

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Expressionsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin
D1 in Gliomen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Julia Theresa Schulz
aus
Emmendingen

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Ritz

Für meine Familie

ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen

1,25(OH)(2)D(3)	1,25-Dihydroxycholecalciferol
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AKT	Serine/Threonine protein kinase Akt
AML	Akute myeloische Leukämie
Bcl-2	B-cell leukemia 2
BSA	Bovine serum albumin
CA	Carcinom
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic acid (=DNS)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HCl	Hydrochlorid
HE	Hematoxylin und Eosin
HIF-1 α	Hypoxia-inducible-factor-1alpha
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1

ABKÜRZUNGEN

IgG	Immunglobulin G
IgG2a	Immunglobulin G2a
IgG2b	Immunglobulin G2b
I-View Biotin Ig	Biotin Immunglobulin
I-View Copper	Kupfer
I-View DAB	Diaminobenzidin
I-View H2O2	Wasserstoffperoxid
I-View SA-HRP	Streptavidin-horseradish peroxidase
Ki-67	Kiel Antigen 67
L. Coeruleus	Locus Coeruleus
LCS	Liquid Cover Slip
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Medulla obl.	Medulla oblongata
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase
MIB-1	Made in Borstel-1
MK0752	Gamma-Sekretaseinhibitor MK0752 (Merck)
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NF1	Neurofibromin 1
NFKB	Neurofibromin-kappa-B

ABKÜRZUNGEN

NH	Normalhirn
o. A.	Ohne Angabe
p14ARF	P14ARF protein
p16INK4a	Protein 16 inhibiting CDK4 (=CDKN2A)
P53	Tumor suppressor gene 53 (protein of 53 kDa)
PAS	Periodic acid-Schiff
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
pH	Pondus Hydrogenii/Potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
p-Wert	Probability-value (p-value)
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid (=RNS)
RNAi	RNA-Interferenz
SBHA	Suberoyl-bishydroxamic Acid
T1	Längsrelaxationszeit
T2	Querrelaxationzeit
TBS	Tris buffered saline
TGF- β	Transforming growth factor beta
TMA	Tissue microarray
TP53	Tumor protein p53

ABKÜRZUNGEN

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
YKL40	Chitinase 3-like protein 1

INHALTSVERZEICHNIS

3	ERGEBNISSE	47
3.1	Notch 1	47
3.1.1	Vergleich der Notch 1 Expression der einzelnen WHO Grade	47
3.1.2	Vergleich der Notch 1 Expression in Abhängigkeit des Alters	49
3.1.3	Vergleich der Notch 1 Expression der beiden Geschlechter	50
3.1.4	Vergleich der Notch 1 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren	51
3.1.5	Vergleich der Notch 1 Expression nach Lokalisation	51
3.2	Notch 2	52
3.2.1	Vergleich der Notch 2 Expression der einzelnen WHO Grade	52
3.2.2	Vergleich der Notch 2 Expression in Abhängigkeit des Alters	54
3.2.3	Vergleich der Notch 2 Expression der beiden Geschlechter	55
3.2.4	Vergleich der Notch 2 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren	55
3.3	Cyclin D1	56
3.3.1	Vergleich der Cyclin D1 Expression der einzelnen WHO Grade	56
3.3.2	Vergleich der Cyclin D1 Expression in Abhängigkeit des Alters	58
3.3.3	Vergleich der Cyclin D1 Expression der beiden Geschlechter	59
3.3.4	Vergleich der Cyclin D1 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren	59
3.4	Korrelationsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 über alle WHO Grade	60

INHALTSVERZEICHNIS

3.5	Korrelationsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 im Einzelvergleich für jeden WHO Grad	60
3.6	Parametrische Überlebensanalyse	61
3.6.1	Notch 1	61
3.6.2	Notch 2	62
3.6.3	Cyclin D1	62
3.7	Survival nach Kaplan-Meier	62
3.7.1	Notch 1	62
3.7.2	Notch 2	64
3.7.3	Cyclin D1	66
4	DISKUSSION	69
4.1	Vor- und Nachteile der TMA-Methode	69
4.2	Allgemeine Ergebnisse	71
4.3	Ergebnisse der einzelnen immunhistochemischen Marker	71
4.3.1	Notch 1 Expression	71
4.3.2	Notch 2 Expression	73
4.3.3	Korrelation der Expressionrate von Notch 1 und Notch 2	74
4.3.4	Cyclin D1 Expression	76
4.4	Zusammenfassende Ergebnisse und Schlussfolgerungen	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS	82
7	ANHANG	95
7.1	Danksagungen	95
7.2	Lebenslauf	96

1 EINLEITUNG

1.1 Hirntumore

Hirntumore sind eine große, heterogene Gruppe von neoplastischen Veränderung des Hirns, die nahezu in jeder Hirnregion, bei jedem Geschlecht und in jedem Alter auftreten können. Sie teilen sich in primäre Neoplasien aller Differenzierungsgrade und möglichen Ursprungs der normal im Hirn vorkommenden Zellen, Neoplasien die aus embryologischem Gewebe entstehen, aber auch mesenchymale und sekundäre Neoplasien in Form von Metastasen (beide nicht hirneigen) aus fast allen im Körper vorkommenden Primärtumoren auf. Die Klassifizierung erfolgt unverändert Histologisch trotz zahlreichen zusätzlichen Methoden, die heute in der Tumorpathologie angewendet werden (Kleihues 2007 a). Es sind jedoch auch schon viele molekulare und zytogenetische Eigenschaften verschiedener Hirntumore bekannt, die eine prognostisch und therapeutisch relevante Aussagekraft besitzen (Burger, 2002).

Schwerpunkt der aktuellen Arbeit sind die hirneigenen Astrozytome (WHO Grad I-IV), die nachfolgend noch einmal detaillierter beschrieben werden.

1.2 Astrozytome und ihre Klassifikation

Astrozytome sind gliale Tumore, die aus der Neuroglia, genauergesagt aus Astrozyten, den häufigsten Gliazellen des ZNS entstehen. Astrozyten sind sternförmige Zellen mit faserartigen Fortsätzen, die an Blutgefäßen und Neuronen anhaften und so das gesamte Interstitium des Neuropil durchziehen. Sie wirken somit einerseits als Stütz- und Haltezellen im Gehirn, sind aber aufgrund ihrer spezialisierten Zellkontakte auch wesentlich am Flüssigkeits- und Stoffwechselfaustausch im Hirngewebe beteiligt (Love 2008). Durch Stimulation z.B. durch Verletzungen werden sie hypertroph oder hyperplastisch und werden vom Erscheinungsbild als „gemistozytisch“ beschrieben (Vinters 1998).

Neoplastische Veränderungen von Astrozyten bilden eine heterogene Gruppe von Raumforderungen des ZNS. Ihre Klassifizierung wird durch vier

histologische Parameter (Kernatypien, Mitosen, Gefäßproliferationen und Nekrosen) vorgenommen, die aus einer älteren Klassifikation der Mayo-Klinik hervorgegangen sind (Kernohan 1949). Die Einteilung erfolgt dabei in die WHO Grade I-IV (s. Abbildung 1), wobei Grad I eine Sonderstellung einnimmt (s.u.) (Burger, 2002). Es zeigt sich außerdem eine enge Korrelation zwischen dem Tumorgrad und dem Lebensalter des Patienten, da Astrozytome WHO Grad II eine Progression über WHO Grad III bis hin zum Glioblastom (WHO Grad IV) durchmachen können. So sind Grad I Tumoren meist „Tumoren des Kindes“, Grad II Tumoren treten in der dritten und vierten Lebensdekade auf, Grad III Astrozytome um das 50. Lebensjahr und Glioblastome Grad IV bei älteren Patienten ab 60 Jahren. Es gibt jedoch auch viele Ausnahmen, da das Alterspektrum breit gestreut ist (Burger 2002; Louis 2007; Ohgaki 2007).

WHO Grad I: Pilozytisches Astrozytom

Das pilozytische Astrozytom ist ein relativ gut umschriebener, langsam wachsender und oft zystisch imponierender glialer Tumor, der meist bei Kindern und Jugendlichen auftritt und 5-6% aller Gliome ausmacht (Scheithauer 2007). Es nimmt eine Sonderstellung bei den Gliomen ein, da es über Jahre und Jahrzehnte bestehen kann, ohne maligne zu entarten. Aus diesem Grund und auch weil eine chirurgische Resektion kurativ erfolgen kann, wird er als WHO Grad I eingestuft (Scheithauer 2007). Das pilozytische Astrozytom tritt geschlechtsunabhängig meist in den ersten zwei Lebensdekaden auf und macht hier mit 16-21% (0-19 Jahre) einen Großteil der kindlichen ZNS Tumoren aus (Central Brain Tumor Registry United States 2006). Mit steigendem Alter nimmt die Häufigkeitswahrscheinlichkeit ab und bei Erwachsenen über 50 Jahren werden nur noch vereinzelt Astrozytome WHO Grad I beschrieben. Typischerweise sind sie infratentoriell in der Mittellinie lokalisiert (Scheithauer 2007). Prädilektionsstellen sind der Nervus opticus (Hoyt 1969), der Thalamus, die Basalganglien (McGirr 1987), das Cerebellum (Cushing 1931; Hayostek 1993), der Hirnstamm (Burger 1996 a; Burger 1996 b; Pollack 1993) und das Rückenmark (Minehan 1995; Rauhut 1989; Rossitch 1990). Klinisch reichen die Symptome von fokalen neurologischen Defiziten, je nach Lokalisation, bis hin

zu unlokalisierten Zeichen wie z.B. Kopfschmerzen, Macrocephalie, Endokrinopathie und ventrikulärer Obstruktion, die bis zu steigendem Hirndruck führen kann. Ist der Nervus opticus betroffen, kann es zum Sehverlust kommen. Cerebellär lokalisierte Astrozytomen führen bei Kindern eher zu Schwindel, starken Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Scheithauer 2007). Im CT oder MRT sind pilozytische Astrozytome meist gut umschrieben, kontrastmittelaufnehmend (Fulham 1993; Lee 1989), zystisch formiert und nur selten kalzifiziert. Makroskopisch sind sie meist weich, grau, eher eigenständig und scharf begrenzt (Scheithauer 2007). Histopathologisch imponieren zwei Verteilungsmuster. Ein kompaktes mit den typischen namensgebenden piloiden, bipolaren Zellen mit Rosenthalfasern und ein eher lockeres mit multipolaren Zellen mit Mikrozysten, „granular bodies“ und hyalinen Tröpfchen. Typischerweise finden sich nur wenige Mitosen, hyperchromatische und pleomorphe Zellkerne. Gefäßproliferate mit teilweise perivaskulären Lymphozyten, infarktähnliche Nekrosen (ohne Pallisadenstellung der Kerne) und Infiltration in die Leptomeningen sind ebenso mit einem pilozytischen Astrozytom vereinbar und keine Zeichen von Malignität (s. Abbildung 1). Das Tumorwachstum scheint ab dem 20. Lebensjahr abzunehmen (Scheithauer 2007). Es gibt sogar Beispiele von spontaner Regression (Gunny 2005). Fernmetastasierung ist fast nicht bekannt. Manche Astrozytome streuen jedoch ins Rückenmark, noch bevor der eigentliche Primärtumor erkannt wurde. Einen Sonderstatus nimmt hierbei die pilomyxoide Variante ein, die aufgrund ihrer Rezidivneigung daher als WHO Grad II eingestuft wird (Tihan 1999). Pilozytische Astrozytome sind die häufigsten glialen Neoplasien, die mit einer Neurofibromatose Typ 1 assoziiert sind. 15% der Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 entwickeln die Tumore vor allem im Nervus opticus. Bis zu 33% der Patienten mit einem pilozytischen Astrozytom an dieser Stelle haben Neurofibromatose Typ 1. Im Allgemeinen sind Neurofibromatose Typ 1-assoziierte pilozytische Astrozytome, vor allem die im Nervus opticus, noch weniger aggressiv als nicht Syndrom-assoziierte Astrozytome (Lewis 1984; Rosser 2002).

WHO Grad II: Diffuses Astrozytom

Das diffuse Astrozytom ist, wie der Name schon sagt, ein diffus infiltrierendes von der WHO als Grad II eingestuftes Astrozytom, das meist bei jungen Erwachsenen, supratentoriell im Marklager auftritt und durch noch relativ gut differenzierte Zellen und ein langsames Wachstum gekennzeichnet ist. Es hat die Tendenz zur malignen Progression über das anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III s. unten) am Ende hin zum Glioblastom (WHO Grad IV) (Ohgaki 2007). Es macht 10-15% aller astroglialen Hirntumoren aus und zeigt bei einer leichten Tendenz zum männlichen Geschlecht (M:F ratio, 1.18:1) (von Deimling 2007) einen Erkrankungsgipfel in der dritten und vierten Lebensdekade. Das diffuse Astrozytom kann in allen Regionen des ZNS vorkommen, meist ist es jedoch im supratentoriellen Marklager des Frontal- oder Temporallappen gelegen oder auch in Hirnstamm und Rückenmark. Nur selten findet man es im Kleinhirn (von Deimling 2007). Klinisch macht sich das diffuse Astrozytom meist durch Krämpfe bemerkbar, aber auch Sprach-, Empfindungs- oder Sehstörungen sowie motorische Störungen sind möglich. Bei frontal lokalisierten Tumoren kann es auch zu Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen kommen (von Deimling 2007). Im CT zeigt es sich als schlecht umschriebene, homogene, kaum kontrastmittelaufnehmende Masse mit niedriger Dichte. Teilweise ist auch Kalzifizierung oder cystischer Umbau zu sehen. Im T1 gewichteten MRT zeigt es sich hypointens, im T2 gewichteten MRT hyperintens. Eine Gadoliniumanreicherung zeigt sich in der Regel erst bei der Progression zum Anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) (von Deimling 2007). Makroskopisch erscheint der Tumor als grau oder gelblich weiße Masse mit unklaren Grenzen und Ausdehnung ins angrenzende Gewebe jedoch ohne Infiltration desselben. Teilweise können auch zystische oder granuläre Bereiche sowie verhärtete aber auch erweichte Zonen vorkommen und mikrozystische Veränderungen können sich als gallertartige Erscheinungen äußern (von Deimling 2007). Histologisch zeigen sich gut differenzierte, fibrilläre oder gemistozytäre Tumorzellen auf einer lockeren, mikrozystischen Matrix gelegen. Die Zellzahl ist leicht erhöht, es finden sich jedoch bis auf wenige Ausnahmen keine Mitosen (s. Abbildung 1). Das Vorhandensein von Nekrosen

oder Gefäßproliferaten ist mit der Diagnose eines diffusen Astrozytoms unvereinbar (von Deimling 2007). Als histologische Untergruppen sind das fibrilläre, das gemistozytäre und das protoplasmatische Astrozytom zu nennen. Die häufigste ist die fibrilläre Variante, die sich durch niedrige bis mittelgradige Zelldichte, Zelltypen wie z.B. erweiterte, zigarrenförmige oder unregelmäßig hyperchromatische Nukleoli und schmalem Zytoplasma darstellt (von Deimling 2007). Die Zellen sind in der GFAP- und Vimentin- Immunohistochemie-Färbung positiv, wobei sich die Vimentinfärbung nur in einem perinukleären Randsaum zeigt (Herpers 1986), die GFAP-Färbung jedoch auch im Zytoplasma sichtbar wird (Kleihues 1987). Das gemistozytäre Astrozytom zeigt eine deutliche, aber variable Anzahl von gemistozytischen, neoplastischen Astrozyten, die mehr als 20% der Tumorzellen ausmachen müssen (von Deimling 2007). Histopathologisch dominieren Gemistozyten mit plumpen, glasigen, eher eckigen eosinophilen Zellkörpern mit zufällig verteilten Zellfortsätzen, die ein grobes fibrilläres Netzwerk bilden. Die Zellkerne liegen meist exzentrisch und haben deutliche Nukleoli und dichtes Chromatin (von Deimling 2007). Es zeigen sich oft perivaskuläre lymphozytische Infiltrate (Burger 1985). Elektronenmikroskopisch sieht man im Zytoplasma und in den Zellfortsätzen reichlich gliale Filamente (von Deimling 2007). Die Gemistozyten exprimieren durchweg GFAP in ihren Zellkörpern und Zellfortsätzen (von Deimling 2007). Teilweise zeigt sich auch eine Expression von p53 Protein und bcl-2 (Newcomb 1997; Watanabe 1997 b). Die seltenste Variante, das protoplasmatische Astrozytom, zeichnet sich durch kleine Zellkörper mit nur wenigen glialen Filamenten und gleichmäßig rund bis ovalen Nukleoli aus. Eine GFAP Färbung zeigt sich kaum, die Zelldichte ist niedrig und es gibt keine mitotische Aktivität. Charakteristisch sind auch mukoide Degenerationen und mikrozystische Veränderungen (von Deimling 2007). Vor allem bei Kindern ist diese Art von Astrozytom nicht immer leicht vom pilozytischen (WHO Grad I) oder pilomyxoiden Astrozytom (WHO Grad II) zu unterscheiden (Prayson 1995). Diffuse Astrozytome mit vielen Gemistozyten tendieren zu einer schnelleren malignen Progression als normale fibrilläre Astrozytome (Okamoto 2004; Peraud 1998). Bei mehr als 60% der Patienten mit diffusem Astrozytom ist eine

TP53 Mutation zu finden (Okamoto 2004; Reifenberger 1996; Watanabe 1997 a). Bei der gemistozytischen Variante ist dies sogar bei über 80% der Patienten der Fall (Okamoto 2004; Watanabe 1998). Ebenso wird oft eine erhöhte mRNA Expression von PDGFR festgestellt (Hermanson 1992). Als häufigste genetische Veränderung wurde ein Fehler auf Chromosom 7q und 8q festgestellt. Ein LOH auf Chromosom 22q wurde in 17% der Fälle beschrieben und eine Deletion auf Chromosom 6 in 14% (Nishizaki 1998; Schröck 1996; Miyakawa 2000). Ein Drittel der diffusen Astrozytome zeigten eine p14ARF Promotor Methylation (Nakamura 2001 a), 50% eine MGMT Promotor Methylation, die sogar signifikant mit einer TP53 Mutation assoziiert war (Nakamura 2001 b) und sogar 72,7% eine IDH1 Mutation (Hartmann 2009). Die mittlere Überlebenszeit nach einer Operation beträgt, natürlich mit individuellen Schwankungen, 6-8 Jahre (von Deimling 2007). Die Gesamtdauer der Erkrankung hängt jedoch stark von der malignen Progression zu höhergradigen Astrozytomen (Grad III-IV) ab, was im Mittel nach 4-5 Jahren geschieht (Ohgaki 2005 b; Vertosick 1991; Watanabe 1997 b). Gerade bei einer TP53 Mutation ist ein Langzeitüberleben möglich (Ohgaki 1999). Zum Diagnosezeitpunkt junge Patienten haben meist einen besseren klinischen Verlauf (Okamoto 2004; Shafqat 1999), wobei sich eine große Tumorgroße eher negativ auswirkt (Karim 1996). Gelingt eine Totalresektion des Tumors, ist die Überlebenszeit signifikant höher (Iwabuchi 1999; Peraud 1998; van Veelen 1998). Patienten bei denen eine Epilepsie das einzige Symptom ist haben eine bessere Prognose als Patienten mit weiteren neurologischen Defiziten (van Veelen 1998).

WHO Grad III: Anaplastisches Astrozytom

Das anaplastische Astrozytom ist ein diffus infiltrierender maligner Hirntumor, der meistens cerebral lokalisiert bei Erwachsenen auftritt und durch erhöhte Zellzahl, ausgeprägte Zellatypien und eine signifikant erhöhte Proliferationsrate gekennzeichnet ist (Kleihues 2007 b). Er wird von der WHO als Grad III Tumor (Kleihues 1993) eingestuft und zeigt eine Tendenz zur Progression zum Glioblastom (WHO Grad IV) (Kleihues 2007 c). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 45 und 51 Jahren mit einer leichten Tendenz zum männlichen

Geschlecht (Ohgaki 2005 b). Auftreten kann das anaplastische Astrozytom, wie auch das diffuse Astrozytom (WHO Grad II) in allen Bereichen des Hirns, es hat jedoch eine Präferenz zu den Großhirnhemisphären (Kleihues 2007 b). Die Symptome sind denen des diffusen Astrozytoms (WHO Grad II) sehr ähnlich. Wenn das anaplastische Astrozytom aus einem diffusen Astrozytom WHO Grad II entsteht, können die neurologischen Defizite, die Krampfanfälle und die Hirndruckzeichen auch verstärkt auftreten (Kleihues 2007 b). Makroskopisch zeigt sich eine Infiltration des umliegenden Hirngewebes jedoch ohne offene Gewebszerstörung und sichtbare Zystenbildung. Makroskopisch ist das Grad III nur schwer vom Grad II Astrozytom zu unterscheiden (Kleihues 2007 b). Histologisch zeigen sich eine gesteigerte Zellzahl, nukleäre Atypien sowie mitotische Aktivität (s. Abbildung 1). Die Interpretation letzterer ist insbesondere von der Gewebeprobengröße abhängig. Ist in einer kleinen Probe, beispielsweise aus einer stereotaktischen Biopsie, schon eine Mitose sichtbar spricht das eher für ein anaplastisches Astrozytom WHO Grad III, als eine einzige Mitose in einem ganzen Geweberesektat, was durchaus noch mit einem WHO Grad II Astrozytom vereinbar wäre. Hierbei kann die Ki-67/MIB-1 Immunhistochemie hilfreich sein, die beim anaplastischen Astrozytom normalerweise zwischen 5-10% liegt, jedoch auch innerhalb desselben Tumors variieren kann (Coons 1993; Jaros 1992; Karamitopoulou 1994; Raghavan 1990). Regionale oder diffuse Zellzahlerhöhung ist ein wichtiges Kriterium, korreliert jedoch nicht immer mit hoher mitotischen Aktivität. Die Varianz in der nukleären Größe, Form und Veränderungen des Chromatins nehmen zu, wie auch die Zahl und Prominenz der Nukleolen (Kleihues 2007 b). Laut Definition führen Nekrosen oder Gefäßproliferate zur Diagnose eines Glioblastoms (Kleihues 2007 c). Daher ist das anaplastische Astrozytom (WHO Grad III) klinisch, morphologisch und genetisch gesehen eine Zwischenstufe zwischen dem diffusen Astrozytom (WHO Grad II) und dem sekundären Glioblastom (WHO Grad IV). Es ist jedoch noch nicht ganz klar, warum manche aus einem WHO Grad II Astrozytom entstehen, andere wiederum *de novo* ohne erkennbare Vorläsion (Kleihues 2007 b). Die hohe Zahl an TP53 Mutationen (>70%) (Watanabe 1997 a) lässt jedoch vermuten, dass eigentlich alle Grad III

Astrozytome aus einem diffusen Astrozytom entstehen, teilweise jedoch so schnell progredieren, dass die Vorstufe nicht gefunden wird (Kleihues 2007 b). Genetisch zeigt sich bei anaplastischen Astrozytomen eine hohe Frequenz von LOH 17p (50-60%) (Ohgaki 2004; Okamoto 2004; von Deimling 1994), LOH 10q (35-60%) (Balesaria 1999; Ichimura 1998), PTEN Mutationen (18-23%) (Davies 1999; Watanabe 1998), LOH 22q (20-30%) (Hartmann 2004) und LOH 6q (33%) (Miyakawa 2000). LOH 19q ist mit 46% signifikant höher als beim diffusen Astrozytom (von Deimling 1994). EGFR Amplifikation ist nicht sehr häufig (<10%) (Kleihues 2007 b). Die Progression zum Glioblastom ist zeitlich variabel, es zeigte sich jedoch ein mittleres Intervall von zwei Jahren (Ohgaki 2004). Steigendes Alter ist ein ungünstiger Faktor (Kleihues 2007 b) und Patienten mit einer EGFR Amplifikation haben eine signifikant kürzere Überlebenszeit (Järvelä 2006).

