

**Aus dem Institut für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. R. Meyermann**

**Expression der Caspase-unabhängigen Apoptosefaktoren  
Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) und Endonuklease G im Vergleich zu  
aktivierter Caspase-3 in humanen Astrozytomen  
unterschiedlichen WHO-Grads und deren Assoziation mit dem  
Überleben**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Hajo Herzog  
aus  
Ludwigsburg**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. P. Steinbach



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Gliazellen des ZNS .....	1
1.2. Epidemiologie von Astrozytomen .....	2
1.3. Ätiologie von Astrozytomen.....	2
1.4. Klassifikation von Astrozytomen.....	4
1.4.1. WHO-Grad I: pilozytisches Astrozytom.....	5
1.4.2. WHO-Grad II: diffuses Astrozytom.....	6
1.4.3. WHO-Grad III: anaplastisches Astrozytom .....	7
1.4.4. WHO-Grad IV: Glioblastom .....	7
1.5. Aktuelle therapeutische Konzepte .....	9
1.6. Apoptose .....	10
1.7. Caspasen .....	11
1.8. Rolle der Mitochondrien in der Apoptose .....	15
1.9. Vorstellung der mitochondrialen Apoptosefaktoren.....	17
1.9.1. Der Caspasen-unabhängige Weg der Apoptose .....	17
1.9.2. Apoptosis-Inducing-Factor (AIF).....	18
1.9.3. Endonuklease G (Endo G).....	19
1.10. Fragestellung.....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1. Definition und Auswahl der Gewebeprobe.....	21
2.1.1. Herstellung histologischer Präparate .....	21
2.2. Tissue Microarrays.....	22
2.3. Immunhistochemie.....	24
2.3.1. Allgemeines .....	24
2.3.2. Antikörper.....	25
2.3.3. Durchführung der IHC.....	26
2.4. Lichtmikroskopische Auswertung .....	27

2.5.	Erfassung der Überlebensdaten.....	28
2.6.	Statistische Auswertung.....	29
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
3.1.	Auswertung der Zellzahl.....	30
3.1.1.	Zelldichte in Astrozytomen .....	30
3.1.2.	Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone .....	31
3.1.3.	Zelldichte bei Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor .....	32
3.2.	Expression der Apoptosefaktoren .....	33
3.2.1.	Allgemeine Expression von AIF in Astrozytomen und Normalhirn.....	33
3.2.2.	Allgemeine Expression von Endonuklease G in Astrozytomen und Normalhirn .....	36
3.2.3.	Allgemeine Expression von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen und Normalhirn .....	39
3.2.4.	AIF-Expression in der Infiltrationszone von Glioblastomen .....	42
3.2.5.	Endo G-Expression in der Infiltrationszone von Glioblastomen.....	43
3.2.6.	Expression von aktivierter Caspase-3 in der Infiltrationszone von Glioblastomen.....	44
3.2.7.	AIF-Expression in Glioblastom-Rezidiven .....	46
3.2.8.	Endo G-Expression in Glioblastom-Rezidiven .....	46
3.2.9.	Expression von aktivierter Caspase-3 in Glioblastom-Rezidiven.....	47
3.2.10.	Vergleich der AIF-, Endo G- und aktivierte Caspase-3-Expression über die WHO-Grade I-IV .....	48
3.2.11.	Fallweise Korrelation der Antikörper.....	51
3.2.12.	Korrelation der Expression mit der Zelldichte .....	53
3.2.13.	Korrelation der Proteinexpression mit dem Patientenalter.....	55
3.3.	Kaplan-Meier-Analyse.....	56
3.3.1.	Assoziation von Proteinexpression mit der Überlebenszeit .....	56
3.3.2.	Kaplan-Meier-Analyse für AIF, Endo G und aktivierte Caspase-3 in WHO-Grad II-IV Tumoren.....	57
3.3.3.	Der Einfluss des Alters auf das Überleben.....	61

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
4.1. Zelldichte in Astrozytomen.....	64
4.2. Expression der untersuchten Apoptosefaktoren in Astrozytomen und in Normalhirn .....	65
4.2.1. Expression von AIF in Astrozytomen .....	67
4.2.2. Expression von Endo G in Astrozytomen .....	69
4.2.3. Expression von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen.....	72
4.3. Expression der Apoptosefaktoren in Normalhirn .....	74
4.4. Expression der Apoptosefaktoren in der Infiltrationszone von Glioblastomen .....	75
4.5. Expression der Apoptosefaktoren in Rezidivtumoren von primären Glioblastomen .....	76
4.6. Fallweise Korrelation der Antikörper .....	77
4.7. Korrelation der Expression mit der Zelldichte.....	79
4.8. Analysen mit dem Überleben.....	80
4.9. Schlussfolgerung und Ausblick .....	82
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>85</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>100</b>
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	100
7.2. Danksagung.....	102
7.3. Lebenslauf.....	103

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Gliazellen des ZNS**

Es werden vier verschiedene Gliazelltypen unterschieden: Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikrogliazellen. Oligodendrozyten bilden die Markscheiden der Axone und sind somit für die Weiterleitung der neuronalen Erregung wesentlich. Astrozyten besitzen das saure Gliafaserprotein (GFAP) und stellen die „Kittsubstanz“ des ZNS. Neuere Erkenntnisse über die Funktion der Astrozyten zeigen, dass sie in der Lage sind mit Neuronen zu kommunizieren. Sie können über Neurotransmitter, Ionenflüsse oder andere Signalmoleküle ein Aktionspotenzial auslösen oder Neurone inhibieren (Araque et al. 2001). Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Funktionalität des Gehirns. Sie können untereinander über Ionenflüsse kommunizieren und regulieren den zerebralen Blutfluss abhängig von der metabolischen Aktivität (Fields und Stevens-Graham 2002, Hatton 2002, Harder et al. 2002). Ependymzellen kleiden die Ventrikel von innen aus (Hirano und Matsui 1975) und Mikrogliazellen, die aus Monozyten hervorgehen, spielen für die Immunüberwachung des ZNS eine wesentliche Rolle (Kreutzberg 1996, Thomas 1992).

Unter Gliomen wird die Gruppe der Tumoren der Gliazellen zusammengefasst. Am häufigsten unter den Gliomen sind die Astrozytome, die aus maligne entarteten Zellen der astrozytären Reihe entstehen und in dieser Arbeit untersucht werden.

## 1.2. Epidemiologie von Astrozytomen

Hirneigene Tumoren machen ca. 2 % aller malignen Neoplasien des Menschen aus.

60 % der auftretenden hirneigenen Tumore sind Gliome, von denen die Astrozytome am häufigsten vorkommen.

Die Inzidenz der Astrozytome unterscheidet sich regional und wird durchschnittlich mit 5-7/100.000 Einwohner angegeben. In Europa, Nordamerika und Australien gibt es mehr Fälle als in Afrika oder Asien. Auch in mehrsprachigen Ländern ist das Auftreten bei Menschen kaukasischer Herkunft höher als bei Menschen mit Wurzeln in Afrika oder Asien (Davis et al. 1999, Kleihues und Cavanee 2000, Shugg et al. 1994, Velema und Walker 1987).

Astrozytome treten in einem Verhältnis von ungefähr 3:2 häufiger bei Männern auf.

## 1.3. Ätiologie von Astrozytomen

Die Ätiologie von Astrozytomen und auch Hirntumoren im Allgemeinen ist weitgehend unbekannt. Zahlreiche epidemiologische Studien untersuchten Zusammenhänge mit Umgebungs-, Ernährungs- und „Lifestyle“-Faktoren, die jedoch selten statistisch signifikant waren.

Folgende Faktoren sind in der Diskussion:

### 1. therapeutische Bestrahlung

Die Bestrahlung bei Kindern mit ALL führt zu einem erhöhten Risiko für Astrozytome und Glioblastome, speziell wenn die Kinder zum Zeitpunkt der Diagnose fünf Jahre oder jünger waren. Ebenso steigt das Risiko bei der Bestrahlung von Hypophysentumoren und anderen intrakraniellen Neoplasien.

### 2. elektromagnetische Felder

In älteren Studien zeigte sich nur ein schwacher Zusammenhang, der dann durch umfangreichere Untersuchungen an Arbeitern in Elektrizitätswerken nicht bestätigt wurden (Mack et al. 1991, Preston-Martin et al. 1989, Sahl et al. 1993).

Viel diskutiert wird im Moment die Rolle der elektromagnetischen Wellen von Mobiltelefonen und Mikrowellen. Für eine valide Aussage ist seit dem Beginn des flächendeckenden Gebrauchs der Geräte zu wenig Zeit vergangen. Neu publizierte

Studien verneinen eine Risikoerhöhung für die Entstehung von ZNS-Tumoren durch den Gebrauch von Mobiltelefonen (Hepworth et al. 2006, Muscat et al. 2006). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die eine Assoziation des Mobiltelefonierens mit dem Vorkommen von Astrozytomen unterstützen (Hardell et al. 2006).

### 3. Immunsuppression

Ein Zusammenhang konnte bisher bei AIDS- oder Transplantations-Patienten für die Entwicklung von primären ZNS-Lymphomen (B-Zell NHL) gezeigt werden, nicht jedoch für Astrozytome.

### 4. Nitratreiche Ernährung

Eine vermehrte nutritive Nitratzufuhr kann das Risiko für einen primären ZNS-Tumor erhöhen (Ahlbom et al. 1986, Burch et al. 1987). Nitratverbindungen werden nach der Aufnahme von Nitrat/Nitrit oder sekundären Aminen gebildet, die vor allem in geräuchertem Fleisch oder Fisch und in Wein vorkommen. Im Gegensatz dazu wurde ein protektiver Effekt von Obst, Gemüse und Vitamin C gezeigt. Diese hemmen die endogene Bildung von Nitratverbindungen (Burch et al. 1987, Preston-Martin et al. 1989).

### 5. Trauma

Durch traumatische Ereignisse kommt es im ZNS zu einer starken Proliferation der Astrozyten, was einen möglichen biologischen Zusammenhang mit der Entstehung von Astrozytomen darstellen könnte. Jedoch ist diese Hypothese in Studien nicht bestätigt worden.

### 6. Virusinfektionen

Gut erforscht ist das Simian-Virus 40 (SV-40). Dabei handelt es sich um ein DNA-Virus, das verschiedene Tumorsuppressoren wie p53 oder RB inaktiviert und menschliche Zellen *in vitro* transformiert.

Durch eine mit SV-40 kontaminierte Polio-Vakzine, die um 1950 in Nordamerika und Europa appliziert wurde, konnte seine Rolle genauer untersucht werden. SV-40-Sequenzen wurden bei 35 % der Hirntumoren in den betroffenen Gebieten gefunden, in Regionen ohne die Vakzine konnten die Viren nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Inzidenz von Hirntumoren war in den SV-40-Gebieten dagegen nicht zu beobachten. Dies spricht für eine vertikale Ausbreitung der Viren in menschlichen Populationen,

jedoch gegen eine kausale Beteiligung in der Tumorgenese. Eventuell begünstigt das intratumorale Milieu die Virusreplikation, was das vermehrte Auftreten erklären kann.

#### 7. Endogene DNA-Mutationen

In Astrozytomen kommen Mutationen des TP53-Gens häufig vor, meist in einer hoch konservierten Region. Das Muster der Mutation ist denen von kolorektalen Karzinomen, Sarkomen und Lymphomen ähnlich, unterscheidet sich jedoch beispielsweise von denen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des hepatozellulären Karzinoms.

Die Mutationen, die aus G:C→A:T-Transitionen bestehen, werden als endogen angesehen. Karzinogene Umwelteinflüsse werden als nicht ursächlich betrachtet. Es ist jedoch keine spezifische Mutation für Astrozytome bekannt. (Übersichtsartikel Lantos et al. 2002, Wrensch et al. 1993)

### **1.4. Klassifikation von Astrozytomen**

Die heute gebräuchliche WHO-Klassifikation benennt die Tumoren nach ihren Ursprungszellen. Histologie und Zytologie werden mittels Lichtmikroskop, konventionellen Färbemethoden und Immunhistochemie zugeordnet. Als Zusatzmethode steht die Elektronenmikroskopie zur Verfügung.

Nach der WHO-Klassifikation werden Astrozytome in vier Grade eingeteilt. Während WHO-Grad I und II Tumore eine eher günstige Prognose mit mittleren Überlebenszeiten von über zehn, bzw. sechs Jahren aufweisen, sind Astrozytome der WHO-Grade III und IV nahezu therapierefraktär. Im Falle des Glioblastoms WHO-Grad IV tritt der Tod durchschnittlich innerhalb circa eines Jahres ein (Kleihues und Cavanee 2000, Maldaun et al. 2004).

### 1.4.1. WHO-Grad I: pilozytisches Astrozytom

Das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I ist ein langsam wachsender astrozytärer Tumor, der vorwiegend bei jungen Menschen auftritt und bevorzugt in den Mittellinienstrukturen des Gehirns lokalisiert ist. Es weist im Gegensatz zu den Tumoren der WHO-Grade II und III nahezu keine Progressionstendenz zu einem höher malignen Astrozytom auf. Ferner ist in pilozytischen Astrozytomen keine TP53-Mutation (Ohgaki et al. 1993), sondern gelegentlich eine Mutation des NF-1-Gens nachweisbar (von Deimling et al. 1993). Eine Sonderform bildet das Optikusgliom, das häufig mit einer Neurofibromatose Typ I assoziiert ist.

Das pilozytische Astrozytom ist ein „Tumor des Kindes- und Jugendalters“. Es tritt bevorzugt in den ersten beiden Lebensdekaden auf mit einem Inzidenzmaximum zwischen dem achten und 13. Lebensjahr. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen (Kleihues und Cavanee 2000, Lantos et al. 2002).

Am häufigsten sind beim WHO-Grad I Tumor der Hirnstamm (McGirr et al. 1987), das Kleinhirn (Hayostek et al. 1993), der Nervus opticus (Hoyt und Baghdassarian 1969) und seltener das Rückenmark betroffen. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 96 % (Ohgaki und Kleihues 2005a), wobei die Prognose entscheidend von der Lokalisation beeinflusst wird und für Tumoren im Hirnstamm am schlechtesten ist.

Pilozytische Astrozytome sind oft scharf vom umliegenden Gewebe abgegrenzt. Makroskopisch sieht man häufig eine mukoide Degeneration des Tumorgewebes, welche vor allem bei Tumoren im Kleinhirn zu einer typischen Zystenbildung führt (Ilgren und Stiller 1987). Mikroskopisch weisen die Tumorzellen vielfach längliche Kerne und ein eosinophiles Zytoplasma mit bipolaren „haarartigen“ Fortsätzen auf (griech.: pilos = Haar). Charakteristisch ist das Auftreten von intrazellulären, eosinophilen wurmförmigen Rosenthal-Fasern, die degenerativ veränderte Astrozytenfortsätze darstellen. Die zu beobachtenden Kernpleomorphien und Gefäßproliferate sind beim pilozytischen Astrozytom im Gegensatz zu den höhergradigen Gliomen kein Hinweis auf Malignität. Immunhistochemisch lässt sich häufig GFAP (glial fibrillary acid protein) nachweisen, eine maligne Progression der WHO-Grad I Tumore ist sehr selten (Kleihues et Cavanee 2000).

### 1.4.2. WHO-Grad II: diffuses Astrozytom

Das diffuse Astrozytom vom WHO-Grad II hat seinen Inzidenzgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr, kann aber prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. Die mittlere Überlebensdauer beträgt nach Operation sechs bis acht Jahre, allerdings mit erheblicher individueller Streuung. Der Tumor kommt etwas häufiger beim männlichen Geschlecht vor (M:F = 1,2:1). Die Tumore zeichnen sich durch eine diffuse, breite Infiltrationszone aus. Eine komplette Resektion ist aufgrund dieser Infiltration meist nicht möglich, weshalb fast alle Astrozytome vom WHO-Grad II rezidivieren (Kleihues und Cavane 2000, Lantos et al. 2002).

Makroskopisch erscheint das Tumorgewebe diffus aufgetrieben und eventuell zystisch verändert. In der Histologie wird das am häufigsten vorkommende fibrilläre Astrozytom vom gemistozytären und vom recht seltenen protoplasmatischen Astrozytom unterschieden. Allen gemeinsam ist eine nur mäßig hohe Zelldichte bei geringer Kernpleomorphie. Mitosefiguren werden in der Regel nicht beobachtet. Mikrovaskuläre Prolifere und Nekrosen treten im Gegensatz zu den höhergradigen Astrozytomen nicht auf. Auch das diffuse Astrozytom vom WHO-Grad II exprimiert als Tumor der astrozytären Reihe GFAP (Kleihues und Cavane 2000).

Im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom ist eine Progression zu einem höhergradigen Astrozytom häufig zu beobachten. Hierbei neigen diffuse Astrozytome vom gemistozytären Typ dazu, früher zu rezidivieren und eine mögliche Tumorprogression zu durchlaufen als Tumore vom fibrillären Subtyp (Schiffer et al. 1988). Molekulargenetisch weisen über 60 % aller WHO-Grad II Astrozytome Mutationen im TP53-Gen auf (Watanabe et al. 1997), das entscheidend an der Regulation und Auslösung von Zellzyklus und Zelltod beteiligt ist und in maligne transformierten Zellen häufig in mutierter Form vorkommt (Kastan et al. 1995).

### 1.4.3. WHO-Grad III: anaplastisches Astrozytom

Die anaplastischen Astrozytome treten am häufigsten zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf und liegen damit auch hinsichtlich ihres Inzidenzgipfels zwischen dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) und dem Glioblastom (WHO-Grad IV). Männer sind häufiger betroffen (M:F = 1,8:1). Die mittlere Überlebensdauer beträgt 1,6 Jahre (Ohgaki und Kleihues 2005a), wobei die Prognose abhängig ist von der möglichen Progression zum Glioblastom und von dem Vorhandensein einer oligodendroglialen Komponente, welche sich im Gegensatz zur malignen Progression günstig auf die Prognose auswirkt.

Makroskopisch zeigt das anaplastische Astrozytom ebenfalls eine diffuse Infiltration. Im Gegensatz zum diffusen Astrozytom sind Zelldichte und Kernpleomorphie erhöht. Zusätzlich zeigen sich im histologischen Bild abnormale Mitosefiguren und aufgestellte Endothelien. Nekrosen kommen beim WHO-Grad III Tumor in der Regel nicht vor. Falls sie gefunden werden, sind sie niemals strichförmig, sondern eher flächig.

Die GFAP-Expression ist auch in anaplastischen Astrozytomen ein beständiges Merkmal des Tumors, nicht jedoch in jeder Zelle vorhanden (Kleihues und Cavane 2000). Die Proliferationsrate der Tumorzellen, ermittelt mit dem Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1, bewegt sich im Bereich von 5-10 % (Jaros et al. 1992, Karamitopoulou et al. 1994).

Molekulargenetisch weisen über 70 % der anaplastischen Astrozytome eine Mutation im TP53 Gen auf (Watanabe et al. 1997). Es neigt dazu, sich zum Glioblastom weiter zu entwickeln. (Kleihues und Cavane 2000)

### 1.4.4. WHO-Grad IV: Glioblastom

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste Hirntumor. 50-60 % aller Astrozytome sind Glioblastome. Das Inzidenzmaximum liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr, es kann jedoch prinzipiell in jedem Alter auftreten. Männer sind etwas häufiger betroffen (M:F = 1,5:1) (Kleihues und Cavane 2000). Mehr als 50 % der Patienten versterben innerhalb der ersten fünf Monate nach Diagnosestellung (Ohgaki

und Kleihues 2005a). Trotz adjuvanter Radiochemotherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei weniger als 3 % (Ohgaki und Kleihues 2005b).

Glioblastome sind bevorzugt im Marklager des Temporal-, Parietal- und Frontallappens lokalisiert, wobei sie sich häufig schmetterlingsförmig („Schmetterlingsgliom“) über den Balken auf die Gegenseite ausdehnen. Insgesamt findet sich bei 7,5% aller Gliome ein multizentrisches Wachstum (Barnard und Geddes 1987). Das Glioblastom tritt entweder als primäres Glioblastom „de novo“ auf oder es ist aus einem niedriggradigeren Astrozytom (Progression der WHO Grad II und III Tumore) entstanden (sekundäres Glioblastom). Primäre Glioblastome machen dabei 95% aller Glioblastome aus (Ohgaki und Kleihues 2005a).

Makroskopisch sind die Glioblastome durch ihre ausgeprägte bunte Schnittfläche gekennzeichnet, was sich in der 1926 von Bailey und Cushing eingeführten Bezeichnung „Glioblastoma multiforme“ widerspiegelt. Das Bild der bunten Schnittfläche setzt sich aus gelben Nekrosearealen und rotbraunen Tumorblutungen zusammen.

Histologisch sind charakteristische Malignitätskriterien zu erkennen: ausgeprägte Kern- und Zellpolymorphien, erhöhte Mitose- und Proliferationsrate, strichförmige Nekrosen mit Pallisadenstellung von Tumorzellen im Randbereich und Gefäßproliferate, die sich in Form von glomerulusartigen Gefäßknäueln darstellen. Diese Tumorgefäße weisen große Schwankungen in Durchmesser und Form auf, sind gelegentlich thrombosiert und von Blutungsresiduen umgeben (Kleihues und Cavanee 2000).

Glioblastome exprimieren normalerweise wie andere astrozytäre Tumoren GFAP. Die Proliferationsrate der Tumorzellen zeigt regionale Schwankungen und liegt insgesamt bei einem hohen Mittelwert von 15-20 % (Jaros et al. 1992, Karamitopoulou et al. 1994). In seltenen Fällen können sich Glioblastomzellen über den zerebrospinalen Fluss verteilen (leptomeningeale Gliomatose) (Giordana et al. 1995).

Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (Keimbahnmutation in TP53) erkranken vermehrt an Glioblastomen. TP-53-Mutationen kommen bei sekundären (65 %) häufiger vor als bei „de novo“- Glioblastomen (31 %) (Ohgaki und Kleihues 2005a).

### 1.5. Aktuelle therapeutische Konzepte

Eine möglichst komplette Resektion des Tumorgewebes ist immer anzustreben. Dies ist jedoch meist nur bei pilozytischen Astrozytomen möglich, da WHO Grad II-IV Astrozytome aufgrund ihres diffusen Wachstumsmusters fast nie „in toto“ reseziert werden können. Bei diffusen Astrozytomen WHO-Grad II kommt eine adjuvante Radiotherapie eher seltener fakultativ, bei Tumoren vom WHO-Grad III und IV hingegen standardmäßig zum Einsatz. Pilozytische Astrozytome WHO-Grad I werden nur bestrahlt, wenn ein progredienter, inoperabler Tumorrest nachzuweisen ist (Stieber 2001, Weller et al. 2006).

Die adjuvante Radiotherapie erfolgt unter dem Schutz von Kortikosteroiden, um einer möglichen Erhöhung des Hirndrucks vorzubeugen. Zusätzlich war in den letzten Jahren eine adjuvante nitrosoharnstoffhaltige Polychemotherapie mit Procarbazin, CCNU und Vincristin (PCV-Protokoll) oder eine Monotherapie mit Nitrosoharnstoffen für maligne Gliome WHO-Grad III und IV im Fokus (Weller et al. 2006). Eine große Metaanalyse signalisierte einen geringen Nutzen der zusätzlichen Chemotherapie (Stewart 2002). Rezidive sollten aufgrund der Progressionstendenz mit dem maximalen Therapieregime angegangen werden, das heißt falls möglich Resektion, Radio- und Chemotherapie.

Den neuesten chemotherapeutischen Ansatz für Glioblastome ermöglicht Temozolomid, eine alkylierende Substanz. Es konnte gezeigt werden, dass Temozolomid zusätzlich zur Radiotherapie das Überleben der Patienten um durchschnittlich 2,5 Monate verlängert (Stupp et al. 2005).

Viele aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit neuen medikamentösen Therapiemöglichkeiten von primären ZNS-Tumoren, wobei deren zytotoxische Wirksamkeit durch die Stimulation der apoptotischen Signalkaskaden überprüft wird. Dabei werden sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Mechanismen des Zelltods erfasst, bei deren voller Wirksamkeit eine effektivere zytotoxische Therapie und weniger Resistenzmechanismen der Tumorzellen erhofft werden können (Fulda et al. 1999, Nomura et al. 2004, Temme et al. 2005, Trejo-Solis et al. 2005).

## 1.6. Apoptose

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein Selbstmordmechanismus der Zelle, der nach einem genetischen Programm festgelegt und unter Energieverbrauch selbst reguliert abläuft (Bredesen 1996, Denk 1997). Sie wird durch die Bildung „letaler“ Proteine durch die Zelle selbst oder von der Umgebung (Stressreize) induziert (Junqueira und Carneiro 1996a). Die morphologischen Veränderungen in der Zelle wurden erstmals 1972 von Kerr et al. beschrieben und damit wurde die Apoptose als eigenständiges physiologisches Phänomen im Organismus erkannt (Kerr et al. 1972). Während der Apoptose kommt es zu Zellschrumpfung mit Kontaktverlust zur Nachbarzelle, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation, Kollabieren des Zytoskeletts, charakteristischem Schwellen des endoplasmatischen Retikulums und letztlich zum Abschnüren von apoptotischen Körperchen, die dann von Makrophagen phagozytiert werden (Arends et al. 1991). Dadurch läuft die Apoptose ohne Entzündungsreaktion ab (Denk 1997).

Die Apoptose ist von unerlässlicher Wichtigkeit bei der prä- und postnatalen Entwicklung, der Zellreifung und Zelldifferenzierung sowie der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Dies erfordert eine optimale Abstimmung von Zellproliferation und Zelltod im Organismus (Xerri et al. 1997). Beispiele für die Beteiligung der Apoptose an physiologischen Vorgängen sind die Embryonalentwicklung, die Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten während der Ausbildung des Immunsystems, die Involution des Thymus und die ständige Erneuerung von Organsystemen wie der Schleimhaut des Verdauungstrakts (Hale et al. 1996, Denk 1997).

Auslöser der Apoptose auf molekularer Ebene sind Todesliganden, die an Todesrezeptoren binden. Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind TNF-alpha (→ TNF-alpha-Rezeptor), TRAIL (→ DR-4 und DR-5) und FasLigand (→ Fas/CD95), die den extrinsischen Signalweg der Apoptose mit einer direkten Caspasenaktivierung auslösen (Nagata 1997, Pan et al. 1997, Smith et al. 1994, Walczak et al. 1997). Verschiedene Stressreize, die auf die Zelle einwirken können, führen ebenfalls in die Apoptose. Hiervon zu erwähnen sind DNA-Schädigungen durch ionisierende Strahlen, Zytostatika oder Sauerstoffradikale, Hitze, Ischämie, Infektion und Entzug von Wachstumsfaktoren. Dabei spricht man vom intrinsischen Signalweg der Apoptose, der unter Beteiligung der

Mitochondrien die Zelle in den Tod führt (Übersichtsartikel Green und Reed 1998). Der extrinsische Weg kann über das Protein Bid jedoch auch den intrinsischen Signalweg aktivieren. Somit besteht eine Verbindung zwischen beiden Armen der apoptotischen Signalkaskade (Song et al. 2003). Ebenso von großer Wichtigkeit ist das Protein p53, ein Protein des Zellzyklus. Es kann eine DNA-geschädigte Zelle in die G0-Phase übergehen lassen oder in die Apoptose führen (Kastan et al. 1995). Die Apoptose-Induktion über p53 geschieht auf unterschiedlichen Wegen: direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit pro- und anti-apoptotischen Proteinen, Wirkung als Transkriptionsfaktor von Bax, Fas-Rezeptor und DR-5 (Bennett 1999) sowie Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien mit anschließender Aktivierung der Procaspase-3 (Marchenko et al. 2000).

Störungen und Veränderungen in Regulation oder Funktion der apoptotischen Proteine und Signalkaskaden wird ein erheblicher Einfluss auf die Tumorgenese, auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie auf den Verlauf von Virusinfektionen zugeschrieben (Übersichtsartikel Green und Kroemer 2004). Ein bekanntes Beispiel ist die Bcl-2-Überexpression, die als Oncogen beim folliculären Lymphom wirkt (Vaux et al. 1988). Daraus ergeben sich vielseitige therapeutische Ansätze unterschiedlicher Erkrankungen, die bei einem besseren Verständnis der komplizierten Vorgänge während der Apoptose ermöglicht werden.

Für Hirntumoren wird angenommen, dass die Zellen im Tumorzentrum aufgrund von Hypoxie und Ischämie zur Nekrose neigen, peripher gelegene Zellen dagegen leichter für die Apoptose zugänglich sind. Dieses Modell ähnelt den Vorstellungen des apoptotischen Zelluntergangs in der Penumbra beim ischämischen Insult (Ray et al. 2002).

## **1.7. Caspasen**

Caspasen sind Cystein-Aspartasen, das heißt Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum Cystein besitzen und ihre Zielproteine am C-terminalen Ende der Aminosäure Aspartat schneiden (Alnemri et al. 1996, Lazebnik et al. 1994). Sie liegen in der Zelle als enzymatisch inerte Procaspasen vor. Funktionell unterscheidet man die

Initiatorcaspasen mit den Hauptvertretern Caspase-8 und Caspase-9 von den Effektorcaspasen mit den Hauptvertretern Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7. Initiatorcaspasen benötigen Adaptorkomplexe (DISC, Apoptosome) für ihre autoproteolytische Aktivierung. Effektorcaspasen werden hingegen immer von einer anderen Caspase von außen aktiviert (Earnshaw et al. 1999).

