

**Die Rolle der Epithelial-mesenchymalen Transition in der Progression des
primären Glioblastoms**

- Eine Expressionsanalyse der Gene ZEB1, CDK1, CDH1 und CDH2 -

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

Vorgelegt von Frederike Sarah Hagedorn
aus Homburg/Saar

Gießen, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie aus der
Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. med. M. Kolodziej
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. A. Menke

Tag der Disputation: 02.11.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)- Definition	1
1.2 Lokalisation und Symptome	1
1.3 Histologische Kriterien des Glioblastoms	2
1.4 Klassifikation des Glioblastoms nach der World Health Organisation (WHO)	3
O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) -Methylierungsstatus.....	4
Isocitratdehydrogenase (IDH)	4
1.5 Klinische Diagnostik	5
Computertomographie (CT)	5
Magnetresonanztomographie (MRT)	5
Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	6
1.7 Therapie	6
Chirurgische Resektion	6
Chemotherapie	8
Strahlentherapie	9
Neue Therapiekonzepte	10
1.8 Prognose	10
1.9 Behandlung des Tumorrezidives	11
1.10 Epitheliale-mesenchymale Transition	12
Definition und Unterteilung	12
Die Rolle der Cadherine in der Epithelial-mesenchymalen-Transition	16
Die Rolle der Zyklin-abhängigen-Kinasen (CDK) in der EMT	17
Die Rolle des Zink-finger E-box binding homeobox 1 Gens in der EMT	18
Die Epithelial-mesenchymale Transition im GBM	19
1.11 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Patientenkollektiv	22
2.2 Kontrollkollektiv	22
2.3 Definition der Realtime-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	23
2.3.1 Isolierung der Ribonukleinsäure.....	25
2.3.2 Nanodrop zur Ermittlung der Konzentration und der Reinheit der RNA.....	25
2.3.3 Umschreiben der RNA in cDNA	26
2.3.4 Durchführung der quantitativen RT-PCR	27
2.3.5 Ermittelte Werte der quantitativen RT-PCR	28
2.3.6 Auswertung mit Hilfe der Δ CT-Methode und Bestimmung der Expressionswerte	29
2.3.7 Materialien der RT-PCR und ihrer Vorbereitungsschritte (siehe Anhang) ...	30
2.4 Immunhistochemie, Definition	31
2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte (Protokoll siehe Anhang).....	32
2.4.2 Entparaffinierung der Schnitte (Protokoll siehe Anhang)	32
2.4.3 Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitte (Protokoll siehe Anhang)	32
2.4.4 Hitzeinduzierte Demaskierung des Antigens.....	32
2.4.5 Einwirken des Primärantikörpers.....	33

Verwendete Antikörper	34
2.4.6 Einwirken des Sekundärantikörpers	35
2.4.7 Antigen-Antikörper-Reaktion	35
2.4.8 Visualisierung des Antikörpers	36
2.4.9 Kernfärbung (Protokoll siehe Anhang)	36
2.4.10 Entwässern und Eindecken (Protokoll siehe Anhang)	36
2.4.11 Fehlerkontrolle	36
2.4.12 Semiquantitative Auswertung der Proteinexpression an immunhistochemischen Schnitten	36
2.4.13 Verbrauchsmaterialien Immunhistochemie (siehe Anhang)	37
2.4.14 Rezepte und Ansätze (siehe Anhang)	37
2.5 Farbintensitätsschemata der Proteinexpression	38
2.5.1 ZEB1 (AREB6)	38
2.5.2 E-Cadherin (CDH1)	39
2.5.3 N-Cadherin (CDH2)	40
2.5.4 CDK1	41
3. Statistische Methode	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Genexpression der untersuchten Gene im GBM im Vergleich zum Normalhirngewebe	44
4.2 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben und deren Korrelation zur Genexpression	48
4.3 Korrelation nach Pearson: Vergleich der einzelnen Gene und ihrer Genprodukte untereinander	52
5. Diskussion	54
5.1 Methodenkritik	64
6. Ausblick	65
7. Zusammenfassung	67
8. Summary	68
9. Abkürzungsverzeichnis	70
10. Abbildungsverzeichnis	73
11. Tabellenverzeichnis	74
12. Anhang	75
Protokolle RT-PCR	85
RNA-Isolation	85
Rezepte und Ansätze der Immunhistochemie	87
Herstellung der Paraffinschnitte	88
Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte	90
Kernfärbung	90
Entwässern und Eindecken	91
Rohdaten der qPCR	92
Normalhirngewebe CT Werte	92
Glioblastomgewebe CT-Werte	92
Rohdaten der Immunhistochemie	96
IHC-Score im Normalhirngewebe	96
IHC-Score im Glioblastomgewebe	97
Restliche Kaplan-Meyer-Kurven der verschiedenen Gene in Bezug auf Progress und Gesamtüberleben stratifiziert nach MGMT-Methylierungsstatus	101
Korrelationsmatrix nach Pearson	103
13. Literaturverzeichnis	104

14. Publikationsverzeichnis	119
15. Erklärung zur Dissertation	120
16. Danksagung.....	121
17. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)- Definition

Das Glioblastom zählt zu den astrozytären Hirntumoren und ist der häufigste maligne hirneigene Tumor im Erwachsenenalter [1]. Die Inzidenz des GBM beträgt 3,19/100.000 [2], [3]. Die Auftretenswahrscheinlichkeit des Glioblastoms steigt mit dem Alter, mit einem Altersgipfel um das 64. Lebensjahr [2], [3]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,6:1) [4]. Von den astrozytären Tumoren sind 51% Glioblastome und das Glioblastom macht 15 % der primären ZNS Tumore aus [5]. Risikofaktoren, die das Auftreten von Glioblastomen begünstigen, sind weitestgehend unbekannt, lediglich ionisierende Strahlung und eine vorliegende Immunsuppression scheinen signifikant die Inzidenz zu erhöhen [6], [5].

Eine relative Häufung von Glioblastomen ist im Rahmen einiger Syndrome wie dem Turcot-Syndrom, dem Li-Fraumeni-Syndrom oder der Neurofibromatose Typ 1 zu beobachten [7], [4]. Der Anteil dieser familiär gehäuft auftretenden Tumore an allen auftretenden Glioblastomen beträgt ca. 5% [8].

Kennzeichnend für das GBM ist sein schnelles und invasives Wachstum. Eine Metastasierung außerhalb des ZNS kommt selten vor [5], [9]. Die mediane Überlebenszeit der Patienten beträgt zwischen 12-15 Monaten, das mediane progressionsfreie Überleben 6,8 Monate [10], [11], [12]. Bis heute besteht keine Möglichkeit der Heilung [4], [12].

1.2 Lokalisation und Symptome

Die Glioblastome sind gehäuft supratentoriell im fronto-temporalen Bereich der Hemisphären lokalisiert [4], [9]. Prinzipiell können sie im gesamten Hirnareal inklusive dem Kleinhirn, dem Hirnstamm und dem Rückenmark auftreten, wobei Glioblastome im Bereich des Rückenmarks eine Rarität darstellen [13], [14]. Die genauen Tumorgrenzen lassen sich meistens nicht definieren, was die therapeutischen Möglichkeiten einschränkt [15]. Abhängig von der Lokalisation und der Wachstumsdynamik des Tumors stellen sich die Patienten mit heterogenen Krankheitssymptomen vor [16]. Durch das Tumorwachstum werden angrenzende Hirnstrukturen verdrängt. Es kann zur Entwicklung eines Hirnödems kommen [17]. Klinisch klagten die Patienten über Kopfschmerzen, Erbrechen und Übelkeit, Bewusstseinsbeeinträchtigung, Wesensveränderungen, Krampfanfälle, neurologische

Defizite jeder Art wie Hirnnervendefizite, Hemiparesen, Ataxie oder visuelle Einschränkungen [16].

1.3 Histologische Kriterien des Glioblastoms

Das Glioblastom weist makroskopisch eine ausgeprägte Heterogenität auf [18]. Die sichtbare graue Tumormasse bildet die Peripherie und ist häufig mit rötlich-braunen Hämorrhagien durchsetzt, als Korrelat der Gefäßthrombosen [15]. Sie säumt in den meisten Fällen eine innenliegende gelbliche Nekrose. Dies hat dem Tumor den Beinamen „bunte Schnittfläche“ verliehen. Die Nekrose entspricht den untergegangenen Myelinzellen und kann bis zu 80% der Tumormasse ausmachen [15].

Mikroskopisch handelt es sich beim Glioblastom um einen pleomorphen, gering differenzierten, astrozytären Tumor mit variablem („multiformen“) Erscheinungsbild [15]. Zu den Kriterien, um histologisch ein Glioblastom nach dem WHO-Grad IV zu diagnostizieren, zählen glial-differenzierte Tumorzellen, eine erhöhte Zellproliferationsrate mit Kern- und Zellatypie, sowie strichförmige Nekrosen im Tumorgewebe mit Pseudopallisadenstellung der Tumorzellen um die Nekrose [15], [19]. Bei den Pseudopallisaden handelt es sich um dicht gepackte, fusiforme Glioblastomzellen, die sich um die strichförmigen Nekrosen orientieren und Studien zufolge Träger des Stammzellphänotypes sind [20], [21]. Glioblastomzellen besitzen mehrere ovale hyperchromatische Nuclei, haben eine spindelförmige bis polygonale Gestalt und weisen ein azidophiles Zytoplasma auf [16]. Ebenfalls findet man in diesen Tumoren eine hohe endotheliale Proliferationsrate mit Gefäßkonglomeraten, die zur Thrombosierung neigen. Einblutungen, Riesenzellen und zystenartige Anteile sind ebenfalls charakteristisch für das GBM [15].

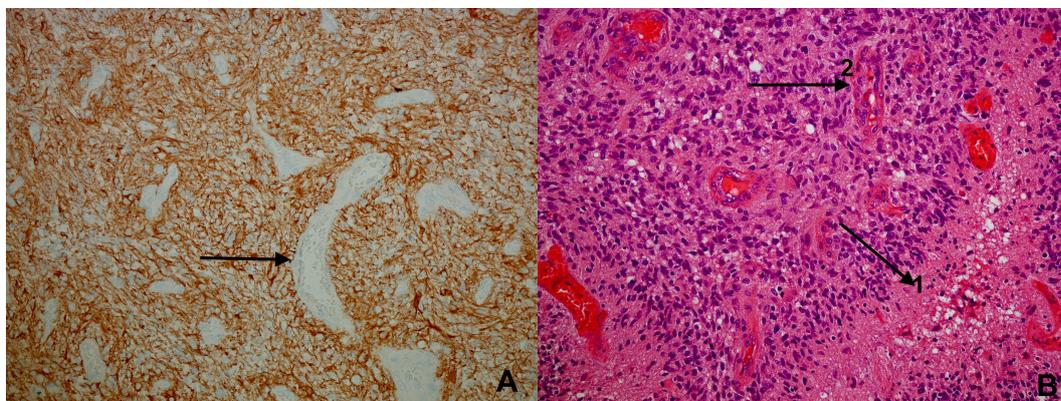


Abbildung 1 A: GFAP (gliale fibrilläre Proteine) Färbung eines Glioblastoms: GFAP als Haupt-Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen (Astrozytenmarker), Gefäßproliferate sind in der Färbung ausgespart (Pfeil). B: HE Färbung eines Glioblastoms mit strichförmiger Tumornekrose und Tumorzellen in Pseudopallisadenstellung (Pfeil 1) und Gefäßproliferaten (Pfeil 2) (A und B in 20-facher Vergrößerung).

1.4 Klassifikation des Glioblastoms nach der World Health Organisation (WHO)

Die Einteilung der glialen Tumore erfolgt zum jetzigen Zeitpunkt nach der im Jahre 2016 überarbeiteten Einteilung der WHO [22]. Das Glioblastom wird von der WHO als WHO-Grad IV - Tumor klassifiziert [15], [22].

Die Hirntumoren werden von der WHO in vier Malignitätsgrade unterteilt.

WHO-Grad I - Gliome sind benigne, langsam wachsend und lassen sich häufig kurativ durch eine Operation behandeln. Sie neigen nicht dazu in ein höheres WHO-Grad-Stadium überzugehen [15].

WHO-Grad II - Gliome sind als semibenigne einzustufen und haben in den meisten Fällen eine gute Prognose. Sie sind hochdifferenziert und zeigen ein langsames Wachstum, mit der Tendenz in das umgebende Hirnparenchym hineinzuwachsen. Sie neigen zu Rezidiven und können in ein höheres WHO-Grad-Stadium übergehen, was zu einer sorgsamten Nachkontrolle dieser Patienten verpflichtet [23].

Mit einer deutlichen Reduktion der Überlebenszeit gehen Tumore des WHO-Grads III einher. Sie gelten als semimaligne, sind gering differenziert und zeigen ein schnelles und aggressives Wachstum [22].

Bei den Gliomen des IV. Grades, zu denen das Glioblastom zählt, zeigt sich eine hohe Proliferationsrate undifferenzierter Zellen. Dies ist mit einer rapiden Krankheitsentwicklung und einer ungünstigen Prognose assoziiert [24].

Seit der Überarbeitung der WHO-Klassifikation im Jahre 2016 wird die histologische Einteilung durch molekulargenetische Untersuchungen ergänzt [22]. Die molekulargenetische Untersuchung auf Deletionen und Mutationen im Glioblastom, welche eine Auswirkung auf die Therapieansprache des Patienten haben, werden in der neuen WHO-Klassifikation sowie den Leitlinien zur Therapieentscheidung des GBMs berücksichtigt. Zum jetzigen Zeitpunkt gehören die Parameter IDH1/2 Mutation, der MGMT-Methylierungsstatus sowie die 1p/19q Co-Deletion zur Routinediagnostik [22], [25], [26]. In Abhängigkeit von ihrer neuronalen Differenzierung werden die GBM in einem von R.G.W. Verhaak et al. im Jahre 2010 vorgestellten Modell an Hand von genotypischen Veränderungen einzelnen Subklassen zugeordnet. Er nimmt eine Unterteilung in vier Subgruppen vor: neuronal, proneuronal, mesenchymal und klassisch [27]. Ziel dieser Einteilung ist es, die verschiedenen Tumorentitäten voneinander abzugrenzen, um eine geeignete „Target-orientierte“ Therapie für den jeweiligen Patienten anwenden zu können [28].

O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) -Methylierungsstatus

Die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist ein Desoxyribonucleinacid (DNA)-Reparaturenzym, welches Alkylgruppen von der Position O⁶ des Guanins entfernt [25], [29]. Dies stellt eine Schutzfunktion gegenüber Alkylierungen dar [5].

Das Gen, welches für MGMT codiert, besitzt im Bereich der 5' Promotorregion eine CpG-Insel. Liegt hier eine Methylierung vor, wird das Gen inaktiviert und es findet keine weitere Transkription statt [30].

Eine Methylierung kann bei 40-50% der Tumore festgestellt werden [9]. Gehäuft tritt die Methylierung in sekundären Glioblastomen auf [15]. Frühere Studien von Weller et al. und Hegi et al. zeigten, dass im Falle der methylierten Promotorregion ein entscheidender Vorteil für Patienten bezüglich der Gesamtüberlebenszeit von circa 5 Monaten und eine deutlich bessere Ansprache auf die Temozolomid-Chemotherapie besteht [29], [31]. Bisher ist der MGMT-Promotormethylierungsstatus klinisch für das Outcome des Patienten bezüglich der Chemotherapieansprache der relevanteste Parameter [12], [25].

Isocitratdehydrogenase (IDH)

Die Isocitratdehydrogenase ist ein Enzym des Citratzyklus, welches die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu Alpha-Ketoglutarat katalysiert [32].

Mit Hilfe von molekulargenetischen Untersuchungen unterscheidet man zwischen einem Wildtyp und einer IDH-mutierten Form [22]. In 85% der Fälle findet man diese Mutationen auf dem Codon 132 für das IDH1-Gen und auf dem Codon 172 für das IDH2-Gen [33], [34]. Diese Genmutationen verändern die Funktion der Isocitratdehydrogenase [35]. Es kommt zu einer vermehrten Anreicherung von D-2-Hydroxyglutarat was normalerweise nur in sehr niedrigen Konzentrationen in der Zelle vorkommt [36]. Dies führt unter anderem zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Zytoskeletts [37]. D-2-Hydroxyglutarat verändert den Zellstoffwechsel und führt zu einem vermehrten oxidativen Stress. Tumorsuppressorgene, die normalerweise Alpha-Ketoglutarat als Cosubstrat benutzen, werden ebenfalls beeinflusst [35].

Die Isocitratdehydrogenasemutation tritt bei circa 12% der Glioblastome auf. Gehäuft ist die Mutation bei sekundären Glioblastomen zu finden [30], [24], [38].

Eine IDH-Mutation ist sowohl bei primären Glioblastomen als auch bei anaplastischen Gliomen mit einer deutlich verbesserten Prognose korreliert [34, p. 2], [39].

Durch den IDH1-Verlust kann zuverlässig zwischen einem primären und einem sekundären Glioblastom unterschieden werden [40]. 90% der Glioblastome entstehen

de novo als sogenannte primäre Tumore. Bei diesen kann keine Entwicklung aus einem niedergradigem Gliom heraus gefunden werden [5], [24], [41]. Die primären Tumore gehen in der Regel mit einem IDH-Wildtyp einher. Sie zeigen einen Verlust des 10q Armes, treten bei Patienten jenseits des 55. Lebensjahres auf und Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen [4], [22],[42]–[44], [45].

Die IDH-mutierten werden den sekundären Glioblastomen zugeordnet, treten bei jüngeren Patienten auf, zeigen u.a. eine Überexpression von PDGF/PDGFR und entstehen in der Regel aus einem niedriggradigen Gliom heraus [4], [22], [43].

1.5 Klinische Diagnostik

Computertomographie (CT)

Auf Grund der oben genannten klinischen Auffälligkeiten erfolgt bei der erstmaligen Vorstellung des Patienten eine Bildgebung. Die primäre kraniale Bildgebung ist in der Regel die Computertomographie (CT). Die Sensitivität dieses Verfahrens beträgt circa 80% [46]. Das Glioblastom erscheint im CT iso- bis hypodens. Es weist eine zentrale Hypodensität auf, die der Nekrose entspricht. Nach Kontrastmittelgabe zeigt sich ein ringförmiges Enhancement [4], [47]. Die CT-Diagnostik alleine ist jedoch unzureichend und sollte zur Therapieplanung durch eine Magnetresonanztomographie (MRT) ergänzt werden [4].

Magnetresonanztomographie (MRT)

Das bildgebende Verfahren der Wahl zur Darstellung eines Glioblastoms ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Die Untersuchung erfolgt nativ und mit Kontrastmittel. Aufgrund der Bluthirnschrankenstörung kommt es zur Anreicherung von Kontrastmittel im Tumor, was eine bessere Therapieplanung erlaubt [4]. Mit Hilfe von speziellen Untersuchungssequenzen können das vitale Tumorgewebe sowie die nekrotischen Anteile dargestellt werden [48]. Das MRT erlaubt eine dreidimensionale Betrachtung des Tumors, welche die Beurteilung der Therapieoptionen erleichtert. Durch die Lokalisierung des Tumors wird eine Darstellung zu den eloquenten Hirnstrukturen möglich. In der T1-gewichteten Sequenz stellt sich der Tumor nach Kontrastmittelgabe als hypointense bis isointense Struktur mit einer ringförmigen Kontrastmittelanreicherung dar. Dies ist auf die zentral gelegene Nekrose

zurückzuführen [47]. In der T2 oder FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) Sequenz ergibt sich ein heterogenes, hyperintenses Bild [5]. Die MRT-Diagnostik dient nicht nur zur primären Diagnostik sondern wird im Rahmen der Behandlung auch als Verlaufskontrolle genutzt [48].

Die im Jahre 1990 von MacDonald entwickelten „Response Assessment in Neuro-Oncology“-Kriterien (RANO), die sich primär auf die Computertomographie bezogen, wurden auf das MRT übertragen [49]. Sie ermöglichen eine objektive Auswertung der Ansprache eines Tumors auf sein Therapieregime. Eine Zunahme der kontrastmittelaufnehmenden Areale um mehr als 25% wird als signifikant gewertet und man spricht ab diesem Zeitpunkt von einer Tumorprogression [50].

Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Eine ergänzende Diagnostikmethode ist die PET-Untersuchung, die mit Hilfe von Glucose oder Aminosäuren die erhöhte Stoffwechselaktivität des Tumors im Vergleich zum Normalhirngewebe zeigt [51]. Höhergradige Gliome zeigen beispielsweise ein stärkeres Enhancement des ^{18}F -Fluordesoxyglucose-Tracers als niedergradige Gliome, bedingt durch ihre starke Proliferation, die große Energiereserven verbraucht [52]. Hierdurch kann eine Abgrenzung zwischen benignen und malignen Prozessen erleichtert werden. Außerdem können hochaktive Tumorbereiche im Bereich des Narbengewebes und um die Nekrose sichtbar gemacht werden, die dann im Rahmen einer stereotaktischen Biopsie gezielt angesteuert werden, um Material zu entnehmen [53].

1.7 Therapie

Zu der Therapie eines GBM gehören die Resektion und die adjuvante konkomitante Radiochemotherapie.

Chirurgische Resektion

Die Operation dient einerseits zur Reduktion der Tumormasse und andererseits zur Sicherung der histologischen Diagnose. Durch die Entfernung des Tumors können sich die neurologischen Defizite zurückbilden [45], [54]. Eine nahezu vollständige Entfernung des Tumors stellt allerdings aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstums bis zum heutigen Tage keinen kurativen Ansatz dar [12], [55]. In der unmittelbaren

Umgebung des Tumors bleiben verstreute Zellen zurück, die für ein Tumorrezidiv verantwortlich sein können [45].

Die Art und das Ausmaß der angewendeten Operation ist vor allem von der Lage und der Zugänglichkeit des Tumors abhängig [56]. Dabei müssen die Bezüge des Tumors zu eloquenten Hirnarealen in die Entscheidung über die Art des operativen Vorgehens mit einbezogen werden [57]. Oberstes Ziel ist es, eine möglichst vollständige Tumorsektion zu gewährleisten [11], [58], [54], mit der Prämisse, die Integrität der neurologischen Funktionen vor die Radikalität der Operation zu stellen. Dies kann das Resektionsausmaß erheblich einschränken [57].

Eine Studie von Stummer et al. zeigte, dass Patienten mit einem vollständig resezierten Glioblastom mit 16,7 Monaten signifikant länger überlebten, als Patienten mit Teilresektionen (11,8 Monate) [10]. Hier bestand ein Überlebensvorteil von im Mittel 5 Monaten. Dieses Ergebnis wurde in den darauffolgenden Jahren durch weitere Studien bestätigt [11], [59].

Eine möglichst vollständige Resektion wird mikrochirurgisch durchgeführt und durch Hilfsmittel erleichtert. Das wichtigste Verfahren, das im Jahre 2006 von Stummer et al. vorgestellt wurde, ermöglicht es mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkers, der sogenannten 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die Tumorränder vom normalen Hirngewebe besser abzugrenzen [60]. Nach einer systemischen Gabe von 5-ALA synthetisieren nur neoplastische Zellen aus diesem Protoporphyrin IX. Wird das Tumorgewebe mit Licht in einem Wellenlängenbereich von 440 nm beleuchtet, kommt es durch 5-ALA zu einem Farbumschlag, der im normalen Hirngewebe nicht stattfindet. Das leuchtende Gewebe kann somit effektiver reseziert werden [61]. Mit Hilfe von 5-ALA ist eine nahezu vollständige Resektion des Tumors möglich [60].

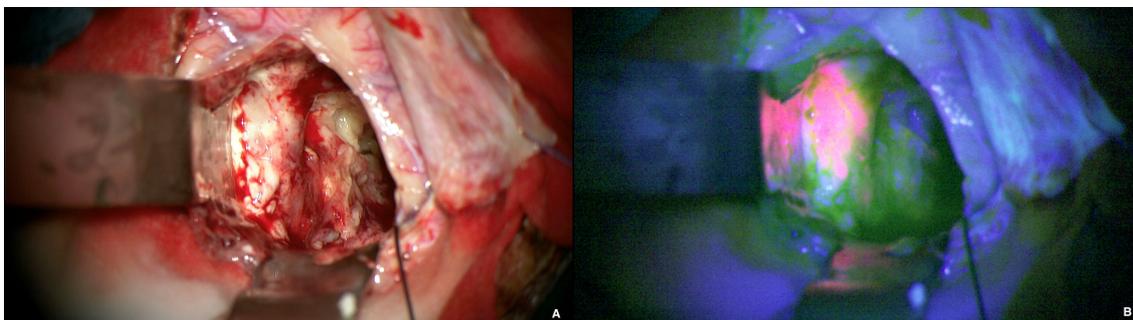


Abbildung 2 Intraoperatives Bild des Gehirngewebes unter dem Mikroskop mit Darstellung des Tumors A: natives Bild: Das Tumorgewebe ist vom angrenzenden Hirngewebe nicht zu unterscheiden; B: Intraoperatives Bild nach 5-ALA Gabe und Betrachtung unter 400nm Blaulicht. Das Tumorgewebe zeichnet sich rosa gegenüber dem gesunden Hirngewebe ab.

