und vermittelt die Bindung von Spermatozoen an die Zona Pellucida (Richardson et al., 1994). Ebenso spielt Spa17 eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung und bei der Zelladhäsion sowohl von somatischen Zellen als auch von männlichen Keimzellen (Lacy et al., 2002).</i></p>
Annexin A1	<p>Freundlicherweise zur Verfügung gestellt Dr. Ursula Rescher; Institut für Medizinische Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster</p> <p><i>Annexin-A1 ist ein Mitglied einer aus mehr als 20 unterschiedlichen Subtypen bestehenden kalziumbindenden Proteinfamilie (Morgen and Fernandez, 1995), die möglicherweise an Membrantransportvorgängen beteiligt ist (Creutz, 1992; Gerke and Moss, 1997; Raynal and Pollard, 1994). Im Bereich des Ependyms wurde eine Expression von Annexin I, II und IV beschrieben (Dreier et al., 1998).</i></p>

Tabelle 5:**Antikörper.**

Quelle und Beschreibung der Antikörper, sowie kurze Zusammenfassung der Funktion ihrer entsprechenden Antigene.

2.4.3. Antigendemaskierung

EXKURS: Jedes Antigen besitzt ein oder mehrere Epitope, welche aus fünf oder mehr Aminosäuren bestehen. Formalinresistente Epitope können eine Formalinfixierung unverändert überstehen. Epitope, die formalinsensitiv sind, unterliegen deutlichen Konformationsänderungen. Verursacht werden diese durch eine formalininduzierte Bildung intermolekularer oder intramolekularer chemischer Quervernetzungen. Daraus ergibt sich ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunaktivität, durch eine sogenannte „Maskierung“ der Epitope. Um die Reaktivität formalinfixierter Antigene zu verbessern, stehen unterschiedliche Methoden zur Vorbehandlung und damit einhergehenden „Demaskierung“ des zu untersuchenden Gewebes zur Verfügung. Das Prinzip der Antigendemaskierung beruht auf der unterschiedlich langen Einwirkung von Hitze auf formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebsschnitte (FFPE). Die über Wasserdampf regulierte Erhitzung des Gewebes mittels Garkocher stellt eine gebräuchliche Methode dar. Durch die proteolytische Trypsin-Andauung werden nichtkoagulierende Fixativa permeabilisiert. Das Gewebe wird hierbei „aufgeschlossen“ (Permeabilisierung) und versteckte Antigene werden wieder zugänglich. Der Pufferung der FFPE Schnitte liegen „Retrieval-Lösungen“ zu Grunde, in die die Objektträger nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebsschnitte eingetaucht werden. (Key M., 2003).

Im Rahmen dieser Studie wurde formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe untersucht. Vorteil hierbei ist die ausgezeichnete Erhaltung der Gewebemorphologie. Die Formalinfixierung verursacht jedoch einen gewissen Verlust der Immunreaktivität vieler Antigene, was das Färbungsergebnis deutlich beeinflussen kann. Zur Optimierung der Immunreaktivität verwendeter Antikörper wurden sie, je nach Bedarf, individuell vorbehandelt. Dabei kamen in den Versuchsansätzen die Verfahren der Trypsin-Andauung, der pH9-Pufferung und einer Vorbehandlung mittels Garkocher zum Einsatz.

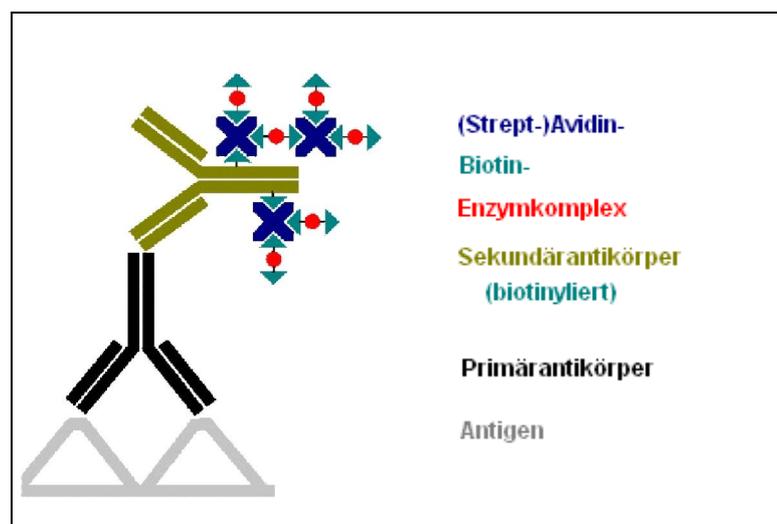
Für die proteolytische Trypsin-Vorbehandlung lagert man die Gewebeschnitte für 10 Minuten bei 37°C in Aqua dest.. Anschließend wird für weitere 10 Minuten das proteolytische Enzym Trypsin gleichmäßig auf dem Gewebe verteilt. Um die Reaktion zu stoppen und die Schnitte zu reinigen, werden diese über 5 Minuten mit Leitungswasser abgespült und diese trypsinangedauten Schnitte bis zum Färbungsvorgang in Aqua dest. gelagert.

Die Hitzebehandlung mittels Garkocher wird über die Erzeugung von Wasserdampf reguliert. Die Objektträger werden im Garkocher in einem Standard- Citratpuffer (pH6) aufbewahrt. Die effektive Inkubationszeit liegt bei 35 Minuten.

Während der Behandlung mit alkalischer Lösung (Citratpuffer), werden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebsschnitte in eine Retrieval-Lösung (pH9) eingetaucht und für 35 Minuten im Garkocher erhitzt. Anschließend werden die Objektträger für 15 Minuten in Eiswasser gelagert. Nach der Abkühlung muss der Puffer mehrmals mittels Aqua dest. ausgespült werden.

2.4.4. Färbeprotokoll

Die hier aufgeführten Arbeitsschritte liegen der Färbung jedes im Rahmen dieser Studie untersuchten Antikörpers zu Grunde. Hierbei wird die (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) in einem automatisierten Gerät (Tech Mate Horizon) der Firma Dako angewandt. Das Prinzip beruht auf der Reaktion eines enzymmarkierten (Strept-) Avidin-Moleküls mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (Abbildung 12).



Quelle: www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php#3

Abbildung 12: (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex.

Abbildung 12: Bei der ABC-Methode wird die erhöhte Affinität von Streptavidin an Biotin ($K_m=10^{15}$) ausgenutzt. Das Biotin-Molekül entspricht dem Vitamin B. Das Streptavidin-Molekül besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, von denen aber nur zwei besetzt werden können. Bei dieser Methode reagiert ein (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Es können so pro gebundenem Primärantikörper viele Enzymmoleküle gekoppelt werden. Die Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase = HRD) dient als Enzymmarker (*Boenisch et al., 2003*).

Arbeitsschritte:

- Entparaffinierung der zu färbenden Gewebsschnitte mittels Xylol (2x 5 Minuten)
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (99%, 90%, 70%) (je 5 Minuten)
- Einlegen der Schnitte in Aqua dest. für mindestens 5 Minuten
- Ansetzen der individuellen Antikörper-Verdünnungsreihen (siehe Tabelle 6)
(Verdünnungsmedium (Dako Real™ Antibody Diluent) + Antikörper = 300µl)
- Vorbereitende Maßnahmen am Tech Mate Horizon-Gerät:
 - I. Saugkissen in das Gerät legen
 - II. Einbringen der Dako REAL Reagenzien in die entsprechend gekennzeichneten **Reagenziengefäße** (jedes Gefäß besitzt 20 Vertiefungen; *Mengenangaben pro Vertiefung*):
 1. Dako REAL Wash-Buffer ansetzen, Code K5006 (je 1 ml)
 - BUF1** (gepufferte Lösung mit Trägerproteinen, Detergenz und Konservierungsmitteln)
 - BUF2** (gepufferte Lösung mit Detergenz und Konservierungsmittel)
 - BUF3** (gepufferte Lösung mit Detergenz und Konservierungsmittel)
 - Water Wash** (wässrige Lösung mit Detergenz und Konservierungsmittel)
 2. **AB1** Primärantikörper in korrekter Reihenfolge nach Protokollvorgabe (je 300µl)
 3. Dako Real™ Detection System (Code: K5001) ansetzen
 - a) **AB2** sekundären Antikörper (biotinyliert; anti-mouse/-rabbit) (300µl)

- b) **HP BK** Peroxidase-Blockierungsreagenz (750µl) zur Blockade der endogenen Gewebseroxidase
 - c) **HRP** Dako Real HRP Substrat Buffer (Streptavidin-Peroxidase) (gepufferte Substatlösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmitteln) (300 µl)
 - d) **CHRO** Dako Real™ DAB+Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel) (750 µl)
4. **HEMA** Hämatoxylin (300µl) für die Kernfärbung
- Start des automatisierten Färbeprotokolls
 - 76 Schritte über 2h 11min
 - Dehydrierung der gefärbten Gewebes in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 99%) und Eindeckung mittels Faramount.

2.4.5. Antikörperkontrolle und Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Protokolle der verschiedenen Antikörper wurden zunächst an Geweben neuropathologisch unauffälliger Gehirne ausgetestet. Diese Gewebeschnitte beinhalteten neben dem Ependym auch Plexus und weiße Hirnsubstanz. Bei stark positiver unspezifischer Färbung von Ependym, Plexus Choroideus und Hirngewebe wurde die Konzentration des Antikörpers entsprechend vermindert. Diejenigen Antikörper, bei denen eine (spezifische) ependymale Färbung nach Ermittlung der Idealkonzentration festgestellt werden konnte, wurden im nächsten Schritt in der ermittelten Konzentration auf den Tissue Arrays getestet. Solche Antikörper, die auf dem Ependym negative Färbungsergebnisse zeigten, wurden nicht weiter auf den Tissue Arrays untersucht, da auf solchen ebenfalls mit einer negative Immunreaktivität zu rechnen war. Tabelle 6 stellt die individuellen Verdünnungsreihen, sowie die ermittelten Gebrauchskonzentrationen der Antikörper, mit der sie auf den Tissue Arrays untersucht wurden, dar. Berücksichtigt werden hierbei auch die Vorbehandlungen einzelner Antikörper.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Verdünnungsreihe	Vorbehandlung	Gebrauchskonz auf dem TA
Kir 5.1	1. rabbit anti goat 2. Schwein anti goat	1:100-1:200-1:400-1:800 1:50-1:100-1:200-1:500	Keine	Keine
CD36	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1.50-1:100-1.200-1:1000	GK, pH9 Trypsin	Keine
GLUT 10	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:500-1:1000-1:2000	pH9 Trypsin	Keine
RGS1	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:100-1.250-1:500-1:1000	pH9 Trypsin	Keine
1. hOPG (Kaninchen) 2. hOPG (Maus)	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:500-1:1000-1:2000-1:4000 1.250	pH9 Trypsin GK	1:100 1:250
Annexin	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	Keine	Keine	1:200
FATP6	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:100-1:200-1:400-1:800	Keine	1:200
GalNac	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1: 1000 - 1: 2000	GK	1:2000
SPAG6	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:300-1: 600-1:1200	pH9 (1:50,1:100,1:300)	1:100 (ohne pH9)
Spa17	Ziege-anti-Maus/anti-rabbit	1:500-1:1000-1:4000-1:5000-1:8000	pH9	1:4000 1:5000 1:8000

Tabelle 6: Übersicht der evaluierten Antikörper.

Angaben über den in der ABC-Methode verwendeten sekundären Antikörper, die angesetzte Verdünnungsreihe, Vorbehandlungen (pH9 und /oder Trypsinandauung und/oder Garkocher (GK)) und die Gebrauchskonzentration des primären Antikörper während der Anwendbarkeit auf den Tissue Arrays (TA) sind dargestellt.

2.4.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der Färbungen erfolgte semiquantitativ anhand der Farbintensität, wobei die Immunreaktivität als *negativ* (0), *schwach* (1), *kräftig* (2) oder *stark* (3) eingeordnet wurde. Ausschließlich die Immunreaktivität von Tumorzellen ging in die Bewertung ein.

Zunächst wurde jede Stanze eines Gewebepaares individuell histologisch bewertet, um anschließend einen Medianwert der Farbintensitäten zweier zusammengehöriger Stanzenpaare zu ermitteln. Die Zahl der histologisch auswertbaren Stanzen ist abhängig von der Qualität eines jeden Gewebsschnittes der Tissue Arrays und der auf ihnen befindlichen Stanzen. Das heißt, dass diejenigen Gewebestanden, die nicht ausreichend Zellmaterial aufwiesen oder gar nicht auf dem Schnitt vorhanden waren, von der histologischen Auswertung ausgeschlossen wurden. Es wurde dann, wenn vorhanden, ausschließlich die Farbintensität des Gewebeduplikats in die Auswertung einbezogen.

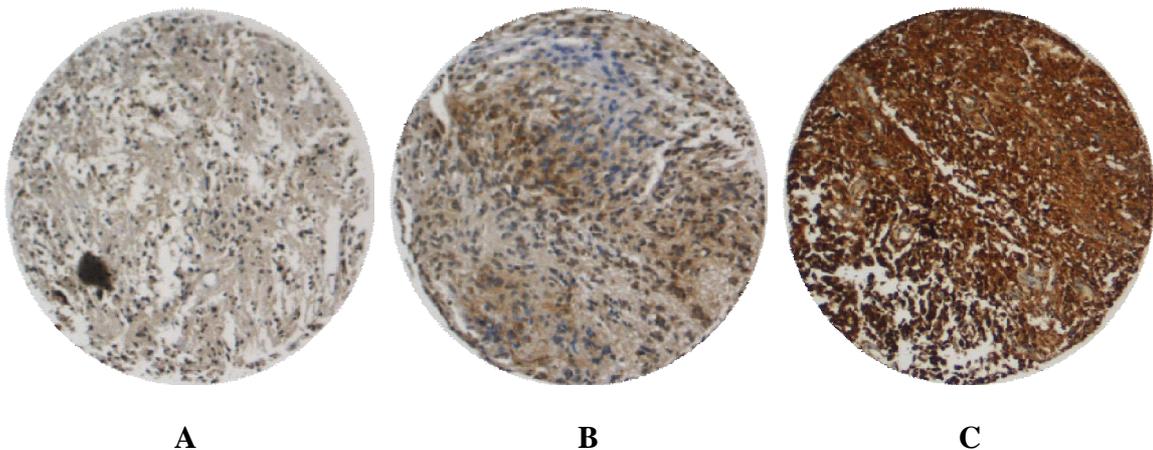


Abbildung 13:

Färbungsintensitäten.

Zu sehen ist eine **A** *schwache* (Ependymom WHO - Grad II), **B** *kräftig* (Ependymom WHO - Grad II) und **C** *starke* Anfärbung (anaplastisches Ependymom WHO-Grad-III) von Stanzen des ependymalen Tissue Arrays mit dem Primärantikörper FATP6 (1:200). Vergrößerung 400-fach.

2.5. Statistik

Eine statistische Beurteilung der Färbungsintensität auf den Tissue Arrays wurde ausschließlich im Fall des Spa17- Antikörpers durchgeführt, um die Signifikanz seiner Immunreaktivität gegenüber ependymalen Tumoren herauszustellen.

Zur Beurteilung der potentiellen Signifikanz der medianen Färbungsintensitäten ependymaler Tumore wurde der Mann-Whitney-U-Test unter Anwendung der Software SPSS (Version 12.0.1) durchgeführt. Ein P-Wert, der kleiner als 0,05 ist, wird hierbei als signifikant bezeichnet.

Die Formeln lauten wie folgt:

Stichprobe 1: Mediane Färbungsintensität ependymale Tumoren

Stichprobe 2: Mediane Färbungsintensität astrozytäre Tumoren

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Legende 1:

n_1	Anzahl der Werte in der Gruppe A
n_2	Anzahl der Werte in der Gruppe B
U_1	Prüfgröße der Gruppe A
U_2	Prüfgröße der Gruppe B
R_1	Rangzahl der Gruppe A
R_2	Rangzahl der Gruppe B

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientenanalyse

Wie schon in Tabelle 1 dargestellt, liegt der Studie auswertbares Gewebematerial von 90 Patientenfällen zu Grunde.

Einen Überblick über die Lokalisation der Tumore, das Alter der Patienten, sowie die Geschlechtsverteilung der 90 untersuchten Fälle gibt Tabelle 7.

	Ependymome (WHO II)	Myxopapilläre Ependymome (WHO I)	Anaplastische Ependymome (WHO III)
Anzahl (%)	59 (65)	15 (17)	16 (18)
Lokalisation (%)			
spinal	43 (78)	15 (100)	0 (0)
infratentoriell	12 (20)	0 (0)	7 (44)
supratentoriell	4 (2)	0 (0)	9 (56)
Altersverteilung (in Jahren)			
Mittelwert	45	34	20
(Bereich)	(0-80)	(10-60)	(0-70)
Geschlechtsverteilung m / w			
Gesamt : 56/34	36 / 23	9 / 6	11 / 5

Tabelle 7:

Patientendaten.

Datenbank des Instituts für Neuropathologie der Universität Münster der Jahre 1998 bis 2005. Zusammengefasst wird die Anzahl der untersuchten Ependymome, myxopapillären und anaplastischen Ependymome, sowie deren prozentualer Anteil (%). Die Lokalisation gliedert sich in spinal, infratentorial und supratentorial. Auch hier wird nach Anzahl und prozentualem Anteil unterschieden. Die Altersverteilung wird als Mittelwert (MW) und Altersspanne, in der die Tumoren auftraten, berücksichtigt. Die Angaben über die Geschlechtsverteilung bezeichnen die Anzahl männlicher (m) und weiblicher (w) Fälle.

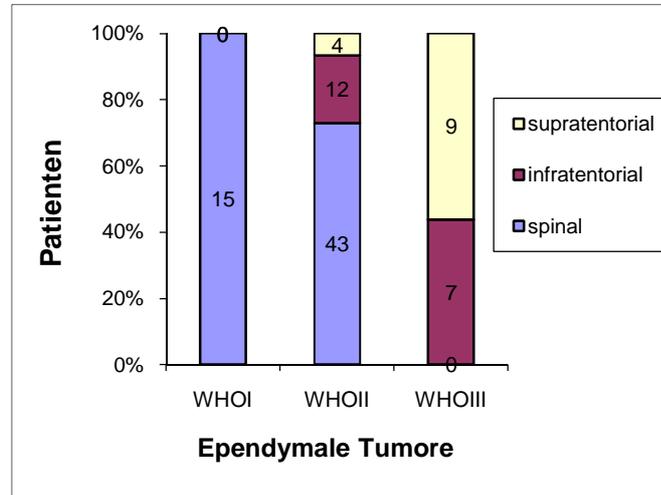
3.1.1. Lokalisation

Zur präzisen Lokalisierung und damit verbundenen Einteilung der beschriebenen ependymalen Tumore, wird ihr spezifisches Vorkommen den entsprechenden Hirnabschnitten zugeordnet (Diagramm 1 (A)). Dabei werden zum einen die supratentoriellen Hirnareale unterschieden, welche den seitlichen, sowie den dritten Ventrikel umfassen. Der infratentorielle Abschnitt beinhaltet den vierten Ventrikel (posteriore Fossa) mit Ausbreitungstendenzen in den Kleinhirnbrückenwinkel. Spinale Tumore befinden sich überwiegend im Bereich des Zentralkanals des Rückenmarks. Hier kann weiterhin eine zervikale, thorakale und kaudale Lokalisation unterschieden werden (Diagramm 1 (B)).

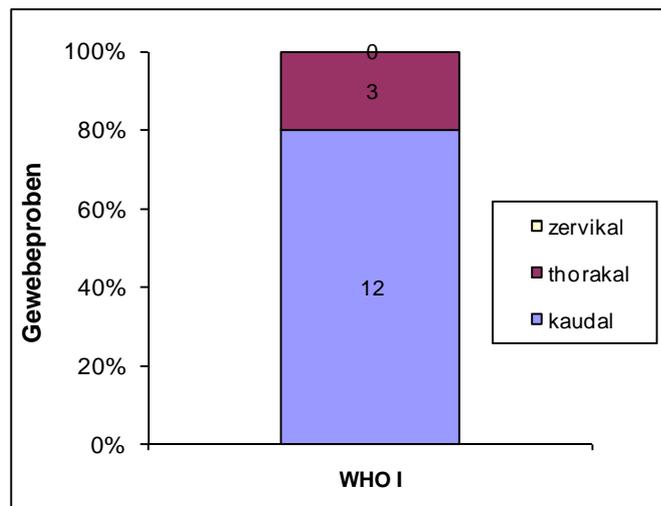
Die histologische Klassifikation der Tumore anhand der WHO- Kriterien (*Kleihues und Cavenee, 2000*) ergab für die insgesamt 90 Primärtumore eine Unterteilung in 59 (65 %) Ependymome (WHO - Grad II), 16 (18%) anaplastische Ependymome (WHO - Grad III), sowie 15 (17%) myxopapilläre Ependymome (WHO - Grad I). Von den Ependymomen (WHO - Grad II) sind 78% (43 Fälle) spinal, 20% (12 Fälle) infratentoriell und 2% (4 Fälle) supratentoriell lokalisiert.

Die 16 anaplastischen Ependymome treten infratentoriell (44%) und supratentoriell (56%) auf. Sie sind in keinem der Fälle spinal lokalisiert. Sechs von sieben infratentoriellen Tumoren waren in der posterioren Fossa, wobei ihr Wachstum Ausbreitungstendenz in den Hirnstamm zeigte. Sechs der neun supratentoriellen anaplastischen Ependymome wurden im Bereich der Seitenventrikel diagnostiziert.

Die 15 myxopapillären Ependymome sind ausschließlich spinal lokalisiert. Sie verteilen sich innerhalb des *Canalis centralis* zervikal (0 Fälle), thorakal (3 Fälle) und in der *Cauda equina* bzw. im *Conus medullaris* (12 Fälle).



A



B

Diagramm 1: Lokalisation ependymaler Tumore.

A) Verteilung ependymaler Tumore (WHO - Grad I-III).

Gliederung in spinale, infratentorielle und supratentorielle Lokalisation bezogen auf den prozentualen Anteil und die Anzahl der beurteilten Gewebeprobe.

B) Verteilung von WHO – Grad-I-Ependymomen im Canalis Centralis.