Caspase-8 vermittelt das Signal nach Binden eines Todesliganden an seinen Rezeptor über den DISC (Death-inducing-signalling-complex) an die Effektorcaspasen-3 und -6. Sie hat ihre Funktion im extrinsischen Signalweg (Perera et al. 1998). Caspase-9 ist die Initiatorcaspase des intrinsischen Signalwegs. Unter Beteiligung von Apaf-1, dATP und Cytochrom c aus den Mitochondrien wird das Apoptosom gebildet, in dem sich Caspase-9 autoproteolytisch spaltet, was dann zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 führt (Li et al. 1997). Auch die Effektorcaspasen können sich untereinander aktivieren. Caspase-3 schneidet Caspase-6 und umgekehrt aktiviert Caspase-6 Caspase-3 (Srinivasula et al. 1996, Liu et al. 1996).

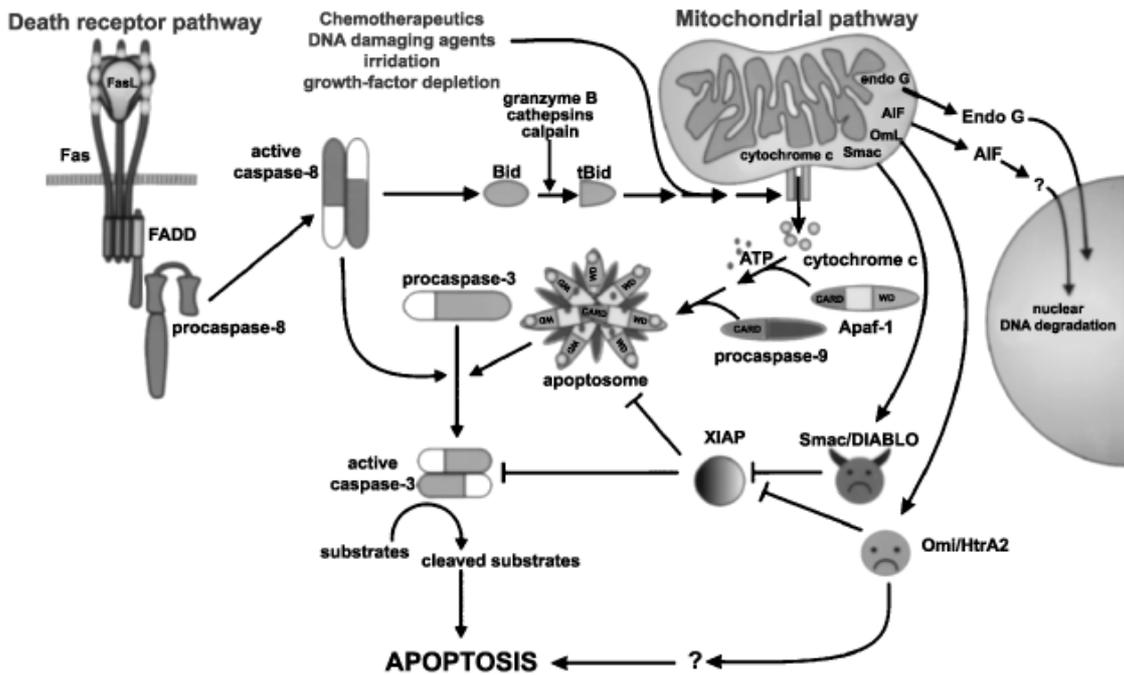
Die Funktion der Caspasen als komplexe Vermittler der Apoptose zeigt sich vor allem an der langen Liste ihrer Substrate. Caspasen können Proteine des Zytoskeletts (Mashima et al. 1995), des Zellkerns (Kaufmann 1989, Lazebnik et al. 1993) und des DNA-Metabolismus bzw. der DNA-Reparatur schneiden (Kaufmann 1989). Zudem werden auch Proteine, die an erblichen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind, von Caspasen geschnitten. Zu erwähnen sind das Huntingtin (Goldberg et al. 1996) bei Chorea Huntington sowie Presenilin-1 und -2 (Loetscher et al. 1997) und das Amyloid Precursor Protein (Barnes et al. 1998) bei Morbus Alzheimer. Des Weiteren haben sie Regulatoren des Zellzyklus und der Proliferation wie das pRB (Janicke et al. 1996), Proteinkinasen (die selbst von Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Voelkel-Johnson et al. 1995)) und weitere Apoptoseproteine zum Ziel. Bei den Apoptoseproteinen handelt es sich sowohl um antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 (Hsu CA. et al. 1997) und Bcl-XL (Clem et al. 1998), als auch um proapoptotische Proteine wie Bid (Li et al. 1998) und Bax (Grandgirard et al. 1998). Von großer Wichtigkeit ist die CAD, die Caspase-abhängige-DNAse, die die Endstrecke des Caspasenwegs im Kernverdau als Nuklease darstellt. Sie wird über Caspase-3 aktiviert, indem ihr Inhibitor ICAD gespalten wird (Enari et al. 1998). Hieraus folgt die Fragmentation der nukleären DNA zu Oligonukleosomen (Junqueira und Carneiro 1996a).

Da in dieser Arbeit die Expression von aktivierter (cleaved) Caspase-3 in humanen Gliomen immunhistochemisch untersucht wurde, soll dieses Protein noch genauer vorgestellt werden.

Als Procaspase-3 (CPP32) besitzt es ein Molekulargewicht von 32 kDa und kommt ubiquitär in jeder Zelle vor. Zu ihrer Aktivierung wird die Procaspase-3 in zwei Untereinheiten zu 17 kDa und 12 kDa gespalten. Die aktivierte Caspase-3 ist immunhistochemisch im Zytosol und im Nukleus zu detektieren (Krajewska et al. 1997, Chen et al. 1998). Wie oben bereits beschrieben, schneidet die aktivierte Caspase-3 eine Vielzahl an Proteinen der Zelle. Zu einer rückkoppelnden Verstärkung der Aktivierung kommt es durch eine Wechselwirkung mit Caspase-9. In Tumorzelllinien werden die Effektorcaspasen-3 und -6 durch unterschiedliche apoptotische Stimuli aktiviert (Faleiro et al. 1997). Eine Überexpression der Caspasen-3 und -6 führt jedoch nicht zu einer autokatalytischen Aktivierung und damit nicht in die Apoptose, was die Notwendigkeit einer Aktivierung der Effektorcaspasen beweist. *In vivo* kann die Wirkung der aktivierten Effektorcaspasen zuverlässig durch z-VAD-Fluormethylketon (z-VAD-fmk) gehemmt werden (Srinivasula et al. 1998).

Eine Möglichkeit, die aktivierte Caspase-3 (und auch Caspase-7 und -9) zu inhibieren, hat die Zelle durch IAP-Proteine (inhibitor-of-apoptosis-proteins), von denen fünf verschiedene bei Säugetieren bekannt sind. Hauptvertreter dieser Gruppe mit der wohl stärksten antiapoptotischen Wirksamkeit ist XIAP, der x-linked-inhibitor of apoptosis (Bratton et al. 2001, Deveraux et al. 1997, Roy et al. 1997). Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Caspasen-Signalweg sind von der Hemmung betroffen. Den IAPs wird eine Rolle in der Entwicklung von Krebserkrankungen zugeschrieben (Deveraux und Reed 1999, LaCasse et al. 1998). Die Bindung und damit Hemmung der Caspasen über die IAPs erfolgt über so genannte „baculovirus IAP repeats“ (BIR) (Takahashi et al. 1998).

Caspase-3 knock-out Mäuse können lebendig geboren werden, sterben jedoch in den ersten drei Lebenswochen aufgrund von Entwicklungsstörungen des ZNS, die mit einem erniedrigten Apoptoselevel einhergehen (Kuida et al. 1996). Trotzdem konnte beobachtet werden, dass die meisten der bekannten Caspase-3-Zielproteine in Abwesenheit von Caspase-3 geschnitten wurden, was auf das Vorhandensein der anderen Effektorcaspasen zurückzuführen ist (Janicke et al. 1998a).



**Abbildung 1:** Übersicht über die apoptotischen Signalkaskaden, die beteiligten Proteine, deren Interaktionen und Zielstrukturen.

In der Abbildung sind der extrinsische Signalweg (hier: „Death receptor pathway“) mit direkter Caspasenaktivierung (linke Bildhälfte), der intrinsische Signalweg (hier: „Mitochondrial Pathway“) unter Beteiligung der mitochondrialen Apoptoseproteine (rechte Bildhälfte) sowie die Verbindung der beiden Signalwege über das Protein Bid dargestellt. Die mitochondrialen Apoptoseproteine Cytochrom C, Smac und Omi/HtrA2 führen zu einer Aktivierung des Caspasenwegs. Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) und Endonuklease G (Endo G) werden ebenfalls aus den Mitochondrien frei und bewirken eine Caspase-unabhängige nukleäre DNA-Degradation (Abbildung nach van Loo et al. 2002).

## 1.8. Rolle der Mitochondrien in der Apoptose

Seit langem als wichtigster Energielieferant eukaryoter Zellen bekannt, spielen die Mitochondrien auch eine wesentliche Rolle in der Auslösung der Apoptose.

Mitochondrien sind 0,1-0,5  $\mu\text{m}$  breite und durchschnittlich 5-6  $\mu\text{m}$  lange Organellen, die vermutlich aus Prokaryoten entstanden sind und symbiotisch von Eukaryoten aufgenommen wurden (Endosymbiontentheorie). Sie besitzen eine eigene ringförmige DNA, die für mitochondriale Proteine kodiert. Die meisten Proteine der Mitochondrien werden jedoch im Zellkern abgelesen und in die Mitochondrien transportiert.

Die Mitochondrienmatrix ist von einer äußeren und inneren Membran umgeben, die beide den klassischen dreischichtigen Aufbau von Zytomembranen aufweisen. Dazwischen befindet sich das Spatium intermembranosum (intermembrane space: IMS), in dem sich die für die Apoptose wesentlichen Proteine befinden. Die Enzyme der Elektronentransportkette (Komplex I bis Komplex V) für die oxidative Phosphorylierung sind in der inneren Membran lokalisiert, die Enzyme des Zitronensäurezyklus befinden sich in der Mitochondrienmatrix (Junqueira und Carneiro 1996b).

Die Mitochondrien werden entweder über den intrinsischen oder den extrinsischen Signalweg in die apoptotische Signalkaskade einbezogen (Luo et al. 1998, Li et al. 1998). Für die Freisetzung der proapoptotischen mitochondrialen Proteine aus dem IMS spielt die Permeabilität der äußeren Membran die wesentliche Rolle. Die Funktionalität der äußeren Membran steht vor allem unter dem Einfluss der Bcl-2-Proteinfamilie. Die wichtigsten proapoptotischen Vertreter sind Bax und Bak mit den gemeinsamen Domänen BH1 bis BH3. Die wichtigsten antiapoptotischen Vertreter sind Bcl-2 und Bcl-xL, die beide die Domänen BH1 bis BH4 teilen (Gross et al. 1999, Adams und Cory 2001). Des Weiteren gibt es proapoptotische BH3-only-Proteine, die als „sensitizers for apoptosis“ wirken, aber nicht in direkter Wechselwirkung mit der äußeren Mitochondrienmembran zur Permeabilisierung stehen. Zu ihnen zählen Bid, Bad, PUMA und Noxa (Puthalakath und Strasser 2002), wobei vor allem Bid als Aktivator von Bax und Bak sowie als Schaltstelle zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg eine wichtige Rolle zukommt. Antiapoptotische Bcl-2

Moleküle können BH3-only Proteine in stabilen Komplexen in der äußeren Membran einlagern und damit inhibieren (Cheng et al 2001).

Über den genauen Mechanismus, wie es zur Freisetzung der mitochondrialen Faktoren kommt, herrscht Unklarheit. Es existieren jedoch verschiedene Modelle:

- 1) Bak und Bax formen tetramere Kanäle in die äußere Membran, über die die Faktoren freigesetzt werden, ohne dass die Mitochondrien anschwellen oder einen Verlust des Membrapotentials erfahren. Dieser Vorgang ist unabgänglich von aktivierten Caspasen (Jurgensmeier et al. 1998, Wei et al. 2001). Bcl-2 und Bcl-XL wirken dem entgegen, indem sie stabilisierende Komplexe an BH3-only-Moleküle in die Membran einlagern (Cheng et al 2001). In Zellen, die die Faktoren Bak und Bax nicht besitzen, kann weder die Aktivierung von BH3-only-Proteinen noch die Hemmung von Bcl-2 und Bcl-xL die Zelle in die Apoptose führen, was auf die wichtige Rolle von Bak und Bax schließen lässt (Zong et al. 2001).
- 2) Permeability transition pores (PTP), die aus VDAC (voltage-dependent-anion-channel) der äußeren Membran und dem ANT-Protein (adenine-nucleotide-translocator) der inneren Membran bestehen, könnten die Freisetzung der Faktoren regulieren (Marzo et al. 1998, Shimizu et al. 1999). Öffnet sich der PTP, kommt es über Verlust des Potentials der inneren Membran (Depolarisation), Anschwellen der Mitochondrienmatrix und sekundärer Ruptur der äußeren Membran zum Freiwerden der Faktoren. Als Öffner der PTP wirken Bak und Bax, stabilisiert wird der PTP über die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Zamzami und Kroemer 2001).
- 3) Das Protein Bid kann Phospholipide zur Mitochondrienmembran vermitteln und zum Verlust des Potentials beitragen. Insbesondere nach Aktivierung von Todesrezeptoren erhöht sich über Phospholipasen das Vorkommen von Phospholipiden, was diesen Weg auslösen könnte (Esposti et al. 2001, Jaattella et al. 1995).

Es lässt sich zusammenfassen, dass dem Bak/Bax-Modell heute die größte Bedeutung zukommt. Ursächlich dafür ist der Nachweis, dass die Faktoren auch ohne eine Depolarisation der Mitochondrienmembran freiwerden können und ein Fehlen von Bak und Bax die Freisetzung verhindert (Finucane et al. 1999, Zong et al. 2001).

## 1.9. Vorstellung der mitochondrialen Apoptosefaktoren

Cytochrom C ist der bekannteste mitochondriale Apoptosefaktor. Nach dem Freiwerden bildet es wie oben bereits beschrieben das Apoptosom zur nachfolgenden Caspasenaktivierung (Li et al. 1997). Seit der Entdeckung der IAPs gilt die Cytochrom C Freisetzung jedoch nicht mehr als point-of-no-return der Apoptose. Es wurde gezeigt, dass manche Zellen den Verlust von Cytochrom C aus den Mitochondrien überstehen, und sich die Mitochondrien regenerieren können (Deveraux et al. 1998, Martinou et al. 1999).

Smac/Diablo wirkt nach seiner Freisetzung in das Zytosol als Inhibitor von XIAP und der anderen IAPs (Du et al. 2000, Verhagen et al. 2000). Dabei vermittelt Smac die Hemmung durch Interaktion mit der BIR-3 Domäne von XIAP, mit der sonst die Caspase-9 inhibiert wird (Liu et al. 2000, Srinivasula et al. 2001). Somit aktiviert Smac den Caspasenweg der Apoptose.

Omi/HtrA2 ist eine Serinprotease, die auf zwei verschiedenen Wegen die Zelle in die Apoptose leitet (Gray et al. 2000). Zum einen wirkt sie ebenso wie Smac als IAP-Inhibitor, wobei sie eine höhere Affinität zur IAP-Domäne des BIR-2 aufweist, die sonst die Hemmung von Caspase-3 vermittelt. Andererseits schreibt man der Serinprotease auf IAP- und Caspasen-unabhängigem Weg eine proapoptische Wirkung zu (Hedge et al. 2002, Suzuki et al. 2001, Verhagen et al. 2002).

### 1.9.1. Der Caspasen-unabhängige Weg der Apoptose

Wie bereits beschrieben, ist die Freilassung der Apoptosefaktoren unabhängig von einer zuvor erfolgten Aktivierung der Caspasenkette (Jurgensmeier et al. 1998). Der Caspase-unabhängige Zelltod zeigt nicht die klassischen morphologischen Veränderungen der Apoptose. Die vollständige Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung sowie die Ausbildung von apoptotischen Körperchen bleibt aus. Dennoch geht die Zelle zugrunde und wird abgeräumt. Über den Stellenwert des Caspase-unabhängigen Zelltods in der Entwicklung, die Mechanismen der Regulation und seine physiologische Funktion herrscht in der Literatur Unklarheit (Chipuk und Green 2005).

Im Weiteren werden die beiden in dieser Arbeit untersuchten mitochondrialen Faktoren beschrieben, deren Ziel der Zellkern ist und die ihre proapoptotische Wirkung ohne die Beteiligung von Caspasen entfalten.

### **1.9.2. Apoptosis-Inducing-Factor (AIF)**

AIF ist ein Flavoprotein im IMS der Mitochondrien mit Oxidoreduktaseaktivität und besitzt ein Molekulargewicht von 57 kDa. Es wird unabhängig von der Art des apoptotischen Stimulus aus den Mitochondrien frei. Nach dem Freiwerden transloziert es in den Zellkern, wo es zu large-scale DNA-Fragmentierung (ca. 50 kbp) und partieller Chromatin-Kondensation führt (Susin et al. 1999, Susin et al. 2000). Wichtig ist die Abgrenzung, dass die oligonukleosomale DNA-Fragmentierung und vollständige Chromatin-Kondensation mit der Ausbildung von apoptotischen Körperchen, wie sie für die CAD charakteristisch ist, durch AIF ausgelöst, nicht beschrieben wird. Durch Untersuchungen mit dem Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk gilt die Caspasen-unabhängige Wirkungsweise von AIF als gesichert (Daugas et al. 2000). Als Inhibitor von AIF wird das Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70) angesehen (Ravagnan et al. 2001). Wird AIF in Mäusen genetisch inaktiviert, konnten Störungen in der Embryogenese festgestellt werden (Joza et al. 2001).

Zusätzlich soll AIF eine wichtige Rolle für die Funktion des Komplex I der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien spielen. Der Phänotyp der Harlekin-Mäuse (Ataxie und Retinadegeneration) wird mit einem Defekt im AIF-Gen, der zu niedriger Expression führt, erklärt. Die neuronalen Zellschädigungen resultieren aus einer gestörten oxidativen Phosphorylierung, als deren Ursache ein Mangel an AIF angesehen wird (Klein et al. 2002, Vahsen et al. 2004).

Nekrotische Zellen durch Entzug von ATP zeigen keine Chromatin-Kondensation, eine AIF-Translokation und large-scale-DNA-Fragmentierung ist jedoch zu beobachten. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass AIF auch am nekrotischen Zelluntergang beteiligt ist (Daugas et al. 2000).

Wird AIF in die Zelle injiziert, wird im Folgenden ein Verlust des Mitochondrienmembranpotentials, eine Freisetzung von Cytochrom C und die für den apoptotischen Zellverdau charakteristische Auslagerung von Phosphatidylserin auf die

Außenseite der Zellmembran beobachtet. Dies deckt sich mit Angaben zu einer frühzeitigen Abgabe von AIF aus den Mitochondrien, nach der es an der Freisetzung von Cytochrom C beteiligt ist. Die Effekte von AIF auf die Mitochondrien könnten mit seiner Oxidoreduktaseaktivität zusammen hängen (Cande et al. 2002, Joza et al. 2001, Susin et al. 1999, Yu et al. 2002).

### 1.9.3. Endonuklease G (Endo G)

Endonuklease G ist ein 33 kDa großes Protein des IMS und wird während der apoptotischen Signalkaskade aus den Mitochondrien frei. Sie kann unabhängig von einer Caspasenaktivierung RNA und DNA schneiden. Zusätzlich wird ihr eine Funktion bei der Replikation der mitochondrialen DNA und bei der Zellproliferation zugeschrieben (Cote und Ruiz-Carrillo 1993, Huang et al. 2006, Li et al. 2001, Parrish et al. 2001, van Loo et al. 2001). Eine Behandlung mit DNA-schädigenden Stoffen (Cisplatin, ROS) erhöht die Empfänglichkeit der DNA für die Endo G-Wirkung (Ikeda und Ozaki 1997).

Endo G soll mit AIF und Hsp 70 Komplexe bilden können. Hsp 70 spielt dabei eine Rolle als Regulator der Endo G-Aktivität, abhängig vom Energiezustand der Zelle. Ist ATP vorhanden, hemmt Hsp 70. Fehlt ATP in der Zelle, aktiviert Hsp 70 die DNase (Kalinowska et al. 2005).

Eine Untersuchung der *in vivo* Funktion von Endo G anhand von knock-out Mäusen zeigte, dass Homozygotie nicht mit dem Leben vereinbar war. Heterozygote Tiere zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli sowie eine reduzierte DNA-Fragmentierung (Zhang et al. 2003). Dies steht in erheblichem Gegensatz zu einer Untersuchung, die bei Endo G knock-out Mäusen keinerlei Auffälligkeiten entdeckte (Irvine et al. 2005).

Endo G ist zu einem umfassenderen DNA-Verdau fähig, der dem durch die CAD ähnelt und über das Stadium der large-scale-DNA Fragmentierung von AIF hinausgeht. Für die volle Wirksamkeit von Endo G mit einem Abbau von Doppelstrang-DNA sind jedoch Kofaktoren (Exonuklease III, DNase I) nötig, die die Nuklease bei ihrer Freilassung mit heranzieht. (Widlak et al. 2001).

Inwiefern es Synergismen zwischen Endo G und AIF gibt und die beiden Faktoren sich gegenseitig für die Caspase-unabhängige DNA-Degradation benötigen, ist nicht vollständig geklärt. Komplexbildungen von AIF und Endo G in humanen Zellen und AIF in der Rolle als Kofaktor von Endo G zum gemeinsamen Abbau von DNA in *C. elegans* (*Caenorhabditis*) wurden bereits beschrieben (Kalinowska et al. 2005, Wang et al. 2002). Sicher ist ihre Translokation von den Mitochondrien in den Zellkern und die Wirkung als Caspase-unabhängige DNase. Ob die beiden Faktoren bei einer fehlenden Caspasenaktivierung den Caspasen-vermittelten Zelltod ersetzen können, wird in zukünftigen Untersuchungen gezeigt werden müssen.

### **1.10. Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, *in vivo* Daten der Expression von den Caspase-unabhängigen nukleären Apoptosefaktoren in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV und in Normalhirnen zu erhalten. Diese sollen dann mit der Expression von aktivierter Caspase-3 in denselben Tumoren verglichen werden. Dadurch soll sich das Verständnis apoptotischer Vorgänge in humanen Gliomen verbessern, da bisher noch keine Brücke zwischen dem klassischen Caspasen-vermittelten Zelltod und der Caspase-unabhängigen Apoptose geschlagen werden konnte.

Das Gebiet der Apoptoseforschung bietet mögliche neue Erkenntnisse über die regulatorischen Vorgänge in der Tumorzelle bis hin zum Verständnis der malignen Entartung. Aufgedeckte Defekte in der apoptotischen Regulation sind heute für viele Tumore bekannt (z. B. Bcl-2 Überexpression beim folliculären Lymphom).

Darum erfolgt die immunhistochemische Evaluation der Apoptosefaktoren an Primär- und Rezidivtumoren, im Zentrum der Tumore sowie in der Infiltrationszone, um hier eventuelle zeitliche oder regionale Unterschiede aufzudecken.

Weiter soll der Einfluss der Expressionsraten auf das Überleben der Patienten analysiert werden. Damit könnten direkte Assoziationen der Faktoren mit dem Verhalten der einzelnen Tumore beurteilt werden und eventuell Anhaltspunkte für zukünftige Therapien der Hirntumore gewonnen werden.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Definition und Auswahl der Gewebeprobe**

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeprobe aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen, die von 1993 bis 2003 in der neurochirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen entnommen wurden, verwendet.

Darin enthalten sind 26 pilozytische Astrozytome WHO-Grad I, 37 diffuse Astrozytome WHO-Grad II (davon 29 fibrilläre, fünf gemistozytäre, drei protoplastische), 52 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und 79 primäre Glioblastome WHO-Grad IV, das heißt keines der Glioblastome ist sekundär aus einem niedriggradigen Astrozytom entstanden. Zusätzlich wurden von 25 Glioblastomen korrespondierende Infiltrationszonen definiert, an denen der Tumor sich in die Peripherie ausdehnt. Von 31 primären Glioblastomen wurden die Erstrezidive in die Untersuchung miteinbezogen.

Zur Kontrolle an gesundem Hirngewebe wurden 23 Gewebeprobe aus der Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung Tübingen herangezogen.

Die Reevaluation der Tumore erfolgte durch mindestens zwei Neuropathologen, wobei nur eindeutig nach den WHO-Kriterien (Kleihues und Cavenne 2000) klassifizierbare Tumoren in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Die Infiltrationszonen für die WHO-Grad IV Tumoren wurden anhand einer -in Vergleich zum Tumorzentrum- etwa auf die Hälfte erniedrigten Zelldichte, geringgradiger Aplasiezeichen sowie eindeutig erkennbarem residualen ZNS-Gewebe festgelegt.

Der Verwendung der Tumor-Paraffinblöcke der Patientinnen und Patienten wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen zugestimmt.

#### **2.1.1. Herstellung histologischer Präparate**

Die Tumoren wurden in 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert (pH 7,4). Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%), zweimal in einem Gemisch aus 100% Alkohol und Chloroform und zweimal in unverdünntem Chloroform. Danach wurden die Tumore in Paraffin eingebettet.

Von den Paraffinblöcken wurden am Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) 5 µm dicke Schnitte gewonnen und diese auf Silan-beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Microm International, Walldorf, Deutschland) aufgezogen.

## 2.2. Tissue Microarrays

Die Gewebeaufarbeitung mittels Tissue Microarray (TMA) bietet bei immunhistochemischen Untersuchungen den Vorteil eines schnelleren und somit effizienteren Screeningverfahrens der Tumoren im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie.

Im TMA-Verfahren, das erstmals 1998 (Kononen et al. 1998) beschrieben wurde, können bis zu 1000 Gewebeproben in einen Paraffinblock eingebracht und später untersucht werden. In dieser Arbeit wurden Paraffinblöcke mit bis zu 108 Gewebezyindern verwendet.

Um für den jeweiligen Tumor repräsentative Areale zu gewinnen, wurden zunächst die konventionellen H.E.-Färbungen der Donor-Tumoren lichtmikroskopisch untersucht und dabei das Gebiet für den TMA-Paraffinblock mit Filzstift markiert. Mit diesem Vorgehen konnte verhindert werden, dass sich im TMA-Block unerwünschte Gewebezonen wie Nekrosen oder Einblutungen befinden.

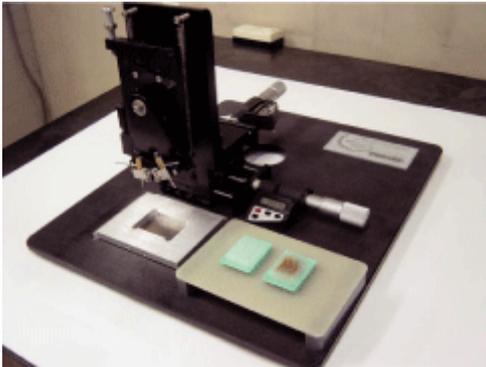
Mit der TMA-Maschine (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie; WI, USA) wurden die Tissue Microarrays nach der Methode von Kononen hergestellt (Kononen et al. 1998).

Dabei wurden in einen frischen Paraffinblock Löcher im Abstand von 1,5 mm gestant und diese sofort danach mit dem Gewebezyylinder aus dem Donor-Tumorblock aufgefüllt. Schrauben in der Plattform der TMA-Maschine sicherten eine exakte Positionierung des Paraffinblocks.

Die Gewebezyylinder haben einen Durchmesser von 0,6 mm. Die Anzahl der Zylinder pro Paraffinblock wurde auf 110 Stück limitiert (maximal elf Reihen und zehn Spalten), um Gewebeverluste durch Ablösung der Tumorproben vom Objektträger bei der späteren Präparatherstellung zu minimieren.

Die fertigen TMA-Paraffinblöcke wurden mit einem auf 42° Celsius vorgeheizten Objektträger versiegelt, wodurch ein Herausgleiten des Gewebes beim Schneidevorgang verhindert werden konnte. Von diesen TMA-Blöcken wurden für die

immunohistochemische Untersuchungen 5 µm dicke Schnitte auf Silan-beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Microm International, Walldorf, Deutschland) aufgezogen. Die Antrocknung der Paraffinschnitte erfolgte im Brutschrank bei 37° Celsius.



**Abbildung 2: MTA-1 Manual Tissue Arrayer** (Beecher Instruments; Abbildung nach Daiichi pure chemicals Co., Ltd).



**Abbildung 3: Tissue Micro Array Paraffin-Block mit 50 Herz-Biopsien und entsprechendem Schnitt in HE-Färbung** (Abbildung nach Daiichi pure chemicals Co., Ltd).