Möglichst vollständige Resektionen sind auch durch technische Innovationen wie die präoperativ durchgeführte transkranielle Magnetstimulation (nTMS), das intraoperative Monitoring (IONM) der evozierten Potenziale sowie das intraoperative CT/MRT verbessert worden. Mit ihnen ist es heute möglich minimalinvasiv zu arbeiten und eloquente Hirnareale zu schonen [62]–[66]. Auch durch den Einsatz von intraoperativ nutzbaren Ultraschallgeräten konnten das Resektionsausmaß und die Operationsresultate maximiert werden [4].

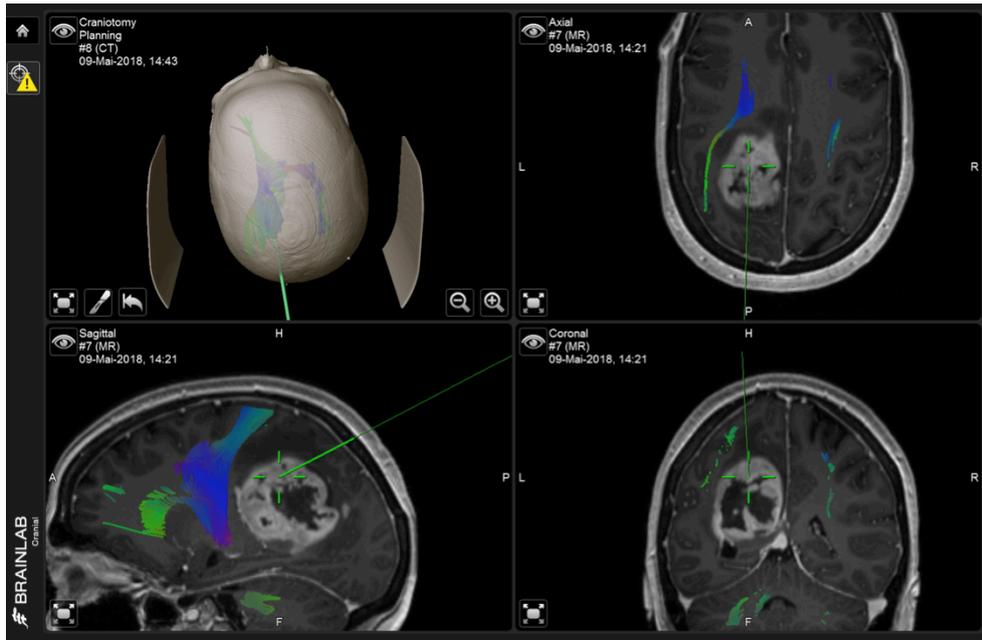


Abbildung 3 Intraoperatives Bild mittels BrainLab Navigation®; Mit Hilfe des Neuronavigationssystems ist es möglich, vorher eingespielte CT/MRT-Bilder des Patienten während der Operation in Echtzeit zu verfolgen und somit den optimalen Zugang zum Tumorgewebe zu generieren. Dargestellt ist mit einem grünen Balken das Neuroinstrument, welches von außen auf den Schädel gehalten wird, um so den Zugang möglichst optimal bestimmen zu können. Das grüne Fadenkreuz entspricht der Spitze des Pointers und befindet sich intraoperativ mitten in der ringförmigen, kontrastmittelaufnehmenden Läsion, hier einem Glioblastom entsprechend.

Ist eine vollständige Resektion nicht möglich, da der Tumor sich bereits in eloquenten Hirnarealen befindet, wird eine Teilresektion durchgeführt. Im Falle eines multilokulären Tumors, einer extrakraniellen Absiedlung oder einer Hirnstammlokalisierung bleibt gegebenenfalls eine Diagnosesicherung mittels Biopsie sinnvoll [67].

Chemotherapie

An die chirurgische Resektion schließt sich die Chemotherapie an. Das im Jahre 2005 von Stupp et al. entwickelte Therapieregime gilt heute als Goldstandard.

Hierbei bekommt jeder Patient eine kombinierte Radiochemotherapie über 6 Wochen mit daran anschließender 6-zyklischer Temozolomid (TMZ)-Behandlung [68].

TMZ gehört zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika [69]. Seine Wirkung beruht auf dem Anheften von Alkylgruppen an der Position O⁶ des Guanins des O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase-Proteins, was zur Apoptose durch Zellzyklusarrest führt [5]. TMZ fungiert auch als Strahlen-Sensitizer. Bestrahlung und Chemotherapie potenzieren ihre Wirkung, wodurch die Wahrscheinlichkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen erhöht wird, was eine weitere Tumorreplikation verhindert [70]. Stupp et al. wiesen einen signifikanten Überlebensvorteil der nach seinem Regime behandelten Patienten nach (Überlebensvorteil von 26,5% als kombiniertes Verfahren im Vergleich zu 10,4% bei alleiniger Bestrahlung) [68].

Es wird empfohlen, dass der Patient bei diesem Regime über 6 Wochen eine Dosis von 75 mg pro m² Körperoberfläche des Chemotherapeutikums erhält. Diese Dosis wird für weitere 4 Wochen nach Beendigung der Bestrahlung verabreicht [4]. Anschließend erfolgt eine Erhöhung der Dosierung auf 200 mg pro m² der Körperoberfläche, welches in 6 Zyklen über weitere 6 Monate eingenommen wird [68].

Strahlentherapie

Es konnte gezeigt werden, dass eine Tumorbestrahlung die Überlebenszeit der Glioblastompatienten von 4 auf 11 Monate verlängert [5]. Jahrelang galt eine Operation mit nachfolgender Ganzhirnbestrahlung als Goldstandard [71]. Seit dem Jahre 2005 gilt dieses Regime durch die Studienergebnisse von Stupp et al. als überholt, heute wird eine konkomitante Radiochemotherapie als Standardverfahren eingesetzt [68], [71]. Die stereotaktische Bestrahlung, die die vorher eingesetzte Ganzhirnbestrahlung ablöste und somit weniger Schaden im gesunden Hirngewebe hinterlässt, stellt einen herausragenden Fortschritt der radioonkologischen Therapie dar und gilt als heutiger Standard [72].

Nach der Operation erhält der Patient über einen Zeitraum von 30 Tagen eine fraktionierte Bestrahlung des Tumorrandgebietes mit einer Strahlendosis von insgesamt 60 Gray (Gy). Dabei werden über 5 Tage jeweils 1,6 Gy appliziert. Die Bestrahlung sollte erst 2 Wochen nach der Operation beginnen, um eine vorausgehende ausreichende Wundheilung zu ermöglichen [73], [74]. Dabei wird ein Randsaum von 2-3 cm um die Resektionshöhle herum mitbestrahlt um potenzielle Tumorüberreste ebenfalls zu erreichen [68]. Narayana et al. zeigten, dass 80-90% der wiederaufgetretenen Glioblastome sich im Bereich unmittelbar um den Ursprungstumor befanden [75].

Eine weitere Option ist der Einsatz von Protonenbestrahlung. Im Gegensatz zur herkömmlichen Bestrahlung mit Photonen haben Protonen eine millimetergenaue Eindringtiefe, die sich individuell steuern lässt. Die Strahlendosis kann dadurch mit hoher Präzision im Tumorgewebe freigesetzt werden unter Schonung des umliegenden Gehirngewebes [76]. Dieses Verfahren ist jedoch äußerst kostspielig und momentan wenigen Behandlungszentren vorbehalten.

Neue Therapiekonzepte

Ein neuartiges Konzept stellen die sogenannten Tumortheraiefelder (TTF) dar. Wechselnde elektrische Felder werden dabei über eine mit Keramik-Gel-Pads versehene Haube direkt auf die Kopfhaut aufgebracht. Durch die Elektrizität wird die Ausbildung der Mitosespindel gestört und somit die Zellteilung verhindert [77]. Stupp et al. zeigten, dass durch die Kombination der TTF- und der TMZ-Chemotherapie das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben signifikant verlängert wurden. Im Mittel zeigten die Patienten unter Kombination nach 6,7 Monaten ein Rezidiv, das Gesamtüberleben betrug 20,9 Monate. Unter der alleinigen Chemotherapie kam es nach 4,0 Monaten zum Rezidiv, das Gesamtüberleben betrug 16,0 Monate [78]. Im Rahmen einer Phase III Studie (CeTeG) von Herrlinger et al. wurde außerdem die Wirkung von einer TMZ Monotherapie im Vergleich zu einer Kombinationstherapie aus TMZ und Lomustin überprüft. Die Kombination zweier Alkylanzien führte zu einer Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens bei Patienten mit positivem MGMT Promotor um 16,7 Monate [79].

1.8 Prognose

Trotz der kombinierten Therapie von Resektion, Chemotherapie und Radiatio liegt die mediane Überlebenszeit zwischen 12-15 Monaten [10], [11] und das mediane progressionsfreie Überleben bei 6,8 Monaten [12]. Momentan gibt es keinen kurativen Ansatz [5].

Eine Studie von Stummer et al. zeigte, dass Patienten mit einem vollständig resezierten Glioblastom mit 16,7 Monaten signifikant länger überlebten als Patienten mit Teilresektionen (11,8 Monate) [10]. Des Weiteren verbessert die Tumorbstrahlung die Überlebensrate der Glioblastompatienten von 4 auf 11 Monate. Nicht zuletzt führt die Chemotherapie mit TMZ zur Verlängerung der Überlebenszeit bei MGMT positiven Patienten um 5 Monate [25], [80].

Zur Abschätzung der mittleren Überlebenszeit eines Patienten mit Glioblastom spielen neben der Art des Glioms (primär vs. sekundär) und der Lokalisation des Tumors (mögliches Resektionsausmaß), das Alter, das genetische Profil des Tumors (Methylierungsstatus, IDH1 usw.), der Karnofsky-Index (KPS) als Maß für den Allgemeinzustand sowie der neurologische Aufnahmestatus des Patienten eine Rolle. Junge Patienten mit hohem KPS, positivem MGMT-Methylierungsstatus sowie einer Tumorentfernung von über 98% zeigen deutlich längere Überlebenszeiten als Patienten ohne diese Kriterien [16], [81], [82].

1.9 Behandlung des Tumorrezidives

Im Falle eines Rezidivs erfolgt bei gutem Karnofsky-Index und einer Lokalisation im nicht eloquenten Areal eine erneute Resektion des Tumors. Hierbei gibt es in der Studienlage Diskrepanzen, ob dies einen Überlebensvorteil für den Patienten bringt oder nicht [83], [84]. Als weitere Optionen der Behandlung des Rezidivtumors kommen eine erneute Bestrahlung oder eine erneute Chemotherapie in Frage. Dabei empfehlen sich eine TMZ-Rechallenge, Nitroseharnstoffe, Bevacizumab oder die Gabe eines Protokolls wie PCV (Procarbazin, Lomustin, Vincristin) als Therapie des Rezidiv-Glioblastoms [85], [86]. Es besteht außerdem die Möglichkeit des Einsatzes der Tumorfeldtherapie in Kombination mit einer erneuten TMZ-Chemotherapie [87].

Schwerpunkte im Bereich der Forschung werden heutzutage vor allem in der *Target*-orientierten Therapie gesetzt. Das zu Grunde liegende Prinzip dieser Form der Behandlungen ist es, mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen spezifische Proteine richten, Signalwege zu blockieren und das Tumorwachstum dadurch einzuschränken.

Studien zu Signalwegblockaden über Antikörper, die sich gegen den epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) richten, wie Erlotinib oder Gefitinib, und Studien zu mTOR (*mechanistic target of Rapamycin*)-Inhibitoren (Rapamycin, Temosirolimus und Everolimus) wurden bereits am GBM-Rezidiv durchgeführt [88], [89]. Als vielversprechend gelten auch Studien mit Roscovitine, einem Purinanalogen und Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen, welche einen antiproliferativen und apoptotischen Effekt auf die Glioblastomzellen *in vitro* zeigten [90], bisher ohne klinisch relevante Erfolge.

1.10 Epitheliale-mesenchymale Transition

Definition und Unterteilung

Bei der Epitheliale-mesenchymalen Transition (EMT) handelt es sich um einen komplexen biologischen Prozess, der es epithelialen Zellen erlaubt durch biochemische Veränderungen mesenchymale Eigenschaften anzunehmen. Die Zellen können somit die Fähigkeit erlangen, sich aus ihrem ursprünglichen Zellverband zu lösen und zu migrieren [91], [92], [93]. Erstmals wurde dieser Prozess im Rahmen der Embryogenese von Elizabeth Hay beschrieben [94]. Die Zellen, die die Transition durchlaufen, verändern ihren Phänotyp, ihre Polarität und ihre biochemische Struktur. Durch die Einnahme eines mesenchymalen Phänotyps sind die Zellen in der Lage, in ihre Umgebung vorzudringen und sich teilweise der Einleitung des Zelltodes zu entziehen [91], [95].

Epithelzellen besitzen eine apiko-basale Orientierung und bilden einen organisierten Zellverband [93]. Epithelzellen sind lateral über Desmosomen, Adhärenz-Kontakte und *Tight Junctions* (sogenannte Verschlusskontakte) mittels Adhäsionsmolekülen verbunden. Diese Verbindung erfolgt beispielsweise über Cadherine oder Integrine [93]. Über sogenannte Hemidesmosomen besteht eine Vernetzung mit der Basalmembran. Zytokeratine gelten unter anderem als spezifische Intermediärfilamente des Zytoskelettes epithelialer Zellen [96].

Mesenchymzellen hingegen sind spindelförmig und nur über „*focal points*“ in die Umgebung integriert, sie kommunizieren über *gap-junctions* und sind diffus vernetzt [93]. Auf Grund dieser Eigenschaften ist es ihnen möglich, sich freier in der extrazellulären Matrix zu bewegen. Ein spezifisches Intermediärfilament mesenchymaler Zellen ist unter anderem Vimentin [94].

Während der Transition kommt es zu inter- und intrazellulären Veränderungen bedingt durch die Integration extrazellulärer Signale, wobei die Zusammenhänge noch nicht vollständig erforscht sind [93]. Eine Reihe molekularer Prozesse welche die Reorganisation des Zytoskelettes, die Expression verschiedener Strukturproteine und Zelloberflächenproteine, die Expression und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Produktion von EZM ab- und umbauenden Enzymen sowie eine Expression spezifischer microRNAs (miRNA) umfasst ist notwendig um die Transition einzuleiten und zu komplementieren [91]. Dabei handelt es sich nicht zwangsläufig um einen vollständig ablaufenden Prozess, eine partielle Transition ist ebenfalls möglich [93]. Die EMT ist außerdem ein reversibler Prozess, es existiert eine Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) [91], [97].

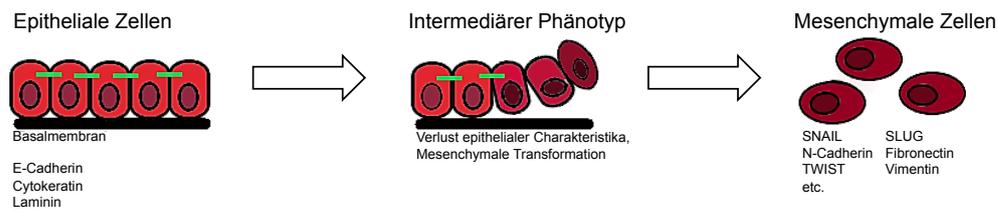


Abbildung 4 Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Switchvorganges epithelialer Zellen in mesenchymale Zellen bei der EMT mit den in der jeweiligen Phase exprimierten Regulatoren und Strukturproteinen [91].

Die EMT kann, je nach biologischem Kontext, in drei Subtypen unterteilt werden [98], [99].

Für die Implantation des Embryos, für die Gastrulation, zur Bildung des Primitivstreifens und für die Ausbildung der Organe ist der EMT-Subtyp 1 von Bedeutung [91], [100], [99]. Umwandlungen und Gewebsdifferenzierungen in Mesoderm und Endoderm finden statt, um einen funktionstüchtigen Organismus zu etablieren [97], [98]. Dieser Typus ist weder in Prozesse wie die Tumorentwicklung noch die Ausbildung einer Fibrosierung/Vernarbung involviert [91], [99], [101].

Der EMT-Subtyp 2 ist an der Wundheilung und der Regeneration von geschädigtem Gewebe im Rahmen eines Entzündungsprozesses oder eines Traumas beteiligt [102]. Die EMT spielt dabei sowohl bei der physiologischen als auch bei der pathologischen Wundheilung eine Rolle [103]. Physiologischerweise ermöglicht die Transition das Epithelzellen aus der Umgebung des geschädigten Gewebes in den Bereich der Schädigung einwandern und zu einer Reepithelialisierung und somit einer Regeneration beitragen [104]. Dabei üben zunächst Entzündungsmediatoren Stress auf die Zellen eines Gewebeverbandes aus [91]. Über verschiedene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise *Epidermal-growth-factor* (EGF) oder *Platet-derived-growth-factor* (PDGF) sowie durch verschiedene Chemokine und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) wird dann eine zumindest partielle Transition eingeleitet [91]. Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskelettes und zu einer Degradierung der Basalmembran [106]. Durch die Transition wird es den Epithelzellen ermöglicht die Basalmembran zu überschreiten. Nachfolgend akkumulieren die ehemals epithelialen Zellen im interstitiellen Gewebe und im Bereich der Gewebeläsion. Die Zellen tragen nun Charakteristika einer fibroblastären Zelle [91]. Außerdem gibt es Hinweise das die Myofibroblasten, welche zu einer Kontraktion des Wundbettes führen, ebenfalls aus Epithelzellen mittels EMT entstehen [105]. Durch den umgekehrten Prozess die MET kommt es zu einer Re-Epithelialisierung, die EZM

wird umgebaut und die Wunde kann heilen [103]. Eine überschießende Aktivierung im Rahmen eines anhaltenden Entzündungsprozesses führt zu einer Persistenz der Fibroblasten/Myofibroblasten. Es kommt zur Gewebefibrosierung mit daraus resultierender erheblicher Organschädigung [91], [99]. Beschrieben wurde dieser zweite Subtyp mit Ausbildung einer massiven Fibrose beispielsweise im Lebergewebe, in der Lunge und im Herzen [107], [108], [109].

Der EMT-Subtyp 3 ist ein Teil der Tumorentwicklung und der Metastasierung und fördert das Tumorwachstum [93], [110].

Der dritte Subtyp zeigt eine Reaktivierung eines embryonalen Prinzips. Im epithelialen Zellverband kommt es zur Auflösung der Zellkontakte untereinander, ebenfalls verändert sich der Integrin-vermittelte Kontakt zur extrazellulären Matrix [91], [111]. Die Zelle verliert ihre apiko-basale Ausrichtung, ihren Kontakt zur Basalmembran sowie ihre kuboide Form [100]. Solche Zellen zeigten in vielen Zellkultur- und in vivo Experimenten an Mäusen eine gesteigerte mesenchymale Markersignatur, beispielsweise durch die Expression von Desmin oder Vimentin. Dieser Vorgang wird auf Grund des Klassenwechsels der Cadherine auch als Cadherin-Switch bezeichnet [101]. Dabei gilt es zu beachten das Tumore stets heterogen sind, sodass einige Zellen weiterhin epitheliale Charakteristika aufweisen, einige Zellen sich in einem intermediären Zustand befinden und wiederum andere eine komplette Transition durchlaufen mit einem vollständig ausgebildeten mesenchymalen Phänotyp. Diese zuletzt genannten Zellen konnten vor allem an der Invasionsfront nachgewiesen werden [91]. In dem Gewebe in dem sie sich einnisten durchlaufen sie dann möglicherweise und zum Teil unvollständig den umgekehrten Prozess, die sogenannte mesenchymale-epitheliale Transition [98]. Somit können sie die histopathologischen Eigenschaften des Tumors aus dem sie ursprünglich hervorgegangen sind zurückerlangen [91].

Das umgebende Mikromilieu des Tumors bewirkt durch Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF, EGF und andere, eine Kaskadenaktivierung unterschiedlicher Signalwege an deren Ende Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der EMT stehen. Zu diesen Faktoren gehören ZEB1, TWIST, SNAIL und SLUG [91].

Durch die Epithelial-mesenchymale Transition können sich Tumore der Detektion des Immunsystems entziehen, sie erlangen einen stammzellähnlichen Charakter und zeigen Resistenz gegenüber einer medikamentösen Behandlung [99] mit einem negativen Einfluss auf das Überleben des Patienten [91].

Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, welche Faktoren zur Einleitung der Transition führen können und woran es liegt, dass einige Zellen und Tumore

empfänglicher für äußere Reize sind als andere. Es wird angenommen, dass Tumore, die besonders empfänglich für EMT-Regulatoren sind, bestimmte Zellen mit genetischen und epigenetischen Veränderungen besitzen, die eine erleichterte Zugänglichkeit des Tumors für äußere Signale bedingen [91]. Dies stellt jedoch nur eine mögliche Ursache dar. Das umgebende Tumormilieu und somit das Vorhandensein bestimmter äußerer Signale ist neben den Tumorcharakteristika ebenfalls von Bedeutung.

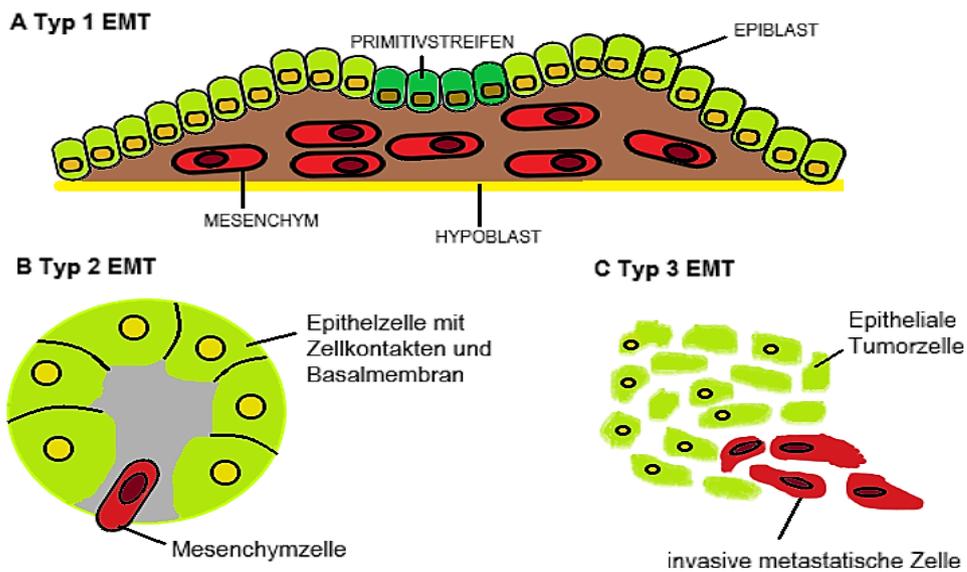


Abbildung 5 Die drei Subtypen der EMT nach Kalluri und Weinberg 2009 [91]. Der Typ A entspricht dem embryonalen Subtyp 1. Der Typ B dem hauptsächlich im entzündlichen Rahmen auftretenden Subtyp 2. Unter C ist der im Rahmen der Tumorentwicklung und Metastasierung auftretende Subtyp 3 dargestellt.

Die Rolle der Cadherine in der Epithelial-mesenchymalen-Transition

Ein entscheidender Prozess während der Epithelial-mesenchymalen Transition ist die Reorganisation der epithelialen Zellkontakte, sowie das *Remodelling* und die Degradierung der Basalmembran [91], [92]. Für die Ausbildung der Zellkontakte sind die Cadherine von großer Bedeutung [111], [112].

E-Cadherin (embryonales/epitheliales Cadherin) gehört zur Familie der Cadherine und bildet neben N-Cadherin (neuronales Cadherin) und P-Cadherin (plazentares Cadherin) eine der drei Hauptklassen [113]. Es handelt sich bei ihnen um Calcium-abhängige Glykoproteine welche die Zellmembran durchziehen. Die intrazelluläre Domäne welche unter anderem an β -Catenin gekoppelt ist, stellt dann über eine Verbindung mit α -Catenin eine Verankerung des Adhäsionskomplexes an das Aktin-Zytoskelett her [92], [112], [114]. Durch dieses Netzwerk erhält die Epithelzelle ihre Form und Ausrichtung [92]. Für E-Cadherin codiert das CDH1 Gen [115], für N-Cadherin das CDH2 Gen [116].

