

Expressionsanalyse von EMT-relevanten Genen bei Glioblastomen

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

vorgelegt von
Thomas, Samuel
aus Frankfurt am Main

Gießen, 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Kolodziej

Gutachter: Prof. Dr. med. T. Acker

Tag der Disputation: 04. September 2024

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS GLIOBLASTOM (GLIOBLASTOMA MULTIFORME, GBM).....	1
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE.....	1
1.1.2	WHO KLASSIFIKATION DES GLIOBLASTOMS	1
1.1.3	HISTOLOGIE UND MOLEKULARE MARKER.....	2
1.1.4	MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS	3
1.1.5	IDH MUTATION	3
1.2	DIAGNOSTIK DES GLIOBLASTOMS.....	5
1.2.1	KLINISCHE PRÄSENTATION.....	5
1.2.2	NEURORADIOLOGISCHE BILDGEBUNG.....	5
1.2.2.1	COMPUTERTOMOGRAFIE.....	5
1.2.2.2	MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE	5
1.2.2.3	FUNKTIONELLE MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE.....	6
1.2.2.4	MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE	6
1.2.2.5	POSITRONENEMISSIONSTOMOGRAFIE	7
1.3	THERAPIE DES GLIOBLASTOMS.....	8
1.3.1	PRÄOPERATIVE UND ALLGEMEINMEDIZINISCHE BEHANDLUNG.....	8
1.3.2	OPERATIVE THERAPIE	8
1.3.3	NACHBEHANDLUNG.....	11
1.3.3.1	CHEMOTHERAPIE.....	11
1.3.3.2	STRAHLENTHERAPIE	13
1.3.4	THERAPIE IM REZIDIVFALL.....	14
1.4	EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION BEI GLIOBLASTOMEN	15
1.4.1	GRUNDLAGEN DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSITION.....	15
1.4.2	EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION IN GLIOZELLEN UND IM RAHMEN DER GLIOMAGENESIS	17
1.4.3	MOLEKULARE MECHANISMEN DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSITION BEI GLIOBLASTOMEN.....	17
1.4.3.1	CDH1/E-CADHERIN UND CDH2/N-CADHERIN	17
1.4.3.2	SNAI1 (SNAIL) UND SLUG (SNAI2).....	18
1.4.3.3	VIMENTIN.....	19
1.4.4	EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION UND THERAPIERESISTENZ SOWIE EMT-INDUKTION DURCH DIE THERAPIE.....	20
1.4.5	THERAPEUTISCHE ANGRIFFSPUNKTE IM RAHMEN DER EPITHELIAL- MESENCHYMALEN TRANSITION	22
1.5	ZIELSETZUNG.....	24

2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV.....	25
2.2	KONTROLLKOLLEKTIV.....	26
2.3	QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASEKETTENREAKTION (Q-RT-PCR) 26	
2.3.1	RNA-ISOLATION.....	26
2.3.1.1	VORBEREITUNGEN	26
2.3.1.2	ABLAUF DER RNA-ISOLATION	26
2.3.1.3	PHOTOMETRISCHE VERMESSUNG DER ISOLIERTEN RNA UND LAGERUNG.....	27
2.3.2	REVERSE TRANSKRIPTION DER RNA IN C-DNA	28
2.3.3	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR MESSUNG	29
2.3.3.1	PRINZIP DER REAL-TIME-PCR	29
2.3.3.2	DÜRFÜHRUNG DER REAL-TIME PCR	31
2.3.3.3	MESSUNGEN IN DER EXPONENTIELLEN PHASE DER REAL-TIME PCR ...	32
2.3.3.4	HOUSEKEEPING-GENE (KONTROLL-/REFERENZ- ODER HAUSHALTSGENE).....	32
2.3.4	AUSWERTUNG DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR	32
2.4	IMMUNHISTOCHEMIE	34
2.4.1	AUFBEREITUNG DES GLIOBLASTOM- UND KONTROLLGEWEBES FÜR PARAFFINSCHNITTE	34
2.4.2	REZEPTE UND ANSÄTZE	34
2.4.3	DÜRFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	35
2.4.4	POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE.....	37
2.4.5	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE.....	37
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV.....	40
3.2	MGMT-EXPRESSION BEI GLIOBLASTOMEN	41
3.3	GENEXPRESSIONSANALYSE AUF RNA-EBENE IM TUMORGEWEBE UND IM GESUNDEN HIRNGEWEBE	42
3.4	PROTEINEXPRESSIONSANALYSE IM TUMORGEWEBE UND IM GESUNDEN HIRNGEWEBE	44
3.5	EXPRESSIONSUNTERSCHIED IN MGMT-METHYLIERTEN UND MGMT-UNMETHYLIERTEN GLIOBLASTOMEN AUF RNA- UND PROTEINEBENE.....	45
3.6	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN	49
3.6.1	SNAIL	49

3.6.1.1	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE.....	50
3.6.1.2	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE.....	51
3.6.1.3	GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE.....	52
3.6.2	SLUG (SNAI2)	53
3.6.2.1	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SLUG-EXPRESSIONS AUF PROTEINEBENE.....	53
3.6.2.2	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SLUG-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	54
3.6.2.3	GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SLUG-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	55
3.6.3	N-CADHERIN	56
3.6.3.1	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN VON DER N-CADHERIN AUF PROTEINEBENE UND IN ABHÄNGIGKEIT DES MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS.....	56
3.6.4	E-CADHERIN	58
3.6.4.1	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	58
3.6.4.2	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	59
3.6.4.3	GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	60
3.6.5	VIMENTIN	61
3.6.5.1	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VIMENTIN_EXPRESSION AUF PROTEINEEBEN.....	61
3.6.5.2	PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER VIMENTIN-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE	62
3.6.5.3	GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER VIMENTIN-EXPRESSIONS AUF PROTEINEBENE	63
4	DISKUSSION	64
4.1	HINTERGRUND.....	64
4.2	ERGEBNISSE DER STUDIE UND EINORDNUNG IN DIE LITERATUR.....	65
4.2.1	MGMT-METHYLIERUNG	65

4.2.2	E- (CDH1) UND N-CADHERIN (CDH2)	65
4.2.3	SNAI1 (SNAIL) UND SLUG (SNAI2)	67
4.2.3.1	SNAI1 (SNAIL).....	67
4.2.3.2	SLUG (SNAI2).....	68
4.2.4	VIMENTIN	70
4.3	AUSBLICK	72
4.4	LIMITATIONEN UND METHODENKRITIK	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	76
6	SUMMARY.....	77
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
8	ANHANG	107
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
8.2	GERÄTE UND MATERIALIEN.....	109
8.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	112
8.4	TABELLENVERZEICHNIS.....	116
8.5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
9	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	120
10	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	121
11	DANKSAGUNG	122
12	LEBENS LAUF	123

1 EINLEITUNG

1.1 DAS GLIOBLASTOM (GLIOBLASTOMA MULTIFORME, GBM)

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene Tumor des Menschen (Jukich, McCarthy, Surawicz, Freels, & Davis, 2001). Die Inzidenz des Glioblastoms liegt zwischen 3,2 und 3,55 pro 100.000/Jahr, wobei die Inzidenz bei Männern um das 1,6-fache höher als bei Frauen ist (Ohgaki & Kleihues, 2005; Ostrom et al., 2013). Glioblastome machen 15,1 % aller primären Hirntumore, 46,1 % aller maligne primären Hirntumore und 55,1 % aller Gliome aus (Ostrom et al., 2013).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren, der Erkrankungsgipfel mit der höchsten Inzidenz liegt zwischen 75 und 84 Lebensjahr.

Durch die Darstellung eines medianen Überlebens ohne Therapie von 42,4 % nach sechs Monaten, 17,7 % nach einem Jahr sowie 3,3 % nach zwei Jahren wird verdeutlicht, dass Glioblastome tödlich verlaufen, sodass Patienten älter als 80 Jahre im Durchschnitt lediglich 1,6 Monate überleben (Ohgaki & Kleihues, 2005).

Eine komplette Resektion des T1-contrast-enhancing Tumolvolumens führt zu einer medianen Überlebenszeit von 15,2 Monaten. Dies ist signifikant länger als bei Patienten ohne vollständige Resektion (9,8 Monate) (Y. M. Li, Suki, Hess, & Sawaya, 2016). Trotz Ausschöpfung aller Therapieoptionen liegt die durchschnittliche Überlebenszeit nur bei 14,9 Monaten (Paravati et al., 2011).

1.1.2 WHO KLASSIFIKATION DES GLIOBLASTOMS

Die WHO-Klassifikation unterteilt die ZNS-Tumore histologisch in vier Grade, wodurch eine Vorhersage über die Prognose und die Ansprechrate der Tumore auf diverse therapeutische Verfahren ermöglicht werden kann (Weller et al., 2003).

Gliome Grad 1 haben ein niedriges proliferatives Potential und es besteht die Möglichkeit einzig durch eine chirurgische Resektion den Patienten zu heilen. Gliome Grad 2 sind auch durch ein niedriges proliferatives Potential und durch hohe Differenzierung gekennzeichnet, sie wachsen aber infiltrativ und können in hochgradigere Tumorentitäten transformieren. Gliome des WHO Grad 3 zeigen maligne histologische Zeichen wie

Zellkernatypien und erhöhte mitotische Aktivität. WHO Grad 4 Gliome zeigt nukleäre Atypien, eine erhöhte Mitoserate, eine Hyperzellularität, Nekroseherde, eine Infiltration in das umgebende Gewebe und eine schlechte Prognose (Burger, Vogel, Green, & Strike, 1985; Louis et al., 2007). WHO Grad IV Gliome werden durch die neueste Leitlinie in 1. Glioblastome, IDH-Wildtyp, 2. IDH-mutierte Astrozytome, WHO Grad 4, 3. Histon H3 K27M-mutierte diffuse Mittelliniengliome und 4. Histon H3 K27M-mutierte hemisphärische diffuse Gliome unterteilt (Wick W et al., 2021).

1.1.3 HISTOLOGIE UND MOLEKULARE MARKER

Histologisch wirkt das Präparat des Glioblastoma muliforme bunt und zeigt nukleäre Atypien, eine erhöhte Mitoserate, eine Hyperzellularität und Nekroseherde. Zudem erscheinen die Zellkerne in der histologischen Untersuchung pleomorph und hyperchromatisch. Um die Nekroseherde wird häufig ein pallisadenartiger Tumorsaum festgestellt, der selbst von infiltrativem Tumorgewebe umgeben ist. Des Weiteren fällt eine starke vaskulär-endotheliale Proliferation auf, wobei die Tumorgefäße eine gesteigerte Thrombosierungsneigung aufweisen. Zudem können kleine anaplastische Zellen sowie mehrkernige Riesenzellen vorhanden sein. Diese histologischen Pathologie neben gesundem Gewebe sind für das heterogen-bunte Bild des Glioblastoms verantwortlich (Burger, 1983; Burger et al., 1985).

Das Glioblastom imponiert vor allem durch das hohe Ausmaß an Invasion von neoplastischen Zellen in das gesunde Hirngewebe. Transformierte Gliazellen können durch spezifische CD44-positive Adhäsionsrezeptoren entlang der extrazellulären Matrix wandern und auch an dieser binden. Durch diese Eigenschaften wird den neoplastischen Zellen die Migration entlang von Nervenfasern, die Überschreitung auf die gegenüberliegende Hemisphäre (Schmetterlingsgliom) und die kontinuierliche Verschiebung der Tumorgrenzen ermöglicht (Bellail, Hunter, Brat, Tan, & Van Meir, 2004).

Bei Glioblastomen, IDH-Wildtyp, WHO Grad 4 liegen keine IDH- oder Histon-H3-Mutationen vor. Bei diffuse Astrozytome, IDH- und Histon-H3-Wildtyp ohne pathologische Gefäßproliferationen oder Nekrosen müssen mehrere genetische Veränderungen, wie eine Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptorgens (EGFR), die Promotormutationen des Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT)-Gens

und/oder ein Gewinn von Chromosom 7 kombiniert mit einem Verlust des Chromosoms 10 (+7/-10), analysiert werden (Brat et al., 2018). Beim Vorliegen einer dieser Veränderungen werden die Tumore auch bei fehlender mikrovaskulärer Proliferation und Nekrosen als Glioblastome, IDH-Wildtyp, WHO-Grad 4 kategorisiert (Louis et al., 2020; Tesileanu et al., 2020).

1.1.4 MGMT-(O-6-METHYLGUANIN-DNA-METHYLTRANSFERASE)-METHYLIERUNGSSTATUS

Die Funktion bzw. die Aktivität der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein entscheidender prognostischer Faktor für die Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika wie Temozolomid (Lechapt-Zalcman et al., 2012). Dieses Enzym entfernt Methylgruppen an der O-6-Position von Guanin, einem wichtigen Angriffspunkt für alkylierende Chemotherapeutika. Die Funktion der MGMT kann durch Hypermethylierung der MGMT-Promoterregion in Hirntumoren inklusive der Glioblastome und in anderen extrakraniellen Neoplasien unterdrückt werden (Esteller, Hamilton, Burger, Baylin, & Herman, 1999). Die Methylierung der Promotorregion führt zu einem längeren durchschnittlichen Überleben der Glioblastom-Patienten (H. Zhao, Wang, Song, Zha, & Li, 2016). Patienten mit der Methylierung der MGMT-Promotorregion überleben durchschnittlich 18,2 Monate im Gegensatz zu 12,2 Monaten ohne die Methylierung. Dieses verlängerte Überleben ist auf die erweiterte Temozolomid-Wirkung bei MGMT-methylierten Tumoren zurückzuführen (Roger Stupp et al., 2009). Patienten mit Glioblastomen, die keine methylierte MGMT-Promotorregion aufweisen, haben nur einen geringen oder keinen Vorteil durch eine Temozolomid-Therapie. Patienten mit einem positiven Methylierungsstatus zeigen ein progressionsfreies Überleben von 10,3 Monaten nach Temozolomid-Chemotherapie und Bestrahlung im Vergleich zu 5,3 Monaten durchschnittliches, progressionsfreies Überleben bei negativen Status (Hegi et al., 2004, 2005).

1.1.5 IDH (ISOCITRAT DEHYDROGENASE) MUTATION

Die Isocitrat Dehydrogenase-1 katalysiert die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NAPH) abhängige oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat, wodurch

die Zellen vor oxidativen Stress geschützt werden (Gabriel, Zervos, & Plaut, 1986; Reitman & Yan, 2010). Durch eine Mutation im IDH1-Gen kommt es zu einer Akkumulation des Onkometaboliten D2-Hydroxyglutarat, welches die Entstehung und maligne Progression von glialen Hirntumoren fördert (Dang et al., 2009; Garber, 2010). Patienten mit nachgewiesener Mutation im IDH1-Gen zeigten ein verlängertes Gesamtüberleben. Dies wird daher bei an Glioblastom erkrankten Patienten als prognostisch günstiger Marker angesehen (Parsons et al., 2008; H. Yan et al., 2009). Da sich Glioblastome, IDH-Wildtyp biologisch und auch klinisch von IDH-mutierten astrozytären Gliomen des WHO-Grads 4 unterscheiden, wird der Begriff „Glioblastom“ für diese Tumore nicht länger verwendet (Brat et al., 2020). Die homozygote CDKN2A/B-Deletion wird neben des histologischen Merkmalen als molekularer Marker für den WHO-Grad IV bei IDH-mutierten Astrozytomen festgelegt (Brat et al., 2020).

1.2 DIAGNOSTIK DES GLIOBLASTOMS

1.2.1 KLINISCHE PRÄSENTATION

Ein primärer Hirntumor kann sich durch verschiedenste Symptome äußern, sowohl durch fokalneurologische als auch durch generalisierte Beschwerden. Die häufigsten Symptome sind Kopfschmerzen (56 %), Gedächtnisverlust (35 %), kognitive Veränderungen (34 %), motorische und sprachliche Defizite (33 %; 32 %), Krampfanfälle (32 %), visuelle Einschränkungen (22 %), Bewusstseinsveränderungen (16 %) sowie Übelkeit und Erbrechen (13 %). Die Symptomatik ist dabei abhängig von der Lokalisation des Tumors im Gehirn (Chandana, Movva, Arora, & Singh, 2008; Chang et al., 2005). Durch zunehmende radiologische Bildgebung im Rahmen von zerebralen Abklärungen bei Kopfschmerzen, Synkopen oder Schwindel steigt die Zahl der Gliom-Zufallsbefunde (Lund-Johansen, 2013).

1.2.2 NEURORADIOLOGISCHE BILDGEBUNG

1.2.2.1 COMPUTERTOMOGRAFIE

Bei akuter zerebraler Symptomatik erhalten Patienten meist initial eine kraniale Computertomografie. Hier zeigen sich erste tumorverdächtige Läsionen in der nativen Computertomografie iso- bis hypodens mit einer zentralen Hypodensität. Bei zusätzlicher Gabe von Kontrastmittel lässt sich meist ein kräftiger und ringförmiger Randbereich erkennen (AG Osborn, KL Salzman, G Katzman, J Provenzale, M Castillo, G Hedlund, A Illner, HR Harnsberger, J Cooper, BV Jones, B Hamilton Amirsys, UT, 2010).

1.2.2.2 MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE

Die kraniale Magnetresonanztomografie (cMRT) mit oder ohne Kontrastmittel werden für die Erstdiagnose als auch Folgeuntersuchung der Hirntumore verwendet (Jacobs et al., 2005). Die cMRT-Bildgebung ist dabei der Goldstandard (Rees, 2003). Die MRT detektiert mit hoher Sensitivität Hirntumore und zeigt außerdem sekundäre Zeichen des Tumors wie raumfordernde Wirkung, Ödeme, Blutungen, Nekrosen und Hirndruckzeichen. Die meisten Hirntumore präsentieren sich in T1-gewichteten MRT-Aufnahmen hypointens und in der FLAIR-*(fluid-attenuated inversion recovery)*, T2- und Protein-gewichteten MRT-Aufnahmen hyperintens. Glioblastome weisen bezüglich der

Destruktion der Blut-Hirn-Schranke eine randständige Kontrastmittelaufnahme sowie ein zentrales hypointenses Nekroseareal in T1-gewichteten MRT-Aufnahmen auf (Jacobs et al., 2005). Diffusions-gewichtete Aufnahmen ermöglichen über eine Messung des *apparent diffusion coefficient* (ADC) im Vergleich zu anderen MRT-Wichtungen eine bessere Darstellung der Tumordinfiltration in das umgebende Gewebe (Provenzale, McGraw, Mhatre, Guo, & Delong, 2004).

Anhand von MRT-Aufnahmen in drei Ebenen können die Tumorgröße, die Tumorausdehnung, die Lokalisation und die oben beschriebenen sekundären Tumorzeichen beurteilt werden. Auf der Grundlage der MRT kann die Diagnose gestellt, die Operation geplant, der postoperative Befund und Verlauf bewertet werden. Um eine objektive Beurteilung der Verlaufsuntersuchungen zu gewährleisten, wurden einheitliche Beurteilungskriterien, sogenannte RANO-Kriterien (*Response Assessment in Neuro-Oncology*), aufgestellt (Macdonald, Cascino, Schold, & Cairncross, 1990; Wen et al., 2010).

1.2.2.3 FUNKTIONELLE MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE

Tumore, die in der Nähe von eloquenten Arealen lokalisiert sind, können präoperativ durch eine funktionelle Magnetresonanztomografie (fMRT) untersucht werden (Fried, Nenov, Ojemann, & Woods, 1995; Hamilton et al., 1997; Herholz et al., 1997). Der postoperative Funktionsverlust reduziert sich, wenn zwischen dem, durch die fMRT aufgezeigtem, funktionell relevanten Kortexareale und dem Tumor ein Abstand größer als 10 mm liegt (Haberg, Kvistad, Unsgard, & Haraldseth, 2004).

1.2.2.4 MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE

Um weitere Informationen über die Stoffwechselaktivität und über molekulare Tumormarker zu erhalten, wird eine Magnetresonanzspektroskopie (MRS) und Positronenemissionstomografie (PET) durchgeführt.

Die MRS zeigt Gewebemetabolite N-Acetylaspartate (NAA), Kreatine, Choline und Laktat (Meyerand, Pipas, Mamourian, Tosteson, & Dunn, 1999). Der Anstieg von cholin-haltigen Verbindungen und von NAA korreliert mit der Tumordinfiltration (Croteau et al., 2001). Das Vorhandensein von Kreatinen ermöglicht die Unterscheidung zwischen Gliomen und Metastasen. Metastasen zeigen keinen Kreatin-Peak, wohingegen Gliome einen Kreatin-Peak aufweisen (Ishimaru et al., 2001). Durch die MRS kann in bis zu 90

% der Fälle richtig zwischen niedriggradigen und hochgradigen Gliomen, Meningeomen, Metastasen, Nekrose und gesundem Gewebe unterschieden werden (De Edelenyi et al., 2000).

1.2.2.5 POSITRONENEMISSIONSTOMOGRAFIE

Die Positronenemissionstomografie (PET) ist eine molekulare Bildgebungstechnik, bei der radioaktiv-markierte Moleküle genutzt werden, um den molekularen Metabolismus in vivo darzustellen (Phelps, 2000; Sokoloff et al., 1977). Die PET mit dem Radiotracer (18F)-fluoro-2-deoxy-D-Glucose ((18F)-FDG) zeigt die Glucoseaufnahme und damit den Glucoseverbrauch an und erlaubt so eine Unterscheidung zwischen normalem Hirngewebe, niedriggradigen und hochgradigen Gliomen und Nekrosen (Heiss et al., 1990; Herholz et al., 1993). Eine erhöhte Glucoseaufnahme korreliert mit dem Patientenüberleben, dem histologischen Tumorstadium und der Zelldichte (Kaschten et al., 1998; Patronas et al., 1985). Um eine Differenzierung zwischen niedriggradigen und hochgradigen Gliomen zu erreichen, wird die Glucoseaufnahme im Bereich des Tumors mit der Glucoseaufnahme der weißen Substanz und des Kortex verglichen. Sobald die Tumor-weiße-Substanz-Ratio ($T/WM = tumor-to-white-matter$) größer als 1,5 ist, deutet dies mit einer Sensitivität von 94 % und einer Spezifität von 77 % auf einen hochgradigen Tumor hin (Delbeke et al., 1995).

Radioaktiv-markierte Aminosäuren wie Methyl-(11C)-L-Methionin ((11C) MET) sind aufgrund von niedrigeren (11C) MET-Werten im umgebenden gesunden Hirngewebe sensitivere Tracer für die Tumordetektion und Tumorklassifikation (J.-K. Chung et al., 2002; Herholz et al., 1998). Eine PET mit (11C)MET und (18F)-FDG zeigt bei hochgradigen Gliomen (WHO III°/IV°) eine erhöhte Aufnahme von beiden Tracern (Goldman et al., 1997).

1.3 THERAPIE DES GLIOBLASTOMS

Die Standardbehandlung von Glioblastom-Patienten beinhaltet die chirurgische Resektion, die Strahlentherapie sowie die konkomitante und adjuvante Chemotherapie (Rasul & Watts, 2015; Roger Stupp et al., 2009; Weller et al., 2014).

1.3.1 PRÄOPERATIVE UND ALLGEMEINMEDIZINISCHE BEHANDLUNG

Um der raumfordernden Wirkung und dem möglicherweise erhöhten intrazerebralen Druck des tumor-assoziierten Ödems entgegenzuwirken und so mögliche neurologische Symptome zu verbessern, beinhaltet die präoperative Behandlung die Gabe von Kortikosteroiden (Kaal & Vecht, 2004; Koehler, 1995; R. Stupp, Brada, van den Bent, Tonn, & Pentheroudakis, 2014; Wick & Kuker, 2004). Kortikosteroide haben in der Behandlung von tumor-assoziierten Ödemen eine große Bedeutung, jedoch verursachen sie eine Reihe von Nebenwirkungen (Koehler, 1995; Kostaras, Cusano, Kline, Roa, & Easaw, 2014; Wen et al., 2006).

Eine antiepileptische Behandlung ist erforderlich, wenn sich der Patient mit epileptischen Krampfanfällen vorgestellt hat (R. Stupp et al., 2014). Patienten mit Gliomen, die keinen symptomatischen epileptischen Anfall hatten, benötigen keine prophylaktische antikonvulsive Therapie (Tremont-Lukats, Ratilal, Armstrong, & Gilbert, 2008).

Neben zuvor beschriebenen Maßnahmen kann die allgemein-medizinische Therapie durch eine antidepressive und eine antikoagulative Therapie ergänzt werden (Lee et al., 2003; Litofsky et al., 2004).

1.3.2 OPERATIVE THERAPIE

Die therapeutische Intervention von neu diagnostizierten Glioblastom-Patienten beinhaltet zuerst die chirurgische Resektion. Denn die Operation ermöglicht sowohl die Sicherung der histopathologischen Diagnose als auch eine Zytoreduktion (Rasul & Watts, 2015; Watts & Sanai, 2016; Wilson, Karajannis, & Harter, 2014).

Stupp et al. und Weller et al. beschreiben, dass eine maximale Zytoreduktion, ohne neurologische Defizite zu verursachen, anzustreben ist (R. Stupp et al., 2014; Weller et

al., 2014). Das progressionsfreie Überleben (PFS engl. für *progression free survival*) und das Gesamtüberleben (OS engl. für *overall survival*) sind signifikant höher bei der Durchführung einer *gross total resection* (GTR) verglichen mit der partiellen Resektion und der Biopsie (Lacroix et al., 2001; Nitta & Sato, 1995; Sanai, Polley, McDermott, Parsa, & Berger, 2011; Ushio, Kochi, Hamada, Kai, & Nakamura, 2005). Ringel et. al. zeigten, dass das Ausmaß der Resektion auch bei Patienten mit Rezidiv-Glioblastomen die Überlebenszeit beeinflusst. Hierbei überlebten Patienten mit einer *gross total resection* länger als Patienten mit einer partiellen Resektion (Ringel et al., 2016).

Um eine maximale Zytoreduktion zu erreichen, ohne neurologische Defizite zu verursachen, bedient man sich ergänzenden Hilfsmitteln. Um das Tumorgewebe besser von gesundem Gehirngewebe zu unterscheiden, werden die Fluoreszenz-gestützte Chirurgie, der intraoperative Ultraschall und die intraoperative MRT genutzt. Fluoreszenz-gestützte Chirurgie ist eine intraoperative Technik bei der Behandlung von *High-grad*-Gliomen. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA engl. für *5-aminolevulinic acid*) ist eine nicht fluoreszierende Aminosäure, welche in der Synthese des Häm-Moleküls vorkommt. Eine orale Gabe von 5-ALA verursacht allerdings eine Ansammlung von fluoreszierendem Protoporphyrin in hochgradigen Gliomen und ermöglicht so die intraoperative Abgrenzung zwischen Tumor- und gesundem Hirngewebe (Watts & Sanai, 2016). Stummer et al. zeigten in ihrer Studie die Vorteile der 5-ALA-Verwendung: 65 % der Patienten aus der 5-ALA-Gruppe erhielten eine komplette Resektion des Kontrastmittel-aufnehmenden Tumorbereichs im Gegensatz zu 35 % ohne Verwendung von 5-ALA. Des Weiteren verlängert die Verwendung von 5-ALA das progressionsfreie Überleben (Eljamel, Goodman, & Moseley, 2008; Stummer et al., 2006).

Zusätzlich für die intraoperative Darstellung des Tumors ist die hochfrequente 3D-Ultraschalluntersuchung (Unsgard, Solheim, Lindseth, & Selbekk, 2011). Der intraoperative Ultraschall (iUS) liefert Echtzeit-Informationen über die Lokalisation, die vaskuläre Beziehung und die anliegenden Strukturen von Gehirntumoren (Moiyadi & Shetty, 2011; Solheim, Selbekk, Jakola, & Unsgård, 2010). Die intraoperative MRT (ioMRT) verbessert die chirurgische Genauigkeit durch Anpassung der Neuronavigation während der Operation. Patienten mit einer intraoperativen MRT zeigen eine signifikant höhere Rate an kompletter Tumorresektion als Patienten ohne ioMRT, was auch mit einem erhöhten progressionsfreien Überleben einhergeht (Kubben et al., 2011; Senft et al., 2011).

Bei neurochirurgischen Operationen in räumlicher Nähe zu eloquenten Hirnarealen werden weitere intraoperative Verfahren wie die intraoperative multimodale Neuronavigation und die direkte elektrische Stimulation verwendet. Durch die Neuronavigation werden präoperative MRT-Bilder mit einem *tracked pointer* synchronisiert und so die Tumorlokalisation und die Tumorgrenzen intraoperativ visualisiert. Die multimodale (funktionelle) Neuronavigation ermöglicht eine Kombination von mehreren präoperativen Bildgebungen, wie MRT, CT, funktionelle MRT (fMRT) und Diffusions-Tensor-MRT (DT-MRI engl. für *diffusion tensor magnetic resonance imaging*), mit intraoperativen Echtzeit-Informationen, die man durch eine intraoperative MRT, Ultraschall-Untersuchungen und durch direkte elektrische Stimulation (DES) erhält (Wolbers, 2014). Durch die Kombination aus fMRT und DT-MRI können eloquente kortikale Bereiche und der Verlauf von subkortikalen Nervenbahnen, die möglicherweise durch den Tumor verschoben wurden, dargestellt werden und erlauben dadurch eine sichere funktionelle Resektion von Hirntumoren in eloquenten kortikalen und subkortikalen Arealen (Gonzalez-Darder et al., 2010; Schonberg, Pianka, Hendler, Pasternak, & Assaf, 2006). Die intraoperative direkte elektrische Stimulation ist eine Methode des funktionellen *Mappings*, welche die Identifikation und Aufrechterhaltung von essenziellen Bahnen für Motorik, Sensibilität und Sprache sowohl kortikal als auch subkortikal ermöglicht. Diese Technik minimiert so die postoperativen neurologischen Defizite und verbessert die Qualität der Resektion (De Witt Hamer, Robles, Zwinderman, Duffau, & Berger, 2012; Duffau et al., 1999; Krieg et al., 2013). De Witt Hamer et al. zeigten, dass schwere neurologische Defizite bei Patienten, die ein *intraoperative stimulation mapping* während der Operation erhalten haben, seltener auftreten im Vergleich zu Patienten ohne *intraoperative stimulation mapping* (3,4 % vs. 8,2 %). Der Prozentsatz von neuroradiologisch bestätigten *gross total resections* war mit der Verwendung von *intraoperative stimulation mapping* größer als ohne *intraoperative stimulation mapping* (75 % vs. 58 %) (De Witt Hamer et al., 2012).

Ist eine mikrochirurgische Resektion nicht möglich, da der Tumor in einem eloquenten Areal liegt oder der Zustand des Patienten es nicht zulässt, wird nur eine stereotaktische Biopsie zur histopathologischen Diagnosesicherung durchgeführt (Rasul & Watts, 2015; Watts & Sanai, 2016).

Im Rezidivfall kann eine Re-Operation erfolgen. Allerdings ist der Nutzen einer Re-Operation bei Rezidiv-Glioblastomen umstritten (Franceschi et al., 2015; Guyotat et al., 2000; Ringel et al., 2016). Guyotat et al. berichten sowohl von einer längeren medianen

Überlebenszeit (5 Monate vs. 2 Monate) als auch von einer Verlängerung der Zeit nach der Feststellung des Rezidivs mit einem Karnofski Performance Status ≥ 60 (4 Monate vs. 1 Monat) durch eine Re-Operation im Vergleich zu keiner Re-Operation (Guyotat et al., 2000). Im Gegensatz dazu berichtet Franceschi et al. von keinem signifikanten Vorteil der Re-Operation (Franceschi et al., 2015).

Bei Patienten mit großen oder multifokalen Läsionen, niedrigem Karnofsky Performance Status und/oder aufgrund des Patientenwunsches kann der Schwerpunkt auf der unterstützenden und palliativen Versorgung liegen (Pace et al., 2017).

1.3.3 NACHBEHANDLUNG

Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom werden nach dem durch Stupp et al. beschrieben EORTC-NCIC –Schema folgendermaßen behandelt: Radiotherapie mit konkomitanter Temozolomid-Gabe für sechs Wochen und anschließender adjuvanten Temozolomid-Gabe in sechs Zyklen (Roger Stupp et al., 2009).

1.3.3.1 CHEMOTHERAPIE

Stupp et al. zeigten, dass das Gesamtüberleben bei Patienten, die eine Radiotherapie und Temozolomid erhielten, im Vergleich zu Patienten, die nur eine Radiotherapie erhielten, verlängert wird. Das Gesamtüberleben nach zwei Jahren liegt bei 27,2 % bei den Patienten mit Temozolomid-Behandlung im Vergleich zu 10,9 % ohne Temozolomid-Behandlung. Nach 5 Jahre liegt das Gesamtüberleben bei Patienten mit Temozolomid-Behandlung bei 9,8 % im Vergleich zu 1,9 % ohne Temozolomid-Behandlung (Roger Stupp et al., 2009). Das mediane Gesamtüberleben mit der Kombinationsbehandlung von Bestrahlung und adjuvanter Temozolomid-Gabe war 14,6 Monate, im Vergleich dazu überlebten die Patienten mit einer alleinigen Bestrahlung 12,1 Monate (Roger Stupp et al., 2005). Außerdem wurde ein Nutzen der Temozolomid-Behandlung für alle klinisch-prognostischen Subtypen inklusive der Patienten in der Altersgruppe von 60-70 Jahren festgestellt (Roger Stupp et al., 2009).

Temozolomid (TMZ) ist ein Prodrug, welches spontan bei physiologische pH-Wert zerfällt und das hochreaktive *Methyl-triazenyl imidazole carboamide* (MTIC) bildet (Patel, McCully, Godwin, & Balis, 2003). MTIC bindet eine Methyl-Gruppe an die O6-Position von Guanin in der genomischen DNA, was während des nächsten

Replikationszyklus zu einem *mismatch* mit Thymin führt. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der am stärksten strahlensensiblen G2-M-Zellzyklus-Phase (Hirose, Berger, & Pieper, 2001). Bei gleichzeitiger Bestrahlung wirkt TMZ als Strahlensensitizer, da es die Strahlen-induzierten DNA-Doppelstrang-Brüche und den Zelltod in Glioblastom-Zellen steigert (Chakravarti et al., 2006; van Rijn, Heimans, van den Berg, van der Valk, & Slotman, 2000). Temozolomid kann sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden (Reyderman et al., 2004). Temozolomid penetriert die Blut-Hirn-Schranke und reichert sich aufgrund der beschädigten Blut-Hirn-Schranke im Tumorgewebe und durch die vermehrte intratumorale Angiogenese im Vergleich zum normalen Hirngewebe vermehrt an (Patel et al., 2003; Rosso et al., 2009).

Patienten mit einem methylierten O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promoter (positiven MGMT-Methylierungsstatus) profitieren mehr von einer Therapie mit Temozolomid als Patienten ohne einen methylierten MGMT Promotor.

Das MGMT-Gen ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert und codiert für ein DNA-Reparaturprotein, das Alkylgruppen von der O6-Position des Guanins entfernt. Durch Methylierung der Promotorregion des MGMT-Gens kommt es zu einer verringerten Expression und damit zu einer herabgesetzten Aktivität des DNA-Reparaturproteins. Dadurch kommt es zu einem besseren Ansprechen von Temozolomid (Hegi et al., 2005; Villalva et al., 2012; J. Zhang, Stevens, & Bradshaw, 2012). Hegi et al. zeigten, dass ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit einem methylierten MGMT Promotor und solchen Patienten ohne methylierten MGMT Promotor besteht und dies damit einen prognostischen Wert besitzt (Hegi et al., 2004). Herrlinger et al. zeigten in einer randomisierten Phase III Studie, dass die Kombination von Lomustin und Temozolomid bei Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom mit einer methylierten MGMT Promotor das Gesamtüberleben verlängern könnte. Diese Option kann bei jüngeren Patienten mit gutem Karnofsky Performance Score und hoher Methylierung des MGMT-Promoters unter Inkaufnahme sowohl einer erhöhten Toxizität als auch einer vermehrten Pseudoprogression diskutiert werden (Herrlinger et al., 2019; Krieg et al., 2013; Wick W et al., 2021). In einer offenen randomisierten Phase-III-Studie konnte gezeigt werden, dass Tumortheraiefelder in Kombination mit Standarderhaltungstherapie mit Temozolomid bei Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom unabhängig der Tumoruntergruppe eingesetzt werden können und das

progressionsfreie und Gesamtüberleben verlängert (Roger Stupp et al., 2017; Wick W et al., 2021).

1.3.3.2 STRAHLENTHERAPIE

Eine fraktionierte lokalisierte postoperative Radiotherapie mit einer Dosis von 60 Gy, die auf 2 Gy an 5 Tagen in der Woche für 6 Wochen (30 Sitzungen) aufgeteilt ist, ist die empfohlene Standardtherapie für maligne Gliome (Laperriere, Zuraw, & Cairncross, 2002; Roger Stupp et al., 2009, 2005; Walker et al., 1980). Laperriere et al. zeigten, dass durch eine Radiotherapie ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil besteht (Laperriere et al., 2002). Die Radiotherapie sollte auf den Kontrastmittel-aufnehmenden Resttumor plus eine 2 cm Sicherheitsgrenze beschränkt sein, da bei einer kompletten Hirn-Bestrahlung keine erhöhten Überlebensraten im Vergleich zu einer lokalisierten Bestrahlung nachgewiesen werden konnten (Halperin, Bentel, Heinz, & Burger, 1989; Kita, Okawa, Tanaka, & Ikeda, 1989; Laperriere et al., 2002; Shapiro et al., 1989).

Durch eine *intensity-modulated radiotherapy* (IMRT) können hohe Strahlendosen im Bereich des Tumorgewebes erreicht und kritisch toxische Strahlendosen für das umgebende gesunde Hirngewebe ausgespart werden. Dies wird durch multiple Strahlengänge aus verschiedenen Winkeln auf das Zielgewebe erreicht (Amelio, Lorentini, Schwarz, & Amichetti, 2010; Burnet et al., 2017; Chan, Schupak, Burman, Chui, & Ling, 2003; Gzell, Back, Wheeler, Bailey, & Foote, 2017).

Da die Tumorzellen des Glioblastom infiltrierend in das umliegende Hirngewebe einwandern und dadurch nicht komplett durch eine Strahlentherapie erreicht werden, kann es nach der Bestrahlung in bis zu 90 % zu einem Lokalrezidiv kommen (Gritsenko, Leenders, & Friedl, 2017; Hochberg & Pruitt, 1980). Eine Re-Bestrahlung ist eine mögliche aber auch kontrovers diskutierte Therapie im Rezidivfall (Combs, Thilmann, Edler, Debus, & Schulz-Ertner, 2005; Ryu et al., 2014). Eine weitere Behandlungsoption ist die Protonenbestrahlung bei neu-diagnostizierten Glioblastomen. Hiermit konnte zwar bisher keine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens erreicht werden, allerdings war die Strahlendosis im umgebenden Gewebe und damit die Toxizität im Vergleich zur herkömmlichen Photonenbestrahlung reduziert (Brown et al., 2021). Zudem konnte bereits erste klinische Studien zeigen, dass die Kohlenstoff-Ionen-Strahlentherapie sicher und wirksam ist (Mizoe et al., 2007).

1.3.4 THERAPIE IM REZIDIVFALL

Die Mehrzahl der Patienten erleidet nach relativ kurzer Zeit ein Rezidiv (medianes progressionsfreies Überleben zwischen 5,0 und 6,9 Monate), welche sich im Rahmen der vierteljährlichen Kontrollen mittels Magnetresonanztomografie herausstellen (R. Stupp et al., 2014; Roger Stupp et al., 2005). Nach derzeitigem Stand ist eine Therapie im Rezidivfall noch nicht standardisiert, da vor allem das klinische Vorgehen von den Aspekten der vorherigen Behandlung, Alter, dem *Karnofsky performance score* und von der Rezidivart bestimmt wird. 20 - 30 % der Patienten kommen aufgrund einer Läsion, die neurologische Defizite verursacht, für eine Re-Operation in Betracht, wenn der Abstand zur ersten Operation mindestens 6 Monate beträgt (Weller et al., 2014).

Nitrosoharnstoffe wie Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU), Nimustin (ACNU) oder Fotemustin sind wie Temozolomid DNA-alkylierende Zytostatika, die auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und für die Therapie von Rezidiv-Glioblastomen eingesetzt werden können (Gallego, 2015).

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor und kann im Rezidivfall zur Therapie eingesetzt werden (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009; Nagane et al., 2012). Bevacizumab hat eine signifikante biologische und antigliomale Aktivität in Patienten mit einem Rezidiv-Glioblastom. Es konnte ein 6-Monat-PFS von 29 %, eine 6-Monat-Gesamtüberleben von 57 % und ein medianes Gesamtüberleben von 31 Wochen erreicht werden (Kreisl et al., 2009). Durch eine Kombinationstherapie von Lomustin und Bevacizumab konnte ein höheres 9-Monate-Gesamtüberleben im Vergleich zu Monotherapie Bevacizumab erzielt werden (43 % Monotherapie Bevacizumab vs. 63 % Kombination Bevacizumab und Lomustin) (Taal et al., 2014).

1.4 EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION BEI GLIOBLASTOMEN

1.4.1 GRUNDLAGEN DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSITION

Epitheliale Zellgruppen sind durch folgende Merkmale charakterisiert: Epithelzellen bilden Zellschichten, welche durch *Tight junctions*, Adhärenz junctions und Desmosomen untereinander verbunden sind und über Hemidesmosome mit der Basalmembran verbunden sind. Durch die Anordnung von Adhäsionsmolekülen, hier Cadherine und Integrine, und der polarisierten Anordnung des Actin-Cytoskeletts sowie durch die Existenz einer Basallamina entsteht eine apikale-basolaterale Polarisation (Thiery & Sleeman, 2006). Im Gegensatz zu Epithelzellen sind mesenchymale Zellen weder in Zellschichten noch durch eine apikal-basolaterale Polarisation organisiert. Mesenchymzellen sind nur fokal mit Nachbarzellen verbunden und haben typischerweise keinen Kontakt mit der Basalmembran (Thiery & Sleeman, 2006).

Nebenbei sind Epithelzellen durch eine hohe Expression von epithelialelem Cadherin (E-Cadherin), welches durch CDH1 codiert wird, charakterisiert, dagegen exprimieren mesenchymale Zellen viel N-Cadherin, welches durch CDH2 codiert wird, Fibronectin 1 und Vimentin. N-Cadherin ist dabei unter anderem für die mesenchymalen Zell-Zell-Adhäsionen verantwortlich; Vimentin ist ein Filament-Protein, welches die Zellmotilität reguliert; Fibronectin 1 fördert den Zellwachstum und die Migration (Franke, Grund, Kuhn, Jackson, & Illmensee, 1982; Kothari, Mi, Zapf, & Kuo, 2014; Peinado, Portillo, & Cano, 2004; Takeichi, 1988, 1995).

Epithelzellen können sich in mesenchymale Zellen umwandeln. Dieser Prozess wird epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) genannt und wurde erstmals von Elizabeth Hay beschrieben (Hay, 1968). Während der EMT verliert die Epithelzelle ihre zuvor beschriebenen Charakteristika und es findet eine komplexe Veränderung in der Zellarchitektur und im Zellverhalten statt (Greenburg & Hay, 1982; Thiery & Sleeman, 2006).

Die EMT kann in drei Subtypen klassifiziert werden: Die EMT und der umgekehrte Prozess mesenchymal-epitheliale-Transition (MET) kommen während Embryogenese und Organentwicklung (Organogenese, Gastrulation, Neuralleistenformation, Herzklappenbildung) vor und bilden den EMT-Subtyp 1 (Gros & Tabin, 2014).

Der EMT-Subtyp 2 spielt eine entscheidende Rolle in Wundheilungsprozessen, in der Gewebereparatur (Banerjee et al., 2015) und in der Organfibrosierung (Grande et al., 2015; Lovisa et al., 2015).

Die EMT im Rahmen der Tumorgenese und Metastasierung wird als Subtyp 3 zusammengefasst (Kalluri, 2009; Kalluri & Neilson, 2003; Thiery & Sleeman, 2006; Weber, Li, Wai, & Kuo, 2012). Ein Kennzeichen all dieser Subtypen ist der Prozess, bei dem die Epithelzelle die Zell-Zell-Kontakte und die Polarisation verliert, sowie eine Expressionsveränderung für die Cytoskelett-Organisation stattfindet. Diese Prozesse sind bei den Subtypen 1 und 2 hochreguliert. Im Subtyp 3 nimmt man an, dass es zu einer Dysregulation kommt, was zu einer Tumorgenese und Metastasierung führt (Kalluri & Neilson, 2003; Kothari et al., 2014; Ruscetti, Quach, Dadashian, Mulholland, & Wu, 2015).

Die Signale, die die epithelial-mesenchymale Transition fördern, beinhalten die *transforming growth factor*-Familie (TGF), den *epidermal growth factor* (EGF), den *fibroblast growth factor* (FGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *hypoxia-inducible factor* (HIF) und viele mehr (Lindsey & Langhans, 2014). Des Weiteren spielen verschiedene Signalwege beim Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition eine entscheidende Rolle. Dazu zählen die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), die *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), *Akt*, *SMADs*, *Wnt/β-catenin* and *Ras* (J. Yang & Weinberg, 2008). Auf molekularer Ebene sind essentielle Regulatoren der epithelial-mesenchymalen Transition die Transkriptionsfaktoren der SNAIL-, TWIST- und *zinc-fingers-E-box-binding*-(ZEB-) Familie. Ein elementarer Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition ist die Repression des epithelialen Cadherins (E-Cadherin), das für die Aufrechterhaltung der Zelladhäsion und der Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich ist. Die Transkriptionsfaktoren SNAIL, TWIST und ZEB reprimieren die E-Cadherin und fördern simultan mesenchymale Proteine wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin 1 (Kothari et al., 2014). Es wird zudem noch zwischen einer vollständigen Umwandlung von Epithelzelle in Mesenchymzelle und der teilweisen Umwandlung der Zelle unterschieden. Hierbei weist die Zelle sowohl einige epitheliale also auch einige mesenchymale Merkmale auf (Christiansen & Rajasekaran, 2006).

1.4.2 EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION IN GLIOZELLEN UND IM RAHMEN DER GLIOMAGENESIS

Gliazellen entwickeln sich aus der neuroepithelialen Zellreihe, sodass sie sich von den klassischen Epithelzellen unterscheiden und im Rahmen der Tumorgenese nicht die epithelial-mesenchymale Transition vom dritten Typ durchlaufen. Gliomzellen weisen Aspekte eines mesenchymalen Phänotyps auf, sodass man von einer *glial-to-mesenchymal transition* (GMT) oder von einem *EMT-like-Process* spricht (Mahabir et al., 2014).

1.4.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSITION BEI GLIOBLASTOMEN

1.4.3.1 CDH1/E-CADHERIN UND CDH2/N-CADHERIN

In den meisten epithelialen Karzinomen ist die epithelial-mesenchymale Transition durch einen *E-to-N-cadherin switch* definiert, wobei es zu einem Verlust von E-Cadherin und zu einer erhöhten Expression von N-Cadherin kommt (Thiery, 2002).

Bei Glioblastom-Zellen kommt es nicht zu einem klassischen *E-to-N-cadherin switch*. Lewis-Tuffin et. al. zeigten, dass eine erhöhte E-Cadherin-Expression in Glioblastom Zelllinien mit einer ungünstigen klinischen Prognose korreliert. Die Expression von E-Cadherin förderte die Invasivität (Lewis-Tuffin et al., 2010). In Studien über Ovarialkarzinome konnte ermittelt werden, dass die Expression von E-Cadherin in diesen Tumoren auch zu einem verstärktem Tumorwachstum, einer erhöhten Invasivität und zu einer vermehrten Metastasierung führte (Auersperg et al., 1999; Dong et al., 2012). Li et al. zeigten bei Patienten mit Magenkarzinomen, dass eine abnorme Expression von E-Cadherin mit einer schlechten Prognose einherging (Y. Li et al., 2012). Alldieweil stellten Zhang et al. heraus, dass eine hohe E-Cadherin Expression bei Patienten mit einem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ein positiver Indikator für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben ist (H. Zhang et al., 2013). Zudem konnte in der Arbeit von Onder et al. gezeigt werden, dass der Verlust von E-Cadherin im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition zur Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen durch Induktion von multiplen Transkriptionsfaktoren beiträgt (Onder et al., 2008).

Eine gesteigerte Expression von N-Cadherin zeigte eine Verringerung der Invasivität in das umliegende Gewebe, im Gegensatz zu epithelialen Karzinomen (Asano et al., 2004). Allerdings zeigte Shinoura et al., dass kein Zusammenhang zwischen Invasivität und der Expression von N-Cadherin besteht (Shinoura et al., 1995). Camand et al. zeigten ein erniedrigtes Expressionlevel von N-Cadherin in Glioblastomen verglichen mit normalen Hirngewebe und dass die verringerte Expression von N-Cadherin mit einer schnelleren und wenig gerichteten Zellmigration einhergeht. Eine erhöhte Expression von N-Cadherin führt zu einer Zellpolarisierung und einer damit verbundenen Inhibierung der Zellmigration (Camand, Peglion, Osmani, Sanson, & Etienne-Manneville, 2012). Im Gegensatz dazu zeigten Utsuki et al., dass die Expression von N-Cadherin mit höheren Astrozytom-Graden korreliert (Utsuki et al., 2002). Perego et al. zeigten, dass der Grad der Organisation und Stabilität von N-Cadherin wichtiger für das Ausmaß der Invasivität ist als die Höhe des Expressionslevels (Perego et al., 2002).

1.4.3.2 SNAI1 (SNAIL) UND SLUG (SNAI2)

Die Transkriptionsfaktoren der SNAIL-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der EMT. SNAIL und SLUG binden den Promotor des CDH1-Genes, welches für E-Cadherin codiert, und unterdrücken damit die E-Cadherin-Transkription. Die Überexpression von SNAIL oder SLUG leitet die EMT ein und führt zu einer erhöhten Tumormetastasierung (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Eger et al., 2005). Aufgrund der zentralen Bedeutung der SNAIL-Familie in der Einleitung der epithelial-mesenchymalen Transition erfolgt die Expressionskontrolle über mehrere Signalwege wie *Wnt*, *TGF β* , *HIF-1 α* und *PI3K/Akt* (Kaufhold & Bonavida, 2014; Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

In Glioblastom-Zellreihen konnte durch das Ausschalten der SNAIL Expression durch siRNA festgestellt werden, dass es dadurch zu einer erhöhten E-Cadherin-Expression und zu einer erniedrigten Vimentin-Expression kam. Außerdem kam es durch die Inhibierung der SNAIL Expression zu einer Reduktion der Proliferation, Viabilität, Invasion und Tumormigration in Glioblastom-Zellen (Han et al., 2011; Myung, Choi, Kim, Wang, & Park, 2014).

SLUG spielt während der epithelial-mesenchymalen Transition im Rahmen der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Charakter erfolgt bei der Bildung des Mesoderms während der

Gastrulation und bei der Auswanderung der Neuralleiste aus dem Neuralrohr (Nieto, Sargent, Wilkinson, & Cooke, 1994). Eine hohe Expression von SLUG steht in Verbindung mit progressiven Tumorstadien, Lymphknotenmetastasen, postoperativen Rezidiven und schlechtem Patientenüberleben in verschiedenen Karzinomen (Shih et al., 2005; Shioiri et al., 2006). SLUG spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Invasivität in vielen Tumorentitäten wie Magen-, Lungen-, Ovarial- Brust- und Pankreaskarzinome (Gonzalez & Medici, 2014). Yang et al. zeigten, dass eine erhöhte Expression von SLUG in Glioblastom-Zellen die Proliferation, die Tumordinvasion, die Angiogenese und das Tumorstadium fördern. Bei supprimiertem SLUG dahingegen verringerte sich die Tumordinvasion und erhöhte sich das Überleben am Mausmodell (H. W. Yang, Menon, Black, Carroll, & Johnson, 2010). Die genetische Hochregulierung von SLUG führte zu einer gesteigerten Resistenz im Rahmen der therapeutischen Bestrahlung und der Temozolomid-Gabe. Ferner zeigte sich, dass Patienten mit einer erniedrigten Expression von SLUG ein verlängertes progressionsfreie Überleben aufwiesen (Oh et al., 2019).

1.4.3.3 VIMENTIN

Vimentin, ein Typ-III Intermediärfilament, ist Bestandteil mesenchymaler Zellen, wie Gliazellen und Astrozyten, und ist im Rahmen verschiedener Entwicklungsstadien für die zelluläre Integrität verantwortlich (B.-M. Chung, Rotty, & Coulombe, 2013; Coulombe & Wong, 2004; Franke et al., 1982).

Eine erhöhte Expression von Vimentin zeigte sich bei verschiedenen hochmalignen Tumoren wie dem maligne Melanom (M. Li et al., 2010), dem Mammakarzinom (Gilles et al., 2003; Sommers et al., 1989), Prostatakarzinom (Lang et al., 2002; Y. Zhao, Yan, Long, Chen, & Wang, 2008) und Bronchialkarzinomen (Al-Saad et al., 2008; Upton et al., 1986). Bei diesen Tumorentitäten war Vimentin mit einer erhöhten Tumordinvasivität und einer schlechten Prognose assoziiert.

Liu et al. zeigten, dass es durch Vimentin-Knockdown zu einer reduzierten Zellproliferation, einer gestörten Wundheilung und zu einer Reorganisation des Zytoskeletts kommt. Weiterhin kam es bei Überexpression von Vimentin zu einer gesteigerten Zellmotilität und zu einem gesteigerten EMT-Phänotyp mit Verlust von E-Cadherin. Des Weiteren wird der EMT-Transkriptionsfaktor SLUG durch Vimentin

verstärkt exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Vimentin als *downstream effector* der SLUG-induzierten epithelial-mesenchymalen Transition dient und somit eine EMT-vermittelte Malignität fördert (C.-Y. Liu, Lin, Tang, & Wang, 2015). Das Expressionslevel von Vimentin korreliert mit der mesenchymalen Zellform und mit der Zellmotilität. Durch das Unterdrücken der Vimentin-Expression mittels *small hairpin RNA* (shRNA) ist ersichtlich, dass Mesenchymzellen eine Epithelzellform annehmen. Bei der Umwandlung von Epithelzellen durch Vimentin-Mikroinjektionen in mesenchymale Zellen kommt es zum Verlust von desmosomalen Kontakten und unter anderem zu einer gesteigerten Zellmotilität (Mendez, Kojima, & Goldman, 2010).

Zhao J et al. untersuchten die Rolle von Vimentin in Glioblastomen auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und konnten zeigen, dass Patienten mit einer hohen Expression von Vimentin ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben und ein kürzeres progressionsfreie Überleben haben (J. Zhao et al., 2018). Zudem konnte in Experimenten herausgearbeitet werden, dass der chemische Inhibitor von Vimentin, *withaferin-A*, die Migration und die Invasivität von Glioblastomzelllinien unterdrückt und somit eine entscheidende Rolle bei der Progression von Glioblastom spielt (J. Zhao et al., 2018). Lin L et al. zeigten bei Glioblastom-Patienten, dass die Expression von Vimentin einen Einfluss auf den Behandlungserfolg mittels Temozolomid hat. Patienten mit einer niedrigen Vimentinexpression wiesen ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Temozolomid auf. Des Weiteren überlebten Glioblastom-Patienten mit einer niedrigen Vimentinexpression länger als Patienten mit einer hohen Expression (L. Lin et al., 2016). Ferner wiesen klinische rezidivierende maligne Gliome in der immunhistochemischen Analyse eine höhere Expression von Vimentin auf (Mahabir et al., 2014).

1.4.4 EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION UND THERAPIERESISTENZ SOWIE EMT-INDUKTION DURCH DIE THERAPIE

Der Zusammenhang zwischen der epithelial-mesenchymalen Transition und einer Medikamentenresistenz wurde bereits bei Pankreaskarzinomen (Arumugam et al., 2009) (Zheng et al., 2015), Urothelkarzinom (McConkey et al., 2009) und bei Mammakarzinomen (Huang, Li, & Ren, 2015) beschrieben.

BCNU-(Carmustin)-resistente Glioblastomzelllinien wiesen Mehrfachresistenzen und einen zur epithelial-mesenchymalen Transition passenden Phänotyp mit erhöhter Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und einer erniedrigten Expression von E-Cadherin auf (Y.-R. Yan et al., 2014). Chockalingam et al. zeigten anhand von humanen U87 Glioblastomzelllinien, die vermehrt *macrophage colony stimulation factor* (MCSF) exprimieren, dass es zu einer erhöhten Resistenz gegen eine Behandlung mit 5-Fluoruracil (5-FU) kam. Diese MCSF-überexprimierenden Glioblastomzelllinien entwickelten dabei einen mesenchymalen Phänotyp mit erhöhter Expression von N-Cadherin und Vimentin im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition (Chockalingam & Ghosh, 2013). U87 Glioblastomzelllinien mit einer entwickelten Resistenz gegen Bevacizumab wiesen eine verstärkte Expression von Genen auf, die mit einem mesenchymalen Phänotyp einhergehen. Ebenfalls präsentierten sich Bevacizumab-Resistenzen mit einem höheren Ausmaß an Invasivität (Piao et al., 2013).

Bei einer Untersuchung von Patienten, die an Glioblastomen erkrankt waren, konnten Meng et al. aufweisen, dass Resistenzen gegenüber einer Bestrahlung mit einer zur epithelial-mesenchymalen Transition passenden genetischen Signatur einhergehen. Da verschiedene mesenchymale Gene mit einer Bestrahlungsresistenz assoziierbar sind, kann angenommen werden, dass die epithelial-mesenchymale Transition in Zusammenhang mit einer Bestrahlungsresistenz steht (Meng, Li, Zhang, Yang, & Fu, 2014). Fortlaufend stellte sich heraus, dass die Glioblastomzellen nach einer Bestrahlung SNAI 1 höher exprimieren und es dadurch zu einer Hochregulierung von Tumormigration und Invasivität kam (Mahabir et al., 2014). Des Weiteren demonstrierten Xiong et al., dass U251 Glioblastomzelllinien durch Bestrahlung zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition und zur Migration getriggert wurden (Xiong et al., 2017). Eine Bestrahlung mit niedrigen Dosen verleitet Glioblastomzellen zur Migration und zur Expression von EMT-Markern (Zaboronok et al., 2014). Simultan zu den vorherigen Ergebnissen zeigte sich Gleiches bei diversen Karzinomen. Bei Mammakarzinom-Patientinnen, bei Patientinnen mit Endometriuskarzinom und bei an kolorektalem Karzinom erkrankten Patienten kam es durch eine Bestrahlung zu einer Änderung der Zellmorphologie im Sinne einer epithelial-mesenchymalen Transition mit einer Hochregulation von EMT-induzierenden Faktoren wie Snail, Twist, Vimentin und einer Herabregulierung von E-Cadherin (Kawamoto et al., 2012; Tato-Costa et al., 2016; Tsukamoto et al., 2007; X. Zhang, Li, Zhang, Yang, & Moran, 2011).

Ferner zeigten Kubelt et al. anhand von T89G Gliomzelllinien, dass die Zelllinien nach einer Behandlung mit Temozolomid die Expression von EMT-induzierenden Faktoren, wie SNAI 1, SLUG, Twist, β -catenin und Vimentin, induzieren. Es konnte anhand dieser Untersuchung vermutet werden, dass die Therapie mittels Temozolomid an dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt sind (Kubelt, Hattermann, Sebens, Mehdorn, & Held-Feindt, 2015).

Zudem konnte durch die Arbeitsgruppe von Kurrey et al. herausgestellt werden, dass SNAIL und SLUG durch Verhinderung einer p53-vermittelten Apoptose und Bildung eines Stammzell-ähnlichen Phänotyps eine Resistenz gegenüber einer Strahlentherapie sowie eine Chemoresistenz förderten (Kurrey et al., 2009).

Daneben zeigte sich auch bei Mammakarzinomen, bei hepatozellulären Karzinomen, bei Kolonkarzinomen und bei Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, dass Doxorubicin zu einer Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition führte (Q.-Q. Li et al., 2009; R. Li et al., 2016; Pan, Wang, & Ye, 2016; Wang et al., 2016; Xu et al., 2016). Doxorubicin induzierte außerdem die epithelial-mesenchymale Transition im Gliomzellen (Q. Liu et al., 2015).

1.4.5 THERAPEUTISCHE ANGRIFFSPUNKTE IM RAHMEN DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSITION

Shi et al. untersuchten U87 GBM Zelllinien nach der Behandlung mit AC1MMYR2, einem Inhibitor der miR-21, der die Umwandlung von pre-miR-21 in die reife miR-21 blockiert. Durch Förderung der E-Cadherin Expression und Inhibierung der mesenchymalen Marker kam es zu einer Umkehrung der epithelial-mesenchymalen Transition in Glioblastomen und einer damit einhergehenden Unterdrückung der Proliferation, Migration und Invasivität. Im Mausmodell zeigte sich auch eine verringerte Proliferation und verminderte Expression von mesenchymalen Markern nach Behandlung mit AC1MMYR2 (Shi et al., 2013). Ren et al. zeigten, dass die Kombination von AC1MMYR2 mit Paclitaxel die EMT-Marker β -catenin und Vimentin deutlich im Vergleich zu einer Monotherapie mit Paclitaxel reduziert sowie die Tumormigration und die Invasivität hemmt (Ren et al., 2015). FTY720, ein Metabolit des Pilzes *Isaria sinclairii*, führte zu einer Reduktion der Proliferation, Migration und Invasivität von U251 und U87 Glioblastomzelllinien über den PI3K/Akt/mTOR/p70S6K-Signalweg und

der Unterdrückung des mesenchymalen Phänotyps durch eine herabgesetzte Expression von Vimentin und N-Cadherin (L. Zhang, Wang, Zhu, Ding, & Xu, 2014). Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition ist die Herabregulation des PI3K/Akt durch *Osthole*. Dabei kommt es zu einer Blockierung der *insulin-like growth factor-1*-(IGF-1)-induzierten epithelial-mesenchymalen Transition und damit zu einer Hochregulation von epithelialen Markern und einer Herabsetzung der Expression von mesenchymalen Markern. Darüber hinaus führt *Osthole* zu einer Inhibierung der EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren SNAIL und Twist (Y.-C. Lin et al., 2014). Anhand von Glioblastomzelllinien konnte der Einfluss von Oleanolsäure auf die epithelial-mesenchymale Transition herausgestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass Oleanolsäure über die Inhibierung des MAPK/ERK-Signalweg die Expression von den mesenchymalen Markern N-Cadherin und Vimentin reduziert und die Expression von E-Cadherin fördert (Guo, Yao, Zhang, & Bo, 2013). Fu et al. untersuchten die Wirkung von NPV-LDE-225 (Erismodegib) und konnten beweisen, dass NPV-LDE-225 die epithelial-mesenchymale Transition durch Hochregulation von E-Cadherin und Inhibierung von N-Cadherin, SNAIL und SLUG reprimiert wird (Fu et al., 2013). Eine weitere Möglichkeit der Blockierung der epithelial-mesenchymalen Transition durch das *EIS regimen*, bestehend aus einer Kombination von den sechs bereits zugelassenen Medikamenten Itraconazol, Metformin, Naproxen, Pirfenidon, Quetiapin und Rifampicin, wurde durch Kast et al. beschrieben (Kast et al., 2017).

1.5 ZIELSETZUNG

Die Komplexität und die genauen Mechanismen der Glioblastomentstehung und Malignität scheinen in der Gesamtheit noch nicht entschlüsselt, sodass eine weitere molekulare Untersuchung der Glioblastome von Nöten ist, um in Zukunft eine personalisierte und zielgerichtete onkologische Therapie zu ermöglichen. Die epithelial-mesenchymale Transition spielt bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Proteine, die die epithelial-mesenchymale Transition induzieren (*SNAIL* und *SLUG*) und für Epithel- bzw. Mesenchymzellen Marker (*E-*, *N-Cadherin*, *Vimentin*) sind, zeigen sich bei den verschiedenen Tumorentitäten im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht. Hierbei gehen die in dieser Arbeit untersuchten Marker mit einer erhöhten Invasivität, Förderung der Zellmigration und einer schlechteren Prognose einher. Der Einfluss und die Funktion von *SNAIL*, *SLUG*, *Vimentin*, *N-* und *E-Cadherin* im Rahmen der Entstehung von Glioblastomen ist nur in wenigen Studien und nicht ausreichend untersucht. Da die epithelial-mesenchymale Transition im Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber den üblichen Standardtherapien steht, könnte eine mögliche Deduktion der epithelial-mesenchymalen Transition beziehungsweise der *glial-to-mesenchymal transition* (GMT) in Zukunft einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

Die Untersuchung folgender Punkte waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- Vergleich der Expression (auf RNA- und Proteinebene) von *SNAI1/SNAIL*, *SNAI2/SLUG*, *Vimentin*, *CDH1/E-Cadherin* und *CDH2/N-Cadherin* im Glioblastomgewebe im Vergleich zum gesunden Hirngewebe
- Vergleich der Expression von *SNAI1/SNAIL*, *SNAI2/SLUG*, *Vimentin*, *CDH1/E-Cadherin* und *CDH2/N-Cadherin* in GBM in Bezug auf die *MGMT*-Methylierung
- Einfluss von *SNAI1/SNAIL*, *SNAI2/SLUG*, *Vimentin*, *CDH1/E-Cadherin* und *CDH2/N-Cadherin* auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Glioblastompatienten

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv handelt es sich um 42 Patienten der Neurochirurgie Gießen, die nach der zum damaligen Zeitpunkt geltenden WHO-Klassifizierung an einem histopathologisch gesichertem primären Glioblastom (WHO Grad 4) im Untersuchungszeitraum von 2006 bis 2012 erkrankten. Anhand der retrospektiven Analyse der Patientenakten wurde eine anonymisierte Datenbank mit folgenden Daten erstellt:

- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Diagnosezeitpunkt
- Operations- und Reoperationszeitpunkt
- Zeitpunkt und Art der Chemotherapie
- Zeitpunkt und Art der Radiatio
- MRT-Verlaufskontrollbefunde
- Zeitpunkt des Rezidivs
- Sterbedatum
- *Progression-free-survival* (Progressionsfreies Überleben ist hier definiert als Zeitpunkt zwischen der 1. Operation bis zum Tumorrezidiv)

Die histopathologischen Proben stellte das Institut für Neuropathologie Gießen zur Verfügung. Es lagen von allen 42 Patienten die Einverständniserklärung vor, dass sie die bei ihnen entnommenen Gewebeproben zu wissenschaftlichen Untersuchungen zur Verfügung stellen und ihre Daten anonymisiert ausgewertet werden dürfen. Hierfür liegt dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg der Ethikantrag mit dem Aktenzeichen 07/09 vor. Die Gewebspräparate wurden vom Institut für Neuropathologie Gießen histopathologisch beurteilt und lagen sowohl in Paraffin fixierten als auch in flüssigen Stickstoff asservierten Kryopräparaten vor.

2.2 KONTROLLKOLLEKTIV

Als Kontrollgruppe stellte das Institut für Neuropathologie Gießen Gewebspräparate von pathologisch unauffälligen Gehirnen aus supra- und infratentoriellen Gewebeproben zur Verfügung. Für die immunhistochemischen Analyse lag eine Kontrollgruppe von fünf in Paraffin fixiert Präparaten vor. Für die Untersuchung mittels quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion bestand ein Kontrollkollektiv von fünf in flüssigem Stickstoff asservierten und kryokonservierten Präparaten.

2.3 QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASEKETTENREAKTION (Q-RT-PCR)

2.3.1 RNA-ISOLATION

2.3.1.1 VORBEREITUNGEN

RNA ist sehr anfällig für den Abbau durch RNasen. Um den RNA-Abbau zu vermeiden, ist eine frühzeitige Trennung von RNA und RNasen notwendig, wobei darauf geachtet wurde, dass es während der einzelnen Schritte der RNA-Extraktion zu keiner Kontamination mit RNasen kommt. Daher wurden Arbeitsflächen sowie die Pipetten und andere verwendeten Materialien mit 70-prozentigen Ethanol gereinigt sowie zusätzlich ausschließlich DNase- und RNase- freie Pipettierspitzen verwendet.

2.3.1.2 ABLAUF DER RNA-ISOLATION

Die RNA-Isolation erfolgte aus in flüssigem Stickstoff gefrorenen Resektaten von Glioblastomen verschiedener Patienten nach der Single-Step-Methode nach Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die 40 mg Gewebestücke wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit 1 ml QIAzol-Lösung versetzt. Die QIAzol-Lösung beinhaltet das Salz Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert, gleichzeitig RNasen inaktiviert und Proteine denaturiert. Des Weiteren enthält die TRIzol-Lösung Phenol, in dem sich RNA löst. Unter zu Hilfenahme von Mahlkugeln wurde das Gewebe für 2 mal 3 Minuten bei einer Frequenz von 30 Hz in einer Kugelmühle homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 20.000 x g, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß umgefüllt und mit

200 µl Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde für 15 Sekunden gevortext und nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zugabe von Chloroform und der anschließenden Zentrifugation kam es zu einer 3-Phasen-Bildung. Die untere rötliche Phase enthielt die DNA-Fraktion, die mittlere trübe Interphase die Proteine. Die obere wässrige Phase mit der RNA-Fraktion wurde vorsichtig mit der Pipette in 100-µl-Schritten abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß eingefüllt. Die beiden anderen Phasen wurden verworfen und in einem entsprechenden Abfall entsorgt. Um die RNA auszufällen, wurde langsam 1 Volumenteil 70-prozentiges Ethanol hinzu pipettiert und gemischt. Auf eine RNeasy-Säule wurden dann 700 µl der Probe geladen und für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die RNeasy-Säule besitzt eine Silikon-Gel-Membran, an der die Nukleinsäuren binden. Die folgende Aufreinigung erfolgte nun nach den Angaben des Handbuches für das Qiagen RNeasy Mini Kit in folgenden drei Schritten: Im ersten Schritt wurden 700 µl RW1 Puffer in die RNeasy Säule pipettiert, bei 10.000 x g für 15 Sekunden zum Waschen zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Im zweiten Schritt wurde RPE Puffer zur RNeasy-Säule hinzugegeben und erneut bei 10.000 x g zum Waschen für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenfalls anschließend verworfen. Im dritten Schritt wurde RPE Puffer hinzugegeben. Auch hier erfolgte eine Waschung. Damit auch der letzte Puffer aus der Silikon-Gel-Membran entfernt wurde, musste man 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugieren. Danach ist die Membran vollständig trocken und nur die RNA haftet an ihr. Durch diese drei Schritte wurde die an der Membran bindende RNA von anderen Substanzen gereinigt. Zum Schluss wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser von der Silikon Gel Membran gelöst.

2.3.1.3 PHOTOMETRISCHE VERMESSUNG DER ISOLIERTEN RNA UND LAGERUNG

Direkt nach der Elution der RNA wurde diese mit Eis gekühlt. Vor der eigentlichen Messung wurde das NanoDrop 1000 Spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit RNase-freiem-Wasser geeicht. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ferner wurde mittels des Extinktionsverhältnisses $E(260)/E(280)$ die Reinheit der RNA überprüft. Werte ab einem Extinktionsverhältnis von 2,0 und höher wurden als rein

angesehen und für das anschließende Umschreiben in komplementäre DNA verwendet. Kleinere Werte wiesen auf eine Kontamination mit Proteinen und/oder Phenol hin. Die isolierte RNA wurde bei -80° C gelagert.

2.3.2 REVERSE TRANSKRIPTION DER RNA IN C-DNA

Da die RNA nicht direkt als Template in der quantitativen Real-time-Polymerasekettenreaktion weiterverwendet werden kann, erfolgte das Synthetisieren einer komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) mithilfe der reversen Transkriptase (RT). Diese reverse Transkription wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen® durchgeführt:

Mit Hilfe des gDNA Wipeout Buffer wurde die RNA effektiv von genomischer DNA (gDNA) befreit, bevor die eigentlichen Schritte der Reverse Transkription beginnen. Folgende Komponenten (siehe Tabelle 1) wurden zusammengefügt und anschließend bei 42 °C für 2 Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde dann anschließend direkt für die Reverse Transkription verwendet.

KOMPONENTEN FÜR DIE ELIMINATION VON GENOMISCHER DNA	VOLUMEN / MASSE
7 x gDNA Wipeout Buffer	2 µL
Template RNA	1 µL
RNase-freies Wasser	Variabel – ad 14 µL

Tabelle 1: Komponenten für die Elimination der genomischen DNA

Grundlage für die Reaktion der reversen Transkription ist das Enzym Reverse Transkriptase, ein multifunktionelles Enzym mit zwei enzymatischen Aktivitäten: (1) RNA-abhängige-DNA-Polymerase, welche die Bildung eines zur RNA-Matrize komplementären DNA-Stranges ermöglicht, und (2) eine Hybrid-abhängige-Exoribonuklease (RNase H), die spezifisch nur an cDNA gebundene RNA schneidet und keinen Einfluss auf die frei RNA hat. Nach der Elimination der genomischen DNA konnte nun die Reverse Transkription durch Zugabe folgender Komponenten (siehe Tabelle 2) und anschließender Inkubation für 15 Minuten bei 42° C durchgeführt werden.

KOMPONENTEN FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION	VOLUMEN
Quantiscript Reverse Transkriptase (RT)	1 μ L
5 x Quantiscript RT Buffer	4 μ L
RT Primer Mix	1 μ L
RNA-Template nach der Elimination von genomischer DNA	14 μ L

Tabelle 2: *Komponenten für die reverse Transkription*

Bei 95 °C für 3 Minuten wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die fertig umgeschriebene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.3.3 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR MESSUNG

2.3.3.1 PRINZIP DER REAL-TIME-PCR

Die konventionelle PCR ist eine enzymabhängige Methode, um in-vitro eine bestimmte Gen-Sequenz innerhalb der DNA zu vervielfältigen und zu analysieren. Das Verfahren beruht auf den Veröffentlichungen von Mullis in den 1980er Jahren (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Die gewünschte Gen-Sequenz wird durch zwei Oligonukleotide (Primer) festgelegt, welche am Anfang und am Ende des zu vervielfältigenden Bereiches liegen. Neben den Primern werden Nukleotide, Puffer und eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt. Diese thermostabilen DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase) verbinden komplementär zum Matrizenstrang die Nukleotide und bilden einen neuen DNA-Strang. Die Vervielfältigung der DNA wird durch die zyklische Wiederholung der folgenden drei Schritte ermöglicht: (1) Denaturierung, (2) Anlagerung (Annealing) und (3) Verlängerung (Elongation). Dadurch ist unter optimalen Voraussetzungen eine Verdopplung der DNA-Stränge pro Zyklus möglich.

Die quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion (q-RT-PCR) erweitert dieses konventionelle Verfahren um die direkte DNA-Quantifizierung. Das Prinzip der q-RT-PCR beruht auf der quantitativen Echtzeit (real-time) - Erfassung der PCR-Produkt-Vermehrung durch eine Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonde, welche komplementär zu der zu amplifizierenden DNA ist und zwischen den beiden Primern hybridisiert (Forster,

1946; Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). Diese fluorogene Oligonukleotide-Sonde (TaqMan-Sonde) bindet am 5'-Ende einen Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (engl. *to report*; berichten) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (engl. *to quench*; löschen) sowie ein 3'-OH-blockierendes Phosphat (siehe Tabelle 3). Das 3'-OH-blockierendes Phosphat verhindert, dass die Sonde selbst durch die DNA-Polymerase verlängert wird. Der Quencher-Farbstoff unterdrückt durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) den durch eine spezifische Wellenlänge (488 nm) angeregten Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (Gibson, Heid, & Williams, 1996; Heid et al., 1996). Der Reporter und der Quencher beinhalten folgende Farbstoffzusammensetzung:

REPORTER	6FAM, CY3, CY5, JOW, NED, TET, VIC
QUENCHER	TAMRA, MGB/NFQ

Table 3: Farbstoffe des Reporters und des Quenchers

Nach der Denaturierung der doppelsträngig vorliegenden cDNA bei 95 °C wird die Temperatur auf 60 °C gesenkt, welches das Annealing der beiden Primer und der dazwischen liegenden Sonde erlaubt. Daraufhin kann die Elongation eines komplementären DNA-Stranges in 5'-3'-Richtung durch die 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase erfolgen. Die DNA-Polymerase benötigt die frei 3'OH-Gruppe des Primers, um die Desoxyribunukleotide zu binden und die Elongation zu starten. Gleichzeitig wird zur Synthese des komplementären DNA-Stranges durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase der Reporter am 5'-Ende von der Sonde gelöst. Folglich wird der Fluoreszenz-Energietransfer durch Anstieg der räumlichen Distanz zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und die durch den Reporter ausgestrahlte Fluoreszenz kann durch die optische Detektionseinheit des PCR-Geräts gemessen werden. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase ist doppelstrangspezifisch, daher werden nur sequenzspezifisch-gebundene Sonden und nicht nicht-hybridisierte Sonden abgebaut.

Das Signal des fluoreszierenden Reporters wird jeden Zyklus durch den Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System-Cycler gemessen und grafisch dargestellt. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Anzahl der PCR-Produkte und mit jedem PCR-Zyklus.

2.3.3.2 DURCHFÜHRUNG DER REAL-TIME PCR

Für die Durchführung der Real-time-PCR wurden 96-well Platten, der TaqMan Gene Expression Mastermix, Nuclease-freies-Wasser, die TaqMan Gene Expression Assays für CDH1 (E-CADHERIN), CDH2 (N-CADHERIN), SNAI1 (SNAIL1), SNAI2 (SLUG/SNAIL2) und VIMENTIN und die zuvor hergestellte cDNA benötigt. Der TaqMan Gene Expression Mastermix enthält alle für PCR benötigten Substrate wie Taq-DNA-Polymerase und die Desoxyribunucleotidtriphosphate. Die TaqMan Gene Expression Assays beinhalten die nötigen Primer und Sonden.

Jedes well wurde mit 10 µl TaqMan Gene Expression Mastermix, 8 µl Nuclease-freies Wasser, 1µl TaqMan Gene Expression Assay und mit 1 µl cDNA (template DNA) gefüllt. Es ergab sich so ein Gesamtvolumen von 20 µl pro well. Ein einheitlicher Mix wurde für jede Probe aus TaqMan Gene Expression Mastermix, Nuclease-freies-Wasser und die TaqMan Gene Expression Assays angefertigt. Als sogenannte no-template-Kontrolle wurde ein well mit diesem Mix pipettiert. Um eine zusätzliche Kontrolle der Ergebnisse zu ermöglichen und um eine Messwertkorrektur durchzuführen, wurde jede Probe in einem 3er-Set analysiert (Pipettierschema siehe Tabelle 4).

Probe 1			Probe 2			Probe 3			Probe 4		
CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1	CDH1
CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2	CDH2
SNAI1	SNAI1	SNAI1	SNAI 1	SNAI1	SNAI1	SNIA1	SNAI1	SNAI1	SNAI1	SNAI1	SNAI1
SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2	SNAI2
VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM	VIM
ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB
No Template CDH1	No Template CHD2	No Template SNAI1	No Template SNAI2	No Template VIM	No Template ACTB						

Tabelle 4: Pipettierschema der 96-well Platte

Anschließend wurde die 96-well Platte für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert und daraufhin in den Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System-Cycler eingesetzt.

Folgende Temperatur-Zyklen liefen in diesem Cycler ab:

- Stufe 1: 50,0 °C für 2 Minuten und 95 °C für 10 Minuten
- Stufe 2: 95.0 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minuten – Stufe 2 wurde insgesamt 40-mal wiederholt

2.3.3.3 MESSUNGEN IN DER EXPONENTIELLEN PHASE DER REAL-TIME PCR

Die Real-Time-PCR fokussiert ihre Messungen auf die exponentielle Phase, die die akkuratesten Daten für die Quantifizierungen liefert. Während der exponentiellen Phase werden zwei Werte berechnet: (1) die „Treshold“ – das Level, indem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt – und (2) den CT-Wert, der den PCR-Zyklus beschreibt, indem die Treshold erreicht wird.

2.3.3.4 HOUSEKEEPING-GENE (KONTROLL-/REFERENZ- ODER HAUSHALTSGENE)

Für die relative Quantifizierung / endogene Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen Actin-beta (ACTB) verwendet. Ein Housekeeping-Gen ist ein konstitutives Gen, welches kontinuierlich und immerwährend transkribiert wird. Dieses Gen ist dabei für die Instandhaltung der basalen Zellfunktion von elementarer Bedeutung und wird in jeder Zelle des Organismus exprimiert (Butte, Dzau, & Glueck, 2001; Eisenberg & Levanon, 2003, 2013). In Experimenten werden Housekeeping-Gene als Referenzwert für die Analyse des Expressionsunterschiedes anderer Gene verwendet (relative Quantifizierung).

ACTB wird an der Chromosomenlokalisierung 7p22.1 gefunden und codiert für eins der sechs Aktin-Proteine. Actin-beta ist eins von zwei Cytoskelett-Aktinen, die nicht ausschließlich in Muskeln gebildet werden, und ist für die Zellbewegungsfähigkeit, die Zellstruktur und die Zellintegrität verantwortlich (Kreuzer et al., 1999; Ponte, Gunning, Blau, & Kedes, 1983; Vandekerckhove & Weber, 1978). Röhn et al. zeigten, dass ACTB in primären und sekundären Glioblastomen sowie zwischen den unterschiedlichen WHO Tumorstadien nicht unterschiedlich exprimiert wird. Außerdem präsentierte sich die ACTB-Expression vor und nach der Bestrahlung beziehungsweise vor und nach einer Chemotherapie als besonders stabil und stellt sich aus diesem Grund als ein geeignete Referenz für Glioblastom-Genexpressionsstudien heraus (Röhn et al., 2018).

2.3.4 AUSWERTUNG DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR

Die q-RT-PCR wurde verwendet, um die quantitative Expression der Gene im gesunden Hirngewebe festzustellen. Das Expressionsverhältnis beider Proben (Glioblastomgewebe und gesundes Hirngewebe) wurde durch die Delta-CT-Methode gebildet.

Die Auswertung erfolgte anhand der CT-Werte, die durch die StepOne-Software ermittelt wurden. Pro Gen und pro Probe wurden drei Werte ermittelt, wovon mindestens zwei Werte eine Standardabweichung von kleiner als 0,25 aufzeigen mussten. Lag bei allen drei Werten die Standardabweichung über der festgelegten Grenze von 0,25 wurde die Analyse der Werte wiederholt. Für die weitere Berechnung wurde der Durchschnitt der zwei Werte mit der kleinsten Standardabweichung ermittelt und in die folgenden Rechnungen eingebracht.

Das Expressionswert wurde mittels der Delta-CT-Methode folgendermaßen kalkuliert:

Berechnung des $\Delta CT_{(Tumorprobe)}$: Der CT-Wert eines Zielgens der Tumorprobe wird auf die Expression eines nicht regulierten, konstitutiven Gens (Housekeeping-Gen) bezogen.

$$\Delta CT_{(Glioblastomprobe)} = CT_{(Zielgen/Glioblastomprobe)} - CT_{(Housekeeping-Gen)}$$

Berechnung des $\Delta CT_{(gesundes Hirngewebe)}$: Der CT-Wert eines Zielgens aus der Probe des gesunden Hirngewebes wird auf die Expression (CT-Wert) eines Housekeeping-Gens bezogen.

$$\Delta CT_{(gesundes Hirngewebe)} = CT_{(Zielgen/gesundes Hirngewebe)} - CT_{(Housekeeping-Gen)}$$

Expressionswert:

Um den Expressionswert sowohl der Tumorprobe als auch des gesunden Hirngewebes zu erhalten, wurde folgende Exponentialfunktion gebildet:

$$\text{Expressionswert} = 2^{-\Delta CT}$$

2.4 IMMUNHISTOCHEMIE

Die immunhistochemische Untersuchung beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei sind die Antikörper entweder direkt mit einem Farbstoff markiert (direkte Immunmarkierung) oder verursachen über ein oder mehrere Zwischenmoleküle (beispielsweise Sekundärantikörper) ein Farbereignis (indirekte Immunmarkierung). Diese Methode wird verwendet, um Proteine in bestimmten Geweben und Zellkompartimenten (zytoplasmatisch, nukleär oder membranständig) darzustellen.

Antigene können sowohl Lipide, Kohlenhydrate, Proteine, als auch andere komplexe Moleküle sein, welche an mehrere antigenen Teilgruppen (sogenannte Epitope) spezifisch Antikörper binden können. Antikörper sind Serumproteine, die von differenzierten B-Lymphozyten, sogenannten Plasmazellen nach Antigenkontakt gebildet werden. Es werden polyklonale und monoklonale Antikörper unterschieden. Polyklonale Antikörper können im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern mehrere Epitope eines Antigens binden. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion basiert auf eine hoch spezifische Reaktion, die durch elektrostatische Anziehung, Wasserstoffbrückenbindungen sowie durch van-der-Waals-Kräfte verursacht wird.

2.4.1 AUFBEREITUNG DES GLIOBLASTOM- UND KONTROLLGEWEBES FÜR PARAFFINSCHNITTE

Durch das neuropathologische Institut Gießen wurden die in Paraffin-fixierten Schnitte bereitgestellt. Durch das neuropathologische Institut wurden mittels Schlittenmikrotom die Glioblastom- und Kontrollpräparate in 3 µm dicke Gewebeschnitte zugeschnitten und nach anschließendem Wasserbad auf einem Objektträger fixiert.

2.4.2 REZEPTE UND ANSÄTZE

HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG (HE-FÄRBUNG)	<u>Hämatoxylin</u> : 1g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. unter Erwärmung auflösen, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure
-------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<u>Eosin</u> : 0,1 %iges wässriges Eosin mit 5 Tropfen 100 %iger Essigsäure vermischen
ETHYLENDIAMIN-TETRAACETAT-PUFFER (EDTA-PUFFER)	0,372 g Titriplex III (Merck) + 1 Liter Aqua dest; anschließend 40 %ige NaOH-Zugabe bis ein pH-Wert von 9,0 erreicht ist.
CITRAT-PUFFER	Durchführung nach der Gebrauchsanweisung von DCS: Verdünnung der 10x konzentrierten Lösung im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem Wasser (100 mL Citrat-Puffer auf 1 L); anschließende Überprüfung des pH-Werts und Einstellung auf pH 6,0 (+/- 0,2).
WASCH-PUFFER	Durchführung nach der Gebrauchsanweisung von DCS: Verdünnung des 20x konzentrierten Waschpuffers im Verhältnis 1:20 mit deionisiertem Wasser (500 mL auf 10 L); anschließende Überprüfung des pH-Werts und Einstellung auf pH 7,5 (+/- 0,2).
CHROMOGEN-3,3-DIAMINOBENZIDIN-TETRAHYDROCHLORID (DAB)	Durchführung nach der Gebrauchsanweisung von DCS: 1mL DAB-Substratpuffer und anschließende Hinzugabe von 1 Tropfen DAB-Konzentrat

Table 5: *Rezepte und Ansätze für die immunhistochemische Analyse*

2.4.3 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE

Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dies wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt: 5 Minuten in Xylol 1, 5 Minuten in Xylol 2 und jeweils 2 Minuten in Ethanol 100 %, in Ethanol 96 %, in Ethanol 70 % und in destilliertem Wasser. Da es in Folge der Gewebefixierung zu Vernetzungsreaktion/Maskierung kommen kann, welches die Antikörper-Bindung mit den Epitopen der Antigenoberfläche erschwert, sollte vor der eigentlichen Antigen-Antikörper-Reaktion eine Demaskierung erfolgen. Hierfür wurden die Gewebeschnitte von E-Cadherin, N-Cadherin und SNAI nach dem Bad in destilliertem Wasser für 15 Minuten in einer Citratpuffer-Küvette bei pH 6,0 in einem Steamer gekocht und anschließend für 15 Minuten in der Citratpuffer-Küvette abgekühlt. Die Gewebeschnitte

für Vimentin wurden ohne Vorbehandlung weiterverarbeitet. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte dreimal für 2 Minuten in destilliertem Wasser und dreimal für 2 Minuten in Tris-basiertem Waschpuffer, welches unspezifische Hintergrundbindungen verhindern soll, gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden nun am Rand abgetrocknet, mit einem Pap Pen umrandet und dann 100 µl des verdünnten Primärantikörpers dazu pipettiert (siehe Tabelle 6: Verdünnung der Antikörper). Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung und ein vollständiges Bedecken geachtet. Die darauffolgenden 60 Minuten Einwirkzeit wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG
Anti-E-Cadherin	1:100
Anti-N-Cadherin	1:2000
Anti-Vimentin	1:500
Anti-SNAI1 + -SLUG	1:1000

Tabelle 6: Verdünnung der Antikörper

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte dreimal für 2 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Um die Färbung/Visualisierungsreaktion einzuleiten, wurden die Gewebeschnitte für je 10 Minuten in Polymer-Enhancer sowie HRP-Polymer und für 7 Minuten in 200 µl DAB-Chromogen inkubiert. Zwischen diesen Inkubationsschritten wurden die Schnitte je dreimal für 2 Minuten in Waschpuffer gelegt. Während der Visualisierungsreaktion wurde das Chromogen 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) durch HRP (Horseradish peroxidase: engl. für *Peroxidase aus Meerrettich*) oxidiert und ein braunes Endprodukt gebildet. Um die Lokalisation der braunen Areale eindeutig zu erkennen, wird zu Kontrastbildung eine Gegenfärbung mit Hämotoxylin nach Meyer durchgeführt. Anschließend wird das überschüssige Hämotoxylin durch das sogenannte Bläuen für 2 Minuten mit Leitungswasser entfernt. Eingedeckt werden die Schnitte in folgender Reihenfolge: Ethanol 70%, Ethanol 96 %, Ethanol 100 %, Ethanol 100 %, Xylol 1 und Xylol 2 für je 2 Minuten. Im letzten Schritt wurde das Präparat durch ein Deckglas ohne Lufteinschlüsse abgedeckt und auf einer Heizplatte für 10 Minuten getrocknet.

2.4.4 POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE

Um den Erfolg der vorherigen Antigen-Antikörper- und Färbungsreaktion zu kontrollieren, wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle ausgearbeitet. Pro untersuchtem Glioblastom- und Kontrollgewebe wurde jeweils ein Gewebeschnitt nicht mit einem Primärantikörper behandelt, um so unspezifische Reaktionen der Polymere und Chromogene auszuschließen. Dies wurde als Negativkontrolle festgelegt.

Als Positivkontrolle diente Gewebe, das gesichert die Zielantigene exprimierte und eine Antigen-Antikörper-Reaktion auslöste. Folgende Tabelle 7 zeigt die zu den Antikörpern gehörenden Kontrollgewebe:

ANTIKÖRPER	KONTROLLGEWEBE
Anti-E-Cadherin	Humanes Hautgewebe
Anti-N-Cadherin	Humanes Herzmuskelgewebe
Anti-Vimentin	Humanes Adenokarzinom der Mamma
Anti-SNAI1 + - SLUG	Humanes Nierengewebe

Tabelle 7: Kontrollgewebe der Antikörper

2.4.5 AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE

Unter Gebrauch des binokularen Mikroskops Leica DMLB erfolgte die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte des Tumorgewebes. Mit Hilfe eines Rechteckrasters, das über die abfotografierten Bereiche des mikroskopischen Bildes projiziert wurde, konnte die Zählung erleichtert werden.

Das Präparat wurde zunächst komplett betrachtet, um die Qualität der Hämatoxylinfärbung zu beurteilen. Bei schwächeren Färbungen oder bei Überbelichtung überlagerten Regionen im Bild erfolgte eine Bildoptimierung mit dem Programm (Image J) (Kontrast-, Farb- und Helligkeitsanpassung).

Es wurden repräsentative und proliferationsaktive Tumorbereiche untersucht, Stellen mit Schnittartefakten, ausgeprägten Tumorblutungen, Nekrosen sowie stark vaskularisierten Regionen wurden ausgeschlossen.

An einer tumorreichen repräsentativen Stelle im Gewebeschnitt erfolgte die 40-fache Vergrößerung des Ausschnittes und die dreifache und anschließend gemittelte Zählung der Zellen. Dies diente zur Standardisierung, um eine Vergleichbarkeit der

Zahlen sicher zu stellen. Das Präparat wurde unter dem Mikroskop dabei nicht verschoben.

Die Auswertung der einzelnen Schnitte erfolgte durch folgende Punkte bei SNAI, SLUG und E-Cadherin:

1. Beurteilung der Farbintensität: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Farbintensität, 2 = mäßige Farbintensität, 3 = starke Farbintensität
2. Prozentuale Anteil: Auszählung aller gefärbten und aller nicht gefärbten Zellen sowie der Bildung des prozentualen Verhältnisses der gefärbten zu nicht gefärbten Zellen (siehe Tabelle 8).
3. Ermittlung des Expressionswert: Produkt aus dem Wert der Farbintensität (Wert 0-3) und dem zugeordneten Zahlenwert der prozentualen Verteilung der gefärbten Zellen (Wert 1-10).

Prozentuale Anteil der gefärbten Zellen	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100%
Wert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Tabelle 8: Prozentuale Anteil der gefärbten Zellen und der zugeordnete Zahlenwert

Da es sich bei Vimentin und N-Cadherin um zytoplasmatische Antikörper handelt und hierdurch Zellgrenzen nicht abgrenzbar waren, erfolgte die Auswertung der Schnitte von Vimentin und N-Cadherin ausschließlich nach Intensität der Färbung.

Beurteilung der Farbintensität: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Farbintensität, 2 = mäßige Farbintensität, 3 = starke Farbintensität.

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS (International Business Machines Corporation (IBM), Version 24) und Microsoft® Excel 2010 durchgeführt. Im Rahmen der beschreibenden Statistik wurden die Kenngrößen Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum und das 95 % Konfidenzintervall errechnet.

Vor Verwendung des t-Tests für unabhängige/unverbundene Stichproben wurde zur Signifikanzberechnung die Normalverteilung geprüft und abschließend als Erweiterung eine einfaktorische Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) durchgeführt. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurden als nicht parametrische Tests der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Die Beziehung zwischen Gen-Expression, progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Methode und log-rank Test analysiert. Hierfür wurden die Patienten zusätzlich in Gruppen mit hohen und niedrigen Gen-Expressionen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte anhand des Medians, dabei wurden die Patienten in die Gruppe mit niedriger Expression eingeteilt, wenn der Expressionswert kleiner oder gleich des Medians war. Lag der Expressionswert über dem Median erfolgte die Einteilung der Patienten in die Gruppe mit der hohen Expression.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots, Balken- und Liniendiagramme erstellt. Es wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV

		N	%
Fallzahl		42	100
Durchschnittsalter (in Jahren)	Insgesamt	63,5 ± 11,58	
	Männlich	64,21 ± 12,84	
	Weiblich	62,93 ± 9,73	
Medianes progressionsfreies Überleben	5,36 Monate (SE: 0,853; 95 % CI: 3,688 – 7,032)		
Medianes Gesamtüberleben	10,59 Monate (SE: 1,777; 95 % CI: 7,107 – 14,073)		
Geschlecht	Männlich	28	66,67 %
	Weiblich	14	33,33 %
Art des Glioms	Primäres Glioblastom	42	100 %
Methylierungsstatus	Positiv	24	57,57 %
	Negativ	18	42,43 %
IDH-Status	IDH-mutiert	0	0 %
	IDH-Wildtyp	38	90,48 %
	Keine Angabe	4	9,52 %
Initiale operative Therapie	Teilresektion	11	26,19 %
	Komplette Resektion	29	69,05 %
	Biopsie	2	4,76 %
Anschließende Therapie	Alleinige Resektion	1	2,38 %
	Alleinige Radiatio mit 60 Gy	1	2,38 %
	Adjuvante Radiochemotherapie mit Temozolomid und 60 Gy	40	95,24 %

Tabelle 9: Patientenkollektiv

3.2 MGMT-EXPRESSION BEI GLIOBLASTOMEN

Der MGMT-Methylierungsstatus wurde bei 42 Patienten untersucht. 24 Glioblastom-Patienten zeigten eine MGMT-Methylierung, bei 18 Patienten konnte man diese nicht nachweisen (siehe Tabelle 9). Wie in Abbildung 1 zu sehen, zeigten die Patienten mit einem MGMT-methylierten Glioblastom im Vergleich zu den Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen ein signifikant verlängertes medianes Gesamtüberleben ($p = 0,005$) und ein signifikant verlängertes medianes progressionsfreies Überleben ($p = 0,002$). Hierbei zeigten die Patienten mit einem MGMT-methylierten Glioblastom ein medianes Gesamtüberleben von 13,7 Monaten (SE: 1,911; 95 % CI: 9,995 – 17,485). Die Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen hingegen überlebten im Median nur 9,2 Monate (SE: 1,739, 95 % CI: 5,761 – 12,597). Betrachtet man das mediane progressionsfreie Überleben blieben die Patienten mit einem positiven MGMT-Methylierungsstatus 9,2 Monate (SE: 2,339; 95 % CI: 4,585 – 13,755) und Patienten mit einem negativen MGMT-Status 4,7 Monate (SE: 0,35; 95 % CI: 4,044 – 5,416) progressionsfrei (siehe Abbildung 1).

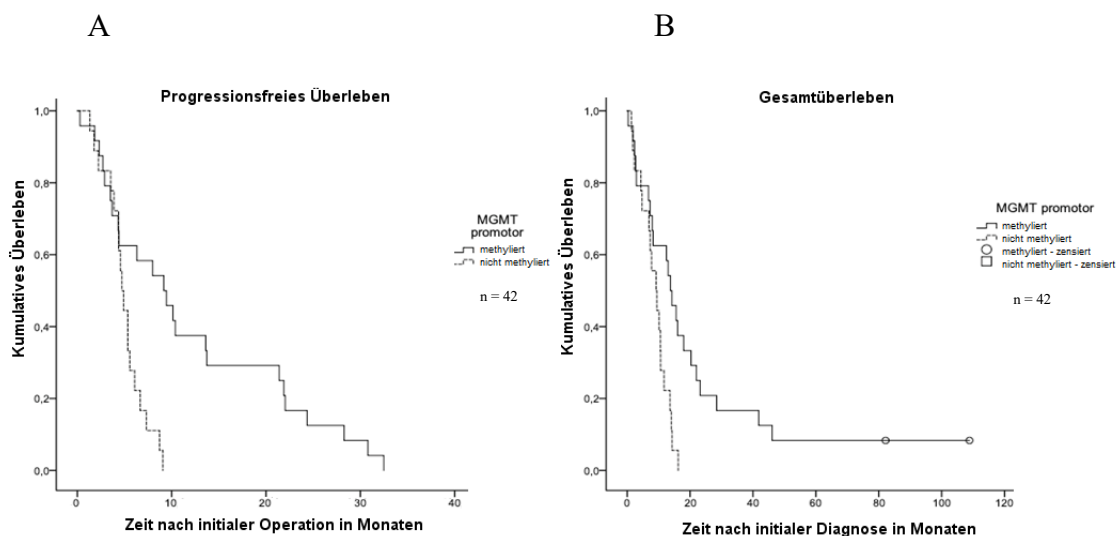


Abbildung 1: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit des MGMT-Methylierungsstatus:

Glioblastompatienten mit einer methylierten MGMT-Promotorregion wiesen ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($p = 0,005$) (B) und progressionsfreies Überleben ($p = 0,002$) (A) auf.

3.3 GENEXPRESSIONSANALYSE AUF RNA-EBENE IM TUMORGEWEBE UND IM GESUNDEN HIRNGEWEBE

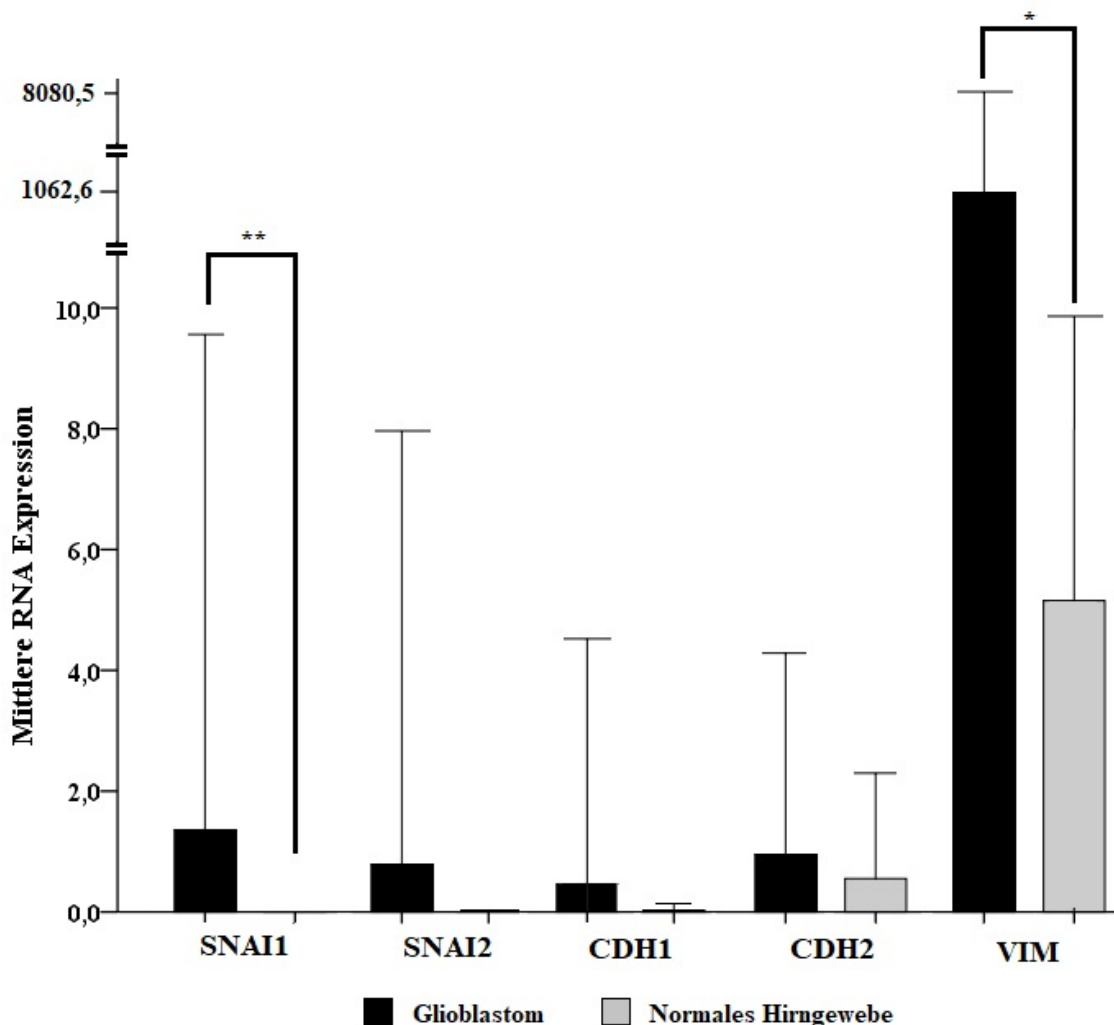


Abbildung 2: Genexpressionsanalyse auf RNA-Ebene im Tumorgewebe und im gesundem Hirngewebe:

Es konnten eine statistisch signifikante Überexpression von *SNAI1* ($p = 0,033$) und *VIM* ($p = 0,026$) sowie eine statistisch nicht signifikante Überexpression von *SNAI2* ($p = 0,342$), *CDH2* ($p = 0,426$) und *CDH1* ($p = 0,386$) im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalhirngewebe herausgestellt werden.

Die Expression von SNAI1 wurde mittels qRT-PCR von 36 Glioblastompräparaten und 5 gesunde Hirnpräparaten untersucht. Im Vergleich zu den gesunden Hirnpräparaten (MW: 0,002; SD: 0,001) konnte in den Glioblastompräparaten (MW: 1,359; SD: 4,101227,789) eine signifikante Überexpression von SNAI1 auf RNA-Ebene ermittelt werden ($p = 0,033$). Dies wird in Abbildung 2 dargestellt.

In der qRT-PCR wurde die Expression von SNAI2 in 37 Glioblastompräparaten und 5 gesunden Hirnpräparaten untersucht. SNAI2 wird im Tumorgewebe mit einem Mittelwert von 0,789 (SD: 3,589) im Vergleich zu den gesunden Hirngeweben mit einem Mittelwert von 0,009 (SD: 0,010) überexprimiert. Dieser RNA-Expressionsunterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,342$) (siehe Abbildung 2).

Mittels qRT-PCR wurde die Expression von CDH2 (kodiert für N-Cadherin) von 36 Glioblastompräparaten und 5 gesunden Hirnpräparaten untersucht. Die Abbildung 2 zeigt eine nicht signifikante ($p = 0,426$) Überexpression von CDH2 im Tumorgewebe (MW: 0,952; SD: 1,666) in Gegenüberstellung zum Normalhirngewebe (MW: 0,553; SD: 0,872).

Die Expression von CDH1 (kodiert für E-Cadherin) wurde bei 39 Glioblastompräparaten und 5 gesunden Hirnpräparaten mittels qRT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, zeigte sich eine nicht signifikante ($p = 0,386$) Überexpression von CDH1 im Tumorgewebe (MW: 0,462; SD: 2,03) im Gegensatz zum Normalhirngewebe (MW: 0,031; SD: 0,054).

Die RNA-Expression von VIM (kodiert für Vimentin) wurde von 39 Glioblastompräparaten und 5 gesunden Hirnpräparaten durch die qRT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 2 dargestellt wird, zeigte sich ein signifikante ($p = 0,026$) Überexpression von Vimentin im Tumorgewebe (MW: 1062,57; SD: 4040,47) im Vergleich zum Normalhirngewebe (MW: 5,152; SD: 3,146).

3.4 PROTEINEXPRESSIONSANALYSE IM TUMORGEWEBE UND IM GESUNDEN HIRNGEWEBE

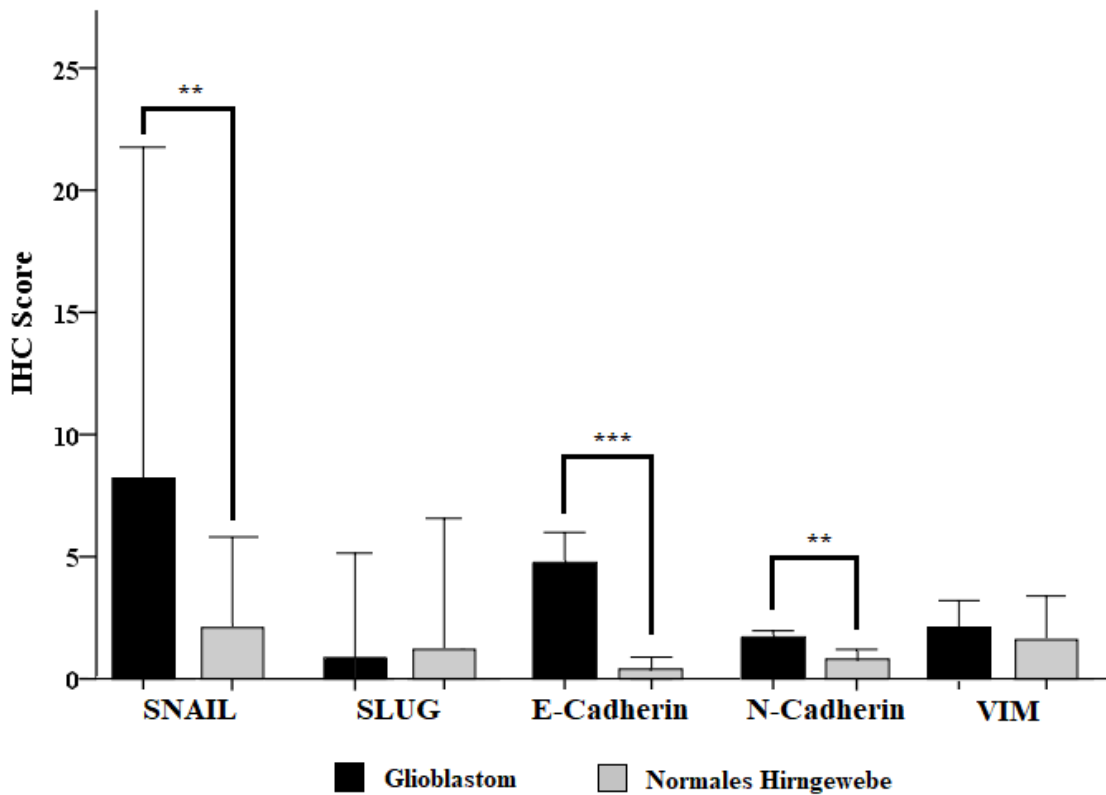


Abbildung 3: Proteinexpressionsanalyse im Tumorgewebe und im gesundem Hirngewebe:

Die Abbildung zeigt eine statistisch signifikante Überexpression von SNAIL ($p = 0,012$), N-Cadherin ($p = 0,001$) und E-Cadherin ($p < 0,001$) im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalhirngewebe. Keinen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Hirngewebe zeigte sich bei SLUG ($p = 0,925$) und VIM ($p = 0,159$) auf Proteinebene.

Mittels Immunhistochemie erfolgte die Analyse der Proteinexpression bei 42 Glioblastomen und 5 gesunden Hirnpräparaten. Abbildung 3 zeigte eine gesteigerte Expression von SNAIL in Glioblastomen (MW: 8,2; SD: 6,781) im Vergleich zu gesunden Hirnpräparaten (MW: 2,00; SD: 1,871). Die Proteinexpression von SNAIL war hier signifikant erhöht ($p = 0,012$). Zudem konnte eine Überexpression von N-Cadherin (MW: 1,84; SD: 0,52) im Unterschied zum Normalhirngewebe (MW: 0,80; SD: 0,447) gezeigt werden. Der Expressionsunterschied war dabei statistisch signifikant ($p = 0,001$) (siehe Abbildung 3). Die immunhistochemische Analyse zeigte außerdem, dass E-Cadherin im Tumorgewebe (MW: 4,96; SD: 4,232) signifikant ($p < 0,001$) in

Gegenüberstellung zum Normalhirngewebe (MW: 0,4; SD: 0,548) überexprimiert wird (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3 zeigt keine signifikant ($p = 0,925$) erhöhte Expression von SLUG im gesunden Hirngewebe (MW: 1,20; SD: 2,683) im Vergleich zu dem Glioblastomgewebe (MW: 0,867; SD: 2,128) und keine signifikant ($p = 0,159$) erhöhte Expression von Vimentin im Tumorgewebe (MW: 2,09; SD: 0,557) im Gegensatz zum Normalhirngewebe (MW: 1,60; SD: 0,894).

3.5 EXPRESSIONSUNTERSCHIED IN MGMT-METHYLIERTEN UND MGMT-UNMETHYLIERTEN GLIOBLASTOMEN AUF RNA- UND PROTEINEBENE

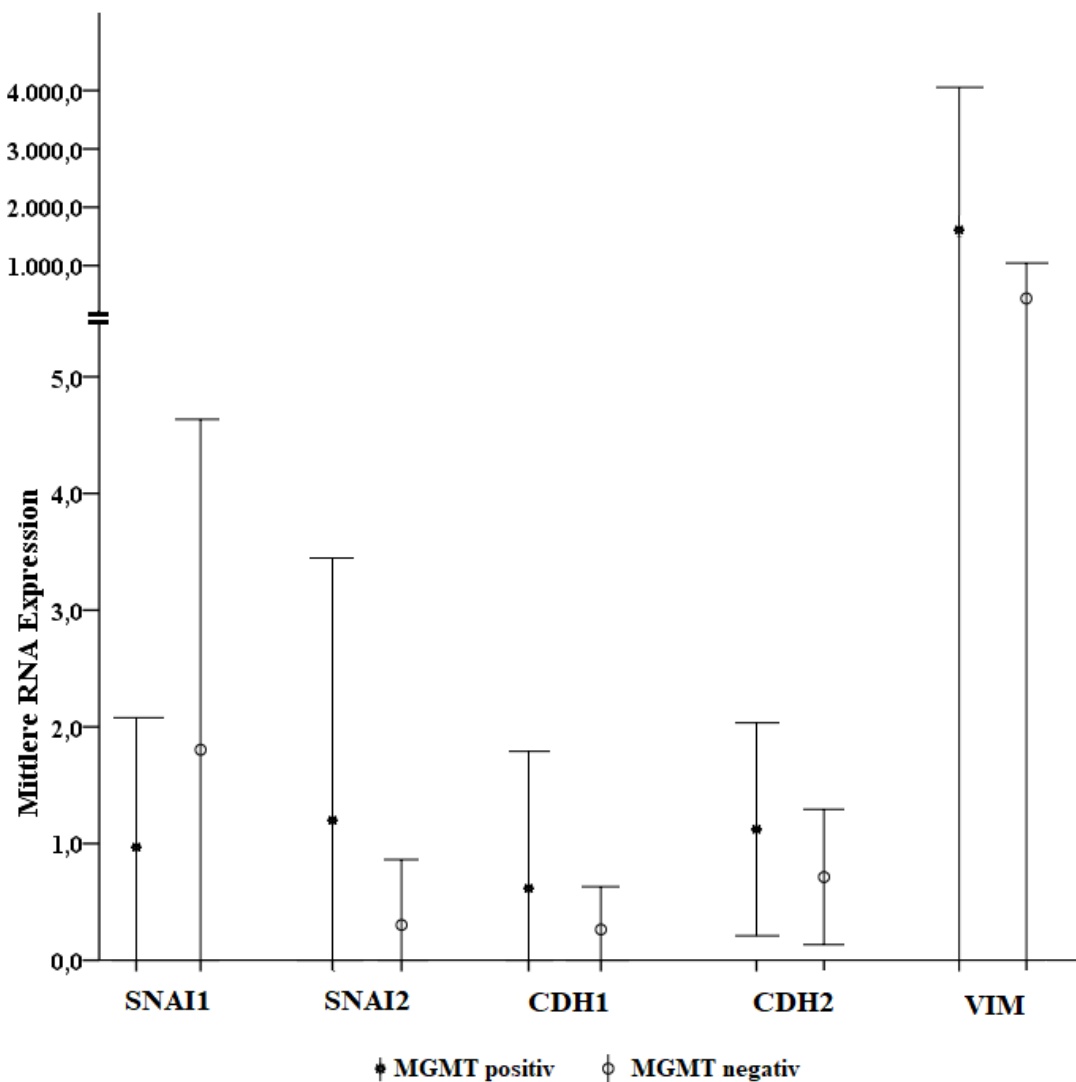


Abbildung 4: RNA-Expression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus: Auf RNA-Ebene ergab sich kein signifikanter Unterschied in der SNAI1, SNAI2, CHD1, CHD2 und VIM Expression beim Vergleich von MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen.

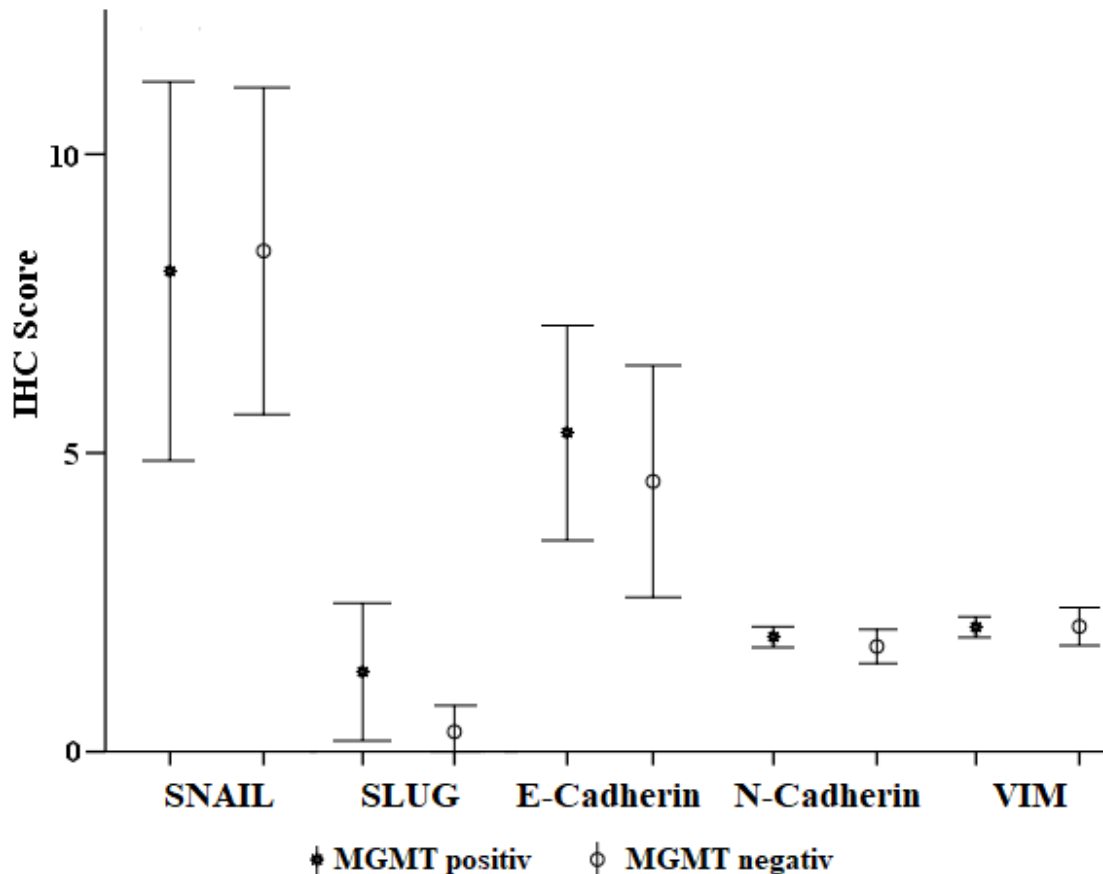


Abbildung 5: Proteinexpression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus: Auf Proteinebene ergab sich kein signifikanter Unterschied in der VIM, N-Cadherin, E-Cadherin, SNAI1 und SLUG Expression beim Vergleich von MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen.

Es zeigte sich beim Vergleich des Expressionsunterschiedes von SNAI1/SNAI2 in MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene kein signifikanter Expressionsunterschied. Die durchschnittliche SNAI2-Expression in der Immunhistochemie bei MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 8,042; SD: 7,515) und bei MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 8,381; SD: 6,012) war nicht signifikant ($p = 0,584$). Die durchschnittliche SNAI1-Expression in der qRT-PCR zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,778$) zwischen den MGMT-methylierten (MW: 0,96; SD: 2,321) und MGMT-unmethylierten (MW: 1,804; SD: 5,508) Glioblastomen.

In Gegenüberstellung der Expressionsunterschiede von SNAI2/SLUG in MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen zeigte sich auch sowohl auf RNA- als auch auf der Proteinebene kein signifikanter Unterschied. Die durchschnittliche SLUG-Expression in der Immunhistochemie zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,422$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 1,333; SD: 2,729) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 0,333; SD: 0,966). Die durchschnittliche SNAI2-Expression in der qRT-PCR wies keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,478$) zwischen den MGMT-methylierten (MW: 1,202; SD: 4,796) und MGMT-unmethylierten (MW: 0,302; SD: 1,092) Glioblastomen auf.

Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der CDH2/N-Cadherin Expression bei MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen. Die durchschnittliche N-Cadherin-Expression in der Immunhistochemie zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,270$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 1,92; SD: 0,408) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 1,76; SD: 0,625). Die durchschnittliche CDH2-Expression in der qRT-PCR zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,526$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 1,122; SD: 2,004) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 0,712; SD: 1,047).

Zwischen MGMT-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CDH1/E-Cadherin Expression auf RNA- und Proteinebene. Die durchschnittliche E-Cadherin-Expression in der Immunhistochemie zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,527$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 5,33; SD: 4,26) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 4,52; SD: 4,262). Die durchschnittliche CDH1-Expression in der qRT-PCR zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,726$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 0,616; SD: 2,647) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 0,263; SD: 2,03).

Sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Vimentin-Expression beim Vergleich von MGMT-methylierten und MGMT-unmethylierten Glioblastomen. Die durchschnittliche Vimentin-Expression in der Immunhistochemie zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,867$) zwischen MGMT-methylierten Glioblastomen (MW: 2,08; SD: 0,408) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 2,1; SD: 0,7). Die durchschnittliche Vimentin-Expression in der qRT-PCR zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,512$) zwischen MGMT-

methylierten Glioblastomen (MW: 1598,974; SD: 5394,266) und MGMT-unmethylierten Glioblastomen (MW: 436,765; SD: 1220,171).

3.6 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN

	SNAIL		SLUG		E-CADHERIN		VIMENTIN	
	Hohe Expression	Niedrige Expression	Hohe Expression	Niedrige Expression	Hohe Expression	Niedrige Expression	Hohe Expression	Niedrige Expression
Progressionsfreies Überleben (alle Patienten)	4,4 Monate	8,7 Monate	3,5 Monate	5,6 Monate	7,33 Monate	4,57 Monate	6,08 Monate	5,35 Monate
	p = 0,357		p = 0,924		p = 0,179		p = 0,723	
Gesamtüberleben (alle Patienten)	7,99 Monate	13,61 Monate	4,7 Monate	11,7 Monate	10,65 Monate	9,17 Monate	6,94 Monate	10,59 Monate
	p = 0,615		p = 0,95		p = 0,189		p = 0,785	
Progressionsfreies Überleben (bei MGMT-methylierten Patienten)	4,4 Monate	10,4 Monate	3,52 Monate	9,44 Monate	10,39 Monate	9,17 Monate	21,9 Monate	7,99 Monate
	p = 0,932		p = 0,741		p = 0,534		p = 0,311	
Progressionsfreies Überleben (bei MGMT-unmethylierten Patienten)	4,57 Monate	4,9 Monate	4,73 Monate	4,9 Monate	5,56 Monate	4,37 Monate	4,73 Monate	4,9 Monate
	p = 0,236		p = 0,83		p = 0,005		p = 0,489	
Gesamtüberleben (bei MGMT-methylierten Patienten)	8,25 Monate	15,58 Monate	8,25 Monate	14,24 Monate	16,01 Monate	12,99 Monate	23,21 Monate	12,99 Monate
	p = 0,797		p = 0,606		p = 0,465		p = 0,19	
Gesamtüberleben (bei MGMT-unmethylierten Patienten)	7,33 Monate	10,59 Monate	4,73 Monate	10,13 Monate	10,13 Monate	7,76 Monate	4,73 Monate	10,13 Monate
	p = 0,271		p = 0,012		p = 0,657		p = 0,159	

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens mit und ohne MGMT-Stratifizierung

3.6.1 SNAIL

3.6.1.1 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Bei den Patienten mit einer hohen SNAIL Expression betrug das mediane progressionsfreie Überleben 4,4 Monate (SE: 0,257; 95 % CI: 3,906 – 4,914). Dahingegen zeigte sich bei den Patienten mit einer niedrigen SNAIL Expression ein medianes progressionsfreies Überleben von 8,7 Monaten (SE: 2,234; 95 % CI: 4,332 – 13,088). Patienten mit einer hohen SNAIL Expression zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 7,99 Monaten (SE: 1,029; 95 % CI: 5,974 – 10,006), die Glioblastompatienten mit einer niedrigen SNAIL Expression ein medianes Gesamtüberleben von 13,61 Monaten (SE: 1,97; 95 % CI: 9,749 – 17,471). Ein statistisch signifikanter Unterschied des medianen progressionsfreien Überlebens ($p = 0,357$) und des Gesamtüberlebens ($p = 0,615$) zeigte sich nicht (siehe Abbildung 6).

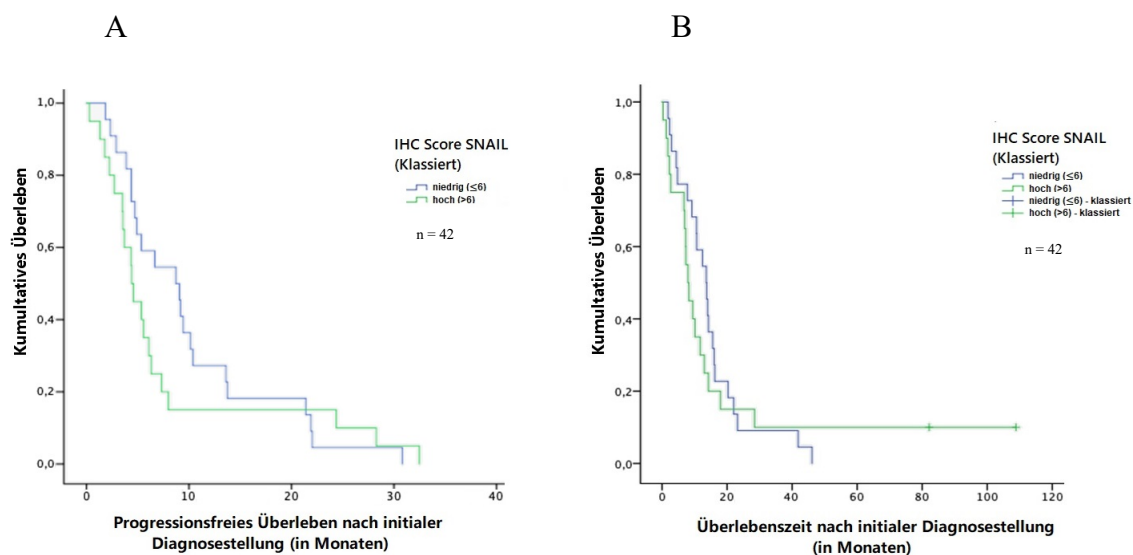


Abbildung 6: Progressionsfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Abhängigkeit von der SNAIL Expression auf Proteinebene:

Glioblastompatienten mit einer hohen SNAIL Expression zeigten ein progressionsfreies Überleben von 4,4 Monaten im Vergleich zu 8,7 Monaten bei niedriger Expression ($p = 0,357$). Patienten mit einer hohen SNAIL Expression zeigten ein Gesamtüberleben von 7,99 Monaten im Unterschied zu 13,61 Monaten bei niedriger Expression ($p = 0,615$).

3.6.1.2 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Auf Proteinebene zeigte sich in der immunhistochemischen Analyse bei den Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit hoher SNAIL Expression ein medianes progressionsfreies Überleben von 4,4 Monaten (SE: 1,448; 95 % CI: 1,572 – 7,248). Im Vergleich dazu wiesen die Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit einer niedrigen SNAIL Expression ein medianes progressionsfreies Überleben von 10,4 Monaten (SE: 2,498; 95 % CI: 5,493 – 15,287) auf. Hierbei gab es keine signifikante Verkürzung des progressionsfreien Überlebens bei Vergleich von hoher und niedriger SNAIL Expression ($p = 0,932$).

Bei den Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen stellte die Immunhistochemie kein signifikanter Unterschied ($p = 0,236$) des medianen progressionsfreien Überlebens zwischen hoher (4,57 Monate; SE: 1,521; 95 % CI: 1,59 – 7,55) und niedriger (4,9 Monate; SE: 0,253; 95 % CI: 4,403 – 5,397) SNAIL Expression fest (siehe Abbildung 7).

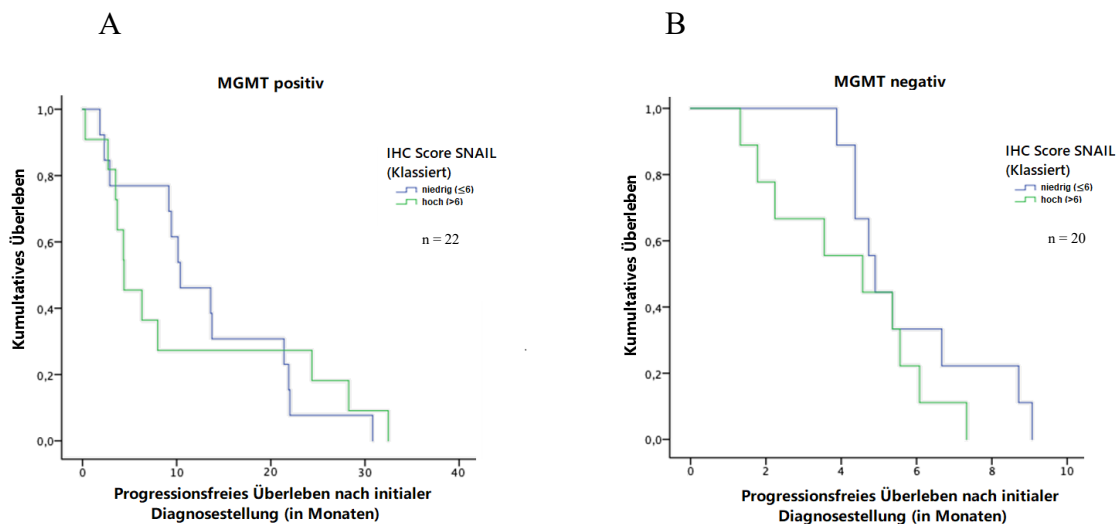


Abbildung 7: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der SNAIL Expression bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus:

Patienten mit einem positiven MGMT-Methylierungsstatus und einem simultan vorliegenden hohen SNAIL Expression zeigten ein medianes progressionsfreies Überleben von 4,4 Monaten im Vergleich zu 10,4 Monaten bei niedriger SNAIL Expression ($p = 0,932$). Patienten mit einem negativen MGMT-Methylierungsstatus und hoher SNAIL Expression (4,57 Monate) wiesen im Vergleich zu einer niedrigen SNAIL

Expression (4,9 Monate) kein signifikanter Unterschied im medianen progressionsfreien Überleben auf ($p = 0,236$).

3.6.1.3 GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SNAIL-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

In Anlehnung an die immunhistochemische Analyse ergab sich, dass Patienten mit einem MGMT-methyliertem Glioblastom und simultan erhöhter SNAIL Expression (8,25 Monate; SE: 3,132; 95 % CI: 2,111 – 14,389) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen SNAIL Expression (15,58 Monate; SE: 1,36; 95 % CI: 12,914 – 18,246) keinen statistisch signifikanten Unterschied des medianen Gesamtüberleben hatten ($p = 0,797$).

Bei den Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit hoher SNAIL Expression zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 7,33 Monaten (SE: 0,581; 95 % CI: 6,19 – 8,47). Die MGMT-unmethylierten Glioblastome mit niedriger SNAIL Expression überlebten 10,59 Monaten (SE: 2,117; 95 % CI: 6,441 – 14,739).

Die Überexpression von SNAIL zeigt keinen signifikanten Unterschied des medianen Gesamtüberlebens bei MGMT-methylierten ($p = 0,797$) und -unmethylierten ($p = 0,271$) Patienten (siehe Abbildung 8).

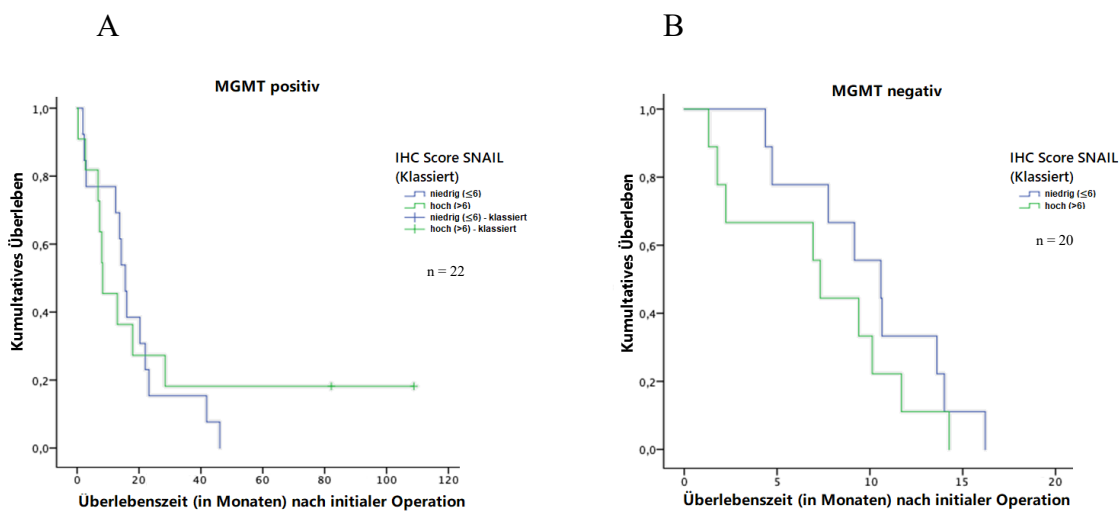


Abbildung 8: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SNAIL Expression bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus:

Die Überexpression von SNAIL zeigt keinen signifikanten Unterschied des medianen Gesamtüberlebens bei MGMT-methylierten ($p = 0,797$) und -unmethylierten ($p = 0,271$) Patienten.

3.6.2 SLUG (SNAI2)

3.6.2.1 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SLUG-EXPRESSIONS AUF PROTEINEBENE

Die immunhistochemische Analyse der Proteinexpression ergab, dass das mediane progressionsfreie Überleben und das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher und niedriger SLUG Expression keinen Unterschied zeigten. Eine statistische Signifikanz konnte für das mediane progressionsfreie Überleben ($p = 0,924$) und das mediane Gesamtüberleben ($p = 0,95$) nicht gezeigt werden.

Bei Patienten mit einer hohen SLUG Expression im Tumorgewebe ergab sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 3,5 Monaten (SE: 1,301; 95 % CI: 0,97 – 6,07), im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen SLUG Expression im Tumorgewebe mit einem medianen progressionsfreien Überleben von 5,6 Monaten (SE: 0,822; 95 % CI: 3,949 – 7,171).

In der Analyse des medianen Gesamtüberlebens zeigte sich bei hoher SLUG Expression ein Gesamtüberleben von 4,7 Monaten (SE: 3,14; 95 % CI: 0 – 10,844) im Vergleich zu einer niedrigen SLUG Expression von 11,7 Monaten (SE: 1,749; 95 % CI: 8,271 – 15,129) (siehe Abbildung 9).

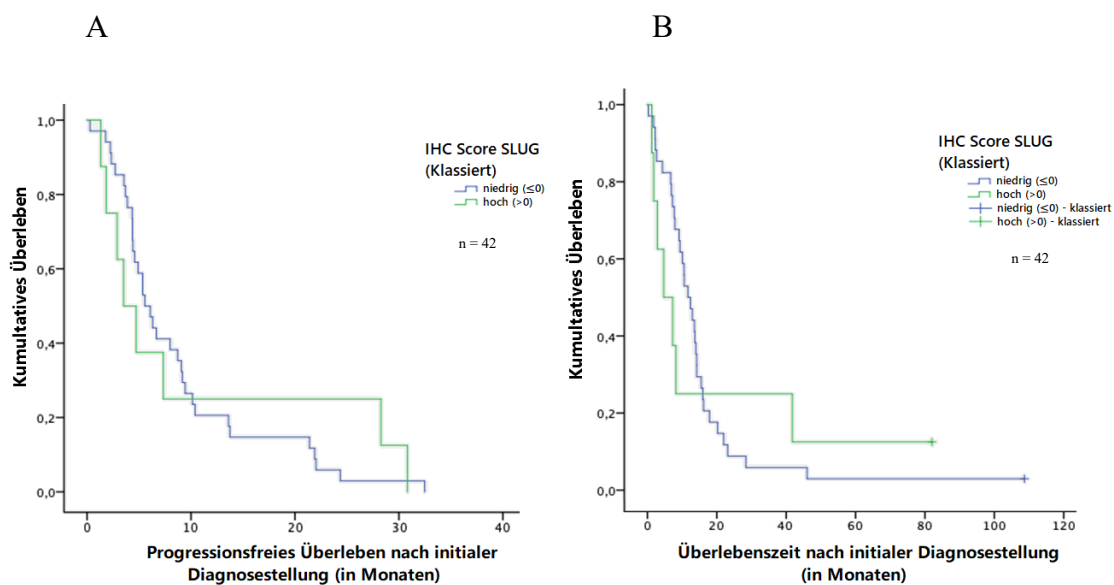


Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Abhängigkeit der SLUG Expression auf Proteinebene:

Eine hohe SLUG Expression geht mit keiner signifikanten Verkürzung sowohl des progressionsfreien Überlebens ($p = 0,924$) (a) als auch des Gesamtüberlebens ($p = 0,95$) (b) einher.

3.6.2.2 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SLUG-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Bei den Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit hoher SLUG Expression ergab sich in der Analyse der Proteinexpression ein medianes progressionsfreie Überleben von 3,52 Monaten (SE: 0,69; 95 % CI: 2,167 – 4,87). Konträr dazu zeigte sich bei Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit niedriger SLUG Expression ein medianes progressionsfreies Überleben von 9,44 Monaten (SE: 1,553; 95 % CI: 6,397 – 12,483). Ein signifikanter Unterschied im medianen progressionsfreien Überleben konnte im statistischen Vergleich der MGMT-methylierten Glioblastome mit hoher und niedriger SLUG nicht gezeigt werden ($p = 0,741$).

In der Immunhistochemie zeigte sich bei Patienten mit MGMT-unmethylierten eine kein signifikanter Unterschied ($p = 0,83$) des medianen progressionsfreien Überlebens bei hoher SLUG Expression (4,73 Monate; SE: 2,784; 95 % CI: 0 – 10,187) im Gegensatz zu einer niedrigen SLUG Expression (4,9 Monate; SE: 0,478; 95 % CI: 3,963 – 5,837) (siehe Abbildung 10).

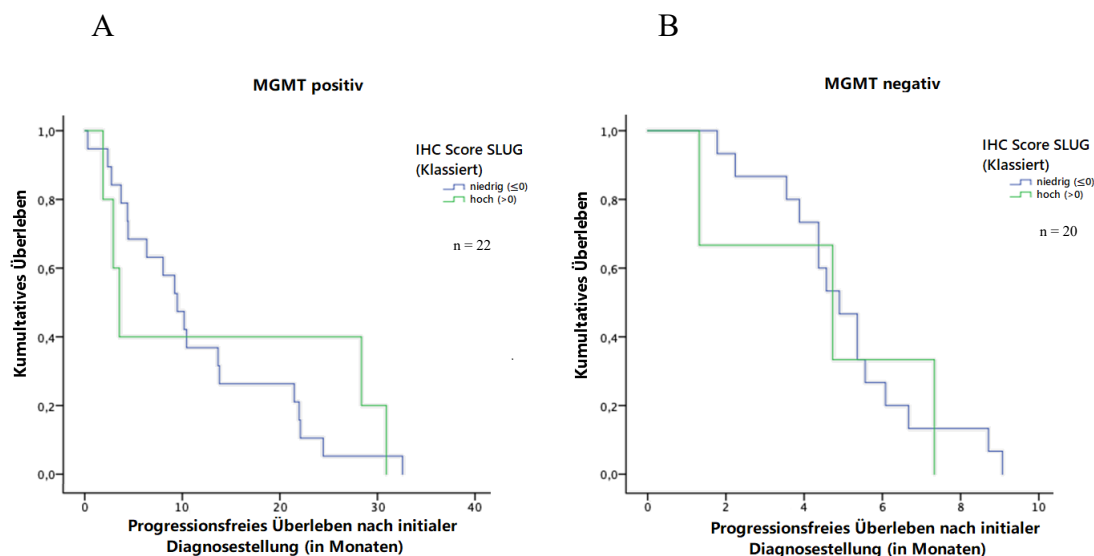


Abbildung 10: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von der SLUG Expression bei positiven (a) und negativen (b) Methylierungsstatus:

Eine Überexpression von SLUG zeigt keinen signifikanten Unterschied des progressionsfreien Überlebens bei MGMT-methylierten ($p = 0,741$) und MGMT-unmethylierten ($p = 0,83$) Glioblastompatienten.

3.6.2.3 GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER SLUG-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

In der Analyse der Proteinexpression in Bezug auf das mediane Gesamtüberleben zeigte sich bei Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit hoher SLUG Expression (8,25 Monate; SE: 5,872; 95 % CI: 0 - 19,758) im Vergleich zu Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit niedriger SLUG-Expression (14,24 Monate; SE: 1,879; 95 % CI: 10,557 – 17,923) kein signifikant verkürztes medianes Gesamtüberleben ($p = 0,606$).

Bei den Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit hoher SLUG Expression betrug das mediane Gesamtüberleben 4,73 Monaten (SE: 2,784; 95 % CI: 0 – 10,187). Im Unterschied dazu zeigte sich bei Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit einer niedrigen SLUG Expression ein medianes Gesamtüberleben von 10,13 Monaten (SE: 0,915; 95 % CI: 8,337 – 11,923). Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$) festgestellt werden (siehe Abbildung 11).

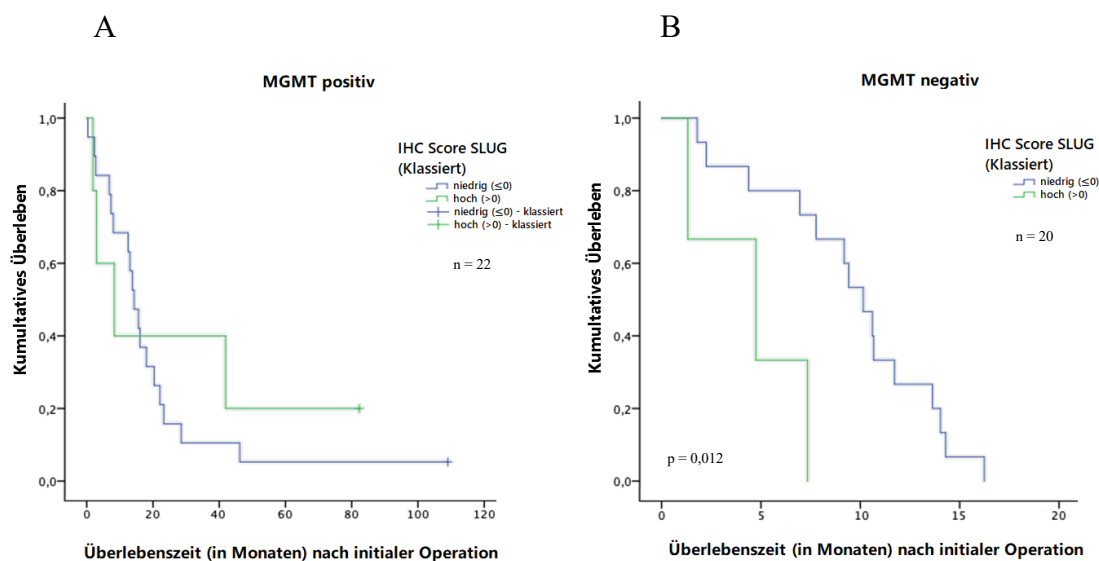


Abbildung 11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SLUG Expression bei positiven (a) und negativen (b) Methylierungsstatus:

Bei MGMT-methylierten Glioblastopatienten führte eine Überexpression von SLUG zu keinem signifikanten Unterschied des Gesamtüberlebens. Bei MGMT-unmethylierten Glioblastopatienten zeigte sich bei simultan vorliegender SLUG Überexpression ein signifikante ($p = 0,012$) Verkürzung des Gesamtüberlebens.

3.6.3 N-CADHERIN

3.6.3.1 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN VON DER N-CADHERIN AUF PROTEINEBENE UND IN ABHÄNGIGKEIT DES MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS

Durch eine Patientenzahl von 42 und durch die Verwendung des Medians zur Trennung in hohe und niedrige Expression von N-Cadherin wurden die Überlebensgrafiken in Abbildung 11, 12 und 13 erzeugt. Hier bestand das Patientenkollektiv mit hoher N-Cadherin Expression nur aus einer beziehungsweise zwei Personen, sodass keine statistische Aussage über das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben mit und ohne Stratifizierung nach MGMT-Methylierungsstatus bei diesen Expressionscharakteristika in diesem Kollektiv getroffen werden konnte.

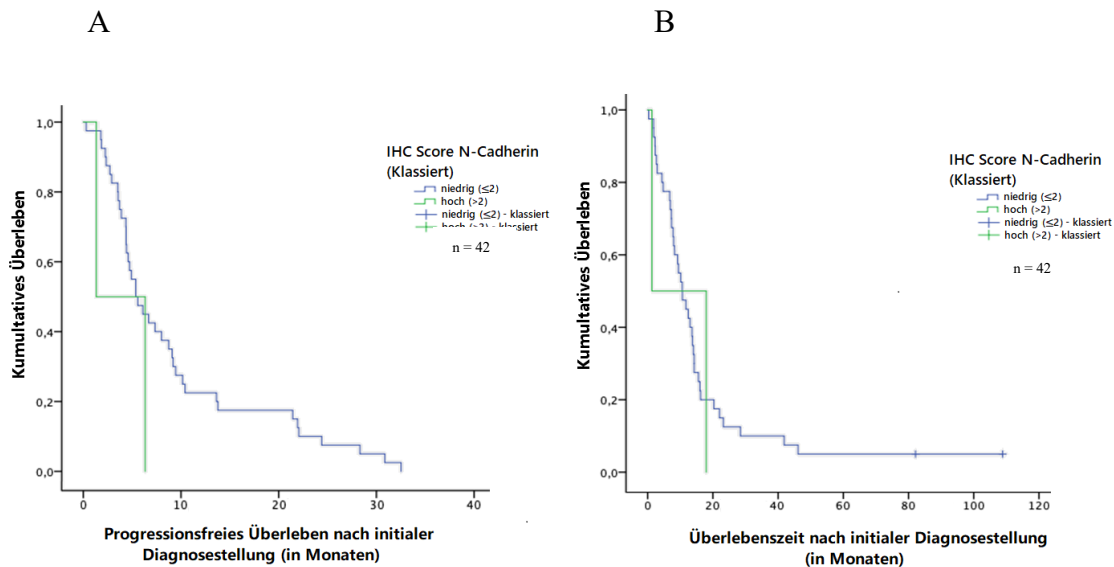


Abbildung 12: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der N-Cadherin Expression auf Proteinebene:

Auf Grundlage der Expressionscharakteristika von N-Cadherin in diesem Patientenkollektiv konnte keine statistische Aussage bezüglich des progressionsfreien Überlebens (A) und des Gesamtüberlebens (B) getroffen werden.

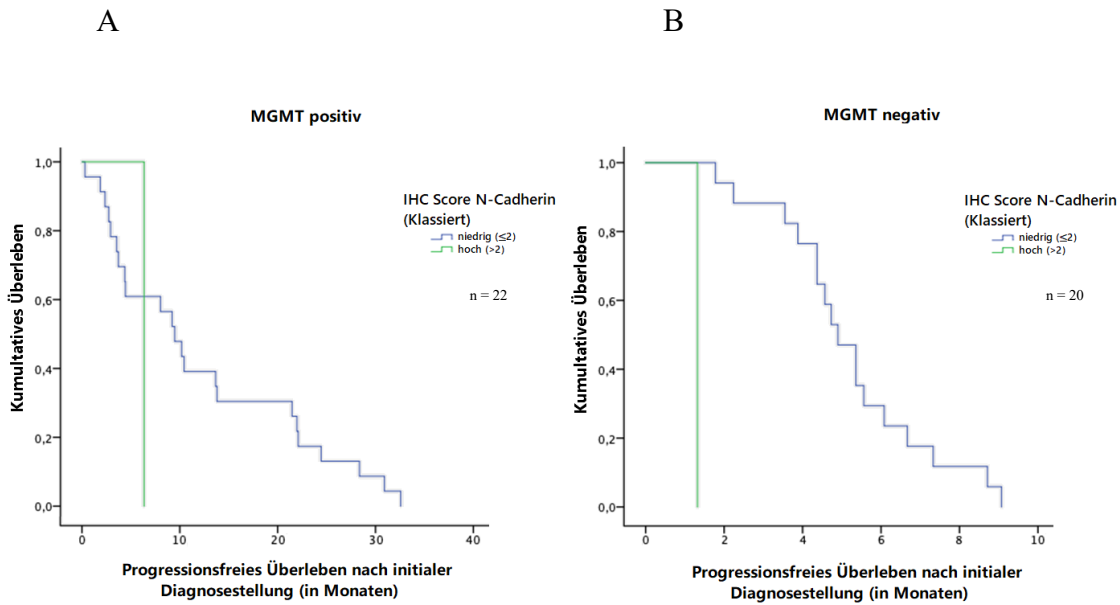


Abbildung 13: Progressionsfreies Überleben bei positiven (A) und negativen MGMT-Methylierungsstatus (B) in Abhängigkeit von der N-Cadherin Expression: Da das Patientenkollektiv mit hoher N-Cadherin Expression nur aus einem Patienten bestand, kann keine statistische Aussage bezüglich des medianen progressionsfreien Überlebens bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus getroffen werden.

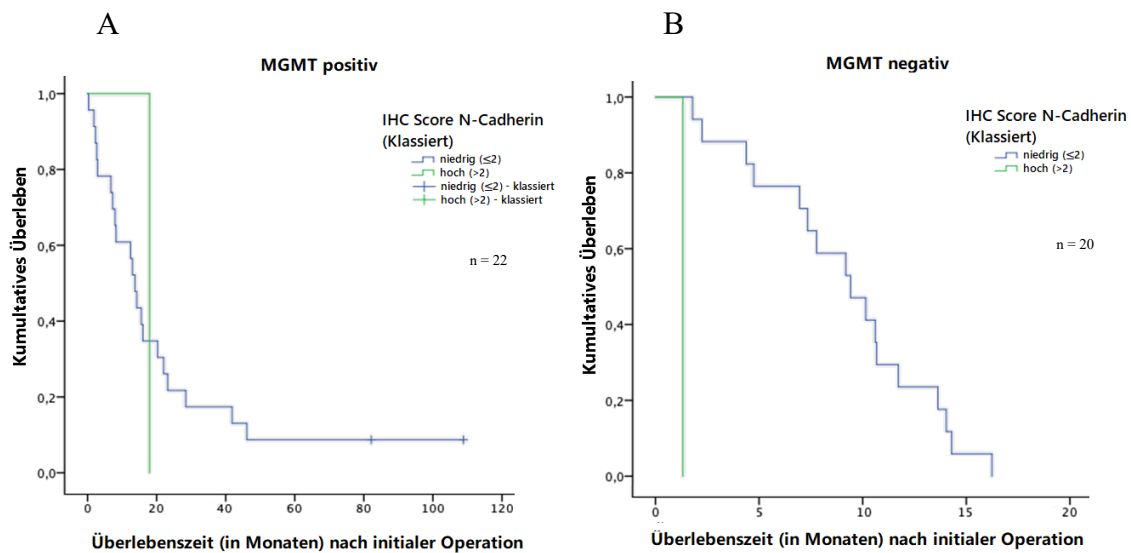


Abbildung 14: Gesamtüberleben bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der N-Cadherin Expression: Da das Patientenkollektiv mit hoher N-Cadherin Expression nur aus einem Patienten bestand, kann keine statistische Aussage bezüglich des medianen Gesamtüberlebens bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus getroffen werden.

3.6.4 E-CADHERIN

3.6.4.1 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Wie in der Abbildung 15 zu erkennen ist, zeigte sich im Rahmen der Expressionsanalyse von E-Cadherin auf Proteinebene kein statistisch signifikanter Unterschied des medianen progressionsfreien Überlebens ($p = 0,179$) und des medianen Gesamtüberlebens ($p = 0,189$) bei den Patienten mit hoher E-Cadherin Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger E-Cadherin Expression.

Patienten mit einer hohen E-Cadherin Expression wiesen ein medianes progressionsfreies Überleben von 7,33 Monate (SE: 1,68; 95 % CI: 4,037 – 10,623) im Gegensatz zu Patienten mit einer niedrigen E-Cadherin Expression von 4,57 Monate (SE: 0,338; 95 % CI: 3,908 – 5,232) auf ($p = 0,179$).

Patienten, die eine hohe E-Cadherin Expression aufwiesen, zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 10,65 Monaten (SE: 4,14; 95 % CI: 2,536 – 18,764) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen E-Cadherin Expression von 9,17 Monate (SE: 3,034; 95 % CI: 3,224 – 15,116) ($p = 0,189$).

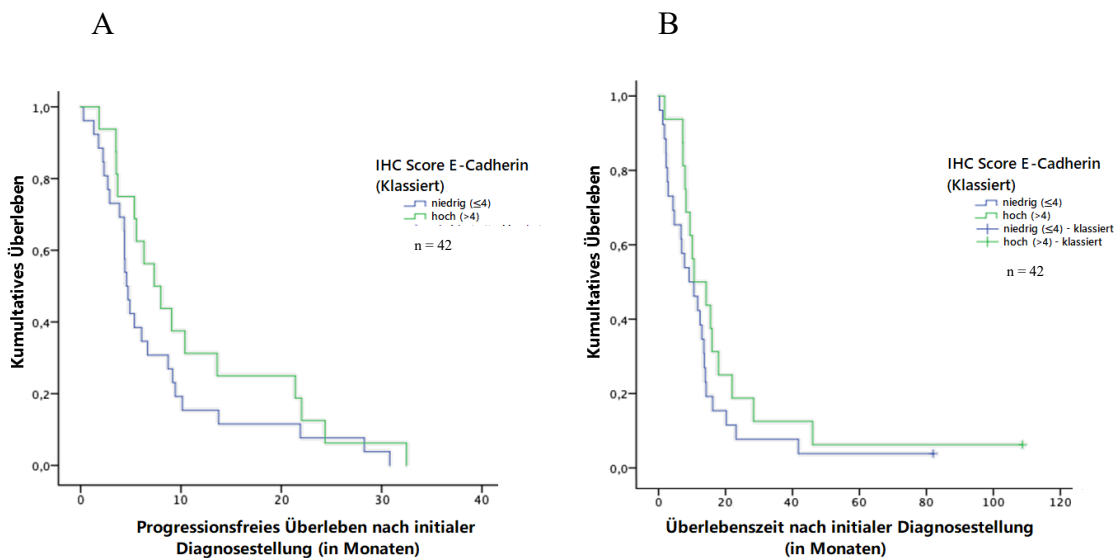


Abbildung 15: Progressionsfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression auf Proteinebene: Hierbei wiesen Glioblastompatienten mit einer Überexpression von E-Cadherin keine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens ($p = 0,179$) (a) und des Gesamtüberlebens ($p = 0,189$) (b) auf.

3.6.4.2 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Patienten mit einer MGMT-Methylierung und einer hohen E-Cadherin Expression (10,39 Monate; SE: 4,374; 95 % CI: 1,817 – 18,963) zeigten auf Proteinebene keine signifikante ($p = 0,534$) Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens beim Vergleich mit Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen und einer niedrigen E-Cadherin Expression (9,17 Monate; SE: 3,606; 95 % CI: 2,103 – 16,237).

In der immunhistochemischen Analyse von Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit einer hohen E-Cadherin Expression zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 5,56 Monaten (SE: 0,569; 95 % CI: 4,444 – 6,676). Demgegenüber wiesen Patienten mit MGMT-unmethylierte Patienten mit einer niedrigen E-Cadherin Expression ein medianes progressionsfreies Überleben von 4,37 Monaten (SE: 0,335; 95 % CI: 3,712 – 5,028) auf. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens ($p = 0,005$).

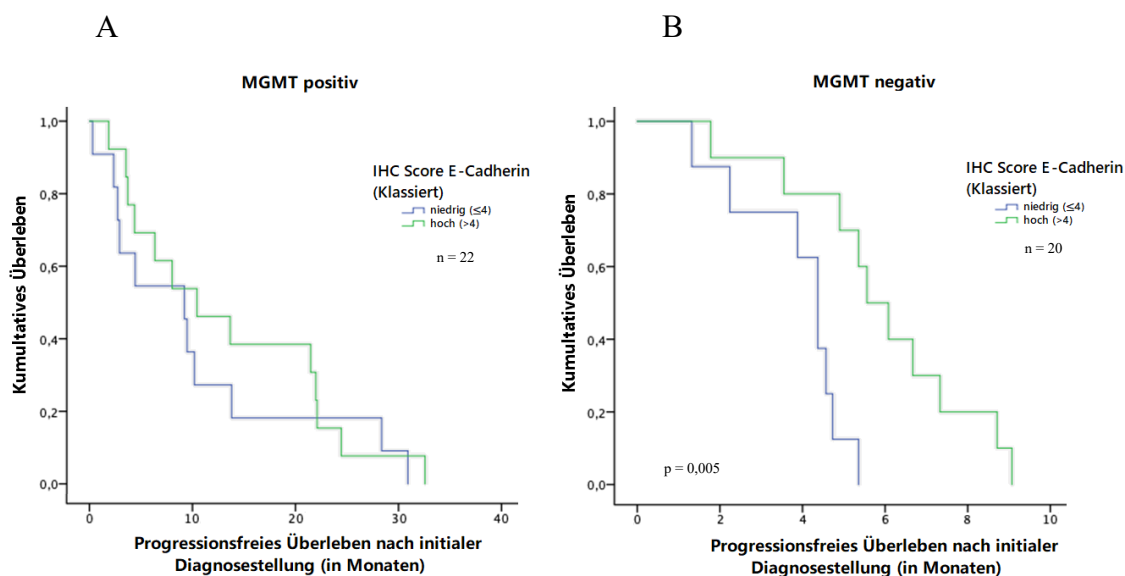


Abbildung 16: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus: Bei MGMT-methylierten Glioblastompatienten und hoher E-Cadherin Expression zeigte sich keine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens ($p = 0,534$). Bei MGMT-unmethylierten Glioblastompatienten konnte ein signifikante ($p = 0,005$) Verlängerung des Gesamtüberlebens bei Überexpression von E-Cadherin herausgestellt werden.

3.6.4.3 GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER E-CADHERIN EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Die Analyse der Proteinexpression ergab bei Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit hoher E-Cadherin Expression ein medianes Gesamtüberleben von 16,01 Monaten (SE: 5,34; 95 % CI: 5,544 – 26,476). Im Vergleich dazu wiesen Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen und niedriger E-Cadherin Expression ein medianes Gesamtüberleben von 12,99 Monaten auf ($p = 0,465$).

Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit hoher E-Cadherin Expression präsentierten sich ein medianes Gesamtüberleben von 10,13 Monaten (SE: 0,8; 95 % CI: 8,563 – 11,697). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit niedriger E-Cadherin Expression ein medianes Gesamtüberleben von 7,76 Monaten (SE: 2,66; 95 % CI: 2,546 – 12,974) ($p = 0,657$) (siehe Abbildung 17).

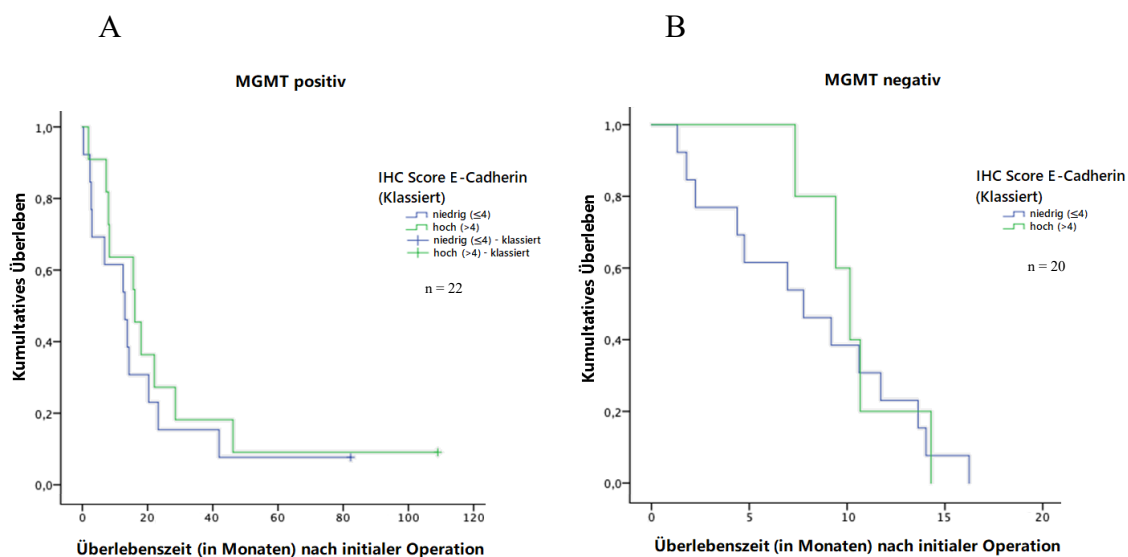


Abbildung 17: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression bei positivem (A) und negativem (B) Methylierungsstatus: Es konnte dargestellt werden, dass Patienten mit einer hohen E-Cadherin Expression im Median kein signifikant verlängertes Gesamtüberleben sowohl bei MGMT-methylierten ($p = 0,465$) (A) als auch bei MGMT-unmethylierten ($p = 0,657$) (B) Glioblastomen aufwiesen.

3.6.5 VIMENTIN

3.6.5.1 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN UND GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VIMENTIN_EXPRESSION AUF PROTEINEEBEN

Die Analyse der Expression von Vimentin auf Proteinebene zeigte keine signifikante Verlängerung beziehungsweise Verkürzung des medianen progressionsfreien Überlebens ($p = 0,723$) und des Gesamtüberlebens ($p = 0,785$) bei Patienten mit hoher Vimentin Expression.

Patienten, die eine hohe Vimentin Expression zeigten, hatten ein medianes progressionsfreies Überleben von 6,08 Monate (SE: 1,372; 95 % CI: 3,391 – 8,769) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Vimentin Expression von 5,36 Monaten (SE: 0,72; 95 % CI: 3,948 – 6,772).

Glioblastom-Patienten mit einer immunhistochemisch erhöhten Vimentin Expression wiesen eine medianes Gesamtüberleben von 6,94 Monaten (SE: 6,371; 95 % CI: 0 – 19,427) im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen Vimentin Expression von 10,59 Monate (SE: 1,676; 95 % CI: 7,304 – 13,876) (siehe Abbildung 18).

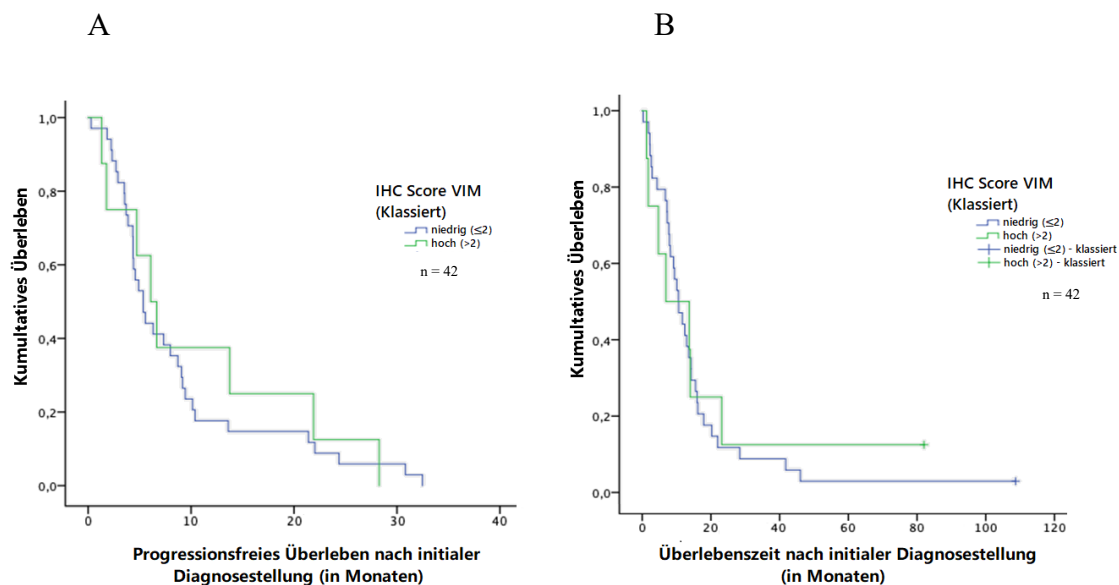


Abbildung 18: Progressionsfreies Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) in Abhängigkeit von der Vimentin Expression auf Proteinebene: Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberleben beim Vergleich von niedriger und hoher Vimentin-Expression.

3.6.5.2 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER VIMENTIN-EXPRESSION AUF PROTEINEBENE

Patienten, die sowohl eine positive MGMT-Methylierung als auch eine hohe Vimentin Expression aufwiesen, zeigten auf Proteinebene keine signifikante ($p = 0,311$) Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens (21,9 Monate; SE: 6,663; 95 % CI: 8,841 – 34,959) im Vergleich zu Patienten mit MGMT-Methylierung und niedriger Vimentin Expression (7,99 Monate; SE: 3,631; 95 % CI: 0,872 – 15,108).

Außerdem zeigte sich bei Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit einer hohen Vimentin Expression kein signifikanter ($p = 0,489$) Unterschied des medianen progressionsfreien Überlebens (4,73 Monate; SE: 4,232; 95 % CI: 0 – 11,064) im Vergleich zu Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit niedriger Vimentin Expression (4,9 Monate; SE: 0,445; 95 % CI: 4,028 – 5,772).

Bei MGMT-methylierten Patienten und bei MGMT-unmethylierten Patienten mit hoher Vimentin Expression zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied des progressionsfreien Überlebens (siehe Abbildung 19).

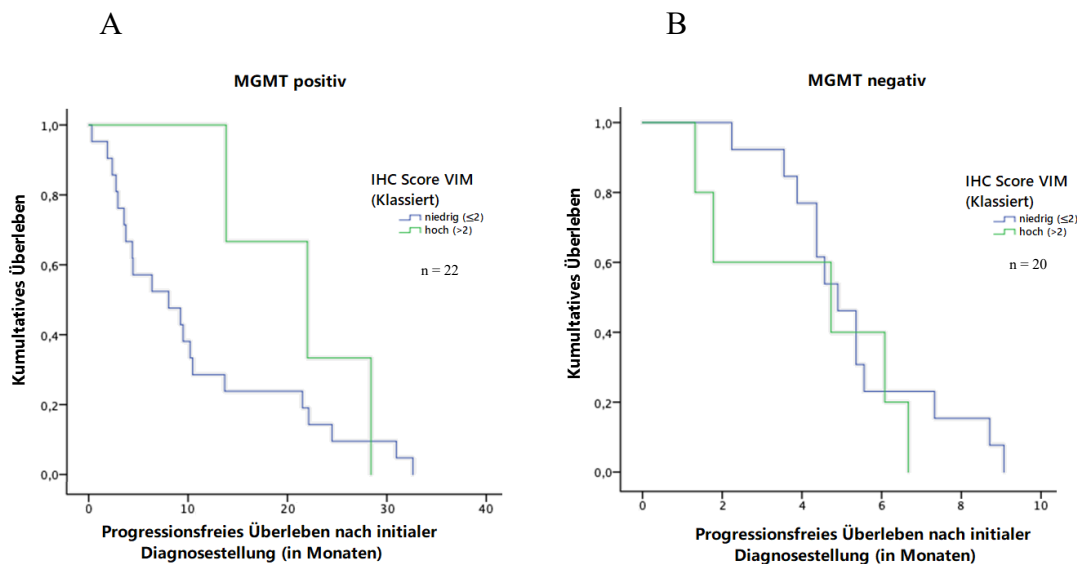


Abbildung 19: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von der Vimentin Expression bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus: Bei MGMT-methylierten Patienten ($p = 0,311$) und bei MGMT-unmethylierten Patienten ($p = 0,489$) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied des medianen progressionsfreien Überlebens.

3.6.5.3 GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER VIMENTIN-EXPRESSIONS AUF PROTEINEBENE

Die Untersuchung der Proteinexpression zeigte bei Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen mit hoher Vimentin Expression eine medianes Gesamtüberleben von 23,21 Monaten (SE: 7,732; 95 % CI: 8,055 – 38,365). Dahingegen wiesen die Patienten mit MGMT-methylierten Glioblastomen und niedriger Vimentin Expression ein medianes Gesamtüberleben von 12,99 Monaten (SE: 4,57; 95 % CI: 4,033 – 21,947). Eine statistische Signifikanz konnte nicht dargestellt werden ($p = 0,19$).

Patienten ohne MGMT-Methylierung und hoher Vimentin Expression zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 4,73 Monaten (SE: 3,232; 95 % CI: 0 -11,064). Alldieweil zeigte sich bei Patienten ohne MGMT-Methylierung und niedriger Vimentin Expression ein medianes Gesamtüberleben von 10,13 Monaten (SE: 0,851; 95 % CI: 8,462- 11,798). Eine statistische Signifikanz erwies sich nicht ($p = 0,159$).

Zusammenfassend konnte bei MGMT-methylierten Patienten und bei MGMT-unmethylierten Patienten mit hoher Vimentin Expression kein signifikanter Unterschied des medianen Gesamtüberlebens gezeigt werden (siehe Abbildung 20).

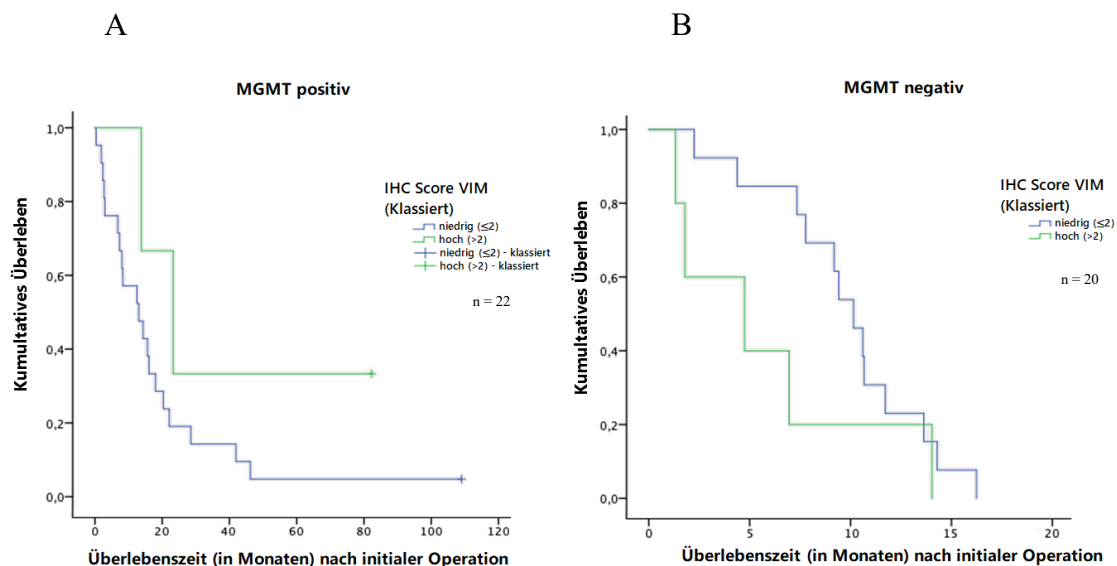


Abbildung 20: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Vimentin Expression bei positiven (A) und negativen (B) MGMT-Methylierungsstatus: Patienten mit einer methylierten MGMT-Promotorregion ($p = 0,19$) und MGMT-unmethylierte Patienten ($p = 0,159$) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied des medianes Gesamtüberleben.

4 DISKUSSION

4.1 HINTERGRUND

Durch das Einbringen von molekularer neuroonkologischer und immunhistochemischer Parameter in die Glioblastom-Diagnostik konnte 2016 durch Louis et al. die WHO-Klassifikation der Glioblastome erweitert und eine ausführliche Aufteilung der Glioblastome erreicht werden (Louis et al., 2016).

Einen ersten Schritt in der genaueren Differenzierung der einzelnen Glioblastome lieferte die Subtypen-Analyse von Verhaak et al. (Verhaak et al., 2010). Verhaak et al. zeigten, dass eine weitere und detailliertere Analyse der Glioblastomentstehung und eine eindeutigere und komplexere Unterteilung von Nöten ist, um für die Patienten den Weg einer individualisierten und spezifischen Therapie der einzelnen Untergruppen zu ebnet. Ein weiteres Ziel der molekularen neuroonkologischen Aufschlüsselung der Glioblastome ist es, genauere Information über die Tumorphiliferation, Tumormigration und Invasivität sowie über die Prognose zu erhalten. Stupp et al. zeigte, dass durch die Methylierung des MGMT- Promoters eine individuelle Therapie mit Temozolomid dem Patienten angeboten werden konnte (R. Stupp et al., 2014). Eine molekulare Differenzierung der Glioblastome ist unvermeidbar, um eine suffiziente Therapie den Patienten anzubieten.

Da der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition bei vielen epithelialen Karzinomen beschrieben ist und mit einer schlechten Prognose, einer gesteigerten Tumorinvasivität und mit einem schnelleren Tumorwachstum einhergeht (Al-Saad et al., 2008; Gilles et al., 2003; Gonzalez & Medici, 2014; Onder et al., 2008; Shih et al., 2005; Shioiri et al., 2006; Sommers et al., 1989) ist weitere Erforschung des Prozesses bei Glioblastomen notwendig. Genauere Vorgänge der epithelial-mesenchymalen Transition sind bei einem Tumor, wie dem Glioblastom, bei dem es sich nicht um einen epithelialen Tumor handelt, noch nicht vollständig erforscht. Tiefergehende Untersuchungen der Prozesse im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition sind von zentraler Bedeutung, da ein Zusammenhang zu Therapieresistenzen in Glioblastomen beschrieben ist. Die vorliegende Arbeit befasst sich gerade deshalb mit der weiteren molekularen Analyse der Glioblastome mit dem Augenmerk auf die epithelial-mesenchymale Transition.

4.2 ERGEBNISSE DER STUDIE UND EINORDNUNG IN DIE LITERATUR

4.2.1 MGMT-METHYLIERUNG

Ein positiver Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion führt zu einem längeren durchschnittlichen Überleben der Patienten (H. Zhao et al., 2016), da das durchschnittlich verlängerte Überleben der Patienten auf die bessere Temozolomid-Wirkung bei MGMT-methylierten Tumoren zurückzuführen ist (Hegi et al., 2005; Roger Stupp et al., 2009).

Zu den aktuellen Daten in der Literatur passend, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p = 0,05$) und progressionsfreies Überleben ($p = 0,002$) bei positiver MGMT-Methylierung, sodass das hier vorliegende Kollektiv als repräsentativ anzunehmen ist. Das progressionsfreie Überleben der Glioblastompatienten mit positiven Methylierungsstatus zeigte sich mit 9,2 Monate im Vergleich zu 4,7 Monate bei MGMT-unmethylierten Patienten verlängert. Das mediane Gesamtüberleben zeigte eine signifikante Verlängerung bei positiven MGMT-Methylierung im Vergleich zu negativen MGMT-Methylierung (13,7 Monate vs. 9,2 Monate).

4.2.2 E- (CDH1) UND N-CADHERIN (CDH2)

Im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition kommt es bei epithelialen Karzinomen zu einem charakteristischen *E-to-N-cadherin switch*. Dabei kommt es zu einem verminderten Expression von E-Cadherin, einem Marker für Epithelzellen (Takeichi, 1995), und zu einer verstärkten Expression von N-Cadherin, einem Marker für Mesenchymzellen (Thiery, 2002).

Camand et al. erläuterten, dass N-Cadherin innerhalb des Glioblastoms im Vergleich zu nicht pathologisch veränderten Astrozyten runterreguliert ist und die verringerte Expression von N-Cadherin mit einer schnelleren und weniger zielgerichteten Zellmigration einhergeht (Camand et al., 2012). Konträr dazu stellten Utsuki et al. heraus, dass die Expression von N-Cadherin mit höheren Astrozytom-Graden korreliert (Utsuki et al., 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wurde verdeutlicht, dass in Gegenüberstellung zum normalen Hirngewebe N-Cadherin in Glioblastomen auf Proteinebene signifikant überexprimiert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Vergleich zu der Studie von Utsuki et al. ähnliche Ergebnisse und bestätigen die

Annahme, dass eine Überexpression von N-Cadherin in Glioblastomen vorliegt und somit ist es zu postulieren, dass die Überexpression von N-Cadherin mit Malignität des Tumors zu assoziieren ist. Im Kontrast zu den hier vorgestellten Ergebnissen steht die Veröffentlichung von Camand et al. (Camand et al., 2012; Utsuki et al., 2002).

Bezüglich des Gesamtüberleben und des progressionsfreien Überlebens mit und ohne Stratifizierung nach MGMT-Methylierungsstatus konnte aufgrund der kleinen Patientenzahl mit hoher N-Cadherin Expression in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Im Gegensatz zu epithelialen Karzinomen, korreliert eine erhöhte E-Cadherin-Expression in Glioblastomen mit einer ungünstigen klinischen Prognose, da E-Cadherin die Invasivität des Tumors fördert (Lewis-Tuffin et al., 2010). Auch in Studien über Ovarialkarzinome konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von E-Cadherin mit einem erhöhten Tumorwachstum, einer erhöhten Invasivität und einer vermehrten Metastasierung einhergeht (Auersperg et al., 1999; Dong et al., 2012). Bei Patienten mit Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten Zhang et al. allerdings aufzeigen, dass eine hohe Expression von E-Cadherin ein positiver Indikator für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben ist (H. Zhang et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte hervorgehoben werden, dass E-Cadherin in Glioblastomen im Vergleich zum normalen Hirngewebe auf Proteinebene signifikant überexprimiert wird. Allerdings konnte nach MGMT-Stratifizierung herausgestellt werden, dass Patienten mit einem negativen MGMT-Methylierungsstatus und einer hohen E-Cadherin Expression ein signifikant verlängertes progressionsfreie Überleben aufwiesen. Bei Patienten mit einer hohen E-Cadherin Expression konnte im Median kein signifikanter Unterschied des Gesamtüberleben sowohl bei MGMT-methylierten also auch MGMT-unmethylierten Glioblastomen dargestellt werden.

Eine konträre Position bezogen Li et al. wiederum, die in ihrer Studie eine Korrelation zwischen einer atypischen Expression von E-Cadherin und einer schlechten Prognose sahen (Y. Li et al., 2012). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv sowohl E-Cadherin als auch N-Cadherin auf Proteinebene signifikant überexprimiert wird. Allerdings kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass eine hohe Expression von E-Cadherin ein prognostisch günstiger Faktor in Bezug auf das progressionsfreie Überleben bei MGMT-unmethylierten Glioblastompatienten darstellt. Man kann daher aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse davon ausgehen, dass sich E-Cadherin in

Glioblastomen ähnlich wie in Bronchialkarzinomen verhält und ein positiver Indikator für das progressionsfreie Überleben bei MGMT-unmethylierten Patienten ist. Dass sowohl E- als auch N-Cadherin im vorliegenden Glioblastom-Tumorgewebe signifikant überexprimiert wird, deutet an, dass es bei Glioblastomen nicht zu einem charakteristischen *E-to-N-cadherin switch* kommt. Hier wäre eine verminderte Expression von E-Cadherin und eine vermehrte Expression von N-Cadherin zu erwarten gewesen. Ein routinemäßiger Nachweis der Expressionshöhe von E-Cadherin bei MGMT-unmethylierten Patienten im histologischen Gewebe wäre als Marker für einen prognostisch günstigeren Verlauf daher sinnvoll.

4.2.3 SNAI1 (SNAIL) UND SLUG (SNAI2)

Die Transkriptionsfaktoren der SNAIL-Familie (SNAIL und SLUG) sind entscheidend an der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt und eine Überexpression von SNAIL und SLUG führt zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition und gleichzeitig zur Repression der E-Cadherin-Expression (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Eger et al., 2005).

4.2.3.1 SNAI1 (SNAIL)

Es zeigte sich in zwei Studien von Han et al. und Myung et al., dass eine Unterdrückung der SNAIL Expression durch *small interfering RNAs* zu einer Reduktion der Invasivität, Tumormigration, Viabilität und Proliferation von Glioblastomzellen gekommen ist (Han et al., 2011; Myung et al., 2014). Des Weiteren führte eine Unterdrückung der SNAIL Expression zu einer erhöhten E-Cadherin Expression, einem Marker von Epithelzellen (Takeichi, 1995), und zu einer erniedrigten Vimentin Expression, einem Marker für Mesenchymzellen (Franke et al., 1982; Han et al., 2011; Myung et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Überexpression von SNAI1/SNAIL auf Proteinebene und auf RNA-Ebene bei Vergleich von Glioblastomgewebe mit normalen Hirngewebe. Wie in der Literatur beschrieben, besteht ein Zusammenhang zwischen SNAIL Expression und der Proliferation, sowie Tumormigration und der Invasivität (Han et al., 2011; Myung et al., 2014). Eine statistisch signifikante Verkürzung des medianen Gesamtüberlebens und des medianen progressionsfreien Überlebens bei hoher SNAIL Expression konnte nicht

herausgearbeitet werden. Bei Patienten mit hoher SNAIL Expression betrug das mediane Gesamtüberleben 7,99 Monaten, konträr dazu überlebten Patienten mit einer niedrigen SNAIL Expression 13,61 Monaten. Patienten mit einer hohen SNAIL Expression wiesen ein medianes progressionsfreies Überleben von nur 4,4 Monaten im Kontrast zu 8,7 Monaten bei niedriger SNAIL Expression.

Sowohl bei MGMT-methylierten als auch bei MGMT-unmethylierten Glioblastompatienten zeigte sich im untersuchten Kollektiv kein signifikanter Unterschied des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens bei erhöhter SNAIL Expression.

Zusammenfassend geht eine Überexpression von SNAIL bei Patienten mit Glioblastomen mit keiner statistisch signifikanten Verkürzung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens einher. Allerdings zeigte sich eine signifikante Überexpression von SNAIL bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv auf Protein- und RNA-Ebene. Eine Untersuchung der Auswirkung einer erhöhten SNAIL Expression auf die Tumorproliferation, Tumormigration und Invasivität könnte Teil zukünftiger Forschung sein. Des Weiteren wäre eine Untersuchung der molekularen Folgen einer Bestrahlung auf die SNAIL Expression sinnvoll, da Mahabir et al. darstellen konnten, dass es nach einer Bestrahlung zu einer SNAIL Elevation in malignen Gliomzelllinien und einer damit einhergehenden Einleitung der epithelial-mesenchymalen Transition und zu einer gesteigerten Migration und Invasivität kommt (Mahabir et al., 2014).

4.2.3.2 SLUG (SNAI2)

Eine hohe Expression von SLUG geht mit einem schlechteren Patientenüberleben, einer hohen Invasivität, progressiven Tumorstadien und einer Metastasierung bei verschiedenen Tumorentitäten einher (Gonzalez & Medici, 2014; Shih et al., 2005; Shioiri et al., 2006). Shih et al. zeigten, dass eine hohe SLUG Expression in Adenokarzinomen der Lunge von einem kurzen Patientenüberleben, Tumorwachstum und einer E-Cadherin-Unterdrückung begleitet wird (Shih et al., 2005). Shioiri et al. veranschaulichten, dass eine Überexpression von SLUG bei kolorektalen Karzinomen mit einer höheren Tumorstadium, Fernmetastasen und schlechten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ist (Shioiri et al., 2006). Im Mausmodell zeigte sich, dass durch die Unterdrückung von SLUG eine verringerte Tumordinvasion und ein verlängertes

Überleben sichergestellt werden konnte (H. W. Yang et al., 2010). Die hohe Bedeutung von Tumorinvasion und -infiltration bei malignen Gliomen durch eine hohe SLUG Expression wird deutlich, wenn man die Tatsache betrachtet, dass eine inkomplette Resektion des Glioblastomgewebes unvermeidbar ist und die verbleibenden Tumorzellen das Rezidiv des Tumors und ein Versagen der Therapie verursachen.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine statistisch signifikante Überexpression von SNAI2/SLUG im Glioblastomgewebe, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Die in der Literatur (Oh et al., 2019) ostulierte Verkürzung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei hoher SLUG Expression konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Eine signifikante Verkürzung des medianen Gesamtüberlebens zeigte sich allerdings bei einem simultan aufkommenden negativen MGMT-Methylierungsstatus und hoher SLUG Expression. Eine mögliche Erklärung für die Verkürzung des medianen Gesamtüberlebens (bei negativen MGMT-Methylierungsstatus) bei hoher SLUG Expression ist die durch SLUG induzierte Chemo- und Bestrahlungsresistenz, die durch Kurrey et al. beschrieben wurde (Kurrey et al., 2009).

Zudem wurde durch Kubelt et al. dargestellt, dass Glioblastomzelllinien, die mit dem Standardtherapeutikum Temozolomid behandelt wurden, eine erhöhte Expression von SNAI1 und SLUG aufweisen und somit an der Initiierung der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt sind (Kubelt et al., 2015). Der in der Veröffentlichung von Kubelt et al. beschriebene Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Temozolomid und der Einleitung der epithelial-mesenchymalen Transition über die Transkriptionsfaktoren SNAI1 und SLUG könnte die noch immer schlechte Prognose trotz Ausschöpfung aller therapeutischen Maßnahmen erklären.

Zusammenfassend geht eine Überexpression von SLUG nur bei Patienten mit MGMT-unmethylierten Glioblastomen mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberlebens einher.

Als die epithelial-mesenchymale Transition beeinflussenden Faktoren scheint es daher, dass SNAI1 und SLUG eine wichtige Rolle in der Einschätzung der Prognose und des Behandlungserfolges von Glioblastom-Patienten spielen. Hierbei könnte SNAI1, vor allem durch eine Bestrahlung induziert, die epithelial-mesenchymale Transition einleiten. SLUG hingegen scheint bei MGMT-unmethylierten Glioblastomen die Invasivität und die Infiltration zu fördern. Nichtsdestotrotz besteht ein Bedarf in der weiteren Erforschung

des Zusammenhangs zwischen SNAIL/ SLUG und der Glioblastomentstehung. Allerdings wäre ein routinemäßiger Nachweis der Expressionshöhe SLUG bei MGMT-unmethylierten Glioblastomen in Bezug auf die Prognose vielversprechend.

4.2.4 VIMENTIN

Vimentin ist als Typ-III-Intermediärfilament ein wesentlicher Bestandteil von mesenchymalen Zellen (B.-M. Chung et al., 2013; Franke et al., 1982) und diente in der durchgeführten Studie neben N-Cadherin als Marker für Mesenchymzellen. Bei verschiedenen Tumorentitäten, wie malignen Melanom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Bronchialkarzinom, konnte bereits herausgestellt werden, dass eine erhöhte Vimentinexpression mit einer schlechten Prognose und Tumorinvasivität einhergeht (Al-Saad et al., 2008; Gilles et al., 2003; Lang et al., 2002; M. Li et al., 2010; Sommers et al., 1989; Upton et al., 1986; Y. Zhao et al., 2008). Es konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Vimentin innerhalb des Glioblastomgewebes, wie bei den anderen oben beschriebenen Tumorentitäten, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe auf RNA-Ebene signifikant erhöht exprimiert wird. Eine Vimentin-Expressionsanalyse bei Glioblastom-Patienten wurde nur in wenigen Studien beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Vimentin die Umwandlung einer Epithelzelle in eine Mesenchymzelle unterstützt und somit die Zellmotilität fördert (Mendez et al., 2010). Vergleicht man nun den Einfluss der Vimentinexpression auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben vor und nach MGMT-Stratifizierung, konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied herausgestellt werden. Zhao J et al. nahmen in ihrer Studie keine MGMT-Stratifizierung vor und stellten dar, dass Patienten unabhängig ihres MGMT-Methylierungsstatus bei hoher Vimentinexpression ein verkürztes Gesamtüberleben und ein verkürztes progressionsfreies Überleben aufwiesen (J. Zhao et al., 2018). Zudem konnte Zhao J. et al. darstellen, dass es durch die Unterdrückung von Vimentin durch *witthaferin-A* zu einer Hemmung der Migration und der Invasivität von Glioblastomzellen kommt (J. Zhao et al., 2018). Die Ergebnisse der Veröffentlichung von Zhao J. et al. deuten darauf hin, dass die Progression von Glioblastomen in Zusammenhang mit der Expression von Vimentin stehen kann, diese Aussage konnte an dem untersuchten Patientenkollektiv bei fehlender statistischer Signifikanz nicht unterstützt werden. Lin et al. zeigten zudem, dass Gliom-

Patienten mit einer niedrigen Vimentinexpression verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit einer hohen Vimentinexpression hatten. Eine Stratifizierung nach dem MGMT-Status erfolgte auch bei dieser Studie nicht (L. Lin et al., 2016). Das verlängerte Überleben bei niedriger Vimentinexpression steht hierbei in Zusammenhang mit dem besseren Ansprechen auf die Therapie mit Temozolomid (L. Lin et al., 2016). Durch die beiden Studien von Zhao J. et al. und L. Lin et al. konnte bereits herausgearbeitet werden, dass die Höhe der Vimentinexpression einen Einfluss auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben aufweist (L. Lin et al., 2016; J. Zhao et al., 2018).

Der Zusammenhang beziehungsweise die Interaktion von Vimentin und der MGMT-Promotorregion in Bezug auf die Tumorproliferation sowie Migration könnte in Zukunft ein weiterer Bestandteil der Forschung werden. Ferner könnte der Zusammenhang zwischen Vimentin-Expression und der Temozolomid-Wirkung ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Studien werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass es bei Glioblastomen nicht, wie bei anderen malignen Tumoren, zu einem klassischen *E-to-N-cadherin switch* kommt, da in dem untersuchten Kollektiv sowohl E-Cadherin also auch N-Cadherin statistisch signifikant überexprimiert war. Zudem konnte E-Cadherin bei MGMT-unmethylierten Patienten als Marker für ein prognostisch günstigen Verlauf sowie SLUG bei MGMT-unmethylierten Patienten als Parameter für ein prognostisch ungünstigen Verlauf herausgearbeitet werden. Vimentin, ein wesentlicher Bestandteil und Marker von Mesenchymzellen, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit im Tumorgewebe auf RNA-Ebene überexprimiert. In Gesamtschau der Ergebnisse ist daher anzunehmen, dass es in Glioblastomen wie auch bei anderen malignen Tumoren zu einer mesenchymalen Transition kommt.

4.3 AUSBLICK

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Überexpression von SNAIL, N-Cadherin und E-Cadherin auf Proteinebene sowie von SNAIL und Vimentin auf RNA-Ebene in Glioblastomzellen aufgezeigt. Hierbei konnte zudem herausgearbeitet werden, dass eine hohe Expression von SLUG mit einem schlechten Gesamtüberleben bei MGMT-unmethylierten Patienten und eine erhöhte Expression von E-Cadherin bei MGMT-unmethylierten Patienten mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben einhergeht. Die hier durchgeführte Untersuchung der Proteine und der zugehörigen Gene zeigt die wichtige Bedeutung im Hinblick auf Invasivität, Migration und Prognose bei Glioblastompatienten. Zuvor wurde dies bereits bei anderen Malignomen präsentiert. Die immer zunehmende klinische Wichtigkeit für eine genauere molekulare Einteilung von Hirntumoren, im besonderen Maße des Glioblastoms, und die große Bedeutung von personalisierten und zielgerichteten Tumorthapie mit Hinzunahme von individuellen molekularen Tumormarkern wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit erneut deutlich. Die genaueste Aufschlüsselung der Signalwege beziehungsweise den zugrundeliegenden Prozessen auf molekularer Ebene für die Glioblastomentstehung und deren Einfluss auf die Prognose des Patienten und einer damit einhergehenden Verbesserung der therapeutischen Optionen wird in Zukunft in der Behandlung nicht nur des Glioblastoms, sondern auch bei verschiedensten Malignomen, eine eventuelle prognoseverändernde Rolle spielen. Die Auswirkung einer Temozolomid-Gabe beziehungsweise einer therapeutischen Radiatio auf die Expression der hier untersuchten Proteine und der zugehörigen Gene und der hiermit einhergehende Einfluss auf die Prognose könnte in Zukunft ein wichtiger Bestandteil der Forschung werden. Dies könnte potenziell die Wahl des therapeutischen Vorgehens beeinflussen. In den letzten Jahren führte die Entdeckung des Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion und der daraus entstandenen Anpassung des von Stupp et al. entwickelten therapeutischen Schemas zur deutlichen Verbesserung der Tumorthapie von Glioblastompatienten (Roger Stupp et al., 2005). Die Erforschung der Mutation im Gen der Isocitrat Dehydrogenase-1 (IDH1) lieferte zusätzlich entscheidende Erkenntnisse über die Prognose der Patienten, da eine vorliegende IDH1-Mutation zu einem verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zum Wildtyp führt (H. Yan et al., 2009). Die Komplexität der Glioblastomentstehung, die hohe Invasivität, die trotz großer Forschungsbestrebungen noch infauste Prognose und die, auf das Patientenüberleben

gesehen, nur geringen Fortschritte stellen die betroffenen Patienten und deren behandelnden Ärzten noch vor ein frustanes Gesamtbild. Dies verdeutlicht aber nochmals die dringende Notwendigkeit zur Entschlüsselung und noch genauem Verständnis des infausten Krankheitsbildes, um in Zukunft für den Patienten ein individualisiertes und zielgerichtete Therapiekonzept zu entwerfen. Die Analyse der hier vorliegenden Arbeit mit den molekularen Untersuchungen der epithelial-mesenchymalen Transition bei einem hoch heterogenen Tumor wie dem Glioblastomen könnte ein weiterer wichtiger Schritt für ein genaueres molekulares Verständnis sein. Die Modulation der hier untersuchten Gene und der zugehörigen Proteine CDH1/E-Cadherin, CDH2/N-Cadherin, SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG und Vimentin könnte ein entscheidender Bestandteil beziehungsweise Grundstein zukünftiger therapeutischer Möglichkeiten darstellen.

4.4 LIMITATIONEN UND METHODENKRITIK

In der vorliegenden Arbeit wurde eine kleine Gruppe von Glioblastomen im Sinne einer retrospektiven Studie untersucht, sodass die Möglichkeit einer Selektionsbias besteht. Allerdings wurden vergleichbare Studien auch mit einer kleinen Fallzahl durchgeführt. In der Studie konnte auf RNA-Ebene nicht differenziert werden, ob das Gewebe eher vom Tumorrand oder vom Tumorzentrum stammt, sodass der Einfluss einer möglichen Hypoxie im Bereich des Tumorzentrums auf die Expression von SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, Vimentin, CDH2/N-Cadherin und CDH1/E-Cadherin nicht berücksichtigt werden konnte.

Es erfolgte die Untersuchung der Expression auf RNA-Ebene bei in flüssigem Stickstoff asservierten Kryopräparaten und bei Präparaten von gesundem Hirngewebe. Im Laufe der Durchführung der quantitativen Real-time Polymerasekettenreaktion von der Probengewinnung, Transport, Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff und anschließender Verarbeitung können Fehler entstehen. Dabei kann es sowohl zu methodischen und systematischen Fehlern kommen, die die quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion sowohl bei den Glioblastompräparaten als auch bei den Präparaten des gesunden Hirngewebes beeinflussen können. Mittels des Housekeeping-Gens Actin-beta (ACTB) erfolgte die relative Quantifizierung. ACTB zeigt eine besonders stabile Expression in Astrozytomen und Glioblastomen sowohl vor und nach einer Chemotherapie beziehungsweise Bestrahlung (Röhn et al., 2018). Primer der endogenen Kontrolle ACTB und die Primer für SNAI1, SNAI2, Vimentin, CDH2 und CDH1 der Firma Life Technologies Inc. wurden verwendet. Der Expressionswert wurde durch die Delta-CT-Methode berechnet. Durch die Ermittlung von drei CT-Werte pro Gen und pro Probe, wovon mindestens zwei Werte eine Standardabweichung von kleiner als 0,25 aufzeigen mussten, konnte einheitliche Werte erzielt und stärker Abweichungen aus der Berechnung ausgeschlossen werden.

Betrachtet man bei der Interpretation der Ergebnisse die mRNA-Expression in Bezug auf die immunhistochemisch gemessene Proteinexpression muss diese nicht übereinstimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Antikörper der Firma Abcam in einer Verdünnung von 1:1000 bei SNAIL und SLUG, von 1:500 bei Vimentin, von 1:100 bei E-Cadherin und von 1:2000 bei N-Cadherin verwendet. In diesem Verdünnungsverhältnis, das vorher ausgetestet wurde, kam es zu einer ausreichend intensiven Färbung. Die vertreibende Firma stellt kein standardisiertes Färbeprotokoll zur Verfügung. Ein einheitliches

Färbeprotokolle wurde hierbei erarbeitet, sodass alle zu untersuchenden Gewebsschnitte standardisiert gefärbt wurden und somit in der Auswertung vergleichbar waren. Trotz des standardisierten Färbeprotokolls ergaben sich weitere mögliche Fehlerquellen. Zum einen konnte durch die subjektive Auswahl der repräsentativen Stelle des vorliegenden Schnittes, erschwertes Auszählen durch Zellhäufungen, Schnittungenauigkeiten des Präparats und durch Tumornekrosen die Auswertung beeinflusst werden. Die Auswertung der Färbintensität weist zudem einen subjektiven Charakter auf.

5 ZUSAMMENFASSUNG

SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, CDH1/E-Cadherin, CDH2/N-Cadherin und Vimentin sind relevante Proteine im Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition. Dieser Prozess spielt bei vielen Malignomen durch Förderung der Tumorinvasivität eine wichtige Rolle und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die Expressionsanalyse von SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, CDH1/E-Cadherin, CDH2/N-Cadherin und Vimentin und deren Einfluss auf die Gesamtprognose bei 42 Glioblastompatienten waren die Ziele dieser Arbeit.

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose war $63,5 \pm 11,58$ Jahre. Das Patientenkollektiv zeigte ein PFS von 5,36 Monate und ein OS von 10,59 Monate. In der Immunhistochemie ergaben sich im Tumorgewebe signifikante Überexpressionen von SNAIL, N-Cadherin und E-Cadherin. Auf RNA-Ebene konnte eine signifikante Überexpression von SNAI1 und Vimentin herausgestellt werden.

Eine signifikante Verkürzung des medianen Gesamtüberlebens zeigte sich bei einem simultan aufkommenden negativen MGMT-Methylierungsstatus und hoher SLUG-Expression ($p = 0,012$). Des Weiteren zeigte sich eine statistisch signifikante Verlängerung des PFS (5,56 Monaten vs. 4,37 Monaten) bei Patienten mit erhöhten E-Cadherin Expression und negativen MGMT-Methylierungsstatus.

Die untersuchten Gene und der dazugehörigen Proteine könnten daher in Zukunft eigenständig beziehungsweise in Zusammenschau mit dem MGMT-Methylierungsstatus als Prognosefaktor dienen.

6 SUMMARY

SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, CDH1/E-cadherin, CDH2/N-cadherin and vimentin are relevant proteins in the process of epithelial-mesenchymal transition. This process plays an important role in many malignancies by promoting tumour invasiveness and is associated with poor prognosis. Expression analysis of SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, CDH1/E-cadherin, CDH2/N-cadherin and vimentin and their impact on overall prognosis in 42 glioblastoma patients were the aims of this work.

The mean age of the patients at diagnosis was 63.5 ± 11.58 years. The patient collective showed a PFS of 5.36 months and an OS of 10.59 months. Immunohistochemistry revealed significant overexpression of SNAIL, N-cadherin and E-cadherin in the tumour tissue. At the RNA level, a significant overexpression of SNAI1 und Vimentin was found.

A significant shortening of median overall survival was seen with simultaneous emergence of negative MGMT methylation status and high SLUG expression ($p = 0.012$). A statistically significant prolongation of PFS ($p = 0,005$) was seen in patients with increased E-cadherin expression and negative MGMT methylation status.

The investigated genes and the corresponding proteins could therefore serve as a prognostic factor in the future, either independently or in combination with the MGMT methylation status.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AG Osborn, KL Salzman, G Katzman, J Provenzale, M Castillo, G Hedlund, A Illner, HR Harnsberger, J Cooper, BV Jones, B Hamilton Amirsys, UT, U. pp. 992. 2009. I. 978-1-93188472-3. (2010, May). Diagnostic Imaging: Brain. 2(nd) edition. *The British Journal of Radiology*.
- Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Donnem, T., Persson, M., Bremnes, R. M., & Busund, L.-T. (2008). The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 99(9), 1476–1483. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604713>
- Amelio, D., Lorentini, S., Schwarz, M., & Amichetti, M. (2010). Intensity-modulated radiation therapy in newly diagnosed glioblastoma: a systematic review on clinical and technical issues. *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 97(3), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.08.018>
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., ... Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 69(14), 5820–5828. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2819>
- Asano, K., Duntsch, C. D., Zhou, Q., Weimar, J. D., Bordelon, D., Robertson, J. H., & Pourmotabbed, T. (2004). Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *Journal of Neuro-Oncology*, 70(1), 3–15.
- Auersperg, N., Pan, J., Grove, B. D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., ... Roskelley, C. D. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6249–6254. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6249>
- Banerjee, P., Venkatachalam, S., Mamidi, M. K., Bhonde, R., Shankar, K., & Pal, R. (2015, May). Vitiligo patient-derived keratinocytes exhibit characteristics of normal

- wound healing via epithelial to mesenchymal transition. *Experimental Dermatology*. Denmark. <https://doi.org/10.1111/exd.12671>
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2(2), 84–89. <https://doi.org/10.1038/35000034>
- Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C., & Van Meir, E. G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 1046–1069. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.013>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., ... Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathologica*, 139(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02127-9>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Holland, E. C., Louis, D. N., Jenkins, R. B., ... Weller, M. (2018, November). cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1913-0>
- Brown, P. D., Chung, C., Liu, D. D., McAvoy, S., Grosshans, D., Al Feghali, K., ... Wefel, J. S. (2021). A prospective phase II randomized trial of proton radiotherapy vs intensity-modulated radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1337–1347. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab040>
- Burger, P. C. (1983). Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme. *Applied Neurophysiology*, 46(1–4), 180–187.
- Burger, P. C., Vogel, F. S., Green, S. B., & Strike, T. A. (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*, 56(5), 1106–1111.

- Burnet, N. G., Jena, R., Burton, K. E., Tudor, G. S. J., Scaife, J. E., Harris, F., & Jefferies, S. J. (2017). Clinical and Practical Considerations for the Use of Intensity-modulated Radiotherapy and Image Guidance in Neuro-oncology. *Clinical Oncology*, 26(7), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2014.04.024>
- Butte, A. J., Dzau, V. J., & Glueck, S. B. (2001, December). Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiological Genomics*. United States. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2001.7.2.95>
- Camand, E., Peglion, F., Osmani, N., Sanson, M., & Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 4), 844–857. <https://doi.org/10.1242/jcs.087668>
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., ... Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76–83. <https://doi.org/10.1038/35000025>
- Chakravarti, A., Erkkinen, M. G., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., ... Loeffler, J. S. (2006). Temozolomide-Mediated Radiation Enhancement in Glioblastoma: A Report on Underlying Mechanisms. *Clinical Cancer Research*, 12(15), 4738 LP – 4746. Retrieved from <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/15/4738.abstract>
- Chan, M. F., Schupak, K., Burman, C., Chui, C.-S., & Ling, C. C. (2003). Comparison of intensity-modulated radiotherapy with three-dimensional conformal radiation therapy planning for glioblastoma multiforme. *Medical Dosimetry : Official Journal of the American Association of Medical Dosimetrists*, 28(4), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.meddos.2003.08.004>
- Chandana, S. R., Movva, S., Arora, M., & Singh, T. (2008). Primary brain tumors in adults. *American Family Physician*, 77(10), 1423–1430.
- Chang, S. M., Parney, I. F., Huang, W., Anderson, F. A. J., Asher, A. L., Bernstein, M., ... Laws, E. R. (2005). Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant

- glioma. *JAMA*, 293(5), 557–564. <https://doi.org/10.1001/jama.293.5.557>
- Chockalingam, S., & Ghosh, S. S. (2013). Amelioration of cancer stem cells in macrophage colony stimulating factor-expressing U87MG-human glioblastoma upon 5-fluorouracil therapy. *PloS One*, 8(12), e83877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083877>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research*, 66(17), 8319–8326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0410>
- Chung, B.-M., Rotty, J. D., & Coulombe, P. A. (2013). Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(5), 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.06.008>
- Chung, J.-K., Kim, Y. K., Kim, S., Lee, Y. J., Paek, S., Yeo, J. S., ... Lee, M. C. (2002). Usefulness of 11C-methionine PET in the evaluation of brain lesions that are hypo- or isometabolic on 18F-FDG PET. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 29(2), 176–182.
- Combs, S. E., Thilmann, C., Edler, L., Debus, J., & Schulz-Ertner, D. (2005). Efficacy of fractionated stereotactic reirradiation in recurrent gliomas: long-term results in 172 patients treated in a single institution. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(34), 8863–8869. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.4157>
- Coulombe, P. A., & Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nature Cell Biology*, 6(8), 699–706. <https://doi.org/10.1038/ncb0804-699>
- Croteau, D., Scarpace, L., Hearshen, D., Gutierrez, J., Fisher, J. L., Rock, J. P., & Mikkelsen, T. (2001). Correlation between magnetic resonance spectroscopy imaging and image-guided biopsies: semiquantitative and qualitative

- histopathological analyses of patients with untreated glioma. *Neurosurgery*, 49(4), 823–829.
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., ... Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>
- De Edelenyi, F. S., Rubin, C., Esteve, F., Grand, S., Decorps, M., Lefournier, V., ... Remy, C. (2000). A new approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images. *Nature Medicine*, 6(11), 1287–1289. <https://doi.org/10.1038/81401>
- De Witt Hamer, P. C., Robles, S. G., Zwinderman, A. H., Duffau, H., & Berger, M. S. (2012). Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(20), 2559–2565. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4818>
- Delbeke, D., Meyerowitz, C., Lapidus, R. L., Maciunas, R. J., Jennings, M. T., Moots, P. L., & Kessler, R. M. (1995). Optimal cutoff levels of F-18 fluorodeoxyglucose uptake in the differentiation of low-grade from high-grade brain tumors with PET. *Radiology*, 195(1), 47–52. <https://doi.org/10.1148/radiology.195.1.7892494>
- Dong, L., Liu, L., Ma, C., Li, J., Du, C., Xu, S., ... Wang, X. (2012). E-cadherin promotes proliferation of human ovarian cancer cells in vitro via activating MEK/ERK pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(6), 817–822. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.30>
- Duffau, H., Capelle, L., Sichez, J., Faillot, T., Abdennour, L., Law Koune, J. D., ... Fohanno, D. (1999). Intra-operative direct electrical stimulations of the central nervous system: the Salpetriere experience with 60 patients. *Acta Neurochirurgica*, 141(11), 1157–1167.
- Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., ... Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24(14), 2375–2385. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208429>

- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics*, *19*(7), 362–365. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00140-9)
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics : TIG*, *29*(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Eljamel, M. S., Goodman, C., & Moseley, H. (2008). ALA and Photofrin® Fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers in Medical Science*, *23*(4), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0494-2>
- Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research*, *59*(4), 793–797.
- Forster, T. (1946). Energy migration and fluorescence. 1946. *Journal of Biomedical Optics*, *17*(1), 11002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.1.011002>
- Franceschi, E., Bartolotti, M., Tosoni, A., Bartolini, S., Sturiale, C., Fioravanti, A., ... Brandes, A. A. (2015). The effect of re-operation on survival in patients with recurrent glioblastoma. *Anticancer Research*, *35*(3), 1743–1748.
- Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., & Illmensee, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *23*(1), 43–59.
- Fried, I., Nenov, V. I., Ojemann, S. G., & Woods, R. P. (1995). Functional MR and PET imaging of rolandic and visual cortices for neurosurgical planning. *Journal of Neurosurgery*, *83*(5), 854–861. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.83.5.0854>
- Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., ... Cloughesy, T. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(28), 4733–4740. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721>

- Fu, J., Rodova, M., Nanta, R., Meeker, D., Van Veldhuizen, P. J., Srivastava, R. K., & Shankar, S. (2013). NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200. *Neuro-Oncology*, *15*(6), 691–706. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not011>
- Gabriel, J. L., Zervos, P. R., & Plaut, G. W. (1986). Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *35*(7), 661–667. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(86\)90175-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(86)90175-7)
- Gallego, O. (2015). Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current Oncology*, *22*(4), e273–e281. <https://doi.org/10.3747/co.22.2436>
- Garber, K. (2010). Oncometabolite? IDH1 Discoveries Raise Possibility of New Metabolism Targets in Brain Cancers and Leukemia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *102*(13), 926–928. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq262>
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, *6*(10), 995–1001. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995>
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P., & Foidart, J.-M. (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Research*, *63*(10), 2658–2664.
- Goldman, S., Levivier, M., Pirotte, B., Brucher, J. M., Wikler, D., Damhaut, P., ... Hildebrand, J. (1997). Regional methionine and glucose uptake in high-grade gliomas: a comparative study on PET-guided stereotactic biopsy. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *38*(9), 1459–1462.
- Gonzalez-Darder, J. M., Gonzalez-Lopez, P., Talamantes, F., Quilis, V., Cortes, V., Garcia-March, G., & Roldan, P. (2010). Multimodal navigation in the functional microsurgical resection of intrinsic brain tumors located in eloquent motor areas: role of tractography. *Neurosurgical Focus*, *28*(2), E5. <https://doi.org/10.3171/2009.11.FOCUS09234>

- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7(344), re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>
- Grande, M. T., Sanchez-Laorden, B., Lopez-Blau, C., De Frutos, C. A., Boutet, A., Arevalo, M., ... Nieto, M. A. (2015). Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*, 21(9), 989–997. <https://doi.org/10.1038/nm.3901>
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(1), 333–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>
- Gritsenko, P., Leenders, W., & Friedl, P. (2017). Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1604-2>
- Gros, J., & Tabin, C. J. (2014). Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6176), 1253–1256. <https://doi.org/10.1126/science.1248228>
- Guo, G., Yao, W., Zhang, Q., & Bo, Y. (2013). Oleanolic acid suppresses migration and invasion of malignant glioma cells by inactivating MAPK/ERK signaling pathway. *PloS One*, 8(8), e72079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072079>
- Guyotat, J., Signorelli, F., Frappaz, D., Madarassy, G., Ricci, A. C., & Bret, P. (2000). Is reoperation for recurrence of glioblastoma justified? *Oncology Reports*, 7(4), 899–904.
- Gzell, C., Back, M., Wheeler, H., Bailey, D., & Foote, M. (2017). Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clinical Oncology*, 29(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.09.015>
- Haberg, A., Kvistad, K. A., Unsgard, G., & Haraldseth, O. (2004). Preoperative blood oxygen level-dependent functional magnetic resonance imaging in patients with primary brain tumors: clinical application and outcome. *Neurosurgery*, 54(4), 902–

905. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000114510.05922.f8>

- Halperin, E. C., Bentel, G., Heinz, E. R., & Burger, P. C. (1989). Radiation therapy treatment planning in supratentorial glioblastoma multiforme: an analysis based on post mortem topographic anatomy with CT correlations. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 17(6), 1347–1350.
- Hamilton, R. J., Sweeney, P. J., Pelizzari, C. A., Yetkin, F. Z., Holman, B. L., Garada, B., ... Chen, G. T. (1997). Functional imaging in treatment planning of brain lesions. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 37(1), 181–188.
- Han, S.-P., Kim, J.-H., Han, M.-E., Sim, H.-E., Kim, K.-S., Yoon, S., ... Oh, S.-O. (2011). SNAIL is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(3), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9643-4>
- Hay, E. D. (1968). Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo, Proceedings of the 18th Hahnemann Symposium: 31-55. Retrieved from <https://eurekamag.com/research/025/184/025184801.php>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Godard, S., Dietrich, P.-Y., Regli, L., Ostermann, S., ... Stupp, R. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(6), 1871–1874.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Heiss, W. D., Heindel, W., Herholz, K., Rudolf, J., Bunke, J., Jeske, J., & Friedmann, G. (1990). Positron emission tomography of fluorine-18-deoxyglucose and image-guided phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in brain tumors. *Journal of*

Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine, 31(3), 302–310.

Herholz, K., Holzer, T., Bauer, B., Schroder, R., Voges, J., Ernestus, R. I., ... Heiss, W. D. (1998). 11C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology*, 50(5), 1316–1322. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.5.1316>

Herholz, K., Pietrzyk, U., Voges, J., Schroder, R., Halber, M., Treuer, H., ... Heiss, W. D. (1993). Correlation of glucose consumption and tumor cell density in astrocytomas. A stereotactic PET study. *Journal of Neurosurgery*, 79(6), 853–858. <https://doi.org/10.3171/jns.1993.79.6.0853>

Herholz, K., Reulen, H. J., von Stockhausen, H. M., Thiel, A., Ilmberger, J., Kessler, J., ... Heiss, W. D. (1997). Preoperative activation and intraoperative stimulation of language-related areas in patients with glioma. *Neurosurgery*, 41(6), 1252–1253. <https://doi.org/10.1097/00006123-199712000-00004>

Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., ... Glas, M. (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 (London, England)*, 393(10172), 678–688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31791-4)

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 11(9), 1026–1030.

Hirose, Y., Berger, M. S., & Pieper, R. O. (2001). p53 Effects Both the Duration of G₂/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research*, 61(5), 1957 LP – 1963. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/5/1957.abstract>

Hochberg, F. H., & Pruitt, A. (1980). Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*, 30(9), 907–911.

Huang, J., Li, H., & Ren, G. (2015). Epithelial-mesenchymal transition and drug

- resistance in breast cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 47(3), 840–848. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3084>
- Ishimaru, H., Morikawa, M., Iwanaga, S., Kaminogo, M., Ochi, M., & Hayashi, K. (2001). Differentiation between high-grade glioma and metastatic brain tumor using single-voxel proton MR spectroscopy. *European Radiology*, 11(9), 1784–1791. <https://doi.org/10.1007/s003300000814>
- Jacobs, A. H., Kracht, L. W., Gossmann, A., Ruger, M. A., Thomas, A. V, Thiel, A., & Herholz, K. (2005). Imaging in neurooncology. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(2), 333–347. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.2.333>
- Jukich, P. J., McCarthy, B. J., Surawicz, T. S., Freels, S., & Davis, F. G. (2001). Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994. *Neuro-Oncology*, 3(3), 141–151.
- Kaal, E. C. A., & Vecht, C. J. (2004). The management of brain edema in brain tumors. *Current Opinion in Oncology*, 16(6), 593–600.
- Kalluri, R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1417–1419. <https://doi.org/10.1172/JCI39675>
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784. <https://doi.org/10.1172/JCI20530>
- Kaschten, B., Stevenaert, A., Sadzot, B., Deprez, M., Degueldre, C., Del Fiore, G., ... Reznik, M. (1998). Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-fluorodeoxyglucose and/or carbon-11-methionine. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 39(5), 778–785.
- Kast, R. E., Skuli, N., Karpel-Massler, G., Frosina, G., Ryken, T., & Halatsch, M.-E. (2017). Blocking epithelial-to-mesenchymal transition in glioblastoma with a sextet of repurposed drugs: the EIS regimen. *Oncotarget*, 8(37), 60727–60749. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18337>

- Kaufhold, S., & Bonavida, B. (2014). Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *33*, 62. <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0062-0>
- Kawamoto, A., Yokoe, T., Tanaka, K., Saigusa, S., Toiyama, Y., Yasuda, H., ... Kusunoki, M. (2012). Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, *27*(1), 51–57. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1485>
- Kita, M., Okawa, T., Tanaka, M., & Ikeda, M. (1989). [Radiotherapy of malignant glioma--prospective randomized clinical study of whole brain vs local irradiation]. *Gan no rinsho. Japan journal of cancer clinics*, *35*(11), 1289–1294.
- Koehler, P. J. (1995). Use of corticosteroids in neuro-oncology. *Anti-Cancer Drugs*, *6*(1), 19–33.
- Kostaras, X., Cusano, F., Kline, G. A., Roa, W., & Easaw, J. (2014). Use of dexamethasone in patients with high-grade glioma: a clinical practice guideline. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *21*(3), e493-503. <https://doi.org/10.3747/co.21.1769>
- Kothari, A. N., Mi, Z., Zapf, M., & Kuo, P. C. (2014). Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine*, *3*, 35. <https://doi.org/10.1186/s40169-014-0035-0>
- Kreisl, T. N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., ... Fine, H. A. (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(5), 740–745. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3055>
- Kreuzer, K.-A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., ... Schmidt, C. A. (1999). Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-free Detection of β -Actin Transcripts as Quantitative Reference. *Clinical Chemistry*, *45*(2), 297 LP – 300. Retrieved from <http://clinchem.aaccjnl.org/content/45/2/297.abstract>

- Krieg, S. M., Schnurbus, L., Shiban, E., Droese, D., Obermueller, T., Buchmann, N., ... Ringel, F. (2013). Surgery of highly eloquent gliomas primarily assessed as non-resectable: risks and benefits in a cohort study. *BMC Cancer*, *13*, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-51>
- Kubben, P. L., ter Meulen, K. J., Schijns, O. E., ter Laak-Poort, M. P., van Overbeeke, J. J., & Santbrink, H. van. (2011). Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *The Lancet Oncology*, *12*(11), 1062–1070. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70130-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70130-9)
- Kubelt, C., Hattermann, K., Sebens, S., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. *International Journal of Oncology*, *46*(6), 2515–2525. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2944>
- Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y., & Bapat, S. A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *27*(9), 2059–2068. <https://doi.org/10.1002/stem.154>
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., ... Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*, *95*(2), 190–198. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lang, S. H., Hyde, C., Reid, I. N., Hitchcock, I. S., Hart, C. A., Bryden, A. A. G., ... Maitland, N. J. (2002). Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *The Prostate*, *52*(4), 253–263. <https://doi.org/10.1002/pros.10088>
- Laperriere, N., Zuraw, L., & Cairncross, G. (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, *64*(3),

259–273. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(02\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(02)00078-6)

Lechapt-Zalcman, E., Levallet, G., Dugue, A. E., Vital, A., Diebold, M.-D., Menei, P., ... Guillamo, J.-S. (2012). O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy. *Cancer*, *118*(18), 4545–4554. <https://doi.org/10.1002/cncr.27441>

Lee, A. Y. Y., Levine, M. N., Baker, R. I., Bowden, C., Kakkar, A. K., Prins, M., ... Gent, M. (2003). Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *The New England Journal of Medicine*, *349*(2), 146–153. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025313>

Lewis-Tuffin, L. J., Rodriguez, F., Giannini, C., Scheithauer, B., Necela, B. M., Sarkaria, J. N., & Anastasiadis, P. Z. (2010). Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PloS One*, *5*(10), e13665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013665>

Li, M., Zhang, B., Sun, B., Wang, X., Ban, X., Sun, T., ... Zhao, X. (2010). A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *29*, 109. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-109>

Li, Q.-Q., Xu, J.-D., Wang, W.-J., Cao, X.-X., Chen, Q., Tang, F., ... Xu, Z.-D. (2009). Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(8), 2657–2665. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2372>

Li, R., Wu, S., Chen, X., Xu, H., Teng, P., & Li, W. (2016). miR-223/FBW7 axis regulates doxorubicin sensitivity through epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *American Journal of Translational Research*, *8*(6), 2512–2524.

Li, Y., Chen, C.-Q., He, Y.-L., Cai, S.-R., Yang, D.-J., He, W.-L., ... Zan, W.-H. (2012). Abnormal expression of E-cadherin in tumor cells is associated with poor prognosis

- of gastric carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 106(3), 304–310.
<https://doi.org/10.1002/jso.23008>
- Li, Y. M., Suki, D., Hess, K., & Sawaya, R. (2016). The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *Journal of Neurosurgery*, 124(4), 977–988.
<https://doi.org/10.3171/2015.5.JNS142087>
- Lin, L., Wang, G., Ming, J., Meng, X., Han, B., Sun, B., ... Jiang, C. (2016). Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(11), 15333–15339.
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5462-7>
- Lin, Y.-C., Lin, J.-C., Hung, C.-M., Chen, Y., Liu, L.-C., Chang, T.-C., ... Way, T.-D. (2014). Osthole inhibits insulin-like growth factor-1-induced epithelial to mesenchymal transition via the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in human brain cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5061–5071.
<https://doi.org/10.1021/jf501047g>
- Lindsey, S., & Langhans, S. A. (2014). Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Oncology*, 4, 358.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00358>
- Litofsky, N. S., Farace, E., Anderson, F. J., Meyers, C. A., Huang, W., & Laws, E. R. J. (2004). Depression in patients with high-grade glioma: results of the Glioma Outcomes Project. *Neurosurgery*, 54(2), 357–358.
- Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J., & Wang, Y.-K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966–15983.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>
- Liu, Q., Sun, Y., Zheng, J.-M., Yan, X.-L., Chen, H.-M., Chen, J.-K., & Huang, H.-Q. (2015). Formononetin sensitizes glioma cells to doxorubicin through preventing EMT via inhibition of histone deacetylase 5. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6434–6441.

- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D. J., Capper, D., Cree, I. A., ... Ellison, D. W. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *30*(4), 844–856. <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>
- Lovisa, S., LeBleu, V. S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vadrnagara, K., Carstens, J. L., ... Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*, *21*(9), 998–1009. <https://doi.org/10.1038/nm.3902>
- Lund-Johansen, M. (2013). Expect the Unexpected: Incidental Findings on Brain Magnetic Resonance Imaging. *World Neurosurgery*, *80*(5), e119–e120. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.07.021>
- Macdonald, D. R., Cascino, T. L., Schold, S. C., & Cairncross, J. G. (1990). Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, *8*(7), 1277–1280. <https://doi.org/10.1200/JCO.1990.8.7.1277>
- Mahabir, R., Tanino, M., Elmansuri, A., Wang, L., Kimura, T., Itoh, T., ... Tanaka, S. (2014). Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-Oncology*, *16*(5), 671–685. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not239>
- McConkey, D. J., Choi, W., Marquis, L., Martin, F., Williams, M. B., Shah, J., ... Dinney, C. (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *28*(3–4), 335–344.

<https://doi.org/10.1007/s10555-009-9194-7>

- Mendez, M. G., Kojima, S.-I., & Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(6), 1838–1851. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151639>
- Meng, J., Li, P., Zhang, Q., Yang, Z., & Fu, S. (2014). A radiosensitivity gene signature in predicting glioma prognostic via EMT pathway. *Oncotarget*, 5(13), 4683–4693. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2088>
- Meyerand, M. E., Pipas, J. M., Mamourian, A., Tosteson, T. D., & Dunn, J. F. (1999). Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel MR spectroscopy. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 20(1), 117–123.
- Mizoe, J.-E., Tsujii, H., Hasegawa, A., Yanagi, T., Takagi, R., Kamada, T., ... Takakura, K. (2007). Phase I/II clinical trial of carbon ion radiotherapy for malignant gliomas: combined X-ray radiotherapy, chemotherapy, and carbon ion radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 69(2), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.03.003>
- Moiyadi, A., & Shetty, P. (2011). Objective assessment of utility of intraoperative ultrasound in resection of central nervous system tumors: A cost-effective tool for intraoperative navigation in neurosurgery. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 2(1), 4–11. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.80077>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Recombinant DNA Part F* (Vol. 155, pp. 335–350). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Myung, J. K., Choi, S. A., Kim, S.-K., Wang, K.-C., & Park, S.-H. (2014). Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(5), 1977–1987.
- Nagane, M., Nishikawa, R., Narita, Y., Kobayashi, H., Takano, S., Shinoura, N., ... Matsutani, M. (2012). Phase II study of single-agent bevacizumab in Japanese

- patients with recurrent malignant glioma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 42(10), 887–895. <https://doi.org/10.1093/jjco/hys121>
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., & Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5160), 835–839. <https://doi.org/10.1126/science.7513443>
- Nitta, T., & Sato, K. (1995). Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. *Cancer*, 75(11), 2727–2731.
- Oh, S.-J., Ahn, E.-J., Kim, O., Kim, D., Jung, T.-Y., Jung, S., ... Moon, K.-S. (2019). The Role Played by SLUG, an Epithelial-Mesenchymal Transition Factor, in Invasion and Therapeutic Resistance of Malignant Glioma. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(6), 769–782. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00677-5>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(6), 479–489.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*, 68(10), 3645–3654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., ... Barnholtz-sloan, J. S. (2013). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 12(1), 28–36. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>
- Pace, A., Dirven, L., Koekkoek, J. A. F., Golla, H., Fleming, J., Rudà, R., ... Taphoorn, M. J. B. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *The Lancet. Oncology*, 18(6), e330–e340. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30345-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30345-5)
- Pan, J.-X., Wang, F., & Ye, L.-Y. (2016). Doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition through SEMA 4A in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), 610–614.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.167>

- Paravati, A. J., Heron, D. E., Landsittel, D., Flickinger, J. C., Mintz, A., Chen, Y.-F., & Huq, M. S. (2011). Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma and anaplastic astrocytoma: validation of Radiation Therapy Oncology Group-Recursive Partitioning Analysis in the IMRT and temozolomide era. *Journal of Neuro-Oncology*, *104*(1), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0499-8>
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5897), 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
- Patel, M., McCully, C., Godwin, K., & Balis, F. M. (2003). Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. *Journal of Neuro-Oncology*, *61*(3), 203–207.
- Patronas, N. J., Di Chiro, G., Kufta, C., Bairamian, D., Kornblith, P. L., Simon, R., & Larson, S. M. (1985). Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. *Journal of Neurosurgery*, *62*(6), 816–822. <https://doi.org/10.3171/jns.1985.62.6.0816>
- Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, *48*(5–6), 365–375. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041794hp>
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Raimondi, A., Pola, S., Cattaneo, M. G., ... Pietrini, G. (2002). Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 16), 3331–3340.
- Phelps, M. E. (2000). PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *41*(4), 661–681.
- Piao, Y., Liang, J., Holmes, L., Henry, V., Sulman, E., & de Groot, J. F. (2013). Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal

- transition. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(16), 4392–4403. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1557>
- Ponte, P., Gunning, P., Blau, H., & Kedes, L. (1983). Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta- and gamma-cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Molecular and Cellular Biology*, 3(10), 1783–1791. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.10.1783>
- Provenzale, J. M., McGraw, P., Mhatre, P., Guo, A. C., & Delong, D. (2004). Peritumoral brain regions in gliomas and meningiomas: investigation with isotropic diffusion-weighted MR imaging and diffusion-tensor MR imaging. *Radiology*, 232(2), 451–460. <https://doi.org/10.1148/radiol.2322030959>
- Rasul, F. T., & Watts, C. (2015). Novel Surgical Approaches to High-Grade Gliomas. *Current Treatment Options in Neurology*, 17(9), 369. <https://doi.org/10.1007/s11940-015-0369-y>
- Rees, J. (2003). Advances in magnetic resonance imaging of brain tumours. *Current Opinion in Neurology*, 16(6), 643–650. <https://doi.org/10.1097/01.wco.0000102626.38669.b9>
- Reitman, Z. J., & Yan, H. (2010). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), 932–941. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq187>
- Ren, Y., Zhou, X., Yang, J.-J., Liu, X., Zhao, X., Wang, Q., ... Kang, C. (2015). AC1MMYR2 impairs high dose paclitaxel-induced tumor metastasis by targeting miR-21/CDK5 axis. *Cancer Letters*, 362(2), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.038>
- Reyderman, L., Statkevich, P., Thonoor, C. M., Patrick, J., Batra, V. K., & Wirth, M. (2004). Disposition and pharmacokinetics of temozolomide in rat. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 34(5), 487–500. <https://doi.org/10.1080/00498250410001685737>

- Ringel, F., Pape, H., Sabel, M., Krex, D., Bock, H. C., Misch, M., ... Simon, M. (2016). Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neuro-Oncology*, *18*(1), 96–104. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov145>
- Röhn, G., Koch, A., Krischek, B., Stavrinou, P., Goldbrunner, R., & Timmer, M. (2018). ACTB and SDHA Are Suitable Endogenous Reference Genes for Gene Expression Studies in Human Astrocytomas Using Quantitative RT-PCR. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *17*, 1533033818802318. <https://doi.org/10.1177/1533033818802318>
- Rosso, L., Brock, C. S., Gallo, J. M., Saleem, A., Price, P. M., Turkheimer, F. E., & Aboagye, E. O. (2009). A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Research*, *69*(1), 120–127. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2356>
- Ruscetti, M., Quach, B., Dadashian, E. L., Mulholland, D. J., & Wu, H. (2015). Tracking and Functional Characterization of Epithelial-Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Research*, *75*(13), 2749–2759. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3476>
- Ryu, S., Buatti, J. M., Morris, A., Kalkanis, S. N., Ryken, T. C., & Olson, J. J. (2014). The role of radiotherapy in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *Journal of Neuro-Oncology*, *118*(3), 489–499. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1337-6>
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, *230*(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Sanai, N., Polley, M.-Y., McDermott, M. W., Parsa, A. T., & Berger, M. S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *Journal of Neurosurgery*, *115*(1), 3–8. <https://doi.org/10.3171/2011.2.jns10998>
- Schonberg, T., Pianka, P., Hendler, T., Pasternak, O., & Assaf, Y. (2006). Characterization of displaced white matter by brain tumors using combined DTI and

fMRI. *NeuroImage*, 30(4), 1100–1111.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.11.015>

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. *The Lancet Oncology*, 12(11), 997–1003. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70196-6)

Shapiro, W. R., Green, S. B., Burger, P. C., Mahaley, M. S. J., Selker, R. G., VanGilder, J. C., ... Strike, T. A. (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *Journal of Neurosurgery*, 71(1), 1–9. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.1.0001>

Shi, Z., Zhang, J., Qian, X., Han, L., Zhang, K., Chen, L., ... Kang, C. (2013). AC1MMYR2, an inhibitor of dicer-mediated biogenesis of Oncomir miR-21, reverses epithelial-mesenchymal transition and suppresses tumor growth and progression. *Cancer Research*, 73(17), 5519–5531. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0280>

Shih, J.-Y., Tsai, M.-F., Chang, T.-H., Chang, Y.-L., Yuan, A., Yu, C.-J., ... Yang, P.-C. (2005). Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(22), 8070–8078. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0687>

Shinoura, N., Paradies, N. E., Warnick, R. E., Chen, H., Larson, J. J., Tew, J. J., ... Hirohashi, S. (1995). Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas. *British Journal of Cancer*, 72(3), 627–633. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.384>

Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., ... Miyazaki, M. (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *British Journal of Cancer*, 94(12), 1816–1822. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603193>

Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K.

- D., ... Shinohara, M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry*, 28(5), 897–916. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x>
- Solheim, O., Selbekk, T., Jakola, A. S., & Unsgård, G. (2010). Ultrasound-guided operations in unselected high-grade gliomas---overall results, impact of image quality and patient selection. *Acta Neurochirurgica*, 152(11), 1873–1886. <https://doi.org/10.1007/s00701-010-0731-5>
- Sommers, C. L., Walker-Jones, D., Heckford, S. E., Worland, P., Valverius, E., Clark, R., ... Gelmann, E. P. (1989). Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 49(15), 4258–4263.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., & Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*, 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., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J. C., & Pentheroudakis, G. (2014). High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(April), 93–101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>
- Stupp, Roger, Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., ... Mirimanoff, R.-O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp, Roger, Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., ... Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Stupp, Roger, Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., ... 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>
- Taal, W., Oosterkamp, H. M., Walenkamp, A. M. E., Dubbink, H. J., Beerepoot, L. V., Hanse, M. C. J., ... van den Bent, M. J. (2014). Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, *15*(9), 943–953. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70314-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70314-6)
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *102*(4), 639–655.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, *7*(5), 619–627.
- Tato-Costa, J., Casimiro, S., Pacheco, T., Pires, R., Fernandes, A., Alho, I., ... Costa, L. (2016). Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, *15*(2), 170-178.e3. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2015.09.003>
- Tesileanu, C. M. S., Dirven, L., Wijnenga, M. M. J., Koekkoek, J. A. F., Vincent, A. J. P. E., Dubbink, H. J., ... van den Bent, M. J. (2020). Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. *Neuro-Oncology*, *22*(4), 515–523. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz200>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Tremont-Lukats, I. W., Ratilal, B. O., Armstrong, T., & Gilbert, M. R. (2008).

- Antiepileptic drugs for preventing seizures in people with brain tumors. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD004424. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004424.pub2>
- Tsukamoto, H., Shibata, K., Kajiyama, H., Terauchi, M., Nawa, A., & Kikkawa, F. (2007). Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, *107*(3), 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.058>
- Unsgard, G., Solheim, O., Lindseth, F., & Selbekk, T. (2011). Intra-operative imaging with 3D ultrasound in neurosurgery. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, *109*, 181–186. https://doi.org/10.1007/978-3-211-99651-5_28
- Upton, M. P., Hirohashi, S., Tome, Y., Miyazawa, N., Suemasu, K., & Shimosato, Y. (1986). Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *The American Journal of Surgical Pathology*, *10*(8), 560–567.
- Ushio, Y., Kochi, M., Hamada, J., Kai, Y., & Nakamura, H. (2005). Effect of surgical removal on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastoma. *Neurologia Medico-Chirurgica*, *45*(9), 454–460; discussion 460–461. <https://doi.org/10.2176/nmc.45.454>
- Utsuki, S., Sato, Y., Oka, H., Tsuchiya, B., Suzuki, S., & Fujii, K. (2002). Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, *57*(3), 187–192.
- van Rijn, J., Heimans, J. J., van den Berg, J., van der Valk, P., & Slotman, B. J. (2000). Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, *47*(3), 779–784. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(99\)00539-8](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00539-8)
- Vandekerckhove, J., & Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of Molecular Biology*, *126*(4), 783–802. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90020-7)

- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Network, T. C. G. A. R. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Villalva, C., Cortes, U., Wager, M., Tourani, J.-M., Rivet, P., Marquant, C., ... Karayan-Tapon, L. (2012). O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation Status in Glioma Stem-Like Cells is Correlated to Temozolomide Sensitivity Under Differentiation-Promoting Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6983–6994. <https://doi.org/10.3390/ijms13066983>
- Walker, M. D., Green, S. B., Byar, D. P., Alexander, E. J., Batzdorf, U., Brooks, W. H., ... Strike, T. A. (1980). Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England Journal of Medicine*, 303(23), 1323–1329. <https://doi.org/10.1056/NEJM198012043032303>
- Wang, X., Jiang, R., Cui, E., Feng, W., Guo, H., Gu, D., ... Bao, Y. (2016). COUP-TFII promotes colorectal carcinoma resistance to doxorubicin involving inhibition of epithelial-mesenchymal transition [corrected]. *American Journal of Translational Research*, 8(9), 3921–3929.
- Watts, C., & Sanai, N. (2016). Surgical approaches for the gliomas. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 51–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00004-9>
- Weber, C. E., Li, N. Y., Wai, P. Y., & Kuo, P. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, TGF-beta, and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *Journal of Burn Care & Research : Official Publication of the American Burn Association*, 33(3), 311–318. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e318240541e>
- Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J. C., Stupp, R., Falini, A., ... Wick, W. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *The Lancet Oncology*, 15(9), e395–e403. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70011-7)
- Wen, P. Y., Macdonald, D. R., Reardon, D. A., Cloughesy, T. F., Sorensen, A. G., Galanis, E., ... Chang, S. M. (2010). Updated Response Assessment Criteria for

- High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), 1963–1972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3541>
- Wen, P. Y., Schiff, D., Kesari, S., Drappatz, J., Gigas, D. C., & Doherty, L. (2006). Medical management of patients with brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 80(3), 313–332. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9193-2>
- Wick, W., & Kuker, W. (2004). Brain edema in neurooncology: radiological assessment and management. *Onkologie*, 27(3), 261–266. <https://doi.org/10.1159/000077976>
- Wick W et al. (2021). S2k-Leitlinie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 20.08.2022). *Deutsche Gesellschaft Für Neurologie*.
- Wilson, T. a, Karajannis, M. a, & Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5, 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>
- Wolbers, J. G. (2014). Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chinese Journal of Cancer*, 33(1), 8–15. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10219>
- Xiong, Y., Ji, W., Fei, Y., Zhao, Y., Wang, L., Wang, W., ... Liang, Z. (2017). Cathepsin L is involved in X-ray-induced invasion and migration of human glioma U251 cells. *Cellular Signalling*, 29, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.10.012>
- Xu, T., Zhang, J., Chen, W., Pan, S., Zhi, X., Wen, L., ... Liang, T. (2016). ARK5 promotes doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma via epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Letters*, 377(2), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.026>
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., ... Bigner, D. D. (2009, February). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
- Yan, Y.-R., Xie, Q., Li, F., Zhang, Y., Ma, J.-W., Xie, S.-M., ... Zhong, X.-Y. (2014).

- Epithelial-to-mesenchymal transition is involved in BCNU resistance in human glioma cells. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 34(2), 128–134. <https://doi.org/10.1111/neup.12062>
- Yang, H. W., Menon, L. G., Black, P. M., Carroll, R. S., & Johnson, M. D. (2010). SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer*, 10, 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-301>
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818–829. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009>
- Zaboronok, A., Isobe, T., Yamamoto, T., Sato, E., Takada, K., Sakae, T., ... Matsumura, A. (2014). Proton beam irradiation stimulates migration and invasion of human U87 malignant glioma cells. *Journal of Radiation Research*, 55(2), 283–287. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrt119>
- Zhang, H., Liu, J., Yue, D., Gao, L., Wang, D., Zhang, H., & Wang, C. (2013). Clinical significance of E-cadherin, beta-catenin, vimentin and S100A4 expression in completely resected squamous cell lung carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 66(11), 937–945. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201467>
- Zhang, J., Stevens, M. F. G., & Bradshaw, T. D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
- Zhang, L., Wang, H., Zhu, J., Ding, K., & Xu, J. (2014). FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 10707–10714. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2386-y>
- Zhang, X., Li, X., Zhang, N., Yang, Q., & Moran, M. S. (2011). Low doses ionizing radiation enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(1), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.074>
- Zhao, H., Wang, S., Song, C., Zha, Y., & Li, L. (2016). The prognostic value of MGMT

promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-1012-4>

Zhao, J., Zhang, L., Dong, X., Liu, L., Huo, L., & Chen, H. (2018). High Expression of Vimentin is Associated With Progression and a Poor Outcome in Glioblastoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM*, 26(5), 337–344. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000420>

Zhao, Y., Yan, Q., Long, X., Chen, X., & Wang, Y. (2008). Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochemistry and Function*, 26(5), 571–577. <https://doi.org/10.1002/cbf.1478>

Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., ... Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525–530. <https://doi.org/10.1038/nature16064>

8 ANHANG

8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit des MGMT-Methylierungsstatus	41
Abbildung 2: Genexpressionsanalyse auf RNA-Ebene im Tumorgewebe und im gesundem Hirngewebe.....	42
Abbildung 3: Proteinexpressionsanalyse im Tumorgewebe und im gesunden Hirngewebe.....	44
Abbildung 4: Proteinexpression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus.....	45
Abbildung 5: RNA-Expression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus.....	46
Abbildung 6: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SNAIL Expression auf Proteinebene	50
Abbildung 7: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der SNAIL Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	51
Abbildung 8: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der SNAIL Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	52
Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SLUG Expression auf Proteinebene	53
Abbildung 10: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der SLUG Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	54
Abbildung 11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der SLUG Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	55
Abbildung 12: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der N-Cadherin Expression auf Proteinebene	56

Abbildung 13: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der N-Cadherin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	57
Abbildung 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der N-Cadherin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	57
Abbildung 15: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression auf Proteinebene	58
Abbildung 16: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der E-Cadherin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	59
Abbildung 17: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der E-Cadherin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	60
Abbildung 18: Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Vimentin Expression auf Proteinebene	61
Abbildung 19: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der Vimentin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	62
Abbildung 20: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Vimentin Expression bei positiven und negativen MGMT-Methylierungsstatus	63

8.2 GERÄTE UND MATERIALIEN

NAME	HERSTELLER
Dualfilter T.I.P.S.®, PCR clean & sterile, 2 –100 µL, 2-200 µL, 50 – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR Tubes, 0.2 mL, PCR clean	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Latitude E6510	DELL
MicroAmp 96-Well Support Base	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
Microtubes 1,5ml DNA LowBind	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikro 200R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Reference® Pipetten (100-1000µL, 10- 100µl, 0,5-10µl, 0,1-2,5µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotina 420 R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Safe-Lock Tubes (1,5 / 2mL), PCR-clean	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal-Tips professional 10µL, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sartorius 1212 MP Waage	Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland

StepOne Plus Real-Time PCR System	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
T.I.P.S. Reloads, PCR clean, 0.1 – 20 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biochtechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex – Genie 2 G-560E	Scientific industries, INC., Bohemia, N.Y., USA

Tabelle 11: Benötigte Geräte und Materialien während der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion

NAME	HERSTELLER
Braun Multi Gourmet Dampfgarer Typ: 3216	Braun GmbH, Deutschland
DCS LabLine Pap Pen	DCS Innovative Diagnostik Systeme
Deckgläser 24x36 mm (Stärke 0,13- 0,16mm)	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik Emmendingen, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm (Stärke 0,13- 0,16mm)	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik Emmendingen, Deutschland
Digi-Lock Timer Typ: TR119	Carl ROTH GmbH&CoKG. Karlsruhe, Deutschland
Digital Sight Nikon DS-L2	Nikon Corporation, Japan
Entwässerungsgerät Tissue Tek VIP 5 Jr	Sakura Finetek Europe B.V. 2408AV Alphen aan den Rijn, Niederlande
Feuchte Kammer Typ: ABOG	Keutz Labortechnik, Reichskirchen, Deutschland
Glison Pipetten 0,2-2 µL, 2-20 µL, 20- 200 µL, 100-1000 µL	Glison, France
Heizplatte Typ: SK-12	Medax Nagel GmbH Kiel, Deutschland
Hettich Zentrifuge 1402	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

KP Marker	HistoLab Products AB, Göteborg, Schweden
Mikroskop Leica DMLB Type: 020-519.511	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH Wetzlar, Deutschland
Mikrotom HM 355 S	Micorm GmbH, Walldorf, Deutschland
Ofen Medite TDO Sahara	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
pH-Meter inoLab pH Level 1	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 0,5-20 µL, 2-200 µL, 50-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikrotubes 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
SuperFrost Plus-Objektträger Microscope Slides	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek Mesh Biopsy Cassette U.S. Patent	Sakura Finetek Europe B.V. 2408AV Alphen aan den Rijn, Niederlande
Wasserbad Typ: SK12	Medax Nagel GmbH Kiel

Table 12: *Benötigte Geräte und Materialien während der Immunhistochemie*

8.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

NAME	HERSTELLER
Chloroform CHROMASOLV	Riedel-de Haën AG, Seelze,
Ethanol 99.8 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika
Nuclease-Free-Water 50 mL	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit 50: - 100µL 7x gDNA Wipeout Buffer - 50µL Quantiscript Reverse Transcriptase - 200µL 5x Quantiscript RT Buffer - 50µL RT Primer Mix - 1,9ml RNase-Free-Water	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50) - 50 RNeasy Mini Spin Columns - QIAzol Lysis Reagent - RNase-free Reagents - Buffers (RPE und RW1)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan Gene Expression Assay HS01023894-m1 CDH1 (E-Cadherin)	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
TaqMan Gene Expression Assay HS00161904-m1 SNAI2	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
TaqMan Gene Expression Assay HS00195591-m1 SNAI1	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
TaqMan Gene Expression Assay HS00958116-m1 VIM	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

TaqMan Gene Expression Assay HS00983056-m1 CDH2 (N-Cadherin)	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
TaqMan Gene Expression Assay HS9999903-m1 ACTB	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
TaqMan Gene Expression Master Mix <ul style="list-style-type: none"> - AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Ultra Pure) - Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) with deoxyuridine triphosphate (dUTP) - ROX™ Passive Reference - Optimized buffer components 	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

Table 13: Verbrauchsmaterialien während der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion

NAME	HERSTELLER
Ampuwa Spüllösung 1000ml Plastipur	Fresenius Kabi, Frankreich
Chloralhydrat EMPROVE	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
DAB-2-Komponenten-Kit 1x6ml DAB-Konzentrat R573 1x100ml DAB-Substratpuffer R574	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
DCS LabLine Antikörper- Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
DCS LabLine Citrat-Puffer, 10x, 500ml	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
DCS LabLine Waschpuffer, 20x, 500 ml	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
Eosin AG 1B-419	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

Essigsäure 100%	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung, Roti-Histofix 4%	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin cryst. C.I.75290	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
HRP-Polymerenhancer Kit DCS SuperVision 2 (2-Schritt HRP-Polymer-Kit mit DAB)	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
Isopropylalkohol (Isopropanol) 100%, 20 KG	Stockmeier Chemie GmbH & Co.KG, Dillenburg, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat EMSURE	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin Surgipath Paraplast, Tissue Embedding Medium 1kg	Leica Biosystems Richmond, Inc., Vereinigte Staaten von Amerika
Richard-Allan Scientific Cytoseal XYL	Thermo Scientific, Vereinigtes Königreich
Titriplex III 372g/l	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
TitriPUR Hydrochloric acid 1mol/l 1.09057.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
TitriPUR Sodium hydroxide solution 1mol/l 1.09137.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% 1.08597.1000	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol (Isomere) 10 l	Carl ROTH GmbH & Co KG., Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure, Granulat 100% rein	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien während der Immunhistochemie

NAME	NUMMER UND HERSTELLER	KONTROLL-GEWEBE	VERDÜNNUNG	VOR-BEHANDLUNG
Anti-E-Cadherin, polyklonaler Kaninchen-AK	ab15148, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Hautgewebe	1:100	Citratpuffer pH=6,0
Anti-N-Cadherin, monoklonaler Maus-AK	ab98952, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Herzmuskel- gewebe	1:2000	Citratpuffer pH=6,0
Anti-SNAIL+ SLUG, polyklonaler Kaninchen-AK	ab180714, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Nierengewebe	1:1000	Citratpuffer pH=6,0
Anti-Vimentin, monoklonaler Kaninchen-AK	ab92547. Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Adenokarzinom Mamma	1:500	Ohne Vorbehandlung

Tabelle 15: Verwendete Antikörper während der Immunhistochemie

8.4 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Komponenten für die Elimination der genomischen DNA</i>	28
<i>Tabelle 2: Komponenten für die reverse Transkription</i>	29
<i>Tabelle 3: Farbstoffe des Reporters und des Quenchers</i>	30
<i>Tabelle 4: Pipettierschema der 96-well Platte</i>	31
<i>Tabelle 5: Rezepte und Ansätze für die immunhistochemische Analyse</i>	35
<i>Tabelle 6: Verdünnung der Antikörper</i>	36
<i>Tabelle 7: Kontrollgewebe der Antikörper</i>	37
<i>Tabelle 8: Prozentuale Anteil der gefärbten Zellen und der zugeordnete Zahlenwert</i> ...	38
<i>Tabelle 9: Patientenkollektiv</i>	40
<i>Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens mit und ohne MGMT-Stratifizierung</i>	49
<i>Tabelle 11: Benötigte Geräte und Materialien während der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion</i>	110
<i>Tabelle 12: Benötigte Geräte und Materialien während der Immunhistochemie</i>	111
<i>Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien während der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion</i>	113
<i>Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien während der Immunhistochemie</i>	114
<i>Tabelle 15: Verwendete Antikörper während der Immunhistochemie</i>	115

8.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(11C)MET	<i>Methyl-(11C)-L-Methionin</i>
(18F)-FDG.....	<i>(18F)-fluoro-2-deoxy-D-Glucose</i>
5-ALA	<i>5-Aminolävulinsäure</i>
5-FU	<i>5-Fluoruracil</i>
ACNU.....	<i>Nimustin</i>
ACTB	<i>Actin-beta</i>
Akt.....	<i>Proteinkinase B</i>
AMP	<i>Adenosinmonophosphat</i>
AMPK	<i>Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase</i>
BCNU.....	<i>Carmustin</i>
CCNU.....	<i>Lomustin</i>
cCT	<i>cranielle Computertomografie</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CDH1	<i>Cadherin-1-Gen</i>
CDH2	<i>Cadherin-2-Gen</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent-kinase 4</i>
CDK6	<i>cyclin-dependent-kinase 6</i>
CDKN2A.....	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B.....	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
cDNA	<i>komplementäre Desoxyribonukleinsäure</i>
CHI3L1.....	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>
CI.....	<i>Konfidenzintervall</i>
cMRT	<i>cranielle Magnetresonanztomografie</i>
DAB	<i>3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid</i>
DES	<i>direkte elektrische Stimulation</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DNasen.....	<i>Desoxyribonuklease</i>
dNTPs.....	<i>- Deoxyribonucleotide triphosphates</i>
DT-MRI.....	<i>Diffusions-Tensor-Magnetresonanztomografie</i>
dUTP	<i>deoxyuridine triphosphate</i>
<i>E-Cadherin</i>	<i>epitheliales Cadherin</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR.....	<i>epidermal growth factor rezeptor</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymale-Transition</i>
EORTC-NCIC.....	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group</i>
ERK.....	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
FET.....	<i>Fluoreszenz-Energietransfer</i>
FGF.....	<i>fibroblast growth factor</i>
FLAIR	<i>fluid-attenuated inversion recovery</i>
fMRT.....	<i>funktionelle Magnetresonanztomografie</i>
FTY720	<i>Fingolimod</i>
GABRA1	<i>gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1</i>
GBM.....	<i>Glioblastoma multiforme</i>
gDNA	<i>genomische Desoxyribonukleinsäure</i>
GMT	<i>glial-to-mesenchymal transition</i>
GTR.....	<i>gross total resection</i>
Gy.....	<i>Gray</i>

HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IDH	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
ioMRT	<i>intraoperative MRT</i>
IMRT	<i>intensity-modulated radiotherapy</i>
iUS	<i>intraoperative Ultraschall</i>
KPS	<i>Karnofsky performance score</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCSF	<i>macrophage colony stimulation factor</i>
MERTK	<i>Mer-Tyrosinkinase</i>
MET	<i>mesenchymal-epitheliale-Transition</i>
mg	<i>Milligramm</i>
MGM2	<i>murine-double-minute 2</i>
MGM4	<i>murine-double-minute 4</i>
MGMT	<i>O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase</i>
miR-21	<i>mikro Ribonukleinsäure-21</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MRS	<i>Magnetresonanzspektroskopie</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomografie</i>
MTIC	<i>Methyl-triazenyl imidazole carboamide</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
NAA	<i>N-Acetylasparat</i>
NAPH	<i>Nikotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
N-Cadherin	<i>neuronales Cadherin</i>
NEFL	<i>Neurofilament light chain gene</i>
NF1	<i>Neurofibromatose Typ 1</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NPV-LDE-225	<i>Erismodegib</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OS	<i>Gesamtüberleben</i>
p70S6K	<i>ribosomale Protein-S6-Kinase beta-1</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PET	<i>Positronenemissionstomografie</i>
PFS	<i>progressionsfreie Überleben</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase, Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
q-RT-PCR	<i>quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin 1</i>
RB	<i>Retinoblastom</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RNasen	<i>Ribonukleasen</i>

RTK.....	<i>Rezeptor Tyrosin Kinase</i>
SD.....	<i>Standardabweichung</i>
SE	<i>Standardfehler</i>
shRNA.....	<i>small hairpin Ribonukleinsäure</i>
siRNA.....	<i>kleine eingreifende Ribonukleinsäuren</i>
SLC12A5.....	<i>potassium-chloride transporter member 5</i>
SYT1	<i>Synaptotagmin-1</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGF-beta	<i>transforming growth factor-beta</i>
TMZ	<i>Temozolomid</i>
TP53	<i>Tumorprotein 53</i>
VEGF	<i>vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren</i>
VT.....	<i>Volumenteil</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZEB	<i>zinc-fingers-E-box-binding</i>
ZNS	<i>zentrales Nervensystem</i>

9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Gött H, Nagl J, Hagedorn F, Thomas, S, et al. ZEB1 induces N-cadherin expression in human glioblastoma and may alter patient survival. *Mol Clin Oncol.* 2022;17(2):123.

Published 2022 Jun 8. doi:10.3892/mco.2022.2556

10 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„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 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Professor Dr. med. E. Uhl für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung und ihrer Durchführung an der Klinik für Neurochirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Von Herzen danke ich Frau Professor Dr. med. M. Kolodziej für die Überlassung des Dissertationsthemas und vor allem für die allumfassende strukturelle, fachliche und zwischenmenschliche Betreuung, ihre Motivationsgabe und ihre unendliche Geduld. Für die zahlreichen Stunden des Auswertens und Korrigierens bedanke ich mich herzlich.

Für die tatkräftige und kompetente Hilfe in der Einarbeitung in die experimentellen Methoden und die Beantwortung unzähliger Fragen möchte ich namentlich Dr. med. C. Koch, Dr. med. F. P. Schwarm, Ilona Magel und auch allen anderen Mitarbeitern der Klinik und des Labors danken. Für die grafische Ausarbeitung der Dissertation danke ich Frau Jasmin Nagl. Besonderer Dank gilt meiner Mitstreiterin Frau Dr. med. Frederike Hagedorn für die kooperative Zusammenarbeit im Rahmen dieser Dissertation.

Zudem möchte ich meine Eltern und meinen Geschwistern Sophia und Maximilian für ihre moralische, emotionale und fachliche Unterstützung im Rahmen des Studiums und bei dem Verfassen dieser Arbeit danken. Meiner Ehefrau Leli Thomas möchte ich für den fortwährenden Zuspruch und die unendliche Motivation danken.

12 LEBENSLAUF

