

**Die hohe Expression von High Mobility Protein Group A am
invasiven Rand des Glioblastoms – Ein möglicher
prognostischer Marker für das Überleben der Patienten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nohman, Amin Ibrahim aus Gießen

Gießen 2023

**Die hohe Expression von High Mobility Protein Group A am
invasiven Rand des Glioblastoms – Ein möglicher
prognostischer Marker für das Überleben der Patienten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nohman, Amin Ibrahim aus Gießen

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Neurochirurgische Klinik

Gutachterin: Prof. Dr. med. Malgorzata Kolodziej

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Hagen Huttner

Tag der Disputation: 29.09.2023

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS GLIOBLASTOM (GBM)	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Ätiologie</i>	2
1.1.3	<i>WHO-Klassifikation</i>	2
1.1.4	<i>Makroskopische und mikroskopische Merkmale</i>	3
1.1.5	<i>Molekulargenetik</i>	4
1.1.6	<i>Klinische Symptome</i>	7
1.1.7	<i>Lokalisation</i>	8
1.1.8	<i>Diagnostik</i>	8
1.1.9	<i>Therapie</i>	10
1.1.10	<i>Prognose</i>	15
1.2	HIGH MOBILITY GROUP A PROTEINE 2 (HMGA2)	16
1.2.1	<i>Allgemein</i>	16
1.2.2	<i>Onkogene Signalkaskaden durch HMGA2</i>	17
1.2.3	<i>Der Einfluss von HMGA2 auf Neoplasien</i>	18
1.2.4	<i>HMGA2 im Glioblastom</i>	19
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	21
2	METHODEN UND MATERIAL	22
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV.....	22
2.1.1	<i>Kontrollkollektiv</i>	22
2.2	REAL-TIME PCR.....	23
2.2.1	<i>RNA Isolation</i>	23
2.2.2	<i>Reinheitsmessung / Nanodrop</i>	24
2.2.3	<i>Umschrieb von RNA auf cDNA</i>	24
2.2.4	<i>Real-time PCR</i>	25
2.2.5	<i>Auswertung der qPCR</i>	27
2.3	IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)	30
2.3.1	<i>Schnittvorbereitung der Proben</i>	30
2.3.2	<i>Färbung der Schnitte</i>	31
2.3.3	<i>Kontrollfärbungen</i>	32
2.3.4	<i>Auswertung der Immunhistochemie</i>	32
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
3	ERGEBNISSE.....	36
3.1	DESKRIPTIVE ANALYSE.....	36
3.2	ERHÖHTE HMGA2 EXPRESSION IM GLIOBLASTOM IM VERGLEICH ZUM NORMALHIRNGEWEBE	37
3.3	HMGA2 EXPRESSION IM RANDBEREICH VS. TUMORMITTE DES GLIOBLASTOMS	38
3.4	KORRELATION DER HMGA2 EXPRESSION IM RANDBEREICH KORRELIERT NICHT MIT MGMT UND WEITEREN PARAMETER	38
3.5	ÜBERLEBENSANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER HMGA2 EXPRESSION IM RANDBEREICH	39
3.5.1	<i>Überlebensanalyse in Abhängigkeit des MGMT Status, sowie HMGA2 Randexpression</i> ... 40	
3.5.2	<i>Einfluss der HMGA2 Expression am Rand auf das Überleben – Multivariate Analyse</i> 42	
4	DISKUSSION.....	44
4.1	EXPRESSIONSUNTERSCHIED VON HMGA2 IM GLIOBLASTOM UND NORMALHIRNGEWEBE.....	44
4.2	ERHÖHTE HMGA2 EXPRESSION AM TUMORRAND	45
4.3	PROGNOSTISCHER FAKTOR VON HMGA2 IM RANDBEREICH DES GLIOBLASTOMS.....	45
4.4	MÖGLICHE MOLEKULARGENETISCHE SCHLÜSSELROLLE VON HMGA2 IN DER RANDZONE DES GLIOBLASTOMS 46	
4.5	MIKROSTRUKTUREN UND RANDBEREICH DES GLIOBLASTOMS	48
4.6	THERAPIEOPTIONEN FÜR DEN RANDBEREICH.....	50
4.7	LIMITATIONEN DIESER ARBEIT	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	55

5.1	SUMMARY	55
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
7	TABELLENVERZEICHNIS	58
8	ABBREVIATIONEN	59
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
10	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	78
11	ROHDATEN QPCR UND IMMUNHISTOCHEMIE.....	79
12	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	80
13	DANKSAGUNG	81

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom (GBM)

Das Glioblastom gehört mit etwa 12-25% zu den häufigsten Tumoren des ZNS und stellt mit ca. 40 % den größten Teil der Gliome (Günter Klöppel, 2012). Diese Erkrankung verläuft trotz maximaler Therapie aggressiv und letal mit einer medianen Lebenserwartung von 20,9 Monaten (Stupp et al., 2017).

Es wird unter primären und sekundären Glioblastomen unterschieden. Diese unterscheiden sich insbesondere in ihrer Tumorgenese. Das primäre Glioblastom entspringt de novo und tritt im Patientenalter von 62 Jahren auf. Sekundäre Glioblastome entwickeln sich aus niedergradigen Tumoren und betreffen jüngere Patienten (Wirsching et al., 2016).

Seit 2016 finden molekulare Marker zunehmend eine Bedeutung in der WHO-Klassifikation und tragen maßgeblich zur Einteilung der Gliome bei. Diese Tatsache wurde in der aktualisierten WHO-Einteilung von 2021 bestätigt und weiter ausgeführt, sodass trotz fehlender histologischer Merkmale eine höhergradigere Einstufung durch molekulare Charakteristika erfolgen kann (Louis et al., 2021). Der IDH Mutationsstatus und MGMT-Promotermethylierung sind bereits standardisiert im klinischen Alltag integriert worden und wirken sich auf den klinischen Verlauf aus (Le Rhun et al., 2019).

1.1.1 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz des Glioblastoms beläuft sich auf ca. 3-4/100.000 und hat sich in den letzten Jahren nicht wesentlich geändert. Das Glioblastom tritt bei den meisten Patienten in der zweiten Lebenshälfte auf und weist ein Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von etwa 62 Jahren (Ostrom et al., 2022). Das Glioblastom kann auch bei jüngeren Patienten auftreten, jedoch ist die Gesamtinzidenz deutlich geringer und die molekulargenetischen Eigenschaften unterscheiden sich (Sturm et al., 2014).

Männer erkranken häufiger an einem Glioblastom als Frauen. Das Verteilungsverhältnis ist etwa bei 1:0,64 (Bondy et al., 2008). Insbesondere primäre Glioblastome treten bei Männern häufiger auf als bei Frauen (Barnholtz-Sloan et al., 2003). Die Geschlechterverteilung von sekundär malignisierten Gliomen, ist nicht so eindeutig.

1.1.2 Ätiologie

Eindeutige Auslöser konnten bisher nicht beschrieben werden (Inskip et al., 1995). Dennoch können aus den bisherigen Studien einige Risikofaktoren zusammengefasst werden, die die Entstehung von Glioblastomen anregen (Ohgaki & Kleihues, 2005). Allgemein lassen sich exogene und endogene Faktoren unterscheiden. Exogene Faktoren können mit sozioökonomischen, beruflichen oder auch umweltbezogenen Umständen korrelieren. Endogene Faktoren sind zumeist erblich oder epigenetisch veranlagt und stellen eine Prädisposition zur Erkrankung dar (Feigelson et al., 1996).

Die Korrelation von ionisierenden Strahlen und primären ZNS Tumoren ergab in den Metaanalysen und Studien die eindeutigste exogene karzinogene Wirkung (Kleihues et al., 1976). Einige endogene Faktoren können ebenso zur Tumorgenese beitragen. Ein überdurchschnittlicher Blutzuckerspiegel und hohe Körpergewichtswerte im Sinne eines metabolischen Syndroms konnten bei Patienten mit einem Glioblastom nachgewiesen (Nelson et al., 2012).

Einige Studienergebnisse suggerieren, dass ca. 5% aller Gliome erblichen Ursprungs entspringen (Malmer et al., 2001). Das Li-Fraumeni-Syndrom oder die Neurofibromatose Typ 1 ist neben anderen Tumoren bzw. Erkrankungen auch vermehrt mit dem Glioblastom assoziiert (Ostrom et al., 2014).

Immunologische Mechanismen sind mit Tumorentstehungsprozessen assoziiert (Lahmar et al., 2016). Chronische Entzündungsreaktionen können verschiedene Signalwege initiieren, die sowohl pro-proliferativ, als auch anti-apoptotisch sein können. So konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α , welches ein klassisches Inflammationsprotein darstellt, in Gliomen erhöht exprimiert wird (Wallach et al., 1999). Oxidativer Stress durch Infektionen oder Immunabwehr führt zu einer genetischen Instabilität und kann Mutationen auslösen (Matsui et al., 2000). Eine weitere Verbindung zwischen Entzündungsgeschehnisse und Tumorgenese ist das Tumorsuppressorprotein p53, welches sowohl bei tumorösen, als auch bei antiviralen Prozessen aktiviert wird (Takaoka et al., 2003).

1.1.3 WHO-Klassifikation

Gliale Tumore werden nach der WHO-Klassifikation in vier Grade eingeteilt. Das Glioblastom ist in der WHO-Klassifikation Grad 4 eingeteilt. Seit der Überarbeitung der WHO-Klassifikation im Jahre 2016 werden zu den histologischen Merkmalen der Neoplasien auch molekulargenetische Kriterien zur Einteilung in der WHO-

Klassifikation genutzt (Louis et al., 2016). Die Konzentration und Betonung der Molekulargenetik wurde in der neuesten Überarbeitung im Jahre 2021 ausgeweitet. Deletionen und Mutationen mit klinischer Relevanz werden untersucht und prägen die Therapie und die Prognose der Tumore.

Insbesondere IDH1/2, MGMT-Promotermethylierung und 1p/19q Kodeletion werden in der Regel routinemäßig untersucht (Weller et al., 2012). Das Glioblastom wird aktuell als diffuses, astrozytäres Gliom ohne IDH Mutation definiert, welches zusätzlich die typischen histologischen und chromosomalen Veränderungen besitzt (Chen et al., 2022). IDH mutierte Gliome mit der CKDN2A/B Deletion werden neuerdings nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 trotz fehlender histologischer Merkmale als Astrozytom Grad 4 eingeteilt und werden nun klar von den Glioblastomen abgegrenzt (Louis et al., 2021). IDH mutierte Gliome samt 1p/19q Kodeletion werden zu den Oligodendrogliomen eingestuft.

Grad 1 Gliome sind benigne Tumore und weisen eine gute Prognose auf. Sie sind gut differenziert und haben ein langsames Wachstum (Perry & Wesseling, 2016). Grad 2 Gliome wachsen etwas schneller und zeigen in der Regel mehrjährige progressfreie Intervalle. Zwar sind sie ebenso gut differenziert wie WHO-Grad 1 Tumore, jedoch wachsen sie infiltrativ und neigen längerfristig zur Malignisierung in höhergradigen Gliome (Perry & Wesseling, 2016). Grad 3 und 4 Gliome sind maligne und undifferenziert. Das sehr infiltrative Wachstumsbild führt zur schlechten Prognose (Louis et al., 2016).

1.1.4 Makroskopische und mikroskopische Merkmale

Makroskopisch weist das Glioblastom eine typisch „bunte“ Schnittfläche auf. Die Nekroseareale können einen großen Teil des Tumors ausmachen und entstehen durch abgestorbene Myelintellen (Weller et al., 2017). In einzelnen Fällen kommt es zu Einblutungen des Tumors in Form von intracerebralen oder subarachnoidalen Blutungen (Soto et al., 2018). Vielmehr zeichnet das Glioblastom ein ausgeprägtes peritumoröses Ödem aus, das nicht mit der Größe des Tumors, sondern mit der Wachstumsrate und mit einer schlechteren Prognose korreliert (Ideguchi et al., 2015).

Mikroskopisch lässt sich eine hohe Zelldichte mit ausgeprägter Kern- und Zellpolymorphie darstellen. Zudem ist die Kern-Plasma-Relation in Richtung große, mehrkernige Nucleoli, welche eine erhöhte Proliferationsrate darstellen, verschoben. Besonders in der Tumormitte lassen sich flächenhafte Nekrosen darstellen, die für den

Tumor sehr charakteristisch sind. Nach wie vor ist die vorherrschende Theorie, dass die tumorkernständige Hypoxie die Zellen in die Peripherie treibt, sodass die Palisadenstruktur resultiert (Abbildung 1) (Brat et al., 2004). Dazu sprossen ausgeprägte Gefäßproliferationen vom Tumorrand in die Mitte hinein (Günter Klöppel, 2012). Obwohl es in Glioblastomen zu deutlichen Gefäßproliferationen kommt, besteht fast immer ein hypoxischer Zustand im Tumor, da die neuen Tumorgefäße selbst nicht physiologisch und intakt ausgebildet werden und die Gefäßwände meist strukturell instabil sind, sodass es zu Mikroleckagen der Gefäßwände und dadurch zu einer herabgesetzten Perfusion kommt. Die pathologischen Vorgänge der Neoangiogenese im Tumor begünstigen die Entstehung von Mikrothromben (Colwell et al., 2017).

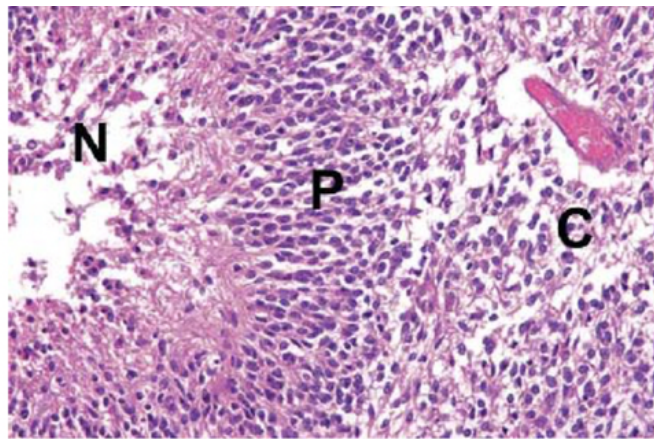


Abbildung 1: Die typische histologische Struktur eines Glioblastoms. Im Tumor zeigen sich nekrotische Areale (N); Im Binnenbereich die palisadenartige Zellanhäufung (P) und angrenzend daran zellreiches Tumorgewebe mit Tumorzellen (C)(Dong et al., 2005)(Reproduced with permission from Dong et al. 2005, Copyright J. Neuropathology&Experimental Neurology)

1.1.5 Molekulargenetik

Deletion von Chromosom 10 - Auf chromosomaler Ebene lässt sich häufig ein Verlust (Loss of heterozygosity, LOH) des 10(q) Chromosoms finden (Riemenschneider & Reifenberger, 2009). Dabei geht die Heterogenität der homologen Chromosome verloren, indem eines der korrespondierenden Allele gelöscht und durch das andere nun gedoppelte und mutierte Allel ersetzt wird (Bleeker et al., 2012). Bemerkenswert ist auch, dass LOH 10 bei fast allen Subtypen aufzufinden und wohl eines der häufigsten Veränderungen ist (Ohgaki & Kleihues, 2007). Genaues Genmapping lässt darauf schließen, dass die betroffenen Gene auf Chromosom 10 sogenannte Tumorsuppressorgene sind und demnach bei Verlust oder Aberration die Onkogenese gefördert wird (Ichimura et al., 1998). Die betroffenen Patienten leben im Vergleich zu Patienten ohne diese Deletion

kürzer, sodass der Verlust des Alles von Chromosom 10 als prognostisch ungünstiger Faktor berücksichtigt wird (Balesaria et al., 1999).

EGFR - Die funktionellen Gegenspieler der Tumorsuppressorgene sind die Onkogene, die die Proliferation und das Zellwachstum antreiben und bei Tumoren die Teilungsrates steigern. Ein Beispiel dieser onkogenen Signalkaskaden ist die EGFR-Signalkaskade (epidermal growth factor receptor). Kommt es zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors, werden PI3K/AKT stimuliert, die wiederum die Zelle in die Mitose einführen und somit zur Zellteilung führen. Glioblastome weisen häufig Amplifikation des EGF-Rezeptors bzw. des dazugehörigen Chromosoms 7 (gain of chromosome 7) auf. Diese Amplifikation des EGFR-Gens zeichnet zumeist primäre Glioblastome aus (Smith et al., 2001). Diese Hochregulation korreliert mit höhergradigen Tumoren, weniger Apoptose der Tumorzellen, vermehrter Therapieresistenz und einer schlechteren Prognose (Pelloski et al., 2006).

CDKN2A/B – In vielen höhergradigen Gliomen ist eine Deletion von CDKN2A/B vorhanden (Brat et al., 2020). Die Deletion von CDKN2A/B ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Shirahata et al., 2018). Auch in niedriggradigen Tumoren, besteht die Assoziation zwischen einer homozygoten Deletion von CDKN2A/B und der schlechten Prognose (Reinhardt et al., 2018). Aufgrund der überzeugenden Daten, wurde die Deletion von CDKN2A/B in die aktuelle WHO-Klassifikation aufgenommen und definiert Astrozytome Grad 4 (Louis et al., 2021). Die Deletion von CDKN2A/B fördert die Entartung durch Fehlregulationen des Zellzyklus und erhöhte Zellproliferation (Sharpless, 2005).

P53 - P53 ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen und friert die Zelle bei Zellschäden oder DNA-Schäden im jeweiligen Zyklus ein, sodass es zu einem Zellzyklusstillstand kommt und letztlich die Apoptose eingeleitet wird. Die Mutation an p53 kann bevorzugt in sekundären Glioblastomen beobachtet werden. Die Funktionsstörung des p53-Gens tritt bereits sehr früh in der Mutationskette auf und bildet somit einen sog. „Early-Event“ (Watanabe et al., 1996).

IDH – Korrespondierend zu p53, so ist auch Isocitrat Dehydrogenase 1 (IDH1) ein Early-Event Molekül und tritt besonders bei niedriggradigen Gliomen und sekundären Glioblastomen auf. Das Enzym ist Teil des Zitratzykluses und dient somit als Energielieferant. Die IDH1-Mutation, die besonders bei jungen Patienten mit guter Prognose aufzufinden ist, korreliert sehr stark mit der 1p19q Kodeletion und der MGMT-Promotermethylierung (Sanson et al., 2009). In den meisten Studien und Metaanalysen

konnte eine IDH Mutation als unabhängiger, prognostisch günstiger Marker präsentiert werden (Khan et al., 2017). Die IDH Mutation führt zu einer D-2-Hydroxyglutarat (D2HG) Elevation, welche theoretisch präoperativ im Blut und auch bildgebend nachgewiesen werden kann (Andronesi et al., 2013). Eine präoperative IDH Einschätzung könnte womöglich die operative Herangehensweise beeinflussen, da die ersten Studien zeigen konnten, dass Patienten mit IDH mutierten Glioblastomen besonders von einer maximalen Resektion profitierten (Beiko et al., 2014; Delev et al., 2019).

MGMT - Das Reparaturenzym MGMT schützt Zellen vor alkylierenden Stoffen und bietet somit einen Zellschutz vor dem adjuvant eingesetzten Chemotherapeutikum Temodal® (Temozolomid). Durch Methylierungen an epigenetischen Strukturen, die vererbbar, dynamisch und veränderbar sind, können kooperative Regulationsmechanismen sowohl auf die Chromatinstruktur, als auch auf die Genexpression einwirken (Goldberg et al., 2007). Promotermethylierungen gehen auf eine epigenetische Konstante zurück und besitzen auch einen erblichen Charakter (Bleeker et al., 2012). Ist nun das MGMT-Gen durch die Promoterhypermethylierung an der Cytosin-Phosphat-Guanin Insel (CpG) moduliert, ist dieser Schutz nicht mehr gewährleistet und die Resistenz vor Temodal® sinkt (Mansouri et al., 2019). Zusammengefasst bewirkt die MGMT-Promotermethylierung, dass das MGMT-Gen abgeschaltet bzw. die Funktion des Reparaturenzyms abgeschwächt wird.

Die Prognose und besonders das Ansprechen auf die Chemotherapie der Patienten mit MGMT-Promotermethylierungen ist signifikant besser als die Prognose der Patienten ohne diesen epigenetischen Charakter (Hegi et al., 2005).

1p/19q Kodeletion – Die 1p/19q Kodeletion ist das Diagnosekriterium für das Oligodendrogliom und kann bei Gliomen mit oligodendroglialen Komponenten auftreten. Diese Deletion ist immer mit einer IDH Mutation assoziiert (Labussiere et al., 2010). In der Regel besteht aufgrund einer balanzierten Translokation stets eine Kodeletion und geht mit einer besseren Prognose einher (Jenkins et al., 2006).

TERT – Die Methylierung des TERT Promoters wirkt sich auf die Telomeraseaktivität aus. Telomerase reguliert die Telomere, die für das Zellüberleben entscheidend sind. In entdifferenzierten und immortalisierten Zellen, wird die Telomeraseaktivität nicht gesenkt und die Telomere werden nicht gekürzt (Patel et al., 2020). Arita H. et al. zeigte, dass eine TERT Promotermutation und ein positiver Methylierungsstatus von MGMT einen positiven Effekt auf das Überleben haben könnte (Arita et al., 2016).

1.1.5.1 Wechselwirkung zwischen Molekulargenetik und Immunsystem

Einige der oben genannten Marker interagieren mit Zellen des Immunsystems. Vor allem Zytokine, die üblicherweise Signalproteine sind, scheinen eine zentrale Rolle zur immuninhibierenden Tumorumgebung zutragen und dadurch dem Tumor die Wachstumsmöglichkeit sichern (Schwartzbaum et al., 2010). Zudem fördern ortsständige Mikroglia und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) das Tumorgeschehen. So wurde bereits beschrieben, dass TAMs eine proliferative, immunsuppressive und ödematöse Kontribution tragen (Gutmann & Kettenmann, 2019). TAMs können unterschiedlich aktiviert sein und haben entweder tumorfördernde oder inhibierende Eigenschaften (Gordon, 2003). TAMs scheinen in verschiedenen Tumorbereichen unterschiedliche Funktionen zu tragen. Es wurde eine erhöhte proinflammatorische Funktion der TAMs im Tumorkern präsentiert, wohingegen die Tumorperipherie eine erhöhte antiinflammatorische Aktivität zeigt (Landry et al., 2020). Auch die zelluläre Konstellation ist regional unterschiedlich und es gibt Hinweise, die andeuten, dass Mikroglia in der invasiven Grenzzone und Makrophagen eher im Tumorkern vorzufinden sind (Z. Chen et al., 2017).

1.1.6 Klinische Symptome

Glioblastome sind durch unspezifische Symptome geprägt. Symptome, wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel können die ersten merklichen Hinweise auf den Tumor sein (Omuro & DeAngelis, 2013). Tumore in eloquenten Arealen oder Tumore, die die Liquorzirkulation behindern und hydrozephalie Symptome auslösen, führen zur schnellen Diagnostik. Befindet sich das Glioblastom in einem eloquenten Areal, treten häufig fokale neurologische Defizite, wie z.B. Sehstörungen, Paresen oder Sensibilitätsausfälle auf. Sehr stark ausgeprägte, peritumoröse Ödeme verstärken in der Regel die Ausfallserscheinungen (Hacke, 2016). In vielen Fällen jedoch sind es anfänglich Kopfschmerzen, die besonders frühmorgens, bifrontal mit ipsilateraler Seitendominanz, samt Übelkeit und Erbrechen einhergehen können (Wen & Kesari, 2008). Die Prävalenz eines intrakraniellen Tumors ohne Kopfschmerzen ist sehr gering und wurde in Metauntersuchungen mit 0,7% beschrieben (Morris et al., 2009). In 95,91% der Fälle wird die Diagnose erst dann gestellt, wenn weitere neurologische Symptome oder Auffälligkeiten geboten werden (Valentinis et al., 2010).

In etwa 25% der Fälle fallen Glioblastome durch Krampfanfälle auf. Temporal- oder kortikal lokalisierte Tumore neigen zu Krampfanfällen, die in Form eines fokalen- oder

globalen Anfalls auftreten können. Über viele neurologische Kliniken, die Patienten mit epileptischen Krampfanfällen behandeln, werden solche Patienten aufgenommen und eine Bildgebung durch eine Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) generiert. Durch passende antikonvulsive lassen sich die Krampfanfälle in den meisten Fällen gut beherrschen (Chaichana et al., 2009). Psychische, kognitive und emotionale Störungen oder auch eine merkbare Wesensveränderung, die schleichend entstehen, werden oft verkannt und können auch durch frontale oder temporale Glioblastome verursacht werden (Golla et al., 2014). Die Symptome und die Klinik am Ende der Erkrankung fallen divers aus. Besonders Bewusstseinsbeschränkung, fokale Störungen, wie z.B. Hemiparesen, Schluckstörungen oder Kommunikationsstörungen und Folgeerkrankungen, wie Infektionen, prägen das präfinale Bild (Thier et al., 2016).

1.1.7 Lokalisation

Glioblastome treten gehäuft in den Großhirnhemisphären auf. Dabei sitzen die Tumore häufig im Frontal- und Temporallappen. Etwa 18% der Patienten zeigen bei der Diagnosestellung bereits multifokale Läsionen. Ein multifokaler Status und sehr große Glioblastome sind prognostisch ungünstig. Etwa 34% der Glioblastompatienten zeigen eine Beteiligung der Basalganglien (Barsouk et al., 2021). Glioblastome in tiefen Hirnregionen, wie z.B. an den Basalganglien oder periventrikulär, sind prognostisch ungünstig (Awad et al., 2017). Rechtshemisphärische und nicht in eloquenten Regionen liegende Tumore führen zur späteren Erstdiagnose (Kawauchi et al., 2022). Der infiltrative Charakter des Glioblastoms führt zur Ausbreitung der Tumorzellen vom Marklager in weitere Teile des Gehirns, wie z.B. in den Kortex, Stammganglien oder schmetterlingsförmig über den Balken auf die Gegenseite (Günter Klöppel, 2012).