CDH1 ist ein Tumorsupressor-Gen, welches ein unkontrolliertes Zellwachstum verhindert und die Zellausbreitung begrenzt. Unterschiedliche Mechanismen wie somatische Mutationen, abnormale Proteinprozessierung, Hypermethylierung der Promotorregion oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren können das CDH1 Gen inaktivieren [117]. Bereits in der Embryonalentwicklung ist eine korrekte zeitliche und räumliche Expression sowie ein Umschalten der E-Cadherin auf eine N-Cadherin Genexpression, je nach Entwicklungsstadium, essenziell [118]. Bei der Krebsentstehung und Metastasierung kommt diesem *Switch*-Vorgang ebenfalls eine große Bedeutung zu [119]. Wird CDH1 beispielsweise durch die Hypermethylierung der CDH1-Promotorregion oder durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie die der SNAIL-Familie, TWIST oder ZEB1, inaktiviert bzw. herunterreguliert trägt dies zur Tumorprogression und Bildung von Metastasen in einigen Tumoren bei [97], [99], [111]. Die Transkriptionsfaktoren binden sich dabei an spezielle DNA-Sequenzen, die E-box-Bereiche der Promotorregion des E-Cadherin-Gens und unterdrücken nachfolgend die Expression von E-Cadherin [99], [100].

E-Cadherin-Verluste sind in einigen Tumoren wie dem Siegelringzellkarzinom des Magens mit einer deutlich verkürzten Gesamtüberlebenszeit des Patienten verbunden [120], [121].

N-Cadherin wird in unterschiedlichen Gewebetypen wie beispielsweise dem zentralen Nervensystem, im Endothel und Knochengewebe exprimiert und ist für die Integration der Synapsen [122], die vaskuläre Stabilität [123] und die Knochenhomöostase [124]

von Bedeutung. Die intrazellulären Domänen der verschiedenen Cadherine weisen Bindungsstellen für verschiedene Catenine auf wie beispielsweise p120-Catenin, das im Bereich der juxtamembranären Domäne bindet, und β -Catenin welches über α -Catenin eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellt [119].

Außerhalb des Hirngewebes zeigten sich die oben erwähnten E-Cadherin-Repressoren (SNAIL, SLUG, ZEB) als CDH2 und somit N-Cadherin-Induktoren [117]. Im Mammakarzinom beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen einer N-Cadherin-Überexpression und der deutlich erhöhten Ausbreitungstendenz des Tumors hergestellt werden [125].

Die Rolle der Zyklin-abhängigen-Kinasen (CDK) in der EMT

Die CDK übernehmen im Zellzyklus die Aufgabe einen kontrollierten Übergang der Zellen von einem Bereich des Zellzyklus in den darauffolgenden zu gewährleisten [126]. Damit sie ihrer Regulationsfunktion bedarfsgerecht nachkommen können, müssen sie mit Hilfe von Zyklinen aktiviert und durch spezielle CDK-Inhibitoren unterdrückt werden. Dieses Zusammenspiel wird von verschiedenen Umgebungsfaktoren beeinflusst [127].

CDK1 und CDK2 sind Serin-Threonin-Proteinkinasen und spielen eine Rolle am Übergang der G2- in die M-Phase des Zellzyklus, wodurch die Mitose im Anschluss an die vollzogene Replikation der DNA eingeleitet wird [128]. Veränderungen der CDK1/2-Aktivität während des Zellzyklus ermöglichen eine kontrollierte Teilung, DNA-Reparaturen und geben dem Zellzyklus eine irreversible Richtung vor [126], [129].

CDK1/CDK2 und seine veränderten Aktivitätslevel wurden bereits an Tumoren wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom oder am Mammakarzinom untersucht. In allen Tumoren zeigte sich, dass eine übermäßige Aktivität dieser Kinasen vorlag, welche zu einem ungehemmten Wachstum und fehlerhaften Zellteilungen beitrug [130]–[132]. Bo et al. zeigten, dass CDK1/CDK2 unter anderem während des Zellzyklus des Glioblastoms überexprimiert vorliegen [128]. Eine Überexpression von CDK1 in humanen Glioblastomzelllinien sowie in Maus-Xenograft-Glioblastomen führt in Studien von Chen et al. zu einer Progression des Glioblastoms, wohingegen eine *Downregulation* dieses Gens eine verringerte Proliferationsaktivität zur Folge hatte [133].

Weiterhin konnten Bo et al. zeigen das CDK1 und CDK2 als Bestandteil eines komplexen Netzwerkes mit weiteren Faktoren wie CCNB1 oder CDC6 im p-53

Signalweg angereichert vorliegen [128]. Der p53 Signalweg ist der in Tumoren allgemein am häufigsten mutierte Signalweg [134].

Der p53-Signalweg hat auch im gesunden Hirngewebe eine Tumorsupressorfunktion, indem er die Proliferation inhibiert und Zellteilungen mit beschädigter DNA verhindert sowie Einflüsse auf den Zellmetabolismus und die Gefäßversorgung ausübt [134]. Die Gliome des WHO-Grad IV sind in ca. 40-65% von Mutationen im p53-Gen betroffen [135], [136]. Deutlich erhöhte CDK1-Expressionswerte in einem komplex interagierenden Netzwerk weiterer Faktoren im p53-Signalweg könnten zu einer Inhibition des p53 beitragen und zu einem beschleunigten Tumorwachstum mit schlechterer Prognose für Gliompatienten führen [128], [137].

Die Rolle des Zink-finger E-box binding homeobox 1 Gens in der EMT

Die Moleküle der ZEB-Familie gehören zu den Transkriptionsfaktoren. Zu ihnen werden zwei Proteine mit den Namen ZEB1 und ZEB2 gezählt [138]. Abhängig vom jeweiligen Gewebe und Genpool können sie durch posttranslationale Modifikationen und durch die Bindung weiterer Cofaktoren sowohl als Repressoren als auch als Aktivatoren der Zellproliferation fungieren [139]. Strukturell sind sie aus zwei Zink-Finger-Domänen aufgebaut, die jeweils am C- und N-Terminus lokalisiert sind und mit denen sie sich an die entsprechenden DNA-Abschnitte zur Regulation anlagern [140]. Sie interagieren mit weiteren Transkriptionsfaktoren und haben beispielsweise eine SMAD-Reaktionsdomäne, mit der sie Einfluss auf den TGF β /BMP- [141] oder den NF- κ B-Signalweg nehmen [138].

ZEB ist in der Lage, die Cadherinexpression aktiv zu beeinflussen und damit die EMT einzuleiten [91], [142]. Sie tragen zum sogenannten Cadherin-Switch bei, der als Schlüsselprozess beschrieben wurde [91], [94]. ZEB1 und ZEB2 führen zur *Downregulation* von E-Cadherin [142]. Mesenchymale Marker hingegen wie Vimentin oder N-Cadherin zeigen eine erhöhte Expressionsrate bei ZEB1/2-Überexpression [139]. Joseph et al. zeigten, dass ZEB1 als einer der Hauptregulatoren der EMT in nekrotischen Arealen im Glioblastom heraufreguliert ist und durch die verstärkte Ausprägung des mesenchymalen Phänotyps zur Invasionsfähigkeit beiträgt [143]. Mittlerweile gibt es zahlreiche Untersuchungen an verschiedensten Tumoren (Prostata, Mamma, Lunge, Kolon etc.), die die ausgeprägte Aggressivität und Metastasierungstendenz bei ZEB-Überexpression belegen [144]–[146], [147]. ZEB1

wird auf diesem Hintergrund eine Schlüsselrolle im Bereich der Tumorprogression zugeschrieben [148]. Die ZEB-Familie spielt sowohl im Bereich der Gefäßversorgung und damit für den Tumor-Metabolismus als auch in den Bereichen Therapieresistenz und der Stammzellcharakteristik eine Rolle [139].

ZEB1 wurde bereits von Siebzehnrubl et al. im GBM untersucht. Siebzehnrubl et al. berichteten, dass das Ausschalten des ZEB1-Genes zu einer erhöhten TMZ-Sensitivität bei Glioblastomen in vitro führte und die Progression der Tumore reduzierte. Im Rahmen von Untersuchungen an Mäusen denen zuvor ein GBM implantiert wurde zeigte er, dass solche Tiere bei denen ZEB1 inaktiviert wurde, signifikant länger überlebten [149]. Welche Umgebungsfaktoren ZEB1 beeinflussen können, wurde in verschiedenen Studien different beschrieben, darunter EGFR, NF- κ B und β -Catenin [149]–[151]. Diese Tatsache lässt vermuten, das ZEB über unterschiedliche Wege aktiviert werden kann.

Die Epithelial-mesenchymale Transition im GBM

Die EMT ist in malignen Hirntumoren von zentraler Bedeutung. Faktoren wie TGF β , EGF, HIF1 α mit nachfolgender Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie SNAIL, TWIST, ZEB1 etc. sind in der Lage die Transition einzuleiten [152]. Die mesenchymale Transition erhöht das maligne Potenzial, die Metastasierungsrate und die Aggressivität von Tumoren [152]. Die Rolle der EMT scheint von übergreifender Bedeutung zu sein, sodass Iser et al. diesen als hauptsächlichen Regulator des GBM beschrieben [153].

Die Unterschiede zwischen der klassischen EMT im Epithel und den sogenannten glialen-mesenchymalen Veränderungen (oder *EMT-like-process*) sind noch unzureichend untersucht worden.

Gliome folgen nicht dem klassischen Verlauf des dritten Subtypes der EMT. E-Cadherin wird in der Mehrzahl der GBM nur schwach exprimiert, wodurch sich der Cadherin-Switch undeutlicher als in anderen Tumoren darstellen lässt [98], [154].

Hirngewebe weist von vornherein eine verstärkte mesenchymale Prägung mit einer hohen N-Cadherin-Expression auf [154]. Asano et al. zeigten, dass eine umgekehrte Abhängigkeit zwischen Invasion und N-Cadherin-Expressionslevel im Gliom vorlag. Je höher das N-Cadherin-Level war, desto weniger neigte der Tumor dazu in sein umgebendes Gewebe einzudringen [155]. Ebenfalls bestätigten seine und andere Studien einen Zusammenhang zwischen dem Gliom-Grad und dem N-Cadherin-Expressionslevel [155], [156].

Hohe E-Cadherin-Werte hingegen wurden mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit des Patienten beschrieben [154]. Diese Beobachtung ist gegensätzlich zu den Erkenntnissen, die in epithelialen Tumoren gewonnen wurden, bei denen E-Cadherin die Invasion und Metastasierung verhinderte [153]. Auch in anderen Hirntumoren wie dem Meningiom gilt E-Cadherin als protektiv [157].

Im GBM zeigte sich in Bezug auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika, dass eine ZEB1-Überexpression zu einer mangelnden Therapieansprache auf TMZ führte [153]. Frühere Studien zeigten, dass Gliome mit einer verstärkten Expression der EMT-Merkmale wesentlich schlechter auf eine Radioansprache [158], [159]. Die Bestrahlung trug über die durch sie induzierte Hypoxie zur Anstoßung der EMT bei [160], [161].

Für die gezielte Therapie eines Tumors ist es wichtig, die molekularen Vorgänge in diesem Tumor zu verstehen. Es ist bis heute nicht möglich, mittels gezielter Antikörpertherapie die Prognose des GBM-Patienten zu verbessern. Diese Problematik diente als Grundlage der folgenden durchgeführten Studie.

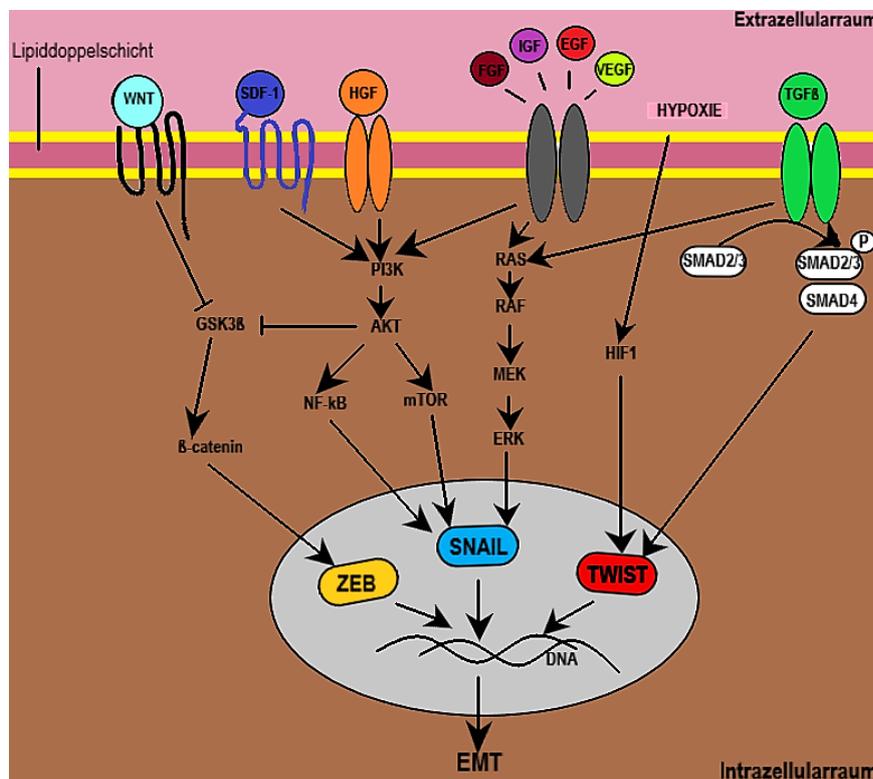


Abbildung 6: Schematische und deutlich vereinfachte Darstellung einiger Regulatoren der EMT am Beispiel einer Gliomzelle. Dargestellt ist die Funktion einiger Signalmoleküle, Strukturproteine sowie Transkriptionsfaktoren und deren Zusammenspiel in der Epithelialen-mesenchymalen-Transition. [153]

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen und der Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) eine Expressionsanalyse durchgeführt und das Verteilungsmuster sowie die quantitative Menge von Schlüsselgenen der Epithelialen-mesenchymalen Transition im Glioblastom untersucht werden. Ziel war es, mit Hilfe dieser Methoden, eine Korrelation zwischen der Genproduktmenge in Bezug auf den Progress und das Gesamtüberleben herzustellen, wobei eine Stratifizierung mit Hilfe des MGMT-Methylierungsstatus erfolgte. Die Untersuchung von Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Hirngewebe sollte die Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression zwischen Glioblastom- und Normalhirngewebe zeigen, um eventuell in der Zukunft eine Target-Therapie etablieren zu können.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

1. Welche Unterschiede gibt es in der Expression der Gene ZEB1, CDK1, CDH1 und CDH2 und ihrer Genprodukte im Normalhirngewebe im Vergleich zum Glioblastom?
Eine Untersuchung mit Hilfe der RT-PCR und der Immunhistochemie.
2. Ist die Expression der Gene ZEB1, CDK1, CDH1 und CDH2 und ihrer Genprodukte abhängig vom MGMT-Methylierungsstatus?
3. Besteht eine Korrelation zwischen der Gen-/Proteinexpression der von uns untersuchten Gene ZEB1, CDK1, CDH1 und CDH2 und dem progressionsfreien, beziehungsweise dem Gesamtüberleben des Glioblastom-Patienten?
4. Welche Auswirkungen haben die Genprodukte der Gene ZEB1, CDK1, CDH1 und CDH2 aufeinander und besteht zwischen den Gen-/Proteinexpressionen eine Korrelation?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen während der Jahre 2006-2015 ein primäres Glioblastom diagnostiziert wurde. Bereitgestellt wurden die histologischen Proben vom Institut für Neuropathologie Gießen (n=44). Hinzu kam eine weitere Tumorprobe in der Immunhistochemie eines der 44 Patienten, von dem sowohl vom Primärtumor, als auch vom Rezidivtumor Gewebe vorlag (n=44+1). Dabei wurden die Tumore noch nach dem damaligen Standard und der damals gültigen WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2007 als Gliome klassifiziert. Molekulargenetische Parameter flossen somit noch nicht zur Identifizierung mit ein.

Die Präparate lagen sowohl als in flüssigem Stickstoff konservierte Gewebeprobe (Kyropräparat) als auch in Paraffin eingebettet vor. Das Gewebe wurde dabei im Rahmen einer chirurgischen Resektion entnommen. Die Einverständniserklärung der Patienten bezüglich der Verwendung der Proben im Dienste der Wissenschaft wurde mit dem Ethikantrag mit dem Aktenzeichen AZ 07/09 abgedeckt und liegt der Justus-Liebig-Universität Gießen vor.

Die patientenbezogenen Daten wurden retrospektiv erhoben. Die erhobenen Parameter umfassten: Geburtsdatum, Geschlecht, primäres/sekundäres Gliom, die molekularpathologischen Parameter MGMT und IDH1, den Zeitpunkt der Erstvorstellung, Zeitpunkt der Operation/Re-Operation, die Nachbehandlung mit Chemotherapie und Strahlentherapie, den Befund der Verlauf-MRT, den Rezidivzeitpunkt, sowie den Zeitpunkt der letzten Vorstellung, beziehungsweise das Sterbedatum. Das progressionsfreie Überleben umfasst den Zeitraum zwischen der Operation und des Wiederauftretens des Tumors. Die Auswertung der Patientendaten erfolgte anonymisiert.

2.2 Kontrollkollektiv

Zur Bildung eines Kontrollkollektivs standen fünf pathologisch unauffällige Hirnbiopsien, welche intraoperativ entnommen wurden, zur Verfügung. Diese Präparate lagen sowohl in Paraffin eingebettet, als auch als Stickstoff-asservierte Proben vor. Die Proben wurden vom Institut für Neuropathologie des UKGM Gießen zur Verfügung gestellt.

2.3 Definition der Realtime-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der 1980 von Kary Mullis entwickelten Methode der Polymerasekettenreaktion geht es darum, mit Hilfe einer Polymerase und sogenannten Primern die DNA zu amplifizieren, um eine genaue Kopie des von den Primern eingeschlossenen DNA-Bereiches zu erhalten [162].

Bei den Primern handelt es sich um spezifische Oligonukleotide, die komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Bereich sind und diesen flankieren. Sie lagern sich an bestimmte Bereiche der DNA an und stellen ein freies 3'OH-Ende zur Verfügung, welches notwendig ist, damit die ersten Nukleotide angeheftet werden können. So dienen die Primer als Start- und Endpunkt für ein Enzym mit dem Namen Polymerase [163].

Die quantitative RT-PCR nutzt das Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion und ermöglicht gleichzeitig eine Quantifizierung der gewonnenen DNA-Menge und deren Visualisierung. Dabei wird die DNA-Menge quantitativ über die Anreicherung eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Die Menge des Farbstoffes korreliert mit der Menge der PCR-Produkte und kann in Echtzeit ausgewertet werden [163]. Sie ist die Methode der Wahl um kleinste Mengen Messenger-RNA (mRNA) zu quantifizieren, da sie hoch sensitiv ist und kleinste Veränderungen in der Genexpression darstellen kann [164]. So ist sie in der Lage weniger als 5 Kopien einer Sequenz ausfindig zu machen, falls sich diese in der Probe befindet [165].

Vom Prinzip her funktioniert auch diese Kettenreaktion wie jede andere. Dabei wird die Probe initial für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Durch die Erwärmung lösen sich gebildeten Primerdimere auf und die Polymerase wird aktiviert. In jedem weiteren der 30 bis 40 Zyklen läuft nun eine Reaktion in 3 Schritten ab:

1. Zunächst werden die beiden DNA-Stränge durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt. Dies gelingt, indem die Probe für 30-60 Sekunden auf 95°C erhitzt wird.
2. Beim zweiten Schritt wird die Temperatur auf 50-65°C gesenkt und es kommt zum sogenannten Annealing, der Anlagerung des Primers an die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte.
3. Der letzte Schritt heißt Elongation. Während dieser Phase lagert sich die DNA-Polymerase an die Primer an und beginnt vom 3'-Ende aus mit der Synthese. Die vorherrschende Temperatur beläuft sich dabei auf 72°C [165].

Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und je nach verwendeter Polymerase kann dieser Schritt unterschiedlich lange dauern.

Ist die Elongation abgeschlossen, besteht die DNA wieder aus einem Doppelstrang. Die DNA-Menge hat sich nun verdoppelt und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Nach jeder abgeschlossenen Runde beläuft sich die DNA-Menge somit auf 2^n , wobei n die Anzahl der durchlaufenen Zyklen darstellt. Die Menge wächst somit exponentiell [166].

Die quantitative RT-PCR findet außerhalb der Forschung unter anderem Anwendung im Bereich der Vaterschaftsdiagnostik und dem genetischen Fingerabdruck zur Detektion von Erbkrankheiten [167].

Die Besonderheit bei der quantitativen RT-PCR besteht darin, dass zusätzlich zu den beiden gewöhnlich verwendeten Primern, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren, noch eine weitere Sonde benötigt wird. Diese besitzt am 5'-Ende einen fluorogenen Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen zweiten Fluorochromfarbstoff, den sogenannten Quencherfarbstoff, welcher durch einen Phosphatrest blockiert wird, um so zu verhindern, dass die Sonde selber verlängert wird. Solange sich der Quencher in unmittelbarer Nähe zu dem Reporter-Farbstoff befindet, wird die Fluoreszenz durch einen Energietransfer vom Reporter auf den Quencher unterdrückt. Selbst bei dem für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Wellenlängenbereich findet somit zwar eine Anregung statt, es kann aber durch die Wechselwirkung der beiden Fluorochrome kein Signal emittiert werden, da der Quencher dieses absorbiert [165]. Für die Signalausendung wird eine weitere Funktion der Polymerase benötigt.

Die Polymerase bei der quantitativen RT-PCR besitzt die Fähigkeiten einer Exonuklease. So kann in 5'-3'-Richtung die Sonde mit dem Fluoreszenzfarbstoff wieder von der DNA entfernt werden, wenn die Polymerase auf ihrem Weg der Verlängerung der Primersonden auf diese stößt. Dabei schneidet die Exonuklease zunächst am 5'-Ende den Reporter-Farbstoff ab. Dieser entfernt sich somit von dem Quencher und kann nun durch die Aufhebung der räumlichen Nähe seine Fluoreszenz entfalten. Der Energietransfer wird unterbrochen. Mit jedem quantitativen RT-PCR-Zyklus steigt die Menge des Farbstoffes proportional zur Menge des RT-PCR-Produktes an und ermöglicht die quantitative Auswertung [162].

Freie, nicht gebundene Sonden hingegen werden nicht geschnitten und tragen somit auch nicht zur Gesamtfluoreszenz bei. So ist das entstandene Signal hochspezifisch, da solche Sonden, die nicht optimal an die DNA binden, sofort wieder verdrängt werden, bevor die Polymerase jene überhaupt erreicht.

2.3.1 Isolierung der Ribonukleinsäure

Damit eine Arbeit mit dem Material der Glioblastom-Patienten überhaupt möglich war, musste zunächst die Erbinformation aus jeder Probe isoliert werden, da nur so die Bedingungen für den Ablauf der später folgenden Polymerasekettenreaktion geschaffen werden konnten. Die Proben lagen dabei als in flüssigem Stickstoff konservierte Kryopräparate vor.

Wichtig war, dass alle Schritte unter einem Abzug auf einer sterilen Arbeitsbank und unter vorheriger Reinigung aller Materialien mit 70%igem Ethanol stattfanden.

Messenger-RNA hat den großen Vorteil, dass sie im Gegensatz zur DNA keine Introns mehr enthält.

Das Ziel des nun folgenden Protokolls war es, die RNA von den übrigen Bestandteilen der Probe zu trennen und mittels mehrerer Waschschriffe am Ende nur noch eben diese an der Silikanmembran der RNeasy-Säule hängen zu haben, um dann in einem letzten Schritt die RNA wieder von der Säule lösen zu können.

Das Endprodukt bestand aus verschiedenen RNA-Formen, wobei die gewollte mRNA einen Anteil von 2 % des Gemisches ausmachte. Da es direkt nach der Lysierung der Zellen zu einer Inaktivierung der RNasen durch die entsprechenden Reagenzien (siehe Protokoll) kam, die normalerweise unsere gesuchte RNA sehr schnell abbauen würden, handelt es sich um eine stabile und qualitativ hochwertige Methode, die sich inzwischen zur Standardmethode der RNA-Isolierung etabliert hat. Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des Rneasy Lipid Tissue Mini Kit® der Firma Quiagen® - Protokoll siehe Anhang.