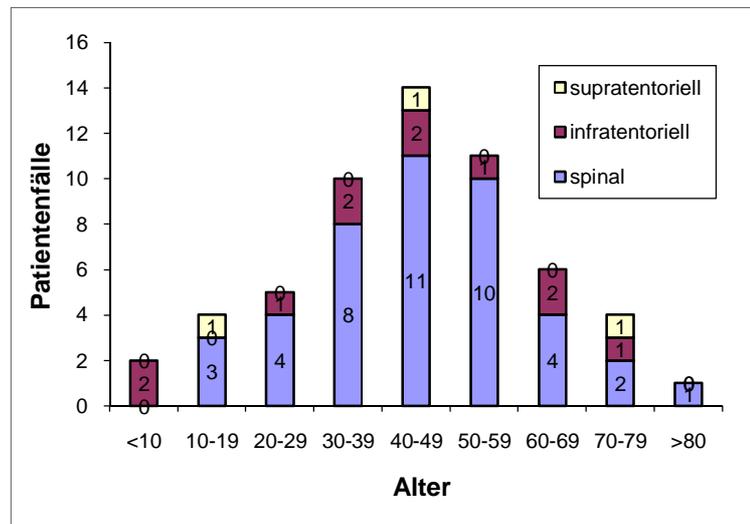
Zervikalmark, Thorakalmark und *Cauda equina*. Angaben über den prozentualen Anteil (Y-Achse) und die Anzahl der Gewebeprobe (Säulen).

3.1.2. Altersverteilung

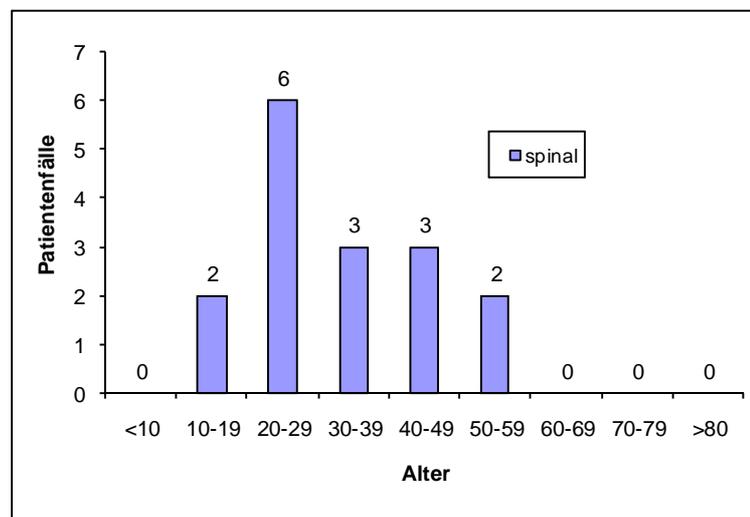
Die Altersverteilung variiert in Abhängigkeit vom histologischen Malignitätsgrad der Ependymome.

Diagramm 2 zeigt, dass die Altersverteilung der WHO - Grad II - Ependymome einen Häufigkeitsgipfel zwischen 40 und 49 Jahren aufweist, wobei hier die spinal lokalisierten Tumore den Hauptanteil darstellen. Bei zunehmendem, wie auch abnehmendem Alter sinkt die Inzidenz kontinuierlich, wobei der Anteil spinaler Ependymome zu jedem Zeitpunkt dominiert. Ausschließlich zwischen 0 und 9 Jahren ist die spinale Lokalisation im untersuchten Patientenstamm abwesend. Hier überwiegt die infratentorielle Lokalisation der WHO - Grad II-Ependymome. Supratentoriell lokalisierte Tumore treten nur in drei Fällen auf und zeigen keine charakteristische Zuordnung zu einem speziellen Altersabschnitt. Sowohl im Kindesalter als auch im mittleren und höheren Erwachsenenalter treten Einzelfälle auf.

Myxopapilläre Tumore (Diagramm 3) haben ihren Häufigkeitsgipfel im Alter von 20 bis 29 Jahren. Zwischen 0 und 9 Jahren, sowie 60 und >80 Jahren sind keine Patientenfälle mit myxopapillären Ependymomen aufgetreten. Das Vorkommen spinaler Ependymome in den übrigen Altersphasen, folglich zwischen 10 und 19 und zwischen 30 und 59 Jahren, ist seltener.

**Diagramm 2:****Altersanalyse Ependymome (WHO-Grad II).**

Anzahl der Patientenfälle verteilt auf definierte Altersspannen (X-Achse).
Unterteilung in spinale, infratentorielle und supratentorielle Lokalisation (Säulen).

**Diagramm 3:****Altersanalyse Myxopapillärer Ependymome (WHO-Grad I).**

Anzahl der Patientenfälle verteilt auf definierte Altersspannen (X-Achse) bei
ausschließlich spinaler Lokalisation (Säulen).

Die anaplastischen Ependymome treten hauptsächlich zwischen dem 1. und 9. Lebensjahr auf (Diagramm 4). Hier wird deutlich, dass im Kindesalter der Anteil infratentoriell lokalisierter Tumore am größten ist. Keines der anaplastischen Ependymome ist spinal lokalisiert. Mit zunehmendem Alter sinkt die Inzidenz der anaplastischen Tumore deutlich und präsentiert sich hauptsächlich supratentoriell.

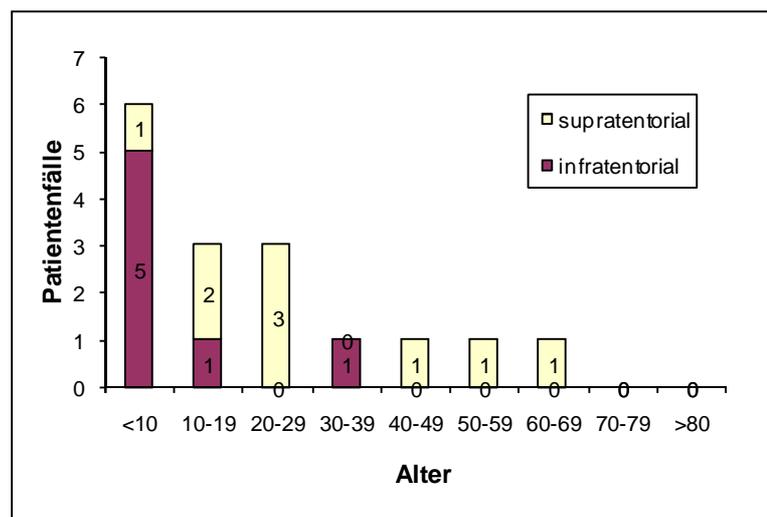


Diagramm 4: Altersanalyse Anaplastischer Ependymome (WHO-Grad III).

Anzahl der Patientenfälle verteilt auf definierte Zeitspannen (X-Achse) unter Berücksichtigung der Lokalisation (infratentoriell und supratentoriell) (Säulen). Spinal lokalisierte Fälle traten nicht auf.

3.1.3. Geschlechterverteilung

Die Zahl männlicher Patienten ist mit 56 deutlich größer als der weibliche Anteil mit 34 Fällen. Das Verhältnis männlich zu weiblich beträgt 1,64: 1. Der Anteil ependymaler Tumore (WHO - Grad II) ist bei beiden Geschlechtern der höchste, gefolgt von den gutartigen Ependymomen (WHO - Grad I). Den kleinsten Anteil stellt bei beiden Geschlechtern das anaplastische Ependymom (WHO - Grad III) dar. (Diagramm 5).

Innerhalb der einzelnen WHO-Grade variiert das Verhältnis der Geschlechter zueinander nur mäßig. Die Geschlechtsverteilung der Ependymome (WHO - Grad II) beträgt 1,57:1, die der WHO – Grad I-Tumore 1,5:1. Bei den anaplastischen Tumoren liegt das Gewicht deutlicher auf Seiten des männlichen Geschlechtes (2,2:1).

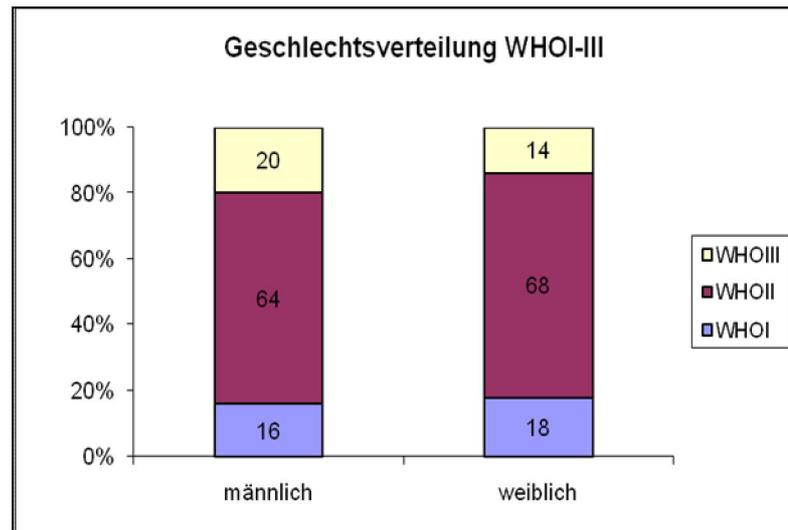


Diagramm 5: Geschlechtsspezifische Analyse ependymaler Tumore (WHO - Grad I – III). Auswertung nach prozentuelm Anteil der Patientenfälle sowie bezüglich des Geschlechtes (Gesamtanzahl der Patientenfälle: weiblich = 34; männlich = 56). Angaben über den prozentualen Anteil der Fälle sind in den Säulen verzeichnet.

3.2. Immunreaktivität etablierter diagnostischer Marker auf den Tissue Arrays

Zur Bewertung der Funktionalität der paraffingebetteten Tissue Array-Gewebeschnitte wurden die Färbungsergebnisse, die durch die Reaktion bekannter diagnostischer Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA), das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) und das S100-Protein in ependymalem Tumorgewebe entstanden sind, ausgewertet (Diagramm 6). Hierbei wurde zwischen positiven, bzw. negativen Färbungsergebnissen unterschieden, ohne die Farbintensität zu berücksichtigen. Die Angaben über die Sensitivität und Spezifität der Antikörper basieren auf den prozentualen Werten der histologisch beurteilten Färbungsergebnisse.

3.2.1. EMA

Es konnten 76 von 90 Duplikaten histologisch ausgewertet werden. Hiervon sind 49 EMA-negativ (9 vom WHO - Grad I, 30 vom WHO - Grad II, 10 vom WHO - Grad III) und 27 (1 vom WHO - Grad I, 21 vom WHO - Grad II, 5 vom WHO - Grad III) zeigen eine positive Färbung. Dem gegenüber stehen 87 auswertbare gliale Stanzenpaare, wovon 74 negativ und 13 positiv gefärbt wurden. Das Verhältnis zwischen positiven ependymalen und glialen Stanzen beträgt 1,09:1 (36%:20%) (Diagramm 6). Die Sensitivität des Antikörpers EMA gegenüber ependymalen Tumoren beträgt 36%, die Spezifität 80%.

Die positiv gefärbten ependymalen Gewebestanden wiesen ein charakteristisches Färbemuster auf. Einerseits fand die Immunreaktion an der luminalen Oberfläche von Zellmembranen echter ependymaler Rosetten, die durch ependymale Tumorzellen gestaltet werden, statt. Zusätzlich sind intrazytoplasmatische EMA- Expressionsmuster verzeichnet worden. Diese bildeten hauptsächlich ringförmige Färbungsmuster. Seltener zeigten sich unregelmäßig begrenzte perinukleär lokalisierte Punkte. Nur ein einziges Stanzenpaar wies eine stark positive diffuse Immunreaktivität auf.

3.2.2. GFAP

Von 77 auswertbaren ependymalen Gewebestandenpaaren waren 16 negativ (2 vom WHO - Grad I, 12 vom WHO - Grad II, 2 vom WHO - Grad III) und 61 (9 vom WHO - Grad I, 41 vom WHO - Grad II, 11 vom WHO - Grad III) positiv gefärbt. Auf dem glialen Tissue Array-Schnitt waren 104 Duplikate histologisch beurteilbar. Hiervon waren 19 negativ und 85 positiv. Das Verhältnis positiv gefärbter ependymaler Stanzen gegenüber den glialen Tumoren betrug 1:1,07 (79%:86%). Die Immunreaktivität dieses Antikörpers ist quantitativ sowie qualitativ als kräftig zu bewerten. Positiv färbten sich insbesondere die Fortsätze der Tumorzellen. Die Sensitivität des Antikörpers GFAP gegenüber Ependymomen beträgt 79%. Die Spezifität ist mit lediglich 14% vergleichsweise gering.

3.2.3. S100

Von 77 auswertbaren ependymalen Gewebeduplikaten reagierten 53 S100- negativ (10 vom WHO - Grad I, 36 vom WHO - Grad II, 7 vom WHO - Grad III). Das beurteilbare

Tumorgewebe des glialen Tissue Arrays (102 Paare) zeigte in 57 Fällen negative und in 45 Fällen positive Färbung. Die positiven Färbungsergebnisse waren durchgehend von schwacher Intensität. Das Verhältnis S-100-positiver glialer zu ependymalen Stanzen betrug 1:0,94 (47%:44%). Sensitivität (44%) und Spezifität (53%) sind mäßig.

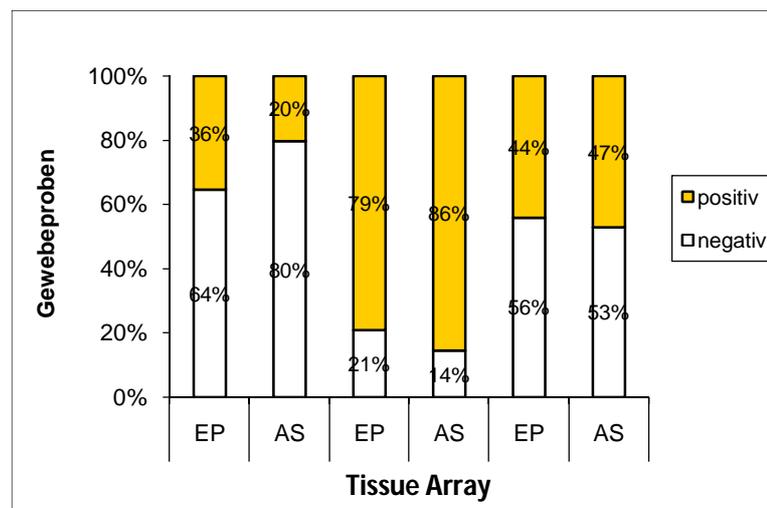


Diagramm 6: Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse bekannter diagnostischer Marker (EMA (1:200), S100 (1:12000), GFAP (1:4000)). Hierbei werden jeweils die Färbungen ependymaler (EP) und astrozytärer Tumore (AS) verglichen; Bewertung nach vorhandener bzw. fehlender Färbung (Angaben in %).

3.3. Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse potentieller diagnostischer Marker

Die zur Verfügung gestellten Antikörper wurden zunächst an histologisch unauffälligem Hirngewebe (Ependym, Plexus, Hippokampus) getestet. Diejenigen Antikörper, die auf dem normalen Ependym negative Färbungsergebnisse lieferten, wurden nicht weiter auf den Tissue Arrays untersucht, weil auch hier mit negativen Färbungsergebnissen zu rechnen war.

3.3.1. Kir 5.1

In der Verdünnungsreihe von 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 wurden negative Färbungsergebnisse bezüglich Ependym, aber auch Plexus und Hippokampus verzeichnet (Abbildung 14 A). Im nächsten Schritt wurde die Konzentration des Antikörpers auf 1:25 und 1:50 erhöht. Die Färbung des Ependyms und des Hippocampus blieb negativ. Der Plexus Choroideus wurde schwach positiv gefärbt (Abbildung 14 B).

In einer zweiten Testreihe wurde derselbe Primärantikörper mit einem anderen sekundären Antikörper der Spezies Schwein (anti goat) der Firma DAKO in der empfohlenen Verdünnung von 1:100 getestet. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe von 1:50, 1:100, 1:200 und 1:500 für den Primärantikörper angesetzt (Abbildung 15).

Auch in Kombination mit dem zweiten Sekundärantikörper ergab sich in keiner der verwendeten Konzentrationen eine ependymale Anfärbung. Nur wenige Astrozyten des kortikalen Gewebes färbten sich bei einer Verdünnung von 1:50 und 1:100 schwach an.

Da am nicht-pathologischen Hirngewebe keine Anfärbung erzielt werden konnte, wurde auf eine weitere Anwendung auf den Tissue – Array - Schnitten verzichtet.

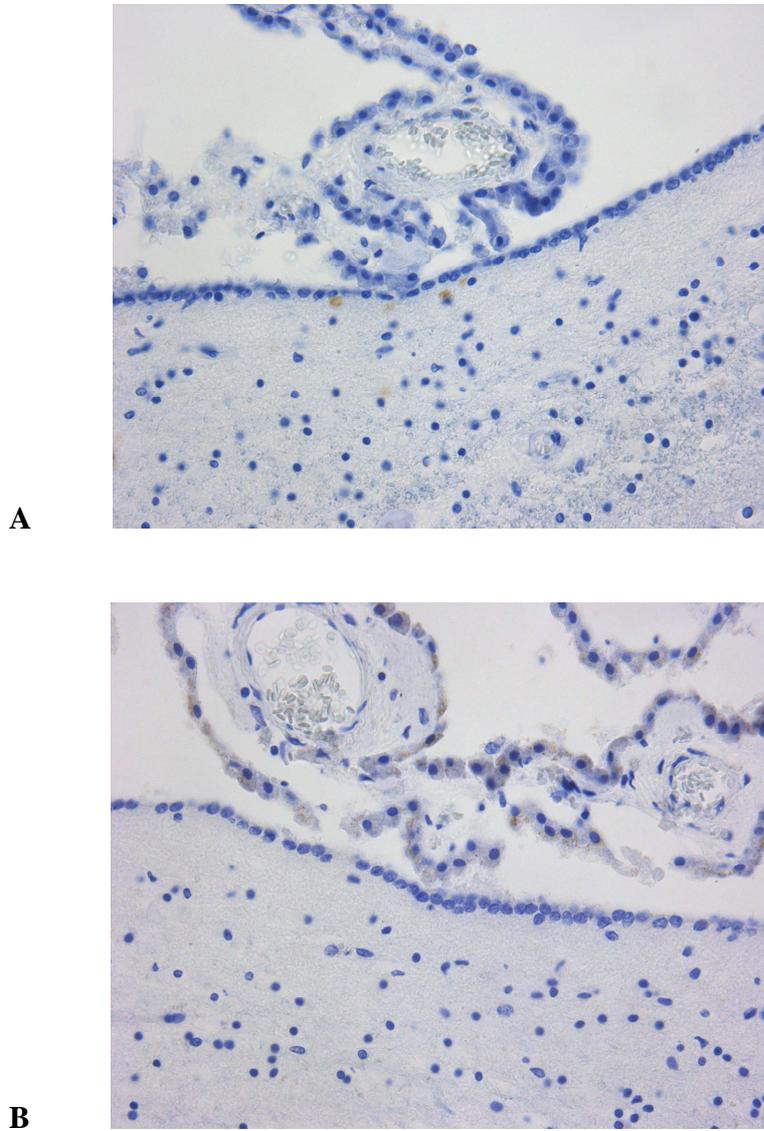
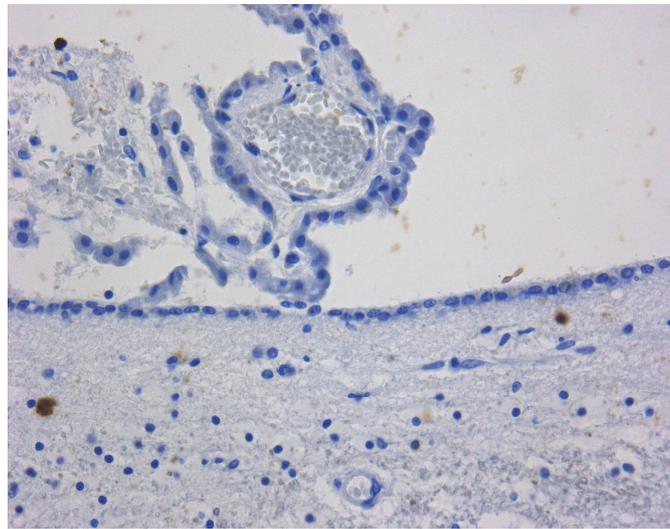
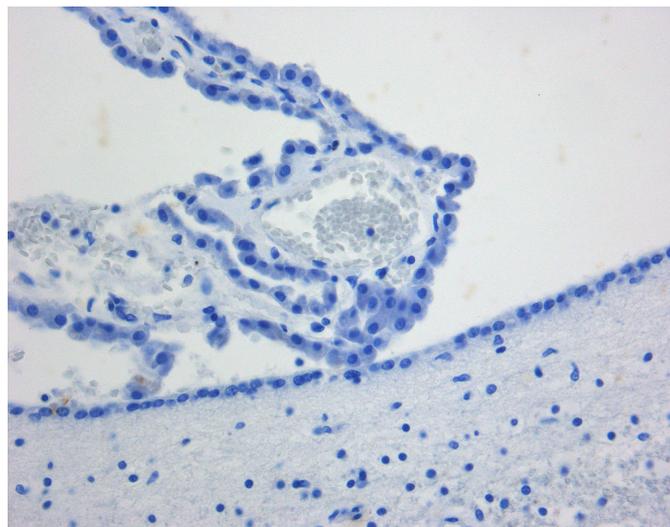


Abbildung 14: Färbungsergebnis des Primärantikörpers Kir5.1 auf normalem Hirngewebe. Sekundärer Antikörper rabbit anti goat (1:200); Vergrößerung 400- fach.
A) Kir5.1 (1:100): negative Färbung des Ependyms, Plexus und Kortex.
B) Kir5.1 (1:25): Ependym und Kortex sind negativ, der Plexus wird schwach gefärbt.



A



B

Abbildung 15: Färbungsergebnis des Primärantikörpers Kir5.1 (anti-goat) auf normalem Hirngewebe.

Sekundärantikörper von der Spezies Schwein anti goat (1:100). Vergrößerung 400 fach.

A) Kir5.1 (1:50): Ependym und Plexus sind immun-negativ; einzelne Astrozyten Des Kortex werden kräftig positiv gefärbt.

B) Kir5.1 (1:500): Keine positive Immunreaktivität gegenüber dem normalen Hirngewebe.

3.3.2. CD36

Dieser monoklonale Antikörper wurde zur Bestimmung seiner optimalen Arbeitskonzentration in einer Verdünnungsreihe von 1:50, 1:100, 1:200 und 1:1000 getestet. Die Färbungsergebnisse des histologisch gesunden Hirngewebes waren in allen vier Konzentrationen negativ. Weder gegenüber dem Ependym noch dem Kortex wies der CD36-Antikörper positive Reaktivität auf. Einzelne Epithelzellen des Plexus wurden schwach positiv gefärbt.

Um die Reaktivität formalinfixierter Antigene des paraffingebetteten Gewebes zu verbessern, wurde in einem weiteren Ansatz vor der Antikörperfärbung eine enzymatische Trypsin - Andauung und eine Citratpuffer – Vorbehandlung (pH9) eingesetzt. Die anschließende Färbung fand bei einer Antikörperkonzentration von 1:50 statt (Abbildung 16).