WHO Grad IV: Glioblastom

Das Glioblastom ist der häufigste primäre Hirntumor (12-15%) und auch der bösartigste und häufigste unter den Astrozytomen (60-75%) (Ohgaki 2005 b). Er lässt sich operativ nicht komplett entfernen und weniger als die Hälfte der Patienten überleben nach der Diagnose länger als ein Jahr (Kleihues 2007 c). Deshalb ist er von der WHO als Grad IV eingestuft (Kleihues 2007 c). Er zeichnet sich durch Kernatypien, Zellpleomorphismen, mitotische Aktivität, Gefäßproliferationen mit Mikrothromben und Nekrosen aus und kommt meist bei Erwachsenen in den Großhirnhemisphären vor. Es gibt primäre Glioblastome die relativ rasch *de novo* entstehen und die sekundären Glioblastome die sich aus den Astrozytomen der WHO Grade II und III eher langsam entwickeln. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 45 und 75 Jahren mit einem Mittel von 61 Jahren (Ohgaki 2004) und einer leichten Tendenz zum männlichen Geschlecht (Ohgaki 2005 a), ein Glioblastom kann prinzipiell aber in jedem Alter auftreten (Kleihues 2007 c). Meist zeigt es sich in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären (31% temporal, 24% parietal, 23% frontal, 16% okzipital), aber auch in den Basalganglien und dem Thalamus (vor allem bei Kindern) und infiltriert nicht selten in umliegendes Gewebe und

sogar über den Balken bis in die gegenüberliegende Großhirnhemisphäre (Kleihues 2007 c). Intraventrikulär (Lee 1997), im Hirnstamm (meist bei Kindern) (Dohrmann 1976), im Kleinhirn und im Rückenmark wird es dagegen selten gefunden. Der Symptomverlauf ist, außer bei den sekundären Glioblastomen, meist kurz (in 50% der Fälle unter drei Monaten) und äußert sich in Form von Hirndruckzeichen wie beispielsweise Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Papillenödem aber auch unspezifische Symptome wie Persönlichkeitsveränderungen können vorkommen. Bis zu einem Drittel der Patienten entwickeln einen epileptischen Anfall (Kleihues 2007 c). Makroskopisch sind Glioblastome aufgrund ihrer kurzen Symptombdauer, wenn sie entdeckt werden, meist schon sehr groß und infiltrieren einen ganzen Lappen. Sitzen sie im Balken oder Hirnstamm haben sie sich oft bereits bilateral ausgebreitet und wirken so sehr symmetrisch („butterfly glioma“) (Kleihues 2007 c). Sie sind im Randbereich von gesundem Hirngewebe schlecht abgrenzbar und haben eine gräuliche Farbe mit zentral gelben Arealen, was der Nekrosezone mit Myelinabbau entspricht und bis zu 80% der Tumormasse ausmachen kann. Sie zeigen typischerweise auch rote und braune Stellen, die frischen und älteren Hämorrhagien entsprechen. Sind makroskopisch sichtbare Zysten vorhanden, sind diese meist mit einer trüben Flüssigkeit aus nekrotischem Tumorgewebe gefüllt (Kleihues 2007 c). Glioblastome infiltrieren sehr schnell das umliegende Hirngewebe (Burger 1988), jedoch selten den Subarachnoidalraum. Sie metastasieren so gut wie nie über den Liquor oder erfassen extraneuronales Gewebe (Pasquier 1980, Pasquier 1979) und durchbrechen auch nur sehr selten die Dura, den venösen Sinus oder den Schädelknochen (Pedersen 1994; Pompili 1993; Shuangshoti 1987). Es wurden schon verschiedene molekulare Mediatoren entdeckt, die für die Invasion von Glioblastomen verantwortlich sind wie z.B. der TGF- β und der AKT Pfad (Wick 2006; Koul 2005), aber auch die Hypoxie die zur HIF-1 α Aktivierung führt (Kaur 2005). Außerdem haben die Tumorzellen eine migrationsfördernde, extrazelluläre Matrix entwickelt (Knott 1998) und sezernieren proteolytische Enzyme, die die Invasion durch eben diese Matrix erlauben (Kleihues 2007 c). Über 90% der Glioblastome entstehen bei älteren Patienten (im Mittel mit 62

Jahren) *de novo* und sind somit primäre Glioblastome (Ohgaki 2004; Ohgaki 2007). Der Rest, also die sekundären Glioblastome, entstehen im Mittel mit 45 Jahren aus einem WHO Grad III Astrozytom, haben sich aus diesem im Schnitt nach 4-5 Jahren entwickelt (Ohgaki 2005 b; Watanabe 1997 a) und haben eine signifikant längere Überlebenserwartung von 7,8 Monaten (im Median) als die primären Glioblastome (Median: 4,7 Monate) (Ohgaki 2004; Ohgaki 2005 b). Sie unterscheiden sich außerdem teilweise auch in ihrer Genetik, ihrem Expressionsmuster (Ohgaki 2005 b) und ihrer Ansprechrate auf eine Therapie, zeigen jedoch beide eine hohe Frequenz von LOH 10q (Fujisawa 1999; Fujisawa 2000; Ohgaki 2004; Ohgaki 2007). Sekundäre Glioblastome besitzen meist auch die typischerweise in niedriggradigen Tumoren gefundenen IDH1 oder IDH2 Mutationen (Yan 2009). Das Glioblastom wird typischerweise durch seine Gewebestruktur klassifiziert, wobei es eine hohe Heterogenität aufweisen kann. Es zeigen sich anaplastische, niedrig differenzierte, oft pleomorphe, astrozytäre Tumorzellen mit Kernatypien, sowie Gefäßproliferationen (teilweise mit Mikrothromben) und/oder Nekrosen (Kleihues 2007 c). Perivaskuläre Lymphozytenanreicherungen sind eher selten. Sogenannte „sekundäre Strukturen“ in Form von pallisadenartig aufgestellten Tumorzellen z.B. an Gefäßen, um Neurone herum und an den Nekrosezonen sind dagegen hoch diagnostisch (Scherer 1940). Gelegentlich enthalten sie auch Abschnitte mit glandulären und fadenförmigen epithelialen Strukturen mit einem ovalen Kern, einem prominenten Nukleolus und rundem, scharf begrenztem Zytoplasma (Rosenblum 1991) (s. Abbildung 1). Manche Glioblastome haben auch Gemistozyten mit sehr viel glasigem, nicht fibrillärem Zytoplasma, das den Kern an den Rand der Zelle drückt oder vereinzelt auch große Zellen mit granulärem PAS positivem Zytoplasma (Kleihues 2007 c). Als Untergruppen sind das kleinzellige Glioblastom mit vielen, kleinen homogenen Zellen mit hyperchromatischem Kern und einer hohen Proliferationsrate (Perry 2004), das Glioblastom mit einer oligodendroglialen Komponente und bessere Prognose als das normale Glioblastom (He 2001; Homma 2006; Kraus 2001) und das Riesenzellglioblastom mit haufenförmig angeordneten Riesenzellen und einer hohen Frequenz von TP53 Mutationen (Kleihues 2007 c) zu nennen, sowie das

Glioblastom mit Granularzellkomponente (Shi 2008). Daneben gibt es noch das Gliosarkom, das einerseits aus einer glialen, andererseits aus einer mesenchymalen Differenzierung besteht (Kleihues 2007 c) und das maligne Gliom („Lipoglioblastom“) mit vielen lipid- oder seifenartigen Tumorzellen (Kepes 1987; Rosenblum 1991; Tanaka 1989). Glioblastome haben eine hohe proliferative Aktivität und zeigen deshalb auch meist sehr viele, teilweise sogar atypische Mitosen, die jedoch nicht in allen Tumorbereichen gleich ausgeprägt sein müssen (Kleihues 2007 c). Als bestdurchbluteter Tumor des Menschen hat er verschiedene Mechanismen zur Vaskularisation entwickelt, wie z.B. die Übernahme bereits bestehender Gefäße durch Tumorzellen (Machein 2004) oder die klassische Angiogenese und Vaskulogenese (Acker 2004; Fischer 2005; Machein 2004). Die Tumorphypoxie ist die größte treibende Kraft zur Gefäßproliferation in Glioblastomen (Acker 2004) und führt zur HIF-1 α Aktivierung (Kaur 2005) und in den pränekrotischen Pallisadenzellen zur VEGF Bildung, die einer der Hauptmediatoren für die gliomassoziierte vaskuläre Dysfunktion darstellt (Kleihues 2007). Genetische Faktoren in primären Glioblastomen sind unter anderem LOH 10q (70%), EGFR Amplifikation (36%), p16INK4a Deletion (31%), TP53 Mutation (28%) und PTEN Mutation (25%) (Ohgaki 2004). In sekundären Glioblastomen ist die Häufigkeitswahrscheinlichkeit der einzelnen genetischen Faktoren etwas anders, LOH 10q (63%), TP53 Mutation (65%), p16INK4a Deletion (19%), EGFR Amplifikation (8%) und PTEN Mutation (4%) (Ohgaki 2004). Glioblastome sind sehr therapieresistent und nur ca. 20% der Patienten überleben trotz eines aggressiven Operationsregimes, hochdosierter Radiotherapie und/oder höchster tolerierter Chemotherapie (z.B. mit Temozolomid) nach der Diagnosestellung länger als ein Jahr, nur 3% über 3 Jahre (Ohgaki 2004; Ohgaki 2005 b). Junge Patienten (<50 Jahre) haben eine signifikant bessere Prognose (Burger 1987) und sekundäre Glioblastome eine signifikant längere Überlebenszeit als primäre Glioblastome (Ohgaki 2004). Auch das Vorhandensein und die Ausdehnung von Nekrosen (Burger 1987; Hammoud 1996; Homma 2006; Pierallini 1998) und LOH 10q sind mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden (Ohgaki 2004).

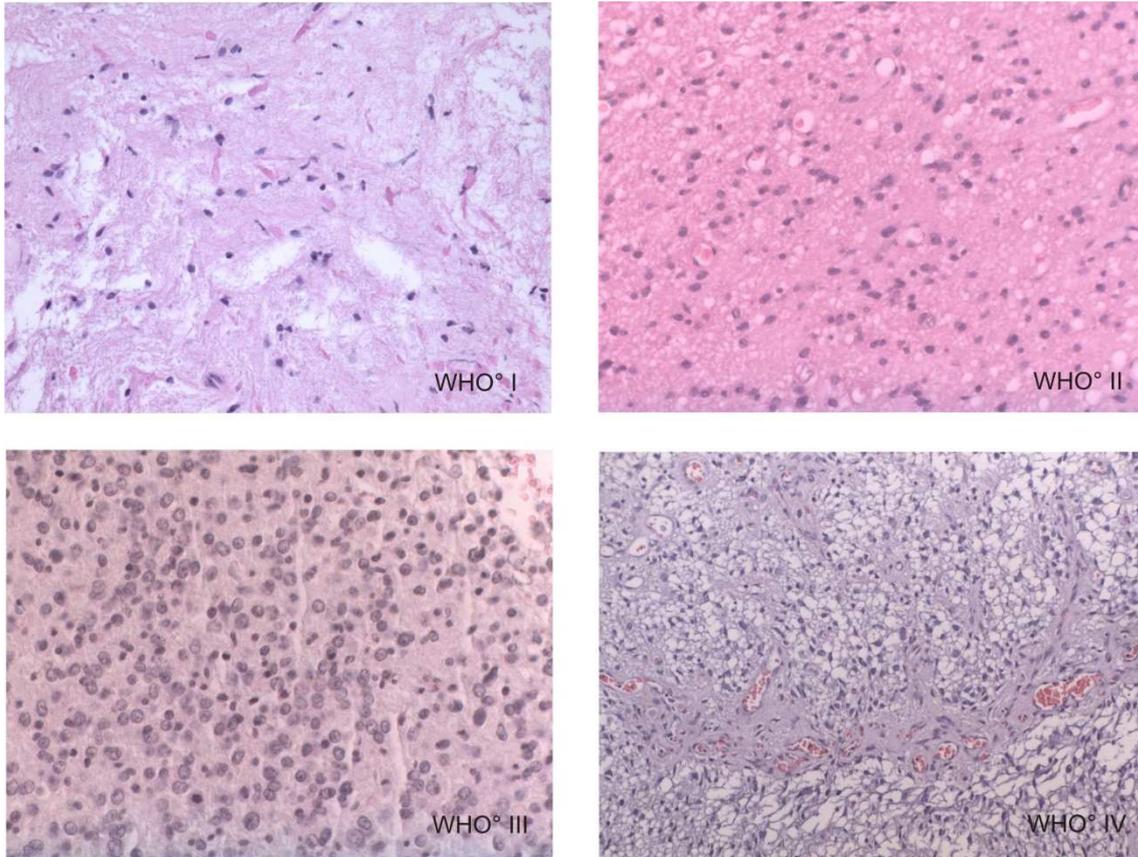


Abb. 1: HE gefärbte Histologieschnitte mit dem exemplarischen Bild von pilozytischen Astrozytomen (WHO° I), diffuse Astrozytomen (WHO° II), anaplastische Astrozytomen (WHO° III) und Glioblastomen (WHO° IV), hier mit pathologischen Gefäßproliferaten.

1.3 Die Rolle von Transmembranrezeptoren in Gliomen

Neben der histologischen Klassifizierung von Gliomen ist, besonders zur Entwicklung neuer Therapieansätze, auch eine Unterscheidung in unterschiedliche Signaltransduktionswege sowie Mutationen derer Mitgliedsgene möglich. Hierbei zeichneten sich drei Expressions- und Aktivitätsmuster von Proteinen in Gliom-relevanten Signalwegen ab. Es zeigte sich je nach Gruppe eine Dominanz der EGFR-Aktivierung, der PDGFR-Aktivierung oder ein Verlust des Ras-Regulators NF1. Die Klasse der EGFR zeigte eine bedeutende Aktivierung des Notch Signalwegs durch eine hohe

Expression von Notch Liganden und Rezeptoren und die Klasse der PDGF-Rezeptoren hohe Level von PDGFB-Liganden und Phosphorylierung von PDGFRbeta und NFkB. Der Verlust von NF1 war mit einer erniedrigten Aktivierung von MAPK und PI3K und relativer Überexpression des mesenchymalen Markers YKL40 assoziiert (Brennan 2009).

1.4 Die Notch-Familie

Die Notch-Gene kodieren für eine Familie von transmembranen Proteinen, die an vielen Prozessen wie der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen beteiligt sind (Ronchini 2001). Sie regulieren dabei nicht nur die embryonale und fetale Organogenese, sondern spielen auch bei der Reifung und Entwicklung von verschiedenem postnatalem und adultem Gewebe eine Rolle (Artavanis-Tsakonas 1999). Die Notch Rezeptorenfamilie besteht aus den bisher bekannten Notch 1 bis Notch 4, die in ihrer vollen Länge und unbearbeitet synthetisiert werden und aus einer extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domäne bestehen. An der extrazellulären Domäne sind viele EGF (-like) Repeats gebunden (s. Abbildung 2 A; Leong 2006). Der Notch Rezeptor bildet zwei Untereinheiten. Die erste besteht aus dem Großteil der extrazellulären Domäne und die zweite aus der transmembranen und der intrazellulären Domäne (Blamueller 1997). Diese zwei Untereinheiten sind nicht-kovalent assoziiert und bilden an der Zelloberfläche einen heterodimeren Typ I Transmembranrezeptor. Wenn kein Ligand an diesen Rezeptor bindet, ist er inaktiv (Leong 2006). Die Notch-Liganden Familie besteht aus Jagged 1 und 2 und Delta-like 1, 3 und 4 (s. Abbildung 2 B). Auch sie sind Typ I Transmembranproteine (Leong 2006). Da die Notch Rezeptoren und Liganden membrangebunden sind, läuft ihr Signalweg über lokale Zell-Zell Kommunikation ab (Grego-Bessa 2004). Hierbei führt eine Ligandenbindung zu einer intramembranen Proteolyse des Rezeptors und resultiert in einem aktiven Notch Fragment. Dieses wandert nun zum Zellkern und vereint sich dort mit einem intrazellulären Protein, um einen Transkriptionskomplex zur Aktivierung weiterer Zielgene zu bilden. Diese Art von Transkriptionsweg wird auch „canonical pathway“ genannt (Kopan 2009).

Notch kann je nach Zelllinie die Zelldifferenzierung blockieren oder aktivieren (Leong 2006). Notch reguliert u.a. die Entwicklung und Differenzierung von verschiedenen blutbildenden Zelltypen wie T-Zellen (Sambandam 2005), B-Zellen (He 2003), Monozyten (Ohishi 2000), Makrophagen (Masuya 2002), dendritische Zellen (Cheng 2003), Osteoklasten (Yamada 2003) und natürliche Killerzellen (DeHart 2005). So führt z.B. eine Notch Aktivierung zur Inhibierung der T-Zell Entwicklung (Maillard 2005). Wegen dieser wichtigen Rolle bei der Blutbildung muss der Notch Signalweg sehr genau reguliert werden, da sich Störungen in diesem System sonst zu hämatologischen Neoplasien entwickeln können (Leong 2006). Bei Säugetierembryonen sind die Notch Rezeptoren und Liganden während der Organogenese stark exprimiert (Artavanis-Tsakonas 1999) und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der drei Keimblätter: Endoderm (Pankreas (Lammert 1999)), Mesoderm (Blutbildendes System (Milner 1999), Brustdrüse (Callahan 2004), Blutgefäße (Karsan 2005)) und Ektoderm (ZNS (Yoon 2005)). Eine Notch Aktivierung führt auch zur Hemmung der Granulozytendifferenzierung (Milner 1996), Myogenese (Luo 2005), Neuro- (Baker 2000; Nye 1994; Wang 1998) und Oligodendrozytengenese, hat jedoch keinen Einfluss auf die Astrozytendifferenzierung (Nye 1994; Wang 1998). Notch kann nicht nur die Differenzierung von neuronalen Stammzellen blockieren, sondern sie auch spezifisch dazu aktivieren Gliazellen zu produzieren (Wang 2000; Furnkawa 2000). Hierbei fungiert Notch als Trigger für die Differenzierung von drei Arten von Gliazellen: Schwannzellen (Morrison 2000), radiale Glia (Gaiano 2000) und Müllerzellen (Furnkawa 2000). In Vitro konnte Notch dabei signifikant die Menge und Rate der glialen Differenzierung von Schwannzellen aktivieren (Morrison 2000). In einer steigenden Anzahl von soliden Tumoren wie Pankreas-CA (Zavadil 2004), Lungen-CA, Mamma-CA, Prostata-CA, Colorektales-CA, Uterus-CA und Ovarial-CA (Ramaswamy 2003) aber auch bei verschiedenen Formen der AML und B-Zell CLL (Radtke 2003; Tonon 2003) zeigt sich eine deregulierte Expression von Notch Rezeptoren und Liganden (Grego-Bessa 2004). Notch kann dabei die Tumorzellen an ihrer Differenzierung hindern und wirkt somit tumorsuppressiv (Radtke 2003). Es kann jedoch auch die Expression von Cyclin D1 aktivieren, was zu vermehrter

EINLEITUNG

Zellproliferation führt und somit direkt Faktoren regulieren, die im Zellzyklus und bei der Zellproliferation eine Rolle spielen (Ronchini 2001). Seine tumorigene Wirkung wird vermutlich aber auch über eine EGFR-vermittelte Aktivierung des Ras-Protoonkogens gesteuert (Weijzen 2002). Notch kann daher sowohl als Tumorsuppressorgen als auch als Onkogen wirken (Nicolas 2003; Radtke 2003; Ronchini 2001).

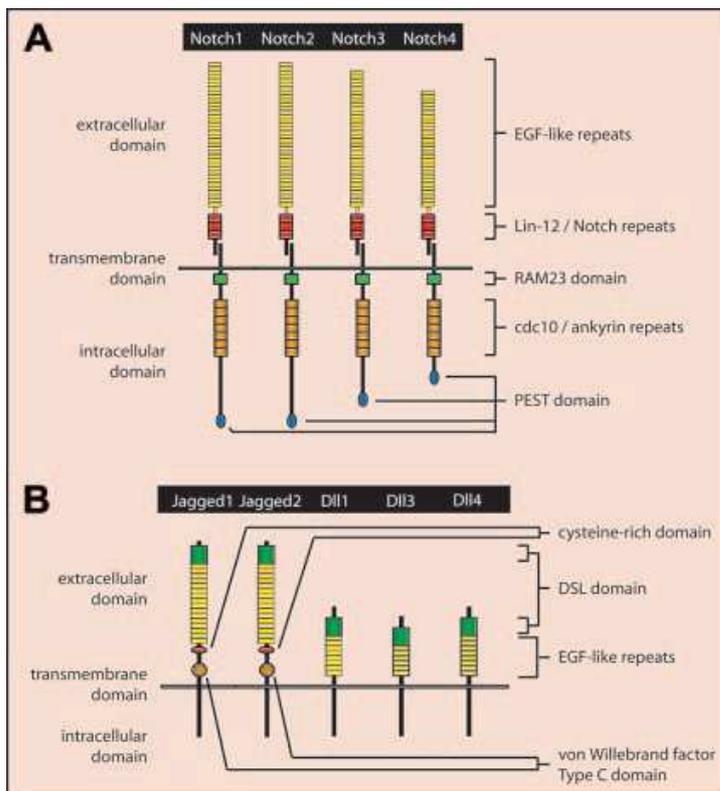


Abb. 2: Schematische Darstellung der Notch Rezeptoren und Liganden Familien in Mammalia (Quelle: Leong 2006).

(A) Die Säugetier Notch Rezeptorfamilie besteht aus vier Untergruppen: Notch 1, Notch 2, Notch 3 und Notch 4.

(B) Die Säugetier Notch Ligandenfamilie besteht aus fünf Untergruppen: Jagged 1, Jagged 2, Delta-like 1, Delta-like 3 und Delta-like 4.

1.4.1 Notch 1

Eine deregulierte Notch 1 Expression wurde als Faktor für die Entstehung von T-Zell ALL und Lymphomen gefunden (Ellisen 1999). Eine Überexpression von Notch 1 und Jagged 1 und 2 wurde auch im primären multiplen Myelom (Houde 2004; Jundt 2004) gefunden. Auch beim Cervix-CA (Gray 1999; Zagouras 1994; 9-16), Colon-CA, Lungen-CA (Zagouras 1994) und Pancreas-CA (Miyamoto 2003) zeigte sich eine gesteigerte Notch 1 Proteinexpression. Beim Mamma-CA zeigte sich Notch 1 als Onkogen (Parr 2004) beim Medulloblastom (Fan 2004) und Hautkrebs (Nicolas 2003) jedoch eher tumorsuppressiv. Notch 1, Delta-like 1 und Jagged 1 wurden außerdem in Gliomen (WHO Grad II-IV) nachgewiesen (Abbildung 2; Purow 2005; Cheung 2006). Hierbei zeigte sich ein hohes Level von Notch 1 im Nucleus bei Gliomen WHO Grad II und III, bei Glioblastomen (WHO Grad IV) war jedoch nur eine geringe nucleäre Notch 1 Expression zu finden. Bei allen drei WHO Graden war die zytoplasmatische Notch 1 Expression sehr gering (Purow 2005). In tumorfreiem, adultem ZNS-Gewebe wird Notch 1 zwar nur gering exprimiert, ist jedoch in neurodegenerativen Prozessen im Hippocampus aufreguliert (Berezovska 1998). Die Herunterregulierung von Notch 1 induzierte in verschiedenen Gliomzelllinien die Apoptose und inhibierte die Zellproliferation (Purow 2005), steigerte jedoch auch die EGFR Rate (Purow 2008). Eine erhöhte EGFR Rate findet sich in vielen aggressiven Gliomen (Libermann 1985) und eine Behandlung mit EGFR-Inhibitoren zeigte bereits Effekte bei der Behandlung von höhergradigen Gliomen (Mellinghoff 2005). Notch 1 spielt somit auch eine Rolle bei der Regulierung von EGFR (Purow 2008).