2.3.2 Nanodrop zur Ermittlung der Konzentration und der Reinheit der RNA

Mit Hilfe eines Mikrovolumen-Spektralphotometers (peqLab NanoDrop® 1000 Spectrophotometer) wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration der isolierten RNA gemessen. Hierfür wurde 1 µl der jeweiligen Patientenprobe auf die Messoberfläche des Gerätes pipettiert.

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Extinktion in einem Wellenlängenbereich von 260 nm, dem Bereich des Nukleinsäure-Absorptionsmaximums, zu einem Wellenlängenbereich von 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Proteine (E260/E280), wurde eine Ratio ermittelt, wobei Werte größer 2,0 ermittelt werden mussten, um von einer nicht kontaminierten Probe ausgehen zu können. Erst durch diese Kontrolle war eine weitere Verwendung der Probe möglich und die Isolierung musste nicht wiederholt werden.

2.3.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Um die isolierte RNA für die RT-PCR nutzen zu können, ist es notwendig, diese zuvor in sogenannte cDNA zu überführen. Nur so kann die cDNA als Template dienen und die Detektion einzelner Gene mittels der RT-PCR ermöglichen. Diese Schritte werden durch ein Enzym namens Reversetranskriptase synthetisiert, welches in Retroviren wie beispielsweise dem HI-Virus vorkommt. Diese Transkriptase synthetisiert aus der einsträngigen RNA eine komplementäre, einzelsträngige DNA. Es handelt sich bei diesem Enzym um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Dabei erhält man nicht nur die Information, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht, sondern es kann auch auf die Stärke der Expression geschlossen werden. Obwohl in dem RNA-Gemisch, wie bereits oben beschrieben, nur ein sehr kleiner Anteil an mRNA vorhanden war, reichte dieser aus, da in der RT-PCR die cDNA eingesetzt wurde, welche durch die anschließende Amplifikation einen sehr hohen Anteil aufwies. Es wurden jeweils 1,0 µg der isolierten RNA mittels eines Reverse Transkription Kits namens QuantiTec® (Firma Quiagen®) in cDNA überschrieben. Hierfür wurde ein PCR-Cycler verwendet (Mastercycler Gradient Thermal Cycler®, Firma Eppendorf). Die Durchführung dieses Versuches erfolgte nach den Angaben des Herstellers im entsprechenden Handbuch.

Bei der Durchführung der reversen Transkription wurde folgendes Protokoll befolgt: Zur Elimination der genomischen DNA (gDNA) wurden folgende Komponenten bei einer Temperatur von 42°C für 2 Minuten zusammengemischt und inkubiert:

1. gDNA-Wipeout-Puffer (7x); Menge: 2 µl
2. Template-RNA; Menge: 1 µg
3. RNase-freies Wasser; Menge: ad 14 µl

Nach der Inkubation wurden diese Komponenten auf Eis gelagert.

Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription. Hierfür wurden folgende Komponenten benötigt:

1. Reverse Transkriptase; Menge: 1 µl
2. Reverse-Transkriptase-Puffer (5x); Menge: 4 µl
3. Reverse-Transkriptase-Primer-Mix; Menge: 1 µl

Nachdem diese 6 µl zusammen in ein Eppendorfgefäß mit den 14 µl des vorausgegangenen Schrittes pipettiert wurden, erfolgte eine Inkubation bei 42°C für 15

Minuten. Nachdem diese Zeit abgelaufen war, wurde die Temperatur auf 95°C erhöht und die Probe für weitere 3 Minuten unter diesen Bedingungen inkubiert, da nur so die reverse Transkription gestoppt werden kann.

Von der nun gewonnenen cDNA wurde im Anschluss entweder 1 µl in die Real-Time Polymerasekettenreaktion eingesetzt oder, falls keine direkte Verarbeitung möglich war, die Probe bei -20°C in einem Kühlschrank gelagert.

2.3.4 Durchführung der quantitativen RT-PCR

Zur Durchführung wurde eine 96well Platte benötigt sowie der TaqMan[®] Gen Mastermix, der sowohl die Desoxyribonukleosidtriphosphate wie auch die Taq-polymerase für die RT-PCR enthielt. Ebenfalls wurden TaqMan[®] Gen Expressions Assays verwendet, die die Sonden und Primer für ACTB, CDK1, CDH1, CDH2 und AREB (ZEB1) enthielten.

Der RT-PCR Mix pro Well ergab sich demzufolge wie folgt:

- + Gene Expression Mastermix mit einer Menge von 10 µl
- + Nuclease-freies Wasser 8 µl
- + Assay 1 µl
- + Template DNA 1 µl

Total: 20 µl

Das Gemisch aus Mastermix, Nuklease-freiem Wasser und Assay wurde dabei als einheitlicher Mix angefertigt, von welchem bei jedem Versuch jeweils eine negativ Kontrolle mitlief, um eine Verunreinigung der Proben ausschließen zu können. In diesem Feld durfte bei der späteren Auswertung keine Expression zu erkennen sein, ansonsten wurde der Versuch solange wiederholt, bis dieses Feld den Wert Null anzeigte.

Ebenfalls wurde eine Positiv-Kontrolle eines Haushaltsgens mitgeführt. Hierbei handelt es sich um ACTB, welches auch Beta-Aktin genannt wird, ein Gen, das in allen menschlichen Körperzellen exprimiert wird und somit immer einen Ausschlag in den späteren Auswertungen zeigen musste. Ansonsten war davon auszugehen, dass keine Erbinformation in die Wells der Platte gelangt war und so musste auch in diesem Falle der Versuch wiederholt werden.

Dieses Haushaltsgen ändert seine Expression auch dann nicht, wenn äußere Einflüsse wie beispielsweise eine Bestrahlung auf die Zelle einwirken. Zudem können sie für eine beliebige Anzahl an Zielgenen zur Normalisierung verwendet werden.

Alle Pipettierschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen mit der Durchführung der Schritte auf einer sterilen Bank und Pipettenspitzen, die extra für die RT-PCR geeignet waren, um einer Verunreinigung vorzubeugen.

Nachdem die Befüllung der Platte abgeschlossen und ein sicherer Verschluss der Proben mit einer geeigneten Folie gewährleistet wurde, wurde die Platte für 5 Minuten bei 500x g zentrifugiert. Anschließend konnte mit der eigentlichen RT-PCR begonnen werden, wofür die Platte mit Hilfe des Applied Biosystems StepOne Realtime-PCR Cycler Systems ausgewertet wurde, was in einem Zeitintervall von ca. 2 Stunden vonstatten ging.

PROBE1			PROBE2			PROBE3			PROBE4		
ZEB1	ZEB1	ZEB1									
CDH1	CDH1	CDH1									
CDH2	CDH2	CDH2									
CDK1	CDK1	CDK1									
ACTB	ACTB	ACTB									

Tabelle 1: Darstellung der Befüllung einer 96 Well Platte

2.3.5 Ermittelte Werte der quantitativen RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR werden zwei Werte während der exponentiellen Phase, auch log-Phase genannt, ermittelt.

1. Threshold: jener Wert, bei dem die fluorogene Aktivität erstmals über die reine Hintergrundaktivität ansteigt (Schwellenwert für diese Arbeit standardmäßig 340,19)
2. CT-Wert: derjenige RT-PCR-Zyklus, der ausreicht, um die Threshold zu erreichen; er ist proportional zu den in der Probe vorhandenen DNA-Kopien [162].

Je mehr DNA in der Probe enthalten war, je mehr Kopien entstanden, desto schneller erfolgte die Anreicherung der Fluorogene und umso schneller wurde die Hintergrundaktivität überschritten.

Andere Methoden ermitteln die DNA-Menge im Bereich der Plateauphase und nicht wie die RT-PCR in der Log-Phase. Dies führt zu einer Reihe von Komplikationen, welche die RT-PCR somit umgeht [168].

Um Störfaktoren, die zur fehlerhaften Interpretation der ermittelten Expression führen könnten, auszuklammern, wurde bei jeder Probe eine Kontrollprobe mitgeführt. Das heißt, es wurde neben der Expression eines Zielgens auch die Expression eines Referenzgens ermittelt. Zu dieser internen Kontrolle wurde dann das Zielgen in ein relatives Verhältnis gesetzt [169].

Für jede Patientenprobe wurden 3 CT-Werte ermittelt, die dann untereinander verglichen wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass mindestens zwei der drei ermittelten Werte nicht weiter als eine Standardabweichung von 0,25 auseinanderlagen. Konnte dies nicht gewährleistet werden, wurde der Versuch wiederholt.

2.3.6 Auswertung mit Hilfe der Δ CT-Methode und Bestimmung der Expressionswerte

Die Δ CT Methode wird verwendet, um den Unterschied der Expression zwischen dem Zielgen und dem Kontrollgen zu berechnen. Es handelt sich um ein mathematisches Verfahren bei dem die Differenz des CT-Wertes zwischen Referenzgen und Zielgen gebildet wird, wobei ersteres von letzterem abgezogen wird [169]. In der folgenden Formel ist die Berechnung für ein Gen bei einem Patienten/ Template exemplarisch dargestellt. Ebenfalls ist die Formel für die Berechnung des Δ CT Wertes des Normalhirngewebes aufgeführt:

Berechnung des Δ CT Wertes
$\Delta \text{ CT Template} = \frac{CT\text{-Wert 1 Template} + CT\text{-Wert 2 Template}}{2} - \frac{CT\text{-Wert 1 Kontrollgen} + CT\text{-Wert 2 Kontrollgen}}{2}$
$\Delta \text{ CT Normalhirn} = \frac{CT\text{-Wert 1 Normalhirn} + CT\text{-Wert 2 Normalhirn}}{2} - \frac{CT\text{-Wert 1 Kontrollgen} + CT\text{-Wert 2 Kontrollgen}}{2}$

Der Δ CT-Wert gibt die unterschiedliche Expression zwischen Ziel- und Referenzgen als n-fache Expression an, wodurch der relative Unterschied zwischen dem Kontrollgen ACTB und dem jeweils untersuchten Zielgen ermittelt wird.

Erhält man einen negativen/kleineren ΔCT -Wert, so gibt dies an, dass zur Fluoreszenzmessung der Kontrolle mehr Zyklen notwendig waren als zur Ermittlung des Templates. Der ΔCT -Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der Template-DNA. Umso niedriger also der ΔCT -Wert, desto mehr Nucleinsäure ist in der Probe vorhanden. Bildet man nun von diesem Wert die Exponentialfunktion erhält man den Expressionswert, wobei sich bei negativerem ΔCT -Wert ein entsprechend höherer Expressionswert ergibt, als bei weniger negativen ΔCT -Wert.

Berechnung Expression
Expressionswert= $2^{-\Delta CT}$

Im Anschluss wurden die Mittelwerte der Genexpression im Tumor und die Mittelwerte der Genexpression im Normalhirngewebe gebildet und miteinander verglichen.

2.3.7 Materialien der RT-PCR und ihrer Vorbereitungsschritte (siehe Anhang)

2.4 Immunhistochemie, Definition

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, um mit spezifischen Antikörpern Strukturen im Zielgewebe zu detektieren (Antigen-Antikörper-Reaktion) und mikroskopisch sichtbar zu machen. Bekannt ist sie bereits seit den 1930er Jahren, die ersten richtigen Studien wurden allerdings erst im Jahre 1942 von Conns et al. durchgeführt [170].

Prinzipiell besteht eine immunhistochemische Färbereaktion aus drei Teilschritten:

- (1) Vorbehandlung des Gewebes, um die Strukturen freizulegen, die später dargestellt werden sollen.
- (2) Inkubation mit einem primären Antikörper, welcher sich spezifisch gegen die gesuchten Epitope (antigene Bindungsstellen) richtet.
- (3) Visuelle Darstellung mittels einer Farbreaktion.

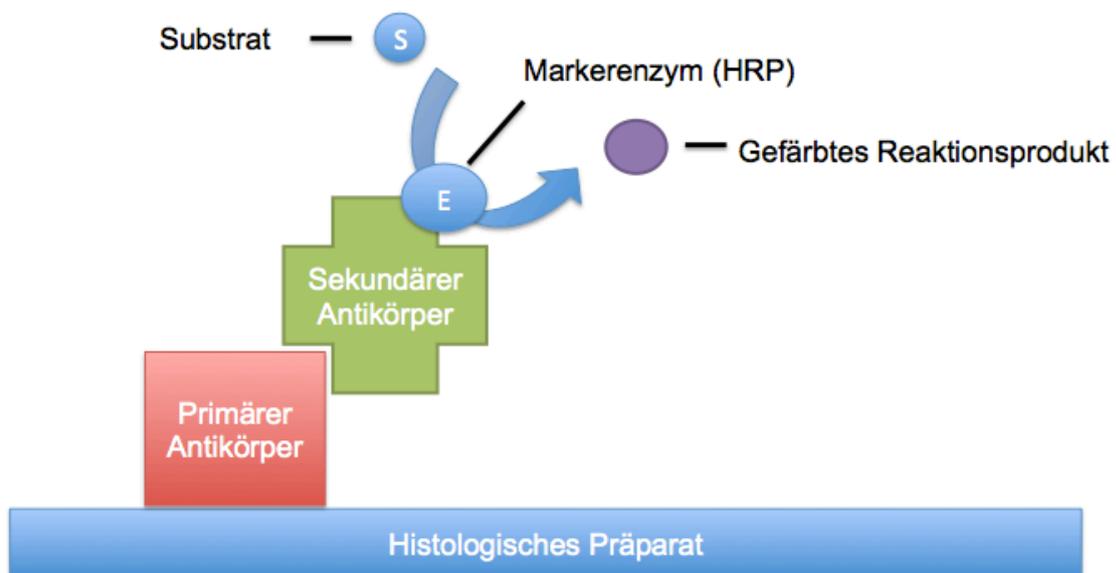


Abbildung 7 Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Färbereaktion

Für die immunhistochemischen Färbungen liegen standardisierte Protokolle vor, wobei die Einzelschritte dem jeweiligen Gewebe und Antikörper anzupassen sind. Dabei sind insbesondere die Antikörperverdünnung und die Vorbehandlung des Gewebes anzupassen.

Bei der vorliegenden Arbeit sollten Antikörper neu an den Schnitten von Glioblastom-Patienten etabliert werden. Dafür wurde formalinfixiertes humanes Gewebe, welches in Paraffin eingebettet vorlag, verwendet.

2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte (Protokoll siehe Anhang)

2.4.2 Entparaffinierung der Schnitte (Protokoll siehe Anhang)

2.4.3 Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitte (Protokoll siehe Anhang)

2.4.4 Hitzeinduzierte Demaskierung des Antigens

Abhängig von dem jeweiligen Antikörper war eine hitzeinduzierte Demaskierung notwendig. Hierbei wurde für jeden einzelnen Antikörper der optimale Puffer einschließlich pH-Wert an positivem Kontrollgewebe etabliert. Es wurden zwei unterschiedliche Puffersysteme verwendet:

1. Citrat-Puffer pH = 6,0
2. Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (EDTA-Puffer) pH = 9,0

Vorgehen:

- Dampfgerar mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) bis zur Markierung befüllen.
- Küvette mit dem entsprechenden Puffer befüllen und für 15 min in einem Dampfgerar der Firma Braun vorwärmen.
- Schnitte in der vorgewärmten Küvette positionieren und 15 min lang kochen.
- Nach Ablauf der 15 min die Küvette aus dem Dampfgerar entnehmen, den Deckel entfernen und für weitere 15 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen.

Der genaue Wirkmechanismus der Hitzeeinwirkung ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Allerdings scheint die Hitze einen Teil der Schäden, welche durch die Fixierung in Formalin und die Paraffineinbettung erzeugt werden, rückgängig zu machen und einige chemische Quervernetzungen wieder aufzubrechen, wobei andere erhalten bleiben. Dieser Aspekt ist Teil einiger Studien [171], [172].

Um die Anzahl der unspezifischen Reaktionen zu reduzieren wurden alle Schnitte anschließend mehrmals gewaschen:

- Jeweils dreimal für 2 Minuten mit Aqua dest. waschen.
- Peroxidaseblock, indem die Schnitte für 8 Minuten in 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2 -Lösung) gestellt werden.
- Erneut dreimal mit Aqua dest. waschen.
- Dreimal mit einem Waschpuffer der Firma DCS (Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG) (WL583C0500) waschen durch dessen Verwendung laut Herstellerangabe die Notwendigkeit eines weiteren Proteinblocks, wie zum Beispiel Biotin, entfällt [171].

2.4.5 Einwirken des Primärantikörpers

Bevor der Primärantikörper einsatzbereit war, musste dieser für den Fall, dass er eingefroren portioniert vorlag, für 20 Sekunden zentrifugiert werden.

Nachdem die Vorbehandlung der Schnitte abgeschlossen war, konnte mit der Inkubation des Primärantikörpers fortgefahren werden:

1. Präparate aus dem Waschpuffer nehmen und mit einem Papiertuch trocken tupfen.
2. Mit einem Pap Pen umranden, der später verhindern soll, dass der Antikörper von dem Objektträger läuft.
3. Pipettieren von 200 μ l des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet werden muss (die jeweilige Verdünnung wurde vorher an einem Kontrollgewebe etabliert).
4. Einwirken des Primärantikörpers bei Raumtemperatur in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer für 60 Minuten.
5. Nach Ablauf der 60 Minuten: Erneut dreimal mit Waschpuffer der Firma DCS (WL583C0500) für 20 Minuten waschen.

Verwendete Antikörper

Name	Nummer und Hersteller	Kontrollgewebe	Verdünnung/ Expression	Vorbehandlung
Anti-AREB6(3G6)-N-terminal, monoklonaler Maus-AK	ab180905, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Lungenadenokarzinom	1:500 nukleär	Citratpuffer pH=6,0
Anti-E-Cadherin, polyklonaler Kaninchen-AK	ab15148, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Hautgewebe	1:100 zytoplasmatisch	Citratpuffer pH=6,0
Anti-N-Cadherin, monoklonaler Maus-AK	ab98952, Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humaner Herzmuskel	1:2000 membranös/ zytoplasmatisch	Citratpuffer pH=6,0
Anti-CDK1 (phosphoT14), monoklonaler Kaninchen-AK	ab183550 Abcam Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA	Humanes Kolongewebe	1:500 nukleär/ zytoplasmatisch	EDTA-Puffer pH=9,0

2.4.6 Einwirken des Sekundärantikörpers

Verwendet wurde das DCS HRP-Polymer-Enhancer Kit DCS SuperVision 2 (2-Schritt HRP-Polymer-Kit mit DAB):

1. Inkubation mit Polymer-Enhancer für 20 Minuten in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer bei Raumtemperatur; hierfür wurden 3 Tropfen auf jedes Präparat getropft.
2. Waschen mit Waschpuffer der Firma DCS (WL583C0500) (3x für jeweils 2 Minuten).
3. Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP)-Polymer-Reagenz für ebenfalls 20 Minuten; auch hier wurden pro Präparat 3 Tropfen der Reagenz verwendet.

Bei der Meerrettichperoxidase handelt es sich um ein Enzym, welches aus der Wurzel der Meerrettichpflanze extrahiert wird und aus 308 Aminosäuren besteht.

Als aktives Zentrum besitzt es eine Hämingruppe, eine eisenhaltige Hämgruppe, welche einen Komplex mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bildet, welches dann in Wasser und Sauerstoff zerfällt. Die Meerrettichperoxidase aktiviert Peroxide, oxidiert verschiedene Gruppen und ist zudem ein Elektronendonator in Redox-Reaktionen [173], [174].

Durch die Verknüpfung mit dem Sekundärantikörper katalysiert dieses Enzym die gewünschte Farbreaktion bei der Zugabe eines entsprechenden Chromogens.

2.4.7 Antigen-Antikörper-Reaktion

In dieser Arbeit wurde eine indirekte Zwei-Schritt Detektionsmethode verwendet. Eines der ältesten Anwendungsgebiete dieser Methode ist der Nachweis von Autoimmunantikörpern im menschlichen Serum zum Beispiel zum Nachweis von Lupus erythematodes.

In einem ersten Schritt bindet sich ein unkonjugierter primärer Antikörper an das jeweilige Antigen. Dieser primäre Antikörper stammte in dieser Studie entweder von der Maus oder vom Kaninchen. Entsprechend musste der Sekundärantikörper, der sich gegen den primären Antikörper richtet, gegen Maus oder Kaninchen gerichtet sein. Das verwendete Kit von DCS deckt dabei beide Varianten ab, sodass es nicht notwendig war, zwei verschiedene Systeme zu verwenden.

2.4.8 Visualisierung des Antikörpers

Danach schloss sich die Substrat-Chromogen-Reaktion an. Hierfür wurden die Schnitte für 7 Minuten mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der enzymgekoppelte Sekundärantikörper sich an den primären Antikörper angelagert hatte, das gesuchte Antigen somit in der Probe vorhanden war, konnte die Meerrettichperoxidase das DAB umsetzen und eine Farbreaktion erzeugen. Dieses Endprodukt ist in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich, was notwendig war, da die Präparate zum Eindecken wieder durch die Alkoholreihe gezogen wurden.

2.4.9 Kernfärbung (Protokoll siehe Anhang)

2.4.10 Entwässern und Eindecken (Protokoll siehe Anhang)

2.4.11 Fehlerkontrolle

Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das Zielgewebe ausschließen zu können, wurde bei jeder neu durchgeführten Gliomfärbung nicht nur ein Schnitt des Kontrollgewebes mit primärem Antikörper, sondern auch ein Schnitt ohne primären Antikörper mitgeführt. Zeigte sich bei diesem Schnitt keine Farbreaktion, konnte von einer spezifischen Bindung des primären und des sekundären Antikörpers ausgegangen werden.

2.4.12 Semiquantitative Auswertung der Proteinexpression an immunhistochemischen Schnitten

Die Präparate wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung ausgewertet (Mikroskop Leica DMLB; Leica Mikroskopie & Systeme GmbH Wetzlar; Type: 020-519.511).

Dabei wurde zunächst am HE-Schnitt der Tumor beurteilt. Bei der semiquantitativen Analyse wurde die Proteinexpression an Stellen mit hoher Expression im Tumorgewebe analysiert. Es wurden drei Areale bei einer 40-fachen Vergrößerung fotografiert (Kamera der Firma Nikon: Digital Sight Nikon DS-L2) und mit Hilfe des Programmes ImageJ (Version 10.2, <http://developer.imagej.net>) analysiert.

Die Auswertung der Gene ZEB1, CDH1 und CDK1 beziehungsweise ihrer Genprodukte erfolgte in zwei Schritten:

1. Es wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen, unter Ausschluss von nekrotischen Arealen sowie der Invasionszone, innerhalb des Tumors bestimmt. Dabei wurden alle Zellen der drei Präparate kumulativ aufaddiert.
2. Im Anschluss wurde die Farbintensität der Antikörperexpression anhand eines vorher erstellten Farbschemas beurteilt, wobei folgende Zahlencodes galten:
0 = gar keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung und
3 = starke Färbung. Zur Ermittlung des Expressionswertes wurde die Intensität mit der prozentualen Anzahl der gefärbten Zellen multipliziert, wobei bis zu 10% der gefärbten Zellen einem Wert von 1, bis zu 20% einem Wert von 2 und so weiter entsprachen. Alle ermittelten Werte wurden im Anschluss in eine Excel-Tabelle übertragen.

Es ergaben sich mit diesem Verfahren Werte zwischen einer minimalen Expression von 0 und einer maximalen Expression von 30. Diese ermittelten Werte werden im Rahmen der Arbeit als IHC-Score bezeichnet.

Da der vierte gegen N-Cadherin gerichtete Antikörper zytoplasmatisch anfärbt und somit die einzelnen Zellgrenzen nicht mehr gegeneinander abgrenzbar waren, wurde bei diesem lediglich die Intensität der Färbung ermittelt und auf den ersten Schritt, die Auszählung der einzelnen Zellen, verzichtet. Hier wurden demnach lediglich Werte zwischen 0 und 3 ermittelt.