Auch durch eine Trypsinvorbehandlung des Gewebes konnte kein positives ependymales Farbsignal erzielt werden. Der Plexus wurde weiterhin lediglich schwach positiv gefärbt. Die pH9- Pufferung und anschließende Färbung mit dem CD36 – Antikörper in einer Konzentration von 1:50 ergibt eine schwach positive Färbung des Ependyms und des Kortex, allerdings eine stärkere Positivfärbung des Plexus Choroideus. Somit ist die Färbung dieses Antikörpers als nicht-sensitiv und unspezifisch gegenüber dem Ependym einzuordnen. Auf eine weitere Testung auf den Tissue Arrays wurde verzichtet.

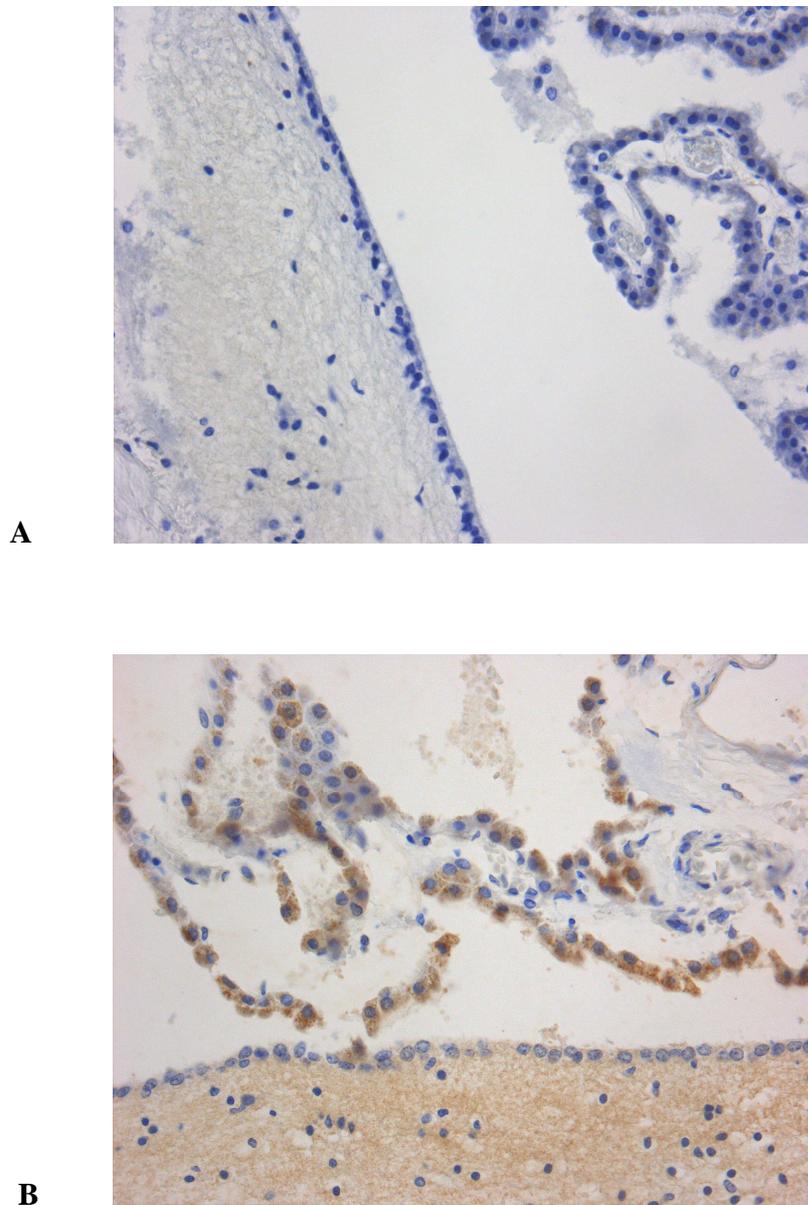


Abbildung 16: Färbungsergebnis des Antikörpers CD36 (1:50).
Berücksichtigt werden unterschiedliche Vorbehandlungen des normalen Hirngewebes;
Vergrößerung 400- fach

A) Trypsin: Der Plexus ist schwach positiv, der Kortex und das Ependym sind nicht gefärbt.

B) pH9-Puffer: Der Plexus wird im Vergleich zu Kortex und Ependym kräftig positiv gefärbt.

3.3.3. Glut 10

Der Antikörper wurde zur Ermittlung seiner optimalen Gebrauchskonzentration in einer Verdünnungsreihe von 1:500, 1:1000 und 1:2000 unter Garkochervorbehandlung (pH6) ausgetestet. Die entsprechenden Färbungsergebnisse bezüglich des Ependyms, des Plexus Choroideus und Kortex blieben jedoch negativ.

In einem zweiten Ansatz wurden die paraffinfixierten Schnitte mittels Trypsin bzw. mittels pH9- Pufferung vorbehandelt. Die anschließende Färbung fand in einer Antikörperkonzentration von 1:100 statt (siehe Abbildung 17). Die Trypsin-Behandlung erzeugte ein schwach positives Färbungsergebnis des Ependyms und des Plexus Choroideus (Abbildung 17 A). Der Kortex wurde nicht gefärbt. Durch die pH9-Pufferung ergab sich eine kräftig positive, allerdings unspezifische Färbung aller beteiligten Gewebe, wobei einzelne Zellen des Plexus Choroideus eine stärkere Färbung als die Ependymzellen aufwiesen (Abbildung 17 B). Dieser Antikörper ist somit trotz seiner Sensitivität nicht als spezifischer diagnostischer Marker ependymalen Tumorgewebes geeignet und kam auf den Tissue Arrays nicht weiter zur Anwendung.

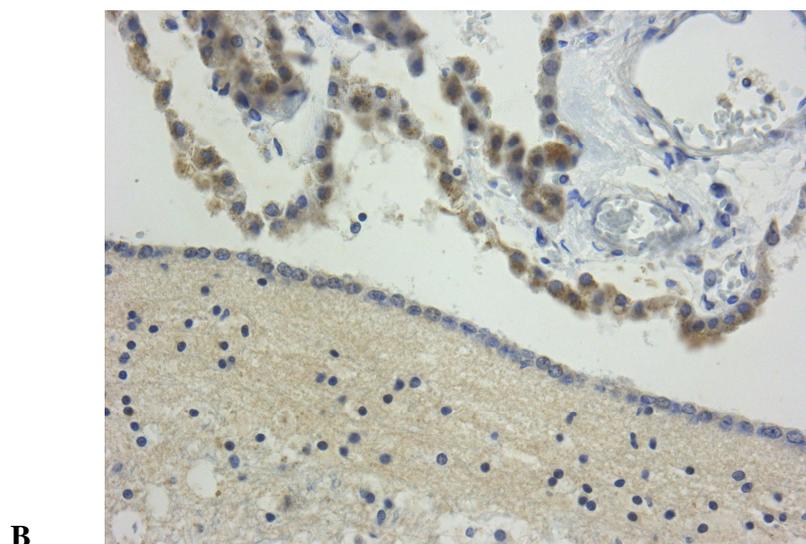
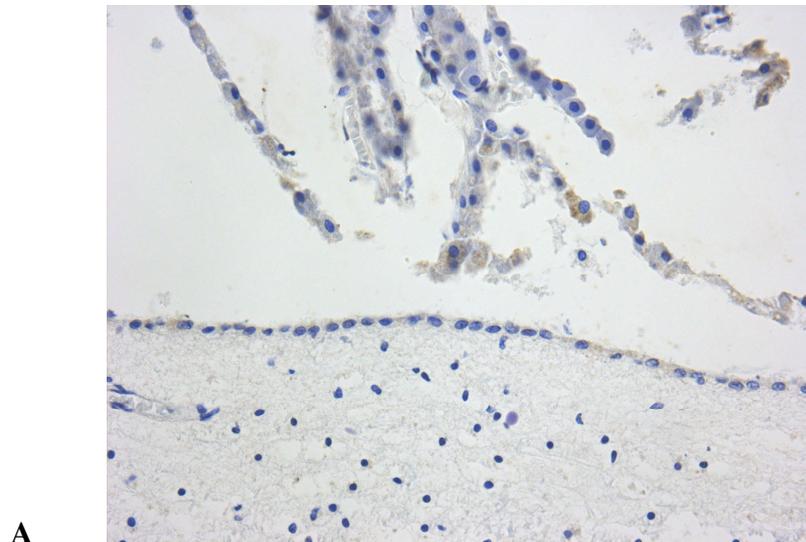


Abbildung 17: Färbungsergebnis des Antikörpers Glut10 (1:100). Berücksichtigt werden unterschiedliche Vorbehandlungen des normalen Hirngewebes; Vergrößerung 400-fach.

- A) Trypsin:** Der Kortex ist negativ gefärbt. Es ergibt sich ein schwaches ependymales Färbesignal. Das Plexusepithel wird kräftig positiv gefärbt.
- B) pH 9-Puffer:** Der Kortex und das Ependym sind schwach positiv, der Plexus besitzt eine stark positive Färbung.

3.3.4. RGS1

In einer Verdünnungsreihe von 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000 sollte die optimale Arbeitskonzentration dieses polyklonalen Antikörpers aus der Spezies Kaninchen erfasst werden. In keiner der verwendeten Konzentrationen zeigte der Antikörper eine positive immunhistochemische Reaktivität bezüglich des Ependyms. Ein positives Färbesignal zeigten lediglich einzelne Astrozyten. Auch der Plexus Choroideus wurde schwach positiv gefärbt.

In der Konzentration 1:50 wurde der Antikörper im nächsten Ansatz auf vorbehandelten Gewebeschnitten untersucht. Aber auch nach Trypsin-Andauung war kein positives Färbesignal ependymaler Zellen zu erzielen. Der Plexus Choroideus war schwach angefärbt. Das pH9-vorbehandelte Gewebe zeigte ebenfalls kein ependymales Farbsignal. Lediglich einzelne Zellen des Plexus vermittelten eine kräftig positive Färbung (Abbildung 18). Dieser Antikörper ist somit nicht als spezifischer diagnostischer Marker für ependymales Gewebe geeignet und kam auf den Tissue Arrays nicht zur Anwendung.

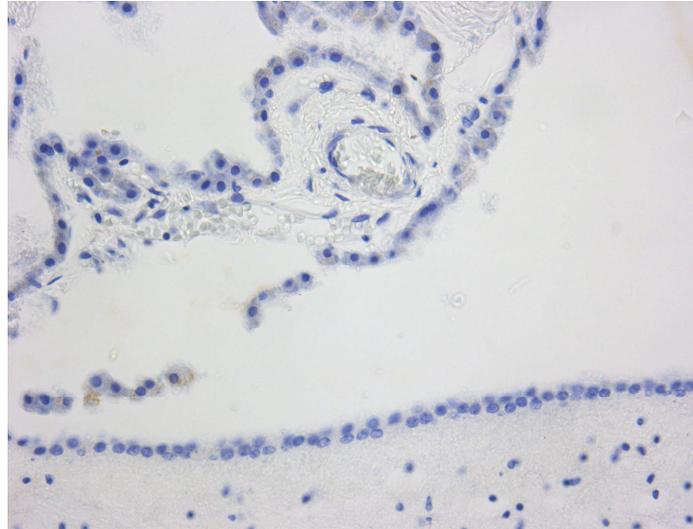
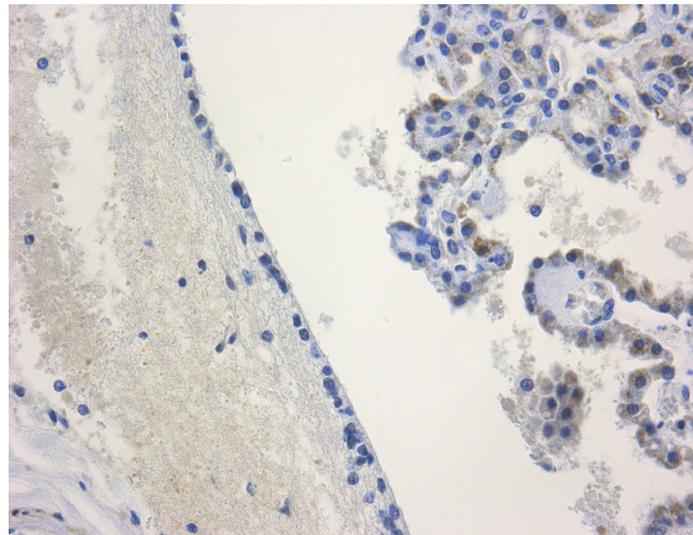
**A****B**

Abbildung 18: Färbungsergebnis des Antikörpers RGS1 (1:50).
Berücksichtigt werden unterschiedliche Vorbehandlungen des nicht-pathologischen Hirngewebes; Vergrößerung 400-fach.

A) Trypsin: Ependym und Kortex sind negativ, der Plexus schwach positiv gefärbt.

B) pH9-Puffer: Ependym und Kortex zeigen keine, der Plexus eine kräftige Positivfärbung.

3.3.5. Anti-hOPG

Zur Untersuchung standen zwei Antikörper gegen das humane Osteoprotegerin unterschiedlicher Spezies zur Verfügung.

1. Antikörper:

Dieser hOPG -Antikörper aus der Spezies Kaninchen wurde in einer Verdünnungsreihe von 1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:4000 auf seine optimale Gebrauchskonzentration und Funktionalität untersucht. Das immunreaktive Verhalten des Antikörpers auf neuropathologisch normalem Hirngewebe verzeichnete in keiner der aufgezeigten Gebrauchskonzentrationen ein positives ependymales Färbungssignal. Durch eine zunehmende Antikörperkonzentration (1:500 und 1:1000) wurde der Plexus Choroideus schwach positiv angefärbt.

In einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 wurde der Antikörper in zwei weiteren Ansätzen auf trypsinvorbehandeltem bzw. pH9-gepuffertem Gewebe getestet (Abbildung 19 A bzw. B). Durch die Trypsin-Vorbehandlung des Gewebes entstand kein positives ependymales bzw. kortikales Färbungssignal. Der Plexus war, wie im nicht-vorbehandelten Gewebe, schwach positiv gefärbt. Die pH9-Pufferung führte zu einem stark positiven Färbungsergebnis des Plexus Choroideus. Demgegenüber wurden das Ependym sowie das kortikale Gewebe nur sehr schwach angefärbt.

Um Aussagen über die immunhistochemische Reaktivität des Antikörpers gegenüber Ependymomen im Vergleich zu glialen Tumoren treffen zu können, wurde hOPG in der zuvor ermittelten optimalen Gebrauchskonzentration (1:100) unter pH9-Pufferung auf den Tissue Arrays auf seine Eignung als diagnostischer Marker gegenüber Ependymomen untersucht. Zur histologischen Auswertung kamen insgesamt 78 ependymale Tumore (11 vom WHO - Grad I, 53 vom WHO - Grad II, 14 vom WHO - Grad III) und 85 Gewebeduplikate des glialen Tissue Arrays. Die Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse ependymaler und astrozytärer Tumore in Diagramm 7 zeigt, dass anti-hOPG kaum Unterschiede in seiner Färbungsintensität aufwies. Eine negative Färbung der Ependymome trat in keinem Fall auf. Die positiven Ergebnisse zeigten schwache (15%), kräftige (45%)

und starke (40%) Intensitäten. Der Antikörper besitzt neben einer Sensitivität von 100% eine Spezifität von 1% gegenüber ependymalen Tumoren und ist somit als unspezifisch für Ependymome einzustufen, da auch andere gliale Tumore zu 99% positiv färben und das Intensitätsmuster dem der Ependymome gleicht (schwach 11%, kräftig 41%, stark 45%).

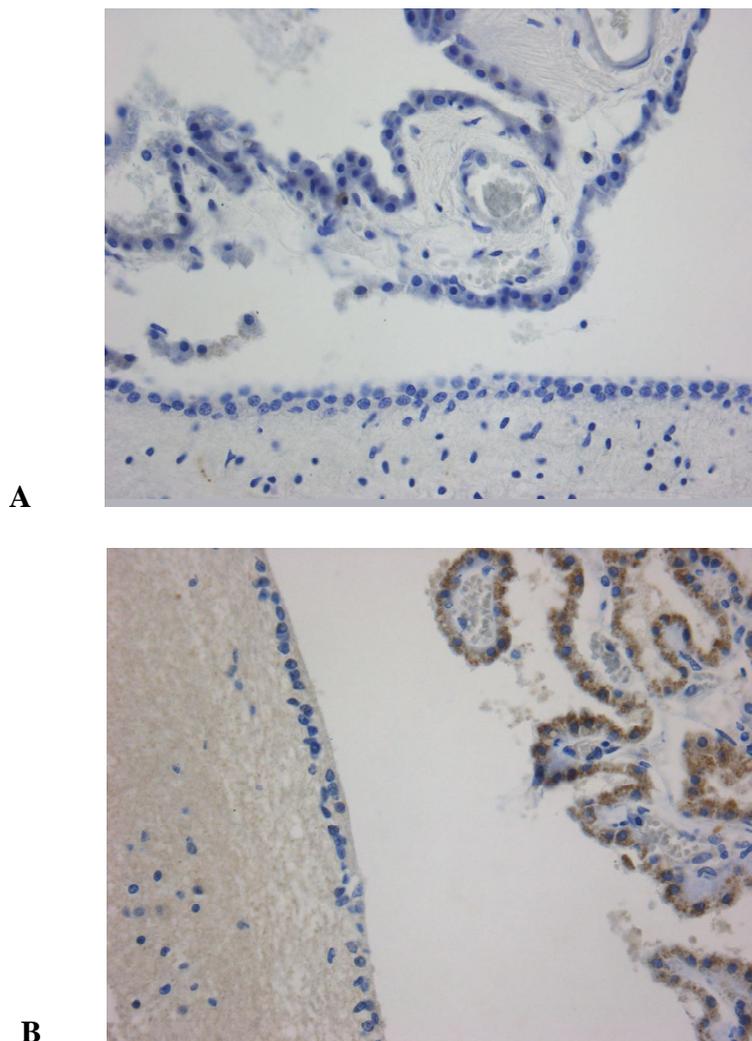


Abbildung 19: Färbungsergebnis des Antikörper hOPG (1:100) auf normalem Hirngewebe. Berücksichtigt werden unterschiedliche Vorbehandlungen; Vergrößerung 400-fach.
A) Trypsin: Ependym und Kortex sind negativ, der Plexus ist schwach positiv gefärbt.
B pH9-Puffer: Das Ependym und der Kortex zeigen eine schwache, der Plexus eine kräftige Positivfärbung.

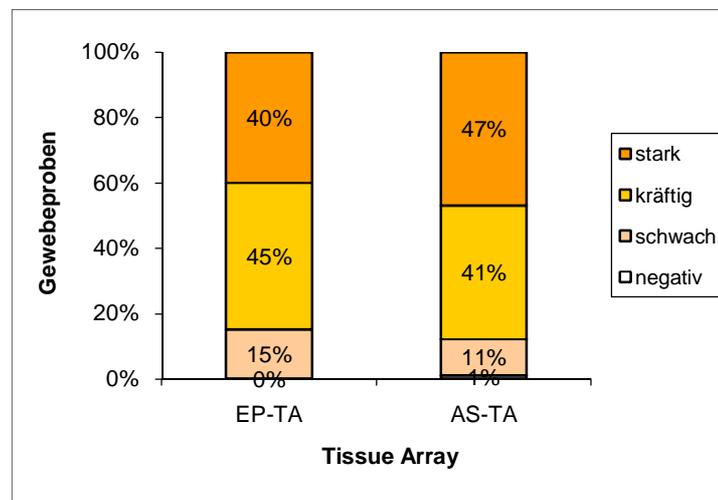


Diagramm 7: Färbungsintensitäten des Antikörpers hOPG (1:100; pH9).
Gegenüberstellung der Ergebnisse des ependymalen (EP-TA; n=78) und des glialen Tissue Arrays (AS-TA; n=85). Angaben über die mediane Färbungsintensität (negativ, schwach, kräftig und stark) der Gewebeproben in %.

2. Antikörper

Für die Verwendung des anti-hOPG aus der Spezies Maus wurde vom Hersteller eine Verdünnung von 1:250 empfohlen. Zunächst wurde dieser Antikörper auf seine Funktionalität gegenüber dem Ependym, Plexus und Kortex untersucht (Abbildung 20). Es zeigte sich bei der histologischen Untersuchung eine stark positive Färbung des Plexus Choroideus. Schwach positiv gefärbt wurden das Ependym und der Hippocampus. Somit war eine Spezifität des Antikörpers gegen normales Ependym nicht nachzuweisen. Jedoch wurde die positive Immunreaktivität des Antikörpers gegen das Ependym in einem nächsten Ansatz ausgenutzt, indem die Anwendung in der ermittelten Gebrauchskonzentration auf den Tissue Arrays wiederholt wurde.

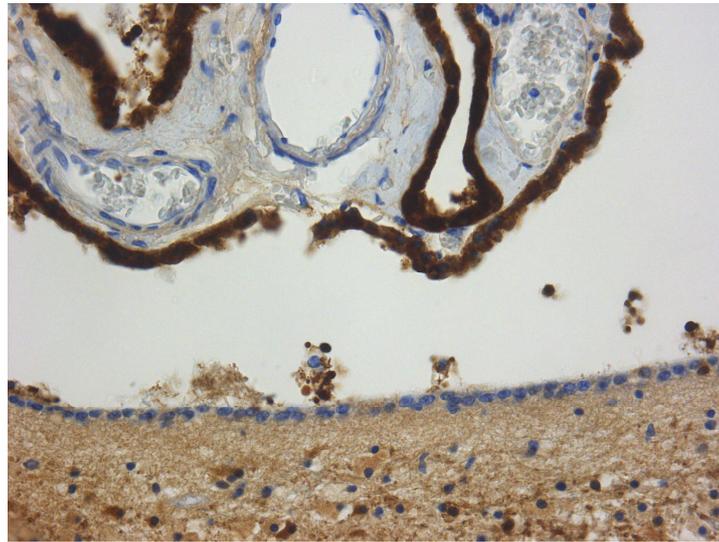


Abbildung 20: Färbungsergebnis des Antikörpers hOPG (1:250) auf normalem Hirngewebe. Das Ependym und der Kortex sind schwach, der Plexus ist stark positiv gefärbt; Vergrößerung 400-fach.