## 2.3. Immunhistochemie

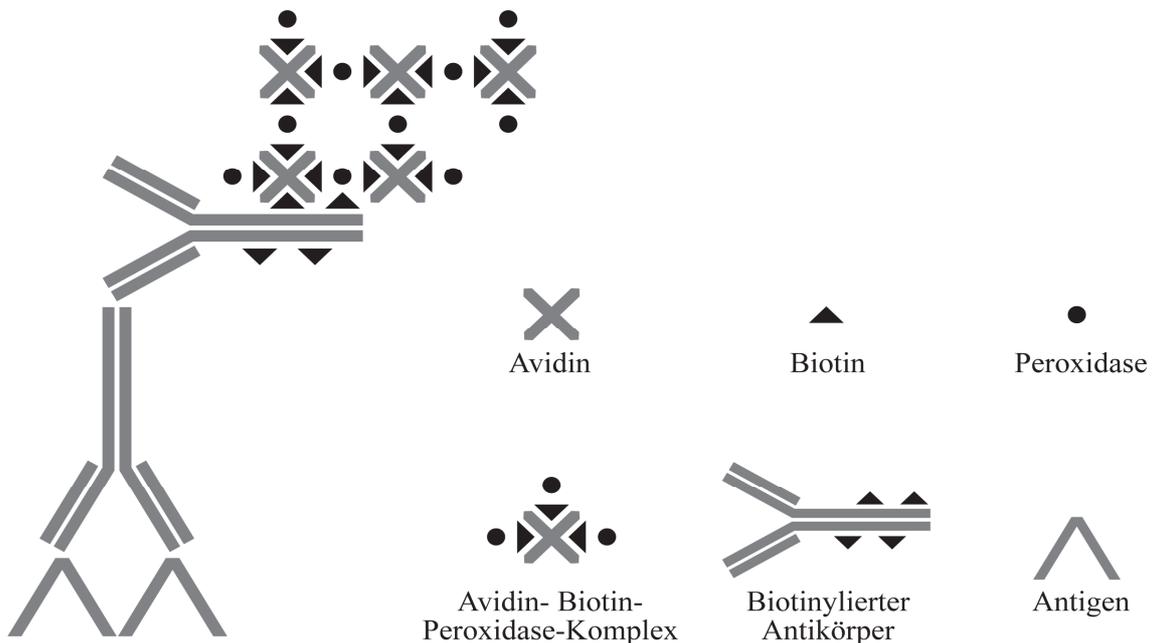
### 2.3.1. Allgemeines

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine beziehungsweise Antigene in Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierbei binden so genannte Primärantikörper mit ihrem F(ab)-Fragment an Proteinabschnitte (Epitope), die sich beispielsweise auf der Zellmembran oder im Zytoplasma befinden. Diese Primärantikörper können je nach Herstellungsart monoklonal oder polyklonal sein. Monoklonale Antikörper sind gegen ein bestimmtes Epitop des Zielproteins gerichtet, während polyklonale Antikörper gegen mehrere Proteinepitope gerichtet sind.

Durch eine Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen und dem Formalin ist eine Antigendemaskierung notwendig. Durch diese Bindungen kommt es zu Proteindenaturierung mit sterischen Konformationsänderungen, wodurch die Zielproteine verdeckt werden und sich dadurch der Antikörperbindung entziehen. Durch eine thermische Vorbehandlung, meist in einem Mikrowellenherd im Pufferbad, werden die Proteine renaturiert und die maskierten Epitope damit freigelegt.

Um das erfolgreiche Binden des Primärantikörpers an das Zielprotein darzustellen, wird zunächst ein Sekundärantikörper auf den Objektträger gegeben. Dieser bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers und trägt an seinem Fc-Teil Biotin kovalent gebunden, was für die weitere Färbereaktion entscheidend ist. Hierbei wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-) Methode (nach Hsu et al. 1981) angewandt. Das zugrunde liegende Prinzip macht sich die starke Affinität zwischen Avidin und Biotin zu Nutze. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex reagiert mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers und führt somit zu einer Ansammlung an Peroxidase in Folge der Bindung des Primärantikörpers an das Zielprotein. Nach Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) wird der Enzymkomplex zu einem braunen Niederschlag im Bereich umgesetzt, der lichtmikroskopisch sichtbar ist.

### Avidin-Biotin-Komplex-Methode



**Abbildung 4: Avidin-Biotin-Komplex-Methode** (Abbildung nach Herzog 2005).

#### 2.3.2. Antikörper

Zum Nachweis von Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) wurde der polyklonale Antikörper AB 16501 Rabbit anti-AIF der Firma Chemicon International (jetzt Millipore, Billerica, USA) verwendet. Der Antikörper bindet die Aminosäuresequenz 517-531 des Proteins. Für die Detektion von Endonuklease G (Endo G) wurde der polyklonale Antikörper AB 3639 Rabbit anti-Endonuklease G der Firma Chemicon International (jetzt Millipore, Billerica, USA) genutzt. Er ist gegen die Aminosäuresequenz 55-70 des Proteins gerichtet.

Zur Ermittlung des Vorkommens von aktivierter Caspase-3 (cleaved caspase-3) wurde der monoklonale Antikörper gegen Cleaved Caspase-3 (Asp 175) (5A1) (Rabbit; Cell Signaling Technology, Danvers, USA) verwendet, der gegen Asp175 des großen Fragments der gespaltenen Procaspase-3 gerichtet ist und nicht die ungespaltene Procaspase oder Caspasenfragmente anderer Caspasen detektiert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden für alle oben erwähnten Tumor- und Normalhirngewebeproben durchgeführt.

### 2.3.3. Durchführung der IHC

Die Entparaffinierung der TMA-Schnitte erfolgte im Chloroformbad für 30 Minuten, die Entwässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%, Aqua dest.) für jeweils zwei Minuten. Zur Freilegung der Antigene wurden die Schnitte für 20 Minuten in Zitratpuffer (pH 6,0) in einem Mikrowellenofen bei 800 Watt gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% Methanol (15 Minuten) geblockt. Die Bindung der Antikörper an unspezifische Bindungsstellen wurde durch die Inkubation (15 Minuten) in 1:10 verdünntem Schweineserum in TBS-Lösung verhindert.

Danach folgte die Inkubation der Primärantikörper bei 4° Celsius. Anti-Endo G wurde 1:50 in TBS-Lösung verdünnt für 60 Minuten. aufgetragen, Anti-Cleaved Caspase-3 wurde über Nacht in 1:100 TBS-Lösung inkubiert. Nach dem Abwaschen wurde der biotinylierte anti-Rabbit F(ab')<sub>2</sub>-Brückenantikörper (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) 1:400 verdünnt für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach einem Waschgang erfolgte die Behandlung des Gewebes mit dem Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) für 30 Minuten. Nach erneutem Waschgang wurden die mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen entwickelt, um die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion in den Tumorzellen sichtbar zu machen (Hsu et al. 1981).

Zur Orientierung auf den Präparaten und zur Erleichterung der Auszählung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, woran sich eine kurze Differenzierung der Präparate in HCl-Alkohol (0,1%) anschloss. Danach durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung (70%, 96%, 100%, 100%, jeweils zwei Minuten) und drei mal fünf Minuten Xylol, wonach sie mit einem Deckglas versehen wurden.

Bei jedem Färbegang mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Endo G wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der während der Primärantikörper-Inkubation in reiner TBS-Lösung inkubiert wurde. Beim Färben mit dem monoklonalen Antikörper Anti-Cleaved Caspase-3 wurden Isotypenkontrollen durchgeführt. Dabei ersetzte ein Rabbit Anti-IgG<sub>1</sub>-Antikörper in entsprechender Verdünnung den Primärantikörper.

Hierdurch konnten unspezifische Reaktionen der Detektionsmethode in den Tumorzellen ausgeschlossen werden.

Beim Färben von AIF mit dem Benchmark Immunochemistry System (Ventana, Strasbourg, Frankreich) wurde die endogene Peroxisase-Aktivität der Gewebe in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 14 Minuten geblockt. Dann folgte die aufbereitende Vorbehandlung für die Immunfärbung für 68 Minuten, wonach der Anti-AIF-Antikörper 1:50 in TBS-Lösung verdünnt auf die Schnitte gegeben wurde. An die 32 Minuten dauernde Inkubation schlossen sich zwei Verstärkungsschritte für jeweils acht Minuten. Als Negativkontrolle wurde nach dem oben genannten Prinzip Schnitte mit reiner TBS-Lösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit einem Avidin- und einem Biotin-Blocker für vier Minuten und mit dem I-View-Biotin Ig (Ventana) für acht Minuten behandelt. Für die Visualisierung in Diaminobenzidin (DAB) erfolgte die Behandlung mit I-View SA-HRP für acht Minuten und dann in DAB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für weitere acht Minuten. Am Ende folgte die Inkubation mit einem Kupfer-Verstärker (Ventana) für vier Minuten, an die sich die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin und die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe anschlossen.

#### **2.4. Lichtmikroskopische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, BX50, Hamburg, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung. Mit Hilfe eines Zähllokulars wurden von jeder Tumor- und Normalhirnprobe die Kästchen bis 200 Zellen inklusive der weiteren Zellen im letzten Kästchen gezählt. Bei geringerem Zellvorkommen wurden alle Kästchen des Zähllokulars, die über der Gewebeprobe anzuordnen waren, ausgezählt. Dadurch konnte zusätzlich noch die Zelldichte in Zellen pro mm des Gewebes zuverlässig ermittelt werden.

Eine eindeutige nukleäre oder zytoplasmatische Färbung wurde bei allen drei Teiluntersuchungen als positiv gewertet.

Nicht berücksichtigt wurden Blutgefäße, Neurone, Zellen des Immunsystems sowie positiv gefärbte Strukturen, die nicht eindeutig einer Zelle zugeordnet werden konnten.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit der Digitalkamera Olympus-Camedia E-20 P (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen.

## **2.5. Erfassung der Überlebensdaten**

Die Erfassung der Patientendaten (Alter, Geschlecht, Überleben) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Allgemeine Neurologie und der Abteilung für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen. Alter, Geschlecht und sehr wenige Überlebenszeiträume waren direkt aus der Patientenakte ersichtlich. Die Mehrheit der Überlebensdaten wurde jedoch durch persönlichen Kontakt zu den Patienten oder deren Hinterbliebenen gewonnen.

Der 15. Dezember 2005 wurde als Ende der Datengewinnung festgelegt. Die an einem Astrozytom erkrankten Patienten konnten bis zu 12,6 Jahre zurückverfolgt werden. Innerhalb dieses Zeitraums starben 102 Patienten nach einem mittleren Überleben von 22,2 Monaten. 78 Patienten waren noch am Leben bei einem Mittelwert der Rückverfolgung von 44,4 Monaten. 54 der 102 Verstorbenen wurden mit einem WHO-Grad IV Tumor diagnostiziert, 31 mit WHO-Grad III, 16 mit WHO-Grad II und ein Verstorbener mit WHO-Grad I.

Von 14 Patienten verlor sich die Spur unmittelbar nach der Operation, so dass diese Gruppe nicht in die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse miteinbezogen werden konnte.

## 2.6. Statistische Auswertung

Die Werte des Anteils an positiven Zellen wurden in den Arcussinus der Quadratwurzel transformiert. Die arithmetischen Mittel wurden mittels der „one-way analysis of variance“ (ANOVA) verglichen und der post-hoc Vergleich wurde mit dem Tukey-Kramer's HSD Test unter Einhaltung einer 5%-Signifikanzschwelle durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu analysieren, wurden individuelle p-Werte mit dem Arcussinus der Quadratwurzel berechnet. Der individuelle, paarweise Vergleich wurde mit dem Student t-test durchgeführt.

Die rücktransformierten Mittelwerte werden zusammen mit ihrem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Signifikante Unterschiede sind wie folgt angegeben: \*  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\*  $0.0001 < p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

Um das Überleben der Patienten zu beschreiben, wurde eine univariate Kaplan-Meier Überlebensanalyse bei WHO-Grad II, III und IV Tumoren durchgeführt. Für die Kaplan-Meier-Analyse wurden drei gleich große Gruppen pro Antikörper mit hoher, mittlerer und niedriger Proteinexpression (Terzile) gebildet. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Tests für zensierte Daten. Exponentielle Verteilungen wurden mit Hilfe des maximal likelihood Verfahrens den individuellen Überlebenskurven angepasst und mit dem likelihood ratio Kriterium auf Unterschiede getestet. Die Anpassung der p-Werte aufgrund von multiplen Testen erfolgte mit der Methode von Bonferroni-Holm.

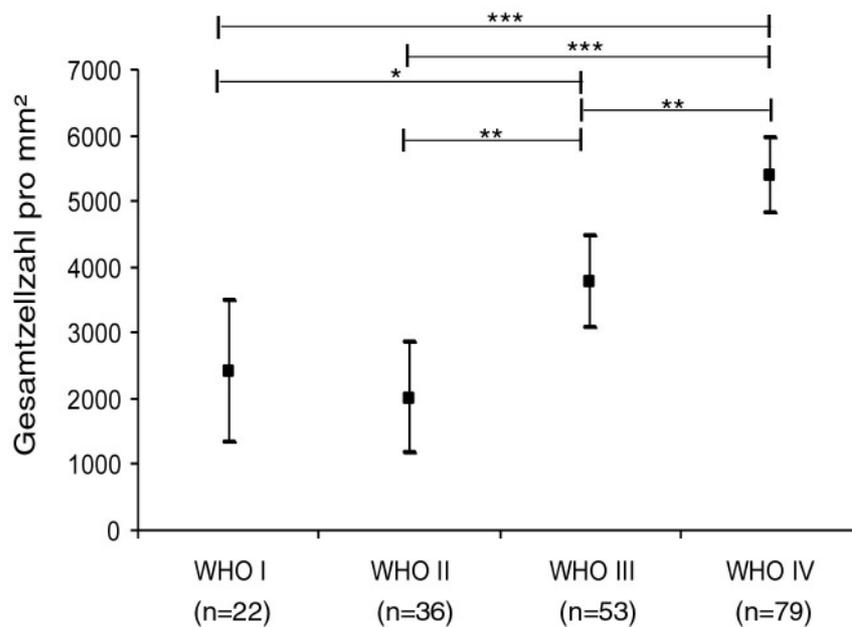
Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm JMP IN 5.1 verwendet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Auswertung der Zellzahl

##### 3.1.1. Zelldichte in Astrozytomen

Es konnte in Astrozytomen ein statistisch signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> von niedriggradigen Astrozytomen WHO-Grad I und II zu anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III sowie von WHO-Grad III Tumoren zu Glioblastomen WHO-Grad IV nachgewiesen werden. Ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Abfall der Zellzahl ist bei den diffusen Astrozytomen WHO-Grad II zu beobachten.



**Abbildung 5: Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> in Astrozytomen WHO-Grad I-IV.**  
Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

Erläuterung zur Darstellung signifikanter Unterschiede in den Abbildungen:

\*  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\*  $0.0001 < p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.0001$

Der Mittelwert für die pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I betrug 2400 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% Konfidenzintervall (KI) 1300-3500 Zellen/mm<sup>2</sup>), für diffuse Astrozytome WHO Grad II 2000 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 1200-2900 Zellen/mm<sup>2</sup>), für anaplastische Astrozytome WHO Grad III 3800 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 3100-4500 Zellen/mm<sup>2</sup>) und für Glioblastome WHO-Grad IV 5400 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 4800-6000 Zellen/mm<sup>2</sup>).

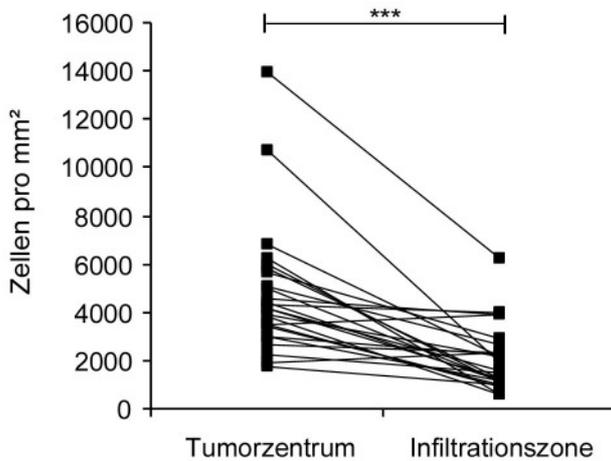
Werden die einzelnen Tumorgruppen miteinander verglichen, ergeben sich folgende p-Werte: Grad I zu II:  $p=0,56$ , Grad I zu III:  $p=0,037$ , Grad I zu IV:  $p<0,0001$ , Grad II zu III:  $p=0,0016$ , Grad II zu IV:  $p<0,0001$  und Grad III zu IV:  $p=0,0005$ .

Diese Ergebnisse stimmen mit den histopathologischen Beobachtungen überein und zeigen die Zuverlässigkeit der Gewebeauswahl.

### **3.1.2. Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone**

In den Infiltrationszonen der 25 untersuchten Glioblastome zeigte sich ein Mittelwert von 2000 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 1200-2900 Zellen/mm<sup>2</sup>), für die dazugehörigen Tumorzentren ergab sich ein Mittelwert von 4800 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 3900-5600 Zellen/mm<sup>2</sup>). Damit ergibt sich eine hoch signifikante Abnahme der Zelldichte in den Infiltrationszonen mit einem p-Wert  $<0,0001$  (bei einer mittleren Differenz von 2700 Zellen/mm<sup>2</sup>, 95% KI 1800-3700).

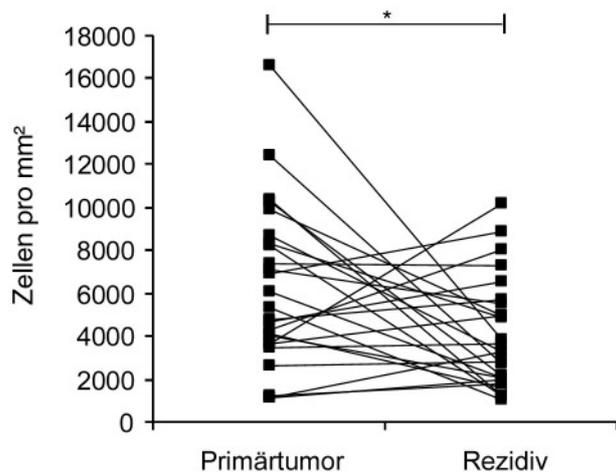
Im Vergleich mit der Zelldichte in der weißen Substanz der Normalhirnproben, wo man eine Zelldichte von 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> (95% KI 900-1200 Zellen/mm<sup>2</sup>) fand, war die Zelldichte in der Infiltrationszone deutlich höher.



**Abbildung 6:** Darstellung der matched-pairs Analyse der Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone beim Glioblastom (n=25). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

### 3.1.3. Zelldichte bei Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor

Bei 30 untersuchten Rezidiven im Vergleich mit korrespondierenden, primären Glioblastomen kam es zu einem signifikanten Abfall der Zellzahl pro mm<sup>2</sup> mit einem p-Wert von 0,013 (bei einer mittleren Differenz von 2200 Zellen/mm<sup>2</sup>, 95% KI 800-3800).



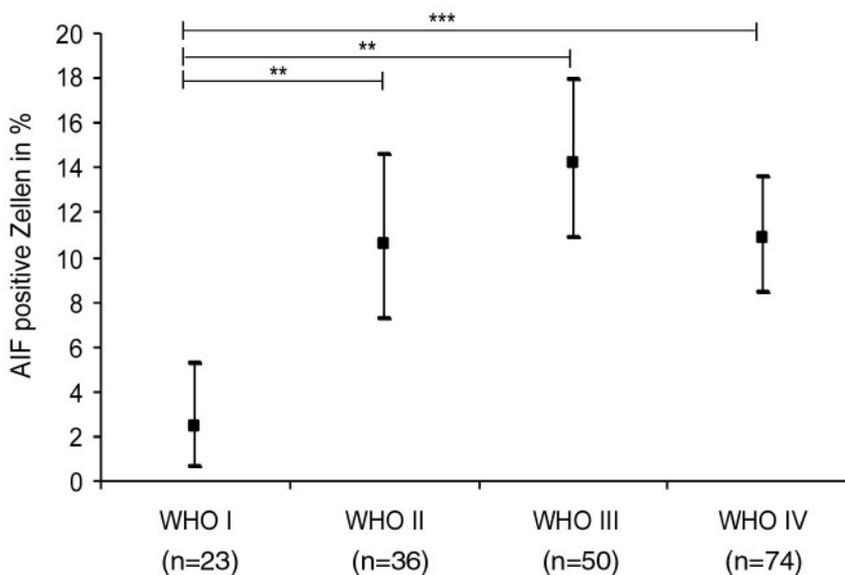
**Abbildung 7:** Darstellung der matched-pairs Analyse der Zelldichte von primären Glioblastomen und ihren Rezidiven (n=30). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

## 3.2. Expression der Apoptosefaktoren

### 3.2.1. Allgemeine Expression von AIF in Astrozytomen und Normalhirn

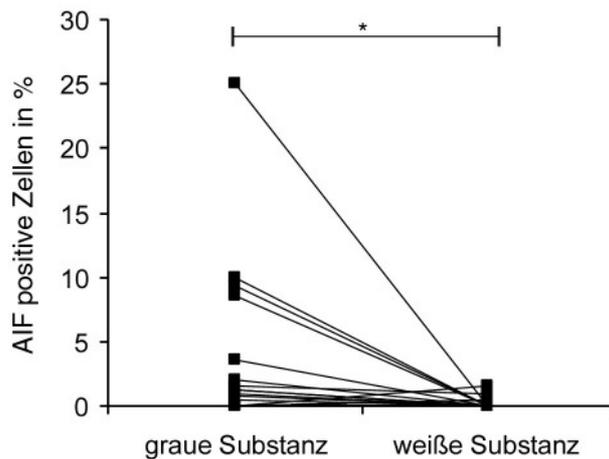
Für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I ergab sich ein Mittelwert von 2,4% (95% KI 0,7-5,2%) AIF-immunreaktiver Zellen. Für diffuse Astrozytome WHO-Grad II wurde ein Mittelwert von 10,6% (95% KI 7,3-14,5%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 14,2% (95% KI 10,9-17,9%) und für Glioblastome WHO Grad IV ein Mittelwert von 10,9% (95% KI 8,5-13,6%) ermittelt.

Im statistischen Vergleich ergibt sich für die Expression von AIF in den vier verschiedenen Tumorguppen ein signifikant niedrigeres Expressionsmuster bei WHO-Grad I Tumoren im Vergleich zu allen drei anderen WHO-Graden (I zu II:  $p=0,0002$ , I zu III:  $p=0,0005$  und I zu IV:  $p<0,0001$ ). Innerhalb der Tumore vom WHO-Grad II, III und IV gab es keine signifikanten Unterschiede.

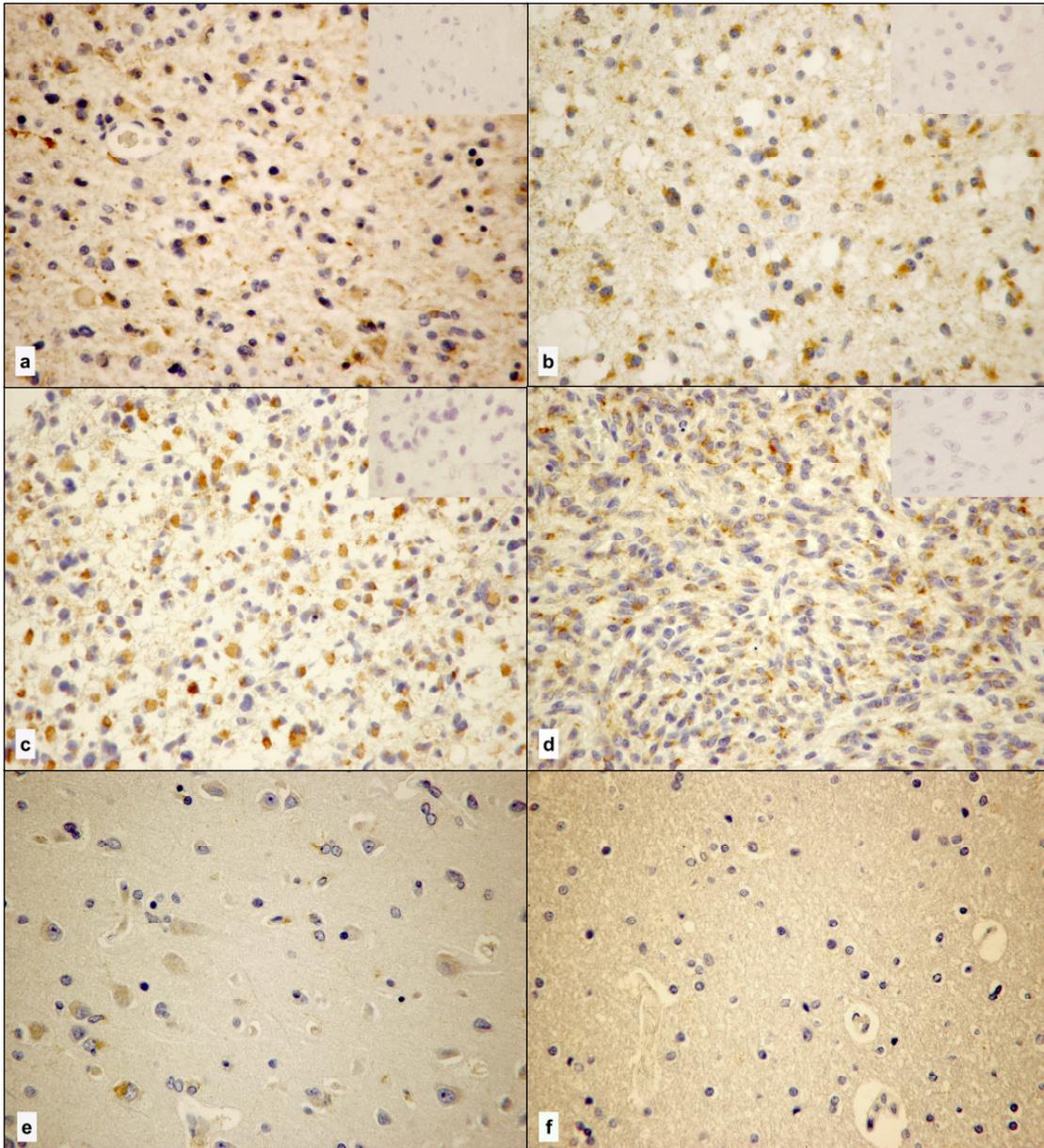


**Abbildung 8: Expression von AIF in Astrozytomen WHO-Grad I-IV.** Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

In den 22 untersuchten Normalhirnproben lag der Mittelwert der prozentual gefärbten Zellen in der grauen Substanz bei 1,3% (95% KI 0,3-3,0) und in der weißen Substanz bei 0,05% (95% KI 0,00-0,16). Der paarweise Vergleich der Expression von AIF in Normalhirnproben ergab eine signifikant erhöhte Expressionsrate in der grauen Substanz im Vergleich zur weißen Substanz ( $p=0,02$ ).



**Abbildung 9:** Darstellung der matched-pairs Analyse der AIF-immunreaktiven Zellen in grauer und weißer Substanz im paarweisen Vergleich (n=22). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

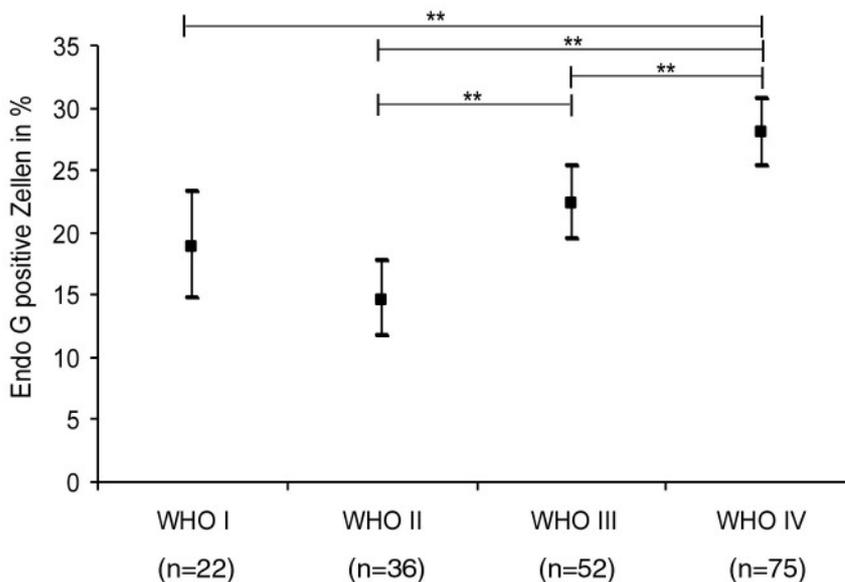


**Abbildung 10: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von AIF in Astrozytomen WHO-Grad I-IV und in Normalhirnkontrollen.** Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (a), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (b), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (c), Glioblastom WHO-Grad IV (d) sowie Rinde (e) und Mark (f) der Normalhirnkontrollen. Die Mittelwerte der AIF-immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Proteinexpression unter den vier Tumorgruppen sind der oben stehenden Grafik zu entnehmen.

