

Analyse des Proteingehaltes von Zystenflüssigkeiten zerebraler Tumoren mittels SELDI-TOF Technik

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

vorgelegt von Martin Hölscher
aus Münster

Giessen 2014

Analyse des Proteingehaltes von Zystenflüssigkeiten zerebraler Tumoren mittels SELDI-TOF Technik

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

vorgelegt von Martin Hölscher
aus Münster

Giessen 2014

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Neurochirurgische Klinik
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Direktor: Prof. Dr. med. S. E. Uhl

Gutachter:
PD Dr. med. U. Nestler
2. Gutachter:
Prof. Dr. E. Uhl

Tag der Disputation:

21.09.2015

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Hirntumore | 1 |
| 1.1.1 | Einteilung und Klassifikation | 1 |
| 1.1.2 | Klinik und Diagnose | 1 |
| 1.2 | Gliome | 1 |
| 1.2.1 | Glioblastoma multiforme | 2 |
| 1.2.1.1 | Definition und Epidemiologie | 2 |
| 1.2.1.2 | Makroskopie und Histopathologie | 2 |
| 1.2.1.3 | Pathogenese | 3 |
| 1.2.1.4 | Genetische Heterogenität | 3 |
| 1.2.1.5 | Proteinexpression | 4 |
| 1.2.1.6 | Therapie und Prognose | 5 |
| 1.3 | Hirnmetastasen | 6 |
| 1.3.1 | Definition und Epidemiologie | 6 |
| 1.3.2 | Makroskopie und Histopathologie | 7 |
| 1.3.3 | Pathogenese | 7 |
| 1.3.4 | Genetische Betrachtungen | 8 |
| 1.3.5 | Therapie und Prognose | 9 |
| 1.4 | Meningeom | 9 |
| 1.4.1 | Definition und Epidemiologie | 9 |
| 1.4.2 | Makroskopie und Histopathologie | 10 |
| 1.4.3 | Pathogenese und genetische Heterogenität | 10 |
| 1.4.4 | Proteinexpression | 11 |
| 1.4.5 | Therapie und Prognose | 11 |
| 1.5 | Zystische Tumoren | 12 |
| 1.5.1 | Definition und Epidemiologie | 12 |
| 1.5.2 | Pathogenese | 13 |
| 1.5.3 | Hirntumorzystenflüssigkeit | 13 |
| 1.5.4 | Therapie und Prognose | 14 |
| 1.6 | Proteinuntersuchung des Liquor cerebrospinalis | 15 |
| 1.7 | Proteine | 16 |
| 1.7.1 | Basigin | 16 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.7.2 | Ferritin light chain | 16 |
| 1.7.3 | Metallothionin | 17 |
| 1.8 | Problemstellung | 18 |
| 2. | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Patienten und Probengewinnung | 19 |
| 2.1.1 | Überlebenszeit bei Diagnose Glioblastom | 19 |
| 2.2 | Methoden | 19 |
| 2.2.1 | SELDI-TOF MS | 19 |
| 2.2.1.1 | Probengewinnung | 21 |
| 2.2.1.2 | Statistische Auswertung | 21 |
| 2.2.2 | Proteinidentifizierung | 22 |
| 2.2.3 | Immunhistochemie | 23 |
| 2.2.3.1 | Verwendete Antikörper | 24 |
| 2.2.3.2 | Arbeitsprotokoll | 25 |
| 2.2.3.3 | Auswertung der Immunhistochemie | 32 |
| 2.2.4 | Statistische Betrachtungen zur Überlebenszeit | 32 |
| 3. | Ergebnisse | 33 |
| 3.1 | SELDI-TOF-MS | 33 |
| 3.1.1 | Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastom und Liquor | 33 |
| 3.1.2 | Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastomrezidiv und Liquor | 33 |
| 3.1.3 | Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastom und Glioblastomrezidiv | 33 |
| 3.1.4 | Liquor von Patienten mit Spinalkanalstenose | 34 |
| 3.1.5 | Vergleich von Glioblastomproteinen und Metastasenproteinen | 34 |
| 3.1.6 | Direktsuche bekannter Proteine | 34 |
| 3.2 | Proteinidentifizierung | 35 |
| 3.3 | Immunhistochemie | 35 |
| 3.3.1 | Basigin | 36 |
| 3.3.2 | Ferritin | 37 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.3 | Metallothionin | 37 |
| 3.3.4 | Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten | 37 |
| 4. | Diskussion | 39 |
| 4.1 | Diskussion der Methoden | 39 |
| 4.1.1 | Patientenkollektiv | 39 |
| 4.1.2 | SELDI-TOF-MS | 40 |
| 4.1.3 | Proteinidentifizierung | 41 |
| 4.1.4 | Immunhistochemie | 42 |
| 4.2 | Diskussion der Ergebnisse | 43 |
| 4.2.1 | Basigin | 43 |
| 4.2.2 | Ferritin | 44 |
| 4.2.3 | Metallothionin | 45 |
| 4.2.4 | Diskussion der Vergleichsproben | 46 |
| 4.3 | Stellungnahme zur Problemstellung | 48 |
| 4.4 | Ausblick | 49 |
| 5. | Zusammenfassung | 50 |
| 5.1 | Deutsche Zusammenfassung | 50 |
| 5.2 | English summary | 51 |
| 6. | Abkürzungen | 52 |
| 7. | Referenzen | 54 |
| 8. | Anhang | 66 |
| 8.1 | Tabellenverzeichnis | 66 |
| 8.2 | Tabellen | 68 |
| 8.3 | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 8.4 | Abbildungen | 87 |
| 8.5 | Ehrenwörtliche Erklärung | 98 |
| 8.6 | Danksagung | 99 |

1. Einleitung

1.1 Hirntumore

1.1.1 Einteilung und Klassifikation

Hirntumore werden durch die WHO in vier Malignitätsgrade eingeteilt [40]. Der WHO-Grad-I bezeichnet histologisch gutartige Tumoren, bei welchen die Möglichkeit einer Heilung durch eine Operation besteht. WHO-Grad-II Tumoren sind ebenfalls histologisch gutartig, neigen jedoch zu infiltrativem Wachstum und Rezidiven. Mit einer Reduktion der Überlebenszeit gehen histologisch bösartige WHO-Grad-III Tumoren einher. Die Bezeichnung WHO-Grad-IV betrifft maligne, teils nekrotische Tumoren mit einer rapiden Krankheitsentwicklung und einer ungünstigen Prognose.

Zu den Hirntumoren im engeren Sinne gehören die Gliome als neuroepitheliale Tumoren. Weitere im Schädelinneren auftretende Tumoren sind beispielsweise Metastasen, meningeale Tumoren, Lymphome und hämatopoetische Tumoren, Keimzelltumoren oder Tumoren der Sellaregion.

1.1.2 Klinik und Diagnose

Bei der klinischen Untersuchung von Hirntumorpatienten findet sich die klassische Trias aus Kopfschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen und Stauungspapille, wobei der Kopfschmerz das häufigste Symptom darstellt [40]. Bei einem Viertel der Patienten treten zudem Schwindel und Gangstörungen auf. Des Weiteren finden sich progrediente psychopathologische Veränderungen oder fokale neurologische Störungen, daneben epileptische Anfälle. Bei rasch wachsenden Tumoren kann durch Herniation der Kleinhirntonsillen in das Foramen Magnum die Erstmanifestation einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen.

Diagnostisch führend sind bildgebende Verfahren wie kraniale Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie. Zur Sicherung der Diagnose kann die Diagnostik um Tumorbiopsien erweitert werden, welche mittels Kraniotomie oder mittels stereotaktischer Serienbiopsie erfolgen können.

1.2 Gliome

Gliome sind hirneigene Tumoren die von den Gliazellen des zentralen Nervensystems ausgehen. Entsprechend ihrer zugehörigen Glia-Vorläuferzelle unterscheidet man Ependymom, Oligodendrogliom und Astrozytom, sowie Mischgliome wie zum Beispiel das Oligoastrozytom. Eine fortschreitende Malignisierung von Gliomen ist besonders bei Tumoren des WHO-Grad II oder III zum WHO-Grad IV zu beobachten [50].

1.2.1 Glioblastoma multiforme

1.2.1.1 Definition und Epidemiologie

Das humane Glioblastom ist der häufigste neuroepitheliale Tumor im Erwachsenenalter. Die Interpretation des Glioblastoms als gemeinsame Endstrecke der astrozytären und der oligodendroglialen Reihe wurde durch die Zugehörigkeit des Tumors zur astrozytären Reihe abgelöst [45]. Das Glioblastom ist gekennzeichnet durch ein schnelles und invasives Wachstum sowie eine hohe Rezidivrate. Die Lokalisation des Tumors ist meist die subkortikale weisse Substanz der cerebralen Hemisphären, wobei temporale und parietale Hirnabschnitte am häufigsten betroffen sind. Hemisphärielle Glioblastome können über den Balken auf die kontralaterale Großhirnhälfte wachsen und werden dann als „Schmetterlingsgliome“ bezeichnet.

Das Glioblastom kann sich in jedem Alter manifestieren, zeigt jedoch eine Häufung im vierten bis siebten Lebensjahrzehnt, wobei Männer 1,28 mal häufiger betroffen sind als Frauen [40]. Beim Auftreten werden primäres und sekundäres Glioblastom voneinander unterschieden. Über 90 % der Glioblastome entwickeln sich sehr schnell als Ersterkrankung bei Patienten höheren Alters und werden als primäre Glioblastome bezeichnet. Sekundäre Glioblastome entstehen hingegen durch fortschreitende Entdifferenzierung benigner Vorstufen. Mit unter 10 % aller Glioblastome sind sie wesentlich seltener und treten mit einem Durchschnittsalter von 45 Jahren bevorzugt bei jüngeren Patienten auf.

Mit einer Inzidenz von 3,55 Fällen, pro 100.000 Einwohner in Mitteleuropa, beläuft sich der Anteil des Glioblastoms an allen intrakraniellen Neoplasien auf 12-15 %, der Anteil an allen Gliomen auf 69 % [50].

1.2.1.2 Makroskopie und Histopathologie

Das Glioblastom erhält durch gemeinsames Vorliegen von Bereichen mit Zysten, Nekrosen, Einblutungen und vaskulären Thrombosen ein multiformes Erscheinungsbild [23]. An die gelblich erscheinende, zentrale Nekrose schliesst sich eine gräuliche Tumorrandszone an. Durch das Vorhandensein von frischen und älteren Blutungen wirkt die Histologie des Glioblastoms inhomogen, wobei ausgedehnte Blutungen auftreten können und in einigen Fällen schlaganfall-ähnliche Symptome auslösen.

In einer 1988 vorgestellten Studie entwickelten Daumas-Duport und Mitarbeiter ein Klassifikationssystem zur histologischen Einteilung von Gliomen [10]. Es umfasst die Beurteilung von Kernatypien, Mitosenzahl, pathologischen Gefäßproliferationen und Nekrosezonen und dient zur Abschätzung des Tumorgades und der Überlebenszeit

(Tabelle 1). Hierbei werden die Grade I und II als benigne oder niedergradig bezeichnet. Die Grade III und IV beschreiben maligne, höhergradige Tumoren, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen.

1.2.1.3 Pathogenese

Die zelluläre, genetische und biochemische Heterogenität der Glioblastome legt die Vermutung nahe, dass die Tumoren aus einer primitiven multipotenten neuronalen Vorläuferzelle oder gar aus einer Stammzelle hervorgehen [17]. So wurden sowohl im Glioblastom selbst, als auch in Glioblastomzellkulturen Stammzeleigenschaften nachgewiesen. In Tierversuchen konnte ausserdem die Fähigkeit isolierter Zellen zur Tumorneogenese gezeigt werden.

1.2.1.4 Genetische Heterogenität

Die Entdifferenzierung neuroepithelialer Zellen zu malignen Tumorzellen ist ein vielschichtiger Prozess, welcher durch genetische Veränderungen begünstigt wird (Tabelle 2).

Beim primären Glioblastom findet sich in 70 % der Fälle ein sogenannter „loss of heterozygosity“ auf dem langen Arm von Chromosom 10, welcher häufig mit einer Mutation der dort lokalisierten tumorsuppressiven Tyrosinphosphatase PTEN/MMC einhergeht [58]. PTEN, lokalisiert auf der Bande 10q23.3, reguliert über die Ausschaltung von Signalwegen die Zellproliferation und das Wachstum. Wenn die Phosphataseaktivität durch die Mutation ausfällt, können Signalwege konstitutiv exprimiert werden, woraus ein überhandnehmendes Zellwachstum resultiert.

Eine Mutation im EGFR-Gen (Chromosom 7) führt durch Überexpression des EGF-Rezeptors zu einer proliferativ wirkenden Disregulation des PI-3 und RAS-MAPK Signalwegs. In 36 % der Glioblastome wird das EGFR-Gen überexprimiert, in 50-70 % dieser Fälle liegt wiederum die stark proliferativ wirkende, natürlich vorkommende Transkriptionsvariante delta EGFR vor [48].

Beim sekundären Glioblastom sind in 65 % Mutationen von Genen nachzuweisen, die an der p53 Signalkaskade beteiligt sind, welche beim primären Glioblastom nur in 28 % auftreten [40]. Normalerweise stoppt p53 den Zellteilungszyklus und induziert DNA-Reparaturmechanismen. Kommt es jedoch durch Mutationen zur Disregulation in der p53 Signalkaskade, zum Beispiel der Proteine pARF14 und mdm2, sind weder das Anhalten des Zellzyklus zur DNA-Reparatur, noch die Einleitung der Apoptose möglich.

Die DNA-geschädigten Zellen teilen sich unkontrolliert und es kommt zum Tumorwachstum.

Des Weiteren kommt bei vielen sekundären Glioblastomen ein Verlust (LOH) auf den Chromosomen 19q oder 22q hinzu.

Veränderungen wie beim primären Glioblastom, wie der Verlust des Chromosoms 10 oder die PTEN-Mutationen finden sich darüber hinaus beim Übergang von zunächst niedergradigen Astrozytomen in maligne sekundäre Glioblastome [13].

1.2.1.5 Proteinexpression

Die Analyse der Proteinexpression von Gliomen stellt eine wichtige Erweiterung der genetischen Studien dar [12]. Zwar konnten in den letzten 20 Jahren die DNA-Veränderungen weitgehend aufgeschlüsselt werden, ein spezifischer genetischer Defekt, der zwingend zur Entstehung von neuroepithelialen Tumoren führt, ist bislang jedoch nicht bekannt. Darüber hinaus führt nicht jede genetische Veränderung zu einer veränderten Proteinexpression der Zellen, was die Bedeutung der Proteinanalyse unterstreicht. In der Vergangenheit waren diese Untersuchungen noch mit zahlreichen Problemen behaftet, vor allem was die technischen Möglichkeiten der Identifizierung und Lokalisierung von Proteinen betrifft. Daher gibt es auch heute nur vergleichsweise wenige Erkenntnisse bezüglich der Wichtigkeit von Proteinen bei der Entstehung oder Progression von Gliomen. Im Gegensatz dazu sind bei Tumoren wie z.B. dem Mamma-, Kolon- oder Ovarialkarzinom die Qualität und die Quantität der Proteinanalysen weit fortgeschritten, was mitunter durch neue Verfahren wie der SELDI-TOF-MS ermöglicht wurde. Dieses Wissen bietet neue Möglichkeiten im Rahmen der Tumorerkennung, der Beurteilung des Verlaufes und auch der Therapie, eventuell sogar mit einer Beeinflussung der Prognose [43].

In einer 1998 veröffentlichten Studie konnten in 66 % aller astrozytären Tumoren Proteine der Metallothioninfamilie nachgewiesen werden, wobei eine signifikante Häufung bei höhergradigen Gliomen zu verzeichnen war [25]. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle im Wachstum von astrozytären Tumoren, die mit der Fähigkeit, Metallothionine zu exprimieren, gleichzeitig an Malignität gewinnen.

Des Weiteren findet sich auf der Oberfläche von Gliomzellen das Protein Basigin, welches Fibroblasten zur Produktion von Matrixmetalloproteinasen anregt [61]. Auch in nicht neoplastischem Hirngewebe ist Basigin in Endothelzellen von Blutgefäßen zu finden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Basiginkonzentration mit

steigendem Malignitätsgrad der Gliome zunimmt, was vermuten lässt, dass das Protein bei der Progression von Gliomen eine Bedeutung hat.

Ein anderes in Gliomen nachgewiesenes Protein ist Ferritin [77]. Dieses Heterodimer aus einer leichten und einer schweren Kette spielt eine Rolle als Regulatorprotein der zellulären Differenzierung. Als Antwort auf Insulingabe konnte in einem Versuch mit Rattengliomzellen die dosisabhängige Expression von Ferritin-mRNA beobachtet werden. Die gleiche Reaktion wurde nach Gabe von IGF-1 beobachtet, wobei hier die erreichbare Stimulation doppelt so hoch war. Weitere im Glioblastom exprimierte Proteine und ihre Funktionen zeigt Tabelle 3.

1.2.1.6 Therapie und Prognose

Die Therapie des Glioblastoms gestaltet sich auch heutzutage noch äußerst schwierig [75]. Zunächst erfolgt die operative Entfernung des Tumors, soweit dies die Lage des Tumors und der Zustand des Patienten zulassen. Das diffus invasive Wachstum des Glioblastoms macht jedoch auch nach vollständiger Resektion ein Rezidiv zur Regel, weswegen die adjuvanten radio- und chemotherapeutischen Verfahren einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, folgt der Operation die Kombination von Bestrahlung mit 60 Gray in 30 wochentäglichen Sitzungen zu 2 Gray und gleichzeitiger Chemotherapie mit Temozolomid. Diese erfolgt in einer Dosierung von 75mg pro m² Körperoberfläche an 40 aufeinanderfolgenden Tagen. Hieran schließen sich 6 Cyclen Temozolomid, in einer Dosierung von 200 mg/m² im Schema 5/23, über 6 Monate an [21, 68]. Zur Früherkennung von Rezidiven erfolgen im Abstand von 6 bis 8 Wochen regelmäßige Kontrollen mittels Magnetresonanztomographie. Im Fall eines Rezidivs ist häufig eine Reoperation sinnvoll, insbesondere bei ausgeprägter Raumforderung und längerem Intervall zur Erstoperation. Zudem profitieren die Patienten von einer zweiten Bestrahlung, zum Beispiel in Form einer stereotaktischen, hypofraktionierten Strahlentherapie. Auch der Wert einer Chemotherapie ist im Rezidiv belegt, wobei verschiedene Verfahren zur Anwendung kommen können. Neben erneuter Chemotherapie mit Temozolomid findet die Gabe eines Protokolls wie PVC (Procarbacin+Vincristin+CCNU) Anwendung, ein Unterschied in der Wirksamkeit konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden [63]. Eine ungewöhnlich hohe Ansprechrate von 61 % der Patienten wurde in einer unizentrischen Studie mit der

Kombination von Avastin und Irinotecan erreicht, was diese Wirkstoffkombination aktuell in den Mittelpunkt des Interesses rückt [73].

Ist die Anwendung aller geeigneten Verfahren ausgeschöpft und lässt sich dennoch das Tumorwachstum nicht mehr kontrollieren, ist eine palliative Therapie angezeigt. Neben physiotherapeutischen und pflegerischen Maßnahmen kommen medikamentöse Therapien zur Senkung des Hirndrucks z.B. mit Dexamethason oder Mannit zum Einsatz.

Die Prognose der Patienten mit Glioblastoma multiforme ist trotz intensiver Bemühungen und der oben genannten Therapieoptionen weiterhin schlecht und eine endgültige Heilung bislang nicht möglich. Mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von weniger als 20 % nach Diagnosestellung ist die Überlebenszeit der Patienten extrem kurz und hängt von einer Vielzahl klinischer Parameter ab [40]. Wesentlich sind hier der histologische Grad des Tumors, das Alter des Patienten sowie sein Allgemeinzustand. Dieser wird nach dem Karnofsky-Index bewertet (Tabelle 4), wobei Werte von 70 oder mehr als günstig gelten.

Ein weiterer, durch die Analyse der Arbeitsgruppe RTOG mittels der RPA-Methode in Betracht bezogener Parameter zur Bestimmung der Prognose ist die Arbeitsfähigkeit des Patienten. Das Ausmaß der Resektion des Tumors gewinnt zudem an Interesse und kann in einer modifizierten RPA berücksichtigt werden [55, 67].

Zunehmende Bedeutung in der Prognose des Glioblastoms erlangen Biomarker, welche genauere Information über das Wachstumsverhalten und das Ansprechen des Tumors auf Radio- und Chemotherapie geben können [31]. Beispiele hierfür sind das Protein YKL-40 (Chitinase-3-like-1), welches mit einer verringerten Überlebenszeit und schlechtem Ansprechen auf Radiotherapie einhergeht, oder MMP-9, das eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit anzeigt [54].

1.3 Hirnmetastasen

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Definierte Absiedlungen von Krebszellen im Hirngewebe, die von malignen Tumoren ausserhalb des Gehirns ausgehen, bezeichnet man als Hirnmetastasen.

Sie stellen die häufigste Neubildung des zentralen Nervensystems dar, wobei die genaue Inzidenz nicht bekannt ist. Bei 25 % der Autopsien von an Krebs verstorbenen Patienten konnten Hirnmetastasen nachgewiesen werden, was nahe legt, dass die wahre Inzidenz höher liegt als epidemiologische Studien der letzten Jahre vermuten lassen [20].

Die häufigsten der Metastase zugrunde liegenden Primärtumoren sind in absteigender Reihenfolge Lungenkrebs, Brustkrebs, das maligne Melanom und das Nierenzellkarzinom. Beim CUP-Syndrom („cancer of unknown primary“) bleibt der Primarius unbekannt. Die Patienten versterben eventuell noch bevor der Primärtumor nachgewiesen werden kann, teilweise ist dies nicht einmal bei der Autopsie möglich. Die Lokalisation von Hirnmetastasen liegt in über 80 % der Fälle in der Übergangszone zwischen grauer und weißer Substanz der cerebralen Hemisphären, etwa 15 % der Hirnmetastasen betreffen das Kleinhirn und 3 % den Hirnstamm [20]. Bei über 50 % der Patienten finden sich mehr als eine Hirnmetastase bei Diagnosestellung, oft sind im übrigen Körper weitere Metastasen zu finden.

1.3.2 Makroskopie und Histopathologie

Hirnmetastasen sind, unabhängig von ihrem Ursprungstumor, meist umschrieben und gut abgrenzbar, oft von einem peritumoralen Ödem umgeben [59].

Im Anschnitt zeigt sich eine grau-weissliche, gekörnte Oberfläche mit einem durch nekrotische Prozesse gelblich gefärbten Zentrum. Bei Metastasen des Chorionkarzinoms, Melanoms, Nierenzellkarzinoms und Lungenkarzinoms treten zudem häufig Blutungen auf. Die Metastasen des malignen Melanoms können in ihrer Morphologie, je nach Vorhandensein und Ausmaß von Melanin oder Einblutungen, eine von rot über braun reichende, bis sogar schwarze Färbung annehmen. Zudem gibt es amelanotische Metastasen des malignen Melanoms, die bis zu ein Drittel aller Hirnmetastasen ausmachen, makroskopisch aber nicht von Metastasen anderen Ursprungs zu unterscheiden sind [59].

So unterschiedlich wie die Primärtumoren der Hirnmetastasen sind auch ihre histologischen Eigenschaften. Die meist gruppiert und intraparenchymal wachsenden Zellen zerstören Hirngewebe, was Reaktionen wie Inflammation und mikrovaskuläre Proliferation hervorruft. Die entstehende Tumornekrose kann so ausgeprägt sein, dass nur noch in der Tumorperipherie und in Nähe zu Blutgefäßen eigentliches Metastasengewebe zu finden ist [59].

1.3.3 Pathogenese

Der Prozess der Invasion von metastasierenden Zellen in das Gehirngewebe erfolgt in mehreren Schritten [20]. Zunächst lösen sich die Zellen vom invasiv wachsenden Primärtumor los, indem sie mittels Sekretion verschiedener Enzyme die Basalmembran der umgebenden Gefäße durchbrechen und in die Blutbahn gelangen. Dort müssen sie

den durch die Zirkulation des Blutes entstehenden Scherkräften und auch dem Immunsystem widerstehen, bis sie das zentrale Nervensystem erreicht haben. Auf den Tumorzellen wurden Oberflächenmoleküle mit antiapoptotischen Eigenschaften gefunden, die zur Verlängerung der Überlebenszeit führen. Auch die Bildung von Tumorzellclustern mit Thrombozyten und Leukozyten schützt die Zellen vor mechanischen Schäden oder Angriffen durch das Immunsystem [20].

Lungentumoren stellen die häufigste Quelle von Hirnmetastasen dar [20]. Dies kann mit ihrer Häufigkeit und der Lokalisation erklärt werden, da die Tumorzellen Zugang zum Pulmonalvenensystem erlangen, das im linken Herzen mündet und der arteriellen Versorgung des Gehirns vorgeschaltet ist.

Neben der Gefäßversorgung spielen für die Entstehung von Metastasen organspezifische Oberflächenproteine auf den Endothelzellen eine wichtige Rolle. Diese erleichtern das Anheften der Tumorzellen, was das Auftreten von Hirnmetastasen bei bestimmten Primärtumoren, wie zum Beispiel dem malignen Melanom, wahrscheinlicher macht. Die Tumorzellcluster bleiben aufgrund ihrer Größe in den Kapillarstrecken der Hirngefäße liegen und beginnen dort, sich zu teilen. So finden sich die meisten Metastasen am Übergang zwischen grauer und weisser Substanz [20].

Ob die Tumorzellen weiter wachsen und unter welchen Umständen aus ihnen eine klinisch oder radiologisch relevante Metastase entsteht, wird durch Interaktionen zwischen Tumorzelle und umgebendem Hirngewebe beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Proteine wie Plasmin oder Matrixmetalloproteinase, welche die extrazelluläre Matrix auflösen können und somit den Tumorzellen die Migration in umgebendes Gewebe ermöglichen [44].

1.3.4 Genetische Betrachtungen

Mittels vergleichender genomischer Hybridisierung konnte eine hohe Übereinstimmung der Gene von Hirnmetastasen mit denen des Ursprungstumors ausserhalb des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Bei Metastasen eines Adenokarzinoms konnten zudem Gene wie Laminin B1 und Securin identifiziert werden, die primäre von metastatischen Tumoren differenzieren [20]. Das Vorhandensein dieser Genveränderungen im Primärtumor ist mit einer schlechteren Prognose und einer Erhöhung des metastatischen Potentials verbunden.

