

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe- Universität
Frankfurt am Main

Neurologisches Institut (Edinger-Institut)

**Zur Charakterisierung von nekrotischem und apoptotischem Zelltod bei
Tumoren des zentralen Nervensystems**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Wera Behrhof
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referentin: Frau PD Dr. D.S. Tews

Korreferent: Prof. Dr. J. Stehle

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2005

Meinen Eltern

0 Inhaltsverzeichnis

1 Einführung in das Thema	1
1.1 Zelltodforschung: ein historisches Resümee	1
1.2 Formen und Wege des Zelltodes	3
1.2.1 Nekrose	3
1.2.2 Apoptose	4
1.2.3 Zwischenformen	9
1.3 Die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems	11
1.4 Ausgewählte Tumore des zentralen Nervensystems	12
1.4.1 Glioblastome	13
1.4.2 Oligodendrogliome	13
1.4.3 Ependymome	14
1.4.4 Medulloblastome/ PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore)	15
1.4.5 Meningiome	16
2 Problemstellung	18
3 Materialien und Methoden	20
3.1 Patienten	20
3.2 Gewebegewinnung, -fixation und –bearbeitung	21
3.3 Antikörper	22
3.3.1 Primärantikörper	22
3.3.1.1 Faktoren des TNF-vermittelten Zelltodweges	22
3.3.1.2 Apoptose-assoziierte mitochondriale Faktoren	23
3.3.1.3 Caspasen	24
3.3.2 Sekundärantikörper	26
3.4 Reagenzien	27
3.5 Präparationsverfahren	30
3.5.1 ABC- (Avidin-Biotin-Complex) Methode	30
3.5.2 TUNEL- (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) Methode	33
3.6 Auswertung	35

3.6.1	Quantitative Analyse	35
3.6.2	Qualitative Analyse	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Normalfälle	37
4.2	Untersuchung der einzelnen Tumore	37
4.2.1	Glioblastome (WHO-IV)	37
4.2.1.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	38
4.2.1.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	39
4.2.2	Oligodendrogliome (WHO-III)	48
4.2.2.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	48
4.2.2.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	49
4.2.3	Ependymome (WHO-III)	56
4.2.3.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	56
4.2.3.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	57
4.2.4	Medulloblastome (WHO-IV)	63
4.2.4.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	63
4.2.4.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	64
4.2.5	PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore; WHO-IV)	70
4.2.5.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	70
4.2.5.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	71
4.2.6	Meningiome	75
4.2.6.1	Atypische Meningiome (WHO-II)	75
4.2.6.1.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	76
4.2.6.1.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	76
4.2.6.2	Anaplastische Meningiome (WHO-III)	81
4.2.6.2.1	<i>TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation</i>	82
4.2.6.2.2	<i>Apoptose-assoziierte Faktoren</i>	82
5	Diskussion	88
5.1	Glioblastome (WHO-IV)	88
5.1.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	88

5.1.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	90
5.1.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	90
5.1.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	93
5.1.2.3	Caspasen	95
5.2	Oligodendrogliome (WHO-III)	99
5.2.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	99
5.2.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	99
5.2.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	100
5.2.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	100
5.2.2.3	Caspasen	101
5.3	Ependymome (WHO-III)	102
5.3.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	102
5.3.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	103
5.3.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	103
5.3.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	104
5.3.2.3	Caspasen	104
5.4	Medulloblastome (WHO-IV)	105
5.4.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	105
5.4.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	105
5.4.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	105
5.4.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	106
5.4.2.3	Caspasen	107
5.5	PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore; WHO-IV)	108
5.5.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	108
5.5.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	109
5.5.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	109
5.5.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	110
5.5.2.3	Caspasen	111
5.6	Meningiome	112
5.6.1	Atypische Meningiome (WHO-II)	112
5.6.1.1	Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	112
5.6.1.2	Apoptose-assoziierte Faktoren	113
5.6.1.2.1	TNF α / TNF-R1/ TRAIL	113
5.6.1.2.2	SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	114

5.6.1.2.3 Caspasen	114
5.6.2 Anaplastische Meningiome (WHO-III)	115
5.6.2.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation	115
5.6.2.2 Apoptose-assoziierte Faktoren	116
5.6.2.2.1 TNF α / TNF-R1/ TRAIL	116
5.6.2.2.2 SMAC/ APAF-1/ Caspase-9	116
5.6.2.2.3 Caspasen	117
6 Zusammenfassung	118
6 Summary	120
7 Anhang	122
7.1 Tabellen	122
7.2 Diagramme	148
7.3 Abbildungen	163
8 Literaturverzeichnis	173
9 Erklärung, Lebenslauf, Publikationen	196

1 Einführung in das Thema

1.1 Zelltodforschung: ein historisches Resümee

Die Ergründung der komplexen Prozesse, die den Untergang von Zellen zur Folge haben, stellt heute ein wichtiges Tätigkeitsfeld moderner zellbiologischer Forschung dar. Insbesondere stehen die Vorgänge der Apoptose im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Die Wurzeln aller derzeit erzielten Erkenntnisse liegen in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Virchow beschrieb 1858 den Zustand der Gangrän. Er verwendete zu diesem Zweck Begriffe wie „Degeneration“, „Nekrose“ oder „Erweichung“. Weigert und Cohnheim führten zur Beschreibung fibrinöser Nekrosen des respiratorischen Epithels bei Diphtherie den Begriff der „Koagulationsnekrose“ ein (Weigert 1877/ Weigert 1885/ Cohnheim 1889). Nach heutigem Verständnis wird dieser Terminus jedoch im Zusammenhang mit ischämischen Infarkten benutzt.

1885 diskutierte Flemming, der auch die Begriffe „Chromatin“ und „Mitose“ prägte, den spontanen Zelltod als physiologisches Ereignis. Zu dieser Zeit war es bereits möglich, anhand histologischer Färbungen Gewebeschnitte lichtmikroskopisch zu analysieren. Flemming untersuchte regressive Ovarialfollikel bei Säugetieren und konnte in den Zellen des Follikelepithels Kernveränderungen nachweisen, wie sie heute mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden (z.B. Kernpyknose). Da diese Prozesse in einem Verschwinden des aufgebrochenen Zellkernes resultierten, nannte er den Vorgang „Chromatolyse“.

Gräper stellte 1914 den Vorgang der Chromatolyse der Mitose zur Aufrechterhaltung der Homöostase gegenüber. Es postulierte, dass vor allem in Epithelien Zellen physiologisch eliminiert werden müssten und dass diese Aufgabe der Chromatolyse zukäme. Auch beschrieb er die Aufnahme von Zelltrümmern durch Nachbarzellen. Heute wird der Begriff der Chromatolyse für das Verschwinden der Nissl-Schollen bei Nervenzellschädigung verwendet.

Der Embryologe Glücksmann wandte 1951 Gräpers Konzept auf den physiologischen Zelltod in embryonalem Gewebe an. Dass für die Durchführung bestimmter Zelltodprogramme eine Proteinneusynthese nötig ist, wurde 1966 von Tata gezeigt. Er stellte den Zelltod nicht mehr nur als passiven Sterbeprozess dar, sondern als einen aktiven Vorgang.

1971 gelang es Kerr durch Ligatur eines Portalvenenastes die Atrophie einer Rattenleber herbeizuführen. Das einheitliche Muster der Vorgänge in den absterbenden Zellen nannte er „shrinkage necrosis“. Ein Jahr später wurde der Begriff im Rahmen einer Publikation unter

Zusammenarbeit mit Wyllie und Currie in „Apoptose“ geändert (Kerr et al. 1972). Die Namensänderung wurde wie folgt begründet: „The name shrinkage necrosis was originally used for it on morphological grounds, but when its widespread incidence and its kinetic significance in health and disease were recognized by us, we proposed the name apoptosis“ (Wyllie et al. 1980). Das Wort Apoptose stammt aus dem Altgriechischen ($\alpha\pi\omicron$ = ab, weg, los; $\pi\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$ = Fall, Senkung) und beschreibt den Zelltod metaphorisch als das Herabfallen welcher Blätter eines Baumes. Elektrophoretische Untersuchungen des Chromatins von Zellen bestrahlten Gewebes zeigten, dass das Chromatin in Form eines charakteristischen „Leitermusters“ in Fragmente zerfällt, die ein Vielfaches von Nukleosomenkomplexen darstellen (Zhivotovsky et al. 1981). 1984 verknüpfte Wyllie in weiteren Arbeiten dieses Ergebnis mit den bekannten Morphologika apoptotischer Zellen. Die ersten Gene, die an der Regulation des programmierten, physiologischen Zelltodes beteiligt sind, wurden 1986 von Ellis und Horvitz in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (im weiteren Verlauf der Arbeit: *C. elegans*) entdeckt. 1991 grenzten Ellis et al. die Apoptose als Zelltodform anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen von der Nekrose ab.

Etwa zur selben Zeit wurde in Studien zum Thema Entzündung das interleukin-1 β converting enzyme (ICE) entdeckt, das heute „Caspase-1“ genannt wird (Cerretti et al. 1992/ Thornberry et al. 1992). Die Verknüpfung zwischen Apoptose und Caspase gelang erstmals 1993, als Yuan et al. einen Zusammenhang zwischen Caspase-1 und dem „Todesgen“ *ced-3* in *C. elegans* herstellen konnten. Die komplexen, streng programmatisch ablaufenden Prozesse der Apoptose konnten hier erstmalig mit einer Gruppe von Proteasen, insbesondere der Caspasen, in Verbindung gebracht werden (Thornberry 1999). Die Entdeckung dieser Enzyme war der Startschuss für ein explosionsartig zunehmendes Interesse an der Entschlüsselung der Mechanismen des Zelltodes. Während der nächsten zehn Jahre wurden unzählige weitere Faktoren entdeckt, die mit den Vorgängen des Zellunterganges assoziiert sind. Auch konnten bisher verschiedene Arten des Zelltodes voneinander abgegrenzt werden (s. Kapitel 1.2.1-1.2.3). Dennoch bleibt der detaillierte Ablauf der Zelltodvorgänge weiterhin ungeklärt. Insbesondere gibt die Art und Weise der Initiierung der verschiedenen Arten des Zellunterganges weiterhin ungelöste Rätsel auf.

1.2 Formen und Wege des Zelltodes

1.2.1 Nekrose

Im Allgemeinen wird der Begriff Nekrose für bestimmte Formen des nicht-programmierten, „passiven“ Zelltodes gebraucht (Haecker 1997), bei dem die sterbende Zelle sich nicht „aktiv“, etwa durch de novo Synthese von Proteinen, an ihrem eigenen Sterbeprozess beteiligt. Genau genommen bedeutet das Wort Nekrose jedoch zunächst nur „Zelltod“ und impliziert alle Formen des programmierten sowie des nicht-programmierten Zelltodes (Levin 1999/ Aigner 2002). Majno und Joris sehen die Nekrose nicht als eigenständige Form des Zellunterganges, sondern als gemeinsame Endstrecke verschiedener Zelltodwege inklusive Apoptose und Onkose an. Sie stellen der Apoptose den Begriff des „accidental cell death“ (wörtlich: zufälliger Zelltod) gegenüber. Eine eigenständige Sonderform des „accidental cell death“ sei der ischämische Zelltod (s. auch Kapitel 1.2.3), für den der Begriff „Onkose“ vorgeschlagen wird. Diese führt zu karyolytischer Nekrose, während es bei der Apoptose zu Nekrose mit Karyorhexis und Zellschrumpfung kommt (Majno und Joris 1995). Aigner stellt die Nekrose als Überbegriff für „nicht-programmierten Zelltod“ der Apoptose als „programmierten Zelltod“ gegenüber (Aigner 2002). Andere Autoren postulieren, dass Nekrose in vivo immer dann eintritt, wenn die Zelle – z.B. durch ATP-Verlust – daran gehindert wird, ihr Apoptosesystem zu aktivieren (Vaux und Strasser 1996).

Von vielen Autoren wird die Ansicht vertreten, Nekrose münde in einer Entzündungsreaktion, Apoptose hingegen nicht (Fiers et al. 1999/ Lueschen 2000/ Zech 2000).

Morphologisch imponiert die Nekrose initial durch ein hydropisches Anschwellen der Zelle durch Veränderungen der Plasmamembranintegrität infolge eines gestörten Ionenhaushaltes mit konsekutivem Flüssigkeitseinstrom in die Zelle und in die Zellorganellen (swelling). Dadurch lässt die Stoffwechselaktivität der Zelle – insbesondere die ATP-Produktion in den Mitochondrien – nach. Durch den resultierenden Bindungsverlust zwischen Zellmembran und dem darunter gelegenen Zytoskelett kommt es zur Ausbildung von Blasen, sog. blebs, die sich in den Extrazellulärraum ausstülpfen (blebbing). Der Prozess mündet im Platzen der Zelle. Der Zelldetritus entleert sich in den Interzellularraum und dient als Stimulus zur Chemotaxis phagozytischer Zellen. In elektrophoretischen Untersuchungen lässt sich die unsystematisch fragmentierte DNA als sog. „smear“ darstellen (Ferrer et al. 1995/ Lieberthal et al. 1996/ Yuan et al. 1999). Dieser Prozess ist etwa zwölf bis 24 Stunden nach dem Einwirken des Nekrose-hervorrufenden Agens in vollem Gang (Majno und Joris 1995).

So unsicher und problematisch die Etablierung der Nekrose als eigenständige Form des Zelltodes ist, so kritisch ist die Definition Nekrose-induzierender Stimuli. Es existieren viele Hinweise darauf, dass die Art des Zelltodweges von der Dosis des auslösenden Agens abhängig ist (Majno und Joris 1995/ Lieberthal et al. 1996/ Szekessy 2000). So führt beispielsweise die einstündige Erwärmung einer Zellkultur auf 43°C zur Apoptose, während der gleiche Vorgang bei 45°C zur Nekrose führt. Ähnliches gilt für Zelltod durch Cisplatin oder Wasserstoffperoxid. Andere Stimuli, wie Topoisomeraseinhibitoren oder Calciumionophore können in Apoptose oder Nekrose resultieren, wobei hier die entscheidenden Faktoren bisher nicht klar definiert werden konnten (Szekessy 2000).

Seit Jahrhunderten findet der Begriff „Nekrose“ Verwendung im Sprachgebrauch von Medizinern und anderen Naturwissenschaftlern. Dabei sind seine Definition und insbesondere die eindeutige Abgrenzung des nekrotischen Zelltodes gegenüber anderen Formen des Zellunterganges bis heute nicht gelungen. Wie oben gezeigt, wurden viele Modelle und Ansätze postuliert, die jedoch alle nicht konsequent und widerspruchsfrei nachvollzogen werden können. Diese Arbeit definiert den Begriff Nekrose aus praktischen Gründen als unphysiologischen Zelltodmechanismus, der „nicht-apoptotisch“ ist.

1.2.2 Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ beschreibt metaphorisch das Herabfallen welcher Blätter von einem Baum (s. Kapitel 1.1). Die Apoptose wird seit etwa 30 Jahren als solche beschrieben und seitdem als eigenständige Form des Zelltodes postuliert (Kerr et al. 1972). Sie wird als ein physiologischer Prozess angesehen, der z.B. in der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Körper, wie etwa bei der Involution von Ovarialfollikeln, eine Rolle spielt (Pfeffer und Schröder 1995/ Robles et al. 1999). In diesem Zusammenhang wird sie zum einen als Gegengewicht zur Mitose betrachtet (Gräper 1914/ Majno und Joris 1995). Zum anderen wird sie der Nekrose gegenübergestellt, die meist als eine unphysiologische Zelltodart definiert ist (Allan et al. 1988/ Pfeffer und Schröder 1995/ Martin 1997). Weiterhin existieren verschiedene Ansichten darüber, ob der Begriff „Apoptose“ als Synonym für den Begriff des „programmierten Zelltodes“ angesehen werden kann. In den meisten Arbeiten wird nicht zwischen diesen beiden Begriffen unterschieden; sie werden synonym gebraucht (Robles et al. 1999/ Hahn et al. 1999/ Grütter 2000). Andere Autoren setzen Apoptose nicht mit programmiertem Zelltod gleich (Schwartz et al. 1993/ Hockenbery 1995/ Majno und Joris 1995). Sie definieren zunächst programmierten Zelltod als physiologische Form des

Zellunterganges, wie er etwa im Rahmen der Embryonalentwicklung auftritt. Die Apoptose sei eine – anhand morphologischer Kriterien definierbare – Art, wie dieser programmierte Zelltod ablaufen könnte. Es werden jedoch auch Beispiele angeführt, in denen andere Zelltodmechanismen am Zelluntergang im Rahmen eines programmierten, also vom gesunden Organismus initiierten Zelltodes beteiligt sind. So sind etwa bei der Metamorphose bestimmter Insekten in den beteiligten Zellen keine Apoptose-charakteristischen Merkmale (s. unten) zu sehen. Auch scheint der Untergang unreifer T-Zellen im Mausthymus über einen anderen Zelltodweg vermittelt zu sein. Es kommt hier nicht zu einer Anhebung der Expressionsrate des Polyubiquitin-Gens. Ubiquitin wird jedoch für die de novo Proteinsynthese, wie sie im Rahmen der Apoptose stattfindet, benötigt. Auch für den Prozess der Spermatogenese und den massiven Zelltod von Neuronen während der embryonalen Entwicklung existieren Hinweise darauf, dass der programmierte Zelltod hier nicht über Apoptose geregelt wird. Die morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen konnten hier nicht immer beobachtet werden (Allan et al. 1987/ Server und Mobley 1991).

Neben der genetischen Determination sind viele Stimuli bekannt, die Apoptose auslösen können. Zu ihnen gehören Viren, physikalische (ionisierende Strahlung, Hyperthermie), toxische (Azide, Wasserstoffperoxid), zelluläre (Zytokine wie TNF/ Tumor Nekrose Faktor, TGF β / Transforming Growth Factor β) oder immunologische (zytotoxische T-Lymphozyten) Faktoren. Zu beachten ist jedoch, dass einige dieser Stimuli dosisabhängig auch andere Zelltodwege triggern können (Majno und Joris 1995/ Lieberthal et al. 1996/ Szekessy 2000). Außerdem können verschiedene Zelltodformen ineinander übergehen (s. Kapitel 1.2.3). Auch gibt es Stimuli, die sowohl Apoptose als auch Nekrose induzieren können, so z.B. der Tumor Nekrose Faktor oder Topoisomerase-Inhibitoren (Laster et al. 1988/ Matsubara et al. 1994). Ob diese heterogenen Stimuli dasselbe oder verschiedene Exekutionssysteme aktivieren, ist nicht restlos geklärt. Es scheint jedoch eine Art Kontrollpunkt zu existieren, den alle Apoptosesignale passieren müssen. Hierfür spricht die Tatsache, dass das zelluläre Protein bcl-2 in der Lage ist, alle Formen der Apoptose – bis auf wenige Ausnahmen – zu verhindern oder zu verlangsamen (Reed 1996). Was in der Zelle zwischen dem Einwirken eines Apoptose-triggernden Stimulus und der Ausbildung charakteristischer Morphologika geschieht, ist bisher nur bruchstückhaft bekannt. Deshalb gibt die Frage, wann Apoptose beginnt, weiterhin Rätsel auf. Meist wird ein Intervall von zwölf bis 24 Stunden nach einem initialen Trigger postuliert. Der „point of no return“, ab dem der Zelluntergang irreversibel geworden ist, scheint jedoch bereits viel früher angesiedelt zu sein (Ferrer et al. 1995/ Yuan et

al. 1999/ Szekessy 2000). Da der genaue molekularbiologische Ablauf des Zelltodes noch nicht vollständig geklärt ist, kann ein exakter Zeitpunkt für diesen „point of no return“ nicht angegeben werden. Experimentell wurde ermittelt, dass er zwischen unterschiedlichen Zelltypen variieren kann. Er scheint jedoch zeitlich vor der Aktivierung sog. Effektor-Caspasen (s. unten) gelegen zu sein (Green and Amarante-Mendes 1998/ Link and Harrison 2001).

Genauer beschrieben sind die morphologischen Veränderungen, die licht- und elektronenmikroskopisch im Rahmen der Apoptose charakteristischerweise zu beobachten sind. Diese Morphologika sind in den unterschiedlichen Zelltypen und verschiedenen Spezies vergleichbar, was als stichhaltiger Beweis dafür angesehen wird, dass der Prozess „Apoptose“ per se überhaupt existiert (Kerr et al. 1972/ Robertson and Thomson 1982/ Abrams et al. 1993).

Zunächst beginnt die apoptotische Zelle zu schrumpfen. Die gesamte Zellstruktur erscheint optisch dichter, was möglicherweise auf einer Akkumulation denaturierter Proteine beruht (Szekessy 2000). Auch scheint ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel von Bedeutung zu sein. Darauf kommt es zu einer Kondensation des Chromatins. Das pyknotische Chromatin bewegt sich in Richtung der Zellkernmembran (sog. Margination des Chromatins). Diese periphere Verteilung des Chromatins innerhalb des Zellkernes wurde bereits frühzeitig und unter Verwendung verschiedener Adverbien (halbmond-, sichel-, hufeisen-, schiffchenförmig) beschrieben. In einigen Fällen kommt es zur Karyorhexis, dem Zerfall des Zellkernes. Zu beachten ist, dass die DNA bei der Apoptose zwischen den Nukleosomen in Fragmente zerlegt wird, die ein Vielfaches von 185 Basenpaaren darstellen. Dies führt bei der Gelelektrophorese zu einem sog. Leitermuster (Ferrer et al. 1995/ Lieberthal et al. 1996/ Yuan et al. 1999). Im weiteren Verlauf bildet die Zelle Fortsätze aus, die Kernfragmente oder Zellorganellen enthalten. Dieser Vorgang wird als „budding-Phänomen“ dem „blebbing“ der Nekrose gegenüber gestellt. Wichtig ist hier, dass bei der Apoptose die strukturelle Integrität der Zellmembran sowie sämtlicher Zellorganellen erhalten bleibt, während sich bei der Nekrose die Zellmembran vom darunter liegenden Zytoskelett ablöst und auch die Zellorganellen durch Flüssigkeitseinstrom geschädigt werden. Die Fortsätze können sich von der Zelle abtrennen und imponieren dann als sog. „apoptotic bodies“. Diese können entweder im Interzellulärraum verbleiben oder phagozytiert werden. Letzteres kann durch Makrophagen oder benachbarte Zellen geschehen. Die Phagozytose der apoptotic bodies wird vermutlich durch eine Modulation der Zellmembran vermittelt. Es kommt hierbei zu einer

Verlagerung des Lipides Phosphatidyserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran (Fadok et al. 1992/ Martin et al. 1995). Während des apoptotischen Prozesses gelangen keine Zellbestandteile in den Interzellulärraum. Deshalb wird durch die Apoptose keine Entzündungsreaktion ausgelöst, eine Chemotaxis neutrophiler Granulozyten oder Lymphozyten etwa durch lysosomale Zellbestandteile bleibt aus.

Auf molekularbiologischer Ebene konnten die komplexen Vorgänge in der apoptotischen Zelle bisher nicht restlos aufgeklärt werden. Ein erster Durchbruch gelang durch entwicklungsbiologische Untersuchungen bei *C. elegans*. Durch Mutationsanalysen konnten Gene für den programmierten Zelltod bestimmter somatischer Zellen identifiziert werden (Ellis und Horvitz 1986). Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um drei Gene, *ced-3*, *ced-4* und *ced-9*. Die Abkürzung „ced“ steht für „cell death defective“. Die Relevanz dieser Gene besteht in ihrer teilweise vollständigen Homologie zu den entsprechenden Proteinen bei Säugetieren. *Ced-9* hat eine anti-apoptotische Wirkung und entspricht zum Teil dem Zellprotein *bcl-2*, das bei Säugetieren die Apoptose verhindern kann. *Ced-3* und *ced-4* sind pro-apoptotisch. Bei dem Homolog von *ced-4* handelt es sich um APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1), der bei der Bildung des Apoptosoms (s. unten) eine Rolle spielt. Das Genprodukt von *ced-3* ist weitgehend homolog zum interleukin-1 β converting enzyme (ICE), bei dem es sich um ein Mitglied der Familie der Cysteinproteasen handelt. Es wird deshalb auch als Caspase-1 bezeichnet (Nicholson et al. 1995/ Alnemri et al. 1997). Bisher wurden 13 weitere Caspasen (cysteine-containing aspartic acid proteases) entdeckt (Pistritto et al. 2002). Dass Caspasen eine wichtige Rolle für den programmierten Zelltod spielen, wird von vielen Autoren beschrieben und gilt heute als unumstritten (Chinnaiyan und Dixit 1996/ Enari et al. 1996/ Greidinger et al. 1996/ Whyte 1996). Sie alle enthalten Histidin-aktiviertes Cystein in ihrem aktiven Zentrum. Weiterhin zeichnen sie sich durch eine hohe Substratspezifität aus. Sie spalten ihre Zielproteine zwischen einem N-terminalen Asparaginsäurerest und einer C-terminalen hydrophoben Aminosäure (Thornberry und Molineaux 1995). Caspasen liegen im Zytosol als inaktive Proform vor und werden durch verschiedene Stimuli proteolytisch aktiviert. Dabei wird aus dem Vorläufermolekül ein größeres (20 kDa/ p20) und ein kleineres (10 kDa/ p10) Peptid herausgeschnitten. Je zwei p10 und p20 Moleküle bilden ein Tetramer mit zwei aktiven Zentren, das für die Enzymaktivität erforderlich ist. Strukturell unterscheiden sich die Caspasen unter anderem in der Länge ihrer Prodomänen. Effektor-Caspasen, wie z.B. Caspase-3, -6 und -7, besitzen kurze Prodomänen und eine hohe enzymatische Aktivität (Thornberry und Lazebnik 1998). Caspasen mit langen Prodomänen

werden oft zu Beginn der Apoptose aktiviert und daher als Initiator-Caspasen bezeichnet, so z.B. Caspase-2, -8 und -9 (Blanchard et al. 1999/ Watt 1999). Sie haben ein großes Potential zur Autoaktivierung. Diese kann durch verschiedene Signalkomplexe der Zelle in Gang gebracht werden. Hierbei unterscheiden manche Autoren zwischen extrinsischer/ Typ I-Apoptose und intrinsischer/ Typ II-Apoptose (Gruetter 2000/ Scaffidi 1998). Für beide Modi, die sich zum Teil auch überschneiden, soll hier exemplarisch ein Aktivierungsweg dargestellt werden:

Bei der extrinsischen Form der Apoptose binden spezifische Liganden an Rezeptoren der Zelloberfläche. So aktiviert z.B. der Fas-Ligand seinen Rezeptor (Fas, Apo-1 oder CD 95 genannt) durch extrazelluläre Bindung, was zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Rezeptoranteile führt. Durch die Oligomerisierung dieser Rezeptoranteile wird die Bindung von FADD (Fas-associated death domain) und Pro-Caspase-8 an den Fas-Rezeptor ermöglicht. Sie bilden gemeinsam den DISC (death inducing signaling complex), woraus die Aktivierung von Caspase-8 resultiert. Die aktivierte Caspase-8 löst eine Caspase-Kaskade aus, indem sie die Effektor-Caspase-3 aktiviert, die wiederum weitere Effektor-Caspasen, z.B. Caspase-6 und -7, prozessiert (Srinivasula et al. 1996). Hierdurch wird unter anderem Caspase-8 aktiviert, wodurch ein signalverstärkender Rückkoppelungskreislauf eingeleitet wird. Neben dem Fas-Rezeptor existieren weitere membranständige Todesrezeptoren, z.B. Mitglieder aus der Familie der TNF-Rezeptoren (Dempsey et al. 2003). Die intrinsische Form der Apoptose impliziert prinzipiell den extrinsischen Weg. Auch hier kommt es durch Oligomerisierung von Rezeptorbestandteilen zu einer Aktivierung von Caspase-8. Diese Aktivierung führt zu einer Fragmentierung verschiedener pro-apoptotischer Faktoren, wie etwa Bid und Bax (Mitglieder der bcl-2-Familie). Das carboxyterminale Spaltprodukt von Bid vermittelt nach seiner Translokation zu den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren Mitochondrienmembran in das Zytoplasma (Jacobson 1997/ Li et al. 1998/ Luo et al. 1998). Cytochrom c bindet nun im Komplex mit dATP an APAF-1, wodurch es zu einer Bindung von Pro-Caspase-9 kommt. Die Pro-Caspase-9 wird durch eine allosterische Konformationsänderung gespalten und aktiviert. Der Komplex aus Cytochrom c gemeinsam mit APAF-1, ATP (oder dATP) und der Caspase-9 wird Apoptosom genannt (von einigen Autoren wird verkürzend auch der Begriff „Aposom“ gebraucht). Die aktivierte Caspase-9 fungiert nun als Initiator-Caspase und prozessiert die Effektor-Caspase-3. Weiterhin werden die Effektor-Caspasen-6 und -7 aktiviert. Eine Signalverstärkung durch positive Rückkoppelungsmechanismen erfolgt bei diesem Apoptoseweg durch Caspase-7-vermittelte Prozessierung von Caspase-9, die wiederum in

einer Aktivierung von Caspase-8 resultiert (Wilson 1998/ Grütter 2000/ Zech 2000/ Gottlieb 2001). Der intrinsische Apoptoseweg kann auch unabhängig von Membranrezeptoren direkt vermittelt sein. Dies ist z.B. bei der Behandlung mit bestimmten Chemotherapeutika möglich (Los et al. 1999).

Wie auch immer die Caspase-Kaskade induziert sein mag, als Resultat findet sich stets eine Aktivierung weiterer Proteasen, die über eine Spaltung von Strukturproteinen zu einer Degradation der Zellbestandteile führt. Hierzu gehören z.B. nukleäre Lamine, Aktin oder Fodrin (Martin und Green 1995) oder das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase) (Oliver et al. 1999).

Zusammenhänge zwischen defekten apoptotischen Prozessen und den unterschiedlichsten Krankheiten werden von vielen Autoren beschrieben. So existieren z.B. Hinweise darauf, dass neurodegenerative Erkrankungen, wie etwa der Morbus Alzheimer, mit einer gesteigerten Apoptoserate in Zusammenhang stehen (Johnson 1994/ Yaar 1997/ Villa und Przedborski 2003). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass ein „Zuviel“ an Apoptose Gewebeschäden und sogar den Tod des Individuums herbeiführen kann. So starben Mäuse, deren Fas-System durch Injektion von rekombinantem FasL aktiviert wurde, binnen kurzer Zeit an Leberversagen (Ogasawara et al. 1993/ Nagata 1997/ Tanaka et al. 1997).

Eine Unterfunktion des apoptotischen Systems wiederum kann mit dem Auftreten verschiedenener Tumore assoziiert sein (Allan et al. 1992/ Lowe und Lin 2000/ Renehan et al. 2001/ Coultas und Strasser 2003). Auch zwischen der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Defekten im Apoptosesystem scheint ein Zusammenhang zu existieren (O'Reilly und Strasser 1999/ Nakayama et al. 2002/ Mevorach 2003).

Die Möglichkeit, apoptotische Prozesse pharmakotherapeutisch zu beeinflussen ist derzeit Gegenstand vieler Studien (Schneider et al. 2000/ Wandering et al. 2003). Die komplexen Vorgänge der Apoptose, die im Rahmen dieser Arbeit nur sehr vereinfacht dargestellt werden konnten, müssen jedoch noch besser verstanden werden, bevor Zelltod-modulierende Substanzen klinisch therapeutisch eingesetzt werden können.

1.2.3 Zwischenformen

Wie bereits ausgeführt sind die Begriffe Apoptose und Nekrose nicht eindeutig definiert. Es existiert eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass es eine Reihe von Zwischenformen von

Zelltodprozessen gibt, die anhand morphologischer Kriterien nicht eindeutig der Apoptose oder der Nekrose zuzuordnen sind.

Um diese Prozesse trotzdem benennen und klassifizieren zu können, schlägt eine Reihe von Autoren die unterschiedlichsten Definitionen vor. An dieser Stelle soll versucht werden, einen Überblick über die geläufigsten Begriffe zu vermitteln.

Der Term „Onkose“ beschreibt eine Form des Zelltodes, die durch Anschwellen der sterbenden Zelle, „blebbing“ und eine erhöhte Zellmembranpermeabilität charakterisiert ist. Autoren, die diesen Begriff verwenden, stellen ihn der Apoptose gegenüber, die durch ein Schrumpfen der Zelle gekennzeichnet ist. Die Nekrose wird als gemeinsame Endstrecke von Apoptose und Onkose verstanden. Es handele sich bei der Nekrose um postmortale Vorgänge in der Zelle (Majno und Joris 1995/ Trump und Berezsky 1996/Levin et al. 1999/ Van Cruchten und Van Den Broeck 2002). Sterbende Zellen, die den morphologischen Kriterien der Onkose entsprechen, scheinen z.B. maßgeblich am ischämischen Zelltod, etwa im Rahmen einer kardialen Ischämie, beteiligt zu sein. Auch toxische Agentien, die einen Einfluß auf das ATP-System der Zelle haben, scheinen eine Rolle zu spielen (Majno und Joris 1995/ Trump et al. 1997/ Elsasser et al. 2001).

Der Begriff „Paraptose“ bezeichnet eine Form des Zelltodes, die morphologisch durch ein Anschwellen der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) imponiert. Es kommt im weiteren Verlauf zu einer Vakuolisierung des Zytoplasmas. Eine Fragmentierung der DNA ist nicht beteiligt. Welche Rolle die Paraptose für den menschlichen Organismus, insbesondere bei der Entstehung oder Verhütung von Krankheiten spielt, bleibt bisher ungeklärt (Aigner 2002/ Chen et al. 2002/ Jadus et al. 2003). Eine mögliche Beteiligung in einigen Fällen von neurodegenerativen Erkrankungen wird diskutiert (Dal Canto und Gurney 1994/ Sperandio 2000). Auch bei Caspase-defizienten Bakterienkulturen wurden morphologische Veränderungen beobachtet, wie sie der Paraptose zugeordnet werden (Wyllie und Goldstein 2001).

Apoptose und Nekrose scheinen ineinander übergehen zu können. So wird z.B. beschrieben, dass Stickstoffmonoxid in der Lage ist, apoptotische Zelltodprozesse in nekrotische umzuwandeln (Fiers et al. 1999/ Melino et al. 2000). Auch spielen Störungen der Mitochondrien eine Rolle. So führen Defekte von Cytochrom c- oder AIF- (apoptosis inducing factor) abhängigen Prozessen zu einer Umwandlung von Apoptose in Nekrose (Leist et al. 1997/ Mc Carthy et al. 1997/ Daugas et al. 2000/ Leist und Jäättelä 2001). In diesem Zusammenhang findet der Begriff der „programmierten Nekrose“ Anwendung. Dabei ist unter anderem der ATP-Gehalt der sterbenden Zelle von Bedeutung. Ist er zu niedrig, so kann

die Zelle nicht die nötige Energie aufbringen, um die geordneten Prozesse der Apoptose ablaufen zu lassen. Es existieren Hinweise darauf, dass die programmierte Nekrose Caspase-unabhängig abläuft (Vercammen et al. 1998/ Kitanaka und Kuchino 1999/ Mateo et al. 1999/ Holler et al. 2000). Es wird jedoch auch über eine Aktivierung von Caspase-8 und -1 berichtet (Leist et al. 1999/ Boise und Collins 2001). Morphologisch lässt sich die programmierte Nekrose von der Apoptose durch ein Fehlen der Chromatin-Kondensation abgrenzen.

Der Begriff „apoptoseartiger programmierter Zelltod“ subsumiert Formen einer Caspase-unabhängigen Zelltodform, die morphologisch bis auf eine geringer ausgeprägte Kondensation des Chromatins mit den Merkmalen der Apoptose übereinstimmt (Foghsgaard et al. 2001). Nicht alle Autoren verwenden jedoch diesen Begriff; sie sprechen von einer „Caspase-unabhängigen Form der Apoptose“ (Xiang et al. 1996/ Torriglia et al. 2000/ Volbracht et al. 2001).

Indem immer neue morphologische Merkmalsvarianten verschiedener Zelltodwege entdeckt werden, kommt es zu einer wahren Flut unterschiedlicher Definitionen der verschiedenen Merkmalskombinationen. Erst wenn die molekularbiologischen Prozesse des Zelltodes verstanden worden sind, besteht die Möglichkeit, ein schlüssiges und weniger verwirrendes System zu etablieren.

1.3 Die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems

Die Tumoren des zentralen Nervensystems sind durch eine enorme Bandbreite hinsichtlich ihrer Morphologie und Histologie charakterisiert. Diese Bandbreite resultiert aus der Komplexität des Organsystems, aus dem die Tumore entstehen. Es wurden viele Versuche unternommen, die Tumoren des zentralen Nervensystems zu klassifizieren. International durchgesetzt hat sich die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. 1979 wurde sie zum ersten Mal publiziert und seitdem mehrfach überarbeitet. Die aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems wurde 1999 in Lyon von der „WHO Working Group“, einer Expertengruppe aus 42 Neuropathologen, ausgearbeitet und 2000 publiziert (Kleihues und Cavenee 2000).

Die Tumore werden aufgrund ihrer Histogenese sortiert. So werden z.B. Tumore des neuroepithelialen Gewebes, der Hirn- und Rückenmarksnerven, der Meningen und Keimzelltumoren unterschieden. Weiterhin werden die Tumore in vier Malignitätsgrade eingeteilt (I=benigne bis IV=maligne), die eine Einschätzung des Wachstumsverhaltens und

der Prognose ermöglichen sollen. Die Entscheidung, in welchen Malignitätsgrad ein Tumor einzuteilen ist, wird unter anderem anhand histologischer Merkmale getroffen. Hierzu zählen Zelldichte, mitotische Aktivität, Gefäßproliferation, Zellpleomorphismus, Kern-Plasma-Relation, Kernatypien sowie das Vorhandensein von Nekrosen. Auch das Wachstumsverhalten (invasiv/ nicht invasiv; Bildung von Zellformationen, wie etwa Rosetten/ Pseudorosetten usw.) und immunhistochemische Protein-Expressionsmuster (Proliferationsmarker, GFAP, S-100, Vimentin uvm.) der Tumorzellen werden berücksichtigt. Hierbei ist stets zu beachten, dass nicht nur der histologische Malignitätsgrad die biologische Wertigkeit eines Hirntumors bestimmt. Auch die Lokalisation des Tumors, seine Ausdehnung, sowie das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten spielen eine entscheidende Rolle.

Die Merkmale, die zu einer Klassifikation der Tumore führen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, werden nun in den Kapiteln 1.4.1-1.4.5 genauer beschrieben.

1.4 Ausgewählte Tumore des zentralen Nervensystems

Es sollen die in dieser Arbeit untersuchten Tumore vorgestellt werden. Dabei werden epidemiologische, klinische, sowie makro- und mikroskopische Aspekte berücksichtigt.

1.4.1 Glioblastome

Das Glioblastom zählt zu den glialen Tumoren. Es ist also histogenetisch betrachtet ein Tumor des neuroepithelialen Gewebes.

Es gehört mit einem Anteil von 12-20% (Daten zur Häufigkeit von Hirntumoren schwanken selektionsbedingt) zu den häufigsten Tumoren des zentralen Nervensystems. Es macht 50-60% aller glialen Tumore aus. Bevorzugt tritt es in der fünften bis sechsten Lebensdekade auf (Pfeiffer et al. 2002). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (3:2). Glioblastome können sekundär aus WHO-II- und -III-Astrozytomen entstehen oder sich primär entwickeln.

Die Klinik ist – wie bei anderen intrakraniellen Neoplasien – geprägt durch Hirndruckzeichen und Herdsymptome. Zu den Hirndruckzeichen zählen z.B. Übelkeit mit morgendlichem Erbrechen, Kopfschmerzen, Visusstörungen, Stauungspapille oder ein psychoorganisches Syndrom. Die Herdsymptome orientieren sich an der Lokalisation des Tumors und können z.B. als Hemiparese, Aphasie, Ataxie, Krampfanfälle oder hormonale Störungen in Erscheinung treten.

Glioblastome haben auch bei suffizienter Behandlung (Tumorexstirpation und Bestrahlung) eine äußerst schlechte Prognose. Die 2-Jahres-Überlebensrate beträgt fünf bis zwölf Prozent. Das Glioblastom ist oft frontotemporal im Marklager lokalisiert und breitet sich dann über den Kortex und die Stammganglien schmetterlingsförmig über den Balken auf die andere Hemisphäre aus. Es wird aufgrund dieses charakteristischen Wachstumsverhaltens auch „Schmetterlingsgliom“ genannt. Begleitet wird dieser Prozess von einer z.T. massiven perifokalen Ödembildung. Die Schnittfläche des Tumors bietet ein sog. „buntes Bild“ mit grau-rötlichen soliden Tumoranteilen, gelblichen Nekrosezonen, Gallertzysten (verflüssigte Nekrosen) und Blutungen.

Histologisch imponiert das Glioblastom als zellreicher Tumor mit ausgeprägten Kern- und Zellpolymorphien. Kennzeichnend sind strichförmige Nekrosen, die von einem palisadenartigen Saum aus Tumorzellen umgeben sind. Neben einer hohen Mitoserate, die für ein schnelles Wachstum des Tumors spricht, finden sich ausgeprägte Gefäßproliferate, die glomerulumartig aufgeknäuel sein können. Das Vorhandensein dieser histologischen Merkmale mündet in einer WHO-IV-Gradifikation, wobei entweder die charakteristischen Gefäßproliferate oder die Nekrosen vorhanden sein müssen. Das Glioblastom ist somit ein hochmaligner Gehirntumor.

1.4.2 Oligodendrogliome

Oligodendrogliale Tumore können verschiedene Malignitätsgrade haben. So zählen zu den oligodendroglialen Tumoren nach WHO das Oligodendrogliom (WHO-II) und das anaplastische Oligodendrogliom (WHO-III), mit dem sich diese Arbeit beschäftigt. Der Anteil von Oligodendrogliomen an allen Hirntumoren beträgt etwa 10% (Bühling et al. 2000). Die Manifestationshäufigkeit ist in der vierten Dekade am größten. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (3:7) (Sandritter und Thomas 1983).

Klinisch treten typischerweise epileptische Anfälle als Erstsymptom auf. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist eher als langsam einzustufen. Die 5- bzw. 20-Jahres-Überlebensrate liegt bei 40-75% bzw. 15%. Bei Oligodendrogliomen konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen molekulargenetischen Veränderungen und der Prognose nachgewiesen werden. So kommt es zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auf den Chromosomen 19q und 1p. Bei anaplastischen Oligodendrogliomen finden sich darüber hinaus Veränderungen auf 9p und Chromosom 10.

Das anaplastische Oligodendrogliom ist bevorzugt in der Hirnrinde lokalisiert. Makroskopisch sind die Hirnwindungen aufgetrieben. Man sieht einen zystischen Zerfall, Nekrosen und Verfettungen. Die Schnittfläche ist demnach weich und zystisch, durch Verkalkungen der Tumorkapillaren erscheint sie oft auch körnig.

Histologisch imponieren die gleichförmig aussehenden Tumorzellen durch die sog. „Honigwabenstruktur“. Die monomorphen kleinen rundlichen Zellkerne liegen in einem optisch leeren Zytoplasma. Die Zellgrenzen sind, ähnlich wie bei Pflanzenzellen, deutlich zu sehen. Verkalkungen finden sich häufig, besonders in der Tumorrandszone. Das anaplastische Oligodendrogliom weist darüber hinaus verschiedene histologische Merkmale auf, die zu einer WHO-III-Gradifikation führen. Dazu gehören eine hohe Zelldichte, ausgeprägte Kernpolymorphie, eine erhöhte Mitoserate, Nekrosen und Gefäßproliferate, die glomerulumartige Figuren bilden können.

Die Korrelation zwischen Malignitätsgrad und Prognose ist geringer ausgeprägt als bei anderen Hirntumoren, wie z.B. Astrozytomen. Von Relevanz scheinen hier – neben den bereits erwähnten molekulargenetischen Merkmalen – Nekrosen und die Mitoserate zu sein.

1.4.3 Ependymome

Die ependymalen Tumore leiten sich von den Ependymzellen der Ventrikel ab und zählen somit ebenfalls zu den Tumoren des neuroepithelialen Gewebes. Sie machen insgesamt etwa 4% aller Hirntumore aus, jedoch 30% aller Hirntumore von Kindern, die jünger als drei Jahre alt sind. Sie manifestieren sich am häufigsten in der zweiten Dekade (Pfeiffer et al. 2002). Ependymome finden sich in der Nachbarschaft der Hirnventrikel. Sie können dabei intra- oder periventrikulär oder auch im Rückenmark auftreten. Die Rezidivrate ist hoch (etwa 50% der Fälle zeigen ein symptomfreies Intervall von fünf Jahren). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer lymphogenen Metastasierung.

Makroskopisch handelt es sich um derbe Tumore mit einer bunten Schnittfläche. Mikroskopisch sind sog. „Pseudorosetten“ charakteristisch. Hierbei lagern sich die Tumorzellen radiär um ein zentrales Gefäß an, wobei der Zellkern der Tumorzellen randständig ist. Es entsteht so ein kernfreier Hof von Zytoplasma um das Gefäß (sog. „Strahlenkranz“). Je nach Erscheinungsbild der Tumorzellen unterscheidet man zwischen zellulären, klarzelligen, papillären oder tanizytischen Ependymomen. Alle diese Varianten werden als WHO-II gradifiziert. Das anaplastische Ependymom (WHO-III) zeichnet sich durch eine hohe Zelldichte und eine deutlich gesteigerte Mitoserate aus. Eine perinekrotische

Zelldichtesteigerung (Bildung sog. „Pseudopalisaden“) wird ebenfalls als Malignitätskriterium gedeutet. Welche dieser Merkmale prognoserelevant sind, ist nicht sicher geklärt.

1.4.4 Medulloblastome/ PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore)

Der Begriff der „primitiven neuroektodermalen Tumore (PNETs) umfasst mehrere, morphologisch ähnliche, hochmaligne Neoplasien. Sie sind überwiegend wenig differenziert; sowohl eine neuroepitheliale als auch mesenchymale Differenzierung ist möglich. Ob die zerebralen (supratentoriellen) oder spinalen PNETs sich histologisch von den Medulloblastomen des Kleinhirnes, die 80% der PNETs ausmachen, unterscheiden, ist nicht restlos geklärt. Die WHO-Klassifikation zählt die PNETs bzw. Medulloblastome zusammen mit Medulloepitheliomen und den Ependymblastomen zu den embryonalen Tumoren. Das Medulloblastom stellt etwa 5% aller Hirntumore. Es ist der häufigste Tumor des Kindes- und Jugendalters. Der Altersdurchschnitt der Erkrankten liegt etwa bei zehn Jahren. Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen (65% aller Erkrankten sind männlich).

Die Klinik besteht aus Hirndruckzeichen (oft wird der Aquädukt verlegt) und zerebellären Symptomen. Die Anamnese ist bei dem schnell wachsenden Tumor eher kurz. Nach suffizienter Behandlung (Operation, Chemotherapie, Bestrahlung) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 50-70%. Tritt in den ersten fünf Jahren nach der Behandlung kein Rezidiv auf, ist die Wahrscheinlichkeit eines späteren Rezidivs gering (Pfeiffer et al. 2002).

Das Medulloblastom ist bei Kindern häufig in den wurmnahen Kleinhirnantteilen, bei Erwachsenen eher in den Kleinhirnhemisphären lokalisiert. Es findet sich manchmal auch in der Brücke oder im Mittelhirn.

Makroskopisch sind die Medulloblastome weich und unscharf begrenzt. Eine diffuse Aussaat in die Leptomeningen äußert sich in einer zuckergussartigen Trübung. In einem Drittel der Fälle bestehen Liquormetastasen. Histologisch imponiert der Tumor durch seine Zelldichte mit runden, chromatinreichen Zellkernen und nur sehr wenig umgebendem Zytoplasma. Die Zellen können ringförmig um ein fibrilläres Zentrum liegen und so Pseudorosetten (sog. „Homer-Wright-Rosetten“) bilden. Die Mitoserate ist hoch. Es finden sich flächenhafte Nekrosen sowie zahlreiche Einzelzellnekrosen.

Aufgrund dieser Merkmale werden Medulloblastome/ PNETs in der WHO-Klassifikation als WHO-IV eingestuft.

1.4.5 Meningiome

Meningiome zählen nach der WHO-Klassifikation zusammen mit den mesenchymalen nichtmeningothelialen Tumoren zu den Tumoren der Meningen. Sie leiten sich von den arachnoidalen Deckzellen ab. In Abhängigkeit ihrer histologischen Merkmale können sie in die Grade WHO-I bis -III eingestuft werden (s. unten).

Es handelt sich um einen der häufigsten Hirntumore im Erwachsenenalter (Anteil von 15%). Atypische Meningiome (WHO-II) machen etwa 4-7% aller Meningiome aus. Anaplastische Meningiome (WHO-III) haben einen Anteil von 1-2%. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (2:1). Meningiome können in jedem Lebensalter auftreten, am häufigsten jedoch in der fünften und sechsten Dekade (Bühling et al. 2000/ Pfeiffer et al. 2002). Aufgrund des langsamen Wachstums dauert es meist lange, bis die bereits in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Symptome (Hirndruck- und Herdzeichen) in Erscheinung treten. Die Prognose ist je nach Malignitätsgrad des Tumors unterschiedlich. Die WHO-I-Meningiome haben eine geringe Rezidivrate und sind operativ relativ gut zu behandeln. Die Prognose ist gut; eine Progression von möglichen Rezidivtumoren zum atypischen und anaplastischen Meningiom ist jedoch möglich. Die atypischen (WHO-II) und anaplastischen Meningiome (WHO-III), mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, zeigen eine hohe Rezidivrate. Bei den anaplastischen Meningiomen liegt die mediane Überlebenszeit bei unter zwei Jahren.

Meningiome sind oft am Keilbeinflügel, der Falx, der Olfaktoriusrinne oder auch im Spinalkanal lokalisiert. Die Schnittfläche erscheint makroskopisch grau und körnig und kann Zysten und Verkalkungen aufweisen. Sie wachsen unter der Dura, verdrängen dabei die umgebenden Hirngewebsanteile, können jedoch auch die Dura durchdringen und durch die Sinusräume in die Knochenmarksräume eindringen. WHO-II- und -III-Meningiome können auch infiltrativ in das Hirngewebe wachsen.

Histologisch werden bei den Meningiomen zahlreiche Subtypen unterschieden, die das breite Differenzierungsspektrum der Arachnoidalzellen widerspiegeln (meningotheliale-, psammomatöse-, mikrozystische-, angiomatöse Meningiome, um nur einige zu nennen). Atypische Meningiome werden histologisch durch folgende Kriterien definiert: Entweder muss die Mitoserate gesteigert sein (definiert als mindestens vier Mitosen pro zehn „high-power-fields“). Oder es müssen drei von fünf Merkmalen (gesteigerte Zelldichte, hohe Kern-Plasma-Relation, unstrukturiertes Wachstum, prominente Nukleolen, flächenhafte Nekrosen) vorliegen. Anaplastische Meningiome zeigen eine stark veränderte, eindeutig maligne Zytologie oder eine sehr stark erhöhte Mitoserate (mindestens 20 Mitosen pro zehn „high-

power-fields“). Infiltratives Wachstum wird nicht mehr als entscheidendes Malignitätskriterium, sondern als Zeichen einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit gewertet (Kleihues und Cavenee 2000).

2 Problemstellung

Die Therapie von Hirntumoren stellt sich bis heute noch sehr problematisch dar. Insbesondere sind maligne WHO-III- und -IV-Tumore durch eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit und eine schlechte Prognose gekennzeichnet. Die mittlere Überlebenszeit eines Glioblastom-Patienten beträgt weniger als ein Jahr nach Diagnosestellung. Medulloblastome bzw. PNETs stellen den häufigsten Tumor des Kindes- und Jugendalters. Auch sie sind häufig nicht suffizient therapierbar und ihre Prognose ist schlecht. Es stellt sich somit die Frage, wie die Empfänglichkeit von Hirntumoren gegenüber verschiedenen Therapievarianten erhöht werden kann.

Um die Therapierbarkeit von Tumoren zu erhöhen, ist es von entscheidender Bedeutung, die Faktoren zu analysieren, die für das biologische Verhalten der Tumore verantwortlich sind. Ein wichtiges therapie- und prognoserelevantes Merkmal ist die Tumorprogression. Das Wachstum eines Tumors ist durch zwei gegenläufige Mechanismen determiniert: Zellwachstum und Zelltod. Bisherige Therapieansätze haben sich hauptsächlich auf die Zellproliferation konzentriert. Diese Vorgehensweise nutzt den Umstand, dass schnell wachsendes Tumorgewebe eher durch zytostatische Substanzen gehemmt wird als „normales“ Körpergewebe. Diese Methode ist jedoch wenig spezifisch. Die Anzahl und Ausprägung von unerwünschten Wirkungen ist entsprechend hoch.

Seit einiger Zeit wird versucht, therapeutische Strategien zu entwickeln, die nicht das Proliferationsverhalten von Tumorzellen zum Angriffspunkt haben, sondern die Induktion ihres Zelltodes.

Die Existenz verschiedener Zelltodmechanismen ist seit langem bekannt. Hierbei wird im Allgemeinen zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden. Nekrose wird dabei meist als unphysiologische passive Reaktion von Zellen auf äußere toxische Stimuli verstanden (s. auch Kapitel 1.2.1), bei der Apoptose handelt es sich hingegen um einen physiologischen Mechanismus, der unter bestimmten Bedingungen zu einer programmiert ablaufenden Form des Zelltodes führt (s. Kapitel 1.2.2). Pathologische Veränderungen in diesem apoptotischen Programm kommen im Rahmen vieler Erkrankungen vor, so auch in Hirntumoren. Da das Apoptoseprogramm in Tumorzellen möglicherweise gestört ist, ist eine genaue Analyse der Apoptose-assoziierten Faktoren in Tumorzellen notwendig, um die Fähigkeit von Zellen, Apoptose zu begehen, therapeutisch nutzen zu können.

In dieser Arbeit werden maligne Hirntumore von 56 Patienten hinsichtlich ihres Wachstums- und Zelltodverhaltens analysiert. Zum einen soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang

zwischen den Proliferations- und Apoptoseraten der untersuchten Tumore (Glioblastome, Oligodendrogliome (WHO-III), Ependymome (WHO-III), Medulloblastome/ PNETs (WHO-IV) und Meningiome (WHO-II bzw. -III)) und ihrer Malignität besteht.

Zum anderen sollen verschiedene Apoptose-assoziierte Faktoren analysiert werden. Da es sich bei der Apoptose um ein komplexes Netzwerk handelt, werden sowohl Faktoren der extrinsischen, Rezeptor-vermittelten (TNF α , TNF-R1, TRAIL), als auch der intrinsischen, mitochondrialen Form der Apoptose (APAF-1/ Caspase-9/ SMAC), sowie verschiedene Initiator- (Caspase-9) und Effektor-Caspasen (Caspase-2, -3, -6 und -7) untersucht.

Die Expression der genannten Faktoren in verschiedenen Kompartimenten der Gewebepräparate (z.B. vitales Tumorgewebe, peritumorales Normalgewebe) wird (semi)quantitativ ermittelt und mit den Daten aus den Normalkontrollen verglichen. Auch wird geprüft, ob sich aus den Expressionsraten der Faktoren Schlüsse bezüglich der Suffizienz des apoptotischen Systems ziehen lassen.

Bei den Medulloblastomen/ PNETs und den WHO-II/ -III Meningiomen wird darüber hinaus versucht, neben Gemeinsamkeiten auch mögliche Unterschiede des biologischen Verhaltens der Tumore hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Lokalisation bzw. ihrer Malignitätsgrade zu entdecken.

Zusammengefasst möchte die vorliegende Arbeit einen Überblick über Wachstum und Zelltodmechanismen von verschiedenen Hirntumoren verschaffen. Dazu soll eine Auswahl maligner Hirntumore hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Apoptose-assoziierten Faktoren charakterisiert werden. Möglichkeiten und Grenzen einer Anwendung dieser Daten als prognostischer Marker oder therapeutische Option sollen aufgezeigt werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten

Die Auswahl der Fälle wird anhand des histopathologischen Befundes sowie durch mikroskopische Begutachtung der vorliegenden HE-Schnitte getroffen. Dabei bildet das Vorhandensein von nekrotischen Arealen im Tumorgewebe die Voraussetzung zur Aufnahme des Falles in die Studie.