### 3.2.2. Allgemeine Expression von Endonuklease G in Astrozytomen und Normalhirn

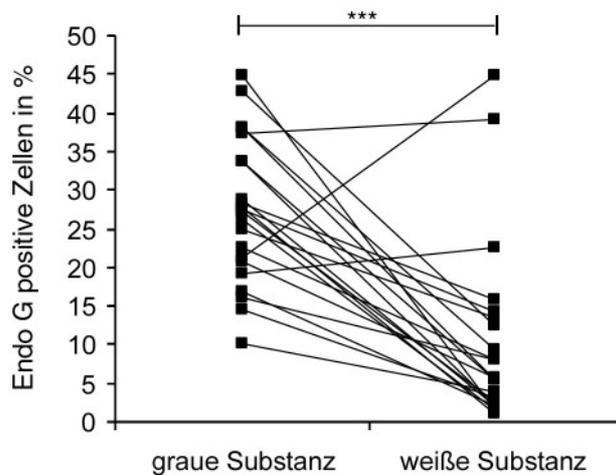
Für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I ergab sich ein Mittelwert an Endonuklease G (Endo G)-immunreaktiven Zellen von 18,8% (95% KI 14,8-23,2%), für diffuse Astrozytome WHO-Grad II ein Mittelwert von 14,6% (95% KI 11,8-17,8%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 22,4% (95% KI 19,5-25,4) und für Glioblastome WHO Grad IV ein Mittelwert von 28,0% (95% KI 25,4-30,7%), womit sich ein ansteigendes Expressionsmuster von WHO-Grad II zu WHO-Grad IV feststellen lässt.

In der statistischen Analyse zeigte sich eine signifikant höhere Endo G-Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV im Vergleich zu allen drei anderen Tumorguppen (I zu IV:  $p=0,0009$ , II zu IV:  $p=0,0007$  und III zu IV:  $p=0,009$ ). Weiter fand sich eine signifikant erhöhte Expression bei Tumoren vom WHO-Grad III im Vergleich zu WHO-Grad II ( $p=0,001$ ).

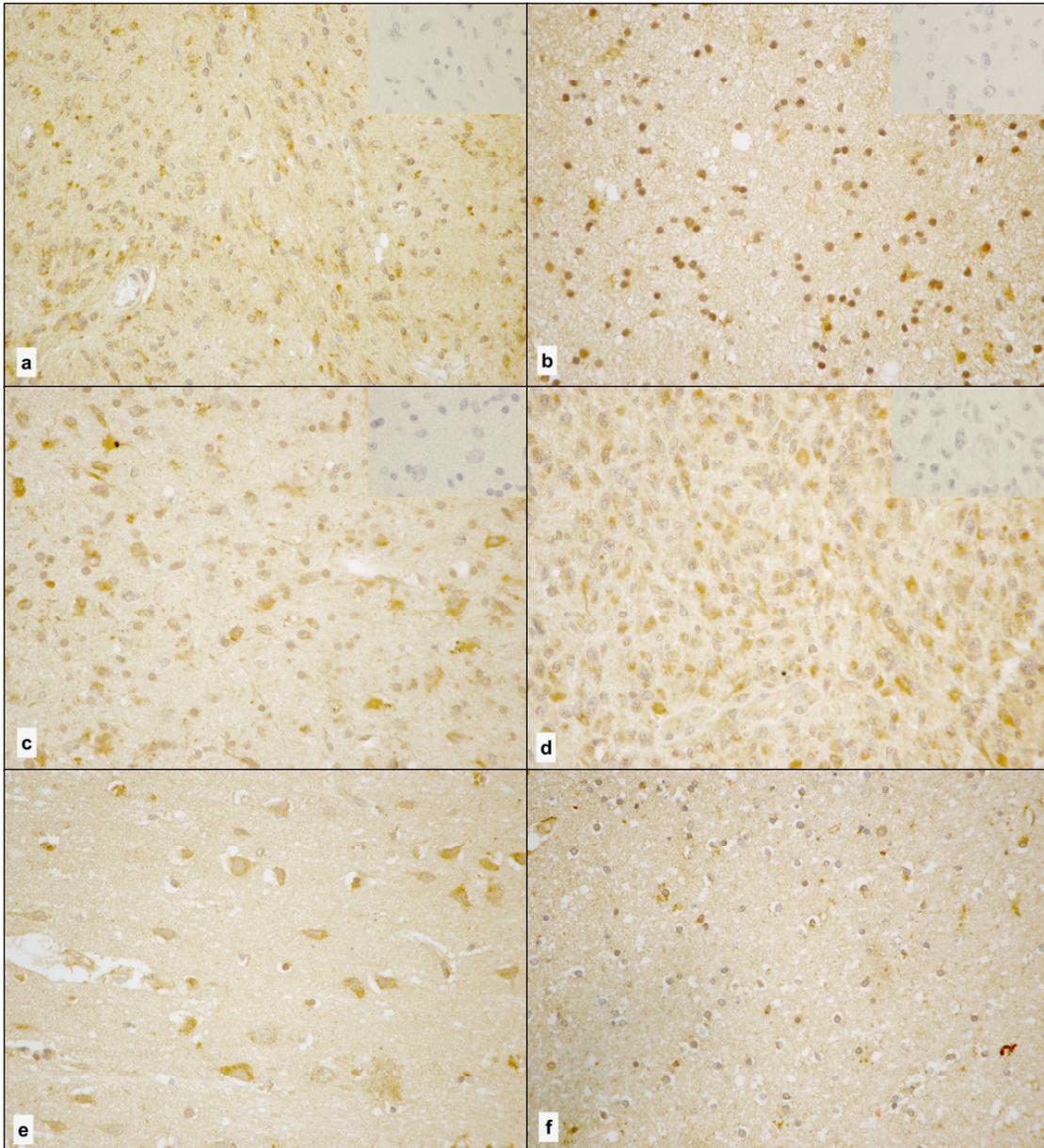


**Abbildung 11: Expression von Endo G in Astrozytomen WHO-Grad I-IV.** Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

In den untersuchten Normalhirnproben (n=22) lag der Mittelwert der prozentual gefärbten Zellen in der grauen Substanz bei 26,8% (95% KI 22,8-30,9%) und in der weißen Substanz bei 8,1% (95% KI 4,4-12,7%). Hierbei zeigten auffällig viele Neurone ein positives Signal für Endo G, was das deutlich höhere Signalniveau in der grauen Substanz im Vergleich zu AIF erklärt. Im paarweisen Vergleich fand sich eine signifikant erhöhte Endo G-Expression in der grauen Substanz im Vergleich zur weißen Substanz mit einem p-Wert<0,0001.



**Abbildung 12:** Darstellung der matched-pairs Analyse der Endo G-immunreaktiven Zellen in grauer und weißer Substanz im paarweisen Vergleich (n=22). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.



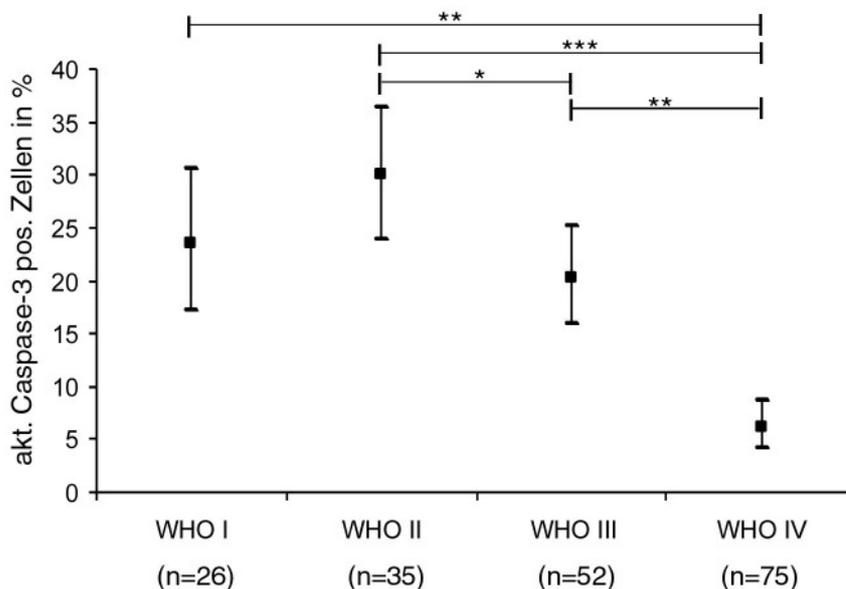
**Abbildung 13: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von Endonuklease G in Astrozytomen WHO-Grad I-IV und in Normalhirnkontrollen.**

Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (a), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (b), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (c), Glioblastom WHO-Grad IV (d) sowie Rinde (e) und Mark (f) der Normalhirnkontrollen. Die Mittelwerte der Endo G-immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Proteinexpression unter den vier Tumorgruppen sind der oben stehenden Grafik zu entnehmen.

### 3.2.3. Allgemeine Expression von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen und Normalhirn

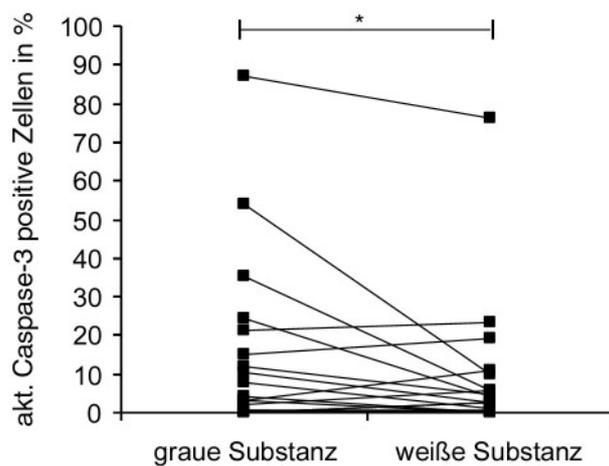
Für die pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I errechnete sich ein Mittelwert der prozentualen aktivierte Caspase-3-Expression von 23,6% (95% KI 17,2-30,7%). Für diffuse Astrozytome WHO-Grad II zeigte sich ein Mittelwert von 30,0% (95% KI 23,9-36,4%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 20,4% (95% KI 16,0-25,1%) und für Glioblastome WHO-Grad IV ein Mittelwert von 6,2% (95% KI 4,2-8,7%).

In der statistischen Analyse zeigte sich in Glioblastomen WHO-Grad IV im Vergleich zu den Tumoren vom WHO-Grad I, II und III eine signifikant geringere Expression von aktivierter Caspase-3 (I zu IV:  $p=0,003$ , II zu IV:  $p<0,0001$ , III zu IV:  $p=0,001$ ). Des Weiteren ergab sich zwischen WHO-Grad III und WHO-Grad II eine leicht signifikante Abnahme der Expression mit einem  $p$ -Wert von 0,02. Demnach gibt es ein abfallendes Expressionsmuster von WHO-Grad II bis WHO-Grad IV.

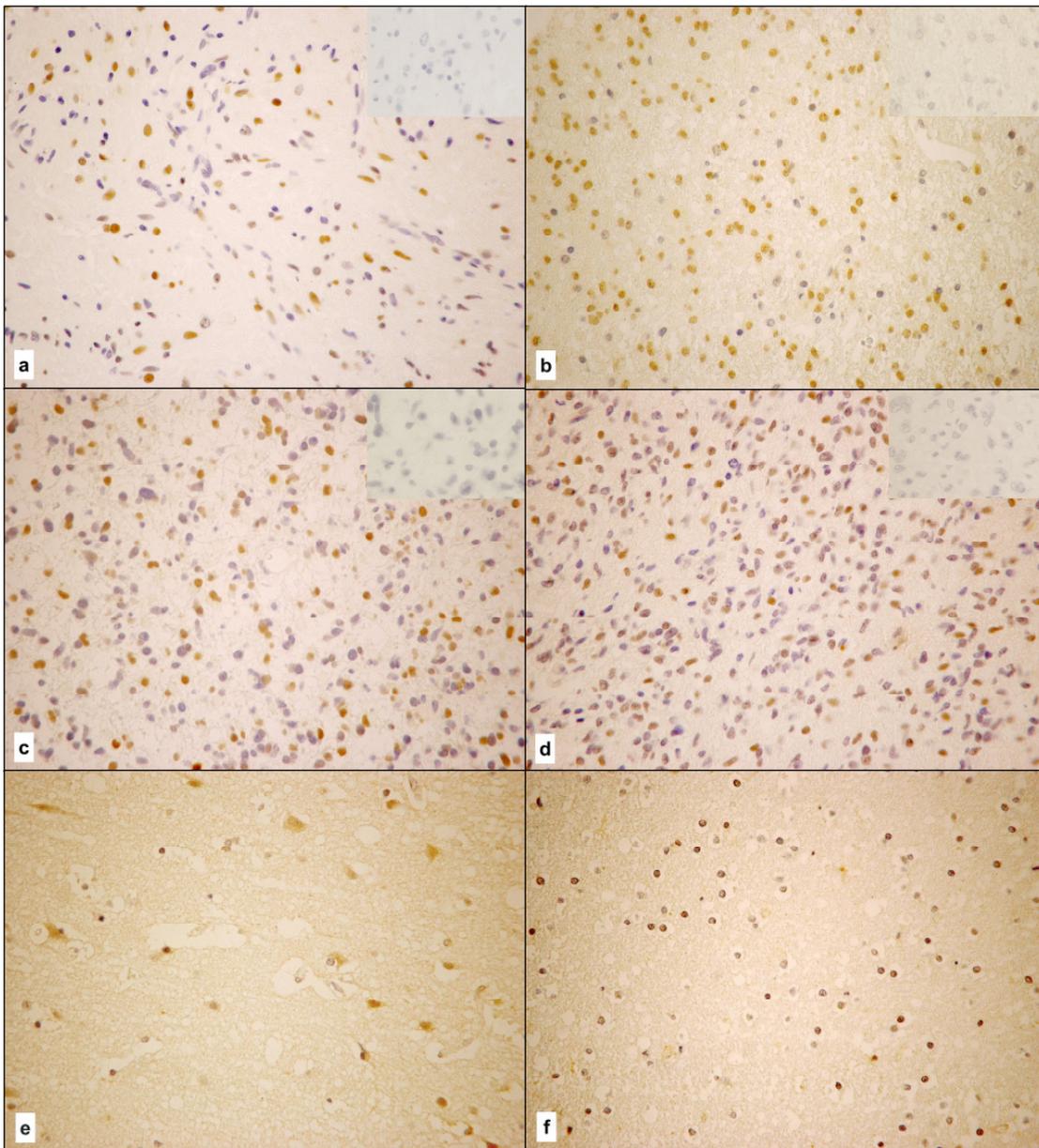


**Abbildung 14:** Expression von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

In der Analyse der Normalhirnproben (n=20) ergab sich ein Mittelwert des relativen aktivierte Caspase-3-Vorkommens in der grauen Substanz von 8,1% (95% KI 2,7-16,3%) und in der weißen Substanz ein Mittelwert von 3,6% (95% KI 0,7-8,4%). Im paarweisen Vergleich zeigte sich eine gering signifikant erhöhte Expression von aktivierter Caspase-3 in der grauen Substanz im Vergleich zur weißen Substanz (p=0,047).



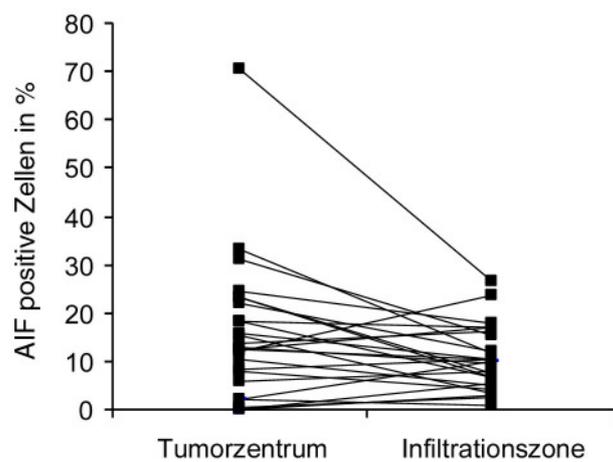
**Abbildung 15:** Darstellung der matched-pairs Analyse der aktivierte Caspase-3-immunreaktiven Zellen in grauer und weißer Substanz im paarweisen Vergleich (n=20). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.



**Abbildung 16: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen WHO-Grad I-IV und in Normalhirnkontrollen.** Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (a), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (b), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (c), Glioblastom WHO-Grad IV (d) sowie Rinde (e) und Mark (f) der Normalhirnkontrollen. Die Mittelwerte der aktivierten Caspase-3-immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Proteinexpression unter den vier Tumorgruppen sind der oben stehenden Grafik zu entnehmen.

### 3.2.4. AIF-Expression in der Infiltrationszone von Glioblastomen

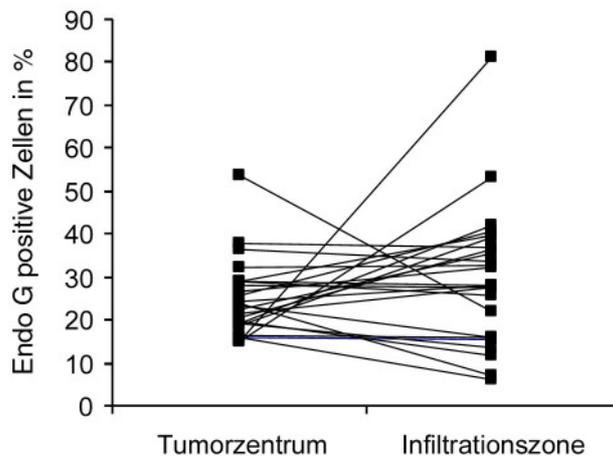
In den 25 untersuchten Infiltrationszonen primärer Glioblastome fand sich ein Mittelwert der AIF-immunreaktiven Zellen von 12,6% (95% KI 6,1-21,0%) und in den dazugehörigen Tumorzentren ein Mittelwert von 13,0% (95% KI 7,7-19,5%). Im paarweisen Vergleich fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Expressionsraten von AIF ( $p=0,09$ ), wobei die Tendenz zu einer vermehrten Expression im Tumorzentrum geht.



**Abbildung 17:** Darstellung der matched-pairs Analyse der AIF-immunreaktiven Zellen in Tumorzentrum und Infiltrationszonen (n=25). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

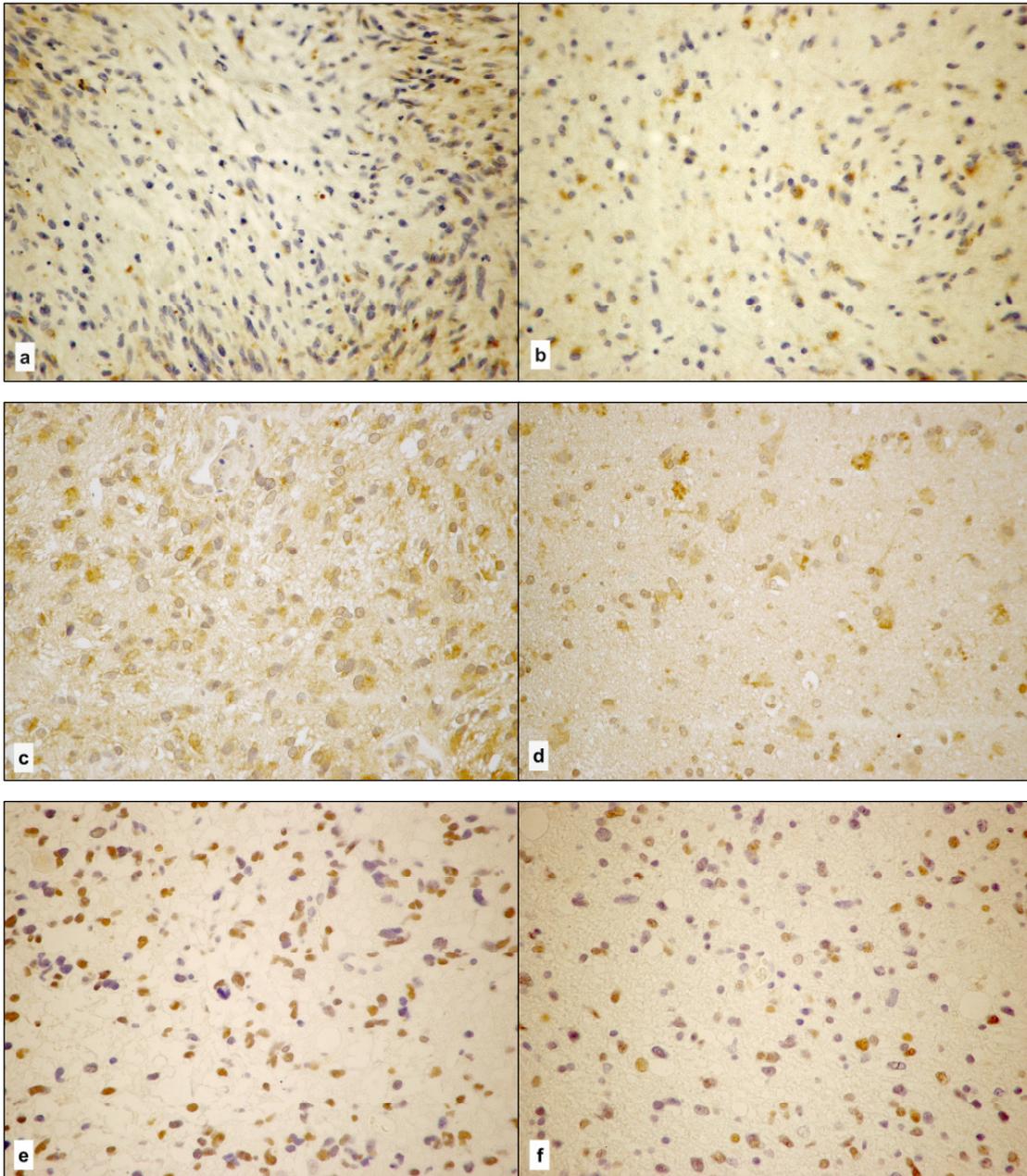
### 3.2.5. Endo G-Expression in der Infiltrationszone von Glioblastomen

In der immunhistochemischen Färbung von Endo G ergab sich für die 25 untersuchten Infiltrationszonen ein Mittelwert von 28,7% Endo G-positiver Zellen (95% KI 22,1-35,8%) und für die korrespondierenden Tumorzentren ein Mittelwert von 24,3% (95% KI 20,9-27,9%). Im paarweisen Vergleich zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Färbeniveau ( $p=0,24$ ).



**Abbildung 19:** Darstellung der matched-pairs Analyse der Endo G-immunreaktiven Zellen in Tumorzentrum und Infiltrationszone (n=25). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

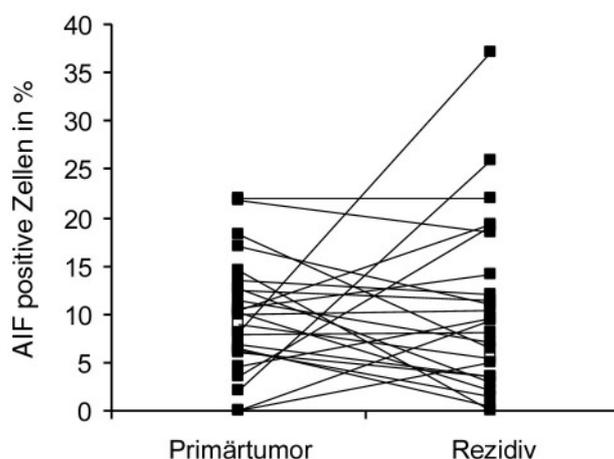




**Abbildung 23:** Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen der Tumorzentren (links) und Infiltrationszonen (rechts) für AIF (a und b), Endonuklease G (c und d) und aktivierter Caspase-3 (e und f). Für aktivierte Caspase-3 ergab sich eine signifikant höhere Expression in der Infiltrationszone im Vergleich zum Tumorzentrum ( $p=0,028$ ). Die Expression von AIF und Endonuklease G zeigte keinen signifikanten Unterschied.

### 3.2.7. AIF-Expression in Glioblastom-Rezidiven

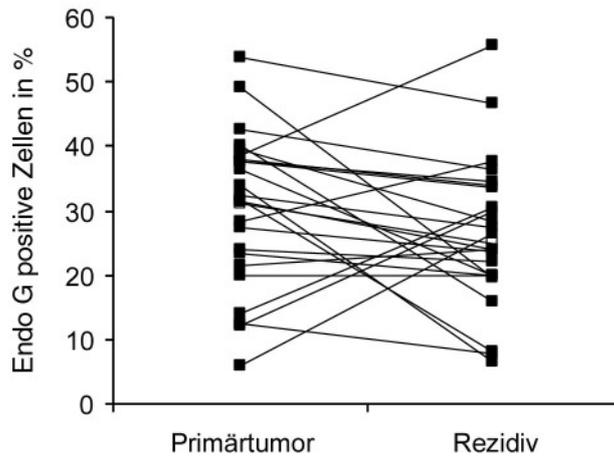
In der Analyse von 30 Rezidivtumoren primärer Glioblastome ergab sich ein Mittelwert der prozentual AIF-positiven Zellen von 8,8% (95% KI 6,2-12,0%), in den dazugehörigen Primärtumoren ein Mittelwert von 9,3% (95% KI 6,8-12,0%). Im paarweisen Vergleich zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Expression von AIF in Rezidiv- oder Primärtumoren ( $p=0,95$ ).



**Abbildung 18:** Darstellung der matched-pairs Analyse der AIF-immunreaktiven Zellen in Primärtumor und Rezidiv beim Glioblastom (n=30). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

### 3.2.8. Endo G-Expression in Glioblastom-Rezidiven

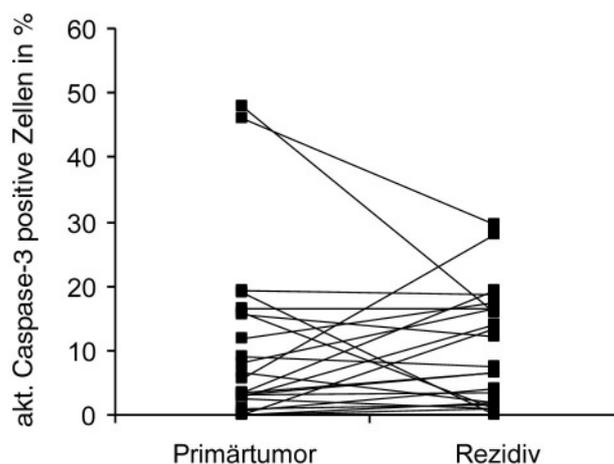
In der Analyse der Expression von Endo G in Rezidivtumoren primärer Glioblastome (n=31) ergab sich ein Mittelwert der prozentual positiv gefärbten Zellen von 25,1% (95% KI 21,1-29,2%) und in den dazugehörigen Primärtumoren ein Mittelwert von 29,4% (95% KI 24,9-34,0%). Im paarweisen Vergleich ergab sich für die Expression von Endo G kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,09$ ), wobei tendenziell ein vermehrtes Vorkommen von Endo G in den Primärtumoren festzustellen war.



**Abbildung 20:** Darstellung der matched-pairs Analyse der Endo G-immunreaktiven Zellen in Primärtumor und Rezidiv beim Glioblastom (n=31). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

### 3.2.9. Expression von aktivierter Caspase-3 in Glioblastom-Rezidiven

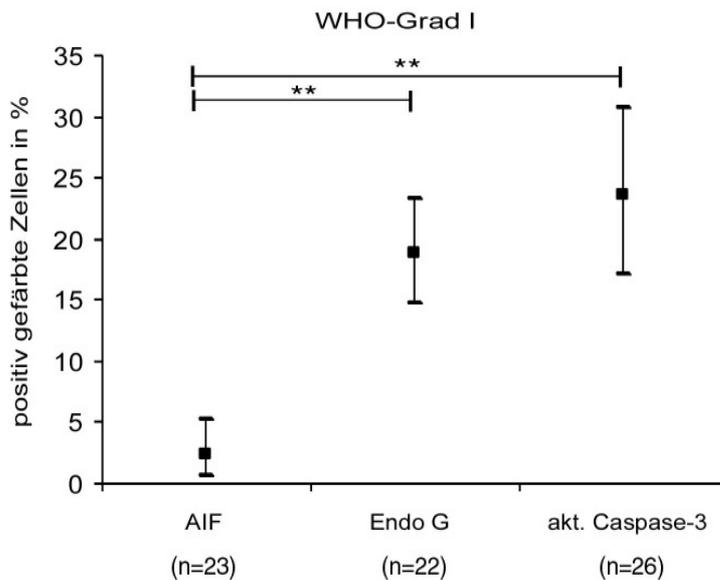
In der Untersuchung der Expression von aktivierter Caspase-3 in 31 Rezidivtumoren primärer Glioblastome ergab sich ein Mittelwert der prozentual gefärbten Zellen von 9,3% (95% KI 5,6-13,8%), in den dazugehörigen Primärtumoren ein Mittelwert von 6,4% (95% KI 3,1-10,8). Im paarweisen Vergleich zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,22$ ).