Zur Diagnosestellung oder zur Prognoseabschätzung von Hirnmetastasen spielt der Nachweis von im Prozess der Metastasierung wichtigen Genen jedoch bisher noch keine Rolle [40].

1.3.5 Therapie und Prognose

Bei der Therapie von Hirnmetastasen sind individuelle Faktoren des Patienten wie der Karnofsky-Index, die Tumorhistologie, die Anzahl der Metastasen und der Status der Primärerkrankung von entscheidender Bedeutung. Als effektive Therapiemöglichkeiten haben sich Chirurgie, Radiochirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie erwiesen [76]. Obwohl es derzeit keine Standardtherapie gibt, werden generelle Richtlinien für die Therapie empfohlen [14]. Patienten mit einer einzelnen Metastase sollten bei gutem Karnofsky-Index neben chirurgischer oder radiochirurgischer Therapie eine Ganzhirnbestrahlung erhalten. Bei Oligometastasen (2-3) sollte je nach Karnofsky-Index individuell über eine Dreifach-Kombination dieser Therapieverfahren nachgedacht werden. Die Therapieoptionen für Patienten mit multiplen Metastasen (4 oder mehr) sind limitiert. Palliative Therapieverfahren mit Ganzhirnbestrahlung sind im Allgemeinen indiziert, wobei chirurgische Interventionen auf Patienten mit Hirndruckzeichen reduziert sein sollten [14].

Zur Prognoseabschätzung hat die RTOG-Arbeitsgemeinschaft Patienten mit Hirnmetastasen in drei Gruppen eingeteilt. Sie umfassen die Kriterien Karnofsky-Index, Primärtumorkontrolle, Alter des Patienten und das Vorhandensein von extrakraniellen Metastasen (Tabelle 5) [18].

Weitere Vorhersageparameter beinhalten die Sensitivität des Tumors auf die Therapieverfahren, sowie die Anzahl und Lokalisation der Metastasen. Generell haben Patienten mit einer einzelnen Metastase durch die Möglichkeit einer chirurgischen Resektion eine verbesserte Lebensqualität und eine verbesserte Prognose [18].

1.4 Meningeom

1.4.1 Definition und Epidemiologie

Meningeome sind meist gutartige Hirntumoren (WHO Grad I) und machen mit einer Inzidenz von 4,5 pro 100.000 Einwohner zirka 30 % aller primären intrakraniellen Neoplasien aus [60]. Bestimmte Subtypen dieses Tumors können maligne entarten und werden dann den WHO-Graden II oder III zugeordnet.

Von der äusseren Zellschicht der Arachnoidea, den so genannten Kappenzellen, seinen Ursprung nehmend, manifestiert sich das Meningeom meist im sechsten oder

siebten Lebensjahrzehnt, mit einer annähernd doppelt so hohen Inzidenz bei Frauen wie bei Männern. Die Mehrzahl der Meningeome wächst intrakraniell mit einer bevorzugten Lokalisation über der cerebralen Konvexität, oft auch mit der Falx cerebri und den venösen Sinus in Verbindung. Weitere typische Lokalisationen sind die Olfaktoriusrinne und der Keilbeinflügel.

1.4.2 Makroskopie und Histopathologie

Das Meningeom präsentiert sich meist gut abgegrenzt als feste, runde Struktur, welche der Dura mater breit aufliegt oder diese und ihre Sinus infiltriert [40]. Bei Beteiligung des Schädelknochens ist eine charakteristische Hyperostose zu beobachten. Sogar eine Infiltration der Haut kann in manchen Fällen verzeichnet werden, genauso wie die Ausdehnung des Tumors in extrakranielle Bereiche, wie z.B. die Orbita. Angrenzendes Hirngewebe ist oft komprimiert, teilweise zeigt sich eine parenchymale Invasion. Auch können zerebrale Arterien von Tumorgewebe umgeben sein, die Arterienwand ist jedoch meist nicht von Tumorzellen infiltriert.

Histopathologisch lassen sich zahlreiche Subtypen des Tumors unterscheiden, wobei das meningotheliale, das fibroblastische und das transitionale Meningeom am häufigsten sind [60]. Das meningotheliale Meningeom ist durch reichlich eosinophiles Zytoplasma mit rundovalen, chromatinarmen Kernen und das fibroblastische Meningeom durch spindelartigen Aufbau der Tumorzellen mit längsovalen Kernen gekennzeichnet. Das transitionale Meningeom wird als Mischform zwischen den beiden oben genannten beschrieben.

1.4.3 Pathogenese und genetische Heterogenität

Die Entstehung des Meningeoms wird als Entartung von arachnoidalen Kappenzellen oder meningothelialen Vorläuferzellen verstanden [60]. Diese können von einer benignen Zelle, über eine atypische, zu einer anaplastischen Meningeomzelle proliferieren, was durch eine Anzahl genetischer Veränderungen begleitet wird (Tabelle 6).

Das Meningeom kann mit einer Neurofibromatose Typ II assoziiert sein, bei welcher es einen Schlüsselbefund darstellt. Neurofibromatose Typ II Patienten haben in vielen Fällen einen LOH auf Chromosom 22q, auf dem sich das NF2-Gen befindet [47]. Beim sporadisch auftretenden Meningeom findet sich diese Mutation nur in der Hälfte der Fälle, insbesondere beim fibroblastischen und transitionalen Meningeom. Das NF2-Genprodukt integriert Membranproteine in das Zytoskelett und gehört zur Familie der

4.1-Strukturproteine. Studien haben gezeigt, dass möglicherweise weitere Meningeom-Gene auf dem Chromosom 22 liegen, wobei BAM22 (β -Adaptin), ein intrazelluläres Transportprotein und MN1, ein Transkriptionsfaktor, am häufigsten nachgewiesen werden konnten [60]. Mit einem aggressiven Tumorwachstum sind hingegen Veränderungen des Genabschnittes NDRG2 auf Chromosom 14q11.2 und des SK6-Gens auf Chromosom 17q23 verbunden. Des Weiteren konnte immunhistochemisch das Protein p53 sowohl im benignen, als auch im atypischen Meningeom nachgewiesen werden.

1.4.4 Proteinexpression

Mithilfe genetischer Betrachtungen konnte die Malignisierung von niedergradigen zu höhergradigen Meningeomen gezeigt werden [60]. Dennoch ist bislang nicht bekannt, ob die Mehrzahl der höhergradigen Meningeome aus niedergradigen Formen, oder doch als Ersterkrankung „de novo“ entstehen.

In einer Studie im Jahr 2006 konnte die Gruppe um Okamoto signifikante Marker bestimmen, die mit dem jeweiligen Tumorgrad, dem klinischen Bild des Patienten sowie der Pathogenese des Tumors korrelieren. Die Untersuchung von 24 humanen Meningeomen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erbrachte dabei den Nachweis von spezifisch exprimierten Proteinen. Diese konnten dem jeweiligen Malignitätsgrad zugeordnet werden und somit liess sich ein Expressionsprofil für jeden Tumor erstellen (Tabelle 7).

Neben einer Unterscheidung der Tumoren anhand ihres Proteinexpressionsmusters führt diese Methode zu einem verbesserten Verständnis der Genese und Progression von Meningeomen [52].

1.4.5 Therapie und Prognose

Wenn eine komplette chirurgische Entfernung des Meningeoms möglich ist, stellt dies die Therapie der Wahl mit der Möglichkeit einer vollständigen Heilung dar. Inkomplett resezierte Tumoren und höhergradige Meningeome werden zusätzlich mit fraktionierter Radiotherapie oder stereotaktischer Radiochirurgie behandelt. Des Weiteren senkt die Radiotherapie die Rezidivrate, hingegen konnten chemotherapeutische Substanzen diesbezüglich nur einen geringen Erfolg erzielen. Mit zunehmender Kenntnis der Pathogenese von Meningeomen erweisen sich gezielte molekulare Therapieoptionen wie Angiogenese-Inhibitoren oder Somatostatin-Analoga als hoffnungsvoll [49]. Bei einigen Patienten mit nicht resektablen Meningeomen der Schädelbasis konnte durch

die Gabe des Somatostatin-Analogons Octreotid eine Progression des Tumors verhindert werden [64].

Der entscheidende Faktor für die Prognose von Patienten mit Meningeom ist das Verhindern von Rezidiven. Auch wenn zumeist die operative Entfernung gelingt, tritt bei 20% dieser Patienten innerhalb von 20 Jahren ein Rezidiv auf. Hierbei stellt das Ausmaß der Resektion, welches durch Lage und Ausbreitung des Tumors sowie die Erfahrung des Chirurgen maßgeblich beeinflusst wird, den wichtigsten Faktor dar. Weitere, die Rezidivwahrscheinlichkeit senkende Faktoren, sind junges Alter und männliches Geschlecht des Patienten. Hierbei wird die zunehmende Einnahme von hormonellen Medikamenten in der weiblichen Bevölkerung als Risikofaktor für die Entstehung von Meningeomen diskutiert [34].

1.5 Zystische Tumoren

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Eine Zyste ist ein abgeschlossener Gewebehohlraum, welcher einen flüssigen Inhalt besitzt und aus mehreren Kammern bestehen kann [22]. Die Zyste kann verschiedene Ursachen haben, wobei „echte“, von Epithel umgebene Zysten, von sogenannten „Pseudozysten“ unterschieden werden, die nur von Bindegewebe umgeben sind. Im zentralen Nervensystem lassen sich zystische Läsionen in vier verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 8).

Zystische Strukturen finden sich in zahlreichen neuroepithelialen Tumoren und sind vor allem in niedriggradigen Gliomen beschrieben, aber auch in Glioblastom, Metastase und Meningeom. Es wird geschätzt, dass ungefähr 10 % aller intrakraniellen Tumoren zystische Strukturen aufweisen [38]. Bei Gliomen sind diese am häufigsten im Glioblastom (40 %) und im Oligodendrogliom (20 %) zu finden [38].

Es wird zwischen im Zentrum des Tumors auftretenden, intratumoralen Zysten und den Tumor begrenzenden, peritumoralen Hirntumorzysten unterschieden. Die Zysten tragen erheblich zur Ausdehnung des Tumorgewebes bei und können den Großteil des Tumolvolumens ausmachen [3].

Daneben gibt es seltene Hirntumoren, die regelmässig ein zystisches Erscheinungsbild aufweisen. Hierzu zählen pilozytische Astrozytome, Hämangioblastome und Gangliogliome. Weitere nicht tumoröse intrakranielle zystische Veränderungen, die in der vorliegenden Arbeit als Vergleichsgruppen mit herangezogen wurden, umfassen Zysten der Pinealisloge, Arachnoidalzysten, Zysten der Rathkeschen Tasche, posthämorrhagische Zysten und Epidermoide.

1.5.2 Pathogenese

Die Ursache für die Entstehung von Hirntumorzysten ist nicht abschließend geklärt, wobei verschiedene Theorien diskutiert werden. So kann die Flüssigkeitsansammlung durch Ablagerung von nekrotischem Tumorgewebe, bedingt durch das schnelle Wachstum von Gliomen bei nicht hinreichender Angiogenese entstehen [1]. Auch die Interpretation von Tumorzysten als nicht zirkulierender Liquor cerebrospinalis, im Sinne eines Liquorverhaltes, wird in Erwägung gezogen [72].

Darüber hinaus kommt eine intratumorale Einblutung, mit anschließender Verflüssigung des Hämatoms, als Ursache in Betracht. Durch die Auflösung des Blutkoagels wirken osmotische Kräfte, die zur Ansammlung von Flüssigkeit und damit zur Bildung einer Zyste führen [30].

Eine neuere Hypothese macht eine Störung der Blut-Hirn-Schranke für die Zystenbildung verantwortlich („blood brain barrier disruption“). Durch Exsudation von Plasmaproteinen und Ansammlung von Interstitialflüssigkeit im Hirnparenchym erfolgt die Bildung eines vaskulären, peritumoralen Hirnödems. In einer Studie mit zystischen und nonzystischen Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass die Patienten mit zystischem Glioblastom eine geringere peritumorale Ödembildung aufwiesen. Gleichzeitig war bei diesen Patienten histologisch eine deutlichere Abgrenzung des Tumorgewebes zum umgebenden Hirngewebe zu beobachten [72]. Dies legt die Vermutung eines gerichteten Ödemstroms nahe, der nach außen gerichtet zur Bildung eines peritumoralen Ödems, nach innen gerichtet aber zur Bildung einer intratumoralen Zyste führt.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass zystische Glioblastome durch maligne Transformation niedriggradiger zystischer Gliome entstehen. Allerdings konnte diese, vor allem mit sekundären Glioblastomen vereinbare Theorie, in klinischen Studien nicht immer bestätigt werden und gibt zudem keine Erklärung für die primäre Zystenentstehung [42].

1.5.3 Hirntumorzystenflüssigkeit

Hirntumorzysten beinhalten üblicherweise eine klare, proteinreiche Flüssigkeit. Neben den in verschiedenen Studien nachgewiesenen Proteinen zerebralen Ursprungs wie Enolase, β -Endorphin und Thymidinkinase finden sich in über 92 % Blutplasmaproteine in der Zystenflüssigkeit [39]. Eine detaillierte Identifizierung von Proteinen in Zystenflüssigkeiten zerebraler Tumoren ist bislang nicht erfolgt, gewinnt vor dem

Hintergrund der aktuellen Proteomforschung jedoch zunehmend an Interesse. So konnte eine signifikante Erhöhung von VEGF, einem Regulatorprotein der Neoangiogenese, in Tumorzystenflüssigkeiten gegenüber dem Blutserum der Patienten nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass VEGF von den Hirntumorzellen produziert und in die Zystenflüssigkeit sezerniert wird, und somit für die Entstehung und Progression von Hirntumoren von Bedeutung sein könnte [66].

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Laktatkonzentration von Hirntumorzysten und dem Malignitätsgrad des Tumors hergestellt werden [39]. Es zeigte sich eine zweifach erhöhte Laktatkonzentration bei Zysten maligner Tumoren im Vergleich zu Zysten benignen Ursprungs, wahrscheinlich bedingt durch die anaerobe Glykolyse des Tumors und der damit einhergehenden Laktatproduktion.

1.5.4 Therapie und Prognose

Die therapeutische Aspiration der Hirntumorzystenflüssigkeit führt durch Verringerung des intrakraniellen Drucks zu einer Verbesserung der Symptomatik des Patienten. Dennoch kann sich die Zyste wieder mit Flüssigkeit füllen und die damit verbundenen Symptome können wieder auftreten [1].

In verschiedenen Arbeiten wird diskutiert, ob das Vorhandensein einer Tumorzyste mit einer im Vergleich zu nicht-zystischen Tumoren veränderten Prognose einhergeht. So wurde eine Erhöhung der mittleren Überlebenszeit von Patienten mit zystischem Glioblastom im Vergleich zu Patienten mit nonzystischem Glioblastom beschrieben, wenn die Zyste mehr als 50 % des Tumolvolumens ausmacht [42]. Einzelne Fallberichte beschreiben Patienten mit einer sehr langen Überlebenszeit nach Diagnose eines zystischen Glioblastoms und untermauern die Vermutung einer Prognoseverbesserung [6]. Ursächlich könnte hierbei eine geringere Anzahl von postoperativ im Gehirn verbliebenen Tumorzellen sein, die mit der besseren Abgrenzung zystischer Glioblastome und somit erleichterten operativen Bedingungen zu begründen versucht wurde [72].

Dennoch war in einer 2011 veröffentlichten Studie von 37 Patienten mit zystischem Glioblastom kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit, im Vergleich zu Patienten mit Glioblastom ohne Zyste, nachzuweisen. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit zystischem Glioblastom lag bei 17,0 Monaten, bei einer mittleren Überlebenszeit von 15,9 Monaten in der Gruppe der nonzystischen Glioblastome [30].

1.6 Proteinuntersuchung des Liquor cerebrospinalis

In den letzten Jahren hat die Proteomanalyse durch technische Neuerungen und computergestützte Auswertungsverfahren an Bedeutung gewonnen und ihren Charakter von einer Proteinidentifizierung mittels Sequenzierung, zu einem ergebnisoffenen Suchverfahren gewandelt. Dieser, im angloamerikanischen Raum als „discovery oriented approach“ bezeichnete Zugang ermöglicht es, mit einer hohen Genauigkeit, eine Vielzahl von Proteinen aus einer einzigen Probe zu ermitteln. Diese werden dann in einem zweiten Schritt analysiert und näher beschrieben.

Zur Erkennung und Behandlung verschiedener neurologischer, onkologischer oder psychiatrischer Erkrankungen nimmt diese Art der Analyse im Liquor cerebrospinalis der betroffenen Patienten eine wichtige Stellung ein. Etablierte Verfahren wie die isoelektrische Fokussierung zur elektrophoretischen Proteinauftrennung finden dabei nach wie vor ihren Einsatz als diagnostische Werkzeuge.

Beispielhaft hierfür sei die Erhöhung von Immunglobulinen im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose genannt [29]. Die Ursache dieser Erhöhung ist eine lokale, oligoklonale Produktion von Antikörpern vorwiegend der Klasse Immunglobulin G, die dann als so genannte oligoklonale Banden nachgewiesen werden können [16].

Zur Erweiterung dieser routinemäßig durchgeführten Methoden ist die genaue Kenntnis des gesamten Liquor-Proteinmusters unerlässlich, um Veränderungen sicher bestimmen zu können. Nachdem verschiedene technische Hindernisse überwunden wurden, gelang im Jahr 2010 erstmalig eine flächendeckende Charakterisierung humaner Liquorproteine mittels multi-dimensionaler Chromatographie der Liquorproben gesunder Probanden [65]. Dabei konnten 2630 Proteine isoliert werden, von denen 56% spezifisch für den Liquor cerebrospinalis und somit nicht im größeren Spektrum von 3654 Plasmaproteinen nachweisbar sind. Besonders erwähnt werden soll hier das Auftreten von Ferritin light und heavy chain im Liquor, sowie ein Precursor-Protein von Basigin. Metallothionin hingegen konnte in Liquor cerebrospinalis gesunder Probanden nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung proteomischer Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung neurologischer Erkrankungen ist die Analyse von Liquor mittels SELDI-TOF bei an Morbus Alzheimer erkrankten Personen [5]. Über die Subtypisierung von Beta-Amyloidfragmenten lassen sich prognostische Biomarker für verschiedene Krankheitsverläufe und im Vergleich zum Tierversuch definieren [56].

1.7 Proteine

1.7.1 Basigin

Das Glykoprotein Basigin, auch bekannt unter den Namen CD 147, Emmprin oder M6-Antigen, hat eine Molmasse von 40.201 kDa und gehört zur Familie der Immunglobuline. Es ist zusammengesetzt aus zwei verschiedenen Untereinheiten, einer transmembranen Komponente sowie einem kurzen, zytoplasmatischen Anteil. Ursprünglich wurde Basigin auf der Oberfläche von Zellen des Lungenkarzinoms entdeckt, wo es umliegende Fibroblasten zur Produktion von Matrixmetalloproteinasen anregt. In der Folge konnten zahlreiche weitere Funktionen von Basigin herausgefunden werden. So spielt das Protein eine entscheidende Rolle in der Spermio-genese und in der Implantation des Embryos im Uterus. Neben dem physiologischen Vorkommen in der humanen Plazenta und in fetalem Gewebe konnten hohe Basiginspiegel sowohl mit zahlreichen benignen und malignen Tumoren assoziiert werden, wie zum Beispiel Lungen-, Brust-, Haut- und oralen Tumoren, als auch mit Gliomen. Hier kommt vor allem eine durch Basigin angeregte Expression von Matrixmetalloproteinasen und damit einhergehende Steigerung der Aggressivität und Invasivität des Tumors zum Tragen [61].

Bei Gliomen konnte zudem eine vermehrte Expression von Basigin mit steigendem Malignitätsgrad des Tumors nachgewiesen werden, so dass die höchsten Werte im Glioblastom gefunden wurden, gefolgt vom anaplastischen Astrozytom und niedergradigen Astrozytomen [61]. Zudem gelang mittels antisense RNA die Inhibierung der Expression von Basigin in humanen Glioblastomzelllinien. Dies führte neben einer reduzierten Zellinvasion zu einer Verminderung der Migration und des angiogenetischen Potentials der betroffenen Zellen [37].

1.7.2 Ferritin light chain

Ferritin ist ein Multimer, zusammengesetzt aus 24 Proteinuntereinheiten zwei verschiedener Typen. Diese sind eine 19.7 kDa grosse leichte Kette (light chain, bestehend aus 174 AS) und eine 21 kDa grosse schwere Kette (heavy chain, bestehend aus 182 AS), die von verschiedenen Genen kodiert werden. Das Verhältnis der beiden Untereinheiten des Ferritinmoleküls variiert stark in Abhängigkeit von Gewebetyp und physiologischem Status der Zelle. In Leber und Milz überwiegt hierbei eher die basische L-Untereinheit, während im Herzen und in der Niere die saure H-Untereinheit vorherrschend ist, die auch in Tumorzellen vorkommt. Das Verhältnis von H- zu L-Ferritin ist jedoch nicht immer konstant, sondern kann sich z.B. bei

Entzündungen, Infektionen oder auch im Verlauf von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen der Zelle ändern [71]. Zudem konnten erhöhte Ferritinwerte im Serum mit malignen Erkrankungen, wie Brustkrebs oder Morbus Hodgkin, assoziiert werden. Des Weiteren wurde bei Fernmetastasen und invasivem Wachstum des Nierenzellkarzinoms und des epitheloiden Sarkoms eine erhöhte Ferritinexpression durch die Tumorzellen nachgewiesen [27].

1.7.3 Metallothionin

Metallothionine bilden eine Familie von in Tier- und Pflanzenwelt weit verbreiteten, zytoplasmatischen Proteinen, die in der Lage sind, Schwermetalle zu binden. Die Proteine sind bei einer Molmasse von 3,5 bis 14 kDa relativ klein. Eine Strukturbesonderheit der Metallothionine liegt im Fehlen von aromatischen Aminen, bei einem gleichzeitig außergewöhnlich hohen Gehalt von Cystein, welcher 30 % des Proteins ausmacht. Auch wenn die Funktionen dieser Proteine noch nicht abschließend geklärt sind, gibt es Hinweise darauf, dass sie an der Homöostase einiger Metalle wie Cadmium, Kupfer und Zink beteiligt sind. Vor allem liegt ihre Aufgabe in der Beseitigung giftiger Metalle, ausserdem werden regulatorische Funktionen für physiologische Metalle diskutiert. Zudem konnte eine Expression von Metallothioninen in den durch Ultrazentrifugation erhaltenen zellulären Subfraktionen humaner Gliome nachgewiesen werden. Es wird diskutiert, dass sie der Tumorzelle Schutz vor Umwelteinflüssen oder Chemotherapie geben [15].

1.8 Problemstellung

Die Entstehung und Bedeutung von zystischen Strukturen in zerebralen Tumoren ist trotz verschiedener Theorien und zahlreicher Studien immer noch nicht hinreichend geklärt. Die zunehmend wichtiger gewordene Untersuchung der Proteinexpression, als Erweiterung genetischer Studien scheint hier weiterhelfen zu können. In der vorgelegten Arbeit soll im Rahmen der Analyse von Zystenflüssigkeiten zerebraler Tumoren, mittels SELDI-TOF Technik, ein Aufschluss über Proteingehalt und Proteinmuster der Zysten erlangt werden.

Im Einzelnen sollen die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Finden sich signifikante Unterschiede des Proteingehaltes von Zysten zu Kontroll-Liquorproben ?
2. Lassen sich die mittels der Proteomanalyse (SELDI-TOF) ermittelten Proteinmassen realen Proteinen zuordnen und finden sich diese mittels histologischer Färbetechniken in Glioblastompräparaten wieder?
3. Erlaubt die SELDI-TOF-Analyse der Zystenflüssigkeiten die Annahme oder Ablehnung von Hypothesen zur Zystenentstehung?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Probengewinnung

Zur Analyse der Proteine in Tumorzysten wurden insgesamt 74 Proben von 67 Hirntumorpatienten in den Jahren 2000 bis 2007 zu Beginn des neurochirurgischen Eingriffs gewonnen (Tabelle 9). Die Operationen fanden in der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Giessen statt.

Patientenakten wurden nicht eingesehen, die Proben wurden ebenso wie die Überlebenszeiten und die Diagnosen der Patienten vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt. Darunter befanden sich 20 Patienten mit Glioblastom, 9 mit Glioblastomrezidiv, 14 mit Hirnmetastasen, 6 Patienten mit pilozytischem Astrozytom und 5 mit Oligoastrozytom Grad III. Aus den selteneren Entitäten sind klassische zystische Tumoren wie Arachnoidalzyste (1), Hämangioblastom (2) und eine Zyste der Rathkeschen Tasche zu nennen. Zysten der Pinealisregion waren zweimal vertreten.

Um der geringen Materialmenge und der teils kleinen Fallzahl bei einigen Diagnosen Rechnung zu tragen, wurden für eine Auswertung mit ausreichender statistischer Power die Ergebnisse der Patientenproben in Auswertungsgruppen zusammengefasst, wie zum Beispiel Glioblastome, zystische Hirntumoren, hämorrhagische Hirntumoren oder niedergradige Hirntumoren.

Als Kontrollgruppe willigten 15 Patienten mit Spinalkanalstenose ein, im Rahmen einer diagnostischen Myelographie Teile des gewonnenen Liquors zur Verfügung zu stellen. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

Von den operierten Tumoren wurden zudem zur histologischen Untersuchung Paraffinblöcke angefertigt.

2.1.1 Überlebenszeit bei Diagnose Glioblastom

Die Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten nach Erstoperation wurde dokumentiert und anhand dieser eine Einteilung in 6 Halbjahres-Überlebenszeitgruppen durchgeführt (Tabelle 17), um gegebenenfalls prognostische Parameter ableiten zu können.

2.2 Methoden

2.2.1 SELDI-TOF-MS

Das Proteinmuster der Tumorzysten- und Liquorproben wurde mittels SELDI-TOF-MS der Firma Ciphergen Biosystems untersucht. Diese Untersuchungen wurden im Institut

für Humangenetik und Anthropologie, Core Unit Chip Application, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, durchgeführt.

Die SELDI-TOF Massenspektrometrie ist die Verbindung von Massenspektrometrie mit der Chromatographie. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine auf einer spezifisch ausgewählten Oberfläche (s=surface, e=enhanced) eines Metallchips gebunden, wohingegen nicht gebundene Proteine durch verschiedene Waschschrirte entfernt werden. Danach werden die verbleibenden Proteine in einer Vakuumröhre durch einen Laser ionisiert, um sie von der Oberfläche des Chips abzulösen (LDI=laser desorption ionization).

Bestimmt durch die Stärke des angelegten elektrischen Feldes und die Masse des Moleküls unterscheiden sich die individuellen Flugzeiten der ionisierten Proteine (TOF=time of flight) in der Röhre vom Matrix-Chip bis zu einem Detektor, der diese Daten verwertet und ein Chromatogramm mit den dazugehörigen Molmassen ausgibt. Die Flugdauer ist auch von der Größe der Proteine abhängig. Je kleiner die Proteine sind, desto geringer ist die Flugzeit bis zum Detektor.

Als Ergebnis erhält man einen Graphen, der auf der x-Achse die Molmassen der Proteine und auf der y-Achse die zugehörige Signalintensität angibt. Diese erhöht sich mit steigender Proteinkonzentration der untersuchten Probe, sodass als „Peaks“ bezeichnete Signale sichtbar werden (Abbildung 1). Metamere Proteine können mehrere Peaks generieren, den für das Gesamtprotein und die für die Untereinheiten, falls das Protein bei der Desorption zerfällt.

Die Technik ermöglicht in Funktion der gewählten Chipmatrix und der Waschpuffer eine Analyse von Proteinen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten, bei einer Molmassengenauigkeit von 0.3 % [32]. Es können bei der SELDI-TOF-MS neben einer zeitgleichen Untersuchung von bis zu 10.000 Parametern im Rahmen der so genannten Multiparameter-Analytik, Proteine unterschiedlichster Größe nebeneinander bestimmt werden.

Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens entsteht durch den hohen Probendurchsatz und eine damit verbundene Zeitersparnis im Vergleich zu anderen Methoden der Proteinanalyse. Auch ist die benötigte, nur verhältnismäßig geringe Probenmenge (bis zu 20-25 Zellen sind ausreichend) bei der SELDI-TOF-MS zu berücksichtigen, wobei auch niedrigste Probenvolumina (bis zu 1 µl ist ausreichend) diesem Verfahren zugeführt werden können. Durch die Bindung der Proteine auf die Chipoberfläche können zudem Detergenzien, die häufig bei anderen Verfahren Störungen verursachen, durch einfache Waschschrirte entfernt werden. Dies macht somit die bei

anderen Techniken häufig durchgeführte, aufwändige Vorbehandlung der Proben entbehrlich [32].

2.2.1.1 Probengewinnung

Nach ultraschallgesteuerter oder stereotaktischer Punktion der Tumorzysten zu Beginn der Operation, erfolgte die Zentrifugation (10 min. 4000 U/min) und anschließende Lagerung der Probenflüssigkeit bei -20°C.

Für die Analyse mittels SELDI-TOF erfolgte nach Auftauen der Proben auf Eis die Gabe von 2 µl auf einen Matrixchip, wobei die späteren Waschschrte entsprechend den Angaben des Herstellers und des gewählten Chips durchgeführt wurden.

2.2.1.2 Statistische Auswertung

Es wurden für jede Probe zwei SELDI-TOF Läufe mit einem Q10 Chip low und einem Q10 Chip high durchgeführt. Nach Bestimmung der Peaks in den Proben wurden die Signalintensitäten zwischen Liquor und Tumorzystenflüssigkeit verglichen. Hierzu wurden die Proben in Diagnosegruppen, wie Glioblastom, Glioblastomrezidiv, Normalliquor oder Metastase, eingeteilt (Tabelle 10, 13, 14). Die prozentuale Häufigkeit des Auftretens eines Molmassen-Peaks in den Proben einer Gruppe wurde mit der Häufigkeit desselben Peaks in der jeweils anderen Gruppe verglichen. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wurden darüber hinaus noch die Höhen der Peaks, d.h. die ursprüngliche Konzentration des Proteins auf dem Matrixchip und das Proteingewicht herangezogen. Ein signifikanter Unterschied wurde für ein Niveau $p < 0,05$ angenommen.

2.2.2 Proteinidentifizierung

Die Identifikation der zu den Molmassen gehörenden Proteine erfolgte über zwei Ansätze. In einem ersten Ansatz wurden aus wissenschaftlichen Arbeiten bekannte, in Hirntumoren nachgewiesene und mit Hirntumorprogression vergesellschaftete Proteine direkt auf ihr Vorhandensein in der Ergebnisliste überprüft (Tabelle 3, 7). Hierunter fallen beispielsweise GFAP, VEGF, Hämoglobin und S100.

Der zweite, bei den meisten Proteinen eingesetzte internetbasierte Suchalgorithmus wurde im Rahmen der Arbeit entwickelt:

Die universal protein database (uniprot) ist ein konsortiales Projekt und enthält Einträge aus dem European Bioinformatics Institute, dem Swiss Institute of Bioinformatics und der Protein Information Resource. Sie ist somit die größte bioinformatische Datenbank, welche Informationen über Proteinfunktionen und -strukturen aller Lebewesen beinhaltet [the uniprot consortium]. Die mit der SELDI-TOF-Technik gefundenen, und als signifikant unterschiedlich auftretend bewerteten, Proteinbanden wurden mit Hilfe der TagIdent-Option der SwissProt Datenbank identifiziert [70].

Diese ist eine Suchoption des Swiss Institute of Bioinformatics, welche nach Eingabe einer Molmasse in Dalton alle bekannten Proteine der gleichen Größe anzeigt. Mit einer +/- 5,0 breiten Variation des isoelektrischen Punkts um pH 7,45, wurden Proteine der Spezies Homo sapiens mit einem Molekulargewicht +/- 0,3 % der gefundenen Proteinbandengröße in der Datenbank gesucht. Eingang fanden die Proteinbanden aus den Vergleichen Glioblastom zu Liquor, Glioblastomrezidiv zu Liquor und Glioblastomrezidiv zu Glioblastom (Tabelle 10).

Die Bandengrößen wurden auf das Vorhandensein von Vielfachen ihrer selbst überprüft, um der etwaigen Bildung von chemischen Addukten, Proteinfragmenten oder Doppelladungen Rechnung zu tragen. Es wurde ebenfalls nach Molmassen homologer Proteine der Proteinsuperfamilien gesucht.

Mit dieser Vorgehensweise fanden sich pro eingegebener Proteingröße je 30 bis 50 Proteinkandidaten als potentielle "Erzeuger" des zu bestimmenden SELDI-TOF-Peaks. Diese unterschiedlichsten Proteine wurden mittels Literaturrecherche bewertet. Hierzu wurde ein Punktesystem entworfen, zum Herausfiltern und Analysieren der mit Hirntumorwachstum assoziierten Proteine (Tabelle 11).

Es war neben der zellulären Lokalisation des jeweiligen Proteinkandidaten entscheidend, ob ein vermehrtes Vorkommen im Gehirn, in Hirntumoren oder allgemein in Tumoren beschrieben ist. Zur Literaturrecherche wurde neben gängigen Internetsuchmaschinen insbesondere auf die Publikationsdatenbank der NCBI

(National Center for Biotechnology Information), www.pubmed.org, zurückgegriffen [57]. Alle Proteine mit einer Punkteanzahl von 3 oder 4 wurden der weiteren Analyse zugeführt. Die relevanten Artikel wurden in Bezug auf wesentliche Zitate und Querverweise hingehend der Fragestellung dieser Arbeit untersucht und gewichtet.

Tabelle 12 zeigt einen Auszug aus der Arbeitsliste potentieller Kandidaten für die fünf höchsten Signifikanzniveaus (p-value). Die Parameter (Proteinfamilie, Chromosomenabschnitt und Funktion) waren für jedes Signifikanzniveau an bis zu 50 Kandidaten ermittelt worden, in der Liste verblieben lediglich Proteine mit einem Punktwert von drei oder mehr.

2.2.3 Immunhistochemie

Um zu kontrollieren ob die ermittelten Proteinkandidaten tatsächlich in den zystischen Tumoren auftreten, wurden Tumorgewebspräparate von Glioblastom-Patienten, deren Zystenflüssigkeit untersucht worden war, immunhistologisch aufgearbeitet. Hierbei weist ein gegen das Protein gerichteter Antikörper dessen Vorhandensein direkt im Gewebe nach.

Die immunhistochemische Untersuchung der Operationspräparate erfolgte im Neuropathologischen Institut der Justus Liebig Universität in Giessen. Hierbei wurden die Proben durch Nummern gekennzeichnet um die Identität der Patienten zu wahren und dennoch eine verblindete Untersuchung der Präparate zu ermöglichen.

Da nicht jeder Patient einer mikrochirurgischen Operation zugeführt worden war, sondern zum Teil auch nur stereotaktische Punktionen zur Zystenverkleinerung erfolgten, waren Glioblastompräparate von 21 Patienten verfügbar, deren Zystenproben vorher mittels SELDI-TOF-Technik aufgearbeitet worden waren.

In diesen Gewebsschnitten fanden sich insgesamt 165 auswertbare zystische Strukturen. Pro Schnitt im Mittel 4,23 Zysten, bei einer Variation von 1 bis 12 Zysten.

Aus den identifizierten und klassifizierten Proteinen wurden die drei Proteinkandidaten Basigin, Ferritin und Metallothionin aufgrund ihrer Relevanz in Bezug auf die Entstehung neuroepithelialer Tumoren der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt. Hierdurch konnten die potentiellen, mittels SELDI-TOF Technik ermittelten Kandidaten durch ein zweites Verfahren auf zellulärer Ebene dargestellt werden. Zudem war die Lokalisation der Färbung eine entscheidende Fragestellung, insbesondere der Vergleich der Färbeintensität von Zystenwand und restlichem

Tumorgewebe, um eine etwaige Anreicherung der jeweiligen Proteine in der Zystenwand nachweisen zu können.

Um bei der Auswertung mittels Mikroskop zwischen Blutgefäßen und Zystenstrukturen unterscheiden zu können, wurde von allen Präparaten zusätzlich zur durchgeführten HE- auch eine Retikulinfärbung angefertigt, da sich Retikulinfasern in der Zystenwand nicht finden.

2.2.3.1 Verwendete Antikörper

1. Basigin

Es wurde ein monoklonaler, paraffingängiger Maus-Antikörper der Firma Abcam, Seriennummer AB 1843, verwendet. Als Positivkontrolle dienten Zellen eines primären humanen Adenokarzinoms der Lunge (Abbildung 2).

2. Ferritin

Der Antikörper der Firma Abcam mit der Seriennummer AB 76768 kam zum Einsatz. Dieser ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper welcher paraffingängig ist. Humane Leberzellen wurden für die Positivkontrolle verwendet (Abbildung 2).

3. Metallothionin

Ein monoklonaler, paraffingängiger Maus-Antikörper der Firma Abcam, Seriennummer AB 12228, kam zur Anwendung. Zellen von einem humanen Astrozytom Grad II dienten als Positivkontrolle (Abbildung 2).

2.2.3.2 Arbeitsprotokoll

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden mittels Mikrotom in einer Dicke von 4-6 µm geschnitten, das Gewebe anschließend auf Superfrost Objektträger aufgezogen. Alle 21 Gewebeproben wurden mit jedem Antikörper in einem Arbeitsgang gefärbt um eine Vergleichbarkeit mit der jeweiligen Positivkontrolle zu schaffen.

Hämalaun nach Mayer:

- 1 g Hämatoxylin (Merck: 1.04302.01)

In 1000 ml destilliertem Wasser unter Erwärmen lösen

- 0.2 g Natriumiodat (Merck: 6525.01)
- 50 g Aluminiumkaliumsulfat (Merck: 1.01047)
- 50 g Chloralhydrat (Merck: 1.02425)
- 1 g Citronensäure (Serva 386-42)

PBS Waschpuffer, Stammlösung (10X):

- 8,0 g Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck 1.06580)
- 1,3 g Kalium-Dihydrogenphosphat (Merck 1.04873)
- 36,0 g Natriumchlorid (Roth 3957.1)

In 500 ml destilliertem Wasser lösen

Vor Anwendung Verdünnung: 1:10 mit destilliertem Wasser,

pH Messung : 7,4 (pH 7,3 +/- 0,1)

Basigin:

1. Deparaffinierung und Rehydratation
 - 3 x 5 Minuten in Xylol
 - 2 x 3 Minuten 100 % Alkohol
 - 3 Minuten 96 % Alkohol
 - 3 Minuten 70 % Alkohol
 - 2 x 3 Minuten in destilliertem Wasser
2. Vorbehandlung der Schnitte mittels Hitze-induzierter Demaskierung
 - 15 Minuten Kochen mit 0,01 mol/l kochender Citrat Retrieval-Lösung pH 6,0 (Citric acid monohydrate C 7129 Sigma)
 - 3 x Waschen mit PBS Waschpuffer (1 x)
 - Nach dem Kochen die Schnitte für 20 Minuten in der Pufferlösung abkühlen lassen.
 - 3 x 3 Minuten Spülung mit (1 x) PBS –Puffer pH 7,4
3. Peroxidase Block
 - 7 Minuten in 3 % H₂O₂ (H₂O₂ 30% Merck 1.08597)
4. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in Aqua destillata,
 - danach 1 x 2 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
5. Inkubation
 - 20 Minuten mit Ziegen-Serum
 - (normales Goat-Serum Dako : X 907)
6. Inkubation mit Primär-Antikörper
 - 1:50 Abcam Basigin (ab 1843)
 - Inkubationszeit: 1 Stunde bei Raumtemperatur
 - Antikörper-Verdünnungslösung: Dako S 2022
7. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
8. Inkubation mit Brücken-Antikörper
 - Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - (Flasche C Biotinylated Goat Anti Mouse/Rabbit,
 - Dako Kit; Code: K 492)
9. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)

10. Inkubation
mit StrepAB-Komplex 1:100
Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
(Flasche A Streptavidin + Flasche B Biotinylated peroxidase im
Dako Kit, Code: K 492)
11. Waschen
2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
12. Entwickeln
7 Minuten mit DAB
(3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Sigma : D – 5637)
60 mg DAB in 300ml PBS lösen,
120 µl von 30 % H₂O₂ zugeben, gut mischen,
Lösung gleich verwenden
13. Waschen
2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x),
zusätzlich 1 x 3 Minuten mit Aqua destillata
14. Gegenfärbung
1 - 2 Minuten mit Hämalaun nach Mayer (siehe Rezept)
15. Spülen
1 - 2 Minuten unter Leitungswasser,
danach 1 Minute mit Aqua destillata
16. Entwässerung
aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
2 Minuten in 70 % Alkohol
2 Minuten in 96 % Alkohol
2 x 2 Minuten in 100 % Alkohol
3 x 3 Minuten in Xylol
17. Eindecken
mit Cytoseal Xyl (Firma Themo 8312-4)

Ferritin:

1. Deparaffinierung und Rehydratation
 - 3 x 5 Minuten in Xylol
 - 2 x 3 Minuten 100 % Alkohol
 - 3 Minuten 96 % Alkohol
 - 3 Minuten 70 % Alkohol
 - 2 x 3 Minuten in destilliertem Wasser
2. Vorbehandlung der Schnitte mittels Hitze-induzierter Demaskierung
 - 15 Minuten Kochen mit 1 mmol /l kochender EDTA Retrieval-Lösung pH 8,0 (EDTA Bestell-Nr.: E- 5134 Sigma)
 - 3 x Waschen mit PBS Waschpuffer (1 x)
 - Nach dem Kochen die Schnitte für 20 Minuten in der Pufferlösung abkühlen lassen.
 - 3 x 3 Minuten Spülung mit (1 x) PBS –Puffer pH 7,4
3. Peroxidase Block
 - 7 Minuten in 3 % H₂O₂ (H₂O₂ 30% Merck 1.08597)
4. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in Aqua destillata,
 - danach 1 x 2 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
5. Inkubation
 - 20 Minuten mit Ziegen-Serum
 - (normales Goat-Serum Dako : X 907)
6. Inkubation mit Primär-Antikörper
 - 1:500 Abcam Ferritin (ab76768)
 - Inkubationszeit: 1 Stunde bei Raumtemperatur
 - Antikörper-Verdünnungslösung: Dako S 2022
7. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
8. Inkubation mit Brücken-Antikörper
 - Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - (Flasche C Biotinylated Goat Anti Mouse/Rabbit
 - Dako Kit; Code: K 492)
9. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)

10. Inkubation
mit Strep AB-Komplex 1:100
Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
(Flasche A Streptavidin + Flasche B Biotinylated peroxidase im
Dako Kit, Code: K 492)
11. Waschen
2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
12. Entwickeln
7 Minuten mit DAB
(3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Sigma : D – 5637)
60 mg DAB in 300ml PBS lösen,
120 µl von 30 % H₂O₂ zugeben, gut mischen,
Lösung gleich verwenden
13. Waschen
2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x),
zusätzlich 1 x 3 Minuten mit Aqua destillata
14. Gegenfärbung
1 - 2 Minuten mit Hämalaun nach Mayer
15. Spülen
1 - 2 Minuten unter Leitungswasser,
danach 1 Minute mit Aqua destillata
16. Entwässerung
aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
2 Minuten in 70 % Alkohol
2 Minuten in 96 % Alkohol
2 x 2 Minuten in 100 % Alkohol
3 x 3 Minuten in Xylol
17. Eindecken
mit Cytoseal Xyl (Firma Themo 8312-4)

Metallothionin

1. Deparaffinierung und Rehydratation
 - 3 x 5 Minuten in Xylol
 - 2 x 3 Minuten 100 % Alkohol
 - 3 Minuten 96 % Alkohol
 - 3 Minuten 70 % Alkohol
 - 2 x 3 Minuten in destilliertem Wasser
2. Keine Vorbehandlung der Schnitte notwendig
3. Peroxidase Block
 - 7 min. in 3 % H₂O₂ (H₂O₂ 30 % Merck 1.08597)
4. Waschen: 2 x 3 Minuten in Aqua destillata
 - danach 1 x 2 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
5. Inkubation
 - 20 Minuten mit Ziegen-Serum
 - (normales Goat-Serum Dako : X 907)
6. Inkubation mit Primär-Antikörper
 - 1:100 Abcam Metallothionein (ab12228)
 - Inkubationszeit: 1 Stunde bei Raumtemperatur
 - Antikörper-Verdünnungslösung: Dako S 2022
7. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
8. Inkubation mit Brücken-Antikörper
 - Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - (Flasche C Biotinylated Goat Anti Mouse/Rabbit, Dako Kit; Code: K 492)
9. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)
10. Inkubation mit StrepAB-Komplex 1:100
 - Inkubationszeit: 30 Minuten bei Raumtemperatur
 - (Flasche A Streptavidin + Flasche B Biotinylated peroxidase im Dako Kit, Code: K 492)
11. Waschen
 - 2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x)

12. Entwickeln
7 Minuten mit DAB
(3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Sigma : D – 5637)
60 mg DAB in 300 ml PBS lösen,
120 µl von 30 % H₂O₂ zugeben, gut mischen,
Lösung gleich verwenden
13. Waschen
2 x 3 Minuten in PBS Waschpuffer (1 x),
zusätzlich 1 x 3 Minuten mit Aqua destillata
14. Gegenfärbung
1 - 2 Minuten mit Hämalaun nach Mayer (siehe Rezept)
15. Spülen
1 - 2 Minuten unter Leitungswasser,
danach 1 Minute mit Aqua destillata
16. Entwässerung:
aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
2 Minuten in 70 % Alkohol
2 Minuten in 96 % Alkohol
2 x 2 Minuten in 100 % Alkohol
3 x 3 Minuten in Xylol
17. Eindecken
mit Cytoseal Xyl (Firma Themo 8312-4)

2.2.3.3 Auswertung der Immunhistochemie

Nach abgeschlossener Färbung wurden die Proben mittels Mikroskop qualitativ beurteilt, wobei durch den Vergleich von HE- und Retikulinfärbung Zysten von Blutgefäßen differenziert werden konnten. In Abbildung 3 findet sich unter A eine Zystenwand in HE-Färbung: in Abbildung B sind in der Retikulinfärbung die in Umgebung der Zyste liegenden Gefäße geschwärzt zu erkennen, ohne Färbung der Zystenwand.

Als Postivkontrolle dienten histologische Schnitte eines primären humanen Adenokarzinoms der Lunge für Basigin, humane Leberzellen für Ferritin, und Astrozytomgewebe für Metallothionin. Die Negativkontrolle erfolgte mit eben diesen Präparaten ohne Zusatz des jeweiligen ersten Antikörpers (Abbildung 2).

Die Färbung des Tumorgewebes und insbesondere der Zystenwände mit den verwendeten Antikörpern konnte mittels eines Punktesystems klassifiziert werden. Die immunhistologisch gefärbten Schnitte wurden allesamt vom selben Untersucher (MH) ausgewertet. Die Stärke der DAB-Färbung wurde in 4 Stufen eingeteilt: 0-keine Färbung, +-schwache Färbung, ++-gut kontrastierte Färbung zum Hintergrund, +++-sehr dunkle Färbung. Aus dieser semiquantitativen Skala (0 bis 3) wurden Mittelwerte gebildet.

Hierbei diente der Mittelwert der Färbeintensität aus 20 verschiedenen Blickfeldern des Tumorgewebes als Vergleichswert zur Intensität der Wandfärbung jeder einzelnen Zyste. Der Färbequotient, gebildet aus der Färbeintensität der Zystenwand geteilt durch den Mittelwert der Intensität der Tumorfärbung, schafft hierbei eine Vergleichbarkeit der Zystenwandfärbungen im untersuchten Schnitt und zwischen den drei verwendeten Antikörpern bei einem Patienten. Insgesamt wurden alle 165 in den Glioblastom-Präparaten nachgewiesenen Zysten beurteilt und die zugehörigen Färbequotienten ermittelt.

2.2.4 Statistische Betrachtungen zur Überlebenszeit

Die statistische Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich Alter und Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten erfolgte mittels unpaired t-test. Dieses Verfahren ermittelt anhand der Mittelwerte zweier nicht zusammenhängender Stichproben die Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Unterschiedes der Mittelwerte der Grundgesamtheit. Ein signifikanter Unterschied wurde für ein Niveau $p < 0,05$ angenommen. Hierbei wurde die Gruppeneinteilung der Glioblastom-Patienten aus Tabelle 17 zugrundegelegt.

3. Ergebnisse

3.1 SELDI-TOF-MS

Die Ergebnisse der Spektroskopie werden computergestützt vom Gerät erfasst und in einer maschinellen Auswertungsschleife auf Qualität und Plausibilität überprüft. So entsteht eine Vorauswahl qualitativ hochwertiger Signale, die bei technischen Schwierigkeiten das Ergebnis einzelner Proben unterdrückt. So erhält man beispielsweise bei den Durchläufen der 20 Glioblastomproben meist 17-18 verwertbare Ergebnisse, die vom Computer freigegeben werden. Dementsprechend wurden die Ergebnisse anhand der Diagnose gruppiert und die Gruppen gegeneinander anhand statistischer Signifikanz verglichen.

Nach Bestimmung der Peaks in den Proben wurden die Signalintensitäten der Zystenflüssigkeit von Glioblastom und Liquor, Glioblastomrezidiv und Liquor sowie Glioblastom und Glioblastomrezidiv verglichen. Das über die ursprüngliche Konzentration der Proteine (Höhe der Peaks) berechnete Signifikanzniveau, wurde für jedes Protein bestimmt. Hierbei zeigten sich starke Unterschiede, wobei 3 Proteine mit 10^{-7} sowie 8 Proteine mit 10^{-6} ein hohes Signifikanzniveau aufwiesen (Tabelle 10). Alle Signifikanzen liegen hier im Millionstelbereich, was bei der Grösse der Proteine ein sehr verlässliches Ergebnis darstellt.

3.1.1 Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastom und Liquor

Der Signalintensitätsvergleich in den Proben von Glioblastomzystenflüssigkeit und Liquor ergab ein signifikant erhöhtes Vorkommen von 28 verschiedenen Proteinen im Glioblastom. Die zugehörigen Molmassen sind zusammen mit dem Signifikanzniveau (P-value) in Tabelle 10 dargestellt.

3.1.2 Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastomrezidiv und Liquor

Beim Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastomrezidiven und Liquor zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen von Proteinen sieben verschiedener Molmassen im Glioblastomrezidiv, dargestellt in Tabelle 10.

3.1.3 Vergleich der Zystenflüssigkeit von Glioblastom und Glioblastomrezidiv

Sechs Proteine unterschiedlicher Molmassen waren vermehrt in Zystenflüssigkeit des Glioblastoms zu finden, hingegen fand sich ein Protein (Basigin) welches mittels

SELDI-TOF vermehrt in der Zystenflüssigkeit des Glioblastomrezidivs nachzuweisen war (Tabelle 10).

3.1.4 Liquor von Patienten mit Spinalkanalstenose

Im Vergleich zu den Glioblastomen fanden sich in den Liquorproben der Kontrollpatienten 23 Banden, die mit einer erhöhten Signifikanz nur im Liquor auftraten. Ebenso traten im Vergleich zu Glioblastomrezidiven 17 Banden nur im Liquor auf. 24 Proteine fanden sich im Vergleich der Liquorproben zu Metastasenproteinen (Tabelle 13).

3.1.5 Vergleich von Glioblastomproteinen und Metastasenproteinen

Beim Vergleich der Zystenflüssigkeiten von Glioblastom gegen Liquor und Metastasen gegen Liquor zeigten sich 14 Proteingrössenhomologien bei einer Gesamtzahl von 38 Kandidaten (Tabelle 14).

3.1.6 Direktsuche bekannter Proteine

Die bereits in Zusammenhang mit Glioblastomen beschriebenen Proteinenbanden für GFAP (49916 Dalton) und VEGF (17224 Dalton) wurden in der Glioblastomgruppe detektiert, VEGF sogar mit einem der höchsten Signifikanzniveaus (Tabelle 10). Diese beiden Banden erscheinen auch in der Metastasengruppe, während bei den Glioblastomrezidiven lediglich die VEGF Bande nachweisbar ist (Tabelle 14).