1.1.8 Diagnostik

Weist ein Patient typische Symptome auf und erhärtet die Anamnese und körperliche Untersuchung den Verdacht eines cerebralen Tumors, kommt es zügig zu einer kranialen Bildgebung. In erster Linie wird häufig eine CT-Untersuchung veranlasst, um akute Blutungen und weitere Pathologien auszuschließen (Cha, 2006). Darauf folgend, wird normalerweise eine MRT-Untersuchung angeordnet, da die räumliche Auflösung im Vergleich zum CT deutlich besser ist. Durch verschiedene MRT Modalitäten können heute präoperativ weitaus mehr Informationen gewonnen werden, als noch vor einigen

Jahren. Ähnlich wie bei der makroskopischen Beobachtung, ist das Glioblastom im CT und MRT durch eine deutliche Inhomogenität geprägt. Diese Inhomogenität resultiert durch das gleichzeitige Vorhandensein von Nekrosen, Blutungen und Ödemen innerhalb und um den Tumor herum (Ideguchi et al., 2015).

1.1.8.1 Computertomographie (CT)

Die Computertomographie ist häufig die erste Bildgebung, die besonders in der Notfalldiagnostik beim Auftreten von neuen neurologischen Defiziten erfolgt. Die schnelle Untersuchungsdauer und gute Verfügbarkeit sind häufig der Grund für eine initiale CT-Bildgebung. Kontraindikationen gegenüber des MRTs, wie z.B. ein einliegender Herzschrittmacher, können ebenso ein Grund zur CT Bildgebung sein (Perkins & Liu, 2016). CT Aufnahmen können darüber hinaus knöcherne Strukturen und Verkalkungen besser darstellen (Bradley et al., 1984).

1.1.8.2 Magnetresonanztomographie

Das MRT ist ein wichtiges, präoperatives diagnostisches Verfahren, da es nicht nur die beste Auflösung bietet, sondern auch die Raumforderung anhand von Perfusions- und Diffusionsmustern weiter einteilen kann (Covarrubias et al., 2004). Anhand des regionalen cerebralen Blutvolumens (rCBV) lassen sich Low-Grade-Gliome von High-Grade-Gliome unterscheiden (Usinskiene et al., 2016). Vielmehr wird die Grenzzone zwischen Tumor und normalem Hirngewebe durch die Perfusionsanalyse verdeutlicht, sodass sowohl die anatomischen, als auch die physiologischen Verhältnisse des Tumors visualisiert werden (Covarrubias et al., 2004). Suszeptibilitätsgewichtete MRT Aufnahmen (SWI) betonen besonders die Durchblutungsverhältnisse des Tumors und können sogar sehr kleine Blutungen oder thrombotische Ereignisse darstellen. Zudem können mittels SWI nekrotische Glioblastome von Abszessen unterschieden werden (Di Ieva et al., 2015). Zusätzlich kann das MRT durch Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) die Nervenbahnen in Form einer Traktographie aufnehmen, um bei der Resektion die funktionsausführenden Bahnen zu schonen (Abdullah et al., 2013). Das Funktions-MRT zeigt die eloquenten Areale des Gehirns an, sodass bei einer möglichen Resektion diese Areale geschont und nicht reseziert werden. Sogar innerhalb des Tumors selbst lassen sich Subareale durch MRT Aufnahmen klassifizieren und demnach einordnen (Shukla et al., 2017). Glioblastome weisen defekte Gefäßstrukturen und Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke auf, sodass Kontrastmittel die Blut-Hirn-Schranke durchlaufen kann und

angereichert wird. Typischerweise ergibt sich eine ringartige Anreicherung um den Tumor herum. Da diese Ringstruktur nicht nur Glioblastome kennzeichnet, sondern auch Metastasen oder Lymphome bildgebend ähnlich aussehen können, erfolgen zusätzlich Perfusions- und Diffusionsuntersuchungen, um hirneigene Tumore von Metastasen zu unterscheiden (Law et al., 2002).

Besonders die frühen postoperativen MRT-Aufnahmen zeigen das Ausmaß der Resektion. Zeigt sich eine komplette Resektion der kontrastmittelaufnehmenden Anteile, korreliert dies mit einem prognostisch positiven Verlauf (Albert et al., 1994). Nicht nur zur initialen Diagnose, sondern auch als Verlaufsparemeter zur Beurteilung des Therapieerfolgs bzw. Tumorprogresses, ist die Magnetresonanztomographie mit eines der wichtigsten bildgebenden Verfahren. In der Regel erhalten Patienten postoperativ in kurzen Abständen MRT-Kontrollen. Dabei ist entscheidend, zwischen einem Rezidiv und Pseudoprogess zu unterscheiden, da beides im MRT sehr ähnlich konfiguriert ist und oftmals eine abschließende Unterscheidung nur im Verlauf möglich ist (Brandes et al., 2008).

1.1.8.3 Positron-Emissionstomographie (PET)/ Einzelphotonen-Emissionstomographie (SPECT)

Die Positron-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT) können zusätzlich zu den herkömmlichen Diagnostikverfahren angewendet werden. Dabei werden jedoch nicht morphologische Strukturen abgebildet, sondern es werden gezielte Stoffwechselfunktionen beobachtet, die Aufschluss auf das zu untersuchende Organ bzw. Struktur geben. Mittels radiomarkierten Aminosäuren im PET können im MRT kontrastmittelaufnehmende Areale besser differenziert werden. Vitales Tumorgewebe kann von (Strahlen)Nekrose besser unterschieden werden (Rapp et al., 2013). PET oder SPECT ermöglichen teilweise eine Graduierung der Malignität und Unterscheidung von neoplastischem zu nicht-neoplastischem Gewebe. Solche Verfahren werden jedoch sehr selten im klinischen Alltag verwendet.

1.1.9 Therapie

Eine Therapie ist immer individuell abzuwägen und Faktoren, wie z.B. Alter, Allgemeinzustand und Wunsch des Patienten, sollten in die Entscheidung einbezogen werden (Iwamoto et al., 2008). Aktuell besteht die Therapie aus einer operativen

Resektion, sowie anschließender konkomitanten Radiochemotherapie und schließlich einer adjuvanten Chemotherapie (Stupp et al., 2005).

1.1.9.1 Operation

Die operative Intervention und das Ausmaß der Resektion gehen mit einer besseren Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit einher. In einer großen systematischen Metaanalyse konnte eine Assoziation zwischen der Überlebenswahrscheinlichkeit und Resektionsausmaß beschrieben werden (Brown et al., 2016). Des Weiteren, verbessert die Entfernung des Tumors im Vergleich zu Biopsie oftmals die Symptomatik des Patienten, da die raumfordernde Komponente minimiert wird (Dayani et al., 2018). Eine komplette Resektion ist aufgrund des invasiven Charakters des Tumors nicht möglich, sodass lediglich eine makroskopische Entfernung der kontrastmittelaufnehmenden Anteile unter Erhalt neurologischer Funktionen erfolgt (Hacke, 2016). Falls der Tumor eine örtliche Nähe zu eloquenten Arealen aufweist, kann eine radikale Resektion erschwert bzw. nicht möglich sein. Der Ausmaß der Resektion korreliert mit Überlebensanalysen und wirkt sich prognostisch günstig aus (Sanai & Berger, 2008). Im Jahre 2006 konnte in einer randomisierten kontrollierten Studie präsentiert werden, dass die fluoreszenzgesteuerte Resektion (siehe 1.1.9.1.1) das Resektionsausmaß und das progressionsfreie Überleben (PFS) steigert (Stummer et al., 2006). Auch das intraoperative MRT wird eingesetzt und zeigt ein erhöhtes Resektionsausmaß (Senft et al., 2011). Metaanalysen bestätigen, dass der Gebrauch des intraoperativen MRTs auch das PFS erhöht (Li et al., 2017). Weitere intraoperative Verfahren, wie z.B. die Sonographie oder die Raman-Spektroskopie werden eingesetzt und können ebenso zur Optimierung der Resektion beisteuern. Die Verbesserung der Resektion und insbesondere die Resektion des Tumorrandes wird angestrebt, um zum einen die rezidivfreie Zeit zu verlängern, aber auch eine bessere Lebensqualität zu erreichen (D'Amico et al., 2017).

1.1.9.1.1 Fluoreszenzgesteuerte Resektion

Bereits in Metaanalysen konnte präsentiert werden, dass der Ausmaß der Resektion mit besseren Überlebensparametern assoziiert ist. Die Prognose für die ersten beiden Jahre und das progressionsfreie Überleben zeigte sich in diesen Metaanalysen nach einer Gross-total Resektion signifikant gebessert im Vergleich zu Teilresektionen oder Biopsien (Brown et al., 2016). Seit der klinischen Phase-3 Untersuchung im Jahre 2006 wurde 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zugelassen (Stummer et al., 2006). Die fluoreszenzgestützte

Resektion dient zur besseren Abgrenzung des Tumorgewebes und zur Verbesserung der Resektionsquantität und -qualität. 5-ALA oder Fluoreszin-Natrium bewirken ein Aufleuchten von Tumorzellen, welche dann unter bestimmten Lichtverhältnissen dargestellt werden können. 5-ALA wird durch spezielles Blaulicht bei 440 Nanometern dargestellt, wohingegen Fluoreszin-Natrium bei 560 Nanometern visualisiert wird (Hamamcioglu et al., 2016). Darüberhinaus besteht in der Bioverteilung der Stoffe ein Unterschied. Die Leuchtkraft und somit Abgrenzbarkeit von 5-ALA nimmt in der Tumorperipherie ab, sodass Fluoreszin-Natrium, welches in der Peripherie und besonders im Infiltrationsrand leuchtet, hinsichtlich der Resektion am Rand hilfreich sein könnte (Diaz et al., 2015). Fluoreszin-Natrium wurde bereits multizentrisch geprüft und durchaus gute Ergebnisse erzielt (Acerbi et al., 2018). Auch die Handhabung und Zufriedenheit der Operateure ist hoch (Bomers et al., 2020).

1.1.9.1.2 Stereotaktische Biopsie

Eine Diagnose kann erst durch die neuropathologische Untersuchung gestellt werden. Dafür werden Gewebeproben gebraucht, die entweder im Rahmen der offenen Resektion oder durch eine Biopsie erhalten werden. Die stereotaktischen Biopsien ermöglichen mithilfe von radiologisch ermittelten Koordinaten eine sehr genaue und punktuelle Entnahme von Gewebeproben. Bei Patienten mit multifokalen Glioblastomläsionen oder Tumoren in eloquenten Arealen, ist eine solche Biopsie sinnvoll, da die kleinstmögliche Zugangsmethode gewählt wird und die Risiken der postoperativen Komplikationen geringer sind. Zur besseren Diagnose von astrozytären Tumoren, werden häufig mehrere Proben benötigt, um die Aussagekraft zu optimieren (Chandrasoma et al., 1989). Um das beste Ergebnis zu erzielen, ist es wichtig, die Ergebnisse mit der klinischen und radiologischen Präsentation abzugleichen, da so ein besseres multimodales Gesamtbild entsteht (Vaquero et al., 2000).

1.1.9.2 Chemotherapie

Nach der Diagnosenstellung des Glioblastoms erfolgt eine konkomittante Radiochemotherapie und anschließend eine adjuvante Chemotherapie. Die zuvor guten Ergebnisse von Temozolomid (Temodal®) in Glioblastomen, führten zur Untersuchung der konkomittanten Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie (Yung et al., 2000). Temozolomid ist ein Zytostatikum, welches antineoplastisch wirkt und die DNA-Replikation stört. Eine entscheidende Eigenschaft für Medikamente, die im

Hirngewebe wirken, ist die Überquerung der Blut-Hirn-Schranke. Die Kombination aus einer Radiochemotherapie erwies eine signifikante Steigerung der durchschnittlichen Überlebenszeit im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie. Das mediane Überleben mit der Kombinationstherapie erbrachte einen Überlebensvorteil von ca. 3 Monaten (Walker et al., 1978).

Die Gabe von Temozolomid erfolgt oral und in zwei Phasen. Zunächst wird das Medikament über 6 Wochen lang simultan zur Bestrahlungstherapie verabreicht und anschließend als Erhaltungstherapie über weitere sechs Monate eingenommen (Hacke, 2016). Die zusätzliche Gabe von Temozolomid zur Radiotherapie verlängert die durchschnittliche Überlebenszeit und verzögert die Progression des Tumors. Der Überlebensvorteil bestätigt sich ebenso bei älteren Patienten ohne relevante Beeinträchtigung der Lebensqualität (Perry et al., 2017). In den allermeisten Fällen ist Temozolomid gut verträglich. Die häufigsten Nebenwirkungen sind: Erschöpfung, Übelkeit, Thrombozytopenie und Leukozytopenie (Scaringi et al., 2013).

1.1.9.3 Radiotherapie

Durch erkenntnisbringende Studien und fortgeschrittenere Technik wird die Bestrahlung durch komplexe Berechnungen und Vorbereitungen möglichst effektiv und schonend verabreicht. Die Gesamtdosis von 60 Gy wurde ermittelt, da höhere oder niedrigere Dosen keine besseren Ergebnisse bzw. eine höhere Rate an Nebenwirkungen ergeben haben (Fulton et al., 1992). Außerdem gibt es verschiedene Radiatiomodalitäten. Somit erfolgt die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy, die fraktioniert auf sechs Wochen á 2 Gy pro Tag (fünf Tage Woche) verteilt werden. Natürlich wird eine möglichst geringe Strahlenbelastung mit ausreichender Wirkung angestrebt. Die Bestrahlung mit 60 Gy ergab einen besseren Verlauf, als niedrigere Dosen (Bleehen & Stenning, 1991).

1.1.9.4 Rezidivtherapie

Die Therapie von Rezidiven ist nicht standardisiert und wird häufig individuell entschieden. Die regelmäßigen bildgebenden Verlaufskontrollen werden nach den Rano-Kriterien in complete response, partial response, progressive disease und stable disease eingeteilt (Chang et al., 2015). In Zusammenschau der klinischen Präsentation wird interdisziplinär die weiterführende Therapie indiziert. In der Regel erfolgt zumindest eine erneute Chemotherapie. Diese kann entweder erneut mit Temozolomid oder mit anderen Chemotherapeutika, wie z.B. Lomustin oder Etoposid. Häufig werden diese

Medikamente kombiniert. Erste Ergebnisse einer prospektiven Arbeit deuten, dass eine Kombination von Lomustin und Temozolomid ein verbessertes Überleben erbringt (Herrlinger et al., 2019). Sollte ein früher Progress eintreten, dann sind Medikamente wie z. B. Bevacizumab zugelassen. Bevacizumab hemmt durch das Blocken von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) die Gefäßneubildung und beschränkt damit die Blutversorgung des schnellwachsenden Tumors (Diaz et al., 2017). Eine eindeutige Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität konnte durch Bevacizumab nicht erreicht werden. Insbesondere im Kontext einer MGMT Promoter Methylierung zeigen alkylierende Medikamente bessere Ergebnisse (Seystahl et al., 2020). Zudem werden weitere Chemotherapeutika zur Rezidivtherapie eingesetzt. Besonders Lomustin, ein Nitroseharnstoffderivat, erwies sich in mehreren klinischen Studien als förderlich (Weller & Le Rhun, 2020). Eine klinische Studie, die die Kombination von Bevacizumab und Lomustin in 288 Patienten untersuchte, ergab keinen Überlebensvorteil der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Lomustin (Wick et al., 2017). Meta-Analysen mit neueren Daten beschreiben, einen möglichen Vorteil für frühe Rezidivoperationen (Lu et al., 2018).

Eine frühe und adäquate Anbindung an eine palliative Behandlung sollte in fortgeschrittenen Tumorstadien und palliativen Situationen erfolgen. Zudem sollten die Patienten symptomatisch mit Steroiden und passenden Medikamenten therapiert werden, sodass die Lebensqualität und die Leidenszeit des sterbenden Patienten verbessert werden (Walbert & Khan, 2014).

1.1.9.5 Tumor Treating Fields (TTF)

Die Therapie mit TTF wurde erstmalig in einer klinischen Phase-III Studie im Jahre 2012 veröffentlicht. Durch Elektroden an der Kopfhaut werden elektrische Felder mit einer Frequenz von 100-300 kHz und niedriger Intensität angewendet, um die Zellstruktur und damit Zellteilung in schnellwachsenden Tumoren zu stören (Kirson et al., 2004). Nach der medizinischen Zulassung in den USA erfolgten weitere Studien, die durch das Hinzunehmen von TTF zu der regulären Standardtherapie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens (OS) auf 20,9 Monate im Vergleich zu 16 Monaten darstellten. Der prognostisch günstige Einfluss von TTF war unabhängig von anderen klinischen Faktoren, jedoch ist eine gute Compliance der Patienten erforderlich. Starke Nebenwirkungen zeigten sich nicht, lediglich lokale Reizungen der Haut (Stupp et al., 2017). Da die Verblindung bei TTF-Studien nur begrenzt möglich ist und der Einschluss

und Randomisierung der Patienten erst 2 Monate nach der Resektion erfolgte, gibt es kritische Vorbehalte zu diesem Verfahren und ein standardmäßiges Einsetzen im klinischen Alltag ist nicht erfolgt (Fabian et al., 2019).

1.1.10 Prognose

Die Prognose ist trotz des hohen Aufwandes und großer Forschungsaktivität stark eingeschränkt. Die durchschnittliche Überlebenszeit (OS) ist trotz multimodaler Therapie und Versuche individueller Therapieansätze auf ca. 20 Monate limitiert. Eine komplette Heilung ist medizinisch nicht möglich, sodass fast alle Erkrankungsverläufe tödlich verlaufen. Patientenbezogene Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Karnofsky Performance Score oder relevante Vorerkrankungen, sind ebenso prognostisch relevant. Besonders das Alter scheint für das Gesamtüberleben eine wichtige Rolle zu tragen, da ein junges Alter signifikant mit einer besseren Prognose korreliert (Lacroix et al., 2001). Auch wenn Männer etwas häufiger betroffen sind, scheint das Geschlecht keinen signifikanten prognostischen Wert zu tragen. Die aktuell wichtigsten und prognosegünstigsten molekularen Marker sind IDH, MGMT-Promotermethylation und 1p/19q Kodeletion. Eine IDH Mutation ist mit einer besseren Prognose assoziiert (Cancer Genome Atlas Research et al., 2015).

Prognostisch ungünstig ist eine erhöhte EGFR Amplifikation (Saadeh et al., 2018). Eine vergleichbare, prognostisch ungünstige Wirkung hat eine PDGFR Amplifikation (Aldape et al., 2015). Des Weiteren scheint High Mobility Group A (HMGA) prognostisch mit einem ungünstigem Outcome verbunden zu sein (Schwarm et al., 2016). Wie oben beschrieben ist das Ausmaß der Resektion auch prognostisch günstig.

1.2 High Mobility Group A Proteine 2 (HMGA2)

1.2.1 Allgemein

High-mobility Group AT-Hook (HMGA) Proteine sind genregulierende, non-Histone Chromatin Proteine. Sie gehören zu den architektonischen Transkriptionsfaktoren, da sie die Chromatinstruktur aktivierend beeinflussen und somit schließlich die Proteinbiosynthese und Zellaktivität stimulieren (Grosschedl et al., 1994). HMGA2 ist ein kleines Protein und ist genetisch auf Chromosom 12 (12q14-15) lokalisiert (Chau et al., 1995). Die verschiedenen Subtypen der HMGA-Proteine werden durch alternatives Splicing gebildet (Nagpal et al., 1999). Erstmals wurde HMGA2 in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts beschrieben (Goodwin et al., 1973). Zunächst wurden die einzelnen HMG-Proteine durch ihre kleine Größe, gute Löslichkeit in verdünnter Säure und der hohen Phosphorylierung *in vivo* bekannt (Lund et al., 1983). Später wurde HMGA2 eine gen- und proteinregulierende Wirkung attestiert. Sie wirken nicht nur direkt auf die DNA ein, sondern können auch indirekt über Transkriptionsfaktoren, wie Enhancer/Silencer-Systeme, auf die Genaktivität Einfluss nehmen (Bustin & Reeves, 1996; Fusco & Fedele, 2007). Des Weiteren wirkt HMGA2 durch Protein-Protein-Interaktionen und ist Teil mehrerer Signalkaskaden. Einige dieser Signalkaskaden tragen zur Immortalisierung und somit zur Entartung der Zelle bei (Reeves, 2001).

Biochemisch wird HMGA2 durch spezifische Bindungsdomänen ausgezeichnet, die eine hohe Affinität gegenüber adenin- und thyminreichen (AT-reichen) Sequenzen, wie z.B. die kleinen Furchen der DNA-Doppelhelix, aufweisen (Abbildung 2) (Reeves & Nissen, 1990; Strauss & Varshavsky, 1984). HMGA-Proteine haben nicht nur die Fähigkeit an entzerrte und gewundene DNA zu binden, sondern modifizieren, entspiralisieren, entzerren und induzieren Windungen in die DNA-Doppelhelix, sodass letztlich ein erhöhtes Ablesen der Geninformationen und eine Aktivierung der Zelle resultiert (Lehn et al., 1988; Reeves & Nissen, 1990).

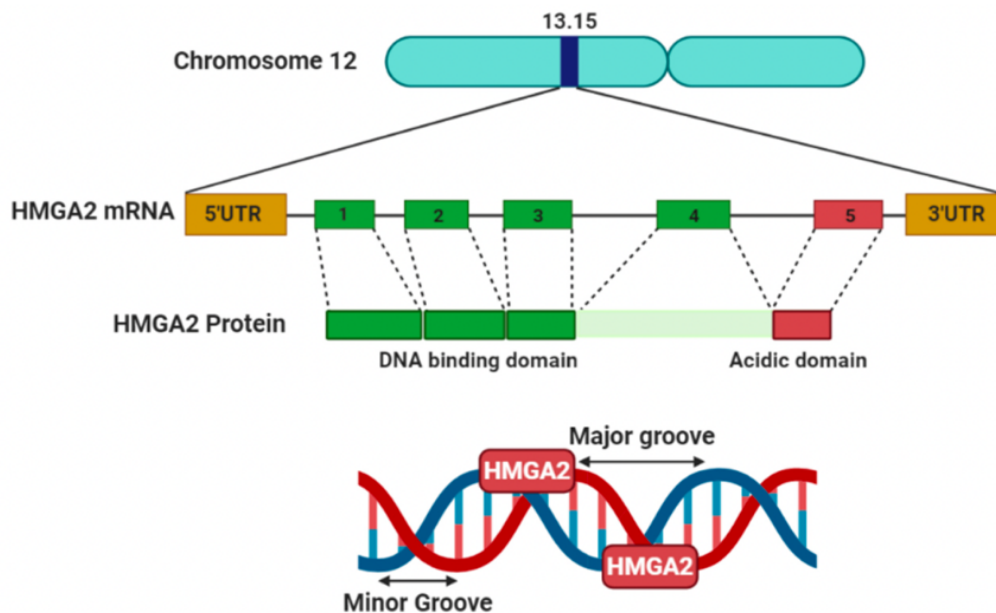


Abbildung 2: Schematische Darstellung von HMGA2 auf chromosomaler Ebene und Proteindarstellung. HMGA2 bindet an die kleinen Kurvature der DNA-Doppelhelix (Mansoori et al., 2021) (Reproduced with the permission from Genes(Basel) – Mansoori, Mohammadi et al. 2021)

1.2.2 Onkogene Signalkaskaden durch HMGA2

Über verschiedene Signalkaskaden trägt HMGA2 eine Rolle bei der Initiierung, Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren. Ein solcher Signalweg ist die Inhibition der let-7 Expression durch HMGA2, welches folglich proliferierende Signalwege, wie z.B. Myc- oder Ras-Kaskaden, aktiviert (Motoyama et al., 2008). Ebenso werden durch eine verminderte let-7 Expression erhöhte ektope LIN28A und LIN28B Expressionen beobachtet, die wiederum die Tumorgenese und insbesondere die maligne Transformation von neuronalen Stammzellen antreiben (Mao et al., 2013). Die genaue Interaktion von let-7 und HMGA2 ist nicht final geklärt und weitere zusammenhängende Faktoren, wie z.B. Hypoxie, werden noch diskutiert.

HMGA2 interagiert mit verschiedenen Signalkaskaden, die die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und infiltrativen Charakter des Tumors begünstigen. Über den TGF- β Signalweg wirkt sich HMGA2 auf die EMT fördernden Proteine Twist und SNAIL aus (Tan et al., 2012). Eine positive Korrelation von HMGA2 und Vimentin, einem mesenchymalen Protein, bestätigt diese Eigenschaft von HMGA2 (Xia et al., 2015). Außerdem induziert HMGA2 EMT-stimulierende Stoffe, wie z.B. Insulin-like-Growthfactor und TGF β RII (Morishita et al., 2013). Die Verbindung zu EMT führe auch zur erhöhten Invasivität und Ausbreitung in das umliegende Gewebe und Lymphknoten (Zhao et al., 2016).

Zudem korreliert eine erhöhte HMGA2-Expression im Glioblastom mit erhöhten SOX2 Werten, da HMGA2 den SOX2-Promoter aktiviert (Chiou et al., 2013). SOX2 ist ein Mastergen, das in neuronalen Stammzellen exprimiert wird und ebenso in HMGA2-positiven Gliomzellen vermehrt exprimiert und letztlich den Gliomzellen stammzellähnliche Eigenschaften verleiht (Gangemi et al., 2009). HMGA2 beeinflusst den Zellzyklus und stößt eine erhöhte Proliferation an, indem es über den PI3K/AKT/mTOR/p70S6K Signalkaskade oder durch die Aktivierung von Zyklin D und E den Zellzyklus stimuliert (Zhang et al., 2019).

Über genregulierende Signalwege hinaus kann HMGA2 über Proteininteraktionen Strukturveränderungen bei Proteinen, wie z.B. bei Nukleosomen, induzieren und wirkt dadurch zumeist proliferierend (Reeves, 2001). HMGA2 erreicht z. B. durch Phosphorylierungen und Interaktionen mit ATR-CHK1 die Inhibition des Apoptosevorganges bei malignen Zellen, sodass der physiologische Eigenschutzmechanismus des Körpers, welches die Entstehung von malignen Tumoren in der Regel durch Apoptose ausbremst, eingeschränkt wird (Natarajan et al., 2013). Des Weiteren scheinen die Protein-Interaktionen mit HMGA die Syntheseaktivität zu beeinflussen, da eine erhöhte IgG-Produktion durch die Interaktion zwischen PU.1 und HMGA gemessen werden konnte, ganz ohne direkten Einfluss auf die DNA (Lewis et al., 2001).