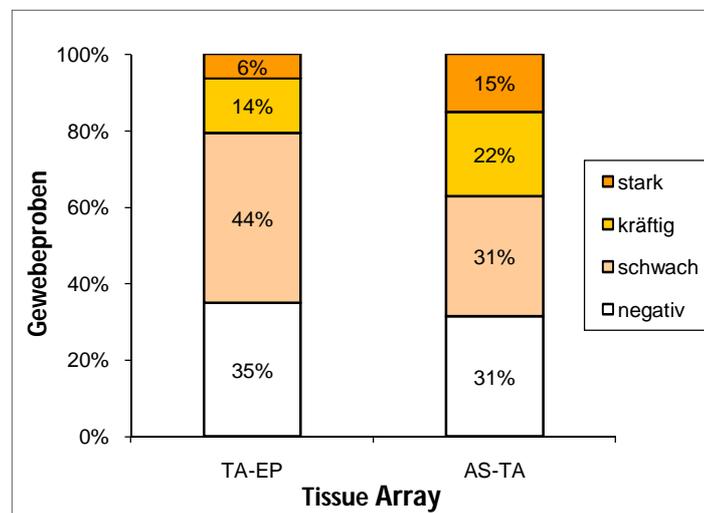


Diagramm 8: Färbungsintensitäten des Antikörpers hOPG (1:250). Gegenüberstellung der Ergebnisse des endymalen (EP-TA, n=63) und des glialen Tissue Arrays (AS-TA, n=86); Angaben über die mediane Färbungsintensität (negativ, schwach, kräftig und stark) in %.

Die histologische Auswertung von insgesamt 63 beurteilbaren Gewebepaaren ependymaler und von 86 anderer glialer Tumore stellt das Diagramm 8 dar. Sowohl Ependymome als auch astrozytäre Tumore zeigten positive Färbungsergebnisse mit vergleichbarer Intensität. Das Verhältnis positiv gefärbter Stanzepaare beträgt 1:1,06 (EP-TA 65%: AS-TA 69%). 44% der positiven ependymalen Gewebeproben sind *schwach*, 14% *kräftig* und nur 6% *stark* gefärbt. Die 86 Färbungswerte des glialen Tissue Arrays zeigten ein kräftigeres Intensitätsmuster, da der Anteil *starker* (15%) und *kräftiger* (22%) Färbungen größer ist als derjenige der ependymalen Positivergebnisse.

Im Vergleich mit dem ersten hOPG-Antikörper verzeichnete dieser eine geringere Sensitivität (65%) neben einer leicht gesteigerten Spezifität (32%). Normales Ependym und ependymales Tumorgewebe zeigten positive Färbungsergebnisse, jedoch hoben sich diese nicht von denen anderer glialer Tumore ab, so dass der Antikörper in keiner der getesteten Konzentrationen ependymale Spezifität zeigte.

3.3.6. Annexin

Annexin A1 wurde in der evaluierten optimalen Konzentration von 1:200 auf den Tissue Arrays der Ependymome und der glialen Tumore untersucht, ohne zuvor auf dem Ependym getestet worden zu sein, da eine ependymale Proteinexpression von Annexin A1 bereits beschrieben worden war (*Dreier et al., 1998*).

Abbildung 21 bestätigt die positive Immunreaktivität des Antikörpers auch auf ependymalem Tumorgewebe der Tissue Arrays. Positiv gefärbt wurden die Tumorzellfortsätze. Zellkerne und Blutgefäße waren negativ.

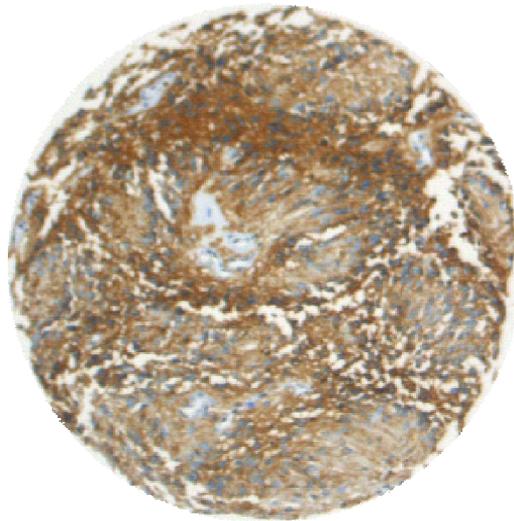


Abbildung 21: Färbungsergebnis des Antikörpers Annexin A1 (1:200). Die Abbildung zeigt eine repräsentative Gewebestanze eines Ependymoms (WHO - Grad II) mit *starker* Positivfärbung der Tumorzellfortsätze und Nichtanfärbung von Gefäßen und Zellkernen; Vergrößerung 100-fach.

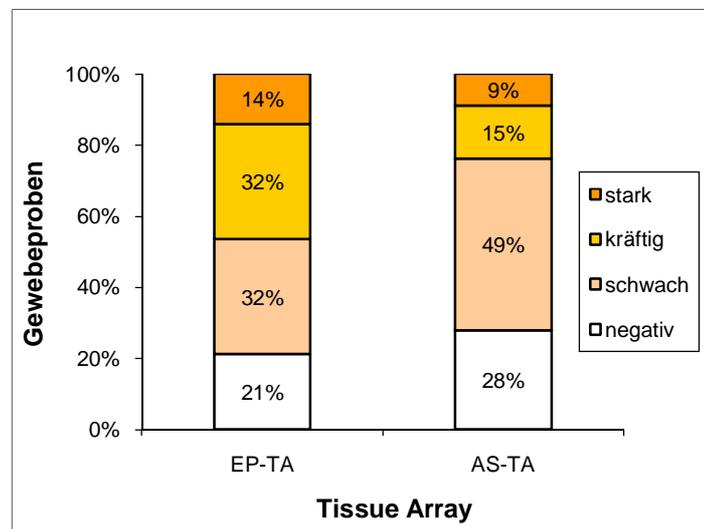


Diagramm 9: Färbungsintensitäten des Antikörpers Annexin A1 (1:200). Gegenüberstellung der Ergebnisse des ependymalen (EP-TA, n=71) und des glialen Tissue Arrays (AS-TA; n=101). Angaben über die Anteile der medianen Färbungsintensität (negativ, schwach, kräftig und stark) der Gewebebeobachten in %.

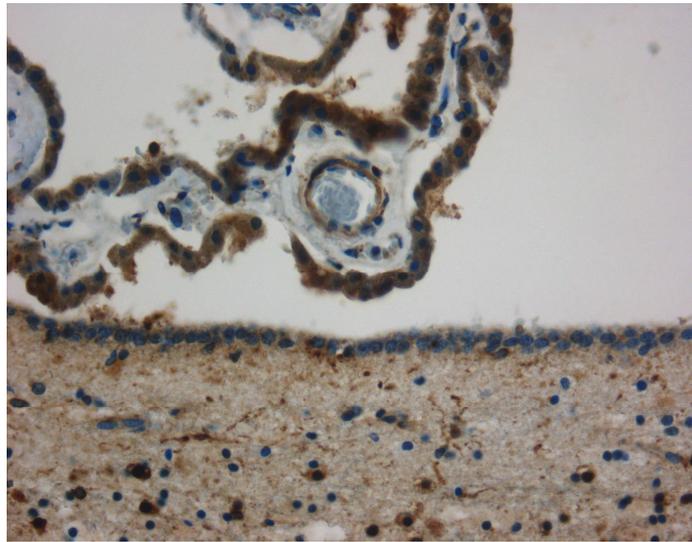
Die histologische Auswertung der immunologischen Reaktivität des Antikörpers veranschaulicht Diagramm 9. Es konnten insgesamt 71 ependymale und 101 gliale Gewebepaare auf ihre mediane Färbungsintensität untersucht werden. Hierbei wiesen beide Tissue Array-Schnitte positive Färbungsergebnisse auf. Das Verhältnis positiver Färbungen der glialen und ependymalen Tumore beträgt 1:1,06. Bezüglich der medianen Farbtensitäten bestehen nur geringe Unterschiede. Mit 32% stellt die *schwache* Färbung den größten Anteil der Ependymome dar. Bei den glialen Tumoren ist die *schwache* Färbung mit 49% vertreten und die *kräftige* ist mit 15% deutlich geringer. *Starke* Färbungen sind bei beiden Arrays selten, jedoch häufiger im Falle der Ependymome (14%) als bei den glialen Tumoren (9%). Der Anteil *nicht-gefärbter* Stenzen ist in ependymalen (21%) und glialen Tumoren (28%) annähernd gleich.

Die Auswertung der Färbungsintensität des anti - Annexin vermittelt zwar eine erhöhte Sensitivität (79%), jedoch nur wenig Spezifität gegenüber Ependymomen (28%). Dieser Antikörper kann somit nicht als diagnostischer Marker für ependymale Tumore dienen.

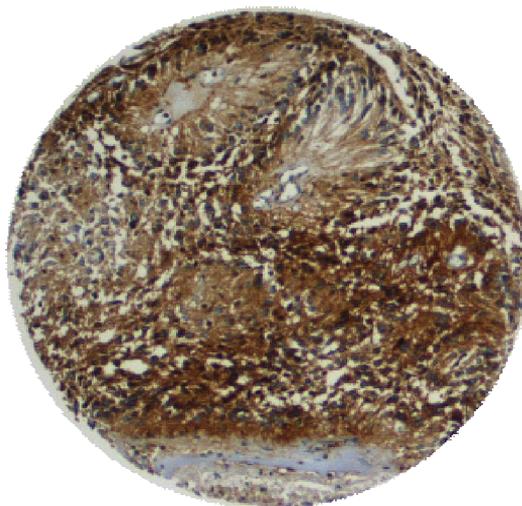
3.3.7. FATP6

Zur Ermittlung der optimalen Gebrauchskonzentration wurde eine Verdünnungsreihe von 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 auf normalem Hirngewebe angesetzt. Ein deutliches Färbungssignal bei minimaler Hintergrundfärbung ergab sich in einer Verdünnung von 1:200 (Abbildung 22 (A)). Eine Spezifität des Antikörpers bezüglich des Ependyms stellte sich allerdings nicht heraus. Der Plexus Choroideus und einzelne Gliazellen wurden kräftig positiv gefärbt. Das Ependym zeigte ein schwach positives Färbungsergebnis.

Unter Verwendung der ermittelten Optimalkonzentration von 1:200 wurde der FATP6-Antikörper auf seine Immunreaktivität hinsichtlich der Tissue Arrays untersucht. Abbildung 22 (B) zeigt eine repräsentative Stanze mit dem Gewebe eines Ependymoms (WHO - Grad II), wobei die ependymalen Tumorzellfortsätze stark positiv angefärbt werden. Die Zellkörper sowie umliegende Gefäße sind immunnegativ.



A



B

Abbildung 22: Färbungsergebnis des Antikörpers FATP6 (1:200).

A) Färbungsergebnis auf normalem Hirngewebe.

Das Ependym und der Kortex werden schwach positiv gefärbt. Der Plexus zeigt eine starke Positivreaktion; Vergrößerung 400-fach.

B) Färbungsergebnis auf einer ependymalen Gewebestanze.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Gewebestanze eines Ependymoms (WHO Grad II) mit starker Färbungsintensität; Vergrößerung 100-fach.

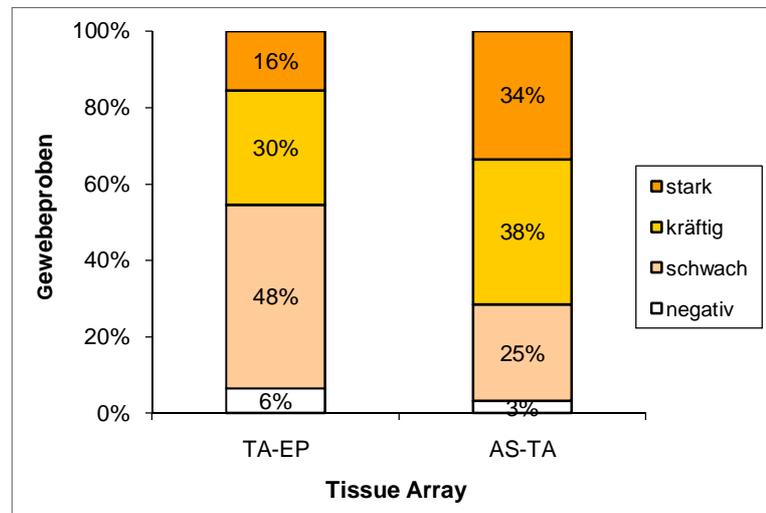


Diagramm 10: Färbungsintensitäten des Antikörpers FATP6 (1:200).

Gegenüberstellung der Ergebnisse des endometrialen (EP-TA, n=77) und des glialen Tissue Arrays (AS-TA, n=95). Angaben zu den Anteilen *negativ*, *schwach*, *kräftig* und *stark* gefärbter Stanzeln in %.

Die histologische Beurteilung der Tissue Arrays auf ihre Farbintensität zeigt die graphische Darstellung (Diagramm 10). Zur Auswertung kamen insgesamt 77 endometriale Gewebepaare (10 vom WHO - Grad I, 51 vom WHO - Grad II und 16 vom WHO - Grad III) sowie 95 astrozytäre Duplikate.

Dem FATP6 - Antikörper war eine positive Funktionalität auf dem paraffinebetteten Tissue Array nachzuweisen, da seine immunhistochemische Reaktivität sowohl auf endometrialem, als auch glialem Tumoren positiv war, wobei die Farbintensitäten individuell variierten. Der Anteil nicht-gefärbter Stanzeln war in beiden Fällen sehr gering, so dass die Zahl positiv gefärbter Gewebepaare, unabhängig von der Farbintensität, über 90% betrug. Das Verhältnis der positiven Färbungsergebnisse von endometrialem zu glialem Tumoren lautet 1:1,3. Hierbei steht der Anteil *kräftiger* (30% : 38%) und *starker* (16% : 34%) Färbungen der glialen Gewebepaare denen der Endometriome voran. 48% der endometrialen Stanzelpaare werden *schwach* gefärbt. Insgesamt zeigte der FATP6-Antikörper in der ermittelten Gebrauchskonzentration eine Sensitivität von 94% gegenüber endometrialem Tumorgewebe. Seine Spezifität ist jedoch sehr gering (3%).

3.3.8. GalNac

Die Untersuchung des Antikörpers auf Ependym, Plexus und Hippokampus fand in einer Verdünnungsreihe von 1:1000 und 1:2000 (Garkocher- Vorbehandlung mit Citatpuffer (pH6)) statt. Der Antikörper zeigte in beiden Konzentrationen eine positive immunhistochemische Reaktivität gegenüber dem Ependym (Abbildung 23 (A)). Dieses wurde im folgenden Ansatz bei der Anwendung des Antikörpers auf den Tissue Arrays in einer Gebrauchskonzentration von 1:2000 ausgenutzt, wobei das Gewebe zunächst pH-9 - vorbehandelt wurde.

Abbildung 23 (B) zeigt eine repräsentative ependymale Gewebestanze mit *kräftiger* Färbung der Tumorzellfortsätze und des Zytoplasmas. Auch Blutgefäße werden gefärbt.

Insgesamt konnten 79 ependymale und 101 gliale Stenzen der entsprechenden Tissue Arrays hinsichtlich ihrer Farbintensität ausgewertet werden. Die Zahl myxopapillärer Ependymome erfasste 12 Patientenfälle. Der Anteil der Ependymome (WHO - Grad II) ist mit 52 Fällen verzeichnet. Von den anaplastischen Ependymomen des Tissue Arrays konnten 15 Duplikate bewertet werden.

Die histologische Auswertung (Diagramm 11) zeigt, dass sich keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Färbungsintensität ependymaler und glialer Tumore verzeichnen lassen. Das Verhältnis positiver Färbungsereignisse beträgt 1:1,01 (glial:ependymal), wobei die Ependymome zu 100% positiv gefärbt wurden.

Festzuhalten ist somit eine hohe Sensitivität (100%) des Antikörpers gegen GalNac in ependymalen Tumoren. Die Spezifität für Ependymome ist jedoch sehr gering (1%), so dass der Antikörper für diagnostische Zwecke nicht eingesetzt werden kann.

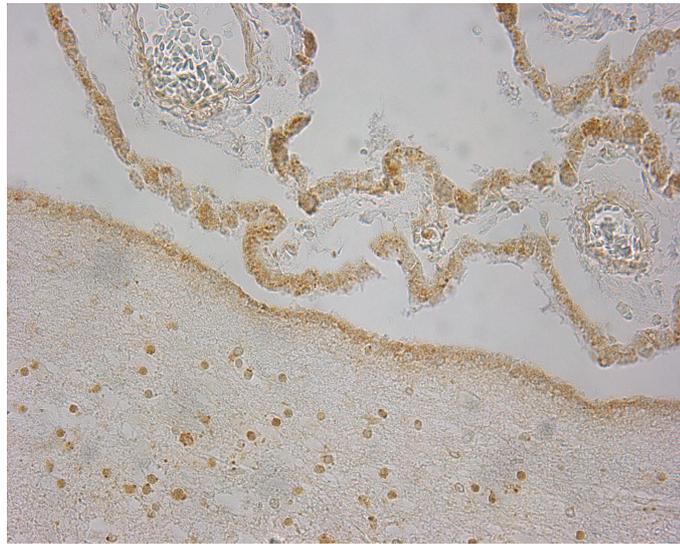
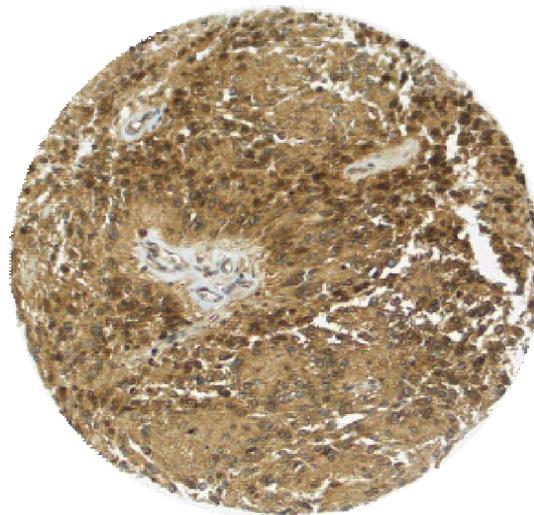
**A****B**

Abbildung 23: Färbungsergebnis des Antikörpers GalNac (1:2000; pH9).

A) Färbungsergebnis auf nicht- pathologischem Hirngewebe. Das Ependym, der Plexus und der Kortex werden *schwach* positiv gefärbt; Vergrößerung 400- fach.

B) Färbungsergebnis auf einer Gewebestanze.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Gewebestanze eines Grad-II Ependymoms mit *kräftiger* Färbungsintensität; Vergrößerung 100-fach.

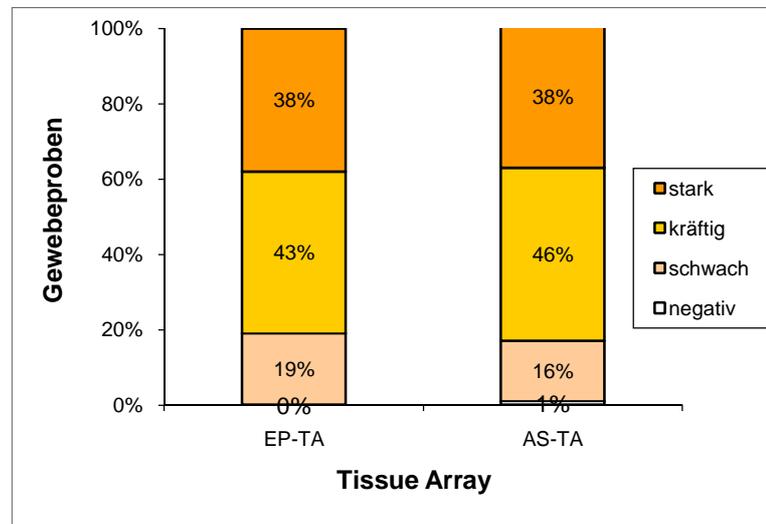


Diagramm 11: Färbungsintensitäten des Antikörpers GalNAc (1:2000, pH 9).

Gegenüberstellung der Ergebnisse des ependymalen (EP-TA, n=79) und des glialen Tissue Arrays (AS-TA, n=101). Angaben über *negative*, *schwache*, *kräftige* bzw. *starke* Färbungen in %.

3.3.9. SPAG6

Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnungsreihe von 1:300, 1:600 und 1:1200 zunächst auf neuropathologisch unauffälligem Hirngewebe ausgetestet. Als orientierende Gebrauchskonzentration diente 1:300, da hier bei minimaler Hintergrundfärbung eine deutlich positive Antikörperreaktion im Ependym zu beobachten war, welche gleichsam Plexus und Hippokampus färbte. Die Konzentrationen 1:600 und 1:1200 ergaben kein positives Färbungssignal des Hirngewebes.

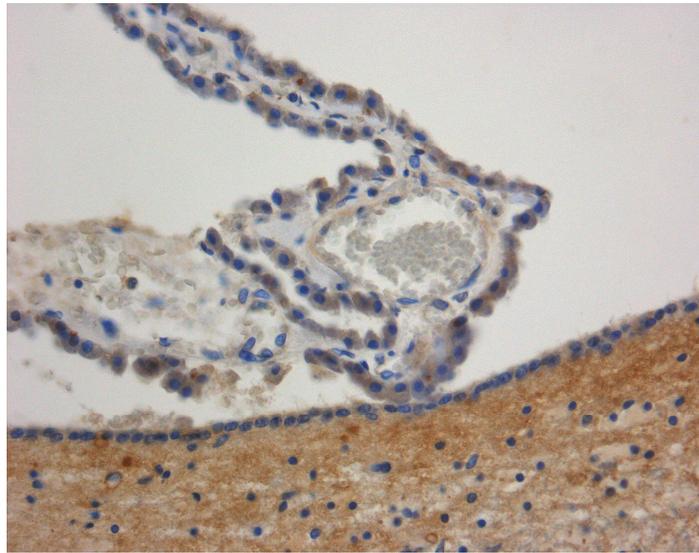
Im nächsten Ansatz wurden die Gewebeschnitte für die Anwendung des Antikörpers in der vorgesehenen Verdünnungsreihe von 1:50, 1:100 und 1:300 pH 9-vorbehandelt (Garkocher). Alle drei Antikörperkonzentrationen zeigten eine unspezifische Färbung gegenüber den Hirngewebeschnitten, wobei der Plexus im Vergleich zum Ependym stärker positiv gefärbt wurde. Bei der Verdünnung von 1:100 (pH 9 vorbehandelter Schnitt) wurden Plexus Choroideus und Ependym in vergleichbarem Maße schwach positiv gefärbt, so dass bei dieser Konzentration der SPAG6-Antikörper erneut, allerdings ohne pH 9-

Vorbehandlung des Gewebes, auf normalem Hirngewebe und anschließend auf den Tissue-Array-Schnitt angewendet wurde. Die histologische Auswertung des normalen Gewebes zeigte eine *schwache* Färbung sowohl des Ependyms, als auch des Plexus und des Kortex (Abbildung 24 (A)). Dieses *schwache* Färbungsergebnis spiegelte sich auch auf dem ependymalen Tissue Arrays wieder. Figur B (Abbildung 24) zeigt in diesem Zusammenhang eine Gewebestanze eines Grad II-Ependymoms. Die Tumorzellfortsätze sind positiv gefärbt.

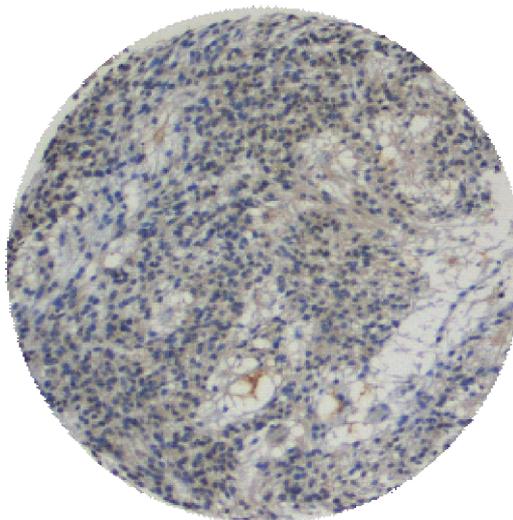
Die in Diagramm 12 dargestellte histologische Auswertung der Tissue Arrays vergleicht die immunhistochemische Reaktivität des Antikörpers auf ependymalem und glialem Tumorgewebe. Zur Auswertung kamen 52 der 90 Gewebepaare ependymaler Stenzen (10 myxopapilläre Ependymome, 36 Ependymome (WHO - Grad II) und 11 anaplastische Ependymome), sowie 79 gliale Duplikate. Die Stenzen der Ependymome zeigen ein mit den glialen Tumoren vergleichbares Färbemuster bezüglich der Intensität, wobei das Verhältnis positiver Färbungsergebnisse 1 : 0,97 (ependymal : glial) beträgt. Den Hauptanteil der positiven Gewebeproben stellen sowohl bei den Ependymomen (50%), als auch bei anderen glialen Tumoren (34%) die *schwach* gefärbten Stenzen dar.

Spezifiziert man die histologische Analyse hinsichtlich der WHO-Klassifikation ependymaler Tumore, ergibt sich im Falle der Grad I-Ependymome eine Sensitivität von 100%. Gleichzeitig ist die mittlere Färbungsintensität myxopapillärer Ependymome (1,7) deutlich höher als die der Grad II - (1,2) und Grad III-Ependymome (1) (Diagramm 13). Vergleicht man allerdings das Färbungsmuster der Grad I-Tumore des glialen Tissue Arrays (91%), zeigen die Gewebeproben ebenfalls einen erhöhten Anteil positiver Färbungsereignisse, so dass kein konkreter Zusammenhang zwischen dem Malignitätsgrad und der Spezifität für Ependymome hervorgehoben werden kann.

Insgesamt zeigte der Antikörper SPAG6 innerhalb der ependymalen Tumorstanzen, bevorzugt gegenüber Grad I – Ependymomen, zwar eine erhöhte Sensitivität (75%), jedoch lässt sich keine nennenswerte Spezifität (27%) verzeichnen, da sowohl ependymale als auch astrozytäre Tumore positiv gefärbt werden.



A



B

Abbildung 24: Färbungsergebnis des Antikörpers SPAG6 (1:100, ohne pH9).

- A) Färbungsergebnis auf nicht-pathologischem Hirngewebe.
Es zeigt die *schwach* positive Färbung des Ependyms, Kortex und Plexus Choroideus; Vergrößerung 400- fach.
- B) Die Abbildung zeigt eine repräsentative Gewebestanzte eines Grad II- Ependymoms mit *schwach* positiver Farbintensität der Tumorzellfortsätze; Vergrößerung 100-fach.

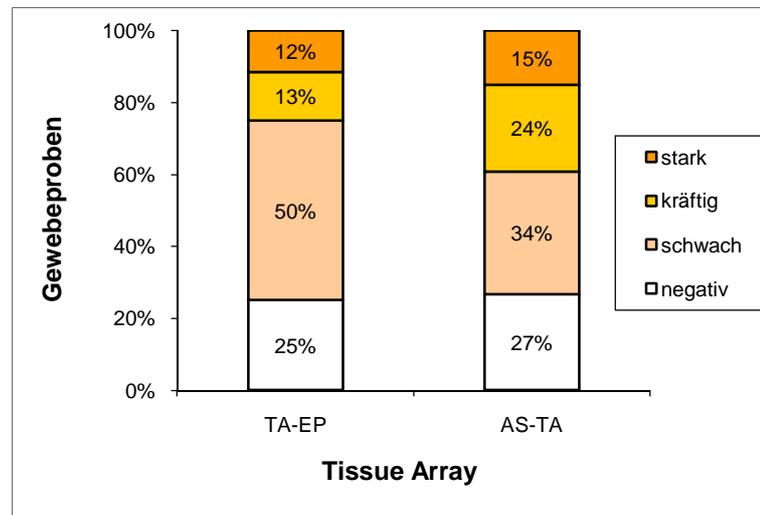


Diagramm 12: Färbungsergebnis des Antikörpers SPAG6 (1:100).
Gegenüberstellung ependymaler (EPTA; n=52) und glialer (AS-TA; n=79) Färbungsintensitäten. Angaben über die Anzahl *negativ*, *schwach*, *kräftig* bzw. *stark* gefärbter Stanzeln in %.

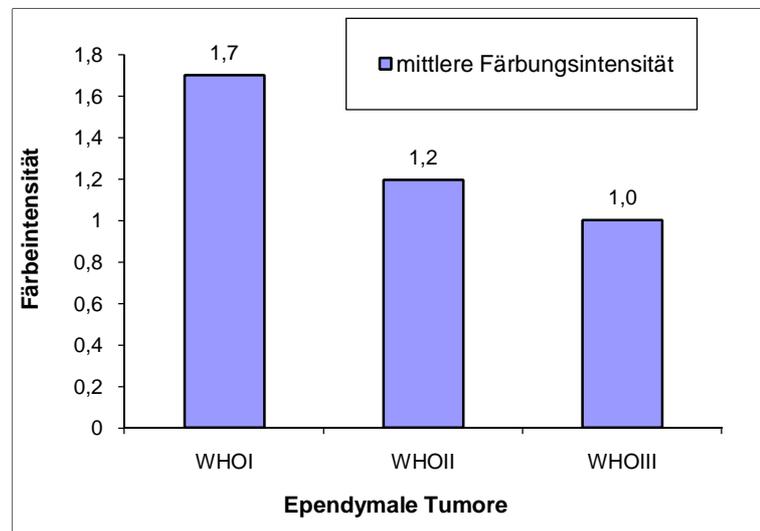


Diagramm 13: Mittlere Färbungsintensität SPAG6 (1:100).
Bestimmt aus der Summe aller Medianwerte der Färbungsintensitäten ependymaler Gewebestanzeln. Unterschieden werden die mittleren Färbungen der histologischen Malignitätsgrade (WHOI-III). Die höchste mittlere Färbung ergibt sich für die Grad I-Ependymome (1,7). Dem folgen die Grad II Tumore (1,2) und die anaplastischen Ependymome (1).

3.3.10. Spa17

Zur Ermittlung der optimalen Arbeitskonzentration wurde der Antikörper zunächst auf pH9- vorbehandeltem neuropathologisch normalem Hirngewebe in einer Verdünnungsreihe von 1:500, 1:1000 und 1:4000 getestet. Für die Konzentration von 1:4000 zeigte sich bei minimaler Hintergrundfärbung eine kräftige Färbung des Ependyms und des Plexus. Der Kortex war deutlich schwächer gefärbt (Abbildung 25).

Im Falle des anti- Spa17 wurden drei Versuchsansätze mit den Tissue Arrays durchgeführt, die sich durch verschiedene Konzentrationen des Antikörpers unterschieden. Hierbei sollte diejenige optimale Arbeitskonzentration herausgearbeitet werden, bei welcher der Antikörper die höchste Sensitivität und Spezifität gegenüber ependymalen Tumoren aufwies.

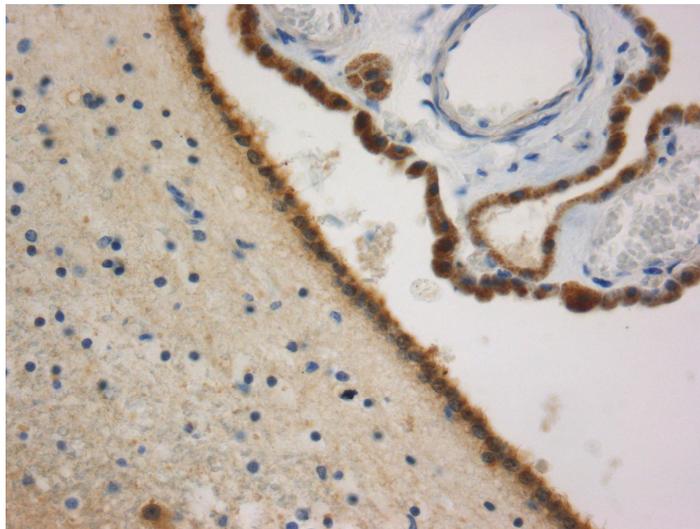


Abbildung 25: Färbungsergebnis des Antikörpers Spa17 (1:4000, pH9) auf normalem Hirngewebe.
Der Plexus und das Ependym werden kräftig, der Kortex schwach positiv gefärbt;
Vergrößerung 400-fach.

3.3.10.1. Gebrauchskonzentration anti- Spa17 (1:4000)

Zunächst kam der Antikörper in der auf dem nicht- neoplastischen Gewebe ermittelten optimalen Gebrauchskonzentration (1:4000) an Schnitten der Tissue Arrays zur Anwendung. Das Gewebematerial wurde ebenfalls pH9- vorbehandelt. Die Expression von Spa17 konnte im Zytoplasma der Tumorzellen beobachtet werden. Zellkerne, sowie Blutgefäße wurden nicht angefärbt.

Insgesamt standen 73 Medianwerte ependymaler (8 myxopapilläre Ependymome, 50 Ependymome WHO Grad II und 15 anaplastische Ependymome) und 103 Medianwerte glialer Stenzen zur histologischen Auswertung. Es war ein hoher Anteil *kräftig* (37%) bzw. *stark* (22%) positiv gefärbter ependymaler Stenzen zu verzeichnen. Demgegenüber stand ein deutlich geringerer Prozentsatz glialer Stenzen, der nur zu 9% *kräftig* und zu 1% *stark* positive Farbtintensität aufwies. Beim Vergleich der *schwach* positiven Färbungen überwog mit 36% der Anteil der glialen Tumore gegenüber dem der ependymalen Stenzen (24%). Hervorzuheben ist der bestehende *negative* Farbanteil glialer Stenzen, der mit 54% den Anteil nicht-gefärbter ependymaler Tumore (17%) deutlich übersteigt. Insgesamt beträgt das Verhältnis positiver Färbungsergebnisse ependymaler zu glialer Tumore 1,83:1 (83% : 46%). Die Sensitivität des Antikörpers beträgt 83%, die Spezifität 54%.

Beim Vergleich der Färbungsergebnisse ependymaler und glialer Tumorproben hinsichtlich der WHO-Klassifikation waren deutlichste Unterschiede in der Immunreaktivität des Antikörpers gegen WHO - Grad II -Tumore zu beobachten. Es entstand ein Verhältnis positiver Färbungsergebnisse glialer zu ependymaler Tumorstanzen von 1: 1,7 (54%: 92%). Während der Hauptanteil positiv gefärbter glialer Tumore des WHO- Grad II eine *schwache* (45%) und zu 9% eine *kräftige* Färbung zeigte, wurden die positiven ependymalen Stenzen zum größten Teil *kräftig* (48%) und *stark* (28%) gefärbt. Nur 16% zeigten eine *schwache* Färbung. Zudem wiesen gliale Tumore (WHO - Grad II) im Gegensatz zu Grad- II- Ependymomen in keinem Fall eine *starke* Färbung auf. Die Sensitivität des Antikörpers gegenüber Grad II Ependymomen beträgt bei der Gebrauchskonzentration von 1:4000 92%, die Spezifität 41%.

Die Auswertung der Färbungsergebnisse zeigte folglich, dass anti-Spa17 eine erhöhte Sensitivität bezüglich ependymaler Tumore aufweist. In der Konzentration von 1:4000 ist seine Spezifität und Sensitivität gegenüber Grad-II-Ependymomen am höchsten.

3.3.10.2. Gebrauchskonzentration anti- Spa17 (1:8000)

Zur Annäherung an eine Antikörperkonzentration, die potentiell eine spezifische Färbung des ependymalen Tumorgewebes hervorruft, wurde die Konzentration auf 1:8000 reduziert und erneut auf pH9 - vorbehandelten Tissue-Array-Schnitten (AS-TA und EP-TA) getestet. In die histologische Auswertung der immunhistochemischen Farbintensität konnten 79 der 90 möglichen Medianwerte ependymaler Tumorstanzen (13 myxopapillären Ependymomen, 51 Ependymomen WHO - Grad II und 15 anaplastischen Ependymomen) und 92 gliale Werte einbezogen werden.

42% der in die Bewertung eingegangenen glialen Gewebeproben wiesen eine *negative* Färbung auf. Demgegenüber standen 15% *negative* ependymale Gewebeproben. Das hieraus ermittelte Verhältnis positiver Stanzen glialer gegenüber ependymalen Tumoren beträgt 1:1,47 (58% : 85%). Der positiv gefärbte Anteil ependymaler Tumore war zu 18% *schwach*, zu 40% *kräftig* und zu 42% *stark* gefärbt. Der Anteil *starker* Färbungen ist in glialen Tumoren mit 5% deutlich geringer. Der Hauptanteil (36%) positiver glialer Stanzen wird *schwach* gefärbt. Die Sensitivität des Antikörpers in der Konzentration 1:8000 beträgt 85%, die Spezifität 42%. Im Vergleich mit der Gebrauchskonzentration von 1: 4000 ist die Spezifität um 12% gesunken, während die Sensitivität annähernd konstant ist.

Beim Vergleich der Grad III - Tumore überwiegt insgesamt der Anteil positiv gefärbter glialer Stanzen. Die Grad II - Tumore weisen eine annähernd gleiche Zahl positiver Gewebeproben auf (94%: 84%; Ependymome: gliale Tumore), wobei der Anteil *stark* gefärbter ependymaler Stanzen mit 39% denjenigen der glialen Tumore (11%) deutlich übersteigt. Die positiven glialen Tumore des WHO - Grad II werden zum größten Teil *schwach* (42%) gefärbt. Deutlicher sind die Ergebnisse beim Vergleich der Grad I - Tumore. Das Verhältnis positiver Färbungen der Gewebestanzten beträgt 1:1,77 (gliäl:ependymal). Während die glialen Tumore wenige *kräftige* (10%) und überwiegend

schwache (43%) Färbungsergebnisse erzielen, werden die myxopapillären Ependymome zu 54% *stark* positiv gefärbt. Der Antikörper besitzt somit in der hier verwendeten Konzentration eine ausgeprägte Affinität gegenüber Ependymomen des Grad I, wobei die Sensitivität 92% und die Spezifität 48% beträgt.

3.3.10.3. Gebrauchskonzentration anti- Sp17 (1:5000)

Im dritten Ansatz wurde die Verdünnung von 1:5000 auf den pH9 - vorbehandelten Tissue Array-Schnitten (EP-TA und AS-TA) untersucht.

In die histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbung (vgl. Diagramm 14) gingen 74 ependymale, unterteilt in 9 myxopapilläre, 15 anaplastische und 50 Grad II-Ependymome, sowie 104 gliale Medianwerte ein. Das Verhältnis positiver Färbungsergebnisse zwischen glialen und ependymalen Geweben beträgt 1:1,87 (84%:45%). Die glialen Stenzen wurden zu 36% *schwach*, zu 8% *kräftig* und zu 2% *stark* gefärbt. Das ependymale Tissue Array zeigte ein insgesamt intensiveres Färbungsmuster, wobei nur 20% der Stenzen *schwach* und 39% *kräftig* sowie 24% *stark* gefärbt wurden. Die Sensitivität des Antikörpers gegenüber den Ependymomen beträgt 84%. In dieser Gebrauchskonzentration des Antikörpers ergibt sich mit 55% die höchste Spezifität.

Beim Vergleich der Färbungsergebnisse hinsichtlich der WHO-Klassifikation zeigten sich nennenswerte Färbungsunterschiede zwischen astrozytären und ependymalen Grad-II-Tumoren (Diagramm 15). Das Verhältnis positiver Färbungen der auswertbaren Gewebeproben beträgt 1: 1,87 (glial:ependymal). Die Ependymome färben zu 92% positiv, davon 16% *schwach*, 48% *kräftig* und 28% *stark*. Die Gewebeproben des glialen Tissue Arrays zeigten mit 55% einen deutlich geringeren Anteil positiver Stenzen (45% *schwach*, 9% *kräftig*). Eine *starke* Färbung tritt hier nicht auf. Die Sensitivität des Antikörpers gegenüber WHO - Grad II-Ependymomen beträgt, wie in den zuvor untersuchten Antikörperkonzentrationen im Zuge der Bewertung einzelner WHO - Grade, 92%. Die Spezifität ist deutlich erhöht (55%).

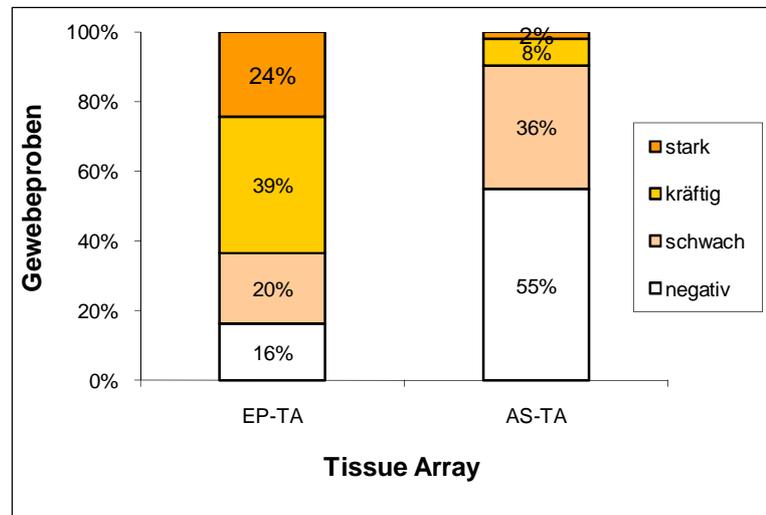


Diagramm 14: Färbungsergebnis des Antikörpers SpA17 (1:5000; pH9). Gegenüberstellung der Ergebnisse des ependymalen (EP-TA, n=79) und glialen (AS TA, n=90) Tumorgewebes der Tissue Arrays. Angabe der Anteile *negativer*, *schwacher*, *kräftiger* und *starker* Färbungsintensitäten in %.

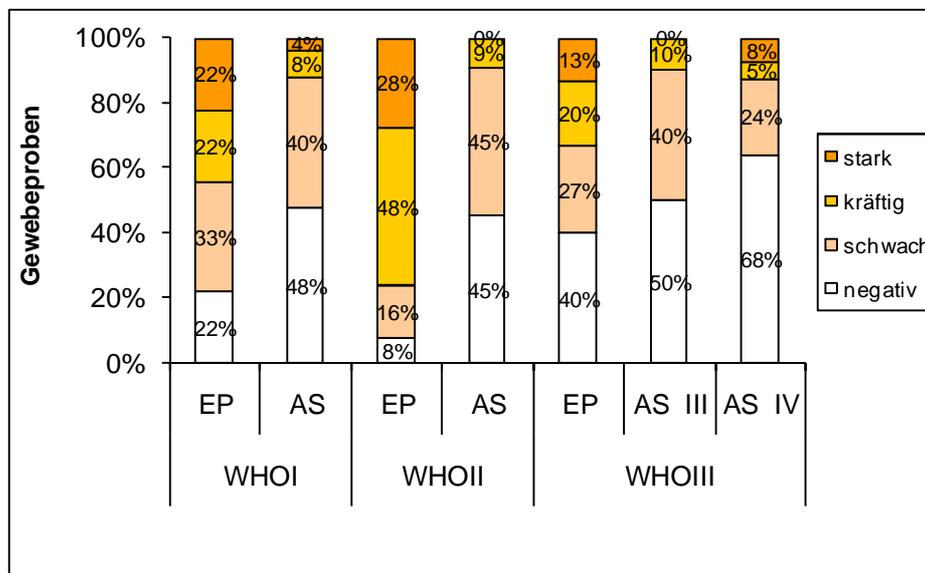


Diagramm 15: Gegenüberstellung der Färbungsintensität anti-SpA17 (1:5000; pH9) hinsichtlich der Malignitätsgrade des ependymalen (WHO I-III) und glialen (WHO-I-IV) Tissue Arrays. Bei einer Sensitivität von 92% besitzt der Antikörper die größte Spezifität (55%) gegenüber Grad II-Ependymomen.



A



B

Abbildung 26: Gegenüberstellung einer ependymalen und einer glialen Gewebestanze gefärbt durch anti-Spa17 (pH9; 1:5000); Vergrößerung 100-fach.

A) Abgebildet ist ein Ependymom (WHO - Grad II) mit einer *starken* Färbungsintensität der Tumorzellfortsätze. Zellkerne und Blutgefäße werden nicht gefärbt.

B) Abgebildet ist ein pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO - Grad II) mit einer *schwachen* Färbung der Tumorzellen.

Abbildung 26 (B) stellt eine Gewebestanze des glialen Tissue Arrays dar. Es handelt sich um ein pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO-Grad-II) und steht im direkten histologischen Vergleich zur Abbildung 26 (A) (Ependymom WHO – Grad II), da beide mit dem Spa17- Antikörper in der Gebrauchskonzentration 1: 5000 gefärbt wurden. Hier bestätigen sich die deutlichen Unterschiede der Färbungsintensität ependymaler und astrozytärer Tumore. Die Immunreaktivität des SPA17-Antikörpers auf dem Ependymom ist *stark* positiv (Färbungsintensität 3). Der gliale Tumor wird *schwach* gefärbt (Färbungsintensität 1).

Anti-Spa17 verzeichnete gegenüber den anaplastischen Tumoren (WHO-Grad III) vergleichbare Immunreaktivität, wobei die ependymalen im Gegensatz zu den glialen Grad-III-Tumoren auch *stark* positive Intensitäten beobachten ließen. Die myxopapillären Ependymome wurden in dieser Gebrauchskonzentration weniger kräftig angefärbt.

3.3.10.4. Gegenüberstellung der Versuchsansätze des anti Spa17

Diagramm 16 stellt die Werte für die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers gegenüber. Berücksichtigt werden hier die Färbungsergebnisse der ependymalen Tumore in den bisher angewendeten Gebrauchskonzentrationen.

Anti- Spa17 verzeichnete in jeder getesteten Konzentration eine deutlich erhöhte Sensitivität. Die höchste Spezifität ergab sich bei einer Gebrauchskonzentration von 1:5000 (55%). Daneben zeigt Spa17 auch unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad der Ependymome (Diagramm 17). Die Sensitivität gegenüber WHO – Grad II- bzw. Grad I-Ependymomen beträgt in den aufgeführten Gebrauchskonzentrationen konstant 92%. Die höchste Spezifität des Antikörpers ergibt sich in der erwähnten Gebrauchskonzentration (1:5000) gegenüber Grad II-Ependymomen (Spezifität=55%). Bei einer Verdünnung von 1:4000 stellte sich ebenfalls gegen Grad-II-Ependymome eine erhöhte Spezifität heraus. Die myxopapillären Ependymome verzeichnen im Vergleich zu anderen glialen Grad-I-Tumoren bei einer Gebrauchskonzentration von 1:8000 das kräftigste Färbungsmuster.

Insgesamt ergaben sich die deutlichsten Unterschiede der immunhistochemischen Reaktivität des Antikörpers Spa17 bei einer Gebrauchskonzentration von 1:5000, wobei die höchste Affinität des Antikörper an Grad-II-Ependymomen, bei gleichzeitig verminderter Immunreaktivität gegenüber anderen glialen Tumoren derselben WHO-Klassifikation, herausgearbeitet werden konnte. Die Spezifität des Antikörpers beträgt hier 55%. Unabhängig von der Gebrauchskonzentration zeigte sich im Falle der anaplastischen Tumore beider Tissue Arrays insgesamt nur mäßige Immunreaktivität des Spa17 Antikörpers ohne nennenswerte Spezifität und Sensitivität.

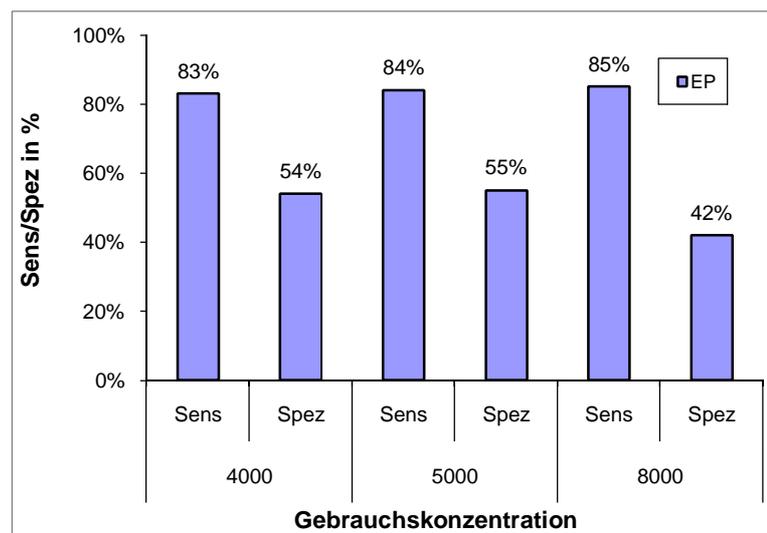


Diagramm 16: Sensitivität und Spezifität des Primärantikörpers Spa17 gegenüber ependymalen Tumoren (EP) unter Berücksichtigung unterschiedlicher Gebrauchskonzentrationen des Antikörpers (1:4000, 1:5000, 1:8000). Die höchste Spezifität ergibt sich bei einer Antikörperkonzentration von 1:5000. Die Sensitivität ist unabhängig von der Konzentration weitestgehend konstant.

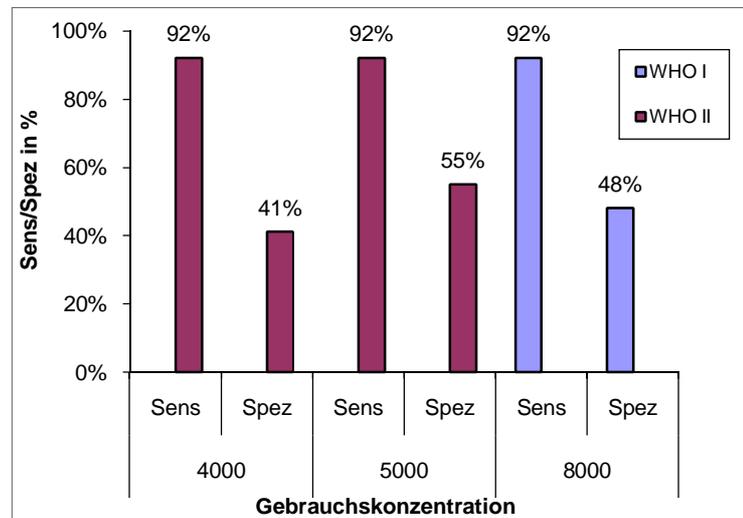


Diagramm 17: Sensitivität (Sens) und Spezifität (Spez) des primären Antikörpers Spa17 in Verschiedenen Gebrauchskonzentrationen (1:4000, 1:5000 und 1:8000) gegenüber ependymalen Tumoren (EP) der Tissue Arrays unter Berücksichtigung der Malignitätsgrade (WHO Grad I/II). Bei einer Konzentration von 1:4000 und 1:5000 ergibt sich hinsichtlich der Grad-II Ependymomen die höchste Spezifität. Bei einer Verdünnung von 1:8000 ist die Spezifität gegenüber myxopapillären Ependymomen erhöht. Die Sensitivität beträgt in jeder Konzentration bezüglich der genannten WHO - Grade 92%. Auch bei der Betrachtung einzelner histologischer Grade zeigt der Spa17 Antikörper seine höchste Spezifität bei einer Antikörperkonzentration von 1:5000.

3.4. Statistische Auswertung der anti - Spa17-Färbungsergebnisse

Die mittlere Färbungsintensität beträgt in Ependymomen 1,818 und in Astrozytomen 0,663. In ependymalen Tumoren ist die anti - Spa17-Färbung signifikant erhöht ($p \leq 0,001$).

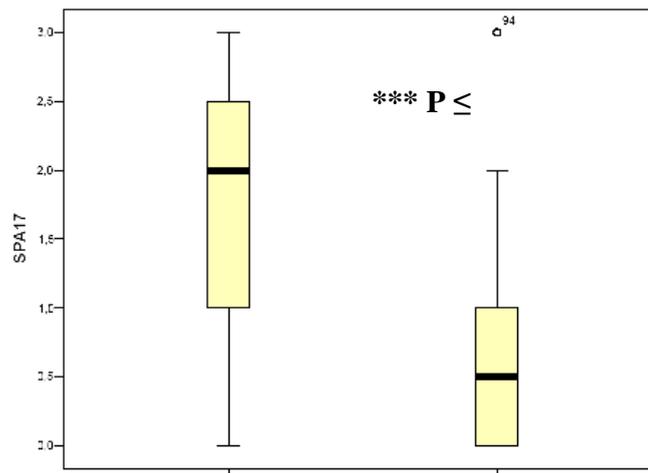


Abbildung 27: Boxplot-Diagramm der medianen anti - Spa17-Färbungsintensität.

Das Minimum der Färbungsintensität liegt bei 0, das Maximum bei 3,0. Der Medianwert ependymaler Tumore beträgt 2,0. Der Interquartilsbereich beträgt 1,6 ($SD \pm 1,002$). Die mediane Färbungsintensität astrozytärer Tumore beträgt 0,5 ($SD \pm 0,7322$). Die mediane Färbungsintensität ependymaler Tumoren ist signifikant erhöht ($P \leq 0,001$).

Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
SPA17 ependymale Tumoren	74	121.53	8993.50
astrozytäre Tumoren	104	66.71	6937.50
Gesamt	178		

Statistik für Test^a

	SPA17
Mann-Whitney-U	1477,500
Wilcoxon-W	6937,500
Z	-7,169
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: Gruppe

Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test

3.5. Zusammenfassung der Färbungsergebnisse

Insgesamt ergab sich bei allen auf dem Gewebe der Tissue Arrays untersuchten Antikörpern eine positive Immunreaktivität. Die größte Differenz positiver Färbungsereignisse zwischen Ependymomen (EP-TA) und astrozytären Tumoren (AS-TA) ließ sich im Fall des anti-Spa17 festhalten. Das Verhältnis positiver Färbungen ependymaler zu glialen Tumoren beträgt 84% : 45%. Alle übrigen auf den beiden Tissue Arrays getesteten Antikörper zeigen nur mäßige Unterschiede im Färbungsmuster. Die Anteile positiver Stenzen sind hierbei auf beiden Tissue Arrays annähernd gleich hoch.

Diagramm 18 fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der auf den Tissue Arrays untersuchten Antikörper, einschließlich der etablierten Antikörper (EMA, GFAP und S100), hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität für Ependymome zusammen.

Die Antikörper gegen SPAG6, FATP6, GalNac, hOPG und Annexin verzeichneten zwar eine erhöhte Sensitivität gegenüber ependymalen Tumoren (vgl. Tabelle 9), ihre Spezifität ist jedoch gering. Für die Antikörper GFAP, FATP6, Annexin, hOPG (1:250), SPAG6 und Spa17 ergab sich jeweils eine über 50%ige Sensitivität. Im Fall des anti-hOPG (1:100) und des anti- GalNac konnte sogar eine 100%ige Sensitivität verzeichnet werden. Ihre Spezifität lag jedoch nur bei 1%. EMA und S100 waren zwar weniger sensitiv, wiesen allerdings erhöhte Spezifität auf (EMA 80%; S100 53%).

Ausschließlich anti-Spa17 zeigte sowohl im Bezug auf die Spezifität als auch auf die Sensitivität erhöhte Werte (Sensitivität (84%), Spezifität (55%)). Er liefert sogar eine signifikant erhöhte mittlere Färbungsintensität bezüglich ependymalen Tumoren.

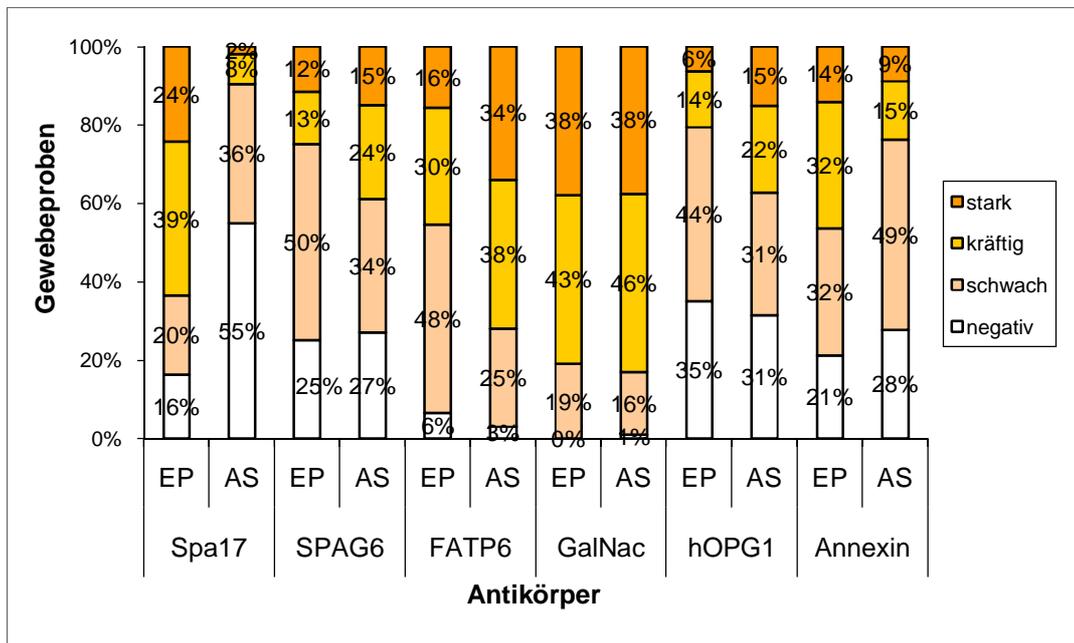


Diagramm 18: Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse (negativ, schwach, kräftig und stark) aller Antikörper in der jeweiligen Gebrauchskonzentration, die auf den Tissue Arrays zur Anwendung kamen, unter Berücksichtigung ependymaler (EP) und glialer (AS) Gewebe; Spa17 (1:5000), SPAG6 (1:100), FATP6 (1:200), GalNac (1:2000), hOPG1 (1.250), Annexin (1:200). Der deutlichste Färbungsunterschied stellt sich bei anti-Spa17 heraus. Die glialen Tumore werden nur zu 45% positiv gefärbt. Die ependymalen Tumore hingegen verzeichnen zu 84% positive Farbsignale. Annähernd kein Unterschied besteht bei der Färbung mit anti-GalNac. Ependymome werden zu 100%, gliale Tumore zu 99% positiv gefärbt.

Primärer Antikörper (Arbeitskonzentration)	Sensitivität	Spezifität
EMA (1:200)	36%	80%
GFAP (1:4000)	79%	14%
S100 (1:12000)	44%	53%
1. hOPG (1:100)	100%	1%
2. hOPG (1:250)	65%	32%
Annexin (1:200)	79%	28%
FATP6 (1:200)	94%	3%
GalNac (1:2000)	100%	1%
SPAG6 (1:100)	75%	27%
Spa17 (1:5000)	84%	55%

Tabelle 9: Spezifität und Sensitivität derjenigen auf den Tissue Arrays getesteten Antikörper. Angaben ihrer Gebrauchskonzentration (...). Angaben der Spezifität und Sensitivität in %.

Anti-EMA weist die höchste Spezifität gegenüber ependymalen Tumoren auf (80%). Seine Sensitivität ist jedoch gering (36%). Dem gegenüber steht anti-Spa17, der die zweithöchste Spezifität (55%) und gleichzeitig eine deutlich erhöhte Sensitivität (84%) vorweist. Die Antikörper mit einer Sensitivität von 100% (GalNac, hOPG) weisen allerdings nur 1% Spezifität auf.

4. DISKUSSION

4.1. Klinische Daten

Charakteristische Daten der dieser Studie zugrunde gelegten Ependymome entsprechen weitestgehend den Ergebnissen anderer klinischer Studien, die das Auftreten dieser Tumore in einem Alterszeitraum von 1 - 81 Jahren bestätigen (*Fokes et al., 1969; Kricheff et al., 1964; Zülch, 1986*). Desweiteren bekräftigt die Literatur einen Altersgipfel für infratentorielle Ependymome im 1. Lebensjahrzehnt (*Kudo et al., 1990*). Im fortgeschrittenen Lebensalter (>10 Jahre) ist der Anteil spinal lokalisierter Tumore der untersuchten Patientenfälle mit 78 % dominierend, entgegen der Ergebnisse einer Studie von *Prayson (1999)*, die ebenso viele Ependymome im IV. Ventrikel beschreibt. Der Altersgipfel spinal lokalisierter Ependymome, der in der zugrunde liegenden Studie im 5. Lebensjahrzehnt auftritt, findet sich in anderen Studien zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (*Wiestler et al., 2000*). Spinale und infratentorielle Ependymome werden in dieser Studie häufiger repräsentiert als supratentorielle. *Schiffer et al. (1991)* bestätigen dieses Ergebnis.

Die myxopapillären Ependymome, die in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich spinal lokalisiert sind, wurden entsprechend der Literatur (*Sonneland et al., 1985*), überwiegend im Bereich des *Filum Terminale* und in der *Cauda equina* – Region beobachtet. Das mittlere Alter von 36,4 Jahren (*Wiestler et al., 2000*), entspricht in etwa dem Ergebniss dieser Studie (39,8 Jahre).

Auch die klinischen Daten der untersuchten anaplastischen Ependymome stimmen weitestgehend mit denen in der Literatur beschriebenen Angaben überein, indem ein Fehlen spinaler Lokalisation beschrieben wird (*Paulus et al., 2000*). Der Altersgipfel manifestiert sich zwischen 0 und 10 Jahren, wobei hier der Anteil derjenigen Tumore dominiert, die in der posterioren Fossa lokalisiert sind (*Wiestler et al., 2000*).

Ependymale Tumore treten, bezogen auf das Geschlecht, annähernd gleich häufig auf. Es ergibt sich ein Verhältnis männlicher zu weiblicher Erkrankungsfälle von 1,3: 1 (*Farwell et al., 1977*), was von demjenigen dieser Studie nur leicht abweicht (1,7: 1).

Insgesamt entsprechen die klinischen Angaben des in dieser Studie verwendeten ependymalen Gewebematerials hinsichtlich der Inzidenz, Lokalisation sowie Alters- und Geschlechtsverteilung weitestgehend den Ergebnissen der Literatur und können somit in Hinblick auf diagnostische Zwecke als repräsentativ angesehen werden.

4.2. Kritische Bewertung von Material und Methoden

In dieser Studie wurden Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische Marker gegenüber neoplastischem ependyalem Geweben im Vergleich zu anderen glialen Tumoren untersucht.

In einer vorangegangenen Studie sind Gene identifiziert worden, deren Proteinprodukte im Ependym im Vergleich zu Hippokampusgewebe überexprimiert waren. In diesem Zusammenhang ist postuliert worden, dass diese Gene möglicherweise auch in ependyalem Tumorgewebe aufreguliert sein könnten. Inwieweit diese Hypothese belegt beziehungsweise durch potentielle methodische Probleme beeinflusst wird, soll hier erörtert werden. Um die möglichen Ursachen für die relativ niedrige Spezifität der untersuchten Antikörper aufzudecken, bedarf es einer Darstellung derjenigen methodischen Problematik, die dieser experimentellen Arbeit zu Grunde liegen könnte. Zu berücksichtigen ist hierbei die Auswahl der Antikörper, das verwendete Screening-Verfahren, die Heterogenität des ausgewählten neoplastischen Gewebematerials sowie die Zusammenhänge zwischen der vorangegangenen cDNA- und der nachgeschalteten MTA-Methodik.

4.2.1. Färbungsergebnisse der Antikörper

Entgegen den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchung, in der unter anderem die Gene Kir5.1, Glut10, CD36 und RGS1 als im Ependym hochreguliert dargestellt wurden, zeigten deren Antikörper keine Immunreaktivität gegenüber dem normalen Ependym. Diese

Tatsache ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Aktivität der verwendeten Antikörper auf humanem und paraffingebettetem Gewebe nur eingeschränkt möglich oder zuvor durch den Hersteller nicht erprobt war. Dies bedeutet, dass die Antikörperauswahl Einfluss auf die negativen Färbungsergebnisse genommen hat.

Hingegen zeigt sich im Falle der Antikörper SPAG6, FATP6, hOPG, Annexin, GalNac sowohl gegenüber dem Ependym, als auch den Ependymomen, eine positive Immunreaktivität. Jedoch unterscheiden sich die Färbungsergebnisse der Antikörper gegenüber den Ependymomen nur mäßig von denen anderer glialer Tumore. So kann festgehalten werden, dass die genannten Antikörper positive Immunreaktivität auf paraffingebetteten Gewebeschnitten verzeichnen. Jedoch wird die Hypothese, solche Antikörper zu identifizieren, die eine hohe Spezifität gegenüber ependymalen Tumoren aufweisen, nicht ausreichend belegt.

4.2.2. Screening-Verfahren

Die Herstellung von Tissue Arrays aus einer hohen Anzahl unterschiedlicher Tumore stellt einerseits ein selektives Hochdurchsatzverfahren zur Expressionsanalyse dar (*Kononen et al., 1998*). Allerdings handelt es sich hierbei um ein Screening-Verfahren, wobei jedem Tumor nur eine sehr kleine zylindrische Gewebeprobe entnommen wird und entsprechende Fehlerquellen zu berücksichtigen sind. Hierzu zählen möglicher Weise eine mangelnde Menge an auswertbarem antigenem Material und die zu diskutierende Funktionalität der Antikörper auf den TA.

In diesem Zusammenhang gilt es zunächst zu diskutieren, ob die TA - Methode ausreichend auswertbare Gewebeeinformationen liefert, um repräsentative Aussagen über die Spezifität und Sensitivität der evaluierten Antikörper gegenüber heterogenen Tumoren treffen zu können. Auf der einen Seite liefern die Gewebestanden, die auf den Tissue Arrays vereinigt wurden, individuell selektiertes Gewebematerial, da vor jeder Gewebeentnahme aus dem Spenderblock eine histologische Vorauswahl des entsprechenden Gewebeschnittes erfolgte. Das Gewebematerial der Stanzenduplikate sollte tumorzellreiche Areale repräsentieren, so dass für die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse ein möglichst großer Anteil

von antigenem Material zu Grunde lag. In Einzelfällen wurde nekrotisches und somit nicht-auswertbares Tumorgewebe erfasst. Ein Lösungsansatz dieser Fehlerquelle wäre es, mehr als zwei Stenzen eines jeden Gewebeblockes auf den Tissue Arrays zu vereinen, wodurch die Wahrscheinlichkeit, auswertbares Tumorgewebe zu erfassen, deutlich erhöht werden könnte.

Weiterhin problematisch einzuschätzen ist, dass zwar selektierte, aber dennoch nur sehr kleine Gewebeabschnitte (Durchmesser 0,6 mm) jedes Tumors zur Verfügung stehen. Das kann dazu führen, dass durch das Schneiden der Array-Paraffinblöcke einige Stenzen gar nicht oder nur unvollständig erfasst wurden, welche dann nicht ausreichend Material für die histologische Auswertung der Immunreaktivität einzelner Antikörper lieferten. Insgesamt spielt jedoch dieser Aspekt während der Erörterung potentieller Fehlerquellen für unsere immunhistochemischen Ergebnisse nur eine untergeordnete Rolle, da ausreichend Material für die histologische Auswertung zur Verfügung stand und der Hauptanteil der Stenzen vollständig erfasst wurde.

Im Zusammenhang mit dem Sampling-Problem muss allerdings die Funktionalität der Tissue Arrays diskutiert werden, wobei es zu klären gilt, ob sie als Grundlage für die immunhistochemischen Untersuchungen geeignet sind. Anhand der im Rahmen dieser Studie erzielten Färbungsergebnisse für die schon etablierten Marker ependymaler Differenzierung, von denen man weiß, dass sie positive Immunreaktivität gegenüber ependymalen Tumoren zeigen, soll diese Überlegung erörtert werden (vgl. Diagramm 6). Die in dieser Studie verwendeten bekannten Marker, das epitheliale Membranantigen (EMA), das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) und das S100 Protein, sind sowohl auf normalem (*Bruni et al., 1998; Sarnat HB, 1998; Song et al., 2005*) als auch neoplastischem ependymalem Gewebe untersucht worden (*Uematsu et al., 1989; Vege et al., 2000*). In Anlehnung an bekannte charakteristische histologische Merkmale ependymaler Tumore, wie den „echten“ bzw. perivaskulären Pseudorosetten und den intrazytoplasmatischen eosinophilen Mikrolumen (*Hasselblatt et al., 2003; Kawano et al., 2000*), wird den genannten Antikörpern unterschiedlichste Immunreaktivität gegenüber ependymalem Tumorgewebe zugeschrieben. *Vege et al., (2000)* arbeiteten an 52 Ependymomen

unterschiedlicher WHO-Grade eine 100%ige GFAP- und S100-Protein-Färbung heraus. Eine positive EMA-Färbung konnte in 36% der Fälle festgehalten werden. Dieses Ergebnis entspricht demjenigen Anteil EMA-positiv gefärbter Stenzen der ependymalen Tissue Arrays dieser Studie. Das Ergebnis bezüglich der GFAP-Färbung zeigt nach *Vege et al.* (100%) leichte Abweichungen zu diesem Studienergebnis (79%), lässt aber eine deutliche Tendenz hinsichtlich einer sensitiven Immunreaktivität festhalten.

Auch in der Literatur bestehen unterschiedlichste Ergebnisse bezüglich der Reaktivität der erwähnten etablierten Antikörper, so dass die in dieser Studie zu 21% negative GFAP-Färbung nicht zwingend darauf zurück zu führen ist, dass das Tumormaterial der Tissue Arrays eine ungeeignete Grundlage für die immunhistochemischen Verfahren bietet. *Kaneko et al.* (1990) ermittelten zum Beispiel in ihrer Studie, dass 19 von 23 (82%) der untersuchten Ependymome eine GFAP-positive-Reaktion und nur in 3 von 23 (13%) Fällen eine positive EMA-Färbung aufweisen. Die positiven Färbungsergebnisse der vorliegenden Studie sind im Falle des GFAP-Antikörpers vergleichbar hoch (79% positiv). Anti-EMA zeigt sogar eine deutlich höhere Immunreaktivität (36%) (vgl. Tabelle 6).

Eine weitere ultrastrukturelle Eigenschaft ependymaler Tumore, die intrazytoplasmatischen Mikrolumina, beschrieben durch *Ho et al.* (1994), konnte auch in dieser Studie durch ring- und punktförmige EMA-Färbemuster (*Hasselblatt et al.*, 2003) auf dem ependymalen TA bestätigt werden. Ihre Präsenz kennzeichnet eine epitheliale Differenzierung der Tumorzellen (*Kawano et al.*, 2000) und liefert einen diagnostischen Aussagewert, der folglich auch durch den Gebrauch immunhistochemischer Färbemethoden auf den Tissue Arrays belegt werden kann. Da letztlich die Färbungsergebnisse der etablierten Marker mit solchen in der Literatur geschilderten Werten weitestgehend übereinstimmen, kann die Funktionalität der Tissue Arrays allgemein angenommen werden.

Ein möglicher Versuchsansatz zur Bestätigung der Färbungsergebnisse der im Rahmen dieser Studie evaluierten Antikörper, wäre die Testung ihrer Funktionalität auf den vollständigen Gewebeschnitten des entsprechenden Tumormaterials. *Milanes-Yearsley et al.* (2001) stellen heraus, dass die TA-Methodik zwar nennenswerte Vorteile, wie Kosten-, Zeit und Gewebersparnis mit sich bringt, dass aber beim Vergleich der Antikörperreaktivität

auf ganzen Schnitten, vor allem während der Untersuchung von Markern mit einer hoch lokalisierten Spezifität innerhalb des Tumors, die Nutzung vollständiger Schnitte vorzuziehen ist. Generell ist die Anwendung der Tissue Arrays besonders durch die Möglichkeit, mehrere Gewebestanzungen eines Tumors aus verschiedenen Regionen des Spenderblocks entnehmen zu können, diagnostisch relevant. Es ist zu betonen, dass der Gebrauch der Tissue Microarray – Methodik im Zuge der Evaluierung diagnostischer Marker in anderen Studien erfolgreich etabliert werden konnte (*Ikato et al., 2006*). Es gilt folglich zu klären, welche Faktoren die Immunreaktivität der Antikörper potentiell beeinflussen, wenn nicht die Antikörper selber oder das Sampling das methodische Problem darstellen.

4.2.3. Heterogenität ependymaler Tumore

Entgegen der formulierten Hochexpression entsprechender Gene im Ependym gegenüber dem Kortex (*Hasselblatt et al., 2005*), konnten im Rahmen dieser Studie vergleichbare Expressionsunterschiede zwischen Ependymomen und anderen glialen Tumoren weniger deutlich dargestellt werden.

Zwar zeigen die Ergebnisse der Immunreaktivität auf den Tissue Arrays eine erhöhte Sensitivität der Antikörper gegenüber Ependymomen (siehe Tabelle 9), allerdings unterscheiden sich die Färbungsergebnisse auf den Ependymomen nur mäßig von denen anderer glialer Tumore. Eine mögliche Ursache für die ähnliche Reaktivität der Antikörper gegenüber ependymalen und astrozytären Tumoren ist, dass gliale Tumore häufig von heterogenem Ursprung sind (*Hirano et al., 1975*). Diese Tatsache würde die positiven Färbungsergebnisse der glialen Tumore, unter der Annahme, dass sie ependymale Anteile besäßen, erklären.

Expliziert wird diese Hypothese beim Vergleich der Ergebnisse dieser Studie, für den als sensitiv und spezifisch anerkannten Marker epithelialer Differenzierungsvorgänge (EMA), mit einer Serie, in der 54 Ependymome und 118 weitere gliale Tumore untersucht wurden (*Hasselblatt et al., 2003*). In der genannten Arbeit konnte eine Sensitivität für eine punktförmige EMA-Färbung von 72% herausgearbeitet werden. Die Färbungsergebnisse in

ependymalen Tumoren waren signifikant höher als in anderen glialen Tumoren. Die Sensitivität des EMA-Antikörpers ist deutlich höher (72%) als in der vorliegenden Studie, die eine Sensitivität von 36% gegenüber ependymalen Tumoren vorweist (vgl. Tabelle 9). Diese Variabilität der Ergebnisse für den diagnostischen Wert des Antikörpers gegen das epitheliale membranantigen in Ependymomen ist möglicherweise auf die Heterogenität des ausgewählten Tumormaterials zurückzuführen.

4.2.4. Ursachen mangelnder Spezifität

Anti-GalNac und anti-hOPG besitzen eine Sensitivität von 100%. Wie bei den übrigen verwendeten Antikörpern, ist ihre Spezifität allerdings deutlich reduziert (vgl. Tabelle 9). Die Problematik der immunhistochemischen Ergebnisse liegt also vor allem darin, dass zwar positive Färbungsergebnisse der Antikörper verzeichnet werden können, sich jedoch nur mäßige Unterschiede in der Immunreaktivität gegenüber anderen glialen Tumoren zeigen. Es gilt somit zu klären, warum neben den Ependymomen auch astrozytäre Tumore, unter Vernachlässigung ihrer Heterogenität, positiv auf die evaluierten Antikörper reagieren.

Diese Studie ist eine Kombinationsarbeit aus der Microtissue- Array (MTA)- und cDNA-Microarray- Methodik. Hierbei lehnt sie sich in der Auswahl zugrunde gelegter Antikörper an die Ergebnisse über eine mehr als 10- fach hochregulierte Expression entsprechender Antigene im Ependym gegenüber dem Hippokampus. Die Problematik liegt hier möglicherweise auch in der fraglichen Übertragbarkeit der nicht weiter mit RT-PCR validierten cDNA-Microarray-Daten (*Hasselblatt et al., 2005*) auf die in dieser Studie untersuchte Methodik.

Insgesamt ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse dieser Studie, bei der auf der Ebene der Proteinexpression gearbeitet wurde, nicht unbedingt mit den Ergebnissen der Genexpression zu vergleichen sind. Mögliche Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression können variable Ergebnisse hinsichtlich immunologischer Färbungsmuster erzeugen, wenn die Heterogenität des neuroepithelialen Tumorgewebes missachtet wird, oder es entstehen die genannten differierenden Angaben über die Sensitivität der Antikörper (*Grizzi et al., 2006; Lim et al., 2002*).

Generell hat sich diese Kombination aus einer vorangehenden Genanalyse und anschließenden Evaluierung signifikanter diagnostischer Marker auf Proteinebene bewährt (*Moch et al., 1999*). Allerdings wurde in der genannten Studie während der cDNA- Analyse die Genexpression von pathologisch unauffälligem mit dem entsprechenden neoplastischen Gewebe verglichen. Schon im Zuge der Genanalyse wurde dort das Expressionsmuster der Tumore berücksichtigt und entsprechende Marker auf den Tissue Arrays des neoplastischen Materials untersucht.

Im Rahmen dieser Studie wurden während der cDNA – Microarray - Analyse die Expressionsdaten für nicht - neoplastisches Gewebe des Ependyms und des Hippokampus verglichen. Die MTA – Analyse auf Proteinebene wurde hingegen auf neoplastischem Gewebe durchgeführt, ohne dass Informationen über die Genexpression der Tumore vorlagen. Zwar konnten zuvor in einer ähnlich aufgebauten Untersuchung beim Vergleich des Plexus Choroideus mit dem Ependym auf der Grundlage einer cDNA – Mikroarray - Analyse erfolgreich diagnostische Marker für Plexuspapillome identifiziert werden (*Hasselblatt et al., 2006*), allerdings gilt es, den Vergleich der Proteinexpressionsmuster von normalem und neoplastischem ependymalem Gewebe kritisch zu beurteilen.

Die vorliegende Methodik zielt also darauf ab, die im Rahmen der cDNA- Microarray- Analyse erhaltene Genexpression des Ependyms auf diejenige der Ependymome zu übertragen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass ein entwicklungsbedingter Zusammenhang zwischen dem Ependym und dem ependymalen Tumorgewebe besteht.

Von der Entstehungsursache ependymaler Tumorzellen wird angenommen, dass sie ihren Ursprung von radialen glialen Zellen des entsprechenden Ursprungsgewebes nehmen (*Taylor et al., 2005*). Belegt wird dies durch die Übereinstimmung der normalen und neoplastischen ependymalen Zellen hinsichtlich spezifischer histologischer Merkmale (*Friede et al., 1978*). Hierbei wird insbesondere der tanzytische Zelltyp des Ependyms mit der Histologie von Ependymomen in Verbindung gebracht (*Guccion et al., 1991*).

Charakteristisch ist die Neigung der Ependymzellen wie auch der ependymalen Tumorzellen zur Oberflächenbildung. Zudem zeigen sich Übereinstimmungen in der Immunreaktivität

gegen GFAP und das S100-Protein. Während sich jedoch die Expression dieser intermediären Filamente im Ependym auf die fetale und unmittelbar postnatale Periode beschränkt (*Sarnat HB, 1998; Bruni JE, 1998*), werden GFAP und das S100-Protein in Ependymomen auch postnatal in histologischen Merkmalen wie den perivaskulären Pseudorosetten bzw. den „echten“ Rosetten entdeckt (*Vege et al., 2000*).

Es stellt sich heraus, dass immunhistochemische Zusammenhänge zwischen Ependym und Ependymomen bestehen. Diese Erkenntnisse werden im Rahmen dieser Studie auf der einen Seite dadurch gestützt, dass neben der Hochregulation entsprechender Gene im Ependym auch die Sensitivität der Antikörper Annexin, hOPG, GalNac, FATP6, SPAG6 und Spa17 in ependymalen Tumoren erhöht ist. Andererseits besteht die Tatsache, dass die im Ansatz als spezifisch gegen das Ependym interpretierten Antikörper eine unerwartet niedrige Spezifität für die Ependymome zeigten, da auch astrozytäre Tumore erhöhte Werte positiver Färbungen verzeichneten. In der cDNA – Mikroarray - Analyse bleibt folglich das Expressionsmuster der untersuchten glialen Tumore unberücksichtigt. Sie trifft keine Aussage darüber, ob die Antigene möglicherweise auch in astrozytären Tumoren hochreguliert sind, sondern zeigt lediglich, dass die Gene im Hippokampus gegenüber dem Ependym herabreguliert sind. Da es sich beim Hippokampus und astrozytären Tumoren jedoch um unterschiedliche Zelltypen handelt, kann das Expressionsmuster des Hippokampus nicht ohne weiteres auf die Genexpression dieser glialen Tumore übertragen werden.

Ein weiterer problematischer Ansatz im Zuge der vorangegangenen cDNA – Mikroarray - Methodik stellt die unterschiedliche Aufarbeitung des Ependyms und des Hippokampus dar. Hier wurde laser - disseziertes Ependym mit nicht – laser – disseziertem Hippokampus verglichen. Möglicherweise nimmt die unterschiedliche Aufarbeitung Einfluss auf die Ergebnisse der ermittelten Genexpressionen. Dies würde auch den Ansatz unserer Untersuchungen beeinflussen, da die Antikörperauswahl direkt an die Ergebnisse der Genexpression im Ependym gekoppelt war. In diesem Zusammenhang müsste geklärt werden, ob sich auch nach identischer Gewebeaufarbeitung die 10 – fache Hochregulation der genannten Antigene im Ependym gegenüber dem Hippokampus bestätigen würde.

4.3. Spa17-Antikörper als potentieller diagnostischer Marker ependymaler Tumore

Signifikante immunhistochemische Färbungsergebnisse ependymaler gegenüber astrozytären Tumoren ergeben sich für den Antikörper gegen das spermienassoziierte Antigen (Spa17). Die im Rahmen dieser Studie erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Immunreaktivität des Antikörpers, ergänzen die von *Grizzi et al. (2006)* beobachteten Spa17-Expression in Tumoren des zentralen Nervensystems durch die positiven Färbungsergebnisse auch im nicht - neoplastischen Hirngewebe (vgl. Abbildung 25). In der Untersuchung von 28 neuroektodermalen Tumoren auf ihre Spa17-Expression wurde in die genannte Arbeit neben 6 Astrozytomen, 16 Glioblastomen und 5 Oligodendrogliomen nur ein ependymaler Tumor einbezogen. Eine Aussage über die Spezifität und Sensitivität des anti - Spa17 gegenüber Ependymomen wurde nicht getroffen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass neben den ependymalen Tumoren vor allem die untersuchten Astrozytome Spa17 – positiv färbten.

Die vorliegende Studie ergänzt die genannten Ergebnisse der Literatur einerseits durch die positive Spa17 - Expression auf nicht-pathologischem Hirngewebe, andererseits durch die Angaben über eine deutlich erhöhte Sensitivität (84%) gegenüber ependyalem Tumorgewebe bei gleichzeitig schwächerer Färbung anderer glialer Tumore (Spezifität 55%).

Bisher wurde die Spa17 - Expression sowohl in nicht-pathologischen Geweben wie dem Respirationstrakt, dem Reproduktionssystem (*Grizzi et al., 2004*), sowie dem menschlichen Hoden und den Spermatozoen (*Grizzi et al., 2003*) als ziliengebunden beschrieben. Daneben wurde seine Funktion als Cancer-Testis- Antigen (CT) in Myelomen (*Lim et al., 2001*) und als mögliches immunotherapeutisches Target in Karzinomen der Ovarien (*Chiriva- Internati et al., 2002*) dargestellt. Allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Studie und der Literatur (*Grizzi et al., 2006*) gezeigt werden, dass Spa17 in Ependymomen und auch in anderen glialen Tumoren, die keine Zilien besitzen, expremiert wird. In diesem Zusammenhang muss deutlich betont werden, dass es sich lediglich um ein spermien -

assoziiertes Antigen handelt. Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass auch nicht-zellbesetzte Zellen das Spa17 - Antigen exprimieren. Somit muss seine Funktion als spezifischer ependymaler Marker in Frage gestellt werden.

Um dennoch eine Aussage über die Rolle dieses Antikörpers in der Diagnostik ependymaler Tumore treffen zu können, kann das in der Literatur beschriebene Ergebnis über die Sensitivität und Spezifität des bisher als diagnostischen Marker etablierten Antikörpers gegen EMA zum Vergleich herangezogen werden. In der Studie von *Hasselblatt et al. (2003)* ergab sich für eine punktförmige EMA-Färbung eine Sensitivität von 72% und eine Spezifität von 81%. Die im Rahmen der vorliegenden Studie bestimmte Sensitivität von anti-Spa17 ist zwar mit 84% durchaus vergleichbar, die Spezifität jedoch mit 55% deutlich geringer. Somit ergibt die vorliegende Untersuchung, trotz des Nachweises einer signifikanten Überexpression von Spa17 in Ependymomen, keine Überlegenheit der Spa17-Färbung gegenüber der bereits etablierten EMA-Färbung für den Einsatz als diagnostischen Marker. Gleichwohl kann dieses Ergebnis als Grundlage weiterer Untersuchungen zur Verifizierung der Rolle des Spa17 in glialen Tumoren dienen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ependymome sind Tumore des zentralen Nervensystems, die charakteristische histologische Ähnlichkeiten mit den, die Hirnventrikel auskleidenden Ependymzellen, besitzen. Auch immunhistochemische Ansätze zur Diagnostik ependymaler Tumore haben sich in der Pathologie bewährt. So sind diagnostische Marker epithelialer Differenzierung, wie das epitheliale Membranantigen (EMA), das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) und S100, bekannt. Neben diesen zwar hilfreichen aber weitestgehend unspezifischen Antikörpern, beschäftigt sich diese Studie mit der Untersuchung ausgewählter Antikörper auf ihre Spezifität und Sensitivität, um ihre Eignung für die Diagnostik ependymaler Tumore zu verifizieren.

In einer vorangegangenen Untersuchung sind auf Genebene Antigene identifiziert worden, deren Expression im Vergleich zum Hippokampus mehr als 10-fach aufreguliert war. Diese Untersuchung stellte die Grundlage zur Auswahl der für diese Studie relevanten Antikörper. Aus einer Gruppe von 96 hochregulierten Antigenen standen letztlich die Antikörper RGS1, GLUT10, GalNac, FATP6, CD36, Kir5.1, SPAG6, hOPG, Annexin und Spa17 zur Verfügung. Die Anwendung dieser Antikörper auf dem ependymalen Tumorgewebe setzte voraus, dass ihre Immunreaktivität gegen das Ependym auch auf neoplastischem ependymalem Gewebe übertragen werden konnte.

Die Spezifität der Antikörper stellt das entscheidende Werkzeug zur Beurteilung der Wertigkeit eines Antikörpers als diagnostischen Marker dar. Sie ergibt sich durch den Vergleich der Färbungsergebnisse ependymaler Tumore mit denen anderer glialer Tumore. Der zentrale methodische Ansatz dieser Studie basiert auf der Herstellung zweier Tissue Arrays, die das Gewebematerial einerseits von 90 Patientenfällen ependymaler und andererseits 133 Fällen weiterer glialer Tumore vereinen. Durch dieses Sampling kann jeder zur Verfügung stehende Antikörper auf einer Vielzahl von Gewebeproben hinsichtlich seiner Immunreaktivität untersucht werden.

Die Funktionalität der Tissue Arrays wurde durch die Anwendung der in der Diagnostik ependymaler Tumore schon etablierten Marker EMA, GFAP und S100 überprüft. Es wurden diejenigen Antikörper auf den Tissue Arrays verglichen, die zuvor auch auf normalem Hirngewebe (Ependym, Kortex und Plexus Choroideus) positive Immunreaktivität zeigten.

Im Falle der Antikörper Kir5.1, Glut10, RGS1 und CD36 ergab sich kein positives Färbungssignal. Die übrigen sechs Antikörper (GalNac, FATP6, SPAG6, hOPG, Annexin, SPA17) zeigten eine hohe Sensitivität gegenüber dem Ependym, so dass sie Anwendung auf den Tissue Arrays fanden. Die Sensitivität der Antikörper GalNac, FATP6, SPAG6, hOPG und Annexin auf dem ependymalen Tissue Array war zwar deutlich erhöht, jedoch war ihre Immunreaktivität auch in anderen glialen Tumoren hoch, so dass sich keine gute Spezifität für die Diagnose von Ependymomen ergab. Signifikante Ergebnisse zeigte ausschließlich der Antikörper gegen das spermienassoziierte Antigen17, der eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 55% aufwies.

Dieses Ergebnis hebt Spa17 als potentiellen diagnostischen Marker ependymaler Tumore im direkten Vergleich mit den übrigen untersuchten Antikörpern hervor. Da er jedoch eine geringere Spezifität als das epitheliale Membranantigen (EMA) zeigt, bringt er als Marker epithelialer Tumore keinen diagnostischen Vorteil. Gleichwohl kann das Ergebnis einer erhöhten Sensitivität an zilienbesetzten Tumorzellen des Ependyms als Grundlage dienen, die Rolle des Spa17-Antikörpers in glialen Tumoren zu verifizieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agaoglu FY, Ayan I, Dizdar Y, Kebudi R, Gorgun O, Darendeliler E (2005) Ependymal tumors in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 45 (3): 298-303
2. Ang LC, Taylor AR, Bergin D, Kaufmann JC (1990) An immunohistochemical study of papillary tumors in the central nervous system. *Cancer*. 65 (12): 2712-9
3. Bailey P, Cushing H (1926) Classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis; Lippincott, Philadelphia.
4. Boenisch T (2003) Färbemethoden- Detektionssysteme. In: Boenisch T (Hrsg.) *Immunchemische Färbungsmethoden*. Copyright 2003 DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA und DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland; S. 36-37
5. Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation and functions: A review. *Microsc Res Tech*. Apr 1; 41 (1): 2-13
6. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS (2002) *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. Churchill Livingstone, New York
7. Butler JK (1979) Methods for improved light microscope microtomy. *Stain Technol*. Mar; 54 (2): 53-69
8. Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Timmins P, Lim SH (2002) Tumor vaccine for ovarian carcinoma targeting sperm protein 17. *Cancer*. 94: 2447-2453
9. CBTRUS (2005) *Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1998-2002*. Central Brain Tumors Registry of the United States, Hinsdale

10. Cooper PR (1989) Outcome after operative treatment of intermedullary spinal cord tumors in adults: intermediate and long-term results in 51 patients. *Neurosurgery* 25:855-859
11. Cosgrove MM, Rich KA, Kunin SA, Sherrod AE, Martin SE (1993) Keratin intermediate filament expression in astrocytic neoplasms: analysis by immunocytochemistry, western blot, and northern hybridization. *Mod Pathol.* 6 (3): 342-7
12. Creutz CE (1992) The annexins and exocytosis. *Science*; Nov 6; 258 (5084): 924-31
13. Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Esiri MM, Reading M (1998) Epithelial membrane antigen expression in ependymomas. *Neuropathol Appl. Neurobiol* 14: 197-205
14. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab.* (1-2):186-99
15. Deck JH, Eng LF, Bigbee J, Woodcock SM (1978) The role of the glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol* 42:183-190
16. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.* 14 (4): 457-60
17. Deutsche Krebsgesellschaft E.V: Ependymome im Kindes- und Jugendalter, Auszug aus: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2004, Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen, 4.Auflage W. Zuckschwedt Verlag

18. Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT (1976) Ependymomas and ependymoblastomas in children. *J Neurosurg*; 45 (3): 273-83.; Ref in: Miettinen Clark R, Virtanen I (1986) Intermediate filament protein in choroid plexus and ependyma and their tumors. *Am J Pathol* 123: 231-240
19. Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Riehemann K (1998) Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* Aug;110 (2):137-48
20. Duffy PE, Graf L, Huang YY, Rapport MM (1979) Glial fibrillary acidic protein in ependymomas and other brain tumors. Distribution, diagnostic criteria, and relation to formation of processes. *J Neurol Sci*; 40 (2-3):133-46
21. Duncan JA, Hoffman HJ (1995) Intracranial ependymomas. In: *Brain Tumors*, Kaye AH, Low ER, Jr. (eds). Churchill Livingstone: Edinburgh. Pp. 493-504
22. Ernestus RI, Schröder R, Stützer H, Klug N (1996) Prognostic relevance of localization and grading in intracranial ependymomas of childhood. *Childs, Nerv Syst.* 12 (9): 522-6
23. Farwell JR, Dohrmann GJ, Flannery JT (1977) Central nervous system tumors in children. *Cancer.* 40 (6): 3123-32
24. Figarella-Branger D, Gambarelli D, Dollo C, Devictor B, Perez-Castillo AM, Genitori L, Lena G, Choux M, Pellissier JF (1991) Infratentorial ependymomas of childhood. Correlation between histological features, immunohistological phenotype, silver nucleolar organizer region staining values and post-operative survival in 16 cases. *Acta Neuropathol (Berl).* 82 (3):208-16

25. Fokes EC, Jr., Earle KM (1969) Ependymomas: clinical and pathological aspects. *J Neurosurg* 30: 585-594
26. Friede RL, Pollak A (1978) The cytogenetic basis for classifying ependymomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1978 Mar-Apr; 37(2):103-18
27. Gerke V, Moss SE (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta.* Jun 27; 1357 (2):129-54
28. Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y; Lodish HF, Stahl A (2003) Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem.* May 2; 278 (18): 16039-44
29. Goswami C, Chatterjee U, Sen S, Chatterjee S. Sarkar S (2007) Expression of cytokeratins in gliomas. *Indian J Pathol Microbiol.* 50 (3): 478-81
30. Grizzi F, Chiriva-Internati M, Franceschini B, Hermonat PL, Soda G, Lim SH, Dioguardi N (2003) Immunolocalisation of sperm protein 17 in human testis and ejaculated spermatozoa. *J Histochem Cytochem,* 9: 1245-1248
31. Grizzi F, Chiriva-Internati M, Franceschini B, Bumm K, Colombo P, Ciccarelli M, Donetti E, Gagliano N, Hermonat PL, Bright RK, Gioia M, Dioguardi N, Kast WM (2004) Sperm protein 17 is expressed in human somatic ciliated epithelia. *J Histochem Cytochem;* 52 (4): 549-54
32. Grizzi F, Gaetani P, Franceschini B, Antonio Di Ieva, Colombo P, Ceva.-Grimaldi G, Bollati A, Frezza E, Cobos E, Rodriguez y Baena R, Dioguardi N, Chiariva-Internati M (2006). Sperm protein 17 is expressed in human nervous system tumours. *BMC Cancer.* 26; 6:23

33. Guccion JG, Saint N (1991) Ependymoma: ultrastructural studies of two cases. Laboratory Service, Department of Veterans Affairs Medical Center, Washington, DC 20422; *Ultrastruct Pathol.*; 15 (2): 159-66
34. Guidetti B, Mercuri S, Vagnozzi R (1981) Long-term results of the surgical treatment of 129 intramedullary spinal gliomas. *J Neurosurg* 54: 323-330
35. Hasselblatt M, Paulus W (2003) Sensitivity and specificity of epithelial membrane antigen staining patterns in ependymomas. *Acta Neuropathol* (2003) 106: 385-388
36. Hasselblatt M, Tatenhorst L, Paulus W (2005) Microarray-based identification of novel diagnostic markers for ependymomas. *Acta Neuropathol.* 110 (3): 327-327
37. Hasselblatt M, Böhm C, Tatenhorst L, Dinh V, Newrzella D, Keyvani K, Jeibmann A, Buerger H, Rickert CH, Paulus W (2006) Identification of novel diagnostic markers for choroid plexus tumors. A microarray-based approach. *Am J Surg Pathol* 30: 66-74
38. Hasselblatt M, Blümke I, Jeibmann A, Rickert CH, Jouvét A, van de Nes JA, Kuchelmeister K, Brunn A, Fevre-Montange M, Paulus W. (2006) Immunohistochemical profile and chromosomal imbalances in papillary tumours of the pineal region. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32 (3): 278-83
39. Haustein J, Cruz-Sanchez F, Cervos-Navarro J (1987) Ependymomas: electron microscopic criteria and demonstration of GFAP. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 133 (2): 163-174

40. Hendrick E, Raffel C (1989) Tumors of the fourth ventricle: Ependymomas, choroid plexus papillomas and dermoid cysts; in *Pediatric Neurosurgery*. Philadelphia, Saunders, pp 366-371. referiert in: Matthew D. Smyth^a, Biljana N. Horn^b, Carolyn Russo^a, Mitchel S. Berger^a (2000) Intracranial Ependymomas of Childhood: Current Management Strategies Departments of. ^aNeurological Surgery and ^bPediatrics, University of California, San Francisco, Calif., USA *Pediatric Neurosurgery*; 33:138-150

41. Hibino H, Fujita A, Iwai K, Yamada M, Kurachi Y (2003) Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol. Chem.* Oct 15; 279 (42):44065-73. Epub 2004 Aug 13

42. Hirano A, Matsui T, Zimmerman HM (1975)The fine structure of ependymona (author's transl) *No Shinkei Geka.*; 3 (7): 557-63

43. Ho KL, Caccamo CV, Garcia JH (1994) Intracytoplasmic lumina in ependymomas: an ultrastructural study.*Ultrastruct Pathol.* 18 (3): 371-380

44. Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y (2006) Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol (Berl)*; 111 (5): 475-482

45. Kaatsch P, Rickert CH, Kuhl J, Schulz J, Michaelis J (2001) Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer* 92: 3155-3164

46. Kaneko Y, Takeshita I, Matsushima T, Iwaki T, Tashima T, Fukui M (1990) Immunohistochemical study of ependymal neoplasm: histological subtypes and glial and epithelial characteristics. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 417 (2):97-103

47. Kawano N, Ohba Y, Nagashima K (2000) Eosinophilic inclusions in ependymoma represent microlumina: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 99: 214-218
48. Kernohan JW, Fletcher-Kernohan EM (1935) Ependymomas. A study of 109 cases. *Assoc Res Nerv Ment Dis* 16:182-209
49. Kernohan, J. W.; Mabon, R. F.; Svien, H. J. und Adson, A. W. (1949): A simplified classification of gliomas, *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24: S. 71-75
50. Key M (2003) Antigendemaskierung (Epitop-Retrieval). In: Boenisch T (Hrsg.) *Immunchemische Färbungsmethoden*. Copyright 2003 DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA und DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland; S. 30-32
51. Kimura T, Budka H, Soler-Federspiel S (1986) An immunocytochemical comparison of the glia-associated proteins glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 protein (S100) in human brain tumors. *Clin Neuropathol* 5: 21-27
52. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.*;4 (7): 844-7
53. Kricheff II, Becker M, Schenk SA, Taveras JM (1964). Intracranial ependymomas; factors influencing prognosis. *J Neurosurg.* 21: 7-14
54. Kudo H, Oi S, Tamaki N, Nishida Y, Matsumoto S (1990) Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery. *Childs Nerv Syst* 6: 375-378

55. Lacy HM, Sanderson RD (2002) Sperm protein 17 is expressed on normal and malignant lymphocytes and promotes heparan sulfate-mediated cell-cell adhesion. *Blood*; 1; 99 (9): 3479-80
56. Landriscina M, Schinzari G, Di Leonardo G, Quirino M, Cassano A, D'Argento E, Lauriola L, Scerrati M, Prudovsky I, Barone C (2006) S100A13, a new marker of angiogenesis in human astrocytic gliomas. *J Neurooncol*: 80 (3): 251-9
57. Langford LA (1986) The ultrastructure of the ependymoblastoma; *Acta Neuropathol (Berl)*. 71 (1-2):136-41
58. Lim SH, Wang Z, Chiriva-Internati M, Xue Y (2001) Sperm protein17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Blood*, 97: 1508-1510
59. Lim SH, Periman P, Klug P, Weidanz J, Whitton V, Chiriva-Internat M, Wang Z, Wright S (2002) Defining tumor antigens: mRNA, protein or cytotoxicity? *Trends Immunol*, 23: 236-237
60. Matthew D. Smyth^a, Biljana N. Horn^b, Carolyn Russo^a, Mitchel S. Berger^a (2000) Intracranial Ependymomas of Childhood: Current Management Strategies
Departments of. ^aNeurological Surgery and ^bPediatrics, University of California, San Francisco, Calif., USA *Pediatric Neurosurgery*; 33: 138-150
61. Maaaji, Becker LE (1988) Ependymal und Choroid plexus tumors. Cytokeratin and GFAP expression. *Cancer* 61 (7): 1377-1385
62. Mc Lendon RE, Wiestler OD, Kros JM, Kurshunov A, Ng HK (2007), Ependymal tumours. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee W (eds) *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. IARC Press, Lyon

63. Miettinen M, Clark R, Virtanen I (1986) Intermediate filament protein in choroid plexus and ependyma and their tumors. *Am J Pathol* 123:231-240
64. Milanes-Yearsley M.D., M Elizabeth Hammond M.D., Thomas F Pajak, Jay S Cooper M.D., Chu Chang M.D., Thomas Griffin M.D., Diana Nelson M.D., George Laramore M.D. and Milijenko Pilepich M.D (2001) Tissue Micro-Array: A Cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups; *Mod Pathol* 2002; 15(12): 1366–1373
65. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.*; 154 (4): 981-986
66. Morgan, R. O., and Fernandez, M-P. (1995) Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*; *Mol. Biol. Evol.* 12, 967-979
67. Muthmann A, Sauerbeck E (1903) Über eine Gliageschwulst des 4.Ventrikels. *Neuroepithelioma gliomatosum. Beitr pathol. Anat.* 34: 445
68. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H (2003) Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol.* 56 (4): 198-204
69. Paulus W (Hrsg), Peiffer J, Schröder J.M (2000) *Neuropathologie, Morphologische Diagnostik der Krankheiten des Nervensystems und der Skelettmuskulatur*, Aufl. 3, S. 357-359

70. Peris- Bonet R, Martinez- Garcia C, Lacour B, Petrovich S, Giner- Ripoll B, Navajas A, Steliarova- Foucher E (2006) Childhood central nervous system tumours—incidence and survival in Europe (1978-1997): report from Automated Childhood Chancer Information System projekt. *Eur J Cancer* 42: 2064-2080
71. Prayson RA, (1999) Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol* 3:11-18
72. Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. Apr 5; 1197 (1): 63-93
73. Rezay N, Tayyab M, Khan SA, Siddique T (2005) Correlation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) with grading of the neuroglial tumours. *J Coll Physicians Surg Pak*. Aug; 15 (8): 472-5
74. Richardson RT, Yamasaki N, O'Rand MG (1994) Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dey Biol*. 165 (2): 688-701
75. Ringertz N (1950) Grading of Gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand* 27: 51-64
76. Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helén PT Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J (2000) Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res*. 1; 60 (23): 6617-22
77. Salvatore L, D'Adamo MC, Polishchuk R, Salmons M, Pessia M (1999) Localization and age-dependent expression of the inward rectifier K⁺ channel subunit Kir 5.1 in a mammalian reproductive system. *FEBS Lett* 1999 Apr 23; 449 (2-3):146-52

78. Sapiro R, Tarantino LM, Velazques F, Kiriakidou M, Hecht NB, Bucan M, Strauss III JF (2000) Sperm Antigen 6 Is the Murine Homologue of the *Chlamydomonas reinhardtii* Central Apparatus Protein Encoded by the PF16 Locus. *Biology of Reproduction* 62, 511-518
79. Sapiro R, Kostetskii I, Old-Clarke P, Gerton GL, Radice GL, Strauss III JF (2002) Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol*; 22 (17): 6298-305
80. Sarnat HB (1998) Histochemistry and Immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microscopy Research and technique* 41:14-28
81. Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffiatti R, Tribolo A (1991) Histologic prognostic factors in ependymoma. *Child Nerv Syst.*7: 177-182
82. Schweitzer JS, Batzdorf U (1992) Ependymoma of the cauda equina region: diagnosis, treatment and outcome in 15 patients. *Neurosurgery* 30 (2): 202-7
83. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, S. Wooden, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density; *Cell* Volume 89, Issue 2, Pages 309-319
84. Sloane JP, Ormerod MG (1981) Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer*. 1;47 (7): 1786-95

85. Song DY, Cho BP, Choi BY, Yang YC, Lee BH, Lim CK, Kang HS. Upregulated and prolonged differentiation potential of the ependymal cells lining the ventriculus terminalis in human fetuses. *Neurosci Lett.* Sep 23;386 (1): 28-33
86. Sonneland PR, Scheithauer BW, Onofrio BM (1985) Myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic and immunocytochemical study of 77 cases. *Cancer* 56: 883-893
87. Takeuchi H, Kubota T, Sato K, Llena JF, Hirano A (2002) Epithelial differentiation and proliferative potential in spinal ependymomas. *J Neurooncol.* 58 (1): 13-9
88. Takei H, Bhattacharjee MB, Rivery A, Dancer Y, Powell SZ (2007) New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors; *Arch Pathol Lab Med*; 131 (2): 234-41
89. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T, Gilbertson RJ. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8 (4): 323-335
90. Uematsu Y, Rojas-Corona RR, Llena JF, Hirano (1989) Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic human ependyma. *Acta Neuropathol.* 1989; 78 (3):325-8
91. Vege KD, Giannini C, Scheithauer BW (2000) The immunophenotype of ependymomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8 (1):25-31

92. Van der Vegt B, de Roos MA, Peterse JL, Patriarca C, Hilkens J, de Bock GH, Wesseling J (2007) The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*; 51 (3): 322-35
93. Wang Z, Goasheng Huang, Peisong Yan, Rong Liang, Juanhong Wang, Qingguo Yan, Jing Zhang, Hong Cheng, Peizhen Hu and M. Joe Ma (2005) Ectopic cervical anaplastic ependymoma, Case Report, *Pathology international*; 55: 781-784
94. Watson N, Linder ME, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ. (1996) RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature*. Sep 12; 383 (6596): 172-5
95. Wiestler OD, Schiffer D, Coons SW, Prayson RA, Rosenblum MK: Ependymal Tumours. Referiert in: Kleihues and Cavernee (2000) World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of the Nervous System. S. 72-81
96. Yong HY, Moon A (2007) Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. *Arch Pharm Ref*. 30 (1) : 75-81
97. Zülch KJ (1962) Die Gradeinteilung (Grading) der Malignität der Hirngeschwülste. *Acta Neurochir* 10: 639-645
98. Zülch KJ (1979) Histological typing of tumours of the central nervous system. *International histological classification of tumours*, No. 21, WHO, Genf.
99. Zülch KJ (1986). *Brain Tumors. Their Biology and Pathology*. 3rd ed, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Firmenangaben

100. Abcam
101. Acris
102. Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer, MTA1, Alphamatrix Biotech
103. BeecherInstruments, Inc.
104. Novus Biologicals
105. R&D Systems

Internetseiten

1. <http://www.acris-antibodies.com/sheets/DM3038.pdf>
2. <http://www.acris-antibodies.com/sheets/NB100-490.pdf>
3. <http://www.acris-antibodies.com/sheets/PP1107P.pdf>
4. www.beecherinstruments.com
5. <http://marketing.abcam.com/index.html?datasheet=22102>
6. <http://www.rndsystems.com/pdf/mab805.pdf>
7. www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php#3

7. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Paulus und Priv.-Doz. Dr. med. M. Hasselblatt vielmals für die Bereitstellung des Promotionsthemas danken.

Zudem danke ich Priv.-Doz. Dr. Martin Hasselblatt für die hervorragende Betreuung und die geduldige Unterstützung durch wertvolle Kritik.

Desweiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts der Neuropathologie für ihre freundliche Einweisung in den Forschungsbereich. Hier danke ich vor allem Sonja, Maria und Arne.

Vielmals möchte ich auch Ulla und Andrea danken.

Mein Dank gebührt weiterhin meiner Familie, die mir neben meinem Studium auch den Rücken für die Vollendung meiner Promotion gestärkt hat.

Ich danke meinen Freundinnen für die treue Unterstützung.

Danke Hajo.

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Schulische Ausbildung

Studium

Ort, Datum

Unterschrift

9. ANHANG

9.1. Abkürzungsverzeichnis

aqua dest	Destilliertes Wasser
AS-TA	Tissue Array der glialen Tumore
CD36	collagen type I receptor, thrombospondin receptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
EMA	Epitheliales Membranantigen
EP-TA	Tissue Array der Ependymome
FATP6	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6
FFPE	formalinfixiert und paraffineingebettet
GalNac	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase
GFAP	Glial fibrillary acidic Protein
GK	Garkocher
GLUT 10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 10
HE	Hämatoxilin-Eosin
hOPG	human Osteoprotegerin
HRD	horse radish peroxidase
ICL	intercytoplasmatische (Mikro-) Lumina
Kir 5.1.	kalium inward rectifier channel 5.1
MTA	MicroTissue Array
RGS1	regulator of G-protein signalling 1
Spa17	sperm autoantigenic protein 17
SPAG6	sperm associated antigen 6
TMA	Tissue Microarray
TA	Tissue Array
WHO	World Health Organization

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ependymale Rosetten	4
Abbildung 2:	Perivaskuläre Pseudorosetten	4
Abbildung 3:	Epitheliales Membranantigen (EMA) in Ependymomen.....	7
Abbildung 4:	Microarray-Analyse	8
Abbildung 5:	Bestandteile des Tissue-Arrayers.....	13
Abbildung 6:	Tissue Array Design.....	15
Abbildung 7:	Orientierung des Tissue Arrays	15
Abbildung 8:	Markierung der Entnahmestelle	16
Abbildung 9:	Paraffinentnahme aus dem Empfängerblock.....	18
Abbildung 10:	Gewebeentnahme aus dem Spenderblock.....	19
Abbildung 11:	Einsetzen des Gewebes in den Empfängerblock.....	20
Abbildung 12:	(Strept-)Avidin-Biotin-Komplex	27
Abbildung 13:	Färbungsintensitäten	31
Abbildung 14:	Färbungsergebnis des Primärantikörpers Kir5.1 auf normalem Hirngewebe	43
Abbildung 15:	Färbungsergebnis des Primärantikörpers Kir5.1 (anti-goat).....	44
Abbildung 16:	Färbungsergebnis des Antikörpers CD36 (1:50)	46
Abbildung 17:	Färbungsergebnis des Antikörpers Glut10 (1:100).....	48
Abbildung 18:	Färbungsergebnis des Antikörpers RGS1 (1:50)	50
Abbildung 19:	Färbungsergebnis des Antikörpers hOPG (1:100) auf normalem Hirngewebe	52
Abbildung 20:	Färbungsergebnis des Antikörpers hOPG (1:250) auf normalem Hirngewebe	54
Abbildung 21:	Färbungsergebnis des Antikörpers Annexin A1 (1:200)	56
Abbildung 22:	Färbungsergebnis des Antikörpers FATP6 (1:200)	58
Abbildung 23:	Färbungsergebnis des Antikörpers GalNac (1:2000).....	61
Abbildung 24:	Färbungsergebnis des Antikörpers SPAG6 (1:100; ohne pH9).....	64
Abbildung 25:	Färbungsergebnis des Antikörpers Spa 17 (1:4000, pH9)	66
Abbildung 26:	Gegenüberstellung einer ependymalen und einer glialen Gewebestanze gefärbt durch anti-Spa17 (pH9; 1:5000);.....	71
Abbildung 27:	Boxplot-Diagramm der medianen anti - Spa17-Färbungsintensität.....	75

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ependymome.....	10
Tabelle 2:	Gliale Tumore.....	11
Tabelle 3:	Etablierte Marker ependymaler Tumore.....	22
Tabelle 4:	Immunreaktivität etablierter ependymaler Tumore.....	23
Tabelle 5:	Antikörper.....	25
Tabelle 6:	Übersicht der evaluierten Antikörper.....	30
Tabelle 7:	Patientendaten.....	33
Tabelle 8:	Mann- Whitney- U-Test.....	75
Tabelle 9:	Spezifität und Sensitivität derjenigen auf den Tissue Arrays getesteten Antikörper.....	78

9.4. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1:	Lokalisation ependymaler Tumore.....	35
Diagramm 2:	Altersanalyse Ependymome (WHO - Grad II).....	37
Diagramm 3:	Altersanalyse Myxopapillärer Ependymome (WHO - Grad I).....	37
Diagramm 4:	Altersanalyse Anaplastischer Ependymome (WHO - Grad III).....	38
Diagramm 5:	Geschlechtsspezifische Analyse ependymaler Tumore (WHO - Grad I – III).....	39
Diagramm 6:	Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse bekannter diagnostischer Marker.....	41
Diagramm 7:	Färbungsintensitäten des Antikörpers hOPG (1:100; pH9).....	53
Diagramm 8:	Färbungsintensitäten des Antikörpers hOPG (1:250).....	54
Diagramm 9:	Färbungsintensitäten des Antikörpers Annexin A1 (1:200).....	56
Diagramm 10:	Färbungsintensitäten des Antikörpers FATP6 (1:200).....	59
Diagramm 11:	Färbungsintensitäten des Antikörpers GalNac (1:2000, pH9).....	62
Diagramm 12:	Färbungsergebnis des Antikörpers SPAG6 (1:100).....	65
Diagramm 13:	Mittlere Färbungsintensität SPAG6 (1:100).....	65
Diagramm 14:	Färbungsergebnis anti-Spa17 (1:5000, pH9).....	70
Diagramm 15:	Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse anti-SPA17 (1:5000; pH9).....	70
Diagramm 16:	Sensitivität und Spezifität des Primärantikörpers Spa17 gegenüber ependymalen Tumoren (EP) unter Berücksichtigung unterschiedlicher Gebrauchskonzentrationen des Antikörpers (1:4000, 1:5000, 1.8000).....	73
Diagramm 17:	Spezifität und Sensitivität des primären Antikörpers Spa17.....	74
Diagramm 18:	Gegenüberstellung der Färbungsergebnisse aller Antikörper.....	77