**Abbildung 22:** Darstellung der matched-pairs Analyse der aktivierte Caspase-3-immunreaktiven Zellen in Primärtumor und Rezidiv beim Glioblastom (n=31). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

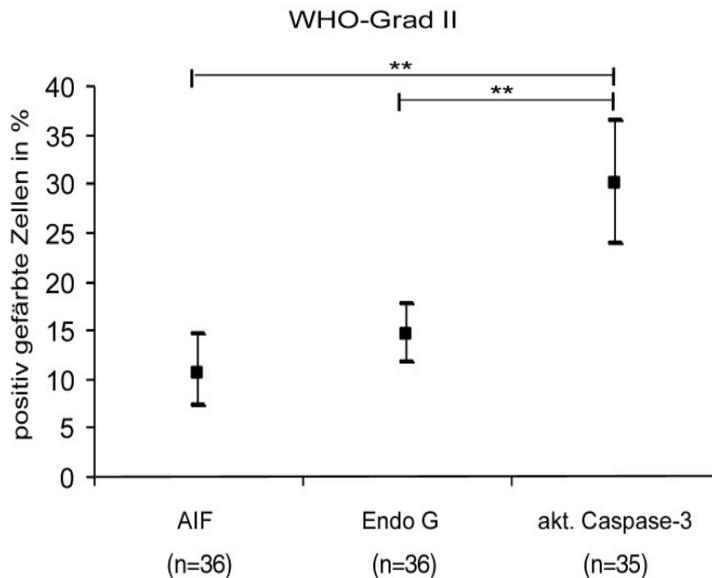
### 3.2.10. Vergleich der AIF-, Endo G- und aktivierte Caspase-3-Expression über die WHO-Grade I-IV

Im quantitativen Vergleich der immunreaktiven Zellen zeigte sich in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I eine signifikant erniedrigte Expression von AIF gegenüber Endo G und aktivierter Caspase-3 (AIF zu Endo G:  $p=0,001$ , AIF zu aktivierter Caspase-3:  $p=0,0002$ ).



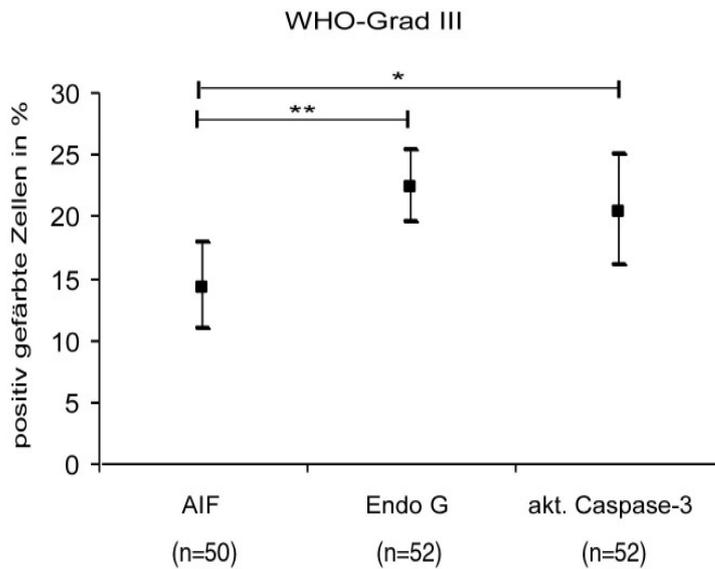
**Abbildung 24:** Expression von AIF, Endo G und aktivierter Caspase-3 in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I. Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

Der quantitative Vergleich der diffusen Astrozytome WHO-Grad II zeigte eine signifikant höhere Expression von aktivierter Caspase-3 im Vergleich zu AIF ( $p=0,004$ ) und Endo G ( $p=0,0002$ ), während zwischen AIF und Endo G kein nachweisbarer Unterschied bestand.



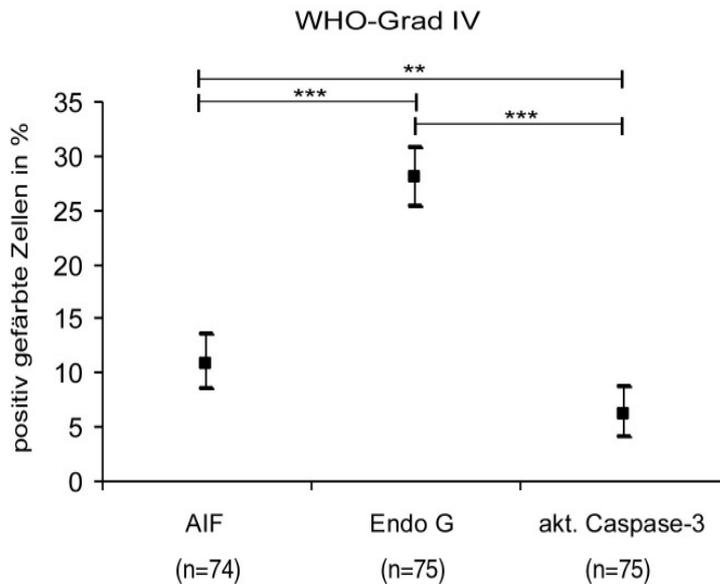
**Abbildung 25: Expression von AIF, Endo G und aktivierter Caspase-3 in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II.** Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

In anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III fand sich eine signifikant niedrigere Expression von AIF im Vergleich zu Endo G ( $p=0,001$ ) und aktivierter Caspase-3 ( $p=0,015$ ), wobei der Mittelwert der AIF-positiven Zellen im Vergleich zu den pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I deutlich höher ist (14,2% in Grad III zu 2,4% in Grad I). Endo G und aktivierte Caspase-3 liegen in den WHO-Grad III Tumoren ungefähr auf demselben Niveau (Mittelwert 22,4% und 20,4%).



**Abbildung 26: Expression von AIF, Endo G und aktivierter Caspase-3 in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III.** Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

In Glioblastomen WHO-Grad IV konnte ein starker Abfall der aktivierte Caspase-3-Expression im Vergleich zu den diffusen Astrozytomen WHO-Grad II und den anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad ermittelt werden. Mit jeweils einem  $p$ -Wert  $< 0,0001$  ist die Expression von aktivierter Caspase-3 und AIF niedriger als von Endo G. Im Vergleich von aktivierter Caspase-3 mit AIF zeigte sich ebenfalls ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau für aktivierte Caspase-3 in Glioblastomen WHO-Grad IV ( $p=0,002$ ).



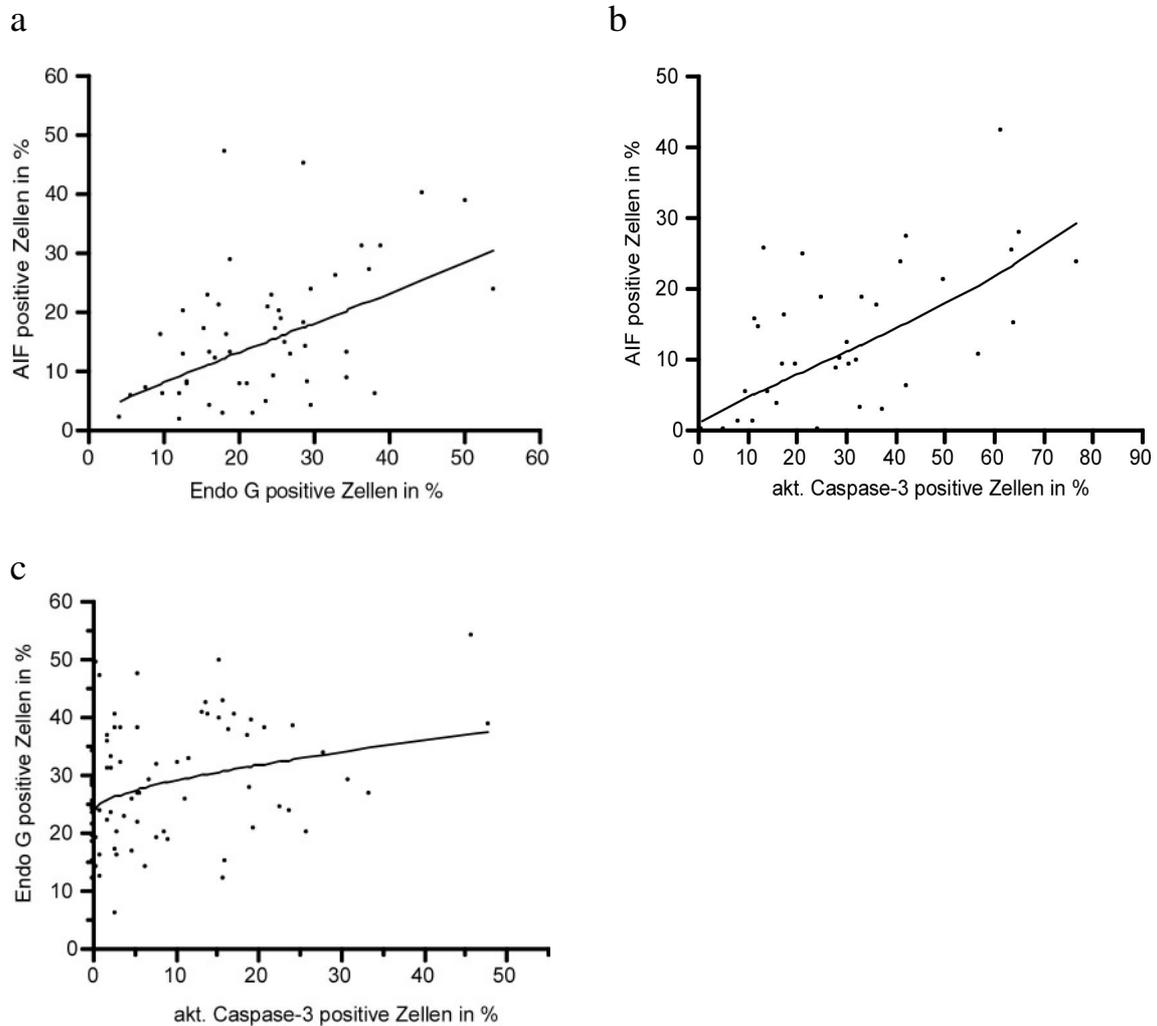
**Abbildung 27: Expression von AIF, Endo G und aktivierter Caspase-3 in Glioblastomen WHO-Grad IV.** Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

Die Tumorgade WHO I-IV betrachtet, zeigte sich durch die ansteigenden Expressionslevels von AIF und Endo G (siehe 3.2.1 und 3.2.2) und das abnehmende Expressionsprofil von aktivierter Caspase-3 (siehe 3.2.3) im direkten Vergleich ein gegenläufiges Bild. Quantitativ lässt sich in den niedriggradigen Gliomen vermehrt aktivierte Caspase-3 detektieren, während im Glioblastom WHO-Grad IV AIF und Endo G hochsignifikant häufiger nachweisbar sind als aktivierte Caspase-3.

### 3.2.11. Fallweise Korrelation der Antikörper

Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang der Proteinexpression zwischen AIF und Endo G in anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III ( $p=0,0003$ , Korrelationskoeffizient = 0,5 mit einem 95% KI von 0,25 bis 0,68,  $n=49$ ), zwischen AIF und aktivierter Caspase-3 in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II ( $p=0,0001$ , Korrelationskoeffizient = 0,61 mit einem 95% KI von 0,34 bis 0,78,  $n=35$ ) und zwischen Endo G und aktivierter Caspase-3 in Glioblastomen WHO-Grad IV ( $p=0,006$ , Korrelationskoeffizient = 0,31 mit einem 95% KI von 0,09 bis 0,5,  $n=75$ ). Ansonsten

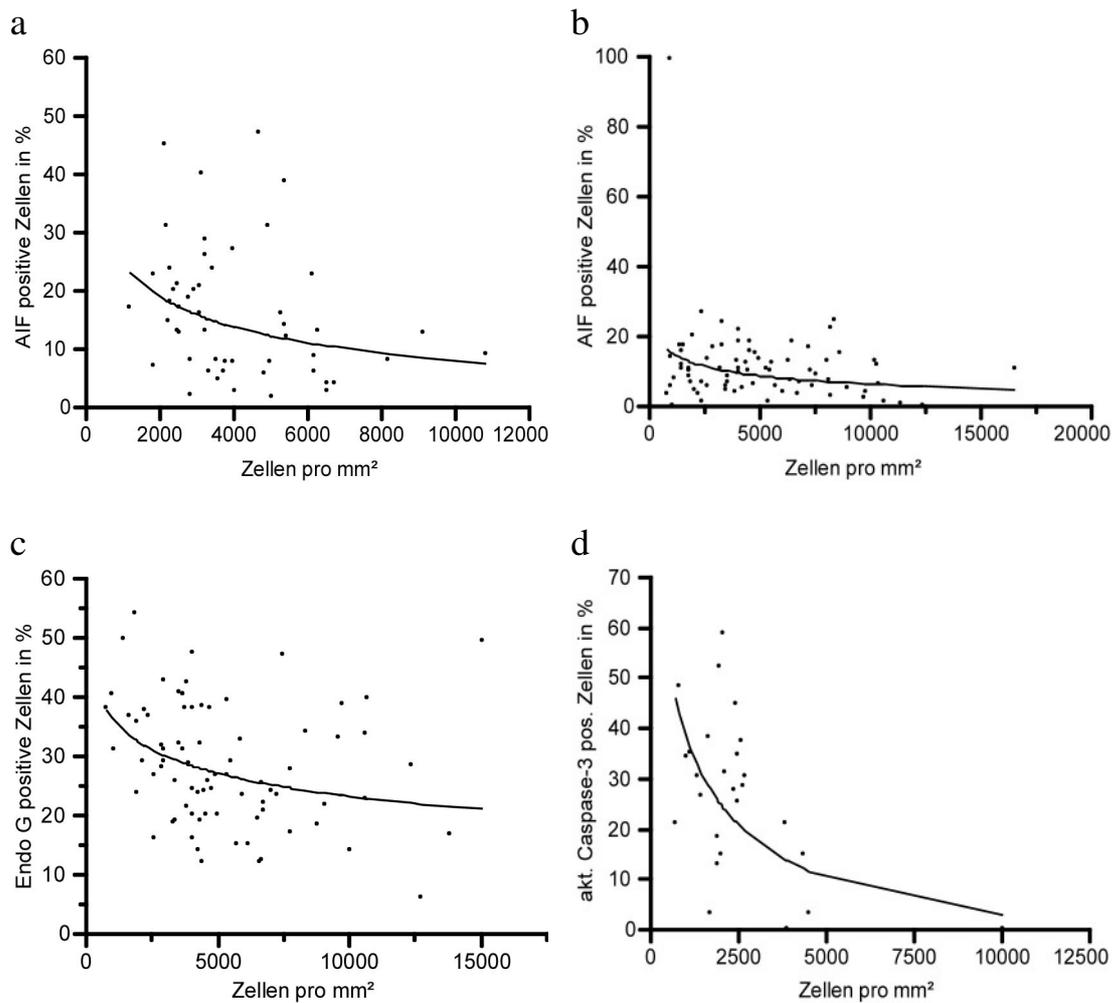
fand sich über die vier Tumorggrade keine positive oder negative Korrelation unter den drei Proteinen.



**Abbildung 28: Darstellung der fallweisen Korrelation der drei Faktoren.** Es fanden sich positive Korrelationen von (a) Endo G mit AIF in WHO-Grad III Tumoren ( $p=0,0003$ ,  $KK=0,5$ ), (b) von AIF und aktivierter Caspase-3 in WHO-Grad II Tumoren ( $p=0,0001$ ,  $KK=0,61$ ) (c) und von Endo G und aktivierter Caspase-3 in Glioblastomen WHO-Grad IV ( $p=0,006$ ,  $KK=0,31$ ).

### 3.2.12. Korrelation der Expression mit der Zelldichte

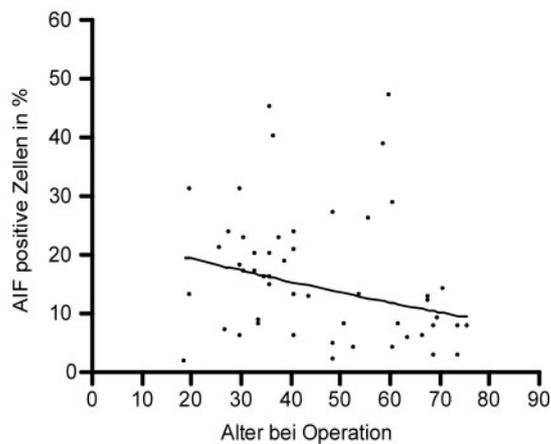
Für die Korrelation der Protein-Expression mit der Zelldichte ergab sich für AIF eine abnehmende Expression mit zunehmender Zelldichte in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ( $p=0,03$ , Korrelationskoeffizient  $-0,3$  mit einem 95% KI von  $-0,53$  bis  $-0,02$ ,  $n=50$ ) und in Glioblastomen WHO-Grad IV ( $p=0,03$ , Korrelationskoeffizient  $-0,26$  mit einem 95% KI von  $-0,46$  bis  $-0,03$ ,  $n=74$ ). Für Endo G zeigte sich eine stark abnehmende Expression mit zunehmender Zelldichte beim Glioblastom WHO-Grad IV ( $p=0,007$ , Korrelationskoeffizient  $-0,3$  mit einem 95% KI von  $-0,5$  bis  $-0,08$ ,  $n=75$ ). Für die aktivierte Caspase-3 konnte lediglich eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen Proteinexpression und Zelldichte bei pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I nachgewiesen werden ( $p=0,004$ , Korrelationskoeffizient  $-0,55$  mit einem 95% KI von  $-0,77$  bis  $-0,19$ ,  $n=26$ ). Es zeigte tendenziell auch beim Glioblastom WHO-Grad IV ein negativer Zusammenhang ( $p=0,09$ ).



**Abbildung 29:** Darstellung der Korrelation der Expression mit der Zelldichte. Es fanden sich negative Korrelationen der Expression von (a) AIF mit der Zelldichte in WHO-Grad III Tumoren ( $p=0,03$ ,  $KK=-0,3$ ,  $n=50$ ), (b) der Expression von AIF mit der Zelldichte beim Glioblastom WHO-Grad IV ( $p=0,03$ ,  $KK=-0,26$ ,  $n=74$ ), (c) der Expression von Endo G mit der Zelldichte beim Glioblastom WHO-Grad IV ( $p=0,007$ ,  $KK=-0,3$ ,  $n=75$ ) und (d) Korrelation der Expression von aktivierter Caspase-3 beim pilozytischen Astrozytom WHO-Grad 1 ( $p=0,004$ ,  $KK=-0,55$ ,  $n=26$ ).

### 3.2.13. Korrelation der Proteinexpression mit dem Patientenalter

Bei der Analyse von Proteinexpression in Abhängigkeit vom Patientenalter fand sich der einzige statistisch signifikante Zusammenhang bei der Expression von AIF in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III. Mit einem p-Wert von 0,049 zeigte sich eine geringere Expression mit steigendem Alter (Korrelationskoeffizient  $-0,28$  mit einem 95% KI von  $-0,51$  bis  $-0,005$ ,  $n=51$ ).



**Abbildung 30:** Darstellung der Korrelation von AIF-Expression in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation ( $n=51$ ).

### 3.3. Kaplan-Meier-Analyse

#### 3.3.1. Assoziation von Proteinexpression mit der Überlebenszeit

Die statistische Auswertung der zurückverfolgten Überlebenszeiten der Astrozytom-Patienten mit Tumoren der WHO-Grade II, III oder IV ergab in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III ein signifikantes Ergebnis für AIF. Die pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I fanden in der Überlebensanalyse keine Berücksichtigung, da im Beobachtungszeitraum lediglich ein Patient verstorben ist.

In anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III korrelierte eine hohe AIF-Expression mit einer längeren Überlebenszeit ( $p=0,0157$ ). Da diese Analyse jedoch auch für Grad II und Grad IV Tumore angewendet wurde, war eine Bonferroni-Holm-Korrektur des ermittelten p-Wertes notwendig, um den Einfluss des multiplen Testens auszuschließen. Somit liegt der p-Wert bei 0,0471, was lediglich eine gering signifikante Assoziation zwischen hoher AIF-Expression und längerem Überleben der Patienten mit anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III bedeutet, das 5%-Signifikanzniveau jedoch noch einhält.

Für Endo G erreicht die errechnete, leichte positive Korrelation der Expression mit dem Überleben ( $p=0,039$ ) in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III nach der Bonferroni-Holm-Korrektur keinen signifikanten Wert mehr. Die anderen beiden Tumorguppen (WHO-Grad II und IV) zeigten keine Assoziation der Expression von AIF und Endo G mit dem Überleben.

Für die Expression von aktivierter Caspase-3 gab es keine statistisch signifikante Assoziation mit dem Überleben in allen WHO-Graden.

### 3.3.2. Kaplan-Meier-Analyse für AIF, Endo G und aktivierte Caspase-3 in WHO-Grad II-IV Tumoren

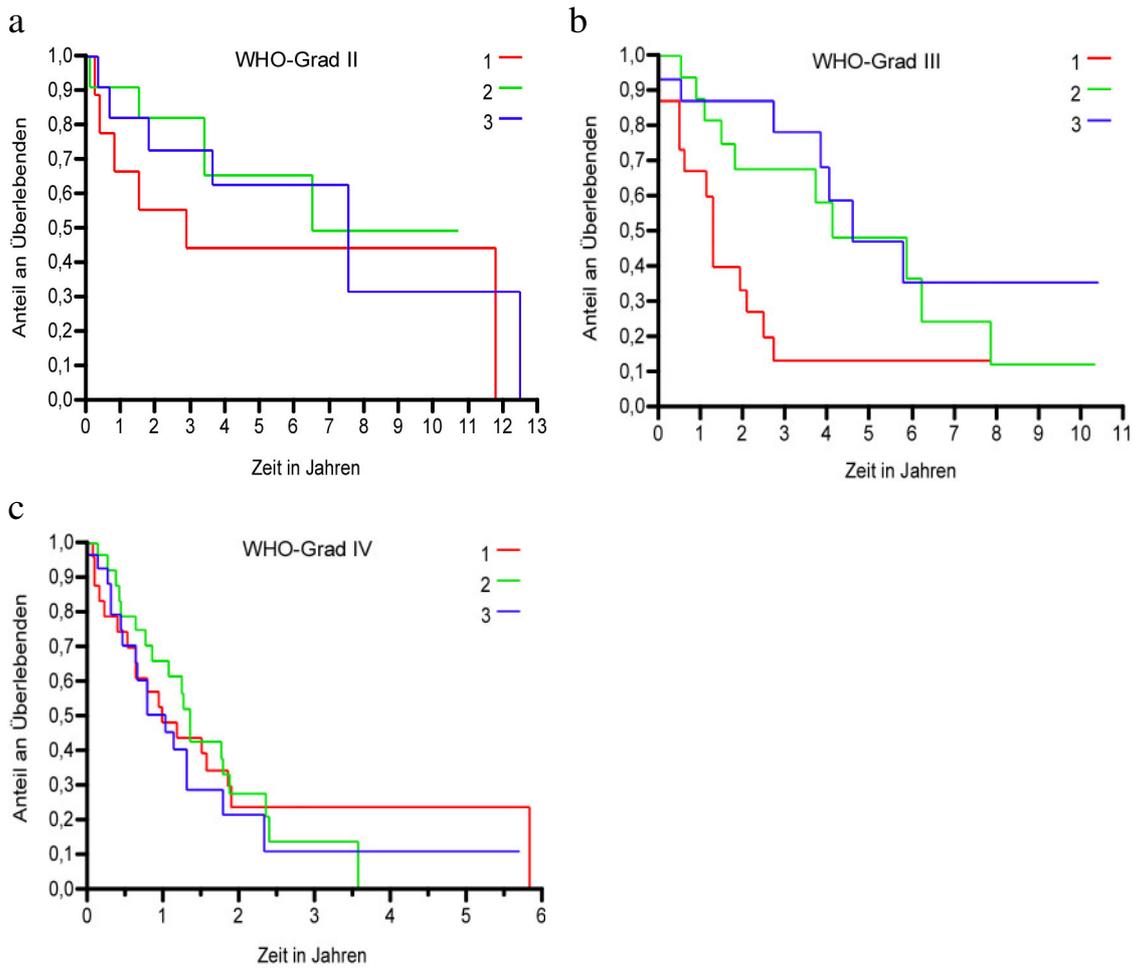
Für diese Untersuchung wurden für jeden der drei Faktoren folgende Terzile gebildet:

- 1: niedrige Expression
- 2: mittlere Expression
- 3: hohe Expression

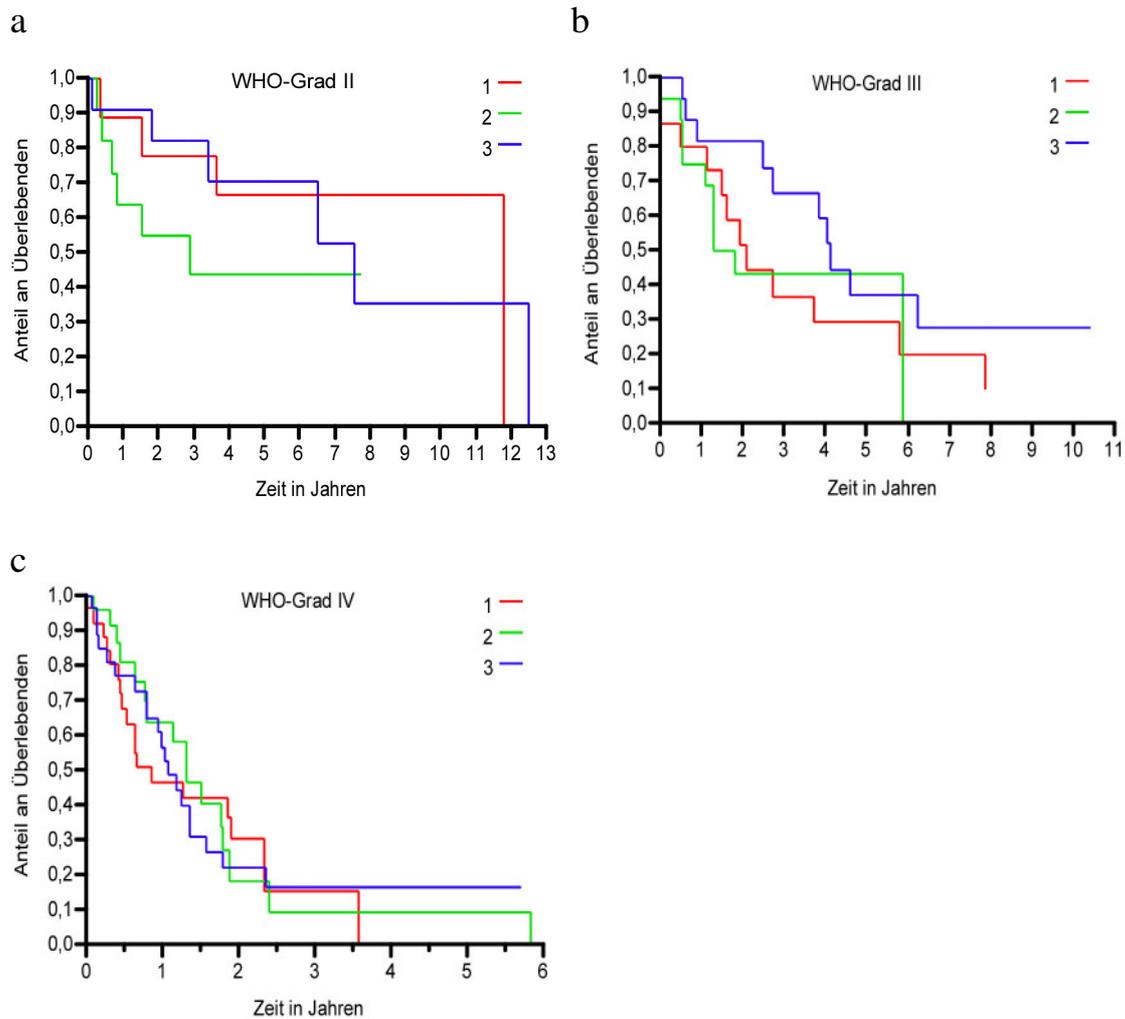
Dadurch sollte eine mögliche Assoziation der Proteinexpression mit dem Überleben der Patienten in WHO-Grad II-IV Tumoren veranschaulicht werden.

Für AIF in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Gruppe 3 mit hoher (n verstorben=7, n zensiert=8) und der Gruppe 2 mittlerer Expression (n verstorben=10, n zensiert=6) im Vergleich zur Gruppe 1 mit niedriger Expression (n verstorben=13, n zensiert=2). Dabei ergaben sich im Wilcoxon Test im Vergleich der Gruppen folgende p-Werte: 1 zu 3:  $p=0,005$ , 1 zu 2:  $p=0,02$  und 3 zu 2:  $p=0,55$ ). Der Mittelwert der Überlebenszeit in Gruppe 1 betrug 1,3 Jahre (95% KI 0,5-2,1 Jahre), in Gruppe 2 4,1 Jahre (95% KI 1,5-7,9 Jahre) und in Gruppe 3 4,6 Jahre (95% KI 2,8-... Jahre). In diffusen Astrozytomen WHO-Grad II und in Glioblastomen WHO-Grad IV fanden sich keine signifikanten Ergebnisse für die AIF-Expression (globales Signifikanzniveau im Wilcoxon Test für AIF in WHO-Grad II:  $p=0,49$  und in WHO-Grad IV  $p=0,53$ ).