1.2.3 Der Einfluss von HMGA2 auf Neoplasien

Die ersten positiven HMGA2-Expressionsanalysen in Neoplasien wurden unter anderen beim Pankreaskarzinom, Bronchialkarzinom und oropharyngeal Plattenepithelkarzinom beschrieben (Abe et al., 2003; Meyer et al., 2007; Miyazawa et al., 2004). Klinisch korrelieren hohe HMGA2-Expressionswerte mit einer schlechteren Prognose, da Tumorgewebe mit erhöhten HMGA2-Werten mit früher Metastasierung und aggressiverem Charakter korreliert (Fusco & Fedele, 2007). Bestätigend konnte gezeigt werden, dass die 3-Jahresüberlebensrate und die Remissionsraten bei Tumoren mit hoher HMGA2-Expression im Vergleich zu Tumoren mit niedrigeren HMGA2-Expressionen, deutlich reduziert ist, sodass die Suppression von HMGA2 zukünftig durchaus zu bedenken ist (Zhang et al., 2018). Zielgerichtete HMGA2-Blocker könnten die oben beschriebenen onkogene Signalwege inhibieren und somit auch die Tumorgröße und folglich die Ausbreitung des Tumors inhibieren (Zhu et al., 2013). Mikro-RNA, wie z. B. miR-185 oder miR-98 hemmen HMGA2 und inhibieren damit die EMT (Abbildung 3)

(Mansoori et al., 2021). Die Arbeitsgruppe von Yadav et al. untersuchte, ob onkogene Transkriptionsfaktoren, wie HMGA2, SOX2 und Snail eine erhöhte Resistenz gegenüber der Bestrahlung induzieren könnten und berichteten, dass ein gezieltes Hemmen dieser Proteine das Ansprechen auf eine Bestrahlung verbessert (Yadav & Shankar, 2019).

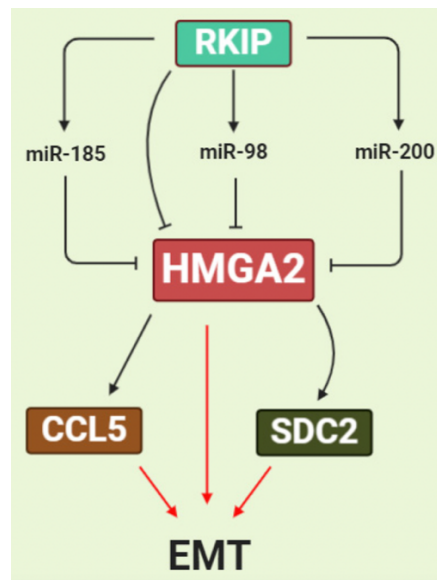


Abbildung 3: Der RAF Kinase Inhibitor hemmt durch miR-185, miR-98 und miR-200 das HMGA2 Protein. Diese Kaskade führt zur Inhibition des EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) Pathway. (Mansoori et al., 2021)(Reproduced with the permission from Genes(Basel) – Mansoori, Mohammadi et al. 2021)

1.2.4 HMGA2 im Glioblastom

Im Glioblastom konnte eine erhöhte HMGA2-Expression ermittelt werden, sodass in den letzten zehn Jahren einige Studien unternommen worden sind, um die Relevanz und klinische Bedeutung von HMGA2 in Glioblastomen zu eruieren (Zhong et al., 2016). HMGA2 ist besonders in hochgradigen hirneigenen Tumoren vermehrt exprimiert und es zeigt sich eine signifikant höhere HMGA2-Expression in Grad 3 und 4 Gliomen im Vergleich zu Grad 1 und 2 Gliomen. In Normalhirngewebe ergab sich signifikant niedrigere Expressionsergebnisse von HMGA2 (Ma et al., 2019). HMGA2 inhibierte Gliomzellen zeigen reduzierte Proliferationseigenschaften und eine geschwächte tumoröse Kapazität (Zhong et al., 2016). HMGA2 könnte die Tumorbildung beeinflussen, sodass einige Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen Tumorgöße und HMGA2-Expression zeigten (Kaur et al., 2016). Da die Ausbreitung des Glioblastoms in der Regel von den Tumorrändern und Übergang zum Normalhirngewebe ausgeht, sprechen die Korrelationsergebnisse von HMGA2 mit Invasivität, Aggressivität und Tumorgöße für einen HMGA2-Einfluss am Tumorrand (Ricard et al., 2012).

Erhöhte HMGA2-Expressionen im Glioblastom sind prognostisch ungünstig und korrelieren mit kürzerem progressionsfreiem Überleben (Liu et al., 2014). Es wurde bereits gezeigt, dass HMGA2 im Glioblastom erhöht exprimiert wird und dass eine erhöhte Expression tendenziell mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Schwarm et al., 2016). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass eine hohe HMGA2-Expression, zusammen mit anderen Faktoren wie z.B. IL-6 und SOX2, mit kürzerem Überleben der Patienten korreliert. Dazu wurde gezeigt, dass die Inhibition dieser Marker die Stammzeleigenschaften des Tumors reduziert (Chiou et al., 2013).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Da es weiterhin keine guten Therapieansätze für das Glioblastom gibt und die Prognose auf ca. 20 Monate eingeschränkt ist, bedarf es weiterhin Untersuchungen, um die Therapieansätze zu optimieren. Durch diverse Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass HMGA2 eine große Rolle in der Tumorphathogenese des Glioblastoms spielt. Ziel dieser Arbeit ist es, die HMGA2-Expression in verschiedenen Tumorbereichen zu untersuchen. Wir betrachten das Glioblastom nicht als homogenen Tumor mit allseits gleichen Expressionsmustern und Eigenschaften, sondern als heterogenen Tumor, wo die Tumorfrente und invasive Zone andere Eigenschaften darstellt, als die Tumormitte. Mit dieser Grundhypothese, soll der bereits vorbeschriebene Marker HMGA2 gesondert am Tumorrand untersucht werden. Schließlich ist es sinnvoll, die HMGA2 Expression mit klinischen Parametern, wie z.B. Alter, Geschlecht und Überleben, zu korrelieren. Dabei soll untersucht werden, ob hohe Randexpressionen von HMGA2 einen Einfluss auf klinische Merkmale ausübt.

- Darstellung der HMGA2-Expression in verschiedenen Tumorbereichen
- Korrelationsanalyse der HMGA2-Expression verschiedener Tumorbereiche mit klinischen Faktoren und dem MGMT-Promoterstatus
- Überlebensanalyse in Abhängigkeit der HMGA2-Expression im Randbereich
- Bedeutung von HMGA2 in der zukünftigen Therapie der Glioblastom-Patienten

2 Methoden und Material

2.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 23 erwachsene Patienten eingeschlossen, die zwischen 2016 und 2018 in der Klinik für Neurochirurgie in Gießen an einem Glioblastom behandelt worden sind. Zudem wurden nur Patienten eingeschlossen, die zunächst eine operative Resektion und anschließend eine Nachbehandlung in Form einer adjuvanten Radiochemotherapie erhalten haben.

Präoperativ wurde eine Zustimmung zur wissenschaftlichen Untersuchung der Gewebeproben durch die Patienten gemäß des Ethikantrages AZ07/09 der Universität Gießen und Marburg eingeholt.

Die klinischen Daten der Patienten, wie z. B. Alter, Therapie, Karnofsky Score und Überlebenszeit, wurden retrospektiv betrachtet und deskriptiv untersucht.

Das untersuchte Gewebe wurde von den Operateuren intraoperativ entnommen. Navigationsgestützt wurden zunächst Randproben gewonnen, die zum einen in die Klinik für Neuropathologie gesendet worden sind und zum anderen in flüssigem Stickstoff eingefroren worden sind. Schließlich erfolgte die Entnahme zweier Proben aus dem Tumorkern, die erneut sowohl in der Klinik für Neuropathologie und in flüssigem Stickstoff gelagert worden sind. Die in Stickstoff gelagerten Proben dienen zur qPCR-Untersuchung, wohingegen die Proben in der Klinik für Neuropathologie zur immunhistochemischen Untersuchung genutzt worden sind.

2.1.1 Kontrollkollektiv

Es wurden zwei Normalhirngewebeproben, die aus der Pathologie der Salzburger Landesklinik zugesendet worden sind, untersucht und als Vergleichs- und Kontrollgruppe genutzt.

2.2 Real-time PCR

2.2.1 RNA Isolation

Um eine Expressionsanalyse des Gewebes mittels PCR durchzuführen, muss zunächst das genetische Material aus den Gewebeproben gewonnen werden. Zunächst wird die RNA isoliert und anschließend erfolgt der Umschrieb in DNA. Vor allem Messenger-RNA (mRNA) und damit ein direktes Abbild der Proteinbiosynthese können durch die Isolation gewonnen werden. In dieser Studie stammte die RNA aus Gewebeproben, die intraoperativ bei Glioblastomresektionen entnommen worden sind.

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH Hilden, Deutschland, Tabelle 1). Zu Beginn der Isolation wurden die Proben, die in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, aufgetaut und passend in 4 mg Stücke geschnitten, da die Anfangsmenge der Probe entscheidend für die Reinheit der Isolation ist. Anschließend wurde 1 ml QIAzol[®] Lysis Reagent und zwei Metallkügelchen dazu gegeben und mit der Schwingmühle (Retsch MM400) homogenisiert. Diese phenol-guanidin-Lösung, die besonders bei lipidreichem Gewebe, wie z. B. Nervenfasern wirkungsvoll ist, induziert die Zellyse und ermöglicht die Bindung der nun freien RNA. RNA-Fragmente aus mehr als 200 Nukleotiden (mRNA) werden selektiv isoliert, wohingegen kleinere RNA Fragmente (z.B. 5.8S rRNA, tRNA etc.) gefiltert werden und nicht in der weiterführenden Isolation berücksichtigt werden. Nachdem die Zellen lysiert und die Proben durchgemischt worden sind, folgte die drei- bis fünfminütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur, bevor die Zelltrümmer durch die Zentrifugation im Mikro200 (Hettich[®]) bei 20.000 g (Umdrehung) für 3 Minuten abgesetzt wurden. Im nächsten Schritt wurde der RNA-haltige Überstand des zuvor zentrifugierten Gewebe abgetragen und mit 200 µl Chloroform versetzt und vorgetextet. Chloroform trennt die RNA-haltige Lösung in drei Phasen. Die untere Phase beinhaltet, zusammen mit der trüben mittleren Phase, DNA und Proteine, wohingegen die obere, wässrige Phase die gewünschte und gesuchte RNA enthält (Chomczynski & Sacchi, 1987), sodass diese obere Phase erneut abgetragen und mit einer äquivalenten Menge an 70% Ethanol versetzt wurde. Um nun lediglich die extrahierte RNA in RNase freiem Wasser aufzufangen, wurde die RNA/Ethanol Lösung auf eine membranhaltige Säule aufgetragen und mittels mehrerer Waschpuffer (RW1 Buffer; RPE Buffer) durchgespült. Letztlich wurde die Säule mit 20-50µl RNase freiem Wasser bei 8000 g für 1 Minute zentrifugiert, um die membrangebundene RNA frei zu lösen und mit dem Wasser in einem 1,5 ml Eppi zu

versetzen. Die nun extrahierte und gewonnene RNA kann durch die reverse Transkriptase und mithilfe eines Cyclers in cDNA zurückgeschrieben werden. Diese cDNA wiederum ist benötigt, um die real-time-PCR durchzuführen.

2.2.2 Reinheitsmessung / Nanodrop

Die gewonnene RNA aus den Gewebeproben wurde durch das Nanodrop-Gerät (peqLab NanoDrop®100), ein Mikrovolumen-Spektralphotometer, hinsichtlich Reinheit und RNA-Konzentration gemessen. Die patentierte Technologie basiert auf einem Probenretentionssystem und nutzt einen optischen Spektralphotometer mit den Wellenlängen $\lambda 260\text{nm}$ und $\lambda 280\text{nm}$ und somit die Wellenlängen im Bereich der Absorptionsmaxima für Nukleinsäuren und Proteine, um das biologische Material im Wasser zu messen. Die Anwendung erfolgte nach dem dazugehörigen Protokoll. Das Gerät wurde zunächst mit RNase freiem Wasser kalibriert und eingestellt (Blank). Im Anschluss wurde jeweils 1 μl der isolierten RNA auf den Nanodrop-Messzähler pipettiert und gemessen. Die RNA-Menge jeder Probe wurde doppelt gemessen und gemittelt. War die RNA-Konzentration höher als 1000 ng/ μl , wurde die jeweilige Probe mit 10-15 μl RNase freiem Wasser verdünnt und erneut nachgemessen, sodass das spätere Pipettieren von zu kleinen und damit auch ungenauen Mengen zum Umschrieb verhindert wurde.

2.2.3 Umschrieb von RNA auf cDNA

Die real-time-PCR benötigt zur Genexpressionsanalyse DNA. Da jedoch zunächst einmal RNA aus den Gewebeproben gewonnen wurde, musste es zu einem sogenannten Umschrieb, also das Rückübersetzen der Geninformationen mittels des Enzyms „Reverse Transkriptase“ (RT), kommen. Das Enzym kann aus einer eingesetzten RNA-Matrize den komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) synthetisieren, welches anschließend zum DNA-Doppelstrang ergänzt und für die real-time-PCR eingesetzt werden kann. Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit protokollgerecht verwendet. Zunächst wurden 1 μg RNA, 2 μl gDNA Wipeout Buffer und eine variable Menge an RNase freies Wasser vermischt, sodass schließlich alle Komponenten zusammen 14 μl ergaben. Da je nach isolierter RNA-Konzentration der Proben 1 μg unterschiedlich viel Volumen der Lösung ergab, wurde für jede einzelne Probe die individuelle RNA-Menge und damit auch die variable Wassermenge errechnet. gDNA-Wipeout Puffer dient zur Extraktion von genomischen DNA-Fragmenten. Eine Kontamination mit nicht gewünschten gDNA-Anteilen wird

ausgeschlossen und die Reinheit des untersuchten RNA-Materials wird gefördert. Sind Wasser, RNA und WipeOut Puffer in einem Röhrchen angesetzt worden, wurde die Probe nach einer kurzen Zentrifugation, zur besseren Durchmischung, in den MasterCycler bei 42°C für 2 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gelegt.

- gDNA-Wipeout-Puffer (2 µl)
- Template-RNA (1 µg)
- RNase freies Wasser (ad 14 µl)

Zu der Probe wurden darauffolgend 1 µl RT-Master Mix, 4 µl RT Buffer und 1 µl RT Primer Mix hinzugegeben. Schließlich resultierte für jede Probe ein Röhrchen mit 20 µl Inhalt aus einem RT-Mix mit Primer und RNA des jeweiligen Patienten, welches nun für 20 Minuten bei 42°C in den MasterCycler gestellt und bei 92°C finalisiert wurde.

2.2.4 Real-time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Verdopplung eines DNA-Doppelstranges. Der nobelpreisgekrönte Kary Mullis entwickelte diese Technik, die durch eine DANN-Polymerase und Primer die Amplifikation der DNA ermöglicht (Hans-Joachim Müller, 2016). Gen-Expressionsanalysen, die Detektion von Pathogenen oder neuerdings auch Proteinanalysen, können mit wenig genetischen Material durchgeführt werden (Kubista et al., 2006).

Die exponentielle Vervielfältigung der DNA-Doppelstränge wird in etwa 25-50 hintereinander laufenden Zyklen erreicht und ergibt über 10^9 Kopien. Ein Zyklus wiederum besteht aus drei Hauptphasen, die größtenteils durch Temperaturänderungen induziert und geregelt werden:

1. Auftrennen des DNA-Doppelstranges durch Hitzedenaturierung bei 95°C.
2. Anheften des Primers, einer Startsequenz, die der DNA-Polymerase als Startpunkt dient (freie Desoxynukleosidtriphosphate docken an das freie 3' -OH Ende des Primers an). Dies geschieht durch das Abkühlen auf 50-60°C.
3. Die DNA-Polymerase beginnt die Synthese des komplementären Stranges bei 72°C. In 5' → 3' Richtung erfolgt die Synthese.

Durch die real-time-PCR kann simultan zur Kettenreaktion bereits das Ergebnis abgelesen werden, da mittels fluoreszierender Moleküle, die mit kurzwelligem Lichtstrahlen beleuchtet werden und als Reaktion darauf selbst höherwelliges Licht abstrahlen, quantitativ die Emission und somit das Reaktionsvermögen bestimmt werden

kann. Diese gemessene Anregungsenergie in Form von Lichtemission ist proportional zu den PCR-Produkten. Am StepOne™ rt-PCR-System (ThermoFischer Scientific®) führten wir die rt-PCR durch (Tabelle 1).

Zusätzlich zu dem Zielgen, sollten bei einer Genexpressionsanalyse stets auch endogene Kontrollen erfolgen, da diese die korrekte Durchführung sichern bzw. Systemfehler aufdecken können. In diesem Fall wurden die Glioblastomproben zusätzlich zu HMGA2, auch auf Beta-Aktin, Tata Box Binding Protein (TBP) und Importin 8 (IPO8) geprüft. Es ist nicht üblich, dass mehrere endogene Kontrollen beobachtet werden, jedoch gibt es Studien, die zu multiplen Kontrollen tendieren und diese empfehlen, um eine noch höhere Sicherheit zu gewährleisten (Tricarico et al., 2002). Die endogenen Kontrollen sollten Marker sein, die durch den Zellzyklus und Zellregulatoren sehr gut und eng kontrolliert werden und damit auch einen stabilen Expressionsmuster aufweisen, sodass diese trotz verschiedener Zellzyklusphasen oder Einflussstörungen immer vergleichbar sind. Es ist davon auszugehen, dass es keine perfekten Kontrollproteine oder -gene gibt, die diese Stabilität besitzen, jedoch kommen die Housekeeping-Gene dem ziemlich nah. Bei WHO- Grad 4 Tumore, wie dem Glioblastom konnte gezeigt werden, dass sich IPO8 und TBP am besten als endogene Kontrollen eignen und deswegen in dieser Untersuchung verwendet wurden (Kreth et al., 2010).

2.2.4.1 Durchführung der qPCR

Die real-time-PCR wurde in 96-well-Platten durchgeführt (Tabelle 2). Dafür wurden zunächst vier Röhrchen angesetzt, die RNase freies Wasser, MasterMix (TaqMan® Gene Expression MasterMix, Tabelle 1) und den jeweiligen Primer (siehe Tabelle 3) beinhalteten.

1. RNase freies Wasser (8 µl)
2. TaqMan® MasterMix (10 µl)
3. Primer (1 µl)
4. Template DANN (1 µl)

Zur Gewährleistung der korrekten Messung wurde jede Messung dreifach durchgeführt. Jede Primermischung wurde in drei verschiedenen Wells pipettiert und anschließend mit 1 µl der zu untersuchenden DNA ergänzt. Diese Herangehensweise ermöglichte den Abgleich der drei verschiedenen Messungen. Größere Expressionsunterschiede zwischen den Wells mit demselben Primer wurden somit erkannt und wiederholt, bis die

Standardabweichung nicht größer als 0,25 war. Vor Start und Durchführung der qPCR, wurden die 96-well-Platten für 5 Minuten durch die Rotina 420 R (Andreas Hettich GmbH, Tabelle 1) gemischt, um durch diese Homogenisierung der zusammengesetzten Medien eine korrekte Kettenreaktion zu ermöglichen. Zu jeder Testung erfolgten drei Negativkontrollen (NegK, Tabelle 2).

2.2.5 Auswertung der qPCR

Die oben beschriebenen Zyklen wurden schließlich durch das Computersystem in Cycle-Threshold-Werte (CT-Werte) umgerechnet und angegeben. Je niedriger dieser CT-Wert, desto mehr DNA ist vorhanden. Da die DNA-Stränge jeweils verdoppelt werden, handelt sich um ein exponentielles Wachstum, welches bei der Auswertung der CT-Werte berücksichtigt werden muss. Zur Auswertung der HMGA2 Expression wurde zunächst ein Mittelwert der gewonnenen CT-Werte der HMGA2 Wells einer Probe ermittelt. Hiernach wurden die CT-Werte der endogenen Kontrollen gemittelt und von dem zuvor gewonnenen CT-Mittelwert für HMGA2 abgezogen. Dies ergab einen CT-Differenzwert (diffCT) und gab den Expressionsunterschied zwischen den endogenen Kontrollen und HMGA2 und somit schließlich die relative Höhe der HMGA2 Expression an. Aufgrund der umgekehrten Proportionalität (siehe oben) zwischen den CT-Werten und der tatsächlichen Expression, wurde letztlich zur Ermittlung der HMGA2 Expression die Formel $2^{-\text{diffCT}}$ verwendet.

Tabelle 1: Geräte und Materialien zur Vorbereitung und Durchführung der qPCR

Geräte und Kits	Hersteller	Zusammensetzung
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland	<ul style="list-style-type: none"> - RNeasy Mini Spin Columns - Collection Tubes (1,5ml + 2ml) - QIAzol® Lysis Reagent - Buffer RW1 und Buffer RPE - RNase-Free Water
Mixer Mill MM 301	Retsch GmbH, Haan Deutschland	
Mikro 220 R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen Deutschland	
peqLab NanoDrop® 1000 Spectrophotometer	peqLab / VWR avantor, Darmstadt Deutschland	
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden Deutschland	<ul style="list-style-type: none"> - gDNA Wipeout - Buffer Quantiscript Reverse Transcriptase - Quantiscript RT Buffer - RT Primer Mix - RNase-Free Water
Mastercycler Gradient Thermal Cyclers	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland	
StepOne System	ThermoFisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA	
TaqMan Gene Expression Master Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA	<ul style="list-style-type: none"> - AmpliTaq Gold DNA Polymerase - Ultra Pure - Mischung aus dNTPs + dTTP/dUTP - Uracil-DNA-Glykosylase
Rotina 420 R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen Deutschland	
Vortex Minishaker	IKA®-Werke GmbH&Co.KG, Staufen Deutschland	
Armadillo PCR 96 well plate	ThermoFisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA	

Tabelle 2: Beispielhafte Darstellung der Befüllung einer 96 Well Platte

PROBE1 Tumorrand			PROBE1 Tumormitte			PROBE2 Tumorrand			PROBE2 Tumormitte		
HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2	HMGA 2
TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP
IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8
NegK	NegK	Negk									
ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB

Tabelle 3: Genutzte Primer/Gene Assay für die Testgruppe und zur endogenen Kontrolle

Primer/Gene Assay	Hersteller
HMGA, human Hs00171569 m1	ThermoFisher, LifeScience, Waltham Massachusetts, USA
TataBox Binding Protein, Human Hs00427620	
Importin8, Human Hs00914040 m1	
Actin- β , Human Hs99999903	

2.3 Immunhistochemie (IHC)

Zusätzlich zu den molekularen Genexpressionsanalysen durch qPCR, wurden die Proben immunhistochemisch ausgewertet, um zum einen die HMGA2 Expression multimodal und visuell nachzuweisen. Auch für die IHC wurden intraoperativ randständige und zentrale Proben entnommen und untersucht. Prinzipiell werden die Proben bei der IHC, die paraffiniert auf einem Objektträger aufgetragen sind, durch eine Antikörper-Antigen/Epitop Bindung gefärbt. Der Vorgang der IHC wurde in drei Abschnitte aufgeteilt. Zunächst erfolgte die Vorbereitung der paraffinierten Proben, damit die Antigene durch das Auftragen des Antikörpers erreichbar sind. Die Vorbereitung der Proben (siehe 2.3.1) hat das Ergebnis und die Sensitivität deutlich verbessert (Shi et al., 1991). Im zweiten Schritt wurde der Primärantikörper auf die Schnitte hinzugefügt und aufgetragen. Durch das Verwenden gezielter Antikörper (Tabelle 4) mit speziellen Bindungseigenschaften werden nur die Zellen gefärbt, die die passenden Antigene zu diesem Antikörper besitzen. Diese spezifische Bindung ist nicht nur durch die primäre Struktur der Proteine, sondern auch durch die dreidimensionale Konfiguration gewährleistet (Zhou, 2017). Durch den sogenannten primären Antikörper wird das Zielprotein gebunden. Es bestehen monoklonale und polyklonale Antikörper, die je nach Färbekraft durch die Verdünnung mit einem Diluent wirken. Die monoklonalen Antikörper binden gezielter an ein Antigen und weisen eine höhere Spezifität auf, wohingegen polyklonale Antikörper eine höhere Sensitivität präsentieren (Taylor & Levenson, 2006). In dieser Arbeit wurde ein polyklonaler IgG-Antikörper genutzt, um besonders quantitativ die HMGA2 Expression ermitteln zu können. Durch das Auftragen des zweiten Antikörpers, welcher wiederum gezielt den primären Antikörper bindet und zudem ein Farbenzym trägt, können die Zielstrukturen schließlich durch die Färbung visualisiert werden (Taylor, 2014).

2.3.1 Schnittvorbereitung der Proben

Wie auch für die Genexpressionsanalyse, wurden differenziert Tumorrand- und Tumormitteproben in die Klinik für Neuropathologie eingeschickt. Zur Qualitätskontrolle der Schnitte wurden HE-Schnitte angefertigt und auf spezielle Tumoreigenschaften, wie z.B. der erhöhten Mikrovaskularisierung, Nekrose oder Pseudopalisaden geprüft, um geeignete Stellen zur immunhistochemischen Untersuchung hervorzuheben (Brat et al., 2014). Die geeigneten Stellen wurden auf den HE-Probeschnitte markiert und zur Referenzierung der untersuchten IHC-Schnitte genutzt. Die paraffinierten Präparate

wurden anschließend durch das Schlittenmikrotom (Leica®, SM2010R) in 3 µm Schichten geschnitten und zur besseren Entfaltung in ein Wasserbad gelegt, um daraufhin auf einen Objektträger aufgetragen zu werden.

2.3.2 Färbung der Schnitte

Die Färbung erfolgte nach einem überarbeiteten Protokoll von ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Firma Zytomed). Die paraffinierten Schnitte wurden zunächst für jeweils 10 Minuten in drei Xylol-haltige Behälter gestellt. Dadurch konnte die Paraffinierung, also die Einbettung zur Konservierung, gelöst werden. Hiernach durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe (2x100%, 95%, 80%, 2x70% haltigen C₂H₆O), sodass diese von der lipophilen Paraffineinbettung in ein hydrophiles, wässriges Milieu versetzt wurden, welches für die Färbung notwendig ist. Um die Aktivität der gewebeeigenen Peroxidasen auszuschalten und somit mögliche Störfaktoren zu minimieren, wurden die Schnitte nach der Alkoholreihe für 10 Minuten in H₂O₂ gelegt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden nach dem Peroxidaseblock für 1h in einen Citratpufferbad eingelegt (pH-Wert von 6; ZytoMed) bei 95°C. Um die gewünschte Temperatur zu erreichen, wurde ein Dampfgarer (Braun® Gourmet Dampfgarer) verwendet und regelmäßig die Temperatur kontrolliert. Bereits 1991 konnte nachgewiesen werden, dass solch eine Vorbehandlung die Quervernetzung, also die gegenseitige Verbindung der Antigene bzw. Epitope des Gewebes, welche eine mögliche Anbindung des Antikörpers hemmt, demaskiert und aufhebt und somit die Zugänglichkeit des primären Antikörpers fördert (Shi et al., 1991). Nach der sogenannten „Heat induced epitope retrieval“ wurden die Schnitte zwischen den einzelnen Teilschritten mit einem Waschpuffer (ZytoMed Systems Wash Puffer 20x; Tabelle 5) gespült. Daraufhin wurde noch, als letzter Schritt vor dem Auftragen des Primärantikörpers, das BlockingSolution System (ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit; Tabelle 5), zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung, auf die Schnitte pipettiert, die in einer Feuchteammer zum Schutz vor dem Austrocknen gelegt wurden.

Im Anschluss auf diese Vorbehandlungen, wurde der Primärantikörper (Tabelle 4) auf die Objektträger und somit Gewebeschnitte aufgetragen und für 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss auf das dreimalige Auswaschen mittels Waschpuffer für jeweils 5 Minuten, wurde ein Verstärkungsreagenz (PostBlock; Firma ZytoMed) für 20 Minuten aufgetragen, um die Antigen-/Antikörperbindung und somit auch die Färbung zu verstärken. Nach weiteren Waschschrinen (3x2 Minuten mittels des o.g. Waschpuffers)

wurde nun das HRP-Polymer auf die Schnitte pipettiert und mit 30 Minuten Inkubationszeit in der feuchten Kammer belassen. Wurde das überschüssige HRP-Polymer durch Wascheinheiten entfernt, kam es, durch die Hinzugabe von DAB-Substrat für 7-9 Minuten und der dadurch erfolgten Oxidation am Zielantigen, zur Braunfärbung der Nuklei, also der Zellkerne. Die Färbung wurde durch Wasser gestoppt und die Objektträger samt den Proben mit Waschpuffer (s.o.) ausgewaschen. Letztlich wurden die Schnitte für maximal eine Minute mit Hämalan nach Meyer gegengefärbt, um eine übersichtlichere und bessere Kontrastierung der Kernfärbung zu erzielen. Abschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2x70%, 80%, 90%, 2x100% haltigen C₂H₆O), die letztlich mit Xylol endete, erneut in einen lipophilen Zustand gebracht, um die Schnitte dann aus dem Xylol mithilfe von Deckgläschen (Dr. Junghans Medical GmbH) und Cytoseal (FisherScientific®) einzudecken.

Tabelle 4: Hersteller- und Antikörperinformationen

Antikörper	Informationen
Abcam, Anti HMGA2 Antikörper (ab207301)	Wirt - Hase Reaktionsspezifität – Human Positivkontrolle – Mammakarzinom Verdünnung – 1:50 Polyklonaler IgG Antikörper

2.3.3 Kontrollfärbungen

Zur Kontrolle der erfolgten Färbungen wurden jeweils Proben aus Mammakarzinomen gemäß des Färbungsprotokolls mitgefärbt. Bei fehlgeschlagener Färbung der Mammakarzinomproben wurde die Färbung wiederholt. Hierzu wurden noch Mammakarzinom-Gewebeproben der Klinik für Neuropathologie genutzt. Diese paraffinierten Schnitte wurden ebenso geschnitten und anschließend mit den Proben der Untersuchungsgruppe mitpräpariert.

2.3.4 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung wurden je Schnittprobe fünf Bereiche der Proben mit einer 40-fachen Vergrößerung betrachtet und analysiert. Zunächst wurden alle Zellkerne dieser fünf Bereiche gezählt. Hiernach wurden lediglich die durch die Kernfärbung braun erscheinenden Zellkerne gezählt. Der Quotient dieser beiden Summen ergab den relativen

Anteil an HMGA2 positiven Zellen. Zusätzlich wurde die Färbungsintensität beurteilt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software ImageJ© (Schneider et al., 2012). Die Intensität wurde zwischen I (schwache Intensität), II (mittelstark) und III (starke Intensität) eingeteilt (Abb. 4). Um eine möglichst neutrale Einschätzung der Färbungsintensität zu treffen, wurden die Bilder alle farbneutral bearbeitet. Das Auszählen erfolgte an demselben Computer und Display, um möglichst stabile Zählbedingungen zu schaffen. Zwei unabhängige Untersucher waren für die Auswertung verblindet und wussten nicht, ob es sich um Rand- oder tumormitteständige Proben handelt. Schließlich wurde zur Expressionsauswertung das Produkt aus dem prozentuellen Anteil HMGA2 positiver Zellen und Färbungsintensität gebildet (ICxI).

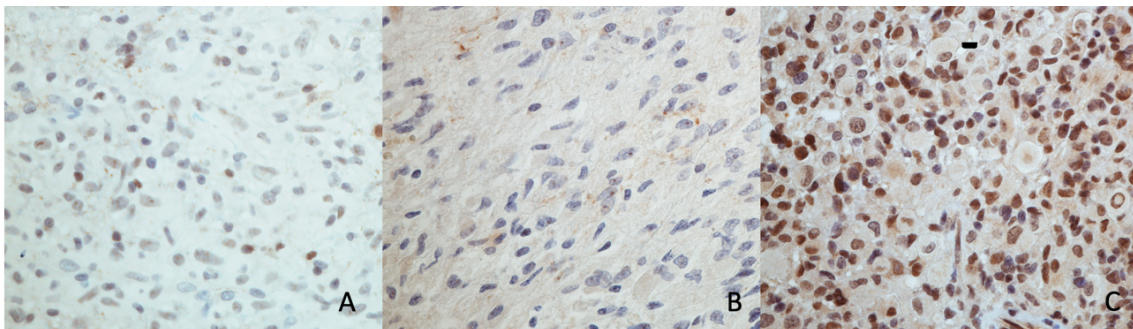


Abbildung 4: Immunhistologische Färbungen mit verschiedenen Färbeintensitäten. A=Schwache Intensität I; B=Mittlere Intensität II; C=Starke Intensität III

Tabelle 5: Geräte und Materialien zur Vorbereitung und Durchführung der Immunhistochemie

Produkt	Hersteller	Zusammensetzung
Schlittenmikrotom, SM2010R	Leica	
WB 693	TESPA	
ZytoChem-Plus HRP Polymer Kit	Zytomed GmbH, Berlin Deutschland	- BlockingSolution - PostBlock - HRP-Polymer
Citrate Buffer, ZUC028-100	Zytomed GmbH, Berlin Deutschland	
Antibody Diluent, ZUC025-100	Zytomed GmbH, Berlin Deutschland	
System Wash Buffer, ZUC020-500	Zytomed GmbH, Berlin Deutschland	
DAB Substrate Kit High Contrast, DAB500plus	Zytomed GmbH, Berlin Deutschland	- DAB Chromogen - DAB Substrate Buffer High Contrast
Dampfgerar	Braun GmbH, Kronberg im Taunus Deutschland	
Deckgläschen	Dr. Junghans Medical GmbH	
Epredia Richard- Allen Scientific Cytoseal	FisherScientific, Waltham Massachusetts, USA	

2.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen und Graphiken erfolgten durch das Programm SPSS (IBM® Software, Armonk, New York, USA). Das Institut für Medizinische Informatik nahm eine beratende und unterstützende Rolle in der statistischen Auswertung ein. Generell wurden alle Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

Zunächst wurden die Daten deskriptiv untersucht und hinsichtlich der Mittelwerte und Standardabweichungen analysiert. Klinische Eckpunkte, wie das Alter zum Zeitpunkt der Erkrankung und die Geschlechterverteilung, wurden betrachtet und mit den aus der Literatur bekannten Daten verglichen. Außerdem wurde die Verteilung von MGMT-methylierten und nicht methylierten Proben, sowie der IDH Status beschrieben. Zur Veranschaulichung wurden graphische Elemente, wie z. B. Boxplots genutzt.

Zum Expressionsvergleich zwischen den verschiedenen Gruppen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. So war es möglich, die HMGA2 Expression vergleichend in Abhängigkeit klinischer Parameter, wie z.B. Alter, Geschlecht und molekulargenetischen Eigenschaften, wie z.B. der MGMT-Methylierungsstatus, zu untersuchen. In gleicher Form konnte das Expressionsmuster zwischen den randständigen und mitteständigen Proben verglichen werden.

Die Überlebensanalyse erfolgte durch die Kaplan-Meier Methode und dem Log-rank-Test. Hierzu wurden die Patienten in eine Gruppe mit hoher HMGA2-Expression im Randbereich des Tumors und eine Gruppe mit niedriger HMGA2-Expression im Randbereich des Tumors unterteilt. Zur Unterteilung wurde eine mindestens doppelt so hohe HMGA2 Expression als der Median im Randbereich aller Proben genutzt. Die doppelte Expression musste sowohl auf molekularer- und Proteinebene bestehen. Diese Unterteilung wurde genutzt, um den Effekt einer sehr hohen und überdurchschnittlichen HMGA2 Expression im Randbereich zu untersuchen. Insbesondere durch die dem HMGA2 Molekül zugeschriebenen Merkmale und Charakteristika, ist bei einer sehr hohen HMGA2 Last im Randbereich ein negativer Einfluss zu erwarten. Die Überlebensanalyse der beiden Randexpressionsgruppen wurde im Anschluss nach Stratifizierung des MGMT Status wiederholt. Es wurde das Gesamtüberleben und progressionsfreie Überleben der Gruppe mit sehr hoher HMGA2 Randexpression und der Gruppe mit niedriger Randexpression in Abhängigkeit mit MGMT verglichen. Zur Unterteilung wurde erneut die mediane Expression von HMGA2 am Rand genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Analyse

Das Versuchskollektiv wurde hinsichtlich des Alters, Geschlechts, IDH- und MGMT-Status betrachtet. Dabei zeigten sich in der Kohorte 16 Männer und 7 Frauen in einem Verhältnis von etwa 2.3:1. Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose war $57,8 \pm 8,4$ Jahren. Zehn der Patienten (43,4%) hatten einen positiven Methylierungsstatus und alle 23 Patienten hatten einen IDH-Wildtyp-Status. Das mediane progressionsfreie Überleben der Patienten betrug $7,26 \pm 6,7$ Monate. Das Gesamtüberleben war im Median $14,3 \pm 8,7$ Monate (Tabelle 6).

Tabelle 6: Patientenkollektiv und Basisinformation

	N (%)
Gesamtfälle	23 (100)
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose	$57,8 \pm 8,4$ Jahre
Geschlecht	
- Männlich	16 (69.6)
- Weiblich	7 (30.4)
MGMT Status	
- Methyliert	10 (43.4)
- Unmethyliert	13 (56.5)
IDH Status	
- Mutation	0 (0)
- Wildyp	23 (100)
Überlebensdaten	
- Gesamtüberleben	$14,3 \pm 8,7$ Monate
- Progressionsfreie Überleben	$7,26 \pm 6,7$ Monate

3.2 Erhöhte HMGA2 Expression im Glioblastom im Vergleich zum Normalhirngewebe

Die HMGA2-Expression in Glioblastomproben zeigte sich signifikant höher als in Normalhirnproben ($p=0,016$; Abbildung 5). Die HMGA2 Expression aller Glioblastomproben wurde ermittelt und mit der Expression im Normalhirngewebe verglichen. In beiden Testmodularitäten, qPCR und IHC, ergab sich dieser signifikanter Unterschied (IHC $p=0,01$).

Sowohl bei randständigen, als auch bei tumormittständigen Gewebeproben ergab sich eine signifikant höhere HMGA2 Expression als im gesunden Hirngewebe. Die HMGA2-Expression im Randbereich von Glioblastomen war in der qPCR und in der Immunhistochemie signifikant höher als im Normalhirngewebe (qPCR $p=0,013$; IHC $p=0,04$). Die HMGA2 Expression in der Tumormitte zeigte sich in der qPCR ebenso signifikant höher als im Normalhirngewebe ($p = 0,04$), jedoch präsentierte sich dieser signifikante Unterschied zwischen Tumormitte-Proben und Normalhirngewebe nicht in der IHC ($p = 0,167$).

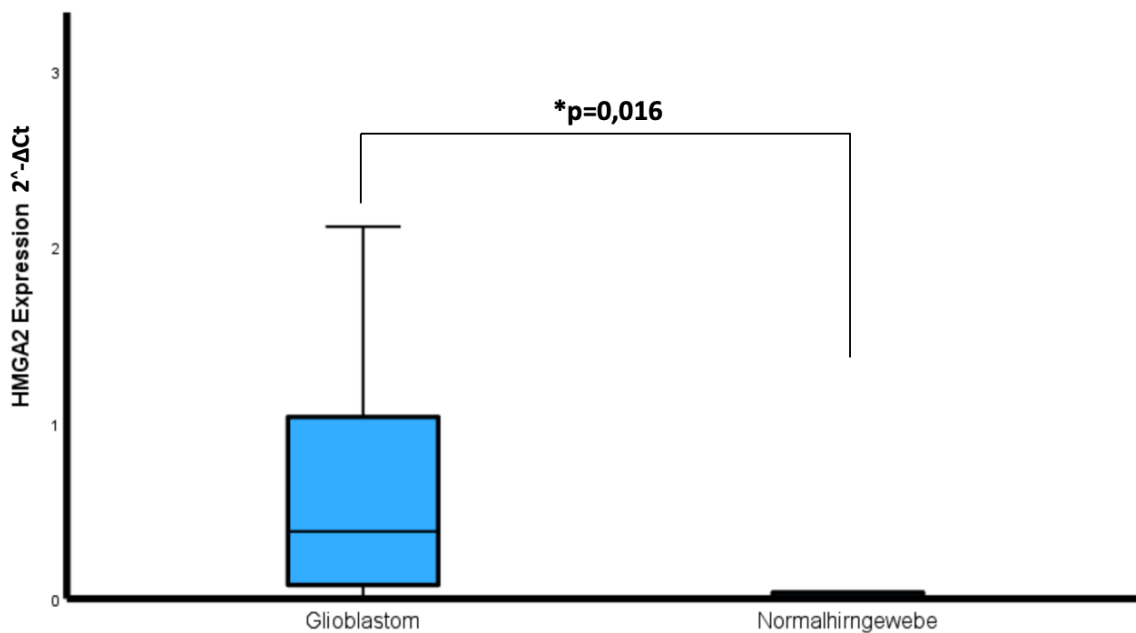


Abbildung 5: HMGA2 Expression im Glioblastom, sowie Normalhirngewebe, die durch die qPCR ermittelt ist. Die HMGA2 Expression aller Proben im Glioblastom, sowohl GBM-Rand, als auch Tumormitte wurden zusammengefügt und durch den Mann-Whitney-U Test mit der Expression in den Normalhirnproben verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte HMGA2 Expression in den GBM-Präparaten ($p=0,016$).

3.3 HMGA2 Expression im Randbereich vs. Tumormitte des Glioblastoms

Es zeigte sich eine signifikant höhere HMGA2 Expression im Randbereich des Glioblastoms als in der Tumormitte ($p=0,012$; Abbildung 6). In beiden Untersuchungsmodalitäten war die HMGA2-Expression im Randbereich höher als in der Tumormitte. Insbesondere die Ergebnisse der Immunhistochemie waren eindeutig und ergaben eine höhere Expression von HMGA2 im Rand als in der Tumormitte. Die Ergebnisse zeigten sowohl für die Randpräparate, als auch für die Tumormitteproben eine relativ große Streuung. In der qPCR ergab sich die Tendenz, dass HMGA2 im Randbereich des Tumors erhöht exprimiert wird, jedoch zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,277$).

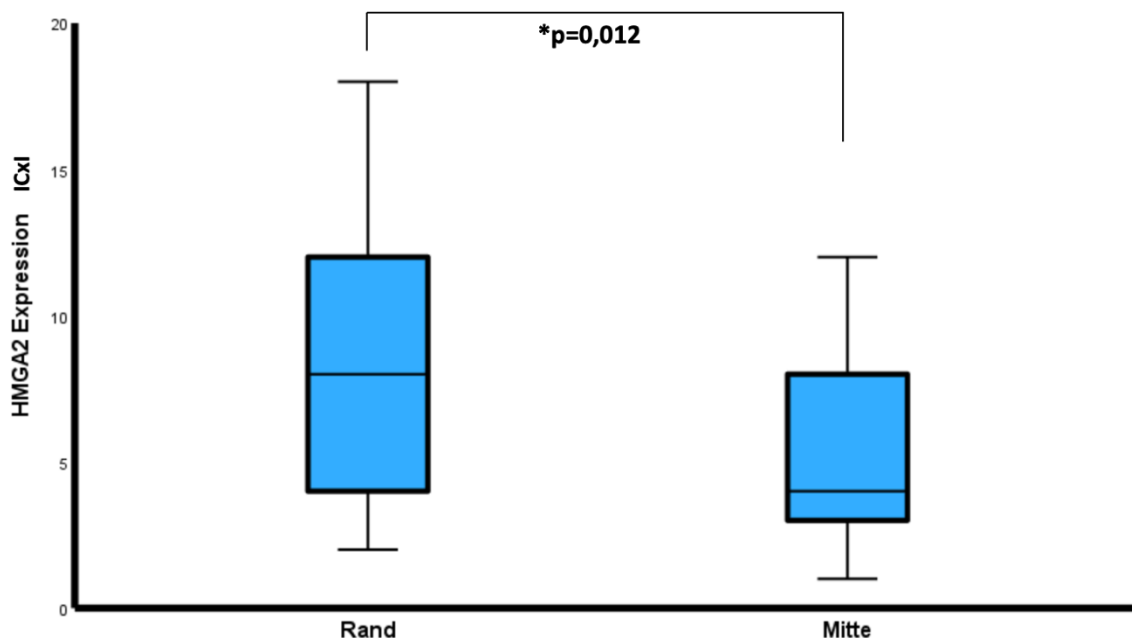


Abbildung 6: HMGA2 Expression auf Proteinebene aus randständigen und tumormitteständigen GBM-Proben. Es zeigt sich eine signifikant höhere HMGA2 Expression in den randständigen Proben als in der Tumormitte ($p=0,012$; Mann-Whitney-U Test).

3.4 Korrelation der HMGA2 Expression im Randbereich korreliert nicht mit MGMT und weiteren Parameter

Des Weiteren wurde die HMGA2-Expression bei MGMT-positiven und MGMT-negativen Tumorpräparaten untersucht. Die HMGA2-Expression zeigte im Vergleich beider Methylierungsgruppen keinen signifikanten Unterschied. Sowohl der Vergleich der HMGA2-Expression in randständigen Proben als auch der Vergleich der HMGA2-Expression in tumormitteständigen Proben in Korrelation zur Methylierungsgruppe, ergab weder in der qPCR noch in der Immunhistochemie einen signifikanten Unterschied

(Ergebnisse der Randproben nach MGMT stratifiziert: qPCR $p = 0,879$; IHC $p = 0,343$; Mitteständige Proben: qPCR $p = 0,376$; IHC $p = 0,232$).

Darüber hinaus wurde die HMGA2-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts und des Alters ermittelt. Die HMGA2 Expression der randständigen Zellen zwischen Männern und Frauen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Ebenso zeigte der Vergleich der tumormitteständigen Proben keinen signifikanten Unterschied zwischen Männer und Frauen (Rand: qPCR $p = 0,974$; IHC $p = 0,82$; Mitte: qPCR $p = 0,376$; IHC $p = 0,065$). Für die Prüfung einer möglichen Korrelation zwischen der HMGA2-Expression und dem Alter wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Zur Unterscheidung diente das mediane Alter samt Standardabweichung unseres Patientenkollektivs, sodass schließlich eine Gruppe mit Patienten älter als 66 Jahre und eine Gruppe mit Patienten, die jünger waren als die von uns bestimmte Grenze von 50 Jahren entstanden. Diese Unterteilung wurde genutzt, um eine mögliche Korrelation der HMGA2 Expression mit dem Alter der Patienten zu untersuchen. Dabei ergaben die Ergebnisse keinen signifikanten Expressionsunterschied von HMGA2 im Randbereich der Glioblastome. Die HMGA2-Last im Randbereich der sehr alten Patienten und der sehr jungen Patienten unterschieden sich nicht ($p = 0,905$ – qPCR; $p = 0,73$ – IHC).

3.5 Überlebensanalyse in Abhängigkeit der HMGA2 Expression im Randbereich

Eine mögliche Korrelation zwischen einer hohen HMGA2-Expression im Randbereich und dem Gesamtüberleben bzw. dem progressionsfreien Überleben wurde ermittelt (Abbildung 7). Dafür wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt. Der Median der HMGA2-Expression im Randbereich in der qPCR und IHC diente als Grenze. Alle Patienten mit doppelter HMGA2-Expression der Randzone im Vergleich zur medianen HMGA2-Expression im Rand wurden als Hohe-Randexpressionsgruppe eingeteilt (Rand-Hohe-Expressionsgruppe). Die hohe Randexpression mussten sowohl in der qPCR, als auch in der IHC dargestellt werden. Die 7 Patienten mit hoher HMGA2 Expression am Rand zeigten ein kürzeres Gesamt- und progressionsfreies Überleben. Das Gesamtüberleben der hohen HMGA2 Expression am Rand betrug 9,1 Monate (95%KI 6,5-11,8 Monate) und war um 7,5 Monate kürzer als die niedrige Randexpressionsgruppe ($p=0,015$). Das progressionsfreie Überleben war in der Rand-Hohe-Expressionsgruppe bei 5 Monaten (95% KI 2,8-7,2) tendenziell kürzer als in der Rand-Niedrig-Expressionsgruppe bei 8,3 Monaten (95% KI 4,5-12; $p=0,175$).

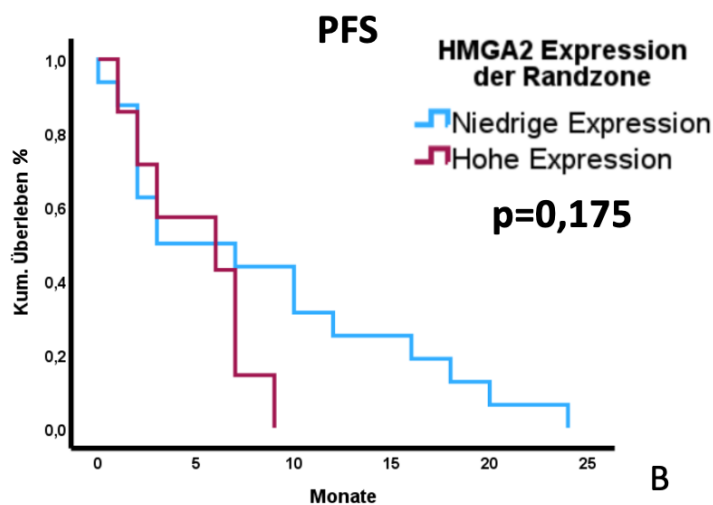
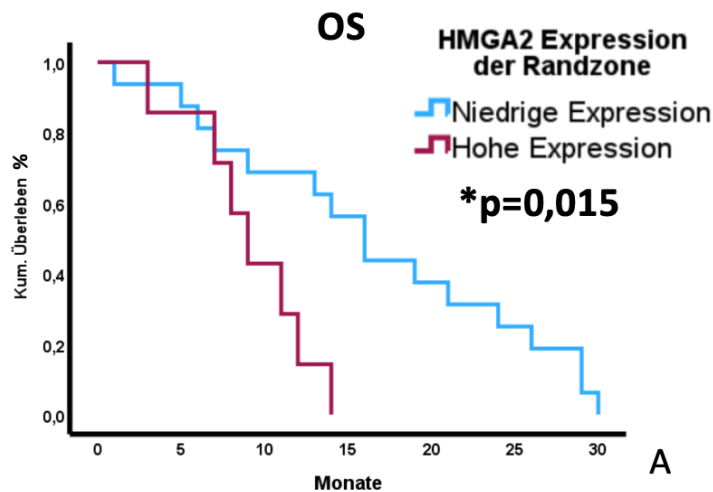


Abbildung 7: Überlebensanalyse je nach HMGA2 Expression im Tumorrandbereich. Die Kaplan-Meier Kurve der Patienten mit hoher HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (A; $p=0,015$) und tendenziell kürzeres progressionsfreies Überleben (B; $p=0,175$).

3.5.1 Überlebensanalyse in Abhängigkeit des MGMT Status, sowie HMGA2 Randexpression

Ergänzend wurde das Überleben mit hoher HMGA2-Expression im Randbereich nach dem MGMT-Methylierungsstatus stratifiziert untersucht (Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Gruppe mit hoher HMGA2-Expression im Randbereich und negativem Methylierungsstatus zeigte das kürzeste Gesamtüberleben mit 8,6 Monaten (95% KI 5,5-11,7 Monate). Im Vergleich zeigte die MGMT-positive und niedrige HMGA2 Randexpressionsgruppe ein Gesamtüberleben von 19,4 Monaten auf (95% KI 13,8-24,9 Monate). Die MGMT-negativen Patienten mit niedriger HMGA2-Expression am Rand wiesen ein mittleres Gesamtüberleben von 15,6 Monaten auf (95% KI 8,4-22,7 Monate). 10,5 Monate (95% KI 3,6-17,4 Monate) waren das mittlere Überleben der MGMT-

positiven und Rand-Niedrig HMGA2-Expressionsgruppe. Das Gesamtüberleben war in den einzelnen Gruppen nach MGMT und Randexpression von HMGA2 eingeteilt signifikant unterschiedlich ($p=0,023$).

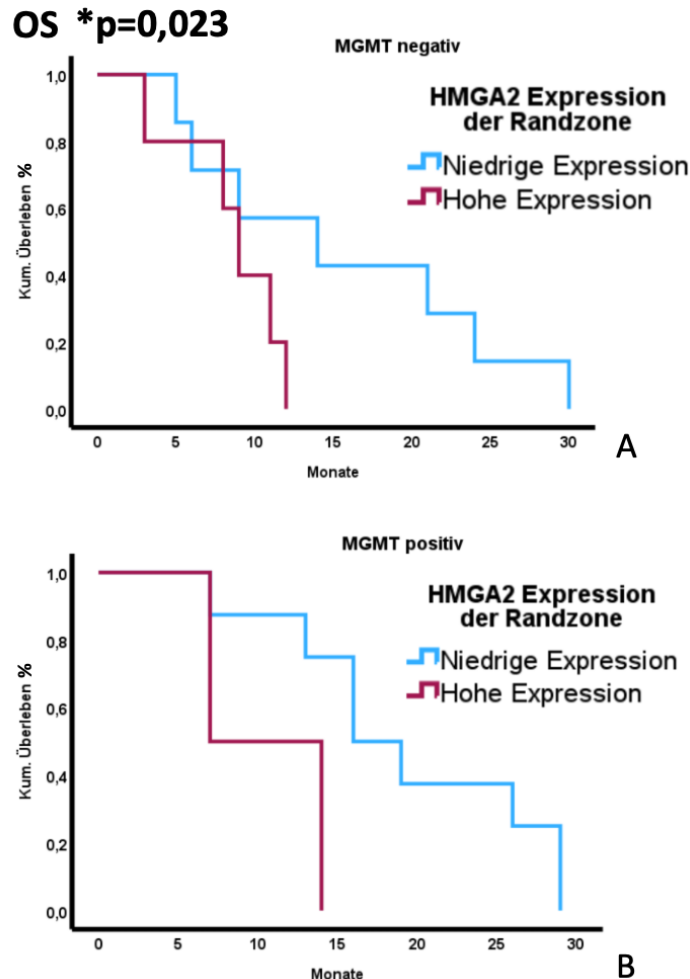


Abbildung 8: Darstellung des Gesamtüberlebens der GBM-Patienten abhängig von MGMT-Methylierungsstatus und HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors. Das Gesamtüberleben war in der Gruppe der Patienten mit hoher HMGA2 Randexpression sowohl für die MGMT positiven, als auch MGMT negativen Patienten signifikant kürzer ($p=0,023$).

Das progressionsfreie Überleben in der MGMT negativen und HMGA2/Rand-Hoch Gruppe war 3,8 Monate (95% KI 1,5-6,1 Monate), wohingegen die MGMT-negativen und HMGA2/Rand-Niedrig Gruppe ein progressionsfreie Überleben von 7 Monate zeigte (95% KI 2,3-11,7 Monate). In der positiven Methylierungsgruppe ergab sich ein progressionsfreies Überleben bei den HMGA2/Rand-Hoch Patienten von 8 Monaten (95% KI 6-10 Monate). Die MGMT-positiven und HMGA2/Rand-Niedrig Gruppe präsentierte ein progressionsfreie Überleben von 10,2 Monaten (95% KI 4-16,4 Monaten). Das progressionsfreie Überleben der Subgruppen nach MGMT-Status und

HMGA2-Randexpression war nicht signifikant unterschiedlich und zeigte allenfalls eine Tendenz zum kürzeren progressionsfreiem Überleben dar ($p=0,189$).

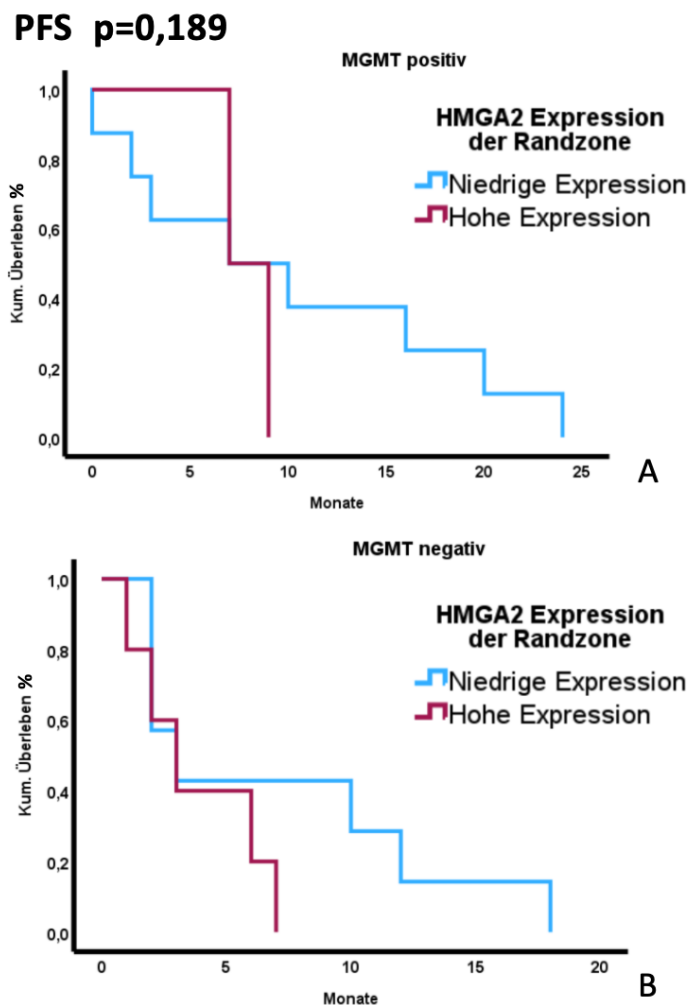


Abbildung 9: Darstellung des progressionsfreien Überlebens der GBM-Patienten abhängig von MGMT-Methylierungsstatus und HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors. Das progressionsfreie Überleben zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit hoher HMGA2 Expression im GBM-Randbereich sowohl für die MGMT positiven, als auch MGMT negativen Patienten tendenziell kürzer ($p=0,189$). Der Unterschied war nicht signifikant.

3.5.2 Einfluss der HMGA2 Expression am Rand auf das Überleben – Multivariate Analyse

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse präsentierte einen signifikanten Einfluss der HMGA2-Expression im Randbereich des Glioblastoms (Tabelle 7). In der multivariaten Analyse wurden das Alter, Geschlecht, MGMT-Status und hohe HMGA2-Expression eingeschlossen. Hierbei zeigte sich lediglich für die hohe HMGA2-Expression im Randbereich ein signifikanten Einfluss ($p=0,011$, Odds Ratio 4,4, 95% KI 1,4-13,6).

Tabelle 7: Multivariate Cox Regressionsanalyse. Unter den Faktoren MGMT Status, Alter, Geschlecht und hohe HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors, zeigte sich lediglich für die hohe HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors einen signifikanten Einfluss auf das Überleben (p=0,011).

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
							Untere	Obere
Schritt 1								
MGMT Status	-,366	,472	,602	1	,438	,693	,275	1,750
Hohes HMGA2 am Rand	1,438	,587	5,994	1	,014	4,213	1,332	13,325
Alter	-,192	,504	,145	1	,703	,825	,307	2,217
Geschlecht	-,364	,510	,509	1	,475	,695	,256	1,888
Schritt 2								
MGMT Status	-,312	,452	,478	1	,489	,732	,302	1,774
Hohes HMGA2 am Rand	1,462	,586	6,232	1	,013	4,314	1,369	13,593
Geschlecht	-,412	,494	,698	1	,403	,662	,252	1,742
Schritt 3								
Hohes HMGA2 am Rand	1,480	,578	6,559	1	,010	4,395	1,415	13,647
Geschlecht	-,405	,493	,674	1	,412	,667	,254	1,753
Schritt 4								
Hohes HMGA2 am Rand	1,473	,582	6,410	1	,011	4,360	1,395	13,634

4 Diskussion

4.1 Expressionsunterschied von HMGA2 im Glioblastom und Normalhirngewebe

Die HMGA2-Expression in unterschiedlichen Regionen des Glioblastoms wurde erstmalig in dieser Arbeit untersucht und sollte zusätzliche Erkenntnisse bezüglich weiterer Diagnostik und Therapie der Glioblastompatienten zeigen.

In dieser Arbeit konnte die erhöhte HMGA2-Expression im Vergleich zu Normalhirngewebe bestätigt werden, was zuvor bereits andere Studien, wie z. B. Schwarm et al. dargestellt haben (Schwarm et al., 2016). Sowohl auf Proteinebene, als auch molekulargenetisch zeigte sich in dieser Arbeit eine erhöhte HMGA2-Expression im Vergleich zu Normalhirngewebe (Abbildung 5). Moleküle, die lediglich im Glioblastom exprimiert werden und in normalen, differenzierten Zellen nicht, stellen potentiell eine diagnostische und therapeutische Zielstruktur dar.

In anderen Tumorentitäten wurde HMGA2 als möglicher diagnostischer Marker untersucht. Meyer et al. führten Hinweise auf, dass die Höhe von HMGA2 im peripheren Blut mit der Anzahl undifferenzierter, leukämischer Zellen korrelieren könnte. Dies sei besonders während des Fortschreitens der Chronischen-Myeloischen-Leukämie in der Blastenkrise relevant (Meyer et al., 2007). Eine andere Arbeitsgruppe stellt hingegen fest, dass HMGA2 zwar mit der Invasivität der Brustkrebserkrankung korreliert, nicht jedoch als Tumormarker dienen kann, da kein signifikanter Unterschied des HMGA2-Levels im peripheren Blut zwischen gesunden und erkrankten Patienten gefunden worden ist (Fabjani et al., 2005). Bisherige Daten bestätigen HMGA2 als Tumormarker im Glioblastom nicht, jedoch könnte HMGA2 durch seine Eigenschaften ein potentieller Tumormarker im Glioblastom sein.

Die eindeutig erhöhte Expression von HMGA2 im Glioblastom könnte eine potentielle therapeutische Zielstruktur darstellen. Gezielte Pharmakotherapien, die gesonderte Zielstrukturen angreifen, wurden bereits getestet. Hegi et al. stellten Ergebnisse vor, die belegen, dass Patienten mit einem positiven MGMT-Methylierungsstatus von der Therapie mit Temozolomid besonders profitierten, wohingegen Patienten ohne positiven Methylierungsstatus nur einen geringen oder keinen Benefit durch die zusätzliche Chemotherapie mit Temozolomid trugen (Hegi et al., 2005). In der NOA16-Studie wurde eine mögliche IDH1(R132H)-Impfung getestet. Dabei wurde lediglich gezeigt, dass die Impfung von den Patienten gut toleriert worden ist und nebenwirkungsarm war (Platten et al., 2021). Weitere Studien, die gezielte Strukturen innerhalb des Glioblastoms

angreifen, wie z. B. EGFR oder BRAF konnten keinen signifikanten Überlebensvorteil darstellen (Le Rhun et al., 2019). Damit HMGA2 als Zielstruktur in Frage kommt, genügt der Expressionsunterschied zwischen Glioblastom und Normalhirngewebe nicht. Der prognostische Zusammenhang von HMGA2 im Glioblastom muss zukünftig genauer dargestellt werden.

4.2 Erhöhte HMGA2 Expression am Tumorrand

Die HMGA2 Expression im Glioblastom ist nicht in allen Tumorbereichen homogen. In dieser Arbeit konnte eine signifikant höhere Expression von HMGA2 im Randbereich des Glioblastoms im Vergleich zur Tumormitte gezeigt werden (Abbildung 6). Die bisher publizierten Daten zur HMGA2 Expression ermöglichten keine differenzierte Aussage zur HMGA2 Expression innerhalb eines Tumors. Erstmals wurden im Glioblastom mehrere Tumorbereiche hinsichtlich der HMGA2-Expression untersucht.

Zhang et al. beschreibt, dass HMGA2 die Invasivität fördert (Zhang et al., 2018). Die Eigenschaft von HMGA2 sich weiter auszubreiten, könnte die erhöhte Expression in der infiltrativen Randzone begründen. In einer anderen Arbeit wurde eine positive Korrelation zwischen HMGA2 und Lymphknotenmetastasen bei Zungengrundkarzinomen dargestellt. Sie fassten zusammen, dass HMGA2 die Invasivität und Aussiedlung des Zungengrundkarzinoms steigert (Zhao et al., 2016). Übertragen auf das Glioblastom wäre es denkbar, dass die erhöhte Expression im Randbereich die Ausbreitung fördert und somit die schlechte Prognose mitbegünstigt.

4.3 Prognostischer Faktor von HMGA2 im Randbereich des Glioblastoms

Eine erhöhte Expression von HMGA2 in Gliomen, aber auch anderen Entitäten korreliert mit einer schlechten Prognose (Liu et al., 2014). Schwarm et al. zeigte, dass die HMGA2-Expression im Glioblastom durchaus eine Bedeutung auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben hat. Metaanalysen zeigten für andere maligne Tumore einen prognostisch ungünstigen Einfluss einer erhöhten HMGA2-Expression (Huang et al., 2018). Eine Korrelation des Tumorgades und der HMGA2-Expression konnte in Hypophysenadenomen gezeigt werden. Es wurde eine signifikant höhere HMGA2 Anhäufung in Grad 4 Adenomen im Vergleich zu Grad 2 Adenomen festgestellt (Qian et al., 2009). Dies bestätigt die Korrelation von HMGA2 zu aggressiven Tumoren und den prognostisch ungünstigen Einfluss von HMGA2. Vergleichbar wurde der prognostisch ungünstige Faktor von HMGA2 in extrakraniellen Tumoren, wie z. B. dem

Mammakarzinom präsentiert. Die HMGA2 Expression korreliert mit der Zellproliferation und Migration (Mansoori et al., 2020).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass eine sehr hohe HMGA2-Expression im Randbereich einen prognostisch ungünstigen Einfluss hat. Eine sehr hohe HMGA2 Expression am Rand zeigt ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (Abbildung 7). Das progressionsfreie Überleben ist bei den Patienten mit sehr hoher HMGA2-Expression im Randbereich tendenziell kürzer (Abbildung 7). Es konnte kein relevanter Einfluss der HMGA2-Expression der Tumormitte dargestellt werden, sodass sich weitere Untersuchungen auf die HMGA2-Expression im Randbereich fokussierten. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss der HMGA2-Expression in der Tumormitte könnte die insgesamt niedrigere Expression sein (Abbildung 6), sowie der avitale Charakter der Tumormitte im Glioblastom, welcher häufig durch viele nekrotische Areale gekennzeichnet ist.

Die Patienten mit sehr hoher HMGA2-Expression im Randbereich, wiesen unabhängig vom MGMT-Status ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (Abbildung 8) und ein tendenziell schlechteres progressionsfreies Überleben auf (Abbildung 9).

Diese Ergebnisse heben die Bedeutung der Randzone hervor. Die diagnostische und therapeutische Bedeutung der Randzone im Glioblastom könnte durch solche Ergebnisse in den zukünftigen klinischen Alltag einbringen. Eine gezielte Probeentnahme der Randzone des Glioblastoms wäre denkbar, um eine bessere prognostische Aussage tätigen zu können. Ein hervorgehobener therapeutischer Ansatz der Randzone im Glioblastom, wäre durch solche Ergebnisse möglicherweise gerechtfertigt.

4.4 Mögliche molekulargenetische Schlüsselrolle von HMGA2 in der Randzone des Glioblastoms

Wang et al. zeigte, dass das Zusammenwirken von HMGA2 mit dem miRNA let-7, ein Tumorsuppressor, welches in den meisten Tumoren erniedrigt erscheint und somit die eigene inhibitorische Wirkung auf Tumore verliert, relevant ist (Wang et al., 2015). Bei Tumoren, wo let-7 erniedrigt oder gehemmt ist, zeigt sich die Expression von HMGA2 und anderen tumorfördernden Faktoren erhöht und die kanzerogenen Eigenschaften, wie z.B. die Epitheliale-Mesenchymale-Transition, die erhöhte Migration oder Therapieresistenz sind betont (Kolenda et al., 2014). In Anbetracht dessen, dass viele Tumorentitäten durch diese Signalkaskade beeinflusst werden und letztlich einen prognostisch negativen Effekt erhalten, ist die genaue Untersuchung dieser Signalkaskade

und speziell die Schnittstellen der einzelnen Vorgänge von Bedeutung für das Verständnis der Tumorgenese, aber auch für mögliche Therapieansätze des Glioblastoms und anderer Tumore.

In dieser Arbeit wurde die signifikant erhöhte Expression von HMGA2 am Rand im Vergleich zur Tumormitte dargestellt und der prognostische Einfluss von HMGA2 im Randbereich des Tumors wurde gezeigt (Abbildung 6 + Abbildung 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikrostruktur und die Eigenschaften am Rand unterschiedlich sind. Durch die vorausgegangene Erklärung des Zusammenhanges von let-7 und HMGA2, kann eine vermehrte Hemmung von let-7 am Tumorrand angenommen werden. Eine entscheidende Rolle in der Entstehung der unterschiedlichen HMGA2 Expression könnte Hypoxie sein, welches let-7 inhibiert. Es wird angenommen, dass die Signalkaskade rund um let-7/LIN28/HMGA2 unabhängig von Sauerstoffgehalt Energie generieren und liefern kann, sodass es ein wichtiger Mechanismus zur Energielieferung im hypoxischen Tumor sein könnte (Ma et al., 2014).

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expression von HMGA2 je nach Hypoxiegradient, könnte im Zusammenspiel mit SOX2 liegen. Hypoxie ist mit einer erhöhten SOX2-Expression in Tumoren, wie z. B. Prostatakarzinom, beschrieben worden (Bae et al., 2016). Durch eine direkte Bindung von HMGA2 an SOX2 wird die Expression von SOX2, einem Transkriptionsfaktor, erhöht (Chiou et al., 2013). Besonders im schnell wachsenden Glioblastom könnte die sauerstoffunabhängige let-7/HMGA2/SOX2 Verbindung im Randbereich zur Robustheit und Malignität des Tumors beisteuern.

Sorensen et al. beschreibt eine hypoxieabhängige Rolle von Immunzellen in verschiedenen Bereichen des Glioblastoms (Sorensen & Kristensen, 2022). Die let-7/LIN28/HMGA2 Achse scheint mit der Differenzierung von CD8 T-Zellen verbunden zu sein und durch die Antigenpräsentation über den T-Zell-Rezeptor gehemmt zu werden (Wells et al., 2017). Glioblastome zeigen im Vergleich zu anderen Tumorentitäten abweichende Präsenz an Immunzellen (De Leo et al., 2020). Die Rolle von Tumor-Assoziierten Makrophagen (TAMs) und Mikroglia auf die let-7/LIN28/HMGA2 Expression in verschiedenen Tumorbereichen ist nicht abschließend erklärt. Die hypoxiegetriebene erhöhte HMGA2-Expression im Randbereich des Tumors und die mit HMGA2 verbundenen molekulargenetischen und zellulären Signalkaskaden, könnten den schlechten Einfluss einer erhöhten HMGA2 Expression im Randbereich des Tumors auf das Gesamtüberleben erklären.

Schließlich scheint die Ausprägung von Hypoxie in verschiedenen Tumorbereichen ungleich zu sein. Katakowski et al. zeigten, dass der Hypoxiemarker HIF-1 α in der invasiven Zone des Glioblastoms erhöht exprimiert ist und stellten die Hypothese auf, dass Hypoxie sich auf die miR-9 Expression auswirkt, die wiederum je nach Zelldichte die Tumorzellen in einen invasiven oder proliferativen Zustand versetzt (Katakowski et al., 2016). Hier wäre ein Vergleich von HMGA2 mit Hypoxiemarkern in der Randzone eine sinnvolle Ergänzung, denn Cai et al. zeigte, dass HMGA2 in hypoxieassiziierten Zellen vermehrt exprimiert ist und anti-apoptotisch und migrationsfördernd wirkt (Cai et al., 2020). Folglich lässt sich die Hypothese stellen, dass die Hypoxie am Tumorrand ursächlich für die erhöhte Expression von HMGA2 in der Randzone ist.

4.5 Mikrostrukturen und Randbereich des Glioblastoms

Die signifikant höhere HMGA2-Expression im Randbereich des Glioblastoms weist auf die strukturelle Heterogenität innerhalb des Glioblastoms hin. Diese Arbeit knüpft an das Konzept, dass verschiedene Bereiche im Glioblastom unterschiedliche Aufgaben und Wirkungen tragen. Das Glioblastom wird nicht als einheitliche Masse betrachtet, sondern vielmehr als heterogenes und komplexes Konstrukt mit Zusammenspiel vieler Bereiche. Die Betrachtung der Randregion ist gezielt und sinnvoll, da speziell die Randregion den Ausgangspunkt für die meisten Rezidive darstellt und therapeutisch noch viele Fragen aufwirft (Burger et al., 1983). Im vorigen Kapitel wird der hypoxiebezogene Unterschied der Randregion, sowie die damit möglicherweise zusammenhängenden Signalkaskaden dargestellt. Nach unseren Ergebnissen lässt sich festhalten, dass HMGA2 als potenter und prognostisch relevanter Marker am Rand vermehrt exprimiert ist. Dieses deskriptive Merkmal attestiert der Randregion eine gehobene Stellung und richtet die Aufmerksamkeit weiterer Arbeiten auf die Randregion und die Interaktion zwischen den einzelnen Markern und Zellen. Auf molekularer Ebene wäre es interessant zu untersuchen, wie HMGA2 mit anderen Molekülen bzw. Markern im Randbereich kommuniziert und interagiert. Welche Strukturen werden durch HMGA2 im Randbereich beeinflusst oder wovon wird HMGA2 im Randbereich beeinflusst?

Das Modell und die Theorie von Nischen und Tumorbereichen, die einen starken Einfluss auf das onkologische Geschehen des Tumors besitzen, erhärtete sich in den letzten Jahren (Filatova et al., 2013). Demnach sind Expressionsunterschiede in verschiedenen Tumorbereichen nachvollziehbar und erklärt. In den Nischen wird eine starke Präsenz von Gliom-Stammzellen (GSC) vermutet, die wiederum in Kombination mit

Immunzellen und Stützzellen des Gehirns Wachstum und Ausbreitung antreiben und fördern können (Hide et al., 2018). Detaillierteres Wissen und Kenntnis über diese proliferations- und invasionsfördernden Mikrostrukturen sind grundlegend, um mögliche Therapieansätze zu generieren. Im Beispiel der perivaskulären Nische, wo das Zusammenspiel von GSC und Endothelzellen (EC) im Mittelpunkt steht, ist die Expression von VEGF (siehe Abbreviationen) erhöht, was wiederum die Neoangiogenese, also die Neubildung von Gefäß- und Kapillarstrukturen fördert und somit die Versorgung des sehr schnell wachsenden Tumors aufrechterhält (Kim et al., 2018). Eine Inhibition von VEGF und somit auch die Hemmung der dazugehörigen Veränderungen der vaskulären und perivaskulären Strukturen, wird heute in der Klinik als Therapieverfahren angewendet und kann insbesondere das Überleben der Patienten mit Rezidiven verlängern (Morisse et al., 2019). Dies ist ein gutes Beispiel dafür, wie das Wissen über die jeweiligen Mikrostrukturen des Glioblastoms und die Kenntnis möglicher Zielstrukturen den Weg für zukünftige Therapieverfahren ebnen können.

Des Weiteren spielt das Zusammenspiel von Immunzellen und Tumorzellen eine wesentliche Rolle, da maligne Tumore lernen das Immunsystem zu unterdrücken und auszuhebeln. Roesch et al. fassen diese Wechselwirkung zusammen und beschreiben, wie Immunzellen sogar eine tumorfördernde Polarisation tragen können (Roesch et al., 2018). Mikroglia, die sich im Wesentlichen von Immunzellen aus dem Knochenmark unterscheiden, dienen nicht nur als reine Immunzellen, sondern spielen eine gesonderte Rolle in der Entwicklung des Gehirns und bei der Wahrung des Gleichgewichtes der neuronalen Strukturen (Ma et al., 2021). Gliomzellen fördern das Einschwemmen von Immunzellen und polarisieren diese, sodass eine tumorfördernde Umgebung geschaffen wird und keine Inhibition erfolgt (Xuan et al., 2021). Dadurch fördern Immunzellen, die durch die Gliomzellen beeinflusst worden sind, die Invasion und Tumorwachstum (Zhu et al., 2016). Präklinische Studien, die ein gezieltes Blockieren dieser Wechselwirkung bewirken, zeigen durchaus vielversprechende Ergebnisse, die jedoch weiterverfolgt und untersucht werden müssen (Pyonteck et al., 2013).

In der invasiven Randzone wurden besondere Merkmale beschrieben, die der Randregion eine besondere Stellung und Einfluss auf das Glioblastom attestieren. Zum einen konnten Hide et al. zeigen, dass die erhöhte Präsenz von randgelegenen Mikroglia und oligodendritischen Progenitorzellen dem Glioblastom stammzelltypische Eigenschaften verleihen und die Ausbreitung und Invasivität fördern. Diese Ergebnisse bestätigen somit inhaltlich das Zusammenspiel solcher Zellen und die oben erwähnten Kaskaden zwischen

Mikroglia und Gliomzellen (Hide et al., 2019). Zum anderen scheint es auch molekulargenetische Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorregionen zu geben (Aubry et al., 2015). In einer Arbeit wurde die Genaktivität von Zellen des Tumorkerns mit Zellen der invasiven Grenzregion verglichen und jeweils Gensignaturen beschrieben, die durchaus unterschiedlich waren. Gene, die mit dem Zellzyklus, Zellüberleben und Aggressivität vergesellschaftet sind, konnten in randständigen Zellen vermehrt beobachtet werden (Fayzullin et al., 2019). So ist z. B. die Expression von GFAP, einem glialen Tumormarker, insbesondere bei Tumorzellen vom Migrationstyp mit hoher Motilität erniedrigt. Bereits 2003 wurde in vivo untersucht und hingewiesen, dass eine niedrige Expression von GFAP mit hochgradigen Gliomen korreliert (Wilhelmsson et al., 2003).

In gastroenteralen Tumoren konnte Dong J. et al. aufweisen, dass das HMGA2-Retinoblastom Protein-FOXL2 Zusammenwirken die Metastasierung und die Epitheliale-Mesenchymale Transition fördert und zudem die Chemoresistenz steigert (Dong et al., 2017). Dieser von Dong J. et al. beschriebener Effekt von HMGA2 auf Tumorzellen passt zu bisherigen Befunden, die zeigen, dass randständige Tumorzellen progenitorähnliche Eigenschaften tragen und die Migrationsbewegung dieser Zellen im Randbereich ausgeprägter ist im Vergleich zu den mesenchymalen Zellen in der Tumormitte (Beadle et al., 2008). Auf zellulärer Ebene wäre die Frage nach einer Korrelation oder Zusammenhang zwischen HMGA2 und tumor-assoziierten Makrophagen/Mikroglia interessant. Wie oben beschrieben, fällt eine immer größere Aufmerksamkeit auf die tumor-assoziierten Makrophagen/Mikroglia, die aus der Peripherie einwandern können oder durch hirneigene Mikroglia repräsentiert werden (Hambardzumyan et al., 2016). Untersuchungen zeigen, dass diese Makrophagen eine Auswirkung auf das Überleben der Patienten tragen (Pyonteck et al., 2013). Eine mögliche Korrelation zwischen HMGA2 und tumor-assoziierten Makrophagen wurde noch nicht untersucht. Eine gezielte Untersuchung dieser Assoziation im Randbereich könnte aufschlussreich sein und die potente Invasionszone weiter entschlüsseln.

4.6 Therapieoptionen für den Randbereich

Die Therapie des Glioblastoms gründet sich auf drei Säulen und ist trotz operativer Resektion, adjuvanter Radio- und Chemotherapie nicht kurativ. Trotz größten Bemühungen, lässt sich kein durchschlagender Erfolg erzielen und die Prognose bleibt schlecht.

Wenn nun der Randbereich eine erhöhte Relevanz trägt und maßgeblich zur Ausbreitung des Glioblastoms beisteuert, dann muss die Therapie des Glioblastoms diese Tatsache berücksichtigen. Eine differenzierte Betrachtung des Tumors auch hinsichtlich der Therapie wäre die logische Konsequenz. In der Regel werden Glioblastome zunächst operativ entfernt, bevor eine adjuvante Radiochemotherapie begonnen wird. Anhand dieser Arbeit ist anzunehmen, dass die sorgfältige Entfernung des Randes womöglich prognostisch wichtiger ist, als ein reines Abtragen der groben Tumormasse. Besonders in der Randzone, wo Hypoxie, HMGA2 und progenitorähnliche Zellen vorhanden sind (s.o.), könnte eine ausgiebige, operative Entfernung der Randzone für das Ergebnis und die Lebenserwartung vorteilhaft sein. Erste Ergebnisse zeigen, dass eine supramaximale Resektion einen Überlebensvorteil bringt (Shah et al., 2020). Eine operative Entfernung von intrakraniellen Raumforderungen ist immer durch die Lokalisation und örtliche Nähe zu eloquenten Zentren limitiert. Die Funktionalität geht vor der radikalen Ausräumung des Glioblastoms, sodass eine ausgiebige Entfernung der Randzone hierdurch nicht in jedem Fall durchgeführt werden kann (Moliterno et al., 2012). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit weisen auf ein schlechteres Überleben von Patienten mit hoher HMGA2 Last im Randbereich auf, sodass die Optimierung der Resektion des Randbereiches in der Zukunft berücksichtigt werden sollte. Die bestehenden Mittel zur Resektionsoptimierung, wie z.B. die intraoperative MRT-Untersuchung, die Wachkraniotomie, kortikales- bzw. subkortikales Mapping, intraoperativer Ultraschall oder fluoreszenzgestützte Resektion, haben sicherlich das operative Vorgehen verbessert, aber die weitere Resektionsoptimierung gilt es weiterhin anzustreben (D'Amico et al., 2014). Besonders in Rezidiv-Glioblastomen könnte eine Kombination der intraoperativen Hilfsmittel nützlich sein, da z.B. nicht alle Rezidiv-Glioblastome Fluoreszenz darstellen (Quick-Weller et al., 2016). Ling Guo et al. generierten eine fluoreszierende Lösung, die insbesondere die Mikroglia darstellt und somit eine bessere Tumor-Normalhirn-Grenze visualisierte. In vitro und in Tierversuchen konnten erste gute Ergebnisse präsentiert werden (Guo et al., 2020). Des Weiteren wurde anderweitig verglichen, ob die Resektion der FLAIR hyperintensiven Regionen im MRT einen Überlebensvorteil bringt. Im Vergleich zu der herkömmlichen Resektion anhand der Gadolinium-gestützten Navigation, konnten in der prospektiven Studie bessere Ergebnisse vermerkt werden (Certo et al., 2021).

Das Wissen der erhöhten Expression von HMGA2 im Randbereich kann bei der Entwicklung neuer operativer Hilfsmethoden genutzt werden. Bei vielversprechenden

Ansätzen von sogenannten Live-Histologie Technologien, werden unpräparierte Gewebeproben spektroskopisch innerhalb weniger Minuten untersucht und durch künstliche Intelligenz ausgewertet. So gibt es bereits erste Versuche, wo der IDH-Status durch solch eine Technologie ermittelt wird (Sciortino et al., 2021). Könnten HMGA2 typische Spektren ermittelt werden und somit HMGA2 gezielt dargestellt werden, dann wäre eine intraoperative Randzonendarstellung mithilfe von HMGA2 möglich.

Durch das infiltrative Wachstum des Glioblastoms bleibt dieser Tumor operativ nicht in toto zu reseziieren. Es werden immer einzelne Tumorzellen oder Aussiedler distal von der primären Raumforderungslokalisation sein. Systemische Chemotherapien sollen die verbliebenen Tumorzellen gezielt bekämpfen. Die Tatsache, dass HMGA2 lediglich in entarteten und entdifferenzierten Tumorzellen exprimiert wird und besonders in Zellen der invasiven Zone vorkommt (Abbildung 5), hebt HMGA2 als mögliches Therapieziel hervor (Mansoori et al., 2021). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass HMGA2 im Normalhirngewebe nicht exprimiert wird. Konsequenterweise muss untersucht werden, ob HMGA2 als Zielstruktur genutzt werden kann und ob das Ausschalten von HMGA2 einen Vorteil bringt und die Rezidivrate senken könnte. In anderen präklinischen Studien wurden andere Tumorentitäten durch eine gezielte Hemmung von HMGA2 behandelt und es konnte ein positiver Effekt beobachtet werden (Zhu et al., 2013). Gao et al. zeigte, dass durch miR-498 eine direkte Hemmung von HMGA2 erreicht wurde und somit Proliferation, Migration und Invasion reduziert werden konnte (Gao et al., 2018). Glioblastome sind in ihrer Struktur besonders und nicht unmittelbar mit anderen Tumorentitäten vergleichbar. Die Lokalisation im Gehirn und die Blut-Hirn-Schranke machen die zielgerichtete Therapie schwieriger und stellt häufig Herausforderungen dar (Desland & Hormigo, 2020). Die Arbeitsgruppe von Jia W. behandelte Zelllinien des Glioblastoms mit Verbascosid und aktivierte Let-7g-5p und inhibierte damit zudem HMGA2. Die Inhibition von HMGA2 in glialen Zelllinien resultierte in einer Abnahme der Invasivität, Migration, Tumorwachstum und Lebensfähigkeit (Jia et al., 2020). Solche Ergebnisse sind erste Schritte und belegen die finale Wirksamkeit der Hemmung von HMGA2 nicht, aber bestätigen die Tendenz, dass HMGA2 mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist und das Runterregulieren durchaus die Aggressivität des Tumors reduzieren könnte.

Schließlich wird die Therapie des Glioblastoms durch die Bestrahlung komplettiert. In Anbetracht, dass die Randregion gute Mikrostrukturen für das Auftreten von Rezidiven bietet und die erhöhte HMGA2-Expression im Randbereich des Glioblastoms mit einer schlechteren Prognose einhergeht, ist die sorgfältige Bestrahlung der Randregion relevant. Durch verschiedene Bestrahlungsformen, wie z.B. die intraoperative Bestrahlung der Resektionshöhle, wurde in der Vergangenheit häufiger der Versuch gestartet ein längeres Überleben der Patienten zu gewinnen (Cifarelli & Jacobson, 2021). In einer großen Studie konnten Schueller et al. keine Verbesserung des Überlebens im Vergleich zur Standardtherapie feststellen (Schueller et al., 2005). Aktuell läuft eine prospektive klinische Phase-III Studie mit dem Namen Intrago II, die die herkömmliche Therapie mit zusätzlicher intraoperativer Radiotherapie vergleicht. In einer ersten Analyse dieser Arbeitsgruppe zeigte sich ein Überlebensvorteil für die Patienten mit intraoperativer Bestrahlung (Sarria et al., 2020). Selbstverständlich spielen bei der intraoperativen Bestrahlung mehrere Faktoren eine Rolle, wie z. B. Dosis und Bestrahlungsform. Hier könnte HMGA2 als Marker der Randregion hinzugezogen werden. In experimentellen Ansätzen könnte die HMGA2-Expression in Randproben vor und nach der intraoperativen Bestrahlung ermittelt werden.

4.7 Limitationen dieser Arbeit

Die gezielte genetische Untersuchung der HMGA2-Expression in mitte- und randständigen Gewebeproben ist sehr innovativ und schenkt dieser Arbeit den Unterschied zu vorigen HMGA2-Publikationen, jedoch sind einige Punkte zu nennen, die diese Studie in der Aussagekraft einschränken. Retrospektive Untersuchungen sind durch ein sehr gemischten Patientenkollektiv geprägt und führen zu einem systemischen Fehler, da die Patienten nicht in allen Aspekten vergleichbar sind. So wird in dieser Arbeit die onkologische Nachbehandlung nicht berücksichtigt, was die Aussagekraft bezüglich des Überlebens sehr limitiert. Unterschiedliche adjuvante Therapien und nicht onkologische Komplikationen, die im weiteren Verlauf entstehen können, wurden nicht integriert, sodass eine wirkliche Aussage zum Überleben nicht vollends getätigt werden kann. Außerdem wäre eine tiefergehende Betrachtung weiterer molekulargenetische Eigenschaften, wie die Ausprägung von 1p/19q Ko-Deletion oder der EGFR-Mutation hilfreich, da die verschiedenen Mutationen tatsächlich verschiedene Entstehungswege des Glioblastoms darstellen (R. Chen et al., 2017). Das Glioblastom wird nicht mehr undifferenziert betrachtet, sondern durch die Molekulargenetik eingeteilt und somit

könnte es heißen, dass HMGA2 nur bei bestimmten Gliomen stärker exprimiert wird. Auch die Randexpression könnte variieren.

Die eingeschlossene Patientenzahl von 23, ist für eine experimentelle Arbeit nicht ungewöhnlich klein, jedoch insgesamt einschränkend auf die Aussagekraft der Studie, da auch statistische Tests durch die Patientenzahl limitiert sind. Insbesondere bei potenziell geringgradigen Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen wirkt sich eine große Patientenzahl positiv auf die Aussagekraft und Aussagefähigkeit aus (Serdar et al., 2021). Zu erwähnen ist zudem die teilweise fehlende Übereinstimmung der Expressionsergebnisse zwischen der IHC und qPCR. Die Ursache für solch eine Diskrepanz könnte multifaktoriell sein und muss kritisch hinterfragt werden. Zur Auswertung der IHC wurden viele Parameter standardisiert. Die Beleuchtung, Schnittausswahl und die Verblindung des Untersuchers zu den Schnitten helfen, um die Auswertung vergleichbarer zu machen, jedoch bleibt es letztlich sehr untersucherabhängig, wie die angefärbten Zellen und die Farbintensität bewertet werden.

Zudem ist die Probenentnahme trotz navigationsgestützter Technik frei und vom Operateur abhängig und nur begrenzt standardisierbar. Zudem lässt sich diskutieren, ob die häufig zentralgelegenen Nekroseareale tatsächlich den Glioblastomkern darstellen oder durch fehlende vitale Zellen eine Verschiebung der Ergebnisse provozieren. Hinzu kommen die Operationstechnik und Probeentnahme. Wird vor der Entnahme viel thermisch koaguliert und das Gewebe iatrogen verändert, so spielt sich dies auch auf die Ergebnisse im Labor aus. Postoperativ erfolgte die Verarbeitung des entnommenen Gewebes zügig und ein wochenlanges Konservieren in flüssigem Stickstoff wurde gemieden. Die Qualität und Integrität von RNA für qPCR-Untersuchungen ist eminent (Fleige & Pfaffl, 2006). Eine Qualitäts- und Quantitätsmessung erfolgte zwar immer unmittelbar nach Erhalt RNA-Proben oder vor dem Umschrieb in DNA, vereinzelte Kühlkettenunterbrechungen konnten nicht gänzlich verhindert werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmalig die HMGA2-Expression im Glioblastom in unterschiedlichen Tumorregionen untersucht. Der direkte Vergleich von Glioblastomproben aus dem Tumorrand mit mitteständigen Tumorproben zeigt, dass HMGA2 im Randbereich des Glioblastoms erhöht exprimiert wird. Zudem bestätigt diese Arbeit, dass HMGA2 im Glioblastom höher exprimiert wird als in Normalhirnproben. Besonders zwischen Proben des Glioblastomrandes und Normalhirngewebe konnte ein großer Expressionsunterschied dargestellt werden. Die erhöhte Expression von HMGA2 im Randbereich ist ein interessantes Merkmal und passt zu aktuellen Betrachtungen und Modellen, welche das Glioblastom als heterogenen Tumor mit verschiedenen Bereichen betrachtet, die unterschiedlich stark das Tumorgeschehen beeinflussen.

Die Korrelationsuntersuchungen zwischen HMGA2 im Randbereich und klinischen Eigenschaften, ergaben keine signifikanten Ergebnisse, jedoch lässt sich vermuten, dass HMGA2 nicht mit Grundeigenschaften, wie z.B. Alter, Geschlecht oder anderen molekulargenetischen Markern korreliert. Eine besonders hohe HMGA2-Expression im Randbereich des Tumors konnte mit einem schlechteren Gesamtüberleben beobachtet werden. Es konnte ein prognostischer Zusammenhang zwischen der HMGA2-Expression im Randbereich und dem Gesamtüberleben präsentiert werden.

Als möglicher randspezifischer Marker könnte HMGA2 zukünftig zur Resektionssteuerung am Tumorrand dienen. Zudem wäre eine gezielte Darstellung der Randstruktur durch Marker wie HMGA2 möglich.

Abschließend lässt sich festhalten, dass regionale Expressionsunterschiede von HMGA2 im Glioblastom bestehen, die zudem einen prognostischen Einfluss darstellen. Weitere Untersuchungen zu HMGA2 im Glioblastom könnten aufschlussreiche Informationen hervorbringen und somit zur Entschlüsselung der Erkrankung liefern. Insbesondere größere Studienkollektive und zielgerichtete Untersuchungen wären notwendig, um stärkere Aussagen treffen zu können.

5.1 Summary

This study investigated the expression of HMGA2 in glioblastoma in different tumor regions for the first time. Direct comparison of glioblastoma samples from the tumor margin with specimens from the center of the tumor shows that HMGA2 is expressed at an elevated level in the marginal region of glioblastoma. In addition, this work confirms that HMGA2 is higher expressed in glioblastoma than in normal brain samples. In

particular, a large difference in expression was shown between samples from the glioblastoma margin and normal brain tissue.

The increased expression of HMGA2 in the rim area, is an interesting feature and fits to current considerations and models, which consider glioblastoma as a heterogeneous tumor with different areas, which differentially influence tumor progression. Correlation analysis between HMGA2 in the marginal area and clinical features, did not yield significant results, but suggests that HMGA2 does not correlate with basic characteristics, such as age, sex or other molecular genetic markers. Particularly high HMGA2 expression at the periphery of the tumor was observed to be associated with poorer overall survival. A prognostic correlation between HMGA2 expression in the marginal area and overall survival could be presented.

As a potential margin-specific marker, HMGA2 could serve as a resection guide at the tumor margin in the future. In addition, targeted imaging of the margin structure by markers such as HMGA2 would be possible.

In conclusion, regional expression differences of HMGA2 exist in glioblastoma, which also represent a prognostic influence. Further studies on HMGA2 in glioblastoma could reveal insightful information and thus contribute to decipher the disease. In particular, larger study collectives and targeted investigation would be necessary to draw stronger conclusions.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Die typische histologische Struktur eines Glioblastoms	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung von HMGA2	18
Abbildung 3: RAF Kinase Inhibitor/HMGA2 Signalkaskade	20
Abbildung 4: Immunhistologische Färbungen	34
Abbildung 5: HMGA2-Expression im GBM, sowie Normalhirngewebe	38
Abbildung 6: HMGA2-Expression am Tumorrand und Tumorkern	39
Abbildung 7: Überlebensanalyse je nach HMGA2-Expression am Rand des GBM	41
Abbildung 8: Gesamtüberleben je nach HMGA2-Expression am Rand und MGMT-Methylierungsstatus	42
Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben je nach HMGA2-Expression am Rand und MGMT-Methylierungsstatus	43

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien zur Vorbereitung und Durchführung der qPCR	29
Tabelle 2: Beispielhafte Darstellung der Befüllung einer 96 Well Platte	30
Tabelle 3: Genutzte Primer/Gene Assay für die Testgruppe und zur endogenen Kontrolle	30
Tabelle 4: Hersteller- und Antikörperinformationen	33
Tabelle 5: Geräte und Materialien zur Vorbereitung und Durchführung der Immunhistochemie	35
Tabelle 6: Patientenkollektiv und Basisinformation	37
Tabelle 7: Multivariate Cox Regressionsanalyse	44

8 Abbreviationen

BRAF - B-Raf Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase

CD8 - Cluster of differentiation 8

CDK - Cyclin dependent Kinase

cDNA - complementary DANN

CT - Computertomographie

Cycle Threshold (CT)

D2HG - D-2-Hydroxyglutarat

DNA - deoxyribonucleic acid

DNA - Desoxyribonukleinsäure

dNTP - Desoxynukleosittriphosphate

EC - Endothelzellen

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

EMT - Epithelial-Mesenchymale Transition

FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

GFAP - glial fibrillary acidic protein

GSC - Gliom Stammzellen

H₂O₂ - Wasserstoffperoxid

HE-Schnitte - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HIF - Hypoxia inducing factor

HMGA - High mobility Group A

IDH - Isocitrat Dehydrogenase

IHC - Immunhistochemie

IPO8 - Importin 8

let-7 - lethal 7

LOH - Loss of Heterozygosity

MGMT - O⁶-Methylguanin-DNS-Methyltransferase

mRNA - Messenger Ribonukleinsäure

MRT - Kernspintomographie

NegK - Negativ Kontrolle

NOA 16 - Phase I Studie des IDH1 Peptid Impfstoffs bei Grad III-IV Gliomen

OS - Gesamtüberleben

PCR - Polymerase Kettenreaktion

PFS - Progressionsfreies Überleben
PI3K/AKT - phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B
PTEN - Phosphatase and tensin homolog
RB1 - Retinoblastom
RNA - Ribonukleinsäure
rRNA - Ribosomale RNA
RT - Reverse Transkriptase
SOX2 - sex determining region Y (SRY)- box 2
STS - Short Term Survival
TAMs - Tumor assoziierte Makrophagen
TBP - Tatabox Binding Protein
tRNA - Transfer Ribonukleinsäure
VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor
WHO - Weltgesundheitsorganisation
ZNS - Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Abdullah, K. G., Lubelski, D., Nucifora, P. G., & Brem, S. (2013). Use of diffusion tensor imaging in glioma resection. *Neurosurg Focus*, 34(4), E1. <https://doi.org/10.3171/2013.1.FOCUS12412>
- Abe, N., Watanabe, T., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Chiappetta, G., Fusco, A., & Atomi, Y. (2003). An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer*, 89(11), 2104-2109. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601391>
- Acerbi, F., Broggi, M., Schebesch, K. M., Hohne, J., Cavallo, C., De Laurentis, C., Eoli, M., Anghileri, E., Servida, M., Boffano, C., Pollo, B., Schiariti, M., Visintini, S., Montomoli, C., Bosio, L., La Corte, E., Broggi, G., Brawanski, A., & Ferroli, P. (2018). Fluorescein-Guided Surgery for Resection of High-Grade Gliomas: A Multicentric Prospective Phase II Study (FLUOGLIO). *Clin Cancer Res*, 24(1), 52-61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1184>
- Albert, F. K., Forsting, M., Sartor, K., Adams, H. P., & Kunze, S. (1994). Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery*, 34(1), 45-60; discussion 60-41. <https://doi.org/10.1097/00006123-199401000-00008>
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129(6), 829-848. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
- Andronesi, O. C., Rapalino, O., Gerstner, E., Chi, A., Batchelor, T. T., Cahill, D. P., Sorensen, A. G., & Rosen, B. R. (2013). Detection of oncogenic IDH1 mutations using magnetic resonance spectroscopy of 2-hydroxyglutarate. *J Clin Invest*, 123(9), 3659-3663. <https://doi.org/10.1172/JCI67229>
- Arita, H., Yamasaki, K., Matsushita, Y., Nakamura, T., Shimokawa, A., Takami, H., Tanaka, S., Mukasa, A., Shirahata, M., Shimizu, S., Suzuki, K., Saito, K., Kobayashi, K., Higuchi, F., Uzuka, T., Otani, R., Tamura, K., Sumita, K., Ohno, M., . . . Ichimura, K. (2016). A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun*, 4(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0351-2>
- Aubry, M., de Tayrac, M., Etcheverry, A., Clavreul, A., Saikali, S., Menei, P., & Mosser, J. (2015). From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*, 6(14), 12094-12109. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3297>
- Awad, A. W., Karsy, M., Sanai, N., Spetzler, R., Zhang, Y., Xu, Y., & Mahan, M. A. (2017). Impact of removed tumor volume and location on patient outcome in glioblastoma. *J Neurooncol*, 135(1), 161-171. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2562-1>
- Bae, K. M., Dai, Y., Vieweg, J., & Siemann, D. W. (2016). Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res*, 6(5), 1078-1088. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294000>
- Balesaria, S., Brock, C., Bower, M., Clark, J., Nicholson, S. K., Lewis, P., de Sanctis, S., Evans, H., Peterson, D., Mendoza, N., Glaser, M. G., Newlands, E. S., & Fisher, R. A. (1999). Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer*, 81(8), 1371-1377. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6693403>

- Barnholtz-Sloan, J. S., Sloan, A. E., & Schwartz, A. G. (2003). Relative survival rates and patterns of diagnosis analyzed by time period for individuals with primary malignant brain tumor, 1973-1997. *J Neurosurg*, *99*(3), 458-466. <https://doi.org/10.3171/jns.2003.99.3.0458>
- Barsouk, A., Baldassari, M. P., Khanna, O., Andrews, C. E., Ye, D. Y., Velagapudi, L., Al Saiegh, F., Hafazalla, K., Cunningham, E., Patel, H., Malkani, K., Fitchett, E. M., Farrell, C. J., & Judy, K. D. (2021). Glioblastoma with deep supratentorial extension is associated with a worse overall survival. *J Clin Neurosci*, *93*, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2021.08.025>
- Beadle, C., Assanah, M. C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S. S., & Canoll, P. (2008). The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell*, *19*(8), 3357-3368. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0319>
- Beiko, J., Suki, D., Hess, K. R., Fox, B. D., Cheung, V., Cabral, M., Shonka, N., Gilbert, M. R., Sawaya, R., Prabhu, S. S., Weinberg, J., Lang, F. F., Aldape, K. D., Sulman, E. P., Rao, G., McCutcheon, I. E., & Cahill, D. P. (2014). IDH1 mutant malignant astrocytomas are more amenable to surgical resection and have a survival benefit associated with maximal surgical resection. *Neuro Oncol*, *16*(1), 81-91. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not159>
- Bleehen, N. M., & Stenning, S. P. (1991). A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer*, *64*(4), 769-774. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.396>
- Bleeker, F. E., Molenaar, R. J., & Leenstra, S. (2012). Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol*, *108*(1), 11-27. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0793-0>
- Bomers, J. P., Danielsen, M. E., Schulz, M. K., Halle, B., Kristensen, B. W., Sorensen, M. D., Poulsen, F. R., & Pedersen, C. B. (2020). Sodium fluorescein shows high surgeon-reported usability in glioblastoma surgery. *Surgeon*, *18*(6), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2020.01.003>
- Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B. J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J. A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J. L., Wrensch, M., Buffler, P. A., & Brain Tumor Epidemiology, C. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, *113*(7 Suppl), 1953-1968. <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>
- Bradley, W. G., Jr., Waluch, V., Yadley, R. A., & Wycoff, R. R. (1984). Comparison of CT and MR in 400 patients with suspected disease of the brain and cervical spinal cord. *Radiology*, *152*(3), 695-702. <https://doi.org/10.1148/radiology.152.3.6463251>
- Brandes, A. A., Tosoni, A., Spagnoli, F., Frezza, G., Leonardi, M., Calbucci, F., & Franceschi, E. (2008). Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: pitfalls in neurooncology. *Neuro Oncol*, *10*(3), 361-367. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-008>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M. J., von Deimling, A., & Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol*, *139*(3), 603-608. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02127-9>