1.4.2 Notch 2

Das Notch 2 Gen liegt in Zentromernähe auf Chromosom 1q. In der externen Körnerzellschicht des Cerebellum und im postnatalen Hirn ist eine Notch 2 Expressierung zu finden. Auch bei vielen Neoplasien ist eine Überexpression von Notch 2 nachgewiesen, wie im primären multiplen Myelom (Houde 2004; Jundt 2004), bei Leukämien (Hubmann 2002), Hautkrebs (Nickoloff 2003) und beim Medulloblastom (Fan 2004). Auch beim Cervix-CA (Gray 1999; Zagouras

1994), Colon-CA, Lungen-CA (Zagouras 1994) und Pancreas-CA (Miyamoto 2003) zeigte sich eine gesteigerte Notch 2 Proteinexpression. Beim Mamma-CA zeigte sich Notch 2 eher tumorsuppressiv (Parr 2004), bei embryonalen Hirntumoren jedoch als Onkogen (Fan 2004). Der Verlust des Notch 2 Genabschnitts bei Oligodendrogliomen und Gliomen ging mit einer besseren Prognose einher (Boulay 2007).

1.4.3 Notch 3 und 4

Im Gegensatz zu Notch 1 und 2 sind die restlichen Familienmitglieder bislang noch nicht gut untersucht. Eine gesteigerte Notch 3 und 4 Expression zeigte sich in malignen Melanomen (Nickoloff 2003), beim Pancreas-CA (Miyamoto 2003) und beim Mamma-CA (Callahan 2004). Auch beim CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) konnte eine Mutation im Notch 3 Gen auf Chromosom 19 festgestellt werden (Delibas 2009). Geeignete Antikörper für die Immunhistochemie existieren derzeit noch nicht, sind jedoch in Entwicklung.

1.5 Cycline

Cycline sind Proteine, die am Ablauf und der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Dieser besteht aus der G1-, S-, G2- und der M-Phase in denen die Zelle sich mitotisch teilt. Nach der M-Phase kann die Zelle auch in die G0-Phase, die sogenannte Ruhephase übergehen. Die Cycline aktivieren nun zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt die CDK, die ständig in den Zellen zu finden ist und aktivieren so den Übergang von einer Phase in die nächste. Cycline sind nur für kurze Zeit im Zellzyklus verfügbar und werden sehr genau reguliert. Während einer Zellzyklusphase werden jeweils die phasenspezifischen Cyclin/CDK-Komplexe gebildet, die ab einer gewissen Konzentration dann den Übergang von einer Phase in die nächste aktivieren (Lüllmann-Rauch 2003).

1.5.1 Cyclin D1

Cyclin D1 ist in der mittleren bis späten G1-Phase maximal exprimiert (Scott 2005) und spielt somit, zusammen mit Cyclin E (Sherr 1996), eine Rolle beim

Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Da die Menge von Cyclin D1 dabei ausschlaggebend ist, muss sie sehr genau reguliert werden. Eine Überexpression beschleunigt die G1-Phase und regt somit direkt die Zellproliferation an (Ronchini 2001). In manchen Zelltypen kann Cyclin D1 jedoch auch zum Zellzyklusarrest führen (Zwijzen 1996; Del Sal 1996) und/oder die Apoptose induzieren (Sofer-Levi 1996; Kranenburg 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Cyclin D1 ein direktes Ziel von Notch 1 und Notch 3 im Notch Rezeptor JAG1 vermittelten Notch Signalweg in Mammakarzinomen darstellt (Cohen 2009). Cyclin D1 spielt zusammen mit anderen Onkogenen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Abweichende Cyclin D1 Konzentrationen wurden bereits in vielen menschlichen Tumoren gefunden (Hall 1996; Lee 2000; Rimerman 2000; Sherr 1996, Tetsu 1999). Die Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern zeigte eine Überexpression von Cyclin D1 beim Mamma-CA (Gillett 1994), Kopf- und Hals Squama-CA (Bartkova 1995; Darzynkiewicz 1996), Ösophagus-CA (Jiang 1992; Jiang 1993) und Rectum-CA (Bartkova 1994). Auch bei Gliomen ist eine Überexpression sowohl von Cyclin D1 als auch MIB-1 nachgewiesen, die mit dem Malignitätsgrad des Glioms ansteigt (Cavalla 1998; Sallinen 1999).

1.6 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Astrozytome bilden eine heterogene Gruppe von neoplastischen Raumforderungen des ZNS und stellen die häufigsten hirneigenen Tumore dar. Sie sind zwar im Vergleich zu anderen extrakraniellen Tumorentitäten seltener, haben jedoch vor allem in höheren WHO Graden eine sehr schlechte Prognose (Burger, 2002). Bisherige Strategien mit unterschiedlichen Ansätzen wie Angiogenese, Hemmung der Tyrosinkinase oder Einsatz von Alkylantien wie Carmustin oder Temozolomid haben nur geringe Verbesserungen hinsichtlich der Überlebenszeit erzielen können. Von daher ist die Erforschung neuer molekularer Ansatzpunkte weiterhin vordringlich.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 in Astrozytomen aller vier WHO-Grade und im Normalhirn auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Methoden.

Da die Notch Proteine an vielen Prozessen wie der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen beteiligt sind (Ronchini 2001) stellt sich nun die Frage, ob durch ihre Expression in verschiedenen Astrozytomgraden eine über die histopathologische Klassifizierung hinausgehende Aussage über die Aggressivität und die Überlebenszeit der Patienten gemacht werden kann, bzw. die Tumore innerhalb der einzelnen WHO-Grade weiter stratifiziert werden können. Aufgrund der in mehreren Studien beschriebenen inversen Korrelation von verschiedenen Notch Proteinen, untersucht diese Arbeit sowohl Notch 1 als auch Notch 2 und ihren Zusammenhang in den einzelnen WHO Graden I bis IV und im Normalhirn. Unter Umständen könnte der Notch Signalweg, bei entsprechender prognostischer Relevanz, einen neuen Ansatzpunkt zur Gliomtherapie darstellen. Für die anderen Mitglieder der Notch-Familie, Notch 3 und 4 existieren derzeit keine sicher funktionierenden paraffingängigen Antikörper, auch ist bisher keine wesentliche Rolle für Notch 3 und 4 in Neoplasien bekannt.

Cycline sind Proteine, die am Ablauf und der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind (Lüllmann-Rauch 2003). Cohen et al. 2009 zeigte, das Cyclin D1

ein direktes Ziel von Notch 1 und Notch 3 im Notch Rezeptor JAG1 vermittelten Notch Signalweg in Mammakarzinomen darstellte. Über ihre Expression in Astrozytomen gibt es widersprüchliche Aussagen (Sallinen 1999; Scott 2005) und in anderen Geweben führte eine Induktion von Cyclin D1 sowohl zur Aktivierung als auch zum Zellzyklus Arrest (Zwijsen 1996; Del Sal 1996). Deshalb wird in dieser Arbeit auch zusätzlich zu Notch 1 und Notch 2 die Cyclin D1 Expression untersucht um einen möglichen Zusammenhang zum Notch Signalweg und zur Malignität und Prognose in Astrozytomen treffen zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Definition und Auswahl der Gewebeproben

Für die vorliegende Arbeit wurden 305 in Paraffin eingebettete Astrozytomgewebeproben aus den Jahren 1991 bis 2007 aus dem Archiv des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen ausgewählt.

Darunter befanden sich 62 pilozytische Astrozytome WHO Grad I, 83 diffuse Astrozytome WHO Grad II (16 vom fibrillären, 4 vom gemistozytären und 2 vom protoplasmatischen Typ; 61 waren nicht näher klassifiziert), 78 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III und 82 Glioblastome WHO-Grad IV.

Der Altersdurchschnitt der Patienten stieg dabei mit der Malignität der Tumore von WHO Grad I-IV an und lag bei den pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I bei 22,50 Jahren (Min-Max: 1-77), bei den diffusen Astrozytomen WHO Grad II bei 45,01 Jahren (Min-Max: 18-77), bei den anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III bei 47,13 Jahren (Min-Max: 10-77) und bei den Glioblastomen WHO Grad IV bei 57,60 Jahren (Min-Max: 25-85).

In jedem WHO Grad (WHO Grad I-IV) wurden sowohl Primärtumore als auch Rezidive eingeschlossen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl der Primärtumore und Rezidivtumore der WHO Grade I-IV

	WHO°I	WHO°II	WHO°III	WHO°IV
Primärtumor	53	68	61	60
Rezidivtumor	8	9	17	22
o. A.	1	6	0	0
gesamt	62	83	78	82

MATERIAL UND METHODEN

Außerdem wurden von allen Tumorgewebeproben, sofern bekannt, der Entnahmeort dokumentiert und den beiden Hirnhälften sowie Hirnabschnitten bzw. einen oder mehreren Lappen zugeordnet (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Seiten- und Lappenverteilung der WHO Grade I-IV

	WHO°I	WHO°II	WHO°III	WHO°IV
beide Hirnhälften	1	1	1	1
links	23	34	26	30
o. A.	25	18	10	2
rechts	13	30	41	49
gesamt	62	83	78	82
frontal	-	26	19	20
frontal,parietal	1	-	1	-
frontal,temporal	2	4	5	1
infratentoriell	35	3	1	2
mediobasal	3	-	-	-
o. A.	2	15	8	2
okzipital	3	2	4	10
parietal	2	5	3	4
Stammganglien	-	2	-	-
parietal,okzipital	2	-	4	2
temporal	8	20	24	36
temporal,okzipital	1	1	1	2
temporal,parietal	-	2	1	3
Thalamus	1	2	2	-
ventrikulär	2	1	5	-
gesamt	62	83	78	82

MATERIAL UND METHODEN

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an pathologischem Gewebe mit denen an physiologischem Hirngewebe vergleichen zu können, wurden 95 Gewebeproben aus unterschiedlichen Hirnabschnitten von 8 Autopsiefällen aus einer Normalhirnbank des Instituts für Hirnforschung der Universität Tübingen untersucht (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Normalhirnproben (NH) in unterschiedlichen Hirnabschnitten

	NH 1	NH 2	NH 3	NH 4	NH 5	NH 6	NH 7	NH 8
Frontal-Rinde	1	1	1	1	1	1	1	1
Frontal-Mark	1	1	1	1	1	1	1	1
Temporal	1	1	1	1	1	-	-	2
Okzipital-Rinde	1	1	1	1	1	1	1	1
Okzipital-Mark	1	1	1	1	1	1	1	1
Hippocampus	2	1	2	2	2	1	1	2
Subst. Nigra	1	1	1	1	1	1	1	1
Cerebellum	1	-	1	1	1	1	1	1
Pons	1	1	1	1	1	1	1	1
Striatum	-	-	1	-	1	1	1	1
Cingulum	-	1	-	-	-	-	-	-
Putamen	-	1	-	1	1	-	-	-
L. Coeruleus	-	2	-	1	-	-	-	1
Medulla obl.	-	1	1	1	1	1	1	1
gesamt	10	13	12	13	13	10	10	14

Die Tumorgewebeproben wurden von Patienten, die in den Jahren 1991 bis 2007 in der Abteilung für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen operiert wurden, gewonnen.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen hatte keine Einwände für die Verwendung der Paraffingewebeblöcke für diese Arbeit.

2.2 Mikroskopische und histologische Beurteilung

Die ausgewählten Tumorproben wurden von mindestens zwei Neuropathologen, in den meisten Fällen sogar von drei Neuropathologen mikroskopiert und nach den aktuellsten WHO Kriterien (Louis 2007) klassifiziert. Für die Fälle die zusätzlich in das Deutsche Gliomverbundprojekt eingeschlossen waren, lag zusätzlich eine externe Referenzpathologie aus dem Hirntumorreferenzzentrum Bonn vor. Es wurden nur Tumorproben in die Studie eingeschlossen, die eindeutig klassifizierbar waren und bei denen Primärdiagnose und Referenzpathologie übereinstimmende Ergebnisse zeigten.

2.3 Herstellung der histologischen Präparate

Nach der operativen Entnahme der Hirngewebeproben wurden diese direkt in 4%-igem Formalin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert (pH 7.4). Nach ausreichender Fixationsdauer erfolgte die Überführung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%) und zweimaliger Entwässerung in einem Gemisch aus 100%- igem Alkohol und Chloroform (1:1) sowie unverdünntem Chloroform. Danach wurden die entnommenen Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Nachdem die Paraffinblöcken an einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Deutschland) geschnitten wurden, wurden die ca. 4 µm dicken Schnitte auf Objektträger (Superfrost Plus Objektträger; Firma R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik Teningen, Deutschland) aufgezogen. Die Vorbereitung der Schnitte für immunhistochemische Methoden erfolgte durch die dreimalige Entparaffinierung in Chloroform für 10 min und anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70 %, destilliertes Wasser) für jeweils 5 min.

2.4 Konstruktion des TMA-Paraffinblocks

Die Gewebeanordnung der einzelnen Proben mittels eines TMA-Paraffinblocks (Tissue microarray) bietet die Möglichkeit einer schnelleren und somit effizienteren Gewebeaufarbeitung im Rahmen immunhistochemischer

Untersuchungsansätze. Diese Methode wurde erstmals 1998 (Kononen 1998) beschrieben und erlaubt die Einbettung, je nach Gewebeart und Blockgröße, von bis zu 1000 Gewebeproben auf einen Paraffinblock. Somit können nach dem Schneiden dieses Blocks mit einer immunhistochemischen Färbung alle auf diesem Block vorhandenen Gewebeproben gleichzeitig mit derselben Methode gefärbt werden.

Auf den TMA-Paraffinblöcken dieser Arbeit befanden sich bis zu 94 Gewebezylinder, in 33 Fällen wurde mehr als ein Zylinder von demselben Tumor angefertigt, um etwaige Heterogenitäten erfassen zu können.

Zur Herstellung der TMA-Paraffinblöcke wurden zuerst die HE gefärbten Schnitte der Donorparaffinblöcke lichtmikroskopisch beurteilt und an den zu untersuchenden, repräsentativen Tumorarealen mit Hilfe eines farbigen Stiftes markiert. Danach wurden die markierten Areale der HE-gefärbten Schnitte deckungsgleich auf die jeweiligen Donorblöcke übertragen. Die Markierung der gewünschten Tumorareale war für den Ausschluss unerwünschter Gewebeproben wie z.B. großflächige Nekrosen oder Einblutungen unerlässlich. Im weiteren Verlauf wurden die ausgesuchten Gewebeareale nicht weiter selektioniert.

Die Tissue microarrays wurden nach der Methode von Kononen et al. (Kononen 1998) mit Hilfe einer TMA-Maschine (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA) hergestellt. Dabei wurden im Abstand von ca 1,5 mm Löcher in einen Akzeptor-Paraffinblock (frischer Paraffinblock) gestanzt, die sofort mit den ausgewählten Gewebezylindern aus den Donor-Blöcken (Zielgewebe-Blöcke) aufgefüllt wurden. Um eine exakte Positionierung des frischen Akzeptor-Paraffinblocks zu gewährleisten, wurde dieser durch Festschrauben, mit kleinen nachjustierbaren Schrauben, auf der Plattform der TMA-Maschine fixiert. Mit einer dünnen Stanze von 600 µm Durchmesser wurden dünne Gewebezylinder aus dem Donor-Block herausgestanzt, um dann mit Hilfe von x-y-Mikrometerschrauben am Akzeptor-Paraffinblock in die gewünschte Position gebracht zu werden. Diese Mikrometerschrauben lassen eine exakte Veränderung und Justierung der Position zu. Um Gewebeverluste beim

Schneiden des neu entstandenen TMA-Blocks zu vermeiden, wurde die Anzahl der Gewebeproben auf 110 (maximal 11 Reihen und 10 Spalten) limitiert. Um ein eventuelles Herausgleiten der Gewebezylinder beim Schneidevorgang zu verhindern, wurden die fertigen TMA-Blöcke zum Schluss mit einem auf 42°C vorgeheizten Objektträger versiegelt.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind jeweils gegen die unten aufgeführten Antigene gerichtet. Es wurden für alle oben erwähnten Tumorgewebe- und Normalhirnproben die immunhistochemischen Färbungen für die jeweiligen Antikörper durchgeführt (s. Tabelle 4).

2.5.1.1 Notch 1

Der Primärantikörper gegen Notch 1 wurde von der Firma Abcam, Cambridge, UK geliefert (Konzentration 0.20 mg/ml) und in einer Verdünnung mit TBS von 1:100 verwendet. Er ist ein monoklonaler IgG2b Antikörper aus der Maus (s. Tabelle 4).

2.5.1.2 Notch 2

Als Primärantikörper gegen Notch 2 wurde ein polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Die Verdünnung mit TBS betrug 1:500. Der verwendete Antikörper wurde von der Firma Lifespan Biosciences, Seattle, WA (USA) in einer Konzentration von 85 mg/ml geliefert (s. Tabelle 4).

2.5.1.3 Cyclin D1

Der gegen Cyclin D1 gerichtete Primärantikörper ist ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG2a und wurde in einer Konzentration von 320 mg/l von der Firma Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark geliefert. Er stammt aus der Maus und wurde in einer Verdünnung mit TBS von 1:100 verwendet (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften

Antikörper	<u>Notch 1</u>	<u>Notch 2</u>	<u>CyclinD1</u>
Spezifität	polyklonal	monoklonal	Monoklonal
Konzentration	0,20 mg/ml	85 mg/ml	320 mg/l
Verdünnung	1:100	1:500	1:100
Entwicklungszeit von Hand	25 sec	3 min	-
Entwicklungszeit mit Maschine	30 min	30 min	32 min
Sekundär Antikörper	Anti-Maus	Anti-Kaninchen	Anti-Maus
Positivkontrolle	Mamma-CA (s. Abbildung 3A)	Niere (s. Abbildung 3C)	Glioblastom (s. Abbildung 3E)
Negativkontrolle	Glioblastom (s. Abbildung 3B)	Niere (s. Abbildung 3D)	Glioblastom (s. Abbildung 3F)

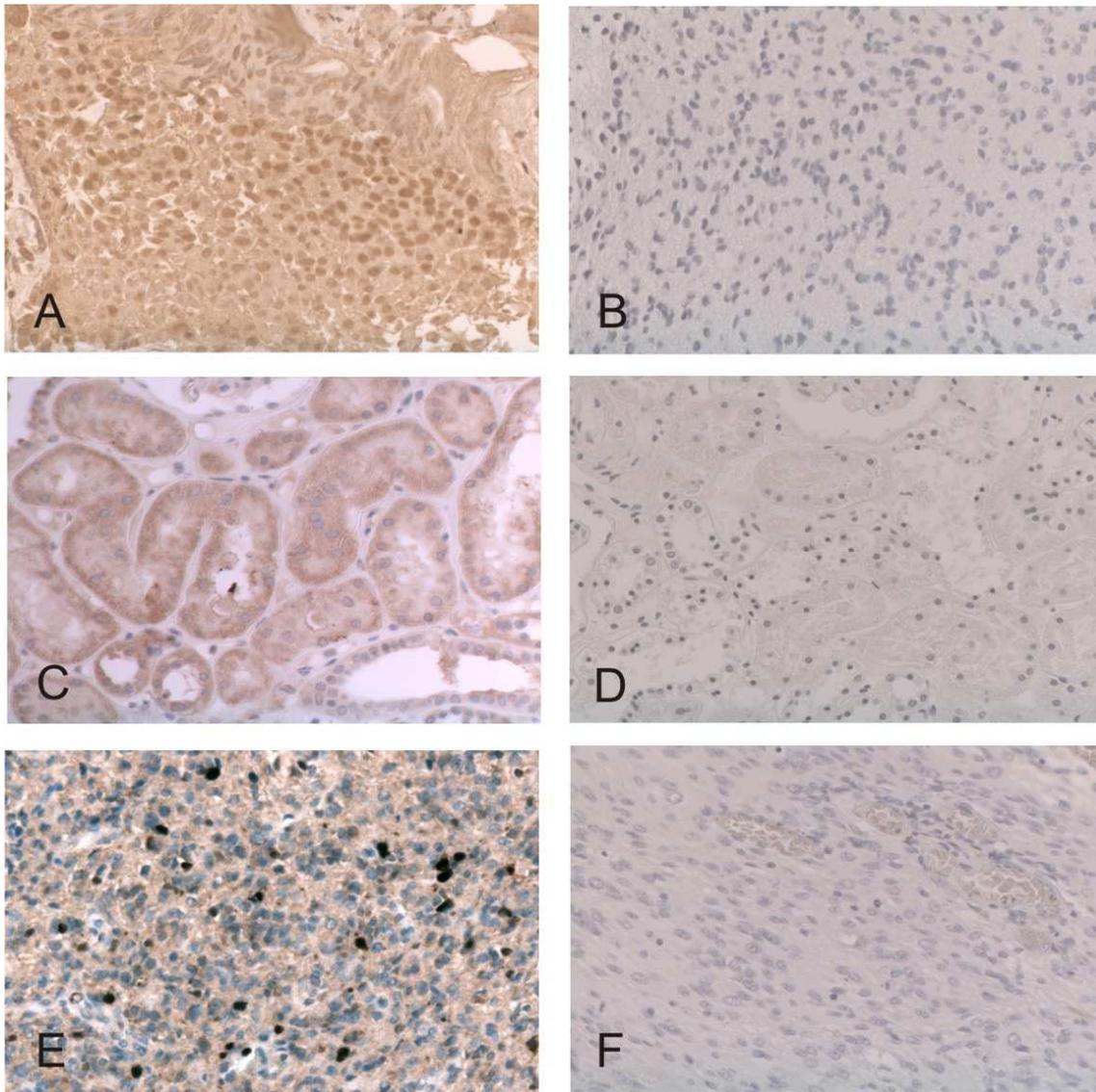


Abb. 3: Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbungen mit Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1.

- (A) Notch 1 Positivkontrolle Mamma-CA .
- (B) Notch 1 Negativkontrolle Glioblastom.
- (C) Notch 2 Positivkontrolle Niere.
- (D) Notch 2 Negativkontrolle Niere.
- (E) Cyclin D1 Positivkontrolle Glioblastom.
- (F) Cyclin D1 Negativkontrolle Glioblastom.

2.5.2 Vorbehandlung und immunhistochemische Färbung

Es wurden zuerst einige Probeschnitte von Kontrollgewebe bestehend aus Glioblastomen WHO Grad IV, Haut und Niere manuell und mit der automatischen Färbemaschine (Ventana BenchMark ICH/ISH Färbemodul, Tucson, AZ (USA)) gefärbt und dann ausgewertet und verglichen. Da der Kontrast bei den maschinell gefärbten Schnitten besser war, wurden die eigentlichen Studienschnitte (TMA-Schnitte der WHO Grade I-IV) jeweils mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle (s. Tabelle 4 und Abbildung 3) mit der Maschine gefärbt.

2.5.2.1 Manuelle immunhistochemische Färbung

Zur Demaskierung d.h. Freilegung der Antikörper wurden alle entparaffinierten Schnitte einer Vorbehandlung unterzogen. Hierzu wurden sie nach absteigender Alkoholreihe und 30 min Chloroformbad in einem Citratpuffer (pH 6) für 15 min gekocht.

Nach dem Abkühlen und Waschen wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mit einem Gemisch aus 190 ml 100%-igem Methanol und 60 ml Wasserstoffperoxid für 15 min blockiert.

Nach erneutem Waschen erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch das Bedecken der Schnitte mit jeweils 100 µl TBS/BSA (BSA: 1 mg/ml) mit 10% Schweineserum für 15 min.

Danach wurde je Schnitt jeweils 100 µl eines Primärantikörpers (Verdünnungen s. Tabelle 3) aufgetragen und alle Schnitte im Kühlraum bei 4°C über Nacht inkubiert.

Abhängig von der Spezies des Primärantikörpers wurde jeweils wieder 100 µl des jeweiligen Sekundärantikörpers (DAKO, Glostrup, Dänemark) (Sekundärantikörper s. Tabelle 3) 1:400 mit TBS/BSA verdünnt aufgetragen und für 30 min inkubiert.

Nach einem Waschgang in TBS wurde weitere 30 min mit einem Peroxidasegekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (ABC, DAKO) inkubiert und dann eine Entwicklung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (Entwicklungszeiten s. Tabelle 3) zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Bindung als Chromogen durchgeführt (Hsu 1981).

Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden alle Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, um dann, nach einer Differenzierung in HCl-Alkohol (0,1%), in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%) für jeweils 2 min sowie dreimal 5 min im Xylolbad entwässert zu werden. Danach wurden die Schnitte mit einem Deckglas bestückt und mit Eukitt eingedeckelt.

Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurde in jedem Lauf eine Negativ- und eine Positivkontrolle (s. Tabelle 3) mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde über Nacht nur mit einer TBS-Lösung ohne Primärantikörper inkubiert, sodass eine unspezifische Bindung des Detektionssystems ausgeschlossen wurde. Die Positivkontrolle enthielt Gewebe für das in der Literatur eine Proteinexpression bekannt war, und somit der jeweilige Primärantikörper bestimmte Strukturen binden würde.

Verwendete Reagenzien

Farbstoffreagenzien

- DAB- Lösung

95 mg DAB (3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)) wurden in 180 ml Aqua dest. Gelöst, es folgten 20 ml Substratpuffer (10-fach) und 700 µl Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt).

- Avidin-Biotin-Komplex

Reagenzien: Avidin (A), biotinylierte Meerrettichperoxidase (B) (DAKO, Glostrup, Dänemark), pH 7,2, 5 µl Lösung (A) und 5 µl Lösung (B)

wurden mit 1000 µl TBS-Gebrauchslösung 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt.

Lösungen

- Citratpuffer-Stammlösung

21,1 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck 244, Darmstadt) gelöst in 1000 ml Aqua dest. = 0,1 M und auf pH 6 eingestellt.

- Citratpuffer-Gebrauchslösung

Citratpuffer-Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.

- Schweineserum (Blockierungslösung)

Gebrauchslösung: Verdünnung 1:10 mit TBS/ Albuminpuffer

- Substratpuffer (10-fach)

21 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt), 34 g Imidazol (Fluka, Neu-Ulm) und 29,2 g NaCl wurden in 500 ml Aqua dest. Gelöst. Kontrolle des pH-Wertes auf 7,0.

- TBS-Stammlösung

60,6g Tris und 163,6g NaCl wurden in 1500 ml Aqua dest. Gelöst und mit 25 % HCl auf pH 7,5 eingestellt.

Danach wurde die Lösung auf 2 Liter mit Aqua dest. Aufgefüllt.

- TBS-Gebrauchslösung

TBS-Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.

- TBS/ BSA- Puffer

50 mg Albumin Bovine Fraction V (Serva, Frankreich) gelöst in 50 ml TBS-Puffer

2.5.2.2 Immunhistochemische Färbung mit der Maschine

Zuerst wurde der Objektträger auf 75°C aufgeheizt und für 4 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von EZ Prep Vol. (einem Puffer zur Einstellung des pH-Wertes) und es wurde wiederum 4 min inkubiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde auf 76°C erhitzt, wieder 4 min inkubiert, dann das Deparaffinierungsvolumen ausgeglichen, ein Coverslip (zum Flüssigkeitsausgleich) aufgetragen und bei 42°C für 2 min inkubiert.

Nach dem Waschen des Objektträgers wurde der Cell Conditioner Nr. 1 (EDTA-Puffer) mittellang und dann zusammen mit dem Coverslip lang aufgetragen und dann bei 95°C für 8 min inkubiert. Danach wurde dieser Schritt mit einer Inkubationszeit von 4 min bei 100°C noch zweimal wiederholt und danach ein EZ Prep CC Adjust (zur pH Korrektur) hinzugefügt und für weitere 4 min inkubiert. Für die Notch 1 Färbung wurde der Cell Conditioner Nr.1 noch zweimal nach diesem Schema aufgetragen, für Notch 2 noch zehnmal (nach je vier Zyklen einmal EZ Prep CC Adjust) und für Cyclin D1 noch sechsmal (nach je vier Zyklen einmal EZ Prep CC Adjust). Danach wurde die Objektträger-Heizung ausgeschaltet, für 8 min inkubiert, der Objektträger gewaschen, das Volumen angepasst und erneut der Coverslip aufgetragen.

Nach dem Auswählen des Reaction Buffer wurde wieder 2 min bei 42°C inkubiert, 1 Tropfen I-View Inhibitor und Coverslip aufgetragen und 4 min inkubiert. Nach dem Waschen des Objektträgers wurde dann für Notch 1 und Notch 2 von Hand der Primärantikörper (s. Tabelle 3) aufgetragen und für 30 min inkubiert und für Cyclin D1 maschinell 1 Tropfen Cyclin D1-Antikörper (s. Tabelle 3) und LCS aufgetragen und für 32 min inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurde ein Tropfen Amplifier A aufgetragen, gewaschen, ein Tropfen Amplifier B aufgetragen, gewaschen und dann mit zwischenwaschen je noch ein Tropfen Blocker A und Blocker B aufgetragen. Für die Notch 1 Färbung wurde der Amplifier A und B Schritt ausgelassen.

Dann wurde 1 Tropfen I-View Biotin Ig (Immunglobulin) und Coverslip aufgetragen, für 8 min inkubiert, gewaschen, 1 Tropfen I-View SA-HRP und

Coverslip aufgetragen, für 8 min inkubiert, gewaschen, 1 Tropfen I-View DAB (Diaminobenzidin), I-View H202 und LCS aufgetragen, für 8 min inkubiert und erneut gewaschen. Nach dem Auftragen von einem Tropfen I-View Copper (zur Kontrastierung) und Coverslip und Inkubation von 4 min wurde nochmal gewaschen, das Volumen angepasst und erneut der Coverslip aufgetragen.

Zur Gegenfärbung und Sichtbarmachung der Zellkerne wurde 1 Tropfen von Counterstain 1 (Hämalaun) und LCS benutzt und für 2 min inkubiert. Danach wurde der Objektträger ein letztes Mal gewaschen.

Zur Überprüfung der Spezifität der Methode wurde auch bei den Färbungen mit der Maschine eine Negativ- und eine Positivkontrolle (s. Tabelle 3) mitgeführt.

2.6 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung

Die Auszählung der drei Antikörper erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, VANOX AHBT3, Hamburg, Deutschland) für Notch 1 und Cyclin D1 bei einer 200-fachen und für Notch 2 bei einer 100-fachen Vergrößerung.

Mit Hilfe eines Zähllokulars (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde die Auswertung der TMA-Gewebeproben quantitativ durchgeführt. Um eine willkürliche Auswahl und Doppelzählungen zu vermeiden, wurde pro Gewebestanze kästchenweise von oben links mäanderförmig alle Zellen ausgezählt, bis genau 100 Zellen gezählt waren oder alle Zellen der Stanze, wenn es weniger als 100 Zellen waren. Eine eindeutige zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung wurden als positiv gewertet.

Zellen in Blutgefäßen und wenig positiv gefärbte Strukturen, die nicht eindeutig einer Zelle zugeordnet werden konnten, wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit einer Digitalkamera, ProgRes10 der Firma Jenoptik (Jena, Deutschland) mit einer Auflösung von 5 Megapixeln aufgenommen.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software: JMP Version 6.0 (SAS Institute, Cary, NJ, USA) durchgeführt. Für die Vergleiche der Notch 1, Notch 2 oder Cyclin D1 Expression in den einzelnen WHO Graden, des Geschlechts sowie der Primär- bzw. Rezidivtumore wurde eine univariate Varianzanalyse und für den Altersvergleich eine einfache logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte der einzelnen WHO Grade wurde ein Student-t Test angeschlossen. Für die Korrelationsanalysen der Faktoren untereinander wurde die Multivariatenanalyse mit nichtparametrischem Vergleich der Gruppen und nachfolgender Bestimmung des Spearman- Koeffizienten (Spearman's rho) verwendet. Außerdem wurde eine parametrische Überlebenszeitanalyse für die WHO Grade II bis IV unter Berücksichtigung des Alters für Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 durchgeführt. Der Vergleich der Kollektive (Teilung der Notch 1-, Notch 2- und Cyclin D1-positiven Proben in zwei Gruppen durch den Median [Notch 1: Median 67, Notch 2: Median 3, Cyclin D1: Median 10]) für die jeweiligen WHO Grade II-IV erfolgte mit der Kaplan-Meier Methode mit anschließender Bestimmung des log-Rank Wertes. Bei allen Auswertungen wurden p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant und p-Werte kleiner 0,0001 als hochsignifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Notch 1

Immunhistochemisch wurde bei der Notch 1 Expression im Tumorgewebe eine nukleäre Färbung und eine etwas weniger starke, diffuse zytoplasmatische Färbung beobachtet. Am stärksten war die nukleäre Färbung in Mitosen ausgeprägt. Im normalen ZNS waren die Neuronen etwas kräftiger gefärbt als das übrige Neuropil. Sowohl Endothelien als auch kollagene Anteile wurden ausgespart. Sowohl nukleär gefärbte Zellen, als auch stark zytoplasmatisch gefärbte Zellen wurden als positiv gewertet.

3.1.1 Vergleich der Notch 1 Expression der einzelnen WHO Grade

Bei der Notch 1 Expression der einzelnen WHO Grade zeigte sich eine stetige Zunahme des prozentualen Anteiles der Notch 1 positiven Zellen von pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I (35,04%; 95%er Konfidenzintervall (CI): 26,56-43,53) über diffuse Astrozytome WHO Grad II (59,46%; 95%CI: 54,56-64,36) und anaplastische Astrozytome WHO Grad III (59,93%; 95%CI: 54,43-65,43) zu den Glioblastomen WHO Grad IV (73,55%; 95%CI: 68,35-78,74). Die Notch 1 Expression war im Normalhirn (43,64%; 95%CI: 38,32-48,96) höher als in der Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO Grad I (35,04%; 95%CI: 26,56-43,53), jedoch noch deutlich unter den Expressionswerten der diffusen Astrozytome (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

ERGEBNISSE

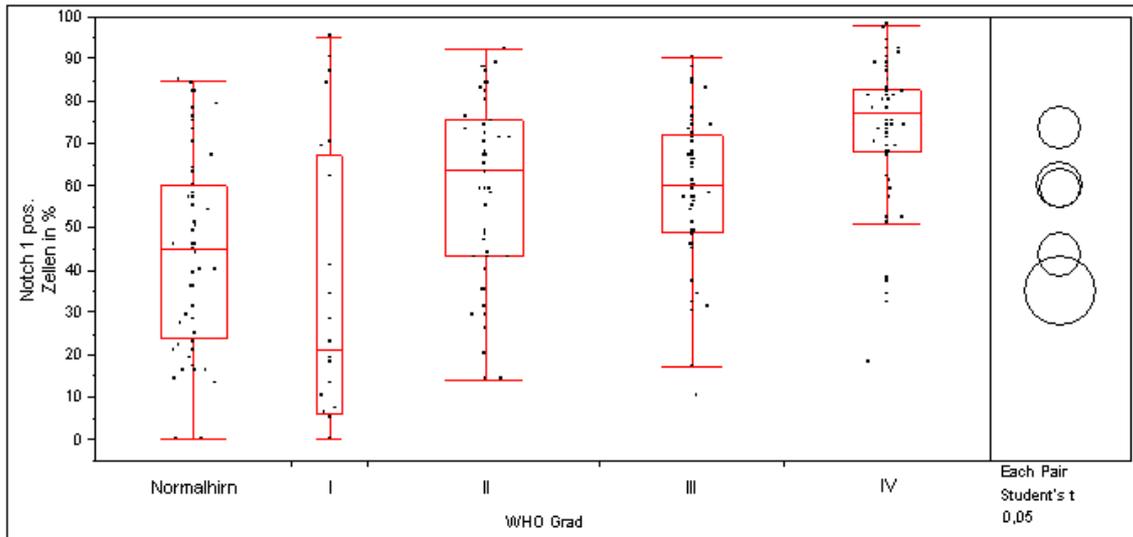


Abb. 4: Notch 1 Expression (in %) in Abhängigkeit von den einzelnen WHO Graden I bis IV und im Normalhirn.

Bei dem paarweisen Vergleichen der Mittelwerte zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) von WHO Grad I zu allen anderen WHO Graden (WHO Grad II-IV) und vom Normalhirn zur Gruppe der diffusen Astrozytome (WHO Grad II, WHO Grad III und WHO Grad IV). In allen Fällen wiesen die Notch 1 Expressionswerte in den Tumoren der WHO Grade II-IV signifikant höhere Werte auf. Eine signifikant höhere Notch 1 Expression zeigte sich außerdem in der Gruppe der Glioblastome WHO Grad IV im Vergleich zu den Astrozytomen WHO Grad II ($p = 0,0001$) beziehungsweise zu den anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III ($p = 0,0005$).

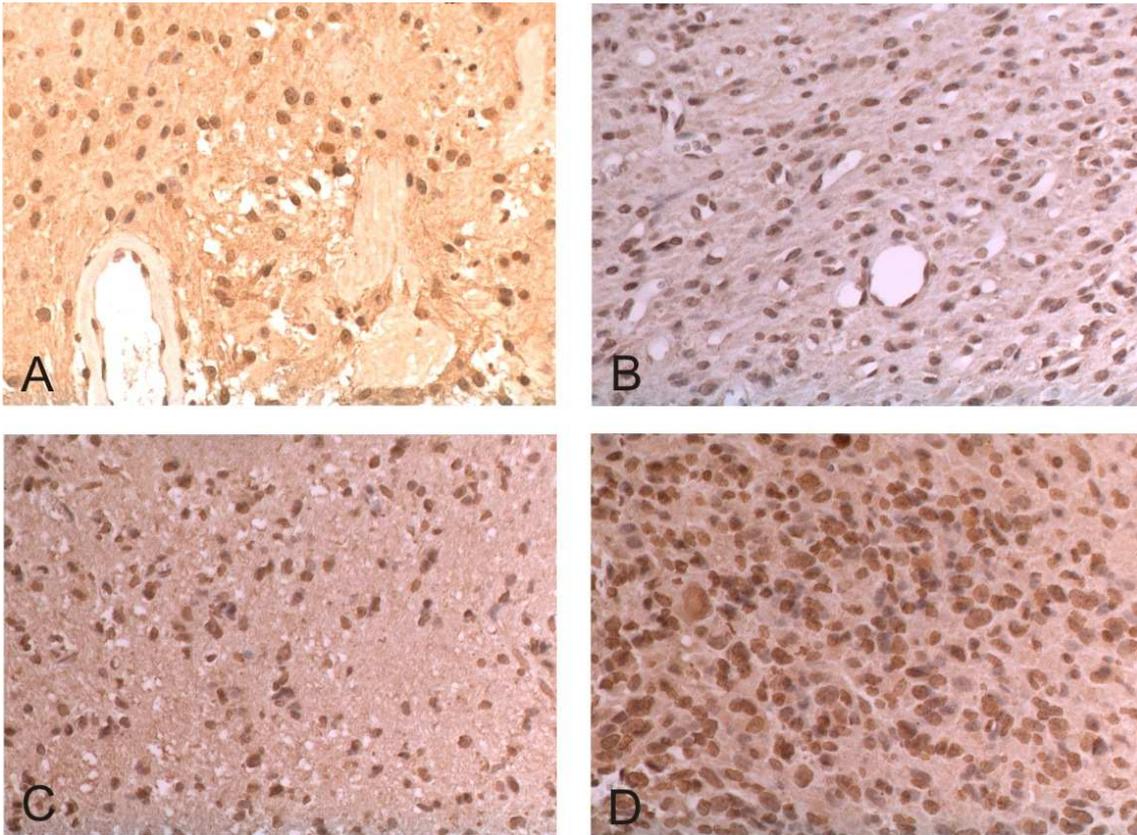


Abb. 5: Notch 1 Expression in der immunhistochemischen Färbung im pilozytischen Astrozytom WHO Grad I (A), diffusen Astrozytom WHO Grad II (B), anaplastischen Astrozytom WHO Grad III (C) und im Glioblastom WHO Grad IV (D).

3.1.2 Vergleich der Notch 1 Expression in Abhängigkeit des Alters

Mit steigendem Alter zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p=0,0001$) der Notch 1 positiven Zellen im Gesamtkollektiv der Tumore (s. Abbildung 6). Die Ergebnisse waren jedoch nach Auftrennung des Gesamtkollektives in die einzelnen WHO Grade für WHO Grad II ($p=0,6471$), WHO Grad III ($p=0,8305$) und WHO Grad IV ($p=0,6381$) nicht mehr signifikant. Für WHO Grad I zeigte sich darüber hinaus sogar mit steigendem Alter eine signifikante Abnahme ($p=0,0399$) der Notch 1 positiven Zellen (s. Abbildung 7).

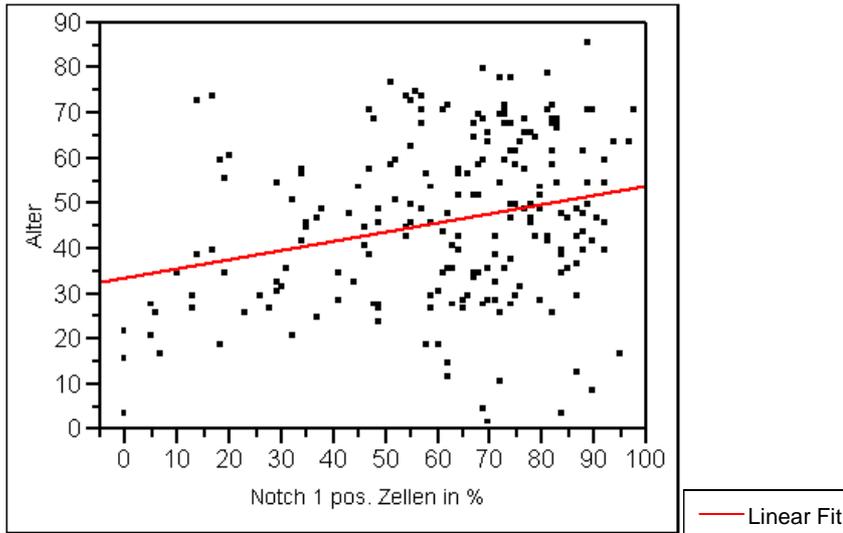


Abb. 6: Notch 1 Expression im Gesamtkollektiv astrozytärer Neoplasien (WHO I-IV) in Abhängigkeit des Alters.

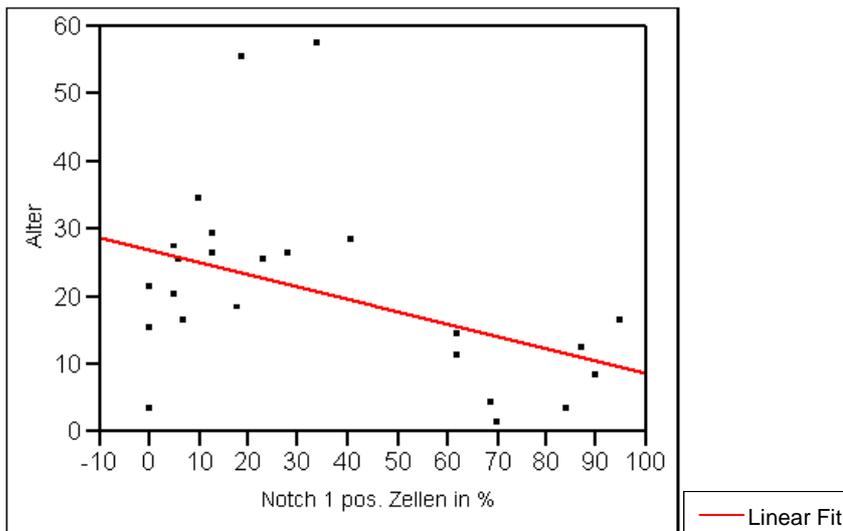


Abb. 7: Signifikante Notch 1 Expressionsreduktion in der Gruppe der pilozytischen Astrozytome WHO Grad I in Abhängigkeit des Alters.

3.1.3 Vergleich der Notch 1 Expression der beiden Geschlechter

In Bezug auf die beiden Geschlechter zeigte sich eine nahezu identische ($p=0,9968$) Expression von Notch 1. Im Mittel waren bei den Frauen 57,21%

(95%CI: 52,72-61,71) der Zellen Notch 1 positiv und bei den Männern 57,22% (95%CI: 53,51-60,94).

3.1.4 Vergleich der Notch 1 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren

Bei den diffusen Astrozytomen WHO Grad II zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,2305$) in der Notch 1 Expression zwischen Primär- und Rezidivtumoren. Bei den Primärtumoren waren im Mittel 59,00% (95%CI: 53,40-64,60) Zellen positiv, während die Werte der Rezidive mit 68,33% (95%CI: 53,99-82,68) geringfügig höher ausfielen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der niedriggradigen Tumore zeigte die Notch 1 Expression in der Gruppe der anaplastischen Astrozytome WHO Grad III eine signifikant höhere Expression in den Rezidiven ($p=0,0463$) als in den jeweiligen Primärtumoren. Im Mittel waren bei den Primärtumoren 57,28% (95%CI: 52,19-62,37) und bei den Rezidivtumoren 67,47% (95%CI: 58,84-76,09) der Zellen Notch 1 positiv.

Innerhalb der Gruppe der Glioblastome WHO Grad IV waren bei den Primärtumoren im Mittel 71,74% (95%CI: 66,98-76,50) der Zellen Notch 1 positiv und fielen bei den Rezidivtumoren mit 79,29% (95%CI: 71,46-87,13) noch höher aus. Es zeigte sich jedoch aufgrund der breiteren Streuung kein signifikanter Unterschied ($p=0,1044$) zwischen diesen beiden Gruppen.

3.1.5. Vergleich der Notch 1 Expression nach Lokalisation

Es zeigte sich initial eine signifikant höhere ($p=0,0051$) Notch 1 Expression in den Gewebeproben der rechten Hemisphäre (66,48%; 95%CI: 62,14-70,82) als in denen der linken Hirnhälfte (56,88%; 95%CI: 51,80-61,97). Bei der weiteren Unterverteilung auf die einzelnen Hirnlappen frontal (62,38%; 95%CI: 56,54-68,21), temporal (64,01%; 95%CI: 58,91-69,11), parietal (70,75%; 95%CI: 58,26-83,23) und okzipital (76,45%; 95%CI: 63,41-89,50) zeigten sich jedoch keine Unterschiede mehr (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: p-Werte im Einzelvergleich der jeweiligen Hirnlappen

Lappen	Lappen	p-Wert
okzipital	frontal	0,0535
okzipital	temporal	0,0812
parietal	frontal	0,2321
parietal	temporal	0,3252
okzipital	parietal	0,5333
temporal	frontal	0,6777

3.2 Notch 2

Bei der Analyse der Notch 2 Expression zeigte sich eine starke nukleäre Färbung der Notch 2 positiven Zellen und sehr selten auch eine leichte zytoplasmatische Färbung. In Gefäßen und inflammatorischen Zellen konnte keine nukleäre Expression beobachtet werden. In der Auswertung wurden nur eindeutig nukleär gefärbte Zellen berücksichtigt.

3.2.1 Vergleich der Notch 2 Expression der einzelnen WHO Grade

In der Notch 2 Expression der einzelnen WHO Grade zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Notch 2 positiven Zellen von pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I (8,21%; 95%CI: 6,15-10,27) über Astrozytome WHO Grad II (7,46%; 95%CI: 6,25-8,66) und anaplastische Astrozytome WHO Grad III (3,05%; 95%CI: 1,74-4,37) zu Glioblastomen WHO Grad IV (2,35%; 95%CI: 1,10-3,61). Die Notch 2 Expression des Normalhirns (7,60%; 95%CI: 6,36-8,83) war jedoch niedriger als im WHO Grad I (8,21%; 95%CI: 6,15-10,27) und lag somit etwa auf dem Niveau der diffusen Astrozytome Grad II WHO (s. Abbildung 8 und Abbildung 9).

ERGEBNISSE

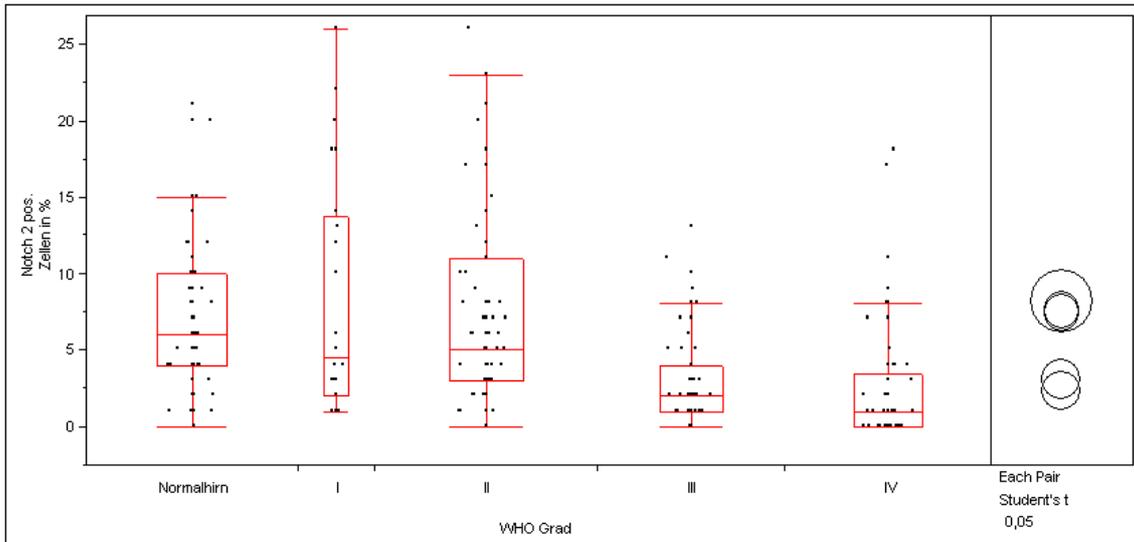


Abb. 8: Notch 2 Expression der einzelnen WHO Grade I bis IV und im Normalhirn.

Beim paarweisen Vergleich der Mittelwerte zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme der Notch 2 Expression ($p < 0,0001$) von Normalhirn und niedriggradigen Gliomen (WHO Grad I und WHO Grad II) zu den höhergradigen Gliomen (WHO Grad III als auch WHO Grad IV).

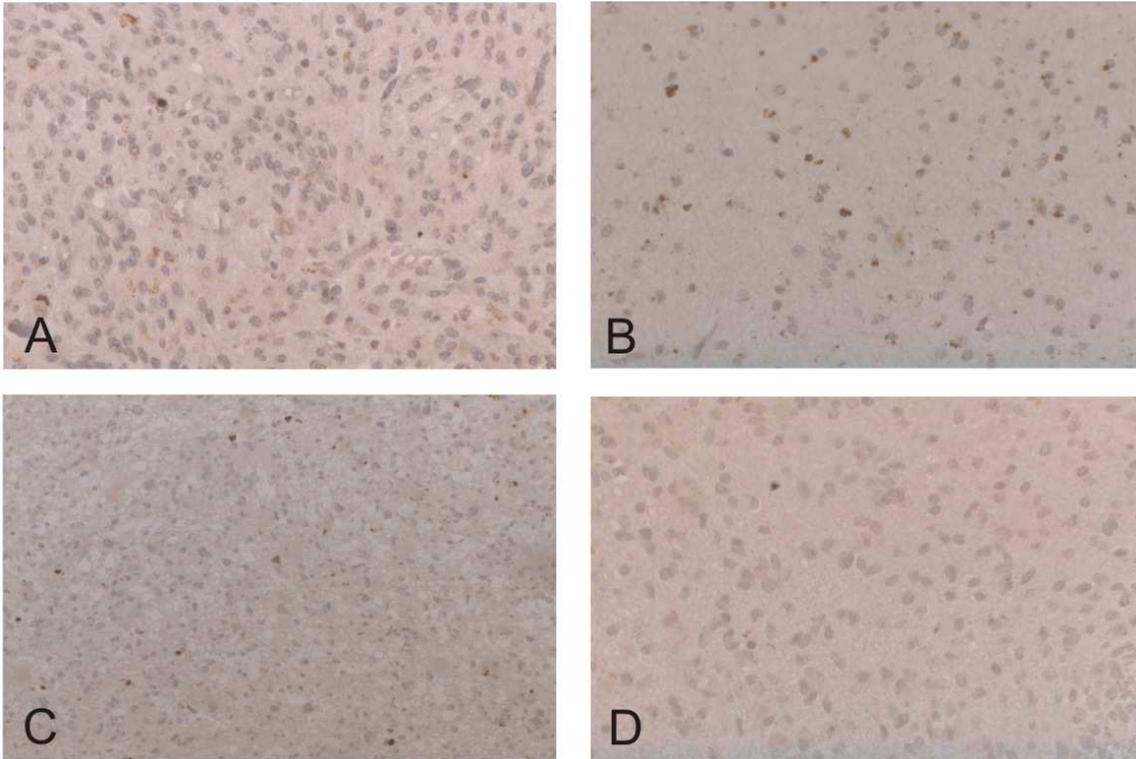


Abb. 9: Nukleäre Notch 2 Expression in der immunhistochemischen Färbung in einzelnen Tumorzellen im pilozytischen Astrozytom WHO Grad I (A), diffusen Astrozytom WHO Grad II (B), anaplastischen Astrozytom WHO Grad III (C) und im Glioblastom WHO Grad IV (D).

3.2.2 Vergleich der Notch 2 Expression in Abhängigkeit des Alters

Es zeigte sich im Gesamtkollektiv der Tumore kein Zusammenhang ($p=0,5008$) zwischen der Notch 2 Expression und dem Alter der Patienten. Diese Ergebnisse blieben auch nach Auftrennung in die einzelnen WHO Grade für WHO Grad I ($p=0,0537$), WHO Grad III ($p=0,2158$) und WHO Grad IV ($p=0,3133$) bestehen. Für den WHO Grad II ($p=0,0435$) zeigte sich jedoch eine, wenngleich geringe, signifikante Zunahme der Notch 2 Expression im Alter (s. Abbildung 10).

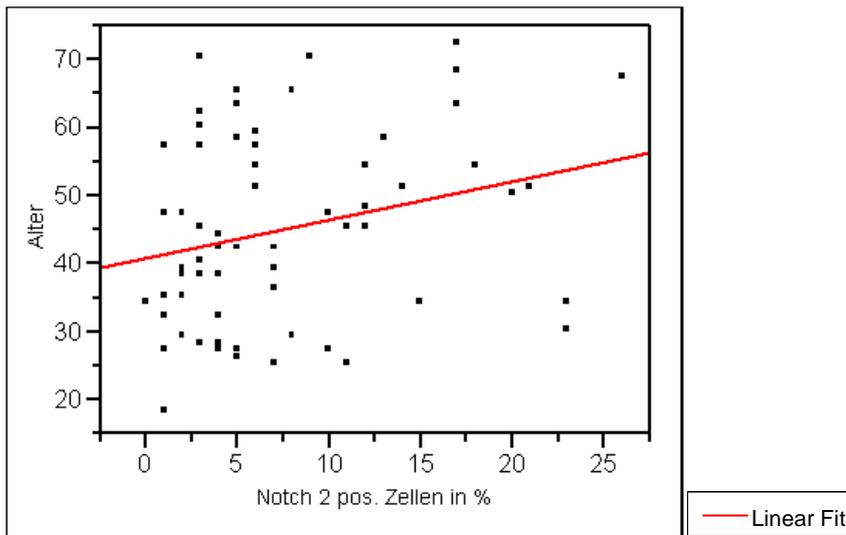


Abb. 10: Steigende Notch 2 Expression in diffusen Astrozytom WHO Grad II in Abhängigkeit des Alters.

3.2.3 Vergleich der Notch 2 Expression der beiden Geschlechter

Im Vergleich der Notch 2 positiven Zellen der beiden Geschlechter zeigte sich kein wesentlicher Unterschied ($p=0,136$). Im Mittel waren bei den Frauen 6,08% (95%CI: 5,05-7,11) der Zellen Notch 2 positiv während den Männern die Werte mit 5,06% (95%CI: 4,20-5,92) nur unwesentlich geringer ausfielen.

3.2.4 Vergleich der Notch 2 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren

Die Rezidivtumore (4,14%; 95%CI: 2,65-5,64) der anaplastischen Astrozytome WHO Grad III zeigten eine geringgradig höhere Notch 2 Expression als die Primärtumore (2,74%; 95%CI: 1,91-3,57) dieser Gruppe, es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,1059$) festgestellt werden.

Bei den diffusen Astrozytomen WHO Grad II und den Glioblastomen WHO Grad IV zeigte sich jedoch eine signifikant höhere ($p=0,0004$) Notch 2 Expression in den Rezidivtumoren (Grad II: 12,00%; 95%CI: 7,91-16,90; Grad IV: 5,13%; 95%CI: 3,39-6,86) als in den Primärtumoren (Grad II: 6,78%; 95%CI: 5,13-8,44; Grad IV: 1,40%; 95%CI: 0,39-2,40) (s. Abbildung 11).

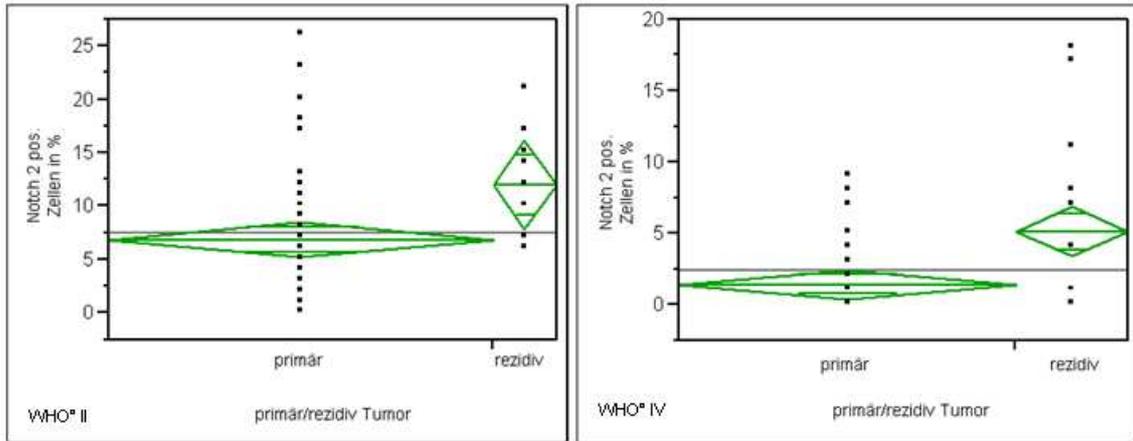


Abb. 11: Notch 2 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren in diffusen Astrozytomen WHO Grad II (links) und Glioblastomen WHO Grad IV (rechts).

3.3 Cyclin D1

Die Cyclin D1 Expression der Zellen zeigte sich meistens in einer kräftigen nukleären Färbung und nur gelegentlich auch in einer diffusen zytoplasmatischen Färbung. In den Endothelien konnte keine nukleäre Färbung beobachtet werden. Im normalen ZNS Gewebe war nur in einzelnen Kernen der Körnerzellschicht Cyclin D1 nachweisbar. Es wurden nur Zellen mit starker Kernfärbung gewertet.

3.3.1 Vergleich der Cyclin D1 Expression der einzelnen WHO Grade

Die Cyclin D1 Expression der einzelnen WHO Grade zeigte eine deutliche Abnahmen der Cyclin D1 positiven Zellen vom Normalhirn (18,29%; 95%CI: 15,84-20,75) zu WHO Grad II (10,84%; 95%CI: 8,46-13,22), WHO Grad III (8,56%; 95%CI: 5,89-11,23) und WHO Grad IV (6,69%; 95%CI: 4,24-9,15), wobei die pilozytischen Astrozytome WHO Grad I (4,42%; 95%CI: 0,38-8,46) jedoch den niedrigsten Expressionsgrad aller Gruppen aufwiesen (s. Abbildung 12 und Abbildung 13).

ERGEBNISSE

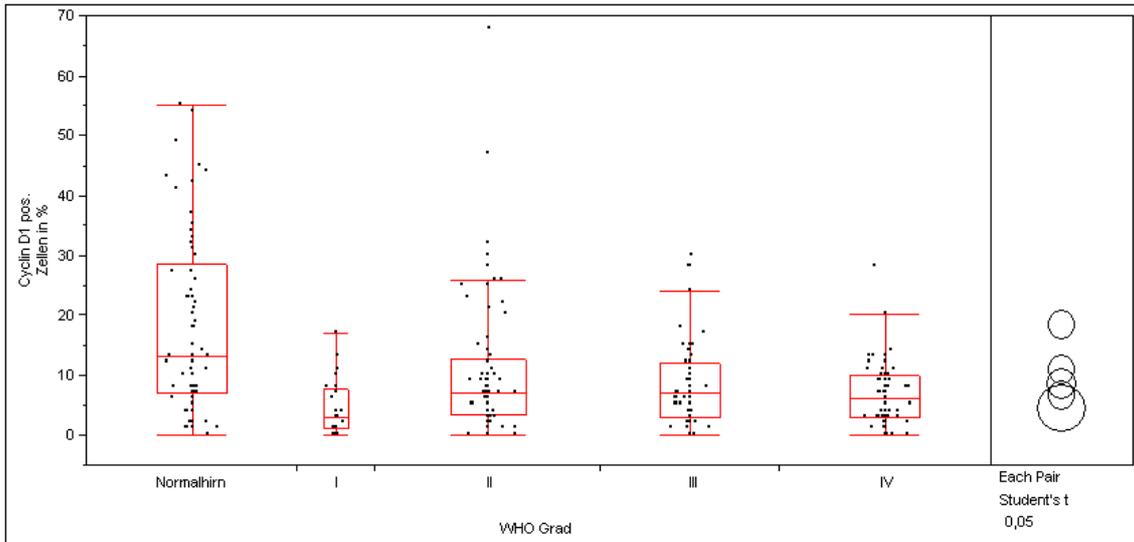


Abb. 12: Cyclin D1 Expression der einzelnen WHO Grade I bis IV und im Normalhirn.

Beim paarweisen Vergleich der Mittelwerte zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme der Cyclin D1 Expression ($p < 0,0001$) vom Normalhirn zu allen Tumorgruppen unabhängig von deren Dignität (WHO Grad I-IV). Eine signifikante Zunahme der Cyclin D1 Expression gab es von WHO Grad I zu WHO Grad II ($p = 0,0075$) und eine signifikante Expressionsabnahme von WHO Grad II zu WHO Grad IV ($p = 0,0177$).

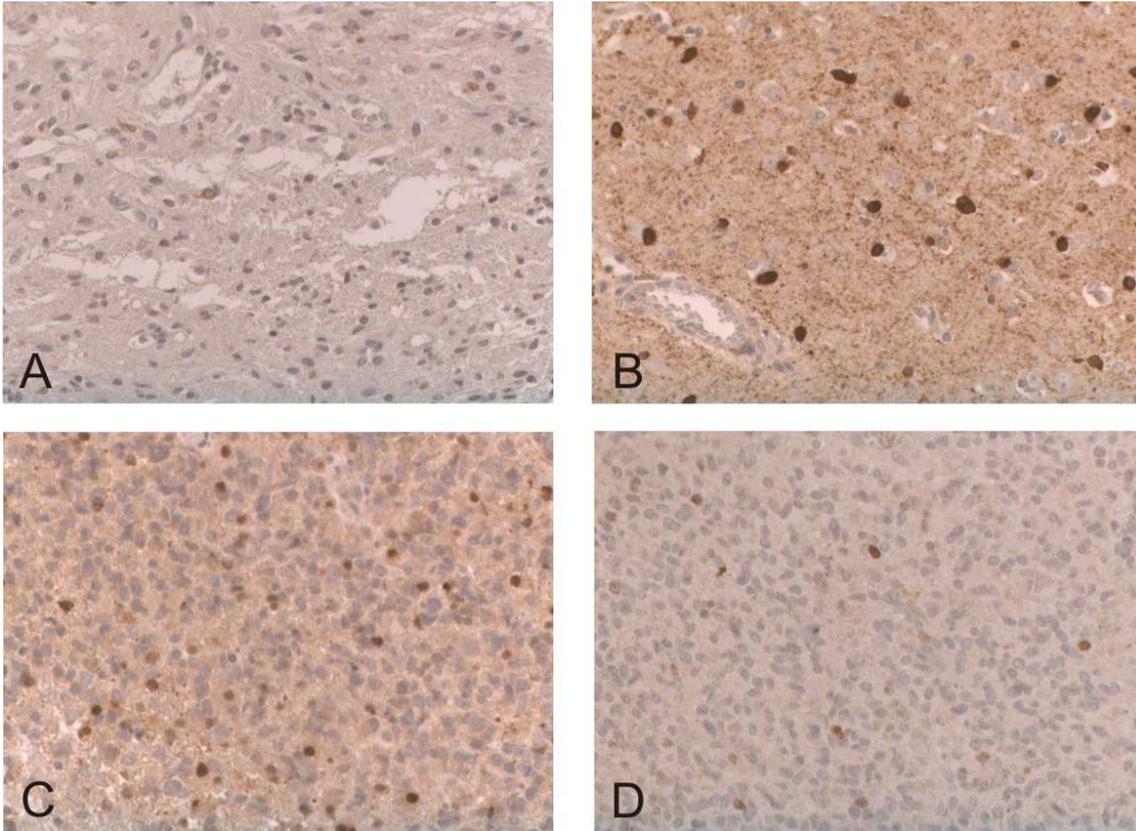


Abb. 13: Cyclin D1 Expression in der immunhistochemischen Färbung am Beispiel im pilozytischen Astrozytom WHO Grad I (A), diffusen Astrozytom WHO Grad II (B), anaplastischen Astrozytom WHO Grad III (C) und im Glioblastom WHO Grad IV (D).

3.3.2 Vergleich der Cyclin D1 Expression in Abhängigkeit des Alters

Zwischen dem Alter der Patienten und der Cyclin D1 Expression zeigte sich im Gesamtkollektiv der Tumore ($p=0,1123$) sowie nach Auftrennung in die einzelnen WHO Grade für WHO Grad I ($p=0,6358$) und WHO Grad III ($p=0,5391$) kein Zusammenhang. Für den WHO Grad II ($p=0,0085$) zeigte sich jedoch mit steigendem Alter ein signifikanter Anstieg der Cyclin D1 Expression und für den WHO Grad IV ($p=0,0217$) ein signifikanter Abfall der Expression von Cyclin D1 (s. Abbildung 14).

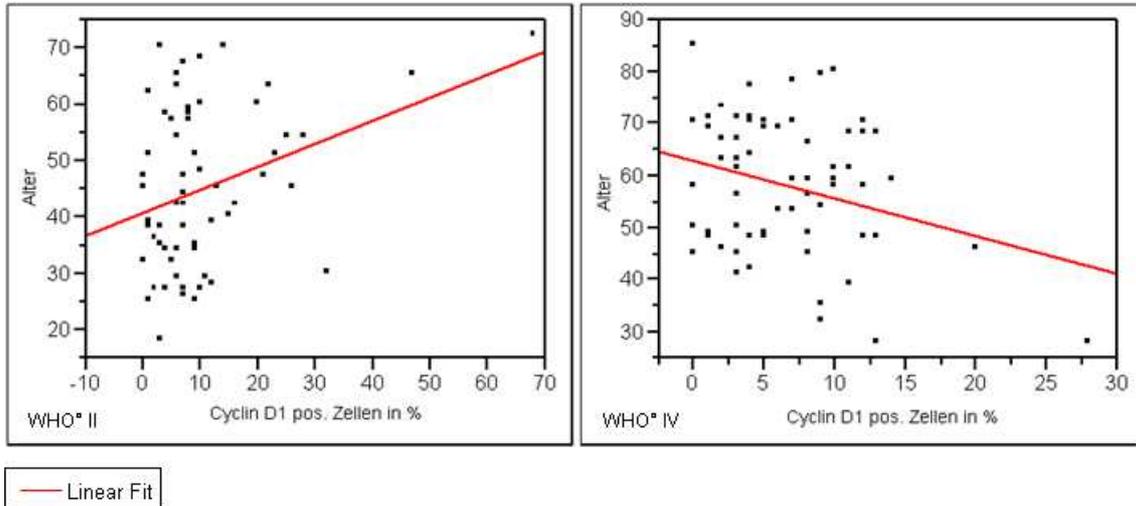


Abb. 14: Cyclin D1 Expression diffuser Astrozytome WHO Grad II und Glioblastome WHO Grad IV in Abhängigkeit des Alters zum Zeitpunkt der Diagnose (WHO Grad III: keine signifikanten Unterschiede).

3.3.3 Vergleich der Cyclin D1 Expression der beiden Geschlechter

In der Cyclin D1 Expression der beiden Geschlechter zeigte sich kein wesentlicher Unterschied ($p=0,2251$). Bei den Frauen waren im Mittel 9,91% (95%CI: 7,74-12,09) der Zellen Cyclin D1 positiv, bei den Männern 11,66% (95%CI: 9,84-13,48).

3.3.4 Vergleich der Cyclin D1 Expression bei Primär- bzw. Rezidivtumoren

Die Cyclin D1 Expression in der Gruppe der diffusen Astrozytome WHO Grad II zeigte keinen Zusammenhang ($p=0,8831$) zwischen Primärtumoren und Rezidiven. Im Mittel waren bei den Primärtumoren 10,50% (95%CI: 7,37-13,63) und bei den Rezidivtumoren 9,89% (95%CI: 2,23-17,55) der Zellen Cyclin D1 positiv.

Bei den Primärtumoren der anaplastischen Astrozytome WHO Grad III waren bei den Primärtumoren im Mittel 10,81% (95%CI: 7,06-14,55) der Zellen Cyclin D1 positiv und bei den Rezidivtumoren 8,08% (95%CI: 1,35-14,81). Es zeigte

sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,4799$) zwischen diesen beiden Gruppen.

Bei den Glioblastomen WHO Grad IV war in der Cyclin D1 Expression zwischen Primär- und Rezidivtumoren kein Zusammenhang feststellbar ($p=0,7141$). Bei den Primärtumoren waren im Mittel 6,57% (95%CI: 5,09-8,05) Zellen positiv und bei den Rezidiven 7,13% (95%CI: 4,46-9,80).

3.4 Korrelationsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 über alle WHO Grade

Es zeigte sich, selbst nach Korrektur für multiples Testen, eine signifikante positive Korrelation von Notch 2 positiven Zellen zu Cyclin D1 positiven Zellen von ($p=0,0157$; $\rho=0,1685$) und eine signifikant inverse Korrelation von Notch 1 und Notch 2 ($p=0,0046$; $\rho=-0,1974$). Für Notch 1 und Cyclin D1 konnte keine Korrelation nachgewiesen werden ($p=0,7844$; $\rho=0,0196$).

3.5 Korrelationsanalyse von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 im Einzelvergleich für jeden WHO Grad

Beim Vergleich der Marker in den einzelnen WHO Graden ergab sich nur für die diffusen Astrozytome WHO Grad II ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Notch 2 und Cyclin D1 Expression ($p=0,0056$, $\rho=0,3303$) (s. Abbildung 15) und eine signifikante inverse Korrelation ($p=0,0157$; $\rho=0,2941$) für Notch 1 und Notch 2 positive Zellen. Für Notch 1 und Cyclin D1 konnte in keinem der vier WHO Grade, wie auch bereits für das Gesamtkollektiv beobachtet, ein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

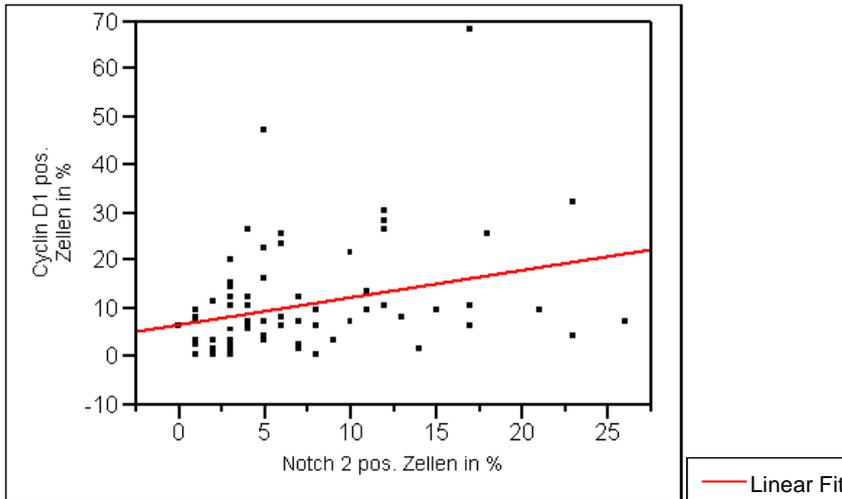


Abb. 15: Die Bivariatenanalyse der Notch 2 und Cyclin D1 Expression in diffusen Astrozytomen WHO Grad II zeigt eine positive Korrelation der beiden Werte.

3.6 Parametrische Überlebensanalyse

Für das Gesamtkollektiv der Tumore (WHO Grad I-IV) zeigte sich in der parametrischen Überlebensanalyse mit steigendem Alter eine hochsignifikant schlechtere Überlebenszeit ($p < 0,0001$).

Nach der Aufteilung in die einzelnen WHO Grade I-IV zeigte sich für die WHO Grade II ($p = 0,3262$) und III ($p = 0,0660$) noch keine signifikante Korrelation zwischen steigendem Alter und kürzerer Überlebenszeit. Für die WHO Grad IV Tumore konnte jedoch eine hochsignifikant kürzere Überlebenszeit mit steigendem Alter ($p < 0,0001$) festgestellt werden.

3.6.1 Notch 1

In der parametrischen Überlebensanalyse zeigte sich für das Gesamtkollektiv der Tumore (WHO Grad I-IV), dass eine hohe Notch 1 Expression mit einer signifikant schlechteren Überlebenszeit assoziiert ist ($p = 0,0010$).

Nach der Auftrennung in die einzelnen WHO Grade I-IV und unter Berücksichtigung des Alters blieb der signifikante Einfluss auf eine kürzere Überlebenszeit der Notch 1 Expression nur für Grad II ($p=0,0015$) bestehen, während dies bei Grad III ($p=0,3059$) und Grad IV ($p=0,4510$) nicht mehr der Fall war.

3.6.2 Notch 2

Eine hohe Notch 2 Expression ging im Gesamtkollektiv der WHO Grad I-IV Tumore in der parametrischen Überlebensanalyse mit einer signifikant besseren Überlebenszeit einher ($p=0,0062$).

Die Expression von Notch 2 zeigte jedoch unter Berücksichtigung des Alters und nach Auftrennung in die einzelnen WHO Grade I-IV keinen Einfluß auf eine höhere Überlebenszeit für Grad II ($p=0,5750$), Grad III ($p=0,5148$) und Grad IV ($p=0,2538$) mehr.

3.6.3 Cyclin D1

Für das Gesamtkollektiv der Tumore (WHO Grad I-IV) ergab sich in der parametrischen Überlebensanalyse für die Cyclin D1 Expression und die Überlebenszeit kein Zusammenhang ($p=0,1135$).

Die Expression von Cyclin D1 zeigte jedoch unter Berücksichtigung des Alters und nach Auftrennung in die einzelnen WHO Grade I-IV eine signifikant bessere Überlebenszeit für Grad II ($p=0,0042$) und Grad III ($p=0,0172$), während dies bei Grad IV ($p=0,6875$) nicht mehr gegeben war.

3.7 Survival nach Kaplan-Meier

3.7.1 Notch 1

Nach der Aufteilung in zwei Gruppen durch den zuvor ermittelten Median von 67% für Notch 1 positive Zellen zeigte sich im Gesamtkollektiv eine signifikant höhere Überlebenszeit für die Gruppe der niedrig Notch 1-exprimierenden Tumore WHO Grad I-IV ($p=0,0003$) (s. Abbildung 16).

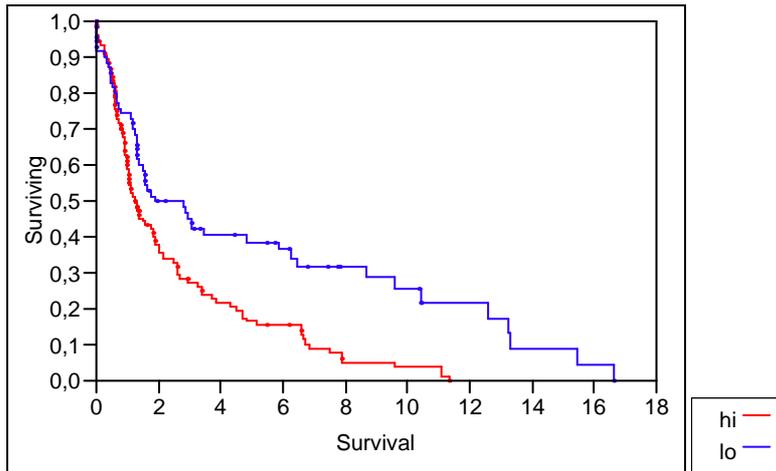


Abb. 16: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) Notch 1-exprimierende Astrozytome im Gesamtkollektiv (WHO Grad I-IV).

Diese signifikant höhere Überlebenszeit blieb nach Aufteilung in die einzelnen WHO Grade I-IV nur für die Gruppe der niedrig Notch 1-exprimierenden Tumore des Grades II ($p=0,0012$) bestehen, nicht jedoch für die der WHO Grade III ($p=0,7849$) und IV ($p=0,5647$) (s. Abbildung 17).

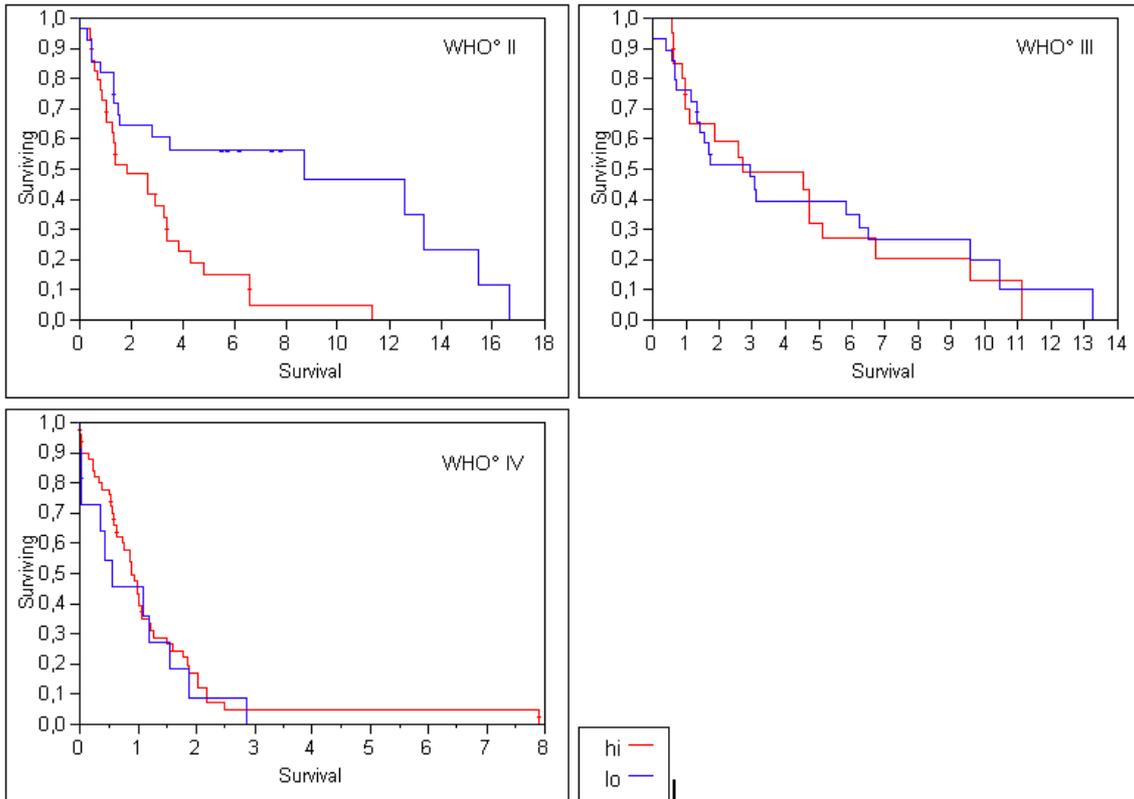


Abb. 17: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für die nach dem Median (67%) in hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) gemittelte, Notch 1-exprimierende Astrozytome unterteilt in die WHO Grade II, III und IV.

3.7.2 Notch 2

Eine signifikant höhere Überlebenszeit für die Gruppe der hoch Notch 2-exprimierenden Tumore der WHO Grad I-IV zeigte sich nach der Aufteilung in zwei Gruppen am Median von 3% der Notch 2 positiven Zellen ($p=0,0030$) (s. Abbildung 18).

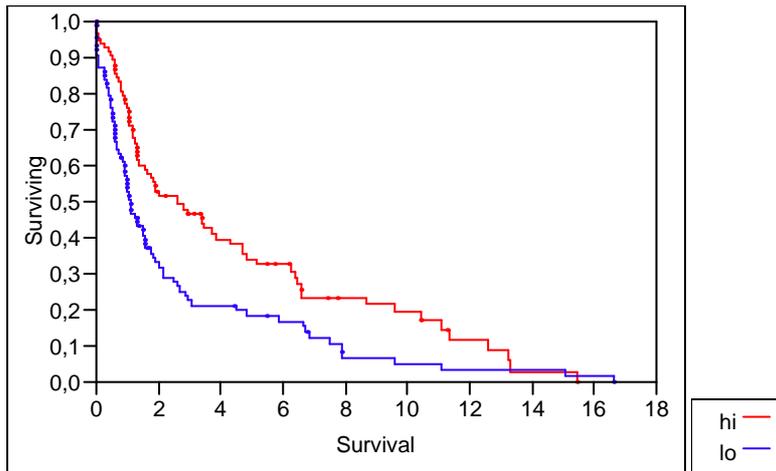


Abb. 18: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) Notch 2-exprimierende Astrozytome im Gesamtkollektiv (WHO Grad I-IV).

Nach der Aufteilung in die einzelnen WHO Grade I-IV konnte jedoch kein Einfluss auf die Überlebenszeit zwischen der Gruppe der hoch und niedrig Notch 2-exprimierenden Tumore mehr festgestellt werden (Grad II: $p=0,6822$; Grad III: $p=0,3661$; Grad IV: $p=0,8150$) (s. Abbildung 19).

ERGEBNISSE

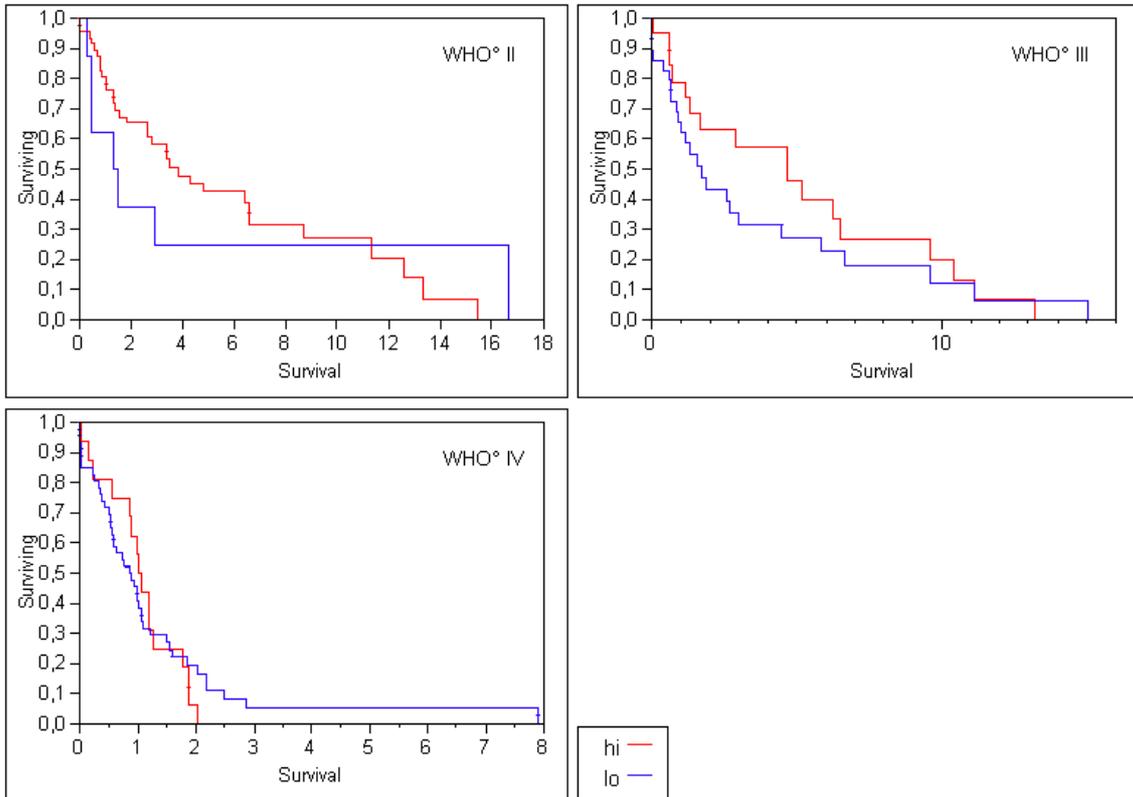


Abb. 19: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für die die nach dem Median (3%) in hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) gemittelte, Notch 2-exprimierende Astrozytome unterteilt in die WHO Grade II, III und IV.

3.7.3 Cyclin D1

Nach der Aufteilung in zwei Gruppen durch den für Cyclin D1 ermittelten Median von 10% Cyclin D1 positiven Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit der beiden Gruppen für die Gesamtheit der Tumore WHO Grad I-IV ($p=0,1049$) (s. Abbildung 20).

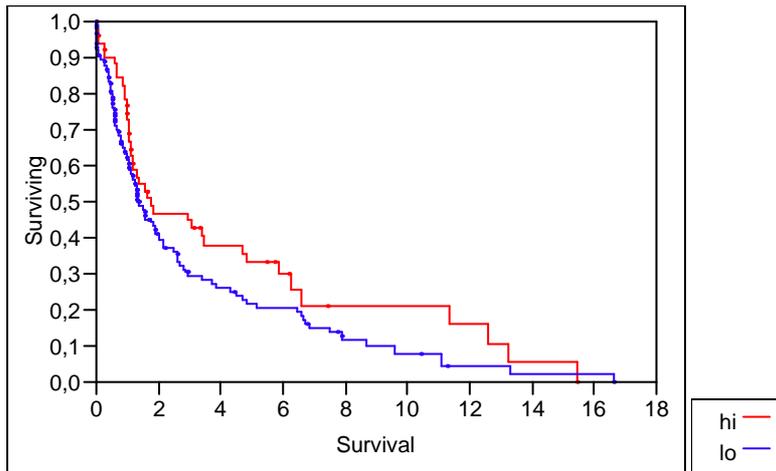


Abb. 20: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) Cyclin D1-exprimierende Astrozytome im Gesamtkollektiv (WHO Grad I-IV).

Nach der Auftrennung in die einzelnen WHO Grade I-IV zeigte sich jedoch bei den WHO Grad II Tumoren eine signifikant höhere Überlebenszeit für die Gruppe der hoch Cyclin D1-exprimierenden Tumore ($p=0,0133$). Für die WHO Grade III ($p=0,5141$) und IV ($p=0,8461$) blieb das Ergebnis jedoch unverändert nicht signifikant (s. Abbildung 21).

ERGEBNISSE

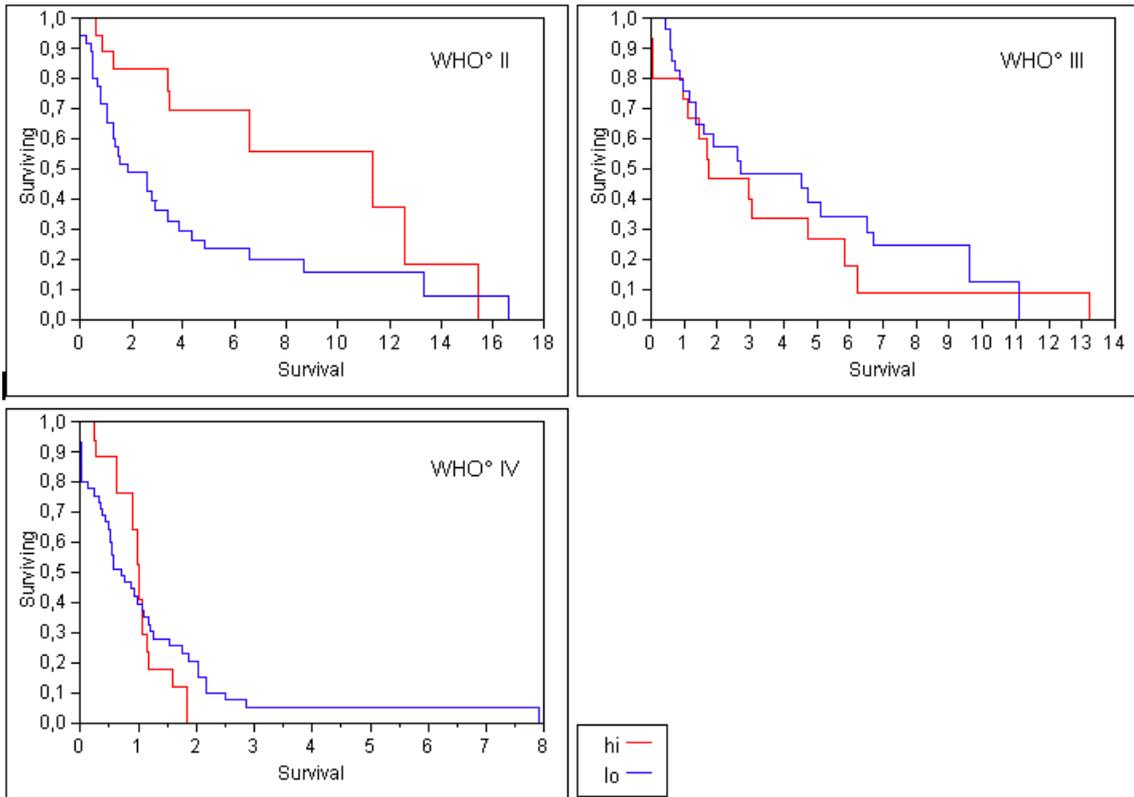


Abb. 21: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse für die die nach dem Median (10%) in hoch (hi = high) und niedrig (lo = low) gemittelte, Cyclin D1-exprimierende Astrozytome unterteilt in die WHO Grade II, III und IV.

4 DISKUSSION

Zu Beginn werde ich Vor – und Nachteile der in dieser Arbeit verwendete TMA-Methode darstellen. Anschließend soll auf die allgemeinen Ergebnisse, die Ergebnisse der einzelnen immunhistochemischen Marker und ihre Korrelation eingegangen werden und ein Vergleich mit anderen Arbeiten zu diesem Thema erfolgen. Zum Schluss werde ich die Diskussionsergebnisse zusammenfassen und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen näher erläutern.

4.1 Vor- und Nachteile der TMA-Methode

Zuerst möchte ich näher auf die Vor- und Nachteile der TMA-Methode eingehen, da diese in einigen Punkten von der normalen immunhistochemischen Verarbeitungsmethode von Flächenschnitten abweicht.

Vorteile der TMA-Methode:

1. Da bei dieser Methode bis zu 1000 verschiedene Gewebezyylinder in einem Block eingebracht und somit auf einen Objektträger aufgezogen werden können, erreicht man einfacher und schneller einen höheren Probenumsatz, der wiederum zu statistisch valideren Aussagen hinsichtlich der Expression und möglicher prognostischer Bedeutung unterschiedlicher Biomarker führt.
2. Durch die Anfertigung serieller TMA-Stanzenschnitte können fast morphologisch identische Gewebeareale in unterschiedlichen immunhistochemischen Färbeansätzen bearbeitet werden. Eine Koexpression bestimmter Proteine kann dadurch besser untersucht werden.
3. Alle auf einem Objektträger befindlichen Stanzzyylinder werden im selben immunhistochemischen Ansatz gefärbt, was zu einer gleichmäßigen und somit standardisierbaren Färbequalität führt.
4. Durch die kleine Größe der einzelnen Stanzzyylinder können diese weitgehend objektiv ausgewertet werden, was zu einem reliableren Ergebnis und geringeren subjektiven Auswertungsproblemen führt.

Nachteile der TMA-Methode:

1. Die TMA-Methode ist durch ihre kleine Stanzzylindergröße und die somit eingeschränkte morphologisch-histologische Untersuchungsmöglichkeit besonders in heterogenen Gewebeproben für diagnostische Zwecke weitgehend ungeeignet.
2. Ein heterogenes Verteilungsmuster des zu untersuchenden Biomarkers kann durch die geringe Zylindergröße nur ungenügend geprüft werden.
3. Die Herstellung der einzelnen TMA-Blöcke stellt einen hohen organisatorischen Aufwand dar, da jede einzelne Gewebeprobe zuerst mikroskopiert und markiert werden muss, um dann gestanzt, in den Block eingesetzt und geschnitten zu werden.
4. Bei Blöcken mit einer sehr großen Gewebezyylinderanzahl kann es vor allem am Rand des Blockes zu Probenverlusten durch das sehr dünne Schneiden kommen. Auch ist das Schneiden von TMA-Blöcken aufgrund der höheren „Fragmentierungsneigung“ der Probe deutlich schwieriger.
5. Die eigentlich sehr konstante Färbung eines kompletten Objektträgers (und der darauf befindlichen Gewebezyylinder) kann für die sich am Rand befindenden Proben eingeschränkt sein, da hier unter Umständen eine ständige Benetzung des Gewebes mit den Reagenzien nicht möglich ist.

Um die unter 2, 4 und 5 aufgeführten nachteiligen Punkte weitgehend auszuschließen wurde die Gewebezyylinderanzahl der einzelnen Blöcke auf 110 Zylinder (größter Block: 94 Stanzen) begrenzt und in vielen Fällen (33) mehrere Stanzzylinder aus unterschiedlichen Tumorarealen verwendet um eventuelle Heterogenitäten zu erfassen. In dieser Arbeit waren die Ergebnisse bei den multiplen Stanzen des gleichen Falles jedoch nicht signifikant verschieden und für die nukleäre Auswertung, die größtenteils durchgeführt wurde, waren die Unterschiede noch geringer als für die zytoplasmatische Auswertung. Trotzdem gab es durch das Schneiden geringe Verluste von Stanzzylinder. So konnten für den WHO Grad II 71 von 83 Proben, für den WHO Grad III 58 von 78 Proben und für den WHO Grad IV 70 von 82 Proben ausgezählt werden. Den größten Verlust gab es bei den WHO Grad I Astrozytomen bei denen insgesamt

nur 24 von 62 Stanzten gezählt werden konnten. Die Statistik zur Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 Expression wurde jedoch nur von den ausgezählten Gewebeproben gemacht, sodass eine Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen ist.

4.2 Allgemeine Ergebnisse

Bei der Altersverteilung der einzelnen WHO Grade I-IV zeigte sich ein Anstieg des Altersdurchschnitts mit steigendem Malignitätsgrad (WHO Grad I: 22,50 Jahren (Min-Max: 1-77), WHO Grad II: 45,01 Jahren (Min-Max: 18-77), WHO Grad III: 47,13 Jahren (Min-Max: 10-77), WHO Grad IV: 57,60 Jahren (Min-Max: 25-85)) was mit den Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt (Burger 2002). Außerdem ergab sich im Gesamtkollektiv der Tumore eine signifikante, für die Gruppe der Glioblastome WHO Grad IV sogar hochsignifikant schlechtere Überlebenszeit mit steigendem Alter, was ebenso mit den Ergebnissen mehreren Studien für diese WHO Grade gut übereinstimmt (Ohgaki 2005 b; Ohgaki 2004; Vertosick 1991; Watanabe 1997 a; Scheithauer 2007). Diese Ergebnisse sprechen für eine repräsentative Probenauswahl des hier eingesetzten TMA-Probenkollektives.

4.3 Ergebnisse der einzelnen immunhistochemischen Marker

4.3.1 Notch 1 Expression

Die in dieser Arbeit gezeigte Notch 1 Expressionszunahme von pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I über diffuse Astrozytome WHO Grad II und anaplastische Astrozytome WHO Grad III zu den Glioblastomen WHO Grad IV lässt sich durch frühere Studien belegen. Purow et al. 2005 beschrieb immunhistochemisch eine Notch 1 Überexpression generell in Gliomen und Kanamori et al. 2007 eine gesteigerte Expression in Glioblastomen WHO Grad IV sowohl in einzelnen Zelllinien als auch in primären Glioblastomproben mit der Western Blot Methode. Andere Arbeiten zeigten ebenso eine gezielte Zunahme der Notch 1 Expression in Astrozytomen mit steigendem Tumorgrad mit immunhistochemischen Methoden, jedoch einer geringeren Fallzahl

(Cheung 2006) und immunhistochemischer Färbung und Western Blot Analyse (Xu 2009).

Da der Notch Signalweg in vielen verschiedenen Zelllinien und somit auch Organ- und Gewebearten eine Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Apoptose spielt (Ronchini 2001) gibt es auch Arbeiten die eine Notch 1 Überexpression mit steigendem Tumorgrad in anderen Gewebetypen zeigten, wie z.B. von hoch zu niedrig differenzierten Mammakarzinomen (Parr 2004) und normalen Osteoblasten und nicht metastasierten Osteosarkomen zu metastasierten Osteosarkomen (Hughes 2010).

Andere Studien zeigten ebenfalls eine erhöhte Notch 1 Expression unter anderem in hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zu normalem Lebergewebe (Gao 2008) und in Dysplastischen Naevi und Melanomen verglichen mit normalen melanozytischen Naevi (Massi 2006).

Die in dieser Arbeit gefundene hochsignifikant niedrigere Notch 1 Expression in pilozytischen Astrozytomen WHO Grad I zu allen anderen WHO Graden, lässt sich gut mit der Sonderstellung dieser niedrig malignen Tumore vereinbaren (Scheithauer 2007) und spricht dafür, dass eine Notch 1 vermittelte Signalkaskade in diesen Tumoren nicht aktiv ist. Auch zeigt sich unter anderem eine signifikant schlechtere Überlebenszeit im Gesamtkollektiv der Gliome mit steigender Expression von Notch 1. Patienten mit einem pilozytischen Astrozytom WHO Grad I haben jedoch in der Regel eine sehr lange Überlebenszeit und können unter Umständen sogar kurativ therapiert werden. In diesem Punkt zeigt sich eventuell eine prognostische Relevanz dieser Ergebnisse, da unter Umständen die Bestimmung der Notch 1 Expression eine Aussage sowohl über die Artdiagnose, also auch über die Überlebens- und Progressionsprognose bestimmter Patienten erlaubt. Den Zusammenhang von hoher Notch 1 Expression zu kürzeren Überlebenszeiten zeigte auch eine Studie von Parr et al. 2004 für Mammakarzinome. Zang et al. 2010 konnte sogar zeigen, dass eine RNAi vermittelte Hemmung der Notch 1 Expression das Wachstum von Mamma-CA Zellen inhibierte und die Chemosensibilität gegenüber Doxorubicin und Docetaxel heraufsetzte. Purow et al. 2005

inhibierten experimentell gezielt Notch 1 in Gliomzellen von Mäusen, was mit einem längeren Überlebensvorteil dieser Mäuse einherging. Somit könnte der gezielten Notch 1 Blockade in humanen Gliomen eventuell ein therapeutisches Potential zukommen.

4.3.2 Notch 2 Expression

Über die gefundene Notch 2 Expressionsabnahme mit steigendem Tumorgad vom pilozytischen Astrozytom WHO Grad I zum Glioblastom WHO Grad IV gibt es kaum Aussagen in der Literatur. Lediglich Xu et al. 2009 beschrieb eine Abwesenheit von Notch 2 in Glioblastomen WHO Grad IV und eine nur sporadische Notch 2 Expression in niedriggradigen Astrozytomen, dafür aber eine Überexpression von Notch 2 in Medulloblastomen in der immunhistochemischen Färbung und Western Blot Analyse. Dasselbe Ergebnis, nämlich eine Abnahme der Notch 2 Expression von gut differenzierten zu niedrig differenzierten Mammakarzinomen zeigte Parr et al. in seiner Studie von 2004 mittels PCR und Immunhistochemie.

Diese Arbeit zeigt immunhistochemisch und somit auf Proteinebene, dass sich eine über den Median hinausgehende Notch 2 Expression positiv auf die Überlebenszeit auswirkt. Dies wurde auch in einer Studie für Oligodendrogliome und Glioblastome für einen LOH von Notch 2 herausgefunden, allerdings nur auf molekularer Ebene mit der Mikrosatellitenmarkermethode (Boulay 2007). In der Studie von Fan et al. 2010 konnte gezeigt werden, dass die aktive Form von Notch 2 das Tumorwachstum anregt. Dies ging jedoch auf Kosten der Tumorstammzellen, deren Anzahl dabei reduziert wurde. Dieser Verbrauch von Tumorstammzellen erklärt eventuell die bessere Prognose von hoch Notch 2 exprimierenden Tumoren. Hier zeigt sich nun die unter Umständen prognostische Relevanz der Notch 2 Expressionrate in Astrozytomen unterschiedlicher WHO Grade.

Auch für Mammakarzinome ist mittels PCR und immunhistochemisch beschrieben, dass eine hohe Notch 2 Expression mit einer besseren

Überlebenszeit einherging (Parr 2004). Für Medulloblastome war das Überleben bei hoher Notch 2 Expression jedoch geringer (Fan 2004).

4.3.3 Korrelation der Expressionsrate von Notch 1 und Notch 2

Sowohl die Notch 1, als auch die Notch 2 Expression zeigt für alle WHO Grade zusammen eine signifikant inverse Korrelation, bei der die Notch 1 Expression mit steigendem Tumorgrad ansteigt und die Notch 2 Expression abnimmt. Dieses Ergebnis stimmt teilweise mit dem von Fan et al. 2004 überein, der zwar einen gegensätzlichen Effekt von Notch 1 und Notch 2 auf denselben Tumortyp zeigte, für Notch 1 jedoch einen inhibierenden und für Notch 2 einen aktivierenden Effekt auf das Wachstum von embryonalen Hirntumorzellen in Medulloblastomen fand. Für das Hepatozelluläre Karzinom und das Mammakarzinom zeigte sich jedoch dieselbe hohe Notch 1 Expressionsrate bei niedriger Notch 2 Expression wie in dieser Arbeit (Gao 2008; Parr 2004).

Da der Notch Signalweg in vielen verschiedenen Organ- und Gewebearten eine Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Apoptose spielt (Ronchini 2001), ist es nicht weiter verwunderlich, dass es in neoplastischem Gewebe, sprich in verschiedenen Tumorarten zu einer gestörten Notch Expression kommen kann. Dass jedoch die Notch-Untergruppen Notch 1 und Notch 2 in denselben Tumoren unterschiedliche, antagonistische Effekte bewirken können ist erstaunlich. Es lässt sich auch keine allgemeine Aussage darüber treffen, ob nun Notch 1 oder Notch 2 generell als Onkogen agiert, was sich durch die unterschiedliche Notch 1 und Notch 2 Aktivität in den Stammzelllinien verschiedener Gewebe erklären ließe. Die Wirkung von Notch 1 und 2 scheint somit gewebspezifisch zu sein. Deshalb gibt es auch noch keinen einheitlichen Behandlungsansatz und verschiedene Möglichkeiten zur Inhibierung bzw. Aktivierung der Notch 1 und Notch 2 Expression sind derzeit in Erprobung. Ning et al. 2008 zeigte, dass eine Aktivierung von Notch 1, das in medullären Schilddrüsenkarzinomzellen antiproliferativ und apoptotisch wirkte, mit SBHA (Suberoyl-bishydroxamic Acid) zu einer Wachstumshemmung dieser Karzinomzellen führte und auch durch eine pharmakologische Aktivierung des Notch Signalwegs im Tiermodell konnte das Wachstum des medullären

Schilddrüsenkarzinoms erfolgreich gehemmt werden (Cook 2010). Greenblatt et al. 2007 zeigte ebenfalls eine Aktivierung des Notch 1 Signalwegs durch Valproinsäure (das vor allem zur Epilepsiebehandlung genutzt wird) mit dadurch induzierter Apoptose und somit Wachstumshemmung in Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms. In einer anderen Studie, die Glioblastomzelllinien mit 1,25(OH)(2)D(3) behandelte, konnte jedoch kein Effekt auf die Schlüsselkomponenten im Notch Signalweg gefunden werden (Reichrath 2010). Ob diese Behandlungsansätze auch im klinischen Alltag bestehen würden ist allerdings fraglich, da die systemische Behandlung zu einer allgemeinen Inhibierung bzw. Aktivierung bestimmter Notch Signalwegkomponenten führen würde und sich somit in unterschiedlichen Gewebearten unterschiedlich auswirken könnte. In einer laufenden Phase-I Studie zur Behandlung von T-Zell ALL mit dem Gamma-Sekretaseinhibitor MK0752 (Merck), der am Notch Signalweg ansetzt, stehen die Ergebnisse noch aus. Es zeigte sich jedoch, dass es durch die generelle Inhibierung aller Notch Rezeptoren, die sich jedoch in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich verhalten, zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann, wie z.B. zur Metaplasie von Goblet Zellen im Interstitium (Wong 2004). Außerdem sind Gamma-Sekretaseinhibitoren nicht Notch spezifisch und greifen wahrscheinlich auch an anderen Zielrezeptoren an (Stockhausen 2010). Wu et al. 2010 entwickelte wegen der unerwünschten Nebenwirkung der interstitielle Toxizität bei der gemeinsamen Inhibierung von Notch 1 und Notch 2 einen hochspezifischen Antikörper zur gezielten Inhibierung genau eines dieser beiden Rezeptoren und konnte dadurch die Gefahr der interstitiellen Toxizität vermindern. Diese Ergebnisse zeigen einen eventuell neuen vielversprechenden, gezielten Behandlungsansatz zur Gliombehandlung am Notch Signalweg auf.

Diese Arbeit zeigt jedoch die durchaus mögliche prognostische Relevanz der Notch 1 und Notch 2 Expression in Gliomen WHO Grad I bis WHO Grad IV, vor allem auch in Kombination durch ihre signifikante inverse Korrelation.

4.3.4 Cyclin D1 Expression

Die Cyclin D1 Expression zeigt eine hochsignifikante Abnahme vom Normalhirn zu allen vier WHO Graden. Es zeigt sich jedoch ebenso eine signifikante Zunahme der Cyclin D1 Expression vom pilozytischen Astrozytom WHO Grad I zum diffusen Astrozytom WHO Grad II. Dies spricht für eine Proliferations- und somit auch Malignitätszunahme von WHO Grad I zu WHO Grad II Tumoren und unterstreicht erneut die Sonderrolle dieser niedrig malignen Astrozytome WHO Grad I (Scheithauer 2007). Eine Studie von Sallinen et al. 1999 zeigte jedoch eine signifikant mit dem Proliferationsstatus assoziierte Cyclin D1 mRNA Expressionszunahme in höhergradigen Gliomen vor allem WHO Grad IV, die mit einem aggressiveren Verhalten korrelierte und eine schlechtere Überlebenszeit aufwies. Auch in dieser Arbeit konnte ein Trend zu kürzeren Überlebenszeiten von hoch Cyclin D1-exprimierenden Tumoren zu niedrig exprimierenden Tumoren festgestellt werden. Sallinen et al. beschreibt jedoch auch eine hohe intratumorale Heterogenität des Cyclin D1 mRNA Expressionsmusters in Glioblastomen Grad IV, sodass eine rein objektive Auswertung sehr schwer sein sollte. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zu dieser Arbeiten lassen sich aber auch durch die kleine Fallzahl der Sallinen et al. Studie und die unterschiedlichen Methoden erklären. Die mRNA Expression von Cyclin D1 zeigte eine gute, jedoch keine signifikante Übereinstimmung mit der immunhistochemischen Cyclin D1 Expression, was dafür spricht, dass es eventuell noch zu einer posttranskriptionalen Regulierung von Cyclin D1 kommen kann. Zwijsen et al. 1996 und Del Sal et al. 1996 beschrieben, dass eine Induktion von Cyclin D1 sowohl zur Aktivierung als auch zum Zellzyklus Arrest führen könne. Eine weitere Studie von Scott et al. 2005 beschrieb keinen Anstieg der immunhistochemischen Cyclin D1 Expression von Gliomen WHO Grad II bis WHO Grad IV und auch keinen Zusammenhang zur klinischen Prognose. Sie berichten außerdem über eine große variable Breite der Anti-Cyclin D1 Antikörper je nach Methode. Auch in dieser Studie war die Fallzahl deutlich geringer als in dieser Arbeit.

In den Korrelationsanalysen konnte eine positive Korrelation von Cyclin D1 zu Notch 2 gefunden werden. Beide nahmen mit steigendem Tumorgrad ab. Zwischen Cyclin D1 und Notch 1 konnte keine Korrelation gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Cyclin D1 einem positiven Regulationsmechanismus von Notch 2 unterliegen könnte, während die direkte Wirkung von Notch 1 in Gliomen im Gegensatz zu Zellkulturexperimenten durch das Einwirken anderer, bisher noch nicht bekannter Faktoren abgeschwächt sein könnte.

Generell gilt, den aktuellen Ergebnissen zufolge, dass Cyclin D1 kein wirklich guter Malignitätsmarker in Astrozytomen ist und auch prognostisch nicht geeignet ist um Tumore hinsichtlich ihres möglichen Wachstums stratifizieren zu können. Im Zusammenhang mit anderen Zellzyklus-Markern oder eventuell Notch 2 lassen sich jedoch vielleicht bessere Aussagen zu Malignität und Prognose bestimmter Gliome geben und zusammen z.B. mit MIB-1 sogar Aussagen über das Wachstumsverhalten bzw. Aggressivität mancher Astrozytome machen (Sallinen 1999).

4.4 Zusammenfassende Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Wichtige Ergebnisse und Schlussfolgerungen, die aus dieser Arbeit hervorgehen sind:

1. Die Expressionsrate von Notch 1 zeigt eine stetige Zunahme von Astrozytomen WHO Grad I bis IV, wobei die pilozytischen Astrozytome WHO Grad I eine hochsignifikant niedrigere Notch 1 Expression als alle anderen Tumorgade aufweisen, was zu ihrer Sonderrolle als benigne Tumoren passt.
2. Für die Notch 2 Expression zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme mit steigendem Tumorgrad von WHO Grad I zu IV. Diese Abnahme war für niedriggradige Gliome (WHO Grad I und WHO Grad II) zu höhergradigen Gliomen (WHO Grad III als auch WHO Grad IV) hochsignifikant.
3. Eine inverse Korrelation von Notch 1 zu Notch 2 konnte, wie bereits in anderen Studien, an einem größeren Tumorkollektiv validiert werden. Die Ergebnisse deuten auf eine antagonistische Aufgabe von Notch 1 und 2 im selben Gewebe hin.
4. In den Überlebensanalysen nach Kaplan-Maier konnte für niedrige Notch 1 und hohe Notch 2 exprimierende astrozytäre Tumore eine prognostisch bessere Überlebenszeit gefunden werden, was bislang für beide Marker nur in Mammakarzinomen beobachtet wurde.
5. Die signifikante Abnahme der Cyclin D1 Expression von Gliomen WHO Grad II über WHO Grad III zu WHO Grad IV, sowie die signifikante Zunahme von WHO Grad I zu WHO Grad II stehen in teilweisem Widerspruch zu früheren Studien, was jedoch durch methodische und strukturelle Unterschiede der einzelnen Arbeiten zu erklären ist.
6. Es zeigte sich eine positive Korrelation der Cyclin D1 Expression zu Notch 2, was auf eine positive Regulation innerhalb der Signalkaskade spricht. Die fehlende Korrelation von Cyclin D1 und Notch 1 spricht hingegen für das Vorliegen weiterer involvierter Regulationsmechanismen innerhalb des Zellzyklusses.

7. Für die diffusen Astrozytome WHO Grad II zeigte sich in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ein längeres Überleben für hoch Cyclin D1 exprimierende Tumore. Diese Wirkung kehrt sich in höhergradigen Gliomen um: Für die WHO Grade III und IV wird, wie bereits in anderen Studien auch, für hoch Cyclin D1 exprimierende Gliome ein Trend zu kürzeren Überlebenszeiten gefunden beobachtet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Astrozytome stellen die häufigsten hirneigenen Tumore dar und bilden eine heterogene Gruppe von neoplastischen Raumforderung des ZNS. Sie sind zwar im Vergleich zu Tumorentitäten anderer Organe eher selten, haben jedoch vor allem bei höherer Malignität eine sehr schlechte Prognose.

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war es, die Expression von Notch 1, Notch 2 und Cyclin D1 in 305 Astrozytomen/Glioblastomen aller vier WHO-Grade und in 95 Normalhirnproben von 8 Patienten zu untersuchen, um so eine mögliche diagnostische, prognostische und therapeutische Relevanz hinsichtlich ihres Expressionsprofils im „Zielgewebe“ näher zu charakterisieren. Dabei wurden immunhistochemische Verfahren in Kombination mit der TMA-Methode eingesetzt.

Die Proteine des Notch Signalwegs sind an vielen Prozessen wie der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen beteiligt und wirken auf Cycline, die als Proteine am Ablauf und der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Deshalb stellte sich nun die Frage, wie die einzelnen Rezeptoren des Notch Signalwegs Notch 1 und Notch 2 und Cyclin D1 in Gliomen der WHO Grade I bis IV in Abhängigkeit von prognostischen Parametern wie Überlebenszeit exprimiert werden.

Die statistische Auswertung ergab für die Expressionsrate von Notch 1 eine stetige Zunahme bei Astrozytomen WHO Grad I bis IV, wobei die pilozytischen Astrozytome WHO Grad I eine hochsignifikant niedrigere Notch 1 Expression als alle anderen Tumorgrade aufwiesen, was zu ihrer Sonderrolle als niedrig maligne Tumoren passt. Für die Notch 2 Expression zeigte sich eine Abnahme mit steigendem Tumorgrad von WHO Grad I zu IV. Eine inverse Korrelation von Notch 1 zu Notch 2 konnte, wie bereits in anderen Studien, gezeigt und somit ihre unterschiedliche Aufgabe sogar im selben Gewebe belegt werden. In den Survival Analysen nach Kaplan-Meier konnte für niedrig Notch 1 und hoch Notch 2 exprimierende Astrozytome eine bessere Überlebenszeit gefunden

ZUSAMMENFASSUNG

werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine onkogene Wirkung von Notch 1 und eine Tumorsuppressive Wirkung von Notch 2 in Gliomen.

Die signifikante Abnahme der Cyclin D1 Expression von Gliomen WHO Grad II über WHO Grad III zu WHO Grad IV, sowie die signifikante Zunahme von WHO Grad I zu WHO Grad II stehen in teilweisem Widerspruch zu früheren Studien, was jedoch durch methodische und strukturelle Unterschiede der einzelnen Arbeiten zu erklären ist. Es zeigte sich eine positive Korrelation von Cyclin D1 zu Notch 2. Für Cyclin D1 und Notch 1 konnte jedoch keine Korrelation nachgewiesen werden. Für die diffusen Astrozytome WHO Grad II zeigte sich in der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier ein längeres Überleben für hoch Cyclin D1 exprimierende Tumore. Für die WHO Grade III und IV konnte, wie bereits in der Literatur beschrieben, für hoch Cyclin D1 exprimierende Gliome ein Trend zu kürzeren Überlebenszeiten gefunden werden. Die unterschiedlichen Expressionsergebnisse von Cyclin D1 lassen jedoch noch wenig Rückschlüsse über seine genaue Wirkung in Astrozytomen zu.

Diese Arbeit zeigt, dass der Notch Signalweg mit seinen Rezeptoren Notch 1 und Notch 2 durchaus Potential für immunhistochemische Untersuchungen zu diagnostischen, prognostischen und vielleicht sogar therapeutischen Zwecken besitzt. Die Ergebnisse der Cyclin D1 Expression sind jedoch weniger aussagekräftig. Um einen genauen Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen zu finden, werden weitere Studien nötig sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Acker T, Plate KH. Hypoxia and hypoxia inducible factors (HIF) as important regulators of tumor physiology. *Cancer Treat Res.* 2004; 117:219-248.
2. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999 ; 284 :770-776.
3. Baker NE. Notch signaling in the nervous system: pieces still missing from the puzzle. *Bioessays.* 2000; 22:264-273.
4. Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, de Sanctis S, Evans H, Peterson D, Mendoza N, Glaser MG, Newlands ES, Fisher RA. Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer.* 1999; 81(8):1371-1377.
5. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. The PRAD-1/ cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 1994; 58:568–573.
6. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res.* 1995; 55:949–956.
7. Berezovska O, Xia MQ, Hyman BT. Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57(8):738-745.
8. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 1997; 90:281-291.
9. Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, Sivasankaran B, Kana V, Ghaffari A, Luyken C, Sabel M, Zerrouqi A, Wasner M, Van Meir E, Tolnay M, Reifenberger G, Merlo A. Loss of NOTCH2 Positively Predicts Survival in Subgroups of Human Glial Brain Tumors. *PLoS ONE.* 2007; 2(6):576-585.
10. Brennan C, Momota H, Hambarzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One.* 2009; 4(11):e7752.
11. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* 1985; 56(5):1106-1111.
12. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer.* 1987; 59(9):1617-1625.
13. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 1988; 68(5):698-704.
14. Burger PC. Pathology of brain stem astrocytomas. *Pediatr Neurosurg.* 1996 a; 24(1):35-40.

15. Burger PC, Breiter SN, Fisher PG. Pilocytic and fibrillary astrocytomas of the brain stem – a comparative clinical, radiological and pathological study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 b ; 55 :640.
16. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. The Brain-Tumors. *Surgical pathology of the Nervous System and its Coverings.* 2002; 4:161.
17. Callahan R, Egan SE. Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004; 9:145-163.
18. Cavalla P, Dutto A, Piva R, Richiardi P, Grosso R, Schiffer D. Cyclin D1 expression in gliomas. *Acta Neuropathol.* 1998; 95:131–135.
19. Central Brain Tumor Registry of the United States, Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. <http://www.cbtrus.org>, betrachtet am 13.04.2010.
20. Cheng P, Nefedova Y, Miele L, Osborne BA, Gabrilovich D. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood.* 2003; 102:3980-3988.
21. Cheung HC, Corley LJ, Fuller GN, McCutcheon IE, Cote GJ. Polypyrimidine tract binding protein and Notch1 are independently re-expressed in glioma. *Modern Pathology.* 2006; 19:1034–1041.
22. Cook M, Yu XM, Chen H. Notch in the development of thyroid C-cells and the treatment of medullary thyroid cancer. *Am J Transl Res.* 2010; 2(1):119-125.
23. Coons SW, Johnson PC. Regional heterogeneity in the proliferative activity of human gliomas as measured by the Ki-67 labeling index. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993 ; 52(6) :609-618.
24. Cushing H. Experiences with the cerebellar astrocytoma. A critical review of seventy-six cases. *Surg Gynecol Obstet.* 1931; 52:1129-1204.
25. Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry.* 1996; 25:1–13.
26. Davies MP, Gibbs FE, Halliwell N, Joyce KA, Roebuck MM, Rossi ML, Salisbury J, Sibson DR, Tacconi L, Walker C. Mutation in the PTEN/MMAC1 gene in archival low grade and high grade gliomas. *Br J Cancer.* 1999; 79(9-10):1542-1548.
27. DeHart SL, Heikens MJ, Tsai S. Jagged2 promotes the development of natural killer cells and the establishment of functional natural killer cell lines. *Blood.* 2005; 105:3521-3527.
28. Deimling von A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG, Louis DN, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res.* 1994; 54(6):1397-1401.
29. Deimling von A, Burger PC, Nakazato Y, Ohgaki H, Kleihues P. Diffuse Astrocytoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* 2007; 4:25-29.
30. Del Sal G, Murphy M, Ruaro EM, Lazarevic D, Levine AJ, Schneider C. Cyclin D1 and p21/waf1 are both involved in p53 growth suppression. *Oncogene.* 1996; 12:177–185.

31. Delibas S, Guven H, Comoglu SS. A case report about CADASIL: mutation in the NOTCH 3 receptor. *Acta Neurol Taiwan*. 2009; 18(4):262-6.
32. Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg*. 1976; 44(4):442-448.
33. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, et al. Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res*. 2004; 64:7787- 7793.
34. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*. 2010; 28(1):5-16.
35. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*. 2005; 15(4):297-310.
36. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol*. 1999; 155(2):387-394.
37. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*. 2000; 80(1):65-72.
38. Fulham MJ, Melisi JW, Nishimiya J, Dwyer AJ, Di Chiro G. Neuroimaging of juvenile pilocytic astrocytomas: an enigma. *Radiology*. 1993; 189(1):221-225.
39. Furukawa T, Mukherjee S, Bao ZZ, Morrow E, and Cepko CL. *Neuron*. 2000; 26:383–394.
40. Gaiano N, Nye JS, Fishell G. *Neuron*. 2000; 26:395–404.
41. Gao J, Song Z, Chen Y, Xia L, Wang J, Fan R, Du R, Zhang F, Hong L, Song J, Zou X, Xu H, Zheng G, Liu J, Fan D. Deregulated expression of Notch receptors in human hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2008; 40(2):114-21.
42. Gillett C, Fant V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res*. 1994 ; 54 :1812–1817.
43. Greenblatt DY, Vaccaro AM, Jaskula-Sztul R, Ning L, Haymart M, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells. *Oncologist*. 2007; 12(8):942-951.
44. Grego-Bessa J, Díez J, Timmerman L, de la Pompa JL. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle*. 2004; 3(6):718-721.
45. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, et al. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol*. 1999; 154:785-794.

46. Gunny RS, Hayward RD, Phipps KP, Harding BN, Saunders DE. Spontaneous regression of residual low-grade cerebellar pilocytic astrocytomas in children. *Pediatr Radiol.* 2005; 35(11):1086-1091.
47. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 1996; 68:67–108.
48. Hammoud MA, Sawaya R, Shi W, Thall PF, Leeds NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 1996; 27(1):65-73.
49. Hartmann C, Nümann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int J Cancer.* 2004; 108(6):839-844.
50. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009; 118(4):469-74.
51. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR, Weiland TL, Schomberg PJ, Kelly PJ, Hu TC. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer.* 1993; 72(3):856-869.
52. He J, Mokhtari K, Sanson M, Marie Y, Kujas M, Huguet S, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Hoang-Xuan K. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 ; 60(9) :863-871.
53. He Y, Pear WS. Notch 85ignaling in B cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2003; 14:135-142.
54. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermarck B, Nistér M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 1992; 52(11):3213-3219.
55. Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 1986; 70(3-4):333-339.
56. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 ; 65(9) :846-854.
57. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood.* 2004; 104:3697-3704.
58. Hoyt WF, Baghdassarian SA. Optic glioma of childhood. Natural history and rationale for conservative management. *Br J Ophthalmol.* 1969; 53(12):793-798.

59. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981; 29(11):1349-1353.
60. Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Duechler M, et al. Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99:3742–3747.
61. Hughes DP. How the NOTCH Pathway Contributes to the Ability of Osteosarcoma Cells to Metastasize. *Cancer Treat Res*. 2010; 152:479-496.
62. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 22(1):9-15.
63. Iwabuchi S, Bishara S, Herbison P, Erasmus A, Samejima H. Prognostic factors for supratentorial low grade astrocytomas in adults. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1999; 39(4):273-279.
64. Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ, Crawford PJ, Kalbag RM, Mendelow AD, Sengupta RP, Pearson AD. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer*. 1992; 66(2):373-385.
65. Järvelä S, Helin H, Haapasalo J, Järvelä T, Junttila TT, Elenius K, Tanner M, Haapasalo H, Isola J. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32(4):441-450.
66. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang Y, Lu S, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res*. 1992; 52:2980–2983.
67. Jiang W, Zhang Y, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu S, Harris CC, Montesano R, Weinstein IB. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:9026–9030.
68. Jundt F, Probsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103:3511-3515.
69. Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, Pieper RO. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 2007; 106(3):417-427.
70. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol*. 1994; 87(1):47-54.
71. Karim AB, Maat B, Hatlevoll R, Menten J, Rutten EH, Thomas DG, Mascarenhas F, Horiot JC, Parvinen LM, van Reijn M, Jager JJ, Fabrini MG, van Alphen AM, Hamers HP, Gaspar L, Noordman E, Pierart M, van Glabbeke M. A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and

- Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36(3):549-556.
72. Karsan A. The role of notch in modeling and maintaining the vasculature. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005; 83:14-23.
 73. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005; 7(2):134-153.
 74. Kepes JJ. Astrocytomas: old and newly recognized variants, their spectrum of morphology and antigen expression. *Can J Neurol Sci.* 1987; 14(2):109-121.
 75. Kernohan JW et al. A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.* 1949; 24:71-75.
 76. Kleihues P, Kiessling M, Janzer RC. Morphological markers in neuro-oncology. *Curr Top Pathol.* 1987; 77:307-338.
 77. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993; 3:255-268.
 78. Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW. WHO grading of tumours of the central nervous system. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* 2007 a; 4:11-12.
 79. Kleihues P, Burger PC, Rosenblum MK, Paulus W, Scheithauer BW. Anaplastic Astrocytoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* 2007 b; 4:30-32.
 80. Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, Nakazato Y, Plate KH, Giangaspero F, von Deimling A, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* 2007 c; 4:33-49.
 81. Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bølge Tysnes B, Edvardsen K, Ness GO, Mørk S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer.* 1998; 75(6):864-872.
 82. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue micro arrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4(7):844-847.
 83. Kopan R, Ilagan MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.* 2009; 137:216-233.
 84. Koul D, Shen R, Bergh S, Lu Y, de Groot JF, Liu TJ, Mills GB, Yung WK. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(11):1681-1688.
 85. Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A. Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J.* 1996; 15:46-54.
 86. Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, Beck M, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol.* 2001; 101(4):311-20.
 87. Lammert E, Brown J, Melton DA. Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech Dev.* 2000; 94:199-203.

88. Lee RJ, Albanese C, Fu M, D'Amico M, Lin B, Watanabe G, Haines GK, Siegel PM, Hung MC, Yarden Y, Horowitz JM, Muller WJ, Pestell RG. Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20:672–683.
89. Lee TT, Manzano GR. Third ventricular glioblastoma multiforme: case report. *Neurosurg Rev.* 1997; 20(4):291-294.
90. Lee YY, Van Tassel P, Bruner JM, Moser RP, Share JC. Juvenile pilocytic astrocytomas: CT and MR characteristics. *AJR Am J Roentgenol.* 1989; 152(6):1263-1270.
91. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood.* 2006 ; 107 :2223-2232.
92. Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP. von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. *Ophthalmology.* 1984; 91(8):929-935.
93. Libermann TA et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature.* 1985; 313:144–147.
94. Louis PN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavanee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 2007; 4.
95. Love S, Louis DN, Ellison DW. Astrocytes. *Greenfield's neuropathology.* 2008; 8:8-18.
96. Lüllmann-Rauch R. Regulierung des Zellzyklus. *Histologie Verstehen-Lernen-Nachschlagen.* 2003; 1:68.
97. Luo D, Renault VM, Rando TA. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16:612-622.
98. Machein MR, Plate KH. Role of VEGF in developmental angiogenesis and in tumor angiogenesis in the brain. *Cancer Treat Res.* 2004; 117:191-218.
99. Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:945-974.
100. Massi D, Tarantini F, Franchi A, Paglierani M, Di Serio C, Pellerito S, Leoncini G, Cirino G, Geppetti P, Santucci M. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):246-254.
101. Masuya M, Katayama N, Hoshino N, et al. The soluble Notch ligand, Jagged-1, inhibits proliferation of CD34 macrophage progenitors. *Int J Hematol.* 2002; 75:269-276.
102. McGirr SJ, Kelly PJ, Scheithauer BW. Stereotactic resection of juvenile pilocytic astrocytomas of the thalamus and basal ganglia. *Neurosurgery.* 1987; 20(3):447-452.
103. Mellinghoff IK et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353:2012–2024.

104. Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:13014-13019.
105. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999; 93:2431-2448.
106. Minehan KJ, Shaw EG, Scheithauer BW, Davis DL, Onofrio BM. Spinal cord astrocytoma: pathological and treatment considerations. *J Neurosurg*. 1995; 83(4):590-595.
107. Miyakawa A, Ichimura K, Schmidt EE, Varmeh-Ziaie S, Collins VP. Multiple deleted regions on the long arm of chromosome 6 in astrocytic tumours. *Br J Cancer*. 2000; 82(3):543-549.
108. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, et al. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2003; 3:565-576.
109. Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. *Cell*. 2000; 101:499-510.
110. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*. 2001 a; 11(2):159-168.
111. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001 b; 22(10):1715-1719.
112. Newcomb EW, Bhalla SK, Parrish CL, Hayes RL, Cohen H, Miller DC. bcl-2 protein expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 gene status. *Acta Neuropathol*. 1997; 94(4):369-375.
113. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch 1 function as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. 2003; 33:416-421.
114. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*. 2003; 22:6598-6608.
115. Ning L, Greenblatt DY, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Suberoyl bis-hydroxamic acid activates Notch-1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid carcinoma cells. *Oncologist*. 2008; 13(2):98-104.
116. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 21(4):340-346.
117. Nye J, Kopan R, Axel R. *Development*. 1994; 120:2421-2430.
118. Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, Biernat W, von Deimling A, Yasargil MG, Yonekawa Y, Kleihues P. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol*. 1999; 97(5):525-532.
119. 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. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004; 64(19):6892-6899.

120. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005 a; 109(1):93-108.
121. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 b ; 64(6) :479-489.
122. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007; 170(5):1445-1453.
123. Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood.* 2000; 95:2847-2854.
124. 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. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004; 108(1):49-56.
125. Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med.* 2004; 14:779-786.
126. Pasquier B, Pasquier D, N'Golet A, Panh MH, Couderc P. [The metastatic potential of primary central nervous tumours (author's transl)]. *Rev Neurol (Paris).* 1979; 135(3):263-278.
127. Pasquier B, Pasquier D, N'Golet A, Panh MH, Couderc P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature. *Cancer.* 1980; 45(1):112-125.
128. Pedersen PH, Rucklidge GJ, Mørk SJ, Terzis AJ, Engebraaten O, Lund-Johansen M, Backlund EO, Laerum OD, Bjerkvig R. Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(21):1593-1599.
129. Peraud A, Ansari H, Bise K, Reulen HJ. Clinical outcome of supratentorial astrocytoma WHO grade II. *Acta Neurochir (Wien).* 1998; 140(12):1213-1222.
130. Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer.* 2004; 101(10):2318-2326.
131. Pierallini A, Bonamini M, Pantano P, Palmeggiani F, Raguso M, Osti MF, Anaveri G, Bozzao L. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. *Neuroradiology.* 1998; 40(3):150-153.
132. Pollack IF, Hoffman HJ, Humphreys RP, Becker L. The long-term outcome after surgical treatment of dorsally exophytic brain-stem gliomas. *J Neurosurg.* 1993; 78(6):859-863.
133. Pompili A, Calvosa F, Caroli F, Mastrostefano R, Occhipinti E, Raus L, Sciarretta F. The transdural extension of gliomas. *J Neurooncol.* 1993; 15(1):67-74.
134. Prayson RA, Estes ML. Protoplasmic astrocytoma. A clinicopathologic study of 16 tumors. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103(6):705-709.

135. Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65:2353–2363.
136. Purow BW, Sundaresan TK, Burdick MJ, Kefas BA, Comeau LD, Hawkinson MP, Su Q, Kotliarov Y, Lee J, Zhang W, Fine HA. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53. *Carcinogenesis.* 2008; 5:918–925.
137. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:756-767.
138. Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1990; 16(2):123-133.
139. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2003; 33:49-54.
140. Rauhut F, Reinhardt V, Budach V, Wiedemayer H, Nau HE. Intramedullary pilocytic astrocytomas—a clinical and morphological study after combined surgical and photon or neutron therapy. *Neurosurg Rev.* 1989; 12(4):309-313.
141. Reichrath S, Denzer N, Müller Cornelia SL, Pfreundschuh M, Tilgen W, Reichrath J. Notch- and vitamin D signaling in 1,25(OH)(2)D(3)-resistant glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol. Elektronische Veröffentlichung vom 04.03.2010, doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.028*
142. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 ; 55(7) :822-831.
143. Rimerman RA, Gellert-Randleman A, Diehl JA. Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:14736–14742.
144. Ronchini C, Capobiancon AJ. Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notch ic: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notch ic. *Molecular and Cellular Biology.* 2001; 17:5925–5934.
145. Rosenblum MK, Erlandson RA, Budzilovich GN. The lipid-rich epithelioid glioblastoma. *Am J Surg Pathol.* 1991; 15(10):925-934.
146. Rosser T, Packer RJ. Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis 1. *J Child Neurol.* 2002; 17(8):630-637.
147. Rossitch E Jr, Zeidman SM, Burger PC, Curnes JT, Harsh C, Anscher M, Oakes WJ. Clinical and pathological analysis of spinal cord astrocytomas in children. *Neurosurgery.* 1990; 27(2):193-196.
148. Sallinen SL, Sallinen PK, Kononen JT, Syrjäkoski KM, Nupponen NN, Rantala IS, Helén PT, Helin HJ, Haapasalo HK. Cyclin D1 expression in

- astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J Pathol.* 1999;188(3):289-293.
149. Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol.* 2005; 6:663-670.
 150. Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, VandenBerg SR, Burger PC. Pilocytic Astrocytoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* 2007; 4:14-20.
 151. Scherer HJ. The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain.* 1940; 63:1-35.
 152. Schröck E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, Cremer T. Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996; 15(4):199-205.
 153. Scott IS, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowler SL, Burnet NG, Coleman N. Immunohistochemical estimation of cell cycle entry and phase distribution in astrocytomas: applications in diagnostic neuropathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2005; 31:455–466.
 154. Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW. Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology.* 1999; 52(4):867-869.
 155. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996; 274:1672–1677.
 156. Shuangshoti S, Kasantikul V, Suwanwela N. Spontaneous penetration of dura mater and bone by glioblastoma multiforme. *J Surg Oncol.* 1987; 36(1):36-44.
 157. Shi Y, Morgenstern N. Granular cell astrocytoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132(12):1946-50
 158. Sofer-Levi Y, Resnitzky D. Apoptosis induced by ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E. *Oncogene.* 1996; 13:2431-2437.
 159. Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro Oncol.* 2010; 12(2):199-211.
 160. Tanaka K, Waga S, Itho H, Shimizu DM, Namiki H. Superficial location of malignant glioma with heavily lipidized (foamy) tumor cells: a case report. *J Neurooncol.* 1989; 7(3):293-297.
 161. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1999; 398:422–426.
 162. Tihan T, Fisher PG, Kepner JL, Godfraind C, McComb RD, Goldthwaite PT, Burger PC. Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Oct; 58(10):1061-1068.
 163. Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiya T, et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet.* 2003; 33:208-213.

164. Veelen van ML, Avezaat CJ, Kros JM, van Putten W, Vecht C. Supratentorial low grade astrocytoma: prognostic factors, dedifferentiation, and the issue of early versus late surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64(5):581-587.
165. Vertosick FT Jr, Selker RG, Arena VC. Survival of patients with well-differentiated astrocytomas diagnosed in the era of computed tomography. *Neurosurgery*. 1991; 28(4):496-501.
166. Vinters HV, Farrell MA, Mischel PS, Anders KH. *Diagnostic neuropathology*. New York: Marcel Dekker. 1998.
167. Wang S, Barres BA. Up a Notch: Instructing Gliogenesis. *Neuron*. 2000; 27:197–200.
168. Wang S, Sdrulla AD, diSibi G, Bush G, Nofzige D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA. *Neuron*. 1998 ; 21 :63–75.
169. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997 a; 3(4):523-530.
170. Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest*. 1997 b; 76(2):277-284.
171. Watanabe K, Peraud A, Gratas C, Wakai S, Kleihues P, Ohgaki H. p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 1998; 95(6):559-564.
172. Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, Osborne BA, Gottipati S, Aster JC, Hahn WC, Rudolf M, Siziopikou K, Kast WM, Miele L. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med*. 2002; 8(9):979-986.
173. Wick W, Naumann U, Weller M. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2006 ; 12(3) :341-349.
174. Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*. 2004; 279(13):12876-12882.
175. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan M, Zha J, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 2010; 464(7291):1052-7.
176. Xu P, Yu S, Jiang R, Kang C, Wang G, Jiang H, Pu P. Differential expression of Notch family members in astrocytomas and medulloblastomas. *Pathol Oncol Res*. 2009; 15(4):703-710.
177. Yamada T, Yamazaki H, Yamane T, et al. Regulation of osteoclast development by Notch signaling directed to osteoclast precursors and through stromal cells. *Blood*. 2003; 101:2227-2234.

178. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009; 360(8):765-73.
179. Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci*. 2005; 8:709-715.
180. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:6414-6418.
181. Zang S, Chen F, Dai J, Guo D, Tse W, Qu X, Ma D, Ji C. RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer. *Oncol Rep*. 2010; 23(4):893-9.
182. Zavadil j, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signaling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2004; 23:1155-1165.
183. Zwijsen RML, Klompmaker R, Wientjens EBHGM, Kristel PMP, van der Burg B, Michalides RJAM. Cyclin D1 triggers autonomous growth of breast cancer cells by governing cell cycle exit. *Mol Cell Biol*. 1996; 16:2554–2560.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Danke sagen möchte ich...

... den gesamten Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung, für die geduldige Beantwortung jeglicher Fragen und die Bereitschaft, mir bei all meinen Anliegen im Labor behilflich zu sein.

... Herrn Prof. Dr. Meyermann, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, das Institut zu jeder Zeit nutzen zu dürfen.

... meinen Mitdoktoranden für die vielen kurzen Ablenkungen und die gemeinsam verbrachten Pausen mit netten Gesprächen. Danken möchte ich vor allem Julia Tichy, die mir zu meiner Dissertation im Institut für Hirnforschung geraten hat.

... meinem Betreuer Dr. Jens Schittenhelm, der mir in jeglicher Hinsicht mit Rat und Tat zur Seite stand und mich mit seiner grenzenlosen Geduld immer wieder auf den richtigen Weg gebracht hat. Ohne ihn und seine ständige Motivation wäre mir diese Arbeit sehr viel schwerer gefallen.

... meinem Vater und meiner Tante Eva für die Unterstützung in stilistischen und grammatikalischen Fragen.

... meinen Eltern für die langjährige Unterstützung, die mein Studium und damit auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

... meinem Freund Alex, nicht nur für die Hilfe bei meinen Computer- und Graphikproblemen, sondern auch für seine allgemeine Unterstützung in dieser Zeit.