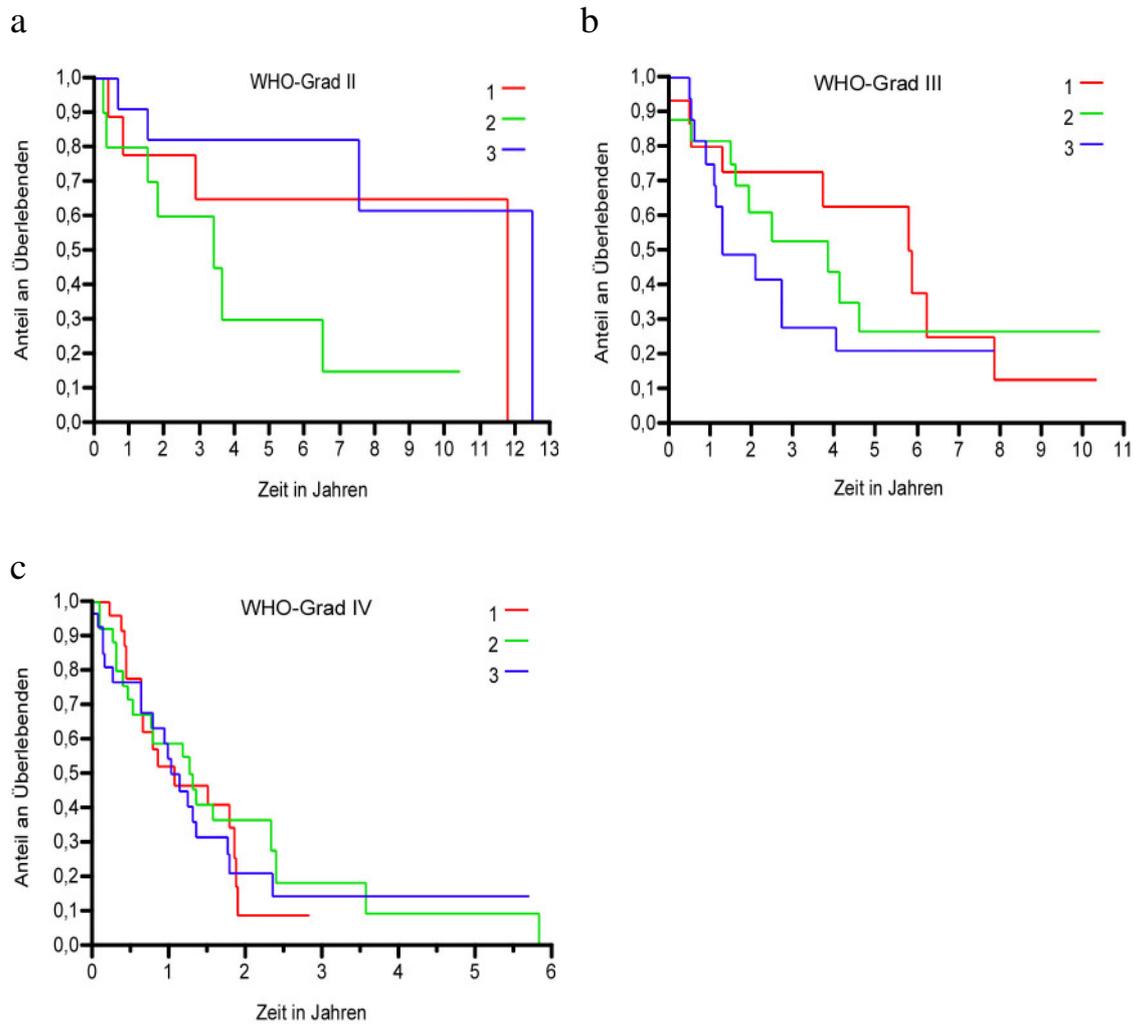
Für alle Kaplan-Meier-Analysen von Endo G und aktivierter Caspase-3 konnte keine signifikante Assoziation mit dem Überleben ermittelt werden (globales Signifikanzniveau im Wilcoxon Test für Endo G in WHO-Grad II:  $p=0,25$ , WHO-Grad III:  $p=0,23$ , WHO-Grad IV:  $p=0,67$  und für aktivierte Caspase-3 in WHO-Grad II:  $p=0,17$ , WHO-Grad III:  $p=0,38$  WHO-Grad IV:  $p=0,7$ ). Die Expression von Endo G in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III fiel in dieser Analyse auf ein globales Signifikanzniveau im Wilcoxon Test von  $p=0,23$  ab. Somit ist wie nach der Bonferroni-Holm-Korrektur der Korrelationsanalyse in 3.3.1 von keinem signifikanten Zusammenhang der Endo G-Expression mit dem Überleben in Astrozytomen WHO-Grad III auszugehen.



**Abbildung 31: Kaplan-Meier-Analysen von AIF in Astrozytomen WHO-Grad II (a), III (b) und IV (c).** Für die anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III zeigte sich ein signifikant längeres Überleben der Gruppen mit hoher (3) und mittlerer Expression (2) im Vergleich zur Gruppe 1 mit niedriger Expression (3 zu 1:  $p=0,005$ , 2 zu 1:  $p=0,002$ ). In WHO-Grad II und IV Tumoren zeigte sich kein statistisch signifikantes Ergebnis.



**Abbildung 32: Kaplan-Meier-Analysen von Endo G in Astrozytomen WHO-Grad II (a), III (b) und IV (c).** In den drei Tumorgruppen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der Endo G-Expression (Gruppe 1: niedrige Expression, Gruppe 2: mittlere Expression, Gruppe 3: hohe Expression) mit dem Überleben.



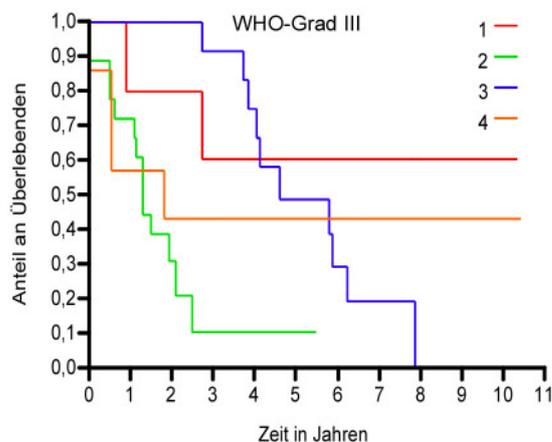
**Abbildung 33: Kaplan-Meier-Analysen von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen WHO-Grad II (a), III (b) und IV (c).** In den drei Tumorgruppen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der aktivierte Caspase-3-Expression (Gruppe 1: niedrige Expression, Gruppe 2: mittlere Expression, Gruppe 3: hohe Expression) mit dem Überleben.

### 3.3.3. Der Einfluss des Alters auf das Überleben

Die Korrelationsanalyse des Alters zum Zeitpunkt der Operation mit dem Überleben ergab ein hochsignifikantes Ergebnis für alle Tumorgruppen WHO-Grad II, III und IV. Ein hohes Lebensalter war mit einem kürzeren postoperativen Überleben verbunden in diffusen Astrozytomen mit  $p=0,01$ , in anaplastischen Astrozytomen mit  $p=0,0003$  und in Glioblastomen mit  $p=0,0003$ .

Weiter wurde ein statistischer Abgleich der altersbedingten Assoziation des Überlebens mit der Proteinexpression auf das Überleben durchgeführt. Für die Expression von AIF in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III fand sich eine schwächere Assoziation mit der Überlebenszeit als von der Überlebenszeit mit dem Patientenalter. Im Effekt Likelihood Ratio Test wurde für das Alter ein p-Wert von 0,002 und für die AIF-Expression ein p-Wert von 0,06 in WHO-Grad III Astrozytomen in Bezug auf die Beeinflussung des postoperativen Überlebens der Patienten ermittelt.

Dieses Ergebnis soll in folgendem Schaubild veranschaulicht werden:



**Abbildung 34: Einfluss des Alters versus der Expression von AIF in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III.** Es wurden vier Gruppen gebildet:

Gruppe 1: niedrige AIF-Expression, rel. geringes Alter (n verstorben=2, n zensiert=3)

Gruppe 2: niedrige AIF-Expression, rel. hohes Alter (n verstorben=14, n zensiert=4)

Gruppe 3: hohe AIF-Expression, rel. geringes Alter (n verstorben=10, n zensiert=6)

Gruppe 4: hohe AIF-Expression, rel. hohes Alter (n verstorben=4, n zensiert=3)

Gruppe 2 zeigt die geringsten Überlebenszeiträume mit einer hohen Frequenz an Sterbefällen. Es handelt sich um die älteren Patienten mit niedriger AIF-Expression. Am längsten leben die jüngeren Patienten mit hoher AIF-Expression, was in der Kurve von Gruppe 3 abzulesen ist. Weiter findet sich in der kleinen Gruppe 4 der älteren Patienten mit hoher AIF-Expression ein ähnlich starker Abfall der Überlebenden wie in Gruppe 2. Gruppe 1 mit den jüngeren Patienten und niedriger Expression ist wegen der geringen Fallzahlen nur schwer zu interpretieren, die Tendenz geht jedoch zu längeren Überlebenszeiten wie in Gruppe 3. Das globale Signifikanzniveau im Wilcoxon Test lag bei  $p=0,002$ .

Insgesamt werden die Kurvenverläufe mehr vom Alter der Patienten dominiert als von der AIF-Expression. Zu bedenken ist jedoch, dass die AIF-Expression in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III mit dem Alter abnimmt (siehe 3.2.13) und die Gruppe von älteren Patienten mit hoher AIF-Expression in der obigen Darstellung (Gruppe 4) mit vier Todesfällen relativ klein war. Somit ist ein Vergleich der Gruppen 3 und 4 nur schwer möglich, allerdings spricht der Effekt Likelihood Ratio Test deutlich für das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation als bestimmender Faktor für das postoperative Überleben.

#### 4. DISKUSSION

Das momentane Verständnis von Tumoren in menschlichem Gewebe beinhaltet die Hypothese, dass Störungen der Regulation apoptotischer Signalwege und damit verbundene Störungen und Hinderungen des Ablaufs der Apoptose für die Entwicklung von Tumorerkrankungen sowie für deren mögliche Resistenz gegenüber zytotoxischer Chemotherapie, wie es bei humanen Gliomen der Fall ist, mit verantwortlich sind. In aktuellen Untersuchungen werden zytotoxische Therapiemöglichkeiten durch die Stimulation der apoptotischen Signalkaskaden in Gliomen erforscht. Dabei sollen für eine möglichst effektive Apoptoseauslösung sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Mechanismen des Zelltods angestoßen werden (Fulda et al. 1999, Nomura et al. 2004, Temme et al. 2005, Trejo-Solis et al. 2005).

Um die Rolle der Caspase-unabhängigen mitochondrialen Apoptosefaktoren AIF und Endonuklease G in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ihre Expression in den Tumoren im Vergleich zu aktivierter Caspase-3 und ihre Assoziation mit dem Überleben der Patienten untersucht. Damit soll in diesen weitgehend chemoresistenten Tumoren das Verständnis der Caspase-unabhängigen apoptotischen Mechanismen verbessert und deren Wichtigkeit für mögliche zukünftige Therapieansätze überprüft werden.

#### 4.1. Zelldichte in Astrozytomen

In der Auszählung der 194 untersuchten Astrozytome unterschiedlicher WHO-Grade fand sich eine zunehmende Zelldichte innerhalb der Gruppe der diffus infiltrierenden Astrozytome von WHO-Grad II bis WHO-Grad IV. Die Werte der Zelldichte in Zellen/mm<sup>2</sup> stimmen weitgehend mit den Angaben in der WHO-Klassifikation der Hirntumore überein (Kleihues und Cavanee 2000). Dort wird die Zelldichte für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I als niedrig, für diffuse Astrozytome WHO-Grad II als mäßig und für Glioblastome WHO-Grad IV als am höchsten angegeben. In der vorliegenden Auswertung fand sich die durchschnittlich niedrigste Zelldichte bei diffusen Astrozytomen WHO Grad II, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I. Die höchste Zelldichte wurde in Glioblastomen WHO-Grad IV ermittelt. Die prinzipiell höheren Werte der Zelldichte über alle vier Tumorggrade im Vergleich zur WHO-Klassifikation kann mit der Auswahl der Tumorgewebe für die TMA-Präparate erklärt werden. Dabei wurden für jede Tumorggruppe histopathologisch charakteristische Areale ausgewählt, die vermehrt in Regionen mit hoher Zelldichte zu finden sind. Dieses Vorgehen ist mit der WHO-Empfehlung zur Diagnosefindung in zellreichen Tumorregionen vereinbar. Insgesamt zeigt die Auswertung der Zelldichte die Validität der TMA-Methode bei Astrozytomen. In den 25 untersuchten Infiltrationszonen von Glioblastomen wurde eine Abnahme der Zelldichte um mehr als die Hälfte im Vergleich zu ihrem Tumorzentrum beobachtet. Dabei lag die Zelldichte in der Infiltrationszone deutlich höher als in der weißen Substanz der Normalhirnkontrollen (Tumorzentrum: 4800c/mm<sup>2</sup>, Infiltration: 2000c/mm<sup>2</sup>, weiße Substanz: 1000 c/mm<sup>2</sup>). Die Infiltrationszone wurde im untersuchten Gewebe definiert als eine dem Tumor benachbarte Region mit deutlich reduzierter Zelldichte ohne Atypiezeichen wie vermehrten Mitosen, Gefäßproliferaten oder Nekrosen sowie eindeutig erkennbarem residualen ZNS-Gewebe. Diese Gebiete werden von wandernden Tumorzellen durchdrungen (Pilkington 1994). Die ermittelten Ergebnisse demonstrieren die zutreffende Auswahl der Gewebeproben als Infiltrationszonen in der Tumorperipherie, wobei zu bedenken ist, dass die gliale Umgebung des Tumors nicht vom eigentlichen Tumorgewebe unterschieden werden

konnte, wodurch auch normales Gliagewebe und reaktiv veränderte Astrozyten mitgezählt wurden.

In der Analyse der Zelldichte in 31 Glioblastom-Rezidiven fand sich eine niedrigere Zelldichte als in den Primärtumoren. Dies kann in Zusammenhang mit der Wirkung der bei der Behandlung des Primärtumors erfolgten Radiochemotherapie auf die Tumorzellen stehen. In Rezidiven von anaplastischen Astrozytomen und von Glioblastomen wurde histologisch eine Riesenzellbildung festgestellt (Ogashiwa et al. 1989), was zu Abnahme der Zelldichte führen kann.

#### **4.2. Expression der untersuchten Apoptosefaktoren in Astrozytomen und in Normalhirn**

Das Verhältnis von Proliferation und Zelltod bestimmt nach heutiger Ansicht das Wachstum eines Tumors (Thompson 1995). Aus diesem Grund haben mit Astrozytomen verschiedene Untersuchungen stattgefunden, die die Proliferation mit dem Proliferationsmarker MIB-1 (Antikörper gegen das Proliferationsantigen Ki-67) und spontane Apoptosen mit der TUNEL-Färbung (in situ Darstellung von DNA-Strangbrüchen) ermittelt haben. Vor der Diskussion der einzelnen Apoptosefaktoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, soll ein Überblick über das grundlegende apoptotische Niveau in Astrozytomen gegeben werden.

Der Apoptoseindex in Astrozytomen steigt mit dem Malignitätsgrad an. Somit finden sich in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I die wenigsten und in Glioblastomen WHO-Grad IV die meisten spontanen Apoptosen (Ellison et al. 1995, Heesters et al. 1999, Kordek et al. 1996, Ralte et al. 2001). Exemplarisch sollen die ermittelten Apoptoseraten (TUNEL positive Zellen) und Proliferationswerte (MIB-1 positive Zellen) aus der Untersuchung mit den meisten Fallzahlen von Heesters et al. genannt werden:

Spontane Apoptose: Astrozytome WHO Grad I Mittelwert 0,3% (n=20), WHO Grad II 0,5% (n=8), WHO Grad III 0,8% (n=28) und WHO Grad IV 1,7% (n=136).

Proliferation: Astrozytome WHO Grad I Mittelwert 6,9% (n=41), WHO Grad II 10% (n=10), WHO Grad III 19% (n=45) und WHO Grad IV 28,2% (n=176).

Hierbei fand sich in allen vier Tumorgraden eine positive Korrelation der spontanen Apoptosen mit der ermittelten Tumorpheriferation, die ebenso von WHO Grad I bis IV zunimmt. Die prinzipiell niedrigen Werte an spontanen Apoptosen werden in den anderen Untersuchungen bestätigt und erklären sich über den Zeitpunkt der Apoptose, den die Markierung von DNA-Strangbrüchen mit TUNEL detektiert. Die nachfolgende Zellschrumpfung und Ausbildung apoptotischer Körperchen mit Phagozytose erfolgt sehr rasch, so dass der Zeitraum, in dem apoptotische Zellen vor ihrer Auflösung TUNEL-positiv sind oder apoptotische Körperchen zeigen, sehr kurz ist (Kordek et al. 1996). Somit darf trotz niedriger Werte in der TUNEL-Färbung die apoptotische Aktivität eines Tumors nicht unterschätzt werden. In der Histologie betrachtet, läuft der apoptotische Untergang einer Zelle innerhalb von drei Stunden und damit rasch ab (Bursch et al. 1990).

Eine Ausnahme bildet die Studie von Nakamizo et al., in der der Apoptoseindex in pilozytischen Astrozytomen mit 17,9% im Mittel deutlich über den Werten der anderen drei Astrozytomgruppen liegt (Bsp.: Glioblastom WHO Grad IV 2,1%). Die Proliferationsraten, die in dieser Studie mit MIB-1 ermittelt wurden, sind mit den anderen Studien vereinbar und steigen mit dem WHO Grad an. Die Autoren erklären die deutlich gesteigerte Apoptose in WHO Grad I Astrozytomen als Ausdruck der biologischen Gutartigkeit des Tumors (Nakamizo et al. 2002). Insgesamt beruhen ihre Ergebnisse jedoch auf der Analyse von nur sechs pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I. Zudem ist die TUNEL-Färbung anfällig für falsch-positive Ergebnisse (Garrity et al. 2003), weshalb man für die weitere Besprechung der Apoptose in Astrozytomen von Apoptoseraten, die im Bereich der oben genannten Werte von Heesters et al. liegen, ausgehen sollte.

Einen weiteren Anhalt für steigende Apoptoseraten mit dem WHO-Grad gibt eine noch nicht veröffentlichte Untersuchung unserer Arbeitsgruppe am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen. Capper et al. führten die TUNEL-Methode an denselben TMA-Tumorstanzen durch, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Dabei wurden für anaplastische Astrozytome WHO-Grad I 0,01% (n=25) der Zellen TUNEL-positiv bestimmt, diffuse Astrozytome WHO Grad II zeigten zu 0,04% (n=37), anaplastische Astrozytome WHO-Grad III zu 0,17% (n=49) und Glioblastome WHO-Grad IV zu 0,14% (n=76) spontane Apoptosen (Capper et al. 2006). Diese Werte liegen

um ein Vielfaches unter denen von Heesters et al. ermittelten Werten, zeigen jedoch ebenfalls das Muster einer ansteigenden spontanen Apoptose mit dem WHO-Grad.

Die meisten Apoptosen in Glioblastomen können aufgrund der gesteigerten Proliferation (Ellison et al. 1995, Heesters et al. 1999) und der vermehrten Hypoxie in diesen hochmalignen Tumoren zustande kommen. Die stattfindende Apoptose kann ein Marker für den Selektionsdruck auf die Tumorzellen sein, Resistenzen zu entwickeln (Steinbach und Weller 2004).

#### **4.2.1. Expression von AIF in Astrozytomen**

Die Expression von AIF in Astrozytomen WHO-Grad I-IV zeigt signifikant höhere Werte in den diffus infiltrierenden Astrozytomen WHO-Grad II, III und IV im Vergleich zu den pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I. Zwischen den Tumoren WHO-Grad II-IV besteht kein signifikanter Unterschied, wobei die anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III den höchsten Durchschnittswert an AIF-immunreaktiven Zellen aufweisen.

Der hohe Anteil AIF-positiver Zellen (14,2% in anaplastischen Astrozytomen) kann damit zusammenhängen, dass AIF zu einem frühen Zeitpunkt in der apoptotischen Signalkaskade aus den Mitochondrien frei wird und neben dem nukleären DNA-Verdau auch an der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit der Freilassung von Cytochrom C beteiligt ist (Daugas et al. 2000, Löffler et al. 2001). Weiter wird die Wirkungsweise von AIF als langsam eingeschätzt. Der bewirkte large-scale DNA-Abbau könnte eine Vorarbeit für die Caspase-abhängigen DNasen darstellen, führt aber auch in Abwesenheit von Caspasenaktivität zum Zelltod (Chipuk und Green 2005, Susin et al. 1999). Somit könnten aufgrund des Wirkungsprofils des Proteins apoptotische Zellen eine zytoplasmatische oder nukleäre Immunoreaktivität für AIF über einen längeren Zeitraum aufweisen, was die ermittelten hohen Färbewerte erklären könnte.

Für den Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen spontanen Apoptose sollte beachtet werden, dass bei der Caspase-unabhängigen Apoptose der AIF-vermittelte DNA-Abbau andersartig abläuft als beim Zelltod mit Caspasenaktivierung. Es kommt zu large-scale-DNA-Fragmentierung (50 kb Bruchstücke) und peripherer

Chromatinkondensation sowie anschließend zur Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran, was die Phagozytose der Zelle vermitteln kann (Susin et al. 1999, Susin et al. 2000). Mit der TUNEL-Färbung werden DNA-Bruchstücke detektiert, wie sie durch den AIF-vermittelten DNA-Verdau möglicherweise nicht oder nur selten vorkommen, sondern vor allem bei dem Verdau durch Caspase-abhängige DNasen entstehen. Somit ist es denkbar, dass Caspase-unabhängige apoptotische Veränderungen durch AIF in Tumorzellen bisher unterschätzt wurden, da sie mit keinem gängigen Apoptose-Marker sicher objektivierbar sind (Chipuk und Green 2005).

Da AIF auch an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist und ein Fehlen von AIF in der Entwicklung zu Defekten in der Embryogenese und zu neuronalen Zellschädigungen führt, ist von einer wichtigen Rolle des Proteins nicht nur im Caspase-unabhängigen Zelltod, sondern auch in stoffwechselaktiven gesunden Zelle auszugehen (Joza et al. 2001, Klein et al. 2002, Vahsen et al. 2004). Hierbei ist zu beachten, dass die vermehrte Expression von AIF in diffus infiltrierenden Gliomen am gesteigerten Energiebedarf dieser im Vergleich zu pilozytischen Astrozytomen schneller wachsenden Tumore liegen könnte und nicht immer aufgrund einer apoptotischen Aktivierung der Zelle zustande kommen muss.

In einer Arbeit von Daugas et al. wird beschrieben, dass AIF-positive Zellen auch nekrotisch werden können, das heißt, dass die zu einem frühen Zeitpunkt der Zellschädigung einsetzende AIF-Freisetzung auch geschieht, wenn das Energieniveau der Zelle nicht mehr für einen apoptotischen Untergang ausreicht und in einem nekrotischen Sterben der Zelle endet (Daugas et al. 2000). Die Rolle von AIF bei der Nekrose wird unterstützt von der Beschreibung eines Bcl-2-vermittelten Nekrostopps (Shimizu et al. 1996), was auf eine Rolle der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, auch bei der Nekrose, schließen lässt. Verschiedene tödliche Stressreize auf die Zelle führen zum Freiwerden der mitochondrialen Apoptoseproteine und Caspasenaktivierung. Im Folgenden entscheidet das Energieniveau und die mitochondriale Restfunktion wahlweise über den apoptotischen Abbau der Zelle oder den nekrotischen Untergang (Kroemer et al. 1998, Saikumar et al. 1998). Daraus folgt für AIF, dass das Protein zellulären Stress zu einem frühen Zeitpunkt markieren könnte, zu dem die Entscheidung über einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod noch nicht

gefallen ist. Die stärkere Expression in diffus infiltrierenden Astrozytomen im Vergleich zu pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I kann demnach mit den zunehmenden spontanen Apoptosen in höhergradigen Astrozytomen als auch mit den vermehrt auftretenden Nekrosen in WHO-Grad III und WHO-Grad IV Tumoren erklärt werden.

Löffler et al. beschreiben drei Möglichkeiten, wie AIF auf den nukleären DNA-Abbau einwirkt: 1) AIF hat eine eigene DNase Aktivität, 2) AIF erhöht die Sensitivität für lokal vorhandene DNase und 3) AIF aktiviert unbekannte „downstream-DNasen“ (Löffler et al 2001). Über den genauen Wirkmechanismus herrscht in der Literatur Unklarheit. Es wurden jedoch bereits wichtige Kofaktoren für AIF in seiner apoptotischen Funktion gefunden. So führt AIF nur zusammen mit Cyclophyllin A zu Chromatinkondensation (Cande et al 2004a), und ROS (reactive oxygene species) sind für die Translokation in den Zellkern und die vollständige Aktivierung von AIF nötig, da die Applikation von Antioxidantien die Translokation verhindern (Park et al. 2005, Trejo-Solis et al. 2005). Somit scheint AIF nicht unmittelbar auf die DNA zu wirken, sondern steht wohl während der Translokation und nach Erreichen des Zellkerns mit anderen Molekülen in Wechselwirkung. Als mögliche Inhibitoren von AIF werden das Hitzeschockprotein 70 und das IAP-Protein Survivin diskutiert. Hsp 70 verhinderte den AIF-vermittelten DNA-Abbau (Ravagnan et al. 2001). Eine Hemmung von Survivin führte zu einer dramatischen Erhöhung von AIF in Neuroblastomen (Shankar et al. 2001) und über einen adenoviralen Vektor applizierte Survivin-Mutanten induzierten die Translokation von AIF in den Nukleus und Caspase-unabhängige Apoptose in Glioblastomen (Temme et al. 2005). Diese Vermutungen zur Rolle von AIF würden den vorhandenen Regulationsmodellen des proapoptotischen Smac, das von XIAP gehemmt wird oder der Caspase-abhängigen DNase (CAD), die von ihrem spezifischen „Inhibitor of CAD“ (ICAD) reguliert wird, ähneln.

#### **4.2.2. Expression von Endo G in Astrozytomen**

Die immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit für Endo G zeigten ein ansteigendes Expressionsmuster des Proteins von WHO-Grad II bis IV mit den höchsten Werten in hochmalignen Astrozytomen WHO-Grad III und IV, wobei die

Glioblastome zu allen drei anderen Tumorgruppen eine signifikant höhere Expression von Endo G aufwiesen. In pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I lag die Proteinexpression zwischen den Werten für diffuse Astrozytome WHO-Grad II und anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III.

Diese Beobachtung der ansteigenden Expression des nukleären Apoptosefaktors mit dem WHO-Grad lässt sich prinzipiell mit den ebenfalls ansteigenden Werten der spontanen Apoptosen in Astrozytomen vereinbaren (Heesters et al. 1999, Kordek et al. 1996). Ein deutlicher Unterschied stellt jedoch das prozentuale Vorkommen an positiven Zellen dar. Glioblastome WHO-Grad IV zeigten im Mittel 28% positive Zellen für Endo G, was deutlich über den in der Literatur beschriebenen Werten für spontane Apoptosen in Glioblastomen liegt (Capper et al. 0,14%, Heesters et al. 1,7%). Im Gegensatz zu AIF führt der DNA-Verdau durch Endo G zu Einzelstrangbrüchen mit nukleosomalen Bruchstücken von ca. 190 bp und subnukleosomalen Bruchstücken von ca. 10 bp (Widlak et al. 2001). Die dadurch freiliegenden 3'-OH-Gruppen sind mit der TUNEL-Methode zu detektieren, weshalb sich ein Verdau der nukleären DNA durch Endo G in einer positiven TUNEL-Färbung niederschlagen sollte (Gavrieli et al. 1992, Ishihara und Shimamoto 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht nur ein nukleäres Signal für Endo G als positiv gewertet, sondern auch zytoplasmatische Signale. Dabei ist zu bedenken, dass Endo G auch eine RNase ist und Funktionen im apoptotischen Abbau der RNA sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma hat (Kalinowska et al. 2005, Widlak et al. 2001). Des Weiteren sind in der Literatur zahlreiche andere Funktionen für Endo G im Zellstoffwechsel beschrieben worden. So soll es an der Replikation und an der Reparatur der mtDNA beteiligt sein (Cote und Ruiz-Carrillo et al. 1993, Ikeda und Ozaki 1997) und sogar an der Zellproliferation mitwirken, indem es wichtige Strangbrüche für die nukleäre DNA-Replikation setzt (Huang et al. 2006). Die von der Apoptose unabhängigen, weiteren Funktionen von Endo G können das hohe Vorkommen des Proteins in den sehr stoffwechselaktiven Tumorzellen erklären. Dies soll jedoch nicht den starken Einfluss des Proteins auf den apoptotischen DNA-Verdau schmälern, da extramitochondrial lokalisiertes Endo G einen apoptotischen DNA-Verdau bewirken kann und eine Hemmung der Aktivität durch einen Antikörper zu einer Abnahme der DNA-Fragmentierung führt (Li et al. 2001, Schafer et al. 2004).

Im Gegensatz zu AIF wird Endo G nicht bei Nekrosen freigesetzt (van Loo et al. 2001). Somit lässt sich die vermehrte Expression in höhergradigen Gliomen nicht ähnlich wie bei AIF mit den häufigen nekrotischen Zelluntergängen in diesen Tumoren erklären.