- Brat, D. J., Castellano-Sanchez, A. A., Hunter, S. B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E. H., Devi, S. N., Kaur, B., & Van Meir, E. G. (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*, *64*(3), 920-927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2073>
- Brat, D. J., Ryken, T. C., Kalkanis, S. N., Olson, J. J., & Committee, A. C. J. G. (2014). The role of neuropathology in the management of progressive glioblastoma : a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*, *118*(3), 461-478. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1331-z>
- Brown, T. J., Brennan, M. C., Li, M., Church, E. W., Brandmeir, N. J., Rakszawski, K. L., Patel, A. S., Rizk, E. B., Suki, D., Sawaya, R., & Glantz, M. (2016). Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*, *2*(11), 1460-1469. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1373>
- Burger, P. C., Dubois, P. J., Schold, S. C., Jr., Smith, K. R., Jr., Odom, G. L., Crafts, D. C., & Giangaspero, F. (1983). Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, *58*(2), 159-169. <https://doi.org/10.3171/jns.1983.58.2.0159>
- Bustin, M., & Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, *54*, 35-100. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60360-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60360-8)
- Cai, Z. L., Liu, C., Yao, Q., Xie, Q. W., Hu, T. T., Wu, Q. Q., & Tang, Q. Z. (2020). The pro-migration and anti-apoptosis effects of HMGA2 in HUVECs stimulated by hypoxia. *Cell Cycle*, *19*(24), 3534-3545. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1850970>
- Cancer Genome Atlas Research, N., Brat, D. J., Verhaak, R. G., Aldape, K. D., Yung, W. K., Salama, S. R., Cooper, L. A., Rheinbay, E., Miller, C. R., Vitucci, M., Morozova, O., Robertson, A. G., Nounshmehr, H., Laird, P. W., Cherniack, A. D., Akbani, R., Huse, J. T., Ciriello, G., Poisson, L. M., . . . Zhang, J. (2015). Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*, *372*(26), 2481-2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>
- Certo, F., Altieri, R., Maione, M., Schonauer, C., Sortino, G., Fiumano, G., Tirro, E., Massimino, M., Broggi, G., Vigneri, P., Magro, G., Visocchi, M., & Barbagallo, G. M. V. (2021). FLAIRectomy in Supramarginal Resection of Glioblastoma Correlates With Clinical Outcome and Survival Analysis: A Prospective, Single Institution, Case Series. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*, *20*(2), 151-163. <https://doi.org/10.1093/ons/opaa293>
- Cha, S. (2006). Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradiol*, *27*(3), 475-487. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551981>
- Chaichana, K. L., Parker, S. L., Olivi, A., & Quinones-Hinojosa, A. (2009). Long-term seizure outcomes in adult patients undergoing primary resection of malignant brain astrocytomas. Clinical article. *J Neurosurg*, *111*(2), 282-292. <https://doi.org/10.3171/2009.2.JNS081132>
- Chandrasoma, P. T., Smith, M. M., & Apuzzo, M. L. (1989). Stereotactic biopsy in the diagnosis of brain masses: comparison of results of biopsy and resected surgical specimen. *Neurosurgery*, *24*(2), 160-165. <https://doi.org/10.1227/00006123-198902000-00002>
- Chang, S. M., Wen, P. Y., Vogelbaum, M. A., Macdonald, D. R., & van den Bent, M. J. (2015). Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO): more than imaging

- criteria for malignant glioma. *Neurooncol Pract*, 2(4), 205-209. <https://doi.org/10.1093/nop/npv037>
- Chau, K. Y., Patel, U. A., Lee, K. L., Lam, H. Y., & Crane-Robinson, C. (1995). The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4262-4266. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4262>
- Chen, J., Han, P., & Dahiya, S. (2022). Glioblastoma: Changing concepts in the WHO CNS5 classification. *Indian J Pathol Microbiol*, 65(Supplement), S24-S32. https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_1109_21
- Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, 14(2), 284-297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
- Chen, Z., Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S. A., Gutmann, D. H., & Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res*, 77(9), 2266-2278. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310>
- Chiou, G. Y., Chien, C. S., Wang, M. L., Chen, M. T., Yang, Y. P., Yu, Y. L., Chien, Y., Chang, Y. C., Shen, C. C., Chio, C. C., Lu, K. H., Ma, H. I., Chen, K. H., Liu, D. M., Miller, S. A., Chen, Y. W., Huang, P. I., Shih, Y. H., Hung, M. C., & Chiou, S. H. (2013). Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Mol Cell*, 52(5), 693-706. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.009>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Cifarelli, C. P., & Jacobson, G. M. (2021). Intraoperative Radiotherapy in Brain Malignancies: Indications and Outcomes in Primary and Metastatic Brain Tumors. *Front Oncol*, 11, 768168. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.768168>
- Colwell, N., Larion, M., Giles, A. J., Seldomridge, A. N., Sizardkhani, S., Gilbert, M. R., & Park, D. M. (2017). Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol*, 19(7), 887-896. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now258>
- Covarrubias, D. J., Rosen, B. R., & Lev, M. H. (2004). Dynamic magnetic resonance perfusion imaging of brain tumors. *Oncologist*, 9(5), 528-537. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-5-528>
- D'Amico, R. S., Englander, Z. K., Canoll, P., & Bruce, J. N. (2017). Extent of Resection in Glioma-A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurg*, 103, 538-549. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.04.041>
- D'Amico, R. S., Kennedy, B. C., & Bruce, J. N. (2014). Neurosurgical oncology: advances in operative technologies and adjuncts. *J Neurooncol*, 119(3), 451-463. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1493-3>
- Dayani, F., Young, J. S., Bonte, A., Chang, E. F., Theodosopoulos, P., McDermott, M. W., Berger, M. S., & Aghi, M. K. (2018). Safety and outcomes of resection of butterfly glioblastoma. *Neurosurg Focus*, 44(6), E4. <https://doi.org/10.3171/2018.3.FOCUS1857>
- De Leo, A., Ugolini, A., & Veglia, F. (2020). Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment. *Cells*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cells10010018>
- Delev, D., Heiland, D. H., Franco, P., Reinacher, P., Mader, I., Staszewski, O., Lassmann, S., Grau, S., & Schnell, O. (2019). Surgical management of lower-grade glioma

- in the spotlight of the 2016 WHO classification system. *J Neurooncol*, 141(1), 223-233. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03030-w>
- Desland, F. A., & Hormigo, A. (2020). The CNS and the Brain Tumor Microenvironment: Implications for Glioblastoma Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197358>
- Di Ieva, A., Lam, T., Alcaide-Leon, P., Bharatha, A., Montanera, W., & Cusimano, M. D. (2015). Magnetic resonance susceptibility weighted imaging in neurosurgery: current applications and future perspectives. *J Neurosurg*, 123(6), 1463-1475. <https://doi.org/10.3171/2015.1.JNS142349>
- Diaz, R. J., Ali, S., Qadir, M. G., De La Fuente, M. I., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. (2017). The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol*, 133(3), 455-467. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2477-x>
- Diaz, R. J., Dios, R. R., Hattab, E. M., Burrell, K., Rakopoulos, P., Sabha, N., Hawkins, C., Zadeh, G., Rutka, J. T., & Cohen-Gadol, A. A. (2015). Study of the biodistribution of fluorescein in glioma-infiltrated mouse brain and histopathological correlation of intraoperative findings in high-grade gliomas resected under fluorescein fluorescence guidance. *J Neurosurg*, 122(6), 1360-1369. <https://doi.org/10.3171/2015.2.JNS132507>
- Dong, J., Wang, R., Ren, G., Li, X., Wang, J., Sun, Y., Liang, J., Nie, Y., Wu, K., Feng, B., Shang, Y., & Fan, D. (2017). HMGA2-FOXL2 Axis Regulates Metastases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Chemoresistant Gastric Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(13), 3461-3473. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2180>
- Dong, S., Nutt, C. L., Betensky, R. A., Stemmer-Rachamimov, A. O., Denko, N. C., Ligon, K. L., Rowitch, D. H., & Louis, D. N. (2005). Histology-based expression profiling yields novel prognostic markers in human glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(11), 948-955. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000186940.14779.90>
- Fabian, D., Guillermo Prieto Eibl, M. D. P., Alnahhas, I., Sebastian, N., Giglio, P., Puduvalli, V., Gonzalez, J., & Palmer, J. D. (2019). Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/cancers11020174>
- Fabjani, G., Tong, D., Wolf, A., Roka, S., Leodolter, S., Hoecker, P., Fischer, M. B., Jakesz, R., & Zeillinger, R. (2005). HMGA2 is associated with invasiveness but not a suitable marker for the detection of circulating tumor cells in breast cancer. *Oncol Rep*, 14(3), 737-741. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16077985>
- Fayzullin, A., Sandberg, C. J., Spreadbury, M., Saberniak, B. M., Grieg, Z., Skaga, E., Langmoen, I. A., & Vik-Mo, E. O. (2019). Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells. *Transl Oncol*, 12(1), 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.09.014>
- Feigelson, H. S., Ross, R. K., Yu, M. C., Coetzee, G. A., Reichardt, J. K., & Henderson, B. E. (1996). Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. *J Cell Biochem Suppl*, 25, 15-22. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(1996\)25+<15::aid-jcb2>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(1996)25+<15::aid-jcb2>3.0.co;2-5)
- Filatova, A., Acker, T., & Garvalov, B. K. (2013). The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, 1830(2), 2496-2508. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.008>
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>

- Fulton, D. S., Urtasun, R. C., Scott-Brown, I., Johnson, E. S., Mielke, B., Curry, B., Huyser-Wierenga, D., Hanson, J., & Feldstein, M. (1992). Increasing radiation dose intensity using hyperfractionation in patients with malignant glioma. Final report of a prospective phase I-II dose response study. *J Neurooncol*, *14*(1), 63-72. <https://doi.org/10.1007/BF00170946>
- Fusco, A., & Fedele, M. (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, *7*(12), 899-910. <https://doi.org/10.1038/nrc2271>
- Gangemi, R. M., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A., & Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*, *27*(1), 40-48. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0493>
- Gao, N., Wang, F. X., Wang, G., & Zhao, Q. S. (2018). Targeting the HMGA2 oncogene by miR-498 inhibits non-small cell lung cancer biological behaviors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *22*(6), 1693-1699. https://doi.org/10.26355/eurev_201803_14582
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, *128*(4), 635-638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
- Golla, H., Ale Ahmad, M., Galushko, M., Hampl, J., Maarouf, M., Schroeter, M., Herrlinger, U., Hellmich, M., & Voltz, R. (2014). Glioblastoma multiforme from diagnosis to death: a prospective, hospital-based, cohort, pilot feasibility study of patient reported symptoms and needs. *Support Care Cancer*, *22*(12), 3341-3352. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2384-z>
- Goodwin, G. H., Sanders, C., & Johns, E. W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*, *38*(1), 14-19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03026.x>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, *3*(1), 23-35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Grosschedl, R., Giese, K., & Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*, *10*(3), 94-100. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90232-1](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90232-1)
- Günter Klöppel, H. H. K., Wolfgang Remmele, Werner Paulus, J. Michael Schröder. (2012). *Pathologie* (Vol. Neuropathologie). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-02324-8>
- Guo, L., Zhang, X., Wei, R., Li, G., Sun, B., Zhang, H., Liu, D., Wang, C., & Feng, M. (2020). Engineering microglia as intraoperative optical imaging agent vehicles potentially for fluorescence-guided surgery in gliomas. *Biomater Sci*, *8*(4), 1117-1126. <https://doi.org/10.1039/c9bm01388a>
- Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. (2019). Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. *Neuron*, *104*(3), 442-449. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.028>
- Hacke, W. (2016). *Neurologie*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-46892-0>
- Hamamcioglu, M. K., Akcakaya, M. O., Goker, B., Kasimcan, M. O., & Kiris, T. (2016). The use of the YELLOW 560 nm surgical microscope filter for sodium fluorescein-guided resection of brain tumors: Our preliminary results in a series of 28 patients. *Clin Neurol Neurosurg*, *143*, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.02.006>

- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*, *19*(1), 20-27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
- Hans-Joachim Müller, D. R. P. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (Vol. 2). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R. D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bahr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., . . . Neurooncology Working Group of the German Cancer, S. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, *393*(10172), 678-688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31791-4)
- Hide, T., Komohara, Y., Miyasato, Y., Nakamura, H., Makino, K., Takeya, M., Kuratsu, J. I., Mukasa, A., & Yano, S. (2018). Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border. *EBioMedicine*, *30*, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.024>
- Hide, T., Shibahara, I., & Kumabe, T. (2019). Novel concept of the border niche: glioblastoma cells use oligodendrocytes progenitor cells (GAOs) and microglia to acquire stem cell-like features. *Brain Tumor Pathol*, *36*(2), 63-73. <https://doi.org/10.1007/s10014-019-00341-2>
- Huang, B., Yang, J., Cheng, Q., Xu, P., Wang, J., Zhang, Z., Fan, W., Wang, P., & Yu, M. (2018). Prognostic Value of HMGA2 in Human Cancers: A Meta-Analysis Based on Literatures and TCGA Datasets. *Front Physiol*, *9*, 776. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00776>
- Ichimura, K., Schmidt, E. E., Miyakawa, A., Goike, H. M., & Collins, V. P. (1998). 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*, *22*(1), 9-15. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199805\)22:1<9::aid-gcc2>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199805)22:1<9::aid-gcc2>3.0.co;2-1)
- Ideguchi, M., Kajiwara, K., Goto, H., Sugimoto, K., Nomura, S., Ikeda, E., & Suzuki, M. (2015). MRI findings and pathological features in early-stage glioblastoma. *J Neurooncol*, *123*(2), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1797-y>
- Inskip, P. D., Linet, M. S., & Heineman, E. F. (1995). Etiology of brain tumors in adults. *Epidemiol Rev*, *17*(2), 382-414. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036200>
- Iwamoto, F. M., Reiner, A. S., Panageas, K. S., Elkin, E. B., & Abrey, L. E. (2008). Patterns of care in elderly glioblastoma patients. *Ann Neurol*, *64*(6), 628-634. <https://doi.org/10.1002/ana.21521>
- Jenkins, R. B., Blair, H., Ballman, K. V., Giannini, C., Arusell, R. M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P. D., Shaw, E. G., & Buckner, J. C. (2006). A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*, *66*(20), 9852-9861. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1796>

- Jia, W. Q., Zhu, J. W., Yang, C. Y., Ma, J., Pu, T. Y., Han, G. Q., Zou, M. M., & Xu, R. X. (2020). Verbascoside inhibits progression of glioblastoma cells by promoting Let-7g-5p and down-regulating HMGA2 via Wnt/beta-catenin signalling blockade. *J Cell Mol Med*, 24(5), 2901-2916. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14884>
- Katakowski, M., Charteris, N., Chopp, M., & Khain, E. (2016). Density-Dependent Regulation of Glioma Cell Proliferation and Invasion Mediated by miR-9. *Cancer Microenviron*, 9(2-3), 149-159. <https://doi.org/10.1007/s12307-016-0190-5>
- Kaur, H., Ali, S. Z., Huey, L., Hutt-Cabezas, M., Taylor, I., Mao, X. G., Weingart, M., Chu, Q., Rodriguez, F. J., Eberhart, C. G., & Raabe, E. H. (2016). The transcriptional modulator HMGA2 promotes stemness and tumorigenicity in glioblastoma. *Cancer Lett*, 377(1), 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.020>
- Kawauchi, D., Ohno, M., Honda-Kitahara, M., Miyakita, Y., Takahashi, M., Yanagisawa, S., Tamura, Y., Kikuchi, M., Ichimura, K., & Narita, Y. (2022). The clinical characteristics and outcomes of incidentally discovered glioblastoma. *J Neurooncol*, 156(3), 551-557. <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03931-3>
- Khan, I., Waqas, M., & Shamim, M. S. (2017). Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *J Pak Med Assoc*, 67(5), 816-817. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507382>
- Kim, M. M., Umemura, Y., & Leung, D. (2018). Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *Cancer J*, 24(4), 180-186. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000326>
- Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., Schatzberger, R., & Palti, Y. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res*, 64(9), 3288-3295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0083>
- Kleihues, P., Lantos, P. L., & Magee, P. N. (1976). Chemical carcinogenesis in the nervous system. *Int Rev Exp Pathol*, 15, 153-232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/176123>
- Kolenda, T., Przybyla, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A., & Lamperska, K. M. (2014). The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18(5), 293-301. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.44467>
- Kreth, S., Heyn, J., Grau, S., Kretschmar, H. A., Egensperger, R., & Kreth, F. W. (2010). Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol*, 12(6), 570-579. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop072>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Labussiere, M., Idbaih, A., Wang, X. W., Marie, Y., Boisselier, B., Falet, C., Paris, S., Laffaire, J., Carpentier, C., Criniere, E., Ducray, F., El Hallani, S., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J. Y., & Sanson, M. (2010). All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*, 74(23), 1886-1890. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e1cf3a>
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, 95(2), 190-198. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>

- Lahmar, Q., Keirsse, J., Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., & Van Ginderachter, J. A. (2016). Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, *1865*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.009>
- Landry, A. P., Balas, M., Alli, S., Spears, J., & Zador, Z. (2020). Distinct regional ontogeny and activation of tumor associated macrophages in human glioblastoma. *Sci Rep*, *10*(1), 19542. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76657-3>
- Law, M., Cha, S., Knopp, E. A., Johnson, G., Arnett, J., & Litt, A. W. (2002). High-grade gliomas and solitary metastases: differentiation by using perfusion and proton spectroscopic MR imaging. *Radiology*, *222*(3), 715-721. <https://doi.org/10.1148/radiol.2223010558>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*, *80*, 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
- Lehn, D. A., Elton, T. S., Johnson, K. R., & Reeves, R. (1988). A conformational study of the sequence specific binding of HMG-I (Y) with the bovine interleukin-2 cDNA. *Biochem Int*, *16*(5), 963-971. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262346>
- Lewis, R. T., Andreucci, A., & Nikolajczyk, B. S. (2001). PU.1-mediated transcription is enhanced by HMG-I(Y)-dependent structural mechanisms. *J Biol Chem*, *276*(12), 9550-9557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008726200>
- Li, P., Qian, R., Niu, C., & Fu, X. (2017). Impact of intraoperative MRI-guided resection on resection and survival in patient with gliomas: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin*, *33*(4), 621-630. <https://doi.org/10.1080/03007995.2016.1275935>
- Liu, B., Pang, B., Hou, X., Fan, H., Liang, N., Zheng, S., Feng, B., Liu, W., Guo, H., Xu, S., & Pang, Q. (2014). Expression of high-mobility group AT-hook protein 2 and its prognostic significance in malignant gliomas. *Hum Pathol*, *45*(8), 1752-1758. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.02.028>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, *131*(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, *23*(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lu, V. M., Jue, T. R., McDonald, K. L., & Rovin, R. A. (2018). The Survival Effect of Repeat Surgery at Glioblastoma Recurrence and its Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg*, *115*, 453-459 e453. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.016>
- Lund, T., Holtlund, J., Fredriksen, M., & Laland, S. G. (1983). On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett*, *152*(2), 163-167. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80370-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80370-6)
- Ma, J., Chen, C. C., & Li, M. (2021). Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, *22*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115775>
- Ma, S., Fu, T., Zhao, S., & Gao, M. (2019). MicroRNA-34a-5p suppresses tumorigenesis and progression of glioma and potentiates Temozolomide-induced cytotoxicity

- for glioma cells by targeting HMGA2. *Eur J Pharmacol*, 852, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.005>
- Ma, X., Li, C., Sun, L., Huang, D., Li, T., He, X., Wu, G., Yang, Z., Zhong, X., Song, L., Gao, P., & Zhang, H. (2014). Lin28/let-7 axis regulates aerobic glycolysis and cancer progression via PDK1. *Nat Commun*, 5, 5212. <https://doi.org/10.1038/ncomms6212>
- Malmer, B., Iselius, L., Holmberg, E., Collins, A., Henriksson, R., & Gronberg, H. (2001). Genetic epidemiology of glioma. *Br J Cancer*, 84(3), 429-434. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1612>
- Mansoori, B., Duijf, P. H. G., Mohammadi, A., Najafi, S., Roshani, E., Shanebandi, D., Hajiasgharzadeh, K., Shirjang, S., Ditzel, H. J., Kazemi, T., Mokhtarzadeh, A., Gjerstorff, M. F., & Baradaran, B. (2020). Overexpression of HMGA2 in breast cancer promotes cell proliferation, migration, invasion and stemness. *Expert Opin Ther Targets*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1736559>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Ditzel, H. J., Duijf, P. H. G., Khaze, V., Gjerstorff, M. F., & Baradaran, B. (2021). HMGA2 as a Critical Regulator in Cancer Development. *Genes (Basel)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/genes12020269>
- Mansouri, A., Hachem, L. D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N. J., Xia, D., Lindeman, N. I., Wen, P. Y., Chakravarti, A., Mehta, M. P., Hegi, M. E., Stupp, R., Aldape, K. D., & Zadeh, G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol*, 21(2), 167-178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>
- Mao, X. G., Hutt-Cabezas, M., Orr, B. A., Weingart, M., Taylor, I., Rajan, A. K., Odia, Y., Kahlert, U., Maciaczyk, J., Nikkhah, G., Eberhart, C. G., & Raabe, E. H. (2013). LIN28A facilitates the transformation of human neural stem cells and promotes glioblastoma tumorigenesis through a pro-invasive genetic program. *Oncotarget*, 4(7), 1050-1064. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1131>
- Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K., Watanabe, M., Hibi, T., & Kitajima, M. (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett*, 151(1), 87-95. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00424-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00424-3)
- Meyer, B., Loeschke, S., Schultze, A., Weigel, T., Sandkamp, M., Goldmann, T., Vollmer, E., & Bullerdiek, J. (2007). HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*, 46(7), 503-511. <https://doi.org/10.1002/mc.20235>
- Miyazawa, J., Mitoro, A., Kawashiri, S., Chada, K. K., & Imai, K. (2004). Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res*, 64(6), 2024-2029. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-1855>
- Moliterno, J. A., Patel, T. R., & Piepmeier, J. M. (2012). Neurosurgical approach. *Cancer J*, 18(1), 20-25. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3183243f6e3>
- Morishita, A., Zaidi, M. R., Mitoro, A., Sankarasharma, D., Szabolcs, M., Okada, Y., D'Armiento, J., & Chada, K. (2013). HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer Res*, 73(14), 4289-4299. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3848>
- Morisse, M. C., Etienne-Selloum, N., Bello-Roufai, D., Blonski, M., Taillandier, L., Lorgis, V., Noel, G., Ahle, G., Duran-Pena, A., Boone, M., & Chauffert, B. (2019). Long-term survival in patients with recurrent glioblastoma treated with

- bevacizumab: a multicentric retrospective study. *J Neurooncol*, 144(2), 419-426. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03245-5>
- Morris, Z., Whiteley, W. N., Longstreth, W. T., Jr., Weber, F., Lee, Y. C., Tsushima, Y., Alphas, H., Ladd, S. C., Warlow, C., Wardlaw, J. M., & Al-Shahi Salman, R. (2009). Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 339, b3016. <https://doi.org/10.1136/bmj.b3016>
- Motoyama, K., Inoue, H., Nakamura, Y., Uetake, H., Sugihara, K., & Mori, M. (2008). Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res*, 14(8), 2334-2340. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4667>
- Nagpal, S., Ghosn, C., DiSepio, D., Molina, Y., Sutter, M., Klein, E. S., & Chandraratna, R. A. (1999). Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J Biol Chem*, 274(32), 22563-22568. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22563>
- Natarajan, S., Hombach-Klonisch, S., Droge, P., & Klonisch, T. (2013). HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells. *Neoplasia*, 15(3), 263-280. <https://doi.org/10.1593/neo.121988>
- Nelson, J. S., Burchfiel, C. M., Fekedulegn, D., & Andrew, M. E. (2012). Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme: the Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurooncol*, 109(2), 315-321. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0895-3>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109(1), 93-108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170(5), 1445-1453. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>
- Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*, 310(17), 1842-1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*, 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro Oncol*, 24(Suppl 5), v1-v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>
- Patel, B., Taiwo, R., Kim, A. H., & Dunn, G. P. (2020). TERT, a promoter of CNS malignancies. *Neurooncol Adv*, 2(1), vdaa025. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa025>
- Pelloski, C. E., Lin, E., Zhang, L., Yung, W. K., Colman, H., Liu, J. L., Woo, S. Y., Heimberger, A. B., Suki, D., Prados, M., Chang, S., Barker, F. G., 3rd, Fuller, G. N., & Aldape, K. D. (2006). Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 12(13), 3935-3941. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2202>
- Perkins, A., & Liu, G. (2016). Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 93(3), 211-217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26926614>

- Perry, A., & Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*, 134, 71-95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>
- Perry, J. R., Laperriere, N., O'Callaghan, C. J., Brandes, A. A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J. G., Roa, W., Osoba, D., Rossiter, J. P., Sahgal, A., Hirte, H., Laigle-Donadey, F., Franceschi, E., Chinot, O., Golfnopoulos, V., Fariselli, L., . . . Trial, I. (2017). Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med*, 376(11), 1027-1037. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611977>
- Platten, M., Bunse, L., Wick, A., Bunse, T., Le Cornet, L., Harting, I., Sahm, F., Sanghvi, K., Tan, C. L., Poschke, I., Green, E., Justesen, S., Behrens, G. A., Breckwoldt, M. O., Freitag, A., Rother, L. M., Schmitt, A., Schnell, O., Hense, J., . . . Wick, W. (2021). A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature*, 592(7854), 463-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03363-z>
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., Olson, O. C., Quick, M. L., Huse, J. T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C. S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C. W., Sutton, J. C., Holland, E. C., Daniel, D., & Joyce, J. A. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*, 19(10), 1264-1272. <https://doi.org/10.1038/nm.3337>
- Qian, Z. R., Asa, S. L., Siomi, H., Siomi, M. C., Yoshimoto, K., Yamada, S., Wang, E. L., Rahman, M. M., Inoue, H., Itakura, M., Kudo, E., & Sano, T. (2009). Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol*, 22(3), 431-441. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.202>
- Quick-Weller, J., Lescher, S., Forster, M. T., Konczalla, J., Seifert, V., & Senft, C. (2016). Combination of 5-ALA and iMRI in re-resection of recurrent glioblastoma. *Br J Neurosurg*, 30(3), 313-317. <https://doi.org/10.3109/02688697.2015.1119242>
- Rapp, M., Heinzl, A., Galldiks, N., Stoffels, G., Felsberg, J., Ewelt, C., Sabel, M., Steiger, H. J., Reifenberger, G., Beez, T., Coenen, H. H., Floeth, F. W., & Langen, K. J. (2013). Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *J Nucl Med*, 54(2), 229-235. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.109603>
- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*, 277(1-2), 63-81. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00689-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00689-8)
- Reeves, R., & Nissen, M. S. (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem*, 265(15), 8573-8582. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692833>
- Reinhardt, A., Stichel, D., Schrimpf, D., Sahm, F., Korshunov, A., Reuss, D. E., Koelsche, C., Huang, K., Wefers, A. K., Hovestadt, V., Sill, M., Gramatzki, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., Koch, A., Thomale, U. W., Becker, A., Hans, V. H., Prinz, M., . . . Capper, D. (2018). Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. *Acta Neuropathol*, 136(2), 273-291. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1837-8>
- Ricard, D., Idbaih, A., Ducray, F., Lahutte, M., Hoang-Xuan, K., & Delattre, J. Y. (2012). Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 379(9830), 1984-1996. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61346-9)
- Riemenschneider, M. J., & Reifenberger, G. (2009). Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci*, 10(1), 184-212. <https://doi.org/10.3390/ijms10010184>

- Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S., & Herold-Mende, C. (2018). When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci*, *19*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020436>
- Saadeh, F. S., Mahfouz, R., & Assi, H. I. (2018). EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *Int J Biol Markers*, *33*(1), 22-32. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000301>
- Sanai, N., & Berger, M. S. (2008). Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*, *62*(4), 753-764; discussion 264-756. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf>
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., & Delattre, J. Y. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*, *27*(25), 4150-4154. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.21.9832>
- Sarria, G. R., Sperk, E., Han, X., Sarria, G. J., Wenz, F., Brehmer, S., Fu, B., Min, S., Zhang, H., Qin, S., Qiu, X., Hanggi, D., Abo-Madyan, Y., Martinez, D., Cabrera, C., & Giordano, F. A. (2020). Intraoperative radiotherapy for glioblastoma: an international pooled analysis. *Radiother Oncol*, *142*, 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.09.023>
- Scaringi, C., De Sanctis, V., Minniti, G., & Enrici, R. M. (2013). Temozolomide-related hematologic toxicity. *Onkologie*, *36*(7-8), 444-449. <https://doi.org/10.1159/000353752>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schueller, P., Micke, O., Palkovic, S., Schroeder, J., Moustakis, C., Bruns, F., Schuck, A., Wassmann, H., & Willich, N. (2005). 12 years' experience with intraoperative radiotherapy (IORT) of malignant gliomas. *Strahlenther Onkol*, *181*(8), 500-506. <https://doi.org/10.1007/s00066-005-1354-2>
- Schwarm, F. P., Uhle, F., Schanzer, A., Acker, T., Stein, M., Reinges, M. H., Weischer, C., Weigand, M. A., Uhl, E., & Kolodziej, M. A. (2016). High-mobility group AT-hook protein 2 expression and its prognostic significance in MGMT methylated and unmethylated glioblastoma. *Int J Oncol*, *48*(4), 1485-1492. <https://doi.org/10.3892/ijco.2016.3397>
- Schwartzbaum, J. A., Xiao, Y., Liu, Y., Tsavachidis, S., Berger, M. S., Bondy, M. L., Chang, J. S., Chang, S. M., Decker, P. A., Ding, B., Hepworth, S. J., Houlston, R. S., Hosking, F. J., Jenkins, R. B., Kosel, M. L., McCoy, L. S., McKinney, P. A., Muir, K., Patoka, J. S., . . . Wrensch, M. R. (2010). Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis*, *31*(10), 1770-1777. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq152>
- Sciortino, T., Secoli, R., d'Amico, E., Moccia, S., Conti Nibali, M., Gay, L., Rossi, M., Pecco, N., Castellano, A., De Momi, E., Fernandes, B., Riva, M., & Bello, L. (2021). Raman Spectroscopy and Machine Learning for IDH Genotyping of Unprocessed Glioma Biopsies. *Cancers (Basel)*, *13*(16). <https://doi.org/10.3390/cancers13164196>
- Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T., & Seifert, V. (2011). Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*, *12*(11), 997-1003. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70196-6)

- Serdar, C. C., Cihan, M., Yucel, D., & Serdar, M. A. (2021). Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Med (Zagreb)*, 31(1), 010502. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.010502>
- Seystahl, K., Hentschel, B., Loew, S., Gramatzki, D., Felsberg, J., Herrlinger, U., Westphal, M., Schackert, G., Thon, N., Tatagiba, M., Pietsch, T., Reifenberger, G., Loffler, M., Wick, W., Weller, M., & German Glioma, N. (2020). Bevacizumab versus alkylating chemotherapy in recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 146(3), 659-670. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03086-9>
- Shah, A. H., Mahavadi, A., Di, L., Sanjurjo, A., Eichberg, D. G., Borowy, V., Figueroa, J., Luther, E., de la Fuente, M. I., Semonche, A., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. (2020). Survival benefit of lobectomy for glioblastoma: moving towards radical supramaximal resection. *J Neurooncol*, 148(3), 501-508. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03541-5>
- Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 576(1-2), 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.021>
- Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 39(6), 741-748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>
- Shirahata, M., Ono, T., Stichel, D., Schrimpf, D., Reuss, D. E., Sahm, F., Koelsche, C., Wefers, A., Reinhardt, A., Huang, K., Sievers, P., Shimizu, H., Nanjo, H., Kobayashi, Y., Miyake, Y., Suzuki, T., Adachi, J. I., Mishima, K., Sasaki, A., . . . von Deimling, A. (2018). Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol*, 136(1), 153-166. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1849-4>
- Shukla, G., Alexander, G. S., Bakas, S., Nikam, R., Talekar, K., Palmer, J. D., & Shi, W. (2017). Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chin Clin Oncol*, 6(4), 40. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.28>
- Smith, J. S., Tachibana, I., Passe, S. M., Huntley, B. K., Borell, T. J., Iturria, N., O'Fallon, J. R., Schaefer, P. L., Scheithauer, B. W., James, C. D., Buckner, J. C., & Jenkins, R. B. (2001). PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*, 93(16), 1246-1256. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.16.1246>
- Sorensen, M. D., & Kristensen, B. W. (2022). Tumour-associated CD204(+) microglia/macrophages accumulate in perivascular and perinecrotic niches and correlate with an interleukin-6-enriched inflammatory profile in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 48(2), e12772. <https://doi.org/10.1111/nan.12772>
- Soto, J. M., Lyon, K. A., & Benardete, E. A. (2018). Glioblastoma multiforme presenting as cryptogenic intracerebral hemorrhage. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 31(4), 516-518. <https://doi.org/10.1080/08998280.2018.1498723>
- Strauss, F., & Varshavsky, A. (1984). A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell*, 37(3), 889-901. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90424-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90424-0)
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H. J., & Group, A. L.-G. S. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7(5), 392-401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)

- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meo, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., . . . Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(23), 2306-2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D. T., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., Hawkins, C., Majewski, J., Jones, C., Costello, J. F., Iavarone, A., Aldape, K., Brennan, C. W., Jabado, N., & Pfister, S. M. (2014). Paediatric and adult glioblastoma: multifactorial (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*, 14(2), 92-107. <https://doi.org/10.1038/nrc3655>
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., & Taniguchi, T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 424(6948), 516-523. <https://doi.org/10.1038/nature01850>
- Tan, E. J., Thuault, S., Caja, L., Carletti, T., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2012). Regulation of transcription factor Twist expression by the DNA architectural protein high mobility group A2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 287(10), 7134-7145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291385>
- Taylor, C. R. (2014). Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice. *Methods Mol Biol*, 1180, 81-109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_5
- Taylor, C. R., & Levenson, R. M. (2006). Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49(4), 411-424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
- Thier, K., Calabek, B., Tinchon, A., Grisold, W., & Oberndorfer, S. (2016). The Last 10 Days of Patients With Glioblastoma: Assessment of Clinical Signs and Symptoms as well as Treatment. *Am J Hosp Palliat Care*, 33(10), 985-988. <https://doi.org/10.1177/1049909115609295>
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S. A., & Orlando, C. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, 309(2), 293-300. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00311-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00311-1)
- Usinskiene, J., Ulyte, A., Bjornerud, A., Venius, J., Katsaros, V. K., Rynkeviciene, R., Letautiene, S., Norkus, D., Suziedelis, K., Rocka, S., Usinskas, A., & Aleknavicius, E. (2016). Optimal differentiation of high- and low-grade glioma and metastasis: a meta-analysis of perfusion, diffusion, and spectroscopy metrics. *Neuroradiology*, 58(4), 339-350. <https://doi.org/10.1007/s00234-016-1642-9>
- Valentinis, L., Tuniz, F., Valent, F., Mucchiut, M., Little, D., Skrap, M., Bergonzi, P., & Zanchin, G. (2010). Headache attributed to intracranial tumours: a prospective

- cohort study. *Cephalalgia*, 30(4), 389-398. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2009.01970.x>
- Vaquero, J., Martinez, R., & Manrique, M. (2000). Stereotactic biopsy for brain tumors: is it always necessary? *Surg Neurol*, 53(5), 432-437; discussion 437-438. [https://doi.org/10.1016/s0090-3019\(00\)00213-5](https://doi.org/10.1016/s0090-3019(00)00213-5)
- Walbert, T., & Khan, M. (2014). End-of-life symptoms and care in patients with primary malignant brain tumors: a systematic literature review. *J Neurooncol*, 117(2), 217-224. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1393-6>
- Walker, M. D., Alexander, E., Jr., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H. A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C. B., Gehan, E. A., & Strike, T. A. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, 49(3), 333-343. <https://doi.org/10.3171/jns.1978.49.3.0333>
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., & Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-367. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.331>
- Wang, T., Wang, G., Hao, D., Liu, X., Wang, D., Ning, N., & Li, X. (2015). Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Mol Cancer*, 14, 125. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0402-5>
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, 6(3), 217-223; discussion 223-214. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00848.x>
- Weller, M., & Le Rhun, E. (2020). How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat Rev*, 87, 102029. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102029>
- Weller, M., Stupp, R., Hegi, M. E., van den Bent, M., Tonn, J. C., Sanson, M., Wick, W., & Reifenberger, G. (2012). Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*, 14 Suppl 4(Suppl 4), iv100-108. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos206>
- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Le Rhun, E., Balana, C., Chinot, O., Bendszus, M., Reijneveld, J. C., Dhermain, F., French, P., Marosi, C., Watts, C., Oberg, I., Pilkington, G., Baumert, B. G., . . . European Association for Neuro-Oncology Task Force on, G. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*, 18(6), e315-e329. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8)
- Wells, A. C., Daniels, K. A., Angelou, C. C., Fagerberg, E., Burnside, A. S., Markstein, M., Alfandari, D., Welsh, R. M., Pobezinskaya, E. L., & Pobezinsky, L. A. (2017). Modulation of let-7 miRNAs controls the differentiation of effector CD8 T cells. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.26398>
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A. A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P. M., Stupp, R., Fabbro, M., Le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A.,

- Golfinopoulos, V., . . . van den Bent, M. J. (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med*, 377(20), 1954-1963. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707358>
- Wilhelmsson, U., Eliasson, C., Bjerkvig, R., & Pekny, M. (2003). Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*, 22(22), 3407-3411. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206372>
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 134, 381-397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Xia, Y. Y., Yin, L., Tian, H., Guo, W. J., Jiang, N., Jiang, X. S., Wu, J., Chen, M., Wu, J. Z., & He, X. (2015). HMGA2 is associated with epithelial-mesenchymal transition and can predict poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther*, 8, 169-176. <https://doi.org/10.2147/OTT.S74397>
- Xuan, W., Lesniak, M. S., James, C. D., Heimberger, A. B., & Chen, P. (2021). Context-Dependent Glioblastoma-Macrophage/Microglia Symbiosis and Associated Mechanisms. *Trends Immunol*, 42(4), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.02.004>
- Yadav, P., & Shankar, B. S. (2019). Radio resistance in breast cancer cells is mediated through TGF-beta signalling, hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and cancer stem cells. *Biomed Pharmacother*, 111, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.055>
- Yung, W. K., Albright, R. E., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M. D., Brada, M., Spence, A., Hohl, R. J., Shapiro, W., Glantz, M., Greenberg, H., Selker, R. G., Vick, N. A., Rampling, R., Friedman, H., Phillips, P., Bruner, J., Yue, N., . . . Levin, V. A. (2000). A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer*, 83(5), 588-593. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1316>
- Zhang, S., Mo, Q., & Wang, X. (2019). Oncological role of HMGA2 (Review). *Int J Oncol*, 55(4), 775-788. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4856>
- Zhang, S., Zhang, H., & Yu, L. (2018). HMGA2 promotes glioma invasion and poor prognosis via a long-range chromatin interaction. *Cancer Med*, 7(7), 3226-3239. <https://doi.org/10.1002/cam4.1534>
- Zhao, X. P., Zhang, H., Jiao, J. Y., Tang, D. X., Wu, Y. L., & Pan, C. B. (2016). Overexpression of HMGA2 promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *J Transl Med*, 14, 26. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0777-0>
- Zhong, X., Liu, X., Li, Y., Cheng, M., Wang, W., Tian, K., Mu, L., Zeng, T., Liu, Y., Jiang, X., Yu, L., Gao, L., & Zhou, Y. (2016). HMGA2 sustains self-renewal and invasiveness of glioma-initiating cells. *Oncotarget*, 7(28), 44365-44380. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9744>
- Zhou, J. (2017). *Histochemistry* (Vol. 1). Walter de Gruyter GmbH & Co.KG.
- Zhu, C., Li, J., Cheng, G., Zhou, H., Tao, L., Cai, H., Li, P., Cao, Q., Ju, X., Meng, X., Wang, M., Zhang, Z., Qin, C., Hua, L., Yin, C., & Shao, P. (2013). miR-154 inhibits EMT by targeting HMGA2 in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 379(1-2), 69-75. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1628-4>
- Zhu, W., Carney, K. E., Pigott, V. M., Falgoust, L. M., Clark, P. A., Kuo, J. S., & Sun, D. (2016). Glioma-mediated microglial activation promotes glioma proliferation and migration: roles of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Carcinogenesis*, 37(9), 839-851. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw068>

10 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

11 Rohdaten qPCR und Immunhistochemie

Supplementäre Tabelle mit den Rohdaten der qPCR

ID	HMGA2-1	HMGA2-2	HMGA2-3	Blaktin-1	Blaktin-2	Blaktin-3	Ipo 8-1	Ipo 8-2	Ipo 8-3	Tbp-1	Tbp-2	Tbp-3
Mi170453.1	27,57	27,27	28	25,89	25,84	26,24	27,89	29,71	29,24	31,5	31,75	31,03
Mi170453.2	27,31	27,58	26,84	25,13	26,52	25,29	31,75	32,02	31,86	24,97	25,27	25,21
SD220861.1	36,96	35,94	36,92	28,09	28,29	28,22	35,27	35,99	35,13	35,7	34,04	35,7
SD220861.2	34,71	33,78	33,6	26,4	26,56	26,15	31,45	30,6	30,46	27	26,63	27,15
MJ250958.1	30,77	31,04	30,75	28,18	27,59	28,13	33,81	34,17	37,14	35,85	35,66	35,72
MJ250958.2	28,26	28,19	28,3	26,62	26,29	26,59	34,5	34,28	34,4	35,95	36,14	37
BK230946.1	31,98	31,98	32,18	25,73	25,63	25,72	32,96	33,16	33,48	26,31	26,01	26,05
BK230946.2	29,88	31,15	30,3	27,3	26,96	26,5	31,74	32,03	31,92	34,68	34,24	34,54
TR060862.1	34,2	34,12	34,63	28,93	28,67	28,98	33,61	33,49	33,62	26,37	26,01	27,56
TR060862.2	36,66	35,98	35,98	27,43	28	28,16	34,44	34,37	35	31	31,4	32,16
BS050471.1	31,81	31,9	32,13	27,37	27,23	27,33	32,5	32,01	31,98	31,08	31,08	31,67
BS050471.2	24,56	24,32	23,68	20,99	20,91	21,08	28,34	28,03	28,76	26,3	25,64	26,54
RA250570.1	36,97	37	undetected	29,37	28,99	29,43	37,03	36,72	36,37	36,98	37,06	36,98
RA250570.2	33,17	32,98	32,74	25,27	25,16	25,4	35,13	35,01	35,48	37,02	34,53	34,99
GH211146.1	33,66	33,91	34,21	28,49	28,43	28,99	34,31	34,47	34,02	34,45	34,81	35,71
GH211146.2	36,41	35,5	35,97	29,64	29,68	29,76	36,81	36,74	37	36,93	36,91	36,99
VS250249.1	36	35,77	35,29	36,81	35,22	37,02	37,21	36,5	36,7	37,12	36,66	36,62
VS250249.2	30,14	30,16	30,19	21,75	20,7	20,72	29,64	29,57	29,67	29,99	29,89	30,73
RC161053.1	35,52	36	35,97	26,56	27,63	26,56	37,01	36,67	36,33	36,23	36,3	36,38
RC161053.2	33,15	32,92	32,99	26,81	27,09	25,83	36,22	35,69	35,92	36,6	36,72	36,43
MC220667.1	35,52	35,44	35,65	31,73	30,63	31,82	36,29	37	36,51	36,47	36,47	37,01
MC220667.2	35,55	35,99	35,39	27,9	27,99	28,39	35,37	34,99	35,01	33,99	33,73	33,81
KH060751.1	36,72	36,81	37,07	35,43	35,49	35,51	36,31	36,44	36,99	36,34	36,3	36,39
KH060751.2	31,41	31,51	31,58	25,47	25,88	25,84	31,84	31,24	31,5	34,22	33,49	33,49
JK090646.1	30,22	31,2	30,18	23,42	23,47	22,89	28,92	28,61	28,68	26,56	28,43	27,93
JK090646.2	32,39	32,06	33,87	26,2	26,37	27,39	32,22	32,31	31,84	34,27	33,92	34,27
EK150354.1	32,34	32,19	32,4	28,04	28,02	28,22	34,92	34,95	34,94	33,27	33,3	33,17
EK150354.2	37	36,5	35,71	29,83	29,76	29,73	37,03	36,44	36,41	35,53	35,62	37,03
DB100564.1	27,53	27,6	27,54	28,57	28,92	29,09	32,69	32,36	32,91	34,59	34,99	34,62
DB100564.2	30,57	30,7	30,63	22,15	21,42	22,18	29,26	29,55	29,38	29,3	29,97	29,82
SM140367.1	33,1	33,98	32,81	27,94	28,73	28,87	35,91	36,08	37,02	36,56	37,01	36,31
SM140367.2	29,18	29,34	29,42	23,79	24,97	23,75	32,12	32,03	32,11	32,1	32,29	32,29
SA100965.1	36,9	36,92	36,59	25,78	25,59	25,67	33,09	32,82	32,59	32,1	31,57	31,78
SA100965.2	undetected	36,72	36,48	33,83	33,36	33,68	34,57	34,27	34,21	34,63	34,48	34,63
TM210556.1	33,53	32,95	33,53	26,75	26,38	27	34,06	34,14	33,46	35,33	36,15	35,22
TM210556.2	33,46	34,7	33,73	27,27	27,85	27,38	33,87	34	35,57	35,39	35,2	35,69
DM250464.1	32,75	32,7	32,96	29	28,35	28,56	33,22	33,4	33,02	35,35	36,23	35,6
DM250464.2	33,36	33,72	34,69	29,18	29,53	29,27	35,27	35,77	37	36,16	36,46	36,2
SS310774.1	33,46	33,27	33,38	29,09	29,28	29,64	36,65	36,92	37,04	36,61	36,4	36,96
SS310774.2	35,87	36,28	35,99	27,81	26,69	27,31	33,99	34,74	33,78	34,43	34,25	34,38
WA100964.1	30,27	30,13	30,19	23,91	23,94	24,16	34,87	34,75	34,43	36,44	36,48	36,41
WA100964.2	31,64	31,6	31,7	17,67	17,56	17,87	28,64	28,77	28,93	28,72	28,63	28,75
CM100362.1	34,7	35,26	35,09	25,11	25,42	25,85	32,93	33,37	33,19	32,92	32,68	32,85
CM100362.2	36,33	36,87	36,97	27,16	27,6	27,98	34,98	35,96	35,22	35,13	35,51	35,98
BM200966.1	30,71	30,9	30,18	25,44	25,26	25,92	27,49	26,97	27,05	28,1	27,64	27,66
BM200966.2	33,54	34,23	33,41	26,31	26,3	26,2	36,15	35,38	35,46	36,22	36,17	37,05

Supplementäre Tabelle mit den Rohdaten der IHC

	B-Nummer	Rand	Intensität	Endwert		Mitte	Intensität	Endwert	
CM100362	B694/17 IIR		0,459837536	2	10	B694/17 IM	0,366521139	2	8
WA100964	B317/18 IR		0,438196586	2	8	B317/18 IIM	0,284532186	1	3
SS310774	B1652/17 IR		0,3801465	1	4	B1652/17 IIM	0,332477024	1	3
DM250464	B285/17 IIR		0,614781855	2	12	B285/17 IVM	0,37287163	2	8
TM210556	B1339/16 IISdR		0,248731151	2	4	B1339/16 Iva	0,374036603	2	8
SA100965	B201/18 II		0,475201417	3	15	B201/18 III	0,456598544	2	10
SM140367	B177/18 II		0,408583304	2	8	B177/18 IV	0,216104902	1	2
DB100564	B473/17 IIB		0,419567234	1	4	B473/17 III	0,328746803	1	3
EK150354	B1030/17 IIB		0,229856944	1	2	B1030/17 IIA	0,537541923	2	10
JK090646	B769/17 II		0,369055424	2	8	B769/17 III	0,330997541	2	6
KH060751	B1735/17 IIE		0,471837395	2	8	B1735/17 IIB	0,429568376	1	4
MC220667	B675/18 III		0,219212489	1	2	B675/18 IV	0,199401849	1	2
RC161053	B115/17 IIA		0,370143036	2	8	B115/17 IIB	0,219730229	1	2
VS250249	B205/18 II		0,332908327	2	10	B205/18 III	0,467553334	2	6
GH211146	B529/18 II		0,542364811	3	15	B529/18 III	0,364779685	3	12
RA250570	B438/18a		0,399761561	1	4	B438/18b	0,306826215	2	6
BS050471	B703/18 II		0,472596367	3	15	B703/18 III	0,436647071	1	4
TR060862	B729/18 IIB		0,630340505	3	18	B729/18 III	0,238034876	2	4
BK230946	B841/18 IIA		0,267371447	1	3	B841/18 IID	0,349341067	1	4
MJ250958	B132/17a		0,548068126	2	12	B132/17b	0,411532592	2	8
SD220861	B1318/18 II		0,411030316	2	8	B1318/18 III	0,070058496	1	1
Mi170453	B829/18 II		0,643222117	3	18	B829/18 III	0,233452044	2	4
BM200966	B7/18 IIR		0,343538887	2	6	B7/18 IIM	0,265942671	1	3

12 Publikationsverzeichnis

Publizierte Abstracts:

Overexpression of High-Mobility Group-A 2 (HMGA2) in the Invasive Border Zone of Glioblastoma Correlates with Poor Prognosis

A. Nohman, F.P.Schwarm, M.Stein, Bender M., H. Dohmen, Koch C., E.Uhl, M.A. Kolodziej

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 70. Jahrestagung in Würzburg 2019. Intraoperative Label-Free Tissue Diagnostics using a Stimulated Raman Histology Imaging System with Artificial Intelligence: An Initial Experience

A. Nohman, P. DaoTrong, C. Beynon, C. Jungk, D. Reuss, A. Unterberg, M. Scherer
Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 72. Jahrestagung in Köln 2022.

Astrocytoma, IDH mutant, WHO Grade 4: Impact of Resection and Treatment Outcomes in a Newly Defined Tumor Subtype

Nohman AI, Reuss D, Herold-Mende C, Unterberg A, Jungk C

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 73. Jahrestagung in Stuttgart 2023.

Publizierte Artikel:

Nohman, A. I., Schwarm, F. P., Stein, M., Schänzer, A., Koch, C., Uhl, E., & Kolodziej, M. (2023). Significantly higher expression of high-mobility group AT hook protein 2 (HMGA2) in the border zone of glioblastoma. *Journal of neurosurgical sciences*, 10.23736/S0390-5616.22.05903-3. Advance online publication.

<https://doi.org/10.23736/S0390-5616.22.05903-3>

Nohman, A. I., Ivren, M., Klein, S., Khatamzas, E., Unterberg, A., & Giese, H. (2022). Intracerebral mucormycosis after COVID-19: illustrative cases. *Journal of neurosurgery. Case lessons*, 3(25), CASE21567. <https://doi.org/10.3171/CASE21567>

Neumann, J. O., Schmidt, S., Nohman, A., Jakobs, M., & Unterberg, A. (2023). Routine ICU admission after brain tumor surgery: retrospective validation and critical appraisal of two prediction scores. *Acta neurochirurgica*, 165(6), 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s00701-023-05592-9>

13 Danksagung

Hiermit möchte ich mich außerordentlich herzlich bei Frau Prof. apl. Dr. Malgorzata Kolodziej bedanken. Sie ermöglichte mir diese Doktorarbeit und hat mich ständig unterstützt. Von Beginn an bis zur letzten Korrektur, stand sie mir zur Seite. Daraus entwickelte sich zudem eine Freundschaft und in vielen persönlichen Gesprächen lernte ich worauf es im Beruf des Arztes ankommt.

Außerdem danke ich herzlich Prof. Dr. Uhl, der als Leiter der Klinik für Neurochirurgie ein wichtiger Teil des Projekts war und diese Arbeit ermöglichte. Zudem bedanke ich mich herzlich bei Dr. Hanna Goett, die mich als Wegbegleiterin häufig angespornt, sowie dem ganzen Team der Neurochirurgie des UKGMs in Gießen.

Ein riesen Dankeschön gilt ebenso den überaus freundlichen Mitarbeiterinnen im Forschungslabor der Neurochirurgie Frau Helga Kierock und Inga Dorn, die mich eingearbeitet haben. Endlos viele schöne und interessante Gespräche entstanden über die Jahre. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeiter im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie für die Einarbeitung in die qPCR.

Allen Mitarbeiter im Institut für Neuropathologie Gießen möchte ich ebenso danken. Besonders Frau Dr. Schänzer und Dr. Dohmen möchte ich ausdrücklich danken, da mir bei der Etablierung der Färbung und Auswertung geholfen worden ist.

Ich möchte ebenso meinen Arbeitskollegen in der Klinik für Neurochirurgie in Heidelberg danken. Ich danke besonders Prof. Dr. Unterberg und Prof. Dr. Herold-Mende für das Vertrauen und Unterstützung.

Als bekennender Christ, möchte ich Gott für die Hoffnung, den Frieden und Zuversicht in Mitten der langwierigen Forschungsphasen danken. Außerdem danke ich meiner Familie, die mich jederzeit unterstützt hat. In schwierigen und guten Phasen des Lebens durfte ich auf den motivierenden Beistand meiner Eltern, Geschwister und meiner Lebenspartnerin Hiba zählen.