2.4.13 Verbrauchsmaterialien Immunhistochemie (siehe Anhang)

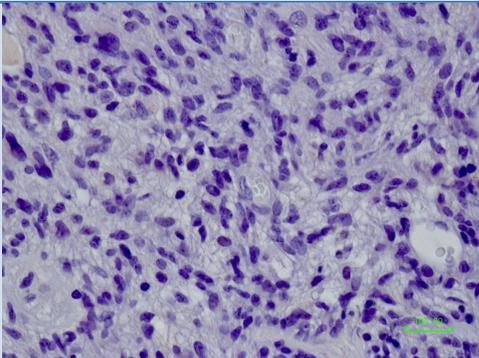
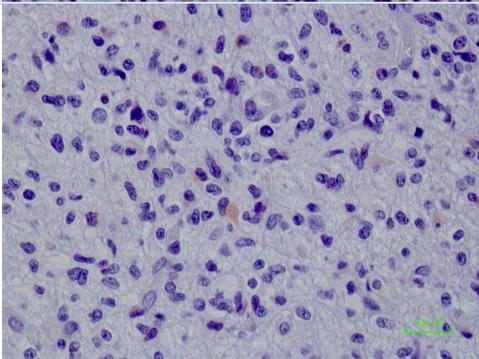
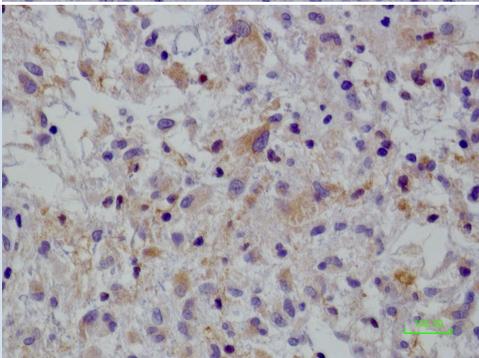
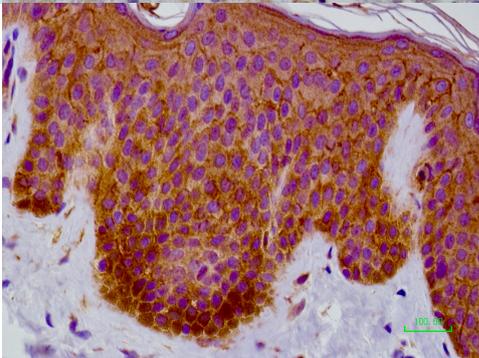
2.4.14 Rezepte und Ansätze (siehe Anhang)

2.5 Farbintensitätsschemata der Proteinexpression

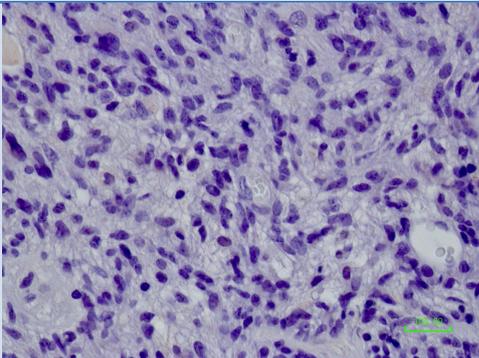
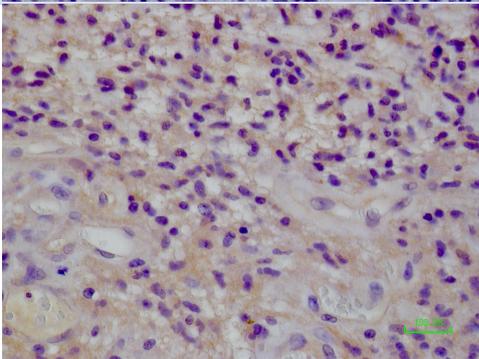
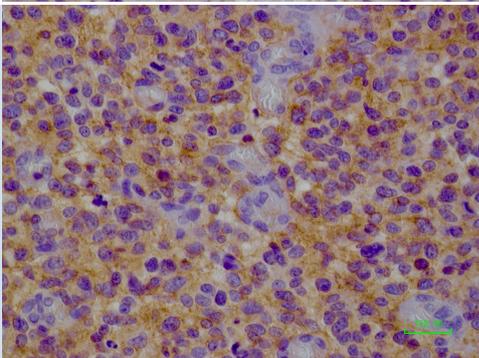
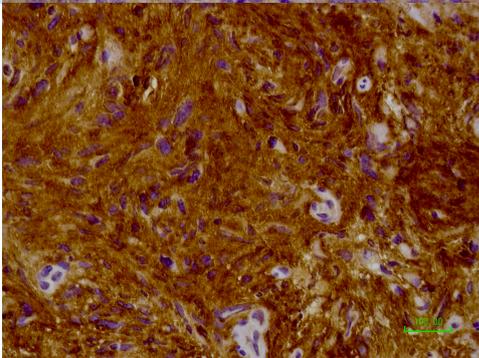
2.5.1 ZEB1 (AREB6)

Farbintensität	Expression	Anzahl der positiven Zellen	
		Wert	
0= keine Färbung (Glioblastom)	10,00%	1	
	20,00%	2	
	30,00%	3	
	40,00%	4	
	50,00%	5	
	60,00%	6	
	70,00%	7	
	80,00%	8	
	90,00%	9	
	100,00%	10	
1= schwache Färbung (Glioblastom)			
2= mäßige Färbung (Glioblastom)			
3= starke Färbung (Glioblastom)			

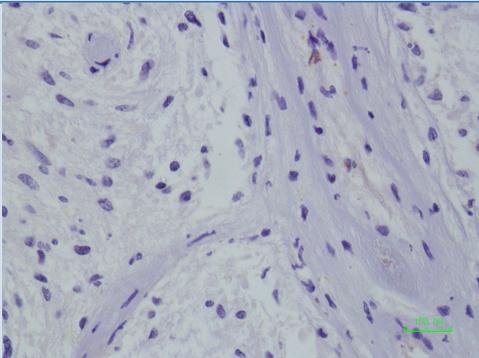
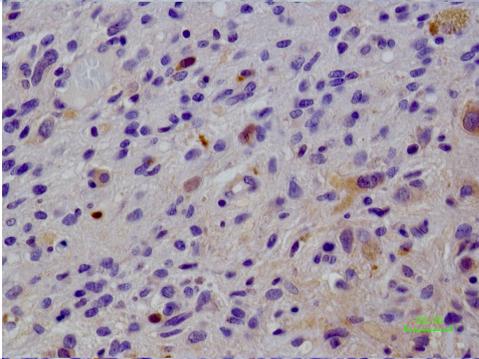
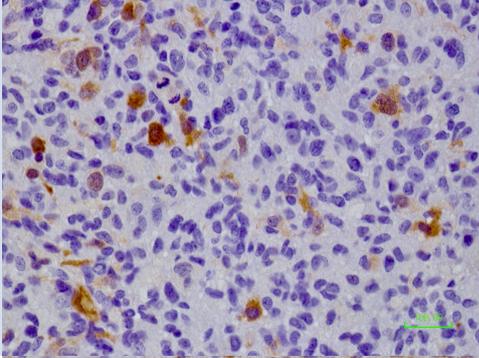
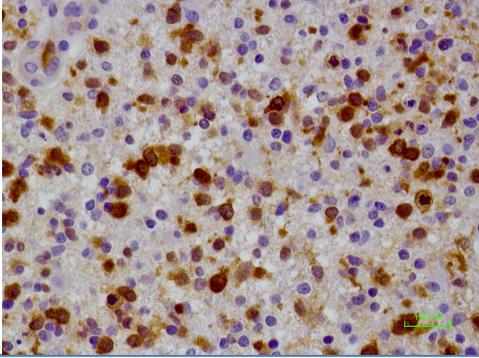
2.5.2 E-Cadherin (CDH1)

Farbintensität		Expression	
		Anzahl der positiven Zellen	Wert
0= keine Färbung (Glioblastom)		10,00%	1
		20,00%	2
		30,00%	3
		40,00%	4
		50,00%	5
		60,00%	6
		70,00%	7
		80,00%	8
		90,00%	9
		100,00%	10
1= schwache Färbung (Glioblastom)			
2= mäßige Färbung (Glioblastom)			
3= starke Färbung (Plattenepithel der Haut)			

2.5.3 N-Cadherin (CDH2)

Farbintensität		Expression	
		Anzahl der positiven Zellen	Wert
0= keine Färbung (Glioblastom)		10,00%	1
		20,00%	2
		30,00%	3
		40,00%	4
		50,00%	5
		60,00%	6
		70,00%	7
		80,00%	8
		90,00%	9
		100,00%	10
1= schwache Färbung (Glioblastom)			
2= mäßige Färbung (Glioblastom)			
3= starke Färbung (Glioblastom)			

2.5.4 CDK1

Farbintensität	Expression	Expression	
		Anzahl der positiven Zellen	Wert
0= keine Färbung (Glioblastom)		10,00%	1
		20,00%	2
		30,00%	3
		40,00%	4
		50,00%	5
		60,00%	6
		70,00%	7
		80,00%	8
		90,00%	9
		100,00%	10
1= schwache Färbung (Glioblastom)			
2= mäßige Färbung (Glioblastom)			
3= starke Färbung (Glioblastom)			

3. Statistische Methode

Zur Statistikberechnung kamen die Programme IBM SPSS Statistics 24 und Microsoft® Excel 2010 zum Einsatz. Für die deskriptive Statistik wurden relative und absolute Häufigkeiten ermittelt. Des Weiteren wurden Mittelwerte, Median, Standardabweichungen, Minimum, Maximum, obere und untere Quartile sowie das 95% Konfidenzintervall berechnet. Vor Beginn des t-Tests für unabhängige/unverbundene Stichproben wurde zur Signifikanzberechnung auf Normalverteilung geprüft. Zur abschließenden Analyse erfolgte als Erweiterung eine einfaktorische Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA). Für den Fall, dass keine Normalverteilung gegeben war, wurden als nicht parametrische Tests der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U Test angewandt. Das α -Signifikanzniveau wurde mit $\alpha < 0,05$ definiert. Graphisch erfolgte eine Verarbeitung der Daten mittels Balken- und Liniendiagrammen.

Die Beziehung zwischen der jeweiligen Genexpression, progressionsfreiem- und Gesamtüberleben wurden mit der Kaplan-Meier Methode und dem Log-rank Test analysiert. Für jedes der untersuchten Gene wurde dabei ein Mittelwert und ein Median über alle Genexpressionswerte berechnet. Auf diesem Wege war es möglich jeweils eine „low“- Genexpressionsgruppe und eine „high“-Genexpressionsgruppe der von uns untersuchten Gene zu erstellen, wobei die Zuordnung durch den vorher errechneten Mittelwert und im Vergleich zum Median erfolgte. Proben mit Expressionswerten unter dem Mittelwert beziehungsweise dem Median wurden in die „low“-Gruppe, solche mit Expressionswerten oberhalb des Mittelwertes/Medians in die „high“-Gruppe eingeordnet. Die Auswertungen zeigten sowohl in Bezug auf den Mittelwert als auch in Bezug auf den Median vergleichbare Werte. Prinzipiell ist der Mittelwert als der präzisere Wert anzusehen. Diese Präzision wird in der Statistik als Effizienz bezeichnet. Allerdings reagiert der Mittelwert sensibler auf Ausreißer und Messfehler. Weist das untersuchte Kollektiv eine weite Streubreite auf, ist der Median auf Grund seiner Unempfindlichkeit gegenüber Ausreißern von Vorteil. Dieses Phänomen nennt man Robustheit [175]. Da in unserem Patientenkollektiv Streuungen vorlagen, wurde sich für die Betrachtung des Medians im Hinblick auf die oben beschriebene Gruppenbildung entschieden.

Die anschließende Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson wobei r per Definition zwischen -1 und +1 liegt. Bei einem Wert von 1 liegt somit ein perfekter positiver linearer Zusammenhang, bei Werten von -1 ein perfekter negativer linearer Zusammenhang vor. Betrug der Wert 0 bestand kein linearer Zusammenhang.

4. Ergebnisse

Es wurden die Tumorproben von 44 Patienten (♂ 30, ♀ 14) mit der histologisch gesicherten Diagnose eines primären Glioblastoma multiforme untersucht. Das Durchschnittsalter betrug $63,8 \pm 11,5$ Jahren (♂ $64,3 \pm 12,4$ Jahre, ♀ $62,9 \pm 9,5$ Jahre). Zwei Patienten wurden zunächst biopsiert, alle Patienten wurden reseziert und konkomitant radiochemotherapiert.

Bei 40 Patienten (27 Männer, 13 Frauen) lag eine IDH1-Mutation vom Wildtyp vor und bei 4 Patienten (3 Männer, 1 Frau) war keine Aussage, auch nach mehrmaliger Nachbestimmung durch die Neuropathologie, bezüglich einer IDH1-Mutation möglich.

Bei 24 Patienten (14 Männer, 10 Frauen) konnte ein positiver MGMT-Methylierungsstatus nachgewiesen werden.

Abhängig von der MGMT-Promotormethylierung zeigten sich bei den Patienten Unterschiede in Bezug auf das Gesamt- (overall survival/OS) sowie das progressionsfreie Überleben (Progression Free Survival/ PFS).

Die progressionsfreie Zeit betrug im Gesamtkollektiv $6,56 \pm 8,47$ Monate. In Bezug auf die MGMT-Promotormethylierung zeigte sich ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben ($p=0,002$) bei den Patienten mit MGMT-Promotormethylierung (Median 9,17 Monate) zu den nicht MGMT-Promotor methylierten Patienten (Median von 4,73 Monaten).

Die Gesamtüberlebenszeit betrug im Schnitt $15,8 \pm 20,2$ Monate. Stratifiziert nach der MGMT-Promotermethylierung ergab sich ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p=0,005$) für Patienten mit MGMT-Promotormethylierung (Median von 13,74 Monaten) im Vergleich zu den nicht MGMT-Promotor methylierten Patienten (Median von 9,17 Monaten, s. Abb. 8).

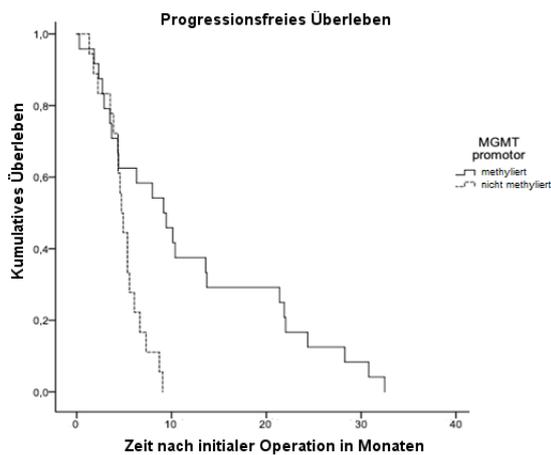
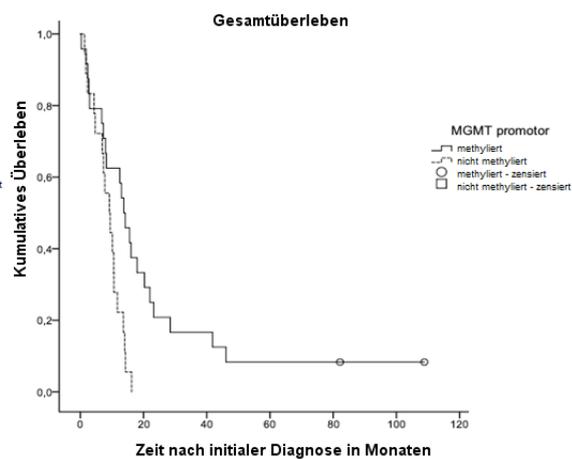
A**B**

Abbildung 8 **A:** Progressionsfreie Zeit des Gesamtkollektives stratifiziert nach MGMT-Promotormethylierung. Median von 9,17 Monaten bei positivem Methylierungsstatus und 4,73 Monaten bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung ($p=0,002$). **B:** Überlebenszeit des Gesamtkollektives stratifiziert nach MGMT-Promotormethylierung. Median von 13,74 Monaten bei positivem MGMT-Methylierungsstatus und 9,17 Monaten bei negativem MGMT-Methylierungsstatus ($p=0,005$).

4.1 Genexpression der untersuchten Gene im GBM im Vergleich zum Normalhirngewebe

Im Rahmen dieser Studie wurden 44 Glioblastomtumorpräparate mit 5 Normalhirngewebepreparaten verglichen mit der Fragestellung, ob es veränderte Gen- und Proteinexpressionsmuster im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Hirngewebe gibt. Bei einem Patienten lag sowohl Material seines primären Tumors als auch des Rezidives vor ($n=45$ in der Immunhistochemie). Einige Patienten mussten aus der Studie im Verlauf auf Grund von mangelndem Material ausgeschlossen werden. In der qRT-PCR konnten für die Gene ZEB1 und CDK1 in 38 bzw. 37 Probenwerte ermittelt werden, für CDH1 in 39 Proben, für CDH2 in 36 Proben. Diese Ergebnisse konnten mit fünf Normalhirngewebeproben verglichen werden. Es wurde zunächst keine Stratifizierung bezüglich des MGMT-Methylierungsstatus durchgeführt.

ZEB1

Das Expressionslevel von ZEB1 im Glioblastom unterschied sich signifikant von dem im Normalhirngewebe (s.Abb.10). Hierbei zeigte sich hoch signifikant ($p=0,0003$) eine stärkere Expression von ZEB1 im Glioblastomgewebe mit einem Mittelwert von $21,71 \pm 6,96$ (IHC-Score) in der Immunhistochemie. Im Normalhirngewebe wurden nur sehr niedrige Expressionen nachgewiesen (IHC $3 \pm 3,94$). In der RT-PCR wurde dies tendenziell, wenn auch nicht signifikant, bestätigt. Es zeigte sich eine höhere

Expression im Glioblastomgewebe gegenüber der Expressionsrate im normalen Hirngewebe (Mittelwert Glioblastom $0,81 \pm 1,98$ vs. Mittelwert Normalhirngewebe $0,7 \pm 0,98$, $p=0,26$).

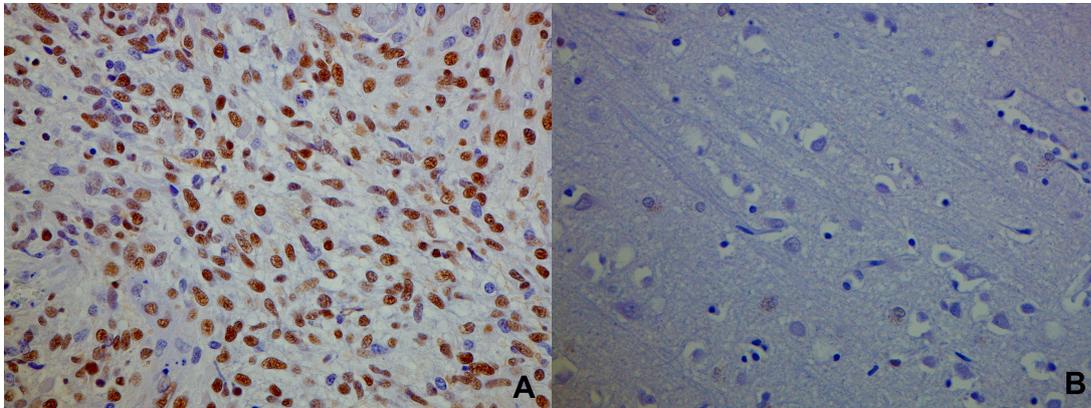


Abbildung 9 Starke nukleäre Expression des Gens ZEB1 im Glioblastom (A) im Vergleich zum Cortexgewebe einer Normalhirnprobe (B) (40-fache Vergrößerung).

CDH1/E-Cadherin

E-Cadherin wurde auf der Proteinexpressionsebene und damit in der Immunhistochemie signifikant höher im Glioblastomgewebe exprimiert mit einem p-Wert von $p < 0,001$ im Vergleich zum Normalhirngewebe. Der Mittelwert für E-Cadherin betrug dabei $4,96 \pm 4,23$ im Glioblastom und $0,4 \pm 0,55$ im Normalhirngewebe. Dies zeigte sich auch in der RT-PCR. Der Mittelwert im Glioblastom für CDH1 betrug $0,46 \pm 2,03$ und im Normalhirngewebe $0,03 \pm 0,05$ ($p=0,39$) (s.Abb.10).

CDH2/N-Cadherin

Das Expressionslevel für N-Cadherin ergab in der Immunhistochemie eine signifikant höhere Expression im Glioblastomgewebe ($p=0,001$) im Vergleich zum Normalhirn mit einem Mittelwert von $1,84 \pm 0,52$ im Glioblastom und einem Mittelwert von $0,8 \pm 0,45$ im Normalhirn. In der RT-PCR zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied der Genexpression von CDH2 im Glioblastom im Vergleich zum Normalhirngewebe (Mittelwert RT-PCR im Glioblastom $0,95 \pm 1,67$ vs. $0,55 \pm 0,87$ im Normalhirngewebe, $p=0,43$) (s.Abb.10).

CDK1

Für CDK1 ergab sich sowohl in der RT-PCR als auch in der Immunhistochemie eine signifikant höhere Expression im Glioblastomgewebe im Vergleich zum Normalhirngewebe ($p < 0,001$ IHC, $p=0,001$ RT-PCR). Der Mittelwert in der Immunhistochemie betrug dabei $5,84 \pm 4,1$ im Glioblastom und $1 \pm 0,71$ im

Normalhirngewebe . In der RT-PCR zeigte sich im Glioblastomgewebe ein Mittelwert von $1,21 \pm 5,14$ im Vergleich zu einem Mittelwert von $0,0014 \pm 0,0005$ im Normalhirngewebe (s.Abb.10).

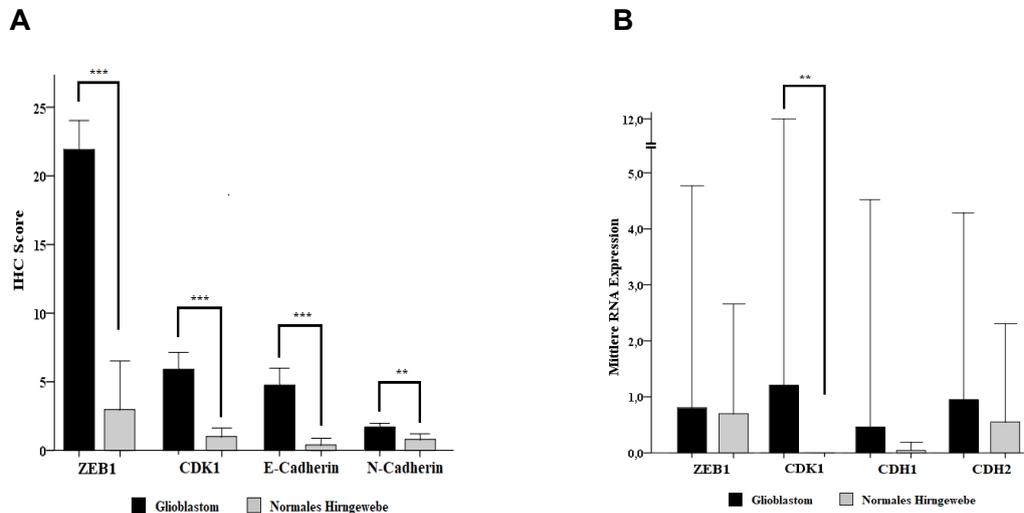


Abbildung 10 Expressionslevel auf (A) Protein- und (B) RNA-Ebene im Normalhirngewebe im Vergleich zum Glioblastom. Signifikant erhöhte Expression von ZEB1 ($p=0,0003$), CDK1 ($p<0,001$), CDH1 ($<0,001$) und CDH2 ($p=0,001$) im GBM im Vergleich zum Normalhirngewebe in der Immunhistochemie, sowie signifikant erhöhte Expression von CDK1 auf der Genebene nachgewiesen mittels RNA Expression ($p=0,001$).

Im Anschluss wurde eine Stratifizierung nach dem MGMT-Methylierungsstatus vorgenommen und ein Mittelwertvergleich durchgeführt um zu analysieren, ob eine unterschiedliche Genexpression zwischen den MGMT-Promotor methylierten Tumorproben und den nicht-MGMT-Promotor methylierten Tumorproben bestand.

ZEB1

In der Immunhistochemie zeigte sich für die MGMT-Promotormethylierten Tumorproben (Gesamtzahl der Proben 24) ein Mittelwert von $21,08 \pm 7,11$, für die nicht-MGMT-Promotormethylierten (Gesamtzahl der Proben 21) ein Mittelwert von $22,43 \pm 6,88$ ($p=0,49$). Für die RT-PCR ergaben sich folgende Werte: Mittelwert der MGMT methylierten Proben (Gesamtzahl 22) $1,24 \pm 2,5$ und für den Mittelwert der nicht-MGMT methylierten Proben (Gesamtzahl 16) $0,21 \pm 0,48$ ($p=0,078$). Es lag somit keine signifikant unterschiedliche ZEB1-Proteinexpression zwischen diesen beiden Gruppen vor, wobei sich auf der Genexpressionsebene abzeichnete, dass MGMT-Promotormethylierte Patienten eine höhere ZEB1 Expression aufwiesen als solche ohne Promotormethylierung (s.Abb.11).

CDH1/E-Cadherin

Die Genexpressionsmenge in Bezug auf das CDH1 Gen und das damit verbundene Genprodukt E-Cadherin unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den MGMT-Promotormethylierten Tumorproben (Gesamtzahl IHC 24, RT-PCR 22) und solchen ohne MGMT-Promotormethylierung (Gesamtzahl IHC 21, RT-PCR 17). Die Mittelwerte betragen in der Immunhistochemie bei positivem MGMT-Methylierungsstatus $5,33 \pm 4,26$, bei negativem MGMT-Methylierungsstatus $4,52 \pm 4,26$ ($p=0,53$). Für die RT-PCR ergaben sich folgende Werte: MGMT-methyliert $0,62 \pm 2,65$, MGMT-nicht-methyliert $0,26 \pm 0,71$; $p=0,73$) (s. Abb.11).

CDH2/N-Cadherin

Für das Gen CDH2 mit seinem entsprechenden Genprodukt N-Cadherin konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,27$ IHC, $p=0,53$ RT-PCR) in der Expression zwischen den MGMT-methylierten (Gesamtzahl IHC 24, RT-PCR 21) und den nicht-MGMT-methylierten Tumorproben (Gesamtzahl IHC 21, RT-PCR 15), weder in der Immunhistochemie noch in der RT-PCR festgestellt werden (Mittelwerte der MGMT-methylierten Tumorproben: IHC $1,92 \pm 0,41$; RT-PCR $1,12 \pm 2,01$; Mittelwerte der nicht-MGMT-methylierten Tumorproben: IHC $1,76 \pm 0,63$; RT-PCR $0,71 \pm 1,05$) (s. Abb.11).

CDK1

Für das Gen CDK1 zeigte sich im Rahmen der Analyse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie bei den Tumorproben der MGMT-Promotormethylierten (Gesamtzahl 24) ein Mittelwert von $4,96 \pm 2,9$, bei den nicht-MGMT-Promotormethylierten (Gesamtzahl 21) ein Mittelwert von $6,86 \pm 5,02$ ($p=0,17$). In der RT-PCR belief sich der Mittelwert der MGMT-Promotormethylierten Tumorproben (Gesamtzahl 21) auf $2,05 \pm 6,76$, bei den nicht-MGMT-Promotormethylierten (Gesamtzahl 16) betrug der Mittelwert $0,1 \pm 0,31$ ($p=0,095$). Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Gen-/Proteinexpression zu detektieren. Tendenziell zeigte sich jedoch auf der Genexpressionsebene eine höhere CDK1 Expression bei positivem MGMT-Methylierungsstatus (s. Abb.11).

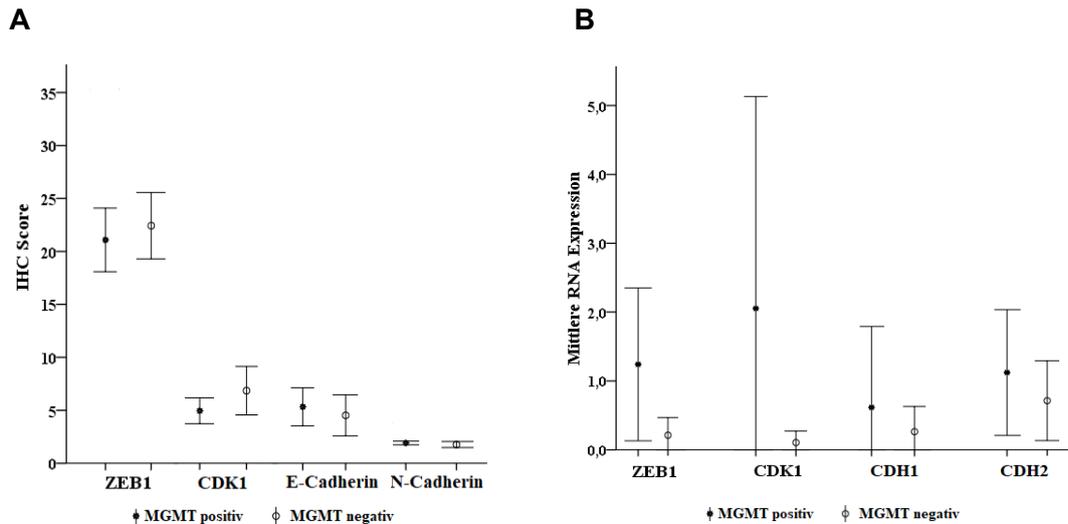


Abbildung 11 Expressionslevel auf (A) Protein- und (B) RNA-Ebene stratifiziert nach MGMT-Promotormethylierungsstatus im Glioblastom. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede sowohl auf Gen- als auch auf Proteinexpressionsebene.

4.2 Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben und deren Korrelation zur Genexpression

Für ZEB1 wurde die Grenze in Bezug auf die *low/high* (niedrig/hoch) Expression in der Immunhistochemie bei 24 angesetzt, da dies dem Median der Expression im Tumorgewebe entsprach. Es zeigte sich nach einer MGMT-Stratifizierung, dass jene Patienten der „*low*“-Expressions-Gruppe (Median ≤ 24) die einen positiven MGMT-Promotorstatus aufwiesen, ein medianes Überleben von 14,25 Monaten zeigten (SE 5,2). Die „*high*“-Expressions-Gruppe (Median > 24) wies ein medianes Überleben von 13,74 Monate auf (SE 0,98, $p=0,781$). Bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung zeigte sich in der „*low*“-Expressions-Gruppe ein medianes Überleben von 9,4 Monaten (SE 1,0) im Vergleich zu 6,94 Monaten (SE 2,4) in der „*high*“-Expressions-Gruppe ($p=0,188$) (s. Abb. 12). Wenn auch nicht signifikant, so lässt sich hieraus die Tendenz ableiten, dass solche Patienten mit negativem MGMT-Promotorstatus ein kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen, wenn ZEB1 stark exprimiert wurde. Auch die MGMT-Promotor methylierten Tumortroben zeigten bei hoher ZEB1-Expression im Median ein verkürztes Gesamtüberleben. Betrachtet man die Aufteilung bezüglich des Progresses, so zeigte sich eine geringfügige Tendenz in Bezug auf das Auftreten eines früheren Progresses bei hoher Genexpression (methyliert: *low* Median 9,44 Monate, SE 4,6; *high* 9,17 Monate, SE 3,74; nicht-methyliert: *low* Median 4,9 Monate, SE 0,56; *high* 4,37 Monate, SE 0,93, nicht dargestellt, s. Anhang).

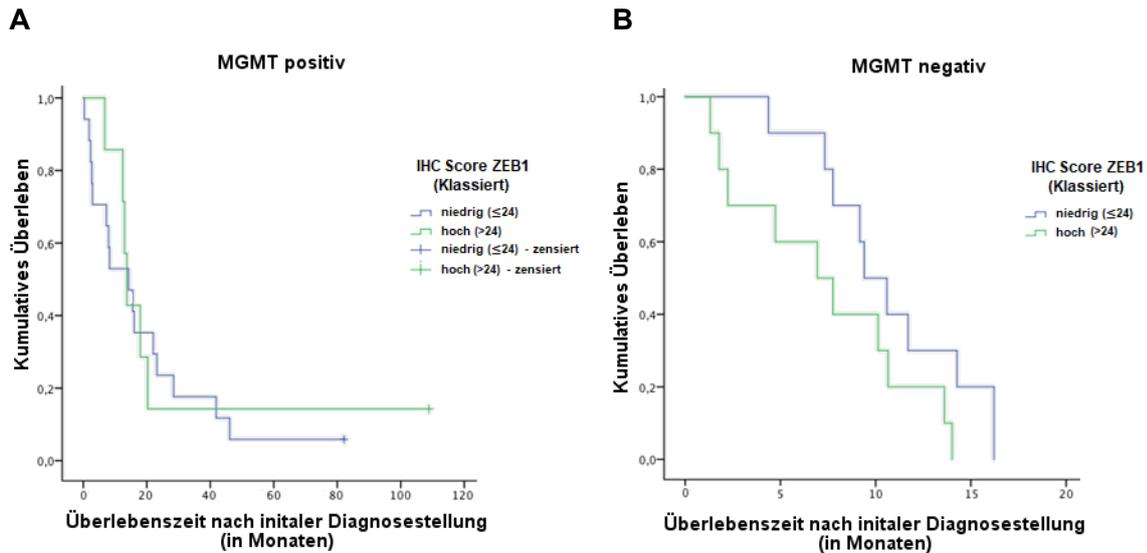


Abbildung 12 Kaplan-Meier Kurve der ZEB1 Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben nach Gruppenbildung in low/high bezüglich des Median in der Immunhistochemie (≤ 24 low, > 24 high). Das Überleben der Patienten ist mit erhöhter ZEB1 Expression bei nicht-methyliertem MGMT-Promotor (B) im Vergleich zu den Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor (A) verkürzt ($p=0,188$).

Für CDH1 beziehungsweise sein Genprodukt E-Cadherin wurden die Grenzen mit ≤ 3 in der „low“-Expressions-Gruppe und > 3 in der „high“-Expressions-Gruppe definiert. Nach einer MGMT-Stratifizierung ergibt sich, dass solche Patienten mit MGMT-Promotormethylierung ein medianes Überleben von 12,99 Monaten (SE 4,18) in der „low“-Gruppe und ein medianes Überleben von 16,01 Monaten in der „high“-Gruppe zeigten (SE 5,34, $p=0,465$, nicht dargestellt, siehe Anhang). Zu einem Progress kam es in der „low“-Gruppe nach 9,17 Monaten (SE 3,61), in der „high“-Gruppe nach 10,39 Monaten (SE 4,38 $p=0,534$, s.Abb.13). Bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung zeigte sich ein medianes Überleben von 7,76 Monaten (SE 2,66) in der „low“- und ein medianes Überleben von 10,13 (SE 0,8) in der „high“-Expressions-Gruppe ($p=0,198$) (nicht dargestellt, siehe Anhang). Betrachtet man in dieser Gruppe das Eintreten eines Progresses, ergab sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung. Solche Patienten mit einer niedrigen E-Cadherin-Expression hatten nach 4,37 Monaten einen Progress, solche mit hoher Expression nach 5,56 Monaten. Bei hoher E-Cadherin-Expression zeigte sich hier eine signifikant längere progressionsfreie Zeit ($p=0,005$, s. Abb.13).

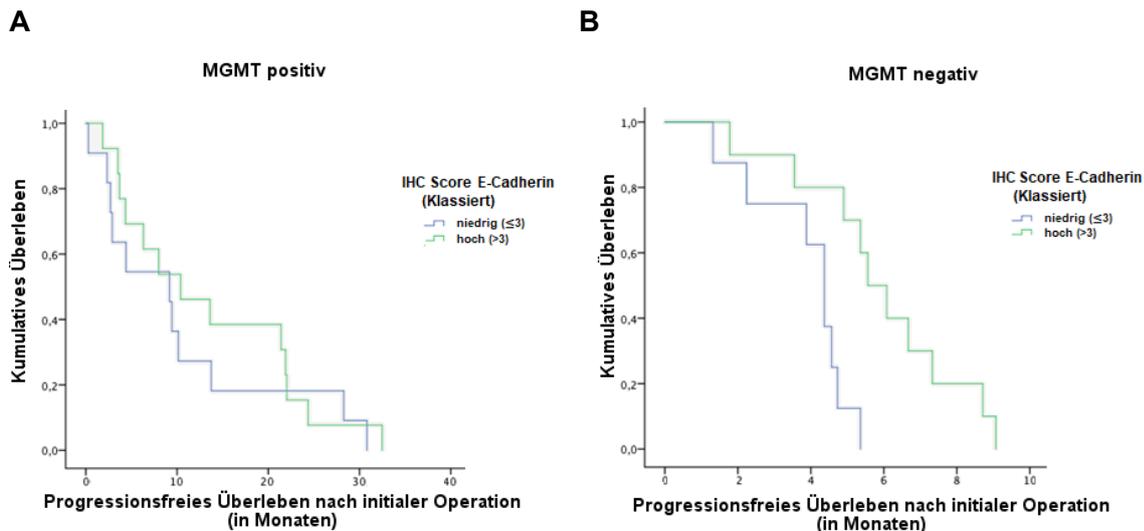


Abbildung 13 Kaplan-Meier Kurve der E-Cadherin-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das progressionsfreie Überleben nach Gruppenbildung in low/high in Bezug auf den Median in der Immunhistochemie (≤ 3 low, >3 high). Patienten, die nicht MGMT-Promotor methyliert sind (**B**) lebten im Vergleich zu den MGMT-Promotor methylierten Patienten (**A**) signifikant länger ohne Progress bei hoher E-Cadherin-Expression ($p=0,005$).

Für das Gen CDH2 beziehungsweise sein Genprodukt N-Cadherin wurden die Grenzen der „low“- und „high“-Gruppe mit Bezug auf den Median wie folgt definiert: „low“-Expressions-Gruppe ≤ 2 , „high“- Expressions-Gruppe > 2 . Stratifiziert man die Ergebnisse nach MGMT, ergibt sich die Tendenz, dass solche Patienten, die einen positiven MGMT-Promotormethylierungsstatus aufwiesen, bei hoher CDH2-Expression kürzer lebten und eher einen Progress zeigten ($p=0,5$) als solche, die das Gen nur wenig bis mässig exprimierten. Deutlicher zeigte sich dies bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung. Diese lebten bei niedriger Expression im Median 9,4 Monate, bei hoher Expression 1,32 Monate ($p < 0,001$, s.Abb.14). Es kam in der „high“-Expressions-Gruppe im Median nach 4,9 Monaten, in der „low“-Expressions-Gruppe nach 1,32 Monaten zu einem Progress ($p < 0,001$) (nicht dargestellt, s.Anhang). Hierbei ist jedoch kritisch anzumerken das die „high“ Expressionsgruppe nur zwei Patienten umfasste.

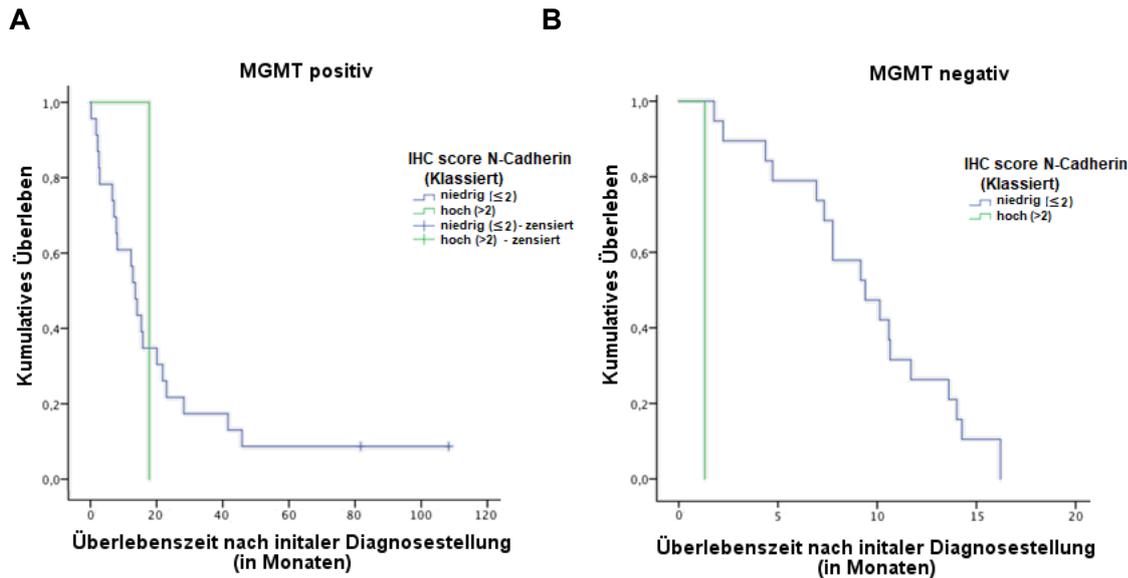


Abbildung 14 Kaplan-Meier Kurve der N-Cadherin-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben nach Gruppenbildung in low/high bezüglich des Median in der Immunhistochemie (≤ 2 low/niedrig, > 2 high/hoch). Das Überleben sowie die progressionsfreie Zeit bei Patienten mit negativem MGMT- Methylierungsstatus (**B**) ist im Vergleich zu den Patienten mit positivem MGMT-Methylierungsstatus (**A**) signifikant verkürzt bei hoher N-Cadherin-Expression ($p < 0,001$).

Für das CDK1 Gen wurde die Grenze bei einer medianen Expression von Werten ≤ 6 als „low“ Expression und von Werten > 6 als „high“ Expression definiert. Stratifiziert man die Ergebnisse nach MGMT, so ergibt sich für jene Patienten mit Methylierung in der „low“-Gruppe ein medianes Überleben von 14,24 Monaten (SE 2,57) und in der „high“-Gruppe ein medianes Überleben von 13,74 Monaten (SE 12,09, $p=0,974$). Bei den Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor hatte somit das Genexpressionslevel keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Dies konnte auch in Bezug auf das progressionsfreie Überleben bestätigt werden. Auch hier zeigte sich kein Einfluss des Expressionsgrades in Bezug auf den Progress (Median low 9,44 Monate SE 2,46 vs. high 7,99 Monate SE 6,43). Betrachtet man die nicht MGMT-Promotor methylierten Patienten, so lebten die Patienten im Median 10,13 Monate (SE 1,69) in der „low“-Expressions-Gruppe und 4,73 Monate (SE 2,7) in der „high“-Expressions-Gruppe ($p=0,138$) (s.Abb.15). Wenn auch nicht signifikant, so zeigte sich hier die Tendenz, dass bei negativem MGMT-Promotormethylierungsstatus bei hoher CDK1-Expression die Patienten kürzer lebten als solche mit niedriger Expression. Ebenfalls kam es in der „high“-Expressions-Gruppe ohne MGMT-Methylierung eher zum Progress (Median low 5,56 Monate, Median high 4,57; $p=0,34$; nicht dargestellt s. Anhang).

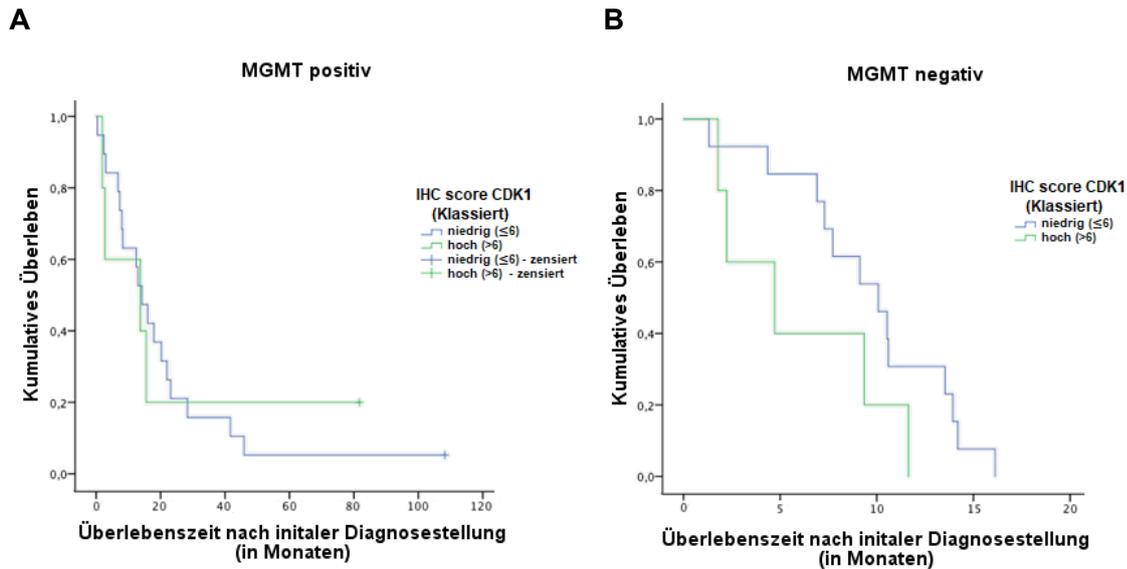


Abbildung 15 Kaplan-Meier Kurve der CDK1-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben nach Gruppenbildung in low/high bezüglich des Median in der Immunhistochemie (≤ 6 low/niedrig, >6 high/hoch). Das Überleben der Patienten ist besonders bei nicht methyliertem MGMT-Promotorstatus (B) im Vergleich zu den Patienten mit methylierten MGMT-Promotorstatus (A) bei erhöhter CDK1-Expression verkürzt ($p=0,138$).

In der RT-PCR lagen breite Streuwerte der Expression auch nach mehrfach durchgeführten Versuchen und Gruppenbildungen in Bezug auf den Median und den Mittelwert vor. Die Ergebnisse, die aus der Immunhistochemie gewonnen wurden, wurden durch die RT-PCR tendenziell bestätigt. Auf eine weitere Auswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Grund der Heterogenität verzichtet, dies gilt es in folgenden Studien zu verbessern.

4.3 Korrelation nach Pearson: Vergleich der einzelnen Gene und ihrer Genprodukte untereinander

Betrachtet man zunächst die linearen Zusammenhänge zwischen ZEB1 und den übrigen untersuchten Genen so zeigte sich in Bezug auf das CDH1 Gen kein linearer Zusammenhang sowohl auf der Protein- als auch auf der Gen/RNA-Ebene (Genebene $r=-0,081$, $p=0,624$; Proteinebene $r=0,055$, $p=0,708$). Im Hinblick auf das CDH2 Gen zeigte sich hingegen sowohl auf der Gen- als auch auf der Proteinebene ein signifikanter linearer Zusammenhang. Dabei konnten wir signifikant höhere Werte für CDH2 bei höherer Expression von ZEB1 auf der Genexpressions- und Proteinexpressionsebene nachweisen (Genebene $r=0,347$, $p=0,033$; Proteinebene $r=0,349$, $p=0,014$). In Bezug auf CDK1 zeigte sich lediglich in der Immunhistochemie und damit auf der Proteinebene ein signifikanter, linearer Zusammenhang. Bei höheren CDK1 Werten zeigten sich dabei signifikant auch höhere ZEB1 Expressionswerte,

diese Ergebnisse konnten auf der Gen-/RNA-Ebene hingegen nicht bestätigt werden (Genebene $r=0,062$, $p=0,703$; Proteinebene $r=0,363$, $p=0,01$).

Für das Gen CDK1 ergab sich außerdem auf der RNA-Ebene ein signifikanter Zusammenhang in Bezug auf CDH2. So zeigte sich bei hoher CDK1- Expression eine hohe CDH2-Expression in der RT-PCR in den jeweils untersuchten Gliompräparaten ($r=0,336$, $p=0,042$). Diese Ergebnisse konnten auf der Proteinebene nur tendenziell bestätigt werden, eine Signifikanz lag hier nicht vor ($r=0,107$, $p=0,464$).

Ein linearer Zusammenhang zwischen dem zweiten untersuchten Cadherin, dem E-Cadherin und CDK1 konnte hingegen weder auf der Protein- noch auf der Genebene hergestellt werden (Genebene $r=-0,064$, $p=0,70$; Proteinebene $r=0,17$, $p=0,242$).

Das CDH2-Expressionslevel zeigt im Bereich der Proteinexpression tendenziell einen Zusammenhang mit dem CDH1-Level. Erhöhte Werte für CDH2 gehen dabei signifikant mit erhöhten Werten für CDH1 einher ($r=0,345$, $p=0,015$). Diese Ergebnisse konnten auf der Genebene mittels RT-PCR jedoch nicht bestätigt werden ($r=-0,087$, $p=0,603$) (Korrelationsmatrix s. Anhang).

5. Diskussion

Die Epitheliale-mesenchymale Transition spielt in Tumoren allgemein und auch in malignen hirneigenen Tumoren wie dem Glioblastom eine große Rolle. Iser et al. bezeichneten die EMT sogar als einen hauptsächlichen Regulator des GBM [153]. Faktoren und Gene wie ZEB1, SLUG, SNAIL, TWIST, TGF β , HIF1 α etc. sind in der Lage die EMT einzuleiten [152]. Der somit initiierte mesenchymale Phänotyp erhöht das maligne Potenzial, die Metastasierungsrate und die Aggressivität von Tumoren unterschiedlicher Entität [91], [152].

Trotz stetiger Verbesserung zeigt der derzeitige Therapiestandard der Glioblastome keine Heilung der Patienten. Das Überleben der Patienten konnte in den letzten Jahren nur marginal von 12 auf circa 14,6 Monate gesteigert werden und die 5-Jahresüberlebensrate ist geringer als 10 % [11], [12], [68]. Mit Hilfe von TTF-Therapien konnten Überlebensraten von bis zu 20,9 Monaten erzielt werden [87], Langzeitergebnisse stehen noch aus.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass die alleinige histopathologische Beurteilung von Tumoren nicht ausreicht, um die Prognose abzuschätzen. Die Beurteilung der Tumore muss durch immunhistochemische und insbesondere durch molekulargenetische Methoden ergänzt werden [15]. In aktuellen Studien von Sahm et al. und Weller et al. konnte gezeigt werden, dass durch neue immunhistochemische und molekulare Marker neue Behandlungsstrategien in hirneigenen Tumoren etabliert werden könnten [176], [177]. Vorreiter auf dem Gebiet der „Target-orientierten Therapie“ sind Studien zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungentumoren beispielsweise mit EGFR-Antikörpern/Tyrosinkinaseinhibitoren oder BRAF-Inhibitoren [178, p. 18], [179].