Einen inhibitorischen Effekt auf Endo G hat das Hitzeschockprotein 70, das somit eine wichtige Rolle in der Regulation der nukleären DNAsen spielen kann (Kalinowska et al. 2005). Eine Neutralisierung des Hsp 70 führt die Zelle auf Caspase-unabhängigem Weg in den Tod (Nylandsted et al. 2000). Zusätzlich wirkt es auch als Inhibitor von AIF (Ravagnan et al. 2001). Hsp 70 könnte die mögliche Interaktion zwischen AIF und Endo G (oder die Wirkung des AIF/Endo G-Komplexes) hemmen. Weiter verhindert Hsp 70 die Ausbildung des Apoptosom und antagonisiert damit den Caspase-abhängigen Cytochrom C-vermittelten Weg der Apoptose (Beere et al. 2000, Saleh et al. 2000). Dass Hsp 70 als genereller Inhibitor der Apoptose die onkogene Transformation von Zellen fördert, konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Seo et al. 1996, Volloch und Sherman 1999). Hsp 70 soll jedoch nicht nur in der Lage sein, die Apoptose auf Caspase-abhängigem und -unabhängigem Weg zu hemmen, sondern auch proapoptische Wirkungen über die Aktivierung der CAD zu entfalten (Liu et al. 2003).

Es stellt sich die interessante Frage einer möglichen Hochregulation des onkogenen Hitzeschockproteins 70 in hochmalignen Astrozytomen WHO-Grad III und IV, da sich dadurch die vermehrte (auch zytoplasmatische) Akkumulation von AIF und Endo G und die abnehmende Expression von aktivierter Caspase-3 (Procaspase-3 wird durch die im Apoptosome aktivierte Caspase-9 aktiviert) in diesen Tumoren erklären lassen könnte. Somit sollte Hsp 70 in höhergradigen Gliomen in künftigen Studien evaluiert werden.

Zusammenfassend zeigt Endo G ein ansteigendes Expressionsmuster mit steigendem WHO-Grad und AIF eine signifikant höhere Expression in diffus infiltrierenden Astrozytomen WHO-Grad II, III und IV im Vergleich zu pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I, was auf einen hohen Anteil des Caspase-unabhängigen Zelltods in höhermalignen Gliomen schließen lässt.

#### 4.2.3. Expression von aktivierter Caspase-3 in Astrozytomen

In den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit fand sich in Astrozytomen der WHO-Grade II bis IV ein abnehmendes Expressionsmuster für aktivierte Caspase-3. Das Protein hatte das häufigste Vorkommen in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II mit 30,0% positiven Zellen und das niedrigste Vorkommen in Glioblastomen WHO-Grad IV mit 6,2%. Die Expression in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I lag zwischen den Werten für diffuse Astrozytome WHO-Grad II und anaplastische Astrozytome WHO-Grad III.

Somit stimmt die abfallende Expression von aktivierter Caspase-3 nicht mit der zunehmenden spontanen Apoptose in Astrozytomen überein (Capper et al. 2006, Heesters et al. 1999) und steht gegensätzlich zu der beschriebenen vermehrten Expression der Caspase-unabhängigen nukleären Apoptosefaktoren AIF und Endo G in höhergradigen Gliomen.

In der Literatur ist ein vermehrtes Vorkommen von Caspase-3 in malignen Gliomen durch immunocytochemische, RT-PCR und Western Blot Analysen beschrieben. Bodey et al. fanden 50% der Zellen in hochgradigen Gliomen immunocytochemisch positiv, Ray et al. ermittelten für WHO-Grad III Tumore 36,8% und für Glioblastome 59,6% positive mRNA-Level in der RT-PCR und bestätigten diese hohen Werte im Western Blot (Bodey et al. 2004, Ray et al. 2002). Es ist jedoch zu bedenken, dass in beiden Arbeiten nicht die aktivierte Caspase-3, sondern nur das ungespaltene Vorläuferprotein Procaspase-3 untersucht wurde. Ray et al. konnten jedoch zeigen, dass die hohe Caspase-3-Expression auch zur nachfolgenden DNA-Fragmentierung führte.

Es finden sich aber auch immunhistochemische Untersuchungen von aktivierter Caspase-3, die die Ergebnisse unserer Färbungen unterstützen. So ist in 56 malignen Gliomen ein Mittelwert von 16,1% positiver Zellen für aktivierte Caspase-3 beschrieben (Uno et al. 2006). Riemenschneider et al. bestätigen die geringe Expression von aktivierter Caspase-3 in 29 untersuchten Glioblastomen (Riemenschneider et al. 2006). Zusätzlich gibt es eine noch nicht veröffentlichte Untersuchung unserer Arbeitsgruppe am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen über die Expression des Caspase-3-Inhibitors XIAP (Bratton et al. 2001, Deveraux et al. 1997, Roy et al. 1997) in unseren Astrozytomen. Interessanterweise fand sich hierbei eine steigende

Expression von XIAP bei ansteigendem WHO-Grad mit dem höchsten Wert von 19,2% positiven Zellen in Glioblastomen WHO-Grad IV (Capper et al. 2006), was das verminderte Vorkommen von aktivierter Caspase-3 in Glioblastomen erklären kann.

Die aktivierte Caspase-3 ist die Haupteffektorcaspase und der wichtigste Vermittler der nukleären Apoptose (Janicke et al. 1998b, Slee et al. 2001, Woo et al. 1998). Sie aktiviert die Caspase-abhängige DNase (CAD), indem sie deren Inhibitor ICAD spaltet. CAD führt dann zum klassischen apoptotischen Phänotyp des Zellkerns durch oligonukleosomale DNA-Fragmentierung (Enari et al. 1998).

Da die Expressionsmuster der untersuchten Faktoren einen gegensätzlichen Verlauf zeigen, kann es somit möglich sein, dass die Caspase-unabhängigen Faktoren AIF und Endo G das Fehlen der aktivierten Caspase-3 kompensieren und die hochmalignen Gliomzellen in die Apoptose führen. Zu beachten ist, dass es neben Caspase-3 auch die Effektorcaspasen-6 und -7 gibt, die diese Rolle übernehmen könnten und den apoptotischen Zellkernverdau hervorrufen (Janicke et al. 1998a).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Caspase-3-Depletion weitaus tragischere Folgen für die Versuchstiere hatte als eine Depletion von CAD. Demnach scheint die Funktion von Caspase-3 weiter zu gehen als die Aktivierung einer einzigen DNase. Die CAD knock-out Mäuse zeigten einen weitgehend unauffälligen Phänotyp, was schon in der Entwicklung die Ersetzbarkeit dieser DNase durch andere Nukleasen aufzeigt, die Caspase-abhängig oder -unabhängig arbeiten können (Kuida et al. 1996, McIlroy et al. 2000, Woo et al. 1998, Zhang et al. 1998).

Um weitere Aufschlüsse über die Aktivität und Funktion von aktivierter Caspase-3 in Glioblastomen zu gewinnen, wären Analysen der CAD und ICAD als upstream-Targets und des Caspase-9-Apoptosom-Komplex als downstream-Aktivator von Caspase-3 sinnvoll. Mit der von Capper et al. ermittelten hohen Expression von XIAP könnten sich zukünftig die Hinweise auf eine verhinderte Aktivierung der Caspase-3 in Glioblastomen erhärten, was eine therapeutische Applikation von aktivierter Caspase-3 in hochgradigen Gliomen sinnvoll machen könnte. Srinivasula et al. entwickelten eine konstitutiv aktive rekombinante Caspase-3, die genterapeutisch in Zellen eingebracht werden kann und die Apoptose unabhängig von anderen Caspasen auslöst (Srinivasula et al. 1998).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis des vermehrten Vorkommens der Caspase-unabhängigen nukleären Apoptosefaktoren AIF und Endo G in hochmalignen Gliomen bei gleichzeitig verminderter Expression von aktivierter Caspase-3 auf eine Aktivierung des Caspase-unabhängigen Zelltods in den Tumoren hindeuten könnte. Untersuchungen von weiteren an der Regulation und Durchführung der Apoptose beteiligten Proteine wie Hsp 70, CAD und ICAD, den anderen Effekto-cas-pasen-6 und -7 sowie des Caspase-9-Apoptosom-Komplexes könnten weitere Erkenntnisse über den Zelltod in Astrozytomen liefern.

### **4.3. Expression der Apoptosefaktoren in Normalhirn**

Die Untersuchung an Normalhirngewebe hat sowohl für AIF und Endo G als auch für aktivierte Caspase-3 ergeben, dass signifikant mehr Zellen in der grauen Substanz eine Immunreaktivität zeigten als in der weißen Substanz. Die Zellen der Normalhirne waren mit hoher Wahrscheinlichkeit einem präfinalen hypoxischen Zustand ausgesetzt, der zur Aktivierung der apoptotischen Signalwege geführt haben könnte. Durch die höhere Vulnerabilität der Neurone gegenüber Hypoxie im Vergleich zu Gliazellen, lieferten hier mehr Zellen ein positives Signal. Zahlenmäßig dominierte Endo G mit durchschnittlich 26,8% positiven Zellen in der grauen Substanz, deutlich mehr als 1,3% AIF-positive Zellen oder 8,1% aktivierte Caspase-3-positive Zellen. Der hohe Wert für Endo G entstand durch eine hohe Immunreaktivität der Neurone, was auf eine vermehrte Freilassung von Endo G bei der neuronalen Zellschädigung durch Hypoxie oder Ischämie hindeutet. Die beschriebenen Beobachtungen im Normalhirngewebe sind mit einer Untersuchung von Tanaka et al. vereinbar, in der die Freisetzung der mitochondrialen Apoptosefaktoren in Neuronen bei Apoptose aufgrund Sauerstoff- und Glukosemangel nachgewiesen wurde (Tanaka et al. 2005). Die Beteiligung von aktivierter Caspase-3 am Ischämie-bedingten neuronalen Zelltod ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (Chen et al. 1998). Insgesamt zeigen die hauptsächlich in der grauen Substanz vorhandenen apoptotischen Faktoren die neuronale Reaktion auf ein präfinales ZNS-Ereignis.

#### **4.4. Expression der Apoptosefaktoren in der Infiltrationszone von Glioblastomen**

Einzig für aktivierte Caspase-3 fand sich ein Unterschied im Vergleich der Expression im Tumorzentrum mit der Peripherie. Signifikant mehr Zellen zeigten sich in der Peripherie immunreaktiv für aktivierte Caspase-3, was auf ein höheres apoptotisches Niveau in der Umgebung des Tumors schließen lässt.

Die Analyse der Zelldichte zeigte ein deutlich geringeres Zellvorkommen in der peripheren Infiltrationszone als im Tumorzentrum.

Ray et al. machten die Entscheidung zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelluntergang in malignen Gliomen, abhängig vom Energiezustand der Zelle und der Stärke des Todessignals (Ischämie, Hypoxie, DNA-Schädigung, DR-Signal) (Ray et al. 2002). Eine kritische Beteiligung der Mitochondrien an den beiden Möglichkeiten des Zelluntergangs ist ebenfalls belegt (Ankarcrona et al. 1995). Die nachgewiesene, vermehrte Expression von aktivierter Caspase-3 in der Peripherie deutet bei vorwiegend nekrotischem Zelluntergang im Tumorzentrum auf ein ähnliches Modell des Zelluntergangs in Glioblastomen wie beim ischämischen Insult in der peripheren Penumbra hin, da die Ischämie-induzierte Apoptose durch aktivierte Caspase-3 vermittelt wird (Chen et al. 1998). Damit ließe sich auf einen besseren Versorgungs- und Energiezustand der peripheren Tumorzellen schließen, was auch die Abwesenheit der für das Zentrum charakteristischen Nekrosen erklären kann. In der besser versorgten Peripherie könnte aktivierte Caspase-3 eine größere Rolle in der Zelltodvermittlung spielen als im schlechter versorgten Tumorzentrum.

Die beschriebene Assoziation von AIF-Positivität und nekrotischem Zelluntergang (Daugas et al. 2000) kann den fehlenden Unterschied der AIF-Expression in Tumorzentrum (nekrotischer Zelltod) und Infiltrationszone (apoptotischer Zelltod) erklären. Endo G hatte ebenso kein bevorzugtes Auftreten in einer der beiden Tumorregionen.

#### **4.5. Expression der Apoptosefaktoren in Rezidivtumoren von primären Glioblastomen**

Bei der Untersuchung der Expression der drei Apoptoseproteinen in 31 Rezidivtumoren im Vergleich mit ihren Primärtumoren ergab sich für keinen der Faktoren ein statistisch signifikanter Unterschied.

In einer Arbeit von Ralte et al. wurden die Proliferationsraten und Apoptoseindizes von Astrozytomen unterschiedlicher WHO-Grade und ihrer Rezidive untersucht. Bei der Ermittlung der spontanen Apoptosen durch die TUNEL-Färbung und der Proliferation durch den Marker MIB-1 zeigte sich in den Rezidivtumoren kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Primärtumoren, wobei in den Rezidivtumoren der Mittelwert der spontanen Apoptosen über dem Wert der Primärtumore lag (1,8+/-1,3 Standardabweichung vs. 0,17+/-0,19 Standardabweichung) (Ralte et al. 2001).

Durch die Radiochemotherapie kann ein Selektionsmechanismus angestoßen worden sein, durch den die Zellen des Rezidivtumors resistent gegenüber genotoxischen Stimuli wurden (Brandes 2003). Die Daten der vorliegenden Untersuchung können weder eine Herauf-, noch eine Herabregulation der Apoptosefaktoren aktivierte Caspase-3, AIF und Endo G in den Rezidiven von primären Glioblastomen feststellen, was in Einklang mit den von Ralte et al. beschriebenen nicht signifikant verschiedenen Apoptoseindizes in Rezidiv- und Primärtumor zu bringen ist. Damit sprechen die Ergebnisse gegen einen Funktionsverlust der Proteine im Rahmen einer Resistenzentwicklung in Rezidivtumoren, da sowohl die spontanen Apoptosen als auch die Faktoren in Primärtumor und Rezidiv gleichartig vorkommen beziehungsweise exprimiert werden.

#### 4.6. Fallweise Korrelation der Antikörper

Eine hochsignifikante Korrelation der Expression von AIF und Endo G fand sich nur in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III. Trotz der gleichartigen Regulation der Freilassung der Proteine aus den Mitochondrien fand sich in den anderen Tumoren kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III zeigt sich eine gleichartige Regulation der Proteine, wobei im Mittel 14,2% der Zellen AIF- und 22,4% der Zellen Endo G-positiv waren.

Inwiefern gibt es in der Literatur Hinweise auf eine synergistische Wirkung der beiden Caspase-unabhängigen Apoptosefaktoren in gegenseitiger Abhängigkeit?

AIF und Endo G können in menschlichen Zellen Komplexe bilden (Kalinowska et al. 2005). Zusätzlich ist gesichert, dass Endo G nicht als alleinige Nuklease auf die DNA wirkt. Für die volle Wirksamkeit muss Endo G mit weiteren Nukleasen wie DNase I oder Exonuklease III interagieren (Widlak et al. 2001). Dabei wirken die Kofaktoren als Verstärker des Endo G-vermittelten DNA-Abbaus (Kalinowska 2005). In *C. elegans* wurde die Bildung von Komplexen und eine Zusammenarbeit im DNA-Abbau von AIF und Endo G beschrieben (Wang et al. 2002). Parrish et al. zeigten in *C. elegans* eine Komplexbildung von Nukleasen als Degradosom, das Caspase-unabhängig wirkt und das Homologe von Endo G beinhaltet (Parrish et al. 2001). Allerdings ist bei den Vergleichen mit *C. elegans* zu bedenken, dass grundsätzlich andere Regulationswege und Hierarchien der apoptotischen Moleküle zwischen dem Wurm und Säugetieren bestehen. Beispielsweise ist bei *C. elegans* die Freilassung von Cytochrom C für die Aktivierung der Effektorcaspasen nicht nötig, da das Homolog von Apaf-1 keine Cytochrom C-bindende Domäne besitzt (Übersichtsartikel Penninger und Kroemer 2003).

Die Wirkungsdynamik der beiden Proteine während der Apoptose ist verschieden. AIF wird frühzeitig aus den Mitochondrien frei, während Endo G erst später zusammen mit Cytochrom C den IMS verlässt (Han et al. 2006, Li et al. 2001, van Loo et al. 2001). Die large-scale Fragmentierung der DNA durch AIF könnte eine Art Vorverdau des apoptotischen DNA-Verdaus darstellen und Endo G wäre auf Caspase-unabhängigem Wege die nächste Instanz, eventuell in Kooperation mit weiteren Nukleasen oder als Nukleasenkomplex im Degradosom. Dass AIF und Endo G zeitgleich am DNA-Verdau

mitwirken, ist aufgrund der Dynamik der mitochondrialen Freilassung und des Schneidemusters (50 kbp AIF versus 10-190 bp Endo G) unwahrscheinlich. Es ist jedoch gut vorstellbar, dass sich beide Faktoren für einen vollständigen Abbau der DNA ohne vorhandene Caspasenaktivierung benötigen.

Weiter zeigten sich für aktivierte Caspase-3 hochsignifikante Korrelationen der Expression mit AIF in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II und mit Endo G in Glioblastomen WHO-Grad IV. Dieser Zusammenhang überrascht, da die Expressionsmuster der Proteine über die vier Tumorggrade eher auf eine gegensätzliche Regulation von aktivierter Caspase-3 und den mitochondrialen Faktoren hingewiesen haben. Eine Erklärung könnten neueste Erkenntnisse über den Freilassungsmechanismus von AIF und Endo G aus den Mitochondrien liefern. Bisher galt die Annahme, dass AIF und Endo G gemeinsam mit den anderen Apoptoseproteinen aus dem IMS freierwerden, sobald die äußere Membran der Mitochondrien permeabilisiert wird (Jurgensmeier et al. 1998, Xiang et al. 1996). Mittlerweile gibt es Hinweise, dass aktivierte Caspase-3 für die Freilassung von Endo G und AIF nötig sein könnte (Arnoult et al. 2002, Arnoult et al. 2003, Lakhani et al. 2006). Dies würde den ermittelten Zusammenhang in unserer Untersuchung erklären, wobei beachtet werden muss, dass die Caspasen-abhängige Freilassung in der Literatur umstritten ist, da auch aktuelle Untersuchungen eine Caspase-unabhängige Freilassung feststellen (Prunet et al. 2005, Trejo-Solis et al. 2005).

In einer Übersichtsarbeit von Cande et al. folgern die Autoren, dass wahrscheinlich der Auslösemechanismus der Apoptose bestimmend ist für die Art und Weise der Freilassung der IMS-Proteine. Eine „explosive Caspasenaktivierung“ könnte auf schnellem Wege zu einer Freilassung von AIF und Endo G durch downstream-Caspasen wie Caspase-3 führen (Cande et al. 2004b). Somit könnte in dem komplexen Regulationsmechanismus und in der variierenden Dynamik der apoptotischen Kaskaden der Grund für gewebe- und auch tumorabhängige Unterschiede in der Expression von apoptotischen Proteinen liegen. Eine genaue Hierarchie unter den zahlreichen Proteinen und einheitliche Abläufe der Aktivierung als gesetzartige Vorschrift sind nicht festzulegen.

#### 4.7. Korrelation der Expression mit der Zelldichte

Bei der Korrelation der Proteinexpression mit der Zelldichte ergab sich ein überraschendes Bild. Eine abnehmende Expression mit zunehmender Zelldichte in Glioblastomen WHO-Grad IV zeigten AIF und Endo G, in anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III AIF und in pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I aktivierte-Caspase-3.

In den hochmalignen Astrozytomen WHO-Grad III und IV wurde demnach eine Herabregulation der Caspase-unabhängigen Apoptosefaktoren mit zunehmender Zelldichte festgestellt, was nicht mit der Vorstellung von gesteigerter Proliferation und Sauerstoffmangel als Auslöser der Apoptose (Steinbach und Weller 2004) zu vereinbaren ist, soweit in Tumoren mit geringerer Zelldichte die Proliferationsrate niedriger und die Sauerstoffversorgung besser ist.

Andererseits ist es auch möglich, dass Tumore mit geringerer Zelldichte weniger zu nekrotischem Zelltod neigen und apoptotische Signalkaskaden aktivieren können, was dem Modell des apoptotischen Zelltods in der besser versorgten und zellärmeren Tumorperipherie nahe kommt (siehe 4.4). Dieser Zelltod könnte dann auf Caspase-unabhängigem Weg zustande kommen, da aktivierte Caspase-3 keine Korrelation mit der Zelldichte in WHO-Grad III und WHO-Grad IV Tumoren zeigt.

In den benignen pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I zeigt aktivierte Caspase-3 dagegen denselben Zusammenhang der zunehmenden Expression mit abnehmender Zelldichte wie die Caspase-unabhängigen in hochgradigen Astrozytomen, was bei gleichzeitig hoher Expression mit durchschnittlich 23,6% positiven Zellen auf eine wichtige Rolle für aktivierte Caspase-3 in pilozytischen Astrozytomen schließen lässt.

Smac korrelierte ebenfalls in Glioblastomen WHO-Grad IV negativ mit der Zelldichte (Capper et al. 2006), was zusammen mit der gleichartigen Korrelation von AIF und Endo G ein Hinweis darauf sein kann, dass die mitochondriale Apoptose durch gesteigerte Proliferation gehemmt wird. Die Apoptoserate korreliert jedoch positiv mit der Proliferation (Heesters et al. 1999, Ralte et al. 2001) in Gliomen und aktivierte Caspase-3 zeigt in der vorliegenden Untersuchung ein geringes Vorkommen in den proliferationsreichen hochmalignen Astrozytomen, so dass eine gehemmte Freilassung der mitochondrialen Caspase-unabhängigen Apoptoseproteine bei gesteigerter

Proliferation unwahrscheinlich wird, da in diesen Tumoren spontane Apoptosen häufiger vorkommen als in niedriggradigen Gliomen (Ellison et al. 1995, Heesters et al. 1999, Kordek et al. 1996, Ralte et al. 2001).

#### **4.8. Analysen mit dem Überleben**

Die Analysen der Proteinexpression in Zusammenhang mit dem postoperativen Überleben der Patienten wurden für die Astrozytome WHO-Grad II, III und IV durchgeführt. Die pilozytischen Astrozytome WHO-Grad sind benigne Tumore mit einem 10-Jahres-Überleben von 96% (Ohgaki und Kleihues 2005a) und während des Beobachtungszeitraums verstarb lediglich ein Patient, weshalb die pilozytischen Astrozytome in der Überlebensanalyse keine Berücksichtigung fanden.

Capper et al. zeigten mit den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Überlebensdaten der Astrozytom-Patienten der TMA-Analyse am Institut für Hirnforschung, dass das mittlere Überleben der Patienten mit Astrozytomen WHO-Grad III und IV im Vergleich zu epidemiologischen Studien erhöht ist (Grad III: 3,2 Jahre versus 1,6 Jahre, Grad IV: 1,2 Jahre versus 0,4 Jahre). Bei diffusen Astrozytomen WHO-Grad II liegen die ermittelten Werte nah beieinander (6,7 Jahre versus 5,6 Jahre) (Capper et al. 2006, Ohgaki und Kleihues 2005a). Ursächlich für das längere Überleben der Patienten mit hochmalignen Gliomen in unserer Untersuchung kann die Tatsache sein, dass ausschließlich Patienten mit operativer Therapie in die Studie einbezogen werden konnten und somit die inoperablen Fälle nicht eingeschlossen sind. Die von Capper et al. ermittelten mittleren Überlebenszeiten für Patienten mit Astrozytomen WHO-Grad II-IV zeigen die Zuverlässigkeit der Gewebeauswahl nach histopathologischen Kriterien (wie auch die Ermittlung der Zelldichten (siehe 4.1)) und die Zuverlässigkeit der Evaluation der Überlebensdaten.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Apoptoseproteinen zeigte AIF in anaplastischen Astrozytomen eine statistisch leicht signifikante positive Korrelation mit dem Überleben ( $p=0,047$ ), die sich auch in der Kaplan-Meier-Analyse veranschaulichen ließ (siehe 3.3.2). Der statistische Abgleich der Expression von AIF gegen den Einfluss des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Operation ergab jedoch eine weitaus größere prognostische Relevanz des Alters, das als dominierender Faktor bezüglich des

Überlebens Astrozytomen WHO-Grad II, III und IV anzusehen ist (siehe 3.3.3). Endo G und aktivierte Caspase-3 zeigten in den drei untersuchten Tumorgraden keine Zusammenhänge oder statistische Auffälligkeiten mit dem Überleben der Patienten.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erkrankung ist der bedeutendste prognostische Faktor in Astrozytomen (Kallio et al. 1991, Ohgaki und Kleihues 2005b), was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Weitere Faktoren, die die Prognose der Patienten bestimmen, sind der präoperative Karnofsky-Performance-Status (klinische Klassifikation nach funktioneller Beeinträchtigung), die histopathologische Diagnose und die Art der Behandlung, wobei sich ein aggressives Konzept aus Tumorchirurgie und Radiochemotherapie als vorteilhaft erwiesen hat (Bussiere et al. 2005).

Nach dem biologischen Verständnis der Apoptose wäre für den programmierten Zelltod ein positiver Effekt auf das Überleben der Patienten zu erwarten, denn je mehr Zellen das Todesprogramm aktivieren können und zugrunde gehen, desto langsamer sollten das Tumorstadium und die Tumorprogression fortschreiten. Es ist jedoch gezeigt worden, dass der Apoptoseindex in Astrozytomen keine Korrelation mit dem Überleben aufweist (Heesters et al. 1999, Schiffer et al. 1995). Hingegen wird für die mit dem Marker MIB-1 ermittelte Proliferationsrate von Astrozytomen ein Einfluss auf die Prognose angenommen (Hsu DW. et al. 1997, Übersichtsartikel von Johannesen und Torp 2006, Neder et al. 2004, Ralte et al. 2001).

In anaplastischen Astrozytomen konnte ferner gezeigt werden, dass die Expression von AIF bei älteren Patienten geringer ist als bei jüngeren Patienten (siehe 3.2.13). Es ist nun denkbar, dass eine altersabhängige Veränderung der Proteinexpression, die in Gliomen beschrieben ist (Batchelor et al. 2004), zu der positiven Korrelation mit der Prognose geführt haben kann. Beim statistischen Ausschluss dieses möglichen Zusammenhangs hat AIF die Prognose nicht mehr mitbestimmt.

Somit zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation des Apoptoselevels in Astrozytomzellen mit dem Überleben der Patienten. Die Auslösung der Caspase-vermittelten als auch der Caspase-unabhängigen Apoptose in Astrozytomen sollte als zukünftiger therapeutischer Ansatz weiter erforscht werden, da in diesen hochmalignen und häufig chemoresistenten Tumoren jede Möglichkeit der antineoplastischen Therapie ausgeschöpft werden muss.

#### 4.9. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Apoptose ist ein hochkomplexer Vorgang, die viele verschiedene Auslöser, Signalwege und Regulationsmechanismen kennt. Die Expression der Apoptosemoleküle ist nicht mit ihrer Funktionalität gleich zu setzen. Es bleibt in der Immunhistochemie unsicher, ob die Proteine letztendlich an ihr Ziel gelangen und dort auch wirken. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Aktivierung des Caspase-unabhängigen Zelltods über die nukleären Faktoren AIF und Endo G bei gleichzeitiger Herabregulation von aktivierter Caspase-3 in hochgradigen Gliomen WHO-Grad III und IV. Somit ist aufgrund der vermehrt vorkommenden Apoptose in diesen Tumoren von einer Aktivierung der Caspase-unabhängigen Apoptose auszugehen, was zu einer weiteren Erforschung dieser Art des Zelltods in Astrozytomen, speziell durch therapeutische Interventionen, führen sollte. Durch zytotoxische Substanzen oder gentherapeutische Verfahren für die Behandlung von hochmalignen Gliomen sollte zukünftig die klassische Caspase-vermittelte Apoptose sowie der Caspase-unabhängige Zelltod aktiviert werden. Damit kann ein maximales apoptotisches Niveau in den Tumorzellen erreicht werden, was für eine erfolgreiche Therapie dieser hochmalignen und häufig chemoresistenten Zellen vorauszusetzen ist.

Die Analyse der Expression in Rezidivtumoren ergab keine Hinweise auf eine Beteiligung der drei untersuchten Proteine an einer möglichen Resistenzentwicklung der Gliomzellen durch die Radiochemotherapie.

Aktivierte Caspase-3 zeigte zusätzlich zur Herunterregulation im Zentrum von WHO-Grad III und IV Tumoren eine stärkere Expression und damit Beteiligung am Zelltod in der besser mit Sauerstoff und Energie versorgten Tumorperipherie und in den benignen pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I.

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren hatte mit dem Überleben der Astrozytom-Patienten keine signifikante Assoziation.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich für zukünftige Untersuchungen des programmierten Zelltods in humanen Astrozytomen folgende Anregungen und Fragenschwerpunkte:

1. Der Caspase-unabhängige Zelltod mit der Beteiligung von AIF und Endo G sollte in Astrozytomen bei genereller Caspasen-Inhibition oder komplettem knock-out der Caspasenaktivität untersucht werden. Damit könnten die in dieser Arbeit erbrachten Hinweise auf eine starke Beteiligung von AIF und Endo G im Zelltod von hochmalignen Gliomen unterstützt werden.
2. Ein Expressionsmuster der Apoptoseproteine in genotoxisch behandelten Gliomzelllinien kann bei Korrelation mit den beobachteten, spontanen Apoptosen die therapeutische Induktion des Caspase-abhängigen und Caspase-unabhängigen Zelltods in Gliomen sichern.
3. Gibt es übergeordnete Regulationsmoleküle des Caspase-unabhängigen Zelltods, die eventuell abhängig von der Zelldichte, dem Energieniveau oder der Proliferationsrate wirken?
4. Ist Hitzeschockprotein 70 in anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen hochreguliert und wirkt als Inhibitor von AIF und Endo G sowie des Apoptosom-Komplexes? Führt Hsp 70 dabei zur vermehrten Expression von AIF und Endo G und zur reduzierten Aktivierung von Caspase-3?
5. Kompensieren die anderen Effektorcaspasen-6 und -7 die geringe Expression von aktivierter Caspase-3 in hochmalignen Astrozytomen?
6. Die Evaluation der Aktivität der Caspase-abhängigen DNase (CAD) als upstream-Target und des Caspase-9-Apoptosom-Komplex als downstream-Aktivator von Caspase-3 könnten den Verdacht einer gehemmten Aktivierung von Caspase-3 in hochmalignen Gliomen erhärten. Dadurch könnte eine gentherapeutische Applikation von aktivierter Caspase-3 in die Tumorzellen wie z. B. durch konstitutiv aktive rekombinante Caspase-3 (Srinivasula et al. 1998) sinnvoll werden.
7. Ist aufgrund einer besseren Sauerstoff- und Energieversorgung in der Tumorperipherie der apoptotische Zelluntergang häufiger und kommen darum die strichförmigen Nekrosen nur im Tumorzentrum vor?