Das kürzlich in Zusammenhang mit Glioblastomen beschriebene S100A9 (13242 Dalton) hat offensichtlich weder bei Glioblastomen, Glioblastomrezidiven oder Metastasen einen Peak generiert [19].

Die von der Meningeomprogression her bekannten Proteine (Tabelle 7) wurden zum grösseren Teil nicht als Banden wiedergefunden. Bandengrössen, die meningeomassoziierten Proteinen entsprechen könnten sind 15819 Dalton (Peroxiredoxin 2, Isoform 2), 27887 Dalton (Proteasom Untereinheit alpha Typ 7) und 47169 Dalton (Alpha Enolase). Alle drei fanden sich beim Vergleich der Glioblastomzystenflüssigkeiten gegenüber Liquor, die Isoform 2 des Peroxiredoxin 2 zusätzlich beim Vergleich der Metastasen gegenüber Liquor. Aufgrund ihrer Assoziation zur Meningeomprogression wurden sie in der vorliegenden Arbeit bei der immunhistochemischen Färbung der Glioblastomzysten ausgeklammert.

Potentiell durch Hämoglobin entstandene Banden, die indirekt auf Einblutungen zurückschliessen lassen, wurden mit den Proteingrössen für HbA (15258 Dalton) und

HbB (15998 Dalton) mit der Varianz von 0,3 % gesucht. Hier liessen sich in der Gruppe der hämorrhagischen Zysten (Hämangiom, Hämangioblastom, posthämorrhagische Zyste) entsprechende Banden für beide Hämoglobintypen finden. Darüber hinaus fand sich lediglich in der Gruppe der Metastasen eine Bande, die dem HbB entsprechen könnte (Tabelle 14). Zystenflüssigkeiten von Glioblastomen und Rezidiven zeigten keine auf Hämoglobin verdächtigen Banden.

3.2 Proteinidentifizierung

Aus den 28 Molmassen des Vergleichs von Glioblastom und Liquor konnten mithilfe der universalen Proteindatenbank (uniprot) 290 humane Proteine gefunden werden, wobei eine Molmassenabweichung von +/- 0,3 % berücksichtigt wurde. Die Analyse der sieben Peaks aus der Betrachtung der Zystenflüssigkeit von Glioblastomrezidiv gegen Liquor ergab 66 Proteine; 57 Proteinkandidaten konnten aus den 7 Molmassen von Glioblastom gegen Glioblastomrezidiv ermittelt werden.

Nach Literaturrecherche und nachfolgender Einteilung der insgesamt 413 identifizierten Kandidatenproteine aller Tumorgruppen mittels des unter 2.2.2 beschriebenen Punktesystems, entstand eine Auswahl von nunmehr 70 Proteinen mit drei oder vier Punkten, die der weiteren Untersuchung zugeführt wurden. Einen Auszug zeigt Tabelle 12.

Mehrere Peaks der SELDI-TOF Analyse konnten hierbei Proteinen zugeordnet werden, die wie GFAP (49916 Da, Tabelle 10) oder VEGF 121 (17224 Da, Tabelle 10) bereits in Zystenflüssigkeit von Glioblastomen von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden [66, 69].

3.3 Immunhistochemie

Der immunhistochemischen Untersuchung wurden die Präparate von 17 Glioblastompatienten, sowie 6 von Glioblastomrezidivpatienten zugeführt. Bei der mikroskopischen Auswertung konnten jedoch in einem Glioblastompräparat und in einem Glioblastomrezidivpräparat aufgrund der geringen Materialmenge keine zystischen Strukturen nachgewiesen werden. Somit wurden insgesamt Proben von 21 Patienten ausgewertet. Nach lichtmikroskopischen Kriterien der HE-Färbung waren keine Endothelauskleidungen der Zysten nachweisbar, sodass alle Zysten als Pseudozysten klassifiziert wurden (Abbildung 4, 7).

Auswahl der Antikörper

Um die Wertigkeit des internetgestützten Auswahlverfahrens für die Kandidatenproteine im Prinzip zu bestätigen, wurden drei kommerziell verfügbare Antikörper für die immunhistochemische Färbung ausgewählt (Tabelle 15). Hierbei wurde auf den Nachweis der bereits als Glioblastommarker bekannten Proteine GFAP und VEGF121 verzichtet. Als Negativkontrolle wurde Metallothionin bestimmt, da sein Vorkommen in glialen Tumoren gezeigt ist und das Molgewicht der verschiedenen Subtypen in der Nähe der hochsignifikanten Bande 6424, aber ausserhalb der zugelassenen Varianz von 0,3 % liegt.

Der Kandidat Basigin war von besonderem Interesse, da er als einzige Bande (40211Dalton) im Glioblastomrezidiv verglichen zum Glioblastom auftauchte. Bei der Auswahl von Ferritin spielte eine Rolle, dass es bisher zwar in Liquor von Gliompatienten nachgewiesen worden war, aber die Datenlage für humane Gliomzellen vergleichsweise unvollständig ist [62]. Zudem wurde mittels SELDI-TOF die Ferritin light chain (19899 Dalton) vermutet, der polyklonale Antikörper ist in der Lage, auch die heavy chain mit nachzuweisen.

3.3.1 Basigin

Die Auswertung der mikroskopischen Präparate erfolgte nach Positivkontrolle des Antikörpers an einem primären humanen Adenokarzinom der Lunge, wobei die Negativkontrolle durchweg negativ ausfiel.

Die Untersuchung der Präparate der insgesamt 21 Patienten ergab eine deutliche Färbung der Zystenwände, mit einem Mittelwert des Färbequotienten (gebildet aus der Färbeintensität der Zystenwand und dem Mittelwert der Intensität der Tumorfärbung) aller 165 Zysten von 1,48, wobei 84,24 % der Zysten einen Färbequotienten größer als 1,0 aufwiesen (Tabelle 16, Abbildung 5, 6, 8)

Das gesunde Hirngewebe zeigt eine Basigin-Expression besonders in den kleineren Gefässen, welche mit zunehmender Grösse der Gefässe an Intensität abnimmt, und durch die charakteristische Verteilung und unter Zuhilfenahme der Retikulinfärbung den Blutgefässen zugeordnet werden kann (Abbildung 9). Im Bereich des Tumors konnte hingegen keine ausgeprägte Färbung der Gefässe festgestellt werden, was als Ausdruck der pathologischen Neoangiogenese beschrieben ist [61].

3.3.2 Ferritin

Nach erfolgreicher Positivkontrolle des Antikörpers an humanen Leberzellen und Negativkontrolle mit Humanserum erfolgte die Färbung der 21 ausgewählten Präparate. Es zeigte sich eine deutliche Färbung der untersuchten Zystenwände mit einem Mittelwert des Färbequotienten von 1,29. Insgesamt wurde bei 107 der 165 untersuchten Zystenwände ein Färbequotient von größer als 1,0 ermittelt, was einem Prozentsatz von 64,85 entspricht (Tabelle 16, Abbildung 5, 6, 10).

3.3.3 Metallothionin

Die Positivkontrolle des Antikörpers erfolgte an Präparaten eines humanen Astrozytoms Grad II, die Negativkontrolle wurde mit Humanserum durchgeführt. Bei der Auswertung der gefärbten Präparate zeigte sich regelmäßig eine Färbung des Tumorgewebes ohne vermehrte Färbung der Zystenwände, die Intensität der Färbung konnte seltener als bei den anderen Antikörpern mit +++ gewertet werden. Der mittlere Färbequotient aller Zystenwände ergab 1,09 bei einem Anteil von 46,67 % der Zystenwände mit einem Färbequotienten größer als 1 (Tabelle 16, Abbildung 5, 6, 11).

3.3.4 Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten

Die Patienten wurden entsprechend der Überlebenszeit nach Erstoperation in 6 Gruppen eingeteilt. Pro Gruppe wurde der Mittelwert des Färbequotienten berechnet (Tabelle 17). Unter den 21 Patienten befanden sich 11 Frauen und 10 Männer, das mediane Alter zur Zeit der ersten Operation betrug 53,9 Jahre (Verteilung 21 bis 77 Jahre).

Der Median der Überlebenszeit nach erster Operation liegt bei 20 Monaten, der Mittelwert bei 23,9 Monaten. Die Überlebenszeit reicht von 2 bis 102 Monaten, bei einem 95 % Konfidenzintervall von 13,2 bis 26,8 Monaten.

6 Patienten (28,6%) überlebten kürzer als 7 Monate (Mittelwert des Alters: 70,08 Jahre) und 4 Patienten (19 %) länger als 30 Monate (Mittelwert des Alters: 53,38 Jahre). Vergleicht man mittels unpaired t-test das Alter der 6 kürzer als 7 Monate überlebenden Patienten mit dem Rest der Kohorte (15 Patienten, Mittelwert des Alters: 50,95 Jahre), kann bei einem p-value von 0,018 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt somit das Lebensalter bei Diagnosestellung als wichtigen Prognosefaktor.

Der Anteil von 28,6 % der Patienten, die mit über 24 Monaten Überlebenszeit der Gruppe der Langzeitüberlebenden zuzuordnen sind, ist im Vergleich zur Literatur hoch [68]. Die Überlebenszeit der 5 untersuchten Patienten mit Glioblastomrezidiv beträgt bei allen mehr als 25 Monate nach Erstoperation, wobei drei der vier Patienten sogar mehr als 30 Monate überlebt haben.

Die Überlebenszeit nach Rezidivoperation reicht von 8 bis 86 Monaten, bei einem Median von 9 Monaten und einem Mittelwert von 34,2 Monaten. Zur Zeit der Datenerfassung waren zwei der Patienten noch am Leben, mit 86 bzw. 59 Monaten Überlebenszeit nach der Rezidivoperation.

Ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Färbequotienten im Vergleich der verschiedenen Gruppen, sowie im Vergleich von Glioblastom und Glioblastomrezidiv, konnte nicht festgestellt werden.

4 Diskussion

Die hier vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Aufschlüsselung der Proteinzusammensetzung von Hirntumorzysten im Vergleich zu Liquor cerebrospinalis tumorfreier Patienten. Als Methode zur Proteomanalyse kommt die SELDI-TOF Technik zum Einsatz, sie wird durch eine internetbasierte Recherche ergänzt und die Ergebnisse werden mittels Immunhistochemie verifiziert. Die prinzipielle Verwendbarkeit dieser Methodik zur näheren Klassifizierung von Tumorproteinen wird gezeigt.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Patientenkollektiv

Es handelt sich um eine Sammlung von 64 Tumorzystenflüssigkeitsproben und zugehörigen histologisch-diagnostischen Gewebeproben, deren Proteinanalyse mit der Patientenüberlebenszeit und den histopathologisch gewonnenen Tumorentitäten korreliert wird. Die Patientenproben, -Diagnosen sowie -Überlebenszeiten wurden vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt, Patientenakten wurden nicht eingesehen. In die Untersuchung wurden in einem Zeitraum von 5 Jahren Patienten mit präoperativ diagnostizierten Hirntumorzysten integriert, ohne Anspruch auf vollständige Erfassung aller Patienten mit Zysten, die in diesem Zeitraum in der neurochirurgischen Klinik Giessen vorgestellt, beraten oder behandelt wurden.

In der aktuellen Literatur wird insbesondere diskutiert, ob das Vorhandensein einer Tumorzyste in Glioblastomen mit verlängerter Überlebenszeit einhergehen kann [6]. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde weisen als wichtigsten prognostischen Faktor bezüglich des Überlebens das Alter der Patienten bei Erstoperation aus. Dies entspricht dem Ergebnis einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, die eine Überlebenszeitverlängerung allein wegen einer Hirntumorzyste ablehnt [30].

Die Aufschlüsselung der Glioblastompatienten bezüglich der Überlebenszeit nach Erstoperation ergab darüber hinaus keinen Unterschied hinsichtlich der immunhistochemischen Nachweisbarkeit von Basigin, Ferritin oder Metallothionin in den Präparaten. Ein Zusammenhang des Proteingehaltes der Zystenflüssigkeit mit der Tumorprogression kann somit nicht hergestellt werden.

4.1.2 SELDI-TOF-MS

Bei der ursprünglichen Konzeption der Zystenprobensammlung war eine Analyse mittels Western Blot vorgesehen. Diese konnte aufgrund der für den Western Blot zu geringen Proteinkonzentration in den Tumorzysten, sowie der zu kleinen Probenmengen, keine Anwendung finden. Das SELDI-TOF Verfahren kann hingegen in geringen Probenvolumina (2 µl) auch bei kleinsten Konzentrationen Proteine mit einer Genauigkeit von 0,3 % Molgewichtsabweichung nachweisen [43]. Die prinzipielle Verwendbarkeit des SELDI-TOF bei Liquorproben wurde bereits für Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und auch an Hirntumoren gezeigt. Die in dieser Arbeit vorgestellte Anwendung bei Hirntumorzystenflüssigkeiten stellt eine Erstbeschreibung dar [28, 46]. Vorteile der SELDI-TOF Technik liegen in der einfachen Verfügbarkeit der Proben nach Gewinnung, Zentrifugation und Lagerung bei -20°C. Die Technik hat ihre Eignung zur Definition von Biomarkern bei vielen systemischen Tumorerkrankungen gezeigt [33]. Das Auflösungsvermögen der SELDI-TOF Technik erreicht seine Grenze bei ca. 0,3 % der Masse des Proteinpeaks. Durch Einführung neuerer Gerätegenerationen konnten die substantiellen Überlagerungen verringert werden. Probleme können die Bildung chemischer Addukte oder mehrfach geladener Moleküle bereiten, da sich hiermit die Flugzeit sowie die Rückberechnung der Proteinmasse verändern. So erzeugt ein doppelt geladenes Albumin einen Peak bei 33 kDa, ein einfach geladenes Albumin den Peak bei 66 kDa [32].

Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die Proteinmassenanalyse durch antikörpergestützte Identifikation oder durch Isolierung und Sequenzierung bestimmter Proteine zu vervollständigen [11]. In der vorliegenden Arbeit wurde diesem Problem Rechnung getragen, indem aufgrund der geringen Materialmenge der Zystenflüssigkeit eine immunhistochemische Färbung des tumoralen Ursprungsgewebes durchgeführt wurde. Somit bietet die Immunhistochemie keinen Beweis für das Vorhandensein der Proteine in der Zystenflüssigkeit, sondern eine Bestätigung des Vorhandenseins in den Zellen der Zystenwand.

Zu beachten sind zudem mögliche Interaktionen zwischen der SELDI-TOF-Chipmatrix und den Proteinen. Gering konzentrierte Proteine, mit hoher Affinität zur Matrix können theoretisch gleich hohe Peaks generieren wie hochkonzentrierte Proteine mit geringer Affinität. Dadurch entsteht eine Abhängigkeit der Peakintensität von der Konzentration des individuellen Proteins, von seiner Struktur und möglichen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Q10 Chip eingesetzt, der die

Gesamtzahl der aufgelösten Signale erhöht und selbst potentielle Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 250 kDa identifizieren helfen kann.

4.1.3 Proteinidentifizierung

Mit der in den letzten Jahren massiv gestiegenen Anzahl von vollständig sequenzierten Genomen, getragen durch eine Vielzahl großer Genomprojekte, ist eine übersichtliche Datenbank zur Navigation zwischen den nun verfügbaren Proteomsequenzen entstanden. Hierbei bietet die universal protein database (uniprot) als grösste bioinformatische Datenbank einen freien Zugang zu einer reichhaltigen Informationsquelle.

Zur Proteinidentifizierung der in der SELDI-TOF-MS gefundenen Molmassen wurde das TagIdent Tool der Datenbank genutzt. Die so herausgefilterten Proteine wurden nach ihrer Relevanz entsprechend der einschlägigen wissenschaftlichen Artikel bewertet. Hierdurch konnte eine Gliederung der einzelnen Proteine, gemessen an ihrer Präsenz in Veröffentlichungen über Hirntumore, Zysten oder Tumorwachstum vorgenommen werden.

Die Wertigkeit des in dieser Arbeit entwickelten Klassifizierungsalgorithmus wurde mittels der immunhistochemischen Färbung der vermuteten Proteine in Glioblastompräparaten überprüft. Hierbei konnte, wie vorausgesagt, das Vorliegen von Basigin und Ferritin in der Tumorzystenwand bestätigt werden, während das nach dem Algorithmus als negativ einzustufende Metallothionin eine schwächere und nicht zystenwandständige Färbung ergab (Abbildung 5,6).

Der hier eingesetzte Zugang ist ein „discovery oriented approach“, das heisst, wie bei vielen modernen genomischen und proteomischen Projekten werden Daten generiert, die durch geeignete Auswahlverfahren fokussiert werden müssen und deren Ergebnisse durch klassische Verfahren eine Bestätigung benötigen.

Im strengen Sinn ist in dieser Arbeit keine eindeutige Identifikation von Zystenproteinen erfolgt. Der Vermutung auf das Vorliegen gewisser Kandidatenproteine folgte der immunhistochemische Nachweis der Kandidaten in der umgebenden Zellwand. Eine zweifelsfreie Identifikation würde einen antikörpergestützten „Pull Down Assay“ nötig machen, oder die Isolierung der Proteine aus der Zystenflüssigkeit mit nachfolgender zweidimensionaler Gelelektrophorese oder sogar einer Proteinsequenzierung. Dies war hier aufgrund der geringen Menge des Probenmaterials nicht adäquat durchführbar.

Bezüglich der Pathogenese von Hirntumoren bietet diese Vorgehensweise jedoch eine grosse Anzahl von Möglichkeiten, bekannte Proteine näher zu charakterisieren, oder sogar neue Biomarker zu definieren. So zeigt die SELDI-TOF Analyse, dass das in den Glioblastomzysten und zystischen Metastasen vorliegende Ferritin vorwiegend aus Leichtketten besteht, da nur diese Bande in den Zystenflüssigkeiten nachgewiesen wird. Der immunhistochemische Nachweis in der Glioblastomzystenwand ist eindeutig positiv (Abbildung 10).

Die in der Internet-basierten Suche ermittelte Proteinauflistung enthält eine grosse Auswahl weiterer Proteinkandidaten, deren Vorhandensein oder Fehlen in Tumorgewebe immunhistochemisch bestätigt werden muss, was jedoch über den Rahmen dieser Dissertation weit hinausgehen würde. Das Bearbeiten dieser potentiellen Biomarker soll Thema zukünftiger Promotionen sein, nachdem in der vorliegenden Arbeit zunächst die prinzipielle Anwendbarkeit des Suchalgorithmus bestätigt werden konnte.

4.1.4 Immunhistochemie

Das „klassische“ Verfahren der Immunhistochemie hat die mittels SELDI-TOF Algorithmus vorausgesagte Anwesenheit von Basigin und Ferritin in der Zystenwand von Glioblastompräparaten bestätigt. Die Färbung des als Negativkontrolle eingesetzten Metallothionins zeigte eine deutlich andere Verteilung.

Die prinzipielle Verwendbarkeit der SELDI-TOF Analyse als Verfahren zur Proteincharakterisierung bei Glioblastomen ist somit gezeigt. Dies entspricht den Ergebnissen an systemischen Tumoren, die ebenfalls SELDI-TOF Analysen mit Immunhistochemie kombiniert haben [27, 74].

Mittels Immunhistochemie kann lediglich eine Aussage über die Anwesenheit des Proteins in den Zellen der Zystenwand getroffen werden. Für eine Einschätzung ob die Zellen das jeweilige Protein selbst synthetisieren oder aus dem Zysteninneren aufgenommen haben, werden komplexere Methoden oder molekulargenetische Untersuchungen notwendig. So kann die Analyse der intrazellulären Messenger-RNA mittels einer in-situ Hybridisierung einen Aufschluss geben oder der elektronenmikroskopische Nachweis sekretorischer Vesikel hilfreich sein [4]. Bei der vorliegenden Materialknappheit müsste eine Mikrodissektionstechnik zur Isolierung der Zystenwandanteile eingesetzt werden [43].

In der vorliegenden Arbeit wurden die in einem Arbeitsschritt gefärbten Schnitte von einem Untersucher nach einem standardisierten Verfahren ausgewertet. Der dabei gebildete Färbequotient eröffnete die Möglichkeit einer semiquantitativen Auswertung. Dies erlaubte eine genauere Aussage über die Färbung der Zystenwand im Vergleich zum Färbegrad des Tumorgewebes. Hierdurch wurde die Einschätzung der unterschiedlichen Färbecharakteristik des Methallothionins gegenüber Basigin und Ferritin unterstützt, da das Tumorgewebe nach Metallothionin-Färbung einen Quotienten über 1 aufwies (Abbildung 6).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Mittels SELDI-TOF Analyse der Zystenflüssigkeit konnte das Vorhandensein von Basigin und Ferritin in der Zystenwand postuliert werden, während Metallothionin als Negativkontrolle diente. Die Immunhistochemie zeigte entsprechend für die drei Proteine unterschiedliche Färbemuster, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2.1 Basigin

Das Glykoprotein Basigin ist ein transmembranöses Protein, das unter anderem auf Erythrozyten als Ok-Blutgruppenantigen vorhanden ist. In dieser Funktion ist es zuletzt vergleichsweise spektakulär in den Blickpunkt des Interesses gerückt, da es die Invasion des Malariaerregers in die roten Blutkörperchen ermöglicht [8].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SELDI-TOF Proben war ein signifikant häufigeres Auftreten des Basigin-Peaks in Glioblastomrezidiven, verglichen zu Glioblastomen, zu verzeichnen (Tabelle 10).

Zudem konnte immunhistochemisch eine deutliche Anfärbung der Zystenwand mit einem Antikörper gegen Basigin festgestellt werden. Die intrazelluläre zytoplasmatische Lokalisation stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein [4]. Auch die Färbung der Blutgefäßwände in gesundem Hirngewebe konnte bestätigt werden [61] (Abbildung 9).

Zum Vorkommen von Basigin in Zysten ist die Datenlage unzureichend. In odontogenen Zysten wurde das Protein nachgewiesen und ein Zusammenhang mit gesteigener Aggressivität des Wachstums hergestellt [2]. Dies spiegelt sich auch in Ergebnissen am Medulloblastom wider, bei dem die Basiginexpression mit Tumorprogression und schlechterer Überlebensprognose einherging [7]. Das Auftreten von Basigin in Hirntumorzysten ist bislang nicht beschrieben, jedoch wird über die

Induktion der extrazellulären Matrixmetalloproteinasen in die Tumorzellen vor Chemotherapie schützender und die Progression begünstigender Effekt postuliert [53]. Besonders auffällig war dabei das Färbeverhalten der Zellen der Zystenwände, die in 84,24 % der Fälle eine stärkere Färbung als das umliegende Tumorgewebe aufwiesen (Abbildung 8, Tabelle 16). Dies legt die Vermutung nahe, dass Basigin über die, der Zyste anliegenden Zellen, in das Lumen abgegeben wird, was dort zu einer Akkumulation des Proteins und somit zu einer Beeinflussung der Grössenzunahme der Zyste, aber auch des Tumorwachstums führen kann.

Hervorzuheben ist hierbei, dass Basigin als einziges Protein häufiger in Glioblastomrezidiven auftritt als im Glioblastom, und in keinem anderen Vergleich von Tumorgruppen gegenüber Liquor gefunden wurde. Es wurde darüber hinaus im Rohdatensatz beim Vergleich von Metastasenproben zu Glioblastomproben häufiger in den Metastasen gefunden (Bande 40206, Signifikanzniveau 0,0106). In Anbetracht der vor Chemotherapie schützenden Matrixmetalloproteinaseninduktion (Emmprin) kann dies als Ausdruck der posttherapeutisch fortschreitenden Tumorerkrankung diskutiert werden.

4.2.2 Ferritin

Ferritin ist ein 24-mer das sich aus wechselnden Anteilen schwerer Ketten („heavy chain“) und leichter Ketten („light chain“) zusammensetzt. Mittels SELDI-TOF wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Molmasse von 19,9 kDa in den Hirntumorzysten von Glioblastom und Metastasen gefunden, die der Masse von Ferritin light chain entspricht. Eine Reihe von Untersuchungen, auch an systemischen Tumoren, hebt ebenfalls die Bedeutung der leichten Kette von Ferritin als tumorassoziiertes Protein hervor [19, 27,43].

In der Literatur findet sich ein Zusammenhang zwischen Ferritin und Gliomen aufgrund unterschiedlicher Beobachtungen. So wurde bereits 1998 die signifikante Erhöhung von Ferritin im Liquor von Glioblastompatienten beschrieben. Aufgrund der hohen Molekülgröße wurde der Übertritt des Proteins aus dem Serum in den Liquor als unwahrscheinlich erachtet und eine Produktion von Ferritin durch Tumorzellen postuliert [62].

Die in dieser Arbeit erfolgten immunhistochemischen Auswertungen finden in Einklang damit eine Färbung des Tumorgewebes, in 64,85 % der Schnitte vornehmlich in der Zystenwand. Dies kann auf eine Produktion von Ferritin light chain durch Zellen der

Zystenwand mit anschliessender Sezernierung in das Lumen schliessen lassen (Abbildung 10).

Eine dadurch erhöhte Ferritinkonzentration könnte entscheidende Veränderungen am Tumor hervorrufen. So wurde Ferritin als ein autokriner Wachstumsfaktor für Tumorzellen diskutiert und bei humanen Leukämiezellen konnte durch einen Ferritinantikörper Wachstum inhibiert werden [36]. Ferner gibt es einen Zusammenhang zwischen reduziertem Ansprechen auf Apoptosereize von invadierenden Gliomzellen und gleichzeitig stark vorhandener Ferritinexpression [26]. Zwar sind diese Ergebnisse nicht uneingeschränkt bestätigt worden, jedoch muss somit eine von der Ferritinkonzentration in Tumor und Zyste abhängige Verstärkung des Tumorwachstums in Betracht gezogen werden.

4.2.3 Metallothionin

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SELDI-TOF-MS wurde kein Peak detektiert, der gemäss der Algorithmusdefinition (Bandenabweichung 0,3 %) einem der vier Metallothionin-Subtypen entspricht. Bei der anschließenden immunhistochemischen Untersuchung wurde ein Antikörper gegen Metallothionine 1 und 2 verwendet, die bereits in Gliomen nachgewiesen wurden, sich aber gemäss der SELDI-TOF Analyse nicht in der Zystenwand finden sollten.

Es zeigte sich eine nahezu homogene, schwache Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper, was vorhergehenden Arbeiten entspricht und das SELDI-TOF Ergebnis bestätigt (Abbildung 6, 11). Einige Autoren hatten eine positive Korrelation zwischen dem histologischen Grad eines Glioms und seiner Metallothioninexpression festgestellt. Eine weitere Bedeutung wird diesen Proteinen im Rahmen der Beeinflussung des Metabolismus der neoplastischen Zelle zugeschrieben, die zum Beispiel Resistenzen gegenüber bestimmten Pharmaka erklären kann [15, 25].

Es war immunhistochemisch eine gleichmässige Färbung und damit Expression von Metallothionin in vielen Tumorpräparaten zu verzeichnen, jedoch kaum Kontrast zwischen zystennahen Strukturen und soliden Tumoranteilen. Der Färbequotient war bei unter 50 % der Zysten grösser als 1 (Abbildung 5, Tabelle 16). Dies legt die Vermutung nahe, dass Metallothionin keinen Einfluss auf die Entwicklung zystischer Strukturen in Gliomen besitzt.

Besonderes Augenmerk verdient hierbei die routinemässige Dexamethason-Prophylaxe des Hirnödems. Im Tierversuch ist nachgewiesen worden, dass die Expression der Metallothionin Subtypen MT1 und MT2 durch Glucokortikoide

induziert wird [24]. Dies kann die homogene und fast ubiquitäre Färbung der Glioblastompräparate erklären.

4.2.4 Diskussion der Vergleichsproben

Ein Vorteil der SELDI-TOF Technik ist der direkte Vergleich von Tumorproben zu Kontroll-Liquorproben und Proben weiterer Tumorgruppen, deren Versuchsvorbereitung nahezu gleichartig verläuft, sodass systematische Fehler, zum Beispiel bei der Pufferzubereitung oder Lagerung, kaum ins Gewicht fallen.

Daraus folgt, dass die beim Vergleich von Tumor zu Liquor gefundenen Proteinpeaks, die im Liquor aber nicht in Tumoren auftreten, genauer betrachtet werden sollten. Es liegen offensichtlich Proteine vor, die der „gesunden“ tumorfreen Situation entsprechen und bei Vorliegen eines Malignoms nicht mehr vorhanden sind (Tabelle 13). Dies umfasst für das Glioblastom 23 Banden, die im Liquor vorhanden sind und in der Zystenflüssigkeit nicht, beim Glioblastomrezidiv 17 Banden und bei Metastasen 24 Banden. 16 dieser Banden sind bei allen drei Tumorentitäten in gleicher Grösse (Variation 0.3%) vorhanden.

Glioblastomrezidive wachsen in der Wand der liquorgefüllten Resektionshöhle neu aus, sodass signifikante Unterschiede dieser Zystenflüssigkeiten zu Liquor deutlich seltener sind. Die Bandenzahlen des Vergleichs Glioblastomrezidiv zu Liquor zeigen dementsprechend weniger Banden als Glioblastom- oder Metastasenzysten, nämlich 7 im Rezidiv und 17 im Liquor (Tabelle 10, 13).

Die 16 in allen drei Tumorentitäten gefundenen, im Liquor vorherrschenden Banden, könnten zum einen verloren gegangene Tumorsuppressorgene sein, die zur mangelnden Wachstumskontrolle bei der malignen Entartung führen. Auf der anderen Seite muss der Vollständigkeit halber die Grunderkrankung Spinalkanalstenose mit chronischem Schmerzsyndrom berücksichtigt werden, da Berichte vorliegen, wie sich in Abhängigkeit von der Schmerztherapie die Proteomsituation im Liquor verändern kann [41, 51].

Eine weitere auffällige Übereinstimmung findet sich bei der Gegenüberstellung der Proteinbanden im Vergleich von Glioblastomen gegen Liquor mit denen von Metastasen gegen Liquor. Von insgesamt 38 Peaks stimmen 14 nach Definition (Variation 0,3 %) überein (Tabelle 14). Dies legt die Vermutung einer gemeinsamen, mehrere Proteine betreffenden Aberration nahe, die die Malignisierung befördert. So finden sich unter den gemeinsamen Proteinen die Kandidaten für Leucine Zipper

Protein 6 (6424 Dalton), VEGF121 (17224 Dalton) und Ferritin (19899 Dalton). Auch die Bande für GFAP (49916 Dalton) findet sich in beiden Entitäten.

Die Übereinstimmung von ungefähr einem Drittel der Glioblastombanden mit Metastasenbanden ist umso interessanter, als dass Metastasen von unterschiedlichsten Primärtumoren ausgehen. Die genauere Beschreibung, sowohl der im Kontrollliquor übereinstimmenden, als auch der in Zysten maligner Tumoren vorhandenen Banden, kann in Zukunft zu einem deutlich verbesserten Verständnis der Genese von malignen Hirntumoren und der dadurch induzierten zerebralen Gewebsreaktion beitragen.

4.3 Stellungnahme zur Problemstellung

Im Folgenden wird auf die in der Problemstellung genannten Fragen Bezug genommen.

1. Finden sich signifikante Unterschiede des Proteingehaltes von Zysten zu Kontroll-Liquorproben ?

Mittels der SELDI-TOF Technik wurden in dieser Arbeit hoch signifikante Unterschiede der Proteinausstattung von Gehirntumorzysten im Vergleich zu Liquorproben von Spinalkanalstenosepatienten gezeigt. Dies kann beispielsweise durch eine zelluläre Überexpression bestimmter tumorassoziierter Proteine entstehen, die Ergebnisse erlauben aber auch die Interpretation dass Tumorsuppressorproteine bei der Malignisierung verloren gegangen sind.

2. Lassen sich die mittels der Proteomanalyse (SELDI-TOF) ermittelten Proteinmassen realen Proteinen zuordnen und finden sich diese mittels histologischer Färbetechniken in Glioblastompräparaten wieder?

Aus den SELDI-TOF Banden lässt sich eine grosse Zahl potentiell in der Zystenflüssigkeit vorhandener Proteine ableiten. Ein Auswahlalgorithmus erlaubte die Definition zweier Zystenwandproteine und einer Negativkontrolle zum immunhistochemischen Nachweis. Die Antikörperfärbung wies Basigin und Ferritin in der Zystenwand nach, ein Bezug von Metallothionin zur Zystenwand konnte nicht gezeigt werden. So konnte das Ergebnis der SELDI-TOF Analyse bestätigt werden.

3. Erlaubt die SELDI-TOF-Analyse der Zystenflüssigkeiten die Annahme oder Ablehnung von Hypothesen zur Zystenentstehung?

Das Verfahren schliesst einen reinen Liquorverhalt oder ein in Resorption befindliches Hämatom als Zystenursache aus, da die Zystenproteine zum Liquor signifikant unterschiedlich sind, und keine Banden in der Grösse der Hämoglobinketten nachweisbar sind. Ein gerichteter, die Tumorzyste bildender Ödemstrom erscheint unwahrscheinlich, da ab einer gewissen Zystengrösse mit begleitender Raumforderung und intrazystalem Druck die Umkehr des Flüssigkeitsstromes eintreten müsste.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation legen als Entstehungshypothese von Gehirntumorzysten ein zweigleisiges Geschehen nahe. Zum einen dürfte eine nekrobiotische Veränderung des Tumorgewebes durch Sauerstoffmangel eintreten, die Kandidatenproteine wie Tumor-Nekrose-Faktor oder NADH Subkomplexe erklärt. Zum anderen reagieren die Zellen auf den hypoxischen Stress mit der Sekretion Angiogenese fördernder Proteine, wie zum Beispiel VEGF 121 oder Chemokinen, die sich ebenfalls in der Kandidatenliste finden.

Zwischenzeitlich sind Veröffentlichungen erschienen, die die Annahme von zwei Kandidaten aus der vorgelegten Liste ermöglichen. So konnte Haptoglobin (43349 Dalton) als Biomarker für Glioblastome definiert werden und eine Rolle des CaMKII (8658 Dalton) bei der Gliomzellmigration gezeigt werden [9, 35]. Dies unterstreicht die Wertigkeit des vorgestellten Verfahrens zur Proteinanalyse von Hirntumorzysten.

4.4 Ausblick

Die Bedeutung der Proteomanalyse zur Definition tumorassoziierter Biomarker in Serum oder Liquor wird aufgrund der computergetützten Verfahren, die das Screening grosser Probenmengen in kurzer Zeit ermöglichen, weiter zunehmen. Ziel ist – ähnlich wie bei manchen systemischen Tumoren – eine Überwachung des Tumorwachstums mittels spezifischer Blutwerte vornehmen zu können.

Die vorliegende Arbeit stellt das SELDI-TOF Verfahren für die Untersuchung von Liquorproben und Hirntumorzysten vor und zeigt die prinzipielle Verwendbarkeit zur Proteomanalyse.

Aufgabe nachfolgender Studien wird es sein, durch geeignete Auswertungsmethoden und den Einsatz von Antikörpertechniken, Proteinsequenzierungsverfahren und molekulargenetischen Methoden die Vielfalt der Ergebnisse auf geeignete Proteine zu fokussieren und den zweifelsfreien Nachweis ihres Vorliegens in den Proben zu erbringen. Von besonderem therapeutischem Interesse sind hierbei die potentiell im Liquor vorhandenen Tumorsuppressorproteine, deren Molgewicht in dieser Arbeit ermittelt wurde aber deren Identifizierung noch aussteht.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die hier zur Promotion vorgelegte Dissertation beschäftigt sich mit der Analyse des Proteingehaltes von Hirntumorzysten verschiedener Entitäten mittels SELDI-TOF Massenspektrometrie und Immunhistochemie.

Es wurden Proben von 67 Hirntumorpatienten untersucht, darunter 20 Patienten mit Glioblastom, 9 mit Glioblastomrezidiv und 14 mit Hirnmetastasen. Der Liquor von 15 Patienten mit Spinalkanalstenose diente zur Kontrolle.

Anhand der SELDI-TOF Ergebnisse und eines in dieser Arbeit entwickelten, internetbasierten Suchalgorithmus wurde eine Proteinliste erstellt. Basigin und Ferritin konnten immunhistochemisch in der Zystenwand von Glioblastomen nachgewiesen werden, das als Negativkontrolle eingesetzte Metallothionin zeigte eine homogene, zystenferne Färbung des soliden Tumoranteils.

Die auf SELDI-TOF basierende Proteinanalyse hat sich als einfach anzuwendende und zuverlässige Methode erwiesen, der Auswahlalgorithmus konnte durch das immunhistochemische Verfahren bestätigt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Vielzahl potentieller Biomarker sowohl in Tumorzystenflüssigkeit als auch im Liquor cerebrospinalis mittels Molgewicht charakterisiert. Die exakte Identifizierung und die Prüfung der Eignung dieser Proteine zur Optimierung der Glioblastomtherapie wird eine Aufgabe nachfolgender Forschungsarbeiten sein.

5.2 English summary

The present study deals with the SELDI-TOF analysis of protein content in brain tumor cyst fluid and its comparison to immunohistochemistry.

67 samples were analyzed, among them 20 from patients with glioblastoma, 9 with recurrent glioblastoma and 14 with brain metastases. As a control, cerebrospinal fluid from 15 patients with lumbar spinal stenosis was examined.

The resulting protein peaks from the SELDI-TOF mass spectrometry were used for an internet database search, and a protein list referring to molecular masses of potential cyst fluid proteins was established. From the candidate proteins, Basigin and Ferritin could be sublocalized in the cyst wall of glioblastoma tissue by immunohistochemistry. As a negative control Metallothionein detection resulted in more homogenous staining, without predilection in the cyst wall.

SELDI-TOF based protein analysis proved to be a reliable and easy method, the validity of the search algorithm was confirmed by immunostaining.

The examination of tumor cyst fluid and cerebrospinal fluid proteins allowed to detect a multitude of potential glioblastoma biomarkers.

The discovery oriented approach yielded a number of molecular weights, according to which detailed identification of proteins is the aim of ongoing research. Its purpose is the definition of reliable biomarkers for glioblastoma therapy monitoring.

6. Abkürzungen

| | |
|---------|---|
| AEBP | Adipocyte enhancer binding protein |
| ARF | Alternate reading frame |
| AS | Aminosäuren |
| ASCL | Achaete scute homolog |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAM | Bovine adrenal medulla |
| CaMKII | Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II |
| CoA | Coenzym A |
| CUP | Cancer of unknown primary |
| CCNU | Chlorethyl-cyclohexyl-nitroso-urea |
| CDKN | Cyclin dependent kinase inhibitor |
| CD | Cluster of differentiation |
| Da | Dalton |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| EBI | European bioinformatics institute |
| EGF | Epidermal-growth-factor |
| EGFR | Epidermal-growth-factor-receptor |
| FAS | Fasciclin |
| GBM | Glioblastom |
| GBM rez | Glioblastomrezidiv |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| Hb | Hämoglobin |
| HE | Hämatoxylin eosin |
| IGF | Insulin-like-growth-factor |
| IGFBP | Insulin-like-growth-factor binding protein |
| kDa | Kilodalton (1 kDa \triangleq 1,6601 ⁻²¹ Gramm [g]) |
| LOH | Loss of heterozygosity |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| MDM | Murine double minute |
| MDP | Magnesium dependent phosphatase |
| Min | Minuten |
| MMC | Mitomycin C |

| | |
|--------------|--|
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| MN | Meningioma |
| MTS | Metastase |
| MW | Molmasse ("molecular weight") in Kilodalton |
| NCBI | National center for biotechnology information |
| NDRG | N-myc downstream regulated gene |
| NF2 | Neurofibromatose Typ 2 |
| PARF | Partner of ADP-ribosylation factor |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PDGFRB | Platelet derived growth factor receptor beta type |
| PI | Phosphoinositid |
| PIR | Protein information resource |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| P-value | Probability-value |
| PVC | Procarbacin, Vincristin, CCNU |
| RAS | Rat sarcoma |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RPA | Recursive partitioning analysis |
| RTOG | Radiation therapy oncology group |
| SD | Standard deviation |
| SELDI-TOF-MS | Surface enhanced laser desorption/ionisation - time of flight - mass spectrometry |
| SIB | Swiss institute of bioinformatics |
| SK | S-phase kinase-associated protein |
| TAB | Tabelle |
| TP | Tumor protein |
| TSC1 | Tumor suppressor in lung cancer |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| VS | Versus |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| WHO | World health organisation |
| WTN | Wingless type |
| YKL | Tyrosine (Y), lysine (K), and leucine (L) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7. Referenzen

1. Afra D, Norman D, Levin VA
Cysts in malignant gliomas. Identification by computerized tomography
J Neurosurg 53(6):821-5, 1980
2. Ali MA
Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic
cysts
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 106(2):258-63, 2008
3. Baggenstos MA, Butman JA, Oldfield EH, Lonser RR
Cystic lesions of the brain. A classification based on pathogenesis, with
consideration of histological and radiological features
Eur J Radiol 17(2):69-84, 1993
4. Betsuyaku T, Kadomatsu K, Griffin GL, Muramatsu T, Senior RM
Increased basigin in bleomycin-induced lung injury
Am J Respir Cell Mol Biol 28(5):600-6, 2003
5. Choi YS, Choe LH, Lee KH
Recent cerebrospinal fluid biomarker studies of Alzheimer's disease
Expert Rev Proteomics 7(6):919-29, 2010
6. Choi CY, Yee GT, Lee CH, Joo M
Large Cystic Glioblastoma Multiforme : Patient Surviving Over 7 Years Without
Progression
Clin Neuroradiol 2012 (Epub ahead of print)
7. Chu T, Chen X, Yu J, Xiao J, Fu Z
Extracellular matrix metalloproteinase inducer is a negative prognostic factor of
pediatric medulloblastoma.
Pathol Oncol Res 17(3):705-11, 2011

8. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ
Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*.
Nature 480(7378):534-7, 2011
9. Cuddapah VA, Sontheimer H
Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma
J Biol Chem 285(15):11188-11196, 2010
10. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P
Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method
Cancer 62(10):2152-65, 1988
11. de Bont JM, den Boer ML, Reddingius RE, Jansen J, Passier M, van Schaik RH, Kros JM, Sillevius Smitt PA, Luider TH, Pieters R.
Identification of apolipoprotein A-II in cerebrospinal fluid of pediatric brain tumor patients by protein expression profiling
Clin Chem 52(8):1501-9, 2006
12. Deighton RF, McGregor R, Kemp J, McCulloch J, Whittle IR
Glioma Pathophysiology: Insights emerging from Proteomics
J Brain Pathol 20(4):691-703, 2010
13. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A
PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors
Oncogene 16(17):2259-64, 1998
14. Ewend MG, Elbabaa S, Carey LA
Current treatment paradigms for the management of patients with brain metastases
J Neurosurgery 57(5 Suppl):S66-77; discussion S1-4, 2005

15. Floriańczyk B, Osuchowski J, Kaczmarczyk R, Starostawska E, Trojanowski T
Distribution of metallothioneins in the brain neoplastic cells
Folia Neuropathol 43(2):91-6, 2005
16. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW
Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement
Arch Neurol 62(6):865-70, 2005
17. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A
Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma
Cancer Res 64(19):7011-21, 2004
18. Gaspar L, Scott C, Rotman M, Asbell S, Phillips T, Wasserman T, McKenna WG, Byhardt R
Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials
J Radiat Oncol Biol Phys 37(4):745-51, 1997
19. Gautam P, Nair SC, Gupta MK, Sharma R, Polisetty RV, Uppin MS, Sundaram C, Puligopu AK, Ankathi P, Purohit AK, Chandak GR, Harsha HC, Sirdeshmukh R
Proteins with Altered Levels in Plasma from Glioblastoma Patients as Revealed by iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis.
PLoS One 7(9):e46153, 2012
20. Gavrilovic IT, Posner JB
Brain metastases: epidemiology and pathophysiology
J Neurooncol 75(1):5-14, 2005

21. Glantz M, Chamberlain M, Liu Q, Litofsky NS, Recht LD
Temozolomide as an alternative to irradiation for elderly patients with newly diagnosed malignant gliomas
Cancer 97(9):2262-6, 2003
22. Go KG, Hew JM, Kamman RL, Molenaar WM, Pruim J, Blaauw EH
Cystic lesions of the brain. A classification based on pathogenesis, with consideration of histological and radiological features
Eur J Radiol 17(2):69-84, 1993
23. Gresner SM, Rieske P, Wozniak K, Piaskowski S, Jaskolski DJ, Skowronski W, Sikorska B, Papierz W, Liberski PP
Gliomas: association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p, 10q, and 19q
Acta Neurobiol Exp (Wars) 67(2):103-12, 2007
24. Hernández J, Carrasco J, Belloso E, Giralt M, Bluethmann H, Kee Lee D, Andrews GK, Hidalgo J
Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6
Cytokine 12(6):791-6, 2000
25. Hiura T, Khalid H, Yamashita H, Tokunaga Y, Yasunaga A, Shibata S
Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival
Cancer 83(11):2361-9, 1998
26. Holtkamp N, Afanasieva A, Elstner A, van Landeghem FK, Könneker M, Kuhn SA, Kettenmann H, von Deimling A
Brain slice invasion model reveals genes differentially regulated in glioma invasion
Biochem Biophys Res Commun 336(4):1227-33, 2005

27. Jézéquel P, Campion L, Spyrtos F, Loussouarn D, Campone M, Guérin-Charbonnel C, Joalland MP, André J, Descotes F, Grenot C, Roy P, Carlioz A, Martin PM, Chassevent A, Jourdan ML, Ricolleau G
Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study
Int J Cancer 131(2):426-37, 2012
28. Kalinina J, Peng J, Ritchie JC, Van Meir EG.
Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology
Neuro Oncol 13(9):926-42, 2011
29. Karrenbauer VD, Prejs R, Masterman T, Hillert J, Glaser A, Imrell K
Impact of cerebrospinal-fluid oligoclonal immunoglobulin bands and HLA-DRB1 risk alleles on brain magnetic-resonance-imaging lesion load in Swedish multiple sclerosis patients
J Neuroimmunol 254(1-2):170-3, 2013
30. Kaur G, Bloch O, Jian BJ, Kaur R, Sughrue ME, Aghi MK, McDermott MW, Berger MS, Chang SM, Parsa AT
A critical evaluation of cystic features in primary glioblastoma as a prognostic factor for survival
J Neurosurg 115(4):754-9, 2011
31. Khalil AA
Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling
Cancer Sci 98(2):201-13, 2007
32. Kiehntopf M, Siegmund R, Deufel T
Anwendung der SELDI-TOF-Massenspektrometrie zur Identifizierung neuer Biomarker: Möglichkeiten und Grenzen
J Lab Med 31(3):93–108, 2007

33. Kikkawa S, Sogawa K, Satoh M, Umemura H, Kodera Y, Matsushita K, Tomonaga T, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F
Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
Int J Proteomics doi: 10.1155/2012/108609 Epub 2012 Jul 25
34. Krayenbühl N, Pravdenkova S, Al-Mefty O
De novo versus transformed atypical and anaplastic meningiomas: comparisons of clinical course, cytogenetics, cytokinetics, and outcome
Neurosurgery 61(3):495-503, 2007
35. Kumar DM, Thota B, Shinde SV, Prasanna KV, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K
Proteomic identification of haptoglobin $\alpha 2$ as a glioblastoma serum biomarker: implications in cancer cell migration and tumor growth
J Proteome Res 9(11): 5557-5567, 2010
36. Kwok JC, Richardson DR
The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation?
Crit Rev Oncol Hematol 42(1):65-78, 2002
37. Liang Q, Xiong H, Gao G, Xiong K, Wang X, Zhao Z, Zhang H, Li Y
Inhibition of basigin expression in glioblastoma cell line via antisense RNA reduces tumor cell invasion and angiogenesis
Cancer Biol Ther 759-62, 2005
38. Lohle PN, Verhagen IT, Teelken AW, Blaauw EH, Go KG
The pathogenesis of cerebral gliomatous cysts
J Neurosurgery 30(2):180-5, 1992
39. Lohle PN, Wurzer HA, Seelen PJ, Kingma LM, Go KG
Analysis of fluid in cysts accompanying various primary and metastatic brain tumours: proteins, lactate and pH
Acta Neurochir 140(1):14-9, 1998

40. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK
WHO Classification of tumours of the central nervous system, 4th edition
International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2007
41. Lu J, Katano T, Nishimura W, Fujiwara S, Miyazaki S, Okasaki I, Aritake K,
Urade Y, Minami T, Ito S
Proteomic analysis of cerebrospinal fluid before and after intrathecal injection of
steroid into patients with postherpetic pain
Proteomics 12(19-20):3105-12, 2012
42. Maldaun MV, Suki D, Lang FF, Prabhu S, Shi W, Fuller GN, Wildrick DM,
Sawaya R
Cystic glioblastoma multiforme: survival outcomes in 22 cases
J Neurosurg 100(1):61-7, 2004
43. Melle C, Ernst G., Scheibner O., Kaufmann R., Schimmel B., Bleul A.,
Settmacher U., Hommann M., Claussen U., von Eggeling F
Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular
carcinoma
Journal of Proteome Research 6:306-315, 2007
44. Nathoo N, Chahlavi A, Barnett GH, Toms SA
Pathobiology of brain metastases
J Clin Pathol 58(3):237-42, 2005
45. Nestler U
Experimentelle Untersuchungen zur Genterapie von Glioblastomen
Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi, Giessen 2008
46. Nestler U, Richter N, Bleul A, Melle C, von Eggeling F, Böker D-K
Detection of proteins in tumor associated cyst fluid using the SELDI-TOF
technique
Acta Neuropathol 112:380, P1057, 2006

47. Nestler U, Schmidinger A, Schulz C, Huegens-Penzel M, Gamedinger UA, Koehler A, Kuchelmeister KW
Glioblastoma simultaneously present with meningioma--report of three cases
Zentralbl Neurochir 68(3):145-50, 2007
48. Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M
Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma
Brain Tumor Pathol 21(2):53-6, 2004
49. Norden AD, Drappatz J, Wen PY
Advances in meningioma therapy
Curr Neurol Neurosci Rep 9(3):231-40, 2009
50. Ohgaki H, Kleihues P
Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma
Am J Pathol 170(5):1445-53 Review, 2007
51. Ohtori S, Suzuki M, Koshi T, Takaso M, Yamashita M, Inoue G, Yamauchi K, Orita S, Eguchi Y, Kuniyoshi K, Ochiai N, Kishida S, Nakamura J, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Suzuki M, Toyone T, Takahashi K
Proinflammatory cytokines in the cerebrospinal fluid of patients with lumbar radiculopathy
Eur Spine J 20(6):942-6, 2011
52. Okamoto H, Li J, Vortmeyer AO, Jaffe H, Lee YS, Gläsker S, Sohn TS, Zeng W, Ikejiri B, Proescholdt MA, Mayer C, Weil RJ, Oldfield EH, Zhuang Z
Comparative proteomic profiles of meningioma subtypes
J Cancer Res 66(20):10199-204, 2006
53. Pan Y, He B, Song G, Bao Q, Tang Z, Tian F, Wang S
CD147 silencing via RNA interference reduces tumor cell invasion, metastasis and increases chemosensitivity in pancreatic cancer cells
Oncol Rep 27(6):2003-9, 2012

54. Pelloski CE, Mahajan A, Maor M, Chang EL, Woo S, Gilbert M, Colman H, Yang H, Ledoux A, Blair H, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD
YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma
Clin Cancer Res 11(9):3326-34, 2005
55. Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W; ALA Glioma Study Group
Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients
Neuro Oncol 10(6):1025-34, 2008
56. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreassen N, Wallin A, Westman-Brinkmalm A, Blennow K
An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid
Neurosci Lett 409(3):215-9, 2006
57. www.pubmed.org
58. Qu M, Jiao H, Zhao J, Ren ZP, Smits A, Kere J, Nistér M
Molecular genetic and epigenetic analysis of NCX2/SLC8A2 at 19q13.3 in human gliomas
J Neuropathol Appl Neurobiol 36(3):198-210, 2010
59. Ribalta T, Fuller GN
Brain metastases: histopathological evaluation and diagnostic pitfalls
In: Sawaya R, Intracranial metastases: current management strategies
Blackwell futura, 2005
60. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G
Histological classification and molecular genetics of meningiomas
Lancet Neurol 5(12):1045-54, 2006

61. Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Koono M, Wakisaka S
Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas
Int J Cancer 88(1):21-7, 2000
62. Sato Y, Honda Y, Asoh T, Oizumi K, Ohshima Y, Honda E
Cerebrospinal fluid ferritin in glioblastoma: evidence for tumor synthesis
J Neurooncol 40(1):47-50, 1998
63. Schmidt F, Fischer J, Herrlinger U, Dietz K, Dichgans J, Weller M
PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma
Neurology 66(4):587-9, 2006
64. Schulz C, Mathieu R, Kunz U, Mauer UM
Treatment of unresectable skull base meningiomas with somatostatin analogs
Neurosurg Focus 30(5):E11, 2011
65. Schutzer SE, Liu T, Natelson BH, Angel TE, Schepmoes AA, Purvine SO, Hixson KK, Lipton MS, Camp DG, Coyle PK, Smith RD, Bergquist J
Establishing the proteome of normal human cerebrospinal fluid
PLoS One 5(6):e10980, 2010
66. Stockhammer G, Obwegeser A, Kostron H, Schumacher P, Muigg A, Felber S, Maier H, Slavc I, Gunsilius E, Gastl G
Vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in brain tumor cysts and correlates with tumor progression
Acta Neuropathol 100(1):101-5, 2000
67. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M
Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion
Acta Neurochir 153(6):1211-8, 2011

68. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma
N Engl J Med 352(10):987-96, 2005
69. Szymaś J, Morkowski S, Tokarz F
Determination of the glial fibrillary acidic protein in human cerebrospinal fluid and in cyst fluid of brain tumors
Acta Neurochir 83(3-4): 144-150, 1986
70. UniProt Consortium
The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010
Nucleic Acids Res 38 (Database issue): D142–D148, doi: 10.1093/nar/gkp846
71. Torti FM, Torti SV
Regulation of ferritin genes and protein
Blood 99(10):3505-16, 2002
72. Utsuki S, Oka H, Suzuki S, Shimizu S, Tanizaki Y, Kondo K, Tanaka S, Kawano N, Fujii K
Pathological and clinical features of cystic and noncystic glioblastomas
Brain Tumor Pathol 23(1):29-34, 2006
73. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS
Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma
Clin Cancer Res 13(4):1253-9, 2007

74. Wehder L, Ernst G, Crecelius AC, Guntinas-Lichius O, Melle C, Schubert US, von Eggeling F
Depicting the spatial distribution of proteins in human tumor tissue combining SELDI and MALDI imaging and immunohistochemistry
J Histochem Cytochem 58(10):929-37, 2010
75. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z
A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma
Neuro-Oncology 5(2): 79-88, 2003
76. Winking M, Bräuer N, Lücke M, Nestler U, Böker DK
Influence of postoperative radiation therapy of cerebral metastases on survival time and disease related to living condition
Zentralbl Neurochir 63(4):163-9, 2002
77. Yokomori N, Iwasa Y, Aida K, Inoue M, Tawata M, Onaya T
Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells
J Endocrinology 128(3):1474-80, 1991

8. Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Daumas-Duport-Klassifikation zur Einteilung von Gliomen

Tabelle 2

Auftreten von genetischen Veränderungen in primären oder sekundären Glioblastomen [nach Ohgaki et al]

Tabelle 3

Proteinexpression in Gliomen [Hiura T. et al, Sameshima T. et al, Yokomori N. et al, Ohgaki H. et al]

Tabelle 4

Karnofsky-Index

Tabelle 5

Klassifikation der RTOG für Patienten mit Hirnmetastasen

Tabelle 6

Genetische Veränderungen assoziiert mit der Initiation und Progression von Meningeomen [nach Riemenschneider MJ et al]

Tabelle 7

Vergleich der Proteinexpressionsmuster bei Meningeomen verschiedener Malignitätsstufen [nach Okamoto H et al]

Tabelle 8

Klassifikation von zystischen Läsionen des ZNS [nach Go KG et al]

Tabelle 9

Diagnosen der 67 untersuchten Hirntumorpatienten

Tabelle 10

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt vorkommender Proteine im Vergleich Glioblastom vs. Liquor, Glioblastomrezidiv vs. Liquor und Glioblastom vs. Glioblastomrezidiv, angegeben mit Signifikanzniveau.
Zum Vergleich Molmassen von Basigin, Ferritin light chain und Metallothionin

Tabelle 11

Punktesystem des Internet-basierten Auswertungs-Algorithmus zur Herausfilterung der mit Hirntumorwachstum assoziierten Proteine

Tabelle 12

Auszug aus der Arbeitsliste potentieller Kandidaten, angegeben mit Molmassen von Bande und Kandidat (MW, in Kilodalton (kDa)), Name, isoelektrischem Punkt (pI), Chromosom, Vorkommen (G: Glioblastom, T: Tumor, H: Hirntumor, S: sezerniert) und Funktion

Tabelle 13

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt im Liquor vorkommender Proteine im Vergleich Glioblastom vs. Liquor, Glioblastomrezidiv vs. Liquor und Metastase vs. Liquor, angegeben mit Signifikanzniveau

Tabelle 14

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt vorkommender Proteine im Vergleich Metastase vs. Liquor, Glioblastom vs. Liquor und Glioblastom vs. Metastase, angegeben mit Signifikanzniveau

Tabelle 15

Immunhistochemisch ausgewertete Proteine mit Bandengröße, Kandidatengröße und der Abweichung des Kandidaten von der jeweiligen Bande in %

Tabelle 16

Anteil der 165 Zysten mit Färbequotienten über 1, gefärbt mit Basigin, Ferritin light chain und Metallothionin, angegeben mit Anzahl, %, Standardabweichung (SD) und Mittelwert (Mean)

Tabelle 17

Einteilung der Glioblastom-Patienten anhand ihrer Überlebenszeit nach Erstoperation. Angegeben mit Patientenanzahl absolut und in Prozent, sowie Mittelwert des Färbequotienten der Zystenwandfärbung für alle 3 Antikörper

8.2 Tabellen

Tabelle 1

Daumas-Duport-Klassifikation zur Einteilung von Gliomen

| | |
|--------------------|--|
| Kernatypen: | hyperchromatisch, Größenvariation, Formvariation |
| Mitosen: | normal konfigurierte, abnormal konfigurierte |
| Gefäßaberrationen: | multiple Endothelzellschichten um Gefäßlumina |
| Nekrosen: | wenn eindeutig |
| Grad I | kein Kriterium vorhanden |
| Grad II | ein Kriterium vorhanden |
| Grad III | zwei Kriterien vorhanden |
| Grad IV | ab drei vorhandenen Kriterien |

Tabelle 2

Auftreten von genetischen Veränderungen in primären oder sekundären Glioblastomen
[nach Ohgaki et al]

| Genetische Veränderung | Primäres Glioblastom | Sekundäres Glioblastom |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| EGFR Amplifikation | 36% | 8% |
| LOH 1p | 12% | 15% |
| LOH 10q | 70% | 63% |
| LOH 13q | 12% | 38% |
| LOH 19q | 6% | 54% |
| LOH 22q | 41% | 82% |
| p16 INK4a Deletion | 31% | 19% |
| PTEN Mutation | 25% | 4% |
| TP53 Mutation | 28% | 65% |

Tabelle 3

Proteinexpression in Gliomen [Hiura T. et al., Sameshima T. et al, Yokomori N. et al, Ohgaki H. et al.]

| Protein | Funktion |
|----------------|--|
| AEBP-1 | Inhibiert die Funktion von PTEN. |
| ASCL-1 | Inhibiert NOTCH-Signalwege. |
| Basigin | Expression korreliert mit der Malignität von astrozytären Tumoren. |
| Fas | Korreliert mit dem Vorkommen ischämischer Nekrosen im Glioblastom. |
| Ferritin | Beteiligt an der Regulation zellulärer Differenzierungsprozesse. |
| IGFBP-2 | Reguliert die Aktivität von Insulin-like growth factor. |
| Metallothionin | Beteiligt an der Wachstumsregulation von astrozytären Tumoren. |
| VEGF | Korreliert mit dem Vorkommen ischämischer Nekrosen im Glioblastom. |

Tabelle 4

Karnofsky-Index

| | |
|-----|---|
| 100 | keine Beschwerden, keine Krankheitszeichen |
| 90 | geringe Symptome, normale Belastung möglich |
| 80 | einige Symptome, normale Belastung unter Anstrengung möglich |
| 70 | normale Belastung nicht möglich, Patient versorgt sich selbst |
| 60 | versorgt sich weitgehend selbst, braucht gelegentlich Hilfestellung |
| 50 | braucht regelmäßige Hilfestellung und häufige Pflege |
| 40 | pflegebedürftig, braucht spezielle Pflege und Unterstützung |
| 30 | schwer pflegebedürftig, bettlägerig |
| 20 | schwerkrank, medikamentöse Behandlung notwendig |
| 10 | moribund |

Tabelle 5

Klassifikation der RTOG für Patienten mit Hirnmetastasen

| | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gruppe 3 |
|--------------------------------------|--------------|----------------|----------|
| Karnofsky-Index | ≥ 70 | ≥ 70 | < 70 |
| Primärtumor | kontrolliert | unkontrolliert | |
| Alter (in Jahren) | < 65 | ≥ 65 | |
| Extrakranielle Metastasen | nein | ja | |
| Mittlere Überlebenszeit (in Monaten) | 7,1 | 4,2 | 2,3 |

Tabelle 6

Genetische Veränderungen assoziiert mit der Initiation und Progression von Meningeomen [nach Riemenschneider MJ et al]

| | |
|---|--|
| ↓ | <p>Arachnoidale (meningotheliale) Zelle</p> <ul style="list-style-type: none">-Chomosom 22q, NF2 Mutationen-4.1B, 4.1R, TSLC1 Expressionsverlust-EGFR/PDGFRB Aktivierung <p>Benignes Meningeom</p> <ul style="list-style-type: none">-Chromosomenmutationen auf: 1p, 6q, 10, 14q, 18q 1q, 9q, 12q, 15q, 17q, 20q-Notch, WTN, IGF Aktivierung <p>Atypisches Meningeom</p> <ul style="list-style-type: none">-Chromosomenmutationen auf: 6q, 10, 14q 9p (CDKN2A/B, p14ARF deletion)-NDRG2 Hypermethylierung-Amplifikation auf 17q23 <p>Anaplastisches Meningeom</p> |
|---|--|

Tabelle 7

Vergleich der Proteinexpressionsmuster bei Meningeomen verschiedener Malignitätsstufen [nach Okamoto H et al]

| Vergleich der exprimierten Proteine zwischen | |
|--|--|
| Benignem und atypischem Meningeom <i>Aktivator von 90kd heat shock Protein</i> <i>Apolipoprotein A1</i> <i>ATPase Homolog 1</i> <i>Calporin</i> <i>Plazenta Ribonuclease Inhibitor</i> <i>Serin-Threonin Kinase Rezeptor assoz. Protein</i> <i>Vitamin D bindendes Protein</i> | Atypischem und benignem Meningeom <i>Annexin A-1</i> <i>ATP Synthase D Kette</i> <i>Peroxiredoxin 2</i> <i>Peroxiredoxin 6</i> <i>Proteasomen Aktivator Komplex Untereinheit 2</i> <i>Retinsäure bindendes Protein 1</i> <i>Spannungsabhängiger Anionenkanal 2</i> |
| Atypischem und anaplastischem Meningeom <i>Acid ceramidase</i> <i>Enoyl-CoA Hydratase</i> <i>Mikrotubuli assoziiertes Protein</i> <i>Proteasom Untereinheit alpha</i> <i>Selen bindendes Protein 1</i> <i>Tropomyosin 1 alpha Kette</i> | Anaplastischem und atypischem Meningeom <i>alpha-1-Antitrypsin</i> <i>alpha-Enolase</i> <i>Fibrinogen gamma Kette</i> |

Tabelle 8

Klassifikation von zystischen Läsionen des ZNS [nach Go KG et al]

| Gruppe | Merkmal |
|--------|--|
| 1 | Der Inhalt der Zyste entspricht Liquor |
| 2 | Das Zystenepithel ist nicht neuralen Ursprungs |
| 3 | Die Zyste hat eine entzündliche Ursache |
| 4 | Die Zyste tritt zusammen mit Tumoren auf |

Tabelle 9

Diagnosen der 67 untersuchten Hirntumorpatienten

| Diagnose | Anzahl |
|------------------------------|---------------|
| Glioblastom | 20 |
| Metastase | 14 |
| Glioblastomrezidiv | 9 |
| Pilozytisches Astrozytom | 6 |
| Oligoastrozytom Grad III | 5 |
| Zyste der Pinealisregion | 2 |
| Epidermoidzyste | 2 |
| Hämangioblastom | 2 |
| Arachnoidalzyste | 1 |
| Hämangiom | 2 |
| Gangliogliom | 1 |
| Hypophysenadenom | 1 |
| Posthämorrhagische Zyste | 1 |
| Zyste der Rathkeschen Tasche | 1 |

Tabelle 10

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt vorkommender Proteine im Vergleich Glioblastom vs. Liquor, Glioblastomrezidiv vs. Liquor und Glioblastom vs. Glioblastomrezidiv, angegeben mit Signifikanzniveau.
Zum Vergleich Molmassen von Basigin, Ferritin light chain und Metallothionin

| Glioblastom versus Liquor | | | Glioblastomrezidiv versus Liquor | | | Glioblastom versus Glioblastomrezidiv | | |
|---------------------------|----------|-----------|----------------------------------|----------|-----------|---------------------------------------|----------|-----------|
| Signal in | MW (kDa) | P-value | Signal in | MW (kDa) | P-value | Signal | MW (kDa) | P-value |
| Metallothionin | 6.120 | | | 6.120 | | | 6.120 | |
| GBM Zyste | 6.424 | 4.42x10-7 | GBM rez. Zyste | 6.437 | 1.66x10-3 | GBM Zyste | 6.421 | 3.96x10-2 |
| GBM Zyste | 6.633 | 1.53x10-5 | | | | | | |
| GBM Zyste | 7.921 | 3.46x10-2 | | | | | | |
| GBM Zyste | 8.633 | 4.48x10-6 | | | | | | |
| GBM Zyste | 8.687 | 3.82x10-6 | GBM rez. Zyste | 8.687 | 1.33x10-3 | | | |
| GBM Zyste | 8.899 | 9.83x10-5 | GBM rez. Zyste | 8.911 | 6.95x10-3 | | | |
| GBM Zyste | 9.362 | 3.26x10-6 | | | | | | |
| GBM Zyste | 9.418 | 3.26x10-6 | GBM rez. Zyste | 9.418 | 1.66x10-3 | | | |
| GBM Zyste | 9.948 | 4.42x10-7 | | | | GBM Zyste | 9.944 | 1.10x10-2 |
| GBM Zyste | 10.829 | 5.56x10-3 | | | | | | |
| GBM Zyste | 12.559 | 2.77x10-6 | | | | GBM Zyste | 12.559 | 3.67x10-3 |
| | | | | | | GBM Zyste | 12.841 | 2.93x10-2 |
| GBM Zyste | 14.946 | 4.08x10-3 | | | | | | |
| GBM Zyste | 15.118 | 1.00x10-2 | | | | | | |
| GBM Zyste | 15.842 | 9.12x10-3 | | | | | | |
| GBM Zyste | 16.656 | 1.33x10-2 | | | | | | |
| GBM Zyste | 17.224 | 6.24x10-7 | GBM rez. Zyste | 17.221 | 4.70x10-3 | | | |
| GBM Zyste | 17.372 | 1.70x10-6 | GBM rez. Zyste | 17.348 | 5.73x10-3 | | | |
| Ferritin light chain | 19.889 | | | 19.889 | | | 19.889 | |
| GBM Zyste | 19.899 | 1.32x10-5 | | | | GBM Zyste | 19.899 | 1.54x10-2 |
| GBM Zyste | 21.615 | 2.07x10-2 | | | | | | |
| GBM Zyste | 27.904 | 3.35x10-3 | | | | | | |
| GBM Zyste | 28.056 | 1.61x10-5 | | | | | | |
| GBM Zyste | 28.256 | 7.27x10-6 | GBM rez. Zyste | 28.258 | 3.83x10-2 | | | |
| GBM Zyste | 28.918 | 2.98x10-5 | | | | | | |
| Basigin | 40.201 | | | 40.201 | | | 40.201 | |
| | | | | | | GBM rez. Zyste | 40.211 | 2.51x10-2 |
| GBM Zyste | 43.354 | 2.70x10-6 | | | | | | |
| GBM Zyste | 47.111 | 2.68x10-3 | | | | | | |
| GBM Zyste | 49.916 | 1.29x10-2 | | | | | | |
| GBM Zyste | 94.289 | 6.35x10-4 | | | | GBM Zyste | 94.381 | 1.82x10-2 |
| GBM Zyste | 122.567 | 6.41x10-3 | | | | | | |

Tabelle 11

Punktesystem des Internet-basierten Auswertungs-Algorithmus zur Herausfilterung der mit Hirntumorwachstum assoziierten Proteine

| | |
|--|---------|
| Protein im Gehirn nachgewiesen | 1 Punkt |
| Protein in Tumoren nachgewiesen | 1 Punkt |
| Protein in Hirntumoren nachgewiesen | 1 Punkt |
| Protein ist Zellwand-assoziiert oder wird sezerniert | 1 Punkt |

Tabelle 12

Auszug aus der Arbeitsliste potentieller Kandidaten, angegeben mit Molmassen von Bande und Kandidat (MW, in Kilodalton (kDa)), Name, isoelektrischem Punkt (pI), Chromosom, Vorkommen (G: Glioblastom, T: Tumor, H: Hirntumor, S: sezerniert) und Funktion

| Bande | Kandidat | Name | pI | Chromosom | Vorkommen | Funktion |
|----------|----------|---|------|---------------|------------|---------------------------------------|
| MW (kDa) | MW (kDa) | | | | | |
| 6424 | 6437 | Leucine zipper protein 6 (MDP6) | 9,68 | 7q33 | G, T, H | Anregung IgG Produktion |
| 6633 | 6651 | Amyloid beta A4 protein | 6,74 | 21q21.3 | G, T, H | Membranprotein, Synapsenbildung |
| 6633 | 6646 | Cholecystokinin | 9,98 | 3p22.1 | G, T, H | Peptidhormon, Neurotransmitter |
| 8687 | 8708 | Apolipoprotein A-II [Precursor] | 5,05 | 1q21-23 | G, T, H | HDL Metabolismus |
| 8899 | 8915 | Apolipoprotein C-II [Precursor] | 4,66 | 19p13.3 | G, T, H, S | VLDL Metabolismus |
| 8899 | 8922 | Plasminogen [Precursor] | 5,12 | 6q26 | G, T, H, S | Fibrinolyse |
| 8899 | 8875 | Proactivator polypeptide [Precursor] | 4,50 | 10q21-q22 | G, T, H, S | aktiviert lysosomale Hydrolasen |
| 9418 | 9425 | Parathyroid hormone [Precursor] | 9,09 | 11p15.3-p15.1 | G, T, H, S | Calciumhomöostase |
| 14946 | 14931 | 15 kDa selenoprotein [Precursor] | 4,83 | 1p31 | G, T, H, S | assoziiert mit Redox-Reaktionen |
| 14946 | 14944 | Galectin-7 | 7,00 | 19q13.2 | G, T, H, S | Zell-Zell Interaktionen |
| 14946 | 14963 | Interleukin-4 [Precursor] | 9,25 | 5q31.1 | G, T, H, S | B-Zell Aktivierung |
| 14946 | 14923 | Profilin-1 | 8,48 | 17p13.3 | G, T, H | Aktinbindung, Zytoskelettstruktur |
| 15118 | 15126 | Hemoglobin subunit alpha | 8,74 | 16p13.3 | G, T, H | O2 Transport |
| 15118 | 15124 | Interleukin-17A [Precursor] | 8,61 | 6p12 | G, T, H, S | induziert Zytokinsynthese |
| 15842 | 15836 | Heparin-binding growth factor 1 [Precursor] | 7,87 | 5q31 | G, T, H | Angiogenese |
| 17372 | 17376 | Prothrombin [Precursor] | 5,00 | 11p11 | G, T, H, S | Gerinnungsaktivierung |
| 17372 | 17353 | Tumor necrosis factor [Precursor] | 6,99 | 6p21.3 | G, T, H, S | Zytokin |
| 19899 | 19889 | Ferritin light chain | 5,51 | 19q13.3-q13.4 | G, T, H, S | Eisenhomöostase |
| 19899 | 19886 | T-cell receptor beta chain C region | 5,33 | 7q34 | G, T, H | Membranprotein |
| 21615 | 21594 | Guanylate kinase | 6,11 | 1q32-q41 | G, T, H | Purinnukleotidstoffwechsel |
| 28256 | 28246 | Phosducin | 5,08 | 1q25.2 | G, T, H | Fotorezeptor Metabolismus |
| 28256 | 28245 | Tetraspanin-11 | 7,53 | 12p11.21 | G, T, H | Membranprotein |
| 40211 | 40201 | Basigin | 5,33 | 19p13.3 | G, T, H | Membranprotein, Blutgruppenantigen |
| 40211 | 40218 | Zinc finger protein 124 | 9,10 | 1q44 | G, T, H | Transkriptionale Regulation |
| 43354 | 43349 | Haptoglobin [Precursor] | 6,12 | 16q22.1 | G, T, H, S | Transportprotein, akute Phase Protein |

Tabelle 13

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt im Liquor vorkommender Proteine im Vergleich Glioblastom vs. Liquor, Glioblastomrezidiv vs. Liquor und Metastase vs. Liquor, angegeben mit Signifikanzniveau

| Glioblastom vs. Liquor | | | Glioblastomrezidiv vs. Liquor | | | Metastase vs. Liquor | | |
|------------------------|----------|-----------------------|-------------------------------|----------|-----------------------|----------------------|----------|-----------------------|
| Signal in | MW (kDa) | p-value | Signal in | MW (kDa) | p-value | Signal in | MW (kDa) | p-value |
| Liquor | 3.892 | 4.31x10 ⁻⁴ | Liquor | 3.906 | 1.44x10 ⁻² | Liquor | 3.892 | 1.08x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 6.799 | 1.08x10 ⁻³ | Liquor | 6.804 | 6.95x10 ⁻³ | Liquor | 6.799 | 3.10x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 6.846 | 6.15x10 ⁻³ | Liquor | 6.847 | 1.01x10 ⁻² | Liquor | 6.846 | 1.08x10 ⁻³ |
| Liquor | 6.888 | 1.47x10 ⁻⁴ | Liquor | 6.886 | 1.66x10 ⁻³ | Liquor | 6.889 | 2.31x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 6.911 | 1.32x10 ⁻⁵ | Liquor | 6.914 | 1.07x10 ⁻³ | Liquor | 6.911 | 1.81x10 ⁻⁵ |
| Liquor | 6.936 | 3.82x10 ⁻⁶ | Liquor | 6.936 | 5.73x10 ⁻³ | Liquor | 6.938 | 9.28x10 ⁻⁵ |
| | | | | | | Liquor | 7.025 | 5.35x10 ⁻⁶ |
| | | | | | | Liquor | 7.239 | 1.47x10 ⁻⁶ |
| Liquor | 7.647 | 5.24x10 ⁻⁶ | | | | | | |
| Liquor | 11.571 | 2.48x10 ⁻⁴ | Liquor | 11.575 | 1.01x10 ⁻² | Liquor | 11.571 | 7.93x10 ⁻⁵ |
| Liquor | 11.679 | 2.36x10 ⁻⁶ | | | | Liquor | 11.704 | 2.58x10 ⁻⁶ |
| Liquor | 13.687 | 3.69x10 ⁻⁵ | Liquor | 13.686 | 2.06x10 ⁻³ | Liquor | 13.688 | 3.10x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 13.737 | 2.18x10 ⁻⁴ | Liquor | 13.741 | 4.54x10 ⁻² | Liquor | 13.741 | 2.31x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 13.775 | 5.65x10 ⁻⁵ | Liquor | 13.775 | 5.37x10 ⁻⁴ | Liquor | 13.773 | 3.58x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 13.821 | 1.78x10 ⁻⁵ | Liquor | 13.828 | 5.73x10 ⁻³ | Liquor | 13.824 | 1.53x10 ⁻⁵ |
| Liquor | 13.879 | 9.74x10 ⁻⁶ | | | | Liquor | 13.871 | 2.08x10 ⁻³ |
| Liquor | 14.006 | 6.75x10 ⁻⁴ | Liquor | 14.002 | 5.73x10 ⁻³ | Liquor | 13.987 | 3.00x10 ⁻⁵ |
| | | | | | | Liquor | 14.032 | 1.48x10 ⁻² |
| | | | Liquor | 20.914 | 4.50x10 ⁻² | Liquor | 20.962 | 2.79x10 ⁻² |
| Liquor | 22.884 | 8.37x10 ⁻⁵ | Liquor | 22.852 | 4.50x10 ⁻² | Liquor | 22.884 | 6.21x10 ⁻⁴ |
| Liquor | 26.687 | 1.06x10 ⁻² | | | | | | |
| Liquor | 34.268 | 3.79x10 ⁻⁴ | | | | Liquor | 34.252 | 1.29x10 ⁻² |
| Liquor | 40.051 | 1.17x10 ⁻⁵ | Liquor | 40.001 | 1.06x10 ⁻³ | Liquor | 40.101 | 2.13x10 ⁻⁵ |
| Liquor | 67.937 | 4.18x10 ⁻³ | | | | Liquor | 67.943 | 4.43x10 ⁻³ |
| Liquor | 73.115 | 9.66x10 ⁻⁵ | Liquor | 73.273 | 1.34x10 ⁻³ | Liquor | 73.299 | 4.43x10 ⁻³ |
| Liquor | 80.046 | 1.88x10 ⁻⁵ | Liquor | 80.179 | 1.06x10 ⁻³ | Liquor | 80.186 | 2.13x10 ⁻⁵ |
| Liquor | 146.376 | 2.68x10 ⁻³ | | | | | | |

Tabelle 14

Vergleich der Molmassen (MW, in Kilodalton (kDa)) signifikant vermehrt vorkommender Proteine im Vergleich Metastase vs. Liquor, Glioblastom vs. Liquor und Glioblastom vs. Metastase, angegeben mit Signifikanzniveau

| Metastase vs. Liquor | | | Glioblastom vs. Liquor | | | Glioblastom vs. Metastase | | |
|----------------------|----------|-----------------------|------------------------|----------|-----------------------|---------------------------|----------|-----------------------|
| Signal in | MW (kDa) | p-value | Signal in | MW (kDa) | p-value | Signal in | MW (kDa) | P-value |
| MTS | 5.099 | 9.52x10 ⁻⁴ | | | | GBM | 6.633 | 3.30x10 ⁻³ |
| MTS | 6.436 | 4.90x10 ⁻³ | GBM | 6.424 | 4.42x10 ⁻⁷ | | | |
| | | | GBM | 6.633 | 1.53x10 ⁻⁵ | | | |
| | | | | | | GBM | 6.876 | 3.19x10 ⁻² |
| | | | | | | MTS | 7.549 | 3.75x10 ⁻² |
| | | | | | | MTS | 7.647 | 7.61x10 ⁻⁴ |
| MTS | 7.943 | 3.95x10 ⁻² | GBM | 7.921 | 3.46x10 ⁻² | | | |
| | | | GBM | 8.633 | 4.48x10 ⁻⁶ | GBM | 8.633 | 3.30x10 ⁻³ |
| | | | GBM | 8.687 | 3.82x10 ⁻⁶ | GBM | 8.687 | 4.40x10 ⁻² |
| | | | GBM | 8.899 | 9.83x10 ⁻⁵ | GBM | 8.899 | 1.28x10 ⁻⁴ |
| | | | GBM | 9.362 | 3.26x10 ⁻⁶ | GBM | 9.362 | 3.46x10 ⁻² |
| MTS | 9.423 | 9.11x10 ⁻⁶ | GBM | 9.418 | 3.26x10 ⁻⁶ | | | |
| MTS | 9.937 | 1.08x10 ⁻⁵ | GBM | 9.948 | 4.42x10 ⁻⁷ | | | |
| | | | GBM | 10.829 | 5.56x10 ⁻³ | | | |
| MTS | 11.278 | 4.14x10 ⁻⁴ | | | | | | |
| MTS | 12.535 | 2.54x10 ⁻⁵ | GBM | 12.559 | 2.77x10 ⁻⁶ | | | |
| | | | | | | GBM | 13.973 | 3.30x10 ⁻³ |
| | | | | | | GBM | 14.034 | 1.74x10 ⁻² |
| | | | | | | GBM | 14.103 | 1.68x10 ⁻⁴ |
| | | | | | | GBM | 14.181 | 5.02x10 ⁻³ |
| | | | GBM | 14.946 | 4.08x10 ⁻³ | | | |
| MTS | 15.116 | 4.90x10 ⁻³ | GBM | 15.118 | 1.00x10 ⁻² | | | |
| MTS | 15.311 | 9.68x10 ⁻³ | | | | MTS | 15.315 | 1.91x10 ⁻² |
| MTS | 15.866 | 9.52x10 ⁻⁴ | GBM | 15.842 | 9.12x10 ⁻³ | | | |
| MTS | 15.982 | 6.18x10 ⁻³ | | | | MTS | 15.978 | 4.40x10 ⁻² |
| MTS | 16.471 | 3.28x10 ⁻² | | | | | | |
| MTS | 16.621 | 1.71x10 ⁻⁴ | GBM | 16.656 | 1.33x10 ⁻² | MTS | 16.645 | 1.21x10 ⁻³ |
| MTS | 17.226 | 5.51x10 ⁻³ | GBM | 17.224 | 6.24x10 ⁻⁷ | GBM | 17.227 | 3.67x10 ⁻³ |
| MTS | 17.353 | 1.82x10 ⁻² | GBM | 17.372 | 1.70x10 ⁻⁶ | GBM | 17.375 | 1.45x10 ⁻² |
| MTS | 18.603 | 1.83x10 ⁻³ | | | | | | |
| MTS | 19.892 | 1.26x10 ⁻⁴ | GBM | 19.899 | 1.32x10 ⁻⁵ | | | |
| | | | GBM | 21.615 | 2.07x10 ⁻² | | | |
| | | | GBM | 27.904 | 3.35x10 ⁻³ | | | |
| MTS | 28.081 | 4.75x10 ⁻² | GBM | 28.056 | 1.61x10 ⁻⁵ | GBM | 28.047 | 1.29x10 ⁻² |
| MTS | 28.273 | 2.79x10 ⁻² | GBM | 28.256 | 7.27x10 ⁻⁶ | GBM | 28.256 | 1.57x10 ⁻² |
| | | | GBM | 28.918 | 2.98x10 ⁻⁵ | GBM | 28.918 | 7.11x10 ⁻³ |
| MTS | 39.402 | 4.00x10 ⁻² | | | | | | |
| | | | | | | MTS | 40.206 | 1.06x10 ⁻² |
| | | | GBM | 43.354 | 2.70x10 ⁻⁶ | | | |
| MTS | 44.311 | 3.15x10 ⁻⁴ | | | | MTS | 44.435 | 2.39x10 ⁻³ |
| | | | GBM | 47.111 | 2.68x10 ⁻³ | | | |
| MTS | 49.959 | 4.00x10 ⁻² | GBM | 49.916 | 1.29x10 ⁻² | | | |
| MTS | 55.978 | 2.74x10 ⁻⁴ | | | | GBM | 55.977 | 1.17x10 ⁻² |
| | | | | | | MTS | 58.424 | 4.17x10 ⁻² |
| | | | GBM | 94.289 | 6.35x10 ⁻⁴ | GBM | 94.354 | 2.13x10 ⁻³ |
| MTS | 110.523 | 1.34x10 ⁻³ | | | | MTS | 110.535 | 3.75x10 ⁻³ |
| | | | GBM | 122.567 | 6.41x10 ⁻³ | | | |
| | | | | | | GBM | 160.731 | 5.19x10 ⁻³ |

Tabelle 15

Immunhistochemisch ausgewertete Proteine mit Bandengröße, Kandidatengröße und der Abweichung des Kandidaten von der jeweiligen Bande in %

| Nr. | Bande | Kandidat | Protein | Abweichung Kandidat von Bande in % |
|------------|--------------|-----------------|-----------------------------|---|
| 1 | 40211 | 40201 | <i>Basigin</i> | 0,025 |
| 2 | 19899 | 19889 | <i>Ferritin light chain</i> | 0,050 |
| 3 | 6424 | 6120 | <i>Metallothionein-4</i> | 4.96 |

Tabelle 16

Anteil der 165 Zysten mit Färbequotienten über 1, gefärbt mit Basigin, Ferritin light chain und Metallothionin, angegeben mit Anzahl, %, Standardabweichung (SD) und Mittelwert (Mean)

| | Anzahl Zysten Färbequotient grösser 1 | % | SD | Mean |
|-----------------------|---------------------------------------|-------|------|------|
| Basigin: | 139 | 84.24 | 0.54 | 1.47 |
| Ferritin light chain: | 107 | 64.85 | 0.49 | 1.29 |
| Metallothionin: | 77 | 46.67 | 0.43 | 1.09 |

Tabelle 17

Einteilung der Glioblastom-Patienten anhand ihrer Überlebenszeit nach Erstoperation. Angegeben mit Patientenanzahl absolut und in Prozent, sowie Mittelwert des Färbequotienten der Zystenwandfärbung für alle 3 Antikörper

| Überlebenszeit | Anzahl Patienten | Anzahl in % | Zystenwand Färbung | Zystenwand Färbung | Zystenwand Färbung |
|------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | Mittelwert | Mittelwert | Mittelwert |
| | | | Basigin | Ferritin | Metallothionin |
| 1-6 Monate: | 6 | 28,6 | 1,388 | 1,360 | 1,267 |
| 7-12 Monate: | 1 | 4,8 | 1,420 | 1,200 | 0,910 |
| 13-18 Monate: | 3 | 14,3 | 1,466 | 1,127 | 0,962 |
| 18-24 Monate: | 5 | 23,8 | 1,425 | 1,418 | 1,143 |
| 25-30 Monate: | 2 | 9,5 | 1,395 | 1,675 | 1,08 |
| > 30 Monate: | 4 | 19 | 1,528 | 1,271 | 1,091 |
| ingesamt: | 21 | 100 | 1,477 | 1,299 | 1,092 |

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1

Chromatogramm der SELDI-TOF Ergebnisse von 4 Tumorzystenflüssigkeiten (14-17) und einer Liquorkontrolle (L6). Die Molmassen können direkt abgelesen und verglichen werden. In Probe 14 sind der Albuminpeak und der Peak des zweifach geladenen Albumins angezeichnet

Abbildung 2: Vergleich der Positiv- (A,C,E) und Negativkontrollen (B,D,F) von Basigin (A,B (humanes Adenokarzinom der Lunge)), Ferritin (C,D (humane Leber)) und Metallothionin (E,F (humanes Astrozytom))

Abbildung 3

Vergleich von HE- (A) und Retikulinfärbung (B) zur Differenzierung von Zysten und Blutgefäßen. Gefäßwandstrukturen zeigen eine schwarze Färbung (B)

Abbildung 4

HE-Färbung einer Zystenwand in 20-facher Vergrößerung

Abbildung 5

Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des Färbequotienten (gebildet aus der Färbeintensität der Zystenwand und dem Mittelwert der Intensität der Tumorfärbung) von Basigin, Ferritin und Metallothionin in 165 untersuchten Zystenwänden

Abbildung 6

Wichtung der Färbeintensitäten von Basigin, Ferritin und Metallothionin in den 165 analysierten Zysten: Unterscheidung zwischen verstärkter Färbung der Zystenwand (blau), ausgeglichener Färbung (rot) und verstärkter Färbung des Tumorgewebes (grün) mit dem jeweiligen Antikörper.

Abbildung 7

Vergleich der immunhistochemischen Färbung einer Zystenwand mit Basigin (A), Ferritin (B) und Metallothionin (C) in 20-facher Vergrößerung

Abbildung 8

Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand

A: Färbung mit Antikörper gegen Basigin in 20-facher Vergrößerung

B: Färbung mit Antikörper gegen Basigin in 40-facher Vergrößerung

C: HE-Färbung in 20-facher Vergrößerung

D: Retikulinfärbung in 20-facher Vergrößerung

Abbildung 9

Immunhistochemische Färbung von Gefäßen mit Basigin in gesundem Hirngewebe (A) und Tumorgewebe (B), in 40-facher Vergrößerung

Abbildung 10

Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand

A: Färbung mit Antikörper gegen Ferritin in 20-facher Vergrößerung

B: Färbung mit Antikörper gegen Ferritin in 40-facher Vergrößerung

C: HE-Färbung in 20-facher Vergrößerung

D: Retikulinfärbung in 20-facher Vergrößerung

Abbildung 11

Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand

- A: Färbung mit Antikörper gegen Metallothionin in 20-facher Vergrößerung
- B: Färbung mit Antikörper gegen Metallothionin in 40-facher Vergrößerung
- C: HE in 20-facher Vergrößerung
- D: Retikulin in 20-facher Vergrößerung

8.4 Abbildungen

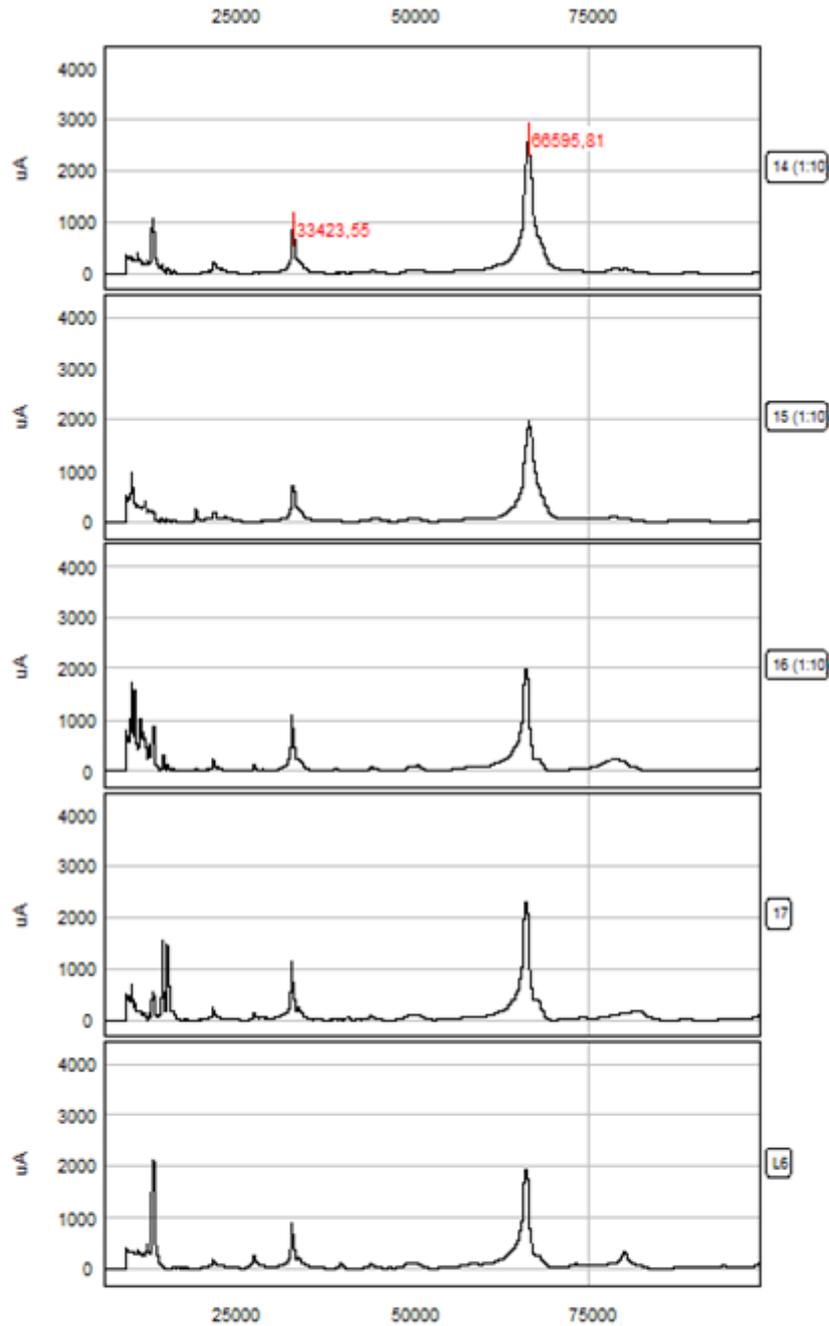


Abbildung 1: Chromatogramm der SELDI-TOF Ergebnisse von 4 Tumorzystenflüssigkeiten (14-17) und einer Liquorkontrolle (L6). Die Molmassen können direkt abgelesen und verglichen werden. In Probe 14 sind der Albuminpeak und der Peak des zweifach geladenen Albumins angezeichnet

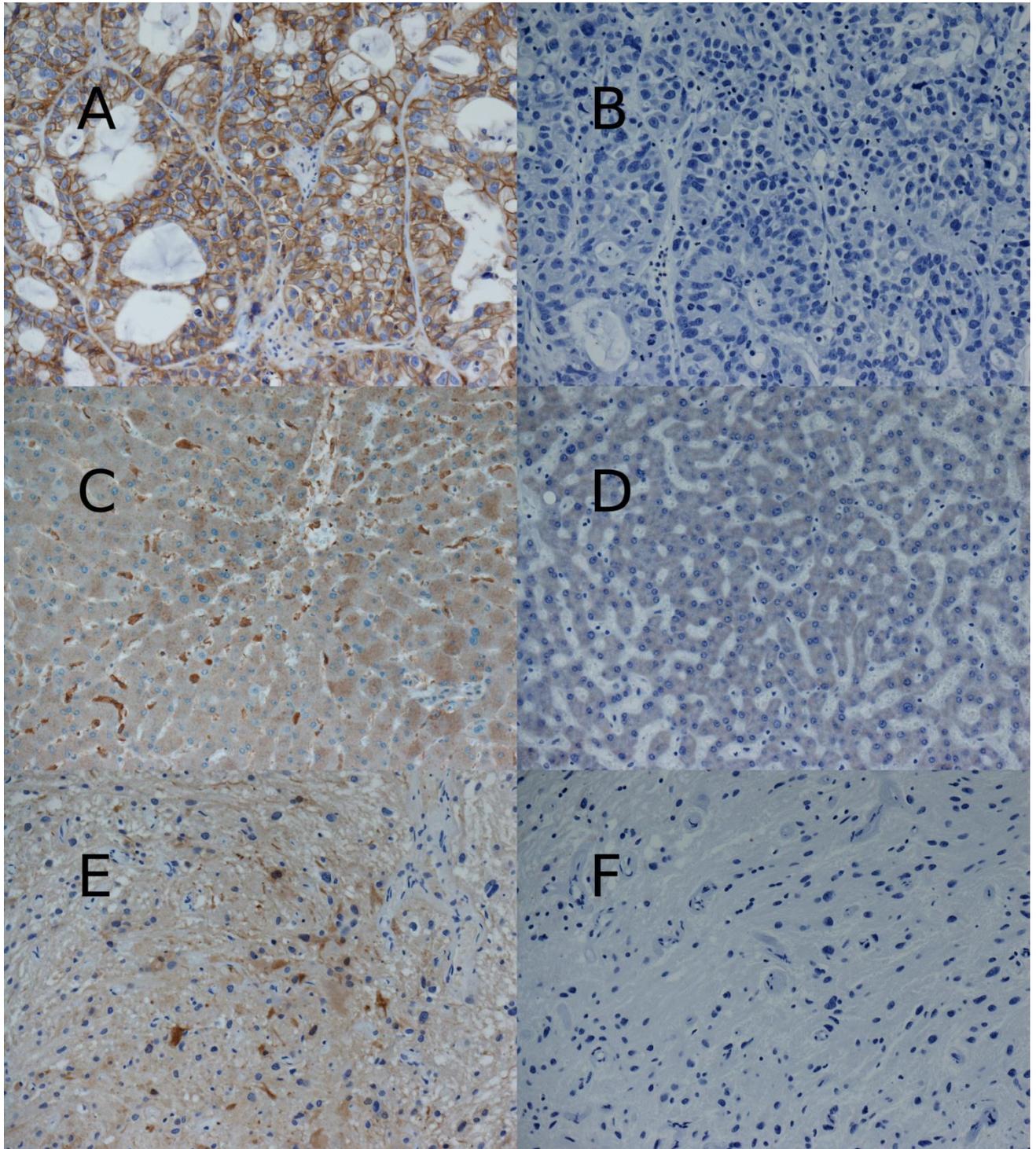


Abbildung 2: Vergleich der Positiv- (A,C,E) und Negativkontrollen (B,D,F) von Basigin (A,B (humanes Adenokarzinom der Lunge)), Ferritin (C,D (humane Leber)) und Metallothionin (E,F (humanes Astrozytom))

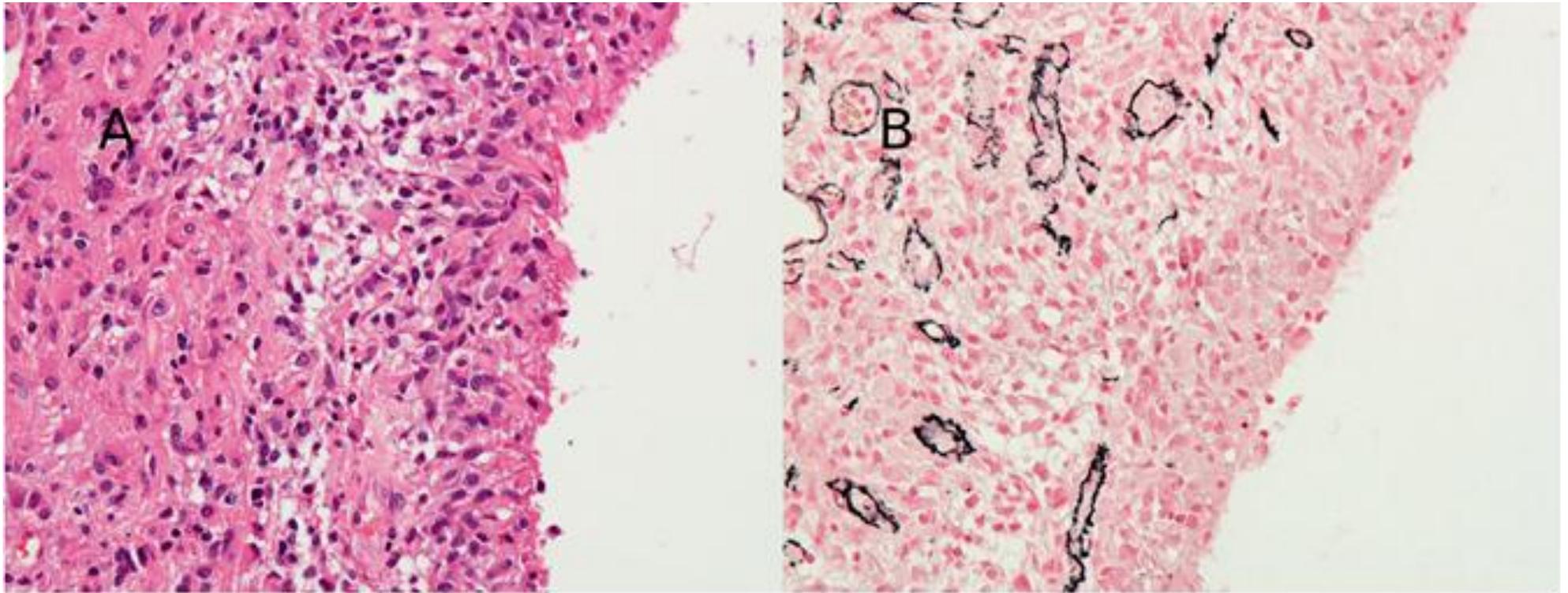


Abbildung 3: Vergleich von HE- (A) und Retikulinfärbung (B) zur Differenzierung von Zysten und Blutgefäßen. Gefäßwandstrukturen zeigen eine schwarze Färbung (B)

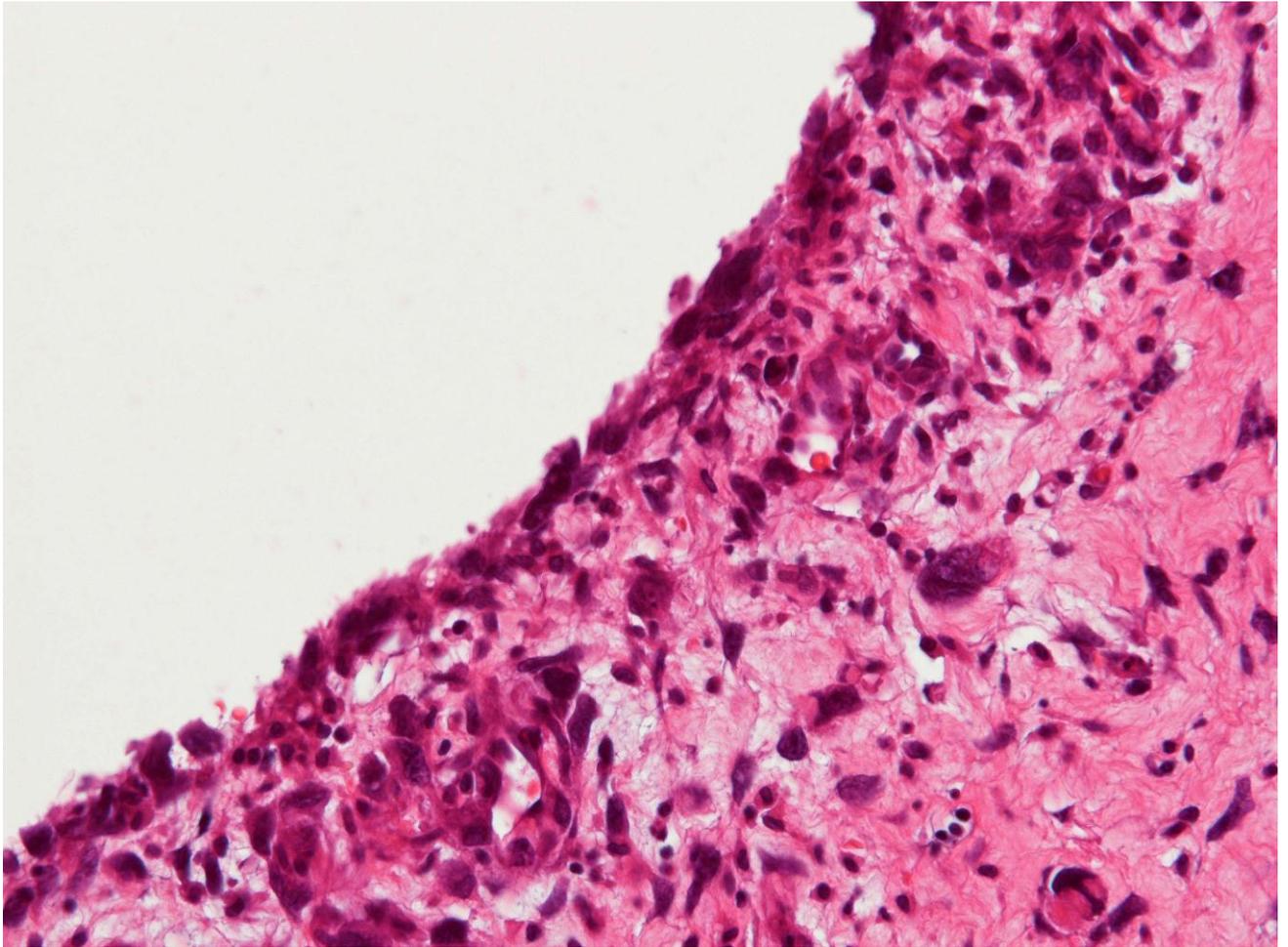


Abbildung 4: HE-Färbung einer Zystenwand in 20-facher Vergrößerung

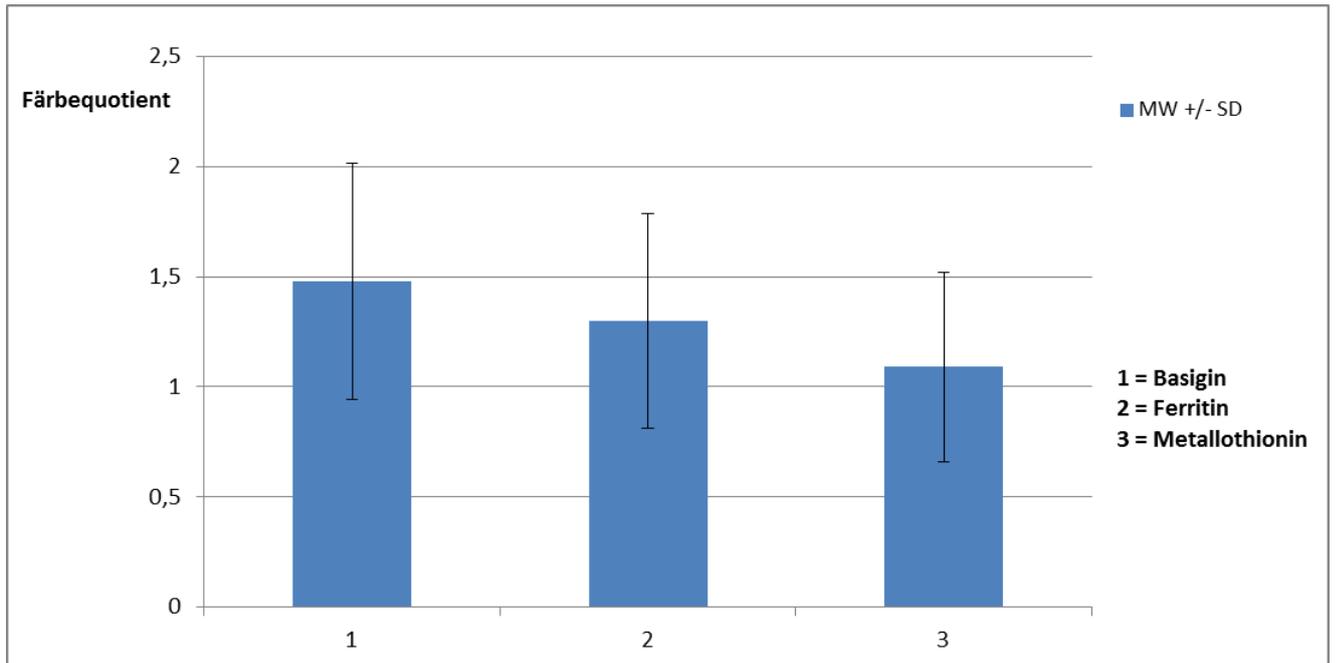


Abbildung 5: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des Färbequotienten (gebildet aus der Färbintensität der Zystenwand und dem Mittelwert der Intensität der Tumorfärbung) von Basigin, Ferritin und Metallothionin in 165 untersuchten Zystenwänden

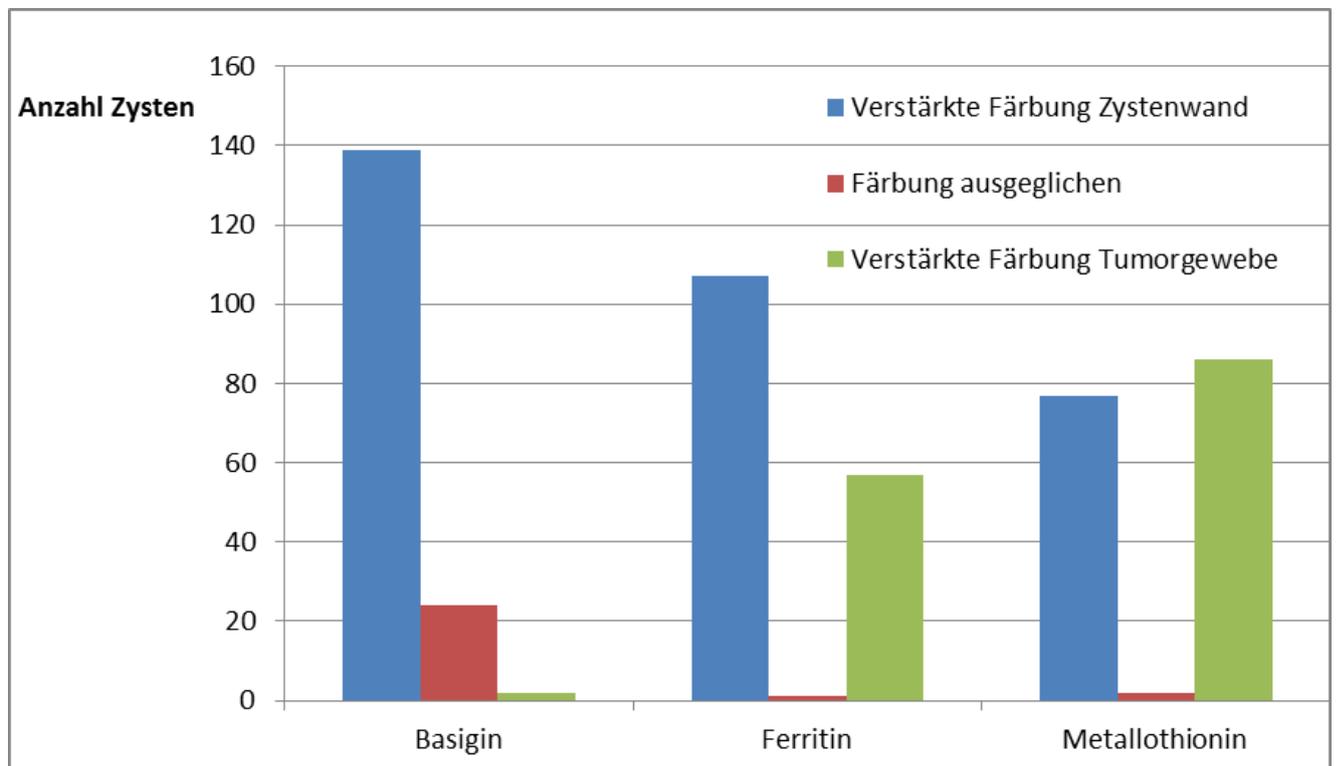


Abbildung 6: Wichtung der Färbeintensitäten von Basigin, Ferritin und Metallothionin in den 165 analysierten Zysten: Unterscheidung zwischen verstärkter Färbung der Zystenwand (blau), ausgeglichener Färbung (rot) und verstärkter Färbung des Tumorgewebes (grün) mit dem jeweiligen Antikörper

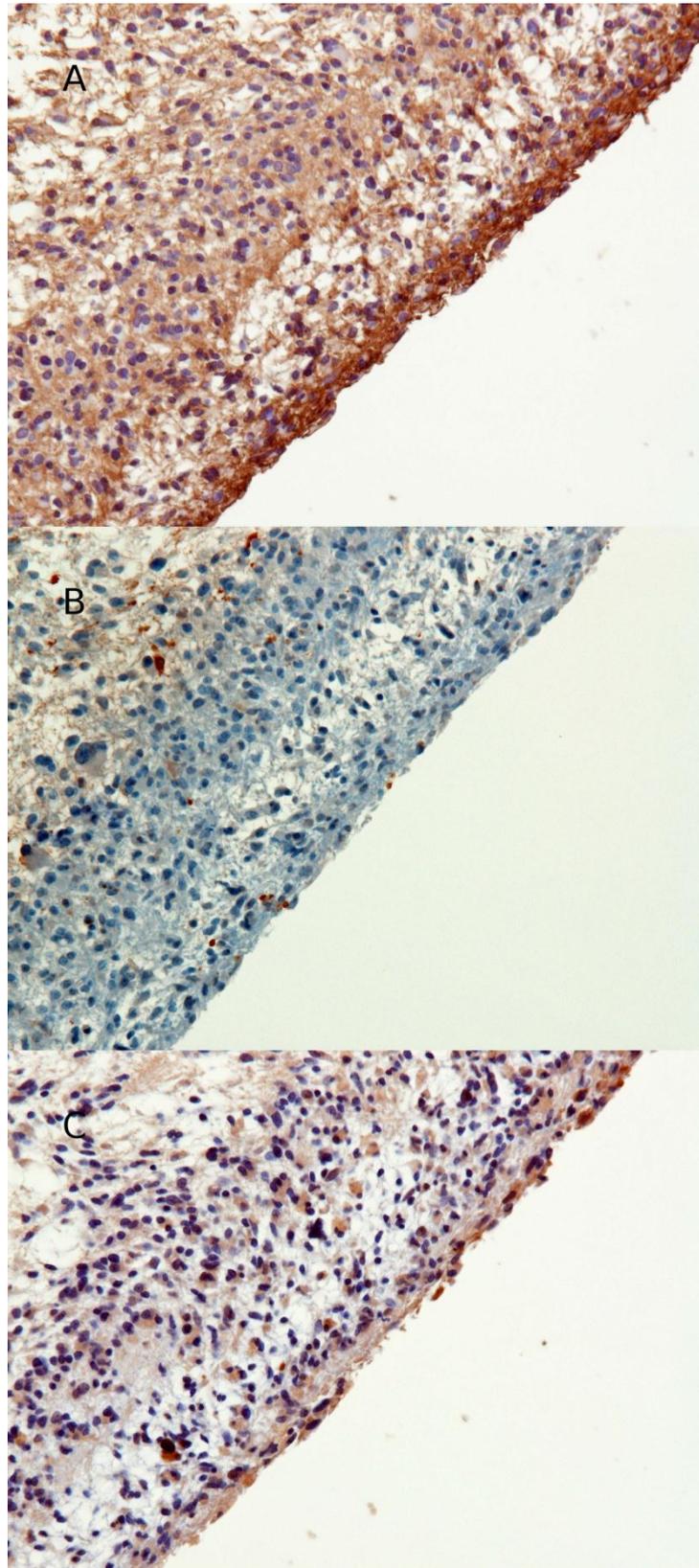


Abbildung 7: Vergleich der immunhistochemischen Färbung einer Zystenwand mit Basigin (A), Ferritin (B) und Metallothionin (C) in 20-facher Vergrößerung

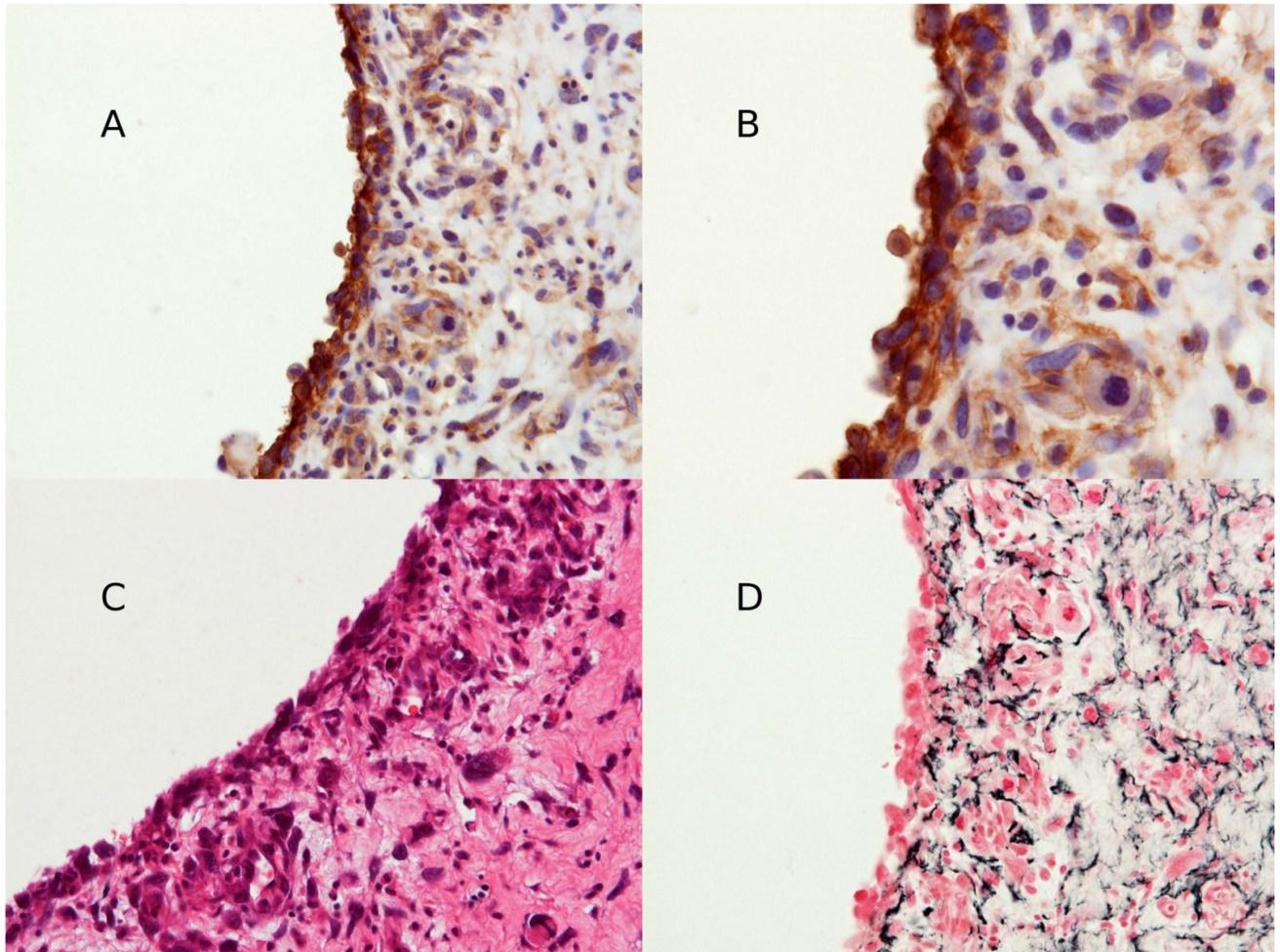


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand
 A: Färbung mit Antikörper gegen Basigin in 20-facher Vergrößerung
 B: Färbung mit Antikörper gegen Basigin in 40-facher Vergrößerung
 C: HE-Färbung in 20-facher Vergrößerung
 D: Retikulinfärbung in 20-facher Vergrößerung

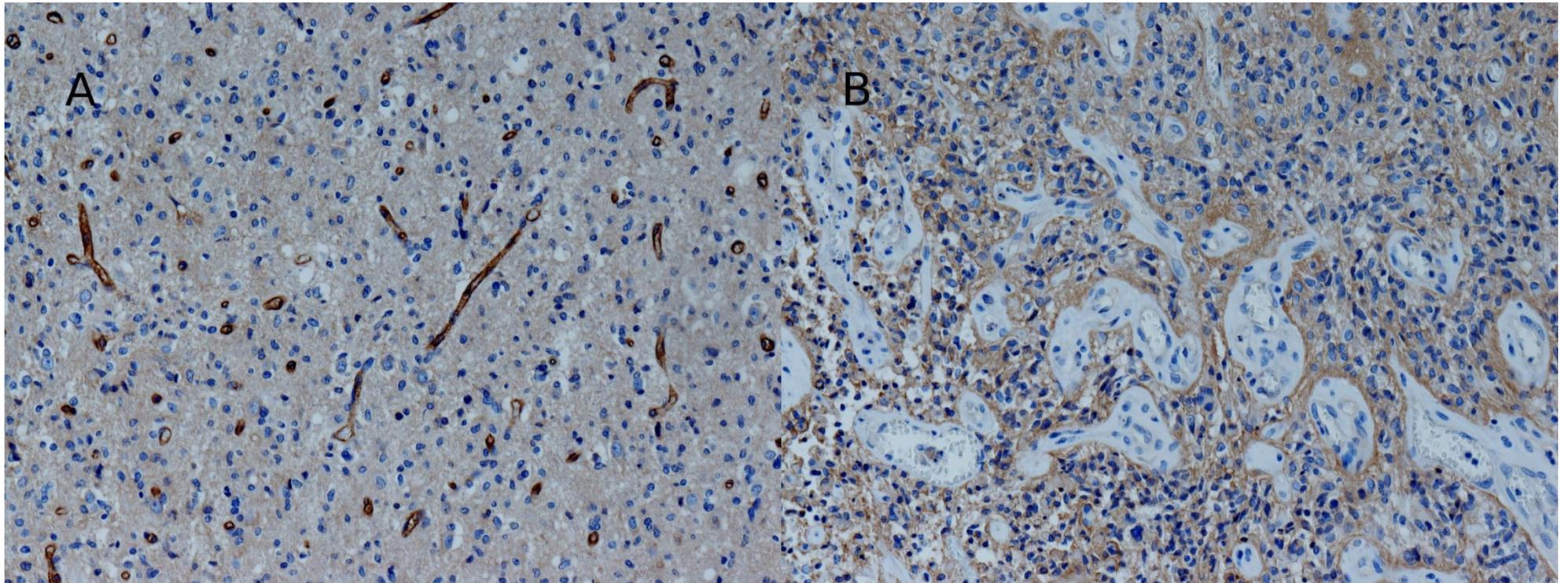


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von Gefäßen mit Basigin in gesundem Hirngewebe (A) und Tumorgewebe (B), in 40-facher Vergrößerung

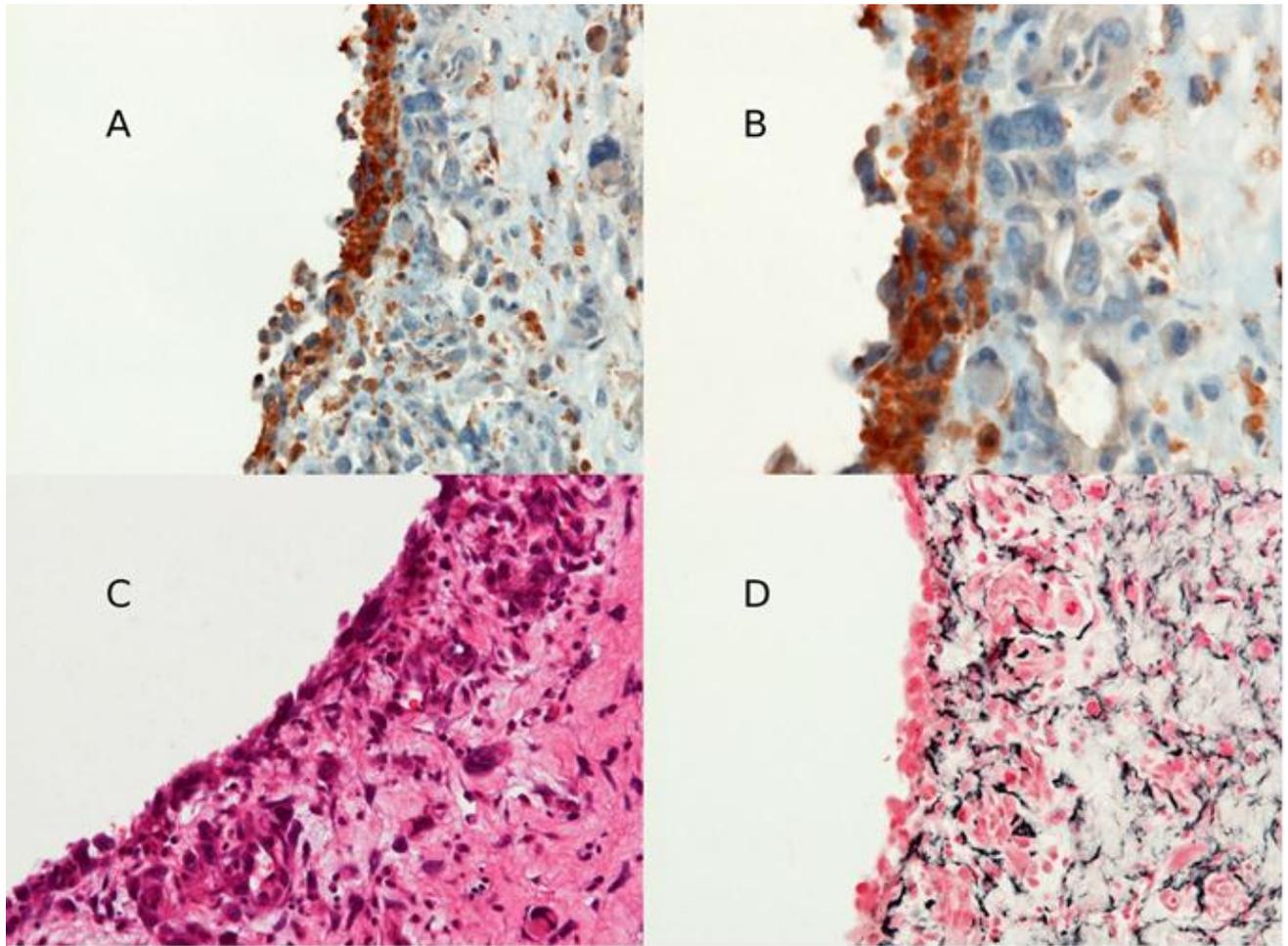


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand
 A: Färbung mit Antikörper gegen Ferritin in 20-facher Vergrößerung
 B: Färbung mit Antikörper gegen Ferritin in 40-facher Vergrößerung
 C: HE-Färbung in 20-facher Vergrößerung
 D: Retikulinfärbung in 20-facher Vergrößerung

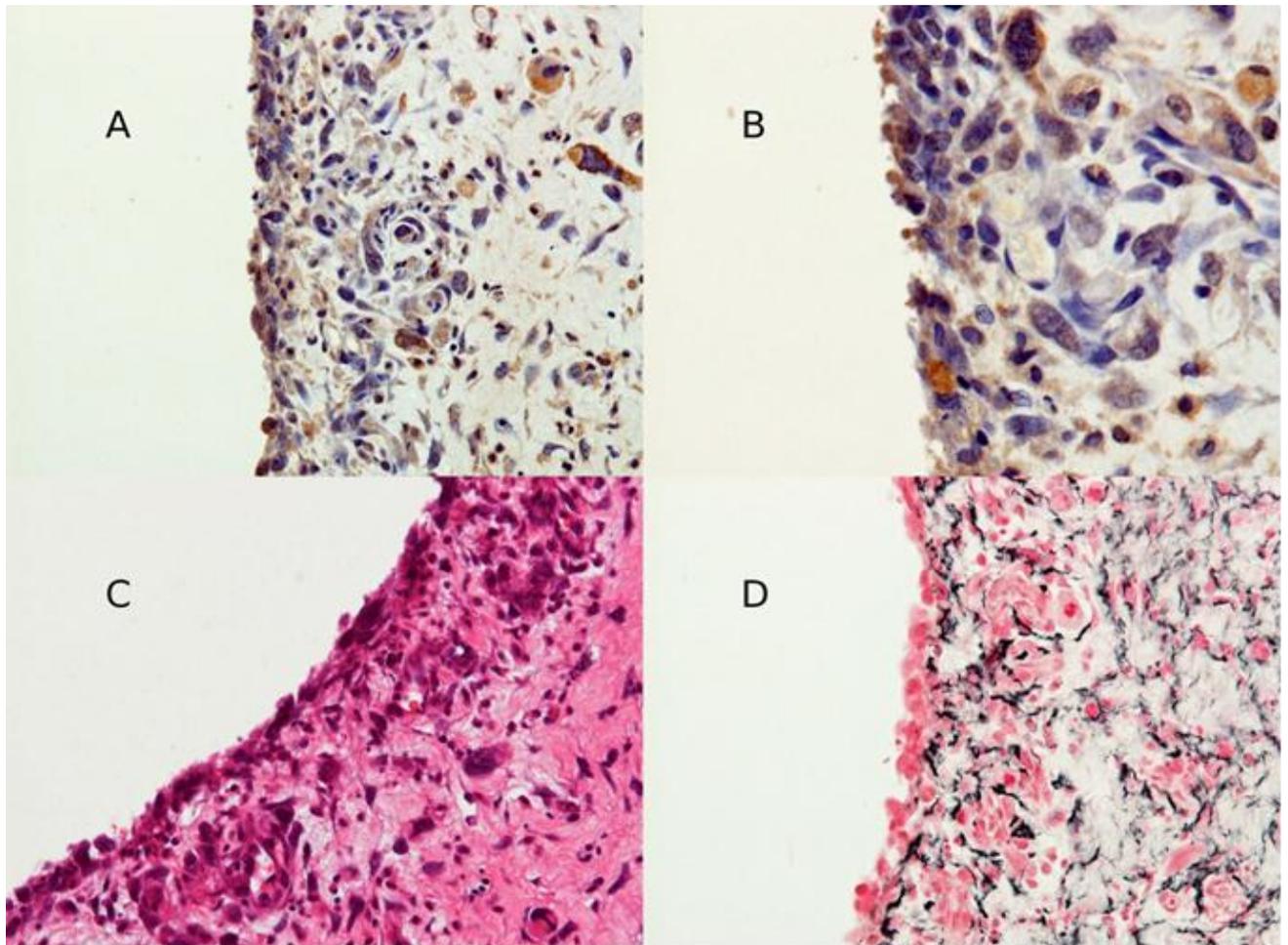


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung einer Zystenwand

- A: Färbung mit Antikörper gegen Metallothionin in 20-facher Vergrößerung
- B: Färbung mit Antikörper gegen Metallothionin in 40-facher Vergrößerung
- C: HE in 20-facher Vergrößerung
- D: Retikulin in 20-facher Vergrößerung

8.5 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.

Teile der vorgelegten Arbeit wurden in folgendem Artikel einer "peer-reviewten" Zeitschrift veröffentlicht:

Hoelscher M, Richter N, Melle C, Eggeling FV, Schaenzer A, Nestler U

SELDI-TOF analysis of glioblastoma cyst fluid is an approach for assessing cellular protein expression

Neurol Res. 35(10):993-1001, 2013

8.6 Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2007 bis 2010 in der Klinik für Neurochirurgie, sowie der Klinik für Neuropathologie der Universität Giessen.

Mein Dank gilt dem ehemaligen Direktor der neurochirurgischen Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Böker, für das Anvertrauen dieses äusserst interessanten Themas. Dem Direktor des neuropathologischen Institutes, Herrn Prof. Dr. med. Acker, danke ich für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung der für diese Arbeit notwendigen Mittel und Räumlichkeiten.

Herrn Privatdozent Dr. med. Ulf Nestler gilt für die ausführliche wissenschaftliche Betreuung des Gesamtprojekts, die kritische Korrektur des Manuskriptes und nicht zuletzt die persönliche Betreuung mein ganz besonderer Dank.

Bei Frau Dr. med. Anne Schänzer und dem gesamten Team der Neuropathologie in Giessen möchte ich mich für die fachliche Anleitung und Einarbeitung in neuropathologische und mikroskopische Arbeitstechniken sowie für aussergewöhnliche Freundlichkeit, Flexibilität und Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die stets tatkräftige Motivation und Unterstützung danke ich meiner Familie und meinen Freunden ganz herzlich. Ohne euch wäre die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.