Unsere Arbeit zielte mit der Expressionsanalyse verschiedener Gene und ihrer entsprechenden Produkte im Glioblastom darauf ab, solche Strukturen, die als Angriffspunkt einer Target-orientierten Behandlung dienen könnten, auch am Glioblastom zu identifizieren. Diese könnten als neuer therapeutischer Ansatz genutzt werden, welcher zu einer individualisierten Therapie des Glioblastom-Patienten führt und damit die Prognose verbessert.

Der wichtigste Stratifizierungsfaktor in der heutigen Glioblastomdiagnostik, der als überlebensverlängernder Faktor angesehen werden kann, ist der MGMT-Methylierungsstatus der Tumorzellen. Stupp et al. und weiterführende Studien [68] zeigten, dass bei MGMT-Promotormethylierung ein verbessertes Ansprechen auf eine TMZ-Therapie vorliegt. Hegi et al. zeigten mit ihrer Studie, dass Patienten, die eine MGMT-Methylierung aufwiesen und nach Standardschema behandelt wurden, länger

lebten (Median 21,7 Monate) im Vergleich zu Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung (Median 15,3 Monate) [29]. In unserer Kohorte betrug das Überleben der Patienten mit positivem MGMT-Promotormethylierungsstatus (n=24) im Median 13,74 Monate, im Vergleich zu 9,17 Monaten bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierungsstatus (n=18). Das mediane PFS betrug bei den Patienten mit Methylierung 9,17 Monate, bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung lediglich 4,73 Monate. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den publizierten Daten von Hegi et al. und Stupp et al. [29], [68].

Parsons et al. zeigten, dass circa 12 % der Glioblastome eine Mutation im Bereich des Isocitratdehydrogenase-Gens (IDH1) aufweisen, wobei es sich dabei zu 80% um sekundäre Glioblastome handelte. Für Patienten mit einer solchen Mutation ist ein besseres Überleben gegenüber den Patienten mit einer Wildtyp-Sequenz bekannt [180]. In unserer Studie wurden ausschließlich primäre Glioblastome untersucht. Ohgaki et al. und Xie et al. beschrieben, dass bei primären Glioblastomen in der Regel keine IDH-Mutationen vorliegen [41], [42]. Dies zeigt sich auch in unserem Kollektiv, in dem bei allen Patienten ein primäres Glioblastom mit IDH1-Wildtyp vorlag, womit unsere Kohorte als repräsentativ angesehen werden kann. Außerdem wurde ausgeschlossen, dass seltene „Glioblastomvarianten“ zum Beispiel mit sarkomatoider Differenzierung zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnten.

Das Gesamtüberleben und die Tumorprogression wurden in dieser Studie nicht in Abhängigkeit von dem IDH-Status untersucht.

Von den drei Subtypen der EMT spielt der dritte die größte Rolle in der Entstehung von Tumoren und der Metastasierung [91], [181].

Eines der Treibergene des dritten Subtyps und somit auch der Tumorprogression und Metastasierung ist der Transkriptionsfaktor ZEB1 [182], [183]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine hoch signifikante Expression des ZEB1-Genes auf der Proteinebene im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalhirngewebe ($p=0,0003$, Mittelwert von $21,71 \pm 6,96$ im Glioblastom vs. $3 \pm 3,94$ im Normalhirngewebe in der Immunhistochemie). Eine durch ZEB1-Überexpression bedingte, verstärkte Proliferation und Invasion wurde bisher bereits in Tumoren anderer Lokalisation und Herkunft beschrieben. In den letzten Jahren gab es eine ganze Reihe von Studien an epithelialen Tumoren, welche eine Korrelation zwischen einer ZEB1 Überexpression und einer erhöhten Aggressivität und Metastasierungstendenz von Tumoren beschrieben, beispielsweise am Kolonkarzinom oder dem Pankreaskarzinom [182], [184]. Tendenziell wurde diese Beobachtung durch die RT-PCR bestätigt, hier zeigte

sich allerdings keine Signifikanz (Mittelwert Glioblastom $0,81 \pm 1,98$ vs. Mittelwert Normalhirngewebe $0,7 \pm 0,98$, $p=0,26$).

ZEB1 kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription fungieren [139]. Interessante Beobachtungen zur Bedeutung von ZEB1 je nach auftretendem Gewebe und umgebenden Mikromileu wurden dabei im Gehirn und den Gliomen gemacht. Initiale Studien beschrieben dabei vor allem den Zusammenhang einer ZEB1 Überexpression in höhergradigen Gliomen und ihre Korrelation mit einer gesteigerten Invasionstendenz und mangelnden Therapieansprache [149] [185]. Studien von Nesvick et al. hingegen beobachteten in IDH-mutierten Gliomen eine signifikant höhere ZEB1 Expression und ein damit einhergehendes signifikant längeres Gesamtüberleben [186]. Dies implementiert einen heterogenen Charakter von ZEB1, sodass möglicherweise auch eine stabilisierende Funktion von ZEB1 mit Unterdrückung der Tumorentstehung je nach umgebenden Mileu im normalen Gehirngewebe zu erwägen ist [187].

Studien von Edwards et al. konnten zeigen das eine Deletion des ZEB1 Genes in circa 50% der Glioblastome vorlag [188], wobei diese Deletion über den Faktor LIF zu einer Heraufregulation von Stammzellcharakteristika führte. Diese Gendeletion könnte erklären warum es uns in der RT-PCR im Glioblastom nur eingeschränkt möglich war ZEB1 zu detektieren und somit keine signifikant höhere Expression im Glioblastom im Vergleich zum normalen Hirngewebe ermittelt wurde. Wodurch die Diskrepanz zwischen der Gen- und Proteinexpression entstand ist abschließend nicht endgültig zu klären und kann auf messtechnische sowie auf biologische Ursachen zurückzuführen sein. Ähnliche Beobachtungen mit zumindestens weitestgehend durchgängig schwacher Expression von ZEB1 auf der Proteinebebe und fehlender Expression auf der Genebene wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht [188].

Schwechheimer et al. und Howng et al. postulierten, dass das Gen CDH1 beziehungsweise sein Expressionsprodukt E-Cadherin im Glioblastom keine Rolle zu spielen scheint, da es ihnen nicht möglich war eine Expression durch IHC und Western-Blot Analysen (Schwechheimer et al.) oder RT-PCR nachzuweisen (Howng et al.) [157], [189]. Unsere Untersuchungen zeigten davon abweichende Ergebnisse. In dieser Arbeit zeigte sich, dass CDH1 sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene sowohl im Glioblastom als auch im Normalhirngewebe nachzuweisen war. Diese abweichende Beobachtung könnte auf den Einsatz unterschiedlicher verwendeter Antikörper und Primer zurückzuführen sein.

In dieser Studie zeigte sich außerdem, dass CDH2 auf der Protein-Ebene im Glioblastom im Vergleich zum Normalhirngewebe signifikant stärker exprimiert wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Asano et al. gemacht [155]. Diese

Ergebnisse ließen sich in der RT-PCR nicht reproduzieren, hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genexpression.

Bezüglich der Funktion und der Expressionsrate von N-Cadherin in glialen Tumoren gibt es differente Studienergebnisse. Utsuki et al. beobachteten eine signifikant höhere immunhistochemische Färbereaktion mit steigendem Gliomgrad [190], welche auch von Asano et al. auf der Genexpressionsebene mittels *Microarray*-Analyse beschrieben wurde [155]. Studien von Camand et al. machten zu unseren und diesen eben genannten Ergebnissen konträre Beobachtungen. Sowohl auf der RNA- als auch auf der Protein-Ebene zeigte sich in den Versuchen von Camand et al. eine verringerte N-Cadherin Expression im Glioblastom gegenüber dem normalen Hirngewebe [191]. Ein einheitlicher Konsensus besteht bis zum heutigen Tage nicht, hier müssen zur genauen Einordnung von N-Cadherin und seiner Bedeutung sowohl im Tumor als auch im gesunden Hirngewebe noch weitergehende Studien erfolgen.

Im Rahmen unserer Arbeit konnte eine signifikant höhere Expression von CDK1 in den Tumorzellen der Glioblastompräparate im Vergleich zum Normalhirngewebe sowohl auf Protein- als auch der RNA-Ebene, beobachtet werden. In einer Studie von Chen H. et al. zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression von CDK1 gegenüber dem normalen Hirngewebe [133]. Chen et al. beschrieben, dass mit steigendem WHO-Grad auch die Expression des CDK1-Gens zunahm, wohingegen eine Herunterregulation der CDK1-Genexpression auf RNA-Ebene zu einer Unterdrückung der Proliferation führte [133]. Im Hinblick auf unsere sowie die oben aufgeführten Studienergebnisse ist anzunehmen, dass CDK1 als Tumorprogressor im Hinblick auf die Regulation des Zellteilungszyklus fungiert und durch eine Inhibition möglicherweise ein Tumorwachstum verlangsamt/verhindert werden kann.

Nach bisherigem Forschungsstand ist zu den Treibergenen der EMT im Glioblastom noch wenig bekannt. Siebzehnrubl et al. zeigten durch den Knockout des ZEB1-Gens in der GBM-Zellkultur und in Tierversuchen an Mäusen eine verbesserte Chemotherapieansprache auf TMZ und dadurch ein verlängertes Gesamtüberleben der untersuchten Mäuse [149]. In einer Studie, in der die konventionelle Hirnbestrahlung mit Protonen mit einer ^{125}I Seedbestrahlung verglichen wurde, zeigte sich auf der Protein- und RNA-Ebene eine Herunterregulation des ZEB1-Gens und damit der Epithelialen-mesenchymalen-Transition. Dies ging mit einem verlängerten Gesamtüberleben der GBM-Patienten einher [192].

In unserem Patientenkollektiv zeigte sich, dass Patienten mit hoher ZEB1-Expression im Tumorgewebe auf der Protein-Ebene, unabhängig vom MGMT-Promotorstatus, eine kürzere Überlebenszeit hatten als Patienten mit einer niedrigen ZEB1-Expression.

Es kam in der „*high*“-Expressionsgruppe auf Protein-Ebene und tendenziell auch auf der RNA-Ebene zu einem früheren Versterben und zu einem früheren Progress der GBM-Patienten. Unsere Ergebnisse zeigen somit eine Korrelation zwischen einer höheren Gesamtsterblichkeit bei Vorliegen einer höheren ZEB1-Expression, was mit den Beobachtungen von Siebzehnruhl et al. übereinstimmt [153]. Es kann somit angenommen werden, dass möglicherweise eine hohe ZEB1-Expression, und damit eine Überexpression eines Hauptregulators der EMT, das Gesamtüberleben der GBM-Patienten signifikant verkürzt.

Die Interaktion von ZEB1 mit den Cadherinen wurde bereits in Studien von Vandewalle et al. oder Aigner et al. beschrieben [138], [148]. ZEB1 gilt als E-Cadherin-Supressor [91], [148], [193] und Aktivator mesenchymaler Gene in einigen Tumoren [194]. Untersuchungen an Glioblastomen in Bezug auf eine ZEB1/E-Cadherin Korrelation gibt es nach unserem Wissensstand bisher nicht, was größtenteils darauf zurückzuführen sein könnte, dass in den meisten Studien keine Protein- und/ oder Genexpression für E-Cadherin im Glioblastom nachgewiesen werden konnte [189]. Qi et al. machten jedoch in Bezug auf ZEB2 die Beobachtungen, dass niedrige ZEB2 Expressionsraten das E-Cadherin Expressionslevel in Glioblastomzelllinien erhöhten, wohingegen das N-Cadherin Expressionslevel sank [195]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar eine E-Cadherin Expression in den meisten Tumorfällen beobachtet werden, kritisch ist jedoch anzumerken, dass es sich hierbei um ein niedriges Expressionslevel im Vergleich zum beispielsweise mitgeführten Kontrollgewebe des Plattenepithels der Haut handelt. Gegenüber dem normalen Hirngewebe zeigte sich dennoch eine signifikant höhere Protein- und Genexpression. Ein linearer Zusammenhang zwischen der ZEB1 Expression und der CDH1/E-Cadherin Expression konnte auch im Rahmen dieser Studie nicht hergestellt werden. Die in anderen Tumoren beschriebene Supressorfunktion von ZEB1 in Bezug auf E-Cadherin scheint im Glioblastom keine Rolle zu spielen, sodass unsere Ergebnisse mit der bisherigen Literaturlage bezüglich der untergeordneten Bedeutung des *Cadherin-Switches* im Glioblastom übereinstimmen [153]. Interessanterweise bestand jedoch in unserer Studie eine signifikante Korrelation zwischen ZEB1 und CDH2. Solche Patienten mit hoher ZEB1 Expression wiesen ebenfalls signifikant höhere CDH2/N-Cadherin Expressionswerte auf. Dies unterstützt unsere Theorie, dass sowohl ZEB1 als auch N-Cadherin im Glioblastom als Initiatoren einer Tumorprogression fungieren und ZEB1 möglicherweise, wie in epithelialen Tumoren, in der Lage ist mesenchymale Gene zu aktivieren. Welche Strukturproteine und Faktoren ZEB1 genau im Glioblastom beeinflusst gilt es in weiteren Studien zu untersuchen. Die Bedeutung dieses Genes scheint allerdings auf Grund unserer Beobachtungen mit einer deutlich verkürzten

Gesamtüberlebenszeit des Glioblastompatienten bei ZEB1 Überexpression als potenziell klinisch relevant.

Die Expression von E-Cadherin wurde im gesunden Gewebe und in einigen Tumoren wie dem Mammakarzinom oder dem Magenkarzinom als „Protektivum“ beschrieben, da es die Zellintegrität und die Ausrichtung des Zellverbandes aufrecht erhält. Ein Verlust von CDH1 geht mit einer Tumorentwicklung einher [120], [121], [196], [197]. CDH1 wurde als Schutzfaktor in anderen hirneigenen Tumoren bereits beschrieben. Schwachheimer et al. zeigten auf Protein-Ebene im Meningiom, als langsam wachsender und meist benigner Tumor, ebenfalls verstärkte Expressionswerte des CDH1-Gens, wobei ein Verlust von CDH1 zu einer Progression des Tumorwachstums führte [157]. Im Glioblastom ist dazu wenig bekannt. Unsere Beobachtungen zeigten, dass solche Patienten mit hoher E-Cadherin Expression signifikant länger progressionsfrei lebten als solche mit niedriger E-Cadherin Expression (4,37 Monate bei niedriger vs. 5,56 Monate bei hoher Expression). Wir postulieren somit E-Cadherin auch im Glioblastom, insofern es exprimiert vorliegt, als Schutzfaktor welcher eine Tumorprogression verringert.

Eine kontroverse Meinung im Vergleich zu unserer Studie über die Funktion von E-Cadherin vertritt die Arbeitsgruppe um Lewis-Tuffin. Lewis-Tuffin et al. führten Versuche am Glioblastom mittels Western Blot und in der Zellkultur durch. Durch ein Knockdown des CDH1-Genes konnte bei CDH1 überexprimierenden Tumoren nach Transplantation in das Mausmodell die Proliferation der Zellen verlangsamt und ein längeres Gesamtüberleben beobachtet werden [154]. Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass im Rahmen der Studie von Lewis-Tuffin et al. eine besondere Untergruppe von Glioblastomen mit epithelialer bzw. pseudoepithelialer histopathologischer und molekulargenetischer Struktur untersucht wurde. E-Cadherin wurde von dieser Arbeitsgruppe als „Aggressivitätsmarker“ postuliert.

In epithelial differenzierten Tumoren wie zum Beispiel dem Ovarialkarzinom, welches auf Protein- und RNA-Ebene von Sundfedt et al. [198] untersucht wurde, oder den bereits oben beschriebenen epithelial differenzierten Gliomen, untersucht von Lewis-Tuffin et al., scheint CDH1 und somit E-Cadherin als Aggressivitätsmarker zu gelten [154].

Abhängig von der Histomorphologie nimmt CDH1 somit unterschiedliche Rollen in der Tumorentwicklung ein, wobei nach unseren Auswertungen von einer protektiven Funktion im Hinblick auf neuro-gliale differenzierte Strukturen auszugehen ist.

Die Funktion und Relevanz des CDH2-Gens bietet in der Literatur kontroverse Meinungen, ähnlich dem CDH1 Gen. Asano et al. zeigten, dass gliale Tumore mit

hoher CDH2-Expression auf der RNA-Ebene ein weniger aggressives Verhalten aufwiesen [155]. Niedrigere Gliome (WHO-Grad II und III) zeigten dabei höhere N-Cadherin-Werte als WHO-Grad IV Tumore, insbesondere traten bei rekurrenten Tumoren signifikant niedrige Expressionsraten in der Immunhistochemie auf [155], [199], [200]. Eine weitere Studie von Camand et al. zeigte im Western Blot Verfahren, dass die niedrigere Expression, beziehungsweise die Herunterregulation von CDH2, zu einer schnelleren und ungerichteten Migration der glialen Tumore führte [191]. Es gilt zu beachten, dass die alleinige Ausschaltung von CDH2 in Astrozyten dabei zu einer wesentlich langsameren Migration führte als die Ausschaltung in den Glioblastomzellen [191]. N-Cadherin scheint somit zwar zu einer beschleunigten Migration zu führen, die allerdings durch weitere Faktoren, die nur im Tumorgewebe von Bedeutung sind, verstärkt werden muss. Auch scheint die Lokalisation von N-Cadherin von Bedeutung zu sein, also in welchem Bereich der Tumorzelle es zu einer Herunter-/Heraufregulation von CDH2 kommt. Im Western Blot zeigten Camand et al. keine generelle Reduktion der CDH2-Expression, sondern eine durch die Immunfluoreszenz darstellbare Reduktion von N-Cadherin im Bereich der Zellkontakte [191]. Siebzehnrubl et al. führten Versuche an Zelllinien durch, die aus primären Gliomen generiert wurden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen konnte in den untersuchten Tumorproben eine verminderte Expression von N-Cadherin im Bereich der Tumordinvasionsfront nachgewiesen werden, wohingegen die Tumormasse stark N-Cadherin positiv war [149]. Ein Knockdown des Gens ZEB1 mittels microRNA (miRNA) führte dazu, dass sich vermehrt N-Cadherin im Bereich der Zellkontakte anreichern konnte und die Zellen langsamer proliferierten. Sie stellten jedoch keine Reduktion der gesamten N-Cadherin-Menge im Western Blot fest, es handelte sich lediglich um eine Umverteilung in den Zellkontaktbereich [149]. Eine Erklärung, warum CDH2 und somit N-Cadherin protektiv wirken könnte wäre, dass es im Bereich der Zellmembran und der Zellkontakte exprimiert wird und somit vor morphologischen Veränderungen schützt und stabilisierend wirkt. Kommt es hingegen zu einer Verlagerung und Akkumulation von N-Cadherin in zentralen und perinukleären Bereichen, wird eine schnelle und ungerichtete Proliferation ermöglicht. Dies würde auch erklären warum kein signifikanter Unterschied der Genexpression zwischen Normalhirngewebe und Glioblastomgewebe detektiert werden konnte. Eventuell ist somit weniger die quantitative Menge von Bedeutung als der Ort der Proteinlokalisierung. In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung in den Glioblastomzellen und keine auf die Zellkontakte beschränkte Färbereaktion im Rahmen der immunhistochemischen Experimente. Möglicherweise führte eine Verlagerung aus dem Bereich der Zellkontakte heraus und eine stärkere Expression im

Zytoplasma und perinukleären Bereich auf der Protein-Ebene zu einer Reduktion des Gesamtüberlebens unserer Patienten.

Im Normalhirngewebe wurde in dieser Studie kaum N-Cadherin exprimiert, die Expression zeigte sich, wenn vorhanden, vor allem im Bereich der astrozytären Fortsätze (s.Abb.16).

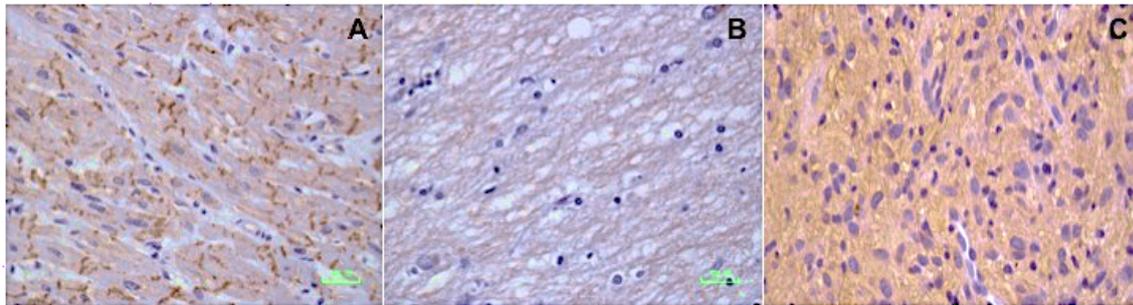


Abbildung 16 (A) Immunhistochemische Darstellung der Expression von N-Cadherin in dem von uns verwendeten Kontrollgewebe(Herzmuskelgewebe), hier zeigt sich eine Expression im Bereich der Z-Streifen und somit der Zellkontakte; (B) Immunhistochemische Darstellung der Expression von N-Cadherin im Normalhirngewebe, hier zeigt sich eine sehr schwache Expression im Bereich der astrozytären Fortsätze und somit der Zellkontakte; (C) Immunhistochemische Darstellung der Expression von N-Cadherin im Glioblastomgewebe, hier zeigt sich eine diffuse zytoplasmatische Expression.

Utsuki et al. zeigten hingegen einen korrelativen Zusammenhang einer CDH2-Überexpression zu der Graduierung der Gliome. Mit höherem histopathologischem Tumorgrad lag bei Utsuki et al. eine vermehrte N-Cadherin-Expression auf der Protein-Ebene vor [190], anders als bei den oben genannten Untersuchungen von Asano et al. [199], [200]. Utsuki et al. führten dabei immunhistochemische Färbungen an 45 Glioblastompräparaten durch. Sowohl Studiengröße als auch Vorbehandlung mittels Dampfgeräts und Citrat-Puffer/EDTA-Puffer entsprachen weitestgehend unserem Studiendesign. Die Arbeitsgruppe untersuchte sowohl Proben aus zentralen Bereichen, der Invasionsfront und den perinekrotischen Bereichen der Tumorbiopsien. Vereinbar mit den Daten aus der Arbeit von Utsuki et al. [190] zeigte sich in unserer Arbeit, dass solche Patienten, die im Tumor eine MGMT-Methylierung aufwiesen bei höheren N-Cadherin-Expressionswerten auf der Protein-Ebene eher einen Progress hatten (Median *low* 9,44 Monate, *high* 6,31 Monate). Diese Tendenz wurde noch deutlicher im Bereich von Patienten ohne eine MGMT-Methylierung (OS Median *low* 9,4 Monate, *high* 1,32 Monate; PFS Median *low* 4,9 Monate, *high* 1,3 Monate). CDH2 könnte somit als Tumorprogressor zu einer erhöhten Zellproliferation beitragen und mit einem früheren Progress der Patienten einhergehen. Hierbei ist jedoch, wie bereits oben beschrieben, kritisch anzumerken, dass unsere Patientengruppe die eine hohe N-Cadherin Expression aufwies mit lediglich zwei Patienten zu klein erscheint um

daraus eine geeignete Schlussfolgerung ziehen zu können. Auf Grund der in der Literatur als äußerst heterogen beschriebenen Funktion von N-Cadherin sowie der Tatsache, dass hohe Expressionsraten nur selten beobachtet werden, bedarf es hier weiterer Studien zur genauen Einordnung der N-Cadherin Funktion in der Tumorprogression des Glioblastoms.

Betrachtet man die Korrelation zwischen CDH1 und CDH2 in dieser Arbeit, so zeigte sich, dass verringerte CDH2-Werte nicht mit einem erhöhten CDH1-Wert und umgekehrt einhergingen. Ein linearer Zusammenhang, wie er in epithelialen Tumoren zu erwarten wäre, konnte im Rahmen dieser Arbeit im Glioblastom nicht hergestellt werden. Dies wurde auch von Camand et al. beschrieben [191]. Der in epithelialen Tumoren ablaufende Cadherin-Switch [181] spielt im Glioblastom eine untergeordnete Rolle [153]. Auf Grund des Nachweises einer signifikant höheren Proteinexpression von N-Cadherin im Glioblastomgewebe im Vergleich zum Normalhirn zeigt sich jedoch eine stärker mesenchymale Ausprägung im Tumor im Vergleich zum normalen Hirngewebe („glial/mesenchymal zu mesenchymaler Switch“). Dies könnte die Tumorentstehung und -ausdehnung begünstigen. Wie bereits Mahabir et al. postulierten sollte hier eher von einer glial-mesenchymalen Transition anstelle einer epithelial-mesenchymalen Transition gesprochen werden [201].