8. Liegt der quantitative Unterschied an spontanen Apoptosen und der Expression der Apoptoseproteine an der zeitlichen Abfolge der Apoptose oder gibt es Funktionsverluste und Inhibitoren nach Aktivierung der Faktoren?
9. Führt der Caspase-unabhängige DNA-Verdau zuverlässig zu TUNEL-positiven Zellkernen?
10. Die Beteiligung von AIF am nekrotischen Zelluntergang sollte weiter definiert werden. Ist eventuell auch Endo G am nekrotischen Zelluntergang beteiligt?
11. Hat Endo G eine bedeutende Rolle im neuronalen Zelltod durch Ischämie oder Hypoxie wie es die starke Expression in den Neuronen der Normalhirnkontrollen nahe legt?
12. Haben AIF und Endo G in Astrozytomen wichtige Apoptose-fremde Funktionen im Energiestoffwechsel beziehungsweise bei der Replikation und bei der Zellproliferation, die die apoptotische Interpretation ihrer Expression verfälschen könnte?

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das momentane Verständnis von Tumoren in menschlichem Gewebe beinhaltet die Hypothese, dass Störungen der Regulation apoptotischer Signalwege und damit verbundene Störungen des Ablaufs der Apoptose für die Entwicklung von Tumorerkrankungen und deren mögliche Resistenz gegenüber zytotoxischer Chemotherapie, wie es bei humanen Gliomen der Fall ist, verantwortlich sind.

Um die Rolle der Caspase-unabhängigen nukleären Apoptosefaktoren AIF und Endonuklease G in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ihre Expression im Vergleich zu aktivierter Caspase-3 in 194 Astrozytomen und 23 Normalhirnkontrollen immunhistochemisch mit der TMA-Methode sowie ihre Assoziation mit dem Überleben der Patienten untersucht.

Für AIF und Endo G fanden sich die maximalen Expressionen in hochmalignen Astrozytomen WHO-Grad III und IV, während sich für aktivierte Caspase-3 ein abfallendes Expressionsmuster mit der niedrigsten Expression in Glioblastomen WHO-Grad IV zeigte. Diese gegensätzliche Regulation der Proteinexpressionen des Caspase-abhängigen und -unabhängigen Signalwegs sprechen für eine wesentliche Rolle von AIF und Endo G im Zelltod von hochmalignen Astrozytomen und für eine Hemmung der Caspase-3-Aktivierung, eventuell durch IAP-Proteine oder Hitzeschockprotein 70.

In den Korrelationsanalysen zeigten sich positive Zusammenhänge in der Expression von AIF und Endo G in WHO Grad-III, von AIF und aktivierter Caspase-3 in WHO-Grad II und von Endo G und aktivierter Caspase-3 in WHO-Grad IV Tumoren. Diese Ergebnisse deuten auf die Komplexität der Auslösung, der Regulation und der Durchführung apoptotischer Prozesse in maligne transformierten Zellen hin, die der Grund für tumorabhängige Unterschiede in der Expression von apoptotischen Proteinen sind. Eine genaue Hierarchie unter den zahlreichen Proteinen und einheitliche Abläufe der Aktivierung als gesetzmäßige Vorschrift sind nicht festzulegen.

In der peripheren Infiltrationszone von Glioblastomen wurde eine vermehrte Expression und damit eine stärkere Beteiligung von aktivierter Caspase-3 am Zelltod in der Peripherie als in den Tumorzentren ermittelt. Die Analyse von 31 Rezidivtumoren im Vergleich zu ihren Primärtumoren ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression aller drei Apoptoseproteine. Damit scheinen die untersuchten Faktoren auf

Expressionsebene nicht an der Entwicklung möglicher Resistenzen durch die Radiochemotherapie beteiligt.

In den 23 Normalhirnkontrollen zeigten alle drei Apoptoseproteine eine signifikant höhere Expression in der grauen Substanz als in der weißen Substanz, was ihre Beteiligung an der neuronalen Reaktion auf ein präfinales ZNS-Ereignis demonstriert.

In den Analysen mit der postoperativen Überlebenszeit der Astrozytom-Patienten fand sich keine statistisch signifikante Assoziation der Proteinexpression und damit der Aktivierung der apoptotischen Proteine auf die Prognose. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation stellte sich als der dominierende Faktor für das Überleben heraus.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Caspase-unabhängigen nukleären Apoptosefaktoren AIF und Endo G eine wichtige Rolle im Zelltod von hochmalignen Astrozytomen zu spielen scheinen. Zukünftige zytotoxische Therapieansätze sollten ihre Wirksamkeit über die Aktivierung des Caspase-vermittelten als auch des Caspase-unabhängigen Zelltods überprüfen. Nur mit einer maximalen apoptotischen Aktivierung der Tumorzellen können sich rasch entwickelnde Resistenzmechanismen vermieden und Erfolg versprechende zytotoxische Behandlungskonzepte für diese hochmalignen Tumoren gewonnen werden.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams JM, Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 26(1):61-6.
2. Ahlbom A, Navier IL, Norell S, Olin R, Spannare B. 1986. Nonoccupational risk indicators for astrocytomas in adults. *Am J Epidemiol.* 124(2):334-7.
3. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87(2):171.
4. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15(4):961-73.
5. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 63:795-813.
6. Arends MJ, Wyllie AH. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 32:223-54.
7. Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC. 2002. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol.* 159(6):923-9.
8. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 22(17):4385-99.
9. Barnard RO, Geddes JF. 1987. The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer.* 60(7):1519-31.
10. Barnes NY, Li L, Yoshikawa K, Schwartz LM, Oppenheim RW, Milligan CE. 1998. Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J Neurosci.* 18(15):5869-80.
11. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jung S, Rhee D, Louis DN. 2004. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 10:228-33.
12. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2(8):469-75.
13. Bennett MR. 1999. Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 58(7):1089-95.
14. Bodey B, Bodey V, Siegel SE, Nasir A, Coppola D, Hakam A, Kaiser HE. 2004. Immunocytochemical detection of members of the caspase cascade of apoptosis in high-grade astrocytomas. *In Vivo.* 18(5):593-602.
15. Brandes AA. 2003. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol.* 30(6 Suppl 19):4-9.
16. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 20(5):998-1009.
17. Bredesen DE. 1996. Genetic control of neural cell apoptosis. *Perspect Dev Neurobiol.* 3(2):101-9.

18. Burch JD, Craib KJ, Choi BC, Miller AB, Risch HA, Howe GR. 1987. An exploratory case-control study of brain tumors in adults. *J Natl Cancer Inst.* 78(4):601-9.
19. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. 1990. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis.* 11:847-53.
20. Bussiere M, Hopman W, Day A, Pombo AP, Neves T, Espinosa F. 2005. Indicators of functional status for primary malignant brain tumour patients. *Can J Neurol Sci.* 32(1):50-6.
21. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci.* 115:4727-34.
22. Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G. 2004a. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene.* 23(8):1514-21.
23. Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. 2004b. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11(6):591-5.
24. Capper D, Simon P, Goeppert B, Dietz K, Mittelbronn M. 2006. Persönliche Mitteilung, Publikation in Vorbereitung.
25. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 18(13):4914-28.
26. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 8(3):705-11.
27. Chipuk JE, Green DR. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(3):268-75.
28. Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM. 1998. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(2):554-9.
29. Cote J, Ruiz-Carrillo A. 1993. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science.* 261(5122):765-9.
30. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14(5):729-39.
31. Davis FG, McCarthy B, Jukich P. 1999. The descriptive epidemiology of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am.* 9(4):581-94.
32. Denk H. 1997. Zell- und Gewebsreaktionen in „Pathologie“, herausgegeben von Böcker W, Denk H, Heitz PU. 1997. Seite 52. Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
33. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388(6639):300-4.
34. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17(8):2215-23.

35. Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13(3):239-52.
36. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.*102(1):33-42.
37. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.
38. Ellison DW, Steart PV, Gatter KC, Weller RO. 1995. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 21:352-61.
39. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391(6662):43-50.
40. Esposti MD, Erler JT, Hickman JA, Dive C. 2001. Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol.* 21(21):7268-76.
41. Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. 1997. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J.* 16(9):2271-81.
42. Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science.* 298:556-62.
43. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 274(4):2225-33.
44. Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM. 1999. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr.* 211(4):319-22.
45. Garrity MM, Burgart LJ, Riehle DL, Hill EM, Sebo TJ, Witzig T. 2003. Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls. *Mod Pathol.* 16(4):389-94.
46. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119(3):493-501.
47. Giordana MT, Bradac GB, Pagni CA, Marino S, Attanasio A. 1995. Primary diffuse leptomeningeal gliomatosis with anaplastic features. *Acta Neurochir (Wien).* 132(1-3):154-9.
48. Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR. 1996. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet.* 13(4):380-2.
49. Grandgirard D, Studer E, Monney L, Belser T, Fellay I, Borner C, Michel MR. 1998. Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J.* 17(5):1268-78.

50. Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, Creasy CL. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem.* 267(18):5699-710.
51. Green DR, Kroemer G. 2004. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science.* 305(5684):626-9.
52. Green DR., Reed JC. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science.* 281(5381):1309-12.
53. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13(15):1899-911.
54. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne V, Culhane AC, Williams GT. 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.* 236(1):1-26.
55. Han W, Shi X, Nuttall AL. 2006. AIF and endoG translocation in noise exposure induced hair cell death. *Hear Res.* 211(1-2):85-95.
56. Hardell L, Carlberg M, Mild KH. 2006. Case-control study of the association between the use of cellular and cordless telephones and malignant brain tumors diagnosed during 2000-2003. *Environ Res.* 100(2):232-41.
57. Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci.* 17:27-31.
58. Hatton GI. 2002. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv Physiol Educ.* 26:225-37.
59. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR, Weiland TL, Schomberg PJ, Kelly PJ, Hu TC. 1993. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer.* 72:856-869.
60. Heesters MA, Koudstaal J, Go KG, Molenaar WM. 1999. Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: prognostic and clinical value. *J Neurooncol.* 44:255-66.
61. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem.* 277(1):432-8.
62. Hepworth SJ, Schoemaker MJ, Muir KR, Swerdlow AJ, van Tongeren MJ, McKinney PA. 2006. Mobile phone use and risk of glioma in adults: case-control study. *BMJ.* 332(7546):883-7.
63. Herzog S. 2005. Evaluation der HER-2/neu-Genamplifikation an Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen und deren Wertigkeit im Vergleich zur immunhistochemischen membranassoziierten Proteinüberexpression. Medizinische Dissertation, Universität Tübingen.
64. Hirano A, Matsui T. 1975. Electron microscopic observation of ependyma (author's transl). *No Shinkei Geka.* 3(3):237-44.
65. Hoyt WF, Baghdassarian SA. 1969. Optic glioma of childhood. Natural history and rationale for conservative management. *Br J Ophthalmol.* 53:793-798.
66. Hsu CA, Rishi AK, Su-Li X, Gerald TM, Dawson MI, Schiffer C, Reichert U, Shroot B, Poirer GC, Fontana JA. 1997. Retinoid induced apoptosis in leukemia

- cells through a retinoic acid nuclear receptor-independent pathway. *Blood*. 89(12):4470-9.
67. Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET. 1997. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56(8):857-65.
  68. Hsu S, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 29: 577-580.
  69. Huang KJ, Ku CC, Lehman IR. 2006. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(24):8995-9000.
  70. Ikeda S, Ozaki K. 1997. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem Biophys Res Commun*. 235(2):291-4.
  71. Ilgren EB, Stiller CA. 1987. Cerebellar astrocytomas. Part I. Macroscopic and microscopic features. *Clin Neuropathol*. 6:185-200.
  72. Irvine RA, Adachi N, Shibata DK, Cassell GD, Yu K, Karanjawala ZE, Hsieh CL, Lieber MR. 2005. Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol Cell Biol*. 25(1):294-302.
  73. Ishihara Y, Shimamoto N. 2006. Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *J Biol Chem*. 281(10):6726-33.
  74. Jaattela M, Benedict M, Tewari M, Shayman JA, Dixit VM. 1995. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*. 10(12):2297-305.
  75. Janicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG. 1996. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J*. 15(24):6969-78.
  76. Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. 1998a. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*. 273(25):15540-5.
  77. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. 1998b. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 273(16):9357-60.
  78. Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ, Crawford PJ, Kalbag RM, Mendelow AD, Sengupta RP, Pearson AD. 1992. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer*. 66(2):373-85.
  79. Johannessen AL, Torp SH. 2006. The Clinical Value of Ki-67/MIB-1 Labeling Index in Human Astrocytomas. *Pathol Oncol Res*. 12(3):143-147.
  80. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410(6828):549-54.
  81. Junqueira LC, Carneiro J, übersetzt von Schiebler TH. 1996a. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Seiten 94, 95. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

82. Junqueira LC, Carneiro J, übersetzt von Schiebler TH. 1996b. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Seiten 53, 54, 55. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
83. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(9):4997-5002.
84. Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P. 2005. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*. 10(4):821-30.
85. Kallio M, Sankila R, Jaaskelainen J, Karjalainen S, Hakulinen T. 1991. A population-based study on the incidence and survival rates of 3857 glioma patients diagnosed from 1953 to 1984. *Cancer*. 68:1394-400.
86. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. 1994. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol (Berl)*. 87(1):47-54.
87. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. 1995. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 14:3-15.
88. Kaufmann SH. 1989. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res*. 49(21):5870-8.
89. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AF. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4): 239-57.
90. Kleihues P, Cavenee WK. Herausgeber. 2000. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of the Nervous System. Seiten 9-51. IARC Press, Lyon, Frankreich.
91. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419(6905):367-74.
92. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 4(7):844-7.
93. Kordek R, Hironishi M, Liberski PP, Yanagihara R, Gajdusek DC. 1996. Apoptosis in glial tumors as determined by in situ nonradioactive labeling of DNA breaks. *Acta Neuropathol*. 91:112-6.
94. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. 1997. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*. 57(8):1605-13.
95. Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 19(8):312-8.
96. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 60:619-42.
97. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384(6607):368-72.
98. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 17(25):3247-59.

99. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 311(5762):847-51.
100. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. 2002. Tumours of the nervous system in "Greenfield's Neuropathology", Seventh Edition, Volume 2, herausgegeben von David I. Graham und Peter L. Lantos. Seiten 767-806. Arnold, London, New York, New Delhi.
101. Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. 1993. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol*. 123(1):7-22.
102. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 371(6495):346-7.
103. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94(4):491-501.
104. Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412(6842):95-9.
105. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91(4):479-89.
106. Liu QL, Kishi H, Ohtsuka K, Muraguchi A. 2003. Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood*. 102(5):1788-96.
107. Liu X, Kim CN, Pohl J, Wang X. 1996. Purification and characterization of an interleukin-1beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J Biol Chem*. 271(23):13371-6.
108. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. 2000. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 408(6815):1004-8.
109. Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G. 2001. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*. 15(3):758-67.
110. Loetscher H, Deuschle U, Brockhaus M, Reinhardt D, Nelboeck P, Mous J, Grunberg J, Haass C, Jacobsen H. 1997. Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem*. 272(33):20655-9.
111. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94(4):481-90.
112. Mack W, Preston-Martin S, Peters JM. 1991. Astrocytoma risk related to job exposure to electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 12(1):57-66.
113. Maldaun MV, Suki D, Lang FF, Prabhu S, Shi W, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. 2004. Cystic glioblastoma multiforme: survival outcomes in 22 cases. *J Neurosurg*. 100(1):61-7.
114. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 275(21):16202-12.

115. Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, Martinou JC. 1999. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol.* 144(5):883-9.
116. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281(5385):2027-31.
117. Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. 1995. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 217(3):1185-92.
118. McGirr SJ, Kelly PJ, Scheithauer BW. 1987. Stereotactic resection of juvenile pilocytic astrocytomas of the thalamus and basal ganglia. *Neurosurgery.* 20: 447-452.
119. McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. 2000. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.* 14(5):549-58.
120. Muscat JE, Hinsvark M, Malkin M. 2006. Mobile telephones and rates of brain cancer. *Neuroepidemiology.* 27(1):55-6.
121. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88(3):355-65.
122. Nakamizo A, Inamura T, Ikezaki K, Yoshimoto K, Inoha S, Mizoguchi M, Amano T, Fukui M. 2002. Enhanced apoptosis in pilocytic astrocytoma: a comparative study of apoptosis and proliferation in astrocytic tumors. *J Neurooncol.* 57:105-14.
123. Neder L, Colli BO, Machado HR, Carlotti CG Jr, Santos AC, Chimelli L. 2004. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. *Clin Neuropathol.* 23(6):262-70.
124. Nomura M, Nomura N, Newcomb EW, Lukyanov Y, Tamasdan C, Zagzag D. 2004. Geldanamycin induces mitotic catastrophe and subsequent apoptosis in human glioma cells. *J Cell Physiol.* 201(3):374-84.
125. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14):7871-6.
126. Ogashiwa M, Maeda T, Yokoyama H, Takeuchi K, Akai K. 1989. Morphologic findings and biologic behavior in the high grade glioma--a postmortem study of 22 cases. *Gan No Rinsho.* 35(11):1297-307.
127. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P. 1993. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog.* 8:74-80.
128. Ohgaki H, Kleihues P. 2005a. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64(6):479-89.
129. Ohgaki H, Kleihues P. 2005b. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 109(1):93-108.
130. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 276(5309):111-3.

131. Park MT, Kim MJ, Kang YH, Choi SY, Lee JH, Choi JA, Kang CM, Cho CK, Kang S, Bae S, Lee YS, Chung HY, Lee SJ. 2005. Phytosphingosine in combination with ionizing radiation enhances apoptotic cell death in radiation-resistant cancer cells through ROS-dependent and -independent AIF release. *Blood*. 105(4):1724-33.
132. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*. 412(6842):90-4.
133. Penninger JM, Kroemer G. 2003. Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol*. 5(2):97-9.
134. Perera LP, Waldmann TA. 1998. Activation of human monocytes induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(24):14308-13.
135. Pilkington GJ. 1994. Tumour cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol*. 4:157-66.
136. Preston-Martin S, Mack W, Henderson BE. 1989. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res*. 49(21):6137-43.
137. Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D, Lizard G. 2005. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*. 19(5):311-26.
138. Puthalakath H, Strasser A. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 9(5):505-12.
139. Ralte AM, Sharma MC, Karak AK, Mehta VS, Sarkar C. 2001. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. *Pathol Oncol Res*. 7:267-78.
140. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 3(9):839-43.
141. Ray SK, Patel SJ, Welsh CT, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. 2002. Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3. *J Neurosci Res*. 69(2):197-206.
142. Riemenschneider MJ, Betensky RA, Pasedag SM, Louis DN. 2006. AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Res*. 66(11):5618-23.
143. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*. 16(23):6914-25.
144. Sahl JD, Kelsch MA, Greenland S. 1993. Cohort and nested case-control studies of hematopoietic cancers and brain cancer among electric utility workers. *Epidemiology*. 4(2):104-14.
145. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1998. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*. 17(26):3401-15.
146. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2(8):476-83.

147. Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A, Meiss G. 2004. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol.* 338(2):217-28.
148. Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Leone M, Soffieti R. 1988. Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. *Cancer.* 61:1386-1393.
149. Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chio A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A. 1995. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett.* 195(2):81-4.
150. Seo JS, Park YM, Kim JI, Shim EH, Kim CW, Jang JJ, Kim SH, Lee WH. 1996. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 218(2):582-7.
151. Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B. 2001. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem.* 79(2):426-36.
152. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1996. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene.* 12(10):2045-50.
153. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399(6735):483-7.
154. Shugg D, Allen BJ, Blizzard L, Dwyer T, Roder D. 1994. Brain cancer incidence, mortality and case survival: observations from two Australian cancer registries. *Int J Cancer.* 59(6):765-70.
155. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 276(10):7320-6.
156. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 76(6):959-62.
157. Song JH, Song DK, Pyrzynska B, Petruk KC, Van Meir EG, Hao C. 2003. TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways. *Brain Pathol.* 13(4):539-53.
158. Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. 1996. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem.* 271(43):27099-106.
159. Srinivasula SM, Ahmad M, MacFarlane M, Luo Z, Huang Z, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1998. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J Biol Chem.* 273(17):10107-11.
160. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature.* 410(6824):112-6.
161. Steinbach JP, Weller M. 2004. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *J Neurooncol.* 70(2):247-256.

162. Stewart LA. 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 359(9311):1011-8.
163. Stieber VW. 2001. Low-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol*. 2(6):495-506.
164. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 352(10):987-96.
165. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397(6718):441-6.
166. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 192(4):571-80.
167. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 8(3):613-21.
168. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*. 273(14):7787-90.
169. Tanaka S, Takehashi M, Iida S, Kitajima T, Kamanaka Y, Stedeford T, Banasik M, Ueda K. 2005. Mitochondrial impairment induced by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in cortical neurons after oxygen and glucose deprivation. *J Neurochem*. 95(1):179-90.
170. Temme A, Herzig E, Weigle B, Morgenroth A, Schmitz M, Kiessling A, Rieger MA, Schackert HK, Rieber EP. 2005. Inhibition of malignant glioma cell growth by a surviving mutant retrovirus. *Hum Gene Ther*. 16(2):209-22.
171. Thomas WE. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev*. 17(1):61-74.
172. Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267:1456-62.
173. Trejo-Solis C, Palencia G, Zuniga S, Rodriguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sanchez A, Moreno-Garcia ME, Cruz A, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Ramirez L, Rodriguez-Enriquez S, Sotelo J. 2005. CasIIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. 7(6):563-74.
174. Uno M, Oba-Shinjo SM, Wakamatsu A, Huang N, Ferreira Alves VA, Rosemberg S, de Aguiar P, Leite C, Miura F, Marino RJ, Scaff M, Nagahashi-Marie SK. 2006. Association of TP53 mutation, p53 overexpression, and p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to apoptosis in adult patients with diffuse astrocytomas. *Int J Biol Markers*. 21(1):50-7.

175. Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23(23):4679-89.
176. van Loo G, Schotte P, van Gorp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 8(12):1136-42.
177. van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9(10):1031-42.
178. Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335:440-2.
179. Velema JP, Walker AM. 1987. The age curve of nervous system tumour incidence in adults: common shape but changing levels by sex, race and geographical location. *Int J Epidemiol.* 16(2):177-83.
180. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102(1):43-53.
181. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* 277(1):445-54.
182. Voelkel-Johnson C, Entingh AJ, Wold WS, Gooding LR, Laster SM. 1995. Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol.* 154(4):1707-16.
183. Volloch VZ, Sherman MY. 1999. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene.* 18(24):3648-51.
184. Von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, Wiestler OD, Seizinger BR. 1993. Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 86:81-85.
185. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16(17):5386-97.
186. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 298(5598):1587-92.
187. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1997. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* 3(4):523-30.

188. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292(5517):727-30.
189. Weller M, Bamberg M, Belka C, Bornemann A, Brugger W, Demuth K, Ernemann U, Ganswindt U, Handgretinger R, Herrlinger U, Honegger J, Hopf N, Huss G, Kaminsky J, Paulsen F, Ritz R, Schabet M, Schmidt B, Scheel-Walter HG, Sökler M, Steinbach JP, Tatagiba M, Wick W, Wilhelm H. 2006. Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge primärer Hirntumoren und ZNS-Metastasen. Herausgeber: Südwestdeutsches Tumor zentrum, Comprehensive Cancer Center Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen. 5. überarbeitete Auflage. ISSN 1438-8979.
190. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem*. 276(51):48404-9.
191. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. 12(6):806-19.
192. Wrensch M, Bondy ML, Wiencke J, Yost M. 1993. Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: a review. *J Neurooncol*. 17(1):47-64.
193. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(25):14559-63.
194. Xerri L, Devillard E, Ayello C, Brousset P, Reed JC, Emile JF, Hassoun J, Parmentier S, Birg F. 1997. Cysteine protease CPP32, but not Ich1-L, is expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Hum Pathol*. 28(8): 912-21.
195. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 297(5579):259-63.
196. Zamzami N, Kroemer G. 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(1):67-71.
197. Zhang J, Liu X, Scherer DC, van Kaer L, Wang X, Xu M. 1998. Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(21):12480-5.
198. Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, Lou D, Wells JM, Olivares-Villagomez D, Van Kaer L, Wang X, Xu M. 2003. Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(26):15782-7.
199. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. 15(12):1481-6.

## 7. ANHANG

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis-Inducing-Factor
ALL	akute lymphatische Leukämie
Apaf-1	apoptotic-protease-activating-factor-1
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated-X-protein
Bcl-2, Bcl-xL	Gruppe der antiapoptotischen „b-cell lymphoma 2“-Proteine
Bid	BH3-interacting-domain death agonist
BIR	baculovirus-IAP-repeat
Bp	Basenpaare
CAD	Caspase-activated-DNase
C. elegans	Caenorhabditis elegans
DAB	Diaminobenzidin
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DISC	Death-inducing-signalling-complex
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DR	Death Receptor
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
Endo G	Endonuklease G
H. E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hsp 70	Hitzeschockprotein 70
HTRA2	high-temperature-requirement protein A2
IAP	inhibitor-of-apoptosis-proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
IHC	Immunhistochemie
IMS	Intermembranespace of mitochondria
MIB-1	Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67
kDa	kilo Dalton
NHL	non-Hodgkin-Lymphom

---

pRB	Retinoblastoma susceptibility protein
SA-HRP	Streptavidin-Horse Radish Peroxidase
SV-40	Simian-Virus 40
TMA	Tissue Microarray
TNF-alpha	Tumor-Necrosis-Factor-alpha
TRAIL	Tumor-Necrosis-Faktor-related apoptosis-inducing ligand
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphat (dUTP) biotin nick end-labeling
WHO	World Health Organization
XIAP	x-linked-inhibitor-of-apoptosis
µm	Mikrometer
ZNS	zentrales Nervensystem
z-VAD-fmk	z-VAD-Fluomethylketon

## 7.2. Danksagung

Ich danke **Herrn Prof. Dr. med. R. Meyermann** für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, die Benutzungserlaubnis der Laboreinrichtungen sowie die Berichterstattung.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. med. Michel Mittelbronn** für seine zuverlässige und freundschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit, für zahlreiche Anregungen und Diskussionen während der Erstellung, für seine permanente Hilfe bei Fragen jeglicher Art samt nächtlicher „Arbeitssessions“ in Unterjesingen, für sein Engagement im Rahmen der statistischen Analysen und schließlich für seine lockere und aufgeschlossene Umgangsweise und die Einführung in das Institut.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei **Herrn David Capper** für seine freundschaftliche Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft, für die Einführung in die Statistik- und Bildbearbeitungsprogramme sowie die Bereitstellung der TMA-Stanzen und der Überlebensdaten.

**Herrn Prof. Dr. K. Dietz** danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Bei **Herrn Benjamin. Goepfert** bedanke ich mich ebenfalls für die Bereitstellung der TMA-Stanzen.

Weiter gilt mein Dank **Herrn Kubrom Bekure** und **Herrn Patrick Harter** für die Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbetechniken sowie **Frau Katrin Trautmann, Frau Wilma Ott** und **Herrn Holger Schlaszus** für die Unterstützung während der Laborarbeit.

Meiner Freundin **Katrin** danke ich von Herzen für die technische und stilistische Hilfe und für ihre Unterstützung und Aufmunterung während der Erstellung der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mir eine umfangreiche Ausbildung ermöglichen und mich stets unterstützen.

### 7.3. Lebenslauf

Name:	Hajo Herzog
Geburtstag:	09.05.1982
Geburtsort:	Ludwigsburg
1988-1992	Grünlandschule in Freiberg am Neckar
1992-2001	Gymnasium in Freiberg am Neckar (Oscar-Paret-Schule)
20.06.2001	Abitur
07/2001-04/2002	Zivildienst im Rettungsdienst des DRK Ludwigsburg
04/2002	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
25.03.2004	Ärztliche Vorprüfung
10/2004-2007	Promotion am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen Direktor: Prof. Dr. R. Meyermann <i>„Expression der Caspase-unabhängigen Apoptosefaktoren Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) und Endonuklease G im Vergleich zu aktivierter Caspase-3 in humanen Astrozytomen unterschiedlichen WHO-Grads und deren Assoziation mit dem Überleben“</i>
02/2007-01/2008	Praktisches Jahr
05.11.2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung