

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

**Immunhistochemische Analyse des axonalen
Lenkungsfaktors Netrin-1 und seines Rezeptors DCC
(deleted in colorectal cancer) in humanen Gliomen**

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

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

**vorgelegt von
Michael Allmendinger
aus
Stuttgart-Bad Cannstatt**

2010

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gliazellen	1
1.2 Epidemiologie von Astrozytomen	2
1.3 Hinweise auf die Ätiologie von Astrozytomen.	2
1.4 Klassifikation von Astrozytomen	6
1.4.1 WHO-Grad I: pilozytisches Astrozytom	7
1.4.2 WHO-Grad II: diffuses Astrozytom	8
1.4.3 WHO-Grad III: anaplastisches Astrozytom	9
1.4.4 WHO-Grad IV: Glioblastom.	10
1.5 Therapeutische Konzepte	12
1.6 Stand der Forschung	14
1.7 Netrin-1	21
1.8 DCC	22
1.9 Abhängigkeitsrezeptoren	24
1.10 Signalkaskaden von DCC und Netrin-1	26
1.11 Netrin-1-Interaktion mit weiteren Rezeptoren	33
1.12 Fragestellung	34
2. Material und Methoden	35
2.1 Definition der Auswahl der Gewebeproben	35
2.1.1 Herstellung histologischer Präparate	36
2.2 Tissue Microarrays	36
2.3 Immunhistochemie	38
2.3.1 Allgemeines	38
2.3.2 Antikörper	39
2.3.3 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen	40
2.4 Lichtmikroskopische Auswertung	41
2.5 Erfassung der epidemiologischen und klinischen Patientendaten	42

2.6	Statistische Auswertung	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Auswertung der Zellzahl	44
3.1.1	Zelldichte in Astrozytomen und Weisser Substanz	44
3.1.2	Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone	45
3.1.3	Zelldichte bei Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor	46
3.2	Immunreaktivität von DCC	47
3.2.1	DCC Immunreaktivität in Astrozytomen und Normalhirn	47
3.2.2	DCC Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen	51
3.2.3	DCC Immunreaktivität in Glioblastom-Rezidiven	52
3.3	Immunreaktivität von Netrin-1	53
3.3.1	Netrin-1 Immunreaktivität in Astrozytomen und Normalhirn	53
3.3.2	Netrin-1 Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen	56
3.3.3	Netrin-1 Immunreaktivität in Glioblastom-Rezidiven	56
3.3.4	Netrin-1 Immunreaktivität in Gefäßen in Astrozytomen und Normalhirn	57
3.4	Kaplan-Meier-Analyse für DCC und Netrin-1	60
4.	Diskussion	63
4.1	Zelldichte in Astrozytomen	64
4.2	DCC Immunreaktivität in Astrozytomen und im Normalhirn	66
4.3	Netrin-1 Immunreaktivität in Astrozytomen, Normalhirn und Gefäßen	70
4.4	DCC und Netrin-1 Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen	76
4.5	DCC und Netrin-1 Immunreaktivität in primären Glioblastomen und deren Rezidiven	77
4.6	Überlebensanalysen	78

4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	79
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Anhang	104
7.1	Abkürzungsverzeichnis	104
7.2	Danksagung	108
7.3	Lebenslauf	109

1. Einleitung

1.1 Gliazellen

Astrozytome entstehen durch die maligne Entartung von Astrozyten und gehören zur heterogenen Gruppe der Gliome. Unter dem Begriff Gliom werden Tumoren zusammengefasst, die sich von den Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS) ableiten. Das Gliagewebe nimmt neben Stütz- und Haltefunktion verschiedene komplexe Funktionen im menschlichen Gehirn und Rückenmark wahr. Neben den Astrozyten werden Oligodendrozyten, Ependymzellen und die Mikroglia zu den Gliazellen gezählt.

Astrozyten exprimieren als Intermediärfilament das saure Gliafaserprotein (GFAP). In ihren Zellmembranen besitzen sie Ionenkanäle und Rezeptoren für Neurotransmitter und andere Signalmoleküle und können auf diese Weise Signale untereinander und mit Neuronen austauschen. Sie können Neuronen sowohl erregen als auch inhibieren und haben die Fähigkeit die synaptische Übertragung zu modulieren (Araque et al., 2001, Fields und Stevens-Graham, 2002, Hatton, 2002). In der Entwicklung des Gehirns spielen sie eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen das Wachstum von Axonen und Dendriten und unterstützen die Migration und Differenzierung von Neuronen (Chamak et al., 1987, Zheng et al., 1996, Anton et al., 1997, Cameron et al., 1997, Dijkstra et al., 1999). Astrozyten greifen in die Homöostase der zerebralen Blutzirkulation ein und sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Harder et al., 2002, Gordon et al., 2007).

Oligodendrozyten bilden das Pendant zu den Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) und bilden Myelinscheiden aus, die die Axone der Neuronen isolieren und die saltatorische Erregungsleitung ermöglichen. Ependymzellen kleiden die Ventrikel aus (Hirano und Matsui, 1975) und Mikrogliazellen, die am wahrscheinlichsten aus der Reihe der Monozyten hervorgehen, sind für die immunologische Überwachung des ZNS zuständig (Kreutzberg, 1996).

1.2 Epidemiologie von Astrozytomen

Primäre intrakranielle Neoplasien machen nur etwa 2% aller malignen Tumoren des Menschen aus. Dennoch spielen sie klinisch eine wichtige Rolle, da sie prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten können und bei den pädiatrischen Neoplasien nach der Gruppe der Leukämien an zweiter Stelle stehen (Ries et al., 1999).

Gliome sind nach einem 2005 veröffentlichten Bericht des Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), der Daten aus den Jahren 1998 bis 2002 umfasst, für 40% aller primären Tumoren des zentralen Nervensystems verantwortlich. Betrachtet man nur die malignen Tumoren, beträgt der Anteil der Gliome 78%. Unter den Tumoren neuroepithelialen Ursprungs ragen Astrozytome, deren maligneste Subform die Glioblastome darstellen, mit einem Anteil von 75% heraus.

Die Inzidenz der Astrozytome wird mit 5-7/100000 Einwohnern angegeben, wobei Unterschiede je nach Region, Herkunft und Geschlecht zu beachten sind. So ist in Westeuropa, den USA oder Australien ihre Inzidenz höher als in Afrika oder Asien. Ebenso ist eine höhere Inzidenz bei Kaukasiern im Vergleich zu Asiaten oder Afrikanern festzustellen. Beim Vergleich der Geschlechter dominieren die Männer mit einem Auftreten von ungefähr 3:2 (McLendon et al., 1985, Velema et al., 1987, Shugg et al., 1994, Davis et al., 1999, Kleihues und Cavenee, 2000).

1.3 Hinweise auf die Ätiologie von Astrozytomen

Die Ätiologie von Astrozytomen ist bis heute weitestgehend unbekannt. Es gibt eine Vielzahl von epidemiologischen Studien über unterschiedliche exogene und endogene Ursachen. Zumeist scheitern die Aussagen jedoch an der statistischen Signifikanz oder sind inkonsistent.

Eine Auswahl der zur Diskussion stehenden Risikofaktoren umfasst:

1. Therapeutische Bestrahlung:

Die therapeutische Bestrahlung gilt als eine der wenigen etablierten Ursachen für die Entstehung für Gehirntumoren (Wrensch et al., 2002). Insbesondere für Kinder sind die Daten überzeugend. Sowohl Patienten dieser Altersgruppe, die in Israel auf Grund von Tinea capitis therapeutisch bestrahlt wurden (Shore et al., 1976, Ron et al., 1988), als auch Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie, die sich einer Strahlentherapie unterziehen mussten, leiden vermehrt unter Astrozytomen und Glioblastomen (Neglia et al., 1991, Walter et al., 1998). Auch die Bestrahlung von Hypophysenadenomen und anderen intrakraniellen Tumoren ist mit einem erhöhten Risiko an astrozytären Tumoren zu erkranken assoziiert (Brada et al., 1992, Tsang et al., 1993, Little et al., 1998).

2. Elektromagnetische Felder:

Der kanzerogene Einfluss elektromagnetischer Felder auf ZNS-Gewebe sowohl am Arbeitsplatz als auch im Haushalt wird in neueren Studien nicht bestätigt (Klaeboe et al., 2005, Kleinerman et al., 2005, Karipidis et al., 2007), während eine ältere Studie einen Zusammenhang vermutet (Wertheimer und Leeper, 1987).

Spekulationen über die Rolle von Mobiltelefonen haben in letzter Zeit Aufsehen erregt. Eine schwedische Arbeitsgruppe postuliert in mehreren Studien ein erhöhtes Risiko, vor allem bei langjährigem Gebrauch (Hardell et al., 2007) und findet bei letzterer Hypothese Unterstützung von einer deutschen Arbeitsgruppe (Schüz et al., 2006). Jedoch wird in vielen anderen Publikationen kein erhöhtes Risiko festgestellt (Christensen et al., 2005, Hepworth et al., 2006, Muscat et al., 2006, Klaeboe et al., 2007). Es besteht ein genereller Konsens, dass die Langzeitfolgen des Gebrauchs von Mobiltelefonen noch nicht abzusehen sind und weiter untersucht werden müssen.

3. Erbliche Tumorsyndrome und familiäres Risiko:

Die Gruppe der Phakomatosen ist zwar nur für 1 - 5% der hirneigenen Tumoren verantwortlich zu machen (Narod et al., 1991, Malmer et al., 2001), aber als endogene Ursache akzeptiert. Diese familiären Tumorsyndrome, einhergehend

mit typischen Hautveränderungen, werden autosomal-dominant vererbt. Ihre Tumoren sind zumeist sehr spezifisch und lassen auf das zu Grunde liegende Syndrom schließen. Erwähnenswert ist das Optikusgliom bei Neurofibromatose Typ I (von Deimling und Perry, 2007) oder das subependymale Riesenzellastrozytom bei Tuberöser Sklerose (Lopes et al., 2007). Auch Keimbahnmutationen des Tumorsuppressorgens p53 (TP53) im Rahmen des Li-Fraumeni Syndroms sind neben dem gehäuften Auftreten anderer Tumoren wie Weichteil- und Knochensarkomen, Mammakarzinomen sowie Nebennierenrindenzellkarzinomen mit Astrozytomen vergesellschaftet (Ohgaki et al., 2007). Erwähnenswert ist überdies das Turcot Syndrom Typ I, welches durch das gehäufte Auftreten von Kolonkarzinomen und Astrozytomen charakterisiert und mit dem hereditären non-polypösen Kolonkarzinom assoziiert ist. Hierbei handelt es sich vor allem um Mutationen der Mismatch-Reparatur-Gene hMLH1 und hPMS1.

Um von einem gehäuften Auftreten von Gehirntumoren bei nahen Verwandten sprechen zu können, ist die Datenlage noch zu unklar.

4. Immunologie:

Für die Gruppe der Atopiker und Patienten mit Autoimmunerkrankungen wird ein erniedrigtes Risiko postuliert (Schlehofer et al., 1999, Wiemels et al., 2002). Dies könnte darauf hinweisen, dass Menschen mit einem „hyperaktiven“ Immunsystem einen gewissen Schutz vor Gehirntumoren haben.

Vermutungen, dass immungeschwächte Patienten, wie Infizierte mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), vermehrt an ZNS-Tumoren erkranken, haben sich nur für ZNS-Lymphome bestätigt (Coté et al., 1996).

5. Trauma:

Zwar sind Traumata des Schädels ein starker Reiz für die Proliferation von Astrozyten, aber Studien können keinen gesicherten Zusammenhang mit der Entstehung von Astrozytomen belegen (Gurney et al., 1996, Preston-Martin et al., 1998).

6. Virusinfektionen:

Es gibt zahlreiche Viren, deren onkogene Wirkung tierexperimentell nachgewiesen ist. Insbesondere die Gattung der Polyomaviren, die das Simian-Virus 40 (SV-40), JC-Virus und BK-Virus umfasst, ist in den Mittelpunkt des Interesses getreten. Die DNA-Viren greifen über Komplexierung und Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und Retinoblastom Protein (Rb) in den Zellzyklus ein und können in vitro menschliche Zellen transformieren (Carbone et al., 1997, Butel und Lednicky, 1999).

Von öffentlichem Interesse ist die Kontamination von Polio-Vakzinen mit SV-40, die zwischen 1955 und 1962 in Nordamerika und Teilen Europas eingesetzt wurden (Carbone et al., 1997). In 35% der Fälle konnte SV-40 in Proben von Hirntumoren nachgewiesen werden (Carbone et al., 1997, Butel und Lednicky, 1999, Huang et al., 1999), während das normale umgebende Gehirngewebe nahezu frei von Viruspartikeln war (Martini et al., 1996, Huang et al., 1999). In der Schweiz, einem Land, welches das Polio-Vakzin angewandt hat, enthielten 25-56% der untersuchten Tumorproben SV-40-Sequenzen. Frei von SV-40-Partikeln war in derselben Studie hingegen eine Serie von Gehirntumoren in Finnland, wo dieses Vakzin nicht eingesetzt wurde (Ohgaki et al., 2000). Jedoch wird aus den Ländern, die das kontaminierte Vakzin in Verwendung hatten, kein signifikanter Anstieg der Inzidenz von Gehirntumoren berichtet (Carbone et al., 1997) und die Inzidenzraten von Gehirntumoren sind in solchen Gebieten, die das Vakzin angewandt haben, ähnlich hoch wie in Ländern, die es nicht appliziert haben (Ohgaki et al., 2000)

7. Ernährung :

Nitratverbindungen haben sich im Tiermodell als Kanzerogene erwiesen. Der Verzehr von Produkten mit einem hohen Anteil an Nitrat/Nitrit und sekundären Aminen, die im Organismus in Nitratverbindungen umgebaut werden, kann das Risiko für einen ZNS-Tumor erhöhen (Burch et al., 1987, Blowers et al., 1997). Gepökelttes Fleisch, aber auch Produkte von gedüngten Feldern wie Feldsalat oder Spinat, enthalten diese Stoffe. Dagegen wird dem Verzehr von Obst- und Gemüsesorten, die reich an Vitamin A, C oder Karotenoiden sind, ein

protektiver Effekt nachgesagt, da sie die endogene Bildung von Nitratverbindungen hemmen (Burch et al., 1987, Preston-Martin et al., 1989). Es gibt auch die Hypothese, dass Oxidanzien, die in zahlreichen Nahrungsmitteln und im Zigarettenrauch vorkommen, kanzerogen wirken und Vitamine ihren Schutz durch ihre antioxidativen Eigenschaft vermitteln (Ames et al., 1993).

1.4 Klassifikation von Astrozytomen

Die histopathologische Gradierung eines Tumors erfolgt nach den Kriterien der WHO-Klassifikation, die vier Grade umfasst. Neben klassischen Hilfsmitteln wie Lichtmikroskopie und konventionellen Färbemethoden kommen immunhistochemische Färbungen bei der Beurteilung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen zum Einsatz. Biologische Merkmale wie Zell- und Kernpolymorphie, Zelldichte, Mitoserate, Endothelproliferation der Tumorgefäße und das Vorkommen von Nekrosen sind von entscheidender Bedeutung bei der Einteilung. Sinn dieser Klassifikation ist die Vorhersage des mit gewissen morphologischen Mustern assoziierte, biologische Verhalten und damit der Malignität des Tumors, woraus im klinischen Dialog Therapieoptionen abgeleitet werden können. Ferner ist ein Rückschluss auf die Prognose des Patienten möglich, wobei andere Kriterien wie Alter und Zustand des Patienten oder die Lokalisation des Tumors miteinbezogen werden müssen. Astrozytome vom Grad I können prinzipiell chirurgisch kurativ behandelt werden und sind mit einer guten Prognose assoziiert, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate bei 96% liegt (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Während Patienten, die an einem Astrozytom Grad II erkrankt sind, noch mit einer mittleren Überlebensrate von sechs bis acht Jahren rechnen dürfen, ist die Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms Grad III oder Glioblastoms WHO-Grad IV mit einer ernüchternden Prognose versehen. Hier liegen die mittleren Überlebensraten bei weniger als 2 Jahren (Grad III) bzw. unter einem Jahr (Grad IV) (Maldaun et al., 2004, Ohgaki und Kleihues, 2005a, Louis et al., 2007).

1.4.1 WHO-Grad I: pilozytisches Astrozytom

Charakteristisch für diesen Tumor ist sein langsames Wachstum, bevorzugt in den Mittellinienstrukturen des Gehirns, und sein gehäuftes Auftreten bei Kindern und jungen Erwachsenen. Das pilozytische Astrozytom stellt das am häufigsten vorkommende Gliom bei Kindern dar, wobei 67% der Tumoren im Cerebellum diagnostiziert werden (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Auch der Hirnstamm (McGirr et al., 1987) und der Nervus opticus (Hoyt und Baghdassarian, 1969) sind, im Gegensatz zum Rückenmark, nicht selten betroffen. Dieses „Gliom des Kindesalter“ hat einen Inzidenzgipfel zwischen dem fünften und neunten Lebensjahr (CBTRUS 2005). Astrozytome WHO-Grad II-IV hingegen treten hauptsächlich erst im mittleren bis höheren Erwachsenenalter auf, wobei diese Neoplasien auch in seltenen Fällen Kinder befallen und als Differentialdiagnose nicht ausgeschlossen werden dürfen.

Makroskopisch sind pilozytische Astrozytome zumeist scharf umschriebene, vom gesunden Gewebe gut abgrenzbare Läsionen. Vor allem im Kleinhirn führt eine mukoide Degeneration des Tumorgewebes zu einer typischen Zystenbildung (Ilgren und Stiller, 1987). Histologisch lässt sich oft ein biphasisches Muster beschreiben, das sich abwechselnd aus faserreichen Abschnitten parallel angeordneter bipolarer Zellen und mikrozystisch aufgelockerten Arealen zusammensetzt. Die in den kompakten Tumorabschnitten vorkommenden bipolaren Zellen weisen mikroskopisch häufig „haarartige“ Fortsätze (griech.: pilos = Haar) und von einem eosinophilen Zytoplasma umgebenen längliche Kerne auf. Auffällig sind in diesen Zellen auch korkenzieherartige eosinophile Strukturen, die im Zytoplasma lokalisiert sind und als Rosenthal-Fasern bezeichnet werden. Tumorzellen in den mikrozystisch aufgelockerten Arealen besitzen einen eher rundlich-ovalen Kern und kürzere Fortsätze und beherbergen in ihrem Zytoplasma rundliche, eosinophile Körperchen („eosinophilic granular bodies“).

Eosinophilic granular bodies und Rosenthal-Fasern kommen jedoch auch bei reaktiven Astroglionen am Rande von chronischen Prozessen vor und sind daher nicht pathognomonisch für das pilozytische Astrozytom.

Passend zum biphasischen Muster exprimieren die faserreichen Tumorareale GFAP, während in mikrozystischen Bereichen diese Expression stark abnimmt. Typisch für diesen Tumor ist auch, dass Mitosen, allerdings nur in geringer Zahl, hyperchromatische oder pleomorphe Kerne, Gefäßproliferate und sogar Nekrosen in Einzelfällen diagnostiziert werden können, ohne - im Gegensatz zu höhergradigen Gliomen - auf Malignität eindeutig hinweisend zu sein (Louis et al., 2007). Lediglich wenn eine erhöhte mitotische Aktivität in Assoziation mit Gefäßproliferaten und/oder pallisadenförmiger Nekrosen mikroskopisch festgestellt wird, ist die Diagnose eines malignen pilozytischen Astrozytom analog WHO-Grad III gerechtfertigt (Tomlinson et al., 1994). Eine Progression vom pilozytischen Astrozytom zum sekundären Glioblastom ist extrem selten (Louis et al., 2007).

Zytogenetisch kann beim pilozytischen Astrozytom gelegentlich eine Mutation des NF-1-Gens nachgewiesen werden, welche mit der Neurofibromatose Typ I assoziiert wird. Ungefähr 15% der Patienten mit dieser Erbkrankheit entwickeln ein pilozytisches Astrozytom, insbesondere im Bereich des Nervus opticus (Lewis et al., 1984, Tada et al., 2003). Eine in höhergradigen Astrozytomen vorkommende TP53-Mutation ist nicht nachzuweisen (Ohgaki et al., 1993).

1.4.2 WHO-Grad II: diffuses Astrozytom

Dieser astrozytäre Tumor hat sein Inzidenzmaximum zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr, kann aber prinzipiell in jedem Lebensalter vorkommen. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (M:F = 1,18:1). Das diffuse Astrozytom ist am häufigsten im Frontal- und Temporallappen lokalisiert, gefolgt vom Hirnstamm und Rückenmark. Im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom ist das Kleinhirn ein seltener Manifestationsort. Diffuses, infiltratives Wachstum in benachbarte Strukturen macht eine komplette Resektion unmöglich, begleitet von einer hohen Rezidivrate. Diese Rezidive neigen häufig zur Progression. Die mittlere Überlebensrate liegt bei 6 bis 8 Jahren, allerdings mit erheblicher individueller Streuung.

Makroskopisch handelt es sich um einen unscharf abgegrenzten, diffus aufgetriebenen Tumor mit zum Teil zystischen Formationen. Histopathologisch lassen sich das am häufigsten vorkommende fibrilläre, das gemistozytäre und das seltene protoplasmatische Astrozytom als Varianten unterscheiden. Das fibrilläre Astrozytom weist stark verzweigte, mikrozystisch angeordnete Tumorzellen mit blassem Zytoplasma auf. Als gemistozytär gilt ein Astrozytom, wenn mehr als 20% der Tumorzellen aus einem plumpen, eosinophilen Zellkörper bestehen, dessen Kern exzentrisch hervorsticht (Krouwer et al., 1991). Kleine degenerierte Astrozyten mit wenigen, feinen Ausläufern werden der raren protoplasmatischen Variante zugeschrieben. Ihnen allen gemein ist eine mäßige Zelldichte und geringe Kernpleomorphie. Mitosefiguren, Gefäßproliferate und Nekrosen sind nicht kompatibel mit der Diagnose eines diffusen Astrozytoms WHO-Grad II. Immunhistochemisch exprimiert das diffuse Astrozytom GFAP (Louis et al., 2007).

Molekulargenetisch weisen über 60% der Tumoren eine TP53-Mutation auf, bei der gemistozytären Variante ist dieses Tumor-Suppressor-Gen sogar bei über 80% der Fälle verändert (Okamoto et al., 2004). Letztere neigt auch dazu früher als der fibrilläre Subtyp zu rezidivieren, und die Progression zum sekundären Glioblastom zu vollziehen (Ständer et al., 2004).

1.4.3 WHO-Grad III: anaplastisches Astrozytom

Das anaplastische Astrozytom kommt in der Altersgruppe zwischen 30 und 60 Jahren am häufigsten vor. Das mittlere Erkrankungsalter wird in einer Studie mit 46 Jahren angegeben (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (M:F = 1.1:1). Die mittlere Überlebensrate beträgt etwa 1,6 Jahre (Ohgaki und Kleihues, 2005a), wobei die Prognose von der Tendenz zur Progression zum Glioblastom entscheidend abhängt. Jüngerer Erkrankungsalter und eine oligodendrogiale Komponente wirken sich günstig auf die Prognose aus.

Makroskopisch fällt wie beim diffusen Astrozytom ein infiltrierender Tumor auf. Im histologischen Bild sind im Vergleich zum WHO-Grad II Astrozytom eine

erhöhte Zelldichte, vermehrte Mitosefiguren und Zellkernatypien zu beobachten. Gefäßproliferate und Nekrosen sprechen bei Astrozytomen bereits für eine Progression hin zum Glioblastom WHO Grad IV.

Wie bei allen astrozytären Tumoren gelingt immunhistochemisch der GFAP-Nachweis. Der Proliferationsindex wird immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das nukleäre Antigen Ki-67 mittels des MIB-1 Antikörpers bestimmt und liegt beim anaplastischen Astrozytom bei 5-10 % (Jaros et al., 1992, Karamitopoulou et al., 1994). Eine Mutation am TP53-Gen weisen mehr als 70% der Tumoren auf (Watanabe et al., 1997). Die Tendenz zur Progression zum Glioblastom ist stark vorhanden, im Durchschnitt geschieht dies innerhalb von 2 Jahren (Ohgaki et al., 2004).

1.4.4 WHO-Grad IV: Glioblastom

Unter den primären Gehirntumoren kommt das Glioblastom am häufigsten vor und ist die bösartigste Variante. 60-75% aller Astrozytome sind Glioblastome. Das Inzidenzmaximum des Glioblastoms liegt zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr (Ohgaki und Kleihues, 2005a), kann aber prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (M:F=1.3:1). Prädilektionsstelle ist das Marklager der Großhirnhemisphären, wobei am häufigsten die Temporallappen (31%), gefolgt von Parietal- (24%), Frontal- (23%) und Okzipitallappen (16%) betroffen sind. Ein kombinierter Befall der fronto-temporalen Region ist besonders typisch (Louis et al., 2007). Über den Balken infiltriert der Tumor häufig auf die Gegenseite („Schmetterlingsgliom“). Ein multizentrisches Wachstum ist in 7,5% der Fälle zu beobachten (Barnard und Geddes, 1987).

90 % der Glioblastome manifestieren sich rapide in weniger als 3 Monaten de novo, ohne dass bereits bestehende niedriggradige Läsionen bekannt sind (primäre Glioblastome). Typischerweise entwickeln sie sich bei älteren Patienten (mittleres Erkrankungsalter: 62 Jahre) (Ohgaki et al., 2004, Ohgaki und Kleihues, 2007). Sekundäre Glioblastome entwickeln sich langsamer aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen. Charakteristischerweise sind hier

jüngere Patienten betroffen (mittleres Erkrankungsalter: 45 Jahre) und das Progressionsintervall variiert beachtlich zwischen weniger als einem Jahr und 10 Jahren, im Durchschnitt sind es 4 bis 5 Jahre (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Wegen ihres invasiven Wachstums können Glioblastome, wie auch die höhergradigen Astrozytome WHO-Grad II und III, nicht komplett reseziert werden und trotz Fortschritten in Strahlen- und Chemotherapie überlebt weniger als die Hälfte der Patienten länger als ein Jahr, wobei hohes Alter bei der Erkrankung einen bedeutend negativen prognostischen Faktor darstellt (Louis et al., 2007). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei weniger als 3% (Ohgaki und Kleihues, 2005b).

Makroskopisch auffällig ist eine bunte Schnittfläche, die sich aus gelblichen nekrotischen Arealen und rotbraunen Einblutungsherden zusammensetzt. Bailey und Cushing inspirierte dieses bunte Bild zur Bezeichnung „Glioblastome multiforme“.

Histopathologische Merkmale beinhalten Zell- und Kernpleomorphie, erhöhte Mitose- und Proliferationsrate, strichförmige Nekrosen mit Palisadenstellung von Tumorzellen im Randbereich und Gefäßproliferate, die sich in Form von glomerulusartigen Gefäßknäulen darstellen. Die Tumorgefäße weisen große Schwankungen in Form und Durchmesser auf, sind gelegentlich thrombosiert und von Blutresiduen benachbart (Louis et al., 2007). In der Regel wird immunhistochemisch die Expression von GFAP nachgewiesen. Die Mitoserate zeigt große regionale Unterschiede und wird im Schnitt mit 15-20% angegeben (Jaros et al., 1992, Karamitopoulou et al., 1994).

Histogenetisch wird der zelluläre Hintergrund des Glioblastoms momentan kontrovers diskutiert. Im Gespräch sind Gehirntumorstammzellen (BTSC), die entartete Abkömmlinge von neuronalen Stammzellen repräsentieren und unlimitiertes Wachstums- und Differenzierungspotential aufweisen (Sanai et al., 2005, Kondo, 2006). Dies würde auch die Diversität des Glioblastoms erklären. Ein direkter Nachweis solcher Zellen steht aber noch aus (Jordan et al., 2006). Auf molekulargenetischer Ebene ist die maligne Transformation der neuroepithelialen Zellen ein mehrstufiger Prozess, der die Akquirierung von genetischen Veränderungen beinhaltet. Die Mehrheit der Tumoren teilt sich den

Verlust der Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 10q und es sind zahlreiche weitere Deletionen auf anderen Chromosomen zu beobachten. Amplifikation des epidermal growth factor receptor (EGFR) ist in 40% der primären Glioblastom beschrieben, in sekundären Glioblastomen jedoch ein seltenes Ereignis (Ohgaki et al., 2004). TP53-Mutationen lassen sich häufiger bei sekundären Glioblastomen nachweisen (65%) als bei der de novo-Variante (28%). TP53-Mutationen kommen auch bei Patienten mit dem Li Fraumeni-Syndrom vor, die vermehrt an Glioblastomen erkranken. Unter anderem treten Mutationen auch an folgenden Genen auf: PTEN, CDK4 und RB1. Primäre und sekundäre Glioblastome bilden somit distinkte Entitäten, die sich auf unterschiedlichen genetischen Pfaden entwickeln, verschiedene Expressionsmuster aufweisen und wahrscheinlich unterschiedlich auf Therapiemodelle reagieren (Louis et al., 2007). Auch weisen diese Erkenntnisse auf die Existenz weiterer Glioblastom-Untergruppen hin, die nur molekulargenetisch voneinander abzugrenzen sind.

1.5 Therapeutische Konzepte

In der Regel wird eine vollkommene Resektion des Tumorgewebes angestrebt, was meistens jedoch nur beim pilozytischen Astrozytom möglich ist. Astrozytome WHO-Grad II bis IV lassen sich wegen ihres diffus infiltrierenden Wachstums nicht radikal entfernen. Bestenfalls ist eine vollkommene makroskopische Resektion zu erreichen, weshalb eine adjuvante Strahlentherapie als zusätzliche Option angewandt wird. Bei diffusen Astrozytomen WHO-Grad II geschieht dies noch fakultativ, höhergradige Astrozytome werden hingegen standardmäßig bestrahlt. Pilozytische Astrozytome werden nur bestrahlt, wenn ein progredienter, inoperabler Tumorrest nachzuweisen ist und zunehmend neurologische Defizite bestehen (Weller et al., 2006).

Die Bestrahlung erfolgt in der Regel unter dem Schutz von Kortikosteroiden, um einem vasogenen Ödem und konsekutiver Hirndrucksymptomatik vorzubeugen. Des Weiteren wurden bei Astrozytomen Grad III und IV adjuvant

nitrosoharnstoffhaltige Chemotherapeutika während oder im Anschluss an eine Radiotherapie appliziert. Dabei standen hauptsächlich entweder eine Polychemotherapie mit Procarbazin, CCNU und Vincristin (PCV-Protokoll) oder eine Monotherapie mit Nitrosoharnstoff zur Verfügung (Weller et al., 2006). Patienten, die sich dieser zusätzlichen Chemotherapie unterzogen, erzielten in einer großen Metaanalyse eine geringe Überlebenszeitverlängerung (Stewart, 2002). Beim Glioblastom hat sich nach neueren Studien das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid in den Fokus gedrängt. Wie sich herausstellte verlängert es in adjuvanter Anwendung die durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten um 2,5 Monate (Stupp et al., 2005).

Trotz dieses vielversprechenden Ansatzes stellt die Therapieresistenz dieser bösartigen Tumoren ein Hauptproblem dar. O(6)-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) ist ein DNA-Reperatur-Enzym, das vom (6)-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) Gen codiert wird (Pegg et al., 1995). Dieses Enzym beseitigt äußerst effektiv Alkylgruppen von der O6-Position der Base Guanin und revidiert so zytotoxische Effekte, die durch Agenzien wie Temozolomid kreiert werden (Pegg et al., 1995, Gerson, 2002). Eine MGMT-Herunterregulierung führt zu einer höheren Sensibilität der Patienten für Temozolomid und zu einem längeren Überleben (Hegi et al., 2008). Folglich ist die AGT-Inhibierung ein vielversprechender Ansatz, um das Therapieregime zu verbessern. Limitierende Faktoren sind jedoch bisher die pharmakologischen Nebenwirkungen der verfügbaren Substanzen (Quinn et al., 2002) und auch in einer neueren Studie wird von hämatologischen Nebenwirkungen berichtet (Quinn et al., 2009).

Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorenstehung und -progression haben in letzter Zeit zur Entwicklung gezielter Therapieoptionen mit dem Ziel einer größeren Effizienz bei geringer Toxizität geführt und werden im Rahmen klinischer Studien getestet.

„Designer Drugs“, die in zelluläre Signaltransduktionswege eingreifen, welche für das Wachstum und Überleben von Gliomzellen von herausragender Bedeutung sind, spielen in aktuellen Studien eine wichtige Rolle. Angriffsziele bilden bei diesen Ansätzen potente Moleküle wie beispielsweise EGFR (Kuan

et al., 2001) und die mit dem Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase (Guillamo et al., 2009). Monoklonale Anti-EGFR Antikörper und niedermolekulare Kinaseinhibitoren haben jedoch bisher den Nachweis eines lebensverlängernden Effektes für Glioblastompatienten verfehlt (Lefranc, 2009, Sathornsumetee und Rich, 2009).

Eine weitere Therapieoption stellt die Hemmung der Angiogeneese dar. Nach anfänglich ernüchternden Ergebnissen im Rahmen der antiangiogenen Monotherapie (Miletic et al., 2009), wird im Rahmen von Phase II Studien der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin), ein Inhibitor des vascular endothelial growth factor (VEGF) - ein parakriner Stimulator der Angiogenese (Fischer et al., 2005) - in Kombination mit dem Zytostatikum Irinotecan getestet und erscheint als vielversprechende Therapieoption für rezidivierende Gliome (Vredenburgh et al., 2007, Poulsen et al., 2009).

Immuntherapeutische Ansätze werden mit dem Ziel der Gewinnung von Vakzinen verfolgt (Ebben et al., 2009, Khan et al., 2009) und bedürfen ebenso weiterer Erforschung wie gentherapeutische Strategien (Westphal und Lamszus, 2009).

1.6 Stand der Forschung

Nach heutigem Stand der Wissenschaft hat sich die Erkenntnis etabliert, dass maligne Tumoren durch die Transformation von „normalen“ gut funktionierenden Körperzellen in bösartige Abkömmlinge entstehen. Im Laufe dieses Prozesses wird das Genom dieser Zellen über Punktmutationen und Schädigung ganzer Chromosomen so weit verändert, dass Tumorzellen neue Eigenschaften erwerben, die ihnen analog zu Darwins Evolutionstheorie einen Selektionsvorteil ermöglichen (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese neu akquirierten Mechanismen, die auch bei der Entstehung und Progression von Astrozytomen zählen, werden im folgenden Abschnitt ohne Garantie auf Vollständigkeit beschrieben.

Die Eigenschaft, dass Tumorzellen autonom von Wachstumssignalen gedeihen können, wird in der Literatur als erster bedeutender Hauptmechanismus von

Tumorforschern beschrieben (Hanahan und Weinberg, 2000). Dabei spielen vor allem drei molekulare Strategien eine wichtige Rolle. Neoplastische Zellen erwerben diese Fähigkeit durch Modifizierung extrazellulärer Wachstumssignale, ihrer transzellulären Signaltransduktion oder durch Veränderung der durch Wachstumssignale ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Produktion von platelet-derived growth factor (PDGF) und tumor growth factor- α (TGF- α) repräsentieren prominente Beispiele für die autokrine Produktion solcher Wachstumssignale von Glioblastomzellen (Hanahan und Weinberg, 2000). Auf Ebene der transzellulären Signaltransduktion ist in vielen Tumoren eine vermehrte Expression von Rezeptoren zu beobachten, die Wachstumssignale vermitteln. Beispielsweise ist der EGF-Rezeptor in Glioblastomen und vielen weiteren Tumoren aufreguliert (Yarden und Ullrich, 1988, Louis et al., 2007, Guillaudeau et al., 2009). Der SOS(Son Of Sevenless)-Ras(Rat sarcoma)-Raf(Rat fibrosarcoma)-Map(Mitogen Activated Protein)-Kinase Signalweg wurde als erster großer Vertreter der intrazellulären Signalkaskaden beschrieben. Das Ras Protein ist in etwa 25% der humanen Tumoren verändert und ermöglicht einen unkontrollierten Ablauf von Signalwegen (Medema und Bos, 1993, Hanahan und Weinberg, 2000).

Analog entstand die Vorstellung, dass Tumorzellen Mechanismen entwickeln, die sie unabhängig von antiproliferativen Signalen machen. Auf molekularer Ebene spielt hier das Tumorsuppressormolekül Retinoblastom Protein (Rb) eine wichtige Rolle, das über Transkriptionsfaktoren die Proliferation von Zellen kontrolliert (Weinberg, 1995). In vielen Tumoren besitzt es eine gestörte Funktion und auch in Glioblastomen weist es Veränderungen auf (Murphree und Benedict, 1984, Louis et al., 2007).

Als nächstes rückte der Umstand in den Fokus, dass Tumorzellen Störungen in der Apoptoseregulation aufweisen. Die Entdeckung, dass das bcl-2 Gen im folliculären Lymphom via chromosomaler Translokation aufreguliert wird (Korsmeyer, 1992) und die Feststellung, dass es antiapoptotische Aktivität besitzt haben weitere Forschungen in diesem Gebiet angeregt (Vaux et al., 1988). Inaktiverung des Tumorsuppressorproteins TP53, einem Bestandteil der

apoptotischen Signalkaskade, führte im Mausmodell zu schnell wachsenden Tumoren mit einer niedrigen Anzahl apoptotischer Zellen (Symonds et al., 1994). TP53-Mutationen sind auch in astrozytären Tumoren nachzuweisen (Louis et al., 2007). Glioblastomzellen weisen eine erhöhte Apoptoseresistenz auf und dies könnte ein Grund sein für die Resistenz dieser Tumoren gegenüber konventioneller Chemo- und Radiotherapie (Steinbach und Weller, 2004, Lefranc et al., 2005, Lefranc, 2009).

Die bisher erwähnten erworbenen Eigenschaften ermöglichen es Tumorzellen unabhängig von der Umwelt zu wachsen. Neoplastische Zellen scheinen weitere Schritte zu benötigen, um zu großen makroskopisch sichtbaren Tumormassen heranwachsen zu können, da nicht entartete Zellen ein beschränktes Replikationspotential aufweisen (Hayflick, 1997). Auf chromosomaler Ebene spielt dabei die Erhaltung der Telomerregion eine wichtige Rolle (Shay und Bacchetti, 1997). Gut erforscht ist in diesem Zusammenhang das Enzym Telomerase, dessen Expression in Glioblastomen und vielen weiteren Malignomen aufreguliert ist (Shay und Bacchetti, 1997, Bryan und Cech, 1999, Patel und Shervington, 2009), während in den meisten normalen Zellen die Aktivität dieses Enzyms streng herunterreguliert erscheint (Hug und Lingner, 2006). Telomerase stellt die bei jeder Zellteilung verlorengehenden Telomeren durch Nukleotideinbau wieder her und führt so zur Immortalisierung der Zellen (Bryan und Cech, 1999).

Die Fähigkeit zur Neovaskularisierung steht in einem engen Zusammenhang mit dem rapiden Wachstum von Neoplasien (Hanahan und Weinberg, 2000). So rückte Mitte der 1990er Jahre die Angiogeneseforschung in den Vordergrund. In dem komplexen Zusammenspiel wurden zahlreiche die Angiogenese stimulierende und hemmende Faktoren entdeckt. Einen prominenten Vertreter der proangiogenen Seite stellt die VEGF-Familie dar. VEGF ist in der Embryologie für die Entwicklung von Blutgefäßen von essentieller Bedeutung (Carmeliet et al., 1996). Ab der Postnatalperiode ist die VEGF-Expression jedoch physiologischerweise als minimal anzusehen, außer in Situationen, die eine Gefäßneubildung erforderlich machen, wie beispielsweise der Prozess der Wundheilung (Tonnesen et al., 2000). In Tumoren führt eine verstärkte VEGF-

Expression zu einer erhöhten Gefäßzellzahl und -permeabilität (Chaudhry et al., 2001, Dvorak, 2005, Nagy et al., 2008). Diese neugebildeten Gefäße unterscheiden sich in Struktur, Funktion und Organisation im Vergleich zu normalen Gefäßzellen (Nagy et al., 2007), was bei Glioblastompatienten zur tumorassoziierten Ödembildung beiträgt (del Maestro et al., 1990).

Das Glioblastom WHO-Grad IV erscheint auf Grund seiner hohen Vaskularisierungsrate als optimales Ziel einer antiangiogenen Therapie (Miletic et al., 2009). Bisher sprechen jedoch nur etwa die Hälfte der Patienten auf Therapieveruche mit dem monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab oder dem niedermolekularen VEGF-Rezeptor Inhibitor Cediranib an und die Dauer der Ansprechzeit ist variabel (Norden et al., 2008).

Die Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung entwickeln viele Tumorzellen früher oder später (Hanahan und Weinberg, 2000), wobei die dabei entstehenden Tumormetastasen für ca. 90% der Krebstote verantwortlich sind (Sporn, 1996). Proteine, die Zell-Zell-Kontakte oder Verbindungen von Zellen zur extrazellulären Matrix (EZM) herstellen, wie beispielsweise Integrine, Cadherine oder Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs), sind hierbei in den Fokus gerückt (Aplin et al., 1998). Veränderungen ihres Expressionsverhalten führt zu phenotypisch invasiven und metastasierenden Tumorzellen (Varner und Cheresch, 1996, Fogar et al., 1997, Christofori und Semb, 1999, Jin und Varner, 2004). Einen weiteren proinvasiven Faktor repräsentieren extrazelluläre Proteasen (Chambers und Matrisian, 1997). Hauptverteter diese Enzymgruppe stellen die Urokinase (uPA), Matrix Metalloproteinasen (MMP) und Cathepsine dar, die die Migration der Tumorzellen durch die Basalmembran – soweit vorhanden – und die EZM vermitteln (Brooks et al., 2009). Integrine und Proteasen spielen eine pleiotrope Rolle. Sowohl beim Anschluss von metastasierenden Zellen an lokale Blutgefäße, als auch bei der Angiogenese sind sie beteiligt (Fischer et al., 2005, Garmy-Susini und Varner, 2008, Brooks et al., 2009). Es ist nicht überraschend, dass viele dieser genannten Proteine auch in Gliomen verändert exprimiert werden (Asano et al., 2004, Kargiotis et al., 2008, Argyriou und Kalofonos, 2009).

Ein weiteres in der jüngeren Vergangenheit entdecktes Phänomen stellt die Fähigkeit von Tumorzellen dar, sich der körperlichen Immunabwehr zu entziehen. Zum einen soll dies auf die Unfähigkeit der Immunzellen des Wirtsorganismus zurückzuführen sein, Tumorzellen zu erkennen, zum anderen scheinen Tumorzellen aktiv Immunzellen zu inhibieren (Whiteside, 2009). Ersteres ist wohl auf die starke Ähnlichkeit der tumor-assoziierten Antigene im Vergleich zu den Wirtszellen zurückzuführen (Finn, 2006, Ferguson et al., 2008). Letzteres wird der Qualität zugeschrieben, dass Tumorzellen mit allen Komponenten und Stufen der Immunabwehr interferieren können (Whiteside, 2008). Dies geschieht beispielsweise durch die Anlockung von Tumor-Suppressor Zellen oder myeloiden Suppressor Zellen, welche die T-Zellantwort des Immunsystems unterdrücken (Serafini et al., 2006, Gregori et al., 2007) oder durch Induktion der Apoptose von aktivierten T-Zellen (Rabinowich, 1998, Whiteside, 2002). In astrozytären Tumoren gibt es Hinweise, dass die T-Zell-Antwort unter anderem durch Veränderung der antigenpräsentierenden MHC-Klasse-I Proteine herunterreguliert wird (Facoetti et al., 2005, Mehling et al., 2007).

Innerhalb der letzten Jahrzehnte hat sich die Vorstellung entwickelt, dass Tumorzellen durch die Entartung einer einzigen Zelle entstehen. In diesem Modell ist eine Serie von genetischen Veränderungen verantwortlich, die den Weg für die oben erwähnten akquirierten Fähigkeiten ebnet. Auf molekulargenetischer Ebene wurde diese Hypothese durch die Entdeckung von dominant agierende Onkogenen und sich rezessiv verhaltenden Tumorsuppressorgenen unterstützt (Feinberg et al., 2006). Kolorektale Tumoren, um ein Beispiel zu nennen, durchlaufen in der Adenom-Karzinom Sequenz eine Serie von Veränderungen in diesen Genen. Als Stellvertreter seien das KRAS-Gen auf der Seite der Onkogene und das TP53-Gen auf Seite der Tumorsuppressorgene genannt (Fearon und Vogelstein, 1990). Dieses Modell hat einerseits seine Stärken, beispielsweise die Entdeckung von Gatekeeper-Mutationen, die notwendig erscheinen für die Initialstadien des Tumorwachstums. Auf der anderen Seite fehlen solch klare Markergene für die folgenden Stadien wie Invasion oder Metastasierung. Es scheinen eher

multiple, heterogene Genveränderungen eine Rolle zu spielen (Feinberg et al., 2006). Auch bleibt die Frage des zeitlichen Ablaufs unbeantwortet. Warum dauert die Krebsentstehung in der Regel Jahrzehnte, wenn nur wenige Gatekeeper-Mutationen ausreichen?

Auf Grund seiner Limitierungen wurde das genetische Model der Tumorentstehung erweitert. Epigenetische Regulationsmechanismen werden mehr und mehr als wichtige Alternative zu den klassischen Mutationsformen wie Punktmutation, Deletion, Insertion oder Translokation bei der Veränderung von Genfunktionen diskutiert (Feinberg et al., 2006). Onkogene und Tumorsuppressorgene können zum Beispiel über Promoterhypermethylierung aktiviert bzw. inaktiviert werden. In diesem Zusammenhang ist die epigenetische MGMT-Promotor-Regulierung als klinisches Beispiel erwähnenswert, welche bei der Behandlung von Glioblastompatienten eine Rolle spielt. MGMT-Promotor-Methylierung resultiert in niedriger AGT-Aktivität und korreliert mit verlängerter progressionsfreier und verlängerter Gesamtüberlebenszeit bei Patienten, die mit Temozolomid behandelt wurden (Hegi et al., 2008).

In jüngerer Zeit wird auch vermehrt die Existenz von Gliomstammzellen diskutiert, welche unlimitiertes Proliferationspotential aufweisen. Diese Stammzellen werden für die Entstehung und Rezidivierung von Gliomen verantwortlich gemacht (Li et al., 2009, Peñuelas et al., 2009). Sie weisen einen im Vergleich zu Gliomzellen unterschiedlichen Differenzierungsgrad auf und neuere Studien deuten darauf hin, dass ihre Signalkaskaden sowohl, von anderen neuronalen Vorläuferzellen, als auch von Gliomzellen differieren (Li et al., 2009, Peñuelas et al., 2009). Glioblastomstammzellen erweisen sich unglücklicherweise höchst resistent gegenüber den traditionellen Therapieansätzen, was die Wichtigkeit der Entwicklung von neuen Therapiestrategien unterstreicht (Li et al., 2009).

Ein möglicher Grund für die bislang spärliche Umsetzung von vielversprechenden Ansätzen in klinischen Studien könnte mit der Fokussierung auf einzelne Signalkaskaden dieser multifaktoriell malignisierenden Tumoren zusammenhängen. Deshalb scheint die Suche nach Molekülen, die in möglichst

viele dieser Signalwege entscheidend eingreifen essentiell, um dadurch eine multimodale Tumoringhibition zu bewirken. Im schlimmsten Fall kann – wie in Versuchen zur antiangiogenen Therapie gezeigt – ein erfolgreiches Einwirken auf einen Mechanismus (erfolgreiche Antiangiogenese) konsekutiv einen negativen Effekt auf einen anderen Signalweg nach sich ziehen (erhöhte Invasivität von Tumorzellen) (Lamszus et al., 2003).

Transforming growth factor- β (TGF- β) ist der Prototyp einer Superfamilie pleiotroper Zytokine, der eine fundamentale Rolle in der Entwicklung und homöostatischen Aufrechterhaltung, sowohl in gesundem, als auch im erkranktem Gewebe spielt (Massagué und Gomis, 2006, ten Dijke und Arthur, 2007). TGF- β spielt eine modulierende Rolle in der Induktion der Immunsuppression und greift in Mechanismen der Tumorprogression wie Angiogenese, Invasion und Metastasierung ein (Derynck et al., 2001, Peng et al., 2006). Auch im biologischen Verhalten von Glioblastomen agiert TGF- β in einer Hauptrolle und hat sich als vielversprechendes molekulares Forschungsziel etabliert (Wick et al., 2006). Hohe TGF- β -Aktivität korreliert mit einer schlechten Prognose bei Glioblastom-Patienten (Bruna et al., 2007) und ist daher das Ziel neuer Therapieansätze. In klinischen Studien wird beispielsweise derzeit die TGF- β -Inhibition mittels Antisense-Technologie auf RNA-Ebene erprobt (Schlingensiepen et al., 2008).

Analog haben pleiotrope Faktoren, die an der embryonalen Entwicklung des ZNS beteiligt sind, großes Interesse geweckt, da ihr Vorkommen in zahlreichen Tumoren festgestellt werden konnte (Surawska et al., 2004, Brantley-Sieders et al., 2006). Ephrin-Rezeptoren, um ein prominentes Beispiel zu erwähnen, und die dazugehörigen Ephrin-Liganden sind, neben ihrer regulierenden Rolle in der axonalen Lenkung und Zellmigration während der Entwicklung des ZNS, auch in der Genese von Tumoren involviert (Surawska et al., 2004). Abnormalitäten im Expressionsmuster von Ephrinrezeptoren, die die größte Fraktion in der Superfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen stellen, und Ephrinliganden resultieren in pathologischer Zelldifferenzierung, Angiogenese, Migration und Invasion (Surawska et al., 2004, Brantley-Sieders et al., 2006, Liu et al., 2007) und sind auch in Glioblastomen zu finden (Li et al., 2009). Hohe

Expressionslevel des Ephrinliganden EphA2 gehen in vitro mit einer malignen Transformation nichttransformierter Brustzellen einher. Die Anwendung eines blockierenden Antikörpers gegen EphA2 stoppt zumindest teilweise die Progression und Exazerbation von Tumoren (Zelinski et al., 2001, Kikawa et al., 2002, Carles-Kinch et al., 2002). Für EphA2 wird auch eine Aufregulierung im Glioblastom WHO-Grad IV beobachtet, was dieses Molekül zum potentiellen Ziel neuer Therapiestrategien macht (Wykosky et al., 2005).

Ebenfalls zur Gruppe embryonaler Faktoren gehören die in dieser Arbeit untersuchten Proteine. Netrin-1 und DCC (deleted in colorectal cancer) wurden Anfang der 1990er Jahre erstmals als axonale Lenkungsproteine beschrieben (Serafini et al., 1994, Keino-Masu et al., 1996). Netrin-1 nimmt in diesem Zusammenhang eine chemoattraktive Rolle ein und erscheint zusammen mit seinem Rezeptor DCC fundamental wichtig für das Wachstum von Axonen. DCC- und Netrin-1-Nullmäuse beispielsweise zeigen eine gestörte Migration, bzw. ihre Migration wird durch Induktion der Apoptose nicht initiiert (Serafini et al., 1996, Fazeli et al., 1997, Llambi et al., 2001).

Fearon und Vogelstein stellten Anfang der 1990er Jahre eine Verbindung von DCC zu kolorektalen Tumoren her (Fearon und Vogelstein, 1990). In der Adenom-Karzinom-Sequenz ist die Deletion von DCC ein Zwischenschritt im Tumorprogressionsmodell von Normalgewebe zum Karzinom.

Interessanterweise gehört DCC zur relativ jungen Familie der Abhängigkeitsrezeptoren, deren Wirkungsmechanismen vom klassischen Liganden-Rezeptor-Bild abweichen.

Über die Verteilung von DCC in astrozytären Tumoren gibt es bisher nur wenige Daten. Das Vorkommen von Netrin-1 in diesen Tumoren ist bisher überhaupt nicht untersucht. Im folgenden werden beide Moleküle, die Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind, genauer vorgestellt.

1.7 Netrin-1

Auf der Suche nach axonalen Lenkungsmolekülen in der Embryogenese wurde Netrin-1 1994 erstmals beschrieben (Serafini et al., 1994). Neurone, die im

dorsalen Bereich des Rückenmarks lokalisiert sind, benötigen für ihr gerichtetes Wachstum einen Hilfsmechanismus, der von einer ventral gelegenen Mittellinienstruktur, der Flügelplatte, ausgeht. Die Flügelplatte lockt in diesem Modell die von dorsal wachsenden Neurone via sezernierter Moleküle an. Netrin-1 wurde als ein solches Protein identifiziert. In seiner Anwesenheit expandieren Neurone in Richtung der ventralen Flügelplatte (Kennedy et al., 1994). Bei Netrin-1-Nullmäusen ist dieser Vorgang gestört. Ihre Migration verläuft abnormal oder wird durch Induktion der Apoptose nicht initiiert (Serafini et al., 1996, Llambi et al., 2001)

Netrin-1 gehört zu einer im Verlauf der Evolution konservierten Familie von axonalen Lenkungsproteinen, die im Genom zahlreicher Spezies wie zum Beispiel *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, und auch beim Menschen vorkommen (Serafini et al., 1994, Mitchell et al., 1996). Netrin-1 hat ein relatives Molekulargewicht von 60 bis 80 kDa und beinhaltet die drei Domänen V, VI, C und ein N-terminales Signalpeptid, das charakteristisch für sezernierte Proteine ist. Domäne V und VI weisen Ähnlichkeiten mit Domänen der Lamininproteine auf und sind in die Interaktion mit den Netrin-1-Rezeptoren involviert (Kruger et al., 2004). Die C-terminale Region ist homolog zu dem Protein tissue inhibitors of metalloproteases (Bányai und Patthy, 1999). Ihm wird eine vermittelnde Wirkung beim Kontakt von Netrin-1 und Integrinen zugeschrieben (Yebra et al., 2003).

Mit Experimenten zur axonalen Lenkung in der Embryogenese wurde DCC als Netrin-1 Rezeptor oder zumindest als Teil eines Rezeptorkomplexes etabliert (Keino-Masu et al., 1996).

1.8 DCC

Zu Beginn der 1990er Jahre beobachtete ein Forscherteam, dass es bei der Entwicklung von Dickdarmkrebs zur Akkumulation von Mutationen an bestimmten Genen kommt. Insbesondere die Entdeckung einer Deletion von Allelen und der damit einhergehende LOH bei 70% des untersuchten Kollektivs am langen Arm des Chromosom 18 beschleunigte die Suche und führte zur

Identifikation eines Rezeptors, der mit der Wortschöpfung *deleted in colorectal cancer* bedacht wurde (Fearon und Vogelstein, 1990). Tatsächlich ist die Expression von DCC bei über 50% der Dickdarmtumoren reduziert (Fearon und Vogelstein, 1990). Im Lauf der Zeit wurde ein Verlust von DCC, nicht nur bei anderen Tumoren wie Magen-, Bauchspeicheldrüsen oder Brustkrebs, sondern auch bei Gliomen beobachtet (Cho und Fearon, 1995, Hara et al., 2001).

DCC gehört zur Gruppe der Typ-I-Transmembranproteine. Primär ist es aus 1447 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein relatives Molekulargewicht von 200 kD.

Die große extrazelluläre Domäne besteht aus etwa 1100 Aminosäuren und entfaltet in seiner Raumstruktur vier immunglobulinähnliche und sechs Fibronectin-Typ-III Domänen. Damit weist sie Ähnlichkeiten zu Strukturen auf, die zur Familie der Nerven-Zell-Adhäsions-Moleküle (NCAM) gehören, und Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakte vermitteln (Cho und Fearon, 1995). Daraus eine Beteiligung von DCC bei der Vermittlung der Zellaggregation herzuleiten wurde lange Zeit kontrovers diskutiert (Chuong et al., 1994, Hedrick et al., 1994), erscheint aber mittlerweile als gesichert (Martín et al., 2006).

Auf den membranständigen hydrophoben Teil folgt die intrazelluläre Domäne aus 325 Aminosäuren, die wenige Ähnlichkeiten mit bereits etablierten Proteinen aufweist. Intrazellulär liegt die Schnittstelle für das Enzym Caspase-3, das sein Substrat an Stelle 1290 der Aminosäuresequenz (Asp1290) schneidet. Etwas proximal, zwischen den Aminosäuren 1243 und 1264, ist die Abhängigkeitsdomäne lokalisiert. Beide Bereiche sind für die Induktion der Apoptose erforderlich, Mutationen dieser Gebiete unterdrücken den proapoptischen Effekt von DCC komplett (Mehlen et al., 1998).

Es werden auch Interaktionen von DCC mit anderen Rezeptoren beschrieben. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptoren A2bAR, UNC5H und Robo soll auf die Funktionsweise von DCC eine modulierende Wirkung haben und den unterschiedlichen Informationen, die Netrin-1 vermittelt, gerecht werden (Hong et al., 1999, Corset et al., 2000, Stein und Tessier-Lavigne, 2001). Ebenso scheint der Lokalisation von DCC in der Zellmembran eine regulierende Funktion zuzukommen. DCC ist auf Cholesterol- und sphingolipidreiche

Regionen, sogenannte Lipid Rafts, für einen geregelten Ablauf seiner Signalkaskaden angewiesen. Wird die Position von DCC in den Lipid Rafts verändert oder deren Organisation gestört, werden Signale nicht mehr vermittelt (Herincs et al., 2005, Furne et al., 2006).

1.9 Abhängigkeitsrezeptoren

In der letzten Dekade des 20. Jahrhunderts wurde mit dem klassischen Bild der Zellphysiologie gebrochen. Ging man bisher davon aus, dass eine Zelle ein Signal auslöst, sobald ein Ligand an seinen zu ihm passenden Rezeptor bindet, wurde ein genau umgekehrter Mechanismus entdeckt. Rezeptoren generieren unter Abwesenheit des Liganden eine Signalkaskade, der gebundene Rezeptor blockiert das Signal. Der Begriff der negativen Signaltransduktion war geboren (Bredesen et al., 1998). Als besonders an dieser Entdeckung erscheint, dass diese Prozesse zwei ganz unterschiedliche Signalwege vermitteln: die klassische Signaltransduktion führt im Allgemeinen zu antiapoptotischen Ereignissen, während ein neuartiger Weg ein proapoptotisches Signal verursacht (Bredesen et al., 2004). Da Abhängigkeitsrezeptoren in Anwesenheit des Liganden so lebensnotwendige Signale wie Differenzierung, Proliferation oder Migration vermitteln (Bredesen et al., 2004), in Abwesenheit aber proapoptotisch wirken, ist das Überleben „abhängig“ (englisch = dependent) von der Präsenz des Liganden (Mehlen et al., 1998, Forcet et al., 2001). Dementsprechend werden die „überlebensnotwendigen“ Liganden auch als Überlebensfaktoren (survival factors) bezeichnet (Llambi et al., 2001).

Abhängigkeitsrezeptoren spielen eine Rolle bei der Entwicklung des ZNS, Entstehung von Neoplasien einschließlich Metastasen und Neurodegeneration. Sie sind auch an Prozessen, die während der Apoptose von Neuronen ablaufen, wie zum Beispiel der Retraktion von Neuriten oder der Schrumpfung der Zellkörper, beteiligt (Del Rio et al., 2007). Bisher wurden 10 Rezeptoren dieser Art entdeckt. Zu ihnen gehören unter anderem die Netrin-1 Rezeptoren DCC und die UNC5H-Familie, sowie beispielsweise der Androgenrezeptor. Die

Mehrzahl dieser Rezeptoren sind Transmembranproteine vom Typ I, d.h. die Rezeptoren sind aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne strukturiert. Lediglich der Androgenrezeptor ist im Zytosol um den Zellkern herum lokalisiert und weist keine Transmembrandomäne auf (Del Rio et al., 2007). Nicht nur auf Grund ihrer Lokalisation, sondern auch morphologisch ist diese Gruppe höchst heterogen. Weder in ihrer Aminosäuresequenz, noch in ihrer dreidimensionalen Struktur oder in der für die Einleitung der Apoptose funktionellen so genannten dependence domain (Abhängigkeitsdomäne) sind Ähnlichkeiten festzustellen. Zu den wenigen strukturellen Gemeinsamkeiten gehört die Expression einer Schnittstelle für die an der Apoptose beteiligten proteolytisch wirksamen Enzyme, den Caspasen. Diese ist an der intrazytoplasmatischen Seite der Rezeptoren anzutreffen. Eine Eigenschaft, die auch viele andere Proteine teilen (Bredesen et al., 2005). Erst kürzlich wurde eine Transmembrandomäne beschrieben, die in allen Abhängigkeitsrezeptoren vorhanden ist, und dependence-associated receptor transmembrane (DART)-Motiv getauft wurde (Del Rio et al., 2007). Sie ist von helikaler Struktur und im Vergleich zu anderen Transmembranregionen reich an der Aminosäure Valin. Diese Eigenschaft wird mit einer erniedrigten Fähigkeit der Rezeptoren zur Dimerisierung in Zusammenhang gebracht, die für die Signaltransduktion von Transmembranrezeptoren notwendig ist (Gurezka et al., 1999). Ob das DART-Motiv bei der Liganden-induzierten Inhibition oder der Einleitung des programmierten Zelltodes beteiligt ist, konnte bislang nicht mit Sicherheit geklärt werden.

Über welchen Mechanismus eine solch heterogene Gruppe an Rezeptoren einerseits den programmierten Zelltod auslösen, diesen andererseits bei Bindung des Liganden blockieren kann, ist nicht völlig geklärt und je nach Abhängigkeitsrezeptor zumindest teilweise unterschiedlich (Bredesen et al., 2004). Mögliche Modelle werden später bei der Präsentation der Signalkaskaden des Abhängigkeitsrezeptor DCC und seines Liganden Netrin-1 beschrieben.

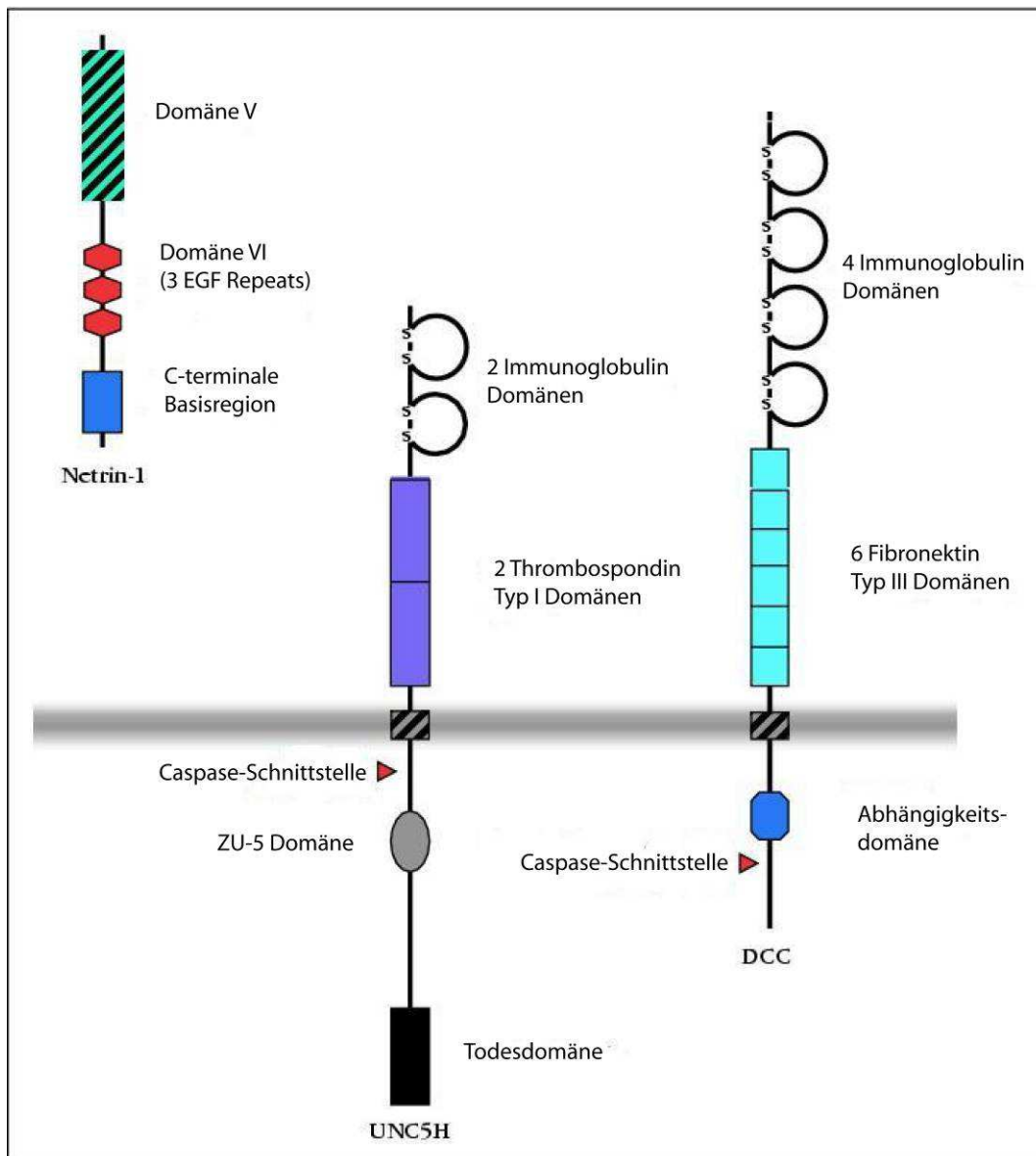


Abbildung 1: Der Ligand Netrin-1 und die Abhängigkeitsrezeptoren UNC5H und DCC (Abbildung nach Bernet und Mehlen, 2007).

1.10 Singalkaskaden von DCC und Netrin-1

Um die funktionelle Bedeutung der Abhängigkeitsrezeptoren und die Rolle von DCC und Netrin-1 besser verstehen zu können, möchte ich kurz auf den Vorgang der Apoptose eingehen.

Mit den Begriffen programmierter Zelltod oder Apoptose werden synonym Vorgänge beschrieben, die unter Energieverbrauch zu einem genetisch

kontrollierten Selbstmord der Zelle führen (Bredesen, 1996, Zatloukal, Roth und Denk, 2004). Die Induktion erfolgt über zwei unterschiedliche Schenkel. Der extrinsische Weg der Apoptose läuft in der molekularen Ebene über Todesliganden, die an Todesrezeptoren binden. Wichtigste Vertreter dieser Gruppe sind TNF-alpha (=>TNF-alpha-Rezeptor), TRAIL (=>DR-4 und DR-5) und Fas Ligand(=>Fas/CD95), die Caspasen direkt aktivieren können (Nagata, 1997). Alternativ kann durch diverse Stressreize wie zum Beispiel Hitze, Radikale, Toxine, Bestrahlung oder Chemotherapeutika der intrinsische Schenkel der Apoptose aktiviert werden, der mit Hilfe der Mitochondrien ebenfalls zur Aktivierung von Caspasen führt (Green und Reed, 1998). Im Verlauf des intrinsischen Signalweges wird über Beteiligung von Apaf-1, dATP und Cytochrom c aus den Mitochondrien das Apoptosom gebildet, in dem Procaspase-9 proteolytisch gespalten wird und als Caspase-9 die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (Li et al., 1997). Die Freisetzung der mitochondrialen Apoptosefaktoren wird durch pro- und antiapoptotische Proteine, deren Hauptvertreter Bax und Bcl-2 sind, kontrolliert (Zatloukal, Roth und Denk, 2004). Über das Protein Bid kann der extrinsische Signalweg auch die intrinsische Signalkaskade in Gang setzen. Somit besteht eine Verbindung zwischen beiden Schenkeln der Apoptose (Song et al., 2003).

Bei den Effektormolekülen der Apoptose handelt es sich um Caspasen, die zur Familie der Proteasen gehören. Als inaktive Vorstufen, Procaspasen, liegen sie in der Zelle vor. Es werden funktionell die Initiatorcaspasen mit den Hauptvertretern Caspase-8 und Caspase-9 von den Effektorcaspasen Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 unterschieden. Für ihre Aktivierung benötigen Initiatorcaspasen Adaptorkomplexe (DISC, Apoptosome). Effektorcaspasen werden hingegen von anderen Caspasen aktiviert (Earnshaw et al., 1999).

Caspase-8 vermittelt den extrinsischen Signalweg nach Bindung eines Liganden an seinen Todesrezeptor über den DISC (Death-inducing-signalling-complex) und nachfolgende Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -6 (Perera et al., 1998). Im Verlauf des intrinsischen Signalweges wird über Beteiligung von Apaf-1, dATP und Cytochrom c aus den Mitochondrien das Apoptosom

gebildet, in dem Procaspase-9 proteolytisch gespalten wird und als Caspase-9 die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (Li et al., 1997). Effektorcaspasen können sich auch gegenseitig aktivieren, so schneidet Caspase-3 Caspase-6 und auch eine umgekehrte Aktivierung ist möglich (Liu et al., 1996, Srinivasula et al., 1998).

Gerät der Mechanismus der Apoptose aus dem Gleichgewicht, hat dies großen Einfluß auf die Entstehung von Tumoren (die Inhibition des Zelltods führt zu einer Zunahme der Zellzahl). Auch die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen und der Verlauf von Viruserkrankungen werden mit fehlerhaften Abläufen des programmierten Zelltods in Zusammenhang gebracht (Green und Kroemer, 2004).

Es existieren verschiedene Theorien, die DCC in den Verdacht bringen, die Apoptose mit einem neuartigen alternativen Signalweg einzuleiten, der unabhängig von Apaf-1 und Cytochrom c, aber abhängig von Caspase-9 ist (Forcet et al., 2001):

1. DCC bildet je nach Konformation einen Caspase-Aktivierungs-Komplex. In Anwesenheit von Netrin-1 nimmt DCC eine solche Konformation ein, die das Schneiden blockiert, jedoch Procaspase-3, die inaktive Vorstufe von Caspase-3, rekrutiert. Durch Wegfall von Netrin-1 wird Caspase-3 aktiviert und schneidet DCC an Asp1290. Als Folge kommt es durch Konformationsänderung, oder durch die stattgefunden proteolytische Spaltung, zur Präsentation der proapoptischen Abhängigkeitsdomäne von DCC (Mehlen et al., 1998, Forcet et al., 2001), die ihrerseits den Caspase-Aktivierungs-Komplex rekrutiert, der Caspase-9 und das Protein DIP13-alpha beinhaltet. DIP13-alpha - auch unter dem Namen APPL (Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1) bekannt - scheint eine wichtige Vermittlerrolle zu spielen. Wird die Expression von DIP13-alpha experimentell mit small interfering RNA (siRNA) herunterreguliert, kommt es nicht zum Ablauf der Apoptose (Liu et al., 2002, Arakawa, 2004). Dieser Komplex soll - ähnlich wie der Apoptosom-Komplex - die weitere Caspase-3 Aktivierung katalysieren. Ob

noch weitere Proteine in diesen Komplex involviert sind ist unklar (Forcet et al., 2001).

2. Ein anderes Modell postuliert, dass DCC, unabhängig der Präsenz von Netrin-1, von Procaspase-3 geschnitten wird, dieser Vorgang allein aber nicht für eine proapoptotische Aktivität ausreichend ist. Die Präsenz des Liganden würde dabei die Rekrutierung von Caspase-9 und die weitere Bildung des Caspase-Aktivierungs-Komplex inhibieren (Forcet et al., 2001).

Ein offensichtliches Paradoxon beider Theorien ist jedoch, dass Pro-Caspase 3 nur im gebundenen Zustand von DCC im C-terminalen Bereich des Rezeptors vorhanden ist, aber nach Wegfall von Netrin-1 zwar aktiviert und proteolytisch wirksam wird, sich aber dadurch seiner Bindungsstelle beraubt und nicht mehr zur Verfügung steht, wenn der Caspase-Aktivierungs-Komplex in der N-terminalen Abhängigkeitsdomäne aktiviert wird. Wie aber kommt es zur weiteren Caspase-3-Aktivierung, um den Vorgang der Apoptose aufrecht zu erhalten? Als Lösung werden zwei Modelle vorgeschlagen:

1. Durch das Schneiden an Asp 1290 von DCC kommt die C-terminal vorhandene Procaspase-3 augenblicklich mit dem N-terminal entstehenden Caspase-Aktivierungs-Komplex in Verbindung und erlaubt so weitere Caspase-3-Aktivierung (Forcet et al., 2001).

2. Der entstandene Caspase-Aktivierungs-Komplex aktiviert andere Effektorcaspasen und die Procaspase-3 Interaktion mit Netrin-1-gebundenen DCC könnte ein Reservoir unverfügbarer Caspase-3 repräsentieren. Dies wäre auch eine Erklärung für die antiapoptotische Eigenschaft von DCC in Präsenz von Netrin-1 (Mehlen et al., 1998, Forcet et al., 2001).

Auch ist in diesen Modellen die Aktivierung der Procaspase-3 nicht geklärt. Zur Diskussion steht die Möglichkeit, dass diese durch eine Protease, die nicht zu den Caspasen gehört, in Gang gesetzt wird (Mehlen und Furne, 2005). Alternativ liegen Ergebnisse vor, dass Procaspasen ebenfalls zu einem gewissen Grade proteolytisch wirksam sind und Zellen anti-Apoptoseproteine (IAPs) als Inhibitoren bilden (Yang et al., 1998, Salvesen und Duckett, 2002). Auch eine Caspaseaktivierung ohne daraus resultierenden Zelltod wird in der Literatur beschrieben (Fernando et al., 2002, Campbell und Holt, 2003). Dies

könnte darauf hinweisen, dass der programmierte Zelltod, vielmehr durch Amplifikation von Caspasen, als durch ihre Initiation ausgelöst wird. Eine Vorstellung, die die Wichtigkeit der zellulären Kontrolle der Caspase-Aktivierung/Inaktivierung im Hinblick auf das Schicksal der Zelle unterstreicht. Zelltod wäre das Resultat einer Verschiebung von niedriger zu hoher Caspase-Aktivierung (Mehlen und Furne, 2005).

Natürlich sind diese Theorien noch sehr lückenhaft, der Mechanismus der Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung sowie welche weiteren Moleküle bei der Vermittlung der Apoptose beteiligt sind ist unklar.

Netrin-1 ermöglicht Zellen durch Inhibition der Apoptose sich zu entwickeln. Über klassische Signalkaskaden greift Netrin-1 in Mechanismen ein, die die zelluläre Migration, Proliferation und Differenzierung kontrollieren (Etienne-Manneville und Hall, 2002, Forcet et al., 2002, Shekarabi et al., 2005).

Gut erforscht sind diese Pfade bei der axonalen Lenkung in der Embryologie. Ligandengebundenen DCC aktiviert in diesem Zustand die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac-1, die Serin/Threonin Kinase p21-activated kinase (Pak-1) und Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP), die über ein komplexes Zusammenspiel die Expansion des axonalen Wachstumskegels fördern (Shekarabi et al., 2005). Alternativ vermittelt die MAP-Kinase Erk-1/2 (Extracellular signal regulated kinase) über eine Phosphorylierungskaskade axonalen Wachstum (Forcet et al., 2002). Ein ähnlichen Effekt wird durch die Aktivierung von Phospholipase C und der Proteinkinase FAK (Focal adhesion kinase) erreicht (Li et al., 2004, Xie et al., 2006). GTPasen und MAP-Kinasen modulieren ebenfalls die Organisation des Zytoskeletts und nehmen so Einfluss auf Zellmotilität, Differenzierung und Proliferation (Stappenbeck und Gordon, 2001, Etienne-Manneville und Hall, 2002, Li et al., 2002). Auch wurde nach Bindung von Netrin-1 ein Anstieg von cAMP beschrieben (Corset et al., 2000, Hong et al., 2000). Eine Arbeitsgruppe postuliert jedoch, dass dabei der Adenosinrezeptor A2b als Co-Rezeptor eine Rolle spielt (Corset et al., 2000).

Auf der Ebene der Proteinbiosynthese beteiligen sich Netrin-1 und DCC auch an der Regulierung der Transkription und Translation, zum Beispiel via dem

Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Graef et al., 2003). Es ist jedoch unklar welche Gene das Ziel dieser Intervention sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass DCC-exprimierende Zellen Netrin-1 zum Überleben benötigen und dieser Umstand eine wichtige Rolle im weiteren Schicksal der Zelle spielt. Physiologisch kommt das Pärchen DCC-Netrin-1 in zahlreichen Geweben vor. Besonders anschaulich ist seine Rolle bei der homöostatischen Regulation des Darmepithels beschrieben. Netrin-1 wird hauptsächlich in den Krypten, dem Ort der zellulären Proliferation und Differenzierung, sezerniert, während DCC der ganzen Zotte entlang exprimiert wird. Auf ihrer Reise in Richtung Zottenspitze sind die Epithelzellen einer immer geringer werdenden Konzentration von Netrin-1 ausgesetzt, sterben schließlich den natürlichen Zelltod und werden abgeschilfert. Eine Überexpression von Netrin-1 führt jedoch zu spontanen gastrointestinalen Neoplasien (Mazelin et al., 2004). Analog hat der Einbau einer intakten Kopie von Chromosom 18 in eine humane Kolonkarzinomlinie, die kein DCC mehr exprimiert hatte, zur Produktion von DCC-Transkripten geführt und Tumorstadium supprimiert (Tanaka et al., 1991). Zusätzlich hat die ektope Expression von DCC in Keratinozytenzelllinien ohne DCC-Expression in gezüchteten Mäusen Tumorstadium unterdrückt (Klingelhutz et al., 1993). Interessanterweise wird in derselben Studie Tumorstadium mit erneutem Verlust von DCC assoziiert. Diese Ergebnisse und der Nachweis von LOH auf Chromosom 18 haben DCC die Reputation eines Tumorsuppressorgens eingebracht. Jedoch gibt es daran einigen Zweifel. Zum einen sind somatische Punktmutationen, ein wichtiges Argument für Tumorsuppressorgene, des DCC-Gens sehr selten, zum anderen residieren auf dem kurzen Arm von Chromosom 18 andere potentielle Tumorsuppressorgene (Thiagalingam et al., 1996). Außerdem zeigen Mäuse, die heterozygot DCC-Mutationen tragen, keinen prädisponierenden Phänotyp für Neoplasien (Fazeli et al., 1997).

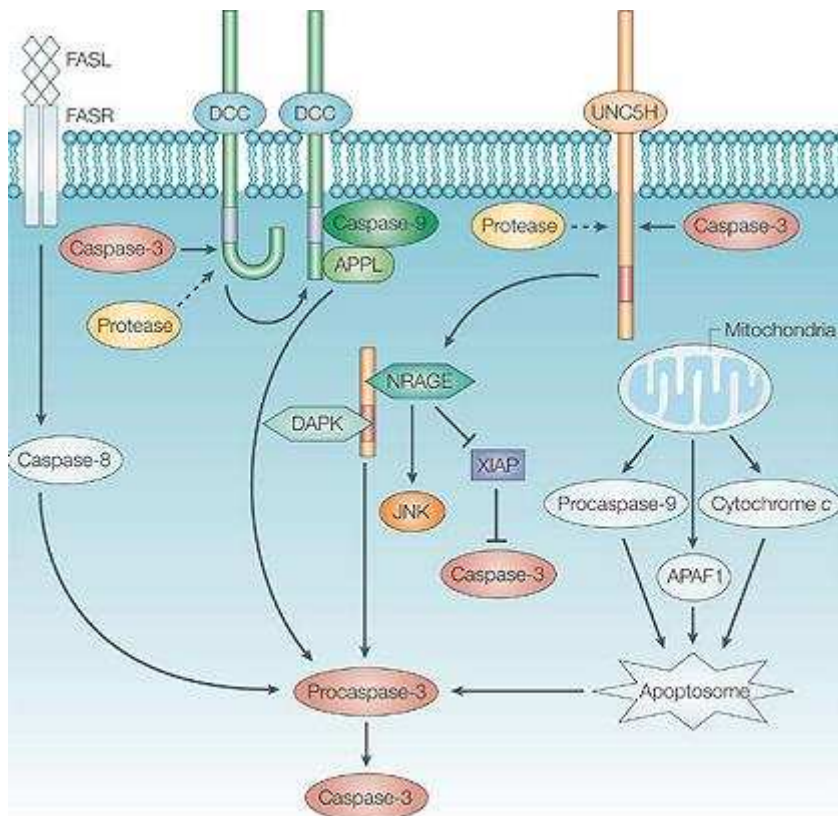


Abbildung 2: Ein Modell über die mutmaßlichen apoptotischen Signalwege der Abhängigkeitsrezeptoren DCC und UNC5H.

Caspase-3 oder eine unbekannte Protease schneidet DCC an Asp1290. Dies führt stromaufwärts der Schnittstelle zur Bildung des Caspase-Aktivierungs-Komplexes im Bereich der Aminosäuren 1121-1290. Dieser auch als Abhängigkeitsdomäne bezeichnete Bereich könnte als Grundgerüst für die Aktivierung von Caspase-9 dienen. Die Abhängigkeitsdomäne enthält vermutlich Caspase-9 und APPL/DIP-13 alpha. Im Fall von DCC könnte die stromabwärts der Schnittstelle gelegene C-terminale Region die Abhängigkeitsdomäne maskieren und auf diese Weise den Caspase-Aktivierungs-Komplex inhibieren. Wahrscheinlich läuft dieser Vorgang unabhängig von den über die Mitochondrien oder den Todesrezeptoren gesteuerten apoptotischen Signalwegen ab (Abbildung modifiziert nach Arakawa, 2004).

1.11 Netrin-1-Interaktion mit weiteren Rezeptoren

Netrin-1 vermittelt auch über weitere Rezeptoren Wirkungen, die in der Genese von Tumoren eine wichtige Rolle spielen.

Die Familie um UNC5H repräsentiert ebenfalls eine Gruppe von Netrin-1 Rezeptoren. UNC5H interagiert bei Prozessen der axonalen Lenkung mit der intrazytoplasmatischen Domäne von DCC. Ihm wird eine repulsive Rolle beim Wachstum von Axonen zugeschrieben (Hong et al., 1999, Llambi et al., 2001).

Über ein Mitglied dieser Familie, UNC5B, scheint Netrin-1 Leukozyten *in vitro* zu hemmen und nimmt somit eine immunevasive Rolle an. Da UNC5B sowohl auf Monozyten, Granulozyten als auch auf Lymphozyten hoch exprimiert vorliegt, könnte Netrin-1, wenn lokal sezerniert, dort zu hochgradig komplexen Immunsuppression führen (Ly et al., 2005).

Netrin-1 greift über den Rezeptor Neogenin in die Angiogenese ein (Park et al., 2004), welche für das Überleben und die Progression insbesondere von höhergradigen Astrozytomen einen wichtigen Mechanismus darstellt. Eine Stimulation der Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durch Netrin-1 wird beobachtet. Netrin-1 wird dabei eine ähnliche Potenz wie VEGF zugeschrieben (Park et al., 2004).

Über die Integrine $\alpha 6 \beta 4$ und $\alpha 3 \beta 1$ nimmt Netrin-1 Einfluß auf die Migration von Epithelzellen. Ob diese Integrine als eigenständige Rezeptoren agieren oder Teile eines Rezeptorkomplexes repräsentieren, ist jedoch unklar (Mehlen und Furne, 2005). Motilitätsfördernde Eigenschaften werden auch dem Rezeptor Neogenin zugeschrieben (Srinivasan et al., 2003, Strizzi et al., 2005).

Ob der Adenosinrezeptor A2B als Rezeptor für Netrin-1 fungiert ist ebenso unklar wie seine Rolle bei der axonalen Lenkung (Mehlen und Furne, 2005).

So ist Netrin-1 ein potentieller Kandidat, um eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung und Progression zu spielen.

1.12 Fragestellung

Auf Grund der oben diskutierten Punkte erscheint der Netrin-1-DCC Aktivierungsweg als ein vielversprechendes Untersuchungsobjekt. Für DCC wird eine Herunterregulierung in Astrozytomen postuliert, jedoch gibt es keine Untersuchung, die die Expression von Ligand und Rezeptor in denselben Proben umfasst. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Expression von Netrin-1 und DCC in Astrozytomen der WHO-Grade I-IV sowie im Normalgehirn zu analysieren. Diese Analyse erfolgt auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie. Für Netrin-1 liegen zu diesem Thema bislang noch keine Daten vor. Auf Grund seiner multimodalen Eigenschaften wird die Expression von Netrin-1 getrennt in Endothelzellen sowie auf normalen und neoplastischen Astrozyten untersucht. Eine Charakterisierung der Expressionslevels von Netrin-1 und DCC an Primär- und Rezidivtumoren, im Zentrum des Tumors sowie in der Infiltrationszone soll mögliche temporo-spatiale Unterschiede aufdecken. Überdies soll die Assoziation der Netrin-1 und DCC Expressionsraten mit dem Überleben der Patienten analysiert werden, um so eine mögliche Bedeutung der Faktoren in Hinblick auf die klinische Prognose herauszufinden.

Diese Untersuchung soll dem weiteren Verständnis der Entstehung und Progression humaner astrozytärer Tumoren dienen und Grundlagen für potentielle Therapiestrategien schaffen, welche in diese Kaskade eingreifen können.

Zum besseren Verständnis wird in den folgenden Kapiteln die Expression der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper auf Proteinebene mit dem Terminus Immunreaktivität bezeichnet.

2. Material und Methoden

2.1 Definition der Auswahl der Gewebeproben

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeproben aus dem Archiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen ausgewählt. Die Gewebeproben sind zwischen 1993 und 2003 in den neurochirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums Tübingen sowie der Asklepios Klinik Schildautal Seesen entnommen worden.

Insgesamt handelt es sich hierbei um 194 in Paraffin eingebettete Astrozytome, aufgeteilt in 26 pilozytische Astrozytome WHO-Grad I, 37 diffuse Astrozytome WHO-Grad II (davon 29 fibrilläre, 5 gemistozytäre, 3 protoplasmatische), 52 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und 79 primäre Glioblastome WHO-Grad IV. Unter den Proben befinden sich keine sekundären Glioblastome, die aus niedriggradigen Astrozytomen entstanden sind. Zusätzlich wurden von 25 Glioblastomen korrespondierende Infiltrationszonen definiert, die die Ausdehnung des Tumors in die Peripherie markieren. Erstrezidive wurden von 31 primären Glioblastomen in die Untersuchung aufgenommen.

Um einen Vergleich zu gesundem Gehirngewebe zu erhalten, wurden 23 Gewebeproben aus der Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung Tübingen herangezogen.

Die Reevaluation erfolgte durch mindestens zwei Neuropathologen, wobei nur eindeutig nach den WHO-Kriterien (Louis et al., 2007) klassifizierte Tumoren in die Untersuchung einbezogen wurden. Die Festlegung der Infiltrationszonen für die WHO-Grad IV Tumoren erfolgte anhand histologischer Merkmale. Maßgeblich war hierbei eine - im Vergleich zum Tumorzentrum - etwa auf die Hälfte erniedrigte Zelldichte, geringgradige Aplasiezeichen sowie eindeutig erkennbares residuelles ZNS-Gewebe.

Die Untersuchung der Tumor-Paraffinblöcke der Patientinnen und Patienten erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Tübingen.

2.1.1 Herstellung histologischer Präparate

Die Tumore wurden nach ihrer Entnahme in 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert (pH 7,4). Nach Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%) wurden die Proben sowohl zweimal in einem Gemisch aus 100% Alkohol und Chloroform als auch zweimal in unverdünntem Chloroform entwässert und in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden anschließend am Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Silanbeschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Microm International, Walldorf, Deutschland) aufgezogen.

2.2 Tissue Microarrays

Die Methode der Gewebeaufarbeitung mittels Tissue Microarray (TMA) bietet im Rahmen von immunhistochemischen Untersuchungen ein effizientes und somit schnelles Screeningverfahren im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie.

Erstmals beschrieben wurde dieses Verfahren 1998 (Kononen et al., 1998). Es bietet den Vorteil, dass je nach Gewebebeschaffenheit und je nach Größe des Paraffinblocks bis zu 1000 Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock eingebracht und untersucht werden können.

Bei der Herstellung der TMA-Paraffinblöcke wurden zunächst konventionelle HE-Färbungen der Donor-Tumoren erstellt und lichtmikroskopisch untersucht, wobei das Areal für den TMA-Block farblich markiert wurde. Dabei wurden die verschiedenen Gebiete (Tumor, Infiltrationszone, weiße bzw. graue Substanz) mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Danach wurden die gekennzeichneten Areale von den HE-gefärbten Schnitten auf die jeweiligen Akzeptor-Blöcke übertragen. Dieser Aufwand musste betrieben werden, um unerwünschte Bezirke wie Nekrosen oder Einblutungen auszuschließen.

Die Herstellung der Tissue Microarrays erfolgte mit der TMA-Maschine (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie; WI, USA) nach der Methode von

Kononen (Kononen et al., 1998). Mit Hilfe der TMA-Maschine wurden dabei Löcher im Abstand von 1,5 mm in einen leeren Paraffinblock gestanzt und danach sofort mit Gewebezylinder aus dem Donor-Block gefüllt. Die Fixierung des frischen Paraffinblocks erfolgte durch Festschrauben an der Plattform der TMA-Maschine, um eine exakte Positionierung des Paraffinblocks zu gewährleisten. Für alle Gewebezylinder des Donor-Blocks wurde ein Durchmesser von 600 μm gewählt. Um die Gefahr von Gewebeverlusten bei der späteren Weiterverarbeitung der TMA-Blöcke zu minimieren, wurde die Anzahl der Gewebeproben pro Paraffinblock auf 108 limitiert.

Mit einem auf 42° Celsius vorgewärmten Objektträger wurden die fertigen Paraffinblöcke versiegelt, um ein Herausgleiten der Gewebezylinder beim Schneidevorgang zu verhindern. Von diesen Paraffinblöcken wurden anschließend am Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Germany) ca. 3 μm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Silan-beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Microm International, Walldorf, Deutschland) aufgezogen.

Die Antrocknung der Paraffinschnitte erfolgte im Brutschrank bei 37° Celsius.



Abbildung 3: MTA-1 Manual Tissue Arrayer (Abbildung nach Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA).

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Allgemeines

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) gibt dem Untersucher die Möglichkeit, bestimmte Proteine anhand spezifischer Antikörper in Gewebeschnitten nachzuweisen. So genannte Primärantikörper binden mit ihrem F(ab)-Fragment an bestimmte Proteinabschnitte (Epitope), die sich beispielsweise in der Zellmembran, im Zytoplasma oder auch im Kern befinden. Je nach Herstellungsart handelt es sich um monoklonale Antikörper, die gegen ein für sie spezifisches Epitop gerichtet sind, oder um polyklonale Antikörper, die mehrere Epitope erkennen und binden können.

Im formalinfixiertem Gewebe kommt es zu kovalenten Bindungen zwischen den Proteinen und dem Formalin, welche zu Proteindenaturierung mit sterischer Konformationsänderung führt. Dadurch werden Zielproteine maskiert und stehen für eine Antikörperbindung nicht mehr zur Verfügung. Daher ist eine Antigendemaskierung notwendig. Diese erfolgt durch thermische Vorbehandlung, meist in einem Mikrowellenherd im Pufferbad, wobei die Proteine renaturiert und die maskierten Epitope freigelegt werden.

Zur besseren Darstellung der Bindung des Primärantikörpers wird ein Sekundärantikörper auf den Objektträger pipettiert. Dieser trägt Biotin an seinem Fc-Abschnitt kovalent gebunden und bindet an den Fc-Abschnitt des Primärantikörpers. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-) Methode (nach Hsu et al., 1981) eingesetzt. Diese Methode macht sich die starke Affinität zwischen Avidin und Biotin zu Nutze. Für eine erfolgreiche Färbereaktion ist die Interaktion des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers entscheidend. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation der Peroxidase in Folge der Bindung des Primärantikörpers am Zielprotein. Der Enzymkomplex wird nach Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbstoff umgewandelt, der lichtmikroskopisch sichtbar ist.

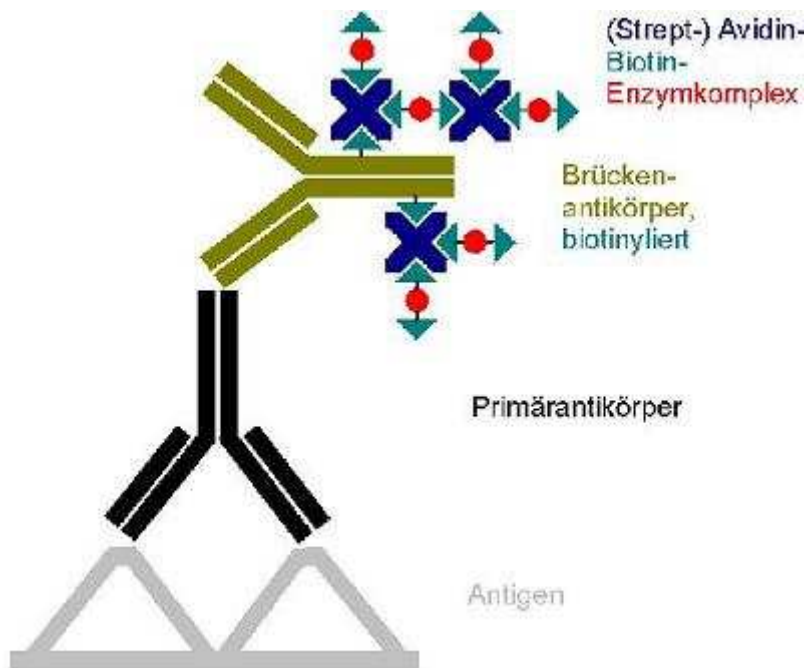


Abbildung 4: Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Abbildung modifiziert nach www.pathologie-online.de).

2.3.2 Antikörper

Zur Darstellung von DCC wurde ein monoklonales Immunglobulin aus der Maus, das der Klasse IgG1 kappa angehört, eingesetzt. Als Primärantikörperlösung wurde eine 1:10 Verdünnung des Antikörpers in TBS angefertigt und in der immunhistochemischen Färbung eingesetzt. Der Antikörper gegen DCC stammt aus dem Klon DM51 der Firma Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Großbritannien.

Beim Antikörper gegen Netrin-1 handelt es sich um ein polyklonales Immunglobulin, das im Hasen gezüchtet wurde. Zur Untersuchung wurde der Klon H-104 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung 1:20 eingesetzt, der gegen die Aminosäuresequenzen zwischen Position 501 und 604 des menschlichen Netrin-1 gerichtet ist.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden für alle oben erwähnten Tumor- und Normalhirngewebeproben durchgeführt.

2.3.3 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die TMA-Schnitte wurden zunächst zur Entparaffinierung für 30 min in ein Chloroformbad gelegt, daraufhin erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%, Aqua dest.) für jeweils zwei Minuten. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Kochen der TMA-Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 800 Watt für 20 Minuten. Danach wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und die endogene Peroxidase-Aktivität mit 1% H₂O₂ in 100% Methanol (15 Minuten) geblockt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden im nächsten Schritt die Schnitte für 15 Minuten mit 1:10 in TBS-Lösung verdünntem Schweineserum inkubiert.

Daraufhin wurde der DCC-Antikörper 1:10 in TBS-Lösung verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Der Antikörper gegen Netrin-1 wurde in analoger Weise appliziert, wobei das Mischungsverhältnis hier bei 1:20 mit der TBS-Lösung lag. Die Schnitte wurden zur Inkubation mit den Antikörpern bei 4° Celsius im Kühlraum über Nacht gelagert. Nach dem Spülen mit TBS-Lösung wurde je nach verwendeten Primärantikörper entweder ein biotinierter anti-Maus F(ab')₂ oder anti-Hase F(ab')₂-Brückenantikörper (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) im Mischungsverhältnis 1:400 für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die TMA-Schnitte aufgetragen. Nach einem weiteren Waschgang wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) behandelt und 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang bevor mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen die spezifischen Antikörper-Antigen-Bindungen farblich sichtbar gemacht wurden (Hsu et al., 1981).

Um die Zellkerne besser erkennen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, gefolgt von einer kurzen Differenzierung in HCL-Alkohol (0,1 %). Zur Entwässerung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%, jeweils zwei Minuten) und drei mal fünf Minuten Xylol. Danach konnten sie mit einem Deckglas versehen werden, wobei Eukit als Eindeckmedium verwendet wurde.

Die Spezifität der Methode wurde sowohl bei DCC als auch bei Netrin-1 mit Dickdarmschleimhautgewebe als Positivkontrolle überprüft. Als Negativkontrolle erfolgte die Auftragung von reiner TBS-Lösung an Stelle des Primärantikörpers bevor die Schnitte über Nacht inkubierten.

2.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung wurde an einem Lichtmikroskop (Olympus, Vanox AHBT 3, Hamburg, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die quantitative Auswertung der TMA-Gewebeproben erfolgte mit Hilfe eines Zähllokulars. Dabei wurden von jeder Tumor- und Normalhirnprobe die Kästchen jeweils bis 100 Zellen inklusive der weiteren Zellen im letzten Kästchen gezählt, wobei die Fläche eines Kästchens 0.0025 mm^2 betrug. Bei geringerem Zellvorkommen wurden alle 100 Kästchen des Zähllokulars ausgezählt. Dies geschah, um die Zelldichte pro mm des Gewebes ermitteln zu können. Eine eindeutige zytoplasmatische Färbung wurde bei beiden Antikörpern als positiv gewertet.

Bei der Auswertung der TMA-Schnitte wurden weder Zellen in Blutgefäßen noch Neurone oder Leukozyten berücksichtigt. Auch positiv gefärbte Strukturen, die keiner Zelle eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden nicht berücksichtigt.

Die Anzahl der Endothelzellen wurde in allen Tumoren und im Normalhirn nach der gleichen Methode wie die Tumorzellen bestimmt. Es wurden nur Endothelzellen, die eindeutig einem Gefäß zugeordnet werden konnten sowie die Zellen aller Zellschichten in Gefäßproliferaten, falls vorhanden, gezählt.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit der Digitalkamera Olympus-DP72 und der Software analySIS docu am Mikroskop Olympus BX41 (alle Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen.

2.5 Erfassung der epidemiologischen und klinischen Patientendaten

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Allgemeine Neurologie und den Abteilungen für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen sowie der Asklepios Klinik Schildautal in Seesen wurde die Erfassung der Patientendaten (Alter, Geschlecht, Überleben) durchgeführt.

Als Ende der Datenerhebung wurde der 15. Dezember 2005 festgelegt. Die Krankengeschichte der an einem Astrozytom erkrankten Patienten konnte bis zu 12,6 Jahre zurückverfolgt werden. Es verstarben 102 Patienten nach einem mittleren Überleben von 22,2 Monaten in diesem Zeitintervall. Am Leben waren noch 78 Patienten bei einem Mittelwert der Rückverfolgung von 44,4 Monaten. Unter den Verstorbenen wurde bei 54 Patienten ein Glioblastom WHO-Grad IV diagnostiziert, 31 litten an einem anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III, 16 an einem diffusen Astrozytom WHO-Grad II und ein Patient an einem pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I.

Von 14 Patienten ließen sich nach ihrer Operation keine Daten ermitteln, so dass dieses Patientengut nicht in die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse miteinbezogen werden konnte.

2.6 Statistische Auswertung

Der Anteil der als positiv gewerteten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen wurde unter Heranziehung des Arcussinus der Quadratwurzel transformiert. Mit der „one way analysis of variance“ (ANOVA) wurden die arithmetischen Mittel verglichen. Unter Einhaltung der Signifikanzschwelle von 5% wurde der post-hoc Vergleich mit dem Tukey-Kramer HSD Test durchgeführt. Zur Analyse signifikanter Unterschiede zwischen den Einzelnen Gruppen wurden individuelle p-Werte mit dem Arcussinus der Quadratwurzel berechnet. Der Student t-test wurde zum individuellen, paarweisen Vergleich herangezogen. Die rücktransformierten Mittelwerte werden zusammen mit ihrem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Zur Beschreibung des Überlebenszeitraumes der Patienten wurde eine univariate Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt. 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 (soweit nicht bereits mit post-hoc Vergleich mittels Tukey-Kramer HSD Test untersucht) aufgrund von multiplen Testen erfolgte mit der Methode von Bonferroni-Holm. Die rücktransformierten Mittelwerte werden zusammen mit ihrem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Signifikante Unterschiede sind wie folgt angegeben: * $0.01 < p \leq 0.05$, ** $0.0001 < p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm JMP IN 5.1.

3. ERGEBNISSE

3.1 Auswertung der Zellzahl

3.1.1 Zelldichte in Astrozytomen und Weisser Substanz

Es kann ein statistisch signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl pro mm^2 über die niedriggradigen Astrozytome hin zu den Glioblastomen WHO-Grad IV beobachtet werden. Ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Abfall der Zellzahl ist bei den diffusen Astrozytomen WHO-Grad II festzustellen.

Die Weisse Substanz zeigt einen Mittelwert von 1086 Zellen/ mm^2 auf (95% Konfidenzintervall (KI) 943-1230 Zellen/ mm^2) und unterscheidet sich damit signifikant von Astrozytomen WHO-Grad III und Glioblastomen WHO-Grad IV (jeweils $p < 0,0001$). Für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I ergibt sich ein Mittelwert von 2876 Zellen/ mm^2 (95% KI 2194-3556 Zellen/ mm^2). Tumoren dieser Gruppe unterscheiden sich signifikant zum Glioblastom WHO-Grad IV ($p < 0,0001$). Diffuse Astrozytome WHO-Grad II zeigen 2256 Zellen/ mm^2 auf (95% KI 1990-2522 Zellen/ mm^2) und unterscheiden sich damit signifikant von Astrozytomen WHO-Grad III und vom Glioblastom WHO-Grad IV (II zu III: $p = 0,0011$, II zu IV: $p < 0,0001$). Für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ergeben sich im Mittelwert 3879 Zellen/ mm^2 (95% KI 3231-4527 Zellen/ mm^2) und für Glioblastome WHO-Grad IV 6159 Zellen/ mm^2 (95% KI 5375-6943 Zellen/ mm^2). Auch für diese beiden Tumorguppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$).

Diese Ergebnisse bestätigen durch ihre Übereinstimmung mit den histopathologischen Beobachtungen die Zuverlässigkeit der Gewebeauswahl.

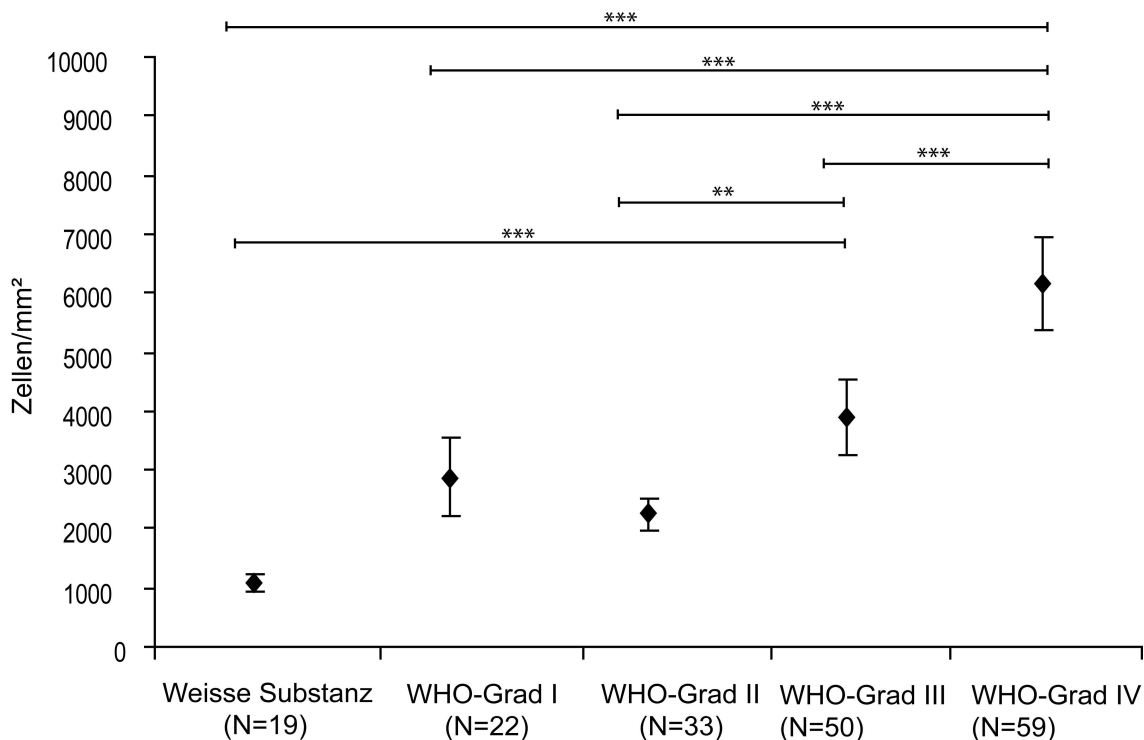


Abbildung 5: Gesamtzellzahl pro mm² in Astrozytomen WHO-Grad I-IV.

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 *** $p \leq 0.0001$.

3.1.2 Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone

In den Infiltrationszonen der 21 untersuchten Glioblastome zeigt sich ein Mittelwert von 2848 Zellen/mm² (95% KI 2156-3539 Zellen/mm²), für die dazugehörigen Tumorzentren ergibt sich ein Mittelwert von 5813 Zellen/mm² (95% KI 4464-7163 Zellen/mm²). Daraus folgt eine hoch signifikante Abnahme der Zelldichte in den Infiltrationszonen mit einem p-Wert $< 0,0001$ (bei einer mittleren Differenz von 3130 Zellen/mm², 95% KI 1752-4507).

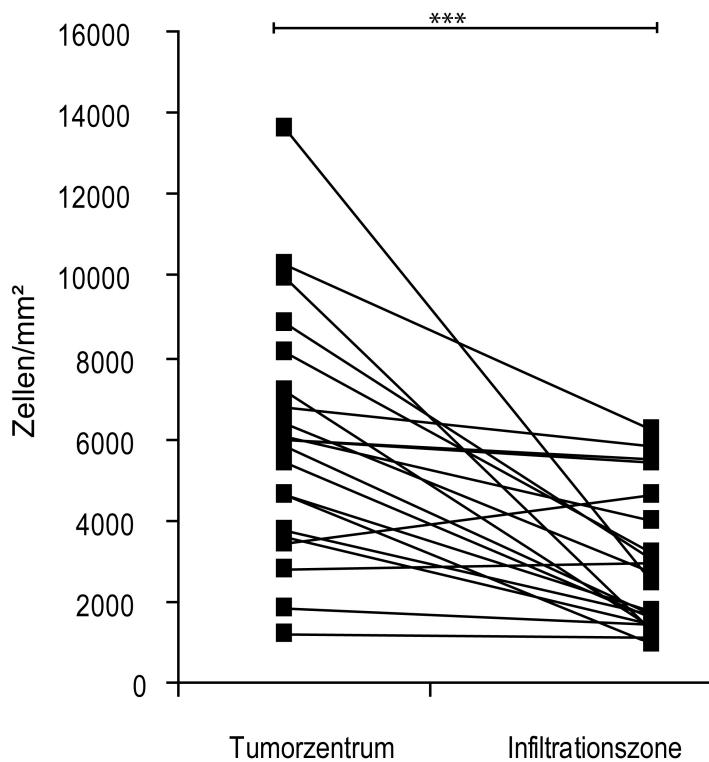


Abbildung 6: Darstellung der matched-pairs Analyse der Zelldichte in Tumorzentrum und Infiltrationszone beim Glioblastom (N=21). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.1.3 Zelldichte bei Rezidiv im Vergleich zum Primärtumor

Bei den 20 analysierten Rezidiven kann im Vergleich zu den korrespondierenden primären Glioblastomen ein signifikanter Abfall der Zellzahl pro mm² bei einem p-Wert von 0,0061 festgestellt werden (bei einer mittleren Differenz von 2899 Zellen/mm², 95% KI 930-4867).

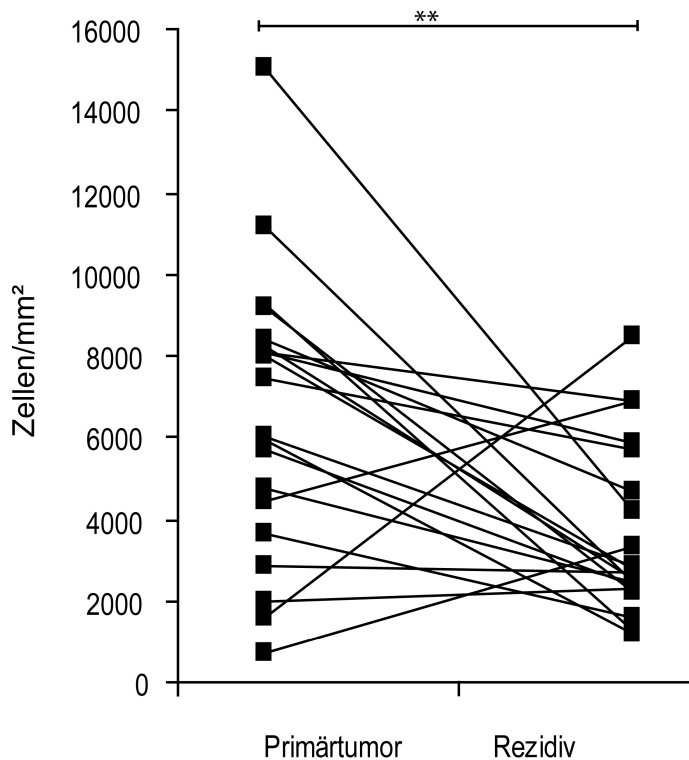


Abbildung 7: Darstellung der matched-pairs Analyse der Zelldichte von primären Glioblastomen und ihren Rezidiven (N=20). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.2 Immunreaktivität von DCC

3.2.1 DCC Immunreaktivität in Astrozytomen und Normalhirn

Für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I ergibt sich ein Mittelwert von 12,4% (95% KI 6,1-20,4%) DCC positiver Zellen. Für diffuse Astrozytome WHO-Grad II ermittelt sich ein Mittelwert von 16,1% (95% KI 10,1-23,2%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 34,1% (95% KI 27,4-41,1%) und für Glioblastome WHO-Grad IV ein Mittelwert von 29,9% (95% KI 24,0-36,1%).

Die DCC Immunreaktivität in den vier verschiedenen Tumordignitäten zeigt signifikant erhöhte Werte für Glioblastome WHO-Grad IV im Vergleich zu Astrozytomen WHO-Grad I und Astrozytomen WHO-Grad II (IV zu I: $p=0,0009$, IV zu II= $0,0039$). Ebenfalls ergibt sich für Astrozytome WHO-Grad III im

Vergleich zu Astrozytomen WHO-Grad II und Astrozytomen WHO-Grad I eine signifikant erhöhte Immunreaktivität (III zu II: $p=0,0004$, III zu I: $p<0,0001$).

Beim Vergleich der 16 Normalhirnproben hinsichtlich ihrer Immunreaktivität für DCC lässt sich ein Mittelwert von 7,4% (95% KI 3,0-13,4%) für Graue Substanz und ein Mittelwert von 24,8% (95% KI 16,7-33,8%) für Weisse Substanz errechnen. Der paarweise Vergleich der Immunreaktivität von DCC in Normalhirnen zeigt eine signifikant erhöhte Immunreaktivität in der Weissen Substanz im Vergleich zur Grauen Substanz auf ($p=0,0114$).

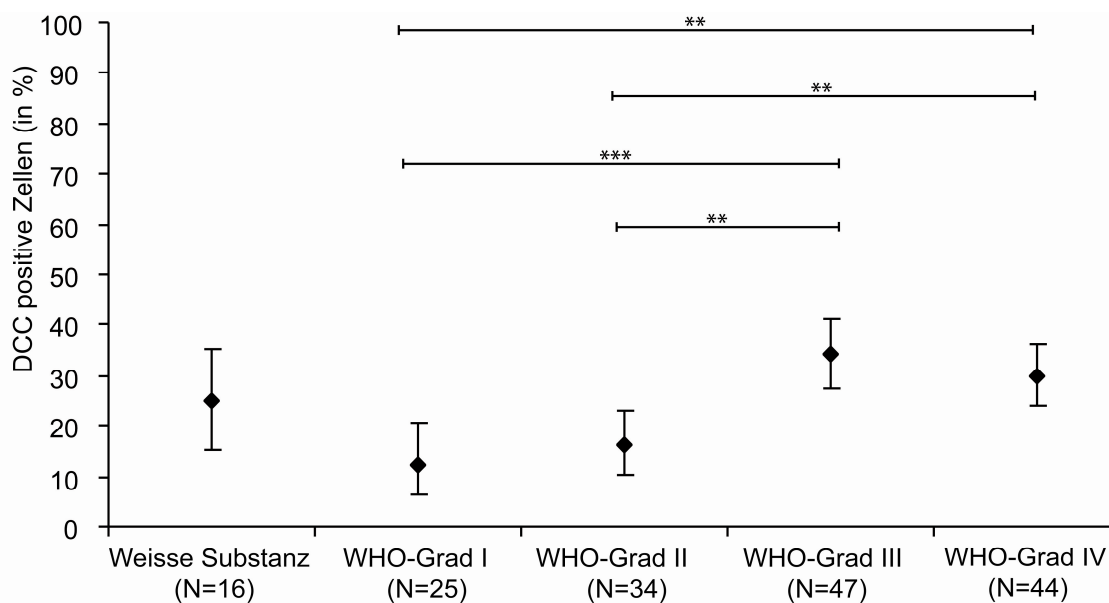


Abbildung 8: Immunreaktivität von DCC in Weisser Substanz und Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

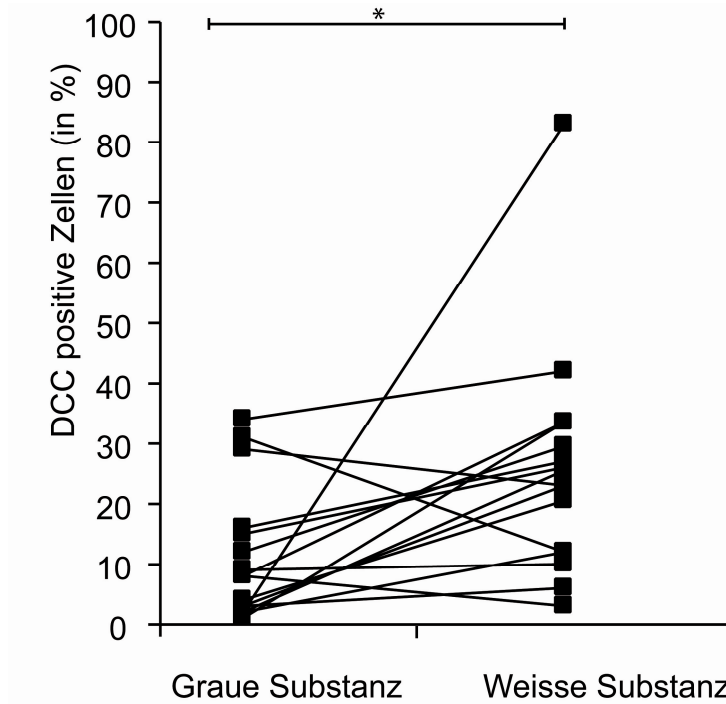


Abbildung 9: Darstellung der matched-pairs Analyse der DCC immunreaktiven Zellen in Grauer und Weisser Substanz im paarweisen Vergleich (N=16).

Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

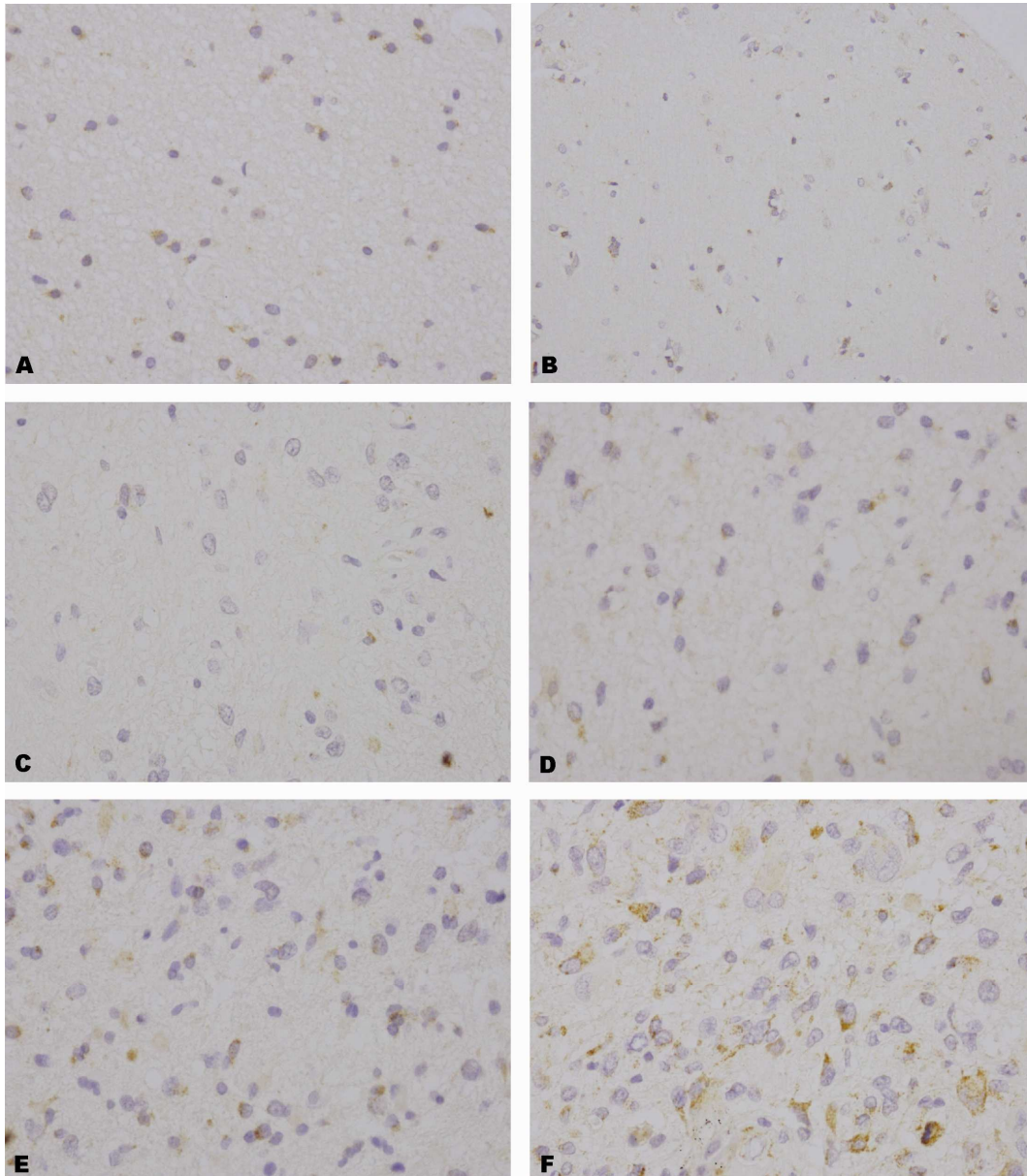


Abbildung 10: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von DCC in Normalhirnmark und -rinde sowie in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Normalhirnmark (**A, 40x-Vergrößerung**), Normalhirnrinde (**B, 20x**), pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (**C, 40x**), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (**D, 40x**), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (**E, 40x**) und Glioblastom WHO-Grad IV (**F, 40x**). Die Mittelwerte der DCC immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Immunreaktivität sind Abbildung 8 zu entnehmen.

3.2.2 DCC Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen

In 24 untersuchten Infiltrationszonen von Glioblastomen ergibt sich ein Mittelwert von 24,7% (95% KI 16,4-34,1%) DCC immunreaktiver Zellen, während in 22 untersuchten Tumorzentren ein Mittelwert von 31,6% (95% KI 22,1-42,0%) aus der Analyse hervorgeht. Im paarweisen Vergleich lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität von DCC feststellen ($p=0,1293$).

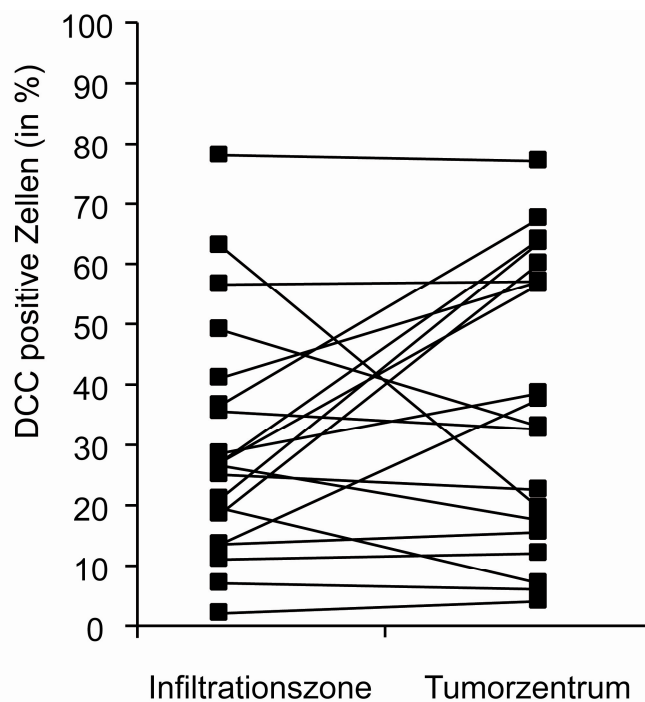


Abbildung 11: Darstellung der matched-pairs Analyse der DCC immunreaktiven Zellen in Infiltrationszone und Tumorzentrum (N=21). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.2.3 DCC Immunreaktivität in Glioblastom-Rezidiven

Die Analyse von 24 Rezidivtumoren primärer Glioblastome ergibt einen Mittelwert von 31,4% (95% KI 21,5-42,3%) DCC positiver Zellen, in den untersuchten 26 Primärtumoren errechnet sich ein Mittelwert von 35% (95% KI 25,1-45,6%). Im paarweisen Vergleich lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität von DCC in Rezidiv- oder Primärtumoren feststellen ($p=0,7732$).

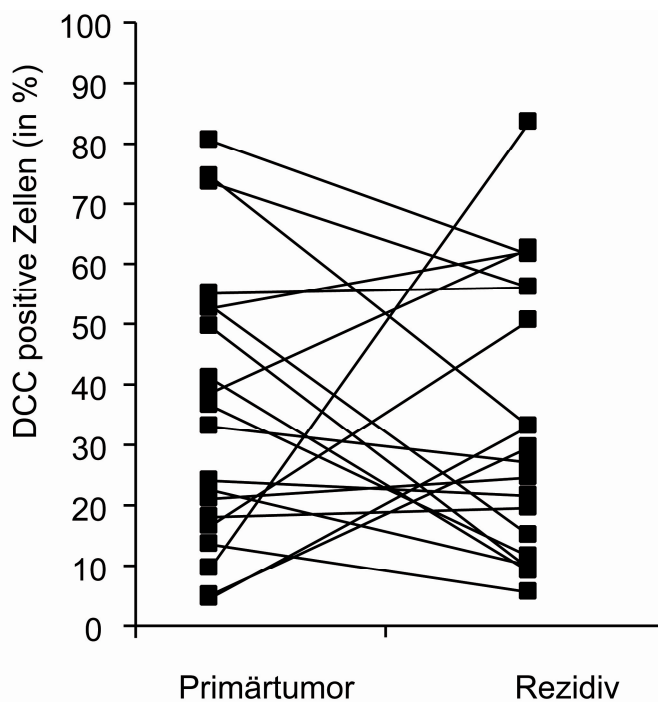


Abbildung 12: Darstellung der matched-pairs Analyse der DCC immunreaktiven Zellen in Primärtumor und Rezidiv beim Glioblastom (N=20). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.3 Immunreaktivität von Netrin-1

3.3.1 Netrin-1 Immunreaktivität in Astrozytomen und Normalhirn

Die Auswertung der pilozytischen Astrozytome WHO Grad I ergibt einen Mittelwert von 7,7% Netrin-1-reaktiver Zellen (95% KI 4,1-12,2%). Für diffuse Astrozytome WHO-Grad II liegt der Mittelwert bei 26,0% (95% KI 20,4-32,0%), bei anaplastische Astrozytomen WHO-Grad III bei 33,1% (95% KI 27,9-38,5%), gefolgt von einem Mittelwert von 67,3% für Glioblastome WHO-Grad IV (95% KI 61,7-72,6%).

In der statistischen Analyse ergibt sich für Glioblastome WHO-Grad IV eine im Vergleich zu den Tumoren von WHO-Grad I, II und III und zur Weissen Substanz des Normalhirns signifikant erhöhte Immunreaktivität von Netrin-1 (jeweils $p < 0,0001$). Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III weisen eine signifikant erhöhte Immunreaktivität im Vergleich zu diffusen Astrozytomen WHO-Grad I und zur Weissen Substanz auf (jeweils $p < 0,0001$). Diffuse Astrozytome WHO-Grad II erweisen sich zu einem signifikant höheren Anteil Netrin-1 immunreaktiv im Vergleich zur Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO-Grad I und zur Weissen Substanz (II zu I: $p < 0,0001$, II zu Weisser Substanz: $p = 0,0025$).

Die Analyse von 13 Proben Grauer Substanz und 16 Proben Weisser Substanz ergibt einen Mittelwert von 13,3% Netrin-1 immunreaktiver Zellen für die Gruppe der Grauen Substanz (95% KI: 8,7-18,7%) und einen Mittelwert von 12% für die Weisse Substanz (95% KI: 8,0-16,6%). Im paarweisen Vergleich ist kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktivität von Netrin-1 zwischen Grauer und Weisser Substanz festzustellen ($p = 0,5213$).

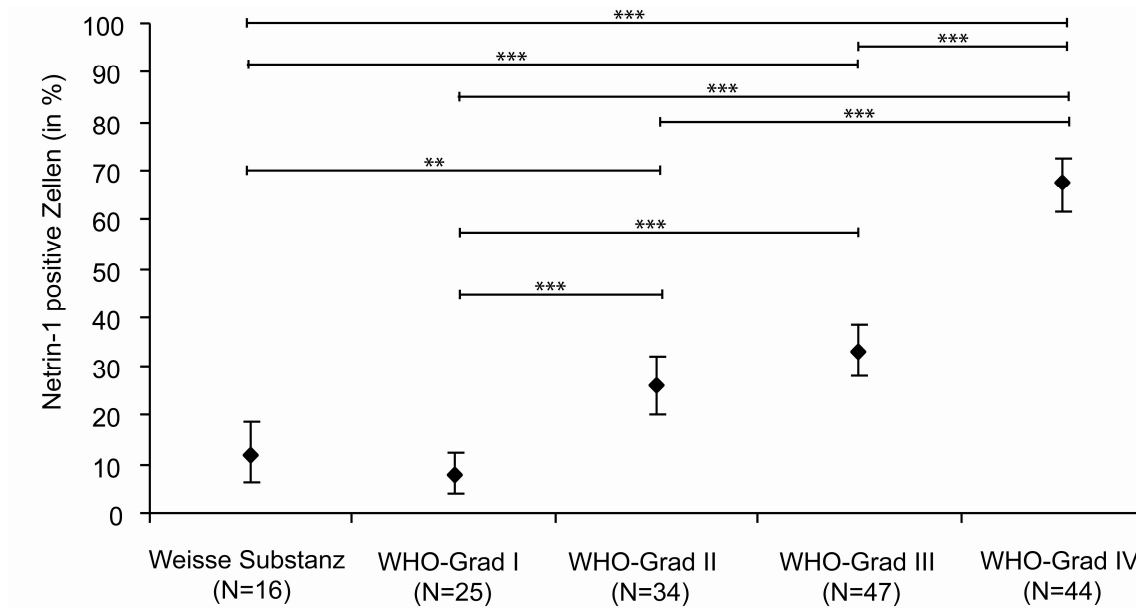


Abbildung 13: Immunreaktivität von Netrin-1 in Weisser Substanz und Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

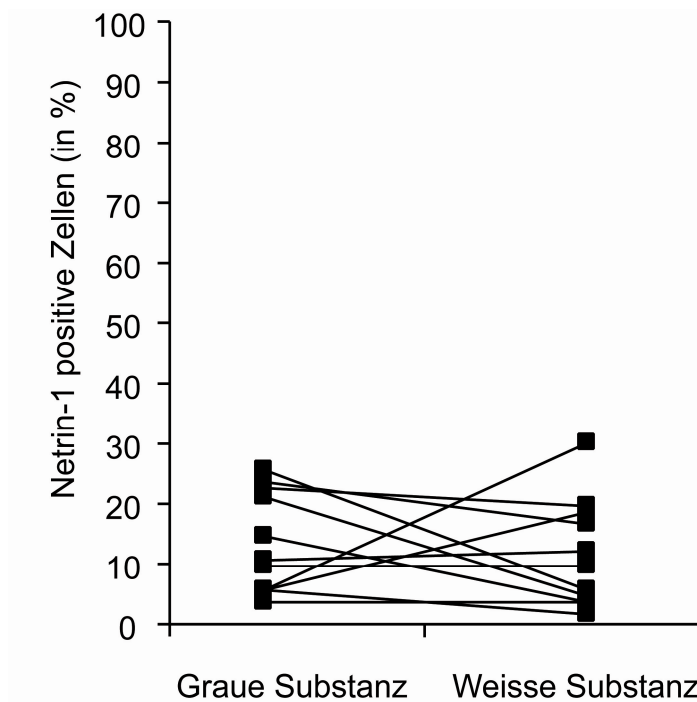


Abbildung 14: Darstellung der matched-pairs Analyse der Netrin-1 immunreaktiven Zellen in Grauer und Weisser Substanz im paarweisen Vergleich (N=11).

Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

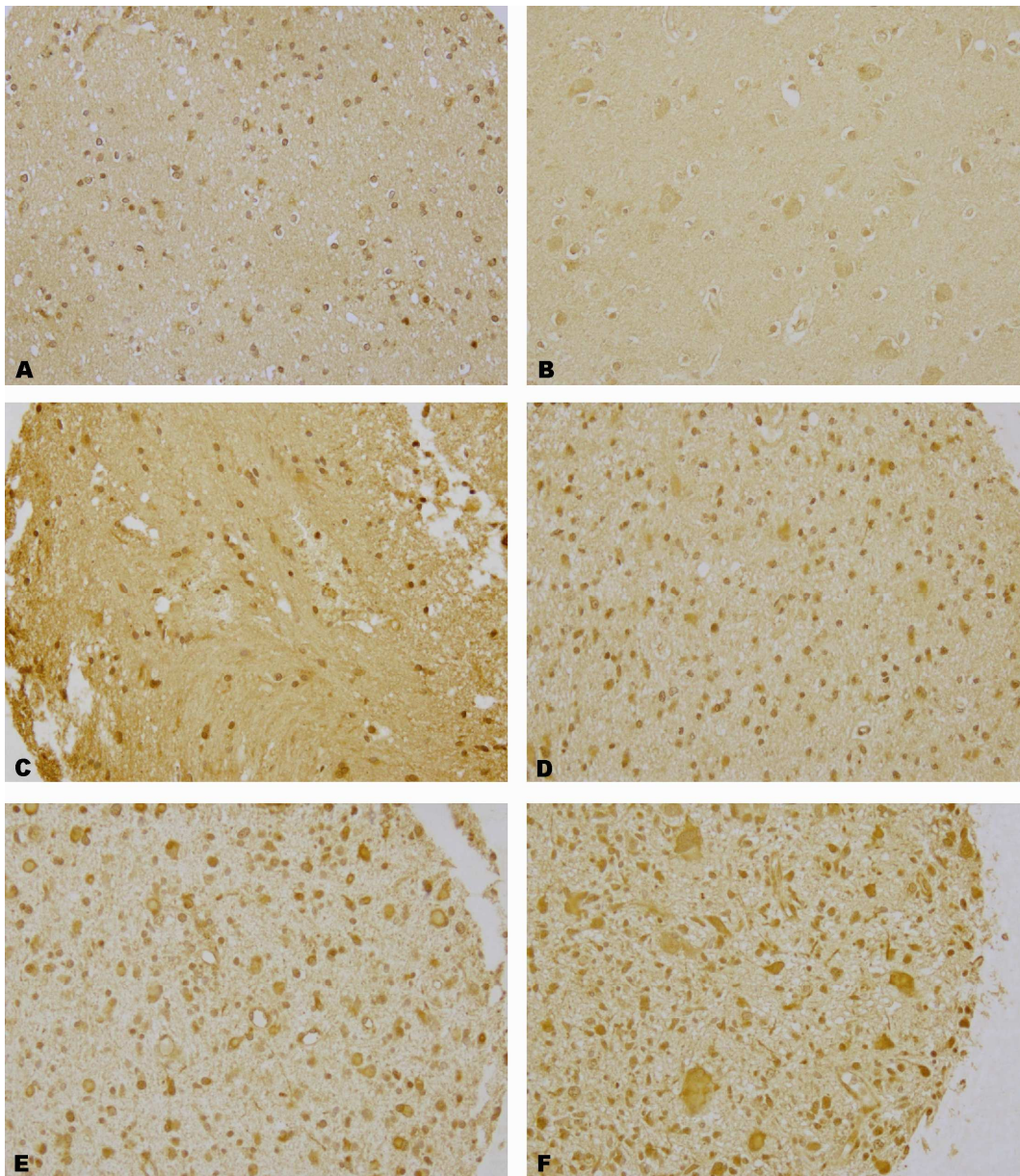


Abbildung 15: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von Netrin-1 in Normalhirnmark und -rinde sowie in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Normalhirnmark (A, 20x-Vergrößerung), Normalhirnrinde (B, 20x), Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (C, 20x), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (D, 20x), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (E, 20x) und Glioblastom WHO-Grad IV (F, 20x). Die Mittelwerte der Netrin-1 immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Immunreaktivität sind Abbildung 13 zu entnehmen.

3.3.2 Netrin-1 Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen

Die Analyse der 23 Infiltrationszonen ergibt einen Mittelwert von 30,5% Netrin-1 immunreaktiver Zellen (95% KI 21,6%-40,3%), in den Tumorzentren von 16 untersuchten Glioblastomen WHO Grad IV liegt der Mittelwert bei 62,3% (95% KI 50,2%-73,6%).

Im paarweisen Vergleich ist die Netrin-1 Immunreaktivität im Tumorzentrum im Vergleich zur Infiltrationszone signifikant erhöht ($p=0,0006$).

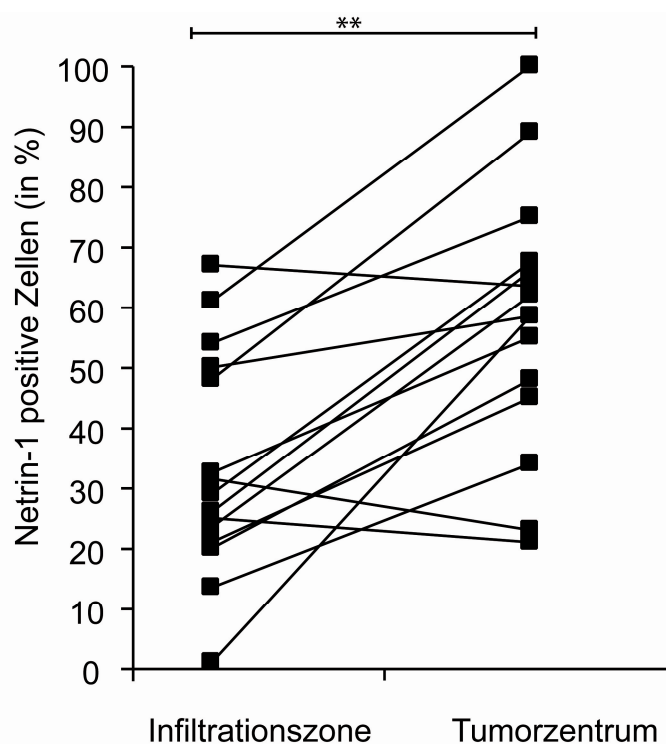


Abbildung 16: Darstellung der matched-pairs Analyse der Netrin-1 immunreaktiven Zellen in Infiltrationszone und Tumorzentrum (N=15). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.3.3 Netrin-1 Immunreaktivität in Glioblastom-Rezidiven

In den 17 untersuchten Rezidivtumoren von Glioblastomen WHO-Grad IV liegt der Mittelwert der Netrin-1 positiven Zellen bei 56,3% (95% KI 45,7%-66,7%),

während in den 17 untersuchten Primärtumoren 70,9% der Zellen immunhistochemisch positiv reagieren (95% KI 60,8%-80,0%).

Im paarweisen Vergleich ergibt sich kein signifikanter Unterschied für die Immunreaktivität von Netrin-1 ($p=0,2028$).

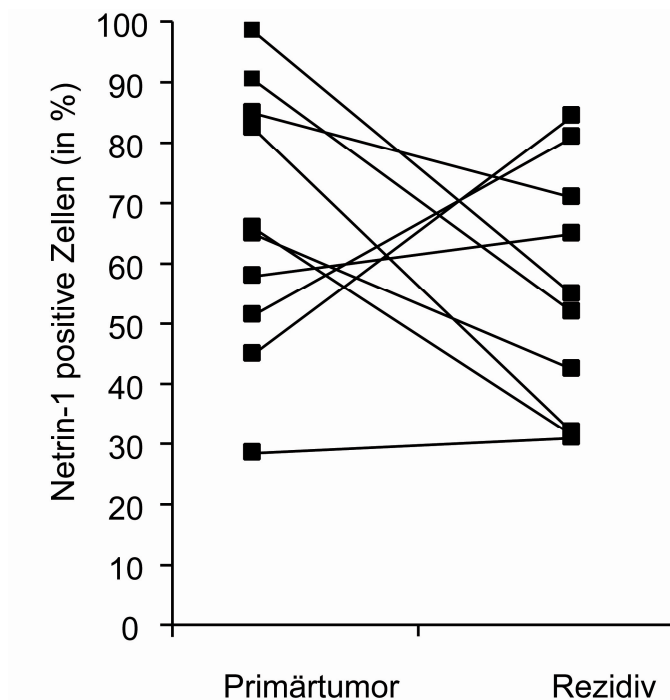


Abbildung 17: Darstellung der matched-pairs Analyse der Netrin-1 immunreaktiven Zellen in Primärtumor und Rezidiv beim Glioblastom (N=10). Zusammengehörige Gewebepaare sind mit einer Linie verbunden.

3.3.4 Netrin-1 Immunreaktivität in Gefäßen in Astrozytomen und Normalhirn

Die Untersuchung der Netrin-1 Immunreaktivität in Gefäßen ergibt für pilozytische Astrozytome WHO-Grad I einen Mittelwert von 86,5% positiv gefärbter Zellen (95% KI 72,3%-96,1%). Für diffuse Astrozytome WHO-Grad II wird ein Mittelwert von 66,5% (95% KI 52,5%-79,2%), für anaplastische Astrozytome WHO-Grad III ein Mittelwert von 70,2% (95% KI 59,5%-79,8%) und für Glioblastome WHO-Grad IV ein Mittelwert von 95,2% (95% KI 89,9%-

98,6%) ermittelt. Für Gefäße der Weissen Substanz in Normalhirnen ergibt sich ein Mittelwert von 25,7% (95 KI 12,0-42,5%).

Im statistischen Vergleich ist die Immunreaktivität von Netrin-1 in den Gefäßen aller Tumorgruppen im Vergleich zur Weissen Substanz signifikant erhöht (Weisse Substanz zu I, III und IV: $p < 0,0001$, Weisse Substanz zu II: $p = 0,0004$). Der prozentuale Anteil Netrin-1 positiver Endothelzellen ist in Glioblastomen WHO-Grad IV signifikant im Vergleich zu Tumoren der Gruppen II und III erhöht (jeweils $p < 0,0001$).

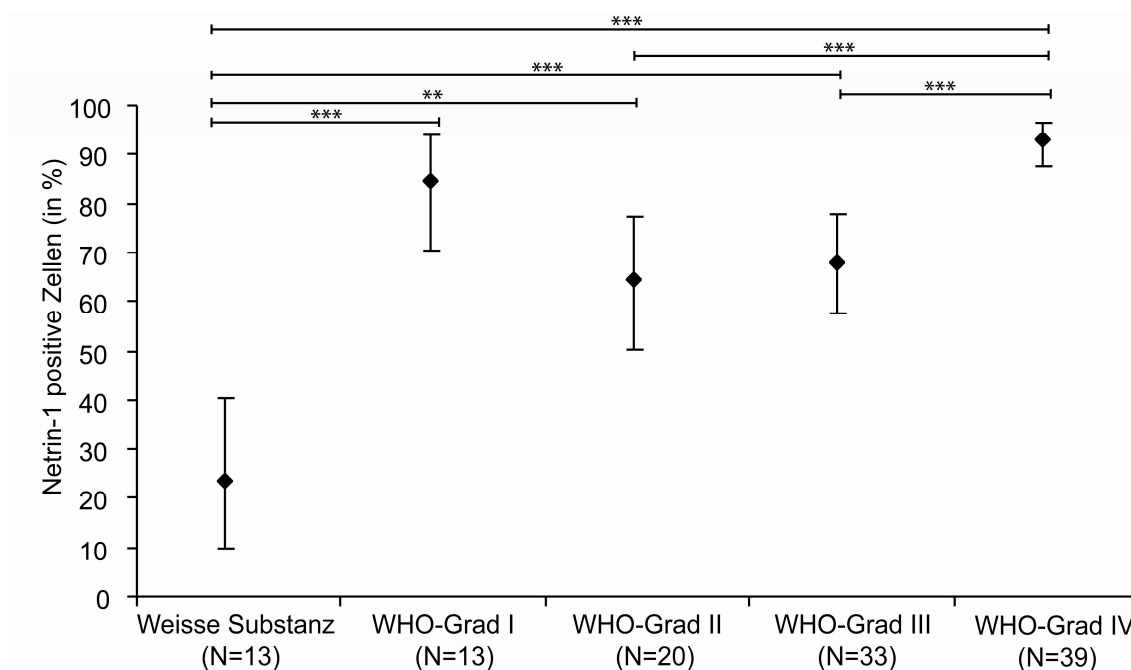


Abbildung 18: Immunreaktivität von Netrin-1 in Gefäßen von Weisser Substanz und Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Darstellung der Mittelwerte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen.

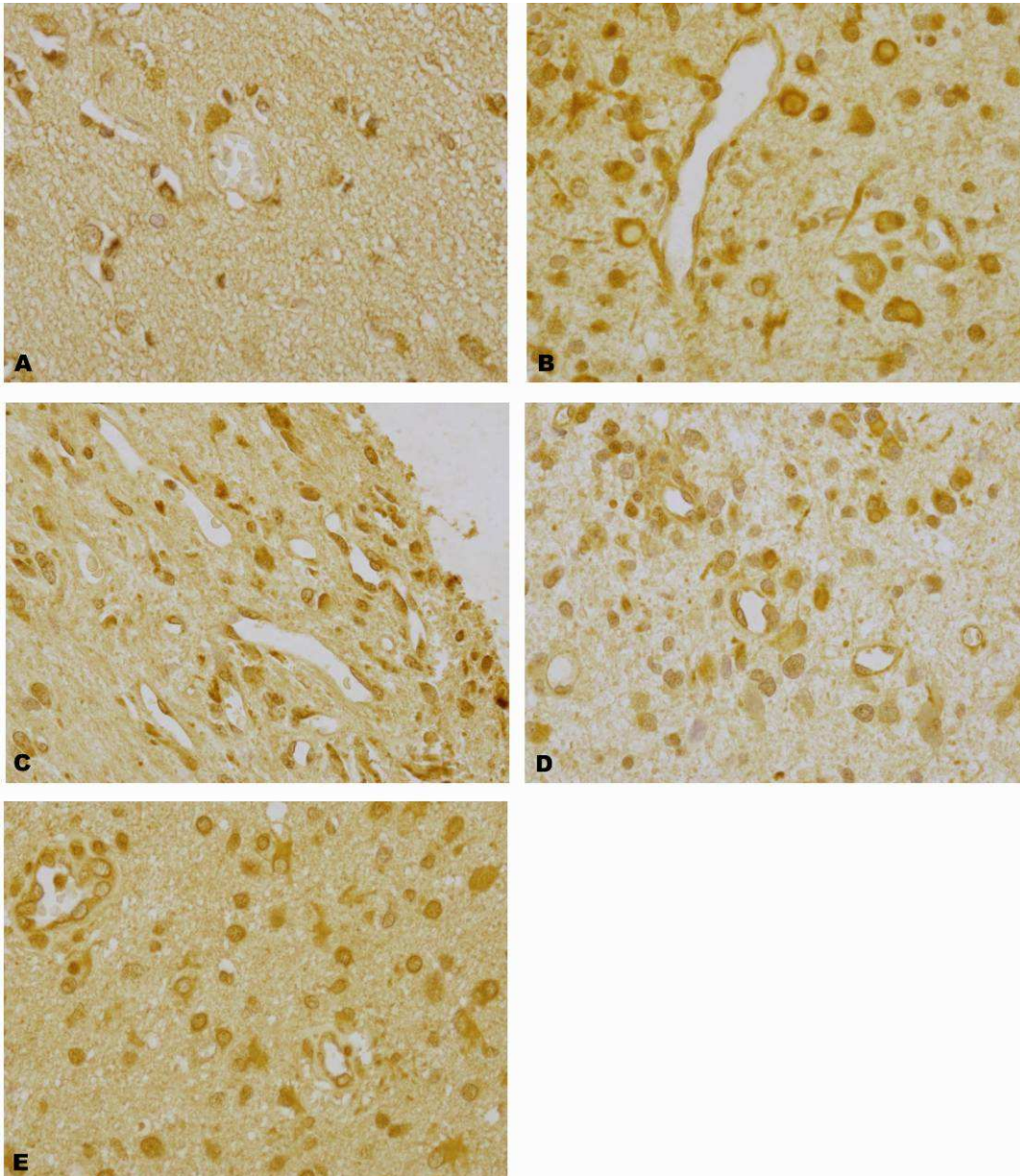


Abbildung 19: Repräsentative Auswahl der immunhistochemischen Färbungen von Netrin-1 in Gefäßen in Normalhirnmark sowie in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Die Bilder sind wie folgt angeordnet: Normalhirnmark (A, 40x-Vergrößerung), Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I (B, 40x), diffuses Astrozytom WHO-Grad II (C, 40x), anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III (D, 40x) und Glioblastom WHO-Grad IV (E, 40x). Die Mittelwerte der Netrin-1 immunreaktiven Zellen, deren 95%-Konfidenzintervall und signifikante Unterschiede der Immunreaktivität sind Abbildung 18 zu entnehmen.

3.4 Kaplan-Meier-Analyse für DCC und Netrin-1

In der statistischen Analyse der Immunreaktivität ergeben sich keine Hinweise für eine Assoziation der beiden Faktoren mit dem Überleben der Patienten.

Die Daten der pilozytischen Astrozytome sind hier nur aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt. Im Beobachtungszeitraum verstarb lediglich ein Patient.

Für DCC ergeben sich folgende p-Werte:

WHO-Grad I: $p=1$, WHO-Grad II: $p=0,875$, WHO-Grad III: $p=0,318$, WHO-Grad IV: $p=0,114$.

Für Netrin-1 ergeben sich folgende p-Werte:

WHO-Grad I: $p=0,729$, WHO-Grad II: $p=0,242$, WHO-Grad III: $p=0,733$, WHO-Grad IV: $p=0,133$.

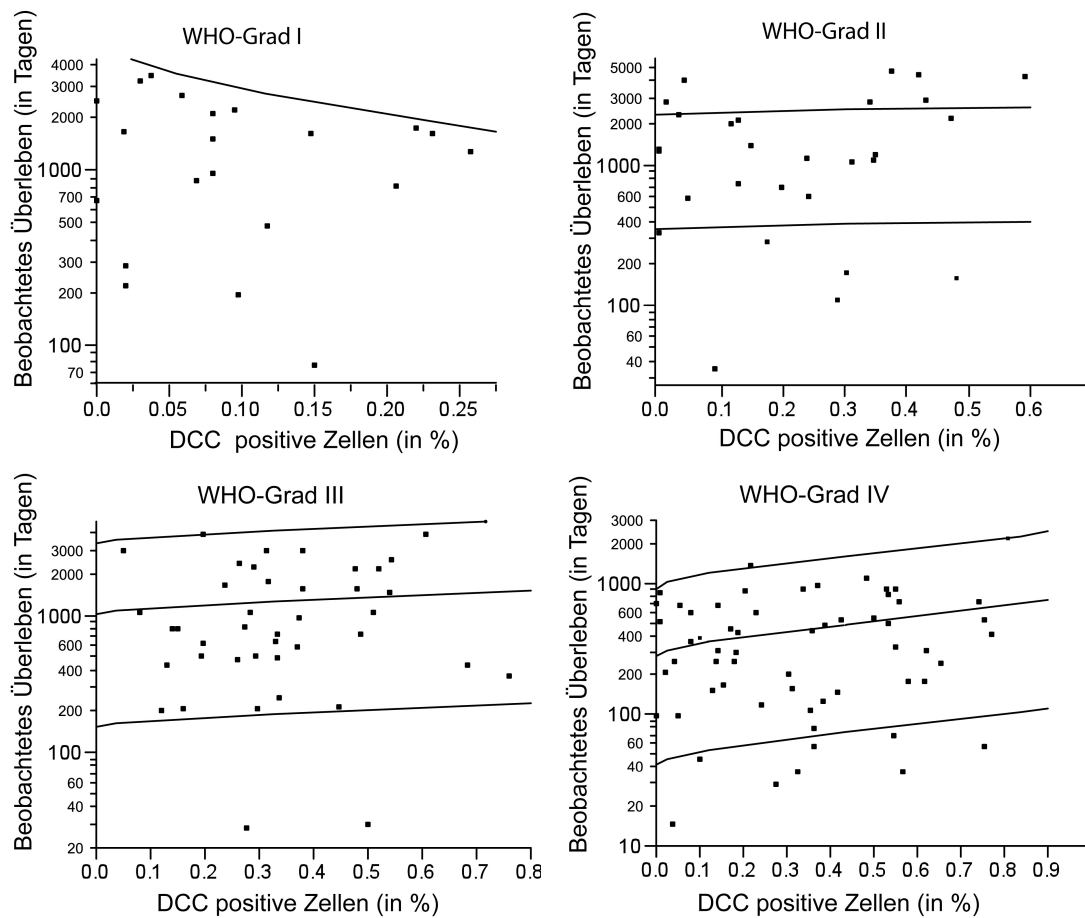


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Analysen von DCC in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Es zeigt sich keine signifikante Assoziation der Immunreaktivität von DCC mit dem Überleben.

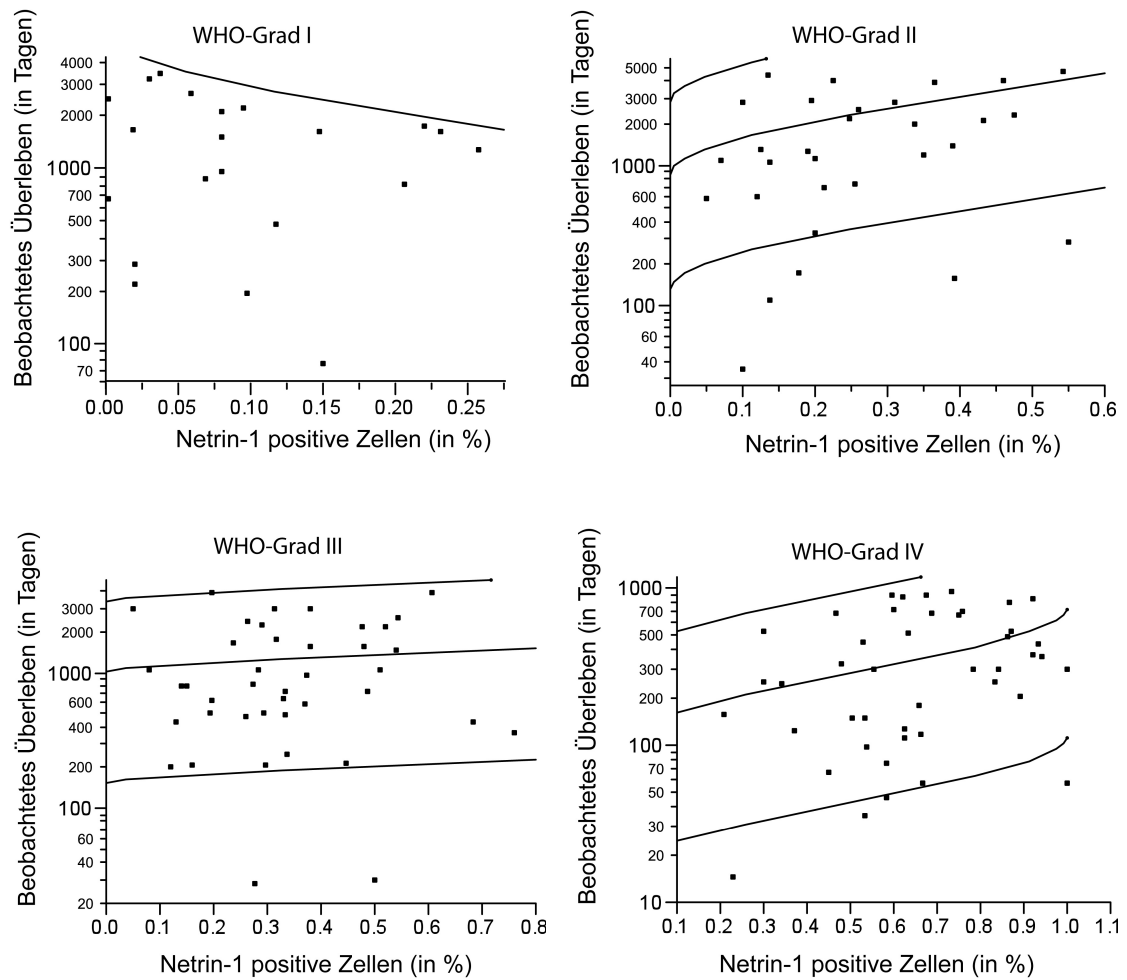


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Analysen von Netrin-1 in Astrozytomen WHO-Grad I-IV. Es zeigt sich keine signifikante Assoziation der Immunreaktivität von Netrin-1 mit dem Überleben.

4. Diskussion

Heute gilt als gesichert, dass Astrozytome in ihrer Entstehung und Progression eine Vielzahl von Veränderungen durchlaufen. Störung der Apoptoseregulation, Aktivierung von zellulärer Migration und Invasion, Sezernierung immunsuppressiver Faktoren und die Induktion der Angiogenese spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Trotz aller Bemühungen und einer Vielzahl klinischer Studien konnte im Rahmen der sogenannten targeted therapy (zielgerichteten Therapie) neben Operation, Radio- und Chemotherapie bisher keine Therapieoption etabliert werden, welche das Überleben der Patienten entscheidend beeinflusst.

Antiangiogene Therapeutika beispielsweise haben schon den Weg in den klinischen Alltag geschafft. So wurde der Angiogenese-Inhibitor Bevacizumab (Avastin®) 2004 zur Behandlung des metastasierenden Kolonkarzinoms zugelassen. Leider hat sich jedoch im Bezug auf Gliome herausgestellt, dass teilweise eine erfolgreiche antiangiogene Therapie mit dem Nebeneffekt einer erhöhten Tumorinvasivität einhergeht (Lamszus et al., 2003).

Einen Ausweg aus dem Dilemma könnte die erfolgreiche Suche nach Molekülen, die in möglichst viele unterschiedliche Signalwege dieser bösartigen Tumoren eingreifen, darstellen. Ziel ist es, durch besseres Verständnis der Entartungsmechanismen möglichst gerichtete und für den Patienten schonende Therapieoptionen zu gewinnen.

Embryonale Faktoren sind nicht zuletzt in den Fokus der Wissenschaft gerückt, da zahlreiche interessante Parallelen zwischen der embryonalen Entwicklung des ZNS und der Entstehung bzw. Progression von Tumoren bestehen. Während der Entwicklung des ZNS können verschiedene Grundprozesse beschrieben werden. Proliferation von Stamm-/Progenitorzellen, Zellmigration und -differenzierung, Ausbildung eines Gefäßsystems im Rahmen der Vaskulogenese und die Entwicklung einer Immunität. Astrozytome scheinen in ihrer Entstehung bzw. Progression diese Prozesse unkoordiniert zu wiederholen.

Netrin-1, erstmals beschrieben als axonales Lenkungsmolekül in der Embryogenese, ist ein Kandidat, als pleiotroper Faktor zu agieren und kann aus theoretischer Sicht die oben genannten Pfade negativ beeinflussen. Als Ligand greift Netrin-1 in unterschiedliche Signalwege ein:

1. Regulierung der Apoptose (hemmender Einfluss)
2. Aktivierung von zellulärer Migration und Invasion (fördernd)
3. Immunevasion (fördernd und hemmend)
4. Angiogenese (fördernd)

Eine Überexpression von Netrin-1 führt beispielsweise in gastrointestinalen Neoplasien zur Inhibition der Apoptose (Mazelin et al., 2004). Dabei wurde ein Apoptosemechanismus nachgewiesen, der nicht wie üblich über das Binden eines Liganden an seinen Rezeptor zur Auslösung von Apoptosemechanismen führt, sondern diese verhindert. Aus diesem Grund werden diese Moleküle auch Abhängigkeitsrezeptoren genannt. Der Netrin-1 Rezeptor DCC gehört zur Gruppe dieser Rezeptoren und hat neben seiner Abhängigkeitsfunktion zusammen mit Netrin-1 auch fördernden Einfluss auf die Regulation der zellulären Migration (Shekarabi et al., 2005).

Über die Verteilung von DCC in astrozytären Tumoren gibt es bisher nur wenige Daten. Das Vorkommen von Netrin-1 in diesen Tumoren ist bisher überhaupt nicht untersucht.

Um die Expression des Paares DCC und Netrin-1 in vivo zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ihre Immunreaktivität im Normalhirn sowie in Astrozytomen WHO-Grad I-IV analysiert und ihre Assoziation mit dem Überleben der Patienten untersucht. Diese Untersuchung soll dem weiteren Verständnis der Entstehung und Progression humaner astrozytärer Tumoren dienen und Grundlagen für potentielle Therapiestrategien schaffen, welche in diese Kaskaden eingreifen können.

4.1 Zelldichte in Astrozytomen

Die Zelldichte steigt innerhalb der Gruppe der Astrozytome WHO-Grad II bis IV mit dem WHO-Grad an. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen

Daten überein (Louis et al., 2007). Lediglich das diffuse Astrozytom WHO-Grad II weist eine nicht signifikant niedrigere Zellzahl als das pilozytische Astrozytom auf.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Validität der TMA-Methode und deuten auf eine repräsentative Probenauswahl hin.

Die mit Hinblick auf die WHO-Klassifikation erhöhte Gesamtzellzahl lässt sich mit der Auswahl der Tumorproben für die TMA-Präparate erklären. So wurden einzig solche Tumorzonen ausgewählt, die histopathologisch charakteristisch für jede Tumorgruppe waren und daher vorzugsweise in Regionen hoher Zelldichte aufzufinden sind.

Die Definition der Infiltrationszone bereitet aus histopathologischer Sicht einige Probleme, da sie morphologisch nicht exakt vom Primärtumor abzugrenzen ist. Zu ihr werden Gebiete gezählt, die sich in direkter Umgebung zum Tumorgewebe befinden, jedoch keine Atypiezeichen wie vermehrte Mitosen, Gefäßproliferate oder Nekrosen aufweisen und nicht als residuales ZNS-Gewebe zu identifizieren sind. Im Vergleich zum Primärtumor ist die Zellzahl in der Infiltrationszone etwa um die Hälfte reduziert, liegt jedoch deutlich über dem Niveau der Weissen Substanz. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee einer repräsentativen Probenauswahl bezüglich der Infiltrationszonen, wobei nicht auszuschließen ist, dass auch normales ZNS-Gewebe und reaktive Astrozyten ausgewertet wurden, da normale Gliazellen in der Tumorumgebung vom eigentlichen Tumorgewebe morphologisch nicht mit absoluter Sicherheit zu unterscheiden sind.

Die Auswertung der 20 Glioblastom-Rezidivtumoren ergibt eine verminderte Zellzahl im Vergleich zu den Primärtumoren. Dies könnte als Konsequenz der erfolgten Radiochemotherapie auf die Tumorzellen betrachtet werden. In der Literatur wird in Rezidiven von anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen eine Riesenzellbildung beschrieben (Ogashiwa et al., 1989), die zur Reduktion der Gesamtzellzahl führen kann.

4.2 DCC Immunreaktivität in Astrozytomen und im Normalhirn

Das Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose hat entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von Tumoren (Thompson, 1995). Aus diesem Grund wurde das Proliferations- und Apoptoseniveau in Astrozytomen in unterschiedlichen Arbeiten analysiert. Bevor die Ergebnisse des Abhängigkeitsrezeptors DCC, der proapoptotischen Eigenschaften aufweist, diskutiert werden, soll kurz auf das allgemeine Apoptoseniveau in Astrozytomen eingegangen werden.

Mit Hilfe der TUNEL-Färbung, die DNA-Bruchstücke markiert, lässt sich die Anzahl spontaner Apoptosen ermitteln. Die Apoptoserate steigt mit dem Malignitätsgrad an (Heesters et al., 1999). So liegt sie beim pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I bei 0,3%, beim diffusen Astrozytom WHO-Grad II bei 0,5%, das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III weist einen Mittelwert von 0,8% auf und das Glioblastom hat den höchsten Apoptoseindex von 1,7% (Heesters et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist auch wichtig zu erwähnen, dass die Proliferationsrate mit dem Malignitätsgrad der Astrozytome ansteigt (Heesters et al., 1999). Diese Rate lässt sich mit dem Proliferationsmarker MIB-1 (Antikörper gegen das Proliferationsantigen Ki-67) bestimmen. Für Astrozytome WHO-Grad I liegt der Mittelwert bei 6,9%, für WHO-Grad II Tumore bei 10%, für WHO-Grad III bei 19% und für Glioblastome WHO-Grad IV bei 28,2% (Heesters et al., 1999). Somit lässt sich eine positive Korrelation der Apoptoserate mit der Proliferationsrate über die WHO-Grade I bis IV feststellen. Die Diskrepanz zwischen niedriger Apoptoserate und hohem Proliferationsindex lässt sich mit der Tatsache erklären, dass die TUNEL-Färbung gegen DNA-Fragmente gerichtet ist, die nur für einen kurzen Zeitraum im Ablauf der Apoptose vorhanden sind (Kordek et al., 1996). Insgesamt gesehen verläuft der Vorgang der Apoptose sehr schnell, histologisch betrachtet innerhalb von 3 Stunden (Bursch et al., 1990). Dennoch muss auch kritisch angemerkt werden, dass mit Hilfe der TUNEL-Färbung auch fälschlicherweise Nekrosen detektiert werden und es fälschlicherweise zu hoch

ermittelten Werten kommen kann. Daher muss bei der Auswertung auch immer die Apoptosemorphologie beachtet werden.

Die Immunreaktivität von DCC im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung zeigt signifikant höhere Werte für das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III und Glioblastom WHO-Grad IV im Vergleich zum pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I und dem diffusen Astrozytom WHO-Grad II, wobei das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III den höchsten Durchschnittswert an DCC immunreaktiven Zellen und das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I den niedrigsten Prozentsatz aufweisen. Der Anstieg der DCC positiven Zellen mit dem Malignitätsgrad ist mit den in der Literatur ermittelten Apoptoseraten in Astrozytomen in Einklang zu bringen (Heesters et al., 1999). Die erhöhten Durchschnittswerte für DCC (34,1 % für das anaplastische Astrozytom WHO-Grad III) könnten mit dem Umstand erklärt werden, dass DCC als Membranprotein nicht nur während der Apoptose exprimiert wird, sondern auch im ligandengebundenen Zustand zu detektieren ist.

So gut die Ergebnisse einer erhöhten DCC Immunreaktivität in Astrozytomen zur apoptotischen Aktivität dieser Gruppe von Gliomen passt, so konträr stehen diese Ergebnisse jedoch zu der in der Einleitung formulierten Hypothese, dass DCC mit wachsendem Malignitätsgrad herunterreguliert wird, wie es auch in der Literatur beschrieben wird (Ekstrand et al., 1995, Reyes-Mugica et al., 1997). Ein Erklärungsansatz wäre, methodische Unterschiede herauszuarbeiten. Eine Arbeitsgruppe um Ekstrand hat ihre Ergebnisse aus einer Tumoranalyse via Western Blot erzielt. Eine andere Arbeitsgruppe um Reyes-Mugica hat - wie in dieser Arbeit - immunhistochemische Färbungen vorgenommen, jedoch auf eine quantitative Auswertung verzichtet und die Tumoren lediglich als DCC positiv bzw. DCC-negativ klassifiziert. Von den 26 untersuchten primären Glioblastomen wurden gerade einmal 6 als DCC-negativ eingestuft. Eine weitere Arbeit befasst sich mit niedriggradigen Astrozytomen und kommt zu dem Schluss, dass die DCC-Expression dieser Tumoren höchst variabel ist (Hilton et al., 2002). Dennoch muss man auch die TMA-Methode kritisch betrachten, da die histologisch-morphologische Begutachtung auf eine 600 Mikrometer durchmessende Schicht begrenzt ist und somit nicht alle

Tumorareale repräsentativ abgedeckt sein könnten. Auch bedacht werden muss, dass insbesondere die Gruppe der Glioblastome WHO-Grad IV eine äußerst heterogene Tumorentität darstellt.

Die Störung der Apoptoseregulation ist eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung und Progression von Astrozytomen (Steinbach und Weller, 2004). Insbesondere in ihrer Infiltrationszone zeigen Gliome eine erhöhte Apoptoseresistenz im Vergleich zum Tumorzentrum, was zur Resistenz dieser hochmalignen Tumoren gegenüber proapoptotischer Radiochemotherapy beitragen könnte (Lefranc et al., 2005, Lefranc, 2009)

Obwohl bekannt ist, dass viele höhergradige Astrozytome eine gestörte Apoptosefunktion aufweisen, wurde andererseits gezeigt, dass diese bösartigen Tumoren unter gewissen Umständen proapoptotische Moleküle bilden (Fischer et al., 2005). Aus biologischer Sicht könnte man sich vorstellen, dass die gesteigerte Proliferationsrate in Glioblastomen einen Selektionsdruck auf den Tumor ausübt, vermehrt proapoptotische Moleküle zu bilden, was einen DCC-Anstieg erklären könnte. In der Literatur wird ein erhöhter Apoptoseindex in Glioblastomen mit einer erhöhten Proliferationsrate und vermehrter Hypoxie in Zusammenhang gebracht (Ellison et al., 1995, Heesters et al., 1999). Im Verlauf der Progression von niedriggradigen zu höhergradigen Tumoren akkumulieren Gliome multiple genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen. Zusammen mit der hypoxischen Mikroumgebung des Tumors führt dies zur genomischen Instabilität (Reynolds et al., 1996, Weinmann et al., 2004). Im hypoxischen Zustand werden im Rahmen der Adaptation zahlreiche Faktoren aufreguliert. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ist in diesem Zusammenhang von speziellem Interesse, da es in multiple Mechanismen wie Angiogenese, Apoptose und Zellproliferation regulierend eingreift (Fischer et al., 2005). HIF-1 aktiviert proapoptotische Proteine wie BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) und NIX (Sowter et al., 2001, Birse-Archbold et al., 2005, Althaus et al., 2006). Analog reduziert HIF-2 im Rattengliommodell Tumorwachstum im Rahmen einer erhöhten Apoptose (Acker et al., 2005). Man könnte mutmaßen, dass DCC als proapoptotischer Faktor über einen ähnlichen, bisher unbekanntem Mechanismus in Astrozytomen aufreguliert wird.

Eine Arbeitsgruppe um Ray stellte eine Überexpression des proapoptotischen Moleküls Bax sowie eine Aufregulierung von Caspase-3 und Caspase-9 in malignen Hirntumoren fest. Hypoxie und ein erhöhter Verbrauch von Nährstoffen werden hierbei als Triggerfaktoren für den Zelltod genannt (Ray et al., 2002). In einer neueren Arbeit wird zumindest das Vorhandensein dieser 3 Faktoren in Glioblastomen bestätigt (Zarnescu et al., 2008).

Die signifikant erhöhten DCC Immunreaktivität des Astrozytoms WHO-Grad III und Glioblastoms WHO-Grad IV passen ebenfalls gut zu der migrationsfördernden Eigenschaft von DCC.

DCC nimmt Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts ein, einem Prozess, der eine wichtige Voraussetzung für Migration und invasives Wachstum darstellt (Shekarabi et al., 2005, Briançon-Marjollet et al., 2008). Es ist bekannt, dass in Gliomen zahlreiche proinvasive Faktoren wie Cadherine (Asano et al., 2004), MMPs (Kargiotis et al., 2008) oder Integrine (Argyriou und Kalofonos, 2009) aufreguliert sind. DCC-Aktivierung führt im Zytoskelett zu Cdc42, Rac1, Pak1 und N-WASP Aktivierung (Shekarabi et al., 2005, Briançon-Marjollet et al., 2008), was direkte Auswirkung auf die Aktinorganisation hat. Welcher Zusammenhang zwischen dem in dieser Arbeit festgestellten Expressionsprofil auf Proteinebene für DCC und einer funktionellen Rolle dieses Faktors im Rahmen der Migration und Invasion besteht, muss jedoch noch mit Migrations- und Invasionsanalysen untersucht werden.

In der statistischen Auswertung zeigt sich eine deutliche DCC Immunreaktivität, wobei der Mittelwert in der Weissen Substanz signifikant gegenüber der Grauen Substanz erhöht ist. DCC wird insbesondere von Neuronen im Gehirn exprimiert (Forcet et al., 2001, Llambi et al., 2001). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass Gliazellen DCC exprimieren. Für Oligodendrozyten ist eine DCC-Expression, sowohl in embryonalem, als auch adultem ZNS, nachgewiesen (Tsai et al., 2003, Jarjour et al., 2008, Rajasekharan et al., 2009). Zusammen mit Netrin-1 ist DCC in die Organisation und Aufrechterhaltung der axoglialen Kommunikation an den paranodalen

Übergangsstellen in adultem ZNS involviert (Reyes-Mugica et al., 1997, Jarjour et al., 2008). Auch für Astrozyten wird eine DCC-Expression in der Literatur postuliert, wobei keine quantitative Angabe zu finden ist (Reyes-Mugica et al., 1997). Auf Grund ihrer vielfältigen Funktionen im ZNS wie beispielsweise die Modulation der synaptischen Übertragung könnte man vermuten, dass Astrozyten sich über einen DCC-gesteuerten Mechanismus an der Organisation von axoglialen Kontakten beteiligen.

4.3 Netrin-1 Immunreaktivität in Astrozytomen, Normalhirn und Gefäßen

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der immunhistochemischen Färbungen ergeben einen kontinuierlichen Anstieg der Netrin-1 Immunreaktivität von WHO-Grad I bis IV und unterstützen die Hypothese, dass Netrin-1 als pleiotroper Faktor in höhergradigen Astrozytomen aufreguliert wird. Für das Glioblastom WHO-Grad IV kann eine signifikante Erhöhung der Immunreaktivität im Vergleich zu allen anderen 3 Tumorgraden und zur Weissen Substanz ermittelt werden. Signifikant ist auch die Immunreaktivität der Astrozytome WHO-Grad II bzw. WHO-Grad III gegenüber dem pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I und der Weissen Substanz erhöht.

Die multifaktoriellen Eigenschaften von Netrin-1 prädisponieren dieses Protein insbesondere in hochmalignen Tumoren aufreguliert zu sein:

Eine gestörte Apoptosefunktion bzw. eine erfolgreiche Evasion vor dem natürlichen Zelltod ist eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung und Progression von Tumoren (Hanahan und Weinberg, 2000, Steinbach und Weller, 2004). Die deutliche Aufregulierung von Netrin-1 in Glioblastomen WHO-Grad IV könnte zu einer Blockierung der durch den Abhängigkeitsrezeptor DCC geförderten Apoptose führen (Llambi et al., 2001). Dabei erschien die Relevanz zwischen malignen Potential und der Apoptoseregulierung in astrozytären Tumoren lange Zeit nicht klar (Ralte et al., 2001). Mehrere Arbeiten konnten keine Korrelation der Apoptoserate mit dem histopathologischen Grad feststellen (Ellison et al., 1995, Carroll et al., 1997, Heesters et al., 1999, Ralte et al., 2001). Nakamura et al. postulieren für

rezidivierende Astrozytome eine höhere Apoptoserate im Vergleich zu den Primärtumoren (Nakamura et al., 1997). Nakamizo et al. weisen für das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I den höchsten Apoptoseindex nach und erklären dies als Zeichen der biologischen Gutartigkeit dieses Tumors (Nakamizo et al., 2002). Aus heutiger Sicht jedoch ist unumstritten, dass in malignen Gliomen zahlreiche Pfade, zum Beispiel p53 oder RB, gestört sind, die die Apoptose kontrollieren (Steinbach und Weller, 2004, Louis et al., 2007). Interessanterweise ist im ZNS unter physiologischen Verhältnissen die Apoptoserate niedrig (Olano et al., 1996), während sie in Astrozytomen oder auch im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen ansteigt (Wang et al., 2009a). Dies steht im Gegensatz zur physiologisch hohen Apoptoserate beispielsweise im Darmepithel, welche im Rahmen der Genese von kolorektalen Karzinomen supprimiert wird (Yang et al., 2009). Man könnte mutmaßen, dass die Erhöhung der Apoptoserate eine am Ende vergebliche Reaktion des ZNS auf die erhöhte Proliferationsrate der astrozytären Tumoren darstellt.

Störende Eingriffe in den Ablauf der Apoptose haben dramatische Folgen für die Dynamik der Tumorprogression, auch wenn das eingreifende Molekül nur antiapoptotisch wirksam ist (Hanahan und Weinberg, 2000). Mögliche Strategien für die Evasion der Apoptose wurden in den 90er Jahren am folliculären Lymphom erstmals ausführlich beschrieben. Neben der forcierten Expression des Bcl-2 Onkogens wurde die Möglichkeit der Apoptosehemmung durch exogene Überlebensfaktoren, in diesem Fall IGF-1 (insulin-like growth factor 1), nachgewiesen (Hueber et al., 1997).

In letzter Zeit wird die autologe Expression von Netrin-1 als Strategie von Tumorzellen beschrieben, die von Abhängigkeitsrezeptoren induzierte Apoptose zu blockieren (Mille et al., 2009). Netrin-1-Überexpression wird überdies für verschiedene Tumoren, zum Beispiel dem Neuroblastom oder Mamma-Ca, als potentieller Marker für eine schlechte Prognose diskutiert (Fitamant et al., 2008, Delloye-Bourgeois et al., 2009). In dem oben erwähnten Lymphommodell scheint die Blockierung der Apoptose den Zellen eine erhöhte Stressresistenz zu vermitteln, welche somit einen Selektionsvorteil erhalten (Strasser et al., 1990). Darüberhinaus wird eine ungestörte Apoptosefunktion

als ein Schlüsselmechanismus des Körpers angesehen, mutierte Zellen zu zerstören (Hanahan und Weinberg, 2000). Im Falle von Netrin-1 scheint es erwiesen zu sein, dass dieser Faktor Zellen vor der Apoptose schützt. So weisen Netrin-1-Nullmäuse im Verlauf der embryonalen Hirnstammentwicklung in DCC exprimierenden Neuronen eine erhöhte Apoptoserate auf (Llambi et al., 2001).

Eine Aktivierung der Zellproliferation wird im Zusammenhang mit einer forcierten Netrin-1-Expression nicht beschrieben. Somit stellt sich die interessante Frage, ob eine gestörte Apoptosefunktion mit einer erhöhten Proliferationsrate gleichzusetzen ist? Bezüglich dem in dieser Arbeit untersuchten Paar Netrin-1/DCC gibt es bisher in der Literatur keinen Hinweis, dass über diesen Signalweg die Zellproliferation gefördert wird. Es gibt nur Anhaltspunkte, dass eine forcierte Expression von DCC in Zellkulturen den Zellzyklus in der G2/M-Phase induziert, und eine Aufregulierung von DCC mit einem bedeutenden Verlust der Proliferationsrate in Zelllinien in Zusammenhang gebracht wird (Chen et al., 1999, Velcich et al., 1999). Leider wurde in diesen Arbeiten die Rolle von Netrin-1 in der Zellproliferation nicht untersucht (Mehlen und Fearon, 2004). In einer neueren Arbeit wird jedoch für Netrin-1 über einen anderen Signalweg eine zellproliferationsfördernde Eigenschaft postuliert. Netrin-1 soll in diesem Fall über den UNC5B-Rezeptor in ischämisch geschädigten Nieren im Mausmodell die Tubuluszellproliferationsrate steigern (Wang et al., 2009b). Als erstes Beispiel in diesem Zusammenhang wird die Rolle des Überlebensfaktors IGF-2 (insulin-like growth factor 2) in transgenen Mäusen, die Pankreastumoren entwickeln, beschrieben. IGF-2-Nullmäuse entwickeln in diesem Modell gutartige Tumore mit hohen Apoptoseraten bei gleich bleibenden Proliferationsraten (Christofori et al., 1994). Apoptoseevasion und Proliferationsinduktion scheinen eher über unterschiedliche Mechanismen in der Genese von Tumoren einzugreifen, als dass eine kausale Verknüpfung nachzuweisen ist.

Mechanismen, die die Zelladhäsion und -migration regulieren, spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung normaler Gewebszellen, sondern sind auch relevant für das Überleben und die

Metastasierung von Tumorzellen (Cavallaro und Christofori, 2004, Strizzi et al., 2005). Insbesondere maligne astrozytäre Tumoren sind charakterisiert durch diffuse Invasion von ZNS-Gewebe. Dieser Prozess ist durch komplexe molekulare Abläufe charakterisiert. Zum Beispiel spielt die Veränderung der Adhäsion von Tumorzellen an extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle, ebenso wie die Sekretion von Proteasen und die Modifikation des Zytoskeletts (Lefranc et al., 2005). Netrin-1 wird zugeschrieben, über die Integrine $\alpha 6\beta 4$ und $\alpha 3\beta 1$ Einfluß auf die Zellmotilität zu nehmen (Yebra et al., 2003, Hebrok und Reichardt, 2004). Mit Hilfe des Rezeptors Neogenin beteiligt sich Netrin-1 auch an der Motilität von Brustdrüsenzellen unter Steuerung des Proteins Cripto-1 (Srinivasan et al., 2003, Strizzi et al., 2005). In diesem Falle erfolgt der Aufregulierung von Neogenin vermutlich jedoch im Rahmen einer negativen Rückkopplung (Strizzi et al., 2005). Erhöhte Netrin-1-Konzentrationen erwirken eine erniedrigte Neogenin-Expression. Die Wirkung von Netrin-1 im Rahmen der Zellmigration ist für Astrozyten wenig erforscht. Erfolgt die Aufregulierung des Abhängigkeitrezeptors DCC vielleicht im Rahmen einer positiven Rückkopplung im Gliagewebe? Die im Rahmen der molekularen Signalkaskaden beteiligten Signalwege, wie zum Beispiel PI3K, Akt, mTOR oder NF-kappaB, spielen eine Rolle bei der Resistenzbildung von Glioblastomzellen gegenüber der Apoptose (Lefranc et al., 2005), was die Wichtigkeit der Erforschung dieser Eigenschaften unterstreicht.

Netrin-1 wird auch eine immunmodulierende Wirkung zugeschrieben. Über den Rezeptor UNC5B soll es, ähnlich wie bei der axonalen Lenkung in der embryologischen Entwicklung des Gehirns, eine chemorepulsive Wirkung entfalten (Ly et al., 2005). UNC5B wird von Leukozyten exprimiert (Ly et al., 2005). Eine funktionierende Immunantwort ist essentiell zur Elimination von bösartigen oder infizierten Zellen, kann jedoch auch, im extremen Falle, negative Konsequenzen, z.B. eine Autoimmunerkrankung, nach sich ziehen (Ly et al., 2005). Daher muss eine Vielzahl von Leukozyten regulierenden Mechanismen bestehen. Die Zirkulation der Leukozyten in einer inaktivierten Form, eine funktionierende Endothelbarriere in Gefäßen sowie die elektrische Ladung des Endothels und der Leukozyten spielen eine wichtige Rolle (Ly et

al., 2005). Neben den bereits beschriebenen chemoattraktiven Molekülen, wie Interleukin-8 (Baggiolini, 2001), existieren vermutlich auch chemorepulsive Faktoren, die Leukozyten regulieren (Ly et al., 2005). Im Modell von Ly soll Netrin-1 seine Wirkung vor allem in Endothelzellen entfalten. In der Vergangenheit wurde interessanterweise auch dem neuronalen Lenkungsmolekül slit-2 nachgewiesen, die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten zu inhibieren (Wu et al., 2001, Chen et al., 2004). Astrozyten spielen eine Rolle bei der Homöostase der zerebralen Blutzirkulation und sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Harder et al., 2002, Gordon et al., 2007). Man könnte mutmaßen, dass mutierte Astrozyten in Gliomen „störende“ einwandernde Leukozyten über einen chemorepulsiven Mechanismus fernhalten.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Netrin-1 Immunreaktivität in Endothelzellen untersucht. Die signifikante Erhöhung Netrin-1 positiver Zellen in allen Tumorgraden unterstützt die Hypothese, dass dieser Faktor als proangiogenes Molekül agiert (Park et al., 2004). Am höchsten war der Mittelwert Netrin-1 immunreaktiver Endothelzellen im Glioblastom WHO-Grad IV, gefolgt vom pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I, anaplastischem Astrozytom WHO-Grad III und dem diffusen Astrozytom WHO-Grad II.

In der Literatur wird die Angiogenese als ein Schlüsselfaktor in der Progression von Gliomen beschrieben (Bello et al., 2004, Fischer et al., 2005). Der Grad der Neovaskularisierung korreliert direkt mit der biologischen Aggressivität, Malignität und Rezidivrate von Gliomen (Burger et al., 1985, Daumas-Duport et al., 1997, Fischer et al., 2005, Louis et al., 2007). Netrin-1 soll als vaskuläres Mitogen eine ähnlich potente Wirkung wie VEGF entfalten (Park et al., 2004). VEGF-Expression korreliert positiv mit dem Grad der Vaskularisierung und Malignität in Gliomen (Chaudhry et al., 2001). Analog könnte die erhöhte Netrin-1-Immunreaktivität in Gliomen, sowohl in Astrozyten, als auch in Endothelzellen, auf die proangiogene Eigenschaft von Netrin-1 zurückzuführen sein. Netrin-1 stimuliert die Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (Park et al., 2004, Bouvrée et al., 2008). Welcher Netrin-1-Rezeptor diese Rolle vermittelt, ist noch unklar

(Park et al., 2004, Bouvrée et al., 2008). Interessanterweise scheint das neuronale Lenkungsmolekül Netrin-1 hierbei als bimodaler Faktor zu agieren. Über den Rezeptor UNC5B vermittelt es eine repulsive Wirkung auf sich entwickelnde Blutgefäße (Bouvrée et al., 2008). Gefäß-Nervenstränge teilen sich oft denselben Trajektionspfad, und so ist ein gemeinsames Lenkungsmolekül nicht unwahrscheinlich (Mukouyama et al., 2002, Park et al., 2004). Inwieweit Netrin-1 mit anderen vaskulären Mitogenen wie VEGF interagiert, muss noch erforscht werden (Park et al., 2004).

Die im pilozytischen Astrozytom WHO-Grad I im Vergleich zum Normalhirn signifikant und zu den Astrozytomen WHO-Grad II und III tendenziell erhöhte Netrin-1 Immunreaktivität in den Gefäßzellen könnte mit der relativ hohen Gefäßzahl und dem Auftreten von Gefäßproliferaten erklärt werden. In der kraniellen Bildgebung ist dieser Tumor trotz seines niedrigen Malignitätsgrades durch Kontrastmittelaufnahme charakterisiert, was auf eine Blut-Hirn-Schrankenstörung hinweist (Fulham et al., 1993). Diese Schrankenstörung beruht auf einer veränderten Permeabilität der gebildeten Tumorgefäße (Del Maestro et al., 1990).

Die extrem erhöhte Netrin-1 Immunreaktivität in Astrozytomen könnte Netrin-1 als potentiellen Kandidaten möglicher gezielter Therapiekonzepte in den Blickpunkt rücken. Um ein derartiges Potential jedoch diskutieren zu können, müssen noch weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen ist der Endothelrezeptor, der die proangiogene Aktivität von Netrin-1 vermittelt noch unbekannt, zum anderen muss ein besseres Wissen über das Zusammenspiel von Netrin-1 mit den weiteren proangiogenen Molekülen wie VEGF oder PDGF ermittelt werden. Überdies muss die antiangiogene Rolle von Netrin-1 genauer untersucht werden. Ebenso herrscht noch Unklarheit über das Zusammenwirken von Netrin-1 und anderen neuronalen Lenkungsmolekülen.

4.4 DCC und Netrin-1 Immunreaktivität in der Infiltrationszone von Glioblastomen

Die Immunreaktivität von Netrin-1 ist im Tumorzentrum im Vergleich zur Infiltrationszone signifikant erhöht. Tendenziell zeigt auch DCC ein erhöhtes Vorkommen im Tumorzentrum, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Auswertung der Zelldichte ergab eine deutlich höhere Zellzahl im Tumorzentrum im Vergleich zur Peripherie.

Auf Grund der hohen Zellzahl im Tumorzentrum ist die Versorgung dieser Region mit Nährstoffen und Sauerstoff reduziert und die Bildung von Gefäßen für das weitere Glioblastomwachstum essentiell (Fischer et al., 2005). Interessanterweise wird durch die Hypoxie die Bildung des Transkriptionsfaktors HIF-1 angeregt, welcher die Expression von VEGF induziert. Folglich besteht eine Verbindung zwischen Hypoxie und Angiogenese (Semenza, 2003, Fischer et al., 2005). Netrin-1, ebenfalls als proangiogenes Molekül beschrieben (Park et al., 2004), könnte durch einen ähnlichen Mechanismus im Tumorzentrum aufreguliert werden. Gelingt es dem Tumor nicht, eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten, entstehen die charakteristischen Nekrosen (Louis et al., 2007).

Neben der Angiogenese spielt jedoch auch ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose eine Rolle (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Aufregulierung von Netrin-1 im Tumorzentrum könnte auch als Reaktion des Tumors auf den proapoptotischen Effekt von DCC erfolgen. Die Überexpression von Netrin-1 verleiht dem Tumor einen ähnlichen Vorteil wie eine Herunterregulierung des Abhängigkeitsrezeptors DCC – die Möglichkeit einer ungehinderten Proliferation und Metastasierung (Fitamant et al., 2008).

Die weitaus geringere Immunreaktivität von Netrin-1 und DCC in der Peripherie könnte beispielsweise für einen verbesserten Ernährungs- und Energiezustand der Tumorzellen außerhalb des zellreichen Tumorzentrums sprechen. Hier sind auch die für das Tumorzentrum typischen Nekrosen nicht aufzufinden. Netrin-1 zeigt sich in seiner Immunreaktivität in der Infiltrationszone tendenziell erhöht im Vergleich zum Normalhirn. Man könnte mutmaßen, dass die multimodalen

Eigenschaften von Netrin-1 in der „Kampfzone“ der Glioblastome zumindest einen supportiven Einfluss auf das Tumorstadium ausüben und Netrin-1 als Überlebensfaktor fungiert.

Invasiv wachsende Gliome weisen eine verminderte Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptoseresistenz in der Peripherie im Vergleich zum zellreichen Tumorzentrum auf (Lefranc et al., 2005). Eine Herunterregulierung von DCC sowie eine vergleichsweise leicht erhöhte Netrin-1 Immunreaktivität in der Peripherie ist mit diesen beiden Eigenschaften zu vereinbaren.

4.5 DCC und Netrin-1 Immunreaktivität in primären Glioblastomen und deren Rezidiven

Es ergibt sich keine statistische Signifikanz bei der Auswertung der beiden Moleküle hinsichtlich ihrer Immunreaktivität in den Rezidivtumoren im Vergleich zu den Primärtumoren.

Das biologische Verhalten der Tumoren kann sich durch die Durchführung der Radiochemotherapie verändern. Rezidivtumoren können ein verändertes Expressionsmuster aufweisen und resistent gegenüber zytotoxischen Agenzien auftreten (Brandes, 2003). Wie bereits erwähnt, ist die Zelldichte in Rezidivtumoren erniedrigt. Histologisch lässt sich zum Teil eine Riesenzellbildung nachweisen (Ogashiwa et al., 1989).

Eine Veränderung der Immunreaktivität kann jedoch auch Hinweise auf das Ansprechen einer Therapie ermöglichen und das Verständnis der molekularen Eigenschaften dieser Tumoren verbessern, weshalb die histopathologische Suche nach therapeutischen Biomarkern auf jeden Fall sehr sinnvoll erscheint (Fischer et al., 2008).

In der statistischen Analyse lässt sich weder eine Auf-, noch eine Herunterregulierung des Pärchens DCC und Netrin-1 feststellen, was gegen einen Funktionsverlust der beiden Proteine im Rahmen einer Resistenzbildung unter Radiochemotherapie spricht.

4.6 Überlebensanalysen

Die Analysen der Immunreaktivität im Zusammenhang mit dem postoperativen Überleben wurden für die Astrozytome WHO-Grad II, III und IV durchgeführt. Das pilozytische Astrozytom WHO-Grad I fand keine Berücksichtigung, da im Beobachtungszeitraum lediglich ein Patient verstarb. Eine Tatsache, die bei einer 10-Jahres-Überlebensrate von 96% (Ohgaki und Kleihues, 2005a) bei diesen Tumoren nicht überrascht.

Für die Proteine Netrin-1 und DCC ergab sich keine signifikante Assoziation mit dem Überleben.

Den bedeutendsten etablierten prognostischen Faktor stellt der WHO-Grad des Tumors zum Zeitpunkt der Erstdiagnose dar (Ohgaki und Kleihues, 2005b, Kallio et al., 1991). Zusätzlichen Einfluss auf die Prognose des Patienten haben das Alter, der präoperative Karnofsky-Performance-Status und die Art der Behandlung (Bussi re et al., 2005).

Während der Apoptoseindex in Astrozytomen nicht mit dem Überleben der Patienten korreliert (Schiffer et al., 1995, Heesters et al., 1999), wird der mit dem Marker MIB-1 ermittelten Proliferationsrate eine die Prognose beeinflussende Qualität zugeschrieben (Ralte et al., 2001, Neder et al., 2004).

Der Grad der Neovaskularisierung korreliert in den Astrozytomen aller WHO-Grade invers mit dem postoperativen Überleben der Patienten (Burger et al., 1985, Fischer et al., 2005, Louis et al., 2007).

Auf Grund dieser Erkenntnisse werden auch verschiedene Therapieoptionen herangezogen. Proapoptotische, antiproliferative und gezielt antiangiogene Pharmazeutika sind im klinischen Einsatz (Vredenburgh et al., 2007, Omuro und Delattre, 2008). Bisher wird jedoch noch auf den großen Durchbruch gewartet, was die Bedeutsamkeit weiterer Grundlagenforschung unterstreicht.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Wichtige Schlussfolgerungen, die sich aus dieser Arbeit ergeben, sind:

- 1.) Der in der Literatur beschriebene Abfall von DCC in Astrozytomen konnte auf Proteinebene immunhistochemisch nicht nachvollzogen werden. Vielmehr konnte ein Anstieg dieses Faktors mit dem WHO-Tumorgrad festgestellt werden. Dies könnte auf ein Gegenregulationsphänomen dieser Tumoren zurückzuführen sein, vermehrt proapoptische Moleküle zu bilden. Ein weiteres Erklärungsmodell lässt vermuten, dass DCC in diesen hochmalignen Tumoren Einfluss auf die Tumorinvasion und Migration nimmt.
- 2.) Diese erste Immunreaktivitätsstudie für Netrin-1 in Astrozytomen ergab eine deutliche Aufregulierung mit steigendem Malignitätsgrad, passend zu den multimodalen, potentiell tumorprogressiven Eigenschaften dieses Faktors.
- 3.) Netrin-1 zeigt sich im Tumorzentrum deutlich aufreguliert im Vergleich zur Infiltrationszone. Dies könnte auf einen proangiogenen Gegenregulationsmechanismus dieses Faktors zurückzuführen sein, dieses hypoxische Areal besser mit Sauerstoff und Nährstoffen (insbesondere Glukose) zu versorgen.
- 4.) Die Gefäßendothelzellen zeigten ebenfalls eine signifikante Netrin-1 Immunreaktivität, was die Hypothese einer proangiogenen Rolle dieses Faktors untermauert.
- 5.) In den Normalhirnproben zeigte sich für DCC eine leicht signifikant erhöhte Immunreaktivität in der Weissen Substanz im Vergleich zur Grauen Substanz, was eine physiologische Rolle dieses Faktors bei der Organisation und Modulation von axoglialen Kontakten vermuten lässt.
- 6.) Die Analyse der Immunreaktivität der beiden Faktoren in Rezidivtumoren ergab keinen Hinweis auf eine Beteiligung der beiden Proteine an einer möglichen Resistenzbildung der Gliomzellen.
- 7.) Die beiden Faktoren zeigten keine signifikante Assoziation mit dem Überleben der Patienten.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen und Anregungen für zukünftige Untersuchungen:

- 1.) Auf Grund dieser Vorarbeit erscheint die Erstellung eines Expressionsprofils (auf RNA- und Proteinebene) – beispielsweise via Western-Blot und Polymerase-Kettenreaktion - von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und den UNC-5 Homologen in Astrozytom- und Kontrollgeweben sinnvoll, um ihr Expressionsniveau besser beurteilen zu können.
- 2.) Netrin-1 und seine Rezeptoren sollten zur Evaluation ihrer funktionellen Rolle in Astrozytomen beispielsweise via der Methode der si-RNA-Inhibierung untersucht werden. Dies könnte Hinweise auf ihre Funktion in der Apoptose, Migration und Invasion, Immunevasion und Angiogenese liefern.
- 3.) Im Rahmen von Zwei-Kammer Techniken, zum Beispiel mit der Boyden Kammer, welche die Rolle von Netrin-1 bei der Migration und Invasion von Astrozytomzellen aufklären könnte.
- 4.) Die deutliche Hochregulierung beider Faktoren mit dem WHO-Tumorgrad wirft die Frage auf, ob gemeinsame Regulationsmechanismen vorhanden sind, oder ob es sich um einen Gegenregulationsmechanismus handelt.
- 5.) Welche Rolle spielt Netrin-1 in der Angiogenese? Ist es ein ebenso potentes Ziel antiangiogener Therapie wie der VEGF vermittelte Signalweg? Welcher Rezeptor vermittelt die proangiogene Rolle von Netrin-1?

5. Zusammenfassung

Astrozytome stellen die größte Gruppe hirneigener Tumoren dar. Trotz Maximaltherapie mit Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie sind diffus infiltrierende Astrozytome bisher nicht heilbar, im Fall des Glioblastoms liegt das mediane Überleben bei unter einem Jahr.

Knapp 100 Gene sind in malignen Tumoren verändert. Diese haben unter anderem Einfluß auf Zellwachstum, zellulärer Migration und Invasion, Sezernierung immunsuppressiver Faktoren und die Induktion der tumoreigenen Angiogenese.

Neben pleiotropen Faktoren wie beispielsweise TGF- β sind embryonale Faktoren – zum Beispiel die Familie der Ephrinrezeptoren und -liganden – Gegenstand der Gliomforschung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das axonale Lenkungsmolekül Netrin-1 sowie dessen Rezeptor DCC in humanen Astrozytomen zu untersuchen. Initial wurden die beiden Moleküle als wichtigstes, auf Axone attraktiv wirkendes Interaktionspaar beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass Netrin-1 neben der axonalen Lenkung auch multimodale Funktionen ausüben kann, welche allesamt positiv auf die Tumorprogression wirken könnten. Für DCC wird eine Herunterregulierung in Astrozytomen an Hand genetischer Studien postuliert. Jedoch gibt es bislang keine Untersuchung, die die Expression von Ligand und Rezeptor in denselben Proben umfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Netrin-1 und DCC Immunreaktivität an 194 Astrozytomen und 23 Normalhirnkontrollen immunhistochemisch mit der tissue microarray (TMA)-Methode studiert. Überdies wurde die Assoziation der Netrin-1 und DCC Immunreaktivität mit dem Überleben der Patienten analysiert, um so eine mögliche Bedeutung der Faktoren in Hinblick auf die klinische Prognose herauszufinden.

Für DCC ergab sich eine signifikante Aufregulierung in höhergradigen Astrozytomen im Vergleich zu niedriggradigen. Dies könnte auf ein reaktives Gegenregulationsphänomen dieser Tumoren hindeuten, vermehrt proapoptische Moleküle zu bilden. Da diese hochmalignen Tumore invasives

Wachstum zeigen, unterstützt das Ergebnis die Hypothese, dass DCC durch Migrationsförderung Einfluss auf die Tumorinvasion nimmt.

In der Weissen Substanz des Normalhirns zeigte sich eine signifikant erhöhte DCC Immunreaktivität im Vergleich zur Grauen Substanz, welche eine physiologische Rolle des Abhängigkeitsrezeptors DCC bei der Organisation und Modulation von axoglialen Kontakten vermuten lassen könnte.

Für Netrin-1 wurde eine Immunreaktivität ermittelt, die signifikant mit der Tumormalignität ansteigt. Dieses Ergebnis passt gut in das Bild des mehrfach als pleiotropes Protein beschriebenen Faktors und lässt Netrin-1 als potenten Progressionsmarker erscheinen.

In den Normalhirnproben konnte kein signifikanter Unterschied in der Netrin-1 Immunreaktivität zwischen Grauer und Weisser Substanz festgestellt werden. Netrin-1 zeigte sich signifikant erhöht in den Tumorzentren im Vergleich zu den Infiltrationszonen der Glioblastome WHO-Grad IV. Dieser Befund könnte möglicherweise Ausdruck einer durch die aufgrund der erhöhten Zelldichte und nutritive Minderversorgung im Zentrum herrschende Hypoxie induzierte, Netrin-1 vermittelte Angiogenese sein. Insbesondere die Aufregulierung von Netrin-1 in den Endothelzellen der gefäßreichen pilozytischen Astrozytomen WHO-Grad I und Glioblastomen WHO-Grad IV unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass es sich bei Netrin-1 um ein vaskuläres Mitogen handelt.

Die statistische Analyse der Rezidivtumoren im Vergleich zu ihren Primärtumoren ergab keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität. Damit ergibt sich kein Hinweis, dass die untersuchten Faktoren auf Proteinebene an der Entwicklung möglicher Resistenzen durch die Radiochemotherapie involviert sein könnten.

In den Analysen der postoperativen Überlebenszeit der Astrozytompatienten lässt sich keine statistisch signifikante Assoziation der Immunreaktivität auf die Prognose feststellen.

Zusammenfassend besteht – zumindest teilweise – eine gesteigerte Expression beider Faktoren mit der Zunahme der Malignität. Damit wird neben den genetischen Untersuchungen die Bedeutung der immunhistochemischen Untersuchungen an humanen Tumor- und Normalgewebe unterstrichen.

6. Literaturverzeichnis

1. Acker T, Diez-Juan A, Aragones J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, Fukumura D, Moreno-Murciano MP, Herbert JM, Burger A, Riedel J, Elvert G, Flamme I, Maxwell PH, Collen D, Dewerchin M, Jain RK, Plate KH, Carmeliet P. 2005. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell*. 8:131-41.
2. Althaus J, Bernaudin M, Petit E, Toutain J, Touzani O, Rami A. 2006. Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int*. 48:687-95.
3. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:7915-22.
4. Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*. 124:3501-10.
5. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 50:197-263.
6. Arakawa H. 2004. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 4:978-87.
7. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*. 63:795-813.
8. Argyriou AA, Kalofonos HP. 2009. Molecularly targeted therapies for malignant gliomas. *Mol Med*. 15:115-22.
9. Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, Weimar JD, Bordelon D, Robertson JH, Pourmotabbed T. 2004. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol*. 70:3-15.
10. Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*. 124:3501-10.
11. Baggiolini M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 250:91-104.
12. Bányai L, Patthy L. 1999. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci*. 8:1636-42.
13. Barnard RO, Geddes JF. 1987. The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer*. 60:1519-31.

14. Bello L, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Costa F, Bikfalvi A. 2004. Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res.* 117:263-84.
15. Birse-Archbold JL, Kerr LE, Jones PA, McCulloch J, Sharkey J. 2005. Differential profile of Nix upregulation and translocation during hypoxia/ischaemia in vivo versus in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25:1356-65.
16. Blowers L, Preston-Martin S, Mack WJ. 1997. Dietary and other lifestyle factors of women with brain gliomas in Los Angeles County (California, USA) *Cancer Causes Control.* 8:5-12.
17. Bouvrée K, Larrivée B, Lv X, Yuan L, DeLafarge B, Freitas C, Mathivet T, Bréant C, Tessier-Lavigne M, Bikfalvi A, Eichmann A, Pardanaud L. 2008. Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. *Dev Biol.* 318:172-83.
18. Brada M, Ford D, Ashley S, Bliss JM, Crowley S, Mason M, Rajan B, Traish D. 1992. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ.* 304:1343-6.
19. Brandes AA. 2003. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol.* 30:4-9.
20. Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hwang Y, Hicks D, Chen J. 2006. Ephrin-A1 facilitates mammary tumor metastasis through an angiogenesis-dependent mechanism mediated by EphA receptor and vascular endothelial growth factor in mice. *Cancer Res.* 66:10315-24.
21. Bredesen DE. Genetic control of neural cell apoptosis. 1996. *Perspect Dev Neurobiol.* 3:101-9.
22. Bredesen DE, Ye X, Tasinato A, Sperandio S, Wang JJ, Assa-Munt N, Rabizadeh S. 1998. p75^{NTR} and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death Differ.* 5:365-71.
23. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. 2004. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev.* 84:411-30.
24. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. 2005. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ.* 12:1031-43.
25. Briançon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piché C, Enslin H, Chebli K, Cloutier JF, Castellani V, Debant A, Lamarche-Vane N. 2008. Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol.* 28:2314-23.
26. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. 2009. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 2009. Publikation in Vorbereitung.
27. Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J, Seoane J. 2007. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell.* 11:147-60.

28. Bryan TM, Cech TR. 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol.* 11:318-24.
29. 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.* 78:601-9.
30. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. 1985. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* 56:1106-11.
31. 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.
32. Bussi re 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.* 32:50-6.
33. Butel JS, Lednicky JA. 1999. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst.* 91:119-34.
34. Cameron RS, Ruffin JW, Cho NK, Cameron PL, Rakic P. 1997. Developmental expression, pattern of distribution, and effect on cell aggregation implicate a neuron-glia junctional domain protein in neuronal migration. *J Comp Neurol.* 387:467-88.
35. Campbell DS, Holt CE. 2003. Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron.* 37:939-52.
36. Carbone M, Rizzo P, Pass HI. 1997. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. *Oncogene.* 15:1877-88.
37. Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, Kinch MS. 2002. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res.* 62:2840-7.
38. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380:435-9.
39. Carroll RS, Zhang J, Chauncey BW, Chantziara K, Frosch MP, Black PM. 1997. Apoptosis in astrocytic neoplasms. *Acta Neurochir (Wien).* 139:845-50.
40. Cavallaro U, Christofori G. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 1014:58-66.
41. CBTRUS. 2005. Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1998-2002. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States.
42. Chamak B, Fellous A, Glowinski J, Prochiantz A. 1987. MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated

- through region-specific neuro-astroglial interactions. *J Neurosci.* 7:3163-70.
43. Chambers AF, Matrisian LM. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 89:1260-70.
 44. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS. 2001. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology.* 39:409-15.
 45. Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ, Yang D. 2004. Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Dm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol.* 173:5914-7.
 46. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong RC, Cipriano SC, Krepulat F. 1999. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene.* 18:2747-54.
 47. Cho KR, Fearon ER. 1995. DCC: linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Eur J Cancer.* 31A:1055-60.
 48. Christensen HC, Schüz J, Kosteljanetz M, Poulsen HS, Boice JD Jr, McLaughlin JK, Johansen C. 2005. Cellular telephones and risk for brain tumors: a population-based, incident case-control study. *Neurology.* 64:1189-95.
 49. Christofori G, Naik P, Hanahan D. 1994. A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis. *Nature.* 369:414-8.
 50. Christofori G, Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 24:73-6.
 51. Chuong CM, Jiang TX, Yin E, Widelitz RB. 1994. cDCC (chicken homologue to a gene deleted in colorectal carcinoma) is an epithelial adhesion molecule expressed in the basal cells and involved in epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Biol.* 164:383-97.
 52. Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyse E, Chédotal A, Mehlen P. 2000. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature.* 407:747-50.
 53. Coté TR, Manns A, Hardy CR, Yellin FJ, Hartge P. 1996. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 88:675-9.
 54. Dumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M, Chodkiewicz JP. 1997. Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol.* 34:61-78.

55. Davis FG, McCarthy B, Jukich P. 1999. The descriptive epidemiology of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am.* 9:581-94.
56. Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin MA, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P. 2009. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med.* 206:833-47.
57. Del Maestro RF, Megyesi JF, Farrell CL. 1990. Mechanisms of tumor-associated edema: a review. *Can J Neurol Sci.* 17:177-83.
58. del Rio G, Kane DJ, Ball KD, Bredesen DE. 2007. A novel motif identified in dependence receptors. *PLoS ONE.* 2:e463.
59. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-29.
60. Dijkstra S, Bär PR, Gispen WH, Joosten EA. 1999. Selective stimulation of dendrite outgrowth from identified corticospinal neurons by homotopic astrocytes. *Neuroscience.* 92:1331-42.
61. Dvorak HF. 2005. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* 3:1835-42.
62. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.
63. Ebben JD, Rocque BG, Kuo JS. 2009. Tumour vaccine approaches for CNS malignancies: progress to date. *Drugs.* 69:241-9.
64. Ekstrand BC, Mansfield TA, Bigner SH, Fearon ER. 1995. DCC expression is altered by multiple mechanisms in brain tumours. *Oncogene.* 11:2393-402.
65. 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.
66. Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420:629-35.
67. Facchetti A, Nano R, Zelini P, Morbini P, Benericetti E, Ceroni M, Campoli M, Ferrone S. 2005. Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. *Clin Cancer Res.* 11:8304-11.
68. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature.* 386:796-804.
69. Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-67.
70. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 7:21-33.
71. Ferguson AR, Nichols LA, Zarling AL, Thompson ED, Brinkman CC, Hargadon KM, Bullock TN, Engelhard VH. 2008. Strategies

- and challenges in eliciting immunity to melanoma. *Immunol Rev.* 222:28-42.
72. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11025-30.
73. Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science.* 298:556-62.
74. Finn OJ. 2006. Human tumor antigens, immunosurveillance, and cancer vaccines. *Immunol Res.* 36:73-82.
75. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. 2005. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol.* 15:297-310.
76. Fischer I, Cunliffe CH, Bollo RJ, Raza S, Monoky D, Chiriboga L, Parker EC, Golfinos JG, Kelly PJ, Knopp EA, Gruber ML, Zagzag D, Narayana A. 2008. High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro Oncol.* 10:700-8.
77. Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P. 2008. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:4850-5.
78. Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli S, Plebani M. 1997. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res.* 17:1227-30.
79. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P. 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3416-21.
80. Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P. 2002. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature.* 417:443-7.
81. Fulham MJ, Melisi JW, Nishimiya J, Dwyer AJ, Di Chiro G. 1993. Neuroimaging of juvenile pilocytic astrocytomas: an enigma. *Radiology.* 189:221-5.
82. Furne C, Corset V, Hérincs Z, Cahuzac N, Hueber AO, Mehlen P. 2006. The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4128-33.
83. Garmy-Susini B, Varner JA. 2008. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol.* 6:155-63.
84. Gerson SL. 2002. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 20:2388-99.
85. Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* 55:1214-21.
86. Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, Tessier-Lavigne M, Crabtree GR. 2003. Neurotrophins and netrins require

- calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*.113:657-70.
87. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281:1309-12.
 88. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305:626-9.
 89. Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, Levings MK, Roncarolo MG. 2007. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol*. 380:83-105.
 90. Guillamo JS, de Boüard S, Valable S, Marteau L, Leuraud P, Marie Y, Poupon MF, Parienti JJ, Raymond E, Peschanski M. 2009. Molecular Mechanisms Underlying Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition on Invasion, Proliferation, and Angiogenesis in Experimental Glioma. *Clin Cancer Res*.
 91. Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, DeArmas R, Bourtoux S, El Demery M, Moreau JJ, Labrousse F. 2009. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 17:220-6
 92. Gurezka R, Laage R, Brosig B, Langosch D. 1999. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem*. 274:9265-70
 93. Gurney JG, Preston-Martin S, McDaniel AM, Mueller BA, Holly EA. 1996. Head injury as a risk factor for brain tumors in children: results from a multicenter case-control study. *Epidemiology*. 7:485-9.
 94. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
 95. Hara A, Saegusa M, Mikami T, Okayasu I. 2001. Loss of DCC expression in astrocytomas: relation to p53 abnormalities, cell kinetics, and survival. *J Clin Pathol*. 54:860-5.
 96. Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH, Morgan LL. 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med*. 64:626-32.
 97. Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci*. 17:27-31.
 98. Hatton GI. 2002. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv Physiol Educ*. 26:225-37.
 99. Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 62:1180-90.
 100. Hebrok M, Reichardt LF. 2004. Brain meets pancreas: netrin, an axon guidance molecule, controls epithelial cell migration. *Trends Cell Biol*. 14:153-5.

101. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. 1994. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev.* 8:1174-83.
102. 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.
103. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 26:4189-99.
104. 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.* 332:883-7.
105. Hérincs Z, Corset V, Cahuzac N, Furne C, Castellani V, Hueber AO, Mehlen P. 2005. DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *J Cell Sci.* 118:1687-92.
106. Hilton DA, Penney M, Evans B, Sanders H, Love S. 2002. Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. *Am J Surg Pathol.* 26:472-8.
107. Hirano A, Matsui T. 1975. Electron microscopic observation of ependyma (author's transl). *No Shinkei Geka.* 3:237-44.
108. Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell.* 97:927-41.
109. Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier-Lavigne M, Poo M. 2000. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature.* 403:93-8.
110. Hoyt WF, Baghdassarian SA. 1969. Optic glioma of childhood. Natural history and rationale for conservative management. *Br J Ophthalmol.* 53:793-8.
111. Huang H, Reis R, Yonekawa Y, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen. *Brain Pathol.* 9:33-42.
112. Hueber AO, Zörnig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science.* 278:1305-9.
113. Hug N, Lingner J. 2006. Telomere length homeostasis. *Chromosoma.* 115:413-25.
114. Hsu SM, 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.* 29:577-80.

115. Ilgren EB, Stiller CA. 1987. Cerebellar astrocytomas. Part I. Macroscopic and microscopic features. *Clin Neuropathol.* 6:185-200.
116. Jarjour AA, Bull SJ, Almasieh M, Rajasekharan S, Baker KA, Mui J, Antel JP, Di Polo A, Kennedy TE. 2008. Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1. *J Neurosci.* 28:11003-14.
117. 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.* 66:373-85.
118. Jin H, Varner J. 2004. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer.* 90:561-5.
119. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 355:1253-61.
120. Kallio M, Sankila R, Jääskeläinen 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.
121. 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).* 87:47-54.
122. Kargiotis O, Chetty C, Gondi CS, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Lakka SS, Kyritsis AP, Rao JS. 2008. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene.* 27:4830-40.
123. Karipidis KK, Benke G, Sim MR, Yost M, Giles G. 2007. Occupational exposure to low frequency magnetic fields and the risk of low grade and high grade glioma. *Cancer Causes Control.* 18:305-13.
124. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell.* 87:175-85.
125. Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell.* 78:425-35.
126. Khan MK, Hunter GK, Vogelbaum M, Suh JH, Chao ST. 2009. Evidence-based adjuvant therapy for gliomas: current concepts and newer developments. *Indian J Cancer.* 46:96-107.
127. Kikawa KD, Vidale DR, Van Etten RL, Kinch MS. 2002. Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation. *J Biol Chem.* 277:39274-9.
128. Klæboe L, Blaasaas KG, Haldorsen T, Tynes T. 2005. Residential and occupational exposure to 50-Hz magnetic fields

- and brain tumours in Norway: a population-based study. *Int J Cancer*. 115:137-41.
129. Klaeboe L, Blaasaas KG, Tynes T. 2007. Use of mobile phones in Norway and risk of intracranial tumours. *Eur J Cancer Prev*. 16:158-64.
130. Kleihues P, Cavenee WK. Editors. 2000. World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. IARC Press, Lyon, France, 1:9-54.
131. Kleinerman RA, Linet MS, Hatch EE, Tarone RE, Black PM, Selker RG, Shapiro WR, Fine HA, Inskip PD. 2005. Self-reported electrical appliance use and risk of adult brain tumors. *Am J Epidemiol*. 161:136-46.
132. Klingelhutz AJ, Smith PP, Garrett LR, McDougall JK. 1993. Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene*. 8:95-9.
133. Kondo T. 2006. Brain cancer stem-like cells. *Eur J Cancer*. 42:1237-42.
134. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 4:844-7.
135. 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.
136. Korsmeyer SJ. 1992. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol*. 10:785-807.
137. Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 19:312-8.
138. Krouwer HG, Davis RL, Silver P, Prados M. 1991. Gemistocytic astrocytomas: a reappraisal. *J Neurosurg*. 74:399-406.
139. Kruger RP, Lee J, Li W, Guan KL. 2004. Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. *J Neurosci*. 24:10826-34.
140. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. 2001. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 8:83-96.
141. Lamszus K, Kunkel P, Westphal M. 2003. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl*. 88:169-77.
142. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. 2005. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 23:2411-22.

143. Lefranc F. 2009. Editorial: on the road to multi-modal and pluridisciplinary treatment of glioblastomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 151:109-12.
144. Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP. 1984. von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. *Ophthalmology*. 91:929-35.
145. Li JJ, Liu DP, Liu GT, Xie D. 2009. EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 28:1759-68.
146. 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*. 91:479-89.
147. Li W, Lee J, Vikis HG, Lee SH, Liu G, Aurandt J, Shen TL, Fearon ER, Guan JL, Han M, Rao Y, Hong K, Guan KL. 2004. Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci*. 7:1213-21.
148. Li X, Saint-Cyr-Proulx E, Aktories K, Lamarche-Vane N. 2002. Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 277:15207-14.
149. Li Z, Wang H, Eyler CE, Rich JN. 2009. Turning cancer stem cells inside-out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *J Biol Chem*. Publikation in Vorbereitung.
150. Little MP, de Vathaire F, Shamsaldin A, Oberlin O, Campbell S, Grimaud E, Chavaudra J, Haylock RG, Muirhead CR. 1998. Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy. *Int J Cancer*. 78:269-75.
151. Liu DP, Wang Y, Koeffler HP, Xie D. 2007. Ephrin-A1 is a negative regulator in glioma through down-regulation of EphA2 and FAK. *Int J Oncol*. 30:865-71.
152. Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn A, Finley RL Jr, Chen YQ. 2002. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem*. 277:26281-5.
153. 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*. 271:13371-6.
154. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. 2001. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J*. 20:2715-22.
155. Lopes MBS, Wiestler OD, Stemmer-Rachamimov AO, Sharma MC. 2007 in: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Seiten 218-221. IARC Press, Lyon, Frankreich.

156. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. Herausgeber. 2007. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Seiten 10-47. IARC Press, Lyon, Frankreich.
157. Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prodhon P, Moore KJ, Kinane TB. 2005. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:14729-34.
158. 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.* 100:61-7.
159. Malmer B, Iselius L, Holmberg E, Collins A, Henriksson R, Grönberg H. 2001. Genetic epidemiology of glioma. *Br J Cancer.* 84:429-34.
160. Martín M, Simon-Assmann P, Kedinger M, Martin M, Mangeat P, Real FX, Fabre M. 2006. DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *Eur J Cell Biol.* 85:769-83.
161. Martini F, Iaccheri L, Lazzarin L, Carinci P, Corallini A, Gerosa M, Iuzzolino P, Barbanti-Brodano G, Tognon M. 1996. SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res.* 56:4820-5.
162. Massagué J, Gomis RR. 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580:2811-20.
163. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P. 2004. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 431:80-4.
164. McGirr SJ, Kelly PJ, Scheithauer BW. 1987. Stereotactic resection of juvenile pilocytic astrocytomas of the thalamus and basal ganglia. *Neurosurgery,* 20:447-52.
165. McLendon RE, Robinson JS Jr, Chambers DB, Grufferman S, Burger PC. 1985. The glioblastoma multiforme in Georgia, 1977-1981. *Cancer.* 56:894-7.
166. Medema RH, Bos JL. 1993. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog.* 4:615-61.
167. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. 1998. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 395:801-4.
168. Mehlen P, Fearon ER. 2004. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 22:3420-8.
169. Mehlen P, Furne C. 2005. Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* 62:2599-616.
170. Mehling M, Simon P, Mittelbronn M, Meyermann R, Ferrone S, Weller M, Wiendl H. 2007. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery

- components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? *Acta Neuropathol.* 114:111-9.
171. Mille F, Llambi F, Guix C, Delloye-Bourgeois C, Guenebeaud C, Castro-Obregon S, Bredesen DE, Thibert C, Mehlen P. 2009. Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ.* Publikation in Vorbereitung.
172. Miletic H, Niclou SP, Johansson M, Bjerkvig R. 2009. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin Ther Targets.* 13:455-68.
173. Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996. Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron.* 17:203-15.
174. Mukoyama YS, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ. 2002. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* 109:693-705.
175. Murphree AL, Benedict WF. 1984. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science.* 223:1028-33.
176. Muscat JE, Hinsvark M, Malkin M. 2006. Mobile telephones and rates of brain cancer. *Neuroepidemiology.* 27:55-6.
177. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-65.
178. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. 2007. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2:251-75.
179. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. 2008. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis.* 11:109-19.
180. 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.
181. Nakamura M, Konishi N, Tsunoda S, Hiasa Y, Tsuzuki T, Inui T, Sakaki T. 1997. Retinoblastoma protein expression and MIB-1 correlate with survival of patients with malignant astrocytoma. *Cancer.* 80:242-9.
182. Narod SA, Stiller C, Lenoir GM. 1991. An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *Br J Cancer.* 63:993-9.
183. Neder L, Colli BO, Machado HR, Carlotti CG Jr, Santos AC, Chimelli L. 2004. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. *Neuropathol.* 23:262-70.
184. Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruyman FB, Sather HN, Hammond GD. 1991. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med.* 325:1330-6.
185. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. 2008. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol.* 7:1152-60.

186. 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.
187. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Höll 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.
188. Ohgaki H, Huang H, Haltia M, Vainio H, Kleihues P. 2000. More about: cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst*. 92:495-7.
189. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 64:6892-9.
190. Ohgaki H, Kleihues P. 2005a. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 64:479-89
191. Ohgaki H, Kleihues P. 2005b. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 109:93-108.
192. Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 170:1445-53.
193. Ohgaki H, Olivier M, Hainaut P. 2007 in: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Seiten 222-225. IARC Press, Lyon, Frankreich.
194. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schüler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lütolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. 2004. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 108:49-56.
195. Olano JP, Wolf D, Keherly M, Gelman BB. 1996. Quantifying apoptosis in banked human brains using flow cytometry. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55:1164-72.
196. Omuro AM, Delattre JY. 2008. What is the place of bevacizumab and irinotecan in the treatment of glioblastoma and other malignant gliomas? *Curr Opin Neurol*. 21:717-9.
197. Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY. 2004. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:16210-5.
198. Patel R, Shervington A. 2009. Telomerase and DNA repair in glioma. *Biochim Biophys Acta*. 1792:275-9.
199. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. 1995. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 51:167-223.

200. Peng Y, Gorelik L, Laouar Y, Li MO, Flavell RA. 2006. TGFbeta-mediated immunoregulation. Ernst Schering Res Found Workshop. 56:155-60.
201. Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, García-Dorado D, Poca MA, Sahuquillo J, Baselga J, Seoane J. 2009. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell*. 15:315-27.
202. 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*. 95:14308-13.
203. Poulsen HS, Grunnet K, Sorensen M, Olsen P, Hasselbalch B, Nelausen K, Kosteljanetz M, Lassen U. 2009. Bevacizumab plus irinotecan in the treatment patients with progressive recurrent malignant brain tumours. *Acta Oncol*. 48:52-8.
204. Preston-Martin S, Mack W, Henderson BE. 1989. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res*. 49:6137-43.
205. Preston-Martin S, Pogoda JM, Schlehofer B, Blettner M, Howe GR, Ryan P, Menegoz F, Giles GG, Rodvall Y, Choi NW, Little J, Arslan A. 1998. An international case-control study of adult glioma and meningioma: the role of head trauma. *Int J Epidemiol*. 27:579-86.
206. Quinn JA, Pluda J, Dolan ME, Delaney S, Kaplan R, Rich JN, Friedman AH, Reardon DA, Sampson JH, Colvin OM, Haglund MM, Pegg AE, Moschel RC, McLendon RE, Provenzale JM, Gururangan S, Tourt-Uhlig S, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Friedman HS. 2002. Phase II trial of carmustine plus O(6)-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*. 20:2277-83.
207. Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, Gururangan S, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Walker A, Friedman HS. 2009. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol*. 27:1262-7.
208. Rabinowich H, Reichert TE, Kashii Y, Gastman BR, Bell MC, Whiteside TL. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest*. 101:2579-88.
209. Rajasekharan S, Baker KA, Horn KE, Jarjour AA, Antel JP, Kennedy TE. 2009. Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. *Development*. 136:415-26.
210. 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.
211. 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.* 69:197-206.
212. Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G, Yahanda A, Fearon ER, Kleihues P, Reale MA. 1997. Loss of DCC expression and glioma progression. *Cancer Res.* 57:382-6.
213. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. 1996. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 56:5754-7
214. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR. 1999. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649.
215. Ron E, Modan B, Boice JD Jr, Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L. 1988. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med.* 319:1033-9.
216. Salvesen GS, Duckett CS. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:401-10.
217. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 353:811-22.
218. Sathornsumetee S, Rich JN. 2009. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci.* 1142:108-32.
219. Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chiò A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A. 1995. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett.* 195:81-4.
220. Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, Ahlbom A, Choi WN, Giles GG, Howe GR, Little J, Ménégos F, Ryan P. 1999. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer.* 82:155-60.
221. Schlingensiepen KH, Fischer-Blass B, Schmaus S, Ludwig S. 2008. Antisense therapeutics for tumor treatment: the TGF-beta2 inhibitor AP 12009 in clinical development against malignant tumors. *Recent Results Cancer Res.* 177:137-50.
222. Schüz J, Böhler E, Berg G, Schlehofer B, Hettlinger I, Schläefer K, Wahrendorf J, Kunna-Grass K, Blettner M. 2006. Cellular phones, cordless phones, and the risks of glioma and meningioma (Interphone Study Group, Germany). *Am J Epidemiol.* 163:512-20.
223. Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3:721-32.

224. Serafini P, Borrello I, Bronte V. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol.* 16:53-65.
225. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell.* 78:409-24.
226. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell.* 87:1001-14.
227. Shay JW, Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 33:787-91.
228. Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, Kennedy TE. 2005. Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci.* 25:3132-41.
229. Shore RE, Albert RE, Pasternack BS. 1976. Follow-up study of patients treated by X-ray epilation for *Tinea capitis*; resurvey of post-treatment illness and mortality experience. *Arch Environ Health.* 31:21-8.
230. 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.* 59:765-70.
231. 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.* 13:539-53.
232. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61:6669-73.
233. Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet.* 347:1377-81.
234. Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. 2003. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell.* 4:371-82.
235. 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.* 273:10107-11.
236. Ständer M, Peraud A, Leroch B, Kreth FW. 2004. Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. *Cancer.* 101:1028-35.

237. Stappenbeck TS, Gordon JI. 2001. Extranuclear sequestration of phospho-Jun N-terminal kinase and distorted villi produced by activated Rac1 in the intestinal epithelium of chimeric mice. *Development*.128:2603-14.
238. Stein E, Tessier-Lavigne M. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*. 291:1928-38.
239. Steinbach JP, Weller M. 2004. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *J Neurooncol*. 70:247-256.
240. Stewart LA. 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 359:1011-8.
241. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 348:331-3.
242. Strizzi L, Bianco C, Raafat A, Abdallah W, Chang C, Raafat D, Hirota M, Hamada S, Sun Y, Normanno N, Callahan R, Hinck L, Salomon D. 2005. Netrin-1 regulates invasion and migration of mouse mammary epithelial cells overexpressing Cripto-1 in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 118:4633-43.
243. 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*. 352:987-96.
244. Surawska H, Ma PC, Salgia R. 2004. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15:419-33.
245. Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T. 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*. 78:703-11.
246. Tada K, Kochi M, Saya H, Kuratsu J, Shiraishi S, Kamiryo T, Shinojima N, Ushio Y. 2003. Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol*. 5:228-34.
247. Tanaka K, Oshimura M, Kikuchi R, Seki M, Hayashi T, Miyaki M. 1991. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature*. 349:340-2.
248. ten Dijke P, Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:857-69.

249. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet.*13:343-6.
250. Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267:1456-62.
251. Tomlinson FH, Scheithauer BW, Hayostek CJ, Parisi JE, Meyer FB, Shaw EG, Weiland TL, Katzmann JA, Jack CR Jr. 1994. The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *J Child Neurol.* 9:301-10.
252. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. 2000. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 5:40-6.
253. Tsai HH, Tessier-Lavigne M, Miller RH. 2003. Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development.* 130:2095-105.
254. Tsang RW, Laperriere NJ, Simpson WJ, Brierley J, Panzarella T, Smyth HS. 1993. Glioma arising after radiation therapy for pituitary adenoma. A report of four patients and estimation of risk. *Cancer.* 72:2227-33.
255. Varner JA, Cheresch DA. 1996. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 8:724-30.
256. 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.
257. Velcich A, Corner G, Palumbo L, Augenlicht L. 1999. Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. *Oncogene.* 18:2599-606.
258. 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.* 16:177-83.
259. Von Deimling A, Perry A. 2007 in: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Seiten 206-209. IARC Press, Lyon, Frankreich.
260. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. 2007. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 25:4722-9.
261. Walter AW, Hancock ML, Pui CH, Hudson MM, Ochs JS, Rivera GK, Pratt CB, Boyett JM, Kun LE. 1998. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol.* 16:3761-7.

262. Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D. 2009a. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol*. Publikation in Vorbereitung.
263. Wang W, Reeves WB, Ramesh G. 2009b. Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 296:F723-9.
264. 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*. 3:523-30.
265. Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81:323-30.
266. Weinmann M, Belka C, Plasswilm L. 2004. Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours. *Onkologie*. 27:83-90.
267. 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 zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge primärer Hirntumoren und ZNS-Metastasen. Herausgeber: Südwestdeutsches Tumorzentrum, Comprehensive Cancer Center Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen. 5. überarbeitete Auflage. ISSN 1438-8979.
268. Wertheimer N, Leeper E. 1987. Magnetic field exposure related to cancer subtypes. *Ann N Y Acad Sci*. 502:43-54.
269. Westphal M, Lamszus K. 2009. Other experimental therapies for glioma. *Recent Results Cancer Res*. 171:155-64.
270. Whiteside TL. 2002. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol*. 12:43-50.
271. Whiteside TL. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 27:5904-12.
272. Whiteside TL. 2009. Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral Oncol*. Publikation in Vorbereitung.
273. Wick W, Naumann U, Weller M. 2006. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 12:341-9.
274. Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M. 2002. History of allergies among adults with glioma and controls. *Int J Cancer*. 98:609-15.
275. Wykosky J, Gibo DM, Stanton C, Debinski W. 2005. EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res*. 3:541-51.
276. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. 2002. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 4:278-99.

277. Wu JY, Feng L, Park HT, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Zh, Zhang Xc, Rao Y. 2001. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature*. 410:948-52.
278. Xie Y, Hong Y, Ma XY, Ren XR, Ackerman S, Mei L, Xiong WC. 2006. DCC-dependent phospholipase C signaling in netrin-1-induced neurite elongation. *J Biol Chem*. 281:2605-11.
279. Yang SY, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet MC. 2009. Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends Mol Med*. 15:225-33.
280. Yang X, Chang HY, Baltimore D. 1998. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*. 1:319-25.
281. Yarden Y and Ullrich A. 1988. EGF and erbB2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 57:443-478.
282. Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V. 2003. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell*. 5:695-707.
283. Zarnescu O, Brehar FM, Chivu M, Ciurea AV. 2008. Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Bax in U87 glioblastoma xenografts. *J Mol Histol*. 39:561-9.
284. Zatloukal K, Roth J, Denk H. 2004. Zell- und Gewebereaktion in „Pathologie“, herausgegeben von Böcker W, Denk H, Heitz PU. Seite 66. Urban&Fischer, München, Jena.
285. Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. 2001. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 61:2301-6.
286. Zheng C, Heintz N, Hatten ME. 1996. CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science*. 272:417-9.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A2bAR	A2b adenosine receptor
Apaf-1	Apoptotic-protease-activating-factor-1
APPL	Adaptorprotein phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1
AGT	O(6)-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
Asp1290	Aspartat 1290
Bax	Bcl-2-associated-X-protein
Bcl-2	gehört zur Gruppe der antiapoptotischen „b-cell- lymphoma 2“-Proteine
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BTSC	Brain tumor stem cells
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAMs	Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
Cdc42	cell division cycle 42
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
C-terminal	Carboxy-terminus
DAB	Diaminobenzidin
DART	dependence-associated receptor transmembrane
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	Deleted in colorectal cancer
DIP13- α	DCC-interacting protein 13- α
DISC	Death-inducing-signalling-complex
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR	Death receptor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EphA2	Ephrinrezeptor A2
Erk-1/2	Extracellular signal regulated kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase

G2-Phase	Gap2-Phase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GTPase	Guanin-Triphosphathydroxylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HIF-2	Hypoxia-inducible factor-2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hMLH1	Human mutL homolog 1
hPMS1	Human postmeiotic segregation increased 1
HNPCC	non-polypösen Kolonkarzinom
IAP	Inhibitor-of-apoptosis-proteins
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IHC	Immunhistochemie
kDA	kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of heterozigosity
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MGMT	(6)-Methylguanin-DNA Methyltransferase
MHC	Major histocompatibility complex
MIB-1	Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCAM	Nerven-Zell-Adhäsions-Molekül
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-kappaB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NGF	Nerve growth factor
NF-1	Neurofibromatose Typ I
N-terminal	Amino-terminus
N-WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
Pak-1	P21-activated kinase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PNS	Peripheres Nervensystem
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
Robo	Roundabout receptor
siRNA	small interfering RNA
SOS	Son of sevenless
SV-40	Simian-Virus 40
TGF- α	Tumor growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TMA	Tissue Microarray
TNF-alpha	Tumor-necrosis-factor-alpha
TP53	Tumorsuppressorgen p53
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphospat (dUTP) biotin nick end-labeling
T-Zelle	Thymus-abhängiger Lymphozyt
Unc5H	Uncoordinated in gene 5 homolog
UNC5B	Uncoordinated in gene 5 b
uPA	Urokinase

VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
µm	Mikrometer
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Meyermann für die Überlassung des Promotionsthemas, die Berichterstattung und die großzügige Benutzungserlaubnis des Instituts.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Michel Mittelbronn, der jederzeit zu fachlichen und weltlichen Diskussionen zur Verfügung stand und sich als hilfsbereiter und zuverlässiger Instrukteur erwies. In bester Erinnerung sind Statistik- und Fotosessions in Freiburg und Frankfurt, die nicht nur meinen neuropathologischen Horizont erweitert haben.

Bei Herrn Dr. med. Jens Schittenhelm möchte ich mich für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft und interessante Diskussionen bedanken.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Benno Bunz und Herrn Dr. med. Patrick Harter für die Einführung in die immunhistochemischen Färbetechniken. Letzterer erwies sich auch als große Hilfe bei der Erstellung von Grafiken und als diskussionsfreudiger Ansprechpartner.

Herrn Dr. med. David Capper und Herrn Dr. med. Benjamin Goeppert gilt mein Dank für die Bereitstellung der TMA-Stanzen.

Frau Katrin Trautmann und Frau Wilma Ott gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung während der Laborarbeit.

Bei meiner Schwester möchte ich mich für die Unterstützung bei der Literaturrecherche und der Korrektur dieser Arbeit bedanken.

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