Unter weiterer Berücksichtigung von Qualität und Größe der vorliegenden Präparate werden 56 Patienten ausgewählt (s. Tab. 7.1.1). Eine Patientin hat einen Rückenmarkstumor. Bei den restlichen Fällen handelt es sich um intrakranielle Neoplasien.

Bei vier Patienten war die Gewebentnahme nicht aufgrund eines tumorösen Prozesses erfolgt. In allen Fällen handelt es sich um Blutungen. Diese Fälle dienen als Normalkontrollen. Die geringe Anzahl der verwendeten Normalkontrollen ergibt sich aus der Tatsache, dass selten Gehirngewebe von Patienten entnommen wird, bei denen keine Pathologika vorliegen. Es wird darauf verzichtet, Normalfälle aus Autopsiematerial zu rekrutieren, da hier durch ein „post mortem delay“ eine artifizielle Veränderung apoptotischer Parameter, wie z.B. DNA-Fragmentation, vorliegen könnte.

In 18 Fällen liegt ein Glioblastom (WHO-IV) vor. Bei drei der 18 Patienten werden jeweils zwei, bei einem Patienten drei verschiedene Areale des operativ entfernten Tumors untersucht. Es ergibt sich so eine Gesamtzahl von 23 untersuchten Glioblastompräparaten. Die Gewebeproben von zwei der 18 Patienten zeigen fokal auch eine oligodendrogliale Differenzierung. Bei zwei der oben genannten Patienten handelt es sich um ein Rezidiv.

Bei den sechs untersuchten Oligodendrogliomen handelt es sich um anaplastische Oligodendrogliome WHO-III (s. Kapitel 1.4.2), eines davon ist ein Rezidiv. Einer der Fälle ist ein anaplastisches Mischgliom (ebenfalls WHO-III).

Bei zwei untersuchten Fällen handelt es sich um anaplastische Ependymome (WHO-III; s. Kapitel 1.4.3).

Vier der sechs ausgewählten Medulloblastome (WHO-IV) zeigen die klassisch-homogene, eines die desmoplastische Variante (s. Kapitel 1.4.4). In einem Fall liegt ein Mischtyp vor. Bei einem der klassischen Medulloblastome handelt es sich um ein Rezidiv; von diesem Tumor wurden zwei verschiedene Areale untersucht. Demnach werden insgesamt sieben Medulloblastompräparate analysiert.

In sechs Fällen liegt ein „Primitiver Neuroektodermaler Tumor“ (PNET) vor (WHO-IV; s. Kapitel 1.4.4). Einer davon ist nicht intrakraniell, sondern auf Höhe der LWK 3-5 lokalisiert. Bei einem der Fälle handelt es sich um die Metastase eines vorbestehenden Neuroblastoms. Ein weiterer Fall weist ein multipotentes Differenzierungsmuster auf.

Es werden insgesamt 18 Meningiome (s. Kapitel 1.4.5) untersucht, wobei es sich in 14 Fällen um atypische/ intermediäre Meningiome (WHO-II) handelt. Eines davon ist ein Rezidiv. In vier Fällen liegt ein anaplastisches/ malignes Meningiom (WHO-III) vor. Bei dreien davon handelt es sich um Rezidive.

3.2 Gewebebegewinnung, -fixation und -bearbeitung

Die Entnahme des Hirngewebes erfolgt im Rahmen einer offenen neurochirurgischen Operation. Das Material wird zunächst in 10% gepuffertem Neutralformalin fixiert, daraufhin dehydriert, geklärt sowie abschließend gemäß einem Standardprotokoll über Nacht im Autotechnikon (AT) in reines Paraffin eingebettet.

Die angefertigten Blöcke werden mit einer Fallnummer versehen und archiviert. Das in ihnen enthaltene Gewebe ist auf lange Zeit haltbar.

Zu immunhistologischen Zwecken werden mit einem Mikrotom (Leica Modell Jung SM 2000) 3µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen, die zur besseren Haftung des Gewebes zuvor mit Silan (s. Kapitel 3.4) beschichtet worden waren. Die Schnitte werden daraufhin eine halbe Stunde bei 40°C auf einer Heizplatte und anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Die so entstandenen Präparate können bis zur weiteren Verarbeitung nahezu unbegrenzt lange aufbewahrt werden.

Vor einem sich anschließenden Färbeverfahren muss das Paraffin wieder aus dem Gewebe entfernt werden. Dies geschieht durch Einlegen des Objektträgers in zwei Xylolbäder (für jeweils ca. 10 Min.) und Durchlaufen der sog. aufsteigenden Alkoholreihe. Dabei wird der Objektträger für jeweils einige Minuten in Alkoholbäder der Konzentrationen 100%, 96%, 70% (jeweils zwei Mal) eingelegt. Im Anschluss daran verbleibt der Objektträger für einige Minuten in Aqua dest. Das Gewebe ist nun für alle beliebigen Färbeverfahren vorbereitet; alle weiteren Schritte hängen von dem gewünschten Verfahren ab und werden in Kapitel 3.5 beschrieben.

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

3.3.1.1 Faktoren des TNF-vermittelten Zelltodweges

Tumor Nekrose Faktor (TNF α)

Klon:	polyklonal, Kaninchen
Spezifität/ Kommentar:	Der Antikörper erkennt sowohl das 26 kDa schwere Prohormon, als auch das 76 Aminosäuren kürzere reife Protein des menschlichen TNF α . TNF β (Lymphotoxin) wird nicht markiert.
Quelle:	Acris

Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1)

Klon:	polyklonal, Kaninchen
Spezifität/ Kommentar:	Der Antikörper richtet sich gegen ein Protein (Aminosäuren 30-301) in der extrazellulären, Ligand-bindenden Domäne des zellmembranständigen TNF-Rezeptor 1 des Menschen. Der TNF-Rezeptor 1 ist 55 kDa schwer und vermittelt als „Todesdomäne“, zusammen mit Fas und den Signalproteinen TRADD, FADD/ MORT-1 und RIP, das durch den Tumor Nekrose Faktor vermittelte apoptotische Signal.
Quelle:	Santa Cruz

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/ Apo-2L)

Klon:	polyklonal, Kaninchen
Spezifität/ Kommentar:	TRAIL/ Apo-2L ist ein weiteres Mitglied der TNF-„Familie“. Es handelt sich um ein 281 Aminosäuren langes Protein, welches sowohl in löslicher als auch in zellmembranständiger Form in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt. Die lösliche Variante vermittelt Apoptose in

unterschiedlichen Tumor-Zelllinien. Der Antikörper ist gegen die Aminosäuresequenz 25-281 des C-Terminus des Proteins gerichtet.

Quelle: Santa Cruz

3.3.1.2 Apoptose-assoziierte mitochondriale Faktoren

Apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1)

Klon: polyklonal, Kaninchen

Spezifität/ Kommentar: APAF-1 ist ein 130 kDa schweres Protein, das gemeinsam mit Cytochrom c und Caspase-9 das sog. „Apoptosom“ bildet, wodurch eine Reihe von Effektor-Caspasen (vor allem Caspase-3) aktiviert, und somit Apoptose vorangetrieben wird. Auch ist APAF-1 in der Lage unabhängig von Cytochrom c und dATP Caspase-9 zu aktivieren. Dies geschieht durch Oligomerisierung des Vorläufer-Moleküls von Caspase-9, was zu einer Autoaktivierung führt. APAF-1 enthält eine Domäne, die zu 48% ähnlich und zu 22% identisch ist mit dem Zelltod-vermittelnden Gen ced-4 des Nematoden *C. elegans*. Der Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuresequenz 871-1194 des C-Terminus des Proteins.

Quelle: Santa Cruz

Second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC/ DIABLO/ direct inhibitor-of-apoptosis-binding protein with low pI)

Klon: polyklonal, Kaninchen

Spezifität/ Kommentar: SMAC ist ein 239 Aminosäuren langes Protein, das normalerweise im Mitochondrium zu finden ist, jedoch in das Zytosol entlassen wird, sobald Zellen apoptotische Prozesse durchlaufen. Im Zytosol inhibiert SMAC die anti-apoptotischen Effekte der IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), indem es an sie bindet. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Aktivierung

von Caspase-9 (über das Apoptosom, bestehend aus Cytochrom c, APAF-1 und Caspase-9), wodurch wiederum verstärkt Effektor-Caspasen (wie Caspase-3) aktiviert werden. Es kommt letztendlich zu einer Hochregulierung der Apoptose. SMAC kommt in nahezu allen Gewebearten des Menschen vor. Der Antikörper richtet sich gegen die HisTag-Komponente des menschlichen SMAC-Proteins.

Quelle: Biocarta

3.3.1.3 Caspasen

Caspase-9

Klon: 9CSP02, monoklonal, Maus

Spezifität/ Kommentar: Caspase-9 ist ein 46-48kDa großes Protein, das im Zytosol unter apoptotischen Stimuli vermehrt exprimiert wird. Dort bindet es unter Präsenz von Cytochrom c und dATP an APAF-1, wodurch es zu einer Aktivierung der Caspase-9 kommt. Als Initiator-Caspase kommt ihr nun die Rolle zu, Effektor-Caspasen wie Caspase-3, -6 und -7 zu aktivieren, wodurch diese durch Spaltung von der Proform in die aktive Form überführt werden und die apoptotische Degeneration der Zelle weiter vorangetrieben werden kann. Der Antikörper reagiert mit der Prodomäne menschlicher Caspase-9.

Quelle: Biocarta

Caspase-7

Klon: 7CSP01; monoklonal, Maus

Spezifität/ Kommentar: Caspase-7 ist ein 35 kDa schweres Protein, dem als Effektor-Caspase die Funktion zukommt, Substrate durch Spaltung abzubauen, die für die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die eine Zelle während der Apoptose

durchläuft, verantwortlich sind. Sie wird zytoplasmatisch exprimiert.

Eine Alpha- und eine Betaform sind bekannt. Die Alphaform umfasst 303 Aminosäuren und wird während der Aktivierung in 20 und 12 kDa Untereinheiten gespalten. Die 253 Aminosäuren lange Betaform entsteht eventuell im Rahmen eines alternativen Spaltungsvorganges und spielt möglicherweise die Rolle eines negativen Regulators bei apoptotischen Vorgängen.

Das Protein dient in seiner gesamten Länge als Antigen für den Antikörper.

Quelle: Biocarta

Caspase-3/ CPP32

Klon: 3CSP03; monoklonal, Maus

Spezifität/ Kommentar: Die Caspase-3 ist als Effektor-Caspase für die spezifische Spaltung von Substraten verantwortlich, aus deren Degradation die zellmorphologischen Veränderungen während der Apoptose resultieren. Sie liegt als 32 kDa schweres Proenzym vor, das nach Aktivierung in zwei 17 kDa und 12 kDa schwere Untereinheiten zerfällt. Beide Formen kommen hauptsächlich im Zytosol vor. Im zentralen Nervensystem spielt aktivierte Caspase-3 bei der Apoptose im Rahmen neuronaler Differenzierungsvorgänge in der embryonalen Entwicklung eine Rolle. Auch hier dient das Protein dem Antikörper in seiner gesamten Länge als Antigen.

Quelle: Biocarta

Caspase-2/ ICH-1

Klon: polyklonal, Kaninchen

Spezifität/ Kommentar: Als Antigen dient der C-Terminus der menschlichen Caspase-2. Caspase-2 fungiert als Initiator-Caspase und vermittelt zum einen die Freisetzung mitochondrialer Faktoren (SMAC,

Cytochrom c, AIF) im Rahmen von Apoptose. Zum anderen aktiviert sie die Effektor-Caspase-3.

Quelle: abcam

Caspase-6/ mammalian Ced-3 homologue 2 (Mch2)

Klon: polyklonal, Kaninchen

Spezifität/ Kommentar: Caspase-6 wird durch Apoptose-induzierende Stimuli, wie z.B. Granzym B (Todesprotease der zytotoxischen T-Zellen), und vor allem durch Caspase-3 aktiviert. Dabei ist das inaktivierte Zymogen im Gegensatz zur aktivierten Caspase-6 kein Dimer. Es existieren eine alpha- (34 kDa) und eine beta-Isoform (22 kDa), die beide durch den Antikörper detektiert werden. Während des Vorganges der Apoptose kommt der Caspase-6 die Aufgabe zu, Spindelapparat-Proteine (nuclear mitotic apparatus protein/ NuMA) des Zellkernes zu spalten. Weiterhin vermittelt sie generell die Schrumpfung und Fragmentation des Zellkernes.

Quelle: StressGen

MIB-1

Klon: Ki-67, monoklonal, Maus

Spezifität/ Kommentar: Der Antikörper markiert proliferierende Zellen. Er ist gegen ein Antigen gerichtet, das von menschlichen proliferierenden Zellen in der G1-, G2-, S- und M-Phase exprimiert wird, nicht jedoch während der G0-Phase.

Quelle: DACO

3.3.2 Sekundärantikörper

Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)

Klon: polyklonal, Kaninchen

Spezifität/ Kommentar: Der in der Ziege produzierte Antikörper reagiert spezifisch mit den eingesetzten polyklonalen Kaninchen-Primärantikörpern. An das konjugierte Biotin kann im Rahmen von Färbeverfahren Avidin zu Avidin-Biotin-Komplexen binden, die wiederum Kontaktstelle für das zuzugebende Chromogen sind. Dies ermöglicht die Darstellung des zu detektierenden Lokus, an dem sich das gesuchte jeweilige Antigen befindet. Der Sekundärantikörper fungiert somit als sog. Brückenantikörper (näheres: s. 3.5.1).

Quelle: Vector Laboratories

Biotinylated anti-mouse IgG (H+L)

Klon: monoklonal, Maus

Spezifität/ Kommentar: Der im Pferd produzierte Antikörper reagiert spezifisch mit den eingesetzten monoklonalen Maus-Primärantikörpern. Das an eine schwere Kette des kristallinen Fragmentes des Sekundärantikörpers konjugierte Biotin ermöglicht die Anheftung des Avidin zum Avidin-Biotin-Komplex und somit (s. o.) die Anfärbung des gesuchten Antigens (näheres: s. Kapitel 3.5.1).

Quelle: Vector Laboratories

3.4 Reagenzien

Silan (3-Aminopropyltri-Ethoxysilan/ APES)

- herstellen einer 2% Silan-Aceton-Lösung
- Objektträger 20 sec. in Silanlösung tauchen
- 2 x in Aceton spülen
- 2 x in Aqua dest. spülen
- Objektträger über Nacht bei 37°C trocknen lassen
- die Silanisierung der Objektträger verbessert die Haftung des Präparates
- Quelle: Fluka

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 0,01 M

- Na_2HPO_4 Dinatriumphosphat 11,50 g
- KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat 0,43 g
- NaCl Natriumchlorid 5,84 g
- die Lösung wird in 1 l Aqua dest. mittels NaOH/ HCl auf pH 7,4 eingestellt
- PBS dient zum Spülen der Präparate, zum Ansetzen diverser Reagenzien (s. dort) sowie zum Verdünnen der Primär- und Sekundärantikörper
- Quelle: Merck

Zitratpuffer

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Zitronensäure-Monohydrat 2,10 g
- in 1 l Aqua dest. lösen
- mit NaOH/ HCl auf pH 6,0 einstellen
- Zitratpuffer ermöglicht (vor allem in Kombination mit Wärme) eine Auffaltung von Zellproteinen, wodurch die Epitope besser für die Antikörper-Bindung zugänglich werden; außerdem dient es dem Ansetzen diverser Lösungen (s.dort)
- Quelle: Merck

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%

- mit Aqua dest. oder Methanol zu 3%iger Lösung verdünnen
- senkt die endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes und reduziert so eine falsch positive Anfärbung (Hintergrund)
- Quelle: Merck

Methanol (CH_3OH)

- senkt als 3%ige Lösung mit Wasserstoffperoxid die endogene Peroxidase-Aktivität im Gewebe
- Quelle: Riedel-de Haen

Proteinase K

- 1 mg wird zusammen mit 10 ml PBS-Stammlösung (10fach konzentriertes PBS) angesetzt
- bewirkt als Enzym ein „Andauen“ von Zellproteinen, wodurch die zu markierenden Epitope besser für eine Antikörper-Bindung zugänglich werden.
- Quelle: Sigma

Triton X (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)

- wird 0,1%ig in 0,1%igem Zitratpuffer angesetzt
- reduziert die Oberflächenspannung des Präparates, wodurch die nachfolgend aufgetragene Substanz (z.B. Antikörper) besser haftet
- Quelle: Sigma

3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)

- wegen Toxizität als Fertigpräparat:
eine Tablette DAB und eine Tablette Urease in 5 ml PBS unmittelbar vor Gebrauch ansetzen
- dient in seiner Funktion als Elektronendonator als Chromogen (braune Anfärbung); in Alkohol unlöslich
- Quelle: Sigma

Non-Immuserum

- reduziert die unspezifische Hintergrundfärbung durch Anlagerung an stark geladene z.B. Bindegewebelemente des Präparates, an die sich sonst der verwendete Primärantikörper unspezifisch binden könnte
- stammt aus derselben Spezies wie der Brückenantikörper (hier: Pferd/ monoklonal; Ziege/ polyklonal)
- wird 1:100 in PBS angesetzt
- Quelle: Vector Laboratories

Hämalaun nach MEYER

- dient als Kernfärbung (blau) der Gegenfärbung der Präparate

- Quelle: Merck

Glyceringelatine

- wird zum Einbetten auf das Präparat aufgetragen
- Quelle: Merck

Avidin-Biotin-Komplex

- der Peroxidase-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex bindet an den Biotin-konjugierten Sekundärantikörper
- Quelle: Vector Laboratories

TUNEL- (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) Lösung

- Terminale Deoxynukleotidyltransferase aus Kalbsthymus in Puffer
- Nukleotid-Gemisch in Reaktionspuffer
- ermöglicht die Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen (näheres: s. Kapitel 3.5.2)
- Quelle: Roche

Converter-POD

- Anti-Fluorescein-Antikörper, Fab Fragment aus dem Schaf
- konjugiert mit Meerrettichperoxidase, die die Umwandlung eines Chromogens ermöglicht
- Quelle: Roche

3.5 Präparationsverfahren

3.5.1 ABC- (Avidin-Biotin-Complex) Methode

Die Avidin-Biotin-Methode (weiterhin: ABC-Methode) ermöglicht auf einfache Art und Weise unter Verwendung von spezifischen Antikörpern die Darstellung verschiedener Antigene (= Proteine) in Geweben. Es handelt sich hierbei um ein sogenanntes immunhistochemisches Verfahren.

Zunächst muss das darzustellende Epitop durch verschiedene Verfahren dem antigenbindenden Fragment (Paratop) des entsprechenden Primärantikörpers zugänglich gemacht werden.

Dazu wird zunächst das Einbettungsmaterial Paraffin wie oben dargestellt in der absteigenden Alkoholreihe aus dem Gewebe entfernt. Im nächsten Schritt werden die Schnitte entweder in Zitratpuffer in einer Mikrowelle gekocht oder mit Proteinase K inkubiert (s. Tab. 3.1). Dies führt zu einer Auffaltung bzw. Andauung von Zellproteinen, die evtl. das gesuchte Epitop verdecken könnten. Der Primärantikörper erhält so einen besseren Zugang zum Antigen. Daraufhin werden die Präparate mit PBS abgespült und mit Tierserum inkubiert. Das Serum soll von dem Tier stammen, aus dem der Sekundärantikörper gewonnen wurde, um eine unspezifische Anlagerung desselben zu vermeiden. Bei monoklonalen Primärantikörpern handelt es sich in diesem Fall um Pferde-, bei polyklonalen um Ziegen Serum. Das Serum lagert sich im Gewebe an freiliegende Stellen mit hoher Ladung an, die eine hohe Affinität zu Proteinen haben (so z.B. Kollagen- oder Bindegewebelemente). So wird verhindert, dass sich der Primärantikörper, bei dem es sich ebenfalls um ein Protein handelt, an diese Stellen bindet. Eine unspezifische Hintergrundfärbung des Präparates kann hierdurch reduziert werden. Das Tierserum wird nicht durch einen Waschvorgang entfernt, sondern lediglich abgeklopft.

Nun wird der gewünschte Primärantikörper in einer durch ein Titrationsverfahren ermittelten Konzentration in PBS verdünnt aufgetragen und unterschiedlich lange bei verschiedenen Temperaturen auf den Präparaten belassen (Einzelheiten: s. Tab. 3.1). Der Primärantikörper soll möglichst spezifisch an sein jeweiliges Gewebs-Antigen binden.

Nachdem die Objektträger in PBS gewaschen wurden, wird der Sekundärantikörper (verdünnt in PBS) aufgetragen. Bei verwendeten polyklonalen Primärantikörpern (generiert im Kaninchen) handelt es sich in diesem Fall um einen gegen Kaninchenprotein ausgerichteten Antikörper, der aus der Ziege gewonnen wurde. Bei entsprechenden monoklonalen Primärantikörpern (aus der Maus) dagegen um einen gegen Mäuseprotein gerichteten Antikörper, der im Pferd generiert wurde. Der Sekundärantikörper ist an seinem kristallinen Fragment kovalent mit Biotin konjugiert. Er reagiert spezifisch mit seinem antigenbindenden Fragment mit dem kristallinen Fragment des zuvor aufgetragenen Primärantikörpers.

Nach diesem Schritt und einem weiteren Waschen in PBS werden die Präparate nun mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (weiterhin: AB-Komplex) inkubiert. Das Avidin hat eine hohe Affinität für Biotin. Es besitzt vier freie Bindungsstellen, die aufgrund der molekularen Konfiguration jedoch in der Regel nicht vollständig mit Biotin-Molekülen

besetzt sind. An das biotinylierte kristalline Fragment des Sekundärantikörpers binden nun die zugegebenen AB-Komplexe. Das in ihnen enthaltene Biotin ist seinerseits mit Peroxidase konjugiert.

Nach einem weiteren Waschvorgang in PBS wird Diaminobenzidin-Hydrochlorid (DAB) zu den Präparaten gegeben. Das DAB dient der Peroxidase des AB-Komplexes als Elektronendonator, was in einer einfachen chemischen Reaktion zur Entstehung eines Farbmoleküles und Wasser führt. Die Farbmoleküle präzipitieren nun an der Stelle des gesuchten Antigens.

Nach Spülen mit Wasser werden die Präparate mit MEYER'S Hämalaun und späterem Bläuen unter fließendem Wasser gegengefärbt.

Abschließend werden unter Verwendung von Glyceringelatine Deckgläser auf die Objektträger gebracht.

Die Präparate stehen nun einer Analyse unter dem Lichtmikroskop zur Verfügung.

Protokoll ABC-Methode (Immunhistochemie)

(sofern nicht anders angegeben, wurden die entsprechenden Schritte bei Raumtemperatur/ RT durchgeführt)

1. entparaffinieren
2. 2% H₂O₂ in Aqua dest. 10 min.
3. kochen in Zitratpuffer in der Mikrowelle 3x5 min.
oder: Proteinase K für 15 min.
4. abkühlen lassen 20-30 min.
5. spülen in PBS 5 min.
6. Serum auftragen 1:100 in PBS 20 min.
7. Primärantikörper auftragen (Konzentrationen, Zeit, Temperatur: s. Tab. 3.1)
8. spülen und waschen in PBS 5 min.
9. biotinylierten Sekundärantikörper auftragen 1:100 in PBS 30 min.
10. spülen und waschen mit PBS 5 min.
11. Avidin-Biotin-Komplex auftragen 1:100 in PBS 30 min.
12. spülen und waschen mit PBS 5 min.
13. DAB auftragen 10 min.
14. abspülen und wässern 15 min.
15. gegenfärben mit MEYER'S Hämalaun 2-4 min.

16. bläuen unter fließendem Wasser 15 min.

17. eindeckeln mit Glyceringelatine

Primär- Antikörper	Verdünnung	Inkubationsverhältnisse	Vorbehandlung
TNF α	1: 100	über Nacht; 4°C	Mikrowelle
TNF-R1	1: 150	über Nacht; 4°C	Mikrowelle
TRAIL	1: 100	über Nacht; 4°C	Mikrowelle
APAF-1	1: 100	über Nacht; 4°C	Proteinase K
SMAC	1: 4000	über Nacht; 4°C	Proteinase K
Caspase-9	1: 400	60 min.; RT	Mikrowelle
Caspase-7	1: 100	60 min.; RT	Mikrowelle
Caspase-6	1: 100	60 min.; RT	Proteinase K
Caspase-3	1: 100	60 min.; RT	Mikrowelle
Caspase-2	1: 750	60 min.; RT	Mikrowelle

Tab. 3.1: Übersicht über die Modalitäten der Anwendung der benutzten Primärantikörper.

3.5.2 TUNEL- (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) Methode

Mit der TUNEL-Methode lassen sich durch in situ-labeling DNA-Einzelstrangbrüche, sogenannte „nicks“ sichtbar machen. Im Gegensatz zur Elektrophorese, bei der sich Apoptose in der sog. DNA-Leiter (Oligonukleosomen) manifestiert, lassen sich durch die TUNEL-Methode in situ Rückschlüsse auf die Lokalisation einzelner apoptotischer Zellen ziehen.

Zunächst müssen jedoch die Präparate vorbehandelt werden, um die entsprechenden DNA-Einzelstrangbruchstellen den für die Methode spezifischen Reagenzien zugänglich zu machen.

Nach einer Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe wird Proteinase K auf die Schnitte gegeben. Diese sorgt als eiweißspaltendes Enzym für ein Andauen von Zellproteinen, sodass die DNA-Einzelstrangbrüche als Substrat einer Bindungsreaktion zur Verfügung stehen.

Es folgt ein Waschvorgang mit PBS. Weiterhin werden die Präparate mit Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert, wodurch die Aktivität der endogenen Gewebe-Peroxidase gehemmt wird (diese könnte sonst dem zugegebenen Chromogen als Substrat dienen). Somit wird eine falsch positive Anfärbung des Präparates reduziert.

Nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen wurden, wird nun in Zitratpuffer angesetztes Triton X auf das Gewebe gebracht. Das Triton X reduziert die Oberflächenspannung der Präparate, wodurch das nachfolgend aufzutragende TUNEL-Reaktionsgemisch besser anhaften kann.

Das TUNEL-Reaktionsgemisch ist eine Mischung aus zwei Komponenten, bestehend aus einem Enzym (der terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase; weiterhin: TdT) und Fluoreszeinkonjugierten Nukleotiden. Die TdT erkennt Strangbrüche in hochmolekularer DNA und verknüpft die freien 3'-OH Enden mit den Fluoreszeinkonjugierten Nukleotiden.

Nach dem Waschen in PBS wird nun ein Antikörper zu den Präparaten gegeben, der sowohl gegen Fluoreszein gerichtet, als auch mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Er bindet mit seinem antigenbindenden Fragment an das konjugierte Fluoreszein der an den Einzelstrangbrüchen polymerisierten Nukleotide.

Die Schnitte werden nochmals mit PBS gewaschen. Daraufhin werden sie mit DAB inkubiert, das, wie bereits in der oben beschriebenen ABC-Methode, der Peroxidase als Elektronendonator dient, wodurch dort ein Farbstoff präzipitiert, der spezifisch die apoptotischen Einzelstrangbrüche sichtbar macht.

Damit die Präparate besser beurteilt werden können, werden die Schnitte nach einem weiteren Waschvorgang (mit Wasser) mittels MAYER'S Hämalaun gegengefärbt. Hierbei ist zu beachten, dass die Kernfärbung nicht zu intensiv ausfällt, damit die nukleären Zellveränderungen, die sich während der Apoptose ereignen, noch hinreichend beurteilt werden können.

Zuletzt werden die Präparate mit Wasser und PBS gewaschen und abschließend mit Glycergelatine eingedeckelt.

Die Schnitte stehen nun einer Analyse unter dem Lichtmikroskop zur Verfügung.

Protokoll TUNEL- (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) Methode

(sofern nicht anders angegeben, wurden die entsprechenden Schritte bei Raumtemperatur/ RT durchgeführt)

1. entparaffinieren
2. auftragen von Proteinase K für 15 min.
3. waschen mit PBS 2 x 5 min.
4. auftragen von 2% H₂O₂ in Methanol für 30 min.
5. waschen mit PBS 2 x 5 min.

6. auftragen von 0,1% Triton X in 0,1% Citratpuffer für 2 min. bei 4°C
7. waschen mit PBS 2 x 5 min.
8. inkubieren mit TUNEL-Reaktionsgemisch für 60 min. bei 37°C
9. waschen mit PBS bei 3 x 5 min.
10. inkubieren mit Converter-POD für 30 min. bei 37°C
11. waschen mit PBS 3 x 5 min.
12. auftragen von DAB für 10 min.
13. waschen mit H₂O für 2 x 5 min.
14. gegenfärben mit MAYER'S Hämalaun für 1-2 min.
15. waschen mit PBS für 5 min.
16. bläuen mit H₂O für 2 min.
17. eindeckeln mit Glyceringelatine

3.6 Auswertung

3.6.1 Quantitative Analyse

Im Rahmen der quantitativen Analyse sollen bei jedem Präparat in einem etwa 10000 Zellen umfassenden Areal die durch die beschriebenen Verfahren markierten Zellen gegen die nicht markierten Zellen ausgezählt werden.

Dabei soll das Ausmaß der exprimierten Apoptose-assoziierten Faktoren zu einem Überblick über die Zelltodvorgänge im vorliegenden Tumorgewebe verhelfen.

Zu diesem Zweck werden zunächst in den angefertigten Schnitten Bereiche ausgewählt, die in allen seriellen Schnitt-Präparaten einer Gewebeprobe vorhanden sind und ein repräsentatives Bild über die Tumorverhältnisse des jeweiligen Falles abgeben. Explizit wird darauf geachtet, dass in den untersuchten Abschnitten Nekrosen vorhanden sind. Weiterhin werden die im Tumorrandgebiet liegenden Zellen sowie im mikroskopisch tumorfreien Normalgewebe des Präparates befindliche Zellen ausgewertet. Die Auszählung der Zellen erfolgt unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe eines Zählrasters.

Dabei wird bei den Antikörpern gegen TNF α , TNF-R1, TRAIL, SMAC, sowie Caspase-9, -3 und -6 ein semiquantitatives Auswertungsverfahren gewählt (nach: Tews und Nissen 1999/ Tews 2000). So entspricht eine Anfärbung von 1-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3 und 76-100% = 4; färben sich keine Zellen an, ergibt sich der Term 0. Zum besseren Verständnis wird diese semiquantitative Skala im Text in den entsprechenden Prozentangaben angegeben.

Bei einigen Färbungen findet sich jedoch eine zum Teil so spärliche Expression, dass ein quantitativer Auswertungsmodus verwendet werden muss (in Prozent; keine Anfärbung = 0). Dies ist bei den Antikörpern gegen APAF-1, sowie Caspase-2 und -7 der Fall.

Apoptose- und Proliferationsraten werden in Prozent ausgewertet.

Für alle Faktoren werden Mittelwerte, sowie Minimal- und Maximalwerte angegeben.

Zur statistischen Auswertung der Daten werden zum einen Korrelationspunktvolken erstellt. Diese Methode wird verwendet, wenn sich aus vorangegangenen Studien aufschlussreiche Fragestellungen hinsichtlich der Korrelation der untersuchten Faktoren ergeben. Zum anderen werden der H-Test von Kruskal und Wallis für mehrere unabhängige Stichproben, sowie der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney (für zwei unabhängige Stichproben) angewendet. Die Ergebnisse werden als signifikant eingestuft, wenn $p < 0,05$ ist.

3.6.2 Qualitative Analyse

Bei der qualitativen Analyse wird zum einen untersucht, in welchen Bereichen des Präparates eine Expression der untersuchten Faktoren zu erkennen ist. Hierbei sind besonders die in den Präparaten vorkommenden Nekrosezonen sowie das sie umgebende perinekrotische Areal interessant. Auch wird untersucht, ob es zu einer Expression der Faktoren im peritumoralen Hirngewebe kommt.

Es wird ebenfalls geprüft, ob die markierten Zellen ein besonderes Verteilungsmuster der untersuchten Faktoren zeigen. Zum einen geht es dabei um die Frage, ob sich Faktoren bestimmten Zellkompartimenten zuordnen lassen (intranukleär oder zytoplasmatisch). Auch wird geprüft, ob die markierten Tumorzellen gleichmäßig, d.h. ohne erkennbares Muster, über das Tumorgewebe verteilt sind, oder ob es zu fokalen Expressionssteigerungen kommt.

Die in den Präparaten befindlichen Gefäße werden dahingehend analysiert, ob sie durch die verwendeten Antikörper angefärbt werden oder nicht.

4 Ergebnisse

4.1 Normalfälle (N=4)

Bei den untersuchten Normalkontrollen, bei denen es sich in allen vier Fällen um Blutungen handelt, findet sich keine Expression der untersuchten Apoptose- assoziierten Faktoren in den zum Vergleich zu den Tumorzellen der anderen Präparate herangezogenen Gliazellen.

Die bei den Blutungspatienten gefundenen Ergebnisse korrelierten in den Präparaten der Tumorpatienten mit den Gewebeabschnitten, die – soweit morphologisch erkennbar – nicht von Tumorgewebe infiltriert waren. Eine Ausnahme bilden hier die Glioblastom- und Oligodendrogliompräparate, in denen auch im nicht infiltrierten Normalgewebe in einigen Fällen geringe Expressionsraten der Faktoren TNF α , TRAIL, Caspase-3 und Caspase-6 gefunden wurden (s. Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.2). Dies soll in den Kapiteln 5.1 und 5.2 ausführlich diskutiert werden.

Einige der in den Normalkontrollen vorhandenen Gefäße zeigen eine physiologische Expression der untersuchten Faktoren (TNF α , TNF-R1, TRAIL, APAF-1, SMAC, Caspase-9, -7, -3, -2 und -6). Dies ist ebenfalls in den tumorfreien Arealen der Patientengruppe zu beobachten.

4.2 Untersuchung der einzelnen Tumore

4.2.1 Glioblastome (N=18; WHO-IV; s. Tab. 7.1.1)

Zur statistischen Auswertung der Daten werden Korrelationsdiagramme erstellt (s. auch Kapitel 3.6.1). Es werden die Expressionsraten folgender untersuchter Faktoren gegeneinander aufgetragen:

Die Proliferationsrate (entsprechend der MIB-1-Expressionsrate) gegen die Apoptoserate (entsprechend der Markierungsrate durch TUNEL; s. Diagramm 7.2.1; näheres: s. Kapitel 5.1.1); TNF α -positive Tumorzellen gegen TNF-R1-positive Tumorzellen (s. Diagramm 7.2.2; näheres: s. Kapitel 5.1.2.1), TNF-R1-positive Tumorzellen gegen die Rate der TUNEL-positiven Tumorzellen (s. Diagramm 7.2.3; näheres: s. Kapitel 5.1.2.1), SMAC-positive Tumorzellen gegen TUNEL-positive Tumorzellen, sowie SMAC gegen die Expressionsraten von TRAIL (s. Diagramme 7.2.4-5; näheres: s. Kapitel 5.1.2.1), Caspase-9 (s. Diagramm 7.2.6 sowie Kapitel 5.1.2.2) und Caspase-2 (s. Diagramm 7.2.7 sowie Kapitel 5.1.2.3).

Weiterhin werden die Expressionsraten von Caspase-2 gegen die von Caspase-3 und die TUNEL-Expressionsrate aufgetragen (s. Diagramme 7.2.8-9 und Kapitel 5.1.2.3). Ebenso wird eine Korrelation der Expressionsraten von Caspase-3-positiven- mit Caspase-9-positiven Tumorzellen geprüft (s. Diagramme 7.2.10 und Kapitel 5.1.2.3), zudem werden Caspase-6- gegen Caspase-7- positive Tumorzellen gegeneinander aufgetragen (s. Diagramme 7.2.11 und Kapitel 5.1.2.3).

Es ergibt sich in keinem Fall eine klare Korrelation zwischen den untersuchten Faktoren.

Die statistische Analyse mittels H- und U-Test (s. Kapitel 3.6.1) führt zu folgenden Ergebnissen:

Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionsraten von TNF α bei allen untersuchten WHO-IV-Tumoren ($p=0,402$; s. Kapitel 5.1.2.1). Jedoch unterscheiden sich die Expressionsraten von TNF α signifikant, wenn man die Tumoren der verschiedenen Malignitätsgrade (WHO-II, -III und -IV) miteinander vergleicht ($p=0,007$; s. Kapitel 5.1.2.1). Niedrigmaligne Tumore exprimieren demnach mehr TNF α als hochmaligne. APAF-1 und Caspase-9 werden von den Tumoren der Malignitätsgrade WHO-II, -III und -IV nicht signifikant unterschiedlich exprimiert ($p=0,053$ bzw. $p=0,828$; s. Kapitel 5.1.2.2). Hingegen existiert ein signifikanter Unterschied bezüglich den Expressionsraten von SMAC bei den Tumoren der unterschiedlichen Malignitätsgrade ($p=0,004$). Hochmaligne Hirntumore exprimieren weniger SMAC als niedrigmaligne. Die Analyse der Expressionsraten von Caspase-3 zeigt, dass diese signifikant höher in WHO-IV-Tumoren exprimiert wird als in Tumoren der WHO-Grade II und III ($p=0,004$; s. Kapitel 5.1.2.3). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expressionsraten bei den Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade ergeben sich für die Caspase-2 ($p=0,706$), -6 ($p=0,151$) und -7 ($p=0,208$; näheres: s. Kapitel 5.1.2.3).

4.2.1.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Der Anteil TUNEL-markierter Tumorzellen liegt bei den untersuchten Glioblastom-Präparaten im Mittel bei 0,83% (Min: 0%, Max: 7,5%; s. Abb. 7.3.1). Dabei lässt sich in einem guten Drittel der Fälle beobachten, dass hauptsächlich Zellen in den perinekrotischen Bezirken des Tumorgewebes apoptotisch sind. In zwei Fällen sind keine apoptotischen Zellen zu finden.

Demgegenüber liegt der Durchschnitt proliferierender Zellen im Tumorgewebe bei 24,13% (Min: 5%, Max: 50%). Hierbei ist kein spezielles Verteilungsmuster, z. B. perinekrotisch, zu erkennen.

Es zeigt sich somit eine vielfach höhere Proliferations- als Apoptoserate.

4.2.1.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.4-8)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.4)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF α -exprimierender Tumorzellen liegt im semiquantitativen Mittel bei 1,26 (Min: 0; Max: 4), d.h. bei etwa 32% der Zellen des tumorös veränderten Gewebes. In fünf Fällen ist ein fokales Expressionsmuster erkennbar, bei dem TNF α -exprimierende Zellen das insgesamt spärlich angefärbte Tumorgewebe straßenförmig durchziehen oder kleine Bezirke in Form von Zellnestern bilden.

In drei Fällen sind ausgeprägt gemistozytäre Zellformen vorhanden, die stets intensiv angefärbt sind.

In drei Fällen ist keine Anfärbung von Tumorzellen zu sehen.

Die in den – soweit lichtmikroskopisch erkennbar – nicht von Tumor infiltrierten Arealen der Randzone vorhandenen Zellen sind in geringerem Ausmaß positiv für TNF α (0,26 in der Tumorrandzone, was etwa 7% entspricht; nur in sechs Fällen ist in diesen nicht-tumorösen Abschnitten überhaupt eine Anfärbung zu sehen. Sowie 0,48 (12%) im Normalgewebe; hier sind lediglich vier Fälle positiv).

Die Anfärbung der Zellen beschränkt sich stets auf das Zytoplasma, in keinem der Fälle ist eine Färbung des Zellkernes zu sehen. Diese Zytoplasma-Anfärbung ist zumeist gleichmäßig, in fünf Fällen ergibt sich jedoch ein feingranuläres Expressionsmuster von TNF α .

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

In allen Präparaten sind strichförmige bis großflächige Nekrosezonen zu finden, die sich in zwei Fällen unspezifisch intensiv anfärben. In den übrigen Fällen unterscheidet sich die Anfärbung der Nekrosezonen nicht von der übrigen Hintergrundfärbung.

Die in den perinekrotischen Arealen gelegenen Tumorzellen unterscheiden sich in ihrem Anfärbungsverhalten nicht von den restlichen, im vitalen Tumorgewebe befindlichen Zellen.

Lediglich in einem Fall ist eine deutliche perinekrotische Expressionssteigerung für TNF α zu sehen.

Gefäße

Sowohl in den Bezirken vitalen Tumorgewebes als auch in morphologisch nicht von Tumor infiltrierten Gewebearealen zeigt sich eine Expression von TNF α in den Gefäßen.

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.4)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF-R1-exprimierender Tumorzellen beträgt im Mittel 1,09 (Min: 0; Max: 4). Dies entspricht etwa 27%. In fünf Fällen findet sich ein fokales Expressionsmuster, in dem intensiv gefärbte Tumorzellen in Form von Straßen und kleineren Zellnestern das Tumorgebiet durchsetzen.

In zwei Fällen sind es hauptsächlich gemistozytäre neoplastische Astrozyten, die durch eine Expression von TNF-R1 imponieren.

Bei drei Fällen ist keine Anfärbung von Tumorzellen auszumachen.

Betrachtet man die Tumorrundzonen der Präparate, so weisen die dort vorhandenen Gliazellen weitaus geringere Expressionsraten auf. Hier liegt der Anteil der TNF-R1-positiven Zellen bei 0,30 (8%). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass jeweils in nur vier Fällen überhaupt angefarbte Gliazellen zu finden sind.

Bei TNF-R1-exprimierenden Zellen ist stets eine Anfärbung des Zytoplasmas zu sehen, eine Anfärbung des Zellkernes findet sich nicht. Dabei ist das Zytoplasma generell diffus angefarbt, es sind keine intrazytoplasmatischen Granulae o.ä. auszumachen.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

Die Untersuchung der mehr oder weniger ausgeprägt vorhandenen nekrotischen Bereiche der Präparate zeigt in drei Fällen eine intensive generalisierte, wahrscheinlich unspezifische Anfärbung der Nekrosezonen.

Die Expression in den perinekrotischen Tumorzellen entspricht der des vitalen Tumorgewebes. In vier Fällen zeigt sich eine perinekrotische Expressionssteigerung.

Gefäße

In den Gefäßen zeigt sich eine Expression von TNF-R1 sowohl in Bereichen des vitalen Tumorgewebes, als auch in den Präparateanteilen, die keine pathologischen Veränderungen aufweisen.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.5)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TRAIL-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 1,17 (Min: 0; Max: 4). Dies entspricht knapp 30%. In sechs Fällen ist ein fokales Expressionsmuster vorhanden. Zum Teil finden sich hier straßenförmige Züge intensiv gefärbter Zellen innerhalb des Tumorgebietes, zum anderen sind jedoch auch kleine Gruppen positiver Zellen zu sehen. In den Präparaten, die eine gemistozytäre Tumorzellkomponente aufweisen, ist auch hier zu erkennen, dass diese stets intensiv angefärbt sind.

In sechs Fällen wird TRAIL im Tumorgewebe nicht exprimiert.

Gliazellen in Gewebeabschnitten, die lichtmikroskopisch keine pathologischen Veränderungen aufweisen, färben sich in jeweils sechs der untersuchten Fälle an. Im Mittel beträgt der Anteil positiver Zellen 0,35 (9%; in der Tumorrandszone), bzw. 0,39 (10%; im Normalkontrollgewebe).

In allen untersuchten Fällen zeigt sich stets eine Anfärbung des Zytoplasmas, niemals ist ein gefärbter Zellkern zu finden. Hierbei ist ausschließlich eine diffuse, generalisierte Färbung des Zytoplasmas zu sehen, es liegen keine intrazytoplasmatischen Granulae oder Vesikel vor.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

Die Betrachtung der Nekrosezonen zeigt, dass diese sich bis auf eine Ausnahme nicht anfärben. In den perinekrotischen Tumoranteilen kommt es jedoch in fünf Fällen zu einer deutlichen Expressionssteigerung von TRAIL in den Tumorzellen. Es kommt zu wallartigen Formationen von positiven Zellen um die Nekrosezonen herum, die inmitten von Tumorgewebe liegen, das eine deutlich geringere Expression von TRAIL zeigt.

Gefäße

Bei der Untersuchung der Gefäße ist zu erkennen, dass diese sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe zum Teil positiv für TRAIL sind.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.5)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil APAF-1-exprimierender Tumorzellen liegt bei 8% im Mittel (Min: 2%, Max: 50%). Zu beachten ist, dass in lediglich zwölf (ca. 50%) der Fälle überhaupt eine Expression von APAF-1 zu sehen ist (s. Abb. 7.3.2). Von diesen zwölf Fällen zeigen wiederum fünf ein deutliches fokales Expressionsmuster. Sofern sich im Tumorgewebe Gemistozyten befinden, färben diese sich intensiv an. In elf Fällen werden durch den APAF-1 Antikörper keine Zellen markiert.

In den Tumorrandgebieten der untersuchten Fälle sind im Mittel lediglich 0,7% der Gliazellen positiv. Hierbei ist zu beachten, dass in nur drei von 23 Fällen überhaupt eine Anfärbung zu sehen ist (auch dann sind jedoch nur maximal 5% der Gliazellen positiv). Die Expressionsrate von APAF-1 ist somit in diesen Gewebeanteilen der Präparate deutlich niedriger als im vitalen Tumorgewebe. Stets zeigt sich eine diffuse, zum Teil auch fein granuläre Anfärbung des Zytoplasmas, niemals sind Zellkerne gefärbt.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

In drei der Fälle färben sich die Nekrosezonen deutlich und unspezifisch an. Ebenfalls in drei Fällen ist eine deutliche wallartige Anfärbung der perinekrotisch liegenden Tumorzellen zu erkennen. Diese setzen sich deutlich gegen das umgebende Tumorgewebe ab, das insgesamt eine schwächere Expression von APAF-1 zeigt.

Gefäße

Die Gefäße sind zum überwiegenden Teil negativ für APAF-1. Lediglich in zwei Fällen findet sich eine Anfärbung der Gefäße im vitalen Tumorgewebe, in einem der beiden Fälle sind auch die Gefäße in tumorfreien Gewebeanteilen gefärbt.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.6)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Im Mittel sind 1,91 der Tumorzellen in den untersuchten Präparaten positiv für SMAC (Min: 0; Max: 3). Dies entspricht etwa 48% aller Tumorzellen. In nur drei Fällen ist keine Anfärbung des vitalen Tumorgewebes zu sehen. In drei Fällen sind fokal einzelne Zellnester

positiv für SMAC, in zwei weiteren Fällen zeigt sich ein straßenförmiges Expressionsmuster von SMAC im Tumorgewebe.

Die Betrachtung der Tumorrandbereiche der untersuchten Präparate zeigt eine deutlich geringere Expression von SMAC in den Gliazellen. Sie liegt in den Tumorrandgebieten im Mittel bei 0,09 (entspricht etwa 2%). Hierbei ist zu beachten, dass sich in nur drei Fällen überhaupt eine fokale Anfärbung vereinzelter Zellen für SMAC zeigt, während in allen anderen Fällen die Gliazellen nicht gefärbt sind. Im vitalen Tumorgewebe der untersuchten Präparate ist demnach insgesamt eine deutlich höhere Expressionsrate für SMAC erkennbar. In sämtlichen Präparaten ist das Zytoplasma gefärbt, niemals der Zellkern. In mehreren Fällen ist ein feingranuläres, vesikelartiges Expressionsmuster von SMAC zu sehen.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

Einige Nekrosezonen sind unspezifisch angefärbt. In 13 Fällen (> 50%) kommt es zu einer Steigerung der Expression von SMAC in den perinekrotischen Tumorzellen. Sie heben sich deutlich gegen das umgebende insgesamt meist SMAC-negative Tumorgewebe ab. Es sind hier wallartige, die Nekrosezonen umgebende Zellformationen zu sehen.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße zeigt, dass diese sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe zum Teil positiv für SMAC sind (etwa gleich häufig).

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.6)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil an Caspase-9-exprimierenden Tumorzellen liegt bei den untersuchten Fällen im Mittel bei 2,30 (Min: 1; Max: 4), was etwa 58% entspricht. Hierbei sind in allen Präparaten Caspase-9-positive Zellen zu sehen. In 15 Fällen sind dabei die Tumorzellen nicht gleichmäßig verteilt angefärbt. So sind zum Teil fokal positive Zellnester im insgesamt eher spärlich angefärbten Tumorgewebe zu sehen. In einigen Fällen sind die Caspase-9-positiven Tumorzellen netzartig verteilt. Diese retikulären Muster finden sich häufig in perivaskulären, aber auch in perinekrotischen Gewebeabschnitten.

Die Expression von Caspase-9 ist streng auf das vitale Tumorgewebe beschränkt. Bei Betrachtung der Tumorrandzonen sowie der lichtmikroskopisch nicht pathologisch veränderten Gewebeabschnitte zeigen sich nahezu keine markierten Zellen. Der Anteil

positiver Zellen liegt in den Tumorrandozonen lediglich bei 0,04 (ca. 1%). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in nur einem Fall überhaupt markierte Zellen zu sehen sind. Im Normalkontrollgewebe liegt der Anteil positiver Zellen bei 0,00. Es sind in keinem der Fälle angefärbte Zellen zu sehen.

In keinem der Fälle ist eine Anfärbung der Zellkerne festzustellen. Die positiven Zellen zeigen eine zytoplasmatische Anfärbung, die bis weit in die Zellfortsätze hineinreicht (s. Abb. 7.3.3 und 7.3.4).

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

Vereinzelt zeigen die Nekrosezonen eine unspezifische Färbung. In 13 Präparaten (etwa 50%) findet sich ein perinekrotisches Verteilungsmuster von Caspase-9. Hier sind die Tumorzellen, die die Nekrosezonen umgeben, vermehrt positiv für Caspase-9, während das restliche Tumorgewebe eine eher geringere Expression von Caspase-9 zeigt. Es kommt so perinekrotisch zu wallartig und ringförmig aussehenden Zellformationen.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren zum Teil Caspase-9. Dies gilt auch für die Gefäße der tumorzellfreien Gewebeabschnitte.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.7)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Die Expressionsrate von Caspase-2 liegt im Tumorgewebe durchschnittlich bei 13% (Min. 1%, Max. 70%). In einem der 23 Fälle ist keine Expression von Caspase-2 feststellbar. In drei der Fälle sind fokale positive Zellnester im ansonsten negativen Tumorgewebe zu sehen. In fünf Fällen ist eine perinekrotische Steigerung der Expression von Caspase-2 zu erkennen (s. Abb. 7.3.5).

Zu beachten ist, dass die gemistozytären Tumorzellanteile stets eine besonders intensive Anfärbung zeigen.

Die Betrachtung der Tumorrandozonen sowie der Gewebeanteile der Präparate, die nicht von Tumor infiltriert sind, ergibt einen geringeren Anteil von Zellen, die positiv für Caspase-2 sind. In den Tumorrandozonen ist in nur vier Fällen eine Expression von Caspase-2 feststellbar. Diese liegt im Mittel bei 4%.

In allen Fällen ist das Zytoplasma der Zellen angefärbt, niemals findet sich eine Anfärbung des Zellkernes. Das Zytoplasma zeigt dabei eine diffuse Anfärbung, Vakuolen oder granuläre Muster kommen nicht zur Darstellung.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

In drei Fällen zeigen die Präparate unspezifisch intensiv gefärbte Nekrosezonen, in den restlichen Fällen färben sich die Nekrosezonen nicht an.

In fünf der Fälle kommt es zu einer perinekrotischen Expressionssteigerung von Caspase-2. In diesen Fällen zeigen die perinekrotisch liegenden Tumorzellen eine intensive Expression von Caspase-2, während sie im restlichen Tumorgewebe weit weniger ausgeprägt exprimiert wird. Es kommt so zu wallartigen und ringförmigen Formationen Caspase-2-positiver Tumorzellen um die Nekrosezonen herum.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße zeigt eine Anfärbung von Gefäßen sowohl im vitalen Tumorgewebe, als auch in den Gewebeanteilen, die nicht von Tumorzellen infiltriert sind.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.7)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-3-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 2,61 (Min: 0; Max: 4). Dies entspricht etwa 65%. Lediglich in zwei Fällen sind keine Zellen zu sehen, die für Caspase-3 positiv sind.

Etwa die Hälfte der Fälle, die im Tumorgewebe Caspase-3 exprimieren, lassen ein fokales Expressionsmuster erkennen. In diesen Fällen können intensiv gefärbte Zellinseln inmitten eines Tumorgebietes liegen, das ansonsten keine Anfärbung zeigt. Diese positiven Tumorzellanteile können einen unterschiedlichen Anteil des gesamten Tumorgewebes in den Präparaten ausmachen. In den übrigen Fällen sind die Caspase-3-exprimierenden Tumorzellen relativ gleichmäßig diffus und einzeln über das gesamte Tumorgewebe verteilt.

Die Betrachtung der Tumorrandgebiete sowie derjenigen Anteile der Präparate, die nicht von Tumor infiltriert sind, zeigt eine geringere Expressionsrate von Caspase-3 in den entsprechenden Gliazellen. So beträgt der Anteil Gliazellen, die positiv für Caspase-3 sind, in den Tumorrandgebieten 1,17. Dies entspricht etwa 29%. In den nicht von Tumor infiltrierten Gewebeanteilen der untersuchten Präparate liegt die Expressionsrate bei 1,00, was etwa 25%

entspricht. Hierbei ist zu beachten, dass lediglich in elf Fällen überhaupt eine Expression des Apoptose-assoziierten Faktors Caspase-3 erkennbar ist.

In allen Fällen ist das Zytoplasma der Zellen angefärbt, niemals findet sich eine Anfärbung des Zellkernes. Das Zytoplasma ist stets diffus angefärbt, es sind keine Granula oder Vesikel erkennbar.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

In fünf Fällen zeigt sich eine unspezifische intensive Anfärbung der Nekrosezonen.

In 17 der 23 Präparate liegt eine perinekrotische Expressionssteigerung für Caspase-3 in den Tumorzellen vor. Hier bilden die perinekrotisch liegenden Tumorzellen Caspase-3-positive Zellformationen, die wallartig oder ringförmig aussehen und im insgesamt weniger exprimierenden restlichen Tumorgewebe liegen.

Gefäße

Die Gefäße können sowohl im Tumorgewebe als auch in nicht von Tumor infiltrierten Gewebegebieten eine Expression von Caspase-3 zeigen. Dies ist in mehreren Fällen zu sehen.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.8)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-6-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 2,04 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 51%. Alle Präparate zeigen eine Expression von Caspase-6 im Tumorgewebe. In zwei der Fälle kommt es zu einer fokalen Expressionssteigerung von Caspase-6. In diesen Präparaten sind Tumoranteile zu sehen, die sich in ihrer Anfärbung deutlich gegen das negativere Resttumorgewebe abgrenzen (s. Abb. 7.3.6). In zwei weiteren Fällen bilden die Caspase-6 positiven Tumorzellen retikuläre Formationen.

Die gemistozytären Tumorzellanteile zeigen stets eine besonders ausgeprägte Anfärbung.

Die Betrachtung der Tumorrاندzonen sowie der Anteile, die keine Infiltration von Tumorzellen erkennen lassen, ergibt geringere Expressionsraten für Caspase-6.

In den Tumorrاندgebieten liegt der Anteil von Gliazellen, die Caspase-6 exprimieren, im Mittel bei 0,87. Dies entspricht etwa 22%. In den Normalgeweben liegt der Anteil Caspase-6-exprimierender Gliazellen durchschnittlich bei 1,52, was etwa 38% entspricht.

In allen Fällen ist das Zytoplasma gefärbt, niemals der Zellkern. In einem der Fälle sind positive Granula im sonst ungefärbten Zytoplasma zu sehen.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

Bei keiner der Nekrosezonen kommt es zu einer Anfärbung. In zwei Fällen findet sich jedoch eine deutliche perinekrotische Expressionssteigerung von Caspase-6. Es kommt so zu ringförmigen Zellformationen in den Präparaten.

Gefäße

Die Gefäße, die im vitalen Tumorgewebe liegen, zeigen in allen Fällen eine Expression von Caspase-6. Auch in den Gewebeanteilen der Präparate, die nicht durch Tumor infiltriert sind, kommt es in einigen Fällen zu einer Anfärbung der Gefäße.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.8)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In 16 Fällen finden sich im Tumorgewebe Caspase-7-positive Zellen. Hierbei liegt die Rate gefärbter Tumorzellen im Mittel bei 6% (Min: 0,5%; Max: 60%). In vier der Fälle, die Caspase-7 exprimieren, liegen fokal Nester positiver Tumorzellen im sonst spärlich gefärbten Gewebe. Diese Zellinseln machen unterschiedlich große Anteile des gesamten Tumorgewebes aus. Die restlichen Fälle lassen nur vereinzelt Tumorzellen erkennen, die positiv für Caspase-7 sind.

In keinem der Präparate sind in den Tumorrundzonen oder im nicht von Tumor infiltrierten Normalgewebe Gliazellen zu finden, die Caspase-7 exprimieren. In sämtlichen Fällen ist das Zytoplasma der Caspase-7-exprimierenden Zellen gefärbt. Eine Anfärbung von Zellkernen ist nicht zu erkennen.

Nekrosezonen und perinekrotische Areale

In einem der untersuchten Fälle ist eine unspezifische intensive Anfärbung der Nekrosezonen zu sehen. Die perinekrotischen Tumorzellen unterscheiden sich in ihrem Färbeverhalten nicht von den übrigen Tumorzellen. In keinem der Fälle sind perinekrotische Formationen Caspase-7-positiver Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

Sowohl im vitalen Tumorgewebe, als auch in den Präparateanteilen, die keine pathologischen Veränderungen aufweisen, kommt es zu einer Anfärbung der Gefäße.

4.2.2 Oligodendrogliome (N=6; WHO-III; s. Tab. 7.1.1)

Die statistische Analyse mittels Korrelationsdiagrammen wurde bei folgenden Faktoren verwendet:

Es werden die Expressionsraten der TNF α -positiven Tumorzellen gegen TNF-R1- und TUNEL-positive Tumorzellen aufgetragen (s. Diagramme 7.2.12-13 und Kapitel 5.2.2.1). Weiterhin wird eine Korrelation der Expressionsraten von TRAIL mit denen von SMAC und TUNEL untersucht (s. Diagramme 7.2.14-15 und Kapitel 5.2.2.1). Zudem werden die Expressionsraten von SMAC und Caspase-9 hinsichtlich einer Korrelation analysiert (s. Diagramm 7.2.16 und Kapitel 5.2.2.2), ebenso wie die Expressionsraten von Caspase-2 und SMAC sowie Caspase-2 und Caspase-3 (s. Diagramme 7.2.17-18 und Kapitel 5.2.2.3). In keinem der Fälle besteht eine klare Korrelation für die Expressionsraten der gegeneinander aufgetragenen Faktoren.

Die statistische Analyse mittels H- und U-Test (s. Kapitel 3.6.1) führt zu folgenden Ergebnissen:

Die Proliferationsrate (entsprechend der Anzahl MIB-1-positiver Tumorzellen) ist bei WHO-III-Tumoren signifikant niedriger als bei WHO-IV-Tumoren ($p < 0,0001$; s. Kapitel 5.2.1), hingegen unterscheiden sich die Raten der TUNEL-positiven Tumorzellen bei den Tumoren der unterschiedlichen Malignitätsgrade nicht signifikant voneinander ($p = 0,934$; s. Kapitel 5.2.1). Die Fälle, bei denen es zu einer Co-Expression der Faktoren SMAC und TRAIL kommt, zeigen keine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber den Fällen, die lediglich SMAC, nicht jedoch TRAIL exprimieren ($p = 0,127$; s. Kapitel 5.2.2.2). Ebenso führt eine Co-Expression von Caspase-9 und APAF-1 nicht zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate gegenüber den Fällen, die nur Caspase-9 exprimieren ($p = 0,275$; s. Kapitel 5.2.2.2).

4.2.2.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Der Anteil von Zellen, die in den untersuchten Präparaten als TUNEL-positiv markiert sind, liegt im Durchschnitt bei 0,5% (Min: 0,29; Max: 1,06; s. Abb. 7.3.7). In einem der Fälle sind keine apoptotischen Zellen zu eruieren. In einem anderen Fall sind hauptsächlich perinekrotisch gelegene Zellen TUNEL-positiv.

Hingegen liegt der Durchschnitt proliferierender Zellen in den Präparaten bei 22,5% (Min. 5%; Max. 50%).

Die Rate der Proliferation ist somit um ein Vielfaches höher als die Apoptoserate.

4.2.2.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.9-11)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.9)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF α -exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 2,00 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht 50%. In zwei der untersuchten Fälle ist ein Expressionsmuster zu erkennen. Hierbei liegen fokale gehäufte TNF α -positive Tumorzellhaufen in einem sonst spärlicher angefärbten Resttumorgewebe.

In den Tumorrandzonen, sowie in den Gewebeanteilen, die nicht tumorinfiltriert sind, finden sich geringere Expressionsraten von TNF α . In den Tumorrandgebieten sind in keinem der untersuchten Fälle Zellen zu finden, die eine Expression von TNF α zeigen.

In nicht tumorös veränderten Gewebeanteilen liegt die Expressionsrate von TNF α durchschnittlich bei 0,83. Dies entspricht etwa 21%.

In allen untersuchten Fällen ist eine Anfärbung des Zytoplasmas zu sehen. Es finden sich keine angefärbten Zellkerne.

Nekrosezonen/ perinekrotische Areale

In zwei der Fälle liegen keine Nekrosezonen im Präparat vor. In drei der übrigen vier Fälle ist eine unspezifische intensive Anfärbung der Nekrosezonen zu erkennen.

In einem der Fälle ist eine deutliche perinekrotische Expressionssteigerung für TNF α zu sehen. Die TNF α -exprimierenden Tumorzellen bilden intensiv gefärbte Randwände um die Nekrosezonen herum, während das restliche Tumorgewebe geringere Expressionsraten von TNF α zeigt.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße zeigt, dass sowohl im vitalen Tumorgewebe als auch in Gewebeabschnitten, die nicht tumorartig verändert sind, eine Expression von TNF α in den Gefäßen vorkommt.

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.9)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF-R1-exprimierender Tumorzellen liegt in den untersuchten Präparaten im Durchschnitt bei 0,83 (Min: 0; Max: 2). Dies entspricht etwa 21%. In einem Fall finden sich Areale innerhalb des Tumorgewebes, in denen es zu einer fokalen Anhäufung von Tumorzellen kommt, die positiv für TNF-R1 sind. Ein Fall zeigt keine Expression von TNF-R1 in den Tumorzellen.

In den Tumorrandozonen sowie in den angrenzenden Gewebereichen, die frei von Tumorzellen sind, ist keine Expression von TNF-R1 zu verzeichnen.

In allen Präparaten findet sich eine Anfärbung des Zytoplasmas, die Zellkerne bleiben stets ungefärbt.

Nekrosezonen/ perinekrotische Areale

In vier der Fälle finden sich Nekrosezonen, die jedoch nicht angefärbt sind. In zwei der Fälle, die nekrotische Areale enthalten, ist eine perinekrotische Expressionssteigerung von TNF-R1 in den Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

In keinem der Fälle ist eine Expression von TNF-R1 in den Gefäßen zu verzeichnen.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.9)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In vier der untersuchten Fälle findet sich eine Expression von TRAIL in den Tumorzellen. Diese liegt im Durchschnitt bei 0,83, was etwa 21% entspricht (Min: 0; Max: 2). In einem der Fälle ist vor allem die gemistozytäre Tumorkomponente positiv für TRAIL.

Die Betrachtung der Tumorrandozonen sowie des angrenzenden Normalgewebes zeigt deutlich geringere Expressionsraten für TRAIL. Im Normalgewebe liegt der Anteil TRAIL-exprimierender Gliazellen bei 0,33. Das entspricht etwa 8%. Hierbei ist zu beachten, dass sich in nur einem Fall überhaupt eine Expression von TRAIL in den Gliazellen des Normalgewebes zeigt. In den Tumorrandozonen sind keine TRAIL-positiven Gliazellen zu sehen.

Stets ist das Zytoplasma der TRAIL-exprimierenden Zellen gefärbt, nicht ihr Kern.

Nekrosezonen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. In keinem der Fälle ist eine perinekrotische Expressionssteigerung für TRAIL zu erkennen.

Gefäße

Sowohl im Tumorgewebe als auch in den Bereichen der Präparate, die frei von Tumor sind, kommt es zum Teil zu einer Expression von TRAIL in den Gefäßen.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.9)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil APAF-1-exprimierender Tumorzellen beträgt in den untersuchten Präparaten durchschnittlich 3% (Min: 0,1%; Max: 15%). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass lediglich drei (50%) der Präparate überhaupt eine Expression für APAF-1 zeigen.

In den Tumorrandzonen der Präparate sowie in den Gewebeanteilen, die frei von Tumorerkrankung sind, ist keine Expression von APAF-1 feststellbar.

Die APAF-1-positiven Zellen zeigen sämtlich eine Anfärbung des Zytoplasmas. Eine Anfärbung der Zellkerne ist in keinem der untersuchten Präparate vorhanden.

Nekrosezonen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. Auch kommt es zu keiner Expressionssteigerung von APAF-1 in den perinekrotischen Tumorzellen.

Gefäße

In keinem der Fälle ist eine Anfärbung der Gefäße zu sehen.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.10)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In allen untersuchten Fällen kommt es zu einer Expression von SMAC im Tumorgewebe. Der Anteil SMAC-positiver Tumorzellen beträgt durchschnittlich 3,67 (Min: 2; Max: 4). Dies entspricht etwa 92%. In zwei der Fälle finden sich im insgesamt SMAC-positiven Tumorgewebe fokale Zellnester, die keine Expression von SMAC zeigen. Zum Teil sind

ungefärbte Tumorzellen zu erkennen, die das SMAC-exprimierende Resttumorgewebe straßenförmig durchwandern.

In den Tumorrandzonen sowie in den Abschnitten der Präparate, die frei von Tumordinfiltration sind, wird SMAC nicht exprimiert.

In allen untersuchten Fällen findet sich eine Anfärbung des Zytoplasmas. Eine Anfärbung der Zellkerne wird nicht beobachtet.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist angefärbt. In einem der Fälle kommt es in den perinekrotischen Tumorbereichen zu einer deutlichen Expressionssteigerung von SMAC in den Tumorzellen. Es sind wall- und ringförmige Formationen SMAC-positiver Tumorzellen im sonst gering markierten Tumorgewebe zu sehen.

Gefäße

In keinem der Präparate ist eine Expression von SMAC in den Gefäßen zu erkennen.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.10)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle untersuchten Fälle zeigen eine Expression von Caspase-9 im Tumorgewebe. Der Anteil Caspase-9-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 1,83 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 46%.

In zwei der Fälle ist eine fokale Expression von Caspase-9 in den Tumorzellen zu erkennen. Hier liegen Zellnester positiver Tumorzellen im insgesamt von positiven Tumorzellen nur spärlich durchsetzten Tumorgewebe.

In den angrenzenden Tumorrandzonen sistiert die Expression von Caspase-9 abrupt. Auch in den Arealen der Präparate, die morphologisch keine tumorösen Veränderungen bieten, liegt der Anteil Caspase-9-positiver Gliazellen bei 0,00.

Sämtliche Fälle zeigen eine Expression von Caspase-9 im Zytoplasma der Tumorzellen. Die Zellfortsätze kommen hierbei gut zur Darstellung (s. Abb. 7.3.8). Eine Anfärbung der Zellkerne kommt in keinem der Präparate vor.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen färben sich nicht an. In einem der Fälle findet sich eine Expressionssteigerung von Caspase-9 in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen. Diese bilden intensiv gefärbte wallartige Formationen um die Nekrosen herum.

Gefäße

Die Gefäße, die sich innerhalb der Bezirke vitalen Tumorgewebes der Präparate finden, zeigen sehr häufig eine Expression von Caspase-9. Dies kommt auch bei den Gefäßen vor, die in Bereichen liegen, in denen morphologisch keine tumorartigen Veränderungen vorhanden sind.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.10)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-2-exprimierender Tumorzellen liegt im Durchschnitt bei 8% (Min: 1%; Max: 50%). Zu beachten ist, dass in einem der untersuchten Fälle Caspase-2 nicht exprimiert wird. In zwei der Fälle liegen Gruppen von Tumorzellen, die stark positiv für Caspase-2 sind (bis zu 50% der hier vorkommenden Tumorzellen), im sonst spärlich bis gar nicht markierten Tumorgewebe.

In den Zellen der Tumorrandozonen oder im angrenzenden Normalgewebe wird Caspase-2 nicht exprimiert.

In allen Fällen wird Caspase-2 im Zytoplasma der Tumor- bzw. Gliazellen exprimiert. Die Zellkerne bleiben stets ungefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen lässt eine Anfärbung erkennen. Auch kommt es zu keiner Steigerung der Expression von Caspase-2 in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen.

Gefäße

Die Betrachtung der innerhalb des vitalen Tumorgewebes liegenden Gefäße zeigt, dass diese zum Teil Caspase-2 exprimieren.

Die Gefäße, die innerhalb des nicht tumorösen Normalgewebes liegen, zeigen keine Anfärbung.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.10)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle untersuchten Fälle zeigen eine Expression von Caspase-3. Dabei liegt der Anteil Caspase-3-positiver Tumorzellen bei 2,00 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 50% aller Tumorzellen. In der Hälfte der Fälle sind Tumorabschnitte zu finden, in denen es zu einer fokalen Expressionssteigerung von Caspase-3 kommt. So sind in einigen Tumorbereichen dieser Fälle bis zu 75% der Zellen positiv für Caspase-3, während andere Bezirke desselben Tumors lediglich wenige positive Tumorzellen zeigen.

Die Tumorrandzonen sowie die angrenzenden Normalgewebe, die keine morphologischen Zeichen von Tumorausbreitung aufweisen, zeigen deutlich geringere Expressionsraten von Caspase-3. Im Tumorrandgebiet sind keine Zellen positiv für Caspase-3. Im angrenzenden Normalgewebe liegt der Anteil Caspase-3-exprimierender Gliazellen im Mittel bei 0,83. Dies entspricht etwa 21%. Zu beachten ist, dass in nur zwei der Fälle Gliazellen vorkommen, die positiv für Caspase-3 sind.

In allen Fällen wird Caspase-3 zytoplasmatisch exprimiert, eine Anfärbung der Zellkerne ist nicht zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen zeigen keine Anfärbung. In drei der vier Fälle, in denen Nekrosezonen vorkommen, ist eine Expressionssteigerung von Caspase-3 in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen zu sehen. Diese bilden intensiv gefärbte Randwände um die Nekrosezonen herum und heben sich dadurch deutlich gegen das restliche spärlicher gefärbte Tumorgewebe ab.

Gefäße

Die im vitalen Tumorgewebe der Präparate liegenden Gefäße zeigen häufig eine Expression von Caspase-3.

Die Gefäße, die innerhalb des nicht tumorartig veränderten Normalgewebes liegen, lassen keine Anfärbung erkennen.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.11)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle untersuchten Fälle zeigen eine Expression von Caspase-6 im vitalen Tumorgewebe. Der durchschnittliche Anteil Caspase-6-positiver Tumorzellen liegt bei 1,33 (Min: 1; Max: 2). Dies entspricht etwa 33%.

Drei der untersuchten Fälle lassen innerhalb des Tumorgewebes Bereiche erkennen, in denen die Expression von Caspase-6 stark variiert. So können beispielsweise Tumoreale Expressionsraten von bis zu 50% zeigen, während in unmittelbarer Nähe nur ca. 10% der Tumorzellen gefärbt sind. Es entstehen so stark positive Zellinseln oder das Tumorgewebe durchwandernde Straßen gefärbter Tumorzellen.

Die Zellen der Tumorrandozonen sowie der angrenzenden Normalgewebe, die frei von Tumorzellen sind, zeigen eine weit geringere Expression von Caspase-6. In den Tumorrandozonen liegt die Expressionsrate bei 0,33 (entspricht etwa 8%), in den Normalgeweben bei 0,67 (entspricht etwa 17%).

In allen Fällen wird der Apoptose-assoziierte Faktor Caspase-6 zytoplasmatisch exprimiert, eine Anfärbung der Zellkerne ist in keinem der Präparate zu finden (s. Abb. 7.3.9 und 7.3.10).

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen weisen keine Anfärbung auf.

Eine Steigerung der Expressionsrate von Caspase-6 ist in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen in keinem der Fälle zu verzeichnen.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße ergibt, dass es sowohl im vitalen Tumorgewebe als auch in morphologisch nicht tumorös veränderten Gewebearealen zu einer Expression von Caspase-6 in den Gefäßen kommen kann.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.11)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In keinem der untersuchten Fälle sind Zellen zu finden, die Caspase-7 exprimieren. Sämtliche Präparate sind negativ für Caspase-7.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die in den Präparaten vorhandenen Nekrosezonen zeigen keine Anfärbung. Auch lässt das perinekrotische Tumorgewebe keine Expression von Caspase-7 erkennen.

Gefäße

Sämtliche in den Präparaten vorhandenen Gefäße sind negativ für Caspase-7 und zeigen keine Anfärbung.

4.2.3 Ependymome (N=2; WHO-III; s. Tab. 7.1.1)

Für Ependymome kann aufgrund der geringen Fallzahl keine Korrelationsanalyse anhand von Verteilungsdiagrammen vorgenommen werden.

Die Analyse mittels H- und U-Test (s. Kapitel 3.6.1) ergibt folgendes:

Die Expressionsraten von TNF α bei WHO-III-Tumoren sind signifikant erhöht gegenüber denen der WHO-IV-Tumore ($p=0,007$; s. Kapitel 5.3.2.1). Die Expressionsraten von TNF-R1 und TRAIL unterscheiden sich bei den Tumoren der unterschiedlichen Malignitätsgrade nicht signifikant voneinander ($p=0,283$ bzw. $p=0,228$; s. Kapitel 5.3.2.1).

4.2.3.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Der Anteil an Zellen, die TUNEL-positive DNA-Einzelstrangbrüche aufweisen, beträgt durchschnittlich 0,26% (Min: 0,00%; Max: 0,51%). Dabei sind in einem der Fälle keine Zellen zu finden, die Einzelstrangbrüche zeigen, wie sie im Rahmen apoptotischer Prozesse vorkommen. In dem anderen Fall sind die apoptotischen Zellen disseminiert über das Präparat verteilt. Besondere Verteilungsmuster, etwa im Rahmen einer perinekrotischen Expressionssteigerung, sind nicht vorhanden.

Die Rate proliferierender Zellen ist deutlich höher. Sie liegt im Durchschnitt bei 17,5% (Min: 5%; Max: 30%). Auch hier verteilen sich die proliferierenden Zellen gleichmäßig über die Anteile vitalen Tumorgewebes.

4.2.3.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.12 und 7.1.13)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF α -exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 2,00 (Min: 2,00; Max: 2,00). Dies entspricht etwa 50%. In allen Fällen ist eine Expression von TNF α zu sehen. In einem Fall sind hierbei Bereiche im vitalen Tumorgewebe zu erkennen, die fokale Expressionssteigerung von TNF α bieten (s. Abb. 7.3.11). Hier ziehen positive Tumorzellen straßenförmig durch Areale weniger TNF α -exprimierenden Tumorgewebes. In dem anderen Fall sind die TNF α -exprimierenden Tumorzellen gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt.

Stets wird TNF α zytoplasmatisch exprimiert, eine Anfärbung der Kerne der Tumorzellen ist nicht zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle ist eine unspezifische intensive Anfärbung der Nekrosezonen zu sehen. In dem anderen Fall ist keine der Nekrosen angefärbt.

Eine perinekrotische Expressionssteigerung von TNF α ist in keinem der Fälle zu beobachten.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße zeigt, dass diese zum Teil TNF α exprimieren.

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In allen Fällen wird TNF-R1 exprimiert. Dabei liegt der Anteil TNF-R1-positiver Tumorzellen bei durchschnittlich 1,00 (Min: 1,00; Max: 1,00), was etwa 25% entspricht.

Dabei sind in beiden Fällen die positiven Tumorzellen gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt. Insel- oder straßenförmige Bezirke, in denen eine fokale Expressionssteigerung von TNF-R1 in den Tumorzellen zu beobachten wäre, finden sich nicht.

Stets wird TNF-R1 zytoplasmatisch exprimiert. Eine Anfärbung der Zellkerne ist nicht zu erkennen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen färben sich nicht an.

In einem der Fälle ist eine deutliche Expressionssteigerung von TNF-R1 in den perinekrotisch liegenden Tumorzellen zu beobachten. Die positiven Tumorzellen bilden hier intensiv gefärbte Randwälle um die nekrotischen Areale des Tumorgewebes herum.

Gefäße

In keinem der Präparate kommt es zu einer Expression von TNF-R1 in den Gefäßen.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TRAIL-exprimierender Tumorzellen liegt im Durchschnitt bei 1,00 (Min: 1,00; Max: 1,00), was etwa 25% entspricht.

In allen untersuchten Präparaten findet sich eine Expression von TRAIL. Dabei sind die TRAIL-exprimierenden Tumorzellen gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt. Bezirke fokaler Expressionssteigerung sind nicht zu erkennen.

TRAIL wird stets zytoplasmatisch exprimiert. Eine Anfärbung der Kerne ist nicht zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen färbt sich unspezifisch an. Auch eine perinekrotische Expressionssteigerung von TRAIL in den Tumorzellen ist nicht zu finden.

Gefäße

TRAIL wird von den Gefäßen nicht exprimiert.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil APAF-1-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 3% (Min: 0%; Max: 5%).

In einem der Fälle sind dabei die Tumorzellen gleichmäßig über die Areale vitalen Tumorgewebes verteilt. Hier liegt der durchschnittliche Anteil APAF-1-exprimierender Tumorzellen bei etwa 1%.

In dem anderen Fall finden sich fokale Expressionsraten von etwa 5%, während in den Tumorzellen des übrigen vitalen Tumorgewebes APAF-1 nicht exprimiert wird. Es zeigen sich Inseln APAF-1-positiver Tumorzellen, die im sonst ungefärbten Tumorgewebe liegen.

APAF-1 wird immer zytoplasmatisch und nicht nukleär exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle färben sich die Nekrosezonen intensiv an. Eine Expressionssteigerung von APAF-1 in den perinekrotischen Tumorzellen findet sich jedoch nicht.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert APAF-1.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil SMAC-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 3,5 (Min: 3,00; Max: 4,00), was etwa 88% entspricht.

Dabei zeigt die Betrachtung des vitalen Tumorgewebes in einem der Fälle Areale, in denen SMAC von den Tumorzellen fokal nicht exprimiert wird. Diese Bezirke liegen direkt neben Arealen, in denen SMAC bis zu 100% exprimiert wird. Dem Betrachter bietet sich ein fleckig-geschecktes Bild des vitalen Tumorgewebes. Besonders im Übergang zur Tumorrandszone ist eine randsaumartige Expressionssteigerung von SMAC zu erkennen.

Dabei wird SMAC stets zytoplasmatisch exprimiert. Eine Anfärbung der Zellkerne ist in keinem der Präparate zu erkennen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle sind die Nekrosezonen intensiv angefärbt. Hier findet sich auch eine Expressionssteigerung von SMAC in den perinekrotisch liegenden Tumorzellen.

Der andere Fall bietet beides nicht.

Gefäße

SMAC wird in beiden Fällen von den Gefäßen exprimiert.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-9-exprimierender Tumorzellen liegt in den untersuchten Präparaten durchschnittlich bei 1,00 (Min: 1,00; Max: 1,00), was etwa 25% entspricht.

In einem der Fälle sind dabei die Caspase-9-positiven Tumorzellen disseminiert im vitalen Tumorgewebe verteilt. In dem anderen Fall kommt es zu einer fokalen Expression von Caspase-9 im sonst negativen Tumorgewebe.

Stets ist eine zytoplasmatische Expression von Caspase-9 zu sehen, die bis in die distalen Anteile der Zellfortsätze zu erkennen ist. Eine Anfärbung der Zellkerne ist in keinem der Präparate zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In keinem der Fälle kommt es zu einer Anfärbung der Nekrosezonen. Auch eine Expressionssteigerung der perinekrotisch liegenden Tumorzellen ist nicht zu erkennen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert Caspase-9.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Beide Fälle zeigen eine Expression von Caspase-2. Dabei liegt der Anteil Caspase-2-positiver Tumorzellen durchschnittlich bei 43% (Min: 0,5%; Max: 85%).

Ein Fall bietet lediglich einzelne Zellnester, die Caspase-2 exprimieren. Das übrige vitale Tumorgewebe ist negativ für Caspase-2.

Der andere Fall hingegen lässt nur kleine Areale erkennen, in denen Caspase-2 nicht exprimiert wird, während der größte Anteil der Tumorzellen Caspase-2-positiv ist (s. Abb. 7.3.12).

In beiden Fällen ist eine Anfärbung des Zytoplasmas der Tumorzellen zu sehen, die Zellkerne exprimieren Caspase-2 nicht.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keiner der untersuchten Fälle weist eine Anfärbung der Nekrosezonen oder eine Expressionssteigerung für Caspase-2 in den perinekrotischen Tumorzellen auf.

Gefäße

In den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes wird Caspase-2 zum Teil exprimiert.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.12)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-3-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 3,5 (Min: 3,0; Max: 4,0). Dies entspricht etwa 88%.

Die Betrachtung der Präparate zeigt, dass im insgesamt stark positiven vitalen Tumorgewebe Nester von Tumorzellen liegen, die Caspase-3 nicht exprimieren. In einem Fall ist der Gesamtanteil dieser negativen Zellen so gering, dass die Expression von Caspase-3 hier mit 4,0 (entspricht 75%-100%) angegeben wird. In allen Präparaten sind aber negative Zellen vorhanden.

Caspase-3 wird in allen Fällen zytoplasmatisch exprimiert. Eine Anfärbung der Zellkerne ist nicht zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle färben sich die Nekrosezonen intensiv an. Hier kommt es auch zu einer Expressionssteigerung von Caspase-3 in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen.

Der andere Fall lässt weder eine Anfärbung der Nekrosezonen, noch eine perinekrotische Expressionssteigerung von Caspase-3 erkennen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert Caspase-3.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.13)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-6-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 2,5 (Min: 2,0; Max: 3,0). Dies entspricht etwa 63%.

In einem der Fälle fällt dabei auf, dass die perivaskulären Tumorzellen Caspase-6 nicht exprimieren. Es kommt hier zu einer perivaskulären Expressionsminderung in den Präparaten. Der andere Fall zeigt eine gleichmäßige Verteilung Caspase-6-exprimierender Tumorzellen über das vitale Tumorgewebe.

Die Tumorzellen lassen stets eine Anfärbung ihres Zytoplasmas erkennen. In den Zellkernen wird Caspase-6 nicht exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In keinem der Fälle finden sich angefärbte Nekrosezonen. In einem der Fälle ist eine Expressionssteigerung von Caspase-6 in den perinekrotisch gelegenen Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren Caspase-6 zum Teil.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.13)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-7-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 1% (Min: 0,1%; Max: 2%).

Dabei sind in einem der Fälle Areale im vitalen Tumorgewebe zu sehen, in denen Caspase-7 gar nicht exprimiert wird. Diese liegen direkt neben Bereichen, in denen eine Expression von Caspase-7 von bis zu 10% beobachtet werden kann. Vergleicht man den quantitativen Anteil des negativen mit dem des exprimierenden vitalen Tumorgewebes, so sind etwa 2% des gesamten Tumorgewebes positiv für Caspase-7 (siehe Mittelwert).

Die Expression von Caspase-7 ist stets zytoplasmatisch, in keinem der Präparate nukleär.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In keinem der untersuchten Präparate kann eine Anfärbung der Nekrosezonen oder eine Expressionssteigerung von Caspase-7 in den perinekrotischen Tumorzellen beobachtet werden.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren Caspase-7 nicht.

4.2.4 Medulloblastome (N=6; WHO-IV; s. Tab. 7.1.1)

Für folgende Faktoren werden zur statistischen Auswertung Korrelationsdiagramme erstellt:

Es werden die Expressionsraten von MIB-1 mit denen von TUNEL verglichen (s. Diagramm 7.2.19 und Kapitel 5.4.1). Ebenso werden die Expressionsraten von TNF α gegen die von TNF-R1 aufgetragen (s. Diagramm 7.2.20 und Kapitel 5.4.2.1). In beiden Fällen liegt eine Korrelation der Expressionsraten der Faktoren vor, die geringe Fallzahl ist jedoch zu beachten. Keine Korrelation existiert für die Expressionsarten von TNF α und TUNEL, sowie TRAIL und TUNEL (s. Diagramme 7.2.21-22 und Kapitel 5.4.2.1). Auch korrelieren die Expressionsraten von Caspase-2 und SMAC, sowie Caspase-2 und Caspase-3 nicht miteinander (s. Diagramme 7.2.23-24 und Kapitel 5.4.2.3).

Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Expressionsrate von TNF α bei WHO-III- gegenüber WHO-IV-Tumoren ($p=0,007$; Kapitel 5.4.2.1).

4.2.4.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Die Tumorzellen der untersuchten Fälle weisen zu einem durchschnittlichen Anteil von 0,47% (Min: 0%; Max: 1,25%) TUNEL-positive DNA-Fragmente auf. In zwei der Fälle sind keine apoptotischen Zellen zu sehen. Die apoptotischen Zellen liegen ohne erkennbares Verteilungsmuster im vitalen Tumorgewebe. Eine perinekrotische Steigerung der Apoptoserate ist nicht erkennbar.

Die Rate proliferierender Tumorzellen liegt im Durchschnitt bei 47,14% (Min: 20%; Max: 70%).

Der Anteil proliferierender Zellen ist somit um ein Vielfaches höher als der Anteil apoptotischer Tumorzellen.

4.2.4.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.14-16)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.14)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle Fälle exprimieren TNF α im vitalen Tumorgewebe. Der durchschnittliche Anteil TNF α -exprimierender Tumorzellen liegt bei 1,43 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 36%.

In einem der Fälle zeigen Areale des vitalen Tumorgewebes eine fokale Expressionssteigerung von TNF α . Andere Bezirke desselben Tumors exprimieren TNF α nicht.

Die übrigen Fälle lassen solche fokalen Expressionssteigerungen oder -minderungen nicht erkennen. Hier sind die TNF α -positiven Tumorzellen gleichmäßig im Tumorgewebe verteilt. Stets wird TNF α im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert, niemals in deren Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle sind die in den Präparaten vorkommenden Nekrosezonen intensiv unspezifisch angefärbt.

Eine Expressionssteigerung der perinekrotischen Tumorzellen ist nicht zu erkennen.

Gefäße

Die Betrachtung der Gefäße des vitalen Tumorgewebes in den untersuchten Fällen zeigt, dass diese zum Teil TNF α exprimieren.

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.14)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Durchschnitt TNF-R1-positiver Tumorzellen liegt bei 1,00 (Min: 0; Max: 2). Dies entspricht etwa 25%. Zwei der untersuchten Fälle exprimieren TNF-R1 nicht.

Einer der Fälle lässt einzelne Tumorzellnester erkennen, die TNF-R1 exprimieren.

Alle Fälle zeigen eine Expression von TNF-R1 im Zytoplasma der Tumorzellen. In einem der Fälle sind im farblosen Zytoplasma kleine, intensiv gefärbte Vesikel zu sehen. Die Zellkerne färben sich nicht an.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen färben sich in keinem der Fälle an.

In zwei der Fälle kommt es zu einer Steigerung der Expression von TNF-R1 in den perinekrotischen Tumorzellen. Diese bilden intensiv gefärbte Randwälle um die Nekrosezonen herum.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren zum Teil TNF-R1.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.14)

Vitales Tumorgewebe

Der Anteil TRAIL-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 1,14 (Min: 0; Max: 3), was etwa 29% entspricht. Dabei ist zu beachten, dass TRAIL in drei Fällen nicht exprimiert wird.

Von den vier verbleibenden Fällen, in deren Präparate TRAIL-positive Zellen zu sehen sind, zeigt ein Fall ein retikuläres Verteilungsmuster TRAIL-exprimierender Tumorzellen. Hier durchziehen Stränge gefärbter Tumorzellen das sonst negative vitale Tumorgewebe und verleihen ihm ein netzartiges Aussehen.

Die übrigen Fälle zeigen keine Verteilungsmuster für TRAIL.

In allen Fällen wird TRAIL zytoplasmatisch exprimiert, eine Anfärbung der Zellkerne wird nicht beobachtet.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Bei keinem der Fälle ist eine Anfärbung der Nekrosezonen zu sehen. Auch kommt es nicht zu einer Expressionssteigerung von TRAIL in den perinekrotischen Tumorzellen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert TRAIL.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.14)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Nur einer der Fälle zeigt eine Expression von APAF-1 in den Zellen des vitalen Tumorgewebes. Die Expressionsrate liegt bei 7% (rein rechnerisch ergibt sich unter Einbeziehung der übrigen Fälle ein Mittelwert von 1%. Min: 0%; Max: 7%). Die APAF-1-positiven Zellen liegen gleichmäßig verteilt im vitalen Tumorgewebe. Sie exprimieren APAF-1 zytoplasmatisch, die Zellkerne sind nicht gefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der in den untersuchten Präparaten vorhandenen Nekrosezonen zeigt eine Anfärbung. Auch eine Expressionssteigerung von APAF-1 in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht zu sehen.

Gefäße

APAF-1 wird von den Gefäßen nicht exprimiert.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.15)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Im Durchschnitt beträgt der Anteil SMAC-exprimierender Tumorzellen 2,86 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 72% aller Tumorzellen. Alle Fälle exprimieren SMAC.

Hierbei kommt es in drei Fällen zu einer fokalen Expressionssteigerung von SMAC in den Zellen des vitalen Tumorgewebes (s. Abb. 7.3.13). Auch durchziehen Formationen von SMAC-negativen Tumorzellen straßenförmig das gefärbte Resttumorgewebe, wodurch ein netzartiges Muster entsteht.

In den restlichen Fällen liegen die positiven Tumorzellen gleichmäßig verteilt im vitalen Tumorgewebe.

Die Tumorzellen zeigen stets ein gefärbtes Zytoplasma. In den Zellkernen wird SMAC nicht exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist angefärbt. Eine Steigerung der Expression von SMAC in den perinekrotischen Tumorzellen ist ebenfalls nicht erkennbar.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert SMAC.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.15)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-9-exprimierender Tumorzellen liegt im Durchschnitt bei 0,43 (Min: 0; Max: 1). Dies entspricht etwa 11% aller Tumorzellen. Es ist jedoch zu beachten, dass in lediglich drei der Fälle Caspase-9 exprimiert wird. Die übrigen Fälle sind negativ für Caspase-9.

In den drei Caspase-9-positiven Fällen ist eine Expression von Caspase-9 hauptsächlich fokal in kleineren Zellnestern zu sehen. Der Hauptteil des vitalen Tumorgewebes bleibt ungefärbt. Stets zeigen die Caspase-9-exprimierenden Tumorzellen ein gefärbtes Zytoplasma. Die Zellkerne bleiben ungefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist angefärbt. Eine Expressionssteigerung von Caspase-9 in den perinekrotischen Tumorzellen findet sich nicht.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße exprimiert Caspase-9.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.15)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der durchschnittliche Anteil Caspase-2-exprimierender Tumorzellen liegt bei 8% (Min: 0%; Max: 50%). Es ist dabei zu beachten, dass in drei der Fälle Caspase-2 nicht exprimiert wird. Zwei Fälle mit positiven Tumorzellen lassen lediglich einzelne positive Tumorzellen im insgesamt ungefärbten Tumorgewebe erkennen. In einem weiteren Fall sind Bereiche innerhalb des Tumorgewebes zu sehen, in denen es zu einer fokalen Expressionssteigerung von Caspase-2 kommt. In den übrigen Fällen sind die Caspase-2-exprimierenden Tumorzellen ohne erkennbares Verteilungsmuster gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt.

Die Tumorzellen zeigen stets eine Expression von Caspase-2 in ihrem Zytoplasma. Die Zellkerne sind nicht angefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen sind alle ungefärbt. Auch ist eine Expressionssteigerung in den perinekrotischen Tumorzellen in keinem der Präparate zu erkennen.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren Caspase-2 zum Teil.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.15)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-3-exprimierender Tumorzellen liegt im Mittel bei 1,71 (Min: 0; Max: 3), was etwa 43% entspricht. Zu beachten ist jedoch, dass zwei der Fälle Caspase-3 nicht exprimieren. In drei der verbliebenen Fälle sind die Caspase-3-positiven Tumorzellen nicht gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt. Sie bilden gefärbte Zellnester oder durchziehen das Gewebe in straßenähnlichen Formationen.

Die Expression von Caspase-3 ist stets auf das Zytoplasma beschränkt, eine Anfärbung der Zellkerne ist in keinem der Fälle zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keiner der Fälle weist angefärbte Nekrosezonen auf. In einem der Fälle ist zum Teil eine Steigerung der Expression von Caspase-3 in den perinekrotischen Tumorzellen zu sehen. Diese grenzen die Nekrose als intensiv gefärbter Wall gut sichtbar gegen das vitale Tumorgewebe ab.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren Caspase-3 nicht.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.16)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-6-exprimierender Tumorzellen liegt durchschnittlich bei 1,43 (Min: 0; Max: 3). Dies entspricht etwa 36% aller Tumorzellen. In einem der Fälle wird Caspase-6 nicht exprimiert.

In zwei der Fälle, die eine Expression von Caspase-6 zeigen, liegen lediglich vereinzelt positive Tumorzellen in einem für Caspase-6 negativen Tumorgewebe. Ein weiterer dieser Fälle weist eine fokale Expressionssteigerung von Caspase-6 auf. Hier finden sich gefärbte Zellnester. Die übrigen Caspase-6-positiven Fälle lassen keine besonderen Verteilungsmuster erkennen.

In allen Fällen wird Caspase-6 zytoplasmatisch exprimiert. Eine Anfärbung der Zellkerne findet sich nicht.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Weder ist eine Anfärbung der Nekrosezonen zu erkennen, noch kommt es zu einer gesteigerten Expression von Caspase-6 in den perinekrotischen Tumorzellen.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren zum Teil Caspase-6.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.16)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Von allen Fällen weist nur ein Fall Tumorzellen auf, die Caspase-7 exprimieren. Dieser Fall zeigt in seinem vitalen Tumorgewebe fokal eine Expression von etwa 15% für Caspase-7, das übrige Tumorgewebe ist jedoch bis auf dieses kleine Areal komplett negativ.

Insgesamt ergibt sich für diesen Fall eine Expressionsrate von etwa 1%. Bezieht man nun die übrigen negativen Fälle mit ein, ergibt sich ein Mittelwert von 0,14% für den Anteil Caspase-7-exprimierender Tumorzellen in allen Fällen (Min: 0%; Max: 1%).

Caspase-7 wird stets zytoplasmatisch exprimiert, eine Anfärbung der Zellkerne kommt nicht vor.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Weder die Nekrosezonen noch die perinekrotischen Tumorzellen lassen eine Expression von Caspase-7 erkennen.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren Caspase-7 nicht.

4.2.5 PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore; N=6; WHO-IV; s. Tab. 7.1.1)

Die statistische Analyse mittels Korrelationsdiagramm ergibt keine Korrelation für die Raten MIB-1- und TUNEL-positiver Tumorzellen (s. Diagramm 7.2.25 und Kapitel 5.5.1).

Die Verwendung von H- und U-Test (s. Kapitel 3.6.1) führt zu folgenden Ergebnissen:

Die Expressionsraten von TNF α , TNF-R1 und TRAIL unterscheiden sich nicht signifikant zwischen PNETs und Medulloblastomen ($p=0,191$, bzw. $p=0,429$, bzw. $p=0,760$; s. Kapitel 5.5.2.1). Die Apoptoserate ist bei Fällen, die eine Co-Expression von TNF α und TNF-R1 zeigen, nicht signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die nur TNF α exprimieren ($p=0,221$; s. Kapitel 5.5.2.1). Bei Fällen, die eine Co-Expression von TRAIL und SMAC zeigen, ist die Apoptoserate nicht signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die nur TRAIL exprimieren ($p=0,990$; s. Kapitel 5.5.2.1). Die Apoptoserate ist bei Fällen, die eine Co-Expression von Caspase-2 und -3 zeigen, nicht signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die nur Caspase-3 exprimieren ($p=1,000$; s. Kapitel 5.5.2.3).

4.2.5.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Der Anteil Tumorzellen, der TUNEL-positive DNA-Fragmente aufweist, beträgt im Durchschnitt 0,22% (Min: 0%; Max: 0,69%). Es sind nur vereinzelt apoptotische Zellen im vitalen Tumorgewebe zu sehen.

Der durchschnittliche Anteil proliferierender Tumorzellen beträgt hingegen 39,17% (Min: 15%; Max: 80%).

Die Proliferationsrate der PNETs ist somit um ein Vielfaches höher als die Apoptoserate.

4.2.5.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.17-19)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.17)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Vier der sechs untersuchten PNETs exprimieren TNF α . Die durchschnittliche Expressionsrate von TNF α in den Tumorzellen beträgt 0,83 (Min: 0; Max: 2). Dies entspricht etwa 21%. Die positiven Tumorzellen liegen verteilt im vitalen Tumorgewebe und lassen keine Expressionsmuster, wie z.B. fokale Häufung oder perivaskuläre Expressionssteigerung erkennen (Abb. 7.3.14).

TNF α wird im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert, nicht von den Zellkernen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen färben sich nicht an. Auch findet sich keine Expressionssteigerung von TNF α in den perinekrotischen Tumorzellen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TNF α .

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.17)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der durchschnittliche Anteil TNF-R1-exprimierender Tumorzellen beträgt 0,67 (Min: 0; Max: 1). Dies entspricht etwa 17%. Es ist jedoch zu beachten, dass nur vier der untersuchten Fälle positiv für TNF-R1 sind.

Die positiven Tumorzellen liegen regellos verteilt im vitalen Tumorgewebe. Expressionsmuster finden sich nicht.

TNF-R1 wird im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert, nicht in deren Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. Es ist keine Expressionssteigerung von TNF-R1 in den perinekrotischen Tumorzellen zu erkennen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TNF-R1.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.17)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In fünf der sechs Fälle findet sich eine Expression von TRAIL in den Tumorzellen. Der durchschnittliche Anteil TRAIL-exprimierender Tumorzellen liegt bei 0,83 (Min: 0; Max: 1). Dies beträgt etwa 21%.

Die TRAIL-positiven Tumorzellen sind gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt. Spezielle Expressionsmuster sind nicht zu sehen (s. Abb. 7.3.15). TRAIL wird stets im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Nekrosen und perinekrotische Tumorzellen färben sich nicht an.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TRAIL.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.17)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In nur einem der Fälle wird APAF-1 von den Tumorzellen exprimiert. Die Expressionsrate von APAF-1 beträgt 0,5%. Bezieht man die restlichen negativen Fälle mit ein, ergibt sich für die Expressionsrate ein Durchschnittswert von 0,08% (Min: 0%; Max: 0,5%).

Die vereinzelt positiven Tumorzellen exprimieren APAF-1 in ihrem Zytoplasma, nicht im Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Nekrosezonen und perinekrotische Tumorzellen sind ungefärbt.

Gefäße

APAF-1 wird von den Gefäßen nicht exprimiert.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.18)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle Fälle zeigen eine Expression von SMAC im vitalen Tumorgewebe. Die durchschnittliche Expressionsrate von SMAC in den Tumorzellen beträgt dabei 1,5 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 38%.

In allen Fällen ist eine fokale Steigerung der Expression von SMAC zu sehen. Hier liegen Zellgruppen, die SMAC in hohem Maß exprimieren neben Arealen des vitalen Tumorgewebes, die eine schwache Expression für SMAC zeigen oder negativ sind.

In einem Fall ist eine perivaskuläre Steigerung der Expression von SMAC zu sehen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Nekrosezonen und perinekrotische Tumorzellen exprimieren SMAC nicht.

Gefäße

SMAC wird von einem Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.18)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Keiner der Fälle exprimiert Caspase-9.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Nekrosezonen und perinekrotische Tumorzellen sind negativ.

Gefäße

Die Gefäße exprimieren Caspase-9 nicht.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.18)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Caspase-2 wird von durchschnittlich 15% aller Tumorzellen exprimiert (Min: 0%; Max: 75%). Es ist jedoch zu beachten, dass nur drei der Fälle (entspricht 50%) positiv für Caspase-

2 sind. Es sind keine besonderen Expressionsmuster, wie etwa fokale oder perivaskuläre Expressionssteigerung zu erkennen.

Die Tumorzellen exprimieren Caspase-2 in ihrem Zytoplasma, eine spezifische Anfärbung der Zellkerne ist nicht zu erkennen.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Weder sind die Nekrosezonen angefärbt, noch zeigen die perinekrotischen Tumorzellen eine Steigerung der Expressionsrate von Caspase-2.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert Caspase-2.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.18)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle Fälle zeigen eine Expression von Caspase-3 im vitalen Tumorgewebe. Die durchschnittliche Expressionsrate für Caspase-3 in den Tumorzellen beträgt 1,5 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 38%. Vier Fälle exprimieren Caspase-3 nur fokal. Im negativen Tumorgewebe liegen verschieden große Tumorzellnester, die Caspase-3-positiv sind.

Die Tumorzellen exprimieren Caspase-3 stets in ihrem Zytoplasma, nicht im Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen sind nicht angefärbt. Die perinekrotischen Tumorzellen zeigen keine gesteigerten Expressionsraten für Caspase-3.

Gefäße

Caspase-3 wird von den Gefäßen nicht exprimiert.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.19)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Caspase-6 wird in allen Fällen von den Zellen des vitalen Tumorgewebes exprimiert. Die durchschnittliche Expressionsrate liegt bei 1,83 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 46%. Drei der Fälle zeigen fokale hohe Expressionsraten für Caspase-6, während angrenzende

Tumorareale Caspase-6-negativ sind. Ein weiterer Fall weist eine Steigerung der Expressionsrate in perivaskulären Tumorzellen auf.

In allen Fällen wird Caspase-6 im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert, die Zellkerne sind negativ.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Die Nekrosezonen sind nicht gefärbt. Die perinekrotischen Tumorzellen zeigen keine Steigerung der Expressionsrate von Caspase-6.

Gefäße

Caspase-6 wird von den Gefäßen exprimiert.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.19)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Keiner der Fälle zeigt eine Expression von Caspase-7 im vitalen Tumorgewebe.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Nekrosezonen und perinekrotische Tumorareale exprimieren Caspase-7 nicht.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert Caspase-7.

4.2.6 Meningiome

4.2.6.1 Atypische Meningiome (N=14; WHO-II; s. Tab. 7.1.1)

Die statistische Analyse der Expressionsraten mittels Korrelationsdiagramm wird bei folgenden Faktoren durchgeführt: TRAIL und TUNEL (s. Diagramm 7.2.26 und Kapitel 5.6.1.2.1), Caspase-2 und SMAC (s. Diagramm 7.2.27 und Kapitel 5.6.1.2.2) sowie Caspase-2 und -3 (s. Diagramm 7.2.28 und Kapitel 5.6.1.2.3). In keinem der Fälle zeigt sich eine Korrelation.

Die Apoptoserate der Fälle, die eine Co-Expression von TRAIL und SMAC zeigen, ist signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die lediglich TRAIL exprimieren ($p=0,029$; s. Kapitel 5.6.1.2.1).

4.2.6.1.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Durchschnittlich zeigen 0,40% aller Zellen des vitalen Tumorgewebes TUNEL-positive DNA-Fragmente (Min: 0%; Max: 2,15%). In drei Fällen sind keine apoptotischen Tumorzellen vorhanden. In drei der TUNEL-positiven Fälle gruppieren sich die apoptotischen Tumorzellen um die Nekrosezonen herum. Es ist eine perinekrotische Steigerung der Rate TUNEL-positiver DNA-Fragmente zu sehen. In zwei weiteren der positiven Fälle ist eine fokale Häufung apoptotischer Tumorzellen erkennbar. Die übrigen positiven Fälle zeigen eine diffuse Verteilung von Tumorzellen mit TUNEL-positiven DNA-Fragmenten.

Die durchschnittliche Proliferationsrate liegt bei 8,4% (Min: 4%; Max: 15%). Die proliferierenden Tumorzellen sind ohne erkennbare Verteilungsmuster gleichmäßig über das vitale Tumorgewebe verteilt.

Die Proliferationsrate ist um ein Vielfaches höher als die Apoptoserate.

4.2.6.1.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.20-24)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.20)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Zwölf der 14 Fälle exprimieren TNF α in den Zellen des vitalen Tumorgewebes. Die durchschnittliche Expressionsrate beträgt 1,92 (Min: 0; Max: 4). Dies entspricht etwa 48%. Zwei der Fälle zeigen eine fokale Steigerung der Expressionsrate von TNF α . Hier beträgt die Expression von TNF α in einigen Tumorealen 100%, während andere Bereiche des vitalen Tumorgewebes TNF α -negativ sind.

Stets wird TNF α im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert, nicht im Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Drei der Nekrosezonen sind intensiv angefärbt. In einem Fall ist eine Steigerung der Expression von TNF α in den perinekrotischen Tumorzellen erkennbar.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TNF α .

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.20)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil TNF-R1-exprimierender Tumorzellen beträgt durchschnittlich 1,25 (Min: 0; Max: 3). Dies entspricht etwa 31%. Zu beachten ist, dass TNF-R1 in zwei Fällen nicht exprimiert wird. Fünf der zwölf positiven Fälle zeigen eine fokale Expressionssteigerung von TNF-R1. In diesen Fällen wird TNF-R1 in nur einigen Bereichen des vitalen Tumorgewebes exprimiert, während das übrige Tumorgewebe negativ ist. Die restlichen positiven Fälle lassen nur vereinzelte TNF-R1-exprimierende Tumorzellen erkennen.

Stets wird TNF-R1 im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle sind die Nekrosezonen angefärbt. Eine Steigerung der Expression von TNF-R1 in den perinekrotischen Tumorzellen ist in zwei der Fälle zu sehen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TNF-R1.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.21)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In zwei der Fälle sind alle Tumorzellen TRAIL-negativ. Die durchschnittliche Expressionsrate für TRAIL beträgt 1,50 (Min: 0; Max: 3). Dies entspricht etwa 38%. In drei der Fälle wird TRAIL fokal, also nur von einigen Bereichen des vitalen Tumorgewebes exprimiert. TRAIL wird zytoplasmatisch exprimiert, die Zellkerne der Tumorzellen zeigen keine spezifische Anfärbung.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. In einem Fall ist eine Expressionssteigerung von TRAIL in den perinekrotischen Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

In einigen Fällen wird TRAIL von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes exprimiert.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.21)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

APAF-1 wird von sechs der untersuchten Fälle exprimiert (s. Abb.7.3.16). Im Durchschnitt liegt die Expressionsrate in den Tumorzellen bei 7% (Min: 0%; Max: 50%). Vier der APAF-1-positiven Fälle zeigen eine fokale Expressionssteigerung von APAF-1. Hier können in einigen Tumorarealen bis zu 50% der Tumorzellen APAF-1-positiv sein. APAF-1 wird im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In zwei der Fälle sind die Nekrosezonen intensiv angefärbt. Eine Expressionssteigerung von APAF-1 in den perinekrotischen Tumorzellen ist in zwei weiteren Fällen zu sehen.

Gefäße

Einige Gefäßen des vitalen Tumorgewebes exprimieren APAF-1.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.22)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

In allen Fällen ist eine Expression von SMAC in den Tumorzellen zu sehen. Die durchschnittliche Expressionsrate liegt bei 2,57 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 64%. In sechs Fällen wird SMAC fokal unterschiedlich exprimiert. Hier liegen verschieden große Inseln spezifisch gefärbter Tumorzellen direkt neben negativen Tumorarealen (s. Abb. 7.3.18).

SMAC wird stets zytoplasmatisch exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem Fall sind intensiv gefärbte Nekrosezonen zu sehen. Vier weitere Fälle zeigen eine Expressionssteigerung von SMAC in den perinekrotischen Tumorzellen. Diese bilden intensiv gefärbte Randwälle um die Nekrosezonen herum.

Gefäße

SMAC wird von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes teilweise exprimiert.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.22)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Zwei der untersuchten Fälle exprimieren Caspase-9 im vitalen Tumorgewebe. In diesen beiden Fällen sind kleinere Zellnester im vitalen Tumorgewebe zu sehen, in denen Caspase-9 fokal exprimiert wird. Bezieht man die übrigen negativen Fälle mit ein, so ergibt sich ein rechnerischer Mittelwert von 3,57% Caspase-9-positiver Tumorzellen (Min: 0; Max: 1).

Die positiven Tumorzellen exprimieren Caspase-9 in ihrem Zytoplasma.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Alle Nekrosezonen sind Caspase-9-negativ. Eine perinekrotische Expressionssteigerung von Caspase-9 ist in keinem der Präparate zu sehen.

Gefäße

Zu einem geringen Teil wird Caspase-9 von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes exprimiert.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.23)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Caspase-2 wird durchschnittlich von 11% (Min: 0%; Max: 65%) aller Tumorzellen exprimiert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nur neun der 14 untersuchten Fälle Caspase-2-positiv sind. Die restlichen Fälle sind negativ. In einem Fall sind im spärlich positiven Tumorgewebe Foki auszumachen, in denen eine Expressionssteigerung von Caspase-2 auf etwa 50% der Zellen zu sehen ist. Die übrigen positiven Fälle lassen keine besonderen Verteilungsmuster Caspase-2-exprimierender Tumorzellen erkennen. Stets zeigen die positiven Tumorzellen eine spezifische Anfärbung ihres Zytoplasmas, nicht der Zellkerne.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. Eine Expressionssteigerung von Caspase-2 in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht zu erkennen.

Gefäße

In Einzelfällen wird Caspase-2 von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes exprimiert.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.23)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der Anteil Caspase-3-exprimierender Tumorzellen beträgt durchschnittlich 1,14 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 29%. Caspase-3 wird von allen untersuchten Fällen exprimiert. In fünf Fällen ist die Expression von Caspase-3 auf einzelne Foki des vitalen Tumorgewebes beschränkt. Hier sind positive Tumorzell-Inseln innerhalb des Tumorgewebes zu sehen (s. Abb. 7.3.18). Ausnahmslos wird Caspase-3 vom Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert. Die Zellkerne sind nicht spezifisch gefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem der Fälle zeigen die Nekrosezonen eine intensive Anfärbung. Eine Expressionssteigerung von Caspase-3 in den perinekrotischen Tumorzellen ist in zwei weiteren Fällen zu beobachten. Hier sind intensiv gefärbte Randsäume positiver Tumorzellen zu sehen, die die Nekrosezonen umgeben.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert Caspase-3.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.24)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle untersuchten Fälle zeigen eine Expression von Caspase-6 im vitalen Tumorgewebe. Der durchschnittliche Anteil positiver Tumorzellen beträgt 2,50 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 63%. Drei der Fälle lassen eine fokale Steigerung der Expressionsrate auf bis zu 100% erkennen, während das übrige Tumorgewebe negativ oder allenfalls gering positiv gefärbt ist. In einem weiteren Fall sind große Anteile des vitalen Tumorgewebes spezifisch gefärbt, während hier fokal Tumorzell-Inseln zu sehen sind, die Caspase-6 nicht exprimieren. Stets ist das Zytoplasma der Tumorzellen spezifisch gefärbt, nicht die Zellkerne.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist gefärbt. In drei Fällen ist eine Expressionssteigerung von Caspase-6 in den perinekrotischen Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren Caspase-6 nicht.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.24)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Caspase-7 wird von einem der untersuchten Fälle exprimiert. Hier liegt im insgesamt negativen Tumorgewebe ein größeres Areal, in dem etwa 50% der Tumorzellen Caspase-7-positiv sind. Vergleicht man die Größe des positiven Fokus mit der des negativen Resttumorgewebes, so ergibt sich eine ungefähre Expressionsrate von 5% für diesen Fall. Bezieht man nun die übrigen Caspase-7-negativen Fälle mit ein, so ergibt sich ein rechnerischer Mittelwert von 0,36% Caspase-7-exprimierender Tumorzellen (Min: 0%; Max: 5%).

Caspase-7 wird stets im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keine der Nekrosezonen ist angefärbt. Eine Expressionssteigerung von Caspase-7 in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht zu sehen.

Gefäße

Von den Gefäßen wird Caspase-7 nicht exprimiert.

4.2.6.2 Anaplastische Meningiome (N=4; WHO-III; s. Tab. 7.1.1)

Die statistische Analyse der Expressionsraten mittels Korrelationsdiagramm wird bei folgenden Faktoren durchgeführt: SMAC und Caspase-2 (s. Diagramm 7.2.29 und Kapitel 5.6.2.2.2-3), sowie Caspase-2 und Caspase-3 (s. Diagramm 7.2.30 und Kapitel 5.6.2.2.3). In keinem der Fälle zeigt sich eine Korrelation.

Die Apoptoserate ist in den Fällen, die eine Co-Expression der Faktoren TRAIL und SMAC zeigen, nicht signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die nur TRAIL exprimieren ($p=0,221$; s. Kapitel 5.6.2.2.1).

4.2.6.2.1 TUNEL-positive DNA-Fragmente/ Proliferation (s. Tab. 7.1.2 und 7.1.3)

Der durchschnittliche Anteil Tumorzellen, in denen TUNEL-positive DNA-Fragmente zu sehen sind, beträgt 0,13% (Min: 0%; Max: 0,24%). Besondere Verteilungsmuster der apoptotischen Tumorzellen, wie etwa perinekrotisch gehäuftes Vorkommen, sind nicht erkennbar.

Die Proliferationsrate der Tumorzellen beläuft sich im Durchschnitt auf 25% (Min: 20%; Max: 40%).

Die Proliferationsrate ist somit gegenüber der Apoptoserate deutlich erhöht.

4.2.6.2.2 Apoptose-assoziierte Faktoren (s. Tab. 7.1.25 und 7.1.26)

a) TNF α (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Die Rate TNF α -exprimierender Tumorzellen beträgt im Durchschnitt 2,67 (Min: 0; Max: 4). Dies entspricht etwa 67%. In einem Fall wird TNF α nicht exprimiert. Einer der positiven Fälle zeigt eine fokale Steigerung der Expression von TNF α . Im negativen vitalen Tumorgewebe liegen unterschiedlich große Tumorzell-Inseln, die zu etwa 100% spezifisch gefärbt sind. Dabei ist stets das Zytoplasma der Tumorzellen gefärbt, nicht ihr Kern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Ein Fall weist eine Anfärbung der Nekrosezonen auf. Eine Expressionssteigerung von TNF α in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht vorhanden.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert TNF α .

b) TNF-R1 (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Im Durchschnitt liegt der Anteil TNF-R1-exprimierender Tumorzellen bei 2,50 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 63%. Alle Fälle zeigen TNF-R1-positive Tumorzellen. Es sind keine speziellen Verteilungsmuster positiver Tumorzellen zu sehen. TNF-R1 wird zytoplasmatisch exprimiert (s. Abb. 7.3.19).

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem Fall ist eine Färbung der Nekrosezonen zu erkennen. Eine Expressionssteigerung von TNF-R1 in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht vorhanden.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren TNF-R1 zum Teil.

c) TRAIL (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Der durchschnittliche Anteil TRAIL-exprimierender Tumorzellen beträgt 1,00 (Min: 0; Max: 2). Dies beträgt etwa 25%. Ein Fall ist TRAIL-negativ. Die positiven Tumorzellen liegen ohne besondere Muster im vitalen Tumorgewebe verteilt. Stets ist das Zytoplasma Ort der Expression von TRAIL, nicht der Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keiner der Fälle zeigt gefärbte Nekrosezonen. Eine Expressionssteigerung von TRAIL in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht vorhanden.

Gefäße

TRAIL wird von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes nicht exprimiert.

d) APAF-1 (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Die durchschnittliche Expressionsrate von APAF-1 in den Tumorzellen liegt bei 11% (Min: 0%; Max: 30%). Zwei der positiven Fälle zeigen ein fokales Expressionsmuster von APAF-1 in den Tumorzellen. Im sonst negativen Tumorgewebe liegen verstreut Areale unterschiedlicher Form und Größe, die APAF-1 zu 15% bis 30% exprimieren. Stets ist das Zytoplasma der Tumorzellen APAF-1-positiv, nicht der Zellkern.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

In einem Fall sind die Nekrosezonen intensiv gefärbt. Eine Expressionssteigerung von APAF-1 in den perinekrotischen Tumorzellen findet sich nicht.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren APAF-1 nicht.

e) SMAC (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle Fälle exprimieren SMAC in den Tumorzellen. Die durchschnittliche Expressionsrate liegt bei 3,50 (Min: 2; Max: 4). Dies entspricht etwa 88%. Obwohl der Anteil SMAC-positiver Tumorzellen sehr hoch ist, zeigen alle Fälle Tumorbezirke, in denen SMAC fokal nicht exprimiert wird. Stets ist das Zytoplasma der Tumorzellen positiv, die Zellkerne sind nicht spezifisch gefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Ein Fall zeigt intensiv gefärbte Nekrosezonen. Eine Expressionssteigerung von SMAC in den perinekrotischen Tumorzellen ist in drei der vier Fälle zu sehen.

Gefäße

Ein Teil der Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimiert SMAC.

f) Caspase-9 (s. Tab. 7.1.25)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Caspase-9 wird von nur einem der Fälle exprimiert. Hier ist im vitalen Tumorgewebe ein Fokus zu sehen, in dem Caspase-9 in etwa 25% der Tumorzellen exprimiert wird. Das übrige Tumorgewebe ist negativ. Bezieht man die übrigen negativen Fälle mit ein, so ergibt sich für die durchschnittliche Expressionsrate von Caspase-9 ein Mittelwert von etwa 6% (Min: 0%; Max: 25%). Die positiven Tumorzellen exprimieren Caspase-9 in ihrem Zytoplasma.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Sämtliche Nekrosezonen sind negativ. Eine Expressionssteigerung von Caspase-9 in den perinekrotischen Tumorzellen ist nicht zu beobachten.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren Caspase-9 nicht.

g) Caspase-2 (s. Tab. 7.1.26)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Alle Fälle sind Caspase-2-positiv. Die durchschnittliche Expressionsrate von Caspase-2 in den Tumorzellen liegt bei 29% (Min: 2%; Max: 90%). In einem der Fälle sind im Tumorgewebe Areale zu sehen, in denen Caspase-2 fokal stärker exprimiert wird als im Resttumorgewebe. In den übrigen Fällen ist kein besonderes Verteilungsmuster der Caspase-2-positiven Zellen zu erkennen. Stets wird Caspase-2 zytoplasmatisch exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Keiner der Fälle zeigt eine Färbung der Nekrosezonen. Eine Expressionssteigerung von Caspase-2 in den perinekrotischen Tumorzellen ist in einem der Fälle zu sehen.

Gefäße

Die Gefäße des vitalen Tumorgewebes exprimieren Caspase-2 nicht.

h) Caspase-3 (s. Tab. 7.1.26)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Keiner der Fälle ist negativ für Caspase-3. Der durchschnittliche Anteil Caspase-3-exprimierender Tumorzellen beträgt 1,50 (Min: 1; Max: 3). Dies entspricht etwa 38%. Zwei der Fälle zeigen eine fokale Expression von Caspase-3. Im negativen vitalen Tumorgewebe sind Areale zu sehen, in denen Caspase-3 exprimiert wird. Dabei ist stets das Zytoplasma der Tumorzellen gefärbt.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Weder ist eine Anfärbung der Nekrosezonen noch eine Expressionssteigerung von Caspase-3 in den perinekrotischen Tumorzellen zu sehen.

Gefäße

Von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes wird Caspase-3 nicht exprimiert.

i) Caspase-6 (s. Tab. 7.1.26)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Keiner der Fälle ist Caspase-6-negativ. Die durchschnittliche Expressionsrate liegt bei 3,00 (Min: 1; Max: 4). Dies entspricht etwa 75%. Besondere Verteilungsmuster Caspase-6-exprimierender Tumorzellen, wie etwa fokale Expressionssteigerung, sind nicht zu sehen. Stets wird Caspase-6 vom Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Eine Färbung der Nekrosezonen sowie eine Expressionssteigerung von Caspase-6 in den perinekrotischen Tumorzellen sind nicht vorhanden.

Gefäße

Von den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes wird Caspase-6 zum Teil exprimiert.

j) Caspase-7 (s. Tab. 7.1.26)

Vitales Tumorgewebe und Randzone

Nur einer der Fälle zeigt eine Expression von Caspase-7 in den Tumorzellen. In diesem Fall sieht man fokal einen Bereich mit positiven Zellen im vitalen Tumorgewebe (s. Abb. 7.3.20). Die Expressionsrate beträgt insgesamt etwa 1%. Bezieht man die übrigen negativen Fälle mit ein, so ergibt sich ein durchschnittlicher Anteil Caspase-7-positiver Tumorzellen von 0,25% (Min: 0%; Max: 1%). Die positiven Tumorzellen exprimieren Caspase-7 zytoplasmatisch.

Nekrosen/ perinekrotische Areale

Eine Färbung der Nekrosezonen sowie eine Expressionssteigerung von Caspase-7 in den perinekrotischen Tumorzellen sind nicht zu sehen.

Gefäße

Die Gefäße des Falles, der positive Tumorzellen aufweist, zeigen eine Expression von Caspase-7 in den Gefäßen des vitalen Tumorgewebes.

5 Diskussion

Welche Faktoren über das Leben und Sterben von Zellen entscheiden, ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Besondere Bedeutung kommt hierbei der Entschlüsselung apoptotischer Prozesse zu. Schon lange ist bekannt, dass ein gesteigertes oder vermindertes Maß an Apoptose im Rahmen vieler Erkrankungen, so z.B. bei der Entstehung verschiedener Neoplasien oder degenerativer Erkrankungen, eine Rolle spielt. Ein genaueres Verständnis der apoptotischen Vorgänge in den unterschiedlichen Zellen des Körpers ist Voraussetzung und Grundlage für die Anwendung dieser Kenntnisse z.B. als möglicher prognostischer oder diagnostischer Marker oder auch als therapeutische Option. Welche Faktoren für die Apoptose in Tumoren des zentralen Nervensystems eine Rolle spielen könnten, wurde in dieser Arbeit untersucht und soll im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Glioblastome (WHO-IV)

5.1.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

Bei Glioblastomen handelt es sich um hochgradig maligne Neoplasien des zentralen Nervensystems. Ihre Malignität wird unter anderem durch ihr schnelles Wachstum bestimmt. Die Progression eines Tumors spiegelt die Balance zwischen Proliferation und Zelltod wider. Bei den untersuchten Glioblastomen findet sich eine entsprechend hohe durchschnittliche Rate proliferierender Zellen von 24% (entsprechend der Expression von MIB-1). Alle untersuchten Glioblastome zeigen proliferierende Zellen, wobei deren Anteil zwischen 5% und 50% schwankt. Zelltod wird bei Glioblastomen durch mindestens zwei Mechanismen vermittelt: durch Nekrose und Apoptose. Da die Gefäße, die die Tumorzellen versorgen, nicht so schnell wachsen wie die Tumorzellen selbst, kommt es im Laufe der Tumorentwicklung konsekutiv zur Entstehung von ischämischen Nekrosezonen, wie sie bei den Glioblastomen regelmäßig sowohl makro- als auch mikroskopisch zu erkennen sind. Fraglich ist, ob eine Hochregulation von TNF α in den Tumorzellen zu einer Entstehung von Nekrosen beiträgt, wie dies in einigen Arbeiten angenommen wird (Raza et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diesen Ansatz jedoch nicht. In nur einem Fall findet sich eine perinekrotische Expressionssteigerung von TNF α . Außerdem ist die Expressionsrate von TNF α in den niedrigmalignen Tumoren (WHO-II und -III) wesentlich höher als in den Tumoren, die sich durch einen höheren Anteil nekrotischer Zellen auszeichnen. Der Anteil an Zellen, die morphologische Merkmale der Apoptose zeigen (sichtbar gemacht durch die

Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen mittels TUNEL, s. Kapitel 3.5.2), deren Zelltod durch Apoptose somit weitgehend als gesichert angesehen werden kann, ist bei den Glioblastomen im Vergleich zur Proliferationsrate mit durchschnittlich 0,83% eher gering ausgeprägt. In zwei Fällen sind keine apoptotischen Zellen zu finden. In den übrigen Fällen sind bis zu 7,5% apoptotische Zellen zu sehen, die in einem Drittel der Fälle hauptsächlich perinekrotisch lokalisiert sind. Dieses Verteilungsmuster wird auch in anderen Untersuchungen beschrieben (Tachibana et al. 1996/ Nakasu et al. 1998/ Matyja et al. 1999/ Takekawa et al. 1999/ Schiffer et al. 2001/ Bell et al. 2001/ Liao et al. 2002). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Verteilung wäre, dass man sich die perinekrotische Tumorzone als Gebiet mit äußerst schlechten Wachstumsbedingungen für Zellen vorstellt. Wie bereits oben dargestellt, entstehen die Nekrosezonen in Glioblastomen – wie in anderen stark proliferierenden Tumoren – unter anderem durch die mangelnde Vaskularisation bestimmter Tumoreareale. Der Verlust an Sauerstoff ist so dramatisch, dass die Zellen nekrotisch werden (Zagzag et al. 2000/ Hemmerlein et al. 2001). Zwischen den Nekrosezonen und dem vitalen Tumorgewebe, das ausreichend vaskularisiert ist, scheint es aber auch eine Zone zu geben, in der die Überlebensbedingungen für Zellen als so grenzwertig anzusehen sind, dass die Zellen zwar nicht überleben können, ihnen jedoch noch so viele Energiereserven zur Verfügung stehen, dass sie die Apoptose vollziehen können. Hier könnten auch die in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Zwischenformen der verschiedenen Zelltodmechanismen eine Rolle spielen. So wird z.B. in anderen Untersuchungen beobachtet, dass Apoptose ATP-abhängig in Nekrose übergehen kann (Leist et al. 1997/ Mc Carthy et al. 1997/ Daugas et al. 2000/ Leist und Jäättelä 2001). Apoptose scheint in diesem Zusammenhang ein relevanter Mechanismus zu sein, der für die Situation von Zellen des perinekrotischen Tumorgewebes charakteristisch ist. Dabei stellt sich auch die Frage, ob besonders rasch wachsende Glioblastome auch besonders hohe Apoptoseraten zeigen, da das schnell wachsende Tumorgewebe nicht mehr ausreichend vaskularisiert ist und die schlecht versorgten Zellen absterben. Sollte eine Korrelation zwischen Apoptose- und Proliferationsrate in Glioblastomen bestehen, wäre weiterhin von Interesse, ob sich aus dem Verhältnis von Apoptose zu Mitose prognostische oder diagnostische Schlüsse ziehen lassen. Von einigen Arbeitsgruppen wird eine Korrelation zwischen Apoptose- und Proliferationsrate beschrieben (Nakamizo et al. 2002/ Heesters et al. 1999), während andere keine Korrelation zwischen dem apoptotischen und dem Proliferationsindex in Glioblastomen eruieren konnten (Schiffer et al. 1995/ Vaquero et al. 2002). Auch in dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen Apoptose- und Proliferationsrate bei Glioblastomen gefunden werden (s. Diagramm 7.2.1).

5.1.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Der geringe Anteil von Zellen, die lichtmikroskopisch apoptotische Merkmale zeigen, steht im Gegensatz zu einer deutlichen Hochregulation Apoptose-vermittelnder Faktoren in den Glioblastomen. Es wurden Apoptose-assoziierte Proteine des TNF/Rezeptor-vermittelten ($\text{TNF}\alpha$, TNF-R1, TRAIL) und des mitochondrialen (APAF-1, SMAC, Caspase-9) Modus der Apoptose, sowie verschiedene Caspasen (Caspase-7, -3, -2 und -6) untersucht. Es stellt sich nun die Frage, wie die Expression der Apoptose-assoziierten Faktoren bei der gleichzeitig niedrigen „vollendeten“ Apoptoserate der Tumorzellen zu werten ist. Einige Autoren verstehen diesen Umstand als eine Art „gesteigerte Bereitschaft“ der Tumorzellen, Apoptose zu vollziehen (Ehrmann et al. 2000). Diese These ist vor allem dann interessant, wenn man versuchen möchte, als therapeutische Maßnahme Apoptose bei Hirntumoren zu induzieren. Eine „gesteigerte Bereitschaft“ zur Apoptose als Sinnbild eines automatisch ablaufenden, expandierenden Suizid-Programmes, das es nur gilt, in Gang zu setzen, wäre ein idealer Umstand für eine therapeutische Induktion von Apoptose. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich die Biologie einer Tumorzelle maßgeblich von der einer normalen Zelle unterscheidet und man zunächst davon ausgehen muss, dass die zellulären Mechanismen der Apoptose bei Tumorzellen stark gestört sind und eventuell nicht so effektiv arbeiten können wie in normalen Zellen. Daneben haben die meisten Apoptose-assoziierten Faktoren auch andere biologische Wirkungen, die es erst zu verstehen gilt, bevor man sie modifiziert und so neben Tumorzell-Apoptose auch mögliche unerwünschte Wirkungen verursacht. So spielt z.B. $\text{TNF}\alpha$ eine Rolle bei der Regulierung der Körpertemperatur sowie bei der Regulierung des Zusammenspiels verschiedener Zytokine im Rahmen der körpereigenen Abwehr (Dayer 2002/ Leon 2004). Im Folgenden sollen weitere mögliche Erklärungsansätze erörtert werden, wie die Hochregulation Apoptose-assoziiierter Faktoren bei einer gleichzeitig niedrigen Apoptoserate zu werten sein könnte.

5.1.2.1 *TNF α / TNF-R1/ TRAIL*

Durchschnittlich sind rund 30% der Zellen des vitalen Tumorgewebes der Glioblastome positiv für $\text{TNF}\alpha$, TNF-R1 und TRAIL. Ähnliche Expressionsraten finden sich in den anderen untersuchten WHO-IV-Tumoren (Medulloblastome und PNETs; $p=0,402$). Der Anteil positiver Tumorzellen in den untersuchten WHO-II- und -III-Tumoren (Oligodendrogliome, Ependymome und Meningiome) ist vor allem für $\text{TNF}\alpha$ mit bis zu 67% deutlich höher als bei den hochmalignen Tumoren. Es scheint demnach ein Zusammenhang zwischen dem

Malignitätsgrad von Hirntumoren und der Expressionsrate zumindest einiger Apoptose-assoziiierter Faktoren zu existieren, wobei die niedriger malignen Tumorgrade zumindest theoretisch eine höhere Suszeptibilität für Apoptose aufweisen könnten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsraten für TNF α bei den Tumorgraden WHO-II, -III und -IV ($p=0,007$). Dies wurde auch in anderen Studien so beschrieben (Kaiser und Bodey 2000). In den Tumorrandozonen sowie im angrenzenden Normalgewebe der Präparate liegt die Expressionsrate der Faktoren etwa bei 10% (4.2.1.2). Die Expressionsraten zeigen eine große Variabilität von vereinzelt bis zu annähernd 100% positiver Zellen. Damit schließen sich diese Ergebnisse denen anderer Arbeiten an, die ebenfalls über eine Expression der genannten Apoptose-assoziierten Faktoren in Glioblastomen berichten (Iwasaki et al. 1995/ Rieger et al. 1999). TNF α und TNF-R1 werden lediglich in drei, TRAIL in sechs von 23 Glioblastompräparaten nicht exprimiert.

In 18 der 23 Glioblastompräparate kommt es zu einer Co-Expression der Faktoren TNF α und TNF-R1. Eine klare Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TNF-R1 besteht jedoch nicht (s. Diagramm 7.2.2). In allen untersuchten Tumorarten liegt jedoch die Expressionsrate von TNF-R1 unter der von TNF α .

TNF α und sein Rezeptor 1 können in vielen Zelltypen Apoptose vermitteln (D'Souza et al. 1995/ Yin et al. 1995). In Glioblastomen wird die Fähigkeit von TNF α zur Induktion von Apoptose jedoch von vielen antagonistischen Faktoren, die nur zum Teil bekannt sind (wie z.B. cIAP), herabgesetzt (Knight et al. 2001/ Webster et al. 2002). Es wird eine Reihe von Faktoren wie z.B. Dexamethason oder Cisplatin diskutiert, die über eine direkte oder indirekte agonistische Funktion Apoptose über TNF α induzieren sollen (Duan L et al. 2001/ Cheng et al. 2002). Einige Studien postulieren den Ansatz, eine erhöhte Expression von TNF-R1 könne die Sensibilität des Tumorgewebes für eine zytotoxische Aktivität von TNF α verstärken (Hayashi et al. 2001). In dieser Arbeit kann jedoch keine Korrelation zwischen der Expressionsrate von TNF-R1 und dem apoptotischen Index bei Glioblastomen festgestellt werden (s. Diagramm 7.2.3). In den in dieser Arbeit untersuchten Glioblastomen kann hingegen in allen Fällen, die eine Hochregulation von TNF α bieten, auch eine hohe Expression von Effektor-Caspasen beobachtet werden. Dies gilt insbesondere für Caspase-3 und -6, was vor dem Hintergrund interessant ist, dass die TNF α -induzierte Apoptose über Effektor-Caspasen vermittelt wird (s. Kapitel 1.2.2).

TRAIL interagiert als Mitglied der TNF-Familie mit verschiedenen Rezeptoren der Zellmembran. Apoptose kann so über eine Bindung an DR4 und DR5 induziert werden. Diese Induktion kann über eine Interaktion mit den sog. „decoy“ Rezeptoren DcR1 und DcR2

antagonisiert werden. In vielen Studien wird TRAIL das Potential zugeschrieben, selektiv in Tumorzellen von Glioblastomen und nicht im umgebenden Normalgewebe Apoptose hervorrufen zu können und so eine Regression der Tumormasse zu verursachen (Roth et al. 1999/ Hao et al. 2001/ Pollack et al. 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre etwa die verminderte Expression von Apoptose-antagonistischen decoy-Rezeptoren bei Tumorzellen. Die Expression variiert jedoch nicht nur zwischen den unterschiedlichen Tumorarten, sondern auch innerhalb verschiedener Tumorzelllinien bei den Glioblastomen (Wu et al. 2000). In neueren Studien wird auch darauf hingewiesen, dass etwa Adenovirus-vermittelter Gentransfer von Apo2L/TRAIL nicht zu einer Induktion von Apoptose führt (Naumann et al. 2003). In diesem Zusammenhang wurde eine Reihe von amplifizierenden Faktoren für TRAIL-vermittelte Apoptose in Glioblastomen diskutiert. So wird z.B. dem auch in dieser Arbeit untersuchten Faktor SMAC eine agonistische Funktion bei der TRAIL-vermittelten Apoptose zugeschrieben, die eine Eradikation von Hirntumoren erst ermöglichen soll (Rohn et al. 2001/ Fulda et al. 2002/ Deng et al. 2002/ Kandasamy et al. 2003). In dieser Arbeit kann bei den Glioblastomen jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Expressionsraten von TRAIL mit denen von SMAC oder TUNEL hergestellt werden (s. Diagramme 7.2.4 und 7.2.5).

Es wurde auch eine Expression von TRAIL in normalem Hirngewebe beschrieben (Frank et al. 1999/ Matysiak et al. 2002). Dies stellt sich in unseren Normalkontrollen zwar so nicht dar, in den Gewebeanteilen von sechs der untersuchten Glioblastompräparate, die morphologisch nicht von Tumorgewebe infiltriert sind, findet sich aber ein durchschnittlicher Anteil TRAIL-positiver Gliazellen von etwa 10%. In anderen Studien wurde auch eine Expression von TNF α im peritumoralen Normalgewebe beschrieben (Maruno et al. 1997). Es stellt sich somit die Frage, ob das tumorumgebende normale Hirngewebe von Patienten molekularbiologisch anders charakterisiert ist als das Hirngewebe von Menschen, die nicht an einem infiltrierenden Tumor erkrankt sind. Ähnliche Ergebnisse haben wir in einigen Fällen für die Faktoren TNF α , Caspase-3 und Caspase-6 bei Glioblastomen und Oligodendrogliomen gefunden. Zu bedenken ist aber darüber hinaus, dass viele Apoptose-assoziierte Faktoren auch andere biologische Funktionen wahrnehmen. So wird neben anderen Apoptose-unabhängigen Funktionen z.B. eine Expression von Interleukin-8 durch Interaktion von TRAIL mit DR5 im Rahmen von Immunreaktionen beschrieben (Degli-Esposti 1999/ Abe et al. 2000/ Song et al. 2000/ Daigle und Simon 2001/ Choi et al. 2002/ Dorr et al. 2002). Diese möglichen weiteren biologischen Funktionen von TRAIL, dessen Rezeptoren nahezu ubiquitär im Organismus vorhanden sind, müssen vor einer therapeutischen Anwendung von modulierenden

Substanzen des TRAIL-Systems entschlüsselt werden. Eine Aktivierung von TRAIL im Rahmen therapeutischer Intervention könnte sonst zum einen ein unerwünschtes „zu viel“ an Apoptose auslösen, zum anderen könnten Nebenwirkungen auftreten, die im Zusammenhang mit den anderen biologischen Funktionen von TRAIL zu sehen sind, mit bisher unabsehbaren Folgen.

5.1.2.2 SMAC/APAF-1/ Caspase-9

APAF-1 wird von 8%, SMAC von 48% und Caspase-9 von 58% der Zellen des vitalen Tumorgewebes der Glioblastome exprimiert. Nur zwölf der 23 Glioblastompräparate sind positiv für APAF-1. SMAC wird von 20 und Caspase-9 von allen Glioblastomen exprimiert. In den positiven Fällen variieren die Expressionsraten dieser Faktoren bei den Tumorzellen von 2-50% (APAF-1), 25-75% (SMAC) und 25-100% (Caspase-9). Betrachtet man die Expressionsraten dieser Faktoren bei den untersuchten Hirntumoren im Hinblick auf deren WHO-Grade, so zeigt sich, dass sich die Expressionsraten für APAF-1 und Caspase-9 bei den Tumoren der WHO-Grade II, III und IV nicht signifikant unterscheiden ($p=0,053$ bzw. $p=0,828$). Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsraten von SMAC ($p=0,004$). Hochmaligne Hirntumore exprimieren demnach tendenziell weniger SMAC als niedrigmaligne, was für deren höhere Suszeptibilität gegenüber Apoptose-assoziierten Faktoren sprechen könnte.

Es exprimieren annähernd 90% der Tumorzellen anaplastischer Meningiome, Oligodendrogliome und Ependymome (alle WHO-III) SMAC, während dies bei nur 40-50% der Tumorzellen von Glioblastomen und PNETs der Fall ist. Allerdings zeigen die atypischen Meningiome (WHO-II) lediglich eine Expressionrate von 64% für SMAC. Einige Autoren, die die Expressionsraten von SMAC bei verschiedenen Sarkomen und Karzinomen untersucht haben, erwägen, ob eine verminderte Expression von SMAC mit Malignität und Progression der Tumore korreliert ist (Yoo et al. 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten könnten eine solche Theorie stützen.

SMAC ist wie Cytochrom c im Mitochondrium lokalisiert und wird während der Apoptose in das Zytosol überführt. Dies wird möglicherweise durch TRAIL induziert. So wird in anderen Arbeiten berichtet, dass eine Blockierung TRAIL-vermittelter Apoptose über eine Hochregulation von Bcl-2 zu einer Senkung der Expressionsrate von SMAC führt. Über eine Korrelation mit dem apoptotischen Index wird jedoch nichts berichtet (MacFarlane et al. 2002/ Zhang et al. 2003). Zu bedenken ist hierbei, dass es sich bei Bcl-2 um einen sehr potenten und unspezifischen anti-apoptischen Faktor handelt, dessen Verwendung im

Rahmen einer solchen Studie evtl. keine genauen Rückschlüsse auf die spezifische Beziehung zweier Apoptose-assoziiierter Faktoren erlaubt. Eine Auswirkung auf die Apoptoserate durch eine TRAIL-induzierte Erhöhung von SMAC bei Hirntumoren wäre dennoch ein interessanter Ansatzpunkt für eine mögliche therapeutische Option.

Des Weiteren wird der Ausstrom von SMAC aus den Mitochondrien wahrscheinlich über Caspasen vermittelt. Eine besondere Bedeutung scheint hierbei der Caspase-9 zuzukommen (Adrain et al. 2001/ McNeish et al. 2003). Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass nicht von allen Caspase-9-exprimierenden Glioblastomen auch SMAC exprimiert wird. Auch besteht keine klare Korrelation zwischen den Expressionsraten von SMAC und Caspase-9 (s. Diagramm 7.2.6). Im Zytosol bindet SMAC an IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) und reduziert so deren anti-apoptotische Wirkung, die über eine Inhibition der Caspasen-3, -9 und -7 erfolgt. Die IAPs wiederum können SMAC durch Ubiquitylierung deaktivieren (Hu und Yang 2003). Daneben spielen zahlreiche andere regulierende Faktoren eine Rolle. Ebenfalls scheint SMAC in der Lage zu sein, Zellen für zytotoxische Substanzen zu sensibilisieren und so deren Wirkung zu verstärken (Hunter et al. 2003/ McNeish et al. 2003). Dagegen könnte die Funktion von SMAC in normalen Zellen eher gering sein. SMAC-defiziente Mäuse z.B. weisen keine histologischen, verhaltens- oder entwicklungsbiologischen Unterschiede zu normalen Mäusen auf (Okada et al. 2002). Über die Expression von SMAC in normalem Gewebe ist wenig bekannt. Es wird lediglich über die Verbreitung von SMAC in einigen Gewebetypen (Leber, Niere, Pankreas, Intestinaltrakt, Lunge, Hoden) von Mäusen berichtet (Tikoo et al. 2002). In dieser Studie zeigte sich keine Expression von SMAC in normalem Hirngewebe.

Die Faktoren APAF-1, SMAC und Caspase-9 spielen eine Rolle bei der sog. intrinsischen Form der Apoptose, die durch eine mitochondriale Beteiligung charakterisiert ist. APAF-1 und Pro-Caspase-9 bilden gemeinsam mit Cytochrom c und dATP das Apoptosom. Hierdurch wird Caspase-9 prozessiert und kann nun als sog. Initiator-Caspase andere Effektor-Caspasen aktivieren (s. auch Kapitel 1.2.2). Bei den untersuchten Präparaten ist die Expression von Caspase-9 streng auf das Tumorgewebe begrenzt. In den Normalkontrollen ist keine Expression von Caspase-9 feststellbar. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (Glaser und Weller 2001/ Waltereit und Weller 2002). Nur in zwölf von 23 Glioblastompräparaten ist eine Co-Expression von APAF-1 und Caspase-9 vorhanden, während alle Glioblastome Caspase-9 exprimieren (s. oben). Dies könnte einen alternativen Stimulationsmechanismus, z.B. über eine cytochrom c-unabhängige Aktivierung durch Caspase-12 (Morishima et al. 2002) oder eine alternative biologische Funktion von Caspase-9

andeuten. Es könnte aber auch ein Hinweis auf ein gestörtes Apoptose-System bei Glioblastomen sein. Durch die mangelnde Expression von APAF-1 könnte dann die Caspasen-Kaskade bei der intrinsischen Form der Apoptose nicht aktiviert werden. Studien zeigen, dass durch ein gemeinsames Vorkommen von APAF-1 und Caspase-9 die Effektor-Caspasen aktiviert, bzw. Tumore gegenüber zytotoxischen Substanzen sensibilisiert werden können (Shinoura et al. 2001). Dabei sind hohe Expressionsraten von APAF-1 sogar in der Lage, Caspase-9 zu aktivieren, ohne dass eine mitochondriale Schädigung vorliegt. Dies impliziert, dass die Aktivierung von Caspase-9 auch Cytochrom c-unabhängig ablaufen kann (Hermisson et al. 2000/ Furukawa et al. 2002/ Jendrossek et al. 2003). Andererseits existieren auch Hinweise darauf, dass im Rahmen einer Aggregation mehrerer Pro-Caspase-9-Moleküle diese unabhängig von APAF-1 in der Lage sind, sich selbst zu aktivieren (Chang et al. 2003). Bei den von uns untersuchten Glioblastomen findet sich eine erhöhte Apoptoserate auch in den Fällen, die keine Expression von APAF-1 zeigen.

Ein intaktes intrinsisches Apoptose-System scheint demnach in vielen Fällen nicht zwingend erforderlich für die Durchführung der Apoptose zu sein (Adams und Cory 2002/ Marsden et al. 2002/ Belmokhtar et al. 2003). Außerdem können Effektor-Caspasen auch unabhängig von den Bestandteilen des Apoptosoms aktiviert werden, so z.B. über den bereits beschriebenen Rezeptor-vermittelten Weg. Entscheidender für eine therapeutische Option könnte die Funktion der Effektor-Caspasen sein, da diese letztlich für die Spaltung von Zellproteinen verantwortlich sind.

5.1.2.3 Caspasen

Die Caspasen -2, -3, -6 und -7 werden von Glioblastomen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (Glaser und Weller 2001/ Meller et al. 2002/ Ray et al 2002). Die Caspase-2 nimmt aufgrund ihrer Funktionsweisen eine Sonderstellung unter den genannten restlichen Caspasen ein. So fungiert sie sowohl als Initiator- als auch als Effektor-Caspase (s. unten). Sie wird in 22 von 23 Glioblastompräparaten zu einem durchschnittlichen Anteil von 13% der Tumorzellen (Min: 1%; Max: 70%) exprimiert. Auch in den übrigen untersuchten Tumoren zeigt sich eine gesteigerte Expression von Caspase-2 in den Tumorzellen, wobei sich die Expressionsraten für Caspase-2 bei den Tumoren der WHO-Grade II, III und IV nicht signifikant unterscheiden ($p=0,706$). Eine Expression von Caspase-2 in den Normalkontrollen findet sich nicht. Welche Rolle Caspase-2 für die Apoptose spielt, konnte bisher nicht restlos aufgeklärt werden. Zum einen scheint sie die Freisetzung von Cytochrom c und anderer mitochondrialer Faktoren in

das Zytoplasma zu induzieren. Dies geschieht zum einen über eine Stimulation des pro-apoptotischen Faktors Bid (s. Kapitel 1.2.2) und zum anderen über eine direkte Induktion der Faktoren SMAC, AIF und Cytochrom c. Letzteres vermittelt dann über die Bildung des Apoptosoms den intrinsischen Modus der Apoptose. In dieser Arbeit lässt sich keine direkte Korrelation zwischen den Expressionsraten von Caspase-2 und SMAC feststellen (s. Diagramm 7.2.7). Dies spricht für eine Existenz weiterer regulierender Faktoren des intrinsischen Weges der Apoptose. Auf welche Weise Caspase-2 aktiviert wird, ist noch nicht bekannt. Als möglich erscheint jedoch eine Form von Oligomerisation (Araya et al. 1998/ Guo et al. 2002/ Read et al. 2002). Zum anderen soll Caspase-2 die Effektor-Caspase-3 aktivieren (Gorman et al. 1999/ Huo et al. 2002/ Robertson et al. 2002). Dieser Umstand wird bereits experimentell als pharmakotherapeutischer Ansatz genutzt. So führt eine Inkubation von Astrozytom- und Glioblastomzellen mit verschiedenen Chemotherapeutika (Actinomycin D, Staurosporin, Cisplatin, Adenosin-Analoga) zu einer Induktion von Apoptose mittels Caspase-2-induzierter Aktivierung von Caspase-3 (Narita et al. 2000/ Ceruti et al. 2003). Zu beachten ist jedoch, dass alle diese Ergebnisse in vitro ermittelt werden und dass bis zu einer Anwendung in vivo noch weitere Kenntnisse über das apoptotische Netzwerk von Tumorzellen erlangt werden müssen. Unsere Daten zeigen, dass Glioblastome, die eine hohe Expressionsrate von Caspase-2 aufweisen, tendenziell auch viel Caspase-3 exprimieren, was die These einer Aktivierung der Effektor-Caspase durch Caspase-2 bestätigen könnte. Eine klare Korrelation besteht jedoch nicht (s. Diagramm 7.2.8). Auch kann in den untersuchten Glioblastompräparaten keine Korrelation zwischen der Expressionsrate von Caspase-2 und dem apoptotischen Index festgestellt werden (s. Diagramm 7.2.9).

Eine weitere mögliche Funktion von Caspase-2 ist die Vermittlung pro-apoptotischer Signale über den Golgi-Komplex unter anderem durch spezifische Spaltung von Golgin-160 (Mancini et al. 2000).

Die Effektor-Caspase-7 wird in 16 von 23 Glioblastompräparaten zu einem durchschnittlichen Anteil von 6% in den Tumorzellen exprimiert. Alle Glioblastome sind positiv für Caspase-6 (im Durchschnitt zu 51%). Caspase-3 wird in 21 von 23 Glioblastompräparaten zu einem durchschnittlichen Anteil von 65% der Tumorzellen exprimiert. Daneben kommt es in den Gliazellen des umgebenden Normalgewebes der Präparate in elf von 23 Präparaten zu einer durchschnittlichen Expression von 25%. Auch die Effektor-Caspase-6 zeigt eine Expression in den Gliazellen des Normalgewebes der Tumorpräparate von durchschnittlich 38%. Die Normalkontrollen zeigen indes keine Expression von Caspase-3 oder -6. Ähnliches wird in der aktuellen Literatur kaum beschrieben und könnte ein interessanter Ausgangspunkt für

weitere Untersuchungen sein, die sich mit dem biologischen Verhalten von peritumoralem Hirngewebe befassen. Eine Studie prägt in diesem Zusammenhang den Begriff der „peritumoralen Dysfunktion“ des Hirngewebes (Whittle und Kelly 2001). Allerdings wurden hier keine Apoptose-assoziierten Faktoren untersucht. Trotzdem gibt sie Hinweise auf eine metabolische Dysregulation und eine veränderte Rezeptor-Ausstattung der peritumoralen Zellen. Es wäre möglich, dass die Expression von den Caspasen -3 und -6 in den „normalen“ Gewebeanteilen der Tumorpatienten auf tumorinduzierte Veränderungen in den Zellen zurückzuführen sind, die mikroskopisch nicht erkennbar sind. Hierbei wäre es interessant, herauszufinden, ob die Anwesenheit maligne entarteter Zellen die Zellen des peritumoralen morphologisch scheinbar normalen Hirngewebes in ihrem biologischen Verhalten beeinflusst und ob dieser Umstand Auswirkungen auf Therapierbarkeit und Prognose des Tumors hat. Einige Studien beschäftigen sich in diesem Zusammenhang mit den Auswirkungen des peritumoralen Ödems oder Störungen der Blut-Hirn-Schranke, die auch über größere Distanz durch die Tumorzellen im peritumoralen Hirngewebe induziert werden können (Stewart et al. 1987/ Galasso et al. 2000).

Auch die anderen untersuchten Tumore sind positiv für Caspase-3 und -6, jedoch nur zum Teil für Caspase-7 (s. dort). Hochmaligne Tumore exprimieren signifikant mehr Caspase-3 als Tumore der WHO-Grade II und III ($p=0,004$). Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied bei den Expressionsraten der Caspase-6 ($p=0,151$) und -7 ($p=0,208$).

Im Gegensatz zu anderen Studien, die über eine Expression von Caspase-3 sowohl in den Zellkernen als auch im Zytoplasma berichten (Schiffer et al. 2001), kommt es bei unseren Präparaten nur zu einer Anfärbung des Zytoplasmas.

Caspase-3 kann dabei abhängig vom Modus der Apoptose über Caspase-8 oder -9 prozessiert werden (s. Kapitel 1.2.2). Es lässt sich keine eindeutige Korrelation zwischen den Expressionsraten der Caspasen-9 und -3 feststellen (s. Diagramm 7.2.10), was für ein gleichzeitiges Vorkommen mehrerer Aktivierungswege der Effektor-Caspase spricht. Zumindest kommt es in 21 Präparaten zu einer Co-Expression der beiden Caspasen. Caspase-3 hat mehrere Funktionen. Zum einen aktiviert sie im Rahmen einer Caspasen-Kaskade die Effektor-Caspasen -7 und -6, wobei die Aktivierung von Caspase-7 zeitlich der von Caspase-6 vorausgehen soll (Slee et al. 1999/ Meller et al. 2002). Bei unseren Präparaten wird Caspase-6 auch von den Glioblastomen exprimiert, die negativ für Caspase-7 sind. Auch korrelieren die Expressionsraten von Caspase-7 und -6 nicht miteinander (s. Diagramm 7.2.11). Dies könnte dafür sprechen, dass die Aktivierung von Caspase-6 unabhängig vom Aktivierungszustand von Caspase-7 ist, oder zumindest noch über weitere Mechanismen vermittelt werden kann.

Diese Vermutung stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, die auf unterschiedliche Aktivierungsmechanismen für die Caspasen-6 und-7 schließen lassen (Henshall et al. 2002). Des Weiteren kommt es zu einer spezifischen Spaltung mehrere Zellproteine, wie z.B. Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP), Protein Kinase C (PKC) und DNA Fragmentierungs-Faktor (DFF). Caspase-7 spaltet ebenfalls PARP, während Caspase-6 spezifisch die Spaltung von Lamin A herbeiführt. Die Spaltung dieser Substrate ist beteiligt an der Entwicklung der morphologischen Merkmale, die für die Apoptose charakteristisch sind. Auch wenn der zytotoxische Effekt vieler Chemotherapeutika in vitro über Caspase-3 vermittelt wird (Yasugi et al. 1998/ Qi et al. 2002), scheint eine alleinige Aktivierung von Caspase-3 nicht ausreichend zur Induktion von Apoptose zu sein. Hierzu wird zusätzlich die Stimulierung eines der Caspase-3 vorgeschalteten Faktors, wie z.B. des Fas-Liganden, benötigt (Hueber et al. 1998/ Shinoura et al. 2000). Viel versprechende Ergebnisse werden hierbei mit der Konstruktion modifizierter Caspase-3 und-6 Moleküle erzielt, die per se aktiv und nicht mehr abhängig von der Aktivierung durch Initiator-Caspasen sind (Srinivasula et al. 1998/ Komata et al. 2001).

Bei sämtlichen Apoptose-assoziierten Faktoren kommt es in einem Teil der Fälle zu einer fokalen Expressionssteigerung im vitalen Tumorgewebe der Glioblastome. So sieht man insel- oder straßenförmige Bezirke positiver Tumorzellen im vitalen Tumorgewebe, das ansonsten keine oder nur eine geringe Expression des jeweiligen Faktors zeigt (näheres: s. Kapitel 4.2.1.2). Sonstige, etwa morphologische Unterschiede zwischen den positiven und den negativen Tumorzellen existieren nicht. Eine mögliche Erklärung für dieses Färbeverhalten wäre das Vorliegen verschiedener genetischer Mutationen der entarteten Tumorzellen, die jeweils verschiedene Zellprotein-Profile der Tumorzellen bedingen. Ein experimenteller Ansatz, in dem versucht wurde, aus verschiedenen Tumor-Zelllinien ein „natürlicheres“ Hirntumor-Modell zu entwickeln, zeigte eine ähnliche fokal-positive Anfärbung der Tumorzellen (Whittle et al. 1998). Natürlich ist dabei zu bedenken, dass solche konstruierten Modelle nur bedingt auf menschliche Hirntumore in vivo übertragbar sind. Dennoch könnte die klonale Heterogenität von Glioblastomen Auswirkungen auf ihre Therapierbarkeit mittels Apoptose-induzierender Substanzen haben und sollte genauer untersucht werden.

5.2 Oligodendrogliome (WHO-III)

5.2.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

Anaplastische Oligodendrogliome (im Folgenden: AO) zeichnen sich durch ein weniger aggressives Wachstum und eine bessere Prognose als die der hochmalignen WHO-IV-Tumore aus. Es kann jedoch im Rahmen der Tumorprogression dazu kommen, dass sich anaplastische Oligodendrogliome in Glioblastome umwandeln (Deiningner et al. 1999/ Tong et al. 1999). Das langsamere Wachstum schlägt sich in einem entsprechend mäßigen Anteil proliferierender Zellen von 22,5% nieder (zum Vergleich: embryonale WHO-IV-Tumore zeichnen sich durch Proliferationsraten von über 40% (s. dort) aus). Alle untersuchten AOs zeigen MIB-1-positive Zellen, deren Rate von 5-50% schwankt. Demgegenüber steht eine durchschnittliche Apoptoserate von 0,5% (entsprechend der DNA-Einzelstrangbrüche durch TUNEL-Markierung). Ein Fall bietet keine TUNEL-positiven Zellen, in den übrigen schwankt die Expressionsrate zwischen 0,29% und 1,06%. Eine perinekrotische Steigerung der Expression apoptotischer Zellen, wie sie bei den Glioblastomen häufig vorkommt (s. Kapitel 5.1.1) ist bei den AOs nur in einem Fall zu sehen. Als WHO-III-Tumore zeigen die AOs eine signifikant niedrigere Rate MIB-positiver Zellen als die untersuchten hochmalignen WHO-IV-Tumore ($p < 0,0001$). Die Expressionsrate TUNEL-positiver Zellen unterscheidet sich hingegen bei den Tumoren der WHO-Grade II, III und IV nicht signifikant ($p = 0,934$). In diesem Punkt reiht sich die vorliegende Arbeit in eine Anzahl weiterer Studien ein (Schiffer et al. 1995/ Schiffer et al. 1997(1)/ Schiffer et al. 1997(2)/ Wharton et al. 1998/ Heesters et al. 1999). Diese konnten zwar zeigen, dass sich Proliferationsraten unter 10% tendenziell günstig auf die Prognose auswirken, eine prognostische Signifikanz musste in Multivarianzanalysen jedoch verworfen werden. Auch konnte keine Korrelation zwischen Apoptoserate und Prognose gezeigt werden.

5.2.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Die AOs exprimieren alle untersuchten Apoptose-assoziierten Faktoren mit Ausnahme der Caspase-7. Dabei kommt es bei den Faktoren TNF α , TRAIL, Caspase-3 und -6 auch zu einer Expression im peritumoralen Normalgewebe, während die Normalkontrollen negativ bleiben. Auf Einzelheiten soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

5.2.2.1 *TNF α /TNF-R1/TRAIL*

50% der Tumorzellen der AOs sind positiv für TNF α , während TNF-R1 und TRAIL zu je 21% im vitalen Tumorgewebe exprimiert werden. In allen Fällen wird TNF α , in fünf von sechs TNF-R1 und in vier von sechs Fällen TRAIL exprimiert. Es kommt demnach in fünf von sechs Fällen zu einer Co-Expression von TNF α und seinem Rezeptor1. In allen Fällen wird TNF-R1 insgesamt weniger exprimiert als TNF α , was wiederum die Frage nach einer Abhängigkeit der Expression beider Faktoren aufkommen lässt. Die Expressionsraten korrelieren jedoch nicht (s. Diagramm 7.2.12). Auch besteht keine Korrelation der Expression von TNF α zur Apoptoserate (s. Diagramm 7.2.13), was nahe legen könnte, dass Apoptose bei AOs auch über andere Faktoren vermittelt wird. Dennoch ist TNF α in der Lage, Apoptose bei Oligodendrogliomen zu induzieren (Scurlock und Dawson 1999). In den Gliazellen des peritumoralen Normalgewebes wird TNF α im Durchschnitt zu 21%, TNF-R1 zu 8% exprimiert. Über eine Expression Apoptose-assoziiierter Faktoren im peritumoralen Normalgewebe von Oligodendrogliomen wird auch in anderen Studien berichtet (Delgado et al. 1999). AOs exprimieren die gleichen Faktoren im peritumoralen Normalgewebe wie Glioblastome (TNF α , TNF-R1, Caspase-3 und -6). Diese beiden Hirntumore scheinen sich demnach in ihrem biologischen Verhalten ähnlich zu sein. Dies ist auch insofern schlüssig, da – wie bereits oben beschrieben – AOs in Glioblastome übergehen können. Welche Rolle das peritumorale Hirngewebe insbesondere im Hinblick auf therapeutische Implikationen spielt, bleibt auch bei den AOs unbeantwortet. Über den Stellenwert des Faktors TRAIL ist bei den AOs kaum etwas bekannt (Nakamura et al. 2000). Analog zu den in Kapitel 5.1.2.1 diskutierten Mechanismen TRAIL-vermittelter Apoptose wurde ein evtl. bestehender Zusammenhang zwischen der Expression von TRAIL und der des möglicherweise agonistisch wirkenden Faktors SMAC überprüft. Es zeigt sich, dass AOs, die eine hohe Expressionsrate von TRAIL aufweisen, tendenziell eher weniger SMAC-positiv sind, es besteht jedoch keine klare Korrelation (s. Diagramm 7.2.14). Auch hat die Expressionsrate von TRAIL keinen direkten Einfluß auf die Apoptoserate (s. Diagramm 7.2.15), was jedoch die Beteiligung von TRAIL an einem komplexen Netzwerk apoptotischer Prozesse auch in den Tumorzellen anaplastischer Oligodendrogliome keineswegs ausschließt.

5.2.2.2 *SMAC/APAF-1/Caspase-9*

APAF-1 wird von drei der AOs zu durchschnittlich 3% in den Tumorzellen exprimiert. Alle AOs sind positiv für Caspase-9 (im Mittel zu 46% aller Tumorzellen) und SMAC. Es fällt eine besonders hohe Expressionsrate für SMAC auf. Sie liegt bei durchschnittlich 92% aller

Tumorzellen und ist damit die höchste Expressionsrate von SMAC bei allen untersuchten Tumorarten, gefolgt von den anderen WHO-III-Tumoren (Ependymome und Meningiome). Es besteht – wie bereits unter 5.1.2.2 gezeigt – eine signifikant erhöhte Expressionsrate von SMAC bei WHO-III- gegenüber WHO-IV-Tumoren ($p=0,004$). Da SMAC bei anderen Hirntumoren als agonistischer Faktor TRAIL-vermittelter Apoptose diskutiert wird, verglichen wir die Apoptoserate von Fällen, die eine Co-Expression beider Faktoren zeigen (vier von sechs Fällen) mit der, die nur eine Expression von SMAC zeigt (zwei Fälle). Es zeigt sich, dass in den Fällen, die beide Faktoren exprimieren, die Apoptoserate zwar tendenziell höher ist als in den Fällen, die nur SMAC exprimieren, es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,127$).

Da die Freisetzung von SMAC in das Zytosol Caspase-9-vermittelt sein soll (Adrain et al. 2001/ Mc Neish et al. 2003), untersuchten wir, ob eine Korrelation der Expressionsraten beider Faktoren im Tumorgewebe besteht. Dies ist jedoch nicht der Fall (s. Diagramm 7.2.16), was bedeuten könnte, dass die apoptotischen Netzwerke in der Tumorzelle weitaus komplexer sind und dass ein Faktor stets von mehreren anderen Faktoren beeinflusst wird. APAF-1 und Caspase-9 werden von drei AOs co-exprimiert. Die Apoptoserate dieser Fälle ist jedoch nicht höher als die der Fälle, bei denen es nur zu einer Expression von Caspase-9 kommt ($p=0,275$). Dies könnte andeuten, dass der Apoptosom-vermittelte intrinsische Modus der Apoptose bei den AOs einen geringeren Stellenwert einnimmt. Auch könnten alternative Aktivierungsmechanismen (Chang et al. 2003) von Caspase-9 eine Rolle spielen.

5.2.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird im Durchschnitt von 8% aller Tumorzellen exprimiert (ein Fall ist negativ für Caspase-2). Gemäß ihrer in Kapitel 5.1.2.3 näher beschriebenen Funktionen, überprüften wir, ob eine Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und SMAC, sowie Caspase-2 und -3 vorliegt. Die Expressionsraten von Caspase-2 und SMAC korrelieren nicht eindeutig (s. Diagramm 7.2.17). Wahrscheinlich wird SMAC – wie bereits oben angedeutet – von mehreren Faktoren beeinflusst. Auch existiert keine direkte Korrelation zwischen der Expression der Caspasen -2 und -3 (s. Diagramm 7.2.18). Da jedoch für die Caspase-3 bereits verschiedene Aktivierungswege bekannt sind und noch nicht restlos geklärt ist, wie genau sich die Caspasen -2 und -3 gegenseitig beeinflussen, steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zu den Resultaten anderer Studien. Caspase-3 wird in allen AOs zu durchschnittlich 50%, Caspase-6 im Mittel zu 33% (keine negativen Fälle) exprimiert. Caspase-7 wird von den AOs nicht exprimiert. Dies könnte für eine Insuffizienz des Caspase-

3-vermittelten Aktivierungsweges sprechen. Daneben kommt es gleichzeitig zu einer Expression von Caspase-6, die ebenfalls über Caspase-3 aktiviert wird. Dieser Umstand spricht dafür, dass die Caspasen -6 und -7 durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Auch andere Studien haben Hinweise auf unterschiedliche Aktivierungswege von Caspase-6 und -7 durch Caspase-3 gefunden (Henshall et al. 2002). Daneben zeigen die Gliazellen des peritumoralen Normalgewebes der AOs in jeweils zwei Fällen eine Expression von Caspase-3 (zu 21%) und -6 (zu 17%). Hier verhalten sich die AOs ähnlich wie die Glioblastome (s. Kapitel 5.1.2.3). Möglicherweise unterstreicht dieser Umstand den biologischen Verwandtheitsgrad dieser beiden Tumore (AOs können im Rahmen einer malignen Progression in Glioblastome übergehen).

5.3 Ependymome (WHO-III)

5.3.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

Das biologische Verhalten anaplastischer Ependymome (im Folgenden: AEs) ist aufgrund der Heterogenität dieses Tumors sehr unterschiedlich. Deshalb erzielten viele Studien, die versuchen, das biologische Verhalten von Ependymomen zu charakterisieren, widersprüchliche Ergebnisse. Dazu tragen zum Teil auch die geringen Fallzahlen bei. Auch unsere Ergebnisse, die zu einer Charakterisierung der AEs beitragen sollen, sind aufgrund der kleinen Fallzahl nur eingeschränkt und unter Vorbehalt übertragbar. Dennoch soll versucht werden, die erzielten Resultate in den vorherrschenden Wissensstand über Ependymome einzuordnen. Die von uns untersuchten AEs haben eine mittlere Proliferationsrate von 17% (Min: 5%; Max: 30%). Sie ist vergleichbar mit der anderer WHO-III-Tumore. Der apoptotische Index beträgt durchschnittlich 0,26% (Min: 0%; Max: 0,51%). Hierbei ist zu beachten, dass in einem Fall keine TUNEL-positiven Zellen zu sehen sind. Eine hohe Proliferationsrate war mit einer niedrigen Apoptoserate verknüpft. Eine statistische Berechnung der Korrelation erscheint jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl wenig sinnvoll. Viele Studien beschreiben, dass eine hohe Proliferationsrate (z.B. MIB-1 positive Zellen >20%) tendenziell auf eine schlechte Prognose hindeutet (Schroder et al. 1993/ Ritter et al. 1998/ Rushing et al. 1998/ Schiffer und Giordana 1998). Andere können keinen Zusammenhang zwischen der Prognose und der Proliferationsrate (gemessen am MIB-1-Index) finden (Prayson 1999). Auch wird der Stellenwert der Apoptose als prognostischer Marker von vielen Autoren als eher gering eingeschätzt (Schiffer et al. 1995/ Verstegen et al. 2002). Niedrigen Apoptoseraten (z.B. apoptotischer Index <1%) wird tendenziell eine

Korrelation zu einem hohen Malignitätsgrad und einer schlechteren Prognose nachgesagt (Korshunov 2000/ Korshunov et al. 2002(1)). Alles in allem scheinen die erzielten Resultate ähnlich heterogen wie die untersuchten Tumore zu sein.

5.3.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Die AEs exprimieren alle untersuchten Apoptose-assoziierten Faktoren in ihrem vitalen Tumorgewebe. Das peritumorale Normalgewebe sowie die Normalkontrollen exprimieren die Faktoren nicht. Die mögliche Bedeutung dieser Expression soll im Folgenden diskutiert werden.

5.3.2.1 TNF α / TNF-R1/ TRAIL

Von allen AEs werden TNF α (zu 50% im Mittel), TNF-R1 und TRAIL (zu jeweils durchschnittlich 25%) exprimiert. Diese Expressionsraten sind vergleichbar mit denen anderer WHO-III-Tumoren. Dabei ist die Expression von TNF α bei den AEs, wie auch bei den übrigen untersuchten WHO-III-Tumoren signifikant höher als bei den WHO-IV-Tumoren ($p=0,007$). Für TNF-R1 bzw. TRAIL existiert jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsrate im Tumorgewebe ($p=0,283$ bzw. $p=0,228$). Die Zellen des peritumoralen Normalgewebes sowie die der Normalkontrollen exprimieren die Faktoren nicht. Die Expression von TRAIL in Ependymomen wird auch in anderen Studien beschrieben (Frank et al. 1999/ Nakamura et al. 2000). Abgesehen davon beschäftigen sich nur sehr wenige Studien mit der TNF-vermittelten Apoptose bei Ependymomen. Es kommt zwar in allen Fällen zu einer Co-Expression von TNF α und TNF-R1, ob dies jedoch eine Auswirkung auf die nachfolgenden Effektor-Caspasen hat, lässt sich kaum beurteilen. Zwar werden diese von beiden Ependymomen exprimiert, letztendlich ist jedoch die Fallzahl nicht hoch genug, um eventuell vorhandene Zusammenhänge erkennen zu können. Auch scheint kein Zusammenhang zur Apoptoserate zu bestehen, da diese in den untersuchten AEs sehr differiert. Über eine Suffizienz des TNF-vermittelten Apoptoseweges in den AEs lässt sich somit nur schwer etwas aussagen. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Faktoren dieses Modus der Apoptose exprimiert werden und somit prinzipiell aktiviert werden könnten, was jedoch durch weiterführende in vivo-Studien noch zu beweisen wäre. Für andere Tumore wurde beschrieben, dass SMAC die Wirkung von TRAIL verstärken könnte (Rohn et al. 2001/ Deng et al 2002/ Fulda et al. 2002/ Kandasamy et al. 2003). Wir können feststellen, dass beide AEs TRAIL und SMAC co-exprimieren. Der Fall, der SMAC stärker exprimiert (dessen TRAIL-vermittelter Apoptoseweg somit verstärkt ablaufen müsste), zeigt zwar eine

höhere Expression der Caspasen-3 und -7, jedoch nicht von Caspase-9 oder -6. Auch ist die Apoptoserate nicht erhöht. Studien mit größeren Fallzahlen wären vonnöten, um die extrinsische Apoptoseaktivierung bei Ependymomen besser beurteilen zu können.

5.3.2.2 SMAC/APAF-1/ Caspase-9

Beide AEs sind positiv für APAF-1 (3% im Durchschnitt), Caspase-9 (zu durchschnittlich 25%) und SMAC (88% im Mittel). In beiden Fällen kommt es somit zu einer Co-Expression von APAF-1 und Caspase-9. Die Expression der durch das Apoptosom aktivierbaren Effektor-Caspasen ist hochreguliert. Da die Apoptoseraten jedoch sehr unterschiedlich sind, kann über die Zusammenhänge des intrinsischen Apoptoseweges bei AEs nur spekuliert werden. Da alle Faktoren intrinsischer Apoptose exprimiert werden, stellt sich die Frage, ob eine Inhibition der Durchführung von Apoptose durch Faktoren vermittelt wird, die vor allem die Aktivität der Effektor-Caspasen beeinflussen. Zu ihrer Beantwortung wären auch hier Studien mit größeren Fallzahlen notwendig.

5.3.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird von den AEs in sehr unterschiedlichem Ausmaß exprimiert (Min: 0,5%; Max: 85%; Durchschnitt: 43%). Alle AEs sind positiv für die Effektor-Caspasen-3 (88% aller Tumorzellen), -6 (63% im Mittel) und -7 (durchschnittlich 1%). Der Umstand, dass Caspase-7 so wenig, Caspase-6 jedoch in recht hohem Maße exprimiert wird und beide von der ebenfalls hochregulierten Caspase-3 aktiviert werden, könnte wiederum für unterschiedliche Aktivierungsmechanismen (Henshall et al. 2002) von Caspase-6 und -7 sprechen. Die in Kapitel 5.1.2.3 erläuterten Funktionen der Caspase-2 werden durch die Resultate bei den AEs nicht untermauert. Zum einen soll Caspase-2 die Freisetzung von SMAC bewirken, zum anderen Caspase-3 aktivieren. Die Expressionsraten von SMAC und Caspase-3 sind jedoch in den AEs höher, die eine niedrige Expression von Caspase-2 zeigen. Andererseits ist in AEs mit hohen Expressionsraten von Caspase-2 die Apoptoserate erhöht. Abschließend sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen vonnöten, um anaplastische Ependymome hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Apoptose besser charakterisieren zu können.

5.4 Medulloblastome (WHO-IV)

5.4.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

Medulloblastome zählen zu den embryonalen Tumoren und zeichnen sich durch ein aggressives Wachstumsverhalten aus. Entsprechend hoch ist die Proliferationsrate mit durchschnittlich 47% MIB-1-positiven Tumorzellen (Min: 20%; Max: 70%). Die Apoptoserate beträgt 0,47% (Max: 1,25%), wobei in zwei Fällen keine TUNEL-markierten Zellen zu sehen sind. Sie ist damit niedriger als die der Glioblastome (0,83%), die ebenfalls zu den hochmalignen WHO-IV-Tumoren zählen. Tendenziell sind hohe Proliferations- mit geringen Apoptoseraten verknüpft (s. Diagramm 7.2.19). Auch andere Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen Apoptose- bzw. Proliferationsrate und dem Wachstumsverhalten bzw. der Prognose (Korshunov et al. 2002(2)/ Ramachandran et al 2002/ Sarkar et al. 2002). Einige Arbeiten sehen zwar eine Korrelation der Prognose mit der Proliferations-, nicht jedoch mit der Apoptoserate (Nam et al. 2000).

5.4.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Die untersuchten Medulloblastome exprimieren die Apoptose-assoziierten Faktoren in ihrem vitalen Tumorgewebe. Eine Expression im peritumoralen Normalgewebe sowie in den Normalkontrollen findet sich nicht.

5.4.2.1 TNF α / TNF-R1/ TRAIL

Alle untersuchten Medulloblastome exprimieren TNF α . Durchschnittlich sind 36% aller Tumorzellen TNF α -positiv. TNF-R1 wird in fünf Tumoren (zu durchschnittlich 25%) und TRAIL von vier Medulloblastomen (im Mittel zu 38%) exprimiert. Diese Werte sind vergleichbar mit den anderen untersuchten WHO-IV-Tumoren (Glioblastome und PNETs), die WHO-III-Tumore zeigen höhere Expressionsraten ($p=0,007$). Auch hier sind in allen Fällen die Expressionsraten für TNF-R1 niedriger als für TNF α . Ebenfalls ist die Tendenz zu erkennen, dass Medulloblastome, die hohe Expressionsraten für TNF α aufweisen, auch stärker TNF-R1-positiv sind (s. Diagramm 7.2.20). Dies könnte eine mögliche Abhängigkeit für TNF-R1 von der Existenz von TNF α andeuten. Dass TNF α -vermittelte Apoptose eine Rolle bei dem Zelltod in Medulloblastomen spielt, wird auch von anderen Studien beschrieben (Dufay et al. 1999). Auch andere Rezeptoren der TNF-Familie sowie deren Liganden (insbesondere Fas/ FasL) scheinen am apoptotischen Zelltod bei Medulloblastomen beteiligt zu sein (Bodey et al. 1999). Ein direkter Zusammenhang zwischen den

Expressionsraten von TNF α und der Apoptoserate besteht jedoch nicht (s. Diagramm 7.2.21). Dies spricht zum einen für die Existenz weiterer Apoptose-Mechanismen, zum anderen für eine mögliche Insuffizienz des TNF α -vermittelten Apoptoseweges, da es trotz der Expression der Faktoren nicht zu einer Durchführung des apoptotischen Programmes kommt. TRAIL-induzierte Apoptose wird für Medulloblastome ebenfalls beschrieben, gleichzeitig scheinen jedoch potente inhibitorische Faktoren vorhanden zu sein. Diese gälte es, im Rahmen einer Therapie auszuschalten (Nakamura 2000/ Zuzak et al. 2002). TRAIL wird von unseren Medulloblastomen wenig exprimiert. Die Expressionsraten korrelieren nicht mit dem apoptotischen Index (s. Diagramm 7.2.22). Auch die Expression des Faktors SMAC, der möglicherweise die TRAIL-vermittelte Apoptose verstärkt, führt in den Fällen, die eine Co-Expression beider Faktoren zeigen, nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate.

5.4.2.2 SMAC/APAF-1/ Caspase-9

APAF-1 wird nur in einem Fall exprimiert (zu 7% im Durchschnitt), Caspase-9 in drei Fällen (zu 11% im Mittel). Alle Medulloblastome exprimieren SMAC (zu durchschnittlich 72% aller Tumorzellen). Dieser Faktor scheint demnach eine besondere Bedeutung für den apoptotischen Zelltod bei Medulloblastomen zu haben. Alternative biologische Funktionen von SMAC, die zu einer Hochregulation führen könnten, sind natürlich nicht auszuschließen, es existieren jedoch in der aktuellen Literatur keine Hinweise darauf. Bei der TRAIL-vermittelten Apoptose scheint SMAC keine große Rolle zu spielen (s. oben). Die Freisetzung von SMAC aus dem Mitochondrium in das Zytosol soll Caspase-9-vermittelt sein (Adrain et al. 2001/ McNeish et al. 2003). So kommt es in drei Fällen zu einer Co-Expression von Caspase-9 und SMAC. Die Expressionsraten von SMAC sind aber auch in den Fällen hoch, die Caspase-9 nicht exprimieren. Die Apoptoseraten sind in den Fällen, die Caspase-9 nicht exprimieren, höher als in den Fällen, die eine Co-Expression beider Faktoren zeigen. Dies könnte alternative, Caspase-9-unabhängige Aktivierungsmechanismen von SMAC andeuten. In einem Fall werden die Faktoren APAF-1 und Caspase-9 co-exprimiert. Dieser Fall hat eine sehr geringe Apoptoserate. Es scheinen daher entweder APAF-1-unabhängige Aktivierungswege Caspase-9-vermittelter Apoptose in Medulloblastomen (mit viel Apoptose) stark ausgeprägt zu sein, oder die Effektivität Caspase-9-vermittelter Apoptose wird von inhibitorischen Faktoren, die nicht näher bekannt sind, herabgesetzt. Caspase-9 aktiviert die Effektor-Caspase-3. Die Fälle, die Caspase-9 exprimieren, zeigen hohe Expressionsraten von Caspase-3. Diese wird jedoch auch in den Fällen exprimiert, die Caspase-9-negativ sind. Dass der mitochondriale Apoptoseweg funktionstüchtig ist, wurde von einzelnen Studien

dargestellt (Fulda und Debatin 2000/ Kogel et al. 2001). Therapeutische Ansätze mit Betulinsäure führten hier zu einem Effekt auf mitochondriale Faktoren, die über eine Aktivierung von Caspasen Apoptose bei Medulloblastomen induzieren konnten.

5.4.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird bei den Medulloblastomen in vier Fällen (zu durchschnittlich 8% in den Tumorzellen) exprimiert. Caspase-3 wird in fünf Fällen (zu 43% im Mittel), Caspase-6 von sechs Medulloblastomen (im Durchschnitt zu 36%) exprimiert. Nur ein Fall zeigt Caspase-7-positive Tumorzellen. Hier exprimieren durchschnittlich 1% der Tumorzellen Caspase-7, die Expressionsrate steigt jedoch fokal auf etwa 15% an.

Caspase-2 soll zum einen für die Induktion mitochondrialer Faktoren in das Zytosol verantwortlich sein. In vier Fällen werden SMAC und Caspase-2 gemeinsam exprimiert. Diese Fälle zeigen im Vergleich zu den anderen drei Fällen, die Caspase-2-negativ sind, eher hohe Expressionsraten für SMAC. Eine direkte Korrelation besteht jedoch nicht (s. Diagramm 7.2.23). Alternative regulierende Mechanismen deuten sich demnach bei den Medulloblastomen ebenso wie bei den anderen untersuchten Tumoren an. Zum anderen vermittelt Caspase-2 die Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Drei Fälle zeigen eine Co-Expression der beiden Faktoren. Hier kommt es tendenziell zu eher hohen Expressionsraten von Caspase-3 im Vergleich zu den Caspase-2-negativen Fällen. Obwohl keine eindeutige Korrelation besteht (s. Diagramm 7.2.24), erscheint die These einer Caspase-2-vermittelten Aktivitätssteigerung von Caspase-3 nicht völlig abwegig. Es wurden bei Glioblastomen bereits erste viel versprechende pharmakotherapeutische Versuche *in vitro* durchgeführt (Narita et al. 2000/ Ceruti et al. 2003). Ein ähnlicher experimenteller Ansatz mit Medulloblastomen wäre ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Studien. Die Effektor-Caspase-3 ist unter Anderem verantwortlich für die Aktivierung der Caspasen -7 und -6. Die Expressionsraten für diese beiden Caspasen unterscheiden sich bei den Medulloblastomen jedoch ganz erheblich. Während Caspase-7 nur in einem Fall mäßig exprimiert wird, sind sechs von sieben Fällen zu einem erheblichen Anteil positiv für Caspase-6. Dies scheint die Theorie verschiedener Aktivierungsmechanismen für Caspase-6 und -7 durch Caspase-3 zu stützen. Einige Studien zeigen, dass Caspase-3 eine erhebliche Bedeutung bei der Durchführung der Apoptose bei Medulloblastomen zuzukommen scheint. Sie berichten ebenfalls über eine deutliche Hochregulierung von Caspase-3, während Caspase-7 auch in diesen Studien nur zu einem geringen Anteil von wenigen Zellen exprimiert wird (MacDonald und Ladisch 2001/ Puig et al. 2001). Das vielschichtige Netzwerk apoptotischer

Faktoren ist bereits durch seine Komplexität für viele Störfaktoren anfällig. Eine Dysregulation der koordinierten Expression Apoptose-assoziiierter Faktoren könnte bei den Medulloblastomen unter anderem darin begründet sein, dass es sich bei ihnen um nur mangelhaft differenzierte Tumore handelt. Dies könnte eine Therapie von Medulloblastomen, die auf einer Induktion von Apoptose beruht, möglicherweise erschweren.

5.5 PNETs (Primitive Neuroektodermale Tumore; WHO-IV)

Ob sich die PNETs von den Medulloblastomen unterscheiden lassen, oder ob sie schlicht eine supratentorielle oder spinale Form des Medulloblastoms darstellen, ist bis heute nicht restlos geklärt (Zeltzer et al. 1990/ Rorke et al. 1997/ Goldbrunner et al. 1999). Unter anderem soll im Rahmen dieser Diskussion Hinweisen, die für eine Unterscheidung beider Tumoren sprechen, nachgegangen werden.

5.5.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

PNETs haben als hochmaligne WHO-IV-Tumore eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, die sich in einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen niederschlägt. Bei den untersuchten PNETs findet sich eine durchschnittliche Rate von nahezu 40% proliferierender (d.h. MIB-1-exprimierender) Tumorzellen. Dies ist vergleichbar mit der Proliferationsrate anderer untersuchter WHO-IV-Tumore. Alle untersuchten PNETs zeigen proliferierende Tumorzellen. Die Expressionsraten von MIB-1 schwanken zwischen 15% und 80%. Dem gegenüber steht eine Apoptoserate (d.h. Zellen mit TUNEL-markierten DNA-Einzelstrangbrüchen) von durchschnittlich 0,22%. Ein Fall zeigt keine apoptotischen Tumorzellen, während in den übrigen Fällen die Apoptoserate zwischen 0,05% und 0,69% schwankt. Wie bei den Medulloblastomen zeigen auch die PNETs keine erhöhte Rate perinekrotisch gelegener apoptotischer Zellen. Eine Korrelation zwischen Apoptose- und Proliferationsrate kann nicht gefunden werden (s. Diagramm 7.2.25). Ähnliche Ergebnisse werden auch von anderen Autoren erzielt (Szekessy und Stoltenburg-Didinger 2001/ Schouten van Meeteren et al. 2002). Widersprüchliche Aussagen liegen bezüglich einer Verwertbarkeit der Apoptose- oder Proliferationsrate als prognostischer Marker vor. Einige Veröffentlichungen sehen eine Korrelation zwischen der Apoptoserate und dem Behandlungserfolg (gemessen an der Länge der progressionsfreien Überlebenszeit) (Haslam et al. 1998), während andere Arbeitsgruppen keine Zusammenhänge erkennen können (Grotzer et al. 2001(1)). In einigen Veröffentlichungen wird der Proliferationsrate eine

prognostische Relevanz bescheinigt (Bodey et al. 1997/ Grotzer et al. 2001(2)). Andere Arbeiten können dies nicht bestätigen (Woodburn et al. 2001). Zusammengefaßt lassen diese gegensätzlichen Ergebnisse zumindest darauf schließen, dass es sich bei den PNETs um eine sehr heterogene Tumorart handelt. Studien, die ausschließlich mit Medulloblastomen gearbeitet haben, konnten zum Teil Ergebnisse erzielen, die eine Korrelation zwischen Apoptose- und Proliferationsrate mit der Prognose aufzeigten (s. Kapitel 5.4.1). Dies könnte auf ein unterschiedliches biologisches Verhalten der Medulloblastome und der PNETs hindeuten.

5.5.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Caspase-9 und -7 werden von den untersuchten PNETs nicht exprimiert. Die übrigen Apoptose-assoziierten Faktoren werden von den Tumorzellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Das peritumorale Normalgewebe sowie die Normalkontrollen sind negativ für die untersuchten Faktoren.

5.5.2.1 TNF α / TNF-R1/ TRAIL

TNF α wird in vier von sechs Fällen exprimiert. Die durchschnittliche Expressionsrate liegt bei 17% positiver Tumorzellen. TNF-R1 wird ebenfalls von vier Fällen exprimiert, allerdings kommt es in nur zwei Fällen zu einer Co-Expression der beiden Faktoren. Durchschnittlich sind 17% aller Tumorzellen positiv für TNF-R1. PNETs zeigen damit die niedrigsten Expressionsraten von allen untersuchten Tumoren für diese Faktoren. Die anderen WHO-IV-Tumore zeigen allerdings Expressionsraten gleicher Größenordnung, sodass kein signifikanter Unterschied insbesondere zwischen Medulloblastomen und PNETs ermittelt werden kann ($p=0,191$ für TNF α , $p=0,429$ für TNF-R1 und $p=0,760$ für TRAIL). Die Tatsache, dass auch in den Fällen TNF-R1-positive Tumorzellen zu sehen sind, die keine Expression von TNF α zeigen, lässt die Vermutung zu, dass die Expression beider Faktoren nur bedingt voneinander abhängig ist. Es bleibt jedoch die Frage, ob in den Tumoren, die lediglich TNF α , nicht jedoch TNF-R1 exprimieren, Apoptose ähnlich suffizient ablaufen kann wie in den Fällen, die eine Co-Expression beider Faktoren zeigen. Die Apoptoserate ist bei den beiden Fällen, die sowohl TNF α als auch TNF-R1 exprimieren zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht ($p=0,221$). Studien konnten zeigen, dass eine Inkubation von Neuroblastom-Zelllinien mit Retinolsäure zu einer Steigerung der Expression von TNF-R1 führt. Konsekutiv kam es zu einer TNF α -vermittelten Aktivierung von Caspase-3 (Condorelli et al. 2000). TRAIL wird in fünf von sechs Fällen zu durchschnittlich 21% von den Tumorzellen exprimiert. Dass TRAIL

bei der Apoptose in PNETs von Bedeutung ist, wird auch von anderen Studien beschrieben (Grotzer et al. 2000/ Zuzak et al. 2002). Zwischen TRAIL-vermittelter Apoptose bei Medulloblastomen und PNETs wird dort jedoch nicht unterschieden. Dem schließen sich die Ergebnisse dieser Arbeit an. Analog zu den anderen untersuchten Tumoren werden die Expressionsraten von TRAIL und SMAC und ihre Korrelation mit der Apoptoserate untersucht. Nur in einem Fall kommt es nicht zu einer Co-Expression der beiden Faktoren. Eine Korrelation zur Apoptoserate, die für eine Verstärkung TRAIL-vermittelter Apoptose durch SMAC spräche, existiert aber nicht ($p=0,990$).

5.5.2.2 SMAC/APAF-1/ Caspase-9

SMAC wird von allen untersuchten PNETs exprimiert. Dabei sind durchschnittlich 38% der Tumorzellen SMAC-positiv. In allen Fällen kommt es zu einer fokalen Expressionssteigerung von SMAC. Es existieren demnach nicht nur inter- sondern auch intratumoral unterschiedliche Expressionsraten. In zwei Fällen ist dies so ausgeprägt, dass einige Bereiche des vitalen Tumorgewebes negativ, andere zu annähernd 100% SMAC-positiv sind. Solche fokalen Expressionsmuster werden auch von anderen Studien über PNETs beschrieben, allerdings für andere Apoptose-assoziierte Faktoren (Gyure et al. 1999). Ihre Bedeutung ist bisher unklar. Eventuell hängt dies mit der Heterogenität der PNETs zusammen. So kann es innerhalb eines Tumors zu verschiedenen Differenzierungen und Tumorzellklonen kommen, die sich in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden können. Die beiden anderen untersuchten mitochondrialen Faktoren, APAF-1 und Caspase-9, werden von den PNETs kaum exprimiert. Lediglich ein Fall zeigt eine geringe Expression von APAF-1 (0,5%). Alle Fälle sind negativ für Caspase-9. Bei den Medulloblastomen hingegen werden beide Faktoren exprimiert (s. Kapitel 5.4.2.2). Ob dieser Ausfall mitochondrialer Faktoren bei den PNETs zu einer Abnahme der Apoptoserate der PNETs verglichen mit der der Medulloblastome (0,22% vs. 0,47%) führt, ist aufgrund der Komplexität des apoptotischen Netzwerkes nicht sicher feststellbar. Studien, die die Rolle des mitochondrialen Apoptoseweges näher beleuchten, beziehen sich hauptsächlich auf Medulloblastome (Fulda et al. 1999). Einige Studien haben bei Neuroblastom-Zelllinien festgestellt, dass APAF-1 und Caspase-9 das Tumorstadium nicht inhibieren. Da auch Cytochrom c nicht aus den Mitochondrien freigesetzt wird, wird ein Defekt postuliert, der im Apoptose-Programm noch vor der Aktivierung mitochondrialer Faktoren liegt (Teitz et al. 2002). Eine genetische Mutation scheint für die Stilllegung von Caspase-9 nicht in Frage zu kommen, was ebenfalls für die Existenz eines vorgeschalteten

Inhibitors sprechen könnte (Catchpoole und Lock 2001). Möglicherweise könnte hierbei Caspase-2 eine Rolle spielen (s. unten).

5.5.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird in drei von sechs Fällen zu durchschnittlich 15% von den Tumorzellen exprimiert. Eine der Funktionen von Caspase-2 ist die Freisetzung mitochondrialer Faktoren wie APAF-1 und SMAC. Der Fall, bei dem es zu einer Expression von APAF-1 kommt, zeichnet sich zwar durch eine hohe Rate Caspase-2-exprimierender Zellen aus (75%), darüber hinaus ist jedoch eine Korrelation zwischen den Expressionsraten von Caspase-2 und APAF-1 sowie SMAC nicht gegeben. Da Caspase-2 von so wenigen Fällen und in einem insgesamt relativ geringen Ausmaß exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob die Insuffizienz des Mitochondrien-vermittelten Apoptoseweges ursächlich mit der geringen Expression von Caspase-2 verknüpft ist (s. oben). Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Freisetzung Apoptose-assoziiierter Faktoren aus den Mitochondrien auch von anderen Faktoren reguliert wird. Auch haben Studien an Neuroblastom-Zelllinien gezeigt, dass eine Inkubation mit Staurosporin zu einer Aktivierung von Caspase-2 und -3, nicht jedoch zu einem Anstieg der Expression von Caspase-9 geführt hat (Lopez und Ferrer 2000). Dies spräche wiederum entweder für die Existenz eines anderen inhibierenden Faktors, der jedoch noch nicht bekannt ist, oder für eine nicht-mitochondriale Form der Aktivierung von Apoptose. Caspase-3 wird in allen Fällen von den Tumorzellen exprimiert (zu durchschnittlich 38%). Die Fälle, bei denen es zu einer Co-Expression von Caspase-2 und -3 kommt, zeichnen sich, verglichen mit den Fällen, die nur Caspase-3 exprimieren, tendenziell durch höhere Apoptoseraten aus. Eine klare Korrelation besteht jedoch nicht ($p=1,000$). Nichtsdestotrotz scheint Caspase-3 bei den PNETs eine wichtige Rolle zu spielen. Dies wird auch von anderen Studien beschrieben. Eine Aktivierung von Caspase-3 konnte bei Inkubationen von PNET-Zelllinien mit verschiedenen Pharmaka (z.B. Cyclooxygenase-2-Hemmer) beobachtet werden (Fulda et al. 1997/ Patti et al. 2002). Die Induktion von Apoptose über eine Aktivierung von Caspase-3 in Tumorzellen stellt somit einen Fokus wissenschaftlichen Interesses dar. Caspase-7 wird von den untersuchten PNETs nicht exprimiert. Caspase-6 wird in allen Fällen zu durchschnittlich 46% von den Tumorzellen exprimiert. Da beide Effektor-Caspasen über Caspase-3 aktiviert werden, könnte dies – ähnlich wie bei den anderen untersuchten Tumoren – für unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von Caspase-6 und -7 sprechen. In diesem Punkt unterscheiden sich die PNETs nicht von den untersuchten Medulloblastomen.

Alles in allem unterstreichen die erzielten Ergebnisse die Heterogenität der wenig differenzierten PNETs. Sie lassen sich hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens und ihrer Fähigkeit zur suffizienten Durchführung apoptotischer Vorgänge schwerlich charakterisieren. Eine klare Unterscheidung zwischen Medulloblastomen und PNETs kann anhand der Ergebnisse nicht getroffen werden, auch wenn einige Faktoren durchaus unterschiedlich exprimiert werden.

5.6 Meningiome

Meningiome werden nach der WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems in eine dreistufige Malignitätsskala eingeteilt (WHO-I-III). Die Einstufung der Malignität eines Meningioms wird anhand verschiedener Parameter vorgenommen (s. Kapitel 1.4.5). Im folgenden Abschnitt soll neben einer Charakterisierung des Zelltodsystems und des Wachstumsverhaltens versucht werden, die atypischen und anaplastischen Meningiome anhand der untersuchten Faktoren entsprechend ihrer unterschiedlichen Graduierung nach WHO voneinander abzugrenzen.

5.6.1 Atypische Meningiome (WHO-II)

5.6.1.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

Atypische Meningiome (im Folgenden: AtM) gehören zu den eher langsam wachsenden Hirntumoren. Ihre durchschnittliche Proliferationsrate ist mit 12,64% MIB-1-markierter Tumorzellen entsprechend niedrig. Alle untersuchten AtMs zeigen MIB-1-positive Tumorzellen. Die Proliferationsraten variieren stark (Min: 4%; Max: 15%). Damit zeigt sich in zwei Fällen eine Überschneidung der MIB-1-Werte von AtMs und anaplastischen Meningiomen (im Folgenden: AnM), auch wenn diese eine höhere Durchschnittsrate proliferierender Tumorzellen haben. Die MIB-1-Markierungsrate von Meningiomen kann daher nicht als sicheres Kriterium zur Einteilung in das WHO-Schema verwendet werden. Zu dieser Einschätzung gelangen auch andere Studien (Khoshyomn et al. 1999/ Abramovich und Prayson 2000/ Torp et al. 2001). Obwohl die MIB-1-Expressionsrate eines einzelnen Meningiomes keine klare Einteilung hinsichtlich der Malignität zulässt, kann die durchschnittliche MIB-1-Rate der Meningiomgruppen Hinweise zur Prognose von AtMs und AnMs geben (Roggendorf et al. 1987/ Niedermayer et al. 1996/ Karamitopoulou et al. 1998/ Amaty et al. 2001/ Ho et al. 2002). Die Apoptoserate der AtMs beträgt im Durchschnitt 0,4%

(entsprechend der Anzahl TUNEL-markierter Tumorzellen). In drei von 14 Fällen sind keine TUNEL-positiven Tumorzellen nachweisbar. Die Expressionsraten schwanken intertumoral stark (0,02%-2,15%). Damit ergibt sich für die Unterscheidung von WHO-II- und -III-Meningiomen ähnliches wie für die Proliferationsrate. Die durchschnittliche Apoptoserate der AnMs ist zwar niedriger, in vielen Fällen überschneiden sich jedoch die Werte. Die Apoptoserate von Meningiomen kann demnach nicht zur Einteilung in die WHO-Klassifikation herangezogen werden. Zu diesem Ergebnis gelangen auch andere Arbeitsgruppen (Konstantinidou et al. 2001). Dennoch sprechen viele Arbeiten der Apoptoserate eine prognostische Relevanz zu (Maier et al. 1997/ Ng und Chen 1998). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass es sich stets um Durchschnittswerte handelt, die für die Einschätzung der Situation einzelner Patienten wenig von Nutzen sind. Drei Fälle zeigten eine perinekrotische Steigerung TUNEL-markierter Zellen. Dies wird auch in anderen Arbeiten beschrieben (Das et al. 2000). Die Bedeutung könnte ähnlich wie bei den Glioblastomen im schlechten Sauer- und Nährstoffangebot in bestimmten Arealen des Tumorgewebes liegen. Dies führt im Extremfall zur Nekrose. In Grenzbereichen könnte jedoch noch eine gewisse Reserve von ATP und damit die Durchführung von Apoptose möglich sein.

5.6.1.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Alle untersuchten Apoptose-assoziierten Faktoren werden von den AtMs im vitalen Tumorgewebe exprimiert. Peritumorale Gewebsanteile sowie die Normalkontrollen sind negativ.

5.6.1.2.1 TNF α /TNF-R1/TRAIL

TNF α und TNF-R1 werden in zwölf von 14 Fällen exprimiert. In elf Fällen kommt es zu einer Co-Expression der beiden Faktoren. Die durchschnittlichen Expressionsraten liegen bei 48% (für TNF α), bzw. 31% (für TNF-R1). Sie sind damit im Vergleich zu den anderen untersuchten Tumoren ähnlich hoch wie die der Ependymome und Oligodendrogliome (beide WHO-III). Die AnMs zeigen deutlich höhere Expressionsraten für TNF α und TNF-R1 (s. Kapitel 5.6.2) als die anderen WHO-III-Tumore und die AtMs. In allen Fällen, die eine Co-Expression beider Faktoren zeigen, sind die Expressionsraten für TNF-R1 niedriger als für TNF α . Ob dies für eine Abhängigkeit für TNF-R1 von TNF α spricht, kann wie bei den anderen untersuchten Tumoren nur vermutet werden. Dass der TNF α -vermittelte Apoptoseweg bei Meningiomen eine Rolle spielt, wird auch in anderen Studien beschrieben (Rittierodt et al. 2001). TRAIL wird von zwölf der 14 AtMs zu 38% im Durchschnitt von den

Tumorzellen exprimiert. Dies ist die höchste TRAIL-Expressionsrate aller untersuchter Tumoren. Welche Rolle TRAIL-vermittelte Apoptose bei den Meningiomen spielt, bleibt jedoch unklar. Eine Korrelation zur Apoptoserate besteht nicht (s. Diagramm 7.2.26). Andere Studien, die sich mit der Expression von TRAIL bei Hirntumoren beschäftigten, konnten keine TRAIL-positiven Tumorzellen bei Meningiomen finden (Nakamura et al. 2000). SMAC soll agonistisch auf die pro-apoptotische Funktion von TRAIL wirken. In zwölf von 14 Fällen werden sowohl TRAIL als auch SMAC exprimiert. Die Apoptoserate ist in diesen Fällen signifikant erhöht gegenüber den Fällen, die keine Co-Expression von TRAIL und SMAC zeigen ($p=0,029$). Nichtsdestotrotz ist dieses Ergebnis aufgrund der eher kleinen Fallzahl kritisch zu sehen.

5.6.1.2.2 SMAC/APAF-1/ Caspase-9

APAF-1 wird von sechs (zu 7%), Caspase-9 von zwei (zu 25%) der 14 und SMAC in allen (zu 64%) Fällen exprimiert. Die Mitochondrien-vermittelte Form der Apoptose wurde für Meningiome bisher kaum beschrieben. Nur wenige Studien können über eine Hochregulation von Caspase-9 und -3 berichten (Ray et al. 2002). In den untersuchten AtMs werden die mitochondrialen Faktoren APAF-1 und Caspase-9 im Gegensatz zu SMAC kaum exprimiert. Da die Überführung von SMAC in das Zytosol zum Teil Caspase-9-vermittelt sein soll (Adrain et al 2001/ McNeish et al. 2003) könnte dies möglicherweise für die Existenz eines Inhibitors sprechen, der die Bildung des Apoptosoms verhindert. Die hohen Expressionsraten von SMAC scheinen jedenfalls kaum Caspase-9-vermittelt zu sein. Eine Caspase-2-vermittelte Aktivierung von SMAC scheint ebenfalls nicht in Frage zu kommen, da die Expressionsraten eher gering sind und nicht mit denen von SMAC korrelieren (s. Diagramm 7.2.27). Dies könnte für einen alternativen Freisetzungsmechanismus von SMAC aus den Mitochondrien sprechen. Die AnMs zeigen ähnliche Expressionsraten für die Faktoren mitochondrialer Apoptose. APAF-1 und Caspase-9 werden ebenfalls wenig, SMAC eher hoch exprimiert. Eine Charakterisierung der Mitochondrien-assoziierten Apoptose bei Meningiomen weist eher auf die Gemeinsamkeiten als auf die Unterschiede zwischen AtMs und AnMs hin.

5.6.1.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird in neun von 14 Fällen zu durchschnittlich 11% im vitalen Tumorgewebe exprimiert. Welche Rolle Caspase-2 bei der Apoptose von Meningiomen spielt, ist unklar. Keine ihrer bekannten Funktionen lässt sich in den untersuchten Fällen klar nachvollziehen

(zu ihrer Wechselwirkung mit SMAC: s. oben). Eine Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-2 wäre zwar möglich, es wird jedoch auch Caspase-3 in Caspase-2-negativen Fällen exprimiert. Hier könnte die Aktivierung von Caspase-3 über andere Mechanismen (z.B. TNF α) vermittelt werden. Eine Korrelation zwischen den Expressionsraten von Caspase-2 und -3 besteht nicht (s. Diagramm 7.2.28). Caspase-3 und -6 werden von allen AtMs exprimiert (zu durchschnittlich 29% bzw. 63%). Lediglich ein Fall exprimiert Caspase-7. Hier kommt es zu durchschnittlich 5% positiven Tumorzellen, während einige Areale des vitalen Tumorgewebes fokal Expressionsraten von etwa 50% zeigen. Obwohl die beiden Effektor-Caspasen-6 und -7 durch Caspase-3 aktiviert werden, sind ihre Expressionsraten sehr unterschiedlich. Dies könnte für unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von Caspase-6 und -7 sprechen. Die Variabilität der Expression sämtlicher Caspasen ist in den untersuchten Fällen sehr groß. Ihre Analyse lässt sich somit allgemeingültig nicht zur Einordnung eines einzelnen Meningiomes in die WHO-Gradifikation verwenden. Die klinische Relevanz einer solchen Analyse hinsichtlich der Prognose ist daher fragwürdig. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass TNF α - und Caspase-3-vermittelte Apoptose bei den AtMs eine Rolle zu spielen scheint, was sich möglicherweise als therapeutische Option nutzen ließe.

5.6.2 Anaplastische Meningiome (WHO-III)

5.6.2.1 Apoptose/ Nekrose/ Proliferation

AnMs sind maligne Hirntumore, die sich innerhalb der Gruppe der Meningiome durch die höchste Aggressivität bezüglich ihres biologischen Verhaltens auszeichnen. Sie wachsen schneller und rezidivieren häufiger als andere Meningiome. Ihre Proliferationsrate (gemessen an MIB-1-positiven Tumorzellen) ist mit durchschnittlich 25% höher als die der AtMs. Alle AnMs zeigen MIB-1-positive Zellen (Min: 20%; Max: 40%). Die Apoptoserate der AnMs beträgt durchschnittlich 0,13% (entsprechend der Anzahl TUNEL-markierter Tumorzellen). In drei von vier Fällen sind TUNEL-positive Tumorzellen zu sehen. Die Expressionsraten schwanken zwischen 0,08% und 0,24%. Die durchschnittliche Apoptoserate der AnMs ist damit zwar niedriger, in vielen Fällen überschneiden sich jedoch die Werte mit den AtMs. Die Apoptoserate von Meningiomen kann demnach nicht zur Einteilung in die WHO-Klassifikation herangezogen werden. Zu diesem Ergebnis gelangen auch andere Arbeitsgruppen (Konstantinidou et al. 2001). Dennoch sehen einige Arbeitsgruppen die Apoptoserate als prognostischen Marker an (Maier et al. 1997/ Ng und Chen 1998). Auch hier

ist zu bedenken, dass es sich bei den Ergebnissen stets um Durchschnittswerte handelt, die auf einzelne Patienten nur bedingt übertragbar sind.

5.6.2.2 Apoptose-assoziierte Faktoren

Die AnMs exprimieren alle untersuchten Faktoren im vitalen Tumorgewebe. Die peritumoralen Gewebsanteile sowie die Normalkontrollen zeigen keine Expression.

5.6.2.2.1 TNF α /TNF-R1/TRAIL

TNF α wird in drei von vier, TNF-R1 in allen Fällen exprimiert. In drei Fällen kommt es zu einer Co-Expression der beiden Faktoren. Die durchschnittlichen Expressionsraten liegen bei 67% (für TNF α), bzw. 63% (für TNF-R1). Sie haben damit im Vergleich zu den AtMs und zu den anderen untersuchten WHO-III-Tumoren deutlich höhere Expressionsraten für TNF α und TNF-R1 (s. Kapitel 5.2 und 5.3). Tendenziell zeigen die Fälle, in denen es zu einer Co-Expression beider Faktoren kommt, höhere Expressionsraten für TNF-R1 als für TNF α . Dass der TNF α -vermittelte Apoptoseweg bei Meningiomen eine Rolle spielt, wird auch in anderen Studien beschrieben (Rittierodt et al. 2001). TRAIL wird in drei von vier Fällen zu 25% im Durchschnitt von den Tumorzellen exprimiert. Diese Expressionsrate ist vergleichbar mit der anderer untersuchter WHO-III-Tumore und liegt unter der der AtMs. TRAIL-vermittelte Apoptose könnte bei den AnMs eine geringere Rolle spielen als bei den AtMs, genaueres bleibt jedoch unklar, schon aufgrund der geringen Fallzahl der AnMs. Eine Korrelation zur Apoptoserate kann im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen Fallzahl TRAIL-exprimierender Tumore nicht berechnet werden. Auch konnten andere Studien, die sich mit der Expression von TRAIL bei Hirntumoren beschäftigten, keine TRAIL-positiven Tumorzellen bei Meningiomen finden (Nakamura et al. 2000). SMAC soll als Agonist auf die pro-apoptische Funktion von TRAIL wirken. In drei von vier Fällen werden sowohl TRAIL als auch SMAC exprimiert. Die Apoptoserate des Falles, der nur SMAC exprimiert ist zwar gering, ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht ($p=0,221$).

5.6.2.2.2 SMAC/APAF-1/Caspase-9

APAF-1 wird in drei von vier Fällen (zu 11%), Caspase-9 in einem Fall (zu 25%) und SMAC von allen Fällen exprimiert (zu 88%). Wenig ist über die Mitochondrien-vermittelte Form der Apoptose bei den Meningiomen bekannt. Nur wenige Studien berichten über eine Hochregulation von Caspase-9 und -3 (Ray et al. 2002). APAF-1 und Caspase-9 werden im Gegensatz zu SMAC kaum exprimiert. Dies könnte für die Existenz eines Inhibitors sprechen,

der die Bildung des Apoptosoms verhindert. Die hohen Expressionsraten von SMAC scheinen weder Caspase-9-, noch Caspase-2-vermittelt zu sein, wie dies für andere Hirntumore beschrieben wurde (Adrain et al 2001/ McNeish et al. 2003). Die Expressionsraten der beiden Initiator-Caspasen sind zu gering und korrelieren nicht mit denen von SMAC (s. Diagramm 7.2.29; da nur von einem Tumor Caspase-9 exprimiert wird, kann keine Analyse einer Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-9 erfolgen). Dies könnte einen alternativen Freisetzungsmechanismus von SMAC aus den Mitochondrien andeuten. Da die Faktoren Mitochondrien-assoziiertes Apoptose bei AtMs und AnMs in ähnlicher Weise exprimiert werden, dient ihre Analyse nicht zur Unterscheidung von WHO-II- und -III-Tumoren.

5.6.2.2.3 Caspasen

Caspase-2 wird in allen vier Fällen zu durchschnittlich 29% im vitalen Tumorgewebe exprimiert. Über die Rolle von Caspase-2 bei der Apoptose von AnMs lässt sich nur mutmaßen. Zwar kommt es in allen Fällen zu einer Ko-Expression von Caspase-2, SMAC und Caspase-3, die Expressionsraten korrelieren jedoch nicht miteinander (s. Diagramme 7.2.29 und 7.2.30). Die Aktivierung von Caspase-3 kann aber auch durch andere Faktoren vermittelt sein (z.B. Caspase-8). Ebenfalls werden Caspase-3 und -6 von allen AnMs exprimiert (zu durchschnittlich 38% bzw. 75%). Lediglich ein Fall exprimiert Caspase-7 (zu 1% im Mittel). Beide Effektor-Caspasen-6 und -7 werden durch Caspase-3 aktiviert. Trotzdem sind ihre Expressionsraten sehr unterschiedlich. Dies könnte für unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von Caspase-6 und -7 sprechen. Häufig kommt es bei einem Vergleich der Expressionsraten der Caspasen zu Überschneidungen von Werten bei atypischen und anaplastischen Meningiomen. Eine Analyse der Apoptose-assoziierten Faktoren lässt sich daher nicht zur Einordnung eines einzelnen Falles in die WHO-Klassifikation verwenden. Die klinische Relevanz einer solchen Analyse ist daher fragwürdig. Bis auf TRAIL werden alle Apoptose-assoziierten Faktoren von den maligneren WHO-III-Meningiomen höher exprimiert als von den atypischen (WHO-II) Meningiomen. Alle anderen untersuchten Tumore zeigen ein eher reziprokes Verhältnis zwischen dem Malignitätsgrad und der Expressionsrate Apoptose-assoziierten Faktoren. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass TNF α - und SMAC-, sowie durch die Effektor-Caspasen -3 und -6-vermittelte Apoptose bei den AnMs eine Rolle spielen könnte. Dies ließe sich möglicherweise als therapeutische Option nutzen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird das Wachstums- und Zelltodverhalten von Tumoren des zentralen Nervensystems untersucht. Des Weiteren wird die Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Faktoren in den Präparaten analysiert und mit Normalkontrollen verglichen.

Es zeigt sich, dass Apoptose von Tumorzellen aller untersuchter Hirntumore und Malignitätsgrade vollzogen werden kann. Die Rate apoptotischer Zellen ist jedoch sehr variabel und korreliert nicht mit dem Malignitätsgrad der Tumore. Auch besteht keine Korrelation zwischen der Apoptose- und der Proliferationsrate. Die Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass die Apoptoserate nicht als Marker für die Malignität von Tumoren des zentralen Nervensystems verwendet werden kann.

Auch unter Einbeziehung Apoptose-assoziiierter Faktoren ist eine Gradifikation der Tumore hinsichtlich der Malignität nicht möglich. So unterscheiden sich z.B. atypische (WHO-II) und anaplastische (WHO-III) Meningiome quantitativ und qualitativ nicht signifikant voneinander. Es können ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression der untersuchten Apoptose-assoziierten Faktoren, sowie der Apoptose- und Proliferationsraten zwischen Medulloblastomen und primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass sich diese Tumore lediglich bezüglich ihrer Lokalisation im zentralen Nervensystem unterscheiden.

Die Analyse der Apoptose-assoziierten Faktoren zeigt, dass alle untersuchten Faktoren grundsätzlich in allen untersuchten Tumoren vorkommen, während die Normalkontrollen diese Faktoren nicht exprimieren. Der Vollzug der Apoptose findet jedoch nicht in diesem Maße statt, da die Apoptoserate der Tumore (markiert durch TUNEL) stets wesentlich geringer ist als die Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Es ist davon auszugehen, dass undifferenzierte Tumorzellen entweder nur begrenzt in der Lage sind, ihr apoptotisches „Selbsterstörungsprogramm“ in Gang zu setzen und zu Ende zu führen, oder, dass apoptosehemmende Mechanismen greifen. Um so interessanter wäre es, durch therapeutische Intervention Apoptose zu initiieren. Die Analyse der einzelnen Apoptose-assoziierten Faktoren liefert Hinweise darauf, an welchen Stellen des apoptotischen Systems eine solche Intervention ansetzen könnte:

Die hochmalignen WHO-IV-Tumore zeigen eine signifikante Hochregulation der Effektor-Caspasen-3 und -6. Die physiologischen Aktivierungsmechanismen dieser Caspasen z.B.

durch Caspase-2 und TNF α scheinen in diesen hochmalignen Tumoren jedoch weniger eine Rolle zu spielen, da diese Faktoren hier nur in geringem Ausmaß exprimiert werden. Jedoch könnten modifizierte, per se aktive Caspase-3- und -6-Moleküle eine interessante therapeutische Option zur Behandlung maligner Tumore des zentralen Nervensystems darstellen. Zu beachten ist aber unter anderem, dass z.B. Glioblastome auch geringe Expressionsraten apoptotischer Faktoren im peritumoralen, mikroskopisch nicht infiltrierten Normalgewebe zeigen. Dies könnte für eine peritumorale Dysfunktion des Hirngewebes sprechen. Welche Rolle dies bei der Behandlung mit Apoptose-stimulierenden Agenzien spielt und wie spezifisch die Anwendung solcher Stimulanzien für Tumorgewebe wären, muss Gegenstand weiterer Studien sein.

Die untersuchten WHO-II- und -III-Tumore zeigen eine Hochregulation vor allem von Faktoren des extrinsischen Apoptoseweges (z.B. TNF α). Die Expressionsraten von TNF α korrelieren signifikant mit dem WHO-Grad der untersuchten Tumore. Interessante therapeutische Optionen könnten hier zum einen die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges über TNF α sein, zum anderen könnte man versuchen, eine direkte Aktivierung über modifizierte Effektor-Caspasen herbeizuführen.

Insgesamt existieren verschiedene mögliche Angriffsorte innerhalb des apoptotischen Netzwerkes der Zelle für eine theapeutische Intervention bei Tumoren des zentralen Nervensystems. Die Komplexität des Kaskade-artigen Systems legt nahe, dass eine therapeutische Intervention möglichst an dessen Ende erfolgen sollte, um möglichst viele Stör- und Hemmfaktoren zu umgehen.

6 Summary

The present report studies growth and cell death in tumors of the central nervous system. The expression of a broad range of apoptosis-associated factors is analyzed and compared to normal control tissue.

Apoptosis can generally be performed by all examined tumors (including the WHO-malignancy-grades II, III and IV). However, the rate of apoptotic cells is variable and shows no correlation with the malignancygrade of the tumors. Furthermore, the rate of apoptosis does not correlate with the proliferation index. These results indicate that the apoptotic rate is not a useful indicator for malignancy of tumors of the central nervous system.

Even by including the analysis of apoptosis-associated factors, a grading of brain tumors is not possible. There is, for example, no significant difference between atypic (WHO-II) and anaplastic (WHO-III) meningiomas. There are, furthermore, no significant differences between medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors (PNETs) concerning the expression of apoptosis-associated factors, as well as the apoptotic-, or proliferation rate. This suggests that these tumors only differ in regard to their localisation in the central nervous system.

Analysis of the apoptosis-associated factors reveals that all factors are up-regulated in all tumors studied here in varying portions, whereas these factors are lacking in normal control brain tissue. As the apoptotic rate is much lower than the expression rate of the apoptosis-associated factors, the sufficiency of the apoptotic system can be questioned. The data indicate, that mutated tumor cells are able to activate their apoptotic “suicide-programme” only in a limited way. An interesting therapeutic approach may be the initiation of apoptosis. Analysis of apoptosis-associated factors may give hints at factors some of which an intervention might be successful:

Highly-malignant WHO-IV-tumors show a significant up-regulation of the effector-caspases-3 and -6. Mechanisms activating these caspases, e.g. caspase-2 or TNF α , seem to be less effective in malignant brain tumors, as they showed no upregulated expression. However, modified, active caspase-3- and -6-molecules could be interesting therapeutic options in the treatment of tumors of the central nervous system. However, it has to be considered that, e.g., glioblastomas also reveal low expression rates of apoptotic factors in peritumoral, but microscopical normal brain tissue, which may be a hint for a peritumoral dysfunction of the surrounding brain tissue. However, which effects the treatment with apoptosis-stimulating

agents will have on the surrounding brain tissue and how tumor-specific these stimulants are, has to be further examined.

WHO-II- and -III-tumors reveal an up-regulation especially of factors of the extrinsic way of apoptosis (e.g. TNF α). The expression rate of TNF α correlates significantly with the WHO-grade of the examined tumors. An interesting therapeutic option could be the activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF α , or to activate the apoptotic programme by modified effector-caspases.

There are many possible targets for a therapeutic intervention within the apoptotic network of a brain tumor cell. The complexity of the apoptotic cascade suggests that a therapeutic invention should target downstream events to avoid as many disturbing side effects as possible.

7 Anhang

7.1 Tabellen

7.1.1 Patientendaten

Diagnose	WHO°	Fallzahl	Geschlecht		Alter	
			weibl.	männl.	Variations- breite	Mittel- wert
Glioblastom	IV	18	14	9	44-70	61
Oligodendro- gliom	III	6	2	4	47-67	57
Ependymom	III	2	2	0	35-59	47
Medullo- blastom	IV	6	4	3	03-55	17
PNET	IV	6	4	2	05-51	25
Meningiom	II	14	9	5	41-79	61
Meningiom	III	4	2	2	38-72	56
Normal- kontrollen		4	3	1	25-75	53

7.1.2 Expressionsraten von TUNEL in % bei den untersuchten Hirntumoren

Tumor	GB	OG	Ep	MB	PNET	MgII	MgIII
Nr.							
01	0,63	0,42	0	0,62	0,69	0,48	0,24
02	1,25	0,32	0,51	0	0,06	0,54	0
03	0,07	1,06		0	0,18	0,41	0,2
04	0,09	0,29		0,34	0	0,48	0,08
05	0,82	0		1,25	0,32	0	
06	0,77	0,91		0,63	0,05	0,2	
07	0			0,47		0	
08	0,13					2,15	
09	1,5					0	
10	0,4					0,55	
11	0,3					0,13	
12	0,05					0,02	
13	7,5					0,24	
14	0,71					0,38	
15	1,0						
16	0,07						
17	2,2						
18	1,04						
19	0,02						
20	0						
21	0,01						
22	0,22						
23	0,3						

(GB=Glioblastom, OG=Oligodendrogliom, Ep=Ependymom, MB=Medulloblastom, PNET=primitiver neuroektodermaler Tumor, MgII=atypisches Meningiom, MgIII=anaplastisches Meningiom)

7.1.3 Expressionsraten von MIB-1 in % bei den untersuchten Hirntumoren

Tumor	GB	OG	Ep	MB	PNET	MgII	MgIII
Nr.							
01	20	05	30	50	25	15	20
02	30	10	5	50	15	15	20
03	20	40		50	80	07	40
04	05	25		70	40	10	20
05	05	05		30	50	04	
06	30	50		60	25	10	
07	30			20		05	
08	20					04	
09	40					05	
10	50					10	
11	30					07	
12	40					05	
13	05					05	
14	45					15	
15	45						
16	30						
17	40						
18	20						
19	10						
20	10						
21	10						
22	20						
23	30						

(GB=Glioblastom, OG=Oligodendrogliom, Ep=Ependymom, MB=Medulloblastom, PNET=primitiver neuroektodermaler Tumor, MgII=atypisches Meningiom, MgIII=anaplastisches Meningiom)

7.1.4 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Glioblastomen (WHO-IV)

Nr.	TNF α						TNF-R1					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	1	0	0				0	0	0			
02	1	0	0	+			1	0	0	+	+	
03	1	0	0	+			2	0	0			
04	1	0	0				1	0	0			
05	1	3	3	+	+		1	2	1	+	+	+
06	2	0	0		+		1	0	0	+	+	
07	1	0	0				0	0	1		+	
08	1	0	0				0	0	0			
09	0	0	0				1(2)	0	0			
10	0	0	1				1	1	0			
11	1	0	0	+			1	0	0		+	
12	1	1	1		nv		2(1)	0	0	+	nv	
13	1	0	0	+			1	0	0	+		
14	1	0	0	+	+		1(2)	0	0	+	+	+
15	2	0	0	+	+	+	1(4)	0	0	+	+	
16	1(3)	1	1	+	+		3	3	1	+	+	+
17	1	0	2	+	+		1	0	0	+	+	
18	3(2)	0	0			+	1	0	0	+		
19	0	0	1		+		1	1	1		+	
20	2(4)	0	0				1	0	0			
21	3	0	1	+	+		1	0	0	+	+	
22	(1)	0	0	+			1	0	0	+		
23	1(2)	1	2	+			1	0	0	+		+

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=GefäÙe im Tumorgewebe, GefNG=GefäÙe im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.5 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Glioblastomen (WHO-IV)

Nr.	TRAIL			APAF-1 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	0	0	0				20					
02	1	0	0				15					
03	3	0	0	+	+	+	5					
04	1(2)	0	0		+		0					
05	1	1	1	+	+		0			+	+	+
06	1(3)	0	0				0					
07	1	0	0	+	+		0					
08	0	0	0				2(5)					
09	2	0	0				3					
10	0	0	0				0					
11	2	0	0				20			+		
12	0	1	1	+	nv		0					
13	2(3)	0	0	+	+	+	3					
14	1	0	0				5(10)					
15	1	0	0				50					
16	4	2	1	+			15	10	5			+
17	1	0	0		+		0		5			+
18	2	2	0	+	+	+	0					
19	0	1	1		+		0					
20	1	0	0				0					
21	1(2)	1	2	+	+	+	0					
22	0	0	0				0					
23	1(2)	0	2	+	+	+	60	7	5			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen – außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.6 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Glioblastomen (WHO-IV)

Nr.	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	3	0	0				2(3)				+	
02	3	0	0			+	3					+
03	3	0	0	+		+	1			+		
04	1	0	0			+	2					+
05	2	0	0	+	+	+	3			+		+
06	1	0	0				1			+		
07	0	0	0				1			+		
08	2	0	0			+	1					
09	3	0	0		+	+	3(4)					+
10	1(2)	0	0	+	+		1					
11	2	0	0			+	3					+
12	2	0	0				3			+		+
13	4	0	0	+	+	+	3					+
14	1	0	0				4					+
15	3(4)	0	0	+	+	+	3				+	
16	3	0	0	+		+	3			+		+
17	2	0	1	+	+	+	3	1		+	+	+
18	2	1	1	+		+	2(3)					+
19	1	0	0				2(3)			+		
20	0	0	0				4					+
21	0	0	0	+	+		4			+		
22	3	0	1	+		+	2			+		+
23	1(3)	1	0				0(2)			+		

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.7 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Glioblastomen (WHO-IV)

Nr.	Caspase-2 [%]						Caspase-3					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	3	0	0				3	0	0	+	+	
02	5	0	0				3	0	0	+		+
03	2	0	0				2(0)	0	0	+	+	+
04	0	0	0				0	0	0			
05	5(30)	0	5	+	+		2	3	2	+	+	+
06	60	0	0			+	4	0	0	+	+	+
07	5	0	0	+	+		0	0	0	+	+	
08	10	0	0				3	0	0	+	+	+
09	3	0	0				3	0	0	+	+	+
10	15	0	10		+		3	3	1	+		+
11	10	0	0		+		3	0	0	+		+
12	1	0	10				3(0)	2	2	+		+
13	1	0	0				3	2	3	+	+	+
14	2	0	0	+	+		3	2	3	+	+	
15	50	0	20	+		+	4	1	0	+	+	+
16	70	50	30	+	+		4	2	1	+	+	
17	10(60)	0	5	+	+	+	4(0)	0	2	+	+	+
18	5	0	0			+	4(0)	0	3	+	+	+
19	5	20	15	+			4(3)	4	2	+		+
20	20	0	0				4(0)	2	0	+	nv	+
21	10	10	10	+	+	+	3	3	1			+
22	5	0	0				4(0)	0	0	+	nv	+
23	2	20	20		+		4(1)	3	3	+	+	

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen – außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.8 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Glioblastomen (WHO-IV)

Nr.	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	3	2	2	+			0	0	0			
02	1	0	2	+	+		2	0	0			
03	2	0	0	+		+	0	0	0			
04	2	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	
05	2	1	2	+	+	+	1	0	0			
06	2	0	0	+	+		0	0	0			
07	1	1	3	+	+		0	0	0			+
08	3	0	0	+	+		0	0	0			
09	2	0	2	+	+		1(20)	0	0			
10	2(3)	3	4	+	+		0,5	0	0			
11	2	0	2	+	+		0,1	0	0			
12	3	3	3	+	+		0,1	0	0			
13	1	0	0	+			(60)	0	0			
14	2	0	0	+			(7)	0	0			
15	3	2	2	+	+		60	0	0	+	+	
16	3	0	0	+	+		5	0	0	+	+	
17	1	2	2	+	+		0,1	0	0	+	+	
18	3	3	3	+	+		2	0	0			
19	1	0	2	+			0,1	0	0			
20	3	0	0	+	nv		3	0	0			
21	1	1	2	+	+		0	0	0			
22	2(3)	1	2	+	+		1	0	0			
23	2	1	2	+	+		5(75)	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.9 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Oligodendrogliomen (WHO-III)

Nr.	TNF α			TNF-R1								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	4	0	2	+	+	+	1	0	0			+
02	2(4)	0	0				1	0	0			
03	1	0	2		+		1	0	0			+
04	1	0	0		+		0	0	0			
05	1	0	0	+	+		1(2)	0	0			
06	1(3)	0	1		+		1	0	0			

Nr.	TRAIL			APAF-1 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	1	0	0				0,1	0	0			
02	0	0	0				0,2	0	0			
03	1	0	2				0	0	0			
04	0	0	0				0	0	0			
05	1	0	0				15	0	0			
06	2	0	0	+	+		0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=GefäÙe im Tumorgewebe, GefNG=GefäÙe im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - auÙer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.10 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Oligodendrogliomen (WHO-III)

Nr.	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	2(4)					+	1	0	0	+	+	
02	3						3	0	0	+		+
03	4						3	0	0			
04	4						1	0	0	+	+	
05	3						1	0	0	+		
06	2						2	0	0	+		

Nr.	Caspase-2 [%]						Caspase-3					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	5	0	0				1(3)	0	0	+		+
02	5(50)	0	0				4	0	0	+		+
03	0	0	0				1	0	2			+
04	1	0	60				1(2)	0	3	+		
05	1	0	0				3	0	0	+		
06	35	0	0	+			1	0	0	+		

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.11 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Oligodendrogliomen (WHO-III)

Nr.	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	1	0	2	+	+		0	0	0			
02	1(2)	0	0				0	0	0			
03	1(2)	2	2				0	0	0			
04	1	0	0				0	0	0			
05	2	0	0	+	+		0	0	0			
06	2	0	0	+	+		0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.12 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei Ependymomen (WHO-III)

	TNF α						TNF-R1					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	2	nv	0	+			1	0	0			+
02	2	1	0	+	+		1	0	0			

	TRAIL						APAF-1[%]					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	1	0	0				1	0	0			
02	1	0	0				(5)	0	0			

	SMAC						Caspase-9					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	4	0	0	+		+	1	0	0			
02	3(4)	0	0	+			1	0	0			

	Caspase-2 [%]						Caspase-3					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	0,5						4(0)	0	0	+		+
02	85			+	nv		3(4)	4	4	+	nv	

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.13 Expressionsraten von Apoptose-asoziierten Faktoren bei Oligodendrogliomen (WHO-III)

	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	2	0	0			+	2(10)	0	0			
02	3	0	0	+			(0,1)	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.14 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei Medulloblastomen (WHO-IV)

	TNFα			TNF-R1								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	1	0	0				1	0	0			
02	2	0	0	+	+		2	0	0	+	+	
03	1	0	1		+		0	0	0		+	
04	2(4)	0	0				2	0	0			
05	1	0	0	+			1	0	0			
06	1	0	0	+			1	0	1			
07	1	0	0	+			0	0	0			

	TRAIL			APAF-1 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	2	0	0				0	0	0			
02	3	0	0				7	0	0			
03	0	0	0				0	0	0			
04	2	0	0				0	0	0			
05	0	0	0				0	0	0			
06	1	1	0				0	0	0			
07	0	0	0	+	+		0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.15 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei Medulloblastomen (WHO-IV)

	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	4	0	0				0	0	0			
02	4	0	0	+	+		1	0	0			
03	4	0	0	+	+		1	0	0	+		
04	4(0)	0	0	+			1	0	0			
05	3	0	0				0	0	0			
06	1	0	0				0	0	0			
07	1	0	0	+			0	0	0			

	Caspase-2 [%]			Caspase-3								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	0	0	0				0	0	0			
02	(3)	0	0				(1)	0	0			
03	0,5	0	0	+			3	0	0			
04	50	0	0	+		+	3	0	0			
05	0,1	0	0				0	0	0			
06	0	0	0				3	0	0			
07	0	0	0				2	0	0			+

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.16 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei Medulloblastomen (WHO-IV)

Nr.	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	3	0	0				0	0	0			
02	2	0	0				0	0	0			
03	0	0	0				0	0	0			
04	2	0	0				1(15)	0	0			
05	1	0	0				0	0	0			
06	1	0	0	+	+		0	0	0			
07	1	0	0				0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.17 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten-Faktoren bei primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs; WHO-IV)

Nr.	TNF α			TNF-R1			Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	
	TG	TRG	NG	TG	TRG	NG				
01	2	0	0	+			1	0	0	+
02	1	0	0				0	0	0	
03	1	0	0	+			1	0	0	
04	1	0	0				0	0	0	
05	0	0	0				1	0	0	
06	0	0	0				1	0	0	nv

Nr.	TRAIL			APAF-1 [%]			Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
	TG	TRG	NG	TG	TRG	NG			
01	1	0	0	+			0,5	0	0
02	1	0	0				0	0	0
03	0	0	0				0	0	0
04	1	0	0	+			0	0	0
05	1	0	0				0	0	0
06	1	0	0	+			0	0	0

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=GefäÙe im Tumorgewebe, GefNG=GefäÙe im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - auÙer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.18 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten-Faktoren bei primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs; WHO-IV)

Nr.	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	3	0	0	+			0	0	0			
02	(1)	0	0				0	0	0			
03	(1)	0	0				0	0	0			
04	4(0)	0	0				0	0	0			
05	0(4)	0	0				0	0	0			
06	(1)	0	0	+	nv		0	0	0			nv

Nr.	Caspase-2 [%]						Caspase-3					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	75	0	0	+			(1)	0	0			
02	0	0	0				2	0	0			
03	5	0	0				(1)	0	0			
04	0	0	0				3	0	0			
05	0	0	0				1(2)	0	0			
06	5	0	0	+			1	0	0			nv

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.19 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten-Faktoren bei primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs; WHO-IV)

	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	3	0	0	+			0	0	0			
02	2	0	0				0	0	0			
03	2	0	0	+			0	0	0	+		
04	2(3)	0	0	+			0	0	0			
05	0(2)	0	0	+	+		0	0	0			
06	0(1)	0	0		nv		0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.20 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei atypischen Meningiomen (WHO-II)

Nr.	TNF α			TNF-R1								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	2	0	0	+			1	0	0			
02	(2)	0	0	+			(2)	0	0		+	+
03	4	0	0				1(2)	0	0			
04	4	0	0				1	0	0	+	+	
05	1	0	0	+			(1)	0	0			
06	0	0	0				0	0	0			
07	1	0	0				1	0				
08	3	0	0				1	0	0			
09	2	0	0				1(4)	0	0			
10	1	0	0				0	0	0			
11	0	0	0			+	1	0	0			
12	1	0	0				1	0	0			
13	0(4)	0	0				2(3)	0	0			
14	1	0	0				1	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.21 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei atypischen Meningiomen (WHO-II)

Nr.	TRAIL			APAF-1 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	1	0	0				0	0	0			
02	(3)	0	0	+			0	0	0			
03	(1)	0	0	+			(10)	0	0	+		
04	1	0	0				2	0	0			
05	3	0	0	+			0	0	0			
06	1	0	0				0	0	0			
07	0	0	0				0	0	0			
08	1	0	0			+	2(10)	0	0			+
09	0	0	0				0	0	0			
10	2	0	0				(5)	0	0			
11	1	0	0				20(50)	0	0			
12	1	0	0				0	0	0			
13	1	0	0				5	0	0			+
14	1(4)	0	0				0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.22 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei atypischen Meningiomen (WHO-II)

Nr.	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	1	0	0				1	0	0	+		
02	(2)	0	0		+	+	0	0	0			
03	(3)	0	0			+	0	0	0			
04	1	0	0			+	1	0	0			
05	4	0	0				0	0	0			
06	1(3)	0	0				0	0	0			
07	(2)	0	0				0	0	0			
08	(1)	0	0			+	0	0	0			
09	4	0	0	+			0	0	0			
10	3	0	0				0	0	0			
11	2(4)	0	0	+			0	0	0			
12	4	0	0				0	0	0			
13	3	0	0	+			0	0	0			
14	0	0	0				0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.23 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei atypischen Meningiomen (WHO-II)

Nr.	Caspase-2 [%]			Caspase-3								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	15	0	0				1(2)	0	0			+
02	65	0	0		+		2	0	0			
03	0	0	0				1	0	0	+		
04	0	0	0				1	0	0	+		
05	3	0	0	+			2	0	0	+		
06	0,1	0	0				1(3)	0	0			
07	1	0	0				1	0	0	+		
08	0	0	0				1	0	0			+
09	1	0	0				1	0	0			
10	0	0	0				(2)	0	0			
11	0	0	0				1	0	0			
12	2	0	0				1	0	0			
13	0,1	0	0				1	0	0			
14	2(50)	0	0				1	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.24 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei atypischen Meningiomen (WHO-II)

Nr.	Caspase-6			Caspase-7 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
01	(3)	0	0			+	0	0	0			
02	3	0	0			+	0	0	0			
03	2	0	0				0	0	0			
04	4	0	0				0	0	0			
05	1	0	0				0	0	0			
06	1(4)	0	0				0	0	0			
07	2	0	0				0	0	0			
08	3(2)	0	0			+	0	0	0			
09	4	0	0				0	0	0			
10	3	0	0				0	0	0			
11	3	0	0				0	0	0			
12	1	0	0				0	0	0			
13	2	0	0				5(50)	0	0			
14	2	0	0				0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

7.1.25 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei anaplastischen Meningiomen (WHO-IV)

	TNF α			TNF-R1								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	4(2)	0	0				2	0	0			
02	3	0	0				4	0	0	+	+	
03	3	0	0	+	+		3	0	0			+
04	0	0	0				1	0	0			

	TRAIL			APAF-1 [%]								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	1	0	0				0	0	0			
02	1(2)	0	0		+		(15)	0	0			
03	1	0	0		+		(30)	0	0			
04	0	0	0				0,1	0	0			

	SMAC			Caspase-9								
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	4	0	0				0	0	0			
02	4	0	0		+	+	0	0	0	+		
03	4	0	0	+	+	+	(1)	0	0			
04	2(3)	0	0			+	0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrangewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=GefäÙe im Tumorgewebe, GefNG=GefäÙe im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - auÙer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wieder)

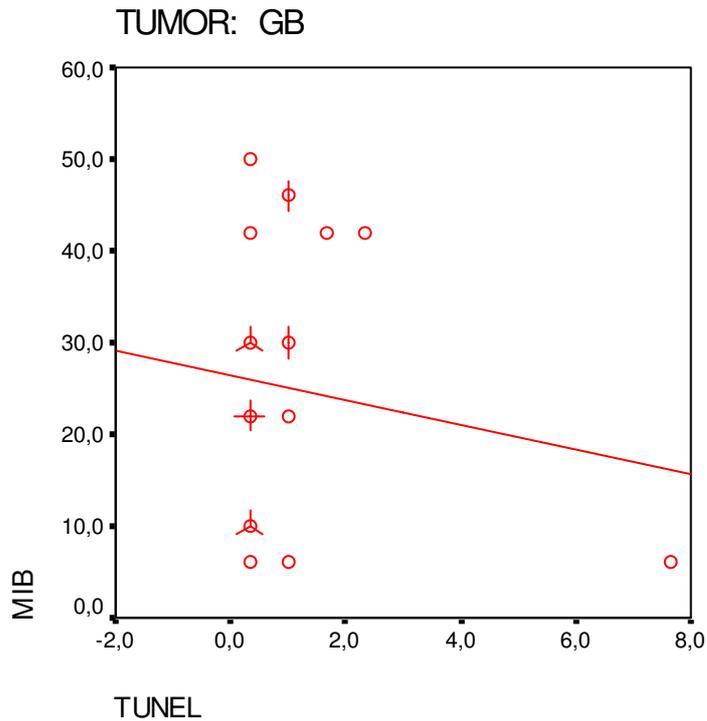
7.1.26 Expressionsraten von Apoptose-assoziierten Faktoren bei anaplastischen Meningiomen (WHO-IV)

	Caspase-2 [%]						Caspase-3					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	15(30)	0	0				1	0	0			
02	90	0	0			+	(2)	0	0			
03	10	0	0		+		2(3)	0	0		+	
04	2	0	0				1	0	0			

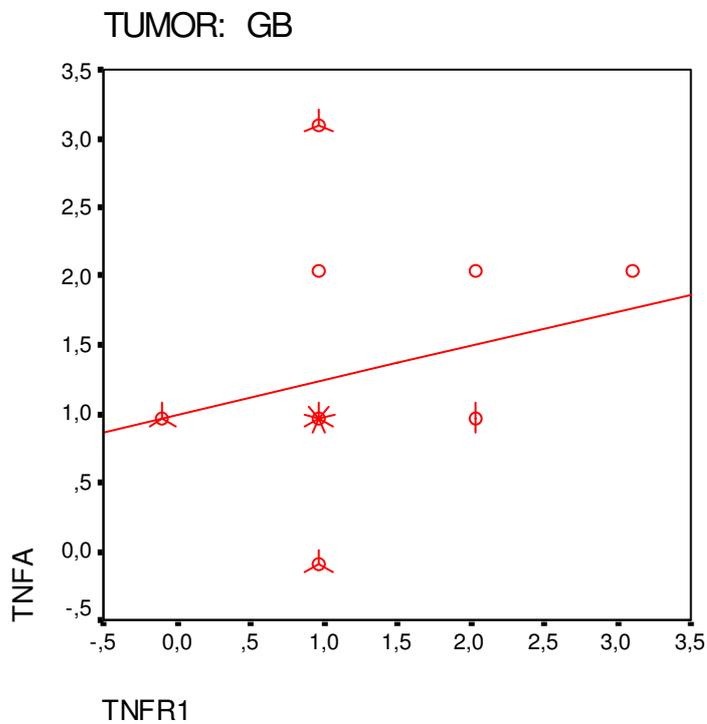
	Caspase-6						Caspase-7 [%]					
	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek	TG	TRG	NG	Gef _{TG}	Gef _{NG}	pNek
Nr.												
01	4	0	0				0	0	0			
02	4	0	0	+	+		1	0	0	+		
03	3	0	0				0	0	0			
04	1	0	0				0	0	0			

(TG=Tumorgewebe, TRG=Tumorrandgewebe, NG=Normalgewebe, GefTG=Gefäße im Tumorgewebe, GefNG=Gefäße im Normalgewebe, pNek=perinekrotische Expressionssteigerung, nv=nicht im Präparat vorhanden; 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% positiver Zellen - außer bei Faktoren, die in [%] angegeben werden; Werte in () geben fokale Expressionssteigerungen wider)

7.2 Diagramme

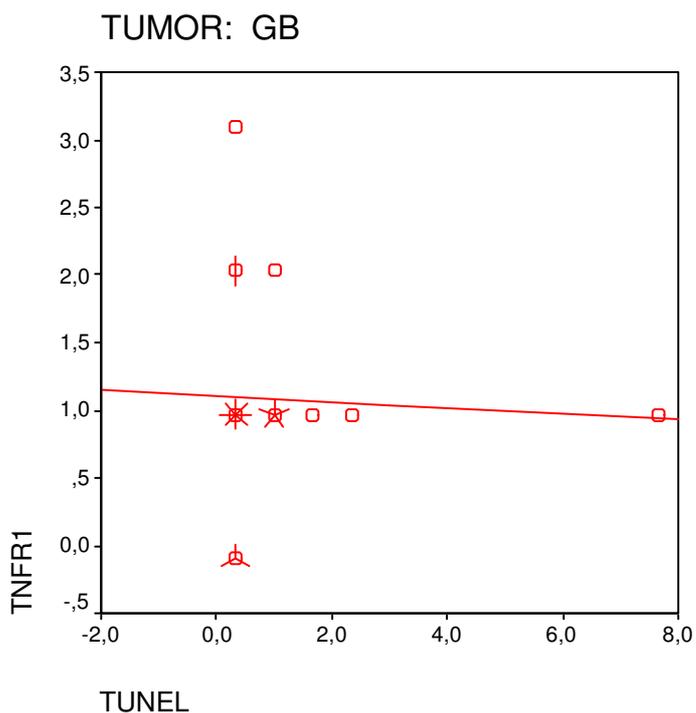


7.2.1 Korrelation der Expressionsraten von MIB-1 und TUNEL bei Glioblastomen

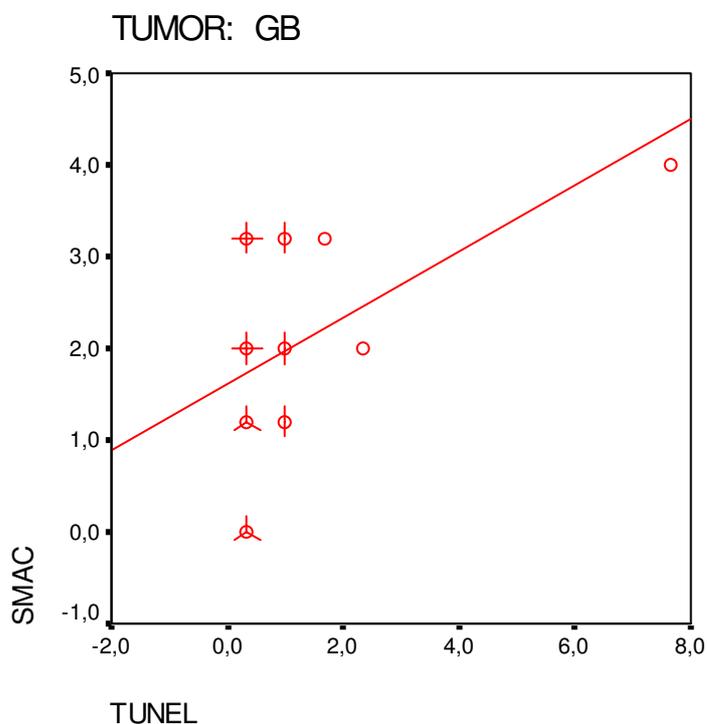


7.2.2 Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TNF-R1 bei Glioblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \star = acht Präparate]

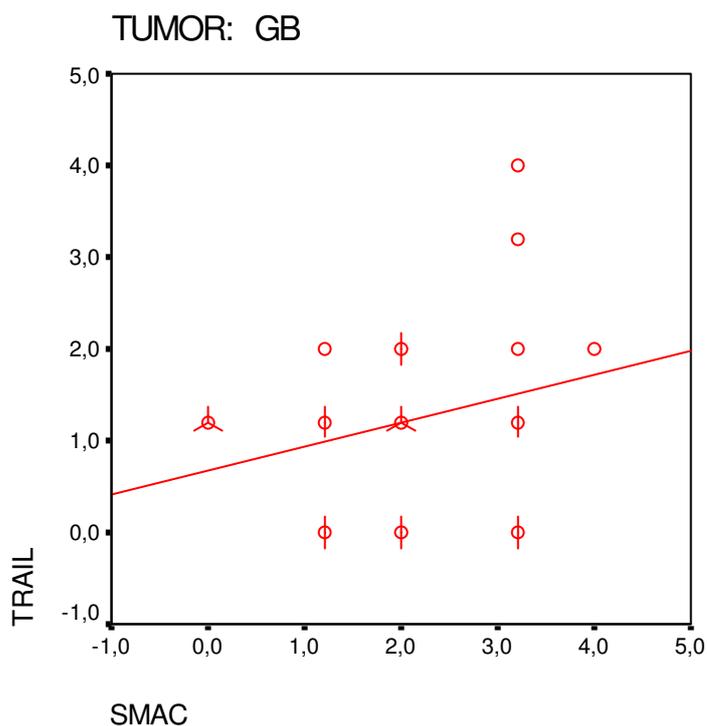


7.2.3 Korrelation der Expressionsraten von TNF-R1 und TUNEL bei Glioblastomen

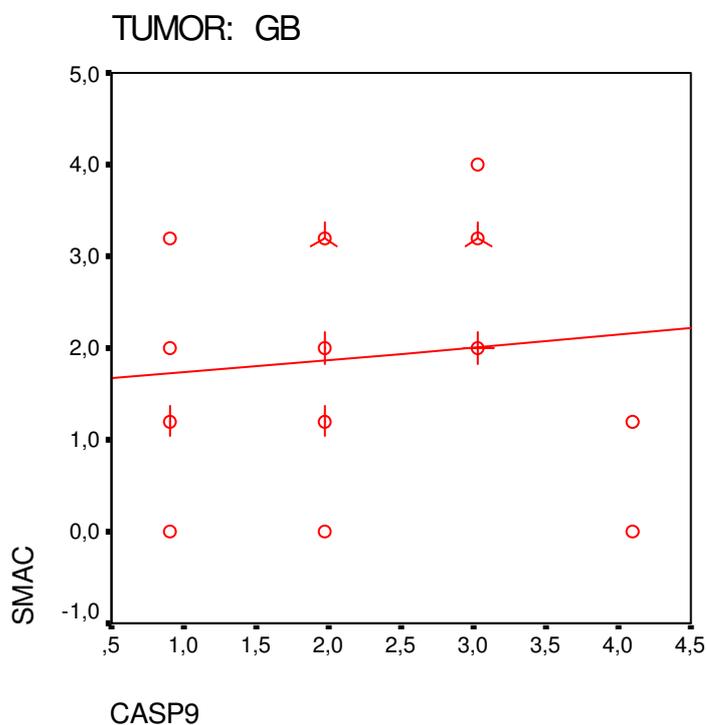


7.2.4 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und TUNEL bei Glioblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⊗ = acht Präparate]

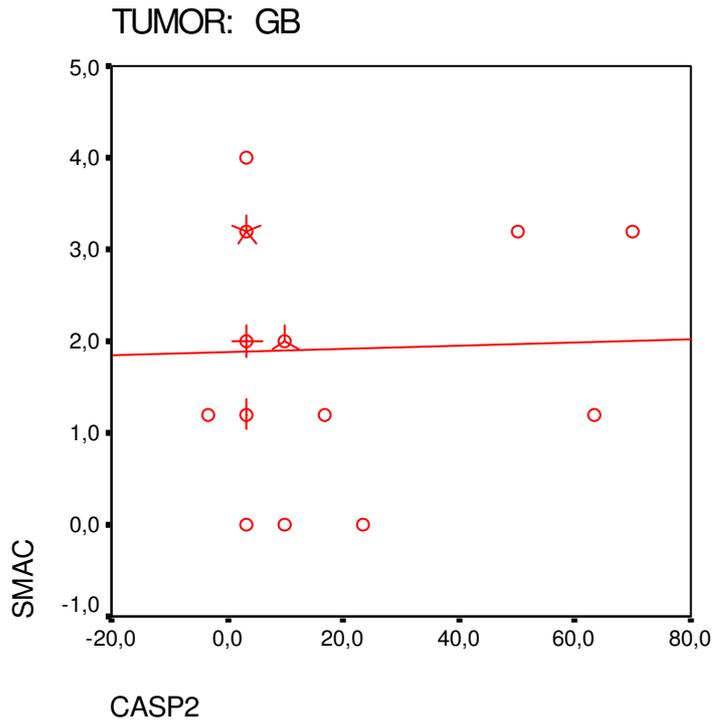


7.2.5 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und TRAIL bei Glioblastomen

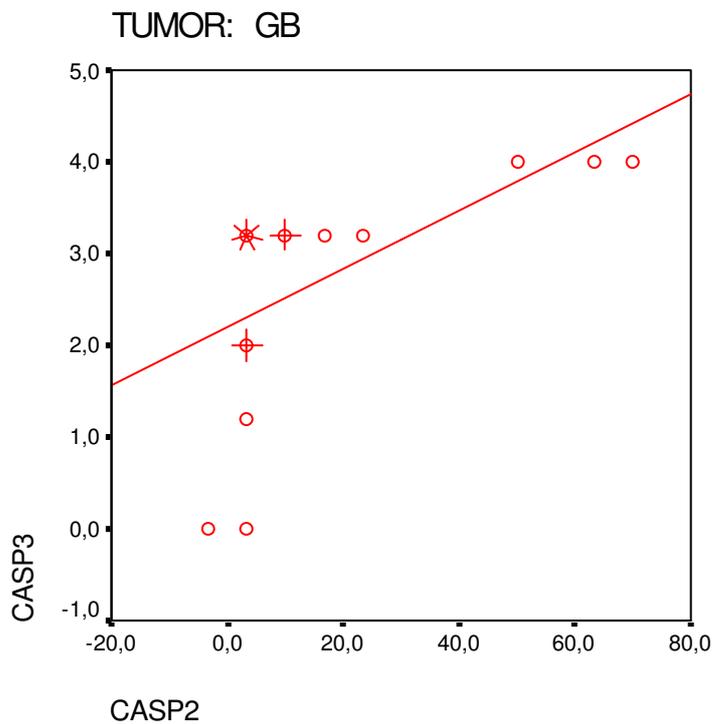


7.2.6 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-9 bei Glioblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ☼ = acht Präparate]

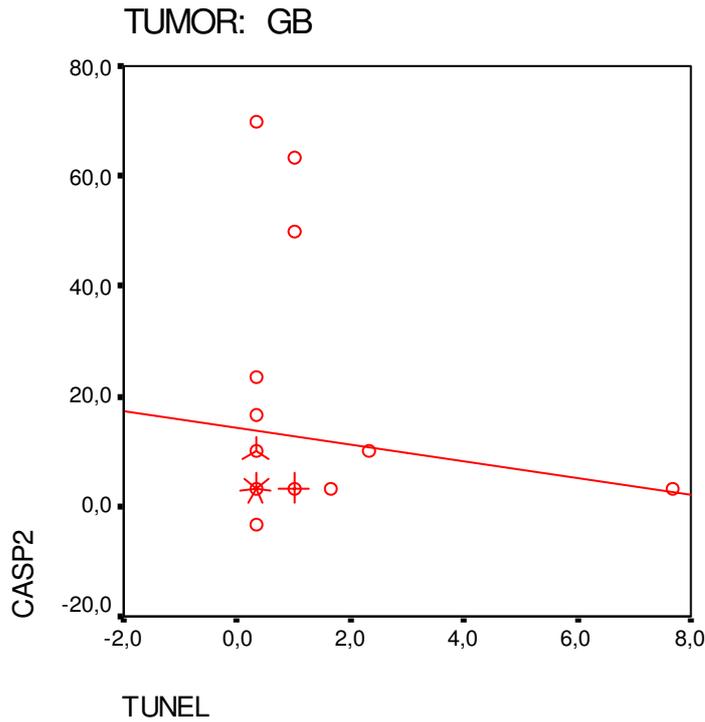


7.2.7 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-2 bei Glioblastomen

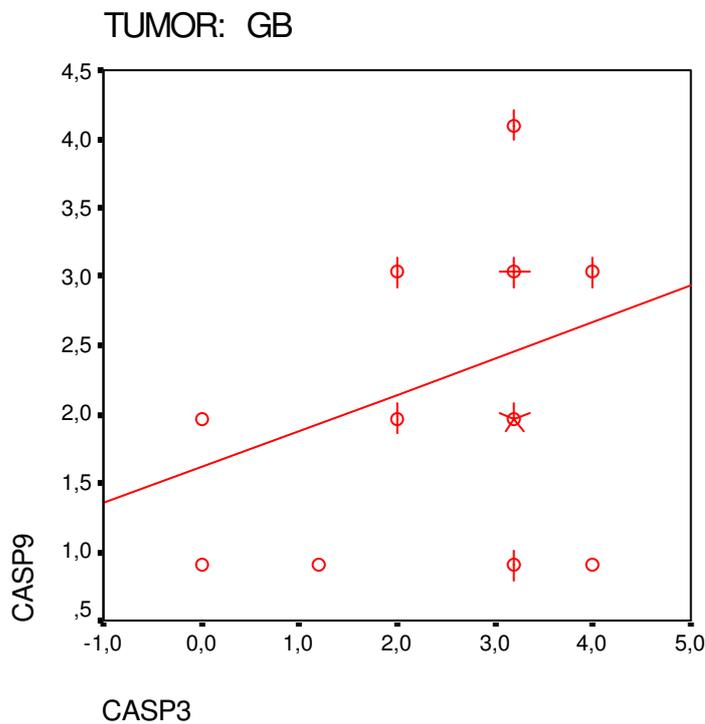


7.2.8 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und -3 bei Glioblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \star = acht Präparate]

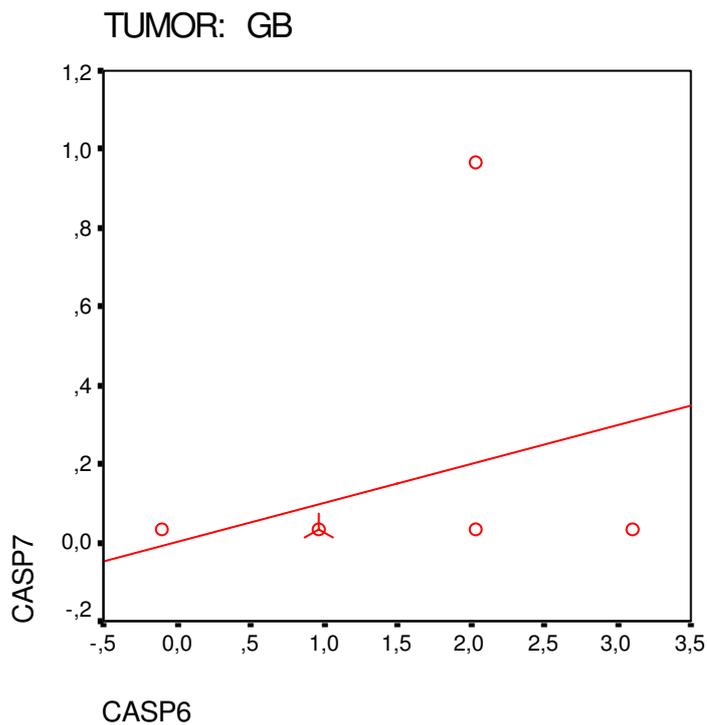


7.2.9 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und TUNEL bei Glioblastomen

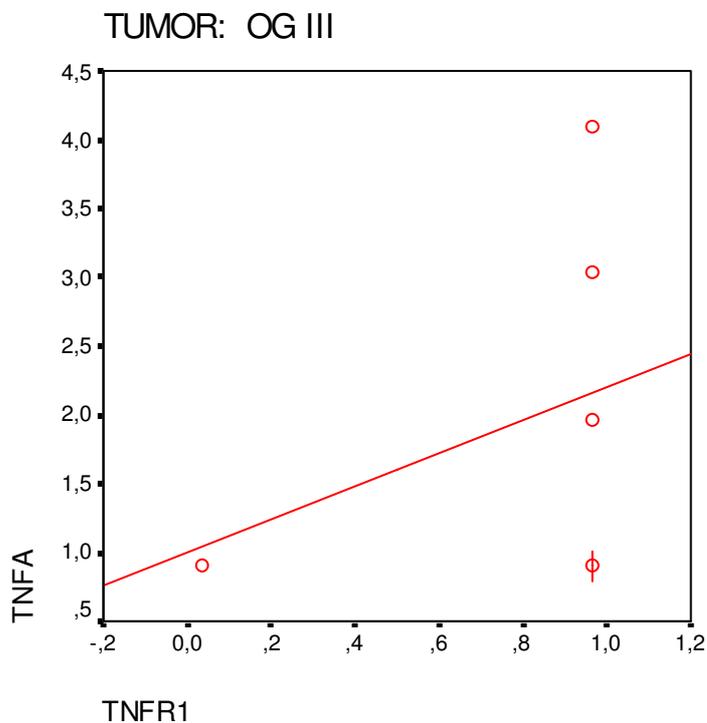


7.2.10 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-9 und -3 bei Glioblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⋆ = acht Präparate]

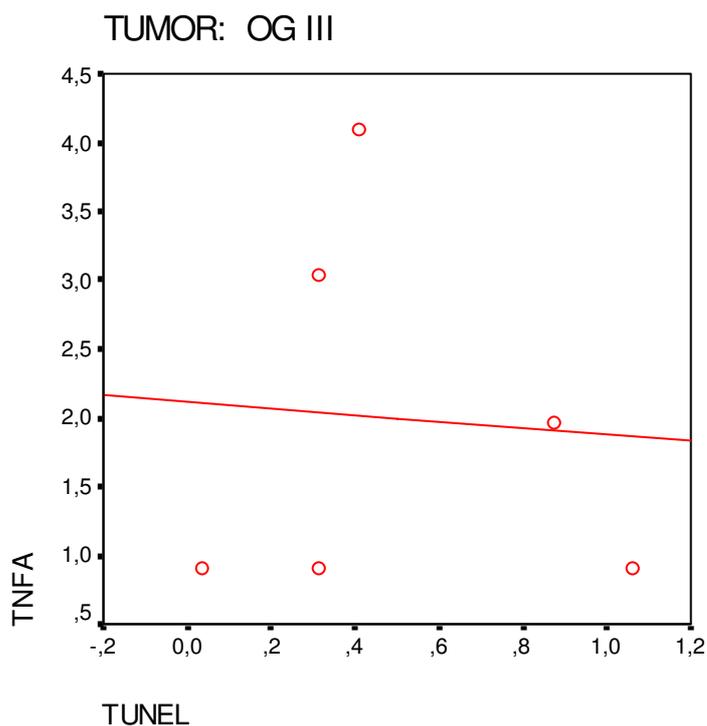


7.2.11 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-6 und -7 bei Glioblastomen

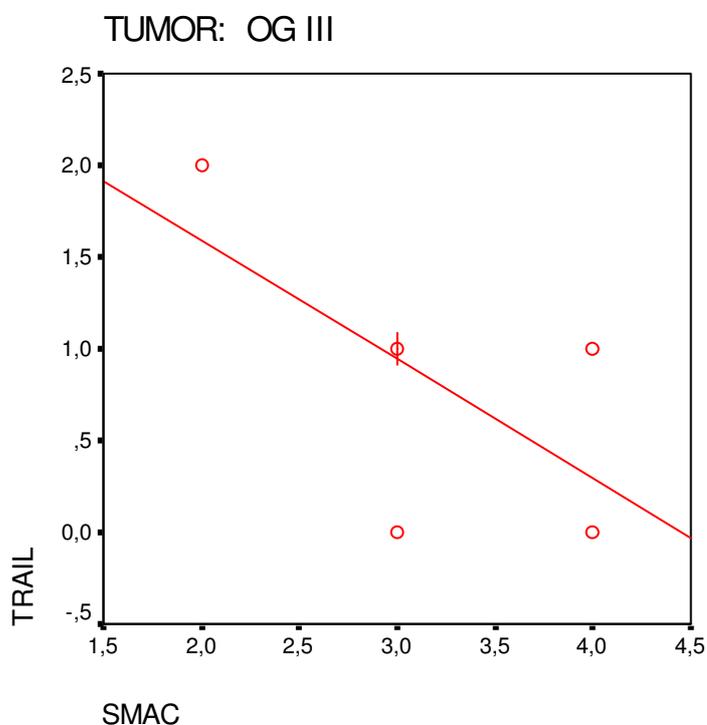


7.2.12 Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TNF-R1 bei anaplastischen Oligodendrogliomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \otimes = acht Präparate]

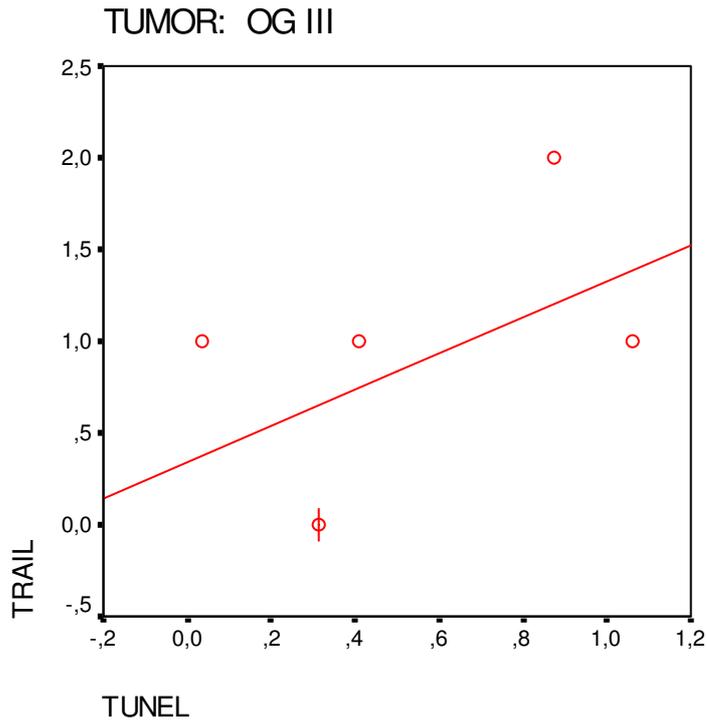


7.2.13 Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TUNEL bei anaplastischen Oligodendrogliomen

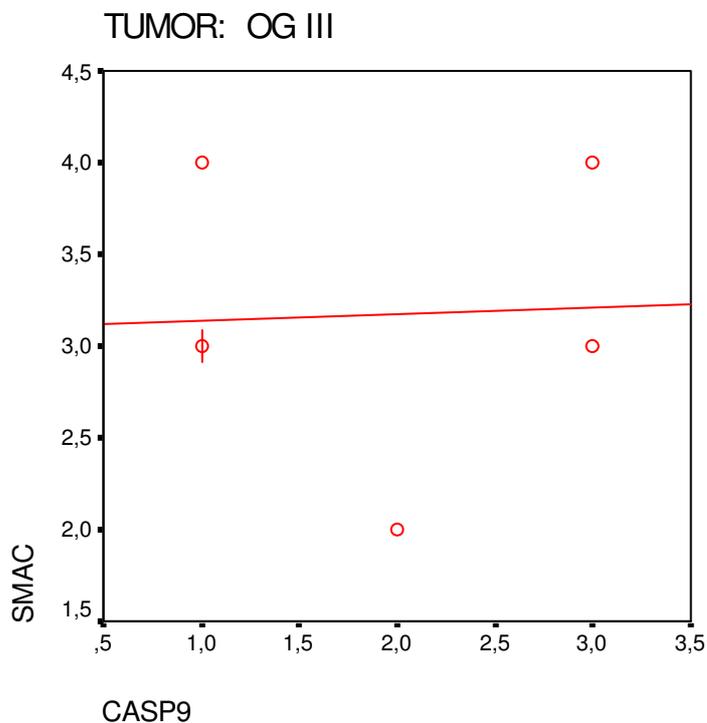


7.2.14 Korrelation der Expressionsraten von TRAIL und SMAC bei anaplastischen Oligodendrogliomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \odot = acht Präparate]

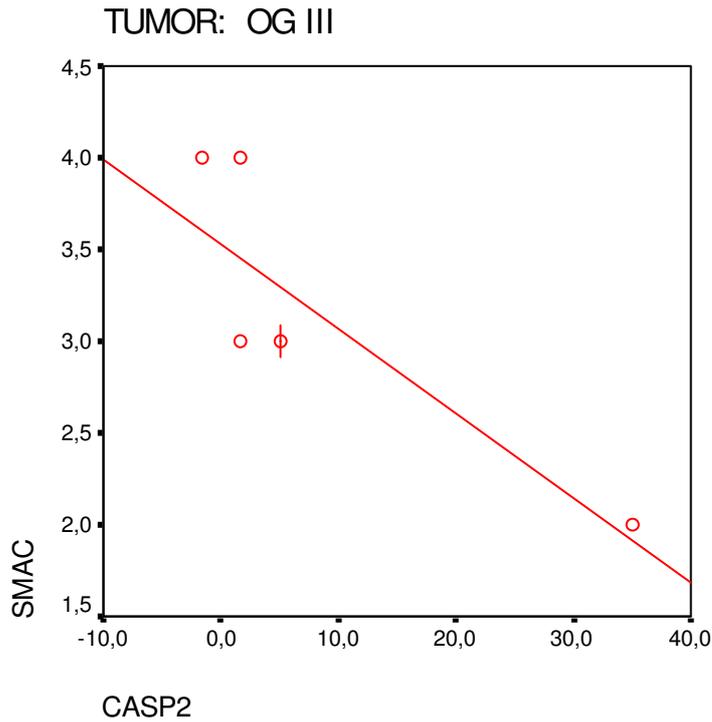


7.2.15 Korrelation der Expressionsraten von TRAIL und TUNEL bei anaplastischen Oligodendrogliomen

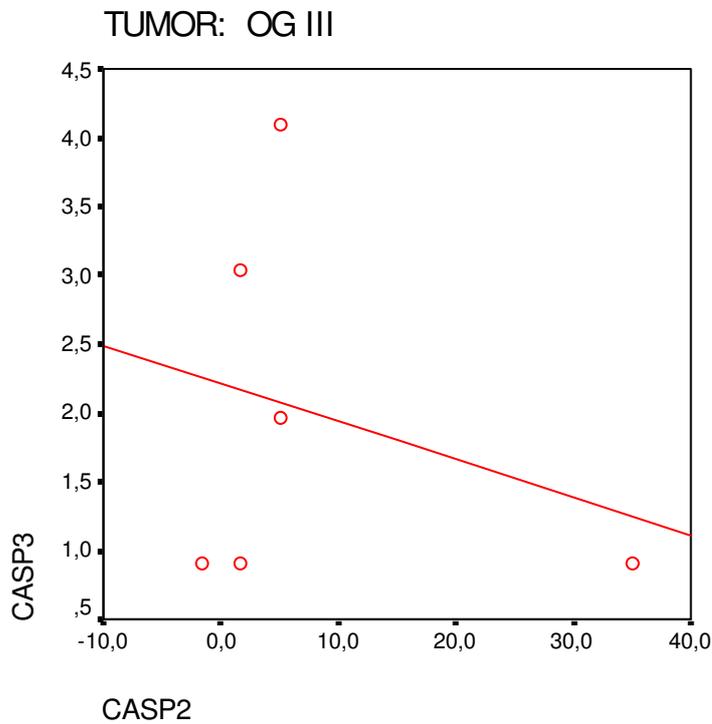


7.2.16 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-9 bei anaplastischen Oligodendrogliomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⊕ = acht Präparate]

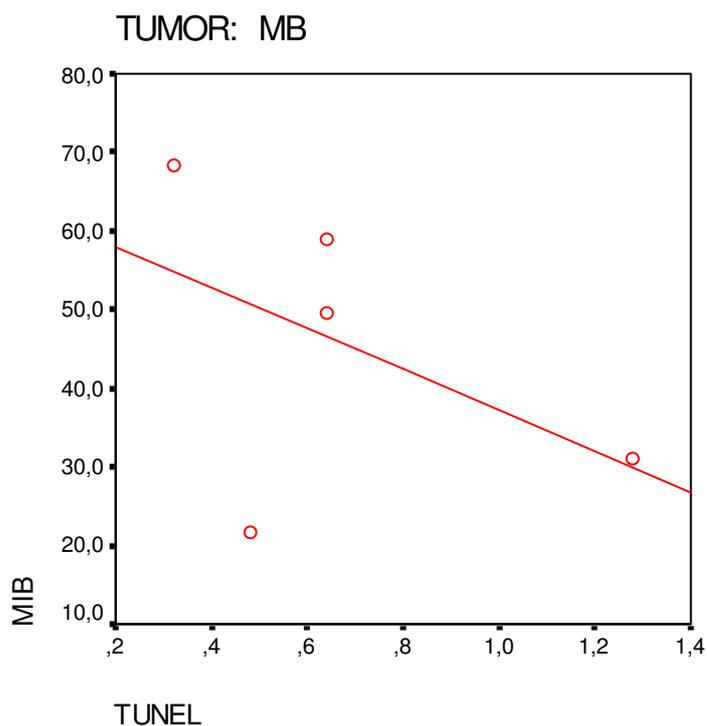


7.2.17 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-2 bei anaplastischen Oligodendrogliomen

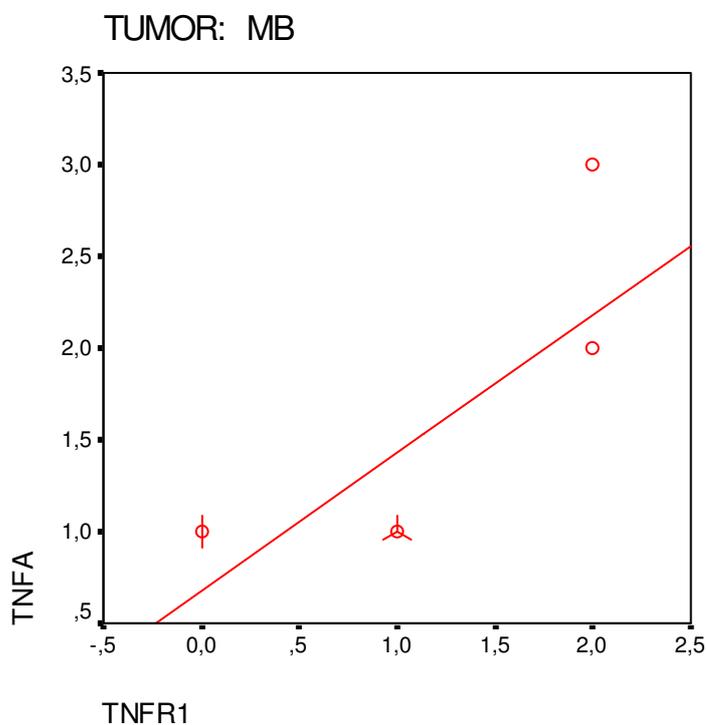


7.2.18 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und -3 bei anaplastischen Oligodendrogliomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⊕ = acht Präparate]

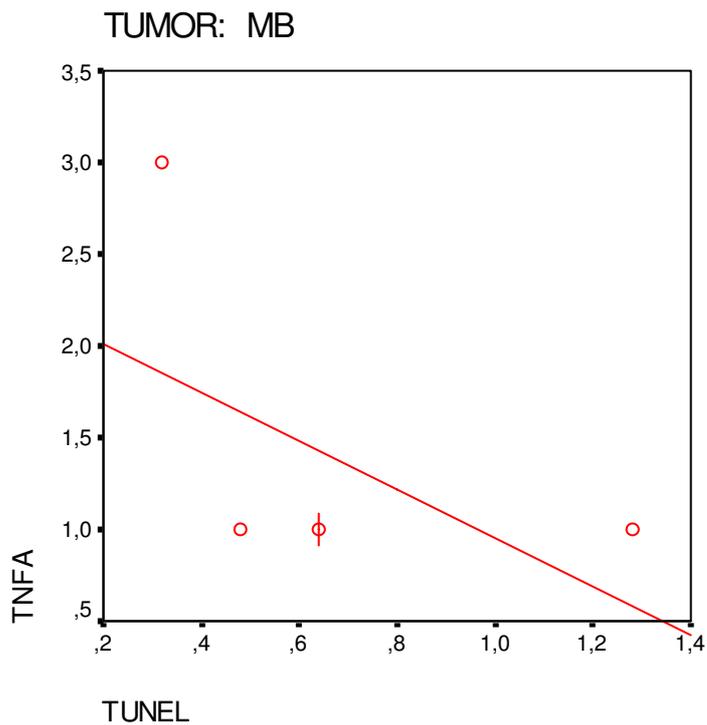


7.2.19 Korrelation der Expressionsraten von TUNEL und MIB-1 bei Medulloblastomen

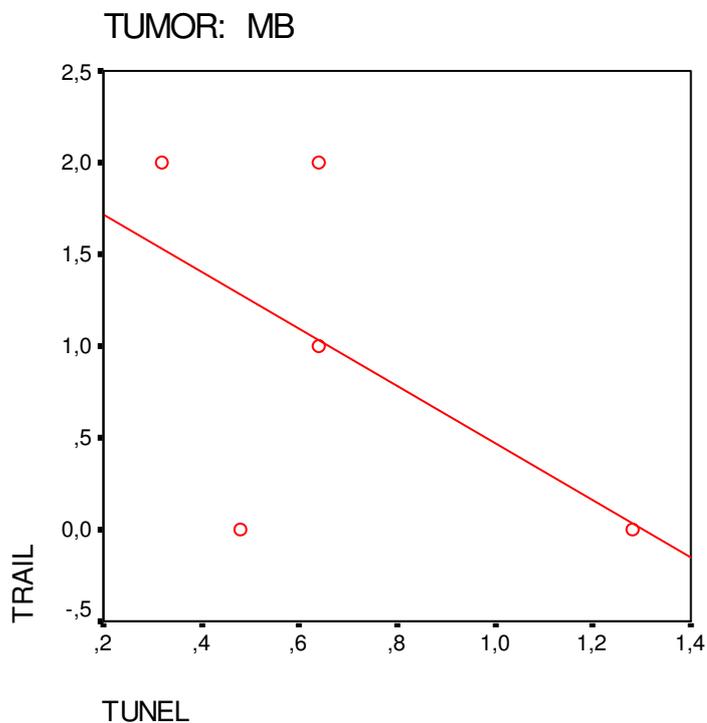


7.2.20 Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TNF-R1 bei Medulloblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \odot = acht Präparate]

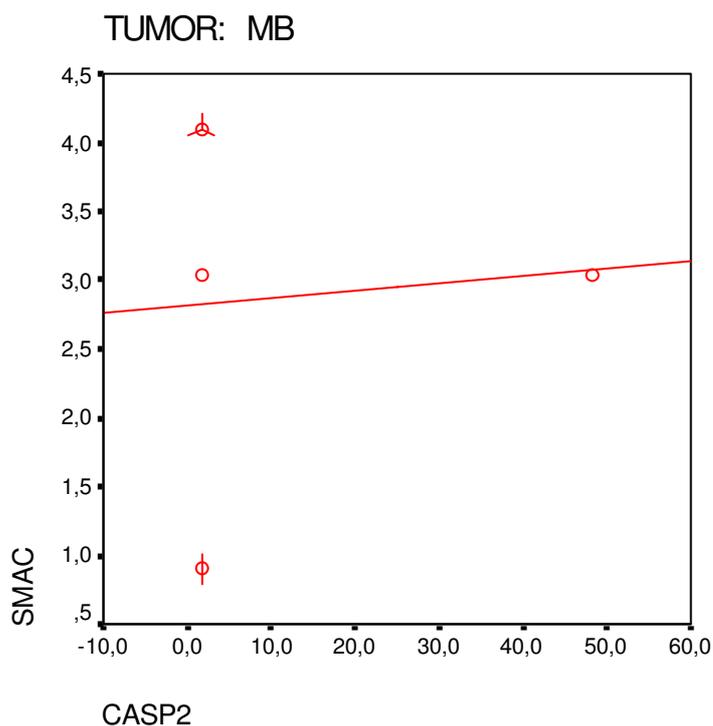


7.2.21 Korrelation der Expressionsraten von TNF α und TUNEL bei Medulloblastomen

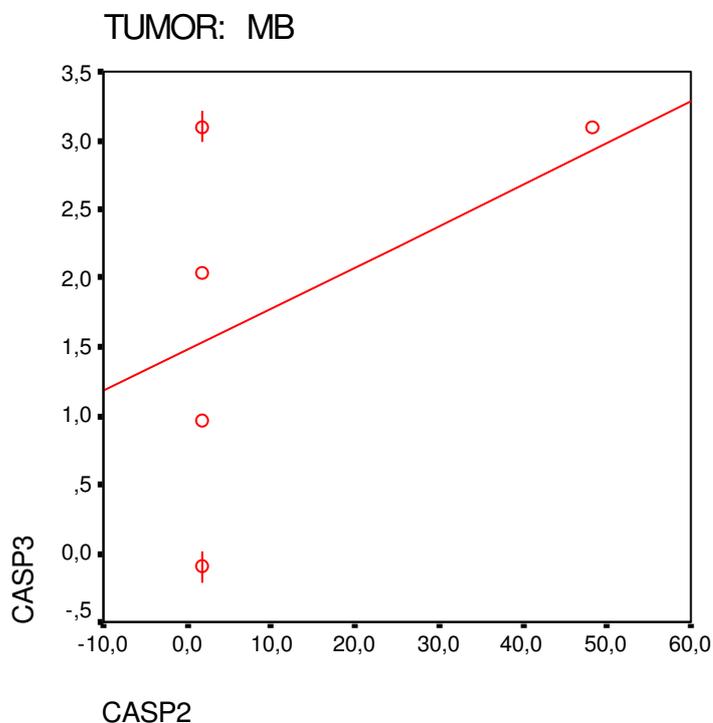


7.2.22 Korrelation der Expressionsraten von TRAIL und TUNEL bei Medulloblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: \circ = ein Präparat, \odot = acht Präparate]

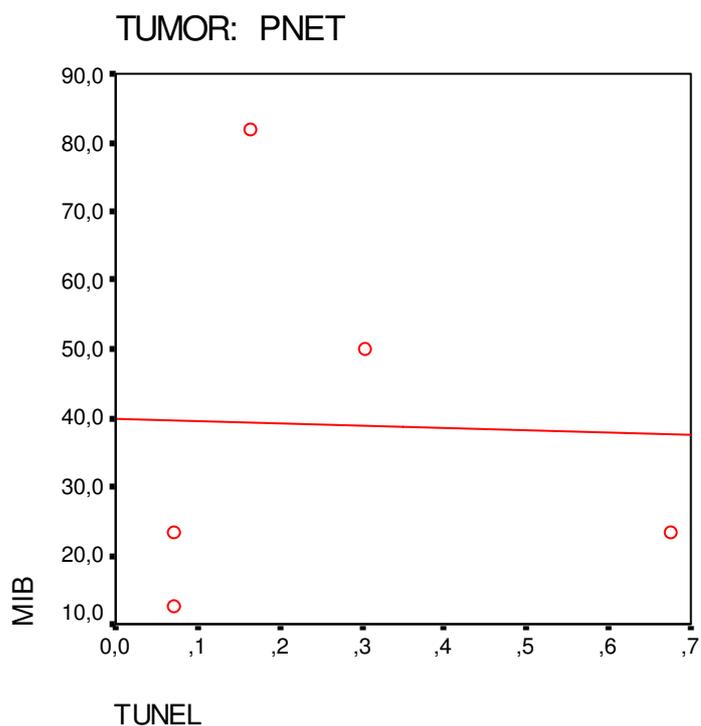


7.2.23 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-2 bei Medulloblastomen

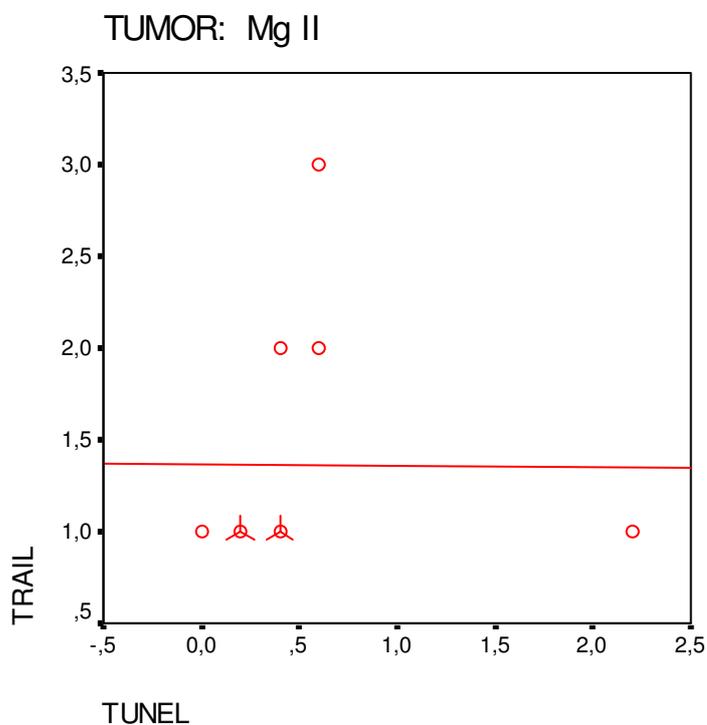


7.2.24 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und -3 bei Medulloblastomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⊗ = acht Präparate]

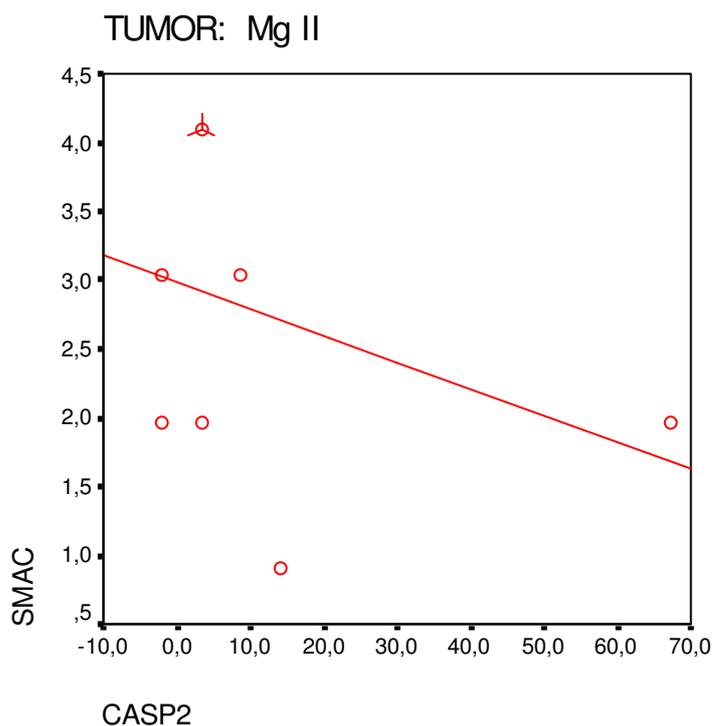


7.2.25 Korrelation der Expressionsraten von MIB-1 und TUNEL bei PNETs

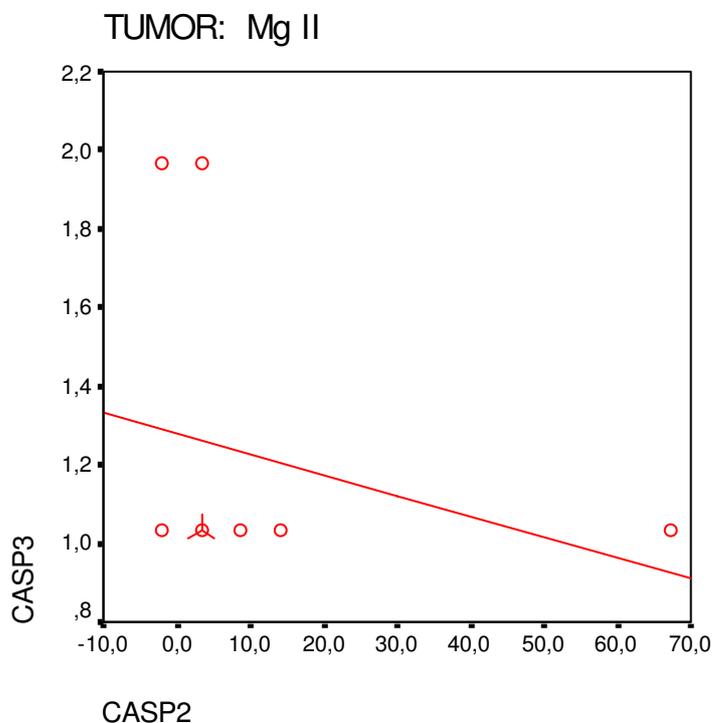


7.2.26 Korrelation der Expressionsraten von TRAIL und TUNEL bei atypischen Meningiomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ☼ = acht Präparate]

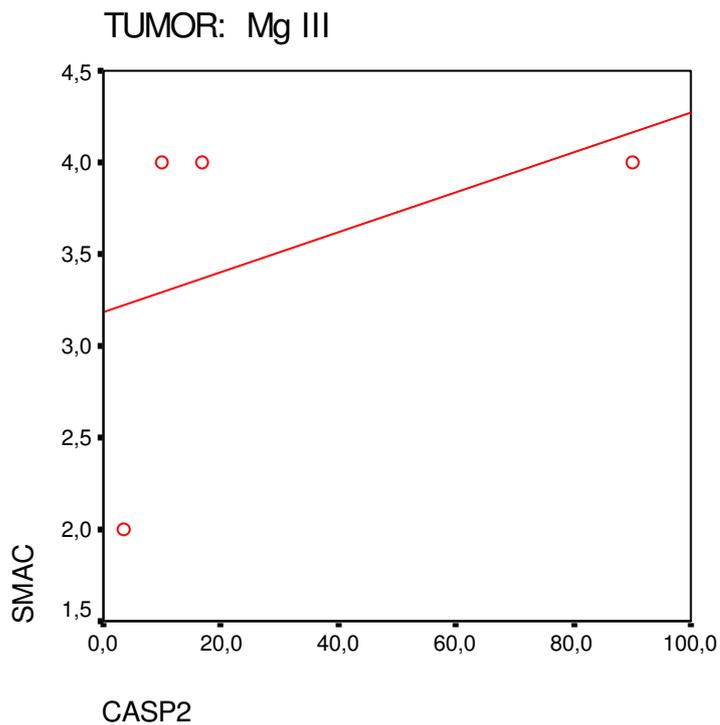


7.2.27 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-2 bei atypischen Meningiomen

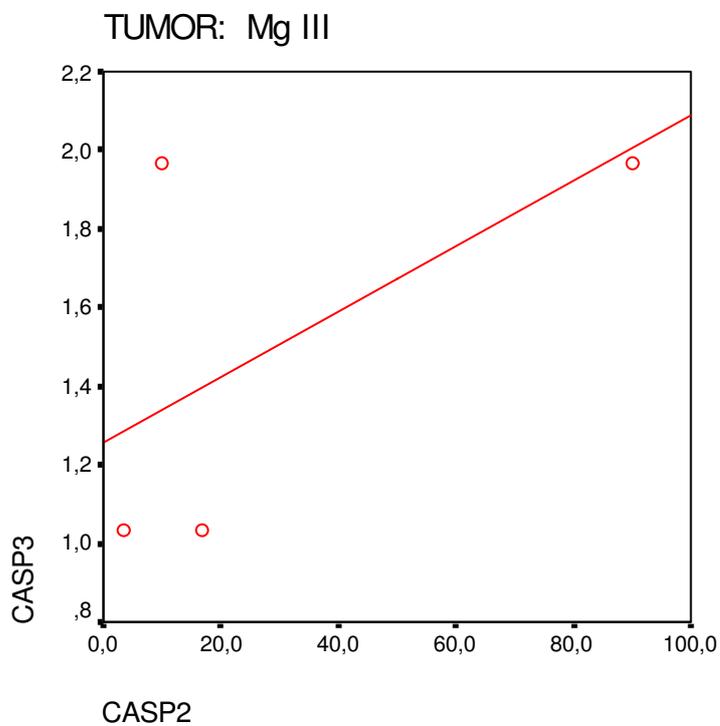


7.2.28 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und -3 bei atypischen Meningiomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ⊗ = acht Präparate]



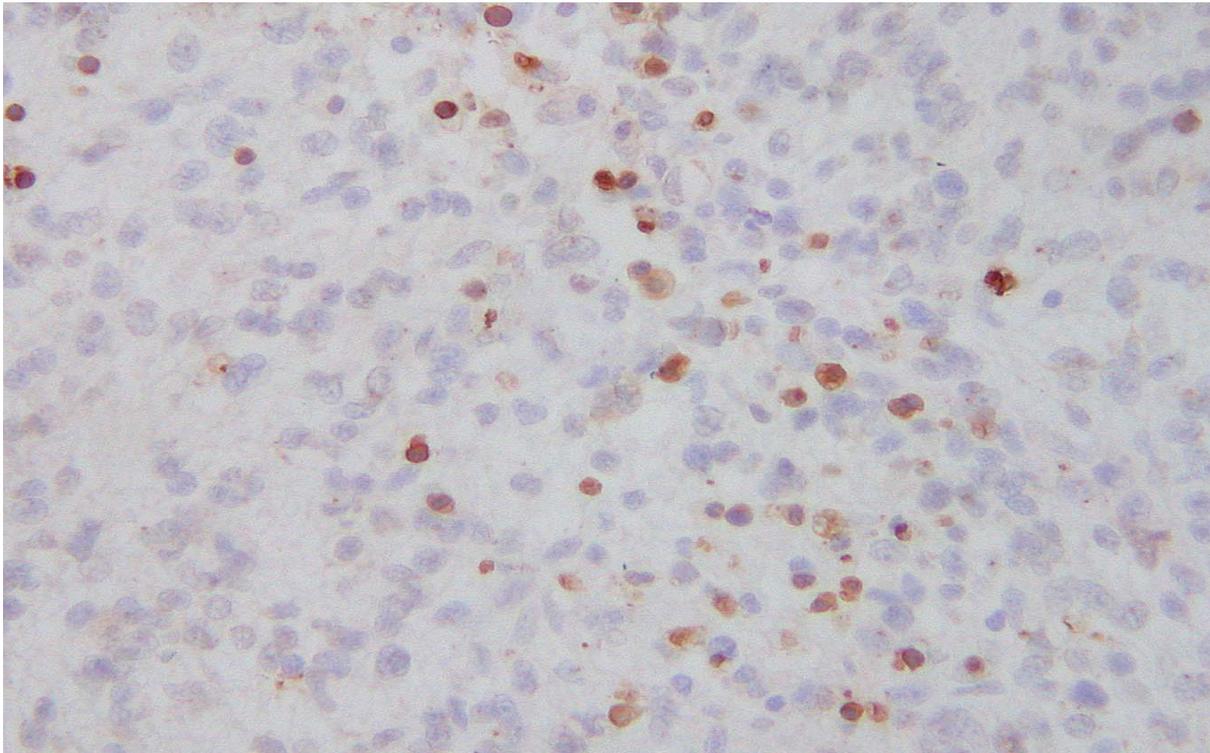
7.2.29 Korrelation der Expressionsraten von SMAC und Caspase-2 bei anaplastischen Meningiomen



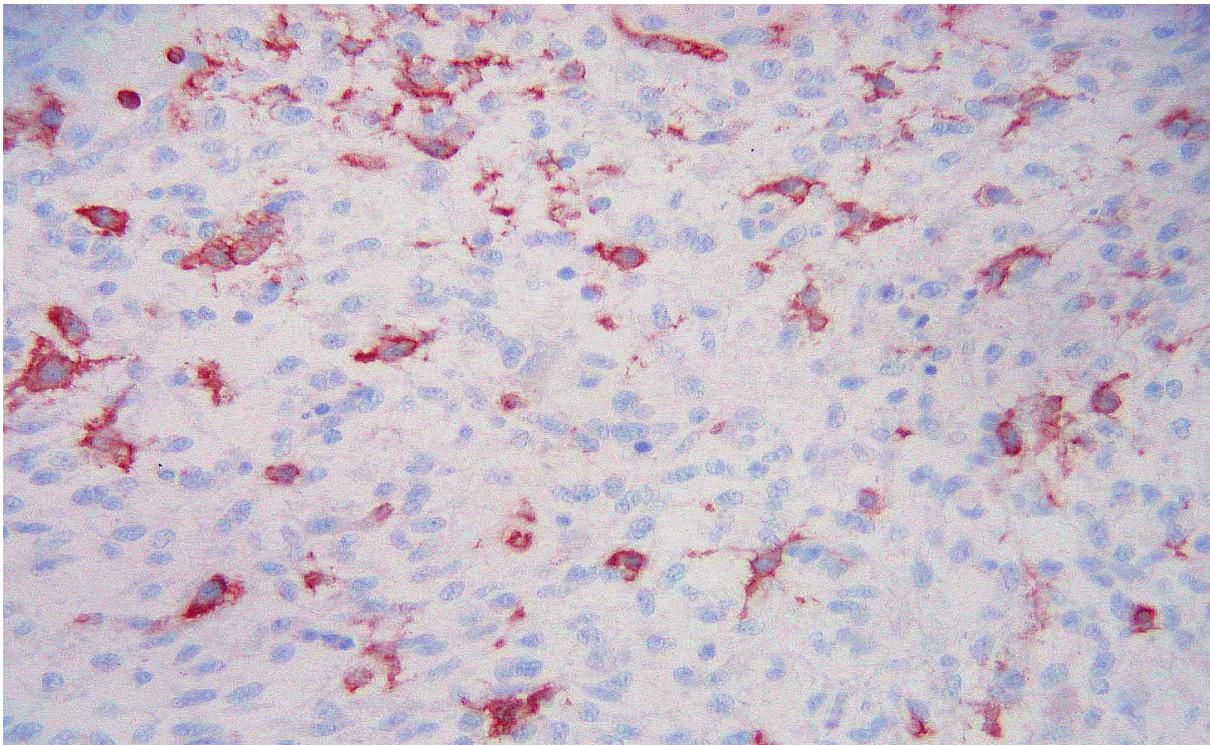
7.2.30 Korrelation der Expressionsraten von Caspase-2 und -3 bei anaplastischen Meningiomen

[Erläuterung: Die in der Grafik dargestellten Symbole repräsentieren die Fallzahlen der in den Achsen angezeigten Expressionsraten der Apoptose-assoziierten Faktoren. Die Kreisfigur steht für ein Präparat, bei den übrigen Symbolen repräsentiert jeder Teilstrich ein Präparat. Bsp.: ○ = ein Präparat, ☼ = acht Präparate]

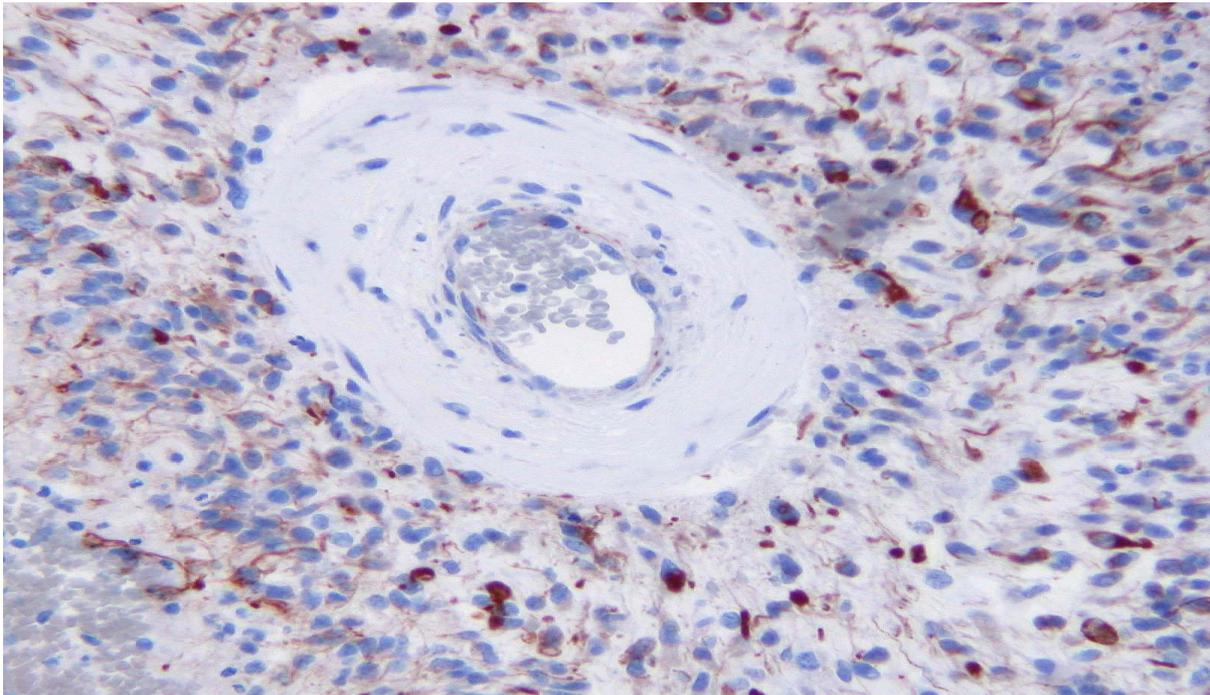
7.3 Abbildungen



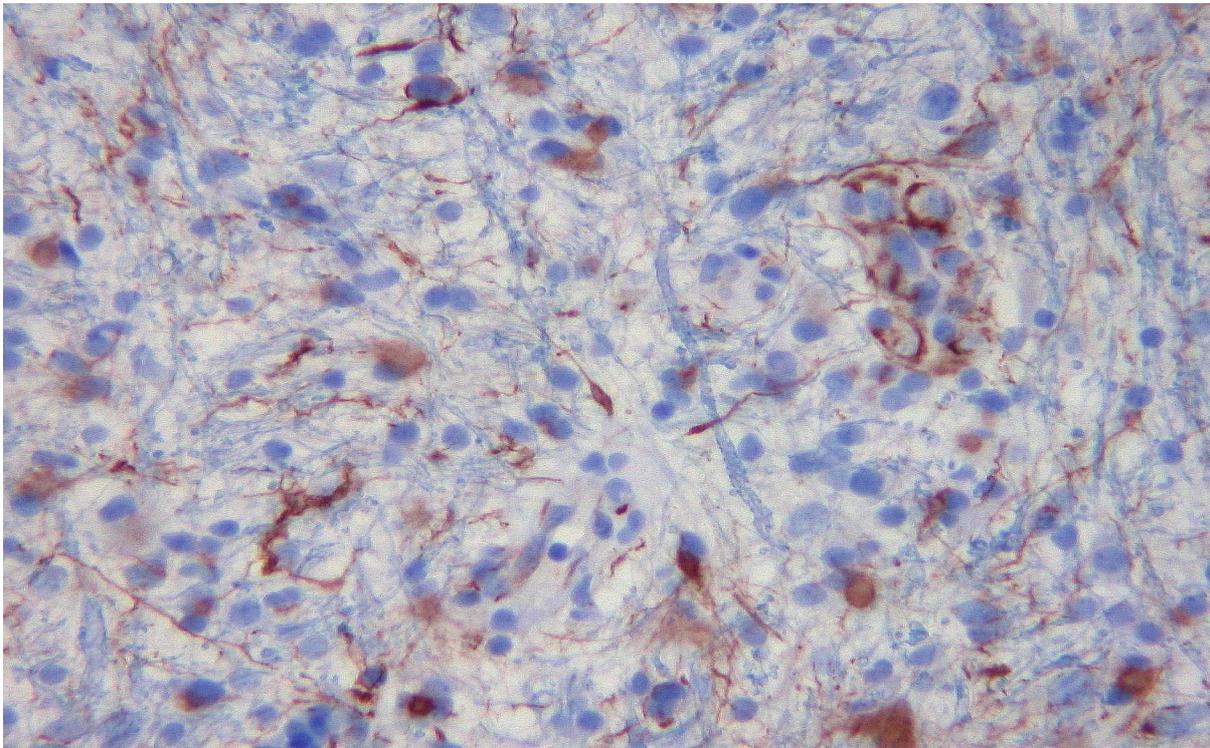
7.3.1 TUNEL-positive Tumorzellen bei einem Glioblastom (WHO-IV; x600)



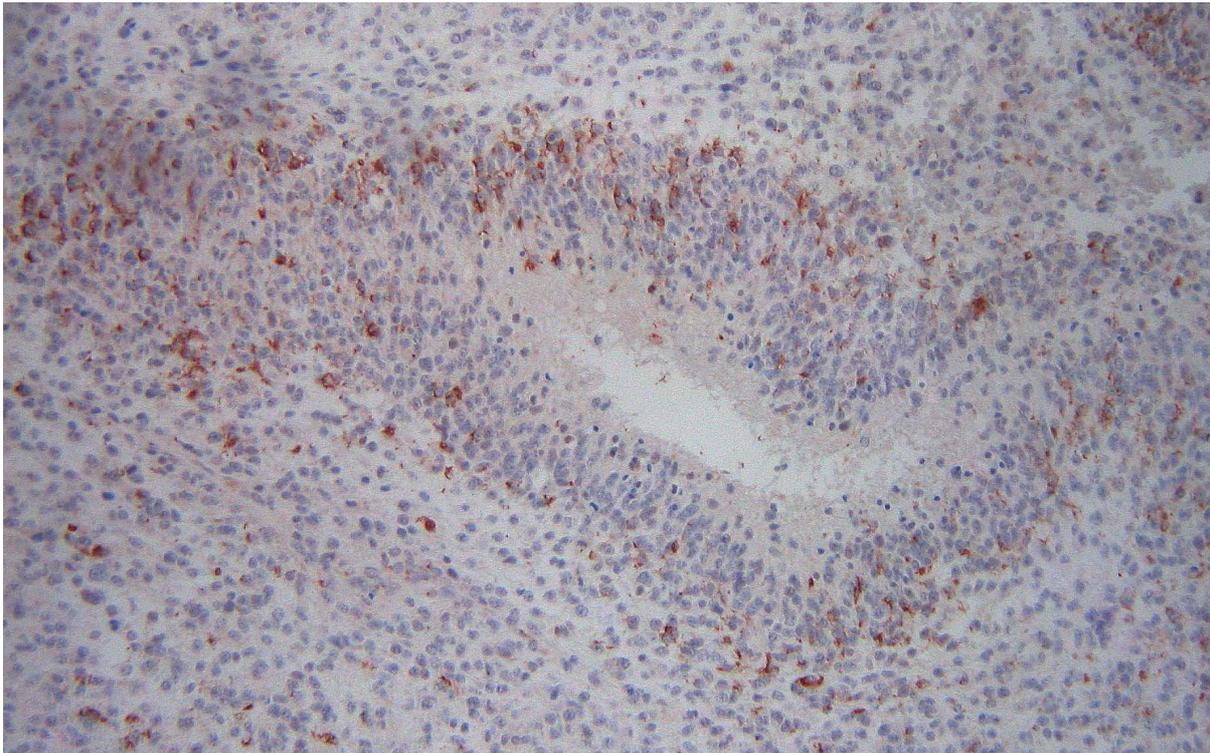
7.3.2 APAF-1-positive Tumorzellen eines Glioblastoms (WHO-IV; x360)



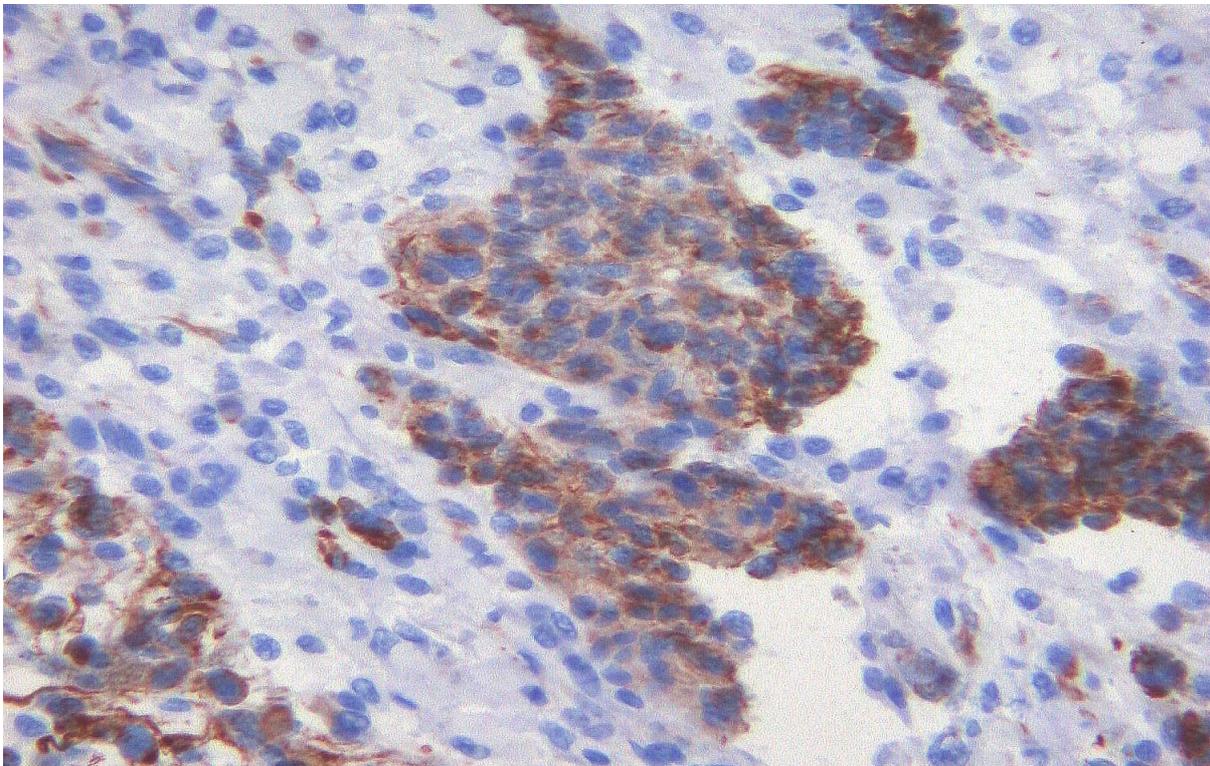
7.3.3 Caspase-9-positive Tumorzellen eines Glioblastoms (WHO-IV; x360)



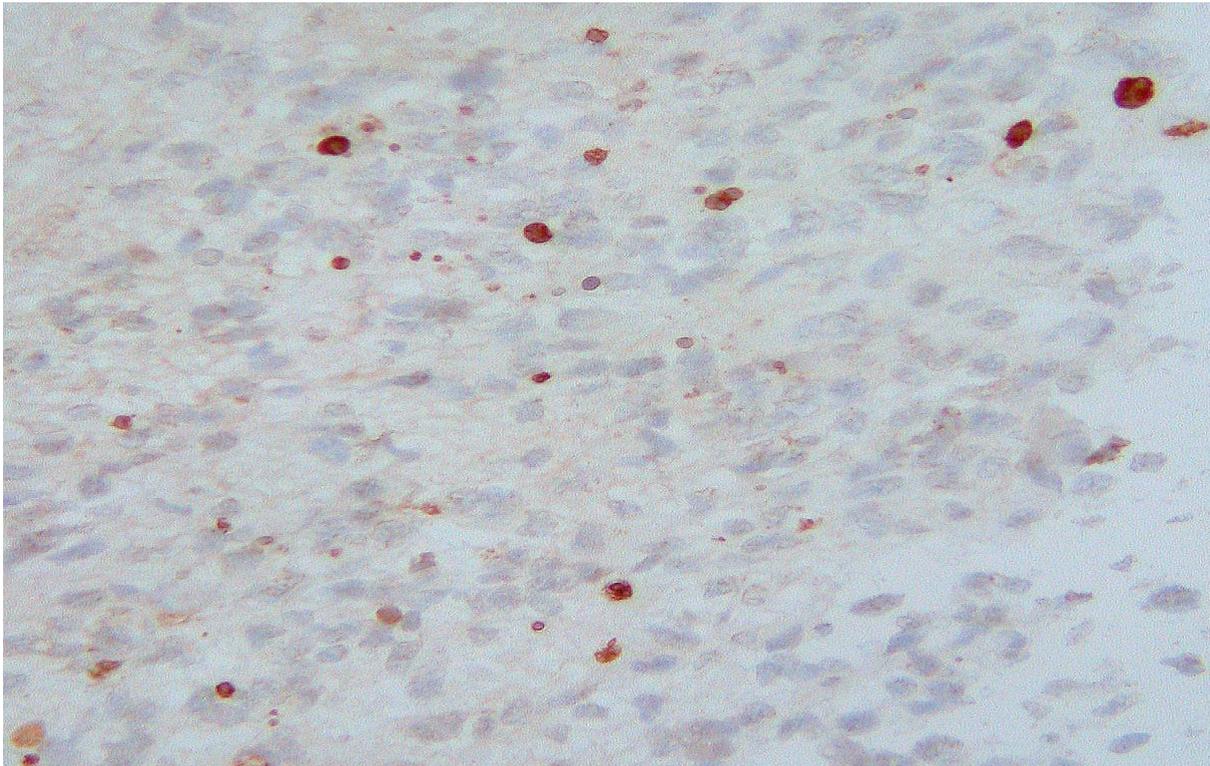
7.3.4 Caspase-9-positive Tumorzellen eines Glioblastoms (WHO-IV; x600)



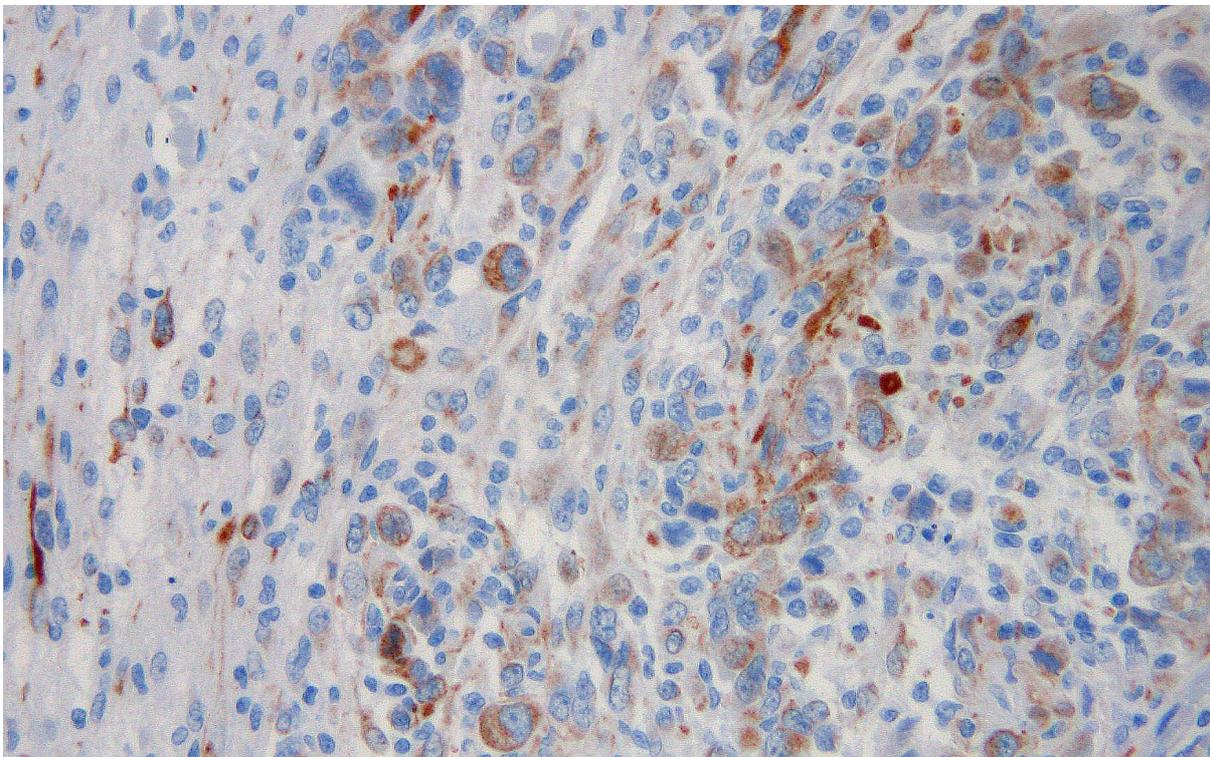
7.3.5 Perinekrotische Expressionssteigerung Caspase-2-positiver Tumorzellen eines Glioblastoms (WHO-IV; x160)



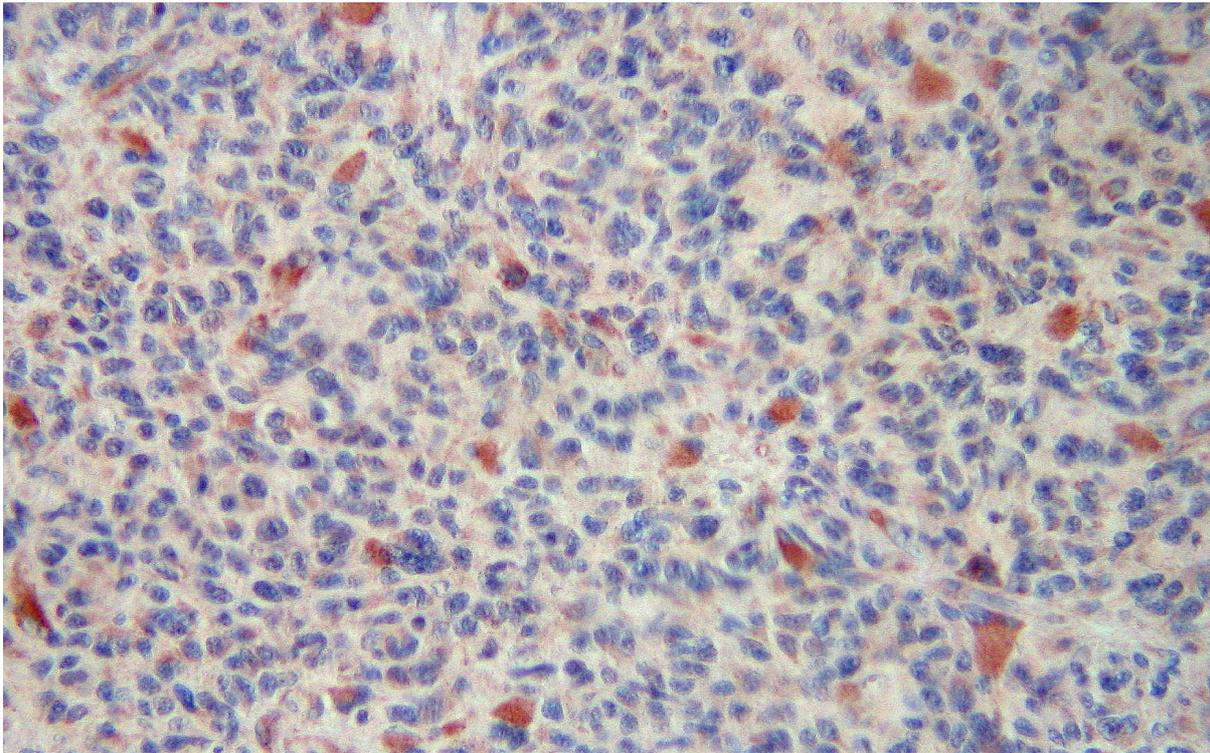
7.3.6 Fokale Expressionssteigerung von Caspase-6 im vitalen Tumorgewebe eines Glioblastoms (WHO-IV; x600)



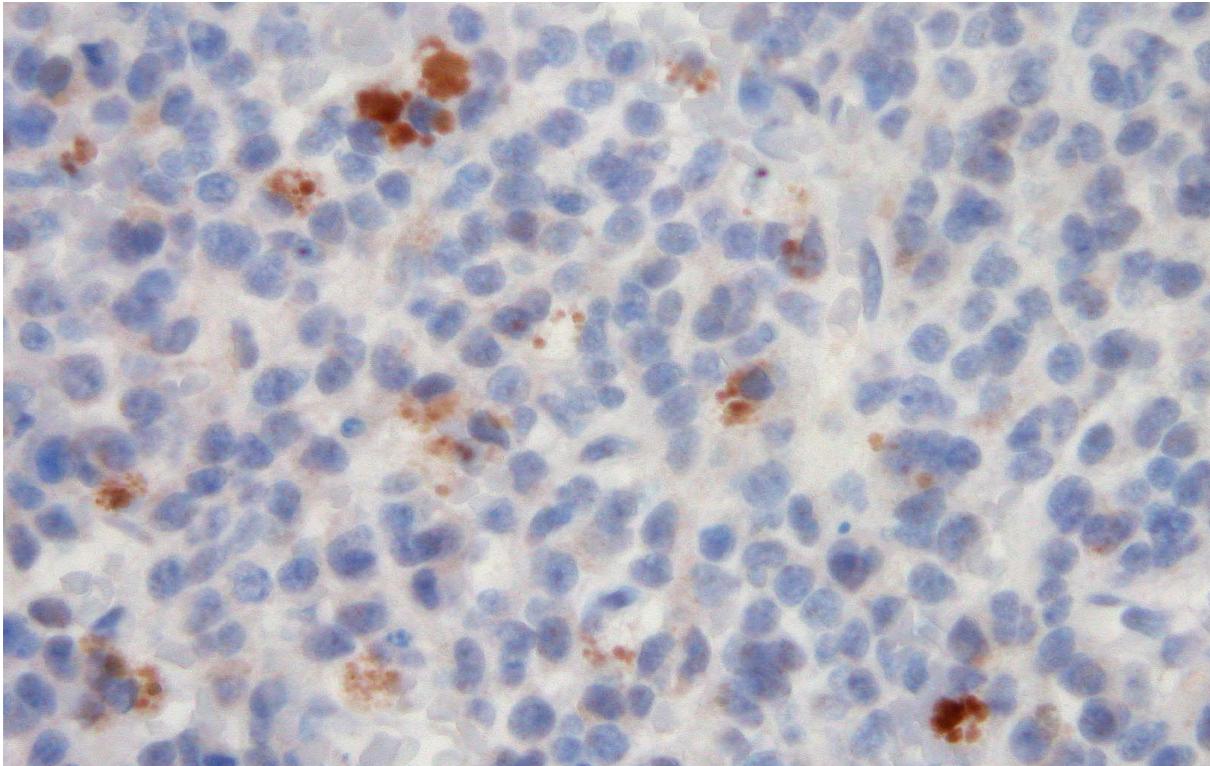
7.3.7 TUNEL-positive Tumorzellen eines Oligodendroglioms (WHO-III; x360)



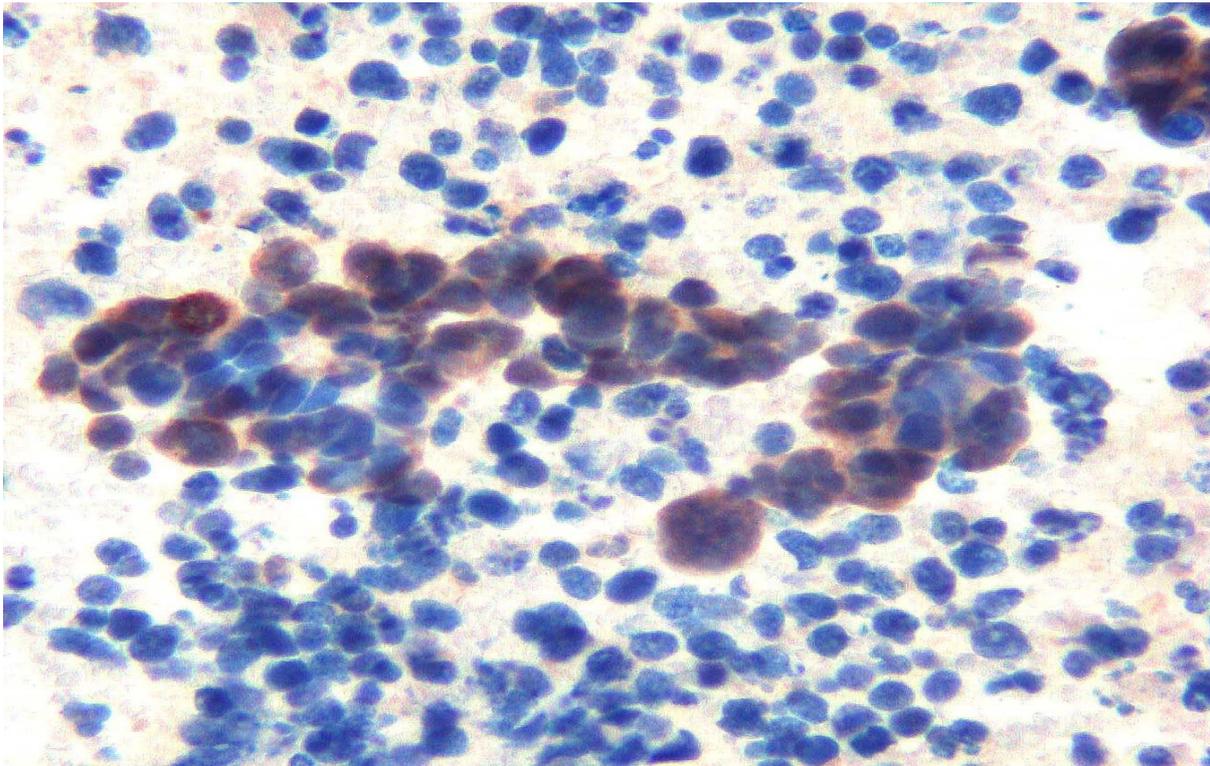
7.3.8 Expression von Caspase-9 in Tumorzellen eines Oligodendroglioms (WHO-III; x360)



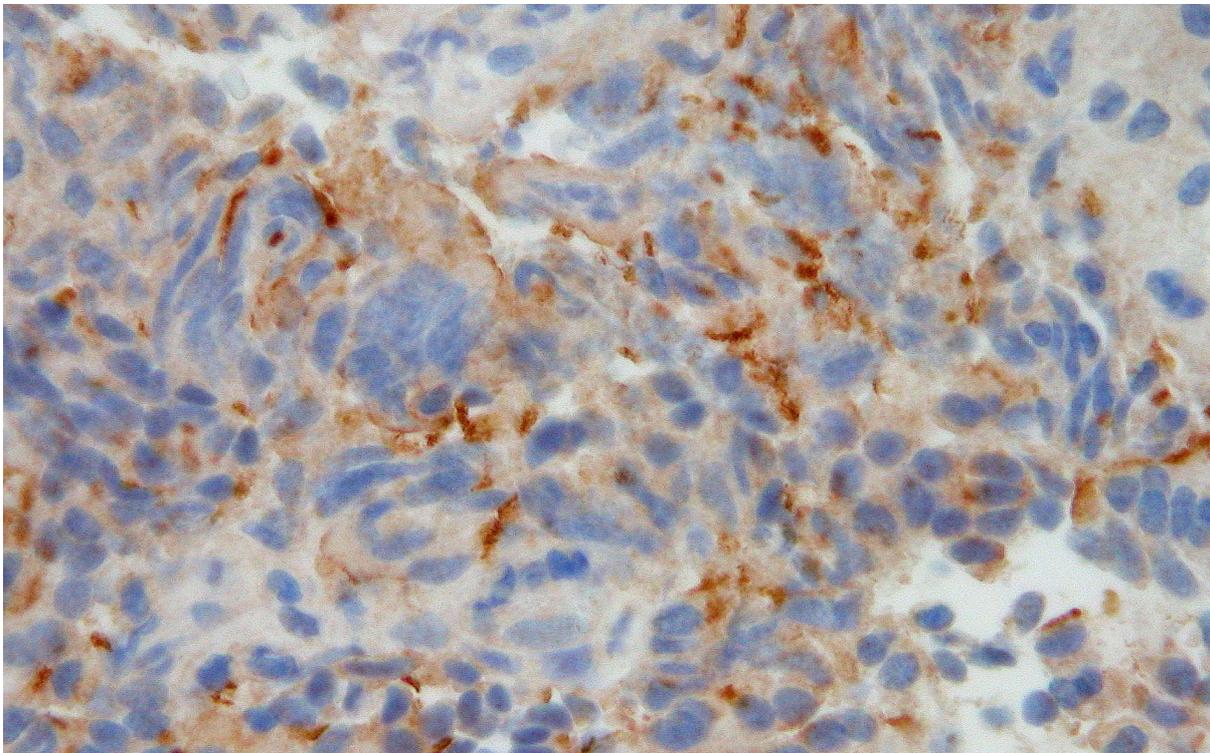
7.3.9 Zytoplasmatische Expression von Caspase-6 in den Tumorzellen eines Oligodendroglioms und in aktivierten Astrozyten (WHO-III; x360)



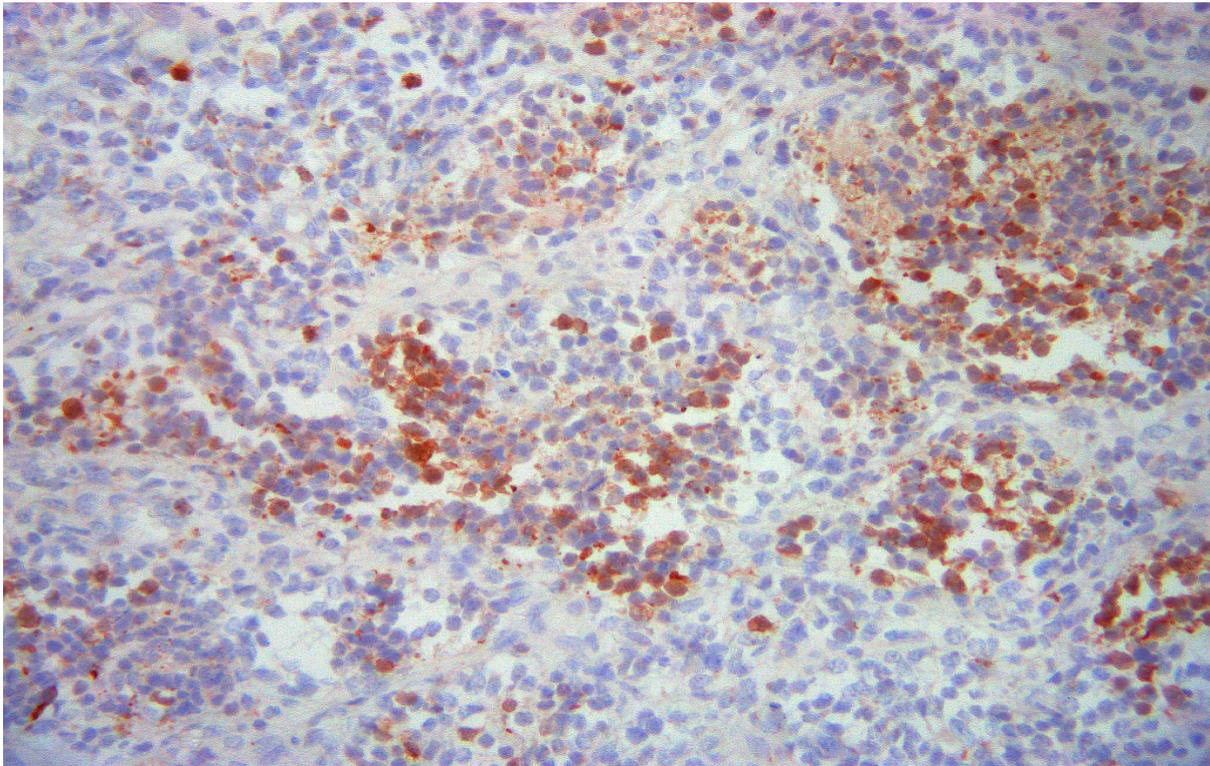
7.3.10 Zytoplasmatische Expression von Caspase-6 in den Tumorzellen eines Oligodendroglioms (WHO-III; x1000)



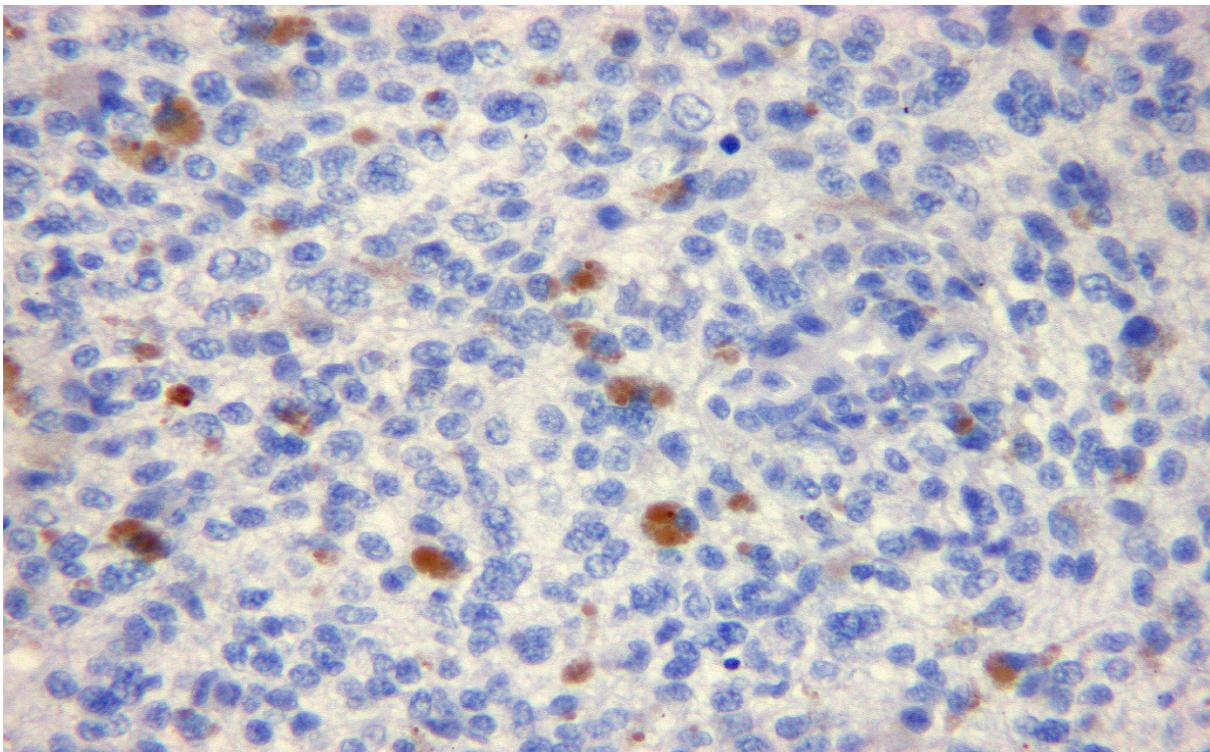
7.3.11 Fokales Expressionsmuster TNF α -positiver Tumorzellen eines Ependymoms (WHO-III; x1000)



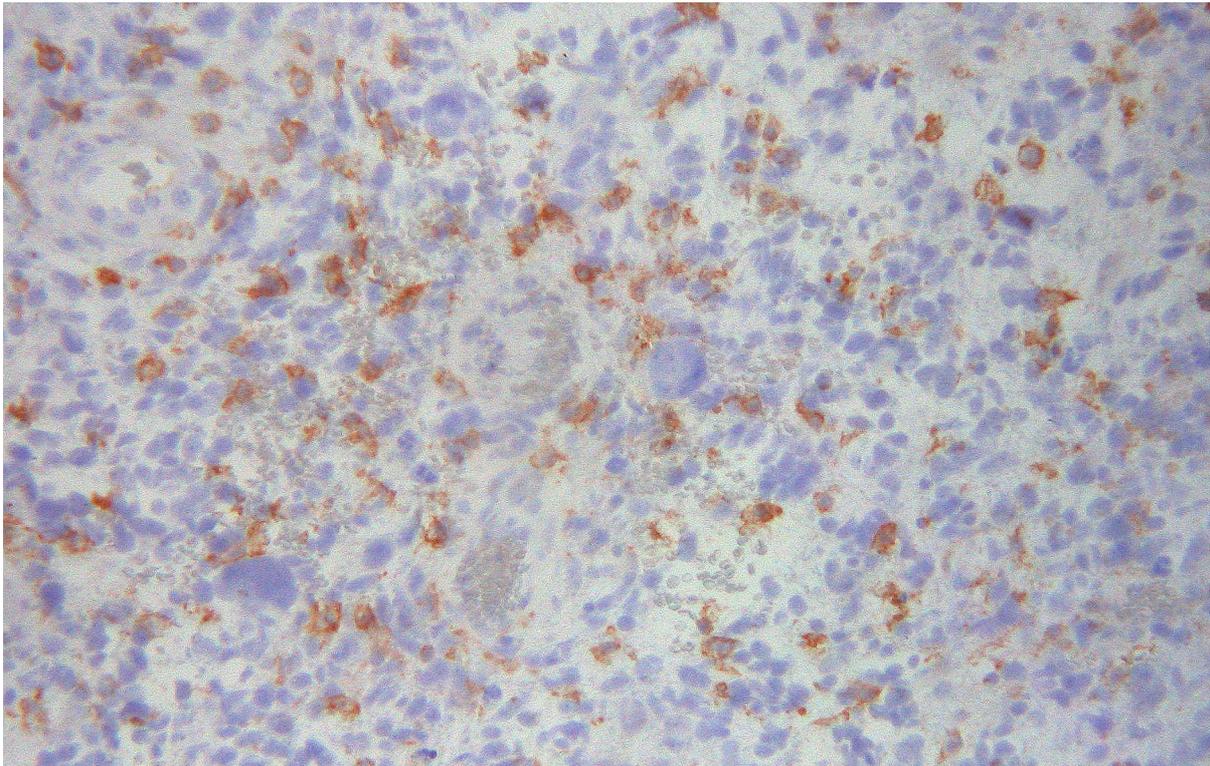
7.3.12 Expression von Caspase-2 im vitalen Tumorgewebe eines Ependymoms (WHO-III; x1000)



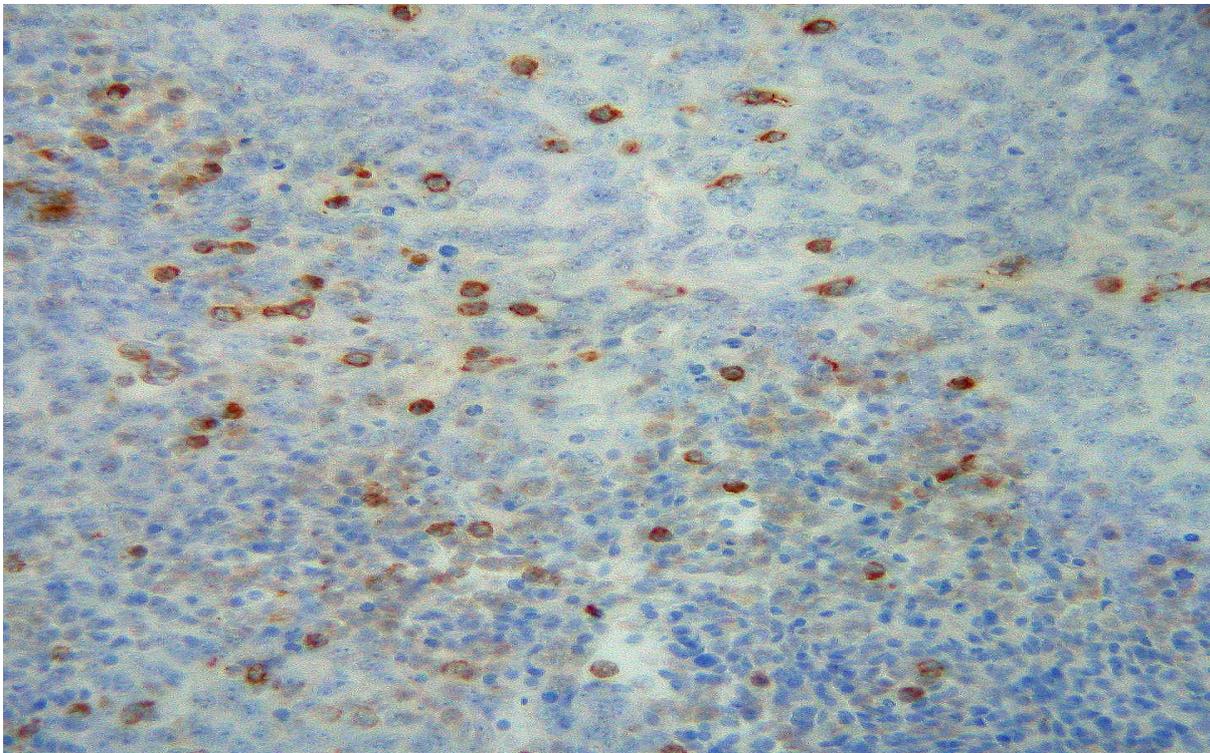
7.3.13 Fokale Expressionssteigerung von SMAC im vitalen Tumorgewebe eines Medulloblastoms (WHO-IV; x240)



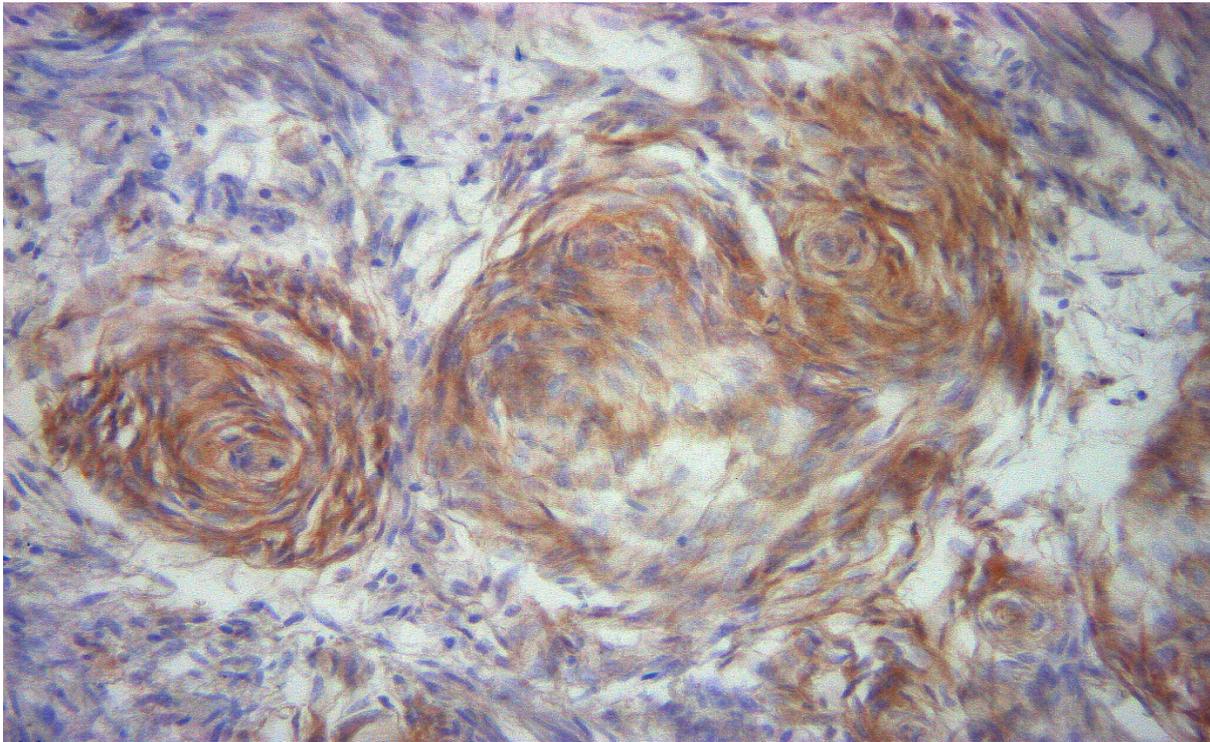
7.3.14 Gleichmäßige Verteilung der Expression von TNF α im vitalen Tumorgewebe eines PNETs (WHO-IV; x600)



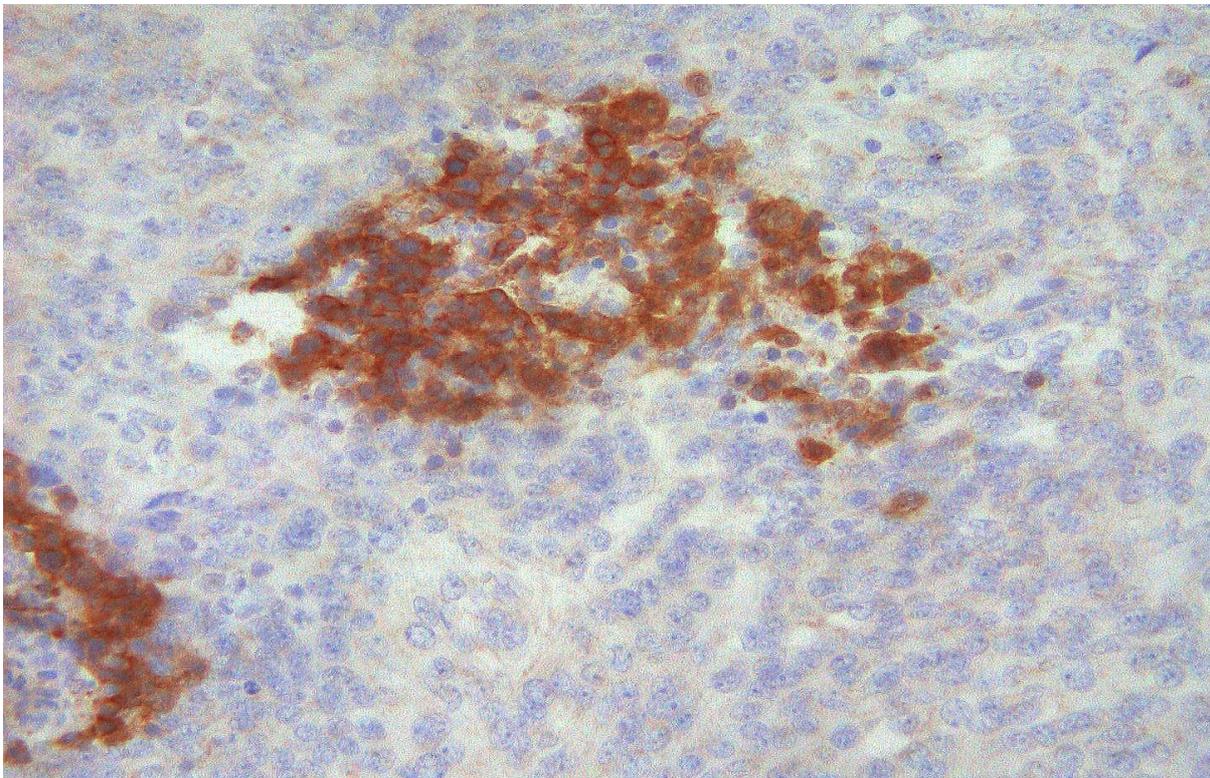
7.3.15 TRAIL-positive Tumorzellen eines PNETs (WHO-IV; x240)



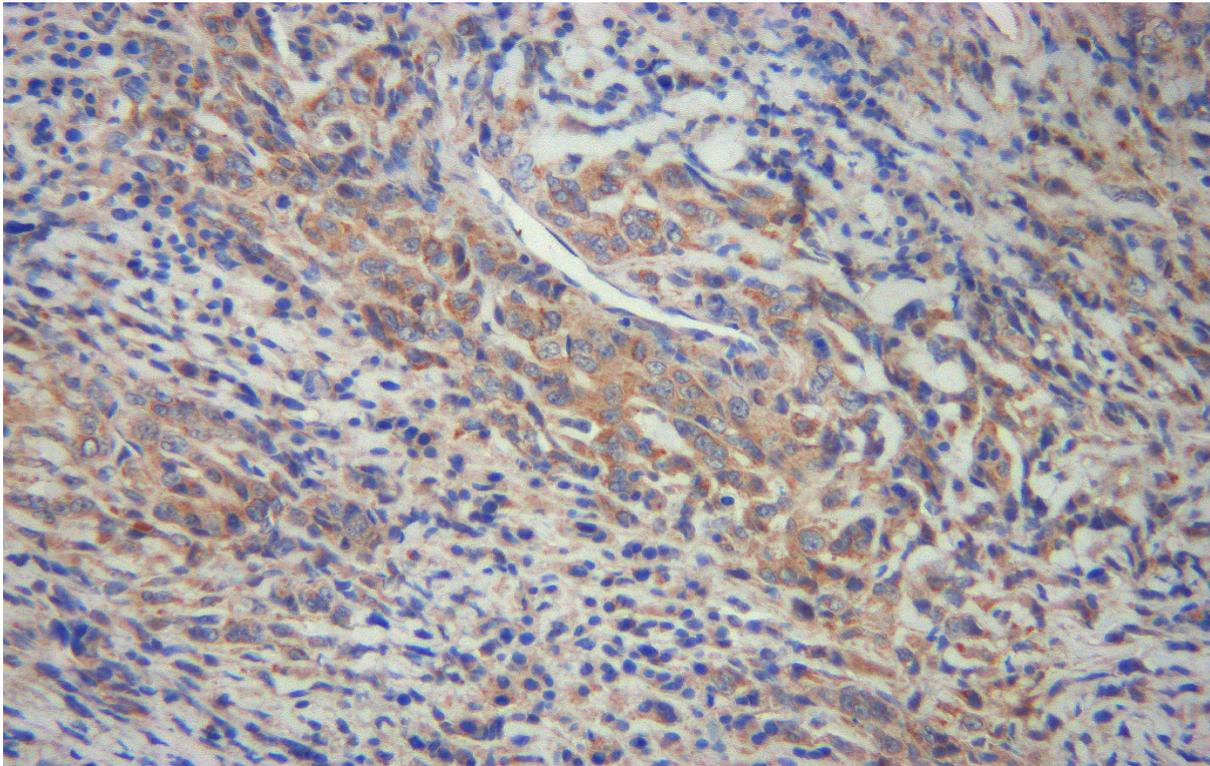
7.3.16 APAF-1-positive Tumorzellen eines atypischen Meningioms (WHO-II; x360)



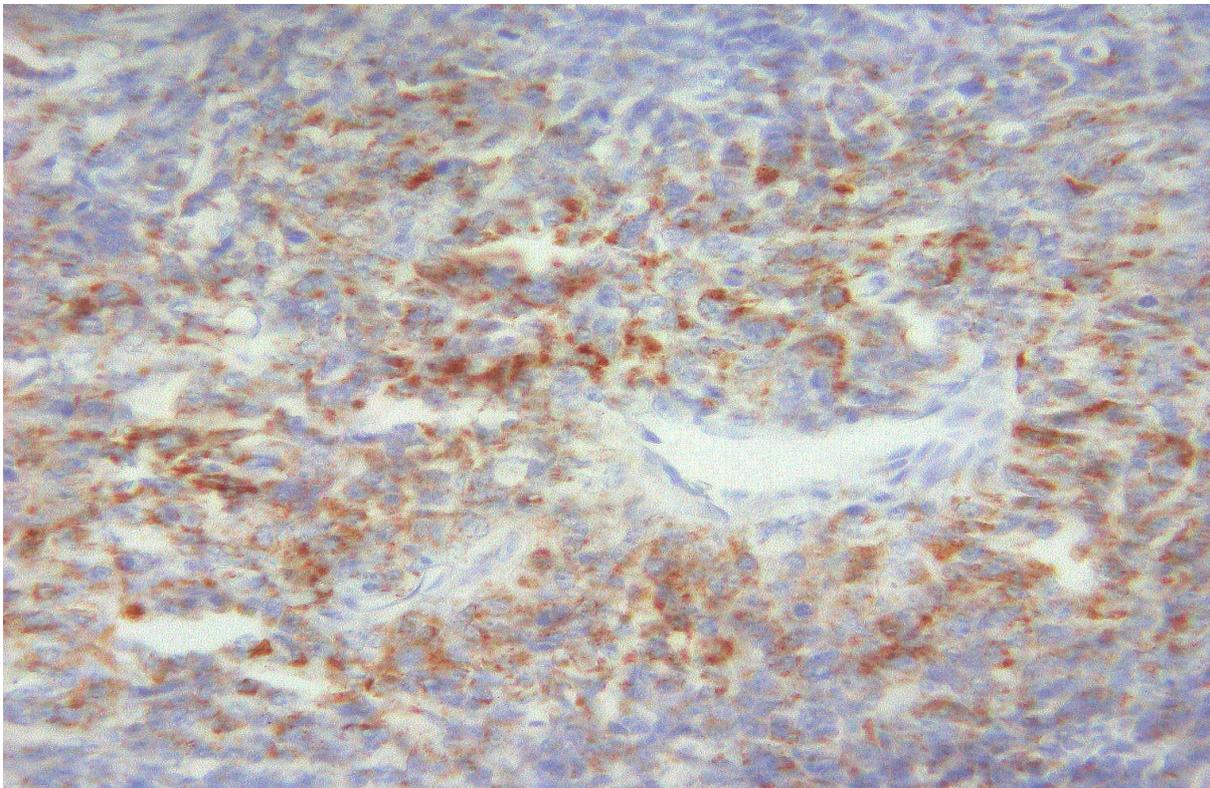
7.3.17 Fokale Expressionssteigerung von SMAC im vitalen Tumorgewebe eines atypischen Meningioms (WHO-II; x360)



7.3.18 Fokale Expression von Caspase-3 im vitalen Tumorgewebe eines atypischen Meningioms (WHO-II; x600)



7.3.19 Expression von TNF-R1 im Zytoplasma von Tumorzellen eines anaplastischen Meningioms (WHO-III; x240)



7.3.20 Fokale Expression von Caspase-7 im vitalen Tumorgewebe eines anaplastischen Meningioms (WHO-III; x360)

8 Literaturverzeichnis

Abe K, Kurakin A, Mohseni-maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R:

The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand

Ann N Y Acad Sci (2000), 926: 52-63

Abramovich CM, Prayson RA:

Apoptotic activity and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. Association with grade and outcome

Am J Clin Pathol (2000; Jul), 114(1): 84-92

Abrams JM, White K, Fessler LI, Steller H:

Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis

Development (1993), 117: 29-43

Adams JM, Cory S:

Apoptosomes: engines for caspase-activation

Curr Opin Cell Biol (2002; Dec), 14(6): 715-20

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ:

Apoptosis-associated release of SMAC/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2

EMBO J (2001; Dec 3), 20(23): 6627-36

Aigner T:

Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens?

J. Pathol. (2002), 198(1): 1-4

Allan DJ et al.:

Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast

J Pathol (1992; May), 167(1): 25-32

Allan DJ, Gobe GC, Harmon BV:

Sertoli cell death by apoptosis in the immature rat testis following x-irradiation

Scanning Microsc (1988, Mar), 2(1): 503-12

Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR:

Cell death in Spermatogenesis. Perspectives on mammalian cell death

Perspectives on mammalian cell death; edited by CS Potten; Oxford University Press, New York (1987): 229-58

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J:

Human ICE/CED-3 protease nomenclature

Cell (1996, Oct 18), 87(2): 171

Alnemri ES:

Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases

J Cell Biochem (1997, Jan), 64(1): 33-42

Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuhara T, Inai K:

Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign,

atypical and anaplastic meningiomas
Hum Pathol (2001; Sep), 32(9): 970-5

Araya R, Uehara T, Nomura Y:
Hypoxia induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-MC cells by caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria
FEBS Lett (1998; Nov 13), 439(1-2): 168-72

Bell HS, Whittle IR, Walker M, Leaver HA, Wharton SB:
The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems
Neuropathol Appl Neurobiol (2001; Aug), 27(4): 291-304

Belmokhtar CA, Hillion J, Dudognon C, Fiorentino S, Flexor M, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E:
Apoptosome-independent pathway for apoptosis. Biochemical analysis of APAF-1 defects and biological outcome
J Biol Chem (2003; Aug 8), 278(32): 29571-80

Blanchard H et al.:
The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis
Structure Fold Des (1999, Sep 15), 7(9): 1125-33

Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM, Siegel SE, Kaiser HE:
Clinical and prognostic significance of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen expression in childhood primitive neuroectodermal brain tumors
Anticancer Res (1997; Jan-Feb), 17(1A): 189-96

Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE:
Fas (APO-1, CD95) receptor expression and new options for immunotherapy in childhood medulloblastomas
Anticancer Res (1999; Jul-Aug), 19(4B): 3293-314

Boise LH, Collins CM:
Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?
Trends Microbiol (2001), 9: 64-67

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K:
Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie
Urban & Fischer, 2. Aufl. (2000): 192

Catchpoole DR und Lock RB:
The potential tumor suppressor role for caspase-9 (CASP9) in the childhood malignancy, neuroblastoma
Eur J Cancer (2001; Nov), 37(17): 2217-21

Cerretti DP et al.:
Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme
Science (1992), 256: 97-100

Ceruti S, Beltrami E, Matarrese P, Mazzola A, Cattabeni F, Malorni W, Abbracchio MP:
A key role for caspase-2 and caspase-3 in the apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine (cladribine) and 2-chloro-adenosine in human astrocytoma cells
Mol Pharmacol (2003; Jun), 63(6): 1437-47

Chang DW, Ditsworth D, Liu H, Srinivasula SM, Alnemri ES, Yang X:
Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases
J Biol Chem (2003; May 9), 278(19): 16466-9

Chen Y et al.:

Living T9 glioma cells expressing membrane macrophage colony stimulating factor produce immediate tumor destruction by polymorphonuclear leukocytes and macrophages via a "paraptosis"-induced pathway that promotes systemic immunity against intracranial T9 gliomas

Blood (2002; Aug 15), 100(4): 1373-80

Cheng YJ, Yang BC, Hsieh WC, Huang BM, Liu MY:

Enhancement of TNF-alpha expression does not trigger apoptosis upon exposure of glial cells to lead and lipopolysaccharide

Toxicology (2002; Sep 16), 178(3): 183-91

Chinnaiyan AM and Dixit VM:

The cell death machine

Curr Biol (1996), 6: 555-62

Choi C, Kutsch O, Park J, Zhou T, Seol DW, Benveniste EN:

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells

Mol Cell Biol (2002; Feb), 22(3): 724-36

Cohnheim J:

Lectures on general pathology: the pathology of nutrition, sect II, ed 2

Lectures on general pathology; translated from German by AB McKee; reproduced by The New Sydenham

Condorelli F, Sortino MA, Stella AM, Canonico PL:

Relative contribution of different receptor subtypes in the response of neuroblastoma cells to tumor necrosis factor-alpha

J Neurochem (2000; Sep), 75(3): 1172-9

Coultas L, Strasser A:

The role of the bcl-2 protein family in cancer

Semin Cancer Biol (2003; Apr), 13(2): 115-23

Daigle I, Simon HU:

Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils

Swiss Med Wkly (2001; May 5), 131(17-18): 231-7

Dal Canto MC und Gurney ME:

Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis

Am J Pathol (1994; Dec), 145(6): 1271-9

Das A, Tang WY, Smith DR:

Meningiomas in Singapore: demographic and biological characteristics

J Neurooncol (2000; Apr), 47(2): 153-60

Daugas E et al.:

Mitochondrio-nuclear translocation in apoptosis and necrosis
FASEB J (2000), 14: 729-739

Dayer JM:

Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra
Clin Exp Rheumatol (2002; Sep-Oct), 20 (5 Suppl 27): 14-20

Degli-Esposti M:

To die or not to die - the quest of the TRAIL receptors
J Leukoc Biol (1999; May), 65(5): 535-42

Deininger MH, Weller M, Streffer J, Meyermann R:

Antiapoptotic Bcl-2 family expression increases with progression of oligodendrogliomas
Cancer (1999; Nov 1), 86(9): 1832-9

Delgado MB, Anderson JR, Whittle IR, Wharton SB:

Expression of Bcl-2 and Bax in oligodendrogliomas and their relationship to apoptosis
Neuropathol Appl Neurobiol (1999; Oct), 25(5): 400-7

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G:

The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily
Cytokine Growth Factor Rev (2003, Jun), 14(3-4): 193-209

Deng Y, Lin Y, Wu X:

TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of SMAC/DIABLO
Genes Dev (2002; Jan 1), 16(1): 33-45

Dorr J, Waiczies S, Wendling U, Seeger B, Zipp F:

Induction of TRAIL-mediated glioma cell death by human T cells
J Neuroimmunol (2002; Jan), 122(1-2): 117-24

D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, Goodyer C, Antel JP:

Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury
J Neurosci (1995; Nov), 15(11): 7293-300

Duan L et al.:

Sensitization of human malignant glioma cell lines to tumor necrosis factor-induced apoptosis by cisplatin
J Neurooncol (2001; Mar), 52(1): 23-36

Dufay N, Reboul A, Touraine-Moulin F, Belin MF, Giraudon P:

Soluble factors, including TNF alpha, secreted by human T cells are both cytotoxic and cytostatic for medulloblastoma cells
J Neurooncol (1999; Jun), 43(2): 115-26

Ehrmann J, Rihakova P, Hlobilkova A, Kala M, Kolar Z:

The expression of apoptosis-related proteins and the apoptotic rate in glial tumors of the brain
Neoplasma (2000), 47(3): 151-1

Ellis HM, Horvitz HR:

Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*
Cell (1986), 44(6): 817-29

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR:
Mechanisms and functions of cell death
Annu Rev Cell Biol (1991), 7: 663-698

Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J:
The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal
Basic Res Cardiol (2001; May-Jun), 96(3): 219-26

Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S:
Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis
Nature (1996), 380: 723-26

Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM:
Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells
J Immunol (1992), 192: 4029-35

Ferrer I et al.:
Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins.
Acta Neuropathol (Berl) (1995), 90(5): 504-10

Fiers W, Beyaert R, Declercq W and Vandenabeele P:
More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage
Oncogene (1999 Dec 16), 18(54): 7719-30

Flemming W:
Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel
Arch Anat Entw Gesch (1885): 221-44

Foghsgaard L et al.:
Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor
J Cell Biol (2001), 153: 999-1009

Frank S, Kohler U, Schackert G, Schackert HK:
Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors
Biochem Biophys Res Commun (1999; Apr 13), 257(2): 454-9

Fulda S et al.:
Betulinic acid triggers CD95 (Apo-1/ Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors
Cancer Res (1997; Nov 1), 57(21): 4956-64

Fulda S, Debatin KM:
Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors
Med Pediatr Oncol (2000; Dec), 35(6): 616-8

Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM:
Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in treatment of neuroectodermal tumors

Clin Pediatr (1999; Jul-Aug), 211(4): 319-22

Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM:

SMAC agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo

Nat Med (2002; Aug), 8(8): 808-15

Furukawa Y et al.:

Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis

J Biol Chem (2002; Oct 18), 277(42): 39760-8

Galasso JM, Stegman LD, Blaivas M, Harrison JK, Ross BD, Silverstein FS:

Experimental gliosarcoma induces chemokine receptor expression in rat brain

Exp Neurol (2000; Jan), 161(1): 85-95

Glaser T, Weller M:

Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release

Biochem Biophys Res Commun (2001; Feb 23), 281(2): 322-7

Gluecksmann A:

Cell deaths in normal vertebrate ontogeny

Biol Rev Camb Philos Soc (1951), 26: 59-86

Goldbrunner RH et al. :

Different vascular patterns of medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors

Int J Dev Neurosci (1999; Aug-Oct), 17(5-6): 593-9

Gorman AM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Ceccatelli S:

Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells

Eur J Neurosci (1999; Mar), 11(3): 1067-72

Gottlieb RA:

Mitochondria and Apoptosis

Biol Signals Recept (2001), 10: 147-61

Graeper L:

Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung

Arch Zellforsch (1914), 12: 373-94

Green DR, Amarante-Mendes GP:

The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death

Results Probl Cell Differ (1998), 24: 45-61

Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L, Rosen A:

Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated jurkat cells

FEBS Lett (1996), 390: 299-303

Grotzer MA et al.:

Abundance of apoptotic neoplastic cells in diagnostic biopsy samples is not a prognostic factor in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system

J Pediatr Hematol Oncol (2001(1); Jan), 23(1): 25-9

Grotzer MA et al.:

Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression

Oncogene (200; Sep 21), 19(40): 4604-10

Grotzer MA, Geoerger B, Janss AJ, Zhao H, Rorke LB, Phillips PC:

Prognostic significance of Ki-67 (MIB-1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system

Med Pediatr Oncol (2001(2); Feb), 36(2): 268-73

Gruetter MG:

Caspases: key players in programmed cell death

Current opinion in structural biology (2000), 10: 649-55

Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES:

Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria

J Biol Chem (2002; Apr 19), 277(16): 13430-7

Gyure KA, Prayson RA, Estes ML:

Extracerebellar primitive neuroectodermal tumors: a clinicopathologic study with bcl-2 and CD99 immunohistochemistry

Ann Diagn Pathol (1999; Oct), 3(5): 276-80

Haecker G:

Intrazelluläre Mechanismen der Apoptose

Habilitation, München (1997): 12

Hahn C, Hirsch B, Jahnke D, Duerkop H, Stein H:

Three new types of apaf-1 in mammalian cells

Biochem and Biophys Res Com (1999), 261: 746-49

Hao C et al.:

Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells

Cancer Res (2001; Feb 1), 61(3): 1162-70

Haslam RH, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA:

Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma

J Pediatr Hematol Oncol (1998; Nov-Dec), 20(6): 520-7

Hayashi S et al.:

Expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas

Neurol Med Chir (Tokyo; 2001; Apr), 41(4): 187-95

Heesters MA, Koudstaal J, Go KG, Molenaar WM:

Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: prognostic and clinical value

J Neurooncol (1999), 44(3): 255-66

Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P:

Vaskular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas

Virchows Arch (2001; Nov), 439(5): 645-52

Henshall DC et al.:

Expression and differential processing of caspases-6 and -7 in relation to specific epileptiform EEG patterns following limbic seizures

Neurobiol Dis (2002; Jul), 10(2): 71-87

Hermisson M, Wagenknecht B, Wolburg H, Glaser T, Dichgans J, Weller M:

Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release

Oncogene (2000; May 4), 19(19): 2338-45

Ho DM, Hsu CY, Ting LT, Chiang H:

Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma

Cancer (2002; Mar 1), 94(5): 1538-47

Hockenbery D:

Defining Apoptosis

AJP (1995 Jan), 146(1): 16-19

Holler N et al.:

Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule

Nature Immunol (2000), 1: 489-95

Hu S, Yang X:

Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer SMAC/DIABLO

J Biol Chem (1993; Mar 21), 268(12): 10055-60

Hueber A, Winter S, Weller M:

Chemotherapy primes malignant glioma cells for CD95 ligand-induced apoptosis up-stream of caspase-3 activation

Eur J Pharmacol (1998; Jul 3), 352(1): 111-5

Hunter AM, Kottachchi D, Lewis J, Duckett CS, Korneluk RG, Liston P:

A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active SMAC/DIABLO

J Biol Chem (2003; Feb 28), 278(9): 7494-9

Huo J, Luo RH, Metz SA, Li G:

Activation of caspase-2 mediates the apoptosis-induced by GTP-depletion in insulin-secreting (HIT-T15) cells

Endocrinology (2002; May), 143(5): 1695-704

Iwasaki K, Toms SA, Barnett GH, Estes ML, Gupta MK, Barna BP:

Inhibitory effects of tamoxifen and tumor necrosis factor alpha on human glioblastoma therapy

Cancer Immunol Immunother (1995 Apr), 40(4): 228-34

Jacobson MD:

Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected

Curr Biol (1997), 7: R277-R281

Jadus MR et al.:

Human U251MG glioma cells expressing the membrane form of macrophage colony-stimulating factor (mM-CSF)

are killed by human monocytes in vitro and are rejected within immunodeficient mice via paraptosis that is associated with increased expression of three different heat shock proteins

Cancer Gene Ther (2003; May), 10(5): 411-20

Jendrossek V, Handrick R, Belka C:

Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway

FASEB J (2003; Aug), 17(11): 1547-9

Johnson EM Jr:

Possible role of neuronal apoptosis in Alzheimer's disease

Neurobiol Aging (1994), 15Suppl2: 187-9

Kaiser HE, Bodey B:

The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms

In Vivo (2000; Nov-Dec), 14(6): 789-803

Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, Srivastava RK:

Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and SMAC/DIABLO release

Cancer Res (2003; Apr 1), 63(7): 1712-21

Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, Probst A:

Prognostic significance of MIB-1, p53, and Bcl-2 immunoreactivity in meningiomas

Hum Pathol (1998; Feb), 29(2): 140-5

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR:

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics

Br J Cancer (1972), 26: 239-57

Kerr JFR:

Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death

J Pathol (1971), 105: 13-20

Khoshyomn S, Lew S, DeMattia J, Singer EB, Penar PL:

Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression

J Neurooncol (1999), 45(2): 111-6

Kitanaka C, Kuchino Y:

Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology

Cell Death Differ (1999), 6: 508-15

Kleihues P, Cavenee WK:

WHO-classification of tumors of the nervous system

IARC press Lyon (2000): 6-7

Knight MJ, Riffkin CD, Muscat AM, Ashley DM, Hawkins CJ:

Analysis of Fas-L and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells

Oncogene (2001; Sep 13), 20(41): 5789-98

Kogel D et al.:

Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway

Br J Cancer (2001; Nov 30), 85(11): 1801-8

Komata T et al.:

Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter

Cancer Res (2001; Aug 1), 61(15): 5796-802

Konstantinidou A, Korkorlopoulou P, Patsouris E, Mahera H, Hranioti S, Kotsiakakis X, Davaris P:

Apoptosis detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA is a predictor of recurrence in intracranial meningiomas

J Neurooncol (2001; Oct), 55(1): 1-9

Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V:

Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases

J Neurol Sci (2000; Aug 1), 177(1): 72-82

Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V:

Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms

J Neurooncol (2002(1); Jul), 58(3): 255-70

Korshunov A, Savostikova M, Ozerov S:

Immunohistochemical markers for prognosis of average-risk pediatric medulloblastomas. The effect of apoptotic index, TrkC, and c-myc expression

J Neurooncol (2002(2); Jul), 58(3): 271-9

Laster SM, Wood JG, Gooding LR:

Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis

J Immunol (1988), 141: 2629-34

Leist M et al.:

Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis into necrosis

Exp Cell Res (1999), 249: 396-403

Leist M, Jaeeattelae M:

Four deaths and a funeral: from caspases to alternative death mechanisms

Nat Rev Mol Cell Biol (2001; Aug), 2(8): 589-98.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P:

Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis

J Exp Med (1997), 185: 1481-1486

Leon LR:

Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines

Front Biosci (2004; May 1), 9: 1877-88

Levin S et al.:

The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic

Pathologists

Toxicol Pathol. (1999, Jul-Aug), 27(4): 484-90

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J:

Cleavage of Bid by Caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas-pathway of apoptosis
Cell (1998; Aug 21), 94(4): 491-501

Liao Z, Boileau TW, Erdman JW Jr, Clinton SK:

Interrelationships among angiogenesis, proliferation and apoptosis in the tumor microenvironment during N-methyl-N-nitrosourea androgen-induced prostate carcinogenesis in rats
Carcinogenesis (2002; Oct), 23(10): 1701-11

Lieberthal W, Triaca V, Levine J:

Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. Necrosis
Am. J. Physiol. (1996, Apr), 270(4 Pt. 2): F700-8

Link M, Harrison DJ:

To live or die – a cell's choice
Essays Biochem (2001), 37: 109-20

Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K:

The role of Caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice
Immunity (1999; Jun 10), (6): 629-39

Lowe SW, Lin AW:

Apoptosis in cancer
Carcinogenesis (2000; Mar), 21(3): 485-95

Lueschen S:

Untersuchungen zur Signaltransduktion durch den p55-Rezeptor fuer Tumor Nekrose Faktor
Diss, Univ Kiel (2000): 20

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X:

Bid, a bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors
Cell (1998; Aug 21), 94(4): 481-90

MacDonald TJ, Ladisch S:

Antisense to integrin alpha v inhibits growth and induces apoptosis in medulloblastoma cells
Anticancer Res (2001; Nov-Dec), 21(6A): 3785-91

MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM:

Proteasome-mediated degradation of SMAC during apoptosis: XIAP promotes SMAC ubiquitination in vitro
J Biol Chem (2002; Sep 27), 277(39): 36611-6

Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rossler K, Ofner D, Budka H:

Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes
Neuropathol Appl Neurobiol (1997; Dec), 23(6): 496-506

Majno G, Joris I:

Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death.

Am J Pathol (1995, Jan), 146(1): 3-15

Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A:

Caspase-2 is localized at the golgi-complex and cleaves golgin-160 during apoptosis

J Cell Biol (2000; May 1), 149(3): 603-12

Marsden D et al.:

Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/Caspase-9 apoptosome

Nature (2002; Oct 10), 419(6907): 634-7

Martin SJ (edt.):

Apoptosis and Cancer

Apoptosis and cancer, Karger Landes Systems, Basel (1997): 9-10

Martin SJ and Green DR:

Protease activity during apoptosis: death by a thousand cuts?

Cell (1995; Aug 11), 82(3): 349-52

Martin SJ et al.:

Reditribution of plasma membrane phospholipids is an early and widespread event during apoptosis: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl

J Exp Med (1995), 182: 1545-56

Maruno M, Kovach JS, Kelly PJ, Yanagihara T:

Distribution of endogenous tumor necrosis factor alpha in gliomas

J Clin Pathol (1997; Jul), 50(7): 559-62

Mateo V et al.:

CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leucemia

Nature Med (1999), 5: 1277-84

Matsubara K et al.:

Different mode of cell death induced by calcium ionophore in human leukemia cell lines: possible role of constitutive endonuclease

Exp Cell Res (1994), 210: 19-25

Matyja E, Taraszewska A, Marszalek P:

Necrosis and apoptosis of tumor cells in embolized meningiomas: histopathology and p53, Bcl-2, CD68 immunohistochemistry

Folia Neuropathol (1999), 37(2): 93-8

Matysiak M, Jurewicz A, Jaskolski D, Selmaj K:

TRAIL induces death of human oligodendrocytes isolated from adult brain

Brain (2002; Nov), 125(Pt 11): 2469-80

McCarthy NJ, Whyte MKB, Gilbert CS, Evan GI:

Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage or the Bcl-2 homologue Bak

J Cell Biol (1997), 136: 215-227

- McNeish IA, Bell S, McKay T, Tenev T, Marani M, Lemoine NR:
Expression of SMAC/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway
Exp Cell Res (2003; Jun 10), 286(2): 186-98
- Melino G, Catani MV, Corazzari M, Guerrieri P, Bernassola F:
Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch it into necrosis
Cell Mol Life Sci (2000; Apr), 57(4): 612-22
- Meller R, Skradski SL, Simon RP, Henshall DC:
Expression, proteolysis and activation of caspases-6 and -7 during rat C6 glioma cell apoptosis
Neurosci Lett (2002; May 10), 324(1): 33-6
- Mevorach D:
Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance
Clin Rev Allergy Immunol (2003; Aug), 25(1): 49-60
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y:
An endoplasmatic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12
J Biol Chem (2002; Sep 13), 277(37): 34287-94
- Nagata S:
Apoptosis by death factor
Cell (1997; Feb 7), 88: 355-65
- Nakamizo A et al.:
Enhanced apoptosis in pilocytic astrocytoma: a comparative study of apoptosis and proliferation in astrocytic tumors
J Neurooncol (2002; Apr), 57(2): 105-14
- Nakamura M, Rieger J, Weler M, Kim J, Kleihues P, Ohgaki H:
Apo2L/ TRAIL expression in human brain tumors
Acta Neuropathol (2000; Jan Berl), 99(1): 1-6
- Nakasu S, Nakajima M, Nakazawa T, Nakasu Y, Handa J:
Alteration of bcl-2 and bax expression in embolized meningiomas
Brain Tumor Pathol (1998), 15(1): 13-7
- Nakayama M et al.:
Fas/ Fas ligand interaction play an essential role in the initiation of murine autoimmune diabetes
Diabetes (2002; May), 51(5): 1391-7
- Nam DH, Wang KC, Kim YM, Chi JG, Kim SK, Cho BK:
The effect of isochromosome 17q presence, proliferative and apoptotic indices, expression of c-erbB-2, bcl-2, and p53 proteins on the prognosis of medulloblastoma
J Korean Med Sci (2000; Aug), 15(4): 452-6
- Narita Y, Asai A, Kuchino Y, Kirino T:
Actinomycin D and Staurosporine, potent apoptosis inducers in vitro, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme
Cancer Chemother Pharmacol (2000), 45(2): 149-52

Naumann U, Waltereit R, Schulz JB, Weller M:
Adenoviral (full length) Apo2L/TRAIL gene transfer is an ineffective treatment strategy for malignant glioma
J Neurooncol (2003; Jan), 61(1): 7-15

Ng HK, Chen L:
Apoptosis is associated with atypical or malignant change in meningiomas. An in situ labelling and immunohistochemical study
Histopathology (1998; Jul), 33(1): 64-70

Nicholson DW et al.:
Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis
Nature (1995, Jul 6), 376(6535): 37-43

Niedermayer I, Kolles H, Zang KD, Feiden W:
Characterization of intermediate type (WHO "atypical") meningiomas
Clin Neuropathol (1996; Nov-Dec), 15(6): 330-6

O'Reilly LA, Strasser A:
Apoptosis and autoimmune disease
Inflamm Res (1999; Jan), 48(1): 5-21

Ogasawara J et al.:
Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice
Nature (1993; Aug 26) 364(6440): 806-9; Erratum in: Nature (1993; Oct 7), 365(6446): 568

Okada H et al.:
Generation and characterization of SMAC/DIABLO-deficient mice
Mol Cell Biol (2002; May), 22(10): 3509-17

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G:
Poly(ADP-ribose)polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis and disease
Am J Hum Genet (1999; May), 64(5): 1282-8

Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD:
Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib
Cancer Lett (2002; Jun 6), 180(1): 13-21

Pfeffer J, Schroeder M: Buch
Neuropathologie
Neuropathologie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1995): 13-14

Pfeiffer J, Schroeder JM, Paulus W:
Neuropathologie
Neuropathologie, Springer Verlag, 3. Aufl. (2002): 353-55

Pistritto G et al.:
Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia
Cell Death Differ (2002, Sep), 9(9): 995-1006

Pollack IF, Erff M, Ashkenazi A:

Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing in glioma cells

Clin Cancer Res (2001; May), 7(5): 1362-9

Prayson RA:

Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry

Ann Diagn Pathol (1999; Feb), 3(1): 11-8

Puig B, Tortosa A, Ferrer I:

Cleaved caspase-3, caspase-7 and poly (ADP-ribose) polymerase are complementarily but differentially expressed in human medulloblastomas

Neurosci Lett (2001; Jun 22), 306(1-2): 85-8

Qi H, Chen HZ, Jin ZJ:

Caspase-3 gene expression and [Ca²⁺]_i homeostasis underlying desipramine-induced C6 glioma cell apoptosis

Acta Pharmacol Sin (2002; Sep), 23(9): 803-7

Ramachandran C et al.:

Molecular studies in pediatric medulloblastomas

Brain Tumor Pathol (2002), 19(1): 15-22

Ray SK, Patel SJ, Welsh CT, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL:

Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3

J Neurosci Res (2002; Jul 15), 69(2): 197-206

Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R:

Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis

Neurosurgery (2002; Jul), 51(1): 2-13

Read SH, Baliga BC, Ekert PG, Vaux DL, Kumar S:

A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex

J Cell Biol (2002; Dec 9), 159(5): 739-45

Reed JC:

Mechanisms of bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease

Behring Inst Mitt (1996, Oct), 97: 72-100

Renehan AG, Bach SP, Potten CS:

The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine

Can J Gastroenterol (2001; Mar), 15(3): 166-76

Rieger J, Ohgaki H, Kleihues P, Weller M:

Human astrocytic brain tumors express Apo2L/TRAIL

Acta Neuropathol (1999; Jan; Berl), 97(1): 1-4

Ritter AM, Hess KR, McLendon RE, Langford LA:

Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival

J Neurooncol (1998; Oct), 40(1): 51-7

- Rittierodt M, Tschernig T, Samii M, Walter GF, Stan AC:
Evidence of recurrent atypical meningioma with rhabdoid transformation and expression of pyrogenic cytokines in a child presenting with a marked acute-phase response: case report and review of the literature
J Neuroimmunol (2001; Nov), 120(1-2): 129-37
- Robertson AMG, Thomson JN:
Morphology of programmed cell death in the ventral nerve chord of *Caenorhabditis elegans* larvae
J Embryol Exp Morphol (1982), 67: 89-100
- Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orenius S:
Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis
J Biol Chem (2002; Aug 16), 277(33): 29803-9
- Robles R et al.:
Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary
Endocrinology (1999), 140(6): 2641-44
- Roggendorf W, Schuster T, Peiffer J:
Proliferative potential of meningiomas determined with the monoclonal antibody Ki-67
Acta Neuropathol (1987; Berl.), 73(4): 361-4
- Rohn TA et al.:
CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release
Oncogene (2001; Jul 12), 20(31): 4128-37
- Rorke B et al.:
Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system
Brain Pathol (1997; Apr), 7(2): 765-84
- Roth W et al.:
Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity
Biochem Biophys Res Commun (1999; Nov 19), 265(2): 479-83
- Rushing EJ, Brown DF, Hladik CL, Risser RC, Mickey BE, White CL 3rd:
Correlation of bcl-2, p53, and MIB-1 expression with ependymoma grade and subtype
Mod Pathol (1998; May), 11(5): 464-70
- Sandritter W, Thomas C:
Histopathologie
Histopathologie, Schattauer Verlag, 9. Aufl. (1983): 319
- Sarkar C, Pramanik P, Karak AK, Mukhopadhyay P, Sharma MC, Singh VP, Mehta VS:
Are childhood and adult medulloblastomas different? A comparative study of clinicopathological features, proliferation index and apoptotic index
J Neurooncol (2002; Aug), 59(1): 49-61
- Scaffidi C et al.:
Two CD 95 (APO-1/Fas) signaling pathways

EMBO J (1998, Mar 16), 17(6): 1675-87

Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chio A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A:
Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors
Neurosci Lett (1995; Aug 4), 195(2): 81-4

Schiffer D, Dutto A, Cavalla P, Bosone I, Chio A, Villani R, Bellotti C:
Prognostic factors in oligodendrogliomas
Can J Neurol Sci (1997(2); Nov), 24(4): 313-9

Schiffer D, Dutto A, Cavalla P, Chio A, Migheli A, Piva R:
Role of apoptosis in the prognosis of oligodendrogliomas
Neurochem Int (1997(1); Aug), 31(2): 245-50

Schiffer D, Ferracini R, Cavalla P:
Heterogeneity of apoptotic pathways and c.Jun/JNK expression in malignant gliomas
Anticancer Res (2001; Jul-Aug), 21(4A): 2531-5

Schiffer D, Fiano V, Chiado-Piat L, Mortara P, Richiardi P, Cavalla P:
Distribution of activated caspase-3 in relation with apoptosis in human malignant gliomas
Neurosci Lett (2001; Mar 2), 300(1): 37-40

Schiffer D, Giordana MT:
Prognosis of ependymoma
Childs Nerv Syst (1998; Aug), 14(8): 357-61

Schneider C, Matsumoto Y, Kohyama K, Toyka KV, Hartung HP, Gold R:
Experimental autoimmune myositis in the lewis rat: lack of spontaneous T-cell apoptosis and therapeutic response to glucocorticosteroid application
J Neuroimmunol (2000; Jul 10), 107(1): 83-7

Schouten van Meeteren AY et al.:
Features of proliferation and in vitro drug resistance in central primitive neuro-ectodermal tumors
Neuropathol Appl Neurobiol (2002; Jun), 28(3): 200-9

Schroder R, Ploner C, Ernestus RI:
The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 labelling index and mitotic index
Neurosurg Rev (1993), 16(2): 145-50

Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne MA:
Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?
Proc Natl Acad Sci USA (1993, Feb 1), 90(3): 980-84

Scurlock B, Dawson G:
Differential responses of oligodendrocytes to tumor necrosis factor and other pro-apoptotic agents: role of ceramide in apoptosis
J Neurosci Res (1999; Feb 15), 55(4): 514-22

Server AC, Mobley WC:
Neuronal cell death and the role of apoptosis. Apoptosis: the molecular basis of cell death

Edited by LD Tomei and FO Cope; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1991): 263-78

Shinoura N, Muramatsu Y, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H:
Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U-373MG glioma cells
Exp Cell Res (2000; May 1), 256(2): 423-33

Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H:
Over-expression of APAF-1 and caspase-9 augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells
Int J Cancer (2001; Jul 15), 93(2): 252-61

Slee EA et al.:
Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10
in a caspase-9-dependent manner
J Cell Biol (1999; Jan 25), 144(2): 281-92

Song K et al.:
Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation
and cell cycle progression
J Exp Med (2000; Apr 3), 191(7): 1095-104

Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE:
An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death
Proc Natl Acad Sci USA (2000), 97: 14376-438

Srinivasula SM et al:
Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits
J Biol Chem (1998; Apr 24), 273(17): 10107-11

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES:
Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway – the Fas/Apo-1 protease Mch5 is a Crma-inhibitable protease
that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases
Proc Nat Acad Sci USA (1996), 93: 14486-91

Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF:
Quantitative study of microvessel ultrastructure in human peritumoral brain tissue. Evidence for a blood-brain
barrier defect
J Neurosurg (1987; Nov), 67(5): 697-705

Szekessy DP, Stoltenburg-Didinger G:
Differentiation, proliferation and apoptosis in primary and recurrent primitive neuroectodermal tumors of
childhood
Childs Nerv Syst (2001; May), 17(6): 320-7

Szekessy DP:
Morphologie, zelluläre Differenzierung, Proliferation und Apoptose bei PNET des ZNS
Diss, Berlin (2000): 10-11

Tachibana O, Lampe J, Kleihues P, Ohgaki H:
Preferential expression of Fas/APO1 (CD95) and apoptotic cell death in perinecrotic cells of glioblastoma
multiforme
Acta Neuropathol (Berl; 1996; Nov), 92(5): 431-4

- Takekawa Y, Sawada T, Sakurai I:
Expression of apoptosis and its related proteins in astrocytic tumors
Brain Tumor Pathol (1999), 16(1): 11-6
- Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S:
Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice penetrated with Propionibacterium acnes
J Immunol (1997; Mar 1), 158(5): 2303-9
- Tata JR:
Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture
Dev Biol (1966; Feb), 13(1): 77-94
- Teitz T et al.:
Caspase-9 and Apaf-1 are expressed and functionally active in human neuroblastoma cell tumor lines with 1p36 LOH and amplified MYCN
Oncogene (2002; Mar 14), 21(12): 1848-58
- Tews DS, Nissen A:
Expression of adhesion factors and degrading proteins in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors
Invasion Metastasis (1998/99), 18 (5-6): 271-84
- Tews DS:
Adhesive and invasive features in gliomas
Pathol Res Pract (2000), 196: 701-11
- Thornberry NA and Lazebnik Y:
Caspases: enemies within
Science (1998, Aug 28), 281(5381): 1312-16
- Thornberry NA and Molineaux SM:
Interleukin-1 β converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 β production and implicated cell death
Protein Sci (1995, Jan), 4(1): 3-12
- Thornberry NA et al.:
A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes
Nature (1992), 356: 768-74
- Thornberry NA:
Caspases: A decade of death research
Cell Death Differ. (1999), 6: 1023-27
- Tikoo A, O'Reilly L, Day CL, Verhagen AM, Pakusch M, Vaux DL:
Tissue distribution of DIABLO/SMAC revealed by monoclonal antibodies
Cell Death Differ (2002; Jul), 9(7): 710-6
- Tong CY, Ng HK, Pang JC, Hui AB, Ko HC, Lee JC:
Molecular genetic analysis of non-astrocytic gliomas
Histopathology (1999; Apr), 34(4): 331-41

- Torp SH, Lindboe CF, Granli US, Moen TM, Nordtomme T:
Comparative investigation of proliferation markers and their prognostic relevance in human meningiomas
Clin Neuropathol (2001; Sep-Oct), 20(5): 190-5
- Torriglia A et al.:
A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-Dnase II pathway
Ann NY Acad Sci (2000), 926: 192-203
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC:
The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis
Toxicol Pathol (1997 Jan-Feb), 25(1): 82-8
- Trump BF, Berezsky IK:
The role of altered [Ca²⁺]_i regulation in apoptosis, oncosis and necrosis
Biochim Biophys Acta (1996; Oct 11), 1313(3): 173-8
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W:
Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis
Anat Histol Embryol (2002; Aug), 31(4): 214-23
- Vaquero J, Zurita M, Coca S, Oya S:
Imbalance between apoptosis expression and proliferative index can predict survival in primary glioblastomas
Acta Neurochir (Wien) (2002; Feb), 144(2): 155-6
- Vaux DL, Strasser A:
The molecular biology of apoptosis
Proc Natl Acad Sci USA (1996, Mar), 93: 2239-44
- Vercammen D et al.:
Dual signaling of the Fas-receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways
J Exp Med (1998), 188: 919-930
- Verstegen MJ, Leenstra DT, Ijlst-Keizers H, Bosch DA:
Proliferation- and apoptosis-related proteins in intracranial ependymomas: an immunohistochemical analysis
J Neurooncol (2002; Jan), 56(1): 21-8
- Villa M and Przedborski S:
Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases
Nat Rev Neurosci (2003; May), 4(5): 365-75
- Virchow R:
Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology, ed. 2
Cellular pathologie as based upon physiological and pathological histology; translated from German by B
- Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P:
Apoptosis in caspase-inhibited neurons
Mol Med (2001), 7(1): 36-48
- Waltereit R, Weller M:
The role of caspases-9 and -9-short (9s) in death ligand- and drug-induced apoptosis in human astrocytoma

Brain Res Mol Brain Res (2002; Oct 15), 106(1-2): 42-9

Wandinger KP et al.:

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis

Lancet (2003; Jun 14), 361(9374): 2036-43

Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD:

The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis

Structure Fold Des (1999, Sep 15), 7(9): 1135-43

Webster JC et al.:

Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types

Endocrinology (2002; Oct), 143(19): 3866-74

Weigert C:

Ueber Croup und Diphtheritis: Ein experimenteller und anatomischer Beitrag zur Pathologie der specifischen Entzündungsformen

Virchows Arch Pathol Anat (1877-1878) 72: 461-501

Weigert C:

Kritische und ergaenzende Bemerkungen zur Lehre von der Coagulationsnekrose mit besonderer Beruecksichtigung der Hyalinbildung und der Umpraegung geronnener Massen

D Med Wochenschrift (1885), XI(45): 780-82

Wharton SB, Hamilton FA, Chan WK, Chan KK, Anderson JR:

Proliferation and cell death in oligodendrogliomas

Neuropathol Appl Neurobiol (1998; Feb), 24(1): 21-8

Whittle IR, Kelly PA:

Mechanisms of peritumoral brain dysfunction: metabolic and neuroreceptor findings in striatal C6 glioma

J Clin Neurosci (2001; Sep), 8(5): 430-4

Whittle IR, Macarthur DC, Malcolm GP, Li M, Washington K, Ironside JW:

Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line

tumors

J Neurooncol (1998; Feb), 36(3): 231-42

Whyte M:

Ice/Ced-3 proteases in apoptosis

Trends Cell Biol (1996), 6: 245-48

Wilson MR:

Apoptosis: unmasking the Executioner

Cell Death Differ (1998), 5: 646-52

Woodburn RT, Azzarelli B, Montebello JF, Goss IE:

Intense p53 staining is a valuable prognostic indicator for poor prognosis in medulloblastoma/ central nervous system primitive neuroectodermal tumors

J Neurooncol (2001; Mar), 52(1): 57-62

Wu M, Das A, Tan Y, Zhu C, Cui T, Wong MC:
Induction of apoptosis in glioma cell lines by TRAIL/Apo-2l
J Neurosci Res (2000; Aug 15), 61(4): 464-70

Wyllie AH, Goldstein P:
More than one way to go
Proc Natl Acad Sci USA (2001), 98: 11-13

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR:
The significance of apoptosis
Int. Rev. Cytol. (1980), 68: 251-306

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D:
Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on
makromolekular synthesis
J. Pathol. (1984), 142: 67-77

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ:
Bax-induced cell death may not require interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases
Proc Natl Acad Sci USA (1996; Dec 10), 93(25): 14559-63

Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrist BA:
Binding of β -Amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for
Alzheimer's disease
J Clin Invest (1997; Nov 1), 100(9): 2333-40

Yasugi E, Nakata K, Yokoyama Y, Kano K, Dohi T, Oshima M:
Dihydroheptaprenyl and dihydrodecaprenyl monophosphates induce apoptosis mediated by activation of
caspase-3-like proteases
Biochim Biophys Acta (1998; Jan 15), 1389(2): 132-40

Yin D, Kondo S, Barnett GH, Morimura T, Takeushi J:
Tumor necrosis factor-alpha induces p53-dependent apoptosis in rat glioma cells
Neurosurgery (1995; Oct), 37(4): 758-3

Yoo NJ et al.:
Immunohistochemical analysis of SMAC/DIABLO in human carcinomas and sarcomas
APMIS (2003; Mar), 111(3): 382-8

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR:
The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β converting enzyme
Cell (1993), 75: 641-52

Yuan Q, Li R, Zhang G, Yang H, Chen H:
Apoptosis and necrosis of neuron after focal ischemia in brain of rats
Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao (1999, Dec), 30(4): 401-4, 409

Zagzag D et al.:
Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth

and angiogenesis

Lab Invest (2000; Jun), 80(6): 837-49

Zech B:

Stickstoffmonoxid-induzierte Modifikation von Caspase3 und deren Bedeutung während des programmierten Zelltodes

Erlangen, Nuernberg, Univ, Diss. (2000): 14-15

Zech B:

Stickstoffmonoxid-induzierte Modifikation von Caspase-3 und deren Bedeutung während des programmierten Zelltodes

Erlangen, Nuernberg, Univ, Diss, (2000): 10-11

Zeltzer PM, Bodey B, Marlin A, Kemshead J:

Immunophenotype profile of childhood medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors using 16 monoclonal antibodies

Cancer (1990; Jul 15), 66(2): 273-83

Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T, Hersey P:

Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting SMAC/DIABLO release from the mitochondria

Oncogene (2003; May 15), 22(19): 2869-81

Zhivotovsky BD, Zvonareva NB, Hanson KP:

Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body x-irradiation

Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med (1981), 39(4): 437-40

Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, Phillips PC, Egget A, Grotzer MA:

Loss of Caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumor/medulloblastoma

Eur J Cancer (2002; Jan), 38(1): 83-91

9 Erklärung, Lebenslauf, Publikationen

9.1 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

“Zur Charakterisierung von nekrotischem und apoptotischem Zelltod bei Tumoren des zentralen Nervensystems“

im Neurologischen Institut (Edinger-Institut) unter Betreuung und Anleitung von Frau PD Dr. med. Dominique S. Tews mit Unterstützung durch Frau Henkes, Frau Makas und Frau Rech (MTAs) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt am Main, 10.11.2004

.....

(Wera Behrhof)

9.2 Lebenslauf

Name: Wera Behrhof
Geburtsdatum: 06.02.1979
Geburtsort: Frankfurt am Main
Adresse: Jugenheimerstraße 65, 60528 Frankfurt am Main

Grundschule: 1986-1989 Beethovenschule Offenbach
Gymnasium: 1989-1998 Leibnizgymnasium Offenbach
Studium: 10/1998-05/2005 (vorauss.) Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main,
Fachbereich Medizin
10/2000-02/2004 Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main, Fachbereiche
Skandinavistik und Philosophie

ärztliche Vorprüfung: 08/2000
erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 08/2001
zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 04/2004
Praktisches Jahr: 04/2004-05/2005 (vorauss.) am Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
am Main

9.3 Publikationen

Expression of the anti-apoptotic factor survivin in brain tumors – its inhibition as a potential therapeutic target

W Behrhof, DS Tews

Posterbeitrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie; Oktober 2003 in Berlin

in: Acta Neuropathologica, 106/4 (2003), S. 405

Expression patterns of initiator and effector caspases in denervated human skeletal muscle

DS Tews, W Behrhof, S Schindler

in: Muscle and Nerve; der Artikel ist zur Publikation angenommen