

Das Ästhesioneuroblastom bei Hund und Katze - eine histologische und immunhistochemische Studie

Katrin Brosinski

München 2010

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Das Ästheseoneuroblastom bei Hund und Katze - eine histologische und immunhistochemische Studie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Katrin Brosinski
aus Schwerin

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

*Was immer du kannst oder träumst es zu können, fange damit an.
(Wolfgang v. Goethe)*



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Grundlagen des Ästhesioneuroblastoms	3
2.1.1 Historischer Überblick	3
2.1.2 Definition und Synonyme	3
2.1.3 Epidemiologie	3
2.1.4 Ätiologie	4
2.1.5 Lokalisation	4
2.1.6 Symptome	5
2.1.7 Morphologie	6
2.1.8 Klassifikation	7
2.1.9 Immunhistochemie	11
2.1.10 Differentialdiagnosen	13
2.1.11 Therapie und Prognose	13
2.2 Die Regeneration im Riechepithel	14
2.2.1 Grundlagen	14
2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis neuronaler Antigene	16
2.2.3 NSE (neuronenspezifische Enolase)	16
2.2.4 MAP-2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2)	20
2.2.5 NeuN	26
2.3 Tumorwachstum	30
2.3.1 Einflüsse	30
2.3.2 Untersuchungen der Tumorzellproliferation	30
2.3.3 Mitoseindex und Ki-67	31
2.4 Molekulare Tumorgenese	37
2.4.1 Grundlagen	37

2.4.2	p53	37
2.4.3	bcl-2	43
3	Material und Methoden	49
3.1	Untersuchungsmaterial	49
3.2	Allgemeine Kasuistik	49
3.2.1	Fixierung, Einbettung und Zuschnitt	52
3.2.2	Standardfärbungen	52
3.2.3	Immunhistologische Färbungen	54
3.3	Dokumentation und Auswertung	69
3.3.1	Gruppeneinteilung	69
3.3.2	NSE, MAP-2, NeuN	69
3.3.3	Mitose-Index	69
3.3.4	Ki-67	69
3.3.5	p53	70
3.3.6	bcl-2	70
3.3.7	Statistik	70
3.4	Anhang: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Rezepte	72
3.4.1	Chemikalien und Reagenzien	72
3.4.2	Geräte	73
3.4.3	Rezepte	75
4	Ergebnisse	79
4.1	Beschreibung des Patientengutes	80
4.1.1	Rasseverteilung	80
4.1.2	Altersverteilung	80
4.1.3	Geschlechtsverteilung	80
4.2	Histologische Befunde und Tumorklassifikation	82
4.3	Immunhistochemische Auswertung der neuronenspezifischen Marker MAP-2 und NeuN im Vergleich mit NSE	89
4.3.1	MAP-2	89
4.3.2	NeuN	93
4.3.3	NSE	96
4.4	Bestimmung der Proliferationsrate	99
4.4.1	Mitose-Index	99

4.4.2	Immunhistochemische Darstellung des Proliferations- markers Ki-67	99
4.4.3	Erstellung des <i>labeling index</i> (LI) von Ki-67	101
4.5	Immunhistochemische Detektion des Tumorsuppressorproteins p53	105
4.6	Immunhistochemische Auswertung des Proto-Onkogens bcl-2 . .	108
5	Diskussion	117
5.1	Analyse des Patientengutes	119
5.2	Auswertung der histologischen Charakteristika sowie der Gradein- teilung	120
5.2.1	Histologische Charakteristika	120
5.2.2	Klassifikationssystem	121
5.3	Auswertung der neuronalen Marker MAP-2 und NeuN im Vergleich mit NSE	123
5.3.1	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP-2)	123
5.3.2	NeuN	125
5.3.3	Neuronenspezifische Enolase (NSE)	128
5.3.4	Abschließende Betrachtungen	129
5.4	Beurteilung der Proliferationsrate	131
5.4.1	Mitoseindex	131
5.4.2	Ki-67	132
5.5	Bewertung des Tumorwachstums	135
5.5.1	p53	135
5.5.2	bcl-2	137
5.6	Schlussbetrachtung und Ausblick	141
6	Zusammenfassung	143
7	Summary	145
	Danksagung	177

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad C elsius
%	Prozent
μl	M ikroliter
μm	M ikrometer
Abb.	A bbildung
ABC	engl.: a vidin- b iotin- c omplex
ACTH	a drenocorticotropes H ormon
AKS	a merikanisch- k anadischer S chäferhund
APAF	engl.: A poptosis P rotease A ctivating F actor
APUD	engl.: a mine p recursors u ptake and c arboxylation
Aqua dest.	A qua d estillata
Aufl.	A uflage
bzw.	b eziehungsweise
ca.	c irca
Cat.	c atalog
cm	engl.: c entimetre, Zentimeter
CSAH	C itronensäure a nhydrid
Da	D alton
DAB	3,3´- D iaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
d.h.	d as h eißt
Diss.	D issertation
DNES	d iffuses n euroendokrines S ystem
DNT	d ysembryoplastischer n euroektodermaler T umor
Dr.	D oktor
DSH	D eutscher S chäferhund
EAS	ektopisches A CTH- S yndrom
ECVP	E uropean C ollege of V eterinary P athology
ed.	engl.: e ditor, der Herausgeber

eds.	engl.: editors , die Herausgeber
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	lateinisch: et alii , und Mitarbeiter
etc.	lateinisch: et cetera , und die übrigen
Fa.	Firma
FeLV	Felines Leukämievirus
franz.	französisch
FTA	Fachtierarzt
g	Gramm
GFAP	engl.: glial faser acid protein , Saures Gliafaserprotein
Grb2	engl.: Growth factor receptor-bound protein 2
h	engl.: hour , Stunde
H ₂ O	Hydrogenoxid , Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H.E.	Hämalaun-Eosin
HPF	engl.: high power field , 400fache Gesamtvergrößerung
jew.	jeweils
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k.A.	keine Angabe
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
LI	engl.: labeling index
m	männlich
M	molar (Mol/l)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MARTA	MAP-2-RNA trans-acting protein
MI	Mitose-Index
min	engl.: minute , Minute
mind.	mindestens
mk	männlich kastriert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm ²	Quadratmillimeter

MW	Mittelwert
mRNA	engl.: m essenger r ibonucleic a cid, Boten-RNA
N	N ormalität von Lösungen
NNE	n icht n euronale E nolase
No.	engl.: n omination, Nennung
Nr.	N ummer
NSCLC	engl.: n onsmall c ell l ung c arcinoma, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	n euronenspezifische E nolase
n.v.	n icht v orhanden
OT	O bjektträger
P.	P athologie
p.	engl.: p age, Seite
pcd	engl.: p urkinje c ell d egeneration, Degeneration der Purkinje-Zellen
PBS	engl.: p hosphate- b uffered s aline
pH	lateinisch: p ondus h ydrogenii, Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PKA	P roteinkinase A
PNS	P eripheres N ervensystem
PTPR	p apillary t umour of the p ineal r egion, Tumoren der Epiphyse
S.	S eite
SD	engl.: s tandard d eviation, Standardabweichung
SDS-PAGE	engl.: s odium d odecylsulfate p olyacrylamide g el e lectrophoresis
sog.	s ogenannt
Tab.	T abelle
u.a.	u nter a nderem
UICC	franz.: U nion I nternationale C ontre le C ancer
usw.	u nd s o w eiter
v.a.	v or a llem
vet. med.	v eterinär m edizinisch
W	W att
w	w eiblich
WHO	W orld H ealth O rganisation
wk	w eiblich k astriert

x	“mal“
z.B.	zum B eispiel
ZNS	Z entrales N ervensystem

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Riechschleimhaut	5
2.2	Rosettenarten	8
2.3	Klinische Klassifikation nach KADISH [1]	9
2.4	TNM-Klassifikation nach DULGUEROV und CALCATERRA [2]	9
2.5	Klassifikationssystem nach HYAMS [3]	10
2.6	Aufbau der Riechschleimhaut	15
2.7	Signalwege von MAP-2	23
2.8	Signalwege des p53 Proteins	40
2.9	bcl-2 supprimiert die Apoptose, die Nekrose und die Autophagie	45
3.1	Die ABC-Methode	54
4.1	Altersverteilung beider Spezies im Vergleich	81
4.2	Modifikation des Klassifikationssystems nach HYAMS	84
4.3	Histologische Gradeinteilung der Gruppe 1 (Hunde), Grad 1 und 2	85
4.4	Histologische Gradeinteilung der Gruppe 1 (Hunde), Grad 3 und 4	86
4.5	Histologische Gradeinteilung der Gruppe 2 (Katzen), Grad 1 und 2	87
4.6	Histologische Gradeinteilung der Gruppe 2 (Katzen), Grad 3 und 4	88
4.7	Immunhistochemische Darstellung von MAP-2	90
4.8	MAP-2 im Vergleich mit der Gradeinteilung	92
4.9	Immunhistochemische Darstellung von NeuN	94
4.10	Die Subpopulation im immunhistochemischen Vergleich (NeuN, MAP-2 und NSE)	95
4.11	Immunhistochemische Darstellung von NSE	97
4.12	MAP-2, NeuN und NSE im Vergleich	98
4.13	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67	100
4.14	Korrelation zwischen der Gradeinteilung und dem Mitoseindex	103
4.15	Korrelation zwischen Grad und Ki-67	104
4.16	Immunhistochemische Darstellung von p53 in Kontrollgewebe	106

4.17 Detektion von p53 in Ästhesioneuroblastomen	107
4.18 Immunhistochemische Positivkontrollen für bcl-2	109
4.19 Immunhistochemische Darstellung von bcl-2	110
4.20 Korrelation zwischen bcl-2 und der Gradeinteilung	113
4.21 Korrelation zwischen der bcl-2-Expression und dem Mitoseindex (MI)	114
4.22 Korrelation zwischen der bcl-2-Expression und dem Ki-67 <i>labeling</i> <i>index</i>	115

Tabellenverzeichnis

3.1	Alter, Geschlecht und Vorbericht der Gruppe 1 der Hunde	50
3.2	Alter, Geschlecht und Vorbericht der Gruppe 2 der Katzen	51
3.3	Eingesetztes Normalserum und verwendete Primär- bzw. Sekundärantikörper	68
4.1	Gradeinteilung der Gruppe 1 und der Gruppe 2	83
4.2	Semiquantitative Auswertung von MAP-2 bei den Ästhesioneuroblastomen von Hund und Katze	91
4.3	Grad, Mitose-Index und Ki-76 LI der analysierten Fälle	102
4.4	Mittelwert, Standardabweichung, Spannweite und Median des MI und Ki-67 LI der Gruppe 1 und 2	102
4.5	Semiquantitative Auswertung von bcl-2 bei den Ästhesioneuroblastomen von Hund und Katze	111

1 Einleitung

Das Ästhesioneuroblastom, auch olfaktorisches Neuroblastom genannt, ist ein maligner neuroektodermaler Tumor, der vermutlich vom Riechepithel abstammt und der hauptsächlich beim Hund, bei der Katze und beim Pferd beschrieben worden ist.

In der Humanpathologie erstmals 1924 durch BERGER und LUC et al., R. Luc publiziert, sind bis zum Jahr 1977 weltweit 170 Fälle und bis zum Jahr 1997 insgesamt 945 Fälle aufgeführt worden.

Zunächst als Ästhesioneuroepitheliome bezeichnet, folgten Beschreibungen als Ästhesioneurozytom und Ästhesioneuroblastom. Analoge Begriffe sind olfaktorisches intranasales Neuroblastom, olfaktorisches Ästhesioneurom, Tumor der Riechplakoden und neuroolfaktorischer Tumor. Durch die teils ungewöhnliche Polymorphie entsteht eine ausgeprägte diagnostische Unsicherheit. Mit einer Inzidenz von 2-3% der Neoplasien des sinonasalen Traktes beim Menschen ist es ein sehr selten auftretender Tumor. Übersichtsarbeiten dazu sind selten und in der Veterinärmedizin fehlen sie gänzlich. Die wenigen bekannten Fallberichte scheinen in Bezug auf Pathohistologie, Differentialdiagnosen und Symptomatik mit dem humanen Ästhesioneuroblastom vergleichbar zu sein. Anhand des vermehrten Auftretens von humanpathologischen Veröffentlichungen in den letzten zwei Jahren, mit dem Schwerpunkt Therapie und Prognose, kann ein gesteigertes Interesse an dieser Thematik vermutet werden. In der Humanpathologie hat sich in den letzten 10 Jahren ein von HYAMS et al. etabliertes histologisches Klassifikationssystem für diesen Tumor durchgesetzt, welches in Einzelfällen auch in der Veterinärpathologie Anwendung fand. Neben der histomorphologischen Untersuchung spielt beim *Grading* von Tumoren die Bestimmung der Proliferationsrate eine wichtige Rolle. Mit dieser Studie wird an Tumorgewebe von Hund und Katze erstmals in der Veterinärpathologie eine umfassende vergleichende histologische Untersuchung durchgeführt, die Anwendbarkeit des histologischen Klassifikationssystems nach Hyams geprüft und anschließend mittels Bestimmung des Mitoseindex und des Ki-67 *labeling index* die Proliferationsrate bestimmt.

Die Diagnose dieser Neoplasie bereitet aufgrund einiger schlecht abgrenzbarer Differentialdiagnosen, wie das sinonasale undifferenzierte Karzinom (SNUC), das maligne Melanom, das Lymphom und im Besonderen das neuroendokrine Karzinom (NEC) große Schwierigkeiten. Da die bisher verwendeten neuronalen immunhistochemischen Marker in der Vergangenheit massive unspezifische Reaktionen gezeigt haben, werden zwei neue, am Tier teils noch nicht erprobte Antikörper, MAP-2 (mikrotubuliassoziiertes Protein 2) und NeuN (Neuronal Nuclei) etabliert. Vergleichend wird die Expression des bereits gebräuchlichen Markers NSE (neuronenspezifische Enolase) nachgewiesen. Anschließend soll der Grad der MAP-2-Expression in Verbindung mit der vorgenommenen Gradeinteilung gebracht werden.

Die Proteine p53 und bcl-2 stellen wichtige Schnittpunkte grundlegender zellulärer Prozesse, wie dem Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose dar und werden entsprechend ihrer Funktion als Tumorsuppressorprotein bzw. Proto-Onkoprotein bezeichnet. Beim Ästhesioneuroblastom des Menschen zeigt p53 eine immunhistochemisch negative Reaktion. Mutationen konnten bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch stellte man eine Überexpression von Wildtyp-p53 fest. Das Proto-Onkoprotein bcl-2 spielt eine große Rolle bei der Apoptose, aber auch bei der Autophagie und in nekrotischem Gewebe. Zur Beurteilung des biologischen Verhaltens der Ästhesioneuroblastome dieser Arbeit soll die Expression dieser beiden Proteine in kaninem und felinem Tumorgewebe immunhistochemisch nachgewiesen bzw. diese Werte ins Verhältnis zur histomorphologischen Gradeinteilung und zur Proliferationsstärke gesetzt werden.

Der Literaturteil gibt einen kurzen Überblick über den aktuellen Wissensstand des Ästhesioneuroblastoms und der verwendeten Marker bei Mensch und Tier. Neben der zunächst rein akademischen Bedeutung könnten die Ergebnisse dieser Arbeit Ausgangspunkte für die verschiedenen Therapieformen sein. Die Erforschung der eines bestimmten Tumors zugrundeliegenden funktionellen Defekte ist für die Entwicklung einer zielgerichteten und effektiven Therapie von entscheidender Rolle.

2 Literaturübersicht

2.1 Grundlagen des Ästhesioneuroblastoms

2.1.1 Historischer Überblick

Ästhesioneuroblastome sind seltene Tumoren des olfaktorischen Neuroepithels [4]. Der Begriff leitet sich aus dem griechischen *aisthánesthai* - durch die Sinne ab. Sie wurden erstmals 1924 durch BERGER und LUC et al. beschrieben. Seit-her sind in der Humanpathologie weltweit bis zum Jahr 1977 lediglich 170 Fälle [5] und bis zum Jahr 1997 insgesamt 945 Fälle aufgeführt [6]. Entsprechende Übersichtsarbeiten zum Ästhesioneuroblastom fehlen in der Veterinärpathologie gänzlich.

2.1.2 Definition und Synonyme

Ästhesioneuroblastome sind maligne neuroektodermale Tumoren, die vermutlich vom olfaktorischen Neuroepithel abstammen [4]. In der Humanpathologie zu-nächst als Ästhesioneuroepitheliom bezeichnet, folgten später Beschreibungen als Ästhesioneurozytom und Ästhesioneuroblastom. Analoge Begriffe sind olfak-torisches intranasales Neuroblastom, olfaktorisches Ästhesioneurom, Tumor der Riechplakoden und neuroolfaktorischer Tumor [7].

2.1.3 Epidemiologie

Das Ästhesioneuroblastom ist ein seltener Tumor, der laut histologischer Klassifi-kation der Tumoren des Nervensystems von Haussäugetieren bei Hunden [8–12], Katzen [8, 10, 13] und Pferden [14, 15] vorkommt [4]. Es sind aber auch experi-mentelle Studien an Mäusen, Ratten, Primaten und Einzelfallberichte vom Rind [16] und Karpfen bekannt [17]. In der Humanpathologie machen sie etwa 2-3% der Tumoren des sinonasalen Traktes aus. Die Inzidenz liegt hier bei etwa 0,4

pro einer Million Fälle. Das Alter der Patienten reicht von 2 bis 90 Jahren bei einer bimodalen Altersverteilung mit Gipfeln in der 2. und 6. Dekade des Lebens [7]. Nur JETHANAMEST et al. beobachteten bei 311 humanen Ästhesioneuroblastomen eine unimodale Altersverteilung im Bereich von 40-70 Jahren [18]. Das Geschlechtsverhältnis ist annähernd ausgewogen und [6, 7, 19–25] eine Abstammungsdisposition ist nicht bekannt. Lediglich in einer Studie am Menschen von RESTO et al. fielen bei ein Anteil von 93 % Kaukasiern auf (27 Fälle) [22]. In der Veterinärpathologie fehlen entsprechende Angaben, da es keine Übersichtsarbeiten gibt.

2.1.4 Ätiologie

Es gibt in der Humanpathologie keine bekannten ätiologischen Agentien, die ein Ästhesioneuroblastom entstehen lassen. Am Tier hingegen kann experimentell z.B. durch Injektion von Diethylnitrosamin in syrische Hamster und N-Nitrosopiperazin in Ratten dieser Tumor induziert werden [26, 27]. Eine virale Tumorinduktion erscheint ebenfalls möglich. So wiesen SCHRENZEL et al. Retrovirus C Partikel in felinen spontan aufgetretenen Ästhesioneuroblastomen, bei gleichzeitig serologisch positivem Nachweis von FeLV (Felines Leukämievirus), nach [28].

2.1.5 Lokalisation

Am häufigsten tritt das Ästhesioneuroblastom in der oberen Nasenhöhle im Bereich der *Lamina cribrosa* auf. Daneben findet man oft atrophische Turbinalien, eine Verschiebung des *Septum nasale* in Richtung der tumorabgewandten Seite der Nase [9, 12, 14] und bzw. oder eine Expansion in den *Bulbus olfactorius* bzw. in die Orbita [4, 7]. Ein Ursprung vom Vomeronasalorgan, vom *Ganglion pterygopalatinum*, aus der olfaktorischen Plakode und vom Ganglion des *Nervus terminalis* wurde ebenfalls beobachtet. Ein ektopischer Ausgang mit Ursprung in der unteren Nasenhöhle oder der Nasennebenhöhlen, z.B. des *Sinus maxillaris* tritt ebenfalls auf [7]. Das Ästhesioneuroblastom kann sich beim Menschen auch als eine im Bereich des frontalen Lobus liegende intrakraniale Umfangsvermehrung präsentieren [29, 30], die die Siebbeinplatte einbezieht. Selten entstehen Tumoren ohne intranasale Komponente [31].

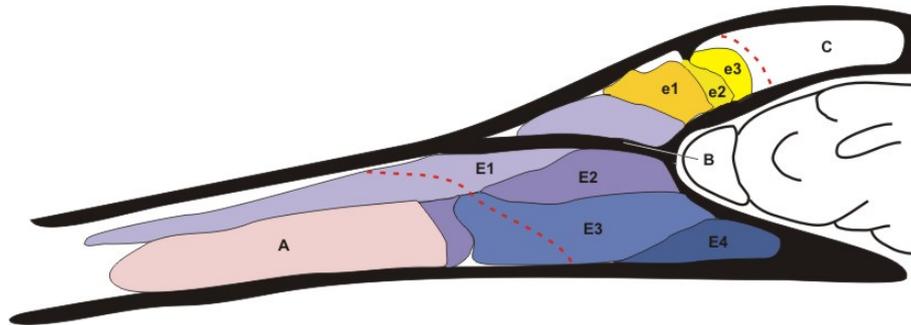


Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung der Riechschleimhaut. E1-E4 Ectoturbinalia 1-4, e1-e3 Endoturbinalia 1-3; A Basallamelle der Concha nasalis ventralis, B Basallamelle der Concha nasalis dorsalis, C Sinus frontalis. Zwischen den beiden rotgestrichelten Linien befindet sich das Riechfeld.**

2.1.6 Symptome

Anhand der topographischen Lage in der oberen Nasenhöhle lassen sich zunächst unilateral behinderte Nasenatmung und Epistaxis, gefolgt von Hyp- oder Anosmie, Rhinorrhoe und Gesichtsschwellungen beobachten. Als Spätsymptome bei intraorbitaler und/oder intrakranialer Ausdehnung können Diplopie, Visuseinschränkung, exzessive Lakrimation oder eine Hirndrucksymptomatik bzw. abhängig von der Infiltration des Gehirns fokale neurologische Ausfälle und Störungen im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis auftreten. Bei asymptomatischem Primärtumor ist die Diagnosestellung durch eventuell auftretende regionale Lymphknotenmetastasen möglich [2–4, 7, 9, 12, 14, 15, 20, 21, 25, 32].

Entsprechend dem sehr langsamen Wachstum können die Symptome auch bereits seit langer Zeit bestehen. Der Zeitraum zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung beträgt beim Menschen etwa sechs Monate [7, 21, 32]. Beim Tier sind Zeiträume von zwei bis zwölf Monaten beschrieben [9, 12, 14, 15].

Selten tritt das Ästhesioneuroblastom des Menschen in Kombination mit anderen Erkrankungen auf, z.B. mit einem Cushing-Syndrom in Verbindung mit einer ektopischen Sekretion von ACTH (ektopisches ACTH Syndrom, EAS). Diese Hormonbildung kommt auch oft als paraneoplastisches Geschehen bei Rundzelltumoren der Lunge vor [33, 34]. Daneben ist dieser Tumor in Kombination mit dem Opsoklonus-Myoklonus-Ataxie (OMA) Syndrom [35] beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die durch unregelmäßige, repetitive,

schnelle Bewegungen des Augapfels in alle Richtungen sowie durch kurze, multifokale myoklonische Muskelzuckungen, gewöhnlich begleitet von zerebellärer Dysfunktion und Ataxie, gekennzeichnet ist. Das OMA-Syndrom tritt oft als Begleiterscheinung von Tumoren der Lunge und der Mamma beim Erwachsenen sowie beim infantilen Neuroblastom auf [35]. Entsprechende Zusammenhänge sind in der Veterinärpathologie nicht bekannt.

Die Inzidenz von lokoregionären Metastasen und von Fernmetastasen variiert erheblich. Zervikale Lymphknotenmetastasen treten zu 10-25 % auf. Die Wahrscheinlichkeit einer Fernmetastasierung liegt zwischen 10 und 60 %. Als Zielorgane werden mediastinale und abdominale Lymphknoten, Skelett, Lunge, Leber, seltener Haut und Pankreas aufgeführt [3, 7, 20, 22, 32].

2.1.7 Morphologie

Makroskopie

Ästhesioneuroblastome sind weiche, unscharf begrenzte, oft stark vaskularisierte Tumoren mit einer von Mukosa überzogenen, glänzenden, polypoiden, braun-grauen Oberfläche [3, 4, 7, 9, 12, 14, 36].

Lichtmikroskopie

Das Ästhesioneuroblastom ist ein sehr zellreicher Tumor. Die in Nestern bzw. Läppchen oder diffus, angeordneten gleichförmigen Zellen sind klein, von kugel- bis säulenförmiger Gestalt und von verästeltem feinem fibrovaskulärem Stroma umgeben. Gewöhnlich besitzen sie eine geringe Menge an nicht gut abgrenzbarem Zytoplasma und runde Zellkerne mit teils gleichmäßig [37], teils grobscholligem verteiltem Chromatin, als *salt and pepper*-Optik bezeichnet, und unauffälligen Kernkörperchen [7]. In Ästhesioneuroblastomen höheren Differenzierungsgrades sind die Zellkerne eher uniform, die mitotische Aktivität ist gering und nekrotische Areale treten selten auf. Mit sinkendem Grad der Differenzierung nimmt der Pleomorphismus zu. Die Kernkörperchen sind prominent und die Nekrosen sind häufiger und in größerer Ausdehnung zu beobachten. Auch die Mitoserate steigt an [7, 37].

Die Tumorzellen sind oft zu Rosetten formiert. Es sind drei Typen von Rosetten zu unterscheiden: Pseudorosetten, Homer-Wright Rosetten und Flexner-

Wintersteiner Rosetten. Die Homer-Wright Rosetten formieren sich durch die radspeichenartige Anordnung der Tumorzellen; im Zentrum befindet sich ein Netzwerk von primitiven neuronalen Fortsätzen. Im Unterschied dazu besitzen Flexner-Wintersteiner Rosetten kleine zytoplasmatische Ausläufer, die in ein weitgehend leeres Lumen hineinragen. Bei den perivaskulären Pseudorosetten formieren sich die Tumorzellen palisadenartig um Blutgefäße herum. Das Präfix "pseudo" differenziert diese Form der Rosette von den anderen beiden und besagt, dass die zentrale Struktur nicht vom Tumor selbst gebildet wird [38, 39].

Rosetten können gelegentlich bei Hunden und regelmäßig bei Katzen gefunden werden. Das Auftreten dieser Rosetten ist nicht pathognomonisch, da sie auch bei anderen Tumorentitäten, einschließlich neuroendokrinen Karzinomen auftreten, welche ebenfalls in der *Regio olfactoria* vorkommen [37].

Ein wichtiges Charakteristikum im differenzierterem olfaktorischen Neuroblastom ist die Anwesenheit eines zwischen den Zellen gelegenen eosinophilen fibrillären Materials, Neuropil genannt. Fibrilläre Matrix und Zellen besitzen unscharfe Grenzen. Das Neuropil enthält Nervenfortsätze, die durch eine Silberfärbung, z.B. Bodian, oder ultrastrukturell dargestellt werden können [7, 37, 38].

Verkalkungen, Ganglienzellen, Melanin-enthaltende Zellen und abweichende Differenzierungsrichtungen (Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, Teratomen, Rhabdomyoblastomen) innerhalb eines Tumors sind eher selten zu beobachten [7].

2.1.8 Klassifikation

Klinische Klassifikationssysteme

Aufgrund des lokal destruierenden Wachstums der Ästhesioneuroblastome im Bereich der Lamina cribrosa, der Nasennebenhöhlen und der vorderen Schädelgrube wurden verschiedene anatomisch begründete Klassifikationssysteme formuliert.

Als erste definierten KADISH et al. 1976 eine klinische Einteilung, welche bisher die weiteste Verbreitung fand und von den meisten Autoren bevorzugt wird [21, 25, 40].

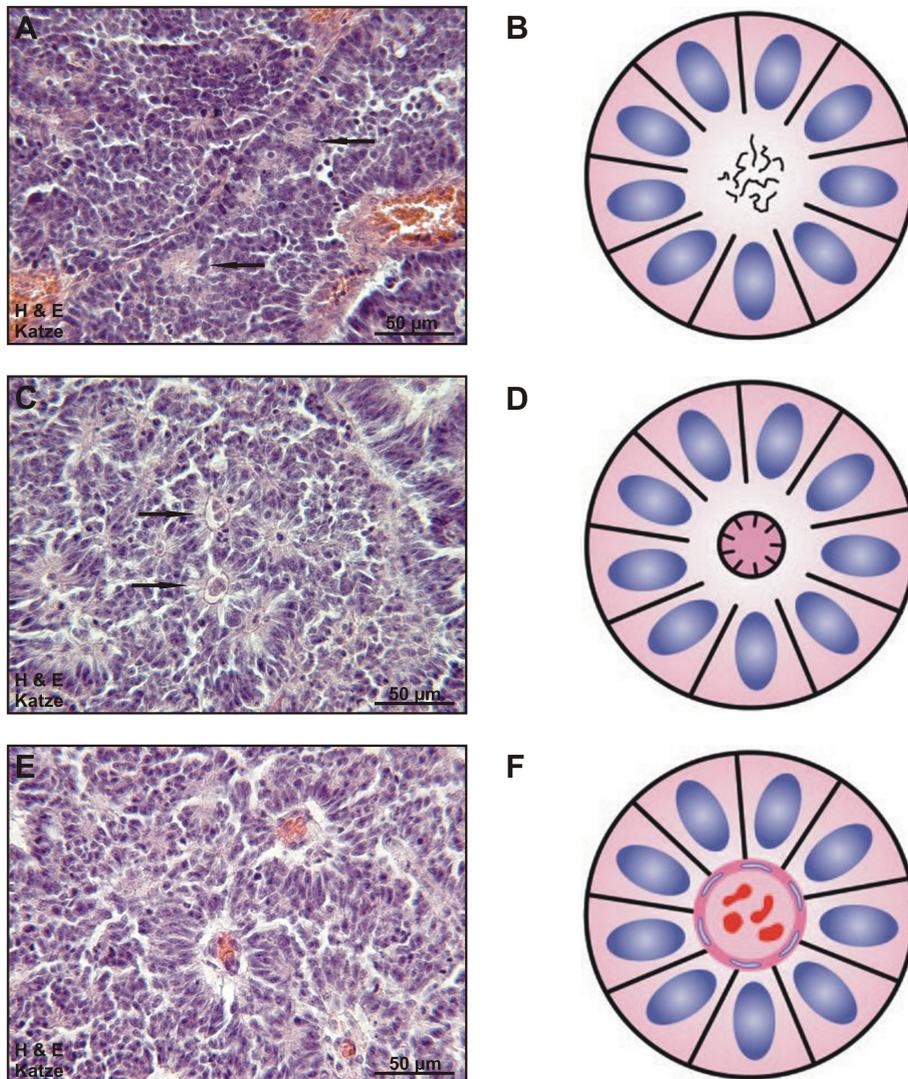


Abbildung 2.2: Rosettenarten: **A, B Homer-Wright-Rosetten:** Die Tumorzellen formieren sich radspeichenartig; im Zentrum befindet sich ein Netzwerk von primitiven neuronalen Fortsätzen. **C, D Flexner-Wintersteiner Rosetten:** Die neoplastischen Zellen zeigen ebenfalls eine Radspeichenstruktur. Kleine zytoplasmatische Ausläufer ragen in ein nahezu leeres Lumen hinein. **E, F: Pseudorosetten:** Diese Formation entsteht durch eine palisadenartige Anordnung der Zellen um die Gefäße herum [39].

Stadium	Klinische Ausbreitung
A	Tumor beschränkt auf die Nasenhöhle
B	Ausdehnung in die Nasenhaupt- und Nebenhöhlen
C	Ausdehnung darüber hinaus

Abbildung 2.3: **Klinische Klassifikation nach KADISH [1]**

Zur weiterführenden Systematik schlugen BILLER et al. 1990 ein System in Anlehnung an die TNM-Klassifikation der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) vor. Diese Klassifikation stellt eine detailliertere Beschreibung der lokalen Tumorausdehnung, insbesondere zur Bewertung der Operabilität, in den Vordergrund.

1992 modifizierten DULGUEROV und CALCATERRA diese Einteilung. Sie stellten den Aspekt der Operabilität in den Hintergrund und führten statt dessen eine an die diagnostische Bildgebung angelehnte Beschreibung der Tumorausdehnung ein [2].

Stadium	Tumorausdehnung
T1	Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen ohne Os sphenoidale
T2	Nasen- und Nasennebenhöhlen mit Befall des Os sphenoidale
T3	Ausdehnung nach intrakranial und intraorbital
T4	Ausdehnung nach intrazerebral
N	regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen

Abbildung 2.4: **TNM-Klassifikation nach DULGUEROV und CALCATERRA [2]**

Histomorphologische Klassifikation

HYAMS et al. des AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*) etablierten ein histologisches Klassifikationssystem für das Ästhesioneuroblastom beim Menschen, basierend auf dem Grad der Differenzierung, der zellulären Anaplasie und der Mitoserate auf und stellten eine Korrelation mit der Prognose fest.

Merkmal \ Grad	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
lobuläre Zytoarchitektur	++	++	+/-	-/+
uniforme Nuclei	++	+/-	-/+	-
Mitosen	-	+	++	++
Verkalkungen	+/-	+/-	-	-
Nekrosen	-	-	+/-	++
fibrillärer Hintergrund	+++	++	+/-	-
HW-Rosetten	+/-	+/-	-	-
FW-Rosetten	-	-	++	-

Abbildung 2.5: **Klassifikationssystem nach HYAMS [3]**

Dieses Schema unterscheidet vier Grade. Der am höchsten differenzierte Grad 1 beinhaltet eine lobuläre Zytoarchitektur und neurofibrillärer Matrix mit uniformen, unscharf begrenzten, kleinen runden, Zytoplasma-armen Zellen und unscheinbaren Kernkörperchen. Homer-Wright Rosetten und Pseudorosetten treten regelmäßig auf. Die mitotische Aktivität ist sehr gering oder abwesend. Nekrosen sind kaum zu beobachten und es können Verkalkungen auftreten. Der Grad 2 ähnelt stark dem Grad 1. Die Mitoserate steigt jedoch an und die Zellen werden polymorpher. In Tumoren vom Grad 3 verliert sich die lobuläre Zytoarchitektur. Die Zellen sind ausgeprägt polymorph und im Gegensatz zu Grad 1 und 2 nimmt die mitotische Aktivität stark zu. Häufig sind Nekrosen und Flexner-Wintersteiner-Rosetten

zu beobachten und die fibrilläre Komponente ist nur selten zu finden. Der Grad 4 zeichnet sich durch Verlust jeglicher Zytoarchitektur mit anaplastischen Zellen mit pleomorphen Kernen und prominenten eosinophilen Nukleoli. Die Mitoserate ist sehr hoch (viele atypische Mitosen) und es treten ausgedehnte Nekroseherde auf. Die verschiedenen histologischen Grade können innerhalb des Tumors vermischt sein. Differenzierte Ästhesioneuroblastome sind mittels der Lichtmikroskopie leicht diagnostizierbar. Schwierigkeiten entstehen mit zunehmenden Grad der Entdifferenzierung [3, 7]. In den letzten 15 Jahren findet dieses Schema beim Menschen [21, 22, 24, 32, 41] und auch beim Tier [9, 12, 37] zunehmend mehr Anwendung.

Elektronenmikroskopie

Dieses Verfahren ist ein nützliches Werkzeug zur Diagnose des Ästhesioneuroblastoms. Zunächst fallen die 50-250 nm großen, dichten, membranbegrenzten neurosekretorischen Granula auf. Daneben sind neuritische Zellfortsätze zu beobachten, die Mikrotubuli, Neurofilamente und selten synaptische Strukturen oder gar Axone enthalten [42]. Zusätzlich sind auch den Schwann'schen Zellen ähnliche Strukturen sichtbar [2, 3, 7, 43–45].

2.1.9 Immunhistochemie

Regelmäßig ist in Ästhesioneuroblastomen eine Expression von NSE (Neuronenspezifische Enolase) zu finden. Ein Grossteil der Tumoren reagiert immunhistochemisch positiv auf Synaptophysin, NFP (Neurofilament-Protein), Beta-Tubulin Klasse III und MAP-2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2). Zusätzlich kann eine Immunreaktivität für Chromogranin und/oder GFAP (engl.: *glial fibrillary acidic protein*) vorliegen. S-100 färbt lediglich die Stützzellen, die teils in der Peripherie der Läppchen liegen, an.

Zytokeratin wird meist nicht exprimiert. Es gibt jedoch Einzelfälle mit wenigen positiven Zellen. Epitheliale Marker, wie z.B. EMA (engl.: *epithelial membrane antigen*) und CEA (engl.: *carcinoembryonic antigen*) sind immunhistochemisch negativ. Das gleiche gilt für LCA (engl.: *leucocyte common antigen*), einen Marker zum Ausschluss von malignen Lymphomen, Desmin, immunhistochemisch positiv in embryonalen Rhabdomyosarkomen, und HMB-45, zur Abgrenzung von

malignen Melanomen [2–4, 7, 36, 37].

2.1.10 Differentialdiagnosen

Für das Ästhesioneuroblastom wichtige Differentialdiagnosen sind [7, 44]:

- das sinonasale undifferenzierte Karzinom (SNUC)
- das neuroendokrine Karzinom (NEC)
- das maligne Lymphom
- das embryonale Rhabdomyosarkom
- das maligne Melanom.

Zusätzlich werden das Plasmozytom, das Hypophysenadenom, periphere primitive neuroektodermale Tumoren und das Ewing´s Sarkom erwähnt [3, 24, 32, 32, 45].

2.1.11 Therapie und Prognose

Aufgrund der Lokalisation des Ästhesioneuroblastoms in der Nasenhöhle wird zunächst eine Inspektion (Rhinoskopie bzw. Nasopharyngoskopie) sowie eine Entnahme von Biopsie vorgenommen. Danach wird mit Hilfe von MRT (Magnetresonanztomographie) und CT (Computertomographie) die Weichteilinfiltration und das Ausmaß der Knochendestruktion erfasst. Als Mittel der Wahl gilt in der aktuellen Literatur eine stadienadaptierte (siehe Abbildung 2.3 und 2.4) Kombination aus operativen Maßnahmen (kraniofaziale Resektion) und Radiotherapie, seltener Chemotherapie [7, 23, 32, 40].

Die Prognose wird mit dem klinischen Klassifikationssystem korreliert (KADISH et al., [1, 7], siehe S. 19). Die 5-Jahres-Überlebensrate für das Ästhesioneuroblastom beim Menschen ist folgendermaßen gewichtet:

- **Stadium A:** 75-91 %
- **Stadium B:** 68-71 %
- **Stadium C:** 41-47 %.

Die 10- bzw. 15-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 71 bzw. 68 % [7, 21, 23, 32].

2.2 Die Regeneration im Riechepithel

2.2.1 Grundlagen

Für die meisten Säugetiere, wie z.B. für den Hund und die Katze trägt der Geruchssinn wesentlich zur Orientierung in der Umwelt, zur Nahrungssuche und zur Unterscheidung von Freund und Feind bei, aufgrund dessen sie als Makrosmatiker bezeichnet werden. Die olfaktorische Riechschleimhaut überzieht speziesspezifisch die Siebbein- und Nasenmuscheln sowie die Wandung des Siebbeins im *Fundus nasi*. Dieses sog. Riechfeld besitzt eine Größe von 75 cm² beim Dackel bis zu 150 cm² beim Deutschen Schäferhund, während es bei der Katze lediglich 4 cm² groß ist. Weiterhin von Riechschleimhaut ausgekleidet ist das *Organum vomeronasale*, das am Boden der Nasenhöhle beidseitig direkt neben der Scheidewand liegt [46].

Regio olfactoria

Die *Regio olfactoria* besteht aus dem Riechepithel und der darunter liegenden *Lamina propria*. Das Riechepithel ist ein mehrreihiges Epithel, das aus drei Zelltypen besteht:

- Riechzellen
- Stützzellen
- Basalzellen

Die primären bipolaren Riechzellen (ORNs, engl.: *olfactory receptor neurons*) besitzen je einen nach apikal ziehenden dendritischen Fortsatz, der in einer knopfartigen Verdickung, *dendritic knob* genannt, endet. Von diesem aus ragen viele, sehr lange Zilien in die Nasenhöhle. Die Axone der Riechzellen reichen bis zu dem frontal im Hirn liegenden *Bulbus olfactorius*. Die Glia-ähnlichen Stützzellen (Sustentacularzellen) im apikalen Bereich des Epithels besitzen zahlreiche, lange Mikrovilli, welche zusammen mit den Zilien der Sinneszellen ein dichtes Netzwerk formen. Beide Zelltypen ragen bis an die Basalmembran heran. Die Basalzellen werden in zwei Gruppen unterteilt: die horizontalen, sich langsam teilenden (alle 60 Tage) und die rundlichen, sich schneller teilenden (täglich) Basalzellen [47, 48].

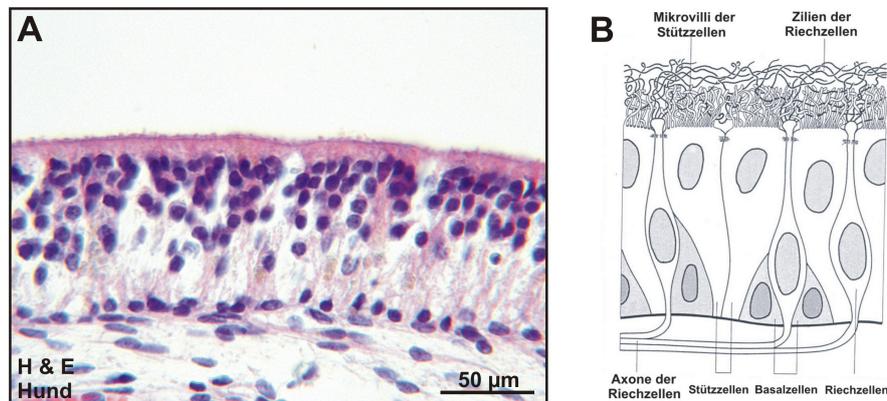


Abbildung 2.6: **Aufbau der Riechschleimhaut. A H&E Schnitt. B Schematische Darstellung [47].**

Die Axone der Riechzellen sind von den sog. *olfactory ensheathing cells* (OEC) umgeben, die mit ihren Zellfortsätzen die Neuriten umschlingen. Sie dienen zu ihrer Regeneration [43].

In der *Lamina propria* befinden sich zahlreiche BOWMAN-Drüsen. Sie produzieren ein dünnflüssiges, die Schleimhaut überziehendes Sekret, in welches das Netzwerk aus Zilien und Mikrovilli eingebettet ist [46, 47, 49, 50].

Riechzellen

Das olfaktorische Neuroepithel ist, neben den neuronalen Zellen der subventrikulären Zone und des *Gyrus dentatus*, eines der eindrucksvollsten Beispiele kontinuierlicher Neurogenese im Adulten. Die Stammzellpopulation mit dieser regenerativen Kapazität ist derzeit noch schlecht fassbar. Die rundlichen Basalzellen scheinen aufgrund ihrer hohen Teilungsrate und der Anfärbbarkeit mit Markern für neuronale Vorläuferzellen oder Stammzellmarker den Pool der Stammzellen des Riechepithels zu bilden [48, 50]. LEUNG et al. wies jedoch kürzlich an horizontalen Basalzellen ähnliche Ergebnisse auf [51].

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor der olfaktorischen neuronalen Vorläuferzellen ist Hash1, das humane Homologon des *Drosophila achaete-scute* Gens, der seit kurzem als ein Tumormarker in humanen Ästhesioneuroblastomen Anwendung findet [52].

Apoptose im olfaktorischen Neuroepithel

Sowohl die ausgereiften Riechzellen als auch die Vorläuferzellen und die runden Basalzellen, nicht jedoch die Stützzellen und die horizontalen Basalzellen unterliegen physiologischerweise der Apoptose. Eine wichtige Rolle spielen bei diesem Vorgang die Stützzellen. Sie phagozytieren die zugrunde gegangenen Zellen. Die Riechzellen regulieren diesen Prozess selbst durch verschiedene Faktoren, wie z.B. den Tumornekrosefaktor (TNF) [50, 53].

2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis neuronaler Antigene

Neuronale Antikörper erkennen durch das Verfahren der Immunhistochemie Antigene meist von Proteinen in Nervenzellen des ZNS und PNS. Man unterscheidet Marker für das neuronale Soma bzw. den Nukleus. Die immunhistochemische Reaktion wird durch einen an den Antikörper gekoppelten Farbstoff sichtbar.

Beispiele für derartige Proteine sind: Die **NSE** (neuronenspezifische Enolase, ein Enzym der Glykolyse, siehe Kapitel 2.4.3.), **Chromogranin** (ein Glykoprotein, das mit den neurosekretorischen Granula verschiedener Zelltypen assoziiert ist), **Synaptophysin** (ein Glykoprotein in Membranen von präsynaptischen Vesikeln), **NeuN** (*neuronal nuclei*, ein regulatorisches Phosphoprotein mit DNA-Bindungseigenschaften), siehe Kapitel 2.4.5.), **MAP-2** (das Mikrotubuli-assoziiertes Protein, ein u.a. die Mikrotubuli stabilisierendes Phosphoprotein, siehe Kapitel 2.4.4.) und **Neurofilament** (Proteine, die einen Großteil des neuronalen Zytoskeletts ausmachen), u.a. [54].

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Marker kurz vorgestellt.

2.2.3 NSE (neuronenspezifische Enolase)

Allgemeines

Die Enolase ist ein löslicher Biokatalysator der Glykolyse, der in verschiedenen Isoformen in den Neuronen des ZNS und des PNS sowie in den sog. APUD-Zellen vorkommt [55]. Dieses Enzym wurde erstmals von MOORE et al. 1965 isoliert und zunächst als 14-3-2 [56] und später als neuronenspezifisches Protein bezeichnet (NSP). Nach Erkennen seiner Funktion als glykolytisches Enzym wurde der Begriff neuronenspezifische Enolase (NSE) geprägt [57, 58]. Das Protein

wurde bisher beim Menschen [59], beim Primaten [60], beim Hund [61], bei der Katze [62], beim Rind [63], beim Pferd [64], beim Kaninchen [56], beim der Ratte [65], beim Huhn [66] und vielen anderen nachgewiesen.

Struktur und Charakteristika

Die NSE Protein besteht aus 433 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 78-82,5 kDa. Die Halbwertszeit beträgt etwa 20 Stunden [55]. Die verschiedenen Isoformen sind Homo- bzw. Heterodimere aus drei möglichen immunologischen Untereinheiten α , β und γ [58]. Von diesen Kombinationen treten jedoch nur fünf auf [55].

- $\alpha\alpha$ in Embryonen (gewebeunspezifisch, im Gehirn als nicht-neuronale Enolase (NNE) bezeichnet) und in der Leber
- $\beta\beta$ und $\alpha\beta$ in Herz- und Skelettmuskulatur
- $\alpha\gamma$ und $\gamma\gamma$ in Neuronen

NSE zeichnet sich im Gegensatz zu NNE durch eine höhere Stabilität gegenüber Chloriden, Harnstoff und höheren Temperaturen (50°C) aus. Während der Entwicklung werden hauptsächlich Heterodimere synthetisiert [55, 67, 68].

Die höchsten Konzentrationen der neuronenspezifischen Enolase weist das humane Hirngewebe mit 4000-21000 ng NSE/mg lösliches Protein auf. In Abhängigkeit von der untersuchten Region schwankt die Menge von 0,4 bis 2,2% des löslichen Gesamtproteins. Die Werte beim Menschen reichen von 8500 in der Epiphyse über 900 im Nebennierenmark bis zu 4-12 im Serum bzw. 1-3 ng NSE/mg lösliches Protein im Liquor [55].

Lokalisation und Expression

Die neuronenspezifische Enolase ist im Zytoplasma, in den Dendriten und in den Axonen, jedoch nicht im Nukleus lokalisiert [68]. Die erstmalige Expression von NSE in der Nervenzelle scheint mit ihrer Reife assoziiert zu sein [69]. Während der Fetalentwicklung, mit Beginn der Neurogenese bzw. der neuralen Aktivität, wird aufgrund der intraneural steigenden Chloridkonzentration von der α -Isoform auf die γ -Variante umgeschaltet („switch“) [65, 67, 70]. In fetalem Hirngewebe und in Gliazellen des adulten Hirns wird am meisten das Enzym NNE synthetisiert [58, 65, 71], während die NSE-Konzentration sehr niedrig ist [72]. Adulte

Neuronen exprimieren aufgrund des vorher erwähnten „*switch*“ auf NSE nur geringe Konzentrationen an NSE. In neuroendokrinen Zellen hingegen erfolgt diese Umschaltung lediglich partiell, was die niedrigere Konzentration von NSE bezogen auf das lösliche Gesamtprotein erklärten [55].

NSE besitzt sowohl für die Nervenzellen des ZNS und des PNS als auch für neuroendokrine Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems (DNES), früher als APUD-System (engl.: *amine precursors uptake and decarboxylation*) bezeichnet, eine Spezifität. Hierzu zählen Zellen des Hypophysenvorderlappens, der Epiphyse, des *Glomus caroticum*, die parafollikulären Schilddrüsenzellen, endokrine Zellen im Bereich des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas und die Zellen des Nebennierenmarks [55, 73]. Auch Tumoren dieser Zellen exprimieren NSE [55]. Außerdem kann NSE in peripheren neuroendokrinen Geweben, wie das diffuse neuroendokrine Zellsystem in der Lunge, im Intestinum, im Thymus und in der Haut nachgewiesen werden [74, 75]. Weiterhin exprimieren bestimmte sensorische Zellen wie Geschmacksrezeptoren [76] und die MERKELschen Tastrezeptoren der Haut die γ -Enolase [76, 77]. Aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit zu Neuronen werden diese Zellen als Paraneuronen bezeichnet [78]. Während die Isoform $\gamma\gamma$ in diesen Geweben überwiegt, dominiert die Isoform $\alpha\gamma$ in anderen, weder neuronalen noch neuroendokrinen Geweben, die dann auch als NSE-positiv gelten. Dazu zählen glatte Muskelzellen in viszeralen Organen und in Blutgefäßen, die Myoepithelzellen in Speicheldrüsen, die juxtaglomerulären Apparate in der Niere, die apokrinen Drüsen und die Mamma, Plasmazellen. Auch T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten können immunhistochemisch positiv reagieren [55, 67, 79].

Die transformierten oder tumorös entarteten Zellen der vorher genannten NSE-exprimierenden Gruppen synthetisieren ebenfalls dieses Enzym [74].

Signalwege und Funktion

Die Enolase stellt neben 10 weiteren Enzymen eine Gruppe von Biokatalysatoren des anaeroben Glukosestoffwechsels dar. Sie katalysiert die Dehydratation von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Daneben hat NSE neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften. Die enge Verbindung zwischen NSE-Gehalt und funktioneller Aktivität der Nervenzellen weist auf eine enge Regulation und Anpassung der metabolischen Enzyme an den aktuellen Status der Zelle hin

[80, 81]. GROSS et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen der Stoffwechselrate und der NSE-Konzentration in einigen Hirnarealen, z.B. den pyramidalen Zellen des Kortex bzw. einigen Zellen des Kleinhirns nach, was zu der Annahme führt, dass der NSE-Gehalt der Zelle von seiner synaptischen Aktivität, dem Grad der Stoffwechselaktivität und damit dem Ausmaß der benötigten Energie, gewonnen durch Glykolyse, abhängig ist [66]. Daraus ergeben sich unterschiedliche NSE-Konzentrationen auch innerhalb der verschiedenen Neuronenklassen. So ist im adulten humanen Gehirn die Menge an NSE in der grauen Substanz (z.B. Neokortex) höher als in der weißen Substanz (z.B. *Tractus corticospinalis* (Pyramidenbahn), *Corpus callosum*) [55]. Unterstützt wird diese Behauptung weiterhin durch die während der Fetalentwicklung stattfindenden Umschaltung der Synthese von NNE auf NSE primär in phylogenetisch älteren Arealen wie der *Medulla oblongata*, der *Pons* und des Thalamus [82]. Durch Behandlung von Neuroblastomen mit Agentien, welche die neuronale Differenzierung unterstützen, steigt die Konzentration von NSE stark an. Folglich scheint NSE mit der neuronalen Differenzierung korreliert zu sein [83].

Klinische Relevanz

NSE ist bei Mensch und Tier seit über zwei Jahrzehnten ein nützlicher Marker zur Unterscheidung neuronaler und nicht-neuronaler Tumoren, z.B. humanen Retinoblastomen [84] und Tumoren des *Plexus choroideus* [59], caninen Meningiomen [85] und felines Ganglioneuroblastomen [62]. Die teils fokal positive immunhistochemische Reaktion z.B. in Glioblastomen, Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Ependymomen, Medulloblastomen, Meningiomen, Choroidplexus-Papillomen und reaktiven Astrozyten, welche eine negative Reaktion erwarten lassen, ist irreführend [77]. Auch in Ästhesioneuroblastomen bei Mensch und Tier ist die neuronenspezifische Enolase ein gebräuchlicher immunhistochemischer Marker zum Ausschluß verschiedener Differentialdiagnosen (siehe Kapitel 2.1.11.) [4, 7, 36, 37, 43, 86–88]. Maligne Melanome können ebenfalls immunhistochemisch positiv reagieren [89].

NSE ist ebenfalls ein wichtiger Marker zur Differenzierung endokriner und neuroendokriner Tumoren, wie z.B. Inselzelladenomen, Phäochromozytomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber, des Thymus, der Mamma, der Haut und der Lunge

[61, 74, 75, 90, 91].

Bei verschiedenen Störungen wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen, Lungenerkrankungen, degenerativen oder entzündlichen Hirnerkrankungen, zerebralen Insulten, Neoplasien (z.B. Neuroblastomen [92] und kleinzelligen Bronchialkarzinomen [93]) u.ä. steigen aufgrund eines veränderten Stoffwechsels bzw. dem Untergang der oben erwähnten Zellen die Serumwerte von NSE an. Durch die Ermittlung dieser Werte können Aussagen über den Verlauf bzw. die Prognose getroffen werden. Der physiologische obere Grenzwert im Liquor beim Menschen liegt bei $12,5 \mu\text{g/l}$. NSE tritt dabei aufgrund der Zerstörung der Zellen in das Serum bzw. den Liquor über. Auch bei zerebralen Schäden durch Hypoxie steigen die Serumwerte von NSE an, was dieses Enzym zu einem nützlichen prognostischen Marker macht. NSE dient daneben als Index für die neuronale Regeneration und die Reinnervation [94].

2.2.4 MAP-2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2)

Allgemeines

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein-2 (MAP-2) ist ein hitzestabiles Phosphoprotein der Familie MAP-2/Tau, die ebenfalls die Proteine MAP-4 und Tau enthält. Während MAP-2 und Tau in Neuronen detektiert werden kann, ist MAP-4 nur in nicht neuronalen Geweben nachweisbar [95]. Eine Reaktivität konnte bisher bei Mensch [96], Hund [97], Katze [98], Gerbil [99], Rind [100], Maus [101], Ratte [102, 103] und Wachtel [104] festgestellt werden.

Struktur und Charakteristika

MAP-2 besitzt wie auch die anderen Mitglieder der Familie alternative Spleißformen, die auf der Basis des Molekulargewichtes in zwei Gruppen eingeteilt werden [105].

- MAP-2a und MAP-2b (hochmolekular)
- MAP-2c und MAP-2d (niedermolekular)

LEWIS et al. wiesen in murinen Gehirnen zwei, allen Isoformen gemeinsame strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen nach [95]: Der Carboxyl-Terminus, kurz C-Terminus genannt, bindet mit vielen sog. *repeats* an Tubulin,

d.h. an die Mikrotubuli [106]. Jede dieser Einheiten enthält ein spezielles Motiv, durch dessen Phosphorylierung die Regulation der Bindung der MAPs an die Mikrotubuli erfolgt [107]. Der in seiner Größe variierende Amino-Terminus (N-Terminus genannt) kann an andere Mikrotubuli, Intermediärfilamente, zelluläre Vesikel und Zellorganellen binden. Diese Domäne besitzt eine stark negative Nettoladung, die infolge eines hohen Gehalts an Prolin und geladenen Aminosäuren [108] entsteht. Dadurch dient der N-Terminus auf der einen Seite als eine Art Abstandshalter für verschiedene Komponenten des neuronalen Zytoskeletts, auf der anderen Seite vernetzt er diese [108, 109]. Daneben bietet dieser Terminus eine Vielzahl von Verankerungsplätzen für Enzyme, z.B. für die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) [108]. Die PKA phosphoryliert MAP-2 und führt so zu einer reduzierten Affinität für Mikrotubuli [107]. Die verschiedenen Isoformen variieren sowohl in der Länge der Projektionsdomäne als auch in der Anzahl der Mikrotubuli-bindenden Einheiten. So ist MAP2c relativ kurz, während der N-Terminus bei MAP2a und 2b länger ist [105].

MAP-2 liegt ähnlich den anderen Proteinen dieser Familie ungefaltet vor. Dies macht die Proteine stark unabhängig von Umwelteinflüssen, wie z.B. hohen Temperaturen oder extremen pH-Werten [110]. Die einzige Region, die eine Sekundärstruktur formt, ist eine Domäne des N-Terminus, die allen Isoformen gemein ist und die mit der regulativen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) interagiert [95].

Lokalisation und Expression

Das Protein MAP-2 der Säugetiere ist hauptsächlich im Zellsoma und den Dendriten von Neuronen nachweisbar. Die Expression in neuronalen Vorläuferzellen ist schwach und nimmt ab etwa einen Tag nach Expression der Neuronenspezifischen Isoform von Tubulin β III zu [111]. MAP-2c ist die juvenile Isoform, die schon früh in der neuronalen Differenzierung herunterreguliert wird und als einzige auch in Axonen vorkommt [108, 112], während MAP-2b sowohl prä- als auch postmitotisch gebildet wird. MAP-2a hingegen wird erst bei abfallenden MAP-2c-Werten exprimiert und ist nicht einheitlich in allen reifen Neuronen detektierbar [103].

Kurz nach der Axogenese wird MAP-2 in die aufkeimenden Dendriten abgesondert, während Tau in die Axone segregiert. Dies weist auf eine Assoziation der

MAPs mit spezifischen Aspekten der neuronalen Differenzierung hin [113]. Ursächlich dafür kommt eine Kombination aus der Proteinstabilität [114], Sortierung anhand des N-Terminus [115] und Dendriten-spezifischer Transport von MAP-2 mRNA [116] in Betracht. Diese räumliche Trennung bleibt auch in den reifen Nervenzellen erhalten [95].

Obwohl MAP-2 ein primär neuronales Protein des ZNS ist, können einige Isoformen auch in Nervenzellen des PNS bzw. in nicht-neuronalen Zellen auftreten. Beispielsweise exprimieren Spinalganglien von Ratten dieses Protein [102]. Vorstufen von Oligodendrozyten, nicht jedoch reife Oligodendrozyten reagieren auf anti-MAP-2c immunhistochemisch positiv [117]. Auch in vielen Zellen des Hodens ist MAP-2 detektierbar [118]. In einer Studie an Ratten von PAPASOZOMENOS et al. konnte eine Expression von MAP-2 in Astrozyten des *Nervus opticus*, aber nicht in Astrozyten des *Tractus opticus* feststellen [119].

Signalwege und Funktion

Die Familie der MAP-2/Tau-Proteine ist bekannt für ihre Mikrotubulistabilisierende bzw. -bindende Aktivität [120]. Dadurch wird die Rigidität der Mikrotubuli erhöht und damit die Zytoarchitektur, insbesondere die der neuronalen Fortsätze gefestigt [121]. Weiterhin spielen sie eine mögliche Rolle als Regulator innerhalb des Netzwerks der Mikrotubuli in den Axonen und Dendriten. Zusätzlich gibt es immer mehr Hinweise auf eine breitere Spannweite ihrer Aufgaben, z.B. Bindung an F(Filament)-Aktin, Rekrutierung von Signalproteinen und Regulation des Mikrotubuli-assoziierten Transports [95, 108].

Die Fähigkeit der MAPs mit F-Aktin, einer Untereinheit der Aktinfilamente, zu interagieren scheint eine Schlüsselrolle für spezifische biologische Funktionen darzustellen. So induziert MAP-2c durch diese Assoziation die Bildung von Neuriten [122]. An Mäusen mit MAP-2-knock-out konnte festgestellt werden, dass homozygote Tiere keine großen Defekte in der Morphologie des Gehirns aufwiesen, die Dichte der Mikrotubuli in den Dendriten jedoch reduziert war. Weiterhin lagen die Dendriten verkürzt vor, was für eine ihre Elongation unterstützende Funktion von MAP-2 spricht [101]. MAP-2 ist ebenfalls fähig, mit großer Affinität an Neurofilamente zu binden [100].

MAP-2 hat aber auch im Rahmen der Signaltransduktion eine entscheidene Be-

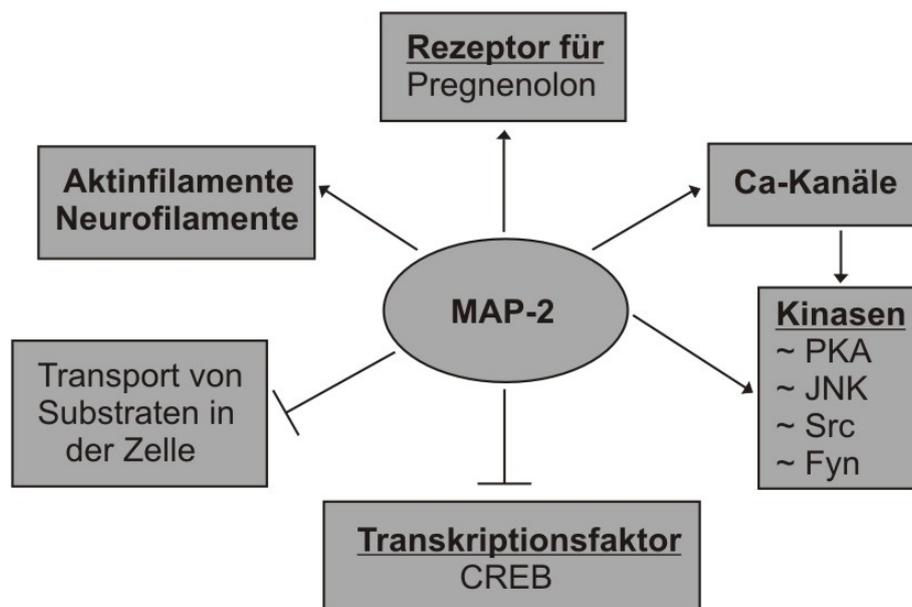


Abbildung 2.7: **Signalwege von MAP-2.** Das Protein bindet an Aktin- und Neurofilamente und dient damit der Stabilisierung des Stützgerüsts der Zelle. MAP-2 dient als Rezeptor für das Neurosteroid Pregnenolon. Es stellt aber auch einen Bindungspartner vieler Kinasen, wie z.B. der PKA (Protein-kinase A) dar, die eine Reihe von Substraten in der Zelle phosphorylieren. Daneben bindet es an Calcium-Kanäle und inhibiert den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*). MAP-2 inhibiert aber auch kompetitiv den Kinesin- und Dynein-abhängigen Transport entlang der Mikrotubuli.

deutung. Seine Bindung an die regulatorische Einheit II der cAMP-abhängigen Proteinkinase A ist eines der am besten untersuchten Beispiele. MAP-2 ist der wichtigste Anker der PKA wie auch der JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) [123] in den Dendriten. Die PKA wiederum phosphoryliert eine Reihe von im Zytoskelett enthaltenen Substraten und Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen. Die Phosphorylierung von MAP-2 führt zu einer reduzierten Affinität für Mikrotubuli [107]. Das Protein reduziert weiterhin die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) [101, 124]. MAP-2 dient auch als Rezeptor für Pregnenolon, ein Prohormon der Steroidhormone, welches die Vorläufersubstanz der Steroidhormone darstellt. Durch deren Bindung wird das Wachstum der neuronalen Fortsätze gefördert [125].

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein-2 interagiert zusätzlich mit anderen Kinasen, z.B. mit der Tyrosinkinase c-Src, der Tyrosinkinase Fyn [126]. Src und Fyn sind Mitglieder der Src-Familie. Sie sind in die Rezeptor-Signalkette der T- und B-Lymphozyten sowie der Wachstumsfaktoren und Zytokine integriert. Weiterhin ist das Protein an der Aktivierung der Blutplättchen, der Zelladhäsion, der Funktion der Ionen-Kanäle, der Differenzierung der natürlichen Killerzellen, der Oligodendrozyten und der Keratinozyten sowie am Eintritt von Zellen in den Zellzyklus beteiligt. Weiterhin bindet MAP-2 an Kalziumkanäle der Klasse C (vom L-Typ), was zur Katalyse der Bindung der PKA an die Kanäle führt und so deren Aktivität erhöht. Diese Kalziumkanäle treten gehäuft auf der postsynaptischen Seite auf und sind ein wichtiger Regulator der Funktion der Neuronen [127]. MAP-2 inhibiert aber auch kompetitiv den Kinesin- und Dynein-abhängigen Transport entlang der Mikrotubuli (siehe Abbildung 2.7) [128].

Klinische Relevanz

An Gehirnen von Gerbilen konnte ein Zusammenhang zwischen Ischämie und sinkenden Werten für MAP-2 festgestellt werden [99, 129]. Auch nahm die Expression von MAP-2 nach peripherem oder zentralem Insult des felines *Nervus trochlearis* im entsprechenden Motorneuron ab [130]. KOIRALA et al. wiesen eine sinkende Expression von MAP-2 und damit degenerative neuronale Veränderungen bei mit FIV (felines Immundefizienz-Virus) infizierten Neuronen der Katze nach [131]. ZEPEDA et al. konnte mit Hilfe von MAP-2 die funktionale Reorganisation der felines Sehrinde nach fokalem ischämischen Insult darstellen [98].

MAP-2 ist am Wachstum, der Differenzierung und der Plastizität der Neuronen beteiligt, mit Schlüsselrollen in der neuronalen Antwort auf Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Neurotoxine, aber auch in der synaptischen Aktivität. Alle diese Studien sehen die Modifikation und die Reorganisation von MAP-2 als ein erstes Zeichen für die neuronale Funktion beeinträchtigender Prozesse an [132].

Als Tumormarker fand MAP-2 in der Humanpathologie bisher nur selten Anwendung. Sowohl die WHO [7] als auch ein großes Standardwerk der veterinärpathologischen Onkologie [37] nennen u.a. diesen Marker für das Ästhesioneuroblastom zur Abgrenzung der Differentialdiagnosen. In einer Studie von HASSELBLATT et al. zeigten PTPRs (*papillary tumour of the pineal region*) des Menschen eine Immunpositivität, während in Tumoren des *Plexus choroideus* eine Anfärbung weniger frequent auftrat [96]. BLÜMCKE et al. konnte in einer humanpathologischen Studie in Oligodendrogliomen, in der oligodendroglialen Komponente von Oligoastrozytomen, in anaplastischen Oligodendrogliomen bzw. Oligoastrozytomen (WHO Grad III), in Tumoren der Epiphyse, in malignen embryonalen Tumoren, nicht jedoch in Gliomen eine konsistente positive Farbreaktion auf MAP-2 feststellen. In 80 % der malignen Melanome (8/10) und 100 % der Rundzelltumoren der Lunge (2/2) manifestierte sich eine Expression von MAP-2. In diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) und anaplastischen Astrozytomen färbten sich nur Subpopulationen an, in zentralen Neurozytomen lediglich die Matrix. Ependymome, dysembryoblastische neuroepitheliale Tumoren (DNTs), reaktive Glia, reife Astrozyten und Oligodendrozyten waren nicht immunoreaktiv [133, 134].

In der Tierpathologie gibt es bisher nur einen Fall eines equinen Ästhesioneuroblastoms, bei dem anti-MAP-2 Anwendung fand. Es reagierten nur wenige Zellen immunhistochemisch [15].

2.2.5 NeuN

Allgemeines

NeuN stellt ein nukleäres, regulatives, DNA-Bindungseigenschaften besitzendes Molekül dar, welches 1992 von MULLEN et al. erstmals bei Vertebraten beschrieben und zunächst als A60 bezeichnet wurde [135]. BIER et al. beschrieb 1988 ein vergleichbares Protein bei *Drosophila melanogaster* [136]. Da es zu diesem Zeitpunkt bereits das neuronale zytoskelettale Protein A60 gab, wurde der Name NeuN (Neuronal Nuclei) geschaffen [137]. Dieses neuronenspezifische Antigen scheint ein früher Marker der neuronalen Differenzierung zu sein, der während der Adoleszenz persistiert und wichtig für die Entwicklung und die Funktion des Nervensystems ist. Es wurde in den verschiedensten Bereichen des zentralen (ZNS) und des peripheren Nervensystems (PNS) detektiert [135]. Kreuzreaktionen konnten bei Menschen [138], Primaten [139], Schweinen [140], Vögeln (z.B. Huhn) [141], Mäusen [135], und Ratten [135] nachgewiesen werden. Die Manifestation einer NeuN-Expression bei vielen vertebralen Spezies, läßt auf einen hohen Grad der Konservierung dieses Antigens schließen [142]. Obwohl dieser Antikörper eine breite Anwendung in der Forschung und in der Diagnostik findet und unbestreitbar mit verschiedenen postmitotischen, neuronaler Phänotypen korreliert, ist die molekulare Natur dieses Antigens wenig erforscht [142].

Struktur und Charakteristika

NeuN ist ein gut lösliches Protein, das in zwei elektrophoretisch unterscheidbaren Isoformen von 46 und 48 kDa vorkommt und intrazellulär mehrfach phosphoryliert vorliegt. Der Verlust von lediglich einer Phosphatgruppe ist kritisch für die eigentliche Funktion des Epitops [142]. So wird z.B durch permanente Depolarisation der Körnerzellen des murinen Kleinhirns die Expression von NeuN herunterreguliert [143]. Nach axonaler Verletzung variiert die Expression von NeuN in den verschiedenen neuronalen Populationen des ZNS und PNS. So wird nach einem Insult des *Nervus facialis* im PNS NeuN stark reduziert exprimiert, während nach einer Schädigung des *Tractus rubrospinalis* im ZNS die Expression erhalten bleibt [144]. Dies läßt auf eine Modulation der Expression mittels vieler verschiedener Signale schließen [144]. MULLEN et al. wiesen *in vitro* DNA-bindende Eigenschaften jedoch keine Funktionalität als nukleäres Matrixprotein nach. Diese Merkmale lassen auf eine Rolle als Nervensystem-spezifisches nukleäres regu-

latorisches Molekül schließen [135].

Lokalisation und Expression

NeuN ist typischerweise im Nukleus, im Perikaryon und proximal in den neuronalen Fortsätzen, nicht jedoch in den distalen Axonen und Dendriten detektierbar [54, 135, 145]. Beide Isoformen können sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei im Zellkern die 46 kDa- und im Zytoplasma die 48 kDa-Isoform dominiert. Innerhalb des Nukleus variiert die Konzentration von NeuN invers mit der von Chromatin, d.h. mit Dichte der DNA-Packung [142]. Die NeuN-positiven Zellen liegen fokal oder diffus verteilt [146].

NeuN ist ein für Neuronen des ZNS und PNS spezifisches Protein [54, 135, 140, 143]. MULLEN et al. stellten am PNS von Ratten eine immunhistochemische Reaktion u.a. in den *Ganglia spinales*, den *Ganglia paravertebrales*, dem *Plexus myentericus* (Auerbach-Plexus) und dem *Plexus submucosus* (Meißner-Plexus) des Darmes fest [135]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine generelle Immunreaktivität auf NeuN im Nervensystem vorhanden ist. Ausnahmen sind die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und die Zellen des *Lobus intermedius* der Hypophyse [135]. Bei ersteren handelt es sich um typische vom Neuralleiste abstammende sog. Paraneuronen, welche Neurotransmitter- oder Neurohormon-ähnliche Substanzen produzieren [78].

Die weiße Substanz reagiert bis auf wenige verstreut liegende ektopische Ganglienzellen immunonegativ [54, 135]. GFAP-positive Strukturen zeigen ebenfalls keine Farbreaktion [135]. Es gibt jedoch auch einige Neuronen, die dieses Protein in keinem Alter exprimieren. Dazu gehören die Photorezeptorzellen, sowie die meisten Zellen der inneren nukleären Schicht der Retina, die CAJAL-RETZIUS-Zellen des *Stratum moleculare* der embryonalen Großhirnrinde, die PURKINJE-Zellen des Kleinhirns, die Neuronen des *Nucleus dentatus* und des *Nucleus olivaris inferior*, die sympathischen Ganglienzellen sowie die Mitralzellen des *Bulbus olfactorius*. Immunhistochemische und biochemische Studien haben weiterhin gezeigt, dass alle Arten von Glia, wie die Oligodendrozyten der weißen Substanz, BERGMANNschen Stützzellen, Pinealocyten, Zellen der Adenohypophyse, Mantelzellen, SCHWANNsche Zellen und neuroendokrine Zellen des Intestinums dieses Protein nicht exprimieren [54, 135, 138, 145]. Dies gilt auch für reaktive Glia, wie aus Untersuchungen an pcd-Mäusen (*Purkinje cell degeneration*) hervorgeht

[135, 147].

In der murinen Neurogenese erscheint NeuN immunhistochemisch erstmals zu Zeitpunkten, welche mit dem Austritt der Nervenzellen aus dem Zellzyklus und/oder mit dem Beginn der terminalen Differenzierung dieser Zellen korrespondieren. Eine Immunoreaktivität ist im murinen Neuralrohr erstmals um den Tag 9,5 der embryonalen Entwicklung nachweisbar, die sich bis zum Tag 12,5 verstärkt [135].

Funktion

Eine starke kernbezogene Darstellung von NeuN lässt an eine nukleäre regulative Funktion dieses Proteins denken. Zum Teil ist es aber auch im Zytoplasma nachweisbar, wobei unklar ist, ob das Antigen hier eine Funktion hat oder ob es hier lediglich synthetisiert wird, bevor der Transport zurück in den Kern erfolgt. Seine Assoziation der Expression mit der neuronalen Differenzierung und die lebenslängliche Persistenz, lässt auf eine Rolle als permanenter Regulator Neuronenspezifischer Moleküle schließen. Auf der anderen Seite lässt die fehlende Bildung dieses Proteins in einigen Arten von Neuronen an weitere mögliche regulative Moleküle denken [135].

Klinische Relevanz

NeuN findet sowohl in der neuropathologischen Forschung als auch in der histopathologischen Diagnostik, nicht zuletzt aufgrund der sehr guten Färbeergebnisse an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Proben, eine weit verbreitete Akzeptanz als verlässlicher Marker für Neuronen [54, 142, 146]. Die spezifische Expression in postmitotischen Nervenzellen macht NeuN in der diagnostischen Neuropathologie zu einem nützlichen Werkzeug zur Unterscheidung von neuronal differenzierten Zellen von Vorläuferzellen und somit zur Abgrenzung von Differentialdiagnosen bzw. von weniger gut differenziertem Tumorgewebe [54]. An primären Tumoren des humanen Gehirns wurde eine Expression von NeuN in allen Arten von Gliomen mit Ausnahme des pilozytischen Astrozytoms gefunden [146]. Während PREUSSER et al. bei diffusen Astrozytomen, Ependymomen, oligodendroglialen Tumoren oder Gangliogliomen keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der NeuN-Expression und dem histologischen Tumorgrad feststellen konnte, bestand eine solche zwischen klassischen, desmoplastischen

und anaplastischen Medulloblastomen [146]. Auch EDGAR et al. und SOYLEMEZOGU et al. bestätigen die reguläre Expression von NeuN in zentralen Neurozytomen [148]. ENGLUND et al. konnten sogar mittels indirekter Immunfluoreszenz zusätzlich eine signifikante negative Korrelation zwischen der NeuN Expression und dem Ki-67 *labeling index* (LI) feststellen. Dies weist auf eine Abnahme der proliferativen Aktivität mit zunehmender neuronaler Differenzierung hin [149]. Im Gegensatz dazu stellten WOLF et al. in einer immunhistochemischen Studie zur Abgrenzung von Oligodendrogliomen von dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren (DNT) fest, dass alle verwendeten Oligodendrogliome immunonegativ auf NeuN waren, während knapp die Hälfte der DNTs (16 Fälle) eine positive Farbreaktion zeigten [150]. Daneben ermöglicht NeuN z.B. die Identifikation von neuronalen Elementen in Ganglionzelltumoren oder Hamartomen, in denen die Unterscheidung zwischen atypischen glialen Zellen und Neuronen Schwierigkeiten bereiten kann [54].

Weiterhin ist der Nachweis von NeuN für die quantitative oder semiquantitative Evaluierung des neuronalen Zellverlustes in ischämisch geschädigtem Gewebe sowie für das Studium des Verlustes von Neuronen bei Epilepsie oder neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung [151, 152]. Daneben wird NeuN zur Beobachtung der neuronalen Differenzierung von Stammzellen, z.B. im Hippocampus von Ratten eingesetzt [153].

Bei Hund und Katze fand dieser Antikörper bisher keine Anwendung.

2.3 Tumorwachstum

2.3.1 Einflüsse

2.3.2 Untersuchungen der Tumorzellproliferation

Grundlagen

Die Zunahme der Zellzahl bedingt das Wachstum eines Tumors. Dieser sog. Netowert ist die Zellzunahme durch proliferative Aktivität und der, durch Apoptose und Nekrose entstehenden, Zellverlust. Die proliferative Aktivität P , d.h. die Geschwindigkeit des Zellzyklus ergibt sich aus der Formel $P = G/T$. G steht dabei für die Wachstumsfraktion in Prozent und T für die Generationszeit. Letztere ist umgekehrt proportional zur proliferativen Aktivität. Eine hohe proliferative Aktivität kann daher das Ergebnis entweder einer hohen Wachstumsfraktion oder einer verkürzten Generationszeit sein. Beides ist ebenfalls möglich [154].

Definitionsgemäß ist ein Proliferationsmarker ein Marker, der ein Indikator für Zellen innerhalb der Wachstumsfraktion einer gegebenen Population ist [155].

Es gibt zur Messung der Wachstumsrate eines Tumors gut etablierte Techniken, wie z.B. die Inkorporation von mit Tritium versetztem Thymidin-Analoga, wie z.B. Bromodeoxyuridin (**BrdU**) oder Silberfärbung von nicht-Histon-Proteinen von Nukleolus organisierenden Regionen (**AgNORs**) [156]. Doch diese Methoden haben einen entscheidenden Nachteil: Sie sind aufwendig, kosten- bzw. zeit-intensiv und übersteigen die technischen Möglichkeiten der meisten pathologischen Einrichtungen. Im Gegensatz dazu ist die Immunhistochemie einfach, kosten-günstiger und den meisten Pathologen vertraut [157].

Der immunhistochemische Nachweis Proliferations-assoziiertes Antigens basiert auf dem Nachweis von endogenen Molekülen am histologischen Schnitt mittels spezifischer Antikörper. In der Regel handelt es sich hierbei um im Zellkern lokalisierte Antigene, wie z.B. **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) und **Ki-67**, die **DNA-Topoisomerase II** findet bisher selten Anwendung [158]. PCNA ist ein, für die DNA-Synthese essentielles, nukleäres, saures nicht-Histon Protein, das sich bei der Beurteilung von Neoplasien des Nervensystems in vielen Fällen als ungünstig erwiesen hat [159]. Das Enzym DNA-Topoisomerase II katalysiert die topologische Isomerisierung der DNA [154].

Nachstehend wird kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten Marker bzw. Methoden eingegangen.

2.3.3 Mitoseindex und Ki-67

Mitose-Index

Die Zählung von Mitosen ist einer der ältesten Wege, die Proliferation zu ermitteln, und findet besonders in der Tumorpathologie als diagnostisches Werkzeug Anwendung. Die Zählung erfolgt lichtmikroskopisch an Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Schnitten. Es gelten strikte Richtlinien, um nur eindeutige Kernteilungsfiguren zu zählen, pyknotische Kerne und verdächtige Zellen dagegen auszuschließen. Mitosen sind definiert als dunkle Ansammlungen von Chromosomen mit faserigen Ausläufern, die beim Spiel mit der Fokussierungsschraube dargestellt werden können. Die Kernmembran fehlt und das Zytoplasma ist eher basophil als eosinophil. Diese chromosomalen Ansammlungen können eine Konfiguration entsprechend der Metaphase, Anaphase oder Telophase annehmen. Der Mitose-Index (MI) wird definiert als Anzahl der eindeutigen Mitosefiguren innerhalb von 10, über die Fläche des HE-gefärbten Präparates verteilten, lichtmikroskopischen Gesichtsfeldern bei 400facher Gesamtvergrößerung. Die Gesichtsfeld des Gesichtsfeldes variiert dabei von Mikroskop zu Mikroskop. Essentiell für vergleichbare Ergebnisse ist es, die exakte Fläche des Gesichtsfeldes zu kennen oder die Anzahl der Mitosen auf eine bestimmte Anzahl von Tumorzellen, z.B. 1000 zu beziehen [154, 156].

Die Aussagekraft des Mitose-Index ist begrenzt, da einerseits nur ein Teil der proliferierenden Zellen Mitosefiguren erkennen lassen. Andererseits kann die Länge der mitotischen Phase, besonders in aneuploiden Tumoren, d.h. in Tumoren, deren Chromosomensatz abweicht, erheblich variieren. Um vergleichbare Indizes zu erhalten sind gewisse labortechnische Aspekte, wie eine standardisierte Schnittdicke und Färbung sowie eine zügige Fixierung der Probe obligatorisch. Zellteilungsprozesse können im ungenügend fixiertem Gewebe weiterlaufen bzw. eingeleitet werden, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt [154, 156].

Ki-67 Protein

Allgemeines

Das Ki-67 Protein ist ein nukleäres Protein, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Diese Eigenheit macht Ki-67 zu einem wertvollen Werkzeug zur Markierung der Zellproliferation mit klinischer Relevanz. 1983 gelang es GERDES et al., Mäuse gegen die Zellkerne von Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen zu immunisieren. Dazu wurde Mäusen Zellkerne von L428, einer aus Patienten mit Morbus Hodgkin abstammenden Zelllinie, injiziert. Der so entstandene monoklonale Antikörper erkannte ein nur in proliferierenden Zellen vorkommendes, in ruhenden Zellen jedoch abwesendes, Antigen [160].

Die Bezeichnung Ki-67 leitet sich von der Herkunftsstadt Kiel, und der Nummer des Originalklons ab [160]. Mittlerweile konnten in proliferierenden nicht-neoplastischen und neoplastischen Geweben verschiedener Spezies homologe Proteine nachgewiesen werden (Schaf, Hund, Rind, Kaninchen, Ratte). Entsprechende Proben färbten sich bei der Maus nur schwach und bei Schwein, Katze, Huhn, Taube überhaupt nicht an [161, 162]. Neben dem ursprünglichen Antikörper Ki-67, der nur zur Anwendung an unfixiertem Gewebe von Menschen und Primaten geeignet ist, wurden zusätzliche Antikörper entwickelt, die das Speziespektrum erweitern und das Ki-67 Protein bzw. sein Äquivalent auch im fixierten Gewebe nachweisen: MIB-1 (Mensch, Primat, Hund, Rind, Schaf, Pferd), MIB-5 (Ratte) und TEC-3 (Maus). MIB steht dabei für *Molecular Immunology Borstel*, das ursprüngliche Forschungszentrum [163].

Struktur und Charakteristika

Die für das Protein Ki-67 kodierende cDNA-Sequenz wurde 1993 von SCHLÜTER et al. veröffentlicht. Durch alternatives Spleißen des primären Transkriptionsproduktes wurden zwei, sich in einem Exon unterscheidende Protein-Isoformen mit einem Molekulargewicht von 320 bzw. 359 kDa generiert [164]. Das Protease-sensible Protein besteht aus repetitiven Einheiten und hat einen hohen Gehalt an zufällig verteilten Prolin-(8,2%) und Lysin-Aminosäuren (11,4%). Jede der sechzehn „Ki-67 Repetitionen“ enthält ein hochkonserviertes, das Epitop enthaltene, „Ki-67 Motiv“ [164]. Daraus ist eine Nukleinsäure-bindende Eigenschaft postulierbar.

Weiterhin erwähnenswert sind etwa 200 potentielle Phosphorylierungsstellen, eine ATP/GTP Bindungsstelle am C-Terminus, auf beiden Isoformen jeweils zehn Kern-Ziel-Erkennungssequenzen („nuclear targeting sites“) und die P-E-S-T Sequenzen (Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin), die als potentielle Erkennungssequenzen, für den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbau kurzlebiger Proteine dienen [165]. Dies könnte die relativ kurze biologische Halbwertszeit (60 - 90 min) und Labilität des Proteins erklären [166].

Die reguläre Halbwertszeit kann z.B. durch Induktion von Wildtyp p53 oder p21 nach DNA-Schädigung auf bis zu 60 Stunden ansteigen [167].

Lokalisation und Expression

Das Protein Ki-67 kann im Nukleus normaler und neoplastischer Zellen in allen Phasen des Zellzyklus, d.h. G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase, nachgewiesen werden. In ruhenden Zellen (G_0 -Phase) ist Ki-67 nicht detektierbar [168]. Untersuchungen über die Expression in der G_1 -Phase ergaben unterschiedliche Ergebnisse: Werden Zellen, die sich in der G_0 -Phase befinden (z.B. T-Lymphozyten), mittels PHA (Phytohaemagglutinin) zur Proliferation stimuliert, kann das Antigen erst ab der späten G_1 -Phase (G_{1A}) nachgewiesen werden. Hingegen ist in Zellen, die bereits eine Mitose durchlaufen haben, das Antigen bereits in der frühen G_1 -Phase (G_{1A}) detektierbar [169]. Die Konzentration der Expression ist nicht immer gleich. So können z.B. proliferierende Zellen bei Nährstoffmangel Ki-67 negativ werden. Grund dafür ist wahrscheinlich die unzureichende de novo Synthese [170].

In der S-Phase nimmt die Konzentration von Ki-67 zu und erreicht ihr Maximum in der G_2 /M-Phase. Die höchste Konzentration von Ki-67 besteht in der Metaphase und sinkt im Verlauf der Ana- und Telophase rasch ab. Unklar bleibt, ob das Antigen komplett abgebaut wird und so in jedem Zellzyklus de novo synthetisiert wird, oder ob die Konzentration auf ein bestimmtes Minimum abfällt [171–173].

Nicht nur die Expressionsstärke, sondern auch die Lokalisation von Ki-67 innerhalb der Zelle variiert im Verlauf des Zellzyklus auffallend stark [169]. Zu Beginn der G_1 -Phase bildet das Protein diskrete Foki im Nukleoplasma nahe der Kernlamina. Anschließend bindet es bis zur Mitte der G_1 -Phase an genau determinierten Stellen an die sich neu bildenden Nukleoli. In der S- und G_2 -Phase ist es im Nukleolus nachweisbar [174].

Zu Beginn der Mitose löst sich das Gefüge der Nuklei und der Nukleoli auf. Nach

der Destruktion der Kernlamina und Desintegration der Kernkörperchen verteilt sich ein Teil der nukleolären Peptide im Zellplasma. Ein anderer Teil, z.B. Fibrillarin, B23/Nukleophosmin und einige ribosomale Proteine sowie Ki-67 werden hochgradig phosphoryliert. Diese Proteine drängen sich in die Peripherie der kondensierenden Chromosomen. Zusammen mit Proteinen der nukleären Matrix und einigen RNA-Molekülen formen sie ein zu den Chromosomen eng benachbartes Netzwerk aus Fibrillen und Granula, die sogenannte perichromosomale Scheide [175–178]. Diese Scheide umgibt von der Prophase bis zur Telophase die Telomere jedes einzelnen Chromosoms wie ein Handschuh. Allerdings bleiben die Centromere ausgespart [179]. Für diese Struktur werden verschiedene mögliche Funktionen vorgeschlagen [177]:

- Organisation der Chromosomen
- Bildung einer Art Barriere um die Chromosomen herum
- Involvierung in die Kompartimentierung der Zellen während der Pro- und Telophase
- Bindungsstelle für chromosomale Proteine, die für die frühe Phase der Kernbildung notwendig sind

Die Proteine der perichromosomalen Scheide werden zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt [173].

In der Prophase, wenn die Kondensation der Chromosomen noch nicht beendet ist, reorganisiert sich Ki-67 und bildet ein über den Nukleus verteiltes, mit dem Chromatin assoziiertes Maschenwerk. In der Metaphase organisiert sich das Protein in Form eines feinen Netzes mit bäumchenartigen Fibrillen um die Chromosomen herum und wird in der Ana- und Telophase zunehmend granulär [169, 170, 180]. In der späten Telophase bildet das Protein aggregierende Herde, die sich mit den neu bildenden Nukleoli der Tochterzellen verbinden. Die Chromosomen decondensieren und die perichromosomale Scheide verschwindet [181]. Tritt die Zelle nicht erneut in den Zellzyklus ein, wird Ki-67 rasch über den Ubiquitin- und Proteasomen-abhängigen Weg abgebaut.

Signalwege und Funktion

Für Ki-67 sind entsprechend den bisherigen Erkenntnissen, insbesondere von

DUCHROW et al., die verschiedensten, z.T. gegensätzlichen Funktionen denkbar:

Das Protein kann vor der Mitose den Verlust der Integrität der Nukleoli und die Kondensation der Chromosomen katalysieren. Auch nach der Mitose ist es durch seine Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedensten Proteinen maßgeblich an der Reformation der Nukleoli sowie der Dekondensation der Chromosomen beteiligt. Diese gegensätzlichen Funktionen erklären sich vermutlich über den Phosphorylierungsstatus von Ki-67. Das physiologisch stark positiv geladene Protein, wird beim Übertritt von der G₂- in die M-Phase hochgradig phosphoryliert und dadurch in seinen biologischen Eigenschaften einschneidend verändert. Dabei begleitet Ki-67 Cyclin B1 [182] und damit den MPF (*mitosis-promoting factor*) in die Nukleoli und MPF bewirkt dann die Phosphorylierung der nukleolären Proteine und von Histon H1. Infolgedessen kommt es zum Verlust der Integrität dieser Organelle und die Chromosomen kondensieren. Verstärkt wird dieser Zusammenbruch noch durch Interaktion von pKi-67 mit Casein Kinase II und Protein Kinase C. Die Phosphorylierung kann aber auch Einfluss auf die Struktur des Proteins und damit das Zusammenspiel mit anderen Proteinen ausüben. Mit dem Ende der Mitose wird durch Dephosphorylierung von Ki-67 seine ursprünglichen Eigenschaften wieder hergestellt [182, 183].

Andere Interaktionspartner von Ki-67 sind [183, 184].

- **ribosomale Proteine:** Neubildung der Ribosomen
- **MCM2:** engl.: minichromosome maintenance deficiency 2 gene, Kontrolle des Eintritts in die S-Phase, DNA-Replikation
- **p95:** Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen
- **RanBP9:** engl.: Ran bindendes Protein, Verankerung der Mikrotubuli am Zentrosom (Ran, Ribonukleinsäure-assoziiertes nukleäres Protein)
- **DNA Helikasen:** Dekondensation der Chromosomen
- **RanBP7:** Transport von Makromolekülen, wie z.B. MPF (siehe oben)
- **Protein Phosphatase 2A:** Antagonisierung der Proteinkinasen, Dephosphorylierung
- **RBBP7:** Retinoblastoma bindendes Protein7, Remodellierung des Chromatins im Anschluss an die Mitose

Zusätzlich ist Ki-67 fähig, mit sich selbst zu interagieren und so polymere Strukturen, wie z.B. die perichromosomale Scheide zu bilden [185].

Durch Hemmung von Ki-67 kommt es vermutlich nicht zu einer kompletten Blockade der Mitose, sondern lediglich zu einer Prolongation [173].

Klinische Relevanz

Die Untersuchung der Proliferation somatischer Zellen ist für die Tumorforschung von grundlegender Bedeutung. Zum einen stellt die unkontrollierte Zellteilung eine der Schlüssel für die Tumorentstehung dar, zum anderen wird in der Routinediagnostik die quantitative Erfassung der Zellproliferation benötigt, um das biologische Verhalten von Neoplasien vorherzusagen [173]. Ein solcher Proliferationsmarker stellt der monoklonale Antikörper Ki-67 dar. Wie bereits erwähnt, führt die Stimulation von peripheren Lymphozyten, also ruhenden Zellen, mit Phytohämagglutinin zu einer Expression von Ki-67 nach 24-36 Stunden [160]. Darüber hinaus konnte MCCORMICK et al. in einem experimentellen „Tumor Xenograft Modell“ eine exakte Korrelation zwischen dem Ki-67 Index und der Wachstumsfraktion feststellen [186]. Es ist daher in der histopathologischen Routinediagnostik möglich, mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen Ki-67 schnell und reproduzierbar die Wachstumsfraktion einer humanen Zell-Population immunhistologisch zu determinieren [157, 187].

Viele retrospektive Studien bewiesen, dass die Bestimmung der Wachstumsfraktion auf diese Weise tatsächlich ein unabhängiger prognostischer Marker ist [188–196]. Es gibt auch einige retrospektive Untersuchungen zu Tumoren des ZNS, wie astrozytischen und oligodendroglialen Tumoren und Meningiomen [197–201]. In den letzten zehn Jahren konnten ähnliche Ergebnisse ebenfalls am Tier erbracht werden [202–206].

2.4 Molekulare Tumorgenese

2.4.1 Grundlagen

Der Untergang von Zellen ist ein wichtiger Faktor im Tumorwachstum. Es gibt zwei Arten des Zelltodes: die Nekrose und die Apoptose. Das Tumorwachstum und die Tumorprogression hängen vom Wechselspiel einer Vielzahl von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ab, welche in einem Ungleichgewicht zwischen der Proliferation und dem programmierten Zelltod münden. Zwei dieser an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligten Genprodukte sind **p53** und **bcl-2**. Diese werden im nächsten Abschnitt kurz vorgestellt.

2.4.2 p53

Allgemeines

p53 stellt eine Schnittstelle im Geflecht der intrazellulären Signalwege dar. Das intranukleäre p53 ist ein Transkriptionsfaktor [207], der in die Reparatur der DNA, die Regulation des Zellzyklus und die Apoptoseinduktion involviert ist. Mutiertes p53 läßt diese Eigenschaften vermissen, was zu einer erhöhten Instabilität des Genoms führt. Dies stellt einen generellen Schritt in der Entwicklung von Neoplasien dar [208]. Das p53 Protein wurde 1979 als ein nukleäres 53 kDa schweres Molekül, gebunden an das *large transforming antigen* des SV40 DNA-Virus von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt [207, 209, 210].

Struktur und Charakteristika

Das humane Phosphoprotein p53 besteht aus 393 Aminosäuren. Eine Unterscheidung von mindestens drei funktionellen Domänen ist möglich. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne ist durch eine hohe Dichte saurer Aminosäuren und einige potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet. Der Amino-Terminus interagiert mit Proteinen des Transkriptionsapparates. Die in der Mitte gelegene spezifische DNA-Bindungsdomäne vermittelt die Oligomerisierung von p53-Monomeren und besteht aus überwiegend basischen Aminosäuren. An diese Domäne bindet auch das große T-Antigen des SV40-Virus. Die C-terminale Domäne bindet an unspezifische Sequenzen der DNA und assoziiert u.a. mit DNA-Doppelstrangbrüchen oder kurzer einzelsträngiger DNA, die durch

Fehler in der Replikation entstehen. Weiterhin lagert sich der C-Terminus in Form von stabilen Tetrameren an Orte kleiner Insertionen bzw. Deletionen der DNA an und die autoinhibitorische Wirkung des C-terminalen Restes auf die spezifische DNA-Bindung macht ihn zu einem Tumorsuppressor [211]. Die Inhibition wird mittels Phosphorylierung durch Proteinkinase C oder Caseinkinase II aufgehoben. Außerdem katalysiert diese Domäne die Reassoziierung von komplementären Einzelsträngen von DNA oder RNA und sie beinhaltet auch die Signalsequenzen für die Lokalisation von p53 im Zellkern [212, 213].

Das Tumorsuppressorgen *p53* weist in rund 50% aller humanen Tumoren Mutationen auf und ist somit das am häufigsten veränderte Gen in ihnen. Hierbei handelt es sich meist um Punktmutationen, die fast ausschließlich die zentrale DNA-Bindungsdomäne (90%) betreffen [214]. Die dadurch entstehenden funktionellen Störungen betreffen entweder die Induktion oder die Signalantwort von Wildtyp (wt) p53 [215]. Mutiertes p53 kann untereinander und mit wt p53 Oligomere bilden, wodurch es zu einer Veränderung von dessen Konformation und einer Störung der Interaktion mit der DNA kommt. [213].

Nicht mutiertes p53 besitzt eine geringe Halbwertszeit von 20-40 Minuten. Aufgrund des schnellen Abbaus mittels des intrazytoplasmatisch gelegenen Ubiquitin-Proteasom-Systems ist die Konzentration dieses Proteins gewöhnlich sehr gering. Durch die vorher erwähnten Mutationen kann sich die Halbwertszeit jedoch sehr verlängern [213].

Nach der Synthese von p53 Protein erfolgt seine posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung bestimmter Serinreste innerhalb des C- und N-Terminus sowie durch Azetylierung von Lysinresten innerhalb des C-Terminus [213].

Lokalisation und Expression

Eine positive immunhistochemische Reaktion mit einem p53-spezifischen Antikörper ist als granuläre oder diffuse Färbung des Zellkerns erkennbar [208]. Die Konzentration von p53 Protein ist nach der Mitose am geringsten und steigt während der G₁-Phase des Zellzyklus an. In der S-Phase und nach Einwirkung genotoxischer Substanzen wird p53 an Serinresten phosphoryliert. Die Funktion wird also über die Konzentration und die Phosphorylierung reguliert.

Die Funktion von p53 ist an seine Lokalisation im Zellkern gebunden, weshalb

der intra- bzw. extranukleäre Transport streng reguliert wird. Der Import von p53 in den Nukleus erfolgt aktiv mit Hilfe von sog. NLS (nukleären Lokalisationssignalen), in Verbindung mit dem Mikrotubulinetzwerk und Dynein [216]. Auch der Export findet durch, im Bereich des C-Terminus gelegene Signale, den sog. NES (nukleären Exportsignalen) statt.

Einige Tumoren besitzen wt p53, welches sich im Zytoplasma ansammelt und nicht mehr in den Zellkern transportiert werden kann. Durch die Abwesenheit von wt p53 im Zellkern kann dieses Protein nicht mehr seinen intranukleären Funktionen, als Wächter des Genoms nachkommen (siehe Absatz Signalwege und Funktion). Die Tumordisposition steigt an [215].

Signalwege und Funktion

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch verschiedene Formen von zellulärem Stress, wie z.B. Bestrahlung (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung), Hypoxie, durch medikamentös induzierten genotoxischen Schaden oder durch Onkogenaktivierung. Daraufhin kommt es zu einer Inhibierung des Zellzyklus, zu einer Induktion der Apoptose oder zur Hemmung der Angiogenese mit dem Ziel der Wachstumskontrolle gestresster Zellen [217, 218].

Die Induktion des Zellzyklusarrests ist ein wesentlicher Effekt der p53-Expression und kann irreversibel oder transient sein. p53 kontrolliert den Übergang von der G₁- zur S-Phase, ist aber auch fähig, den Zellzyklus zwischen der G₂- und der M-Phase, in Abhängigkeit von p21 (siehe nächster Abschnitt), zu stoppen. Daraufhin wird entweder eine Reparatur der DNA induziert oder die Zelle durch Apoptose zerstört [219].

Der Transkriptionsfaktor p53 bindet in Form eines Tetramers an die DNA verschiedener Zielgene und aktiviert oder unterdrückt diese somit. Dadurch reguliert es die meisten intrazellulären Vorgänge. Dies verhindert, dass genetisch veränderte Zellen unkontrolliert proliferieren und Tumoren entstehen [211]. Zu diesen Genen gehören u.a. *p21*, [220], *mdm2* engl.: *Murine Double Minute Chromosome -2* [221], *Gadd45* engl.: *Growth Arrest and Damage Dependent* [222], *bax* engl.: *bcl-2 associated X protein* [213] und *14-3-3 σ* [223]. Die Funktionen dieser Gene werden nachstehend kurz vorgestellt. Durch posttranslationale Modifikation, wie z.B. Phosphorylierungen durch Casein-Kinase II kann die DNA-Bindungsaktivität von p53 erhöht werden [224].

- **p21**: Inhibierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), Arrest des Zellzyklus
- **mdm2**: Inaktivierung der p53-vermittelten Transkription
- **Gadd45**: Arrest des Zellzyklus; Beteiligung am Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem
- **bax**: Einleitung der Apoptose
- **14-3-3 σ** : Arrest des Zellzyklus (Aufrechterhaltung des G₂-Blocks)

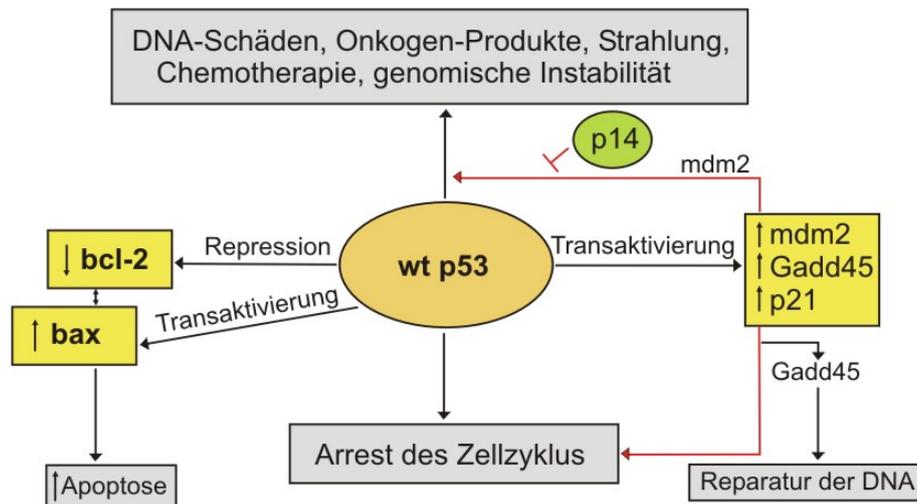


Abbildung 2.8: **Signalwege des p53 Proteins.** Durch **DNA-Schäden, Onkogen-Produkte, Strahlung, Chemotherapie oder genomische Instabilität** kann **Wildtyp (wt) p53** induziert werden. **p53** wiederum stimuliert die **Transaktivierung** verschiedener **Genprodukte (mdm2, Gadd45, p21)**, die alle den **Arrest des Zellzyklus** bewirken. Daneben stimuliert es die **Transaktivierung von bax** bzw. die **Repression von bcl-2**, was zur **Einleitung der Apoptose** führt.

Die Aktivierung von p53 und damit seine Akkumulation wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen am Protein vermittelt. Wichtig hierfür ist seine Lokalisation. Das Protein befindet sich teils im Zellkern, teils im Zytoplasma, doch nur innerhalb des Nukleus kann es seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnehmen. Bei zellulärem Stress akkumuliert p53 im Kern. Eine entscheidene Rolle bei der Regulation spielt das Onkoprotein mdm2 durch Hemmung der transkriptionellen Aktivität von p53 und Beteiligung an seiner Degradation. Auf der anderen

Seite führt p53 durch transkriptionelle Aktivierung des *mdm2*-Gens zur Akkumulation von mdm2 [221]. Somit bilden beide Moleküle einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Ein weiteres an der mdm2-abhängigen Regulation beteiligtes Protein ist p14 (human, p19 murin) [225]. Eine Überexpression von p14 lässt p53 akkumulieren und kann somit oberhalb von diesem in die Signalkaskade ein-geordnet werden. Daneben interagiert p14 mit mdm2 und fixiert es im Nukleolus, was eine Degradation von p53 verhindert. Alle diese Wechselwirkungen werden durch Phosphorylierungen reguliert [225].

Neben der Funktion von p53 im Zellkern besitzt dieses Protein aber auch transaktivierungs-unabhängige Aufgaben im Zytoplasma. Hier erhöht es die Apoptoserate durch Interaktion mit Proteinen im Zytosol und in den Mitochondrien. Beispielsweise interagiert p53 mit bcl-2 und antagonisiert damit die anti-apoptotische Stabilisierung der mitochondrialen Membran [226]. Weiterhin besitzt p53 eine wichtige Rolle bei der Glykolyse, bei der Autophagie, der zellulären Alterung, bei der Angiogenese und der Zelldifferenzierung [227].

Klinische Relevanz

Die Durchführung sowohl von molekularbiologischen als auch immunhistochemischen Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern ist für die Einschätzung des biologischen Verhaltens eines Tumors bzw. den diagnostischen Nutzen eines Markers sehr hilfreich. Eine immunhistochemisch positive Reaktion mit einem für p53 spezifischen Antikörper kann ein Hinweis für eine Mutation des *p53* Gens sein. Jedoch sind auch Tumoren mit einer Überexpression dieses Proteins positiv. Eine zusätzlich positive Farbreaktion auf p21, eines für den Zellzyklus wichtigen regulatorischen Proteins, schließt Mutationen aus [228]. Während in humanen Gehirntumoren in 10 % der Fälle Mutationen auftreten, kommen in Neoplasien des Kolons, der Mamma und der Lunge weitaus häufiger p53-Mutationen vor (bis 27 %) [229].

Beim humanen Ästhesioneuroblastom sind bislang keine Mutationen, sondern eine Überexpression von p53, in Kombination mit der vorher erwähnten p21-Reaktivität beschrieben [7, 228, 230, 231]. Daneben hatten Patienten mit p53-überexprimierenden Ästhesioneuroblastomen z.T. eine schlechtere Prognose [228, 231, 232]. Beim Tier fehlen bislang entsprechende Ergebnisse.

Auch astrozytäre Tumoren reagieren zum Teil immunhistochemisch positiv auf

p53. Dabei korreliert der p53 LI weder mit dem Ki-67 LI oder der Expression von bcl-2, noch mit der histologischen Gradeinteilung [233]. Humane Meningiome können ebenfalls immunhistochemisch positiv reagieren. Die Expression von p53 korreliert dabei sowohl mit der histologischen Gradeinteilung als auch mit dem Ki-67 LI positiv. CHO et al. wiesen Mutationen, in Korrelation mit dem Grad der Entdifferenzierung nach [234]. In Gliomen treten regelmäßig Mutationen des *p53* Gens und auch eine Überexpression von Wildtyp p53 auf, in Verbindung mit einem geringeren Grad der Differenzierung [235, 236]. In primären Neuroblastomen sind hingegen keine Mutationen zu finden [237]. In der Veterinärpathologie gibt es nur wenige Studien zu diesem Thema. Die Ergebnisse entsprechen denen der Humanpathologie [238, 239].

FONTANINI et al. wiesen in humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*) eine umgekehrte Proportionalität zwischen p53 und bcl-2 nach. p53 akkumulierte dabei in Tumoren mit Bildung von Metastasen. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von p53 und der Überlebensrate festgestellt werden [240]. Adenokarzinome der Lungen sind ebenfalls häufig immunhistochemisch positiv und oft liegen Mutationen des *p53* Gens bei diesem Tumor vor. Die Expression von p53 korreliert dabei signifikant positiv mit dem Ki-67 LI, dem histologischen Grad der Entdifferenzierung und einer schlechten Prognose. Die Expression von bcl-2 zeigte ein gegenläufiges Muster [192]. In der Veterinärpathologie konnte beim Hund u.a. in Lymphomen [241], in Mastzelltumoren der Haut [242], in Tumoren der Mamma [243] und in Osteosarkomen [244] eine immunhistochemisch positive Reaktion festgestellt werden.

2.4.3 bcl-2

Allgemeines

bcl-2 (engl.: *B-cell lymphoma 2*) ist ein Proto-Onkoprotein, das als erstes Mitglied der bcl-2-Familie 1984 von TSUJIMOTO et al. aufgrund einer chromosomalen Translokation t(14;18) in humanen follikulären B-Zell-Lymphomen entdeckt wurde [245]. Letztere ist charakteristisch für lymphoide Neoplasien [246, 247]. Die cDNA wurde kurz danach, 1986, isoliert. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) und verschiedenen Herpesvirus-Familien zeigen bcl-2-Homologa [248]. Die bcl-2-Familie ist in drei Klassen untergliedert:

- anti-apoptische, bcl-2-ähnliche Onkogene (z.B. bcl-2, bcl-xL, bcl-w, u.a.)
- pro-apoptische, bax-ähnliche Proteine (z.B. bax, bak, bok, u.a.)
- pro-apoptische, nur aus der BH3-Domäne bestehende, Mitglieder der bcl-2-Familie (z.B. bim, bid, Noxa, Puma, u.a.)

Die beiden zuletzt genannten Gruppen agieren als Tumorsuppressoren [249]. Das Verhältnis von pro- zu antiapoptischen bcl-2 Familienmitgliedern entscheidet über das Überleben von Zellen.

Ein für dieses Protein spezifischer Antikörper wurde bisher bei Mensch [250], Hund [243, 251], Katze [252, 253], beim Kaninchen [245] Pferd, bei der Maus, u.a. angewendet.

Struktur und Charakteristika

bcl-2 ist aus zwei Exons zusammengesetzt, welche für zwei ähnliche, nur in ihrem Carboxyl-Terminus variierende, Proteine bcl-2 α (26 kDa) und bcl-2 β (21kDa) kodieren. Jedes Protein enthält vier konservierte bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-BH4), die mit nachgestellten Ziffern unterschieden werden, und welche für ihre anti-apoptische Funktion von entscheidender Bedeutung sind [254]. Die Homologie-Domänen medieren die Interaktion mit anderen Proteinen. Das schlecht lösliche [255] Protein ist an Oberflächen von intrazellulären Membranen, wie der äußeren Mitochondrienmembran, des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran lokalisiert [254, 256]. Die Integration von bcl-2 in diese Membranen erfolgt durch die den C-Terminus bildenden Domänen BH1 bis BH3, die

eine hydrophobe Tasche formen und die von der Rückseite durch die aminoterminal gelegene Domäne BH-4 stabilisiert wird. Eine weitere wichtige Eigenschaft von bcl-2 und auch aller anderen Mitglieder dieser Familie ist die Fähigkeit zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren.

Als Antwort auf verschiedene apoptotische Stimuli können alle bcl-2-ähnlichen Proteine nach proteolytischer Entfernung der N-terminalen BH4-Domäne in ein pro-apoptotisches Protein konvertiert werden [249, 255]. Bcl-2 wird durch Polyubiquitylierung für den proteasomalen Abbau markiert [257].

Lokalisation und Expression

Das intrazytoplasmatische Protein bcl-2 ist in Ependymzellen, im *Plexus choroideus*, in den SCHWANNschen Zellen, einigen Neuronen, reaktiven Astrozyten, jedoch nicht in Oligodendrozyten und in den Zellen der *Archnoidea* nachweisbar. Hyperplastische Zellen der Spinnenwebshaut und arachnoidale Zysten sind jedoch oft positiv. Im Vorderlappen der Hypophyse ist ein Mosaik-ähnliches Färbemuster zu erkennen. Insbesondere in verschiedenen Stammzellen findet sich eine hohe Expression von bcl-2, die das Überleben dieser wichtigen Zellpopulation sichert. In der Haut wird bcl-2 in basalen Keratinozyten exprimiert. Die Basalzellen vieler Gewebe (Tonsillen, Zunge, Ösophagus, Rektum) sind immunhistochemisch positiv, wie auch die lymphoiden Zellen der intestinalen Submukosa, das endokrine Pankreas, die B-Zell-Follikel in der Milz und die kortikalen Lymphozyten des Thymus. Im Auge sind die Basalzellen der Kornea sowie das Epithel der Linse positiv. Die Leber, das exokrine Pankreas, die Skelett- und die Herzmuskulatur sind negativ [252]. In Melanozyten und Melanomzellen wurde ebenfalls eine Expression von bcl-2 beobachtet [250, 253].

Signalwege und Funktion

bcl-2 ist ein Regulator der Apoptose, der Nekrose und der Autophagie. Als eine Art Wächter operiert es als kritischer Knotenpunkt in einem komplexen Netzwerk und entscheidet damit zwischen dem Leben und dem Untergang von Zellen. Eine Überexpression von bcl-2 fördert das Überleben von Lymphozyten bei vielen verschiedenen Todesstimuli wie z.B. dem Entzug von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung oder oxidativem Stress [258–260]. Der Schutzeffekt wird durch Bindung und somit Neutralisation proapoptotischer Mitglieder erreicht.

Das Protein bcl-2 kann die Apoptose sowohl durch das Binden von „BH3-only“ Proteinen [261] als auch durch eine Bindung von Bax und Bak [262] verhindern und so die die Integrität der Zellmembran der Mitochondrien bewahren. bcl-2 stellt somit einen Gegenspieler zu bax und anderen proapoptotischen Mitgliedern dar, die die mitochondriale Permeabilität der äußeren Membran verändern, was zu einer Freilassung von Cytochrom c, von Caspase-aktivierenden Proteinen, wie APAF1 (engl.: *Apoptosis Protease Activating Factor 1*) und anderen Mediatoren des Zelltodes und zu einer Neutralisierung endogener Caspase-Inhibitoren führt.

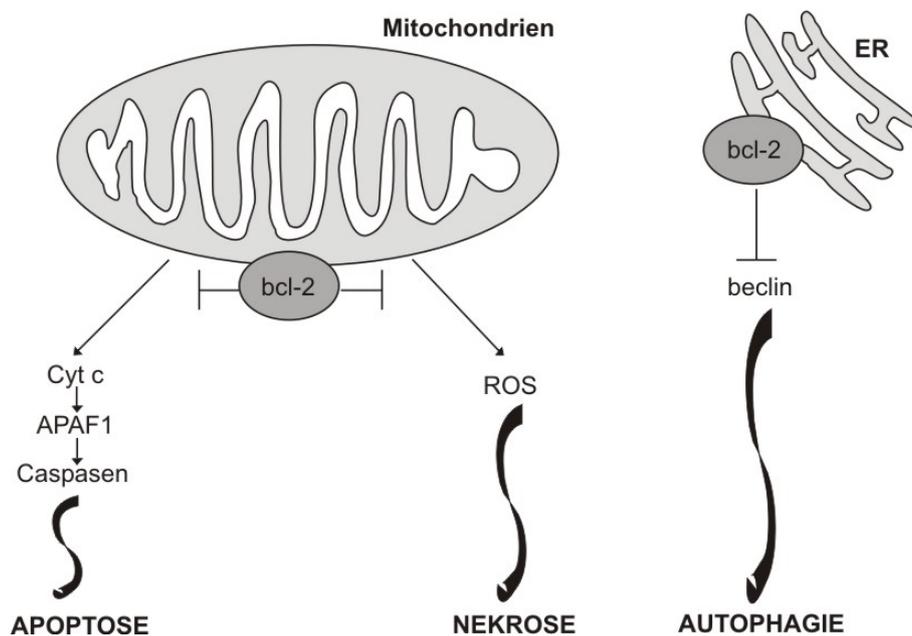


Abbildung 2.9: **bcl-2** supprimiert die Apoptose durch Hemmung der Freilassung von Cytochrom C und unterbricht damit die weitere Aktivierung von APAF1 und den Caspasen. **bcl-2** verhindert daneben die Freilassung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und damit die Nekrose, sowie die Autophagie durch Blockierung von beclin (Modifikation nach REED et al. 2008 [263]).

Mitochondrien sind ebenfalls als Mediatoren der Nekrose bekannt. Durch Defekte im Ionenhaushalt der Mitochondrien werden reaktive Sauerstoffradikale (ROS, engl.: *reactive oxygen species*), z.B. Wasserstoffperoxid, in das Zytoplasma getrieben, was eine Peroxidation von Lipiden und Membranschäden verursacht. Dies wiederum führt zu einer Beeinflussung des Ionengleichgewichts, was zu einer zellulären Schwellung und zu einer Ruptur der Zellmembran, aber auch der

Lysosomen führt. Die dadurch freigelassenen hydrolytischen Enzyme zerstören Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Dieser Vorgang wird ebenfalls durch bcl-2 gehemmt [263].

Alle anti-apoptischen Mitglieder der bcl-2-Familie sind bekannt für ihre Fähigkeit, das Überleben von von Wachstumsfaktoren abhängigen Zellen bei Reduzierung dieser zu verlängern [246]. Fehlen diese Faktoren kann es aber auch zu einem Nährstoffmangel kommen, denn die Expression von Glukosetransportern auf der Zelloberfläche und der Transport von Aminosäuren ist davon abhängig. Dauert dieser Zustand längere Zeit an, wird die Autophagie aktiviert, eine Zellfunktion, die Makromoleküle und Organellen katalysiert und dadurch Substrate für die ATP-Produktion generiert. bcl-2 supprimiert durch Bindung an das Protein beclin diesen Vorgang [263, 264]. Seine Funktion als Inhibitor der Autophagie scheint, unabhängig von der Rolle im Mitochondrium, am endoplasmatischen Retikulum (ER) manifestiert zu sein [263].

Die Apoptose spielt bei vielen Entwicklungsprozessen, wie auch im Immunsystem eine wichtige Rolle. So können Störungen der Apoptose zu Immundefizienzen oder Autoimmunität führen [246, 265]. Während der Fetalentwicklung scheint bcl-2 in die Aufrechterhaltung der Homeostase der Gewebe involviert zu sein. LEBRUN et al. konnten in humanem Fetalgewebe die Präsenz dieses Proteins in vielen Zelltypen, v.a. im Thymus, in hämatopoetischen Zellen, in endokrinen bzw. hormonell regulierten Geweben und in allen Stammzellpopulationen, in variabler Menge nachweisen [266].

Aufgrund einer signifikanten positiven Korrelation zwischen bcl-2 und der Dichte der Gefäßsprossen in Ästhesioneuroblastomen wird eine mögliche Rolle dieses Proteins als Stimulator der Angiogenese in diesen Tumoren postuliert [267].

Klinische Relevanz

bcl-2 wird in den verschiedensten Zelltypen des ZNS exprimiert. Über die Expression von bcl-2 in Neoplasien des ZNS ist nur wenig bekannt. REED et al. wiesen dieses Protein in Zelllinien von Glioblastomen und Medulloblastomen nach [268]. NAKASU et al. beobachteten eine variierende Expression von bcl-2 in Abhängigkeit von der bcl-2-Produktion der Ursprungszellen des jeweiligen Tumors. So waren Ependymome, Neurinome und Papillome des *Plexus choroideus* regelmäßig immunoreaktiv, während astrozytäre Tumoren und Meningiome seltener ein

positive Reaktion zeigten [269].

In humanen astrozytären Tumoren besteht keine Korrelation zwischen p53 und *bcl-2 labeling index* (LI) bzw. dem Ki-67 LI oder der histologischen Gradeinteilung [233]. Bcl-2 zeigt eine umgekehrte Proportionalität zum Grad der Malignität verschiedener Tumorentitäten, wie glialen Neoplasien [269], Lymphomen [270] und Neuroblastomen [271]. Viele humane Ästhesioneuroblastome reagieren immunhistochemisch positiv. Dabei gibt es Hinweise auf eine schlechte Prognose bei einer erhöhten Expression von bcl-2 [272].

Eine erhöhte Expression von bcl-2 ist in humanen und kaninen Tumoren der Mamma [243, 273], in felineen Lymphomen [274, 275], in kaninen vaskulären Tumoren [251] und in felineen Tumoren der Haut und der Basalzellen [253] beschrieben. Die Expression von bcl-2 in humanen Adenokarzinomen scheint mit einem geringeren Ki-67 LI assoziiert zu sein. Daneben liegt eine inverse Verknüpfung zwischen der proliferativen Aktivität von p53 und bcl-2 vor [192]. Dabei ist in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) eine Expression von bcl-2 mit einer günstigen Prognose assoziiert [240]. Welche genaue biologische Rolle allerdings bcl-2 in der Entwicklung dieser Tumoren spielt, bleibt bislang unklar.

Experimentell konnte ein Zusammenhang zwischen bcl-2 und einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika nachgewiesen werden. MIYASHITA and REED et al. zeigten, dass eine dauerhafte Überexpression von bcl-2 in verschiedenen lymphoiden Zelllinien die Resistenz gegenüber einer Bandbreite von DNA- und Mikrotubuli-schädigenden Therapeutika, Nukleosid-Analoga und Glukokortikoiden fördert [276]. Auch bei akuter myeloider Leukämie und anderen hämatolymphoiden Tumorerkrankungen, sowie bei Neoplasien der Prostata konnte dieser Zusammenhang hergestellt werden [263]. Versuche einer bcl-2-zielgerichteten Therapie blieben bislang ohne Erfolg [277, 278].

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen erfolgten an 22 Fällen olfaktorischer Neuroblastome der Jahre 1984 bis 2006, bestehend aus 17 Tumoren aus dem Sektionsgut des Institutes für Tierpathologie sowie aus fünf Einsendungen der Fachpraxis für Tierpathologie, Wolf von Bomhard und Stephan Pfleghaar, München. Das Gewebe wurde in 7%igem Formalin eingelegt. Eine Eruiierung der durchschnittlichen Zeitdauer zwischen Eintritt des Todes und Sektion des Tierkörpers war im Nachhinein nicht mehr möglich.

3.2 Allgemeine Kasuistik

Gruppe 1: Hunde

Proben von 13 Hunden stammen aus dem Zeitraum 1984 - 2006. Das Material der letzten 5 Fälle wurde von der Fachpraxis für Tierpathologie, Wolf von Bomhard und Stephan Pfleghaar, München überlassen.

Nr.N.	Nr.P.	Rasse	Alter	Geschlecht	Vorbericht
258.84	1945.84	Afghane	12	w	beide Trommelfelle defekt, Manegebewegungen, Seitenlage, Opisthotonus, Verdacht auf Gehirntumor
135.85	773.85	Rauhaardackel	12	m	seit 1,5 Jahren Hautveränderungen, Abmagerung trotz gutem Appetit
218.85	688.85	Colli	9	m	Epilepsie, Verdacht auf Gehirntumor
221.86	1508.86	Pudel	11	m	seit 1 Woche schmerzhaftes Abdomen, Spondylosen, leichte Leukozytose, seit 2-3 Wochen zunehmend aggressiv
186.90	819.90	Cocker-Spaniel	15	w	vor 3 Jahren Pyometra, multiple Mammakarzinome; Allgemeinbefinden zunehmend schlechter, Atemnot, Apathie im Wechsel mit tobsuchtartigen Anfällen
424.92	n.v.	DSH	9	m	1. Vorstellung vor ca. 3 Monaten: Mattigkeit, gesenkte Kopfhaltung, Pupillarreflex positiv, Liquor fließt unter Druck ab, geringe Pleozytose, stark erhöhter Eiweißgehalt; unter Cortison 6 Wochen gutes Allgemeinbefinden, nun plötzliches Zusammenbrechen
449.04	772.04	Malamut-Mix	6	m	seit Wochen anfallsweise Schmerzen; Labor unauffällig; Computertomographie: Cauda equina; zunehmende Verschlechterung: unruhiges Hecheln, Rückwärtslaufen, Schielen, Nickhautvorfall
428.06	1041.06	AKS	12	m	Anfälle, schmerzhafter Kiefer, Tenesmus, Anorexie, Abmagerung
6227.03	n.v.	Deutsch-Langhaardackel	8	w	seit 3 Monaten Epistaxis, einseitiger Nasenausfluß
11856.03	n.v.	Basset	8	w	seit 1 Monat einseitiger Nasenausfluß
32546.03	n.v.	Rauhaardackel	7	w	k.A.
12757.04	n.v.	Mischling	k.A.	mk	k.A.
9593.05	n.v.	Soft-Coated-Wheaten	8	m	seit 2 Monaten Aggressivität

DSH deutscher Schäferhund, **AKS** amerikanisch kanadischer Schäferhund, **k.A.** keine Angabe, **m** männlich, **mk** männlich kastriert, **w** weiblich, **wk** weiblich kastriert

Tabelle 3.1: **Alter, Geschlecht und Vorbericht der Hunde der Gruppe 1**

Gruppe 2: Katzen

Proben von 9 Katzen aus dem Zeitraum 1985 - 2005.

Nr.N.	Nr.P.	Alter	Geschlecht	Vorbericht
283/85	1649/85	3	wk	seit 1 Monat chronische Rhinitis, Darmlymphknoten vergrößert, Tumor in der Nase
457/88	1059/88	10	mk	seit ca. 2 Jahren epileptische Anfälle, serologisch FeLV positiv, sonst unauffällig; typische Grand-mal-Anfälle, mit sich im Kreisdrehen, tonisch-klonischen Krämpfen und Raserei, seit einem Monat blutig-seröser Nasenausfluß, reduziertes Allgemeinbefinden
642/88	2340/88	7	mk	seit 4 Tagen Apathie, Inappetenz; seit 1 Tag ZNS-Störungen, Pupillarreflex negativ, Krämpfe, Aggressivität
53/90	238/90	k.A.	m	ohne Vorbericht; sehr wehrhaft, vor 3 Tagen massives Krampfgeschehen; nicht ansprechbar, danach ruhig
316/90	1336/90	10	w	vor 8 Tagen als Fundkatze eingeliefert; Kreislaufen, Inappetenz; trotz Behandlung keine Besserung
69/93	276/93	7	m	seit 4-5 Tagen ZNS-Störungen, anfangs steifer Gang, von kaudal nach kranial fortschreitende Tetraplegie mit Opisthotonus, Nystagmus
92/96	335/96	5	w	ohne Vorbericht
154/97	638/97	5	w	ohne Vorbericht
393/05	939/05	7	mk	Nasentumor mit Durchbruch in die Orbita

k.A. keine Angabe, **m** männlich, **mk** männlich kastriert, **w** weiblich, **wk** weiblich kastriert

Tabelle 3.2: **Alter, Geschlecht und Vorbericht der Katzen der Gruppe 2**

3.2.1 Fixierung, Einbettung und Zuschnitt

Das Gewebe wurde in 7%igem ungepuffertem Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixationszeiten im einzelnen waren nicht bekannt. Je nach Größe und Permeabilität der Probe wurden laborseitig die Zeiten festgelegt, sie betragen mitunter mehrere Tage. Im Anschluß wurde das Gewebe 1-2 Stunden in fließendem Leitungswasser gewässert.

Es erfolgte die automatisierte Entwässerung und Einbettung der Proben in Paraffin (Paraplast Plus, Sherwood Medical) durch das System Hyper Center XP (Shandon, Life Sciences International). Das Schneiden der Präparate wurde an einem Rotationsmikrotom der Firma Leica (Geräte-Typ: 2055) vorgenommen. 5 μm dicke Schnitte wurden im 48°C warmen Wasserbad gestreckt (HIR-3, Kunz Instruments) und für Routinefärbungen auf unbeschichtete Objektträger (R Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurden adhäsivbeschichtete Objektträger eingesetzt (TES OT-Beschichtung, siehe 3.3.4 Anhang). Die Schnitte trockneten bei 37°C für mindestens 24 Stunden im Wärmeschrank.

3.2.2 Standardfärbungen

Von allen Gewebeproben wurden Paraffinschnitte für die Übersichtsfärbung Hämalaun-Eosin hergestellt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Zellkerne, Kalk, Knorpelgrundsubstanz und Schleim sowie grampositive Bakterien färben sich blau, Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rot an.

Vorgehensweise:

1. Herauslösen des Paraffins für 3x5 min in Xylol
2. Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe: 2x100%, 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jeweils 5 min
3. Spülen in Aqua dest.
4. Kernfärbung mit Hämalaun für 7-10 min

5. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 15 min
6. Spülen in Aqua dest.
7. Gegenfärbung mit Eosin für 5-7 min
8. Spülen in Aqua dest.
9. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x96%, 2x100% für jew. 5 min
10. Xylol 3x5 min
11. Eindeckeln mit Histofluid und mind. 30 min trocknen lassen
12. Trocknen der OTs für mind. 30 min

3.2.3 Immunhistologische Färbungen

Prinzip

Zur Detektion von Ki-67-Antigen, p53-Protein, NeuN, MAP2 und bcl-2 wurde die *avidin-biotin-complex* (ABC)-Methode verwendet. Diese macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Vor Antigenpräsentation bedarf es zunächst einer Demaskierung der Antigenstruktur durch Verdauung mit proteolytischen Enzymen oder durch physikalische Methoden, wie z.B. Behandlung in der Mikrowelle oder im Dampfkochtopf.

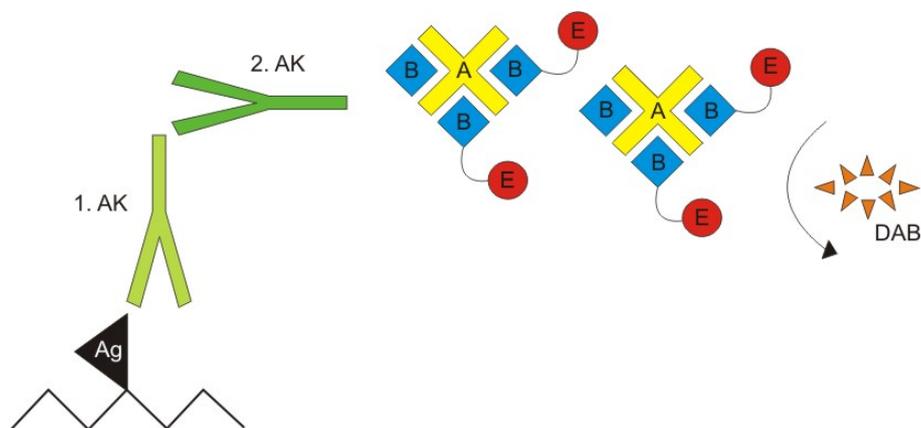


Abbildung 3.1: **Die ABC-Methode.** Der Primärantikörper (1. AK) bindet an das Antigen (Ag). Der biotinylierte Sekundärantikörper (2. AK) stellt eine Brücke zwischen dem 1. AK und dem Avidin-Biotin-Komplex dar (A, B). In Anwesenheit von H_2O_2 wird durch das Enzym (E) das Farbsubstrat DAB oxidiert (siehe unten).

Die Antigendarstellung erfolgt in drei verschiedenen Schichten und wird deshalb auch Sandwich-Methode genannt. Bei dieser indirekten Technik wird im ersten Schritt der Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein biotinylierter, das heißt ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper (Brückenantikörper) aufgetragen, der auf der einen Seite Verbindung zum Fc-Fragment des Primärantikörpers aufnimmt und auf der anderen Seite einen Kontakt zum Avidin-Biotin-Komplex herstellt. Obwohl Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, binden nur drei. An den Komplex ist meistens das Enzym Peroxidase gekoppelt, selten wird statt dessen die alkalische Phosphatase verwendet.

Über mehrere Reaktionsschritte wird durch dieses Enzym in Anwesenheit von H_2O_2 das Farbsubstrat DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) oxidiert. Es entsteht ein braunes Produkt [279, 280].

Technische Durchführung

Alle Reaktionen fanden soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur statt.

Als Postivkontrollen diente für Ki-67 Dünndarmgewebe eines Kalbes, für p53 das Osteosarkom eines Hundes (NP: 265/05) und ein felines extraossäres Osteosarkom, für MAP2 bzw. NeuN canines Kleinhirn (NP: 80/08 bzw. 566/05) und für bcl-2 ein humanes Mammakarzinom.

NSE (neuronenspezifische Enolase)

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min
5. Antigendemaskierung mit 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle für 20 min; OTs im Citratpuffer mind. 30 min abkühlen lassen (siehe 3.3.4 Anhang)
6. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
7. Waschen in PBS 3x5 min
8. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
9. Waschen in PBS für 3x5 min
10. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen NSE (1:500)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
13. Waschen in PBS für 3x5 min
14. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
15. Waschen in PBS für 3x5 min
16. Auftragen der 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz und Inkubation für 45 min (siehe 3.3.4 Anhang)
17. Waschen in PBS für 3x5 min
18. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro OTs

unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)

19. Waschen in PBS für 5 min
20. Waschen in Aqua dest. für 2 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
23. Spülen in Aqua dest. für 5 min
24. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100%
jew. 5 min
25. Xylol 2x5 min
26. Eindeckeln mit Histofluid
27. mind. 30 min trocknen

MAP-2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2)

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min
5. Antigendemaskierung mit 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle für 20 min; OTs im Citratpuffer mind. 30 min abkühlen lassen (siehe 3.3.4 Anhang)
6. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
7. Waschen in PBS 3x5 min
8. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
9. Waschen in PBS für 3x5 min
10. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen MAP-2 (1:100)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
13. Waschen in PBS für 3x5 min
14. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
15. Waschen in PBS für 3x5 min
16. Auftragen der 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz und Inkubation für 45 min (siehe 3.3.4 Anhang)
17. Waschen in PBS für 3x5 min
18. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro OTs unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)
19. Waschen in PBS für 5 min
20. Waschen in Aqua dest. für 2 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
23. Spülen in Aqua dest. für 5 min
24. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100% jew. 5 min
25. Xylol 2x5 min

- 26. Eindeckeln mit Histofluid
- 27. mind. 30 min trocknen

NeuN

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min
5. Antigendemaskierung mit 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle für 20 min; OTs im Citratpuffer mind. 30 min abkühlen lassen (siehe 3.3.4)
6. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
7. Waschen in PBS 3x5 min
8. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
9. Waschen in PBS für 3x5 min
10. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen NeuN (1:500)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
13. Waschen in PBS für 3x5 min
14. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
15. Waschen in PBS für 3x5 min
16. Auftragen der 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz und Inkubation für 45 min (siehe 3.3.4 Anhang)
17. Waschen in PBS für 3x5 min
18. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro 4 OTs unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)
19. Waschen in PBS für 5 min
20. Waschen in Aqua dest. für 2 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
23. Spülen in Aqua dest. für 5 min
24. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100% jew. 5 min
25. Xylol 2x5 min

- 26. Eindeckeln mit Histofluid
- 27. mind. 30 min trocknen

Ki-67-Antigen

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min (siehe 3.3.4 Anhang)
5. Antigendemaskierung mit 0,1%iger Trypsin-Lösung in PBS bei 37°C für 8 min (siehe 3.3.4 Anhang)
6. Waschen in PBS 3x5 min
7. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
8. Waschen in PBS für 3x5 min
9. Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 bei 400 W für 20 min (siehe 3.3.4 Anhang)
10. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
11. OTs im Citratpuffer für 30 min abkühlen lassen
12. Waschen in PBS für 3x5 min
13. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
14. Dekantieren des Normalserums
15. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen Ki-67 (1:200)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
16. Waschen in PBS für 3x5 min
17. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
18. Waschen in PBS für 3x5 min
19. Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz (siehe 3.3.4 Anhang) und Inkubation für 45 min
20. Waschen in PBS für 3x5 min
21. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro 4 OTs unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)
22. Waschen in PBS für 5 min
23. Waschen in Aqua dest. für 2 min
24. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
25. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min

26. Spülen in Aqua dest. für 5 min
27. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100%
jew. 5 min
28. Xylol 2x5 min
29. Eindeckeln mit Histofluid
30. mind. 30 min trocknen

p53 (PAb122)

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min
5. Antigendemaskierung mit 10 mM Citratpuffer pH 6,0 im Dampfkochtopf für 5 min; OTs im Citratpuffer mind. 30 min abkühlen lassen (siehe 3.3.4 Anhang)
6. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
7. Waschen in PBS 3x5 min
8. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
9. Waschen in PBS für 3x5 min
10. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen p53 (1:50)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
13. Waschen in PBS für 3x5 min
14. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
15. Waschen in PBS für 3x5 min
16. Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz und Inkubation für 45 min (siehe 3.3.4 Anhang)
17. Waschen in PBS für 3x5 min
18. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro 4 OTs unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)
19. Waschen in PBS für 5 min
20. Waschen in Aqua dest. für 2 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
23. Spülen in Aqua dest. für 5 min
24. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100% jew. 5 min
25. Xylol 2x5 min

- 26. Eindeckeln mit Histofluid
- 27. mind. 30 min trocknen

bcl-2

1. Entparaffinieren in Xylol für 2x20 min
2. Rehydrieren über absteigende Ethanolreihe: 1x96%, 1x70%, 1x50%, 1x30% für jew. 5 min
3. Spülen in Aqua dest. für 5 min
4. Waschen in PBS für 5 min
5. Antigendemaskierung mit 10 mM Tris-EDTA Puffer pH 9,0 in der Mikrowelle für 15 min; OTs im Citratpuffer mind. 30 min abkühlen lassen (siehe 3.3.4 Anhang)
6. verdunsteten Puffer durch Aqua dest. ersetzen
7. Waschen in PBS 3x5 min
8. Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität durch 0,87%iges H₂O₂ in Methanol für 30 min
9. Waschen in PBS für 3x5 min
10. Inkubation mit in PBS verdünntem **Normalserum Ziege (1:20)** für 30 min
11. Dekantieren des Normalserums
12. Inkubation mit in PBS verdünntem **Primärantikörper gegen bcl-2 (1:50)** in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C
13. Waschen in PBS für 3x5 min
14. Inkubation mit in PBS verdünntem biotinyliertem **Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (1:200)** für 45 min
15. Waschen in PBS für 3x5 min
16. Auftragen der 30 min zuvor angesetzten ABC-Reagenz und Inkubation für 45 min (siehe 3.3.4 Anhang)
17. Waschen in PBS für 3x5 min
18. Farbreaktion mit 1 ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung mit 1 µl frisch hinzugefügtem 30%igem H₂O₂ pro OTs unter optischer Kontrolle (siehe 3.3.4 Anhang)
19. Waschen in PBS für 5 min
20. Waschen in Aqua dest. für 2 min
21. Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaun-Lösung
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
23. Spülen in Aqua dest. für 5 min
24. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe: 1x70%, 1x90%, 2x100% jew. 5 min
25. Xylol 2x5 min

- 26. Eindeckeln mit Histofluid
- 27. mind. 30 min trocknen

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Normalserum		
Ziege, G-Serum	1:20	Novocastra Laboratories Ltd, UK; Cat. No. 600605
Primärantikörper		
mouse anti-human Ki-67; Klon MIB-1	1:200	DAKO A/S, Cat. No.: M7249
mouse anti-p53; Klon PAb122	1:50	MONOAN; Cat. No.: MON 7049
mouse anti-bcl-2; Klon 124	1:50	Dako A/S, DK; Cat. No.: N1587
rabbit anti-NSE; polyklonal	1:500	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland; Cat. No.: NA 1247
mouse anti-MAP-2a,b,c; Klon AP18	1:100	Kamiya Biomedical Company, USA; Cat. No.: MC-734
mouse anti-NeuN; Klon A60	1:500	Chemicon R International; Cat. No.: IHCR1001-6
Sekundärantikörper		
goat anti-mouse; biotinylated	1:200	Vectorial Laboratories, USA; Cat. No.: BA-9200
goat anti-rabbit; biotinylated	1:200	Vectorial Laboratories, USA; Cat. No.: BA-1000

Tabelle 3.3: Eingesetztes Normalserum und verwendete Primär- bzw. Sekundärantikörper

3.3 Dokumentation und Auswertung

3.3.1 Gruppeneinteilung

Die Tumoren wurden anhand des H.E.-Schnittes gesichtet und anschließend versuchsweise das humanpathologische Klassifikationssystem für Ästhesioneuroblastome nach HYAMS angewendet. Dies war so nicht praktikierbar, eine Modifikation des Schemas wurde notwendig.

3.3.2 NSE, MAP-2, NeuN

Die Auswertung der neuronenspezifischen Marker MAP-2, NeuN und NSE erfolgte deskriptiv. Zusätzlich wurde eine semiquantitative Untersuchung der MAP-2-Expression durchgeführt.

3.3.3 Mitose-Index

Der Mitose-Index (MI) ist definiert als Anzahl der eindeutigen Mitosefiguren innerhalb von 10, über die Fläche des HE-gefärbten Präparates verteilten, lichtmikroskopischen Gesichtsfeldern bei 400facher Gesamtvergrößerung.

3.3.4 Ki-67

Es wurden von den immunhistochemisch angefärbten Präparaten 6-10 digitale Mikrophotos mit einer 400fachen Gesamtvergrößerung in gleichmäßiger Verteilung über die Tumorfläche angefertigt (Mikroskop: Zeiss Axiolab R, Jena; Kamera: Prog- Res 3003, Kontron Elektronik, Eching). Die Bilddaten wurden auf CD-ROM archiviert. Eine positive immunhistochemische Reaktion wurde definiert als eine deutliche mittel- bis dunkelbraune Anfärbung des Zellkerns, welcher sich hierdurch vom blassen Zytoplasma abgrenzen ließ.

In die Untersuchung eines Falles einbezogen wurde jeweils das Bild mit augenscheinlich minimaler und jenes mit maximaler Dichte an positiven Zellkernen. Dazu wurden so viele weitere zufällig ausgewählte Photos hinzugezogen bis eine Mindestzahl von 1000 positiven Zellkernen der Beurteilung zur Verfügung stand. Die Quantifizierung wurde durch das frei erhältliche Computerprogramm *ImageJ Version 1.41* (<http://www.rsbweb.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Mittels

der Funktion *Cell Counter* wurden die negativen und positiven Tumorzellkerne parallel markiert und gezählt. Der *Ki-67-labeling index* (LI) wurde definiert als Quotient der Anzahl der positiven Tumorzellkerne und der Gesamtanzahl der untersuchten Tumorzellkerne.

3.3.5 p53

Eine Auswertung der immunhistochemischen Färbung war aufgrund ihrer nahezu ausschließlichen Negativität nicht notwendig. Das eine immunopositive kanine Ästhesioneuroblastom wurde deskriptiv ausgewertet.

3.3.6 bcl-2

Die Untersuchung der Expression von bcl-2 erfolgte durch lichtmikroskopische Begutachtung der immunhistochemisch angefärbten Schnitte und anschließende semiquantitative Analyse.

3.3.7 Statistik

Die vorgenommene statistische Auswertung wurde mit der freundlichen Unterstützung von Frau Monia Mahling vom Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgenommen. Bei den verschiedenen Parametern wurde jeweils das arithmetische Mittel, der Median und die Standardabweichung berechnet.

Durch Bestimmung des Mitoseindex und des *labeling index* (LI) für Ki-67 wurde die Gradeinteilung mit der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson, der ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen ist, gestützt. Zusätzlich fand eine Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho zwischen der Expression von bcl-2 und den zuvor genannten Parametern (Gradeinteilung, Mitoseindex und Ki-67 LI) statt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte hierbei durch einen Chi-Quadrat Test nach Pearson, Kontingenzkoeffizient und Kendall-tau-b [281].

Daneben wurde MAP-2, ebenfalls mit Hilfe der Analyse nach Spearman-Rho, auf eine Korrelation mit der Gradeinteilung hin untersucht. Die Berechnung der

Signifikanz erfolgte entsprechend bcl-2 [281].

Die Bearbeitung der statistischen Daten bzw. deren graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen Microsoft Exel 2003, Microsoft PowerPoint 2003 für Windows und CoralDraw Version 11.

3.4 Anhang: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Rezepte

3.4.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Applichem, Darmstadt; A1582
3-Aminopropyl-triethoxysilan	Sigma, Taufkirchen; A3648
3,3'-Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB)	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Dänemark; 4170
ABC-Reagenz (VECTASTAIN ABC KIT)	Vectastain Laboratories, Inc., CA, USA
Chloroform	AppliChem GmbH, Darmstadt; A1585
Citronensäureanhydrid 98% (CSAH)	Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, Mo, USA; 12,531-8
Citronensäure-Monohydrat zur Analyse	Applichem, Darmstadt; A2337
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat zur Analyse	AppliChem, Darmstadt; A3567
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat)	AppliChem, Darmstadt; A5097
Eosin	AppliChem, Darmstadt; A0822
Ethanol (vergällt)	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck KgaA, Darmstadt; Nr. 1.0854.0250
Formaldehyd (37%ig)	W. Gräen GmbH & Co., München
Formaldehyd (37%ig)	Merck KgaA, Darmstadt; Nr. 4002
Gewebe-Einbettungsmaterial, Paraplast Plus	McCormick Scientific, LLC, St. Louis, Mo, USA; 502004
Histofluid R	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen; 6900002
Isopropanol, 100%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat zur Analyse	AppliChem, Darmstadt; A1043
Mayers Hämalaun-Lösung für die Mikroskopie	AppliChem, Darmstadt; A0884
Methanol zur Analyse	AppliChem, Darmstadt; A0688
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt; A3597
Paraffin (56/58°C)	Engelbrecht, Edermünde
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, reinst	AppliChem, Darmstadt; A0548

Trizma-Base	Sigma, Taufkirchen; T1530
Trypsin	Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, Mo, USA; T7168
Wasserstoffperoxid (30%ig)	AppliChem, Darmstadt; A0626
Xylol (Isomerengemisch)	Merck KgaA, Darmstadt; Nr. 8681

3.4.2 Geräte

Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Dampfkochtopf Sicomatic R - T	Silit Werke GmbH & Co. KG, Riedlingen
Deckgläser	IDL, Nidderau
Digitalkamera, Canon Digital Ixus v2	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Digitalkamera, ProgRes 3003	Kontron Elektronik GmbH, Eching
Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettungssystem, Hyper Center XP	Shandon, Life Sciences International, GmbH, Frankfurt a. Main
Heizblock/Inkubator, Model SK1101D	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tisch-Kochplatte Alaska KP180	SIG GmbH, Düsseldorf
Kühlplatte	Kunz Instruments, Nynäshamn, Sweden
Küvetten	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Groß- burgwedel
Mikroskop, ZEISS Axioplan R	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop, ZEISS Axiolab R	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrotom-Einwegklingen (S35)	Engelbrecht, Edermüde
Mikrowellenherd, Severin Microwave 800	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pasteurpipetten und Sauger	Hilgenberg, Malsfeld
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Groß- burgwedel
Reaktionsgefäße	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Groß- burgwedel

Rotationsmikrotom, Geräte-Typ: 2055	Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Bensheim
Schüttelapparat	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burg- wedel
Stabthermometer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TBS 88 Paraffin Embedding System	medite Medizintechnik, Burgdorf
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Groß- burgwedel

3.4.3 Rezepte

PBS-Puffer (phosphate-buffered saline, pH 7,0 - 7,6)

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	7,4 g
Natriumchlorid	36,0 g
Kaliumhydrogenphosphat	2,15 g

mit Aqua dest. auf 5,0 l auffüllen

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung

DAB	1 Tablette
PBS-Puffer	10,0 ml
H ₂ O ₂ 30 %	10,0 µl

Das in Puffer gelöste DAB kann aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt werden. Wasserstoffperoxid unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen. Der pH-Wert liegt zwischen 7,0 und 7,6.

ABC-Reagenz

PBS-Puffer	5,0 ml
Lösung A	1 Tropfen
Lösung B	1 Tropfen

Komponenten mischen und mind. 30 min im Dunkeln inkubieren.

Citrat-Puffer (10 mM, pH 6,0)

Stammlösung A:

Citronensäure-Monohydrat	21,01 g
Aqua dest.	1000,0 ml

Stammlösung B:

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29,41 g
Aqua dest.	1000,0 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A	9,0 ml
Stammlösung B	41,0 ml
Aqua dest.	450,0 ml

Die Stammlösungen sind bei 2-8°C zu lagern. Die Gebrauchslösung kann nicht aufbewahrt werden.

Citronensäureanhydrid (CSAH) in Aqua dest. 0,4%, pH 7,4

CSAH	0,4 ml
Aqua dest.	1000 ml

H₂O₂ 1,0% in Methanol

H ₂ O ₂ 30%	3,0 ml
Methanol	100,0 ml

TES-Beschichtung für Objektträger

TES (3-Aminopropyl-Triethoxy-Silane)-Acetongemisch 2%

Aceton	196,9 ml
TES-Stammlösung	4,0 ml

Da das TES-Acetongemisch nur für kurze Zeit stabil ist, sollte es erst angesetzt werden, wenn der Objektträger trocken ist.

Vorgehensweise:

Chloroform	30 min
Ethanol 100%	30 min
Lufttrocknung	30 min
TES-Acetongemisch 2%	5 min
zweimaliges Spülen mit reinem Aceton	
Spülen mit Aqua dest.	
Trocknung bei 40°C	24 h

Tris-EDTA Puffer (10 mM, pH 9,0)

Gebrauchslösung:

Trizma-Base	1,21 g
EDTA	0,37 g
Aqua dest.	1000 ml

Trypsin-Lösung 0,1%

Trypsin	0,3 g
PBS-Puffer	300,0 ml

Vor der Zugabe des Trypsins den Puffer auf 37,0°C erwärmen.

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die histologische Klassifizierung der gewählten Ästhesioneuroblastome und die Stützung der Gradeinteilung durch Bestimmung der Proliferationsrate. Zwei neue neuronenspezifische Marker, MAP-2 und NeuN, sollten erstens die Diagnose dieser Tumoren festigen und zweitens neue Möglichkeiten zur Abgrenzung wichtiger Differentialdiagnosen aufzeigen. Zum Vergleich wurde der bereits gebräuchliche Marker NSE herangezogen. Die Beurteilung des Tumorstadiums erfolgte mittels des Tumorsuppressors p53 und des Apoptosemarkers bcl-2.

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte:

1. Patientengut
2. histologische Untersuchung und Gradeinteilung
3. MAP-2 und NeuN im Vergleich mit NSE
4. Mitoseindex und Ki-67
5. p53 und bcl-2

4.1 Beschreibung des Patientengutes

4.1.1 Rasseverteilung

Innerhalb der Gruppe 1 (Hunde) sind Dackel am stärksten vertreten, gefolgt von Mischlingen. In der Gruppe 2 (Katzen) konnten ähnliche Betrachtungen nicht vorgenommen werden, da eine Angabe der Rasse meist fehlt (siehe Tabelle 3.1 und 3.2).

4.1.2 Altersverteilung

Das arithmetische Mittel des Alters liegt in der Gruppe 1 der Hunde bei 9,75 Jahren mit einer Spanne von 7 bis 15 Jahren und einem Maximum von 8-9 bzw. 12-13 Jahren. In der Gruppe 2 der Katzen beträgt das arithmetische Mittel 6,75 Jahre bei einer Spanne von 3 bis 10 Jahren und einem Maximum von 6-7 Jahren. Der Vergleich der Alterverteilung zeigt, dass die erkrankten Katzen im Schnitt jünger sind als die Hunde mit diesem Tumor. Eine bimodale Verteilung, wie in der Humanmedizin beschrieben, mit Gipfeln in der zweiten und sechsten Dekade des Lebens ist hier nicht zu erkennen.

4.1.3 Geschlechtsverteilung

In der Gruppe 1 der Hunde sind fünf weibliche (38 %) und acht (62 %) männliche Tiere betroffen, in der Gruppe 2 der Katzen erkrankten vier weibliche (34 %) und fünf (56 %) männliche Tiere. Damit entspricht die Geschlechtsverteilung nur annähernd den Ergebnissen der Humanpathologie, in der von einer etwa ausgegogenen Verteilung gesprochen wird.

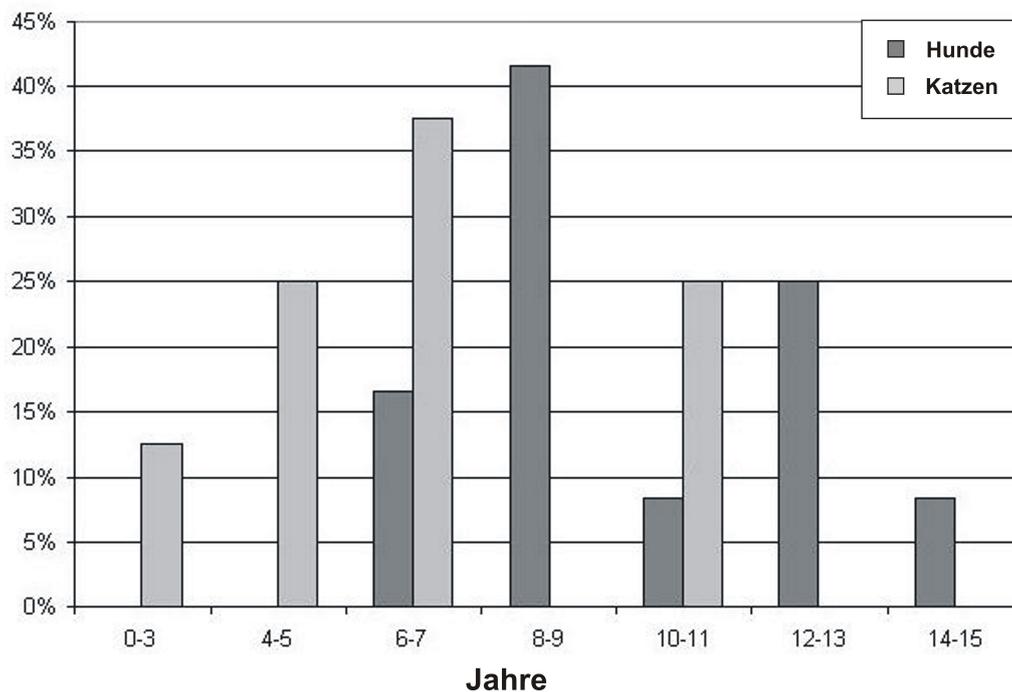


Abbildung 4.1: **Altersverteilung beider Spezies im Vergleich. Das Alter ist auf der x-Achse in Jahren angegeben. Die Häufigkeit des Auftretens ist auf der y-Achse in Prozent sichtbar. Im Schnitt sind die Katzen jünger als die Hunde. Eine modale Verteilung ist nicht erkennbar.**

4.2 Histologische Befunde und Tumorklassifikation

Für die Analyse standen in Paraffin eingebettete Gewebeproben von insgesamt 22 Tieren aus den Jahren 1984 - 2006 zur Verfügung. Die 13 Hunde der Gruppe 1 und die 9 Katzen der Gruppe 2 wurden jeweils lichtmikroskopisch am H.E.-Schnitt gesichtet und eine vorläufige Gradeinteilung nach dem humanpathologischen Klassifikationssystem nach HYAMS für Ästhesioneuroblastome vorgenommen. Aufgrund einiger histologischer Abweichungen stellte sich dieses Schema als eingeschränkt in der Anwendung für Hund und Katze heraus. Zu den Variationen zählen ausgeprägte Nekrosen selbst bei hohem Differenzierungsgrad, die generell hohe mitotische Aktivität, das frequentere Auftreten von Rosetten bei der Katze (siehe Abbildung 4.5 und 4.6) und eine gelegentlich auftretende Begleitentzündung beim Hund, welche unabhängig vom Differenzierungsgrad ist. Eine Unterscheidung der verschiedenen Rosettenformationen, wie auf Seite 7 beschrieben (siehe Abbildung 2.2), ist nicht praktikabel. Verkalkungen spielen kaum eine Rolle. Grosse Schwierigkeiten entstanden bei der Definition der fibrillären Matrix, wahlweise auch Neuropil genannt.

Gemeinsamkeiten zur Humanpathologie sind die stark variierende Zytoarchitektur und die Morphologie der Tumorzellen. Sie sind stets unscharf begrenzt, klein und rund, zytoplasmaarm mit unscheinbaren Kernkörperchen (siehe Kapitel 2.1.7).

Es war erforderlich das bestehende Klassifikationssystem nach HYAMS zu modifizieren, so dass es gleichermaßen bei Hund und Katze anwendbar wird. Das Merkmal *fibrillärer Hintergrund* wurde gestrichen, eine Unterscheidung der verschiedenen Rosettenformationen aufgehoben und bei den anderen Merkmalen die Bewertungen verändert. Die Einteilung der Tumoren in die Grade 1 bis 4 entsprechend dem Grad der Entdifferenzierung wurde beibehalten (siehe Abbildung 4.2).

In der Gruppe 1 der Hunde und der Gruppe 2 der Katzen sind jeweils die Grade 1 bis 4 vertreten, am häufigsten die Grade 2 und 3. Der Mittelwert liegt in der Gruppe der Hunde bei 2,54 bei einer Standardabweichung von 0,877. In der Gruppe der Katzen beträgt der Mittelwert 2,33 und die Standardabweichung 1,0. Die Ästhesioneuroblastome der Katze sind demzufolge insgesamt differenzierter, d.h. sie haben einen niedrigeren Grad, als die der Hunde.

Hunde		Katzen	
Nr.	Grad	Nr.	Grad
1	2	1	4
2	2	2	2
3	2	3	3
4	3	4	1
5	1	5	2
6	3	6	3
7	4	7	3
8	4	8	2
9	2	9	1
10	2		
11	3		
12	3		
13	2		

Hunde Grad 1: 1, Grad 2: 6, Grad 3: 4, Grad 4: 2
Katzen Grad 1: 2, Grad 2: 3, Grad 3: 3, Grad 4: 1

Tabelle 4.1: **Gradeinteilung der Gruppe 1 und der Gruppe 2.** Sowohl bei den Hunden als auch bei den Katzen sind alle vier Grade vertreten, am häufigsten 2 und 3. Der Mittelwert liegt in der Gruppe 1 bei 2,54 und in der Gruppe 2 bei 2,33. Damit sind die Ästhesioneuroblastome der Katze differenzierter als die der Hunde.

Merkmal \ Grad	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
lobuläre Zytoarchitektur	+	+/-	+/-	+/-
nukleärer Polymorphismus	-	+	++	+++
Mitosen	+/-	+	++	+++
Nekrosen	+/-	+	++	+++
Rosetten	+/-	+/-	+/-	-
Verkalkungen	+/-	+/-	-	-

Abbildung 4.2: **Modifikation des Klassifikationssystems nach HYAMS. Das Merkmal *fibrillärer Hintergrund* wurde komplett gestrichen und die Unterscheidung der Rosettenformationen aufgehoben. Bei den anderen Charakteristika wurde lediglich die Bewertung entsprechend der histologischen Befunde bei Hund und Katze abgewandelt.**

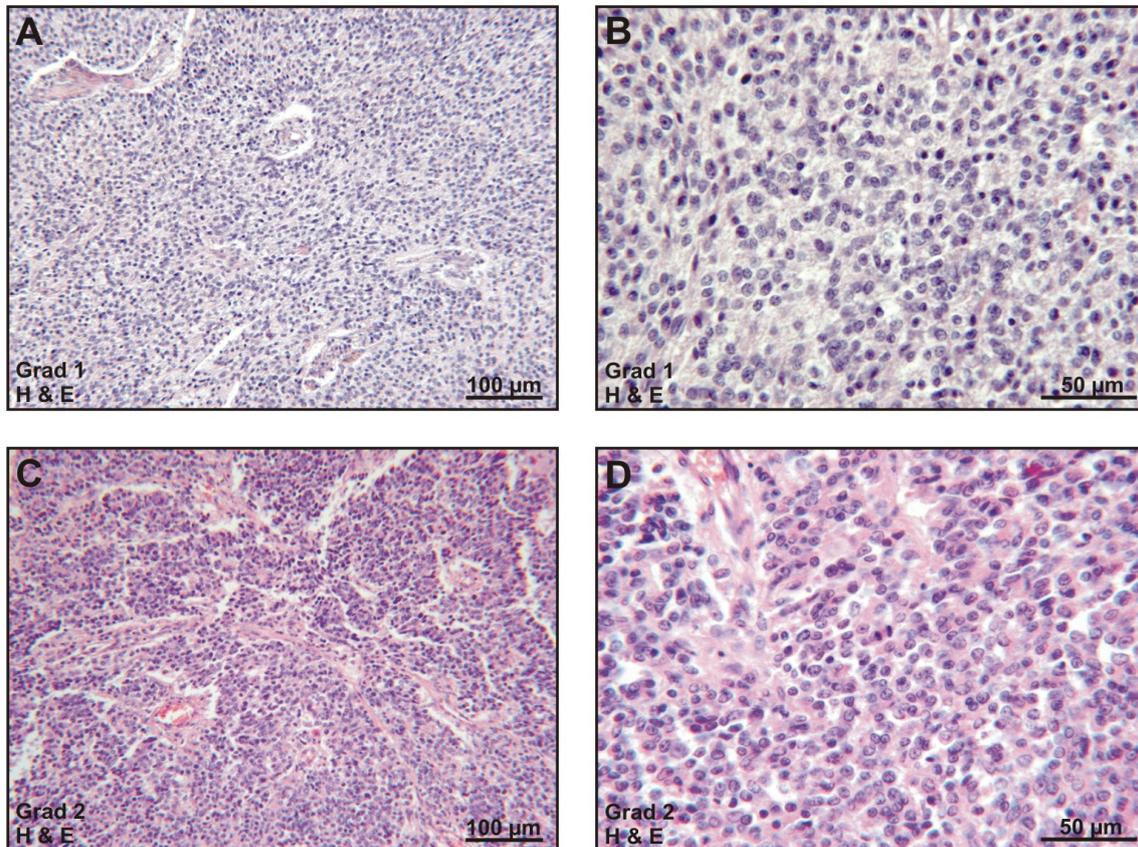


Abbildung 4.3: **Histologische Gradeinteilung der Gruppe 1 der Hunde, H&E-Färbung: A, B Grad 1 (Fall Nr. 186.90): Die Tumorzellen sind angedeutet lobulär formiert, uniform, Mitosen sind kaum auffindbar, Nekrosen treten nicht und Rosettenformationen meist auf. Verkalkungen können vorkommen. C, D Grad 2 (Fall Nr. 218.85): Die lobuläre Zytoarchitektur kann stellenweise aufgelockert sein. Die neoplastischen Zellen sind weniger uniform und Mitosen, Nekrosen und Rosetten treten häufiger auf.**

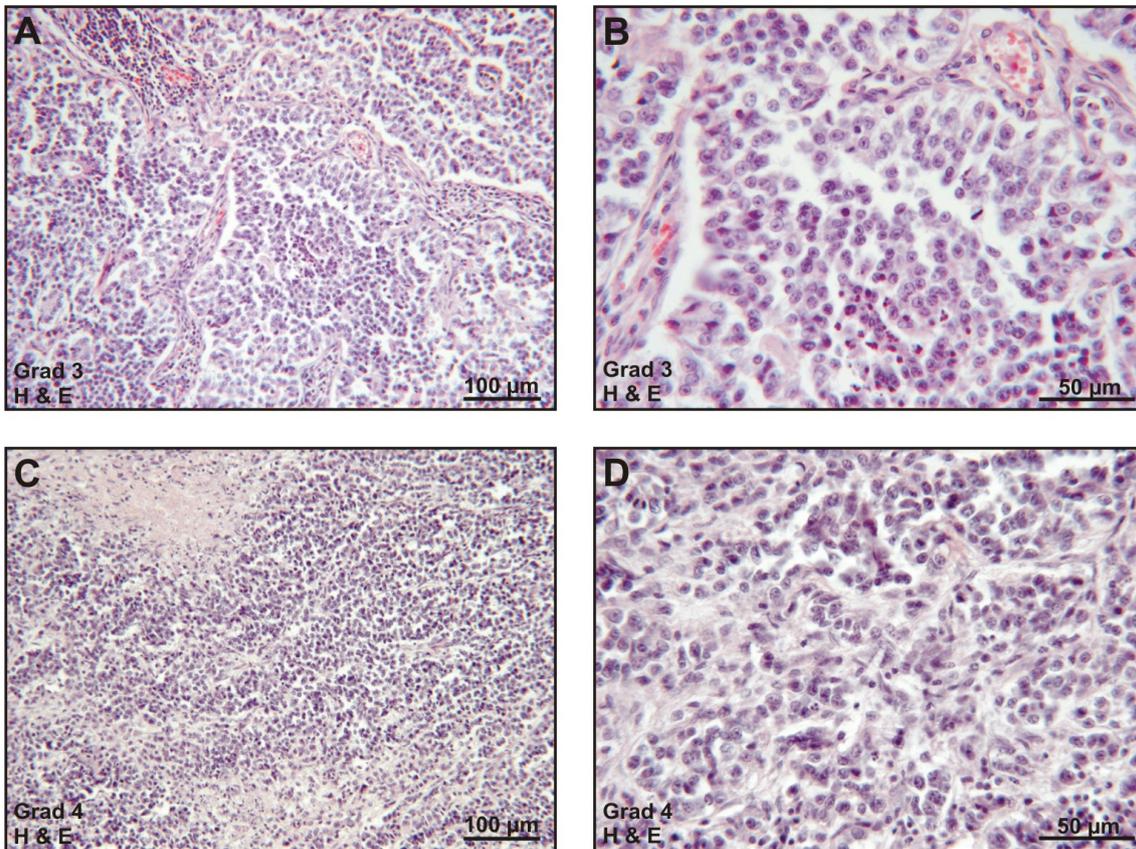


Abbildung 4.4: **Histologische Gradeinteilung der Gruppe 1 der Hunde, H&E-Färbung: A, B Grad 3 (Fall Nr. 424.92):** Die lobuläre Zytoarchitektur ist weniger häufig anzutreffen. Die Tumorzellen sind vielgestaltiger, Nekrosen und Mitosen treten regelmäßig auf und Rosetten können beobachtet werden. **C, D Grad 4 (Fall Nr. 428.06):** Die neoplastischen Zellen verlieren eine geordnete Zytoarchitektur und sind sehr polymorph. Die mitotische Aktivität und der Zelluntergang sind sehr hoch; häufig sind apoptotische Zellen erkennbar. Es treten keine Rosettenformationen auf.

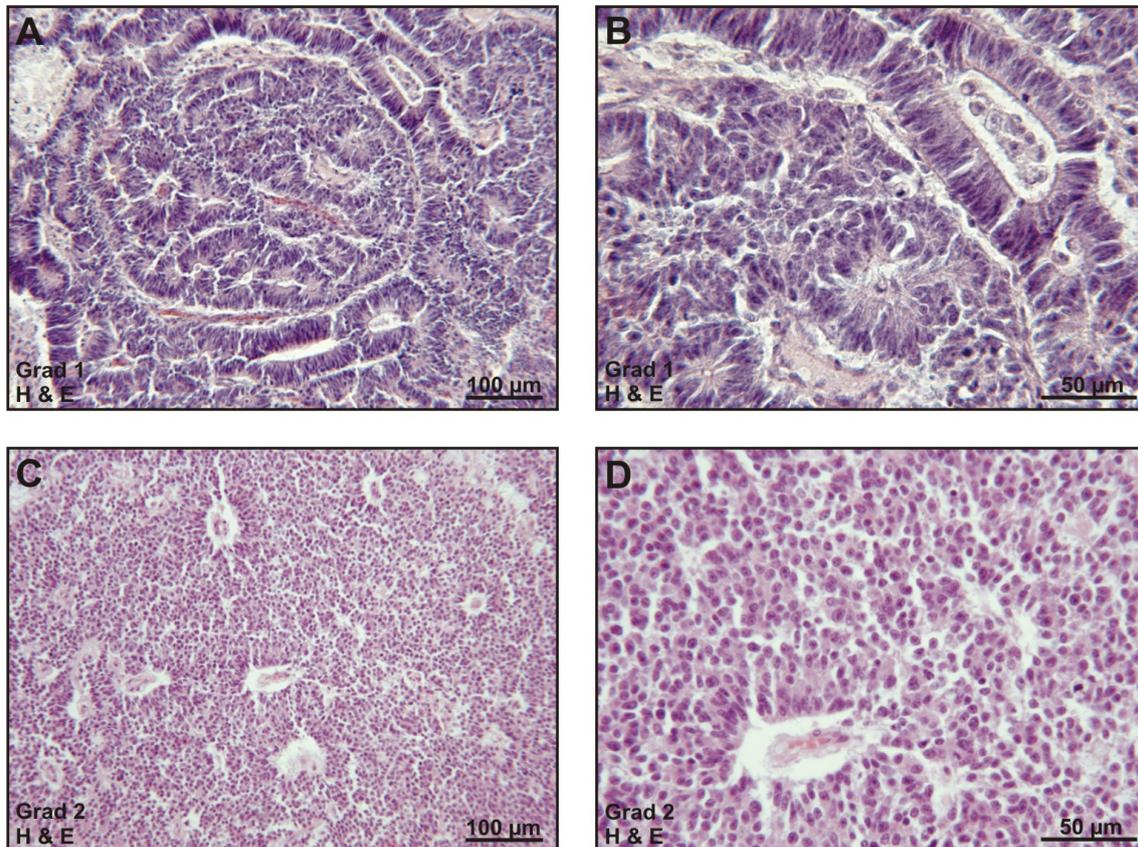


Abbildung 4.5: **Histologische Gradeinteilung der Gruppe 2 der Katzen, H&E-Färbung: A, B Grad 1 (Fall Nr. 393.05): Die lobuläre Zytoarchitektur ist sehr stark ausgeprägt. Die Tumorzellen sind uniform und bilden oft alle Arten von Rosetten (siehe Kapitel 2.1.7). Nekrosen und Mitosen sind selten oder gar nicht anzutreffen. C, D Grad 2 (Fall Nr. 316.90): Die ausgeprägt lobuläre Architektur des Tumors kann sich auflockern. Die Rosettenbildung ist aber immer noch sehr markant; Nekrosen sind eher selten. Die neoplastischen Zellen sind weniger uniform und die Mitoserate steigt leicht an.**

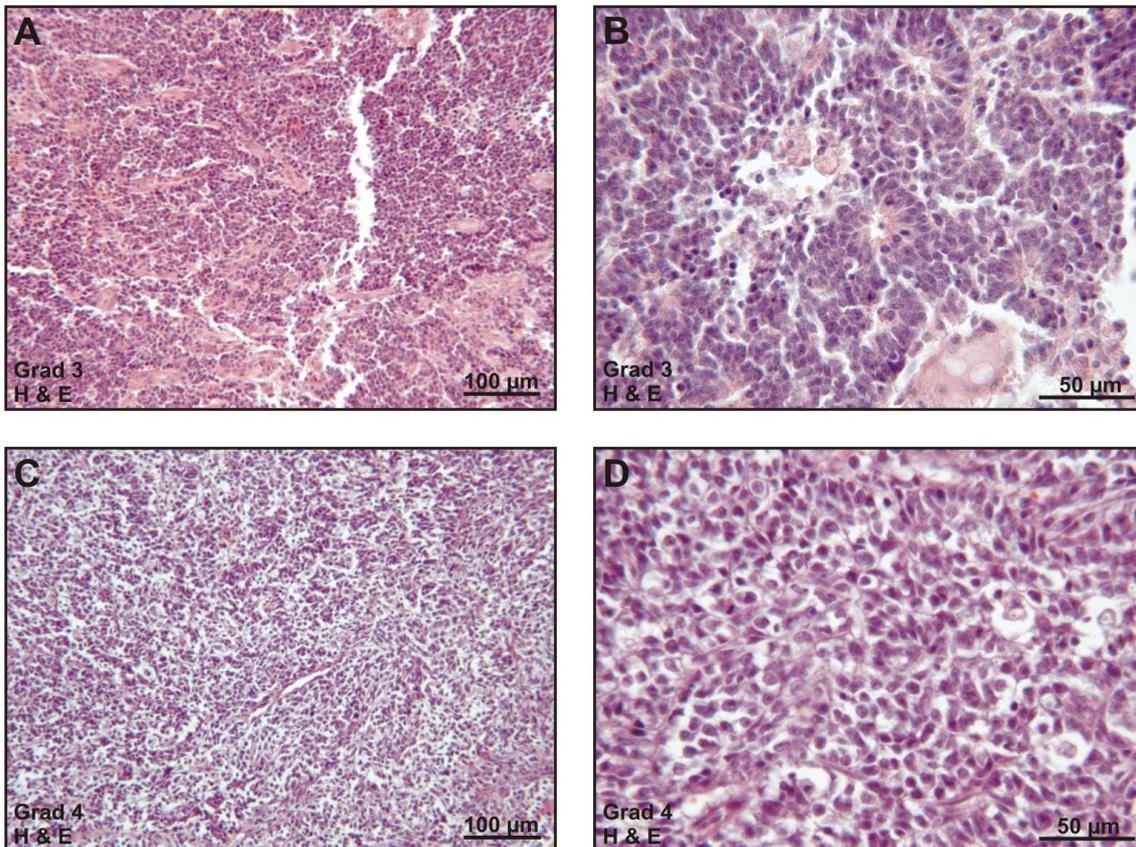


Abbildung 4.6: **Histologische Gradeinteilung der Gruppe 2 der Katzen, H&E-Färbung: A, B Grad 3 (Fall Nr. 69.93): Die Tumorzellen sind nur angedeutet lobulär angeordnet und meist polymorph. Nekrosen treten häufig und Rosettenformationen selten auf. Die mitotische Aktivität ist hoch. C, D Grad 4 (283.85): Das neoplastische Gewebe weist keine lobuläre Formierung auf und ausgedehnte Nekrosen sind zu finden. Die Zellen sind hochgradig polymorph, sind nicht in Rosetten angeordnet und besitzen eine sehr hohe mitotische Aktivität.**

4.3 Immunhistochemische Auswertung der neuronenspezifischen Marker MAP-2 und NeuN im Vergleich mit NSE

4.3.1 MAP-2

Die immunhistochemische Darstellung des neuronenspezifischen Proteins MAP-2 erfolgte mittels des antikörperproduzierenden Klons AP18, der die Isoformen MAP-2a,b und c detektiert. Immunpositive Zellen variieren in ihrer Häufigkeit und sind regellos diffus im Tumorgewebe verteilt und zeigen eine vorwiegend zytoplasmatische immunhistochemische Reaktion, während der Zellkern sich nur schwach anfärbt. Auffallend sind die teils auftretenden intensiv angefärbten neuritenähnliche Fortsätze (siehe Abbildung 4.7). In 4 von 9 Fällen von felinen Ästhesioneuroblastomen bilden die positiv gefärbten Zellen bandartige Herde in der Peripherie. Die Tumorzellen sind dabei in diesem Bereich kleiner, rund und ärmer an Zytoplasma (siehe Abbildung 4.9). Nur ein Tumor der Katze war immunhistochemisch negativ (Fall Nr. 154.97).

In der Regel ist keine Hintergrundfärbung vorhanden, jedoch gelegentlich tritt eine unspezifische Gewebereaktion auf. Andere Zellpopulationen, wie Entzündungszellen, Endothelzellen oder Gliazellen sind nicht immunreaktiv.

Als Positivkontrolle findet kanines Kleinhirn Anwendung. Die Körnerzellen zeigen eine stark variierende Färbintensität von hell- bis dunkelbraun. Eine zusätzliche positive Bestätigung ergibt sich aus dem stellenweise, die Tumoren umgebenden Hirngewebe, das in beiden Gruppen zu finden ist. In diesen Arealen liegt ein ähnliches Färbemuster vor, wie in den neoplastischen Zellen. Eine Unterscheidung von Dendriten und Axonen ist nicht möglich (siehe Abbildung 4.12).

Der prozentuale Anteil immunhistochemisch positiver neoplastischer Zellen wurde semiquantitativ bestimmt. In Anlehnung an eine ähnliche Untersuchung an humanen Gliomen [282] bzw. humanen Oligodendrogliomen [133] sind vier Gruppen gebildet worden:

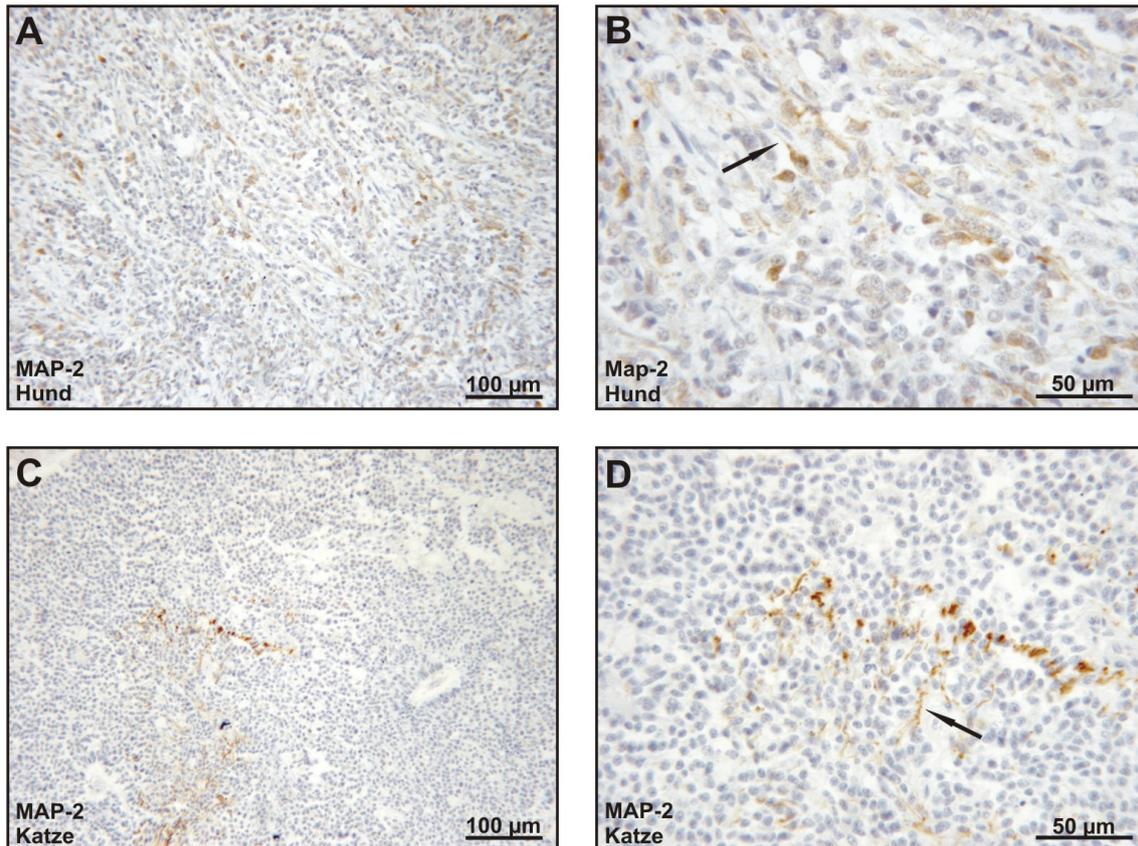


Abbildung 4.7: Immunhistochemische Darstellung von MAP-2. A, B (Fall Nr. 428.06): Hund: Das Zytoplasma und die neuritenähnlichen Gebilde färben sich mittelbraun an (Pfeile), der Zellkern hellbraun. C, D (Fall Nr. 316.90): Katze: Die immunhistochemische Färbung zeigt ähnliche Ergebnisse wie beim Hund. Auffallend ist eine teils im Randbereich auftretende Subpopulation des Tumors, die eine nukleäre mittel- bis dunkelbraune Färbung aufweist (siehe Abbildung 4.9).

Gruppe	Anteil positiver Zellen	Hunde (n)	Katzen (n)
1	0-1%	0,0% (0)	11,1% (1)
2	1-33%	38,4% (5)	44,4% (4)
3	33-66%	30,8% (4)	33,3% (3)
4	>66%	30,8% (4)	11,1% (1)
(n) Anzahl der Fälle dieser Gruppe			

Tabelle 4.2: **Semiquantitative Auswertung von MAP-2 bei den Ästhesioneuroblastomen von Hund und Katze. Entsprechend dem prozentualen Anteil positiver Tumorzellen (*kursiv*) wurden vier Gruppen gebildet. Bei den Hunden verteilt sich der Gehalt von MAP-2 gleichmäßig, während bei den Katzen eine geringe bis mittlere immunhistochemische Markierung zu erkennen ist.**

Bei den Hunden ist kein Tumor MAP-2-negativ. Der Gehalt an MAP-2 verteilt sich in den 13 Tumoren nahezu gleichmäßig auf die Gruppen 2 bis 4, während bei den Katzen ein Ästhesioneuroblastom unmarkiert in Erscheinung tritt. Die meisten feline Tumoren besitzen eine geringe bis mittlere Immunreaktivität und nur ein Ästhesioneuroblastom färbt sich intensiv an. Das arithmetische Mittel der Gruppe der Hunde (2,92) liegt etwas höher als das der Gruppe der Katzen (2,44).

Im Vergleich mit der Gradeinteilung lassen sich nur vorsichtige Aussagen treffen. Stark differenzierte Ästhesioneuroblastome (1. Grad) besitzen weniger MAP-2 positive Zellen, während Neoplasien zweiten Grades bei den Hunden keinen bis einen hohen bzw. bei den Katzen einen geringen bis hohen Gehalt dieses Proteins aufweisen können. Tumoren dritten Grades verhalten sich, bis auf das Fehlen einer mittleren Färbeintensität bei den Hunden, ähnlich wie die zweiten Grades. Im Gegensatz dazu ist in Ästhesioneuroblastomen vierten Grades eine mittlere Markierungsstärke zu finden (siehe Abbildung 4.8).

Die Werte korrelieren markant positiv in der Gruppe 2 der Katzen, während in der Gruppe 1 die positive Korrelation nur schwach ausfällt (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho 0,572 bzw. 0,168). Sie weisen jedoch keine Signifikanz auf (Chi-Quadrat Test nach Pearson 0,11; Kontingenzkoeffizient 0,11; Kendall-Tau-b 0,12) (siehe Kapitel 3.3.7).

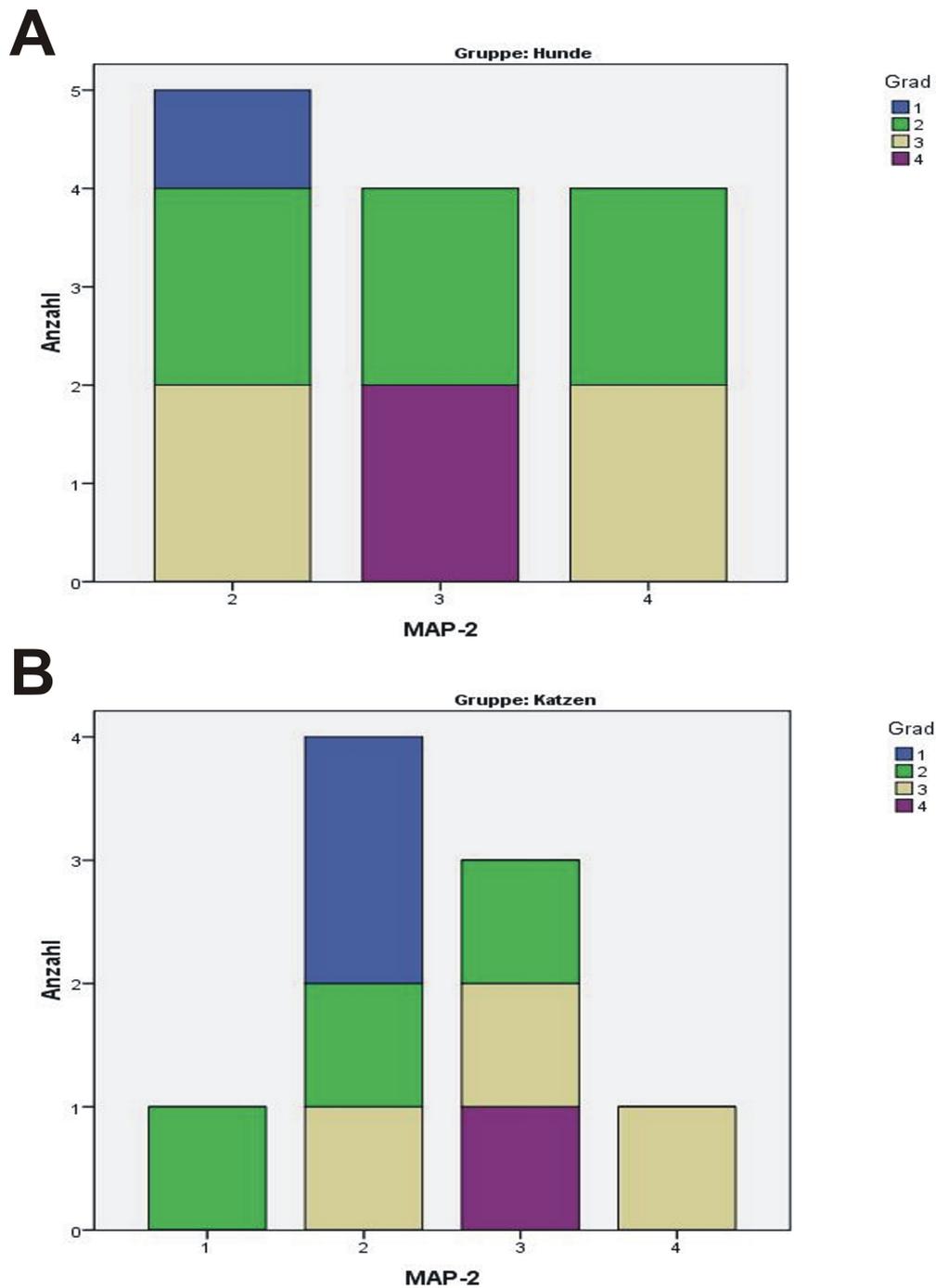


Abbildung 4.8: **MAP-2 im Vergleich mit der Gradeinteilung.** Die Ästhesioneu-
roblastome zweiten Grades weisen bei den Hunden (A) keinen bis einen
mittleren Gehalt und bei den Katzen (B) einen geringen bis hohen Gehalt
an MAP-2 auf. Ähnliche Resultate sind beim Grad drei zu finden. Hoch dif-
ferenzierte Tumoren besitzen einen geringen Gehalt dieses Proteins und
stark entdifferenzierte Neoplasien färben sich mittelgradig an.

4.3.2 NeuN

Die immunhistochemische Darstellung des neuronenspezifischen Markers NeuN erfolgt durch den Antikörper des Klons A60. Die Farbreaktion variiert Spezies-spezifisch sehr stark. Bei den Hunden ist ein inhomogenes, wolkiges, intrazytoplasmatisches, mittel- bis dunkelbraunes Färbemuster zu erkennen. Die reaktiven Zellen liegen im gesamten Tumor unregelmäßig verteilt. Es besteht eine deutliche Assoziation zu den Rosetten, innerhalb derer das Protein intrazytoplasmatisch, apikal lokalisiert ist. Die Menge der reaktiven Zellen variiert zwischen etwa 10% und 80%. Die beiden Fälle 11856.03 und 12757.04 sind immunnegativ. Bei den Katzen ist eine grundlegend andere Verteilung zu erkennen. Die reaktiven Zellen sind kettenähnlich, ein- oder mehrreihig manchmal fokal im Randbereich des Ästhesioneuroblastoms angeordnet. Auffallend ist auch die partielle Anfärbung der das Hirngewebe infiltrierenden Population. Die Eindringtiefe in den soliden Teil der Neoplasie reicht dabei bis ca. $250\mu\text{m}$. Die teils auftretenden Herde können bis etwa 50 Zellen umfassen. Auffallend ist die negative Immunreaktivität des Tumorzentrums und im Besonderen aller Rosettenformationen. Im Inneren des Tumors sind immunreaktive Zellen regellos und sehr spärlich zu finden. Die markierten Zellen sind generell sehr klein, rund bis oval, ausschließlich der Zellkern färbt sich immunhistochemisch mittel- bis dunkelbraun. In ihrer Umgebung liegen ebenfalls immer ähnliche immunnegative Zellen. Weder beim Hund noch bei der Katze tritt eine Hintergrundfärbung auf. Andere Zellpopulationen wie Endothelzellen, Entzündungszellen oder Gliazellen färben sich immunhistochemisch nicht mit NeuN an.

Als Positivkontrolle diente Kleinhirn und Riechschleimhaut vom Hundes. Die Körnerzellen des Kleinhirns zeigen eine stark variierende Farbintensität von hell- bis dunkelbraun, während die PURKINJE-Zellen immunnegativ bleiben. Wie auch bei NSE und MAP-2 stellt das die Ästhesioneuroblastome teils umgebende Hirngewebe eine praktische interne Positivkontrolle dar. Hier färben sich die Nuklei der Nervenzellen, die Perikarya und die neuronalen Fortsätze intensiv dunkelbraun (siehe Abbildung 4.12).

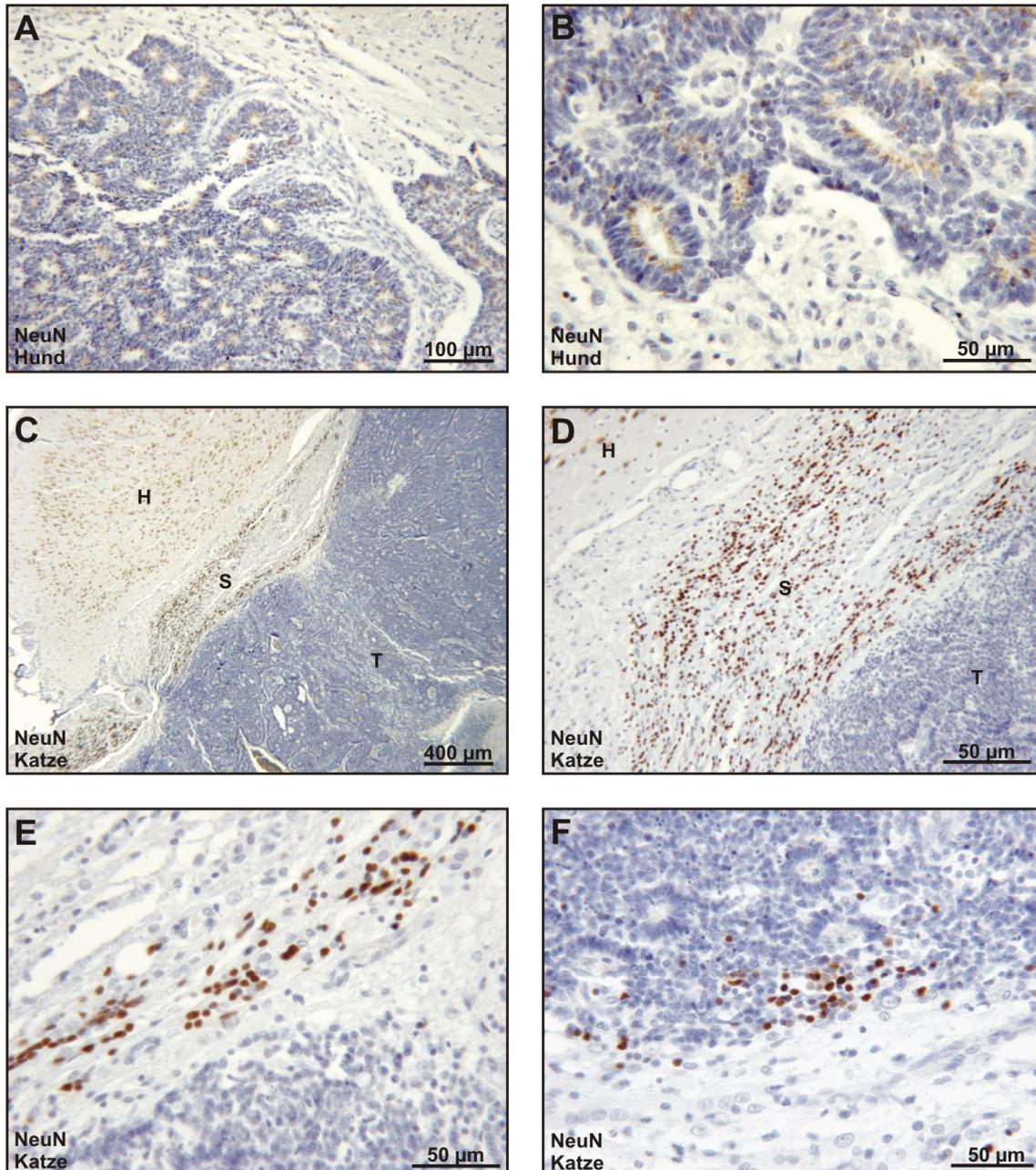


Abbildung 4.9: Immunhistochemische Darstellung von NeuN. A, B (Fall Nr. 449.04): Hund: Die Zellen liegen unregelmäßig im gesamten Tumor verteilt mit inhomogenem, wolkigen, intrazytoplasmatischen, mittel- bis dunkelbraunem Färbemuster. C, D, E (Fall Nr. 92.96) bzw. F (Fall Nr. 393.05): Katze: Die immunhistochemisch positiven Zellen sind kettenähnlich, ein- oder mehrreihig, teils fokal angeordnet. Die neoplastischen Zellen sind klein, rund bis oval mit deutlich angefärbtem Nucleus. H = Hirn, S = Subpopulation, T = Tumor.

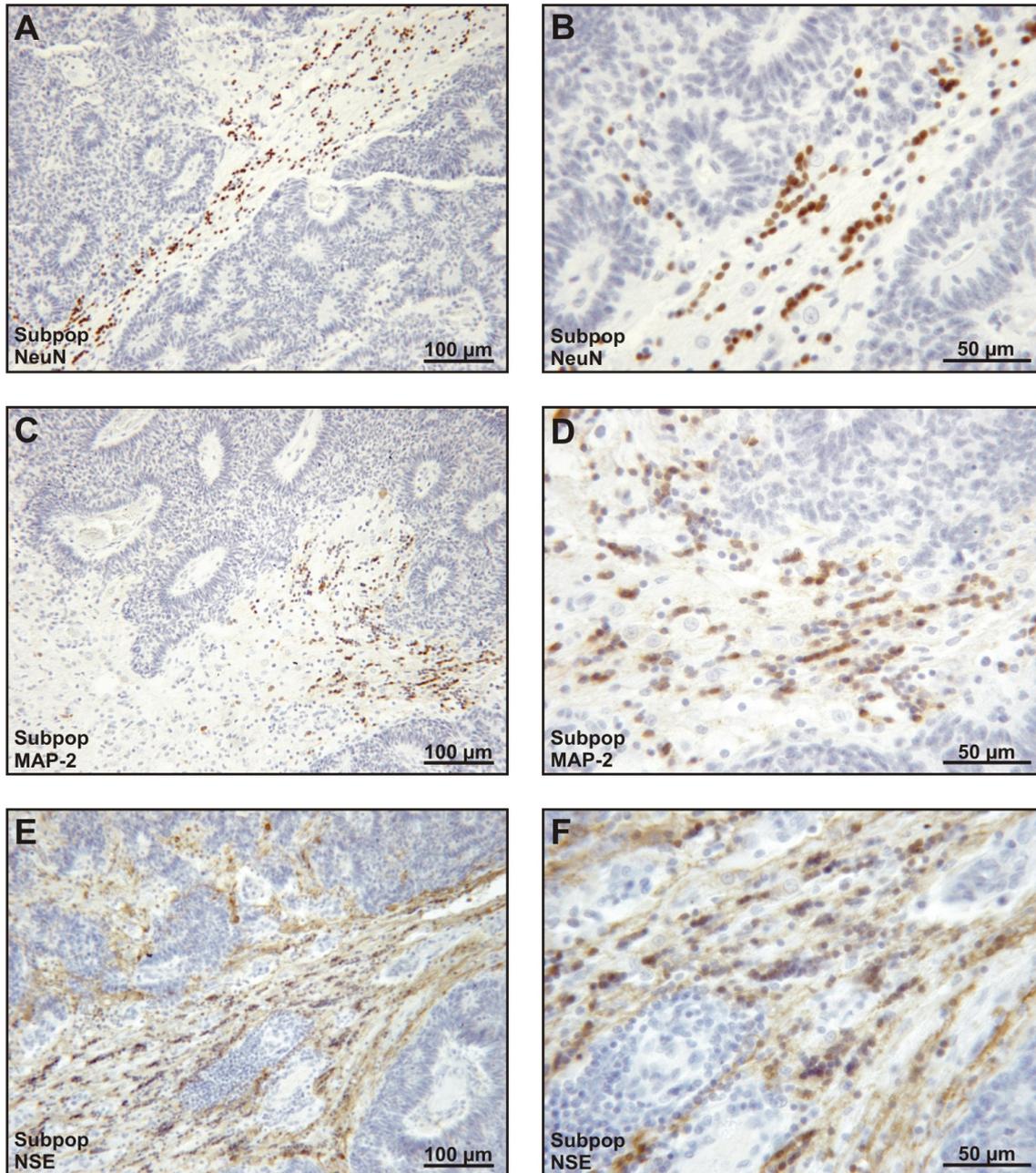


Abbildung 4.10: Die Subpopulation im immunhistochemischen Vergleich. A, B NeuN; C, D MAP-2; D, E NSE (Fall Nr. 393.05): Katze: Die intensive unspezifische Färbung bei NSE erschwert das Erkennen der Subpopulation.

4.3.3 NSE

Die neuronenspezifische Enolase (NSE) konnte mittels eines polyklonalen Antikörpers in allen gewählten Tumoren detektiert werden und stellt sich als eine unscharf begrenzte, hell- bis dunkelbraune, mit dem Zytoplasma, selten auch mit dem Zellkern assoziierte Färbung dar. Bei allen 22 Ästhesioneuroblastomen ist eine, die Abgrenzung der diffus verteilten Tumorzellen erschwerende, unspezifische Hintergrundreaktion sowie ein ausgeprägtes Randphänomen in Form einer homogenen mittelgradigen Anfärbung vorhanden (siehe Abbildung 4.11). Diese behindert ebenfalls die Darstellung der bereits in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 erwähnten Subpopulation (siehe Abbildung 4.10). Auffallend ist eine homogene mittelgradige Braunfärbung in Biopтатаen (Fall Nr. 6227.03, 11856.03, 32546.03, 12757.04 und 9593.05). Entzündungszellen und Gliazellen lassen keine Immunreaktivität erkennen. In Endothelzellen manifestiert sich jedoch stellenweise eine positive Immunantwort und Erythrozyten sind regelmäßig immunreaktiv. Nekrotische Areale lassen regelmäßig eine unscharf begrenzte Anfärbung erkennen.

Als interne Positivkontrolle diente das partiell in der Peripherie der Tumoren gelegene angrenzende Hirngewebe. Neuronale Zellkerne, wie auch deren Perikaryon und Neuriten zeigen eine mittel- bis dunkelbraune Färbung. Eine Unterscheidung zwischen Dendriten und Axonen ist in diesen immunhistochemischen Präparaten jedoch nicht zu erkennen (siehe Abbildung 4.12).

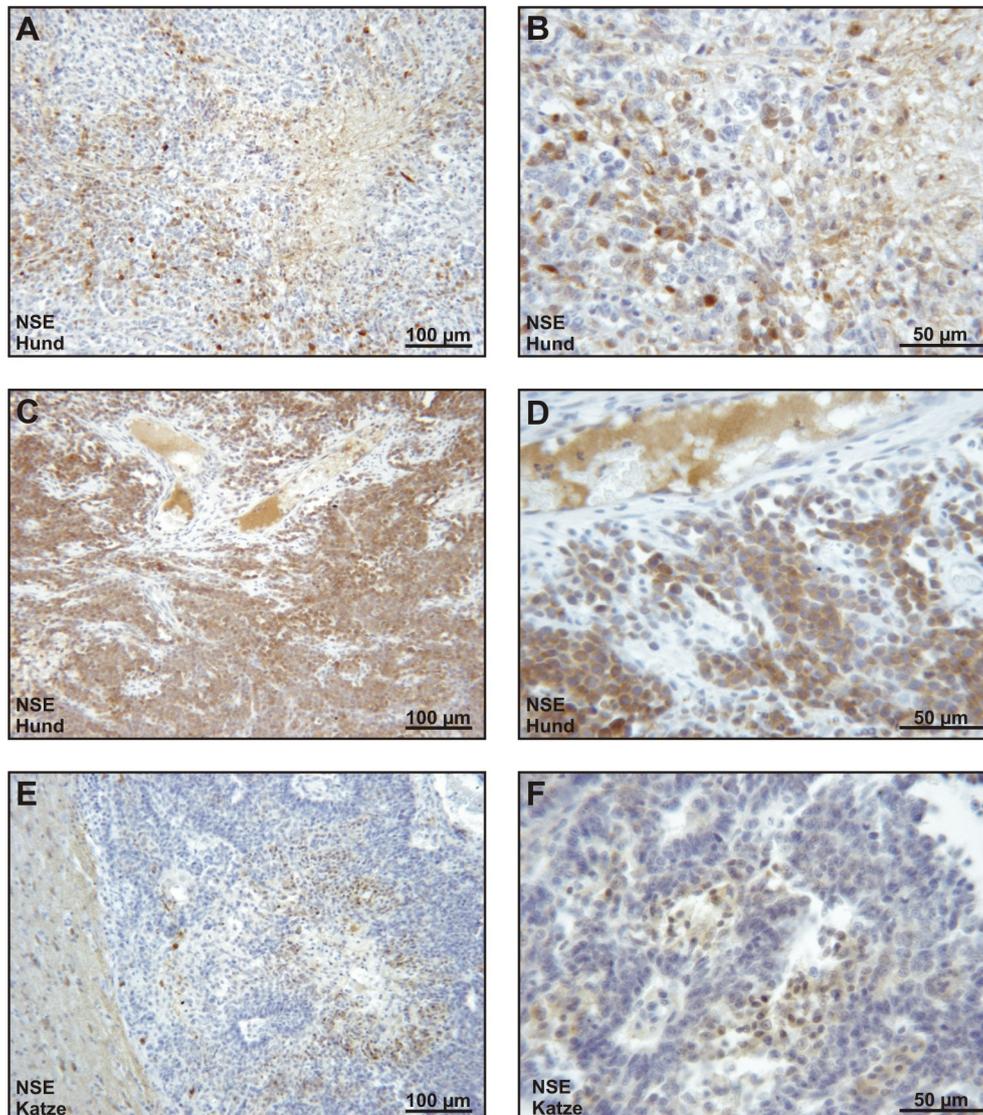


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Darstellung von NSE. A, B (Fall Nr. 428.06); E, F (Fall Nr. 393.05): Hund, Katze: Die neoplastischen Zellen sind diffus, regellos verteilt und zeigen eine gering- bis hochgradige, intrazytoplasmatische, bis in die Neuriten reichende Braunfärbung. C, D (Fall Nr. 12757.04): Hund: Die Abgrenzung der Tumorzellen wird durch eine ausgeprägte Hintergrundfärbung erschwert.

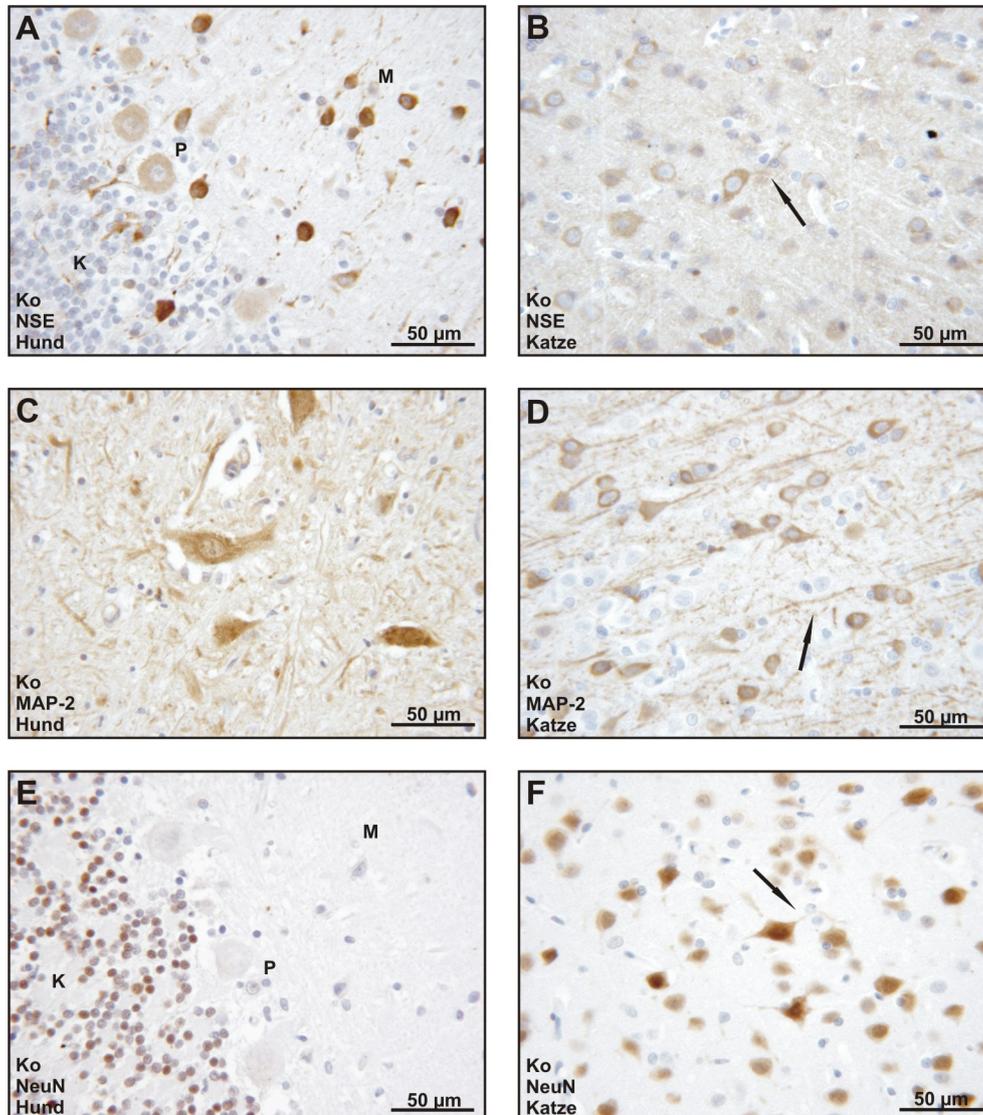


Abbildung 4.12: Färbemuster von MAP-2, NeuN und NSE im Vergleich. B, C, D, F: Grosshirn (Fall Nr. 393.05): Katze: MAP-2 und NSE zeigen eine deutliche intrazytoplasmatische Anfärbung, die bis in die Neuriten zu verfolgen ist. NeuN lässt sich hingegen im Zellkern und den neuronalen Fortsätzen nachweisen. A, E: Kleinhirn (Positivkontrolle): PURKINJE-Zellen (P) enthalten NSE, jedoch kein NeuN. Die Körnerzellschicht (K) reagiert teils NSE-immunpositiv, während die Molekularschicht (M) unmarkiert ist. Bei NeuN liegen umgekehrte Verhältnisse vor.

4.4 Bestimmung der Proliferationsrate

4.4.1 Mitose-Index

Der Mitose-Index (MI) ist definiert als die Anzahl der Mitosefiguren in 10 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung. Die mitotische Aktivität ist generell relativ hoch. Der Mitose-Index der Gruppe 1 der Hunde beträgt im Median 27,0 bei einem Minimum von 16 und einem Maximum von 48. Die Spannweite R liegt bei 32 und die Standardabweichung (SD) bei 8,126. In der Gruppe 2 der Katzen liegt der Median etwas höher (34) bei einem Minimum von 14 und einem Maximum von 62. Die Spannweite beträgt 48 und die Standardabweichung (SD) 16,053. Die Mitose-Indices in den kaninen und felinen Tumoren korrelieren mittelgradig positiv mit der Gradeinteilung (Korrelation nach Bravais und Pearson, Korrelationskoeffizient 0,370 bzw. 0,423). Es liegt jedoch keine Signifikanz (p) vor (Gruppe 1 $p = 0,214$ und Gruppe 2 $p = 0,257$, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) (siehe Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3).

4.4.2 Immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki-67

Bei diesem immunhistochemischen Verfahren werden proliferierende Zellen mit einem spezifischen, paraffingängigen Primärantikörper aus der Maus markiert (MIB-1). Eine positive Reaktion manifestiert sich in allen 22 Ästhesioneuroblastomen als unregelmäßiges und rosettenassoziiertes Färbemuster. Die Anzahl der feingranulären, mittel- bis dunkelbraun kolorierten Zellkerne variiert erheblich. Daneben sind intensiv markierte Kernkörperchen aufzufinden. In der Mitose-Phase zeigt das kondensierte Chromatin eine intensiv dunkelbraune Färbung. Das umgebende Zytoplasma stellt sich homogen hellbraun dar. Neuronen und Gliazellen in stellenweise angrenzendem Hirngewebe, sowie Entzündungszellen und Endothelzellen innerhalb des Tumors sind immunnegativ für MIB-1. Die Schnitte sind frei von unspezifischer Hintergrundfärbung (siehe Abbildung 4.13).

Als Positivkontrolle wurde Dünndarmgewebe eines Kalbes verwendet, welches ein immunhistochemisch ähnliches Färbemuster zeigt.

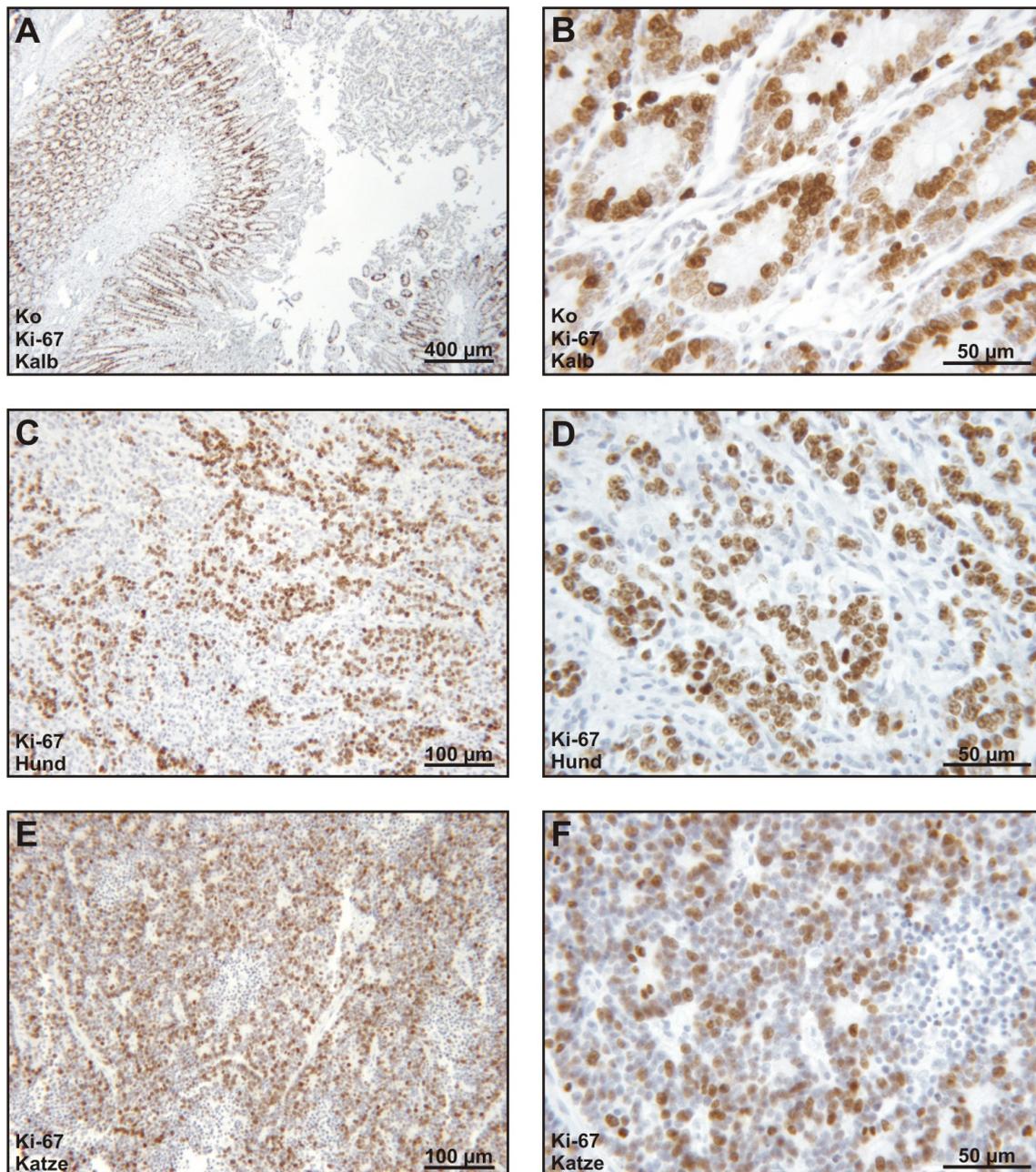


Abbildung 4.13: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67. A, B: Dünndarmgewebe eines Kalbes. Deutlich zu erkennen ist die nukleäre Immunpositivität des Kryptepithels. C, D (Fall Nr. 428.06): Hund. E, F (Fall Nr. 69.93): Katze. Sowohl in den kaninen als auch in den felines Tumoren treten markant bis intensiv gefärbte Zellen in Erscheinung, die unregelmäßig verteilt und rosettenassoziiert vorliegen.

4.4.3 Erstellung des *labeling index* (LI) von Ki-67

Die Ermittlung des Ki-67 LI erfolgt auf der Basis der parallelen Auszählung positiver und negativer Zellkerne in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bis zu einer Mindestzahl von 1000 reaktiven Zellen unter Anwendung des frei erhältlichen Computerprogramms *ImageJ Version 1.41* (<http://www.rsweb.nih.gov/ij>) (siehe Abbildung). Die Indizes eines jeden Tumors sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Der Ki-67 LI liegt bei Hunden zwischen 13,48 und 33,32 bei einem Mittelwert von 21,66 und einem Median von 20,88. Die Spannweite beträgt 19,84 bei einer Standardabweichung von 5,49. Bei den Katzen liegt der Ki-67 LI zwischen 11,98 und 30,42 etwas niedriger als bei den Hunden. Der Mittelwert ist jedoch mit 21,22 etwa gleich, während der Median mit 23,68 etwas höher ist. Die Spannweite beträgt 18,44 bei einer höheren Standardabweichung von 7,12. Die entsprechenden Werte sind vergleichend in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Ki-67 *labeling indices* korrelieren sowohl bei den Hunden (Korrelationskoeffizient $r = 0,734$), als auch bei den Katzen ($r = 0,747$) gleich stark mit der Gradeinteilung. Dabei liegt eine hochgradige Signifikanz vor (Hunde $p = 0,004$ bzw. Katzen $p = 0,021$) (Korrelation nach Bravais und Pearson, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Die Ki-67 Indizes korrelieren mit dem MI bei den Katzen mittel- bis hochgradig ($r = 0,656$), während diese beiden Parameter bei den Hunden nur geringgradig in Verbindung stehen ($r = 0,307$). Eine Signifikanz liegt jedoch in beiden Gruppen nicht vor (Korrelation nach Bravais und Pearson, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Hunde $p = 0,308$, Katzen $p = 0,055$).

Hunde				Katzen			
Nr.N.	Grad	MI*	Ki-67 LI	Nr.N.	Grad	MI*	Ki-67 LI
258.84	2	16	24,12	283.85	4	34	30,42
135.85	2	34	21,31	457.88	2	34	23,68
218.85	2	22	13,48	642.88	3	24	25,68
221.86	3	31	17,24	53.90	1	14	13,25
186.90	1	19	15,10	316.90	2	24	11,99
424.92	3	27	18,41	69.93	3	56	26,44
449.04	4	30	33,32	92.96	3	62	27,01
428.06	4	26	29,11	154.97	2	21	11,98
6227.03	2	20	19,68	393.05	1	39	20,49
11856.03	2	31	20,27				
32546.03	3	27	23,01				
12757.04	3	48	25,70				

*Mitoseindex

Tabelle 4.3: **Analysierte Fälle von Ästhesioneuroblastomen mit Grad, Mitose-Indices (MI) und Ki-67 labeling indices (LI) in beiden Spezies.**

Gruppe	MI MW	Ki-67 MW	MI SD	Ki-67 SD	MI R	Ki-67 R	MI M	Ki-67 M
Hunde	27,77	21,66	8,13	5,49	32	19,84	27,00	20,88
Katzen	34,44	21,22	16,01	7,12	48	18,44	34,00	23,68

Tabelle 4.4: **Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Spannweite (R) und Median (M) des Mitoseindex (MI) und des Ki-67 LI der Gruppe 1 und 2**

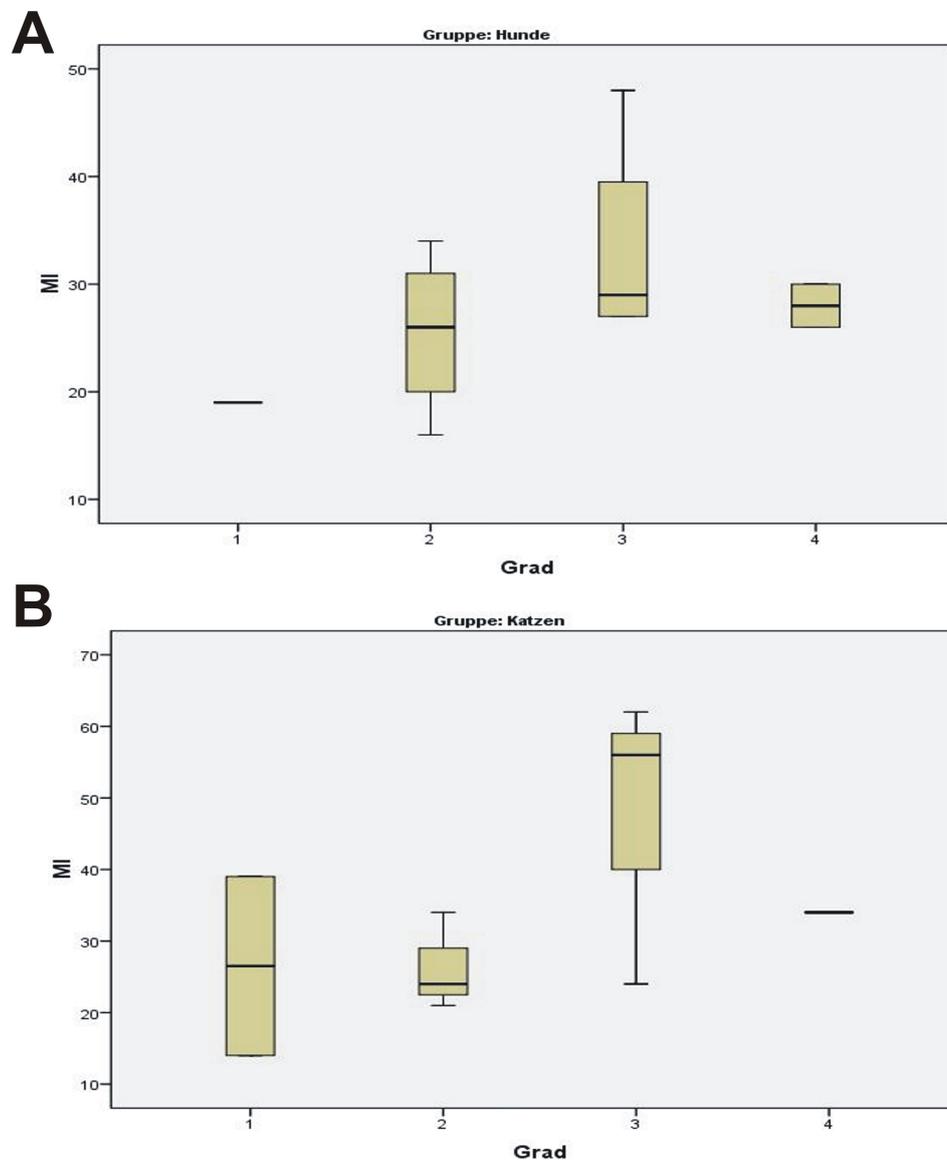


Abbildung 4.14: Korrelation zwischen der Gradeinteilung und dem Mitoseindex bei Hund (A) und Katze (B). Die nominalen Werte sind in Tabelle 4.2 und 4.3 dargestellt. Es besteht eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern (Korrelationskoeffizient $r = 0,370$ (Hund) bzw. $0,423$ (Katze); Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; Korrelation nach Bravais und Pearson).

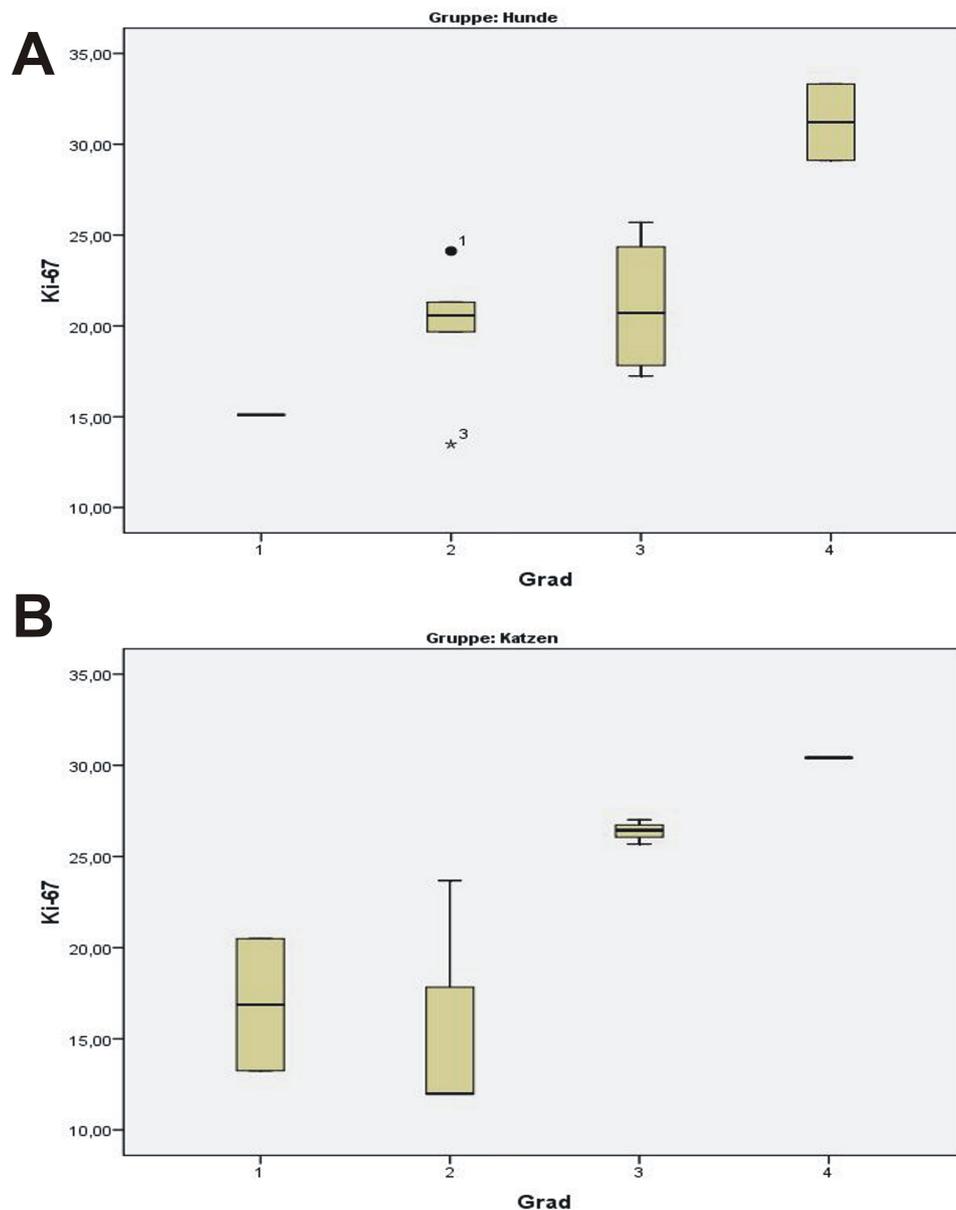


Abbildung 4.15: **Korrelation zwischen Grad und Ki-67 bei Hund (A) und Katze (B).** Die nominalen Werte sind in Tabelle 4.3 dargestellt. Es besteht eine positive Korrelation mit hochgradiger Signifikanz zwischen diesen beiden Parametern (Korrelationskoeffizient $r = 0,734$ (Hund) bzw. $0,747$ (Katze), Signifikanz $p = 0,004$ (Hund) bzw. $0,021$ (Katze); Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; Korrelation nach Bravais und Pearson).

4.5 Immunhistochemische Detektion des Tumorsuppressorproteins p53

Der immunhistochemische Nachweis des Tumorsuppressorproteins p53 erfolgt durch den polyklonalen Antikörper PAb122. Alle 22 Ästhesioneuroblastome bei der Spezies lassen bis auf eine Ausnahme keine immunpositiven Tumorzellen erkennen. In einem kaninen Tumor (Fall Nr. 32546.03) sind einige diffus verteilte, geringgradig markierte Zellen auffindbar. Angrenzendes Hirngewebe und die Blutgefäße zeigen ebenfalls keine positive Farbreaktion. Auch eine unspezifische Hintergrundfärbung ist in allen Tumorpräparaten nicht vorhanden (siehe Abbildung 4.17).

Als Positivkontrollen dienten ein kanines Osteosarkom und ein felines Mammakarzinom. In diesen Präparaten ist eine diffuse, nukleäre Anfärbung zu erkennen. Die Kernkörperchen treten markant hervor (siehe Abbildung 4.16).

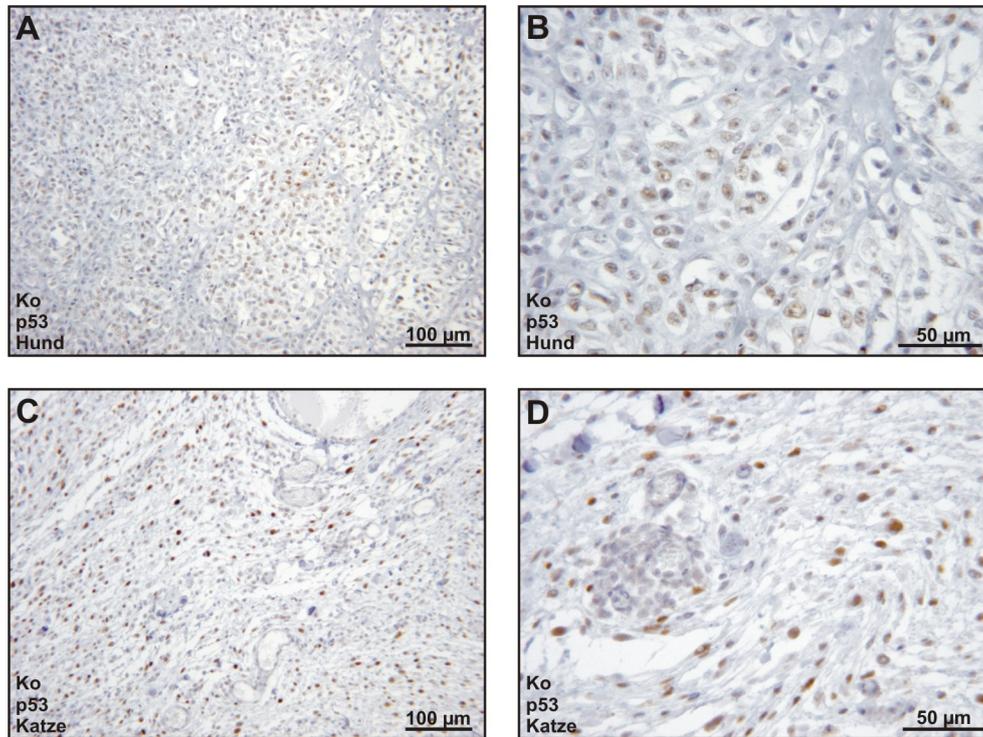


Abbildung 4.16: Immunhistochemische Darstellung von p53 in Kontrollgewebe. **A, B: Osteosarkom eines Hundes. C, D: Mammakarzinom einer Katze. In allen Abbildungen ist eine diffuse, deutliche nukleäre Färbung zu erkennen. Die Kernkörperchen sind intensiv markiert.**

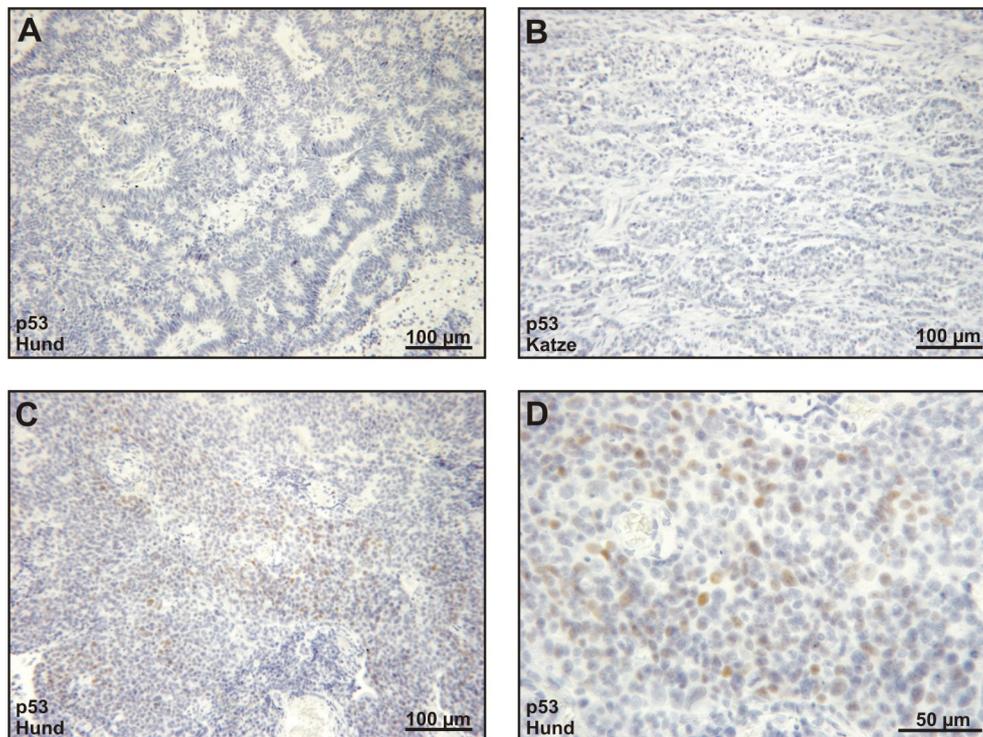


Abbildung 4.17: Detektion von p53 in Ästhesioneuroblastomen. A, B (Fall Nr. 428.06 bzw. 393.05): Die neoplastischen Zellen stellen sich unmarkiert dar. C, D (Fall Nr. 32546.03): In einem kaninen Ästhesioneuroblastom sind einige diffus verteilte, schwach immunreaktive Zellen aufzufinden.

4.6 Immunhistochemische Auswertung des Proto-Onkogens bcl-2

Die gewählten Ästhesioneuroblastome wurden mit dem monoklonalen Antikörper 124 immunhistochemisch auf die Expression von bcl-2 untersucht. In den Tumoren zeigt sich eine positive immunhistochemische Reaktion als granuläre, selten homogene, zytoplasmatische, hell- bis mittelbraune Anfärbung. Die Rosetten sind intrazytoplasmatisch betont apikal markiert. Zum Teil färbt sich Formalinpigment und Zelldebris in Nekrosen dunkelbraun an. Zellpopulationen im partiell angrenzenden Hirngewebe, wie Neuronen oder Glia, aber auch das Endothel der Gefäße und beteiligte Entzündungszellen exprimieren dieses Protein nicht (siehe Abbildung 4.18).

Als Positivkontrolle dienten Anteile eines humanen und eines kaninen Mammakarzinoms, sowie ein felines Lymphom. Im Tumorgewebe von Mensch und Hund zeigen zahlreiche Tumorzellen eine intrazytoplasmatische, mittel- bis dunkelbraune immunhistochemische Reaktion mit einem stellenweise intensiv angefärbten perinukleären Saum, bei gut abgegrenzten, basophilen Zellkern. Zelltrümmer sind ebenfalls teils positiv. Während im humanen Mammakarzinom die Endothelzellen der Gefäße positiv reagierten, färbten sich diese Zellen im kaninen Mammakarzinom nicht an. Die Tumorzellen des felinen Lymphoms hingegen weisen eine nukleäre mittel- bis dunkelbraune Färbung auf (siehe Abbildung 4.18).

Der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen wurde semiquantitativ bestimmt. In Anlehnung an eine ähnliche Untersuchung an humanen Ästhesioneuroblastomen [267] sind vier Gruppen gebildet worden:

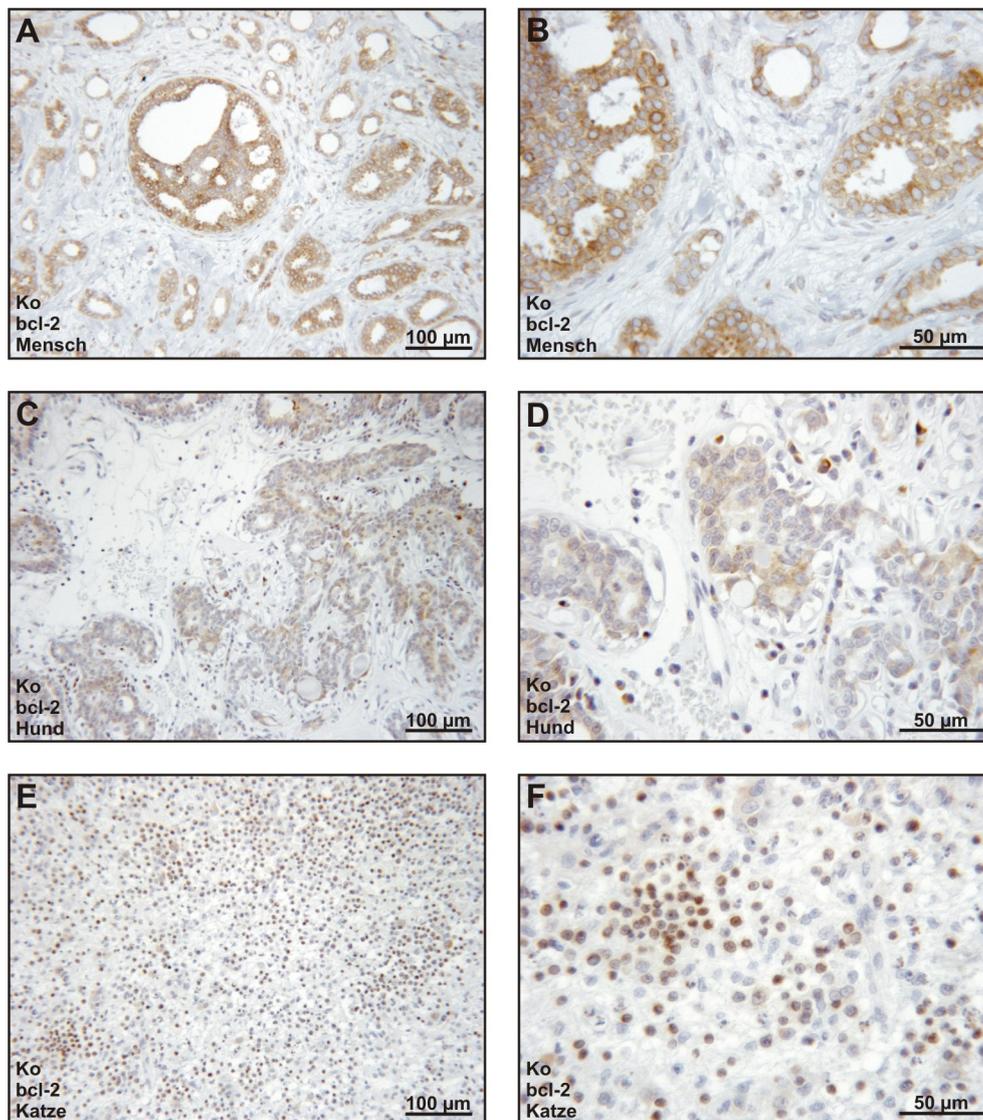


Abbildung 4.18: Immunhistochemische Positivkontrollen für bcl-2. A, B: humanes Mammakarzinom bzw. C, D: kanines Mammakarzinom. Eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung mit scharf abgegrenztem, basophilem Nucleus ist erkennbar. E, F: felines Lymphom: Im Gegensatz zu den Mammakarzinomen ist das spärliche Zytoplasma nur spärlich markiert, der Zellkern hingegen deutlich immunpositiv. Einige Tumorzellen färben sich nicht an.

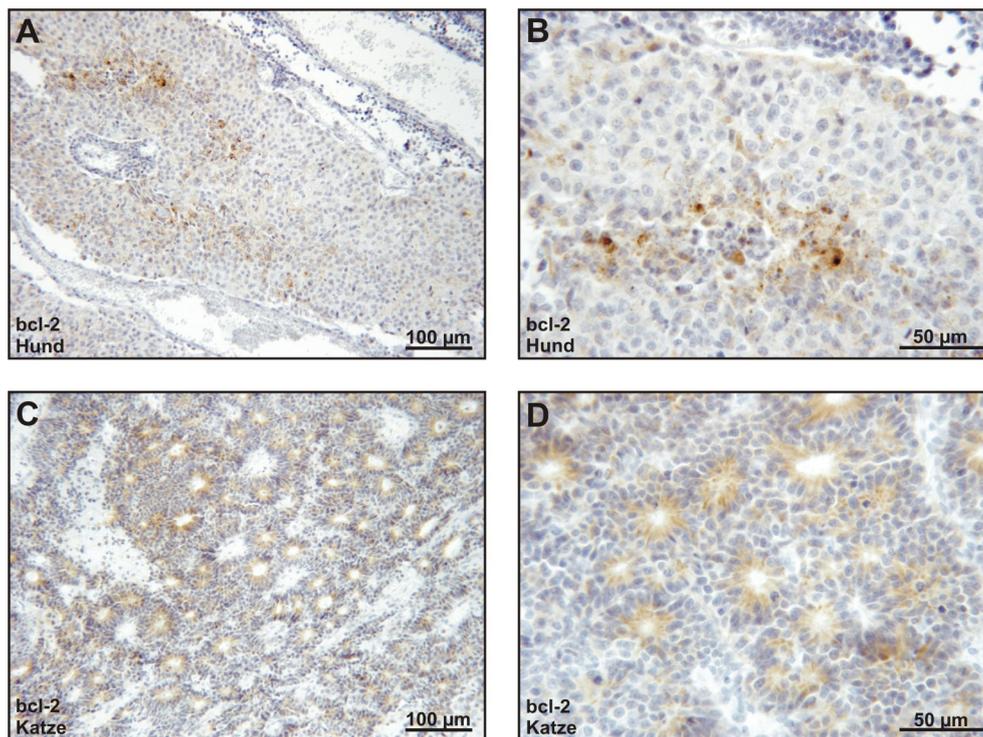


Abbildung 4.19: Immunhistochemische Darstellung von bcl-2. A, B (Fall Nr. 258.84): Hund. C, D (Fall Nr. 642.88): Katze. Bei beiden Spezies fällt eine granuläre, selten homogene zytoplasmatische, hell- bis mittelbraune Anfärbung auf. Die Rosetten sind intrazytoplasmatisch betont apikal immunpositiv.

Gruppe	Anteil positiver Zellen	Hunde (n)	Katzen (n)
1	0-1%	7,7% (1)	0,0% (0)
2	1-33%	69,2% (9)	11,1% (1)
3	33-66%	15,4% (2)	44,4% (4)
4	>66%	7,7% (1)	44,4% (4)
(n) Anzahl der Fälle dieser Gruppe			

Tabelle 4.5: Semiquantitative Auswertung von bcl-2 bei den Ästhesioneuroblastomen von Hund und Katze. Entsprechend dem prozentualen Anteil positiver Tumorzellen (*kursiv*) wurden vier Gruppen gebildet. Während bei den Hunden meist eine geringe Expressionsstärke zu erkennen ist, besitzen die felines Tumoren eher einen mittel- bis hochgradigen Gehalt dieses Proteins.

Bei den Hunden stellt sich ein Tumor unmarkiert dar. Die meisten kaninen Tumoren besitzen einen geringgradigen Gehalt an bcl-2. Nur in wenigen Fällen ist eine mittel- bis hochgradige Anfärbung zu erkennen. Bei den Katzen hingegen zeigt ein Fall eine geringgradige Immunreaktivität. In den meisten felines Tumoren tritt eine mittel- bis hochgradige Anfärbbarkeit in Erscheinung. Das arithmetische Mittel der Gruppe der Hunde (2,23) liegt deutlich niedriger als das der Gruppe der Katzen (3,33).

Im Vergleich mit der Gradeinteilung lassen sich nur vorsichtige Aussagen treffen. Höher differenzierte Ästhesioneuroblastome (2. Grad) zeigen bei beiden Spezies einen geringe bis hohe Expression von bcl-2, während in Neoplasien 1, 3 und 4. Grades bei den Hunden nur wenige bis gar keine immunpositiven Zellen aufzufinden sind. Bei den felines Ästhesioneuroblastomen sind die letztgenannten Grade mittel- bis hochgradig bcl-2-positiv (siehe Abbildung 4.20). Die Werte korrelieren markant negativ in der Gruppe 1 der Hunde, während in der Gruppe 2 eine mittelgradige positive Korrelation vorliegt (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho - 0,522 bzw. 0,579). Eine Signifikanz liegt jedoch nicht vor (Grad: Chi-Quadrat Test nach Pearson 0,32; Kontingenzkoeffizient 0,32; Kendall-Tau-b 0,58 (siehe Kapitel 3.3.7)).

Ein ähnliches Verhältnis ist zwischen bcl-2 und dem Mitoseindex (MI) zu erken-

nen (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho - 0,351 bzw. 0,327) (siehe Abbildung 4.21). Eine vergleichende Betrachtung von bcl-2 und Ki-67 lässt eine geringgradige negative Korrelation bei den Hunden und eine hochgradig positive Korrelation bei den Katzen, jedoch ebenfalls ohne Signifikanz, erkennen (Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho - 0,165 bzw. 0,721) (siehe Abbildung 4.22).

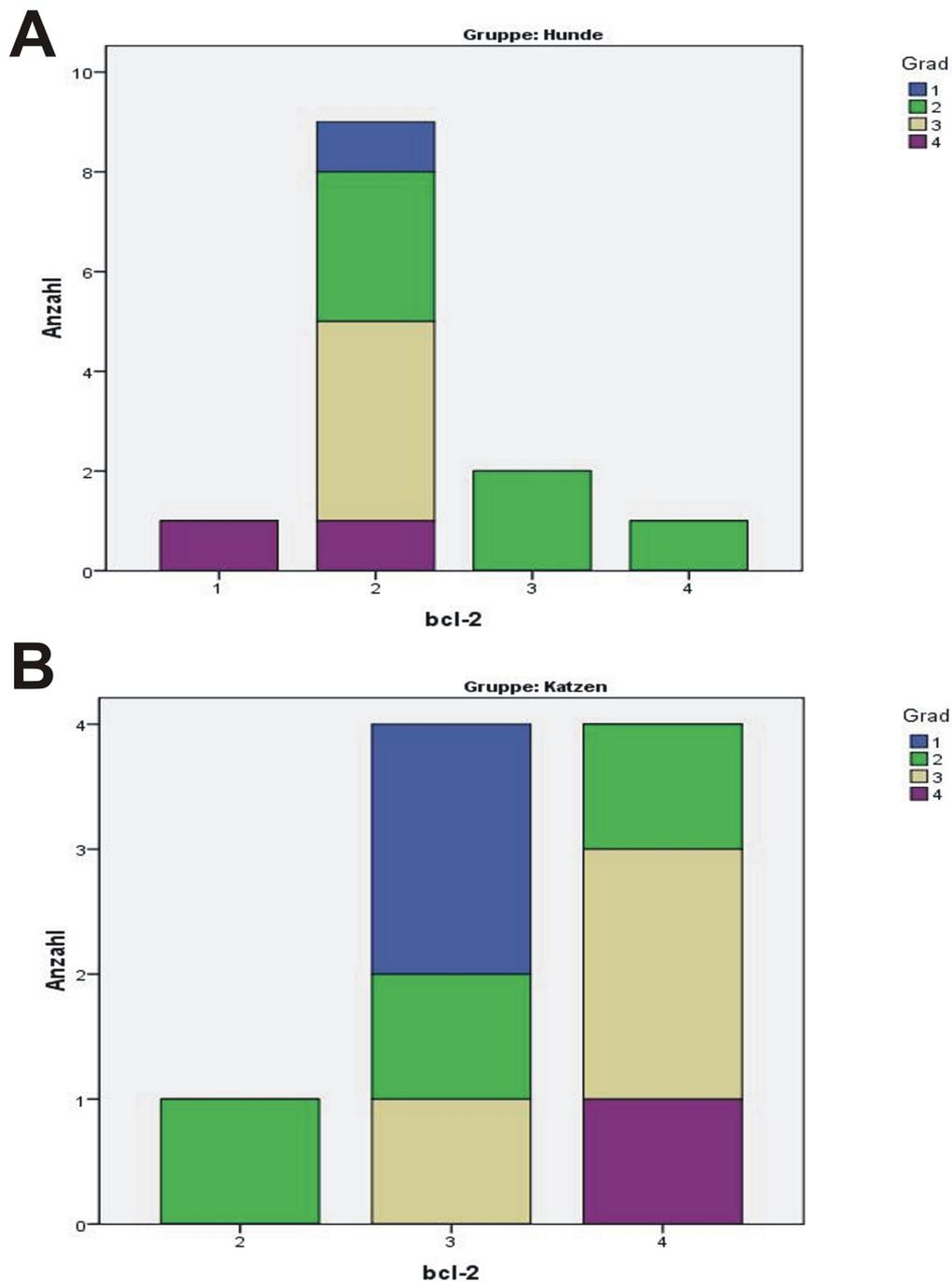


Abbildung 4.20: Korrelation zwischen bcl-2 und der Gradeinteilung. Die Ästhesioneuroblastome zweiten Grades in der Gruppe der Hunde (A), wie auch der der Katzen (B) weisen einen geringen- bis hohen Gehalt an bcl-2 auf. Die Grade 1, 3 und 4 bei den Hunden enthalten nur wenige bis gar keine markierten Zellen. Die felines Tumoren dieser Grade sind mittel- bis hochgradig markiert.

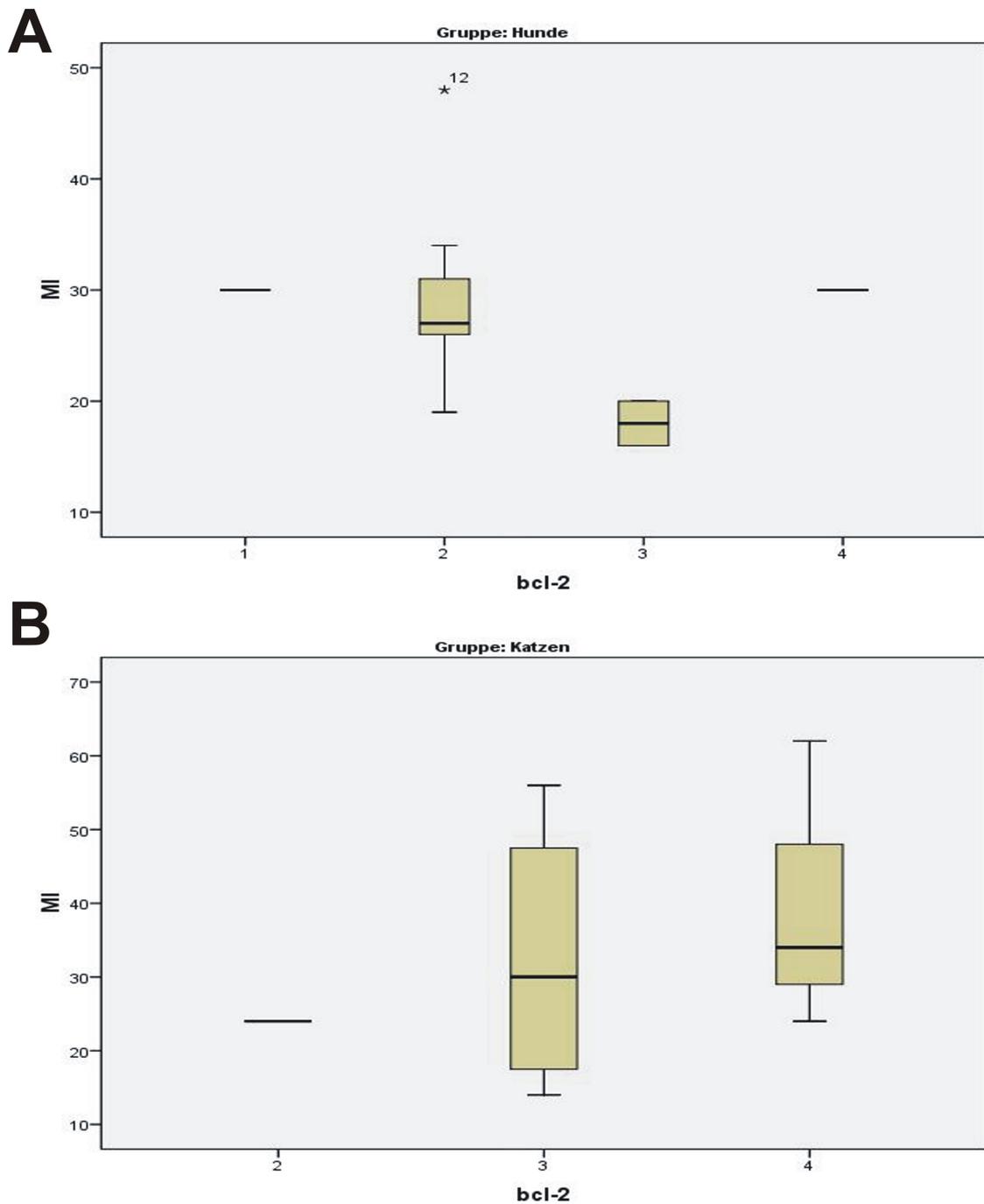


Abbildung 4.21: **Korrelation zwischen der bcl-2-Expression und dem Mitoseindex (MI). Während bei den Hunden (A) eine geringgradige negative Korrelation vorliegt, ist bei den Katzen (B) ein geringgradiges positives Verhältnis zu erkennen.**

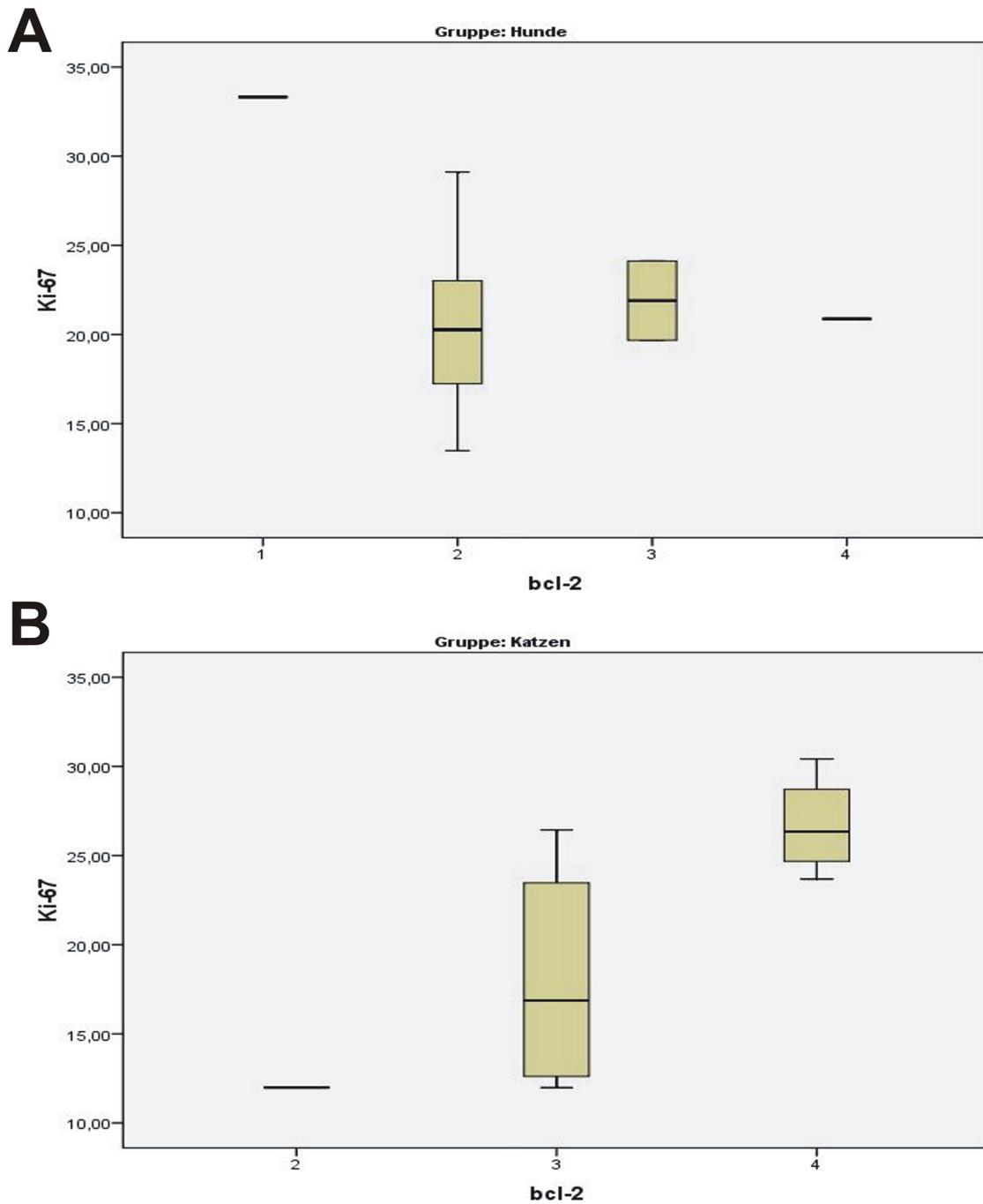


Abbildung 4.22: Korrelation zwischen der bcl-2-Expression und dem Ki-67 *labeling index*. Während bei den Hunden (A) ein geringgradiges negatives Verhältnis zu erkennen ist, liegt bei den Katzen (B) eine hochgradig positive Korrelation vor.

5 Diskussion

Das Ästhesioneuroblastom, auch olfaktorisches Neuroblastom (ONB) genannt, ist ein seltener, maligner neuroektodermaler Tumor, höchstwahrscheinlich abstammend von den Basalzellen der Riechschleimhaut, der hauptsächlich bei Hunden [8–12], Katzen [8, 10, 13] und Pferden [14, 15] vorkommt [4]. Diese 1924 erstmals durch BERGER und LUC et al. beschriebene [283] Neoplasie ist in der kaudalen Nasenhöhle im Bereich der *Lamina cribrosa* lokalisiert und expandiert häufig in die Nasennebenhöhlen, die Schädelhöhle oder die *Orbita*. Seither sind in der Humanpathologie weltweit bis zum Jahr 1997 insgesamt 945 Fälle publiziert worden [6]. Hier repräsentiert er nahezu 2 - 3 % aller sinonasaler Neoplasien. Als ein lokal aggressiver Tumor zeigt er eine Rezidivrate von 30 % und eine Metastasierungsneigung in die Lymphknoten von 10 - 25 % bzw. vor allem in die Lunge und in die Knochen von 10 -60 %. Sie können auch noch Jahre nach einer primären Behandlung auftreten [7]. In der Humanpathologie ist von HYAMS und seinen Mitarbeitern ein Klassifikationsschema erstellt worden. Dieses *Grading* beinhaltet eine Kombination verschiedener Faktoren (Architektur, Rosettenbildung, fibrilläre Matrix, nukleärer Polymorphismus, mitotische Aktivität und Nekroseneigung) [3]. Danach haben humane Ästhesioneuroblastome niedrigeren Grades eine höhere Überlebensrate, als Tumoren höheren Grades. Allerdings lässt sich durch den Grad nicht immer adäquat eine Aussage zur Prognose treffen und auch Metastasen können sich in allen Graden der Differenzierung bilden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es am erstmals Tier eine Übersichtsarbeit über feline und kanine Ästhesioneuroblastome anzufertigen. Die Tumoren sollten histologisch beurteilt und ein Klassifikationsschema etabliert werden. Die Diagnose wurde durch die Verwendung eines gebräuchlichen neuronalen Markers (Neuronen-spezifische Enolase) gefestigt und zusätzlich zwei neue neuronenspezifische Antikörper eingebracht. Zum anderen sollten einerseits durch die Zählung von Mitosen in H&E-gefärbten Schnitten und immunhistochemische Untersuchung der Expression von Ki-67 Aussagen über die Proliferationsrate die-

ser Tumoren getroffen werden. Andererseits sollte mittels immunhistochemischen Nachweises des Tumorsuppressorproteins p53 und des Apotosemarkers bcl-2 das biologische Verhalten der Ästhesioneuroblastome bei Hund und Katze beurteilt werden.

5.1 Analyse des Patientengutes

Es wurde Tumorgewebe von 13 Hunden und 9 Katzen aus dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (17 Fälle) und aus der Fachpraxis für Tierpathologie, Dr. Wolf von Bomhard und Dr. Stephan Pflighaar in München (5 Fälle) aus den Jahren 1984 bis 2006 retrospektiv bearbeitet. In letzterer Einrichtung trat der Tumor häufiger auf. Da es sich aber lediglich um Biopate handelte, wurde von deren Anwendung in dieser Arbeit abgesehen. Die nach Angaben der Literatur geringe Häufigkeit des Ästhesioneuroblastoms beim Menschen wurden auch bei Hund und Katze durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt [6, 7]. In 22 Jahren traten am Institut für Tierpathologie lediglich 17 Tumoren auf. Vergleichswerte gibt es in der Humanpathologie. So traten in verschiedenen Institutionen 26, 17 bzw. 18 Fälle jeweils innerhalb von 25 Jahren auf [25, 284, 285]. Entsprechende Resultate fehlen bisher in der Veterinärpathologie.

Bei den Hunden (Gruppe 1) erkrankten gehäuft Dackel, gefolgt von Mischlingen. In der Gruppe 2 der Katzen waren keine Rasseangaben vorhanden. Vergleichende Literatur hierzu ist noch nicht vorhanden. Die Altersverteilung ließ bei den Katzen ein Auftreten der Erkrankung in jüngeren Jahren erkennen als bei den Hunden. Eine bimodale Verteilung, ähnlich wie in der Humanpathologie beschrieben, mit Gipfeln in der zweiten und sechsten Dekade des menschlichen Lebens, konnte nicht beobachtet werden [7, 22]. Das Geschlechtsverhältnis war annähernd ausgewogen, was ebenfalls in Einklang mit der Humanpathologie steht [6, 7, 22]. Auch die Symptome (unilateraler Nasenausfluss, Anosmie, Epistaxis und neurologische Symptome) werden ebenfalls beim humanen Ästhesioneuroblastom beschrieben. [7, 21, 32]. Vergleiche betreffend dem Zeitraum zwischen dem Auftreten erster klinischer Anzeichen und der Diagnosestellung, der genauen Lokalisation bzw. der Makroskopie konnten aufgrund fehlender Daten nicht vorgenommen werden. Metastasen wurden in der Sektion nicht gefunden. In Anbetracht der geringen Fallzahlen können keine definitiven Aussagen getroffen, sondern lediglich Tendenzen angegeben werden.

5.2 Auswertung der histologischen Charakteristika sowie der Gradeinteilung

5.2.1 Histologische Charakteristika

Das Ästhesioneuroblastom ist ein selten auftretender, sinonasaler Tumor, der nur schwer von anderen Entitäten, wie das sinonasale undifferenzierte Karzinom (SNUC), das neuroendokrine Karzinom (NEC), das maligne Lymphom, das embryonale Rhabdomyosarkom und das maligne Melanom abgrenzbar ist [4, 7, 37]. Es wird daher auch als *great impostor* (engl.: großer Gaukler) bezeichnet. Die licht-

mikroskopische Diagnose ist bei hohem Differenzierungsgrad einfach, kann sich aber mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung als sehr problematisch erweisen. Darum sind histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Analysen unerlässlich [32].

Die lichtmikroskopische Untersuchung der in dieser Arbeit vorgestellten Tumoren ließ einige Parallelen zum Ästhesioneuroblastom des Menschen erkennen. Es handelte sich um sehr zellreiche Tumoren mit teils in Nestern bzw. Läppchen, teils diffus angeordneten Zellen, stellenweise separiert durch ein feines Stroma. Die Tumorzellen waren gleichförmig, klein, von kugel- bis säulenförmiger Gestalt und mit einem spärlichen Zytoplasmasaum. Das Chromatin verteilte sich meist grobschollig und die Kernkörperchen waren unauffällig. Nekrosen traten gelegentlich auf und die mitotische Aktivität war gering. Mit sinkendem Differenzierungsgrad nahm der Pleomorphismus zu, die Kernkörperchen waren deutlicher erkennbar, Nekrosen traten häufiger auf und waren in größerer Ausdehnung zu beobachten. Die Mitoserate stieg stark an [7, 37]. Die Tumorzellen formierten sich oft zu Rosetten. Eine Unterscheidung von Pseudorosetten und Rosetten war möglich. Die Abgrenzung von Homer-Wright Rosetten und Flexner-Wintersteiner Rosetten gestaltete sich allerdings als schwierig. Bei der Katze traten Rosetten häufiger auf, als beim Hund. Dies wird auch in der Literatur beschrieben [4, 9, 37]. Beim Hund trat gelegentlich eine, vom Differenzierungsgrad unabhängige, Begleitentzündung auf. Diese findet keine Entsprechung in der aktuellen Literatur. Verkalkungen spielten im Gegensatz zur Humanpathologie kaum eine Rolle [7]. Nekrosen traten scheinbar häufiger und ausgedehnter auf als bei humanen Ästhesioneuroblastomen und auch die mitotische Aktivität war generell höher [3, 7].

Bei Ästhesioneuroblastomen des Menschen, aber auch von Tieren wird oft von einer sog. fibrillären Matrix [7], auch Neuropil (eosinophiles fibrilläres Material) genannt, gesprochen, welches neuronale Fortsätze enthält [37]. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde diese Struktur aufgrund der unscharfen Definition nicht einbezogen.

5.2.2 Klassifikationssystem

HYAMS et al. stellten ein histologisches Klassifikationssystem für das humane Ästhesioneuroblastom, basierend auf dem Grad der Differenzierung, der zellulären Anaplasie und der Mitoserate auf und wiesen eine Korrelation mit der Prognose nach. Der am höchsten differenzierte Grad 1 beinhaltet eine lobuläre Zytoarchitektur und eine fibrilläre Matrix mit uniformen, unscharf begrenzten, kleinen, runden, zytoplasmaarmen Zellen und unscheinbaren Kernkörperchen. Homer-Wright Rosetten und Pseudorosetten treten regelmäßig auf. Die mitotische Aktivität ist sehr gering oder nicht nachweisbar. Nekrosen sind kaum zu beobachten und es können Verkalkungen auftreten. Der Grad 2 ähnelt stark dem Grad 1. Die Mitoserate ist jedoch höher und die Zellen zeigen einen gesteigerten Polymorphismus. In Tumoren vom Grad 3 verliert sich die lobuläre Zytoarchitektur. Die Zellen sind ausgeprägt polymorph, und im Gegensatz zu Grad 1 und 2 nimmt die mitotische Aktivität stark zu. Häufig sind Nekrosen und Flexner-Wintersteiner Rosetten zu beobachten, und die fibrilläre Komponente ist nur selten zu finden. Der Grad 4 zeichnet sich durch Verlust jeglicher Zytoarchitektur und durch anaplastische Zellen mit pleomorphen Kernen und prominenten eosinophilen Nukleoli aus. Die Mitoserate ist sehr hoch (viele atypische Mitosen) und es treten ausgedehnte Nekroseherde auf. Die verschiedenen histologischen Grade können innerhalb des Tumors vermischt sein. Differenzierte Ästhesioneuroblastome sind mittels der Lichtmikroskopie leicht diagnostizierbar. Schwierigkeiten entstehen mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung [3, 7]. In den letzten 15 Jahren hat dieses Schema beim Menschen [21, 22, 24, 32, 41] und auch beim Tier [9, 12, 37] Beachtung gefunden.

Es galt nun für die 22 Ästhesioneuroblastome der Arbeit dieses bestehende Klassifikationssystem erstmals derart zu modifizieren, dass diese Variante gleichermaßen bei den Tumoren bei Hund und Katze anwendbar ist. Die Einteilung der Neoplasien in die Grade 1 bis 4 entsprechend dem Grad der Entdifferenzie-

rung wurde beibehalten. Von einer Abgrenzung der einzelnen Rosettenformationen wurde jedoch abgesehen und der Parameter *fibrillärer Hintergrund* gestrichen. Die Beurteilung der einzelnen Merkmale wurde entsprechend den Abweichungen modifiziert.

In dieser Studie waren entsprechend der Abwandlung des Schemas bei beiden Spezies jeweils die Grade 1 bis 4, am häufigsten die Grade 2 und 3 vertreten. Dabei lag der Mittelwert in der Gruppe der Hunde höher als bei den Katzen. Dies ließ die Schlußfolgerung zu, dass die Tumoren der Katze insgesamt differenzierter waren, als die der Hunde. In der veterinärpathologischen Literatur sind ähnliche Ergebnisse bisher nicht bekannt.

5.3 Auswertung der neuronalen Marker MAP-2 und NeuN im Vergleich mit NSE

5.3.1 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP-2)

Die pathohistologische Unterscheidung von entdifferenzierten Rundzelltumoren der Nasenhöhle ist sehr schwierig und kann nur basierend auf dem immunhistochemischen Nachweis verschiedener Antigene erfolgen. Selten ist zusätzlich eine elektronenmikroskopische Bestätigung nötig [32]. Ein solches Antigen stellt MAP-2 dar, welches zusammen mit tau eines der wichtigsten Mikrotubuli-assoziierten Proteine im zentralen Nervensystem von Vertebraten darstellt. Dieses Protein dient der Bindung von Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Neurofilamenten und damit der Stabilisierung des zellulären Stützgerüsts [100, 113, 120].

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des antikörperproduzierenden Klons AP18 das neuronenspezifische Protein MAP-2 in allen Ästhesioneuroblastomen, bis auf einen Fall bei der Katze, detektiert. Die markierten Tumorzellen lagen regellos im Gewebe verteilt und die Anzahl variierte stark. Deutlich färbten sich das Zytoplasma, sowie die neuronalen Fortsätze an. Eine Unterscheidung zwischen Axonen und Dendriten war allerdings nicht möglich. Der Zellkern reagierte nur schwach positiv. Ein Fall aus der Gruppe der Katzen war immunhistochemisch negativ. In knapp der Hälfte der Proben fanden sich in der Peripherie der Tumoren fokale, bandartige Ansammlungen immunpositiver Zellen. Daneben waren morphologisch ähnliche Zellen wahrscheinlich derselben Subpopulation zu beobachten. Sie waren kleiner und ärmer an Zytoplasma, als die Zellen des soliden Teils der Neoplasie. Besonders im Fall einer Katze (Fall Nr. 393.05) konnte diese Population vergleichend in MAP-2, NeuN und NSE immunhistochemisch gefärbten Schnitten dargestellt werden (siehe Kapitel 5.3.2). Als Positivmaterial fand regelrechtes Hirngewebe dieser Spezies Anwendung, wobei die Nervenzellen ein analoges Färbemuster zeigten.

Andere Zellpopulationen, wie Entzündungszellen, Endothelzellen der Gefäße oder Gliazellen wurden nicht markiert. Die Untersuchungen von BLÜMCKE et al. zeigten eine vergleichbare Färbecharakteristik [133, 134].

Aufgrund des immunhistochemischen Nachweises im Soma der Nervenzellen

und deren Dendriten wird anti-MAP-2 (AP18) als Marker der neuronalen Differenzierung genutzt [111, 286]. Die Expression dieses Proteins wurde in Gehirntumoren mit neuronalem Phänotyp demonstriert. Dazu zählten Tumoren niedrigeren Grades, wie Gangliogliome, Neurozytome und primitive neuroektodermale Neoplasien [286]. Als Tumormarker fand MAP-2 in der Humanpathologie bisher nur selten Anwendung. Sowohl die WHO [7] als auch ein großes veterinärpathologisches Nachschlagewerk [37] nennen u.a. diesen Marker für das Ästhesioneuroblastom zur Abgrenzung der Differentialdiagnosen. In einer Studie von HASSELBLATT et al. zeigten 13 von 15 PTPRs (*papillary tumour of the pineal region*) des Menschen eine Immunpositivität. Synaptophysin und GFAP konnten nicht und EMA nur in einem von 15 Fällen nachgewiesen werden. In Tumoren des *Plexus choroideus* trat diese weniger frequent auf (7/37) [96]. BLÜMCKE et al. konnten in einer humanpathologischen Studie in Oligodendrogliomen, in der oligodendroglialen Komponente von Oligoastrozytomen, in anaplastischen Oligodendrogliomen bzw. Oligoastrozytomen (WHO Grad III), in Tumoren der Epiphyse, in malignen embryonalen Tumoren, nicht jedoch in Gliomen eine konsistente positive Farbreaktion auf MAP-2 feststellen. In 80 % der malignen Melanome (8/10) und in 100 % der Rundzelltumoren der Lunge (2/2) manifestierte sich eine Expression von MAP-2. In diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) und anaplastischen Astrozytomen färbten sich nur Subpopulationen an, in zentralen Neurozytomen lediglich die Matrix. Ependymome und dysembryoblastische neuroepitheliale Tumoren (DNTs) waren immunnegativ [133, 134].

Korrelation zwischen der Gradeinteilung und MAP-2

Die Anzahl reaktiver Zellen wurde zu dem semiquantitativ, in Anlehnung an eine ähnliche Untersuchung an humanen Gliomen [282] bzw. humanen Oligodendrogliomen [133] bestimmt und 4 Gruppen gebildet (0 %, bis 33 %, bis 66 % und über 66 %). Bei den Hunden in dieser Studie verteilte sich der Gehalt von MAP-2 nahezu gleichmäßig auf die gewählten Einteilungen. Das arithmetische Mittel lag bei den kaninen Tumoren etwas höher als bei den felinen. Es wäre allerdings anzunehmen, dass die Tumoren der Katzen mehr MAP-2 bilden, da sie histologisch insgesamt differenzierter waren. Eine Korrelationsanalyse zwischen MAP-2 und der Gradeinteilung bestätigte diesen Widerspruch. Stark differenzierte Ästhesioneuroblastome (1. Grad) besaßen nur wenig reaktive Zellen. In entdifferenzierteren Tumoren (Grad 2 bis 4) variierte die Expression von MAP-2 von gering-

bis hochgradig. Stark eingeschränkt wird diese Aussage jedoch durch die geringen Fallzahlen in beiden Gruppen, besonders bei Tumoren 1. Grades (je ein Fall pro Gruppe). Die statistische Auswertung ergab eine markant positive Korrelation zwischen MAP-2 und der Gradeinteilung bei den Katzen bzw. eine schwach positive Korrelation bei den Hunden, die jedoch keine Signifikanz aufwies ($r = 0,572$ bzw. $r = 0,168$). Zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass auch ein differenziertes Ästhesioneuroblastom beim Pferd nur wenige, geringgradig immunreaktive Zellen erkennen ließ. Allerdings fand in jener Arbeit keine Klassifikation nach HYAMS statt [15]. Interessanterweise konnten HIROSE et al. in keinem von 22 olfaktorischen Neuroblastomen MAP-2 feststellen [230].

Eine Korrelationsanalyse z.B. mit der Gradeinteilung, dem Mitoseindex, der Expression von Ki-67 oder dem Gehalt an bcl-2 wurde bisher weder beim Menschen, noch beim Tier vorgenommen. Analog gibt es dem gegenüber entsprechende Untersuchungen mit NeuN (siehe Kapitel 5.3.2).

5.3.2 NeuN

Das neuronenspezifische Protein NeuN ist in den Zellkernen lokalisiert und besitzt regulative DNA-Bindungseigenschaften. Es scheint ein früher Marker der neuronalen Differenzierung zu sein, der während der Adoleszenz persistiert und wichtig für die Entwicklung und die Funktion des Nervensystems ist. Der Nachweis erfolgte in den verschiedensten Bereichen des zentralen- (ZNS) und des peripheren Nervensystems (PNS) [135]. Kreuzreaktionen konnten bei Menschen [138], Primaten [139], Schweinen [140], Vögeln (z.B. Huhn) [141], Mäusen [135], und Ratten [135] nachgewiesen werden. Der Antikörper A60 zur Detektion von NeuN findet sowohl in der neuropathologischen Forschung als auch in der histopathologischen Diagnostik eine breite Anwendung. Besonders Formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe zeigte sehr gute Färbeergebnisse [54, 142, 146]. Durch die spezifische Expression dieses Proteins in postmitotischen Nervenzellen stellt es ein nützliches Werkzeug zur Unterscheidung von neuronal differenzierten Zellen von Vorläuferzellen und somit zur Abgrenzung von Differentialdiagnosen bzw. von weniger gut differenziertem Tumorgewebe dar [54]. In humanen Ästhesioneuroblastomen wurde bisher NeuN nicht detektiert. Bei Hund und Katze fand dieser Antikörper generell bisher keine Anwendung. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Etablierung neuer neuronaler Marker.

Die Expression von NeuN wurde in dieser Untersuchung durch den Antikörper aus dem Klon A60 nachgewiesen. Auffallend war ein unterschiedliches Färbemuster in beiden Spezies: Bei den Hunden konnte eine inhomogene, wolkige, intrazytoplasmatische, mittel- bis hochgradige Markierung beobachtet werden. Solche Zellen fanden sich im gesamten Tumor unregelmäßig verteilt. Die Immunpositivität wies dabei eine deutliche Assoziation zu den Rosetten auf, innerhalb derer eine betont apikale, intrazytoplasmatische Anfärbung auffiel. Der Gehalt an NeuN variierte stark. Zwei Fälle färbten sich nicht an. Feline Ästhesioneuroblastome zeigten dagegen ein komplett anderes Färbeverhalten. Innerhalb des Tumors waren nur vereinzelte immunpositive Zellen zu finden, während im Randbereich multifokale Herde reaktiver Zellen nachweisbar waren. Die Rosetten-bildenden neoplastischen Zellen reagierten grundsätzlich nicht. Auffallend war eine gelegentlich auftretende ausschließlich nukleär reaktive Subpopulation in der Peripherie des Tumors, die sich in Haufen oder Ketten formierte.

Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen fiel eine Färbung des Nukleus, des Perikaryons und der proximalen neuronalen Fortsätze auf. Die distalen Axone und Dendriten färbten sich nicht an [54, 135, 145]. Es wurden zwei Isoformen detektiert, wobei eine im Zellkern und eine im Zytoplasma dominierte [142]. Diese Resultate waren anhand der Positivkontrolle in dieser Arbeit sehr gut nachvollziehbar. Innerhalb der Ästhesioneuroblastome färbten sich allerdings, im Gegensatz zu MAP-2 in dieser Arbeit, keine neuritenähnlichen Strukturen an. Die in dieser Arbeit festgestellte rein zytoplasmatische Lokalisation von NeuN beim Hund in dieser Arbeit erscheint bisher nicht in der Literatur. Denkbar wäre z.B. eine Ausschleusung aus dem Kern mit Behinderung der Rückkehr oder eine Hemmung des Transportes von NeuN in den Nukleus nach Translation in den Ribosomen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Neuronen NeuN niemals, also in keiner Altersstufe exprimieren. Dazu gehören unter anderem die Photorezeptorzellen, sowie die meisten Zellen der inneren nukleären Schicht der Retina, die PURKINJE-Zellen des Kleinhirns, die sympathischen Ganglienzellen sowie die Mitralzellen des *Bulbus olfactorius*. Die Immunnegativität der PURKINJE-Zellen konnte in eigenem zerebellärem Positivmaterial bestätigt werden.

Andere Zellpopulationen wie Endothelzellen, Entzündungszellen oder Gliazellen waren in dieser Studie immunnegativ. Dies steht in Einklang mit der veterinärpathologischen Literatur, in der in allen Arten von Glia, wie den Oligodendrozyten

der weißen Substanz, den BERGMANNschen Stützzellen im Kleinhirn, den Mantelzellen des PNS und den SCHWANNschen Zellen dieses Protein nicht detektiert werden konnte [54, 135, 138, 145]. Dasselbe gilt für reaktive Glia [135, 147]. Diese Tatsache läßt vermuten, dass es sich bei der markierten Subpopulation in dieser Arbeit tatsächlich um Tumorzellen und nicht um Glia oder reaktive Glia handelte. Ebenfalls hinweisend ist die Tatsache, dass in Nachbarschaft der markierten Zellen auch immer immunnegative, morphologisch ähnliche Zellen lagen.

Die spezifische Expression in postmitotischen Nervenzellen macht NeuN in der diagnostischen Neuropathologie zu einem nützlichen Werkzeug zur Unterscheidung von neuronal differenzierten Zellen gegenüber ihren Vorläuferzellen und somit zur Abgrenzung von einer Differentialdiagnose von weniger gut differenziertem Tumorgewebe [54]. An primären Tumoren des humanen Gehirns wurde eine Expression von NeuN in allen Arten von Gliomen mit Ausnahme des pilozytischen Astrozytoms gefunden [146]. NeuN-positive Tumoren in dieser Studie waren: Einzelne Fälle von diffusen Astrozytomen (2/106), Glioblastomen (4/115), anaplastische Oligodendrogliome und Oligodendrogliome niedrigeren Grades (4/41), Ependymome unterschiedlichen Grades (9/107), zentrale Neurozytome (10/10), Medulloblastome (63/86 klassisch, 13/14 desmoplastisch, 11/13 anaplastisch) und Gangliogliome/Gangliozytome (4/14) [146]. Während PREUSSER et al. bei diffusen Astrozytomen, Ependymomen, oligodendroglialen Tumoren oder Gangliogliomen keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der NeuN-Expression und dem histologischen Tumorgrad feststellen konnten, bestand eine solche zwischen klassischen, desmoplastischen und anaplastischen Medulloblastomen [146]. Auch EDGAR et al. und SOYLEMEZOGLU et al. bestätigten die reguläre Expression von NeuN in zentralen Neurozytomen [148]. ENGLUND et al. konnten sogar mittels indirekter Immunfluoreszenz zusätzlich eine signifikante negative Korrelation zwischen der NeuN Expression und dem Ki-67 *labeling index* (LI) feststellen. Dies weist auf eine Abnahme der proliferativen Aktivität mit zunehmender neuronaler Differenzierung hin [149]. EDGAR et al. wie auch PREUSSER et al. beobachteten, dass neuronale Komponenten selbst von stark differenzierten Tumoren der Ganglienzellen nicht regelmäßig NeuN exprimierten [145]. Im Gegensatz dazu stellten WOLF et al. in einer immunhistochemischen Studie zur Abgrenzung von Oligodendrogliomen von dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren (DNT) fest, dass alle 25 Oligodendrogliome immunnegativ auf NeuN waren, während 44% der DNTs (16 Fälle) eine positive Farbreaktion

zeigten [150]. Daneben ermöglicht NeuN die Identifikation von neuronalen Elementen in Ganglionzelltumoren oder Hamartomen, in denen die Unterscheidung zwischen atypischen Gliazellen und Neuronen Schwierigkeiten bereiten kann [54]. Von Vergleichen mit anderen Parametern, wie z.B. der Gradeinteilung, dem Ki-67 *labeling index* oder dem Mitoseindex wurde aufgrund der nicht praktikierbaren quantitativen Auswertung der eigenen Ergebnisse abgesehen.

5.3.3 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

NSE ist ein glykolytisches Enzym, das vor allem als Isoform $\gamma\gamma$ im Zytoplasma von Neuronen und neuroendokrinen Zellen vorkommt [55]. Das Enzym spielt eine Rolle im Glukosestoffwechsel und katalysiert dort die Dehydratation von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Daneben hat NSE neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften [80, 81]. Das Protein wurde bisher in vielen Publikationen bei den unterschiedlichsten Spezies beschrieben, unter anderem auch beim Hund [61] und bei der Katze [62].

NSE konnte in dieser Studie mittels eines polyklonalen Antikörpers in allen 22 Ästhesioneuroblastomen nachgewiesen werden. Die neoplastischen Zellen färbten sich intrazytoplasmatisch, hell- bis dunkelbraun. Selten war zusätzlich eine nukleäre, geringgradige Immunreaktivität zu erkennen. In allen Präparaten fiel eine ausgeprägte unspezifische Hintergrundfärbung auf, besonders in Nekrosen, die zusammen mit einem Randphänomen die Beurteilung der Schnitte erschwerte. Besonders in den Fällen, in denen lediglich Biopiate der Tumoren vorlagen, waren die Färbeergebnisse nur eingeschränkt beurteilbar. Auch die in Kapitel 5.3.2 erwähnte Subpopulation war aufgrund dessen nur schwer auszumachen, aber dennoch schwach zu erkennen. In partiell angrenzendem Hirngewebe färbte sich in den Neuronen regelmäßig das Perikaryon und die Neuriten, nicht jedoch der Zellkern an. Entzündungszellen und Gliazellen reagierten nicht. Endothelzellen waren dem gegenüber manchmal immunreaktiv und Erythrozyten färbten sich regelmäßig dunkelbraun an.

Ähnliche Resultate werden in der pathologischen und veterinärpathologischen Literatur beschrieben. NSE wurde im Zytoplasma, in den Dendriten und in den Axonen, jedoch nicht im Nukleus nachgewiesen [68]. Die glatten Muskelzellen der viszeralen Organe und der Blutgefäße, die Myoepithelzellen in Speicheldrü-

sen, die juxtaglomerulären Apparate in den Nieren, die apokrinen Drüsen und die Mamma und Plasmazellen zeigten eine Markierung. Auch T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, wie auch reaktive Astrozyten können immunhistochemisch positiv reagieren [55, 67, 77, 79]. Die transformierten oder tumorös entarteten Zellen der vorher genannten NSE-exprimierenden Gruppen synthetisierten ebenfalls dieses Enzym [74]. In Gliazellen wird das Protein nicht exprimiert [68].

Der Nachweis von NSE stellt seit über zwei Jahrzehnten ein immunhistochemisches Mittel zur Identifizierung von Neuronen und neuroendokrinen Zellen bzw. derer Neoplasien dar. Doch ist es bei weitem nicht so spezifisch für die neuronale Linie wie lange Zeit geglaubt worden ist [60, 77]. Anti-NSE fand unter anderem bei der Differenzierung von humanen Retinoblastomen [84] und Tumoren des *Plexus choroideus* [59], caninen Meningiomen [85] und felines Ganglioneuroblastomen Anwendung [62, 77]. Zu Verwirrungen führte auf der anderen Seite die zum Teil auftretende Immunreaktivität in Glioblastomen, Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Ependymomen, Medulloblastomen und Choroidplexus-Papillomen. Diese sollten entsprechend der Ursprungszellen immunnegativ sein [77]. Auch in Ästhesioneuroblastomen bei Mensch und Tier ist der Nachweis von NSE ein gebräuchliches Werkzeug zum Ausschluß verschiedener Differentialdiagnosen (siehe Kapitel 2.1.11.) [4, 7, 36, 37, 43, 86–88]. Maligne Melanome können ebenfalls immunhistochemisch positiv reagieren [89]. Zudem dient NSE zur Differenzierung endokriner und neuroendokriner Tumoren. Berichte sind unter anderem zu Inselzelladenomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, Phäochromozytomen und zu neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Leber, des Thymus, der Mamma, der Haut und der Lunge erschienen [61, 74, 75, 90, 91].

5.3.4 Abschließende Betrachtungen

Nachweis des neuroektodermalen Ursprungs der 22 Tumoren

Die kaninen Tumoren 11856.03 und 12.757.03 waren MAP-2 immunnegativ und im felines Fall 154.97 konnte kein NeuN nachgewiesen werden. Alle Tumoren zeigten eine deutliche Braunfärbung bei der immunhistochemischen Untersuchung auf NSE. Zusammenfassend kann die Behauptung aufgestellt werden, dass alle Ästhesioneuroblastome in unserem Untersuchungsgut neuroektoder-

malen Ursprungs waren.

Auswertung der Subpopulation

Die in Kapitel 4.3.2 bzw. Abbildung 4.10 dargestellte, in der Peripherie des Tumors liegende Subpopulation konnte im Fall 393.05 mit allen drei neuronalen Markern angefärbt werden. Vermutlich handelte es sich um eine metastasierende Population des Tumors. Diese Hypothese kann aber durch die derzeit bekannte Literatur nicht gestützt werden.

Anwendbarkeit der neuen neuronalen Marker in der neuroonkologischen Diagnostik

Anti-NeuN stellt einen sensitiven und spezifischen neuronalen Marker in formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe dar. Im Besonderen die nukleäre Lokalisation grenzt ihn positiv von den anderen beiden zytoplasmatischen Markern dieser Arbeit, NSE und MAP-2, ab. Da die neoplastischen Zellen des Ästhesioneuroblastoms nur sehr wenig Zytoplasma besitzen, bietet dieser Marker große Vorteile. Leider erwies sich der Antikörper als nur begrenzt einsetzbar. Auf der einen Seite färbten sich manchmal nur sehr wenige Zellen an, was eine Diagnose erschwerte. Auf der anderen Seite war aufgrund dessen eine Quantifizierung der Zellen nicht möglich, und so können keine Aussagen über eine Korrelation zu anderen Parametern (Gradeinteilung, Ki-67 LI u.a.) getroffen werden. Immer häufiger wird NSE durch MAP-2 oder NeuN ersetzt, da diese beiden Marker nicht derart unspezifische Reaktionen hervorbringen. Seine Rolle als Marker der neuroendokrinen Differenzierung bleibt jedoch unbestritten, da weder MAP-2, noch NeuN in diesen Neoplasien nachgewiesen werden können. Der Serumnachweis von NSE bei verschiedenen Störungen wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen, Lungenerkrankungen, degenerativen oder entzündlichen Hirnerkrankungen, zerebralen Insulten, Neoplasien (z.B. Neuroblastomen [92] und kleinzelligen Bronchialkarzinomen [93]) besitzt keinerlei Nachteile und findet darum regelmäßig Anwendung.

5.4 Beurteilung der Proliferationsrate

5.4.1 Mitoseindex

Die Auszählung von Kernteilungsfiguren im H&E-Schnitt ist eine der ältesten Methoden zur Bestimmung der Proliferationsrate. Bis heute wird dieses Verfahren regelmäßig angewendet. Der Mitose-Index (MI) ist definiert als die Anzahl der Mitosefiguren in 10 Gesichtsfeldern bei 400 facher Vergrößerung. Als alleiniger Parameter zur Unterstützung der Gradeinteilung kann er als unzureichend gesehen werden. Erst in Kombination mit anderen Größen, wie z.B. dem Ki-67 *labeling index* lassen sich Aussagen zur Proliferationsrate treffen.

Die Aussagekraft des Mitose-Index ist begrenzt, da einerseits nur ein Teil der proliferierenden Zellen Mitosefiguren erkennen lassen. Andererseits kann die Länge der mitotischen Phase, besonders in aneuploiden Tumoren, d.h. in Tumoren, deren Chromosomensatz abweicht, erheblich variieren.

Die eigenen Untersuchungen der mitotischen Aktivität ergaben bezüglich der Zuordnung zu den Graden ein generell relativ hohes positives Verhältnis. Dabei lagen die Werte bei den Katzen im Median etwas höher als bei den Hunden (34 bzw. 27). Insgesamt betrug das Minimum 14, das Maximum umfasste 62.

Korrelation von Gradeinteilung und Mitoseindex

Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte für den Mitoseindex und die Gradeinteilung eine mittelgradige positive Korrelation gezeigt werden (Hund: $r = 0,370$ bzw. Katze: $r = 0,423$). Diese Resultate waren jedoch nicht signifikant (Hund: $p = 0,214$ bzw. Katze: $p = 0,257$). Ähnliche Ergebnisse zeigte z.B. eine Studie von 55 astrozytären Tumoren des Menschen [197].

Die Aussagekraft des Mitose-Index ist als sehr begrenzt anzusehen, da die Art und Weise der Auszählung der mitotischen Figuren in der Regel die kürzeste Phase des Zellzyklus umfasst und daher proliferierende Zellen auch keine Mitosefiguren erkennen lassen können. Ausnahmen stellen z.B. Tumoren mit Aneuploidie (Abweichung des Chromosomensatzes) dar, in denen die Zeitdauer der M-Phase variieren kann. Zudem können durch postmortale Einflüsse auf das Tumorgewebe mitoseähnliche Strukturen entstehen, die dann zu falsch positiven

Ergebnissen führen. Um vergleichbare Indizes zu erhalten sind gewisse labor-technische Aspekte, wie eine standardisierte Schnittdicke und Färbung sowie eine zügige Fixierung der Proben obligatorisch. In inadäquat fixiertem Gewebe z.B. können mitotische Prozesse weiterlaufen oder eingeleitet werden, die dann zu einer immensen Unter- bzw. Überschätzung der mitotischen Aktivität führen können [154, 156]. Ein wichtiger Aspekt in der Beurteilung der mitotischen Aktivität ist die Tatsache, dass die Proben aus einem Zeitraum von 22 Jahren stammen und nicht von einheitlichen Behandlungsmethoden, wie vorher beschrieben, auszugehen ist. Dies schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit erheblich ein.

5.4.2 Ki-67

Die Untersuchung der Proliferationspotentials somatischer Zellen ist für die Tumorforschung von elementarer Bedeutung. Zum einen stellt die unkontrollierte Zellteilung eine der Schlüssel für die Tumorentstehung dar, zum anderen wird in der Routinediagnostik die quantitative Erfassung der Zellproliferation benötigt, um das biologische Verhalten von Neoplasien vorherzusagen [173]. Das nukleäre, nur in proliferierenden, nicht jedoch in ruhenden Zellen exprimierte Protein Ki-67 stellt ein wertvolles Werkzeug zur Markierung der Zellproliferation mit klinischer Relevanz in vielen Tumorentitäten dar [160, 195, 200, 287–289]. Nur eine Studie von MOSKOWITZ et al. stellte bei 115 Glioblastomen eine solche Verbindung nicht fest [290]. Neben dem ursprünglichen Antikörper Ki-67, der nur zur Anwendung an unfixiertem Gewebe von Menschen und Primaten geeignet ist, wurde ein zusätzlicher Antikörper entwickelt (MIB-1), der das Speziesspektrum erweitern und das Ki-67 Protein bzw. sein Äquivalent auch im fixierten Gewebe markieren sollte [163]. Sowohl die Expressionsstärke von Ki-67, als auch seine Lokalisation innerhalb der Zelle variiert während des Zellzyklus erheblich. Bis zur S-Phase nimmt die Konzentration von Ki-67 zu und erreicht ihr Maximum in der G₂/M-Phase. Im Verlauf der Ana- und Telophase sinkt sie dann rasch ab [171–173]. Die Höhe der Expression ist ebenfalls nicht immer gleich. So können z.B. proliferierende Zellen bei Nährstoffmangel Ki-67 negativ werden. Grund dafür ist wahrscheinlich die unzureichende de novo Synthese [170]. Die Lokalisation betreffend liegt Ki-67 während der G₁-Phase im Nukleoplasma vor, während es in der S- und G₂-Phase im Nukleolus nachweisbar ist [174]. Das Protein kann vor der Mitose den Verlust der Integrität der Nukleoli und die Kondensation der

Chromosomen katalysieren. Auch nach der Mitose ist es durch seine Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedensten Proteinen maßgeblich an der Reformation der Nukleoli sowie der Dekondensation der Chromosomen beteiligt.

Zur Untersuchung der Proliferationsrate wurde neben dem Mitoseindex der Gehalt an Ki-67 immunhistochemisch mit Hilfe des paraffingängigen Antikörpers MIB-1 festgestellt. Eine stark variierende positive Reaktion war in allen 22 Ästhesioneuroblastomen in Form eines unregelmäßigen, rosettenassoziierten Färbemusters zu beobachten. Die Zellkerne zeigten eine feingranuläre, mittel- bis hochgradige Immunreaktivität, während das Zytoplasma sich homogen hellbraun präsentierte. Auffallend prominent markiert war das Chromatin von Zellen in der Mitose-Phase. Andere beteiligte Zellpopulationen, wie Neuronen, Gliazellen, Entzündungszellen und Endothelzellen zeigten sich immunnegativ. Dünndarmepithel besitzt eine nachgewiesenen hohe Proliferationsrate und wurde daher in dieser Arbeit als Positivmaterial verwendet. Es zeigte ein analoges Färbemuster.

Erstellung des *labeling index* (LI) von Ki-67

Entsprechend der verschiedener Studien [192, 208, 233, 239, 291] wurde in dieser Arbeit aus dem Verhältnis immunhistochemisch positiv (mindestens 1000) zu negativ markierter Zellen ein Index gebildet. Der Ki-67 LI lag im Vergleich zum humanen Ästhesioneuroblastom sehr viel höher, wobei er bei den Hunden niedriger (20,88) war, als bei den Katzen (23,68). Die Spannweite reichte insgesamt von 11,98 bis 33,32. Die Methodik variiert in der Literatur stark. Entsprechende Untersuchungen wurden z.B. von MANDARA et. al [196] und JANIK et. al [239] an verschiedenen Subtypen von kaninen Meningiomen durchgeführt. Zur Detektion wurde der gleiche Klon (MIB-1) verwendet. Die Auswertungsmethode von MANDARA et. al unterscheidet sich jedoch von der von JANIK et. al bzw. der eigenen. Sie bestimmten mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-systems das Verhältnis zwischen der Ki-67-positiven Fläche zur Gesamtfläche des analysierten Feldes. Die Untersuchungsmethode dieser Arbeit orientierte sich an der von JANIK et. al., nach der die Auswahl der Felder für die Auszählung nach ihrer Repräsentativität bzw. nach ihrer Aktivität ausgesucht werden können. Die Autoren dieser Untersuchungen beschrieben allerdings nicht, nach welchen Kriterien sie die Areale ausgesucht hatten [239]. In beiden Arbeiten wurde ein höherer Mittelwert bei maligneren Formen nachgewiesen.

Viele retrospektive Studien bewiesen, dass die Bestimmung der Wachstumsfraktion auf diese Weise tatsächlich ein unabhängiger prognostischer Marker ist [188–195]. Es gibt auch einige retrospektive Untersuchungen zu Tumoren des ZNS, wie astrozytischen und oligodendroglialen Tumoren und Meningiomen [197–201]. In den letzten zehn Jahren konnten ähnliche Ergebnisse ebenfalls am Tier erbracht werden [202–206].

Korrelation von Gradeinteilung und Ki-67 *labeling index* bzw. MI

Der Ki-67 LI korrelierte bei den Hunden ($r = 0,734$), wie bei den Katzen ($r = 0,747$) hochgradig positiv mit der Gradeinteilung und mit ausgeprägter Signifikanz (Hund: $p = 0,004$, Katze: $p = 0,021$). Der Ki-67 LI zeigte bei den Katzen ($r = 0,656$) eine starke Korrelation mit dem Mitoseindex (MI), während diese beiden Parameter beim Hund nur geringgradig in Verbindung standen ($r = 0,307$). Die Werte waren jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant (Hund: $p = 0,308$, Katze: $p = 0,055$).

Übereinstimmungen betreffend die Korrelation mit dem Ki-67 LI zeigten die verschiedensten Publikationen der Human- und Veterinärpathologie. So stellten KAYASELCUK et al. an 63 humanen Tumoren des ZNS (Medulloblastome, Meningiome, primitive neuroektodermale Tumoren (PNET), Glioblastome, pilozytische Astrozytome und Oligodendrogliome) fest, dass die ersten drei Entitäten signifikant höhere Ki-67 LI hatten, als die beiden letztgenannten Tumorarten [287]. Analoge Resultate wurden unter anderem beim Menschen an Meningiomen (60, 48, 246 Fälle) [200, 201, 208], Adenokarzinome der Lunge (114 Fälle) [192], astrozytäre Tumoren (25, 55 Fälle) [197, 233], aber auch an kaninen und felinen Tumoren (48 feline Mammakarzinome [202], 27 melanozytäre Tumoren bei Hund und Katze [203] und 30 bzw 48 kanine Mastzelltumoren [205, 206]) beobachtet.

5.5 Bewertung des Tumorwachstums

5.5.1 p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt infolge von verschiedenen Formen von zellulärem Stress, wie z.B. ionisierende Strahlen, Hypoxie, genotoxische Schäden oder durch Onkogenaktivierung über komplexe Signalwege eine Inhibierung des Zellzyklus oder der Apoptose bzw. eine Hemmung der Angiogenese mit dem Ziel der Wachstumskontrolle gestresster Zellen [217, 218]. Alterationen des Tumorsuppressorgens *p53* bzw. die Überexpression dieses Proteins spielen eine große Rolle in der Genese verschiedenster maligner Tumoren. Bei der Mehrheit dieser Abweichungen handelt es sich um Mutationen am *p-53-locus*. Wildtyp (wt) p53 ist in die negative Regulation der Zellproliferation und in die Apoptoseinduktion involviert, während mutiertes p53 diese Eigenschaft verliert und so zu einer erhöhten Instabilität des Genoms führt [207]. Dies stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von Neoplasien dar [208]. Der Nachweis hoher Level dieses Proteins stehen mit Deletionen oder genetischen Punktmutationen in Verbindung [291]. Generell ist ausdrücklich zu betonen, dass Vergleiche zwischen Studien nur eine begrenzte Aussagekraft haben, da meistens unterschiedliche Antikörper und Zählmethoden benutzt wurden.

In der eigenen Untersuchung wurde das Protein p53 durch den polyklonalen Antikörper PAb122 detektiert. Als Positivmaterial diente beim Hund ein Osteosarkom und bei der Katze ein Mammakarzinom. In beiden Kontrollpräparaten konnte eine diffuse, nukleäre Immunreaktivität festgestellt werden. Die Kernkörperchen traten markant hervor. 21 der gewählten Ästhesioneuroblastome färbten sich nicht an. Lediglich ein kaniner Tumor zeigte eine unregelmäßig verteilte, geringgradige intranukleäre Reaktion. Dies entspricht den Angaben in der Literatur [208].

In regulären Zellen ist wt p53 aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nur in geringen Mengen vorhanden und ist allgemein nicht immunhistochemisch detektierbar [213]. Bei einer Reaktion wird angenommen, dass durch eine mutationsbedingte Konformationsänderung oder durch eine Komplexbildung von wt p53 dessen Halbwertszeit verlängert ist. Eine positive immunhistochemische Reaktion ist allerdings kein Beweis für eine Mutation. Eine immunhistochemische Anfärbbarkeit kann Ausdruck einer gesteigerten Expression dieses Proteins infolge einer DNA-Schädigung sein. Eine zusätzlich positive Farbreaktion auf p21, eines für den

Zellzyklus wichtigen regulatorischen Proteins schließt Mutationen aus [228, 292]. In Neoplasien des Gehirns treten in etwa 10 % der Fälle Mutationen auf [229]. Einige Tumoren besitzen wt p53, welches sich im Zytoplasma ansammelt und nicht mehr in den Zellkern transportiert werden kann. Durch die Abwesenheit von wt p53 im Zellkern kann dieses Protein nicht mehr seinen intranukleären Funktionen, als Wächter des Genoms nachkommen. Die Tumordisposition steigt an [215].

Der Nachweis von p53-Protein wurde als eine wichtige Methode etabliert, um Aussagen über die Prognose und die Überlebensrate treffen zu können. Entsprechende Ergebnisse erbrachten unter anderem WOODBURN et. al [293] an 40 humanen primitiven neuroektodermalen Tumoren und KYRITSIS et. al [294] an 122 humanen Glioblastomen (*Glioblastoma multiforme*), 48 Patienten mit anaplastischen Gliomen und 6 humanen Gliomen niedrigen Grades. In humanen Ästhesioneuroblastomen sind bislang keine Mutationen, sondern eine Überexpression von p53 beschrieben worden. Daneben konnte eine p21-Reaktivität nachgewiesen werden [7, 228, 230, 231]. Zudem zeigten Patienten mit p53-überexprimierenden Ästhesioneuroblastomen z.T. eine schlechtere Prognose [228, 231, 232].

Auch astrozytäre Tumoren reagieren zum Teil immunhistochemisch positiv auf p53. Dabei korreliert der p53 LI weder mit dem Ki-67 LI oder der Expression von bcl-2, noch mit der histologischen Gradeinteilung [233]. Humane Meningiome können ebenfalls immunhistochemisch positiv reagieren. Die Expression von p53 korreliert dabei sowohl mit der histologischen Gradeinteilung als auch mit dem Ki-67 LI positiv. CHO et al. wiesen Mutationen, in Korrelation mit dem Grad der Entdifferenzierung nach [234]. In Gliomen treten regelmäßig Mutationen des *p53* Gens und auch eine Überexpression von Wildtyp p53 auf, in Verbindung mit einem geringeren Grad der Differenzierung [235, 236]. In primären Neuroblastomen sind hingegen keine Mutationen zu finden [237]. In der Veterinärpathologie gibt es nur wenige Studien zu diesem Thema. Die Ergebnisse entsprechen denen der Humanpathologie [238, 239].

FONTANINI et al. wiesen in humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC, *nonsmall cell lung carcinoma*) eine umgekehrte Proportionalität zwischen p53 und bcl-2 nach. p53 akkumulierte dabei in Tumoren mit Bildung von Metastasen. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von p53 und der Überlebensrate festgestellt werden [240]. Adenokarzinome der Lunge sind ebenfalls häufig immunhistochemisch positiv und oft liegen Mutationen

des *p53* Gens bei diesem Tumor vor. Die Expression von p53 korreliert dabei signifikant positiv mit dem Ki-67 LI, dem histologischen Grad der Entdifferenzierung und einer schlechten Prognose. Die Expression von bcl-2 zeigte ein gegenläufiges Muster [192]. In der Veterinärpathologie konnte beim Hund u.a. in Lymphomen [241], in Mastzelltumoren der Haut [242], in Tumoren der Mamma [243] und in Osteosarkomen [244] eine immunhistochemisch positive Reaktion festgestellt werden.

Auswahl des Antikörpers

Die Wahl des Klons für diese Arbeit ergab sich nach einem genauen Literaturstudium. CM1 zeigte in einer Studie an kaninen Meningiomen nur eine schwache Immunpositivität bei gleichzeitig stark ausgeprägter, die Beurteilung behindernder Hintergrundfärbung [239]. Es ist bekannt, dass polyklonale Antikörper diese verursachen können [280]. Do-7 markiert kein kanines p53-Protein. Weitere Klone sind PAb240 und PAb122. Da PAb122 ein schwächeres Signal als PAb240 und CM1 aufwies und sich insgesamt weniger Zellen anfärbten, fiel die Wahl auf PAb240 [213].

5.5.2 bcl-2

Das Proto-Onkoprotein bcl-2, welches erstmals in B-Zellen-Lymphomen detektiert wurde, ist ein Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie [245]. Diese sind wichtig für die Gewebemöostase und im Besonderen an der Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt. Während einige Mitglieder diesen Prozess fördern (proapoptotisch), wird er von anderen Teilnehmern gehemmt (anti-apoptotisch). Zur letzteren Gruppe gehört auch bcl-2. Ein wichtiger Knotenpunkt bei diesem Vorgang ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Mutationen in den dafür erforderlichen Prozessen können gravierende Folgen haben. Daneben spielt bcl-2 eine wichtige Rolle in der Nekrose und bei der Autophagie. Ein für dieses Protein spezifischer Antikörper wurde bei vielen Spezies, wie auch bei Hund [243, 251] und Katze [252, 253] angewendet. Von großem Interesse ist die Beobachtung einer experimentellen Verknüpfung zwischen bcl-2 und einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika in lymphoiden Zelllinien sowie bei myeloischer Leukämie und anderen hämatolymphoiden Tumorerkrankungen [263, 276]. Dies stellt eine große Hürde in der Behandlung dieser

Tumoren dar [295].

Im Rahmen dieser Studie wurde die Expression von bcl-2 immunhistochemisch durch den monoklonalen Antikörper 124 nachgewiesen. Alle Ästhesioneuroblastome bis auf einen kaninen Tumor waren immunreaktiv. Als Positivkontrolle wurde ein humanes bzw. ein kanines Mammakarzinom und Material eines felinen Lymphoms verwendet. In letzteren Tumorzellen konnte eine nukleäre, mittel- bis dunkelbraune Reaktion festgestellt werden. In den Proben von Mensch und Hund zeigte sich hier eine intrazytoplasmatische, mittel- bis dunkelbraune Markierung, während der Zellkern basophil erschien. Die olfaktorischen Neuroblastome dieser Arbeit zeigten ein den Mammakarzinomen analoges Färbemuster. Rosetten reagierten intrazytoplasmatisch betont apikal.

Korrelation zwischen der Gradeinteilung und bcl-2

Die Anzahl reaktiver Zellen wurde in Anlehnung an eine ähnliche Untersuchung an humanen Ästhesioneuroblastomen [267] semiquantitativ ausgewertet und in 4 Gruppen eingeteilt (0 %, bis 33 %, bis 66 % und über 66 %). Die meisten Neoplasien der Gruppe 1 der Hunde zeigten einen geringgradigen Gehalt an bcl-2, während nur selten eine starke Anfärbung zu erkennen war. Ein kanines Ästhesioneuroblastom war immunnegativ. Bei den Katzen trat meist eine mittel- bis hochgradige Immunpositivität in Erscheinung. Das arithmetische Mittel dieser Befunde war bei den Katzen höher als bei den Hunden (3,33 bzw. 2,23). Dies wiederum bedeutete, dass die Katzen mehr bcl-2 exprimieren als die Hunde. Die Korrelationsanalyse zwischen bcl-2 und der Gradeinteilung ergab, dass in Tumoren höheren Differenzierungsgrades (2. Grad) in beiden Spezies eine geringe bis hohe Expression von bcl-2 aufwiesen, während bei Hunden bei den anderen Graden (1, 3, 4) gar keine oder nur geringe Immunpositivität nachgewiesen wurde. Bei den Katzen waren diese Grade mittel- bis hochgradig markiert. Die Werte zeigten eine negative markante Korrelation bei den Hunden ($r = - 0,522$) bzw. eine mittelgradige positive Korrelation bei den Katzen ($r = 0,579$), jedoch ohne Signifikanz.

Korrelation zwischen bcl-2 und dem Mitoseindex bzw. dem Ki-67 LI

Das Verhältnis bcl-2 und Mitoseindex war mit dem im vorherigen Abschnitt erwähnten Ergebnis vergleichbar (Hund: $r = - 0,351$, Katze: $r = 0,327$). Der Vergleich

von bcl-2 mit dem Ki-67 *labeling index* ergab eine geringgradige negative Korrelation bei den Hunden ($r = -0,165$) bzw. eine hochgradige positive Korrelation in feline Ästhesioneuroblastomen ($r = 0,721$).

Mutationen des bcl-2 Gens wurden in vielen Tumorentitäten, unter anderem in Melanomen und in Karzinomen der Mamma, der Prostata und der Lunge, festgestellt. Das intrazytoplasmatische Protein bcl-2 ist in Ependymzellen, im *Plexus choroideus*, in den SCHWANNschen Zellen, einigen Neuronen, reaktiven Astrozyten, jedoch nicht in Oligodendrozyten und in den Zellen der *Archnoidea* nachweisbar. Hyperplastische Zellen der Spinnenwebhaut und arachnoidale Zysten sind jedoch oft positiv. Insbesondere in verschiedenen Stammzellen findet sich eine hohe Expression von bcl-2, die das Überleben dieser wichtigen Zellpopulation sichert [252].

bcl-2 wird in den verschiedensten Zelltypen des ZNS exprimiert. Über die Expression von bcl-2 in Neoplasien des ZNS ist nur wenig bekannt. REED et al. wiesen dieses Protein in Zelllinien von Glioblastomen und Medulloblastomen nach [268]. NAKASU et al. beobachteten eine variierende Expression von bcl-2 in Abhängigkeit von der bcl-2-Produktion der Ursprungszellen des jeweiligen Tumors. So waren Ependymome, Neurinome und Papillome des *Pexus choroideus* regelmäßig immunreaktiv, während astrozytäre Tumoren und Meningiome seltener eine positive Farbreaktion zeigten [269]. In humanen Meningiomen waren maligne Formen frequenter immunhistochemisch positiv, als atypische oder benigne Subtypen, so dass von einer von der Differenzierung abhängigen Regulation dieses Proteins ausgegangen werden kann. Die Expression von bcl-2 wies eine signifikante positive Korrelation mit einer ungünstigen Prognose auf, da eine Immunreaktivität in rezidivierenden Tumoren häufiger, als in nicht-rezidivierenden Neoplasien auftrat [201, 208].

In humanen astrozytären Tumoren konnte eine 100 %ige immunhistochemische Positivität nachgewiesen werden, wobei Gebiete mit Pseudopalisaden in Glioblastomen sich eher spärlich anfärbten. Es bestand keine Korrelation zwischen p53 und bcl-2 *labeling index* (LI) bzw. dem Ki-67 LI oder der histologischen Gradeinteilung [233]. Bcl-2 scheint eine umgekehrte Proportionalität zum Grad der Malignität in Gliomen zu besitzen, da Astrozytome niedrigeren Grades das Protein frequenter exprimieren, als anaplastische Astrozytome oder Glioblastome [269]. Ähnliche Ergebnisse konnten in malignen Lymphomen beobachtet werden

[270]. Eine von der Differenzierung abhängige Regulation von bcl-2 wurde auch in Neuroblastomen beobachtet [271]. In Untersuchungen an humanen Ästhesioneuroblastomen waren 12 von 17 Patienten (70%) bzw. 12 von 20 Patienten (60 %) immunhistochemisch positiv. Dabei gab es Hinweise auf eine schlechte Prognose bei einer erhöhten Expression von bcl-2 [272]. DIENSTHUBER et al. konnten eine signifikante positive Korrelation zwischen bcl-2 und der Dichte der Gefäßsprossen beobachten und damit eine mögliche Rolle dieses Proteins als Stimulator der Angiogenese in diesen Tumoren postulieren [267].

Bcl-2 findet eine breite Anwendung bei der Diagnostik einer Vielzahl von humanen epithelialen Tumoren, einschließlich Karzinomen der Lunge, der Mamma, der Schilddrüse, der Ovarien, der Prostata, des Magens und des Kolons. In 43 von 114 humanen Adenokarzinomen der Lunge konnte ISHIDA et al. eine positive immunhistochemische Reaktion auf bcl-2 zeigen. Es färbte sich generell nur das Zytoplasma an. Dabei schien eine Expression von bcl-2 mit einem geringeren Ki-67 LI assoziiert zu sein. Da die Expression von p53 mit einer ungünstigen Prognose assoziiert war, während die Expression von bcl-2 mit einer günstigen Prognose in Verbindung stand, ist davon auszugehen, dass eine inverse Verknüpfung zwischen der proliferativen Aktivität von p53 und bcl-2 vorliegt [192]. FONTANINI et al. zeigten, dass in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) eine Expression von bcl-2 mit einer günstigen Prognose assoziiert ist. Es bestand jedoch kein Verhältnis zwischen bcl-2 und klinisch-pathologischen oder biologischen Parametern, wie Histologie, Gradeinteilung, Bildung von Metastasen oder proliferativer Aktivität [240]. Welche genaue biologische Rolle allerdings bcl-2 in der Entwicklung dieser Tumoren spielt, bleibt bislang unklar. Interessanterweise konnte in humanen Non-Hodgkin-Lymphomen, Mammakarzinomen und NSCLC eine inverse Korrelation zwischen p53 und bcl-2 festgestellt werden [192].

Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von bcl-2 in humanen und kaninen Tumoren der Mamma [243, 273], in felineen Lymphomen [274, 275], in kaninen vaskulären Tumoren [251] und in felineen Tumoren der Haut und der Basalzellen [253] nachgewiesen.

5.6 Schlussbetrachtung und Ausblick

Da ein klinisches Staging fehlt und auch keine Daten zur Metastasierung, zur Rezidivneigung und zur Überlebensrate bestehen, sind die Resultate dieser Arbeit zunächst von rein akademischer Bedeutung. Wichtig wäre auch eine ähnliche Untersuchung mit höheren Fallzahlen. Die ausgeprägte diagnostische Unsicherheit in der Diagnose undifferenzierter Ästhesioneuroblastome könnte durch einen für das Riechepithel spezifischen immunhistochemischen Marker behoben werden. Um ausführlichere Aussagen über das biologische Verhalten dieser Tumoren treffen zu können, wären neben der Detektion von p53-Protein auch die immunhistochemische Markierung von p21 von großem Interesse, da auf diese Weise Mutationen ausgeschlossen werden könnten. Zusätzlich könnten genetische Untersuchungen an Frischmaterial zusätzliche Erkenntnisse bringen.

Leider hätten die dafür erforderlichen Untersuchungen den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

6 Zusammenfassung

Das Ästhesioneuroblastom ist ein hauptsächlich bei Hund, Katze und Pferd vorkommender, sehr seltener maligner Tumor des olfaktorischen Neuroepithels.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung des in der Humanpathologie angewendeten histologischen Klassifikationssystems nach HYAMS sowie die Beurteilung der proliferativen Aktivität durch Bestimmung des Mitose-Index und des Ki-67 *labeling index*. Dazu wurde Tumorgewebe von 13 Hunden und 9 Katzen einer histologischen Untersuchung unterzogen und das System nach HYAMS entsprechend den Abweichungen modifiziert. Histomorphologische Variationen gegenüber den humanen Ästhesioneuroblastomen waren die ausgeprägten Nekrosen, die generell hohe mitotische Aktivität, das frequentere Auftreten von Rosetten bei der Katze und eine gelegentlich in Erscheinung tretende Begleitendzündung beim Hund. Die Mitoseindizes und die Ki-67 *labeling indices* (LI) waren ebenfalls relativ hoch. Der Vergleich der Gradeinteilung mit dem Mitoseindex ließ eine mittelgradig positive, jedoch nicht signifikante Korrelation erkennen. Im Gegensatz dazu korrelierten die Gradeinteilung und der Ki-67 LI bei beiden Spezies hochgradig positiv und mit ausgeprägter Signifikanz.

Die Diagnose wurde durch den gebräuchlichen, jedoch aufgrund ausgedehnter unspezifischer Reaktionen schwierig auszuwertenden, immunhistochemischen, neuronalen Marker NSE (neuronenspezifische Enolase) gefestigt und die zwei neuen ebenfalls nervenzellspezifischen Antikörper MAP-2 (mikrotubuliassoziertes Protein-2) und NeuN etabliert. Alle 22 Ästhesioneuroblastome waren neuroektodermalen Ursprungs. MAP-2 erwies sich als sehr guter Ersatz für NSE, da dieser Antikörper keine unspezifischen Markierungen aufwies. Nach semiquantitativer Auswertung konnte eine nicht signifikante, bei den Katzen hochgradig, bei den Hunden geringgradig positive Korrelation mit der Gradeinteilung festgestellt werden. NeuN, einen durch seine nukleäre Lokalisation sich positiv von den beiden anderen beiden Markern NSE und MAP-2 abgrenzenden Antikörper, erwies

sich als nur begrenzt einsetzbar, da sich nur wenige oder gar keine Zellen anfärbten bzw. diese nicht auswertbar waren. Die mikroskopische Analyse der drei Antikörper ließ eine Art metastasierende Subpopulation im Randbereich einiger feliner Tumoren erkennen.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Beurteilung des biologischen Verhaltens dieser Tumoren bei Hund und Katze mittels des immunhistochemischen Nachweises des Tumorsuppressorproteins p53 und des Apoptosemarkers bcl-2. p53 war bis auf einen kaninen Tumor immunnegativ. Der Gehalt von bcl-2 wurde semi-quantitativ ausgewertet und ließ bei den Katzen eine stärkere Expression erkennen als bei den Hunden. Im Vergleich mit der Gradeinteilung konnte eine negativ markante Korrelation in den kaninen bzw. eine mittelgradig positive Korrelation in den felinen Neoplasien festgestellt werden, jedoch ohne Signifikanz. Die Verhältnisse zwischen dem Gehalt an bcl-2 und der Proliferationsaktivität (MI bzw. Ki-67 LI) ließen ein ähnliches Muster erkennen.

Die Ergebnisse besitzen zunächst eine rein akademische Bedeutung. Interessant wäre eine ähnliche Untersuchung mit höheren Fallzahlen und genauen Angaben z.B. zum Auftreten von Metastasen, zur Therapie, zur Rezidivneigung wie auch zur Überlebensrate bzw. der Vergleich dieser Werte unter anderem mit der histomorphologischen Gradeinteilung und der Proliferationsrate.

7 Summary

Olfactory neuroblastoma in dogs and cats: a histological and immunohistochemical analysis

The olfactory neuroblastoma, also known as esthesioneuroblastoma, is a rare malignant neoplasia of the olfactory neuroepithelium. Generally it occurs in dogs, cats and horses.

Aim of this research was to establish the human pathological histological system of classification of HYAMS as well as evaluation of the proliferative activity by determination of the mitotic index and the Ki-67 *labeling index*. For this purpose neoplastic tissue of 13 dogs and 9 cats was subjected to a histological examination, the system of HYAMS was modified accordingly to the divergencies. Histomorphological variations compared to the human olfactory neuroblastoma were more distinctive necrosis, a generally severe mitotic activity, the more frequently appearance of rosettes and an occasionally collateral inflammation. The mitotic indices and the Ki-67 labeling indices (LI) were relatively high. The comparison of the gradually classification and mitotic index revealed a moderately positive however not significant correlation. By contrast the gradually classification and the Ki-67 LI correlated severe positive with distinctive statistical significance.

The diagnosis was consolidated by the conventional, immunohistochemical, neuronal marker NSE (neuron specific enolase), which is known for widespread unspecific reactions. Aside two new antibodies, MAP-2 (mikrotubuliassociated protein 2) and NeuN, which are also specific for neurons, were established. All examined tumors were of neuroectodermal origin. MAP-2 proved to be a good alternative for NSE, because of the nonexistent unspecific marking. According to a semiquantitative analysis there was determined a significant, in cats severe, in dogs mild positive correlation with the graduation. NeuN, which is demarcated of MAP-2 and NSE because of its intranuclear localisation, was proved to

be restricted in practice due to the fact that very few or not any tumor cells were immunopositive and not evaluable respectively. In the microscopical analysis of these three antibodies there was in the periphery of some feline tumors a kind of metastatic subpopulation.

A further aim of this study was the assessment of the biological behavior of these canine and feline olfactory neuroblastomas by immunohistochemical detection of the tumor suppressor protein p53 and the marker of apoptosis bcl-2. Except for one canine neoplasia all specimens were immunonegative for p53. The content of bcl-2 was analysed and showed a more severe expression in cats as in dogs. In comparison with the grading there were established a negative significant correlation in canine and a moderate positive correlation in feline tumors respectively however without significance. The ratio among expression of bcl-2 and activity of proliferation (MI, Ki-67 LI) showed a similar pattern.

First of all the results offer a pure academic interest. Interesting would be a similar investigation with a larger amount of cases and with more precise information, e.g. about occurrence of metastases, therapy, disposition of recrudescence and rate of survival respectively the equation of these values amongst with the histomorphological grading and the rate of proliferation.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Kadish, M. Goodman, C.C. Wang. Olfactory neuroblastoma: a clinical analysis of 17 cases. *Cancer*, 37:1571–1576, 1976.
- [2] P. Dulguerov, A.S. Allal, T.C. Calcaterra. Esthesioneuroblastoma: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol*, 2:683–690, 2001.
- [3] S.E. Mills, M.J. Gaffey, H.F. Frierson. Atlas of tumor pathology - tumors of the upper aerodigestive tract and ear, p. 153-163. In 3. Series, *Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.*, 2000.
- [4] A. Koestner, T. Bilzer, R. Fatzer, F.Y. Schulman, B.A. Summers, T.J. Van Winkle. Tumors of neuroepithelial tissue, p. 24. In *Schulman, F.Y. (ed.), Histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals. 2nd Edition, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., USA*, 1999.
- [5] R.W. Cantrell, B.Y. Ghorayeb, G.S. Fitz-Hugh. Esthesioneuroblastoma: diagnosis and treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 86:760–765, 1977.
- [6] G. Broich, A. Pagliari, F. Ottaviani. Esthesioneuroblastoma: a general review of the cases published since the discovery of the tumor in 1924. *Anti-cancer Res*, 17:2683–2706, 1997.
- [7] B.M. Wenig, P. Dulguerov, S.B. Kapadia, M.L. Prasad, J.C. Fanburg-Smith, L.D. Thompson (authors). Neuroectodermal tumours, p. 66-70. In *L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky (eds), World Health Organization Classification of Tumors - Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press, Lyon*, 2005.
- [8] G.K. Ogilvie and C.M. LaRue. Canine and feline nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 22:1133–1144, 1992.

- [9] K. Hara, A. Shimada, T. Morita, M. Sawada, T. Umemura. Olfactory neuroepithelioma in a dog: an immunohistochemical and electron microscopic study. *J Vet Med Sci*, 64:391–393, 2002.
- [10] C. Malinowski. Canine and feline nasal neoplasia. *Clin Tech Small Anim Pract*, 21:89–94, 2006.
- [11] M. Kitagawa, M. Okada, H. Yamamura, K. Kanayama, T. Sakai. Diagnosis of olfactory neuroblastoma in a dog by magnetic resonance imaging. *Vet Rec*, 159:288–289, 2006.
- [12] H. Ueno, Y. Kobayashi, K. Yamada. Olfactory esthesioneuroblastoma treated with orthovoltage radiotherapy in a dog. *Aust Vet J*, 85:271–275, 2007.
- [13] N.R. Cox and R.D. Powers. Olfactory neuroblastoma in two cats. *Vet Pathol*, 26:341–343, 1989.
- [14] C. Döpke, A. Gröne, M. von Borstel, T. von Oppen, M.H. Boeve, W. Baumgärtner. Metastatic esthesioneuroblastoma in a horse. *J Comp Path*, 132:218–222, 2005.
- [15] J. Yamate, T. Izawa, K. Ogata, O. Kobayashi, R. Okajima, M. Kuwamura, T. Kotani, M. Aoki. Olfactory neuroblastoma in a horse. *J Vet Med Sci*, 68:495–498, 2006.
- [16] B.C Anderson and D.R. Cordy. Olfactory neuroblastoma in a heifer. *Vet Pathol*, 18:536–540, 1981.
- [17] T. Ishikawa, P. Masahito, S. Takayama. Olfactory neuroepithelioma in a domestic carp (*cyprinus carpio*). *Cancer Res*, 38:3954–3959, 1978.
- [18] D. Jethanamest, L.G. Morris, A.G. Sikora, D.I. Kutler. Esthesioneuroblastoma - a population-based analysis of survival and prognostic factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133:276–280, 2007.
- [19] R.L. Foote, A. Morita, M.J. Ebersold, K.D. Olsen, L.M. Quast, J.A. Ferguson, W.M. O'Fallon. Esthesioneuroblastoma: the role of adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 27:835–842, 1993.
- [20] H.T. Eich, B. Hero, S. Staar, O. Micke, H. Seegenschmiedt, A. Mattke, F. Berthold, R.P. Müller. Multimodality therapy including radiotherapy and

- chemotherapy improves event-free survival in stage c esthesioneuroblastoma. *Strahlenther Onkologie*, 179:233–240, 2003.
- [21] J. Constantinidis, H. Steinhart, M. Koch, M. Buchfelder, A. Schaenzer, M. Weidenbecher, H. Iro. Olfactory neuroblastoma: the university of Erlangen-Nuernberg experience 1975-2000. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 130:567–574, 2004.
- [22] V.A. Resto, D.W. Eisele, A. Forastiere, M. Zahurak, D.J. Lee, W.H. Westra. Esthesioneuroblastoma: the Johns Hopkins experience. *Head Neck*, 22: 550–558, 2000.
- [23] F.L. Dias, G.M. Sá, R.A. Lima, J. Kligerman, M.P. Leoncio, E. Freitas, J.R.S. Soares, R.A. Arcuri. Patterns of failure and outcome in esthesioneuroblastoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129:1186–1192, 2003.
- [24] P.G. Castelnuovo, G. Delù, F. Sberze, A. Pistochini, C. Cambria, P. Battaglia, M. Bignami. Esthesioneuroblastoma: endonasal endoscopic treatment. *Skull Base*, 16:25–29, 2006.
- [25] M.E. Zafereo, S. Fakhri, R. Prayson, P.S. Batra, J. Lee, D.C. Lanza, M.J. Citardi. Esthesioneuroblastoma: 25-year experience at a single institution. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 138:452–458, 2008.
- [26] K.M. Herrold. Induction of olfactory neuroepithelial tumors in syrian hamsters by diethylnitrosamine. *Cancer*, 17:114–121, 1964.
- [27] H. Garcia, L. Keefer, W. Lijinsky, C.E. Wenyon. Carcinogenicity of nitrosothiomorpholine and 1-nitrosopiperazine in rats. *Z Krebsforsch*, 74:179–184, 1970.
- [28] M.D. Schrenzel, R.J. Higgins, S.H. Hinrichs, M.O. Smith, M. Torten. Type c retroviral expression in spontaneous feline olfactory neuroblastomas. *Acta Neuropathol*, 80:547–553, 1990.
- [29] H. Takahashi, S. Ohara, M. Yamada, F. Ikuta, K. Tanimura, Y. Honda. Esthesioneuroepithelioma: a tumor of true olfactory epithelium origin - an ultrastructural and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 75:147–155, 1987.

- [30] H.K. Ng, W.S. Poon, C.Y. Poon, J.R. South. Intracranial olfactory neuroblastoma mimicking carcinoma: report of two cases. *Histopathology*, 12: 393–403, 1988.
- [31] J.H. Lin, D.H. Tsai, Y.H. Chiang. A primary sellar esthesioneuroblastoma with unusual presentations: a case report and review of literatures. *Pituitary*, 12:70–75, 2007.
- [32] P.J. Bradley, N.S. Jones, I. Robertson. Diagnosis and management of esthesioneuroblastoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 11:112–118, 2003.
- [33] B.K. Koo, J.H. An, K.H. Jeon, S.H. Choi, Y.M. Cho, H.C. Jang, J.H. Chung, C.H. Lee, S. Lim. Two cases of ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome with olfactory neuroblastoma and literature review. *Endocr J*, 55: 469–475, 2008.
- [34] L. Josephs, L. Jones, L. Marenette, P. McKeever. Cushing's syndrome: an unusual presentation of olfactory neuroblastoma. *Skull Base*, 18:73–76, 2008.
- [35] D. van Diest, H. de Raeve, J. Claes, P.M. Parizel, D. de Ridder, P. Cras. Paraneoplastic oscloonus-myoclonus-ataxia (oma) syndrome in an adult patient with esthesioneuroblastoma. *J Neurol*, 255:594–596, 2008.
- [36] P.L. Lantos, D.N. Louis, M.K. Rosenblum, P. Kleihues. Volume II, Embryonal tumours, p. 879-882. In *D.I. Graham, P.L. Lantos (eds.), Greenfield's neuropathology. 7th Edition, Arnold, London, 2002.*
- [37] D.W. Wilson and D.L. Dungworth. Tumors of the respiratory tract, p. 371-372. In *D.J. Meuten (ed), Tumors in domestic animals. 4th Edition, Iowa State Press, Ames, Iowa, 2002.*
- [38] S.E. Mills. Neuroectodermal neoplasms of the head and neck with emphasis on neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol*, 15:264–278, 2002.
- [39] F.J. Wippold A. Perry. Neuropathology for the neuroradiologist: rosettes and pseudorosettes. *Am J Neuroradiol*, 27:488–492, 2006.

- [40] Eduardo M. Diaz, Richard H. Johnigan, Colin Pero, Adel K. El-Naggar, Diana B. Roberts, James L. Barker, Franco DeMonte. Olfactory neuroblastoma. the 22-year experience at one comprehensive cancer center. *Head Neck*, 27:138–149, 2005.
- [41] A.B. Porter, D.M. Bernhold, C. Giannini, R.L. Foote, M.J. Link, K.D. Olsen, T.J. Moynihan, J.C. Buckner. Retrospective review of adjuvant chemotherapy for esthesioneuroblastoma. *J Neurooncol*, 90:201–204, 2008.
- [42] G. Spalke, H.D. Mennel, G. Martin. Histogenesis of olfactory neuroblastoma. Electron microscopy of typical human case. *Pathol Res Pract*, 180: 516–520, 1985.
- [43] A. Hafner. Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung der neuralen Elemente der Riechschleimhaut des Hundes und lichtmikroskopische und immunhistochemische Charakterisierung spontaner Riechschleimhauttumoren bei Hund und Katze. Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland, 1987.
- [44] D.L. Dungworth, B. Hauser, F.F. Hahn, D.W. Wilson, T. Haenichen, J.R. Harkema. Epithelial tumors, p. 20-21. In *Schulman, F.Y. (ed.), Histological classification of the tumors of the respiratory system of domestic animals. 2nd Edition, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1999.*
- [45] Z.R. Cohen, E. Marmor, G.N. Fuller, F. DeMonte. Misdiagnosis of olfactory neuroblastoma. *Neurosurg Focus*, 12:e3, 2002.
- [46] R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle. Sinnesorgane, S. 400-405. In *G. Böhme, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. 3. Aufl., Band 3, Verlag Paul Paray, Berlin, Hamburg, 1992.*
- [47] H.G. Burkitt, B. Young, J.W. (eds.) Heath. Special sense organs, p. 375. In *Wheater's Functional Histology. 3rd Edition, Churchill Livingstone, London, 1993.*
- [48] C.D. Duggan and J. Ngai. Scent of a stem cell. *Nat Neurosci*, 10:673–674, 2007.

- [49] S. Firestein. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413: 211–218, 2001.
- [50] K. Simon. Untersuchungen zum Feinbau des Vomeronasalorgans beim Schwein - eine immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Studie. Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland, 2008.
- [51] C.T. Leung, P.A. Coulombe, R.R. Reed. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci*, 10:720–726, 2007.
- [52] M.E. Carney, R.C. O'Reilly, B. Sholevar, O.I. Buiakova, L.D. Lowry, W.M. Keane, F. L. Margolis, J.L. Rothstein. Expression of the human achaete-scute 1 gene in olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma). *J Neurooncol*, 26:35–43, 1995.
- [53] Y. Suzuki. Fine structural aspects of apoptosis in the olfactory epithelium. *J Neurocytol*, 33:693–702, 2004.
- [54] H.K. Wolf, R. Buslei, R. Schmidt-Kastner, P.K. Schmidt-Kastner, T. Pietsch, O.D. Wiestler, I. Bluemcke. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, 44:1167–1171, 1996.
- [55] P.J. Marangos. Neuron-specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci*, 10:269–295, 1987.
- [56] B.W. Moore and D. McGregor. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem*, 240:1647–1653, 1965.
- [57] P.J. Marangos, C. Zomely-Neurath, C.M. Luk, C. York. Isolation and characterization of the nervous system specific protein 14-3-2 from rat brain. *Biol Chem*, 250:1884–1901, 1975.
- [58] L. Fletcher, C.C. Rider, C.B. Taylor. Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta*, 452:245–252, 1976.
- [59] B.D. Radotra, K. Joshi, V.K. Kak, A.K. Banerjee. Choroid plexus tumors - an immunohistochemical analysis with review of literature. *Indian J Pathol Microbiol*, 37:9–19, 1994.

- [60] D.E. Schmechel, M.W. Brightman, P.J. Marangos. Neuron switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Res*, 190:195–214, 1980.
- [61] A.K. Patnaik, S.J. Newman, T. Scase, R.A. Erlandson, C. Antonescu, D. Craft, P.J. Bergman. Canine hepatic neuroendocrine carcinoma: an immunohistochemical and electron microscopy study. *Vet Pathol*, 42:140–146, 2005.
- [62] E.P. Spugnini, G. Citro, I. Dotsinsky, N. Mudrov, P. Mellone, A. Baldi. Ganglioneuroblastoma in a cat: a rare neoplasm treated with electrochemotherapy. *Vet J*, 178:291–293, 2008.
- [63] B.W. Moore. Chemistry and biology of two proteins, S-100 and 14-3-2, specific to the nervous system. *Int Rev Neurobiol*, 15:215–225, 1972.
- [64] B.F. Porter, R.W. Storts, H.R. Payne, J.F. Edwards. Colonic ganglioneuromatosis in a horse. *Vet Pathol*, 44:207–210, 2007.
- [65] O. Jorgensen and G. Centervall. Alpha gamma-enolase in the rat: ontogeny and tissue distribution. *J Neurochem*, 39:537–542, 1982.
- [66] G.D. Maxwell, M.C. Whitehead, S.M. Connolly, P.J. Marangos. Development of neuron-specific enolase immunoreactivity in avian nervous tissue in vivo and in vitro. *Dev Brain Res*, 3:401–419, 1982.
- [67] H. Haimoto, Y. Takahashi, T. Koshikawa, H. Nagura, K. Kato. Immunohistochemical localization of gamma-enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab Invest*, 52:257–263, 1985.
- [68] D. Schmechel, P.J. Marangos, A.P. Zis, M.W. Brightman, F.K. Goodwin. Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science*, 199:313–315, 1978.
- [69] E. Kaiser, R. Kuzmits, P. Pregant, O. Burghuber, W. Worofka. Clinical biochemistry of neuron-specific enolase. *Clin Chim Acta*, 183:13–31, 1989.
- [70] P.J. Marangos, A.P. Zis, R. Clark, F.K. Goodwin. Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res*, 150:117–133, 1978.

- [71] Y. Yoshida, K. Sakimura, T. Masuda, E. Kushiya, Y. Takahashi. Changes in levels of translatable mRNA for neuron-specific enolase and non-neuronal enolase during development of rat brain and liver. *J Biochem*, 94:1443–1450, 1983.
- [72] J.M. Rosenstein. Developmental expression of neuron-specific enolase immunoreactivity and cytochrome oxidase activity in neocortical transplants. *Exp Neurol*, 124:208–218, 1993.
- [73] D. Schmechel, P.J. Marangos, M.W. Brightman. Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, 276:834–846, 1979.
- [74] F.J. Tapia, J.M. Polak, A.J. Barbosa, S.R. Bloom, P.J. Marangos, C. Dermody, A.G. Pearse. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet*, 1:808–811, 1981.
- [75] M.R. Wick, B.W. Scheithauer, K. Kovacs. Neuron-specific enolase in neuroendocrine tumors of the thymus, bronchus, and skin. *Am J Clin Pathol*, 79:703–707, 1983.
- [76] S. Takahashi, T. Iwanaga, Y. Takahashi, Y. Nakano, T. Fujita. Neuron-specific enolase, neurofilament protein and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 238:231–234, 1984.
- [77] S.A. Vinore, J.M. Bonnin, L.J. Rubinstein, P.J. Marangos. Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasm of the CNS and other tissues. *Arch Pathol Lab Med*, 108:536–540, 1984.
- [78] T. Fujita, T. Kanno, S. Kobayashi. The paraneuron. *J Anat*, 162:275–276, 1989.
- [79] P.J. Marangos, I.C. Campbell, D. Schmechel, D.L. Murphy, F.K. Goodwin. Blood platelets contain a neuron-specific enolase subunit. *J Neurochem*, 34:1254–1258, 1980.
- [80] P.J. Marangos, A. Parma, F.K. Goodwin. Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. *J Neurochem*, 31:727–732, 1978.

- [81] H.H. von Dorsche, K. Fält, H.J. Hahn, H. Reiher. Neuron-specific enolase (NSE) as a neuroendocrine cell marker in the human fetal pancreas. *Acta Histochem*, 85:227–228, 1989.
- [82] J. Gross, J. Zinsmeyer, A. Lessing, J. Wenzel, P. Prenzlau, H. Halle, E.L. Grauel. Development of enolase isoenzymes in various regions of the human brain. *Biomed Biochim Acta*, 49:533–538, 1990.
- [83] P.J. Marangos, F.K. Goodwin, A. Parma, C. Lauter, E. Trams. Neuron-specific protein (NSP) in neuroblastoma cells: relation to differentiation. *Brain Res*, 145:49–58, 1978.
- [84] G. Terenghi, J.M. Polak, J. Ballesta, D. Cocchia, F. Michetti, D. Dahl, P.J. Marangos, A. Garner. Immunocytochemistry of neuronal and glial markers in retinoblastoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 404:61–73, 1984.
- [85] P. Montoliu, S. Anor, E. Vidal, M. Pumarola. Histological and immunohistochemical study of 30 cases of canine meningioma. *J Comp Path*, 135: 200–207, 2006.
- [86] A.K. Banerjee, B.S. Sharma, R.K. Vashista, V.K. Kak. Intracranial olfactory neuroblastoma: evidence for olfactory epithelial origin. *J Clin Pathol*, 45: 299–302, 1992.
- [87] A.E. Chang, J.A. Fletcher, J.E. Madewell, P.S. Meltzer, R.P. Moser, V.K. Sondak, R.J. Zarbo. Primitive neuroectodermal tumors and related lesions, p. 951-952. In *Enzinger, F.M. and Weiss, S.W. (eds.), Soft tissue tumors. 3rd Edition, Mosby, St. Louis, Missouri*, 1995.
- [88] I. Haas and U. Ganzer. Does sophisticated diagnostic workup on neuroectodermal tumors have an impact on the treatment of esthesioneuroblastoma? *Onkologie*, 26:261–267, 2003.
- [89] T. Oyamada, H. Tanaka, C.H. Park, H. Ueki, T. Komiya, S. Arai. Pathology of canine oral malignant melanoma with cartilage and/or osteoid formation. *J Vet Med Sci*, 69:1155–1161, 2007.
- [90] M.N. Sheppard, B. Corrin, M.H. Bennett, P.J. Marangos, S.R. Bloom, J.M. Polak. Immunocytochemical localization of neuron-specific enolase in small

- cell carcinomas and carcinoid tumors of the lung. *Histopathology*, 8:171–181, 1984.
- [91] J.M. Nesland, R. Holm, J.V. Johannessen. A study of different markers for neuroendocrine differentiation in breast carcinomas. *Pathol Res Pract*, 181: 524–530, 1986.
- [92] P.M. Zeltzer, P.J. Marangos, H. Sather, A. Evans, S. Siegel, K.Y. Wong, A. Dalton, R. Seeger, D. Hammond. Prognostic importance of serum neuron-specific enolase in local and widespread neuroblastoma. *Adv Neuroblast Res*, 175:319–329, 1985.
- [93] D.H. Johnson, P.J. Marangos, J.T. Forbes, J.D. Hainsworth, R.V. Welch, K.R. Hande, F.A. Greco. Potential utility of serum neuron-specific enolase levels in small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*, 44:5409–5414, 1984.
- [94] T. Kirino, M.W. Brightman, W.H. Oertel, D.E. Schmechel, P.J. Marangos. Neuron-specific enolase as an index of neuronal regeneration and reinnervation. *J Neurosci*, 3:915–923, 1983.
- [95] L. Dehmelt and S. Halpain. The MAP-2/tau family of microtubule-associated proteins - protein family review. *Genome Biol*, 6:204.1–10, 2005.
- [96] M. Hasselblatt, I. Blümcke, A. Jeibmann, C.H. Rickert, A. Jouvet, J.A. van de Nes, K. Kuchelmeister, A. Brunn, M. Fevre-Montange, W. Paulus. Immunohistochemical profile and chromosomal imbalances in papillary tumours of the pineal region. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32:278–283, 2006.
- [97] J. Ostojic, D.S. Sakaguchi, Y. de Lathouder, M.S. Hargrove, J.T. Trent, Y.H. Kwon, R.H. Kardon, M.H. Kuehn, D.M. Betts, S. Grozdanic. Neuroglobin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47:1016–1023, 2006.
- [98] A. Zepeda, F. Sengpiel, M.A. Guagnelli, L. Vaca, C. Arias. Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J Neurosci*, 24:1812–1821, 2004.

- [99] D.A. Dawson and J.M. Hallenbeck. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP-2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *Blood Flow Metab*, 16:170–174, 1996.
- [100] J.F. Leterrier, R.K. Liem, M.L. Shelanski. Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol*, 95:982–986, 1982.
- [101] H. Harada, J. Teng, Y. Takei, K. Oguchi, N. Hirokawa. MAP-2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol*, 158:541–519, 2002.
- [102] P. Forleo, D. Couchie, S. Chabas, J. Nunez. Four repeat high-mol-wt MAP-2 forms in rat dorsal ganglia. *J Mol Neurosci*, 7:193–201, 1996.
- [103] W.J. Chung, S. Kindler, C. Seidenbecher, C.C. Garner. MAP-2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J Neurochem*, 66:1273–1281, 1996.
- [104] R.P. Tucker, L.I. Binder, C. Viereck, B.A. Hemmings, A. Matus. The sequential appearances of low- and high-molecular-weight forms of MAP-2 in the developing cerebellum. *J Neurosci*, 8:4503–4512, 1988.
- [105] N. Kalcheva, J. Albala, K. O'Giun, H. Rubino, C. Garner, B. Shafit-Zagardo. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 10894–10898, 1995.
- [106] S.A. Lewis, D.H. Wang, N.J. Cowan. Microtubule-associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science*, 242:936–939, 1988.
- [107] R.S. Ozer and S. Halpain. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP-2c to the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 11:3573–3587, 2000.
- [108] M. Goedert, R.A. Crowther, C.C. Garner. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP-2. *Trends Neurosci*, 14:193–199, 1991.

- [109] R. Mukhopadhyay and J.H. Hoh. AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS Lett*, 505:374–378, 2001.
- [110] V.N. Uversky. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem*, 269:2–12, 2002.
- [111] J.R. Menezes and M.B. Luskin. Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci*, 14:5399–5416, 1994.
- [112] C.C. Garner, B. Brugg, A. Matus. A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP-2). *J Neurochem*, 50:609–615, 1988.
- [113] A. Matus. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)*, 84:134–137, 1990.
- [114] N. Hirokawa, T. Funakoshi, R. Sato-Harada, Y. Kanai. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2c in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol*, 132:667–679, 1996.
- [115] Y. Kanai and N. Hirokawa. Sorting mechanisms of tau and MAP-2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP-2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron*, 14:421–432, 1995.
- [116] C.C. Garner, R.P. Tucker, A. Matus. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP-2 in dendrites. *Nature*, 336:674–677, 1988.
- [117] D.A. Vouyiouklis and P.J. Brophy. Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP-2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Res*, 42:803–817, 1995.
- [118] K.L. Loveland, D. Herszfeld, B. Chu, E. Rames, E. Christy, L.J. Briggs, R. Shakri, D.M. de Kretser, D.A. Jans. Novel low molecular weight microtubule-associated protein 2 isoforms contain a functional nuclear localization sequence. *J Biol Chem*, 274:19261–19268, 1999.

- [119] S.C. Pappasozomenos and L.I. Binder. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract. *J Neurosci*, 6:1748–1756, 1986.
- [120] N. Hirokawa, S. Hisanaga, Y. Shiomura. MAP-2 is a component of cross-bridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *J Neurosci*, 8:2769–2779, 1988.
- [121] H. Felgner, R. Frank, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, B. Ludin, A. Matus, M. Schliwa. Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol*, 138:1067–1075, 1997.
- [122] L. Dehmelt, F.M. Smart, R.S. Ozer, S. Halpain. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci*, 23:9479–9490, 2003.
- [123] L. Chang, Y. Jones, M.H. Ellisman, L.S. Goldstein, M. Karin. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell*, 4:521–533, 2003.
- [124] W.E. Theurkauf and R.B. Vallee. Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem*, 257:3284–3290, 1982.
- [125] V. Fontaine-Lenoir, B. Chambraud, A. Fellous, S. David, Y. Duchossoy, E.E. Baulieu, P. Robel. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:4711–4716, 2006.
- [126] S.P. Zamora-Leon, G. Lee, P. Davies, B. Shafit-Zagardo. Binding of Fyn to MAP-2c through an SH3 binding domain. Regulation of the interaction by ERK2. *J Biol Chem*, 276:39950–39958, 2001.
- [127] M.A. Davare, F. Dong, C.S. Rubin, J.W. Hell. The A-kinase anchor protein MAP-2b and cAMP-dependent protein kinase are associated with class C L-type calcium channels in neurons. *J Biol Chem*, 274:30280–30287, 1999.
- [128] L.A. Lopez and M.P. Sheetz. Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP-2. *Cell Motil Cytoskeleton*, 24:1–16, 1993.

- [129] D.F. Matesic R.C. Lin. Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem*, 63:1012–1020, 1994.
- [130] A.A. Book, I. Fischer, X.J. Yu, P. Iannuzzelli, E.H. Murphy. Altered expression of microtubule-associated proteins in cat trochlear motoneurons after peripheral and central lesions of the trochlear nerve. *Exp Neurol*, 138:214–226, 1996.
- [131] T.R. Koirala, K. Nakagaki, T. Ishida, S. Nonaka, S. Morikawa, T. Tabira. Decreased expression of MAP-2 and GAD in the brain of cats infected with feline immunodeficiency virus. *Tohoku J Exp Med*, 195:141–151, 2001.
- [132] Y. Li, N. Jiang, C. Powers, M. Chopp. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 29:1972–1980, 1998.
- [133] I. Blümcke, A.J. Becker, S. Normann, V. Hans, B.M. Riederer, S. Krajewski, O.D. Wiestler, G. Reifenberger. Distinct expression pattern of microtubule-associated protein-2 in human oligodendrogliomas and glial precursor cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (10):984–993, 2001.
- [134] I. Blümcke, S. Müller, R. Buslei, B.M. Riederer, O.D. Wiestler. Microtubule-associated protein-2 immunoreactivity: a useful tool in the differential diagnosis of low-grade neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol*, 108:89–96, 2004.
- [135] R.J. Mullen, C.R. Buck, A.M. Smith. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116:201–211, 1992.
- [136] E. Bier, L. Ackerman, S. Barbel, L. Jan, Y.N. Jan. Identification and characterization of a neuron-specific nuclear antigen in drosophila. *Science*, 240:913–916, 1988.
- [137] D.A. Rayner and A.J. Baines. A novel component of the axonal cortical cytoskeleton, A60, defined by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*, 94:489–500, 1989.

- [138] H.B. Sarnat, D. Nochlin, D.E. Born. Neuronal nuclear antigen NeuN: a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev*, 20:88–94, 1998.
- [139] D.F. Emerich, C.G. Thanos, M. Goddard, S.J. Skinner, M.S. Geany, W.J. Bell, B. Bintz, P. Schneider, Y. Chu, R.S. Babu, C.V. Borlongan, K. Boekelheide, S. Hall, B. Bryant, J.H. Kordower. Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. *Neurobiol Dis*, 23:471–480, 2006.
- [140] L. Lyck, J. Jelsing, P.S. Jensen, K.L. Lambertsen, B. Pakkenberg, B. Finsen. Immunohistochemical visualization of neurons and specific glial cells for stereological application in the porcine neocortex. *J Neurosci Methods*, 152:229–242, 2006.
- [141] A.M. Nikolakopoulou, C.R. Dermon, L. Panagis, M. Pavlidis, M.G. Stewart. Passive avoidance training is correlated with decreased cell proliferation in the chick hippocampus. *Eur J Neurosci*, 24:2631–2642, 2006.
- [142] D. Lind, S. Franken, J. Kappler, J. Jankowski, K. Schilling. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res*, 79:295–302, 2005.
- [143] A. Weyer and K. Schilling. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*, 73:400–409, 2003.
- [144] L.T. McPhail, C.B. McBride, J. McGraw, J.D. Steeves, W. Tetzlaff. Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Exp Neurol*, 185:182–190, 2004.
- [145] M.A. Edgar and M.K. Rosenblum. The differential diagnosis of central nervous system tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 132:500–509, 2008.
- [146] M. Preusser, U. Laggner, C. Haberler, H. Heinzl, H. Budka, J.A. Hainfellner. Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology*, 48:438–444, 2006.

- [147] R.J. Mullen, E.M. Eicher, R.L. Sidman. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:208–212, 1976.
- [148] F. Soylemezoglu, S. Onder, G.G. Tezel, M. Berker. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a new tool in the diagnosis of central neurocytoma. *Pathol Res Pract*, 199:463–468, 2003.
- [149] C. Englund, E.C. Alvord, R.D. Folkerth, D. Silbergeld, D.E. Born, R. Small, R.F. Hevner. NeuN expression correlates with reduced mitotic index of neoplastic cells in central neurocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31:429–438, 2005.
- [150] H.K. Wolf, R. Buslei, I. Blümcke, O.D. Wiestler, T. Pietsch. Neural antigens in oligodendrogliomas and dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol*, 94:436–443, 1997.
- [151] G.P. Xu, K.R. Dave, R. Vivero, P.K. Schmidt-Kastner, T.J. Sick, M.A. Perez-Pinzon. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 952:153–158, 2002.
- [152] L. Qiu, C. Zhu, X. Wang, F. Xu, P.S. Eriksson, M. Nilsson, C.M. Cooper-Kuhn, H.G. Kuhn, K. Blomgren. Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27:785–794, 2007.
- [153] S. Liu, J. Wang, D. Zhu, Y. Fu, K. Lukowiak, Y.M. Lu. Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 23:732–736, 2003.
- [154] P.J. van Diest, G. Brugal, J.P. Baak. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*, 51:716–724, 1998.
- [155] M.R. Alison. Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol*, 14:935–944, 1995.
- [156] P.A. Hall and D.A. Levison. Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43:184–192, 1990.
- [157] D.C. Brown and K.C. Gatter. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17:489–503, 1990.

- [158] C.C. You, A.L. Woods, D.A. Levison. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J*, 24:121–131, 1992.
- [159] D.N. Louis, S. Edgerton, A.D. Thor, E.T. Hedley-Whyte. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. *Acta Neuropathol*, 81:675–679, 1991.
- [160] J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, H. Stein. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31:13–20, 1983.
- [161] M. Starborg, K. Gell, E. Brundell, C. Höög. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, 109:143–153, 1996.
- [162] B. Falini, L. Flenghi, M. Fagioli, H. Stein, R. Schwarting, C. Riccardi, I. Manocchio, S. Pileri, P.G. Pelicci, L. Lanfrancone. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, 37: 1471–1478, 1989.
- [163] D.C. Brown and K.C. Gatter. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, 40:2–11, 2002.
- [164] C. Schlüter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, M.H. Becker, G. Key, H.D. Flad, J. Gerdes. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*, 123: 513–522, 1993.
- [165] S. Rogers, R. Wells, M. Rechsteiner. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the pest hypothesis. *Science*, 234:364–368, 1986.
- [166] S. Bruno and Z. Darzynkiewicz. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*, 25:31–40, 1992.

- [167] M.G. van Oijen, R.H. Medema, P.J. Slootweg, G. Rijksen. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol*, 110:24–31, 1998.
- [168] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, H. Stein. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133:1710–1715, 1984.
- [169] R. Verheijen, H.J. Kuijpers, R.O. Schlingemann, A.L. Boehmer, R. van Driel, G.J. Brakenhoff, F.C. Ramaekers. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen - I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci*, 92:123–130, 1989.
- [170] R. Verheijen, H.J. Kuijpers, R. van Driel, J.L. Beck, J.H. van Dierendonck, G.J. Brakenhoff, F.C. Ramaekers. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen - II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*, 92:531–540, 1989.
- [171] W. Ross and P.A. Hall. Ki67: from antibody to molecule to understanding? *J Clin Pathol*, 48:M113–M117, 1995.
- [172] T. Scholzen and J. Gerdes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182:311–322, 2000.
- [173] M. Duchrow. Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens. Medizinische Fakultät der Universität Lübeck, Deutschland, 2003.
- [174] I.R. Kill. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleus - evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, 109:1253–1263, 1996.
- [175] N. Paweletz and M.C. Risueno. Transmission electron microscopic studies on the mitotic cycle of nucleolar proteins impregnated with silver. *Chromosoma*, 85:261–273, 1982.
- [176] D. Hernandez-Verdun. The nucleolus today. *J Cell Sci*, 99:465–471, 1991.
- [177] D. Hernandez-Verdun and T. Gautier. The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*, 16:179–185, 1994.

- [178] A.A. van Hooser, P. Yuh, R. Heald. The perichromosomal layer. *Chromosoma*, 114:377–388, 2005.
- [179] T. Gautier, M. Robert-Nicoud, M.N. Guilly, D. Hernandez-Verdun. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci*, 102:729–737, 1992.
- [180] J.H. van Dierendonck, R. Kejizer, C.J. van de Velde, C.J. Cornelisse. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cell. *Cancer Res*, 49:2999–3006, 1989.
- [181] I.R. Kill, R.G. Faragher, K. Lawrence, S. Shall. The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture. *J Cell Sci*, 107:571–579, 1994.
- [182] E. Endl and J. Gerdes. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*, 257:231–237, 2000.
- [183] M.H. Schmidt, R. Broll, H.P. Bruch, O. Bögl, M. Duchrow. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J Pathol*, 199:18–27, 2003.
- [184] D.E. MacCallum P.A. Hall. The location of pKi-67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*, 190:537–544, 2000.
- [185] M.H. Schmidt, R. Broll, H.P. Bruch, M. Duchrow. Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner. *J Cell Biochem*, 87:334–341, 2002.
- [186] D. McCormick, C. Yu, C. Hobbs, P.A. Hall. The relevance of antibody concentration to the immunohistochemical quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology*, 22:543–547, 1993.
- [187] J. Gerdes. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol*, 1:199–206, 1990.

- [188] T.M. Grogan, S.M. Lippman, C.M. Spier, D.J. Slymen, J.A. Rybski, C.S. Rangel, L.C. Richter, T.P. Miller. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood*, 71:1157–1160, 1988.
- [189] M.F. Tungekar, K.C. Gatter, M.S. Dunnill, D.Y. Mason. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology*, 19:545–550, 1991.
- [190] H.Q. Wintzer, I. Zipfel, J. Schulte-Mönting, U. Hellerich, S. von Kleist. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, 67:421–428, 1991.
- [191] D. Fontana, M. Bellina, L. Gubetta, G. Fasolis, L. Rolle, C. Scoffone, F. Porpiglia, M. Colomba, R. Tarabuzzi, E. Leonardo. Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol*, 148: 1149–1151, 1992.
- [192] H. Ishida, K. Irie, T. Itoh, T. Furukawa, O. Tokunaga. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer*, 80:1034–1045, 1997.
- [193] A. Sendler, K.P. Gilbertz, I. Becker, J. Mueller, U. Berger, U. Fink, D. van Beuningen, J.R. Siewert. Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection. *Europ J Cancer*, 37:1635–1641, 2001.
- [194] J. Cui, B.W. Dong, P. Liang, X.L. Yu, D.J. Yu. Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol*, 10:1533–1536, 2004.
- [195] K. Sakai, K. Hongo, Y. Tanaka, J. Nakayama. Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis. *Brain Tumor Pathol*, 24:57–62, 2007.
- [196] M.T. Mandara, G. Ricci, L. Rinaldi, G. Sarli, G. Vitellozzi. Immunohistochemical identification and image analysis quantification of oestrogen and progesterone receptors in canine and feline meningiomas. *J Comp Pathol*, 127:214–218, 2002.

- [197] M.H. Faria, B.P. Goncalves, R.M. do Patrocinio, M.O. de Moraes-Filho, S.H. Rabenhorst. Expression of Ki-67, topoisomerase 2alpha and c-myc in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. *Neuropathology*, 26:519–527, 2006.
- [198] A.L. Johannessen and S.H. Torp. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*, 12:143–147, 2006.
- [199] F.M. Peria, L. Neder, S.K. Marie, S. Rosemberg, S.M. Oba-Shinjo, B.O. Colli, A.A. Gabbai, S.M. Malheiros, M.A. Zago, R.A. Panepucci, C.A. Moreira-Filho, O.K. Okamoto, C.G. Carlotti Jr. Pleiotrophin expression in astrocytic and oligodendroglial tumors and it's correlation with histological diagnosis, microvascular density, cellular proliferation and overall survival. *J Neurooncol*, 84:255–261, 2007.
- [200] J. Bruna, M. Brell, F.A. Ferrer, P. Gimenez-Bonafe, A. Tortosa. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology*, 27:114–120, 2007.
- [201] N. Uzüm G. A. Ataoglu. Histopathological parameters with Ki-67 and bcl-2 in the prognosis of meningiomas according to WHO 2000 classification. *Tumori*, 94:389–397, 2008.
- [202] M. Castagnaro, R. De Maria, E. Bozzetta, G. Ru, C. Casalone, B. Biolatti, M. Caramelli. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 65:223–226, 1998.
- [203] S. Roels, K. Tilmant, R. Ducatelle. PCNA and Ki-67 proliferation markers as a criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol*, 121:13–24, 1999.
- [204] F. Millanta, G. Lazzeri, M. Mazzei, I. Vannozzi, A. Poli. MIB-1 labelling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Vet Pathol*, 39:120–126, 2002.
- [205] B. Seguin, M.F. Besancon, J.L. McCallan, L.L. Dewe, M.C. Tenwolde, E.K. Wong, M.S. Kent. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *J Vet Intern Med*, 20:933–940, 2006.

- [206] K. Ozaki, T. Yamagami, K. Nomura, I. Namara. Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *J Vet Med Sci*, 69:1117–1121, 2007.
- [207] D.P. Lane and L.V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278:261–263, 1979.
- [208] E. Karamitopoulou, E. Perentes, M. Tolnay, A. Probst. Prognostic significance of MIB-1, p53 and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol*, 29:140–145, 1998.
- [209] A.B. de Leo, G. Jay, E. Appella, G.C. Dubois, L.W. Law, L.J. Old. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:2420–2424, 1979.
- [210] D.I. Linzer and A.J. Levine. Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43–52, 1979.
- [211] D.P. Lane. P53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15–16, 1992.
- [212] C. Wagener (Autor, Ed.). Zellzyklus und Apoptose, S. 139-150. In *Molekulare Onkologie - Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.
- [213] H.B. Newton. Molecular neuro-oncology and the development of targeted therapeutic strategies for brain tumors; part 4: p53 signaling pathway. *Expert Rev Anticancer Ther*, 5:177–191, 2005.
- [214] M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, C.C. Harris. Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54:4855–4878, 1994.
- [215] K.M. Ryan, A.C. Phillips, K.H. Vousden. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13:332–337, 2001.
- [216] P. Giannakakou, D.L. Sackett, Y. Ward, K.R. Webster, M.V. Blagosklonny, T. Fojo. P53 is associated with cellular microtubules and uses dynein-dependent transport for nuclear accumulation. *Nat Cell Biol*, 2:709–717, 2000.

- [217] C. Prives. Signaling to p53: breaking the mdm2-p53 circuit. *Cell*, 95:5–8, 1998.
- [218] B. Vogelstein, D. Lane, A.J. Levine. Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307–310, 2000.
- [219] K. Polyak, Y. Xia, J.L. Zweier, B. Vogelstein. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389:300–305, 1997.
- [220] W.S. El-Deiry. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, 8:345–357, 1998.
- [221] X.W. Wu, J.H. Bayle, D. Olson, A.J. Levine. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7:1126–1132, 1993.
- [222] M.B. Kastan, C.E. Canman, C.J. Leonard. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 14:3–15, 1995.
- [223] H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K.W. Kinzler, B. Vogelstein. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of g2/m progression. *Mol Cell*, 1:3–11, 1997.
- [224] T.R. Hupp, D.W. Meek, C.A. Midgley, D. Lane. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, 71:875–886, 1992.
- [225] Y. Zhang and Y. Xiong. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by mdm2 and ARF. *Cell Growth Diff*, 12:175–186, 2001.
- [226] U.M. Moll, S. Wolff, D. Speidel, W. Deppert. Transcription-independent proapoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*, 17:631–636, 2005.
- [227] K. Heyne. Neue Funktionen des p53-Tumorsuppressors an den Mitochondrien und im Zellkern. Naturwissenschaftliche Fakultät III für Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität Saarland, Deutschland, 2007.
- [228] H. Papadaki, S. Kounelis, S.B. Kapadia, A. Bakker, P.A. Swalsky, S.D. Finkelstein. Relationship of p53 gene alterations with tumor progression and recurrence in olfactory neuroblastoma. *Am J Surg Pathol*, 20:715–721, 1996.

- [229] A. Zupanska and B. Kaminska. The diversity of p53 mutations among human brain tumors and their functional consequences. *Neurochem Int*, 40: 637–645, 2002.
- [230] T. Hirose, B.W. Scheithauer, M.B. Lopes, H.A. Gerber, H.J. Altermatt, S.G. Harner, S.R. VandenBerg. Olfactory neuroblastoma: an immunohistochemical, ultrastructural and flow cytometric study. *Cancer*, 76:4–19, 1995.
- [231] P.A. Levine, R. Gallagher, R.W. Cantrell. Esthesioneuroblastoma: reflections of a 21-year experience. *Laryngoscope*, 109:1539–1543, 1999.
- [232] J. Schlegel, A. Peraud, K. Bise. WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In *Tumorzentrum München*, 2001.
- [233] T. Takekawa, M. Sawada, I. Sakurai. Expression of apoptosis and its related protein in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol*, 16:11–16, 1999.
- [234] H. Cho, S.Y. Ha, S.H. Park, Y.S. Chae. Role of p53 gene mutations in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci*, 14: 199–205, 1999.
- [235] H. Haapasalo, J. Isola, P. Sallinen, H. Kalimo, H. Helin, I. Rantala. Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am J Pathol*, 142:1347–1351, 1993.
- [236] D. Figarella-Branger, C. Colin, B. Coulibaly, B. Quilichini, A. Maues De Paula, C. Fernandez, C. Bouvier. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol (Paris)*, 164:505–515, 2008.
- [237] K. Vogan, M. Bernstein, J.M. Leclerc, L. Brisson, J. Brossard, G.M. Brodeur, J. Pelletier, P. Gros. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res*, 53:5269–5273, 1993.
- [238] G. Stoica, H.T. Kim, D.G. Hall, J.R. Coates. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Vet Pathol*, 41:10–19, 2004.
- [239] D.M. Janik. Das intracraniale Meningeom des Hundes: Analysen zu morphologischen, immunhistochemischen und genomischen Alterationen. Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland, 2005.

- [240] G. Fontanini, S. Vignati, D. Bigini, A. Mussi, M. Lucchi, C.A. Angeletti, F. Basolo, G. Bevilacqua. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 71:1003–1007, 1995.
- [241] J. Sokolowska, A. Cywinska, E. Malicka. P53 expression in canine lymphoma. *J Vet Med*, 52:172–175, 2005.
- [242] H. Wu, T. Hayashi, M. Inoue. Immunohistochemical expression of mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53:65–68, 2006.
- [243] R. Kumaraguruparan, D. Prathiba, S. Nagini. Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci*, 81:218–224, 2006.
- [244] J. Kirpensteijn, M. Kik, E. Teske, G.R. Rutteman. P53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Vet Surg*, 37:454–460, 2008.
- [245] Y. Tsujimoto, L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, C.M. Croce. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226:1097–1099, 1984.
- [246] D.L. Vaux, S. Cory, J.M. Adams. Bcl-2 gene promotes haemopoetic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335:440–442, 1988.
- [247] Z. Chen-Levy, J. Nourse, M.L. Cleary. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol*, 9:701–710, 1989.
- [248] S. Henderson, D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson, A. Rickinson. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2 protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:8479–8483, 1993.
- [249] V. Kirkin, S. Joos, M. Zörnig. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1644:229–249, 2004.
- [250] J.A. Ramsay, L. From, H.J. Kahn. Bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod Pathol*, 8:150–154, 1995.

- [251] M. Murakami, H. Sakai, A. Kodama, T. Mori, K. Maruo, T. Yanai, T. Masugi. Expression of the anti-apoptotic factors bcl-2 and survivin in canine vascular tumours. *J Comp Pathol*, 139:1–7, 2008.
- [252] B.R. Madewell, R. Gandour-Edwards, B.F. Edwards, J.E. Walls, S.M. Griffey. Topographic distribution of bcl-2 protein in feline tissues in health and neoplasia. *Vet Pathol*, 36:565–573, 1999.
- [253] B.R. Madewell, R. Gandour-Edwards, B.F. Edwards, K.R. Matthews, S.M. Griffey. Bax/bcl-2: cellular modulator of apoptosis in feline skin and basal cell tumors. *J Comp Path*, 124:115–121, 2001.
- [254] C. Borner. The bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 39:615–647, 2003.
- [255] A.M. Petros, A. Medek, D.G. Nettesheim, D.H. Kim, H.S. Yoon, K. Swift, E.D. Matayoshi, T. Oltersdorf, S.W. Fesik. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:3012–3017, 2001.
- [256] D.M. Hockenbery, J. Nunez, C. Milliman, R.D. Schreiber, S.J. Korsmeyer. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348:334–336, 1990.
- [257] A.M. Weissman. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:169–178, 2001.
- [258] D.M. Hockenbery, Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75:241–251, 1993.
- [259] G. Baffy, T. Miyashita, J.R. Williamson, J.C. Reed. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 268:6511–6519, 1993.
- [260] S. Kamesaki, H. Kamesaki, T.J. Jorgensen, A. Tanizawa, Y. Pommier, J. Cossman. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase-II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res*, 53:4251–4256, 1993.

- [261] E.H. Cheng, M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, S.J. Korsmeyer. Bcl-2, bcl-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8:705–711, 2001.
- [262] X.M. Yin, Z.N. Oltvai, S.J. Korsmeyer. BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature*, 369:321–323, 1994.
- [263] J.C. Reed. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 111:3322–3330, 2008.
- [264] S. Pattingre, A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, B. Levine. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibits Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122:927–937, 2005.
- [265] D. Merino P. Bouillet. The bcl-2 family in autoimmune and degenerative disorders. *Apoptosis*, 14:570–583, 2009.
- [266] D.P. LeBrun, R.A. Warnke, M.L. Cleary. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol*, 142:743–753, 1993.
- [267] M. Diensthuber, M. Potinius, T. Rodt, A.C. Stan, H.J. Welkoborsky, M. Samii, J. Schreyögg, T. Lenarz, T. Stöver. Expression of bcl-2 is associated with microvessel density in olfactory neuroblastoma. *J Neurooncol*, 89:131–139, 2008.
- [268] J.C. Reed, L. Meister, S. Tanaka, M. Cuddy, S. Yum, C. Geyer, D. Pleasure. Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res*, 51:6529–6538, 1991.
- [269] S. Nakasu, H. Nakasu, Y. Nioka, M. Nakajima, J. Handa. Bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 88: 520–526, 1994.
- [270] L. Leoncini, M.T. Del Vecchio, T. Megha, P. Barbini, P. Galieni, S. Pileri, E. Sabattini, F. Gherlinzoni, P. Tosi, R. Kraft. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, 142:755–763, 1993.

- [271] V.P. Castel, K.P. Heidelberger, J. Bromberg, X. Ou, M. Dole, G. Nunez. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol*, 143:1543–1550, 1993.
- [272] J.W. Kim, I.G. Kong, C.H. Lee, D.Y. Kim, C.S. Rhee, Y.G. Min, C.W. Kim, J.H. Chung. Expression of bcl-2 in olfactory neuroblastoma and its association with chemotherapy and survival. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 139:708–712, 2008.
- [273] W.-Y. Yang, C.-H. Liu, C.-J. Chang, C.-C. Lee, C.-T. Lin. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J Comp Path*, 134:70–79, 2006.
- [274] G. Dank, M.D. Lucroy, S.M. Griffey, R. Gandour-Edwards, B.R. Madewell. bcl-2 and MIB-1 labelling indexes in cats with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 16:720–725, 2002.
- [275] R. Kano, E. Sato, T. Okamura, S. Watanabe, A. Hasegawa. Expression of bcl-2 in feline lymphoma cell lines. *Vet Clin Pathol*, 37:57–60, 2008.
- [276] T. Miyashita and J.C. Reed. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*, 52:5407–5411, 1992.
- [277] A. Webb, D. Cunningham, F. Cotter, P.A. Clarke, F. Di Stefano, P. Ross, M. Corbo, Z. Dziewanowska. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, 349:1137–1141, 1997.
- [278] I. Marzo and J. Naval. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*, 76:939–946, 2008.
- [279] G.L. Bratthauer. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods, p. 203-214. In L.C. Javois (ed.), *Immunohistochemical methods and protocols. 2nd Edition*, Humana Press, New York, 1999.
- [280] S. Noll and S. Schaub-Kuhnen. Nachweismethoden, S. 17-18. In H. Höfler, K.M. Müller (eds.), *Praxis der Immunhistochemie. 1. Aufl.*, Urban & Fischer Verlag, München, 2000.

- [281] J. Bortz (Hrsg.). Verfahren zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen, S. 128-165. In *Statistik für Sozialwissenschaftler. 4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York*, 1993.
- [282] S.O. Suzuki, R. Kitai, J. Llana, S.C. Lee, J.E. Goldman, B. Shafit-Zagardo. MAP-2e, a novel MAP-2 isoform, is expressed in gliomas and delineates tumor architecture and patterns of infiltration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61:403–412, 2002.
- [283] L. Berger, R. Luc, D. Richard. L' esthesioneuroepitheliome olfactif. *Bull Assoc Fr Etude Cancer*, 13:410–421, 1924.
- [284] M. Koch, J. Constantinidis, A. Dimmler, C. Strauss, H. Iro. Long-term experiences in the therapy of esthesioneuroblastoma. *Laryngorhinootologie*, 85:723–730, 2006.
- [285] K. Nakao, K. Watanabe, Y. Fujishiro, Y. Ebihara, T. Asakage, A. Goto, N. Kawahara. Olfactory neuroblastoma: long-term clinical outcome at a single institute between 1979 and 2003. *Acta Otolaryngol*, 127:113–117, 2007.
- [286] S.B. Wharton, K.K. Chan, I.R. Whittle. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is expressed in low and high grade diffuse astrocytomas. *J Clin Neurosci*, 9:165–169, 2002.
- [287] F. Kayaselcuk, S. Zorludemir, D. Gümürdühü, H. Zeren, T. Erman. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol*, 57:115–121, 2002.
- [288] B.J. Fisher, E. Naumova, C.C. Leighton, G.N. Naumov, N. Kerklviet, D. Fortin, D.R. Macdonald, J.G. Cairncross, G.S. Bauman, L. Stitt. Ki-67: a prognostic factor for low-grade glioma? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 52:996–1001, 2002.
- [289] M. Preusser, H. Heinzl, E. Gelpi, R. Höftberger, I. Fischer, I. Pipp, I. Milenkovic, A. Wöhrer, F. Popovici, S. Wolfsberger, J.A. Hainfellner. Ki-67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. *Histopathology*, 53:39–47, 2008.
- [290] S.I. Moskowitz, T. Jin, R.A. Prayson. Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas. *J Neurooncol*, 76:193–200, 2006.

- [291] R.T. Meurer, D.T. Martins, A. Hilbig, M. de C. Ribeiro, A.V. Roehe, L.M. Barbosa-Coutinho, M. da C. Fernandes. Immunohistochemical expression of markers Ki-67, NeuN, synaptophysin, p53 and HER in medulloblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Arq Neuropsiquiatr*, 66:385–390, 2008.
- [292] G. Nagashima, M. Aoyagi, M. Yamamoto, S. Yamamoto, H. Wakimoto, K. Ohno, K. Yamamoto, K. Hirakawa. P53 overexpression and proliferative potential in malignant meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 141:53–61, 1999.
- [293] R.T. Woodburn, B. Azzarelli, J.F. Montebello, I.E. Goss. Intense p53 staining is a valuable prognostic indicator for poor prognosis in medulloblastoma/central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *J Neuro-Oncol*, 52:57–62, 2001.
- [294] A.P. Kyritsis, M.L. Bondy, K.R. Hess, J.E. Cunningham, D. Zhu, C.J. Amos, W.K. Yung, V.A. Levin, J.M. Bruner. Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma. *Clin Cancer Res*, 1:1617–1622, 1995.
- [295] M.I. Walton, D. Whysong, P.M. O'Connor, D. Hockenbery, S.J. Korsmeyer, K.W. Kohn. Constitutive expression of human bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res*, 53:1853–1861, 1993.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Wolfgang Schmahl aus dem Institut für Tierpathologie der Tiermedizinischen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München und Herrn Wolf von Bomhard aus der Fachpraxis für Tierpathologie, Dres. von Bomhard und Pflegehaar in München für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie für inhaltliche Anregungen, konstruktive Kritik und aufbauende Worte.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Dirk Janik für die Ermöglichung der Arbeit, seine fachliche Beratung, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und konstruktive Kritik.

Ein großes Dankeschön gilt allen Beschäftigten des Lehrstuhls, insbesondere Frau Karin Stingl und Frau Györgyi Farkas. Alle Beteiligten haben mich sehr freundlich aufgenommen und standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Es mangelte nie an guten Ideen und wertvoller Kritik.

Auch möchte ich an dieser Stelle der Belegschaft der Fachpraxis für Tierpathologie, Dres. v. Bomhard und Pflegehaar, München danken. Mein spezieller Dank geht hier an Frau Elisabeth Leibold, die gute Seele im Labor, für ihre wertvolle Hilfe. Ihre fröhliche und freundliche Art hat mich oft aufgebaut.

Frau Monia Mahling vom Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität danke ich für die geduldige statistische Auswertung der Daten.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Chris van der Meiden und Frau Julia Loibl von der Rechnerbetriebsgruppe der Tierärztlichen Fakultät sowie Herrn Holger Emrich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit mit dem Programm LaTeX, ein noch recht selten verwendetes System zum Setzen von Texten, welches das Schreiben, gerade von umfangreichen Arbeiten, erheblich vereinfacht. Sie halfen mir in der doch recht aufwendigen Einarbeitungsphase

und erleichterten mir mit vielen hilfreichen Ratschlägen wesentlich den Umgang.

Für die wiederholte, geduldige Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit, sowie für die menschliche Betreuung und Beratung in allen Belangen möchte ich Frau Daniela Emrich, Frau Sophie Bader und Frau Elisabeth Korsmeier danken.

Der größte Dank gebührt meiner Familie und besonders meinem Freund Herrn Rudolf Stadler, die immer zu mir halten und so eine Basis schaffen, mit der fast alles möglich ist.