Die Umwandlung von gesunden Zellen in Tumorzellen geht mit einer Missregulation im Zellzyklus einher, die im Bereich der Checkpoints oder im Bereich verschiedener Reparaturgene liegt [202]. Im Rahmen unserer Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Expression von CDK1 in den Tumorzellen im Vergleich zum Normalhirngewebe sowohl auf Protein- als auch der RNA-Ebene beobachtet werden. Die CDK1-Expression unterschied sich dabei auf Protein-Ebene nicht signifikant zwischen den MGMT-Promotor methylierten Patienten und den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung ($p=0,17$). Bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung zeichnete sich die Tendenz ab, dass bei hohen CDK1-Werten auf der Protein-Ebene die Patienten kürzer lebten und eher einen Tumorprogress zeigten, als solche mit niedriger CDK1-Expression. Aus unseren Ergebnissen in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Bo et al. [128] und Chen et al. [133] lässt sich ableiten, dass CDK1 bei Überexpression im adulten Hirngewebe zu einer Tumorprogression beitragen kann. Chen et al. zeigten, dass die Expressionsmenge von CDK1 mit steigendem Gliomgrad anstieg. Außerdem konnten sie im Mausxenograft Modell zeigen, dass bei einer Herunterregulation/*Knock-out* des CDK1 Genes die Tumorzellen die Apoptose einleiteten [133]. In unserer Arbeit zeigte sich zumindest tendenziell, dass eine nicht vorhandene Promotormethylierung als prognostisch ungünstig angesehen werden

kann, wenn eine Überexpression des CDK1 Genes oder seiner Genprodukte vorlag. Es kam zu einem früher auftretenden Progress und es zeigte sich ein verkürztes Überleben der Patienten (OS Median *low* 10,13 Monate, *high* 4,73 Monate). Dies ist in Zusammenschau nicht nur auf den negativen MGMT-Methylierungsstatus zurückzuführen. Betrachtet man die allgemeine Überlebensrate aller Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung unabhängig von den Genexpressionen, so lag diese im Median bei 9,17 Monaten, bei hoher CDK1 Expression und negativem MGMT-Promotorstatus hingegen bei 4,73 Monaten. Wir postulieren, dass die MGMT-Methylierung möglicherweise die Zellen vor einem Einfluss der Zellzyklusdysregulation schützt. Ein linearer Zusammenhang zwischen CDK1 und E-Cadherin konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Allerdings zeigte sich in Bezug auf das CDH2 Gen eine signifikant höhere CDH2 Expression bei höheren CDK1 Werten, welches auf der Proteinebene tendenziell bestätigt wird. Auch diese Beobachtungen untermauern die bereits oben von uns aufgestellte Theorie, dass es im Rahmen der Glioblastomprogression über die Aktivierung verschiedener Gene der EMT und des Zellzyklus zu einer stärkeren mesenchymalen Genaktivierung kommt und das dies als Aggressivitätsmarker postuliert werden kann.

Viele Studien zeigen das eine alleinige Therapie mit Antikörpern im Glioblastom keinen ausreichenden Effekt erzielen können und die Tumore Resistenzen entwickeln [203] . In den folgenden Jahren wird es vermutlich vor allem um eine Anwendung von kombinierten Verfahren gehen. Eine Standard Chemotherapie mit TMZ zur Reduktion der Tumormasse in Kombination mit einer tumorspezifischen Targettherapie, beispielsweise gegen die EMT oder die den Zellzyklus regulierenden Faktoren wie die CDK, könnte die richtungsweisende und zielführende Behandlungsstrategie der kommenden Jahre darstellen. Dabei könnte es durch den Einsatz gezielter Antikörper dazu kommen, dass eine „Mesenchymalisierung“ des Glioblastoms verhindert/reduziert wird und dadurch das Tumorwachstum und die Ausbreitungstendenz sinkt.

Vorreiter auf diesem Gebiet sind Studien zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungentumoren beispielsweise mit EGFR-Antikörpern/Tyrosinkinaseinhibitoren oder BRAF-Inhibitoren in Kombination mit Chemotherapeutika [178], [179].

5.1 Methodenkritik

Es standen fünf intraoperativ entnommene Normalhirngewebeproben als Kontrollgewebe auf Protein- und auf der RNA-Ebene zur Verfügung. Die Bereitstellung von normalem Hirngewebe als Kontrollgewebe, das weder eine Autolyse noch einen hypoxischen Schaden erlitten hat, ist äußerst schwierig.

Die Genexpression der untersuchten Gene unterschied sich in den beiden von uns verwendeten Methoden, der Immunhistochemie und der RT-PCR. Dies kann folgende Gründe haben: 1) Die vorhandene Menge an mRNA entspricht nicht zwangsläufig der mit Hilfe von Antikörpern nachweisbaren Proteinstruktur. 2) Viel RNA muss dabei nicht zwangsläufig mit einer großen Menge an Proteinexpression einhergehen, was auf die posttranslationale Modifikation zurückgeführt werden kann [204], [205]. 3) Größere Mengen an mRNA im Vergleich zum exprimierten Protein können Zeichen für Defekte im Bereich der Proteinbiosynthese oder ein Zeichen für eine mangelnde Stabilität des Proteins sein [206], [207]. Im Rahmen unserer Studie wurde sich für die Auswertung der Immunhistochemie entschieden welche zu den Standards der Tumordiagnostik zählt [208]. Die Ergebnisse wurden durch die RT-PCR verifiziert um Veränderungen, die lediglich auf Artefakten beruhen, gering zu halten [166], [170]. Betrachtet man die Streubreite der Ergebnisse, so wird deutlich, dass die ermittelten Werte stark variieren. Je stärker das untersuchte Gen exprimiert wurde, desto stärker war diese Streubreite. Möglicherweise ist für die Streubreite der Werte eine große genetische Heterogenität der Tumore und ein damit einhergehendes unterschiedliches Ausmaß an Signalwegaktivierung verantwortlich. Zusätzlich zu dem untersuchten Tumorgewebe kann in den Proben der RT-PCR eventuell auch Nicht-Tumorgewebe enthalten gewesen sein. Dies kann zu veränderten Expressionen von Genen und ihrer Genprodukte führen. In der Immunhistochemie konnte dies durch eine Kontrolle eines HE gefärbten Schnittes und durch das Filtern von solchen Schnittebenen, in denen nur Tumorgewebe enthalten war, gering gehalten werden. Für die Immunhistochemie kann damit angenommen werden, dass die detektierte Proteinexpression, auch die tatsächliche Proteinexpression des Tumors darstellt. Allerdings gilt auch hier zu beachten, dass Tumore heterogen sind und sich die einzelnen Tumorbereiche (Invasionsfront, Tumornekrosen etc.) unterscheiden. Die Auswertung erfolgte in zentralen Tumorbereichen ohne Nachweis einer ausgeprägten Nekrose, ebenfalls wurden „*Proliferations-hot-spots*“ vermieden. Welche exakten Gründe den unterschiedlichen Gen- und Proteinexpressionen zu Grunde liegen, ist mit unseren Analysen letztendlich nicht abschließend zu beantworten. Dies könnte als Grundlage für nachfolgende Studien dienen, in denen mit Hilfe von Knockdown-Experimenten

oder mit Hilfe von miRNA- Suppression die jeweilige Signalwegkomponente unterdrückt und genauer untersucht werden kann.

Die Auswertung der Immunhistochemie bezüglich der Intensität der Färbung und die Festlegung, welche Zellen bereits als gefärbt gewertet werden, ist subjektiv und semiquantitativ. Alle Präparate wurden deswegen von der gleichen Person ausgezählt, um einen Interobserverfehler zu vermeiden. Eine digitalisierte morphometrische Auswertung wäre möglicherweise genauer.

6. Ausblick

Bisherige Studien konnten zeigen, dass individuelle genetische Therapien eine Zukunftsform für die Behandlung von malignen Gliomen bieten könnten. Schwerpunkte der Forschung werden dabei im Bereich der antiangiogenetischen Therapien, in den Molekulartherapien oder in den Immuntherapien gesetzt. Das zu Grunde liegende Prinzip dieser Form der Behandlungen ist es, mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen spezifische Proteine, Oberflächenstrukturen oder Signalmoleküle richten, Signalwege zu blockieren und das Tumorwachstum dadurch einzuschränken.

Bisherige Versuche solche Therapieformen am Glioblastom zu etablieren zeigten nur unzureichende Erfolge. Eine mögliche Ursache der mangelnden Therapieansprache könnte die Epitheliale-mesenchymale-Transition sein. Diese verringert die Anzahl der Zielmoleküle an der Oberfläche der Zelle und minimiert somit die Angriffsmöglichkeiten zahlreicher zugeführter Antikörper [209], [210].

Bis heute hat keines der Medikamente, welche die Transition beeinflussen, Einzug in den klinischen Alltag erlangt. Als vielversprechend gilt allerdings der miR-21 Inhibitor AC1MMYR2. Dieser Inhibitor konnte an Gliom-Zelllinien die Proliferation und Migration supprimieren, indem er die Transition beeinflusst [211].

Durch die Herunterregulation von PI3K/Akt, einer Signalwegkomponente der Epithelial-mesenchymalen Transition, konnte auch das Cumarinderivat Osthole an Gliom-Zelllinien erste Erfolge zeigen [212].

Im Rahmen unserer Studie konnte ein bekannter Hauptregulator der EMT (ZEB1) und ein Zellzyklusprotein (CDK1) mit einer signifikant höheren Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalhirngewebe nachgewiesen werden. Die verstärkt exprimierten Oberflächenstrukturen könnten dann wiederum zugänglicher für bereits etablierte Antikörpertherapien (EGF, VEGF-Antikörpern) sein. Zumindest scheint eine verstärkte mesenchymale Ausprägung unterdrückbar und damit eine

potenzielle Malignisierung verhinderbar mit dem Ziel einer Verlängerung des Gesamtüberlebens oder des progressionsfreien Überlebens des Patienten zu erreichen. Dies gilt es in nachfolgenden Studien, z.B. in Zellkulturen oder Tiermodellen, zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

CDH1, CDH2 und ZEB1 sind Gene, die in die EMT integriert und im Glioblastom nachweisbar sind. CDK1 ist ein Gen des Zellzyklus welches die Zellteilung kontrolliert und ebenfalls im Glioblastom nachweisbar ist. Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Gen- und Proteinexpression in Patienten mit einem primären Glioblastom, wobei eine Stratifizierung im Hinblick auf die MGMT-Promotormethylierung vorgenommen wurde, zur Bestimmung eines prognostischen Wertes (Gesamtüberleben/progressionsfreies Überleben).

Mittels Real-Time PCR und Immunhistochemie wurde die Genexpression dabei in 44 Glioblastom-Tumorproben und in 5 Normalhirngewebeproben untersucht.

Die Expression der untersuchten Gene der EMT und des Zellzyklus waren dabei im Glioblastom auf der Protein-Ebene signifikant gegenüber dem Normalhirngewebe erhöht, auf der RNA-Ebene wurden diese Ergebnisse nur teilweise bestätigt.

Die Überlebensanalyse zeigte, dass solche Patienten mit hoher ZEB1-Expression auf der Protein-Ebene kürzer lebten als mit niedriger Expression, wobei hier kein signifikanter Unterschied bestand (14,24 Monate vs. 13,24 Monate bei den Patienten mit MGMT-Promotormethylierung, bei den nicht MGMT-Promotor methylierten Patienten 9,4 Monate vs. 6,94 Monate). In beiden Gruppen zeigte sich kein Einfluss auf den Progress.

In Bezug auf CDK1 zeigte sich bei den nicht MGMT-Promotor methylierten Patienten mit niedriger CDK1-Proteinexpression tendenziell ein längeres Gesamtüberleben als bei solchen mit hoher Expression (10,13 Monate vs. 4,73 Monate, $p=0,138$). Es kam eher zum Progress bei hoher CDK1-Proteinexpression (nach 5,56 Monaten in der „high“-Expressionsgruppe vs. 4,57 Monate in der „low“-Expressionsgruppe).

Bei hoher CDH2-Expression zeigte sich bei den Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung eine signifikante Reduktion des Gesamtüberlebens und ein signifikant früher auftretender Progress auf der Protein-Ebene (OS 9,4 Monate high vs. 1,32 Monate low, $p<0,001$; PFS 4,73 Monate low vs. 1,3 Monate high, $p<0,001$).

Die CDH1-Expression zeigte, dass solche Patienten mit hoher Expression auf der Protein-Ebene tendenziell länger lebten als solche mit niedriger Expression, unabhängig vom MGMT-Promotorstatus (OS methyliert 12,99 Monate low vs. 16,01 Monate high; OS nicht-methyliert 7,76 Monate low vs. 10,13 Monate high). Diese Beobachtung war nicht statistisch signifikant. Allerdings zeigten die Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben ($p=0,005$) bei hoher CDH1 -Expression (4,73 Monate vs. 5,56 Monate).

Eine hohe ZEB1-, CDH2- und CDK1-Expression auf der Protein-Ebene ist mit einer schlechteren Gesamtprognose verbunden. Eine hohe CDH1-Expression hingegen scheint einen protektiven Charakter zu haben und vor einem frühen Progress zu schützen.

8. Summary

CDH1, CDH2 and ZEB1 are genes involved in the EMT which are also detectable in glioblastoma. CDK1 is a gen of the cell cyclus and it is also expressed in glioblastomas. In this study we investigated the expression of CDH1, CDH2, CDK1/2 and ZEB1 in human glioblastomacells with methylated MGMT-promotor and without MGMT-promotormethylation. Our point of interest was the prognostic value of the gene-expression with regard to survival and progression-free time of patients. In 44 glioblastoma patients and 5 non-tumorous brain specimens, which we used as controls, the gene-expression was determined by performing quantitative real-time PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry (IHC).

The gene-expression in IHC was significant higher in glioblastoma then in normal brain tissue. Survival analysis showed, that patients with high ZEB1-expression on protein level had a shorter overall survival (OS) than patients with low expression-levels (14,24 months vs. 13,24 months for methylated and 9,4 months vs. 6,94 months for unmethylated patients). This observation was not statistical significant. There was no influence regarding the progression-free survival time. Looking at the CDK1-expression, there was a tendency that there was a shorter overall survival and progression-free survival (PFS) in patients without MGMT-promotormethylation when there was a high gene-expression on protein-level (OS 10,13 months vs. 4,73 months, $p=0,138$; PFS 5,56 months low vs. 4,57 months high). Median overall survival time in patients without MGMT-promotormethylation with high CDH2-expression on protein-level was significantly reduced and there was an earlier progress (OS 9,4 months high vs. 1,32 months low, $p<0,001$; PFS 4,73 months low vs. 1,3 months high, $p<0,001$). Patients with high expressions of CDH1 on protein-level showed a tendency of a longer overall survival than patients with low expression, this observation was not statistical significant (patients with MGMT-promotormethylation 16,01 months high vs. 12,99 months low, patients without MGMT-promotormethylation 7,76 months low vs. 10,13 months high). However we showed that high CDH1-expression-levels where associated with a significant longer progression-free survival ($p=0,005$).

Overexpression of ZEB1, CDH2 and CDK1 on protein-level seems to be associated

with a poor prognosis in glioblastoma patients. In contrast to this observation high CDH1-expression-levels seems to have a protective character.

9. Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Aktin Beta
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
BRAF	Serin/Threonin Kinase B-Raf
BTSC	Brain tumor stem cell
CAFs	Cancer-associated-fibroblasts
CDH1	Cadherin-1 (Gen welches für E-Cadherin codiert)
CDH2	Cadherin-2 (Gen welches für N-Cadherin codiert)
CDK	Cyclin-dependent-kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent-kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CT	Computertomographie
°C	Grad Celcius
DAB	Diaminobenzidin
DNA	deoxyribonucleic acid
dt.	Deutsch
E-Cadherin	Epitheliales/embryonales Cadherin
ECTRs	E-Cadherin-transcriptions-repressor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/acid
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal-transition
et al.	et alii (dt.: und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
G	Gramm
GASC	Glioblastoma-associated stroma cells
GBM	Glioblastoma multiforme
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
GFAP	gliale fibrillary acide proteine
Gy	Gray

h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyten-growth-factor
HIF	Hypoxia-inducible-transcription-factors
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRE	Hypoxia-response-element
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz
IDH	Isocitratdehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
IGF1R	Insulin-growth-factor 1 receptor
IONM	Intraoperatives Neuro-Monitoring
KPS	Karnofsky-Index
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
miRNA	MicroRNA
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NaOH	Natriumhydroxid
N-Cadherin	Neuronales-Cadherin
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells
nm	Nanometer
nTMS	transkranielle Magnetstimulation
OS	Overall Survival
p	Wahrscheinlichkeitsfaktor der Statistik
P-Cadherin	Plazentares Cadherin
PCV	Procarbacin, Lomustin, Vincristin
PDGF	Platet-derived-growth-factor
PDGFRα	Platet-derived-growth-factor receptor alpha
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progression Free Survival

PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
RANO	Response Assessment in Neuro-Oncology
RB	Retinoblastom
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	Realtime-Polymerase-chain-reaction
SE	Standard Error
TAM	Tumor-associated macrophages
TGF- β	Transforming-growth-factor beta
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatory T-cells
tRNA	transfer ribonucleic acid
TTF	Tumor Treating Field
u.a.	unter anderem
UKGM	Universitätsklinikum Gießen Marburg
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
VEGF	Vaso-Endothelial-Growth-Factor
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
WNT	Acronym aus "Wingless" und "Int-1"
z.B.	zum Beispiel
ZEB1/2	Zinc finger E-box binding homebox 1/2
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 A: GFAP (gliale fibrillary acide proteine) Färbung eines Glioblastoms	2
Abbildung 2 Intraoperatives Bild des Gehirngewebes unter dem Mikroskop mit Darstellung des Tumors.	7
Abbildung 3 Intraoperatives Bild mittels BrainLab Navigation®	8
Abbildung 4 Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Switchvorganges epithelialer Zellen in mesenchymale Zellen bei der EMT mit den in der jeweiligen Phase exprimierten Regulatoren und Strukturproteinen [91].	13
Abbildung 5 Die drei Subtypen der EMT nach Kalluri und Weinberg 2009 [91].	15
Abbildung 6 Schematische und deutlich vereinfachte Darstellung einiger Regulatoren der EMT am Beispiel einer Gliomzelle [153]	20
Abbildung 7 Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Färbereaktion..	31
Abbildung 8 A : Progressionsfreie Zeit des Gesamtkollektives stratifiziert nach MGMT-Promotormethylierung	44
Abbildung 9 Expression des Genes ZEB1	45
Abbildung 10 Expressionslevel auf (A) Protein- und (B) RNA-Ebene im Normalhirngewebe im Vergleich zum Glioblastom	46
Abbildung 11 Expressionslevel auf (A) Protein- und (B) RNA-Ebene stratifiziert nach MGMT-Promotormethylierungsstatus im Glioblastom.....	48
Abbildung 12 Kaplan-Meier Kurve der ZEB1 Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben	49
Abbildung 13 Kaplan-Meier Kurve der E-Cadherin-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das progressionsfreie Überleben	50
Abbildung 14 Kaplan-Meier Kurve der N-Cadherin-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben	51
Abbildung 15 Kaplan-Meier Kurve der CDK1-Expression im GBM stratifiziert nach MGMT in Bezug auf das Gesamtüberleben	52
Abbildung 16 (A) Immunhistochemische Expression von N-Cadherin in dem von uns verwendeten Kontrollgewebe(Herzmuskelgewebe), hier zeigt sich eine Expression im Bereich der Z-Streifen und somit der Zellkontakte	61
Abbildung 17 Kaplan-Meier Kurven der restlichen bereits oben im Haupttext beschriebenen Proteinexpression	102
Abbildung 18 Korrelationsmatrix nach Pearson	103

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Befüllung einer 96 Well Platte	28
---	----

12. Anhang

RNA-ISOLATION

CHEMIKALIEN

Name	Hersteller	Nummer
Chloroform Chromasolve® 34854	Honeywell Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze	UN-No: 1888 Charge Lot: 92850
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50) - 50 RNeasy Mini Spin Columns - QIAzol Lysis Reagent - RNase-free Reagents Buffers (RPE und RW1)	Qiagen GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden	Art.-Nr.: 74804
Ethanol ≥ 99,8%	Carl Roth GmbH+Co.KG Schoemperlenstr. 3-5 D-76185 Karlsruhe	UN-No: 1170 Art.-Nr.: 9065.4 Charge Lot: 247259599

GERÄTE

Name	Hersteller	Nummer
Eppendorf Reference® Pipetten -100-1000 µL - 10-100 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 4920000083 Art.-Nr.: 4920000059
Eppendorf Research® plus Pipetten (0,5-10µL)	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 4920000024
Zentrifuge: Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen	200 R
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2B, 91052 Erlangen	1000
Vortex – Genie 2 G-560E	Scientific industries, INC.,	G-560-E

	Bohemia, N.Y., USA	
Waage: Sartorius 1212 MP	Sartorius-Werke GmbH, Göttingen	1212 MP
Schwing-Kugelmühle: Retsch MM400	Retsch GmbH Retsch-Allee 1-5 42781 Haan Germany	MM400

ZUSÄTZLICHE MATERIALIEN

Name	Hersteller	Nummer
ep Dualfilter T.I.P.S.®, PCR clean & sterile, -2-200 µL - 50 – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030077.555 Art.-Nr.: 0030077.571
Eppendorf Safe-Lock Tubes PCR-clean -1,5 ml -2 ml	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030123328 Art.-Nr.: 0030123344
SafeSeal-Tips professional 10 µL, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Art.-Nr.: 770005

MATERIALIEN CDNA

CHEMIKALIEN

Name	Hersteller	Nummer
Ethanol 99.8 %	Carl Roth GmbH+Co.KG Schoemperlenstr. 3-5 D-76185 Karlsruhe	UN-No: 1170 Art.-Nr.: 9065.4 Charge Lot: 247259599
QuantiTect Reverse Transcription Kit 50: - 100 µL 7x gDNA Wipeout Buffer - 50µL Quantiscript Reverse Transcriptase - 200 µL 5x Quantiscript RT	Qiagen GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden	Art.-Nr.: 205311

Buffer - 50 µL RT Primer Mix 1,9 ml RNase-Free-Water		
Chloroform Chromasolve® 34854	Honeywell Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Str. 40, 30926 Seelze	UN-No: 1888 Charge Lot: 92850

GERÄTE

Name	Hersteller	Nummer
Eppendorf Reference® Pipetten -10-100 µL - 0,5-10 µL - 0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 4920000059 Art.-Nr.: 4920000024 Art.-Nr.: 4920000016
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg Germany	

ZUSÄTZLICHE MATERIALIEN

Name	Hersteller	Nummer
Microtubes 1,5 ml DNA LowBind	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co. D- 51588 Nümbrecht	Art.-Nr.: 72.706.700
Eppendorf PCR Tubes, 0,2 ml, PCR clean	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030124332
epT.I.P.S. Reloads, PCR clean, 0.1 – 20 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030077.520
ep Dualfilter T.I.P.S.®, PCR clean & sterile, 2 – 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030077.547

MATERIAL DER RT-PCR

CHEMIKALIEN

Name	Hersteller	Nummer
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: 4369016
TaqMan Gene Expression Assay CDH2	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS00983056_m1
TaqMan Gene Expression Assay ZEB1	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS00611018_m1
TaqMan Gene Expression Assay CDK1	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS00938778_m1
TaqMan Gene Expression Assay AKT1	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS00178289_m1
TaqMan Gene Expression Assay EIF2AK3	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS00984006_m1
TaqMan Gene Expression Assay CDH1	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: HS01023894_m1
TaqMan Gene Expression Assay ACTB	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von	Art.Nr.: HS9999903_m1

	Amerika	
Nuclease-Free-Water 50 ml	Qiagen GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden	Art.-Nr.: 129114

GERÄTE

Name	Hersteller	Nummer
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art. Nr.: 4376600
MicroAmp® FAST 96-Well Support Base	Applied Biosystems by life technologies, Foster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.Nr.: 4379590
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biochtechnologie GmbH, Erlangen	
Latitude E6510	DELL, Round Rock , Texas, Vereinigte Staaten	
Eppendorf Reference® Pipetten -10-100 µl - 0,5-10 µl . 0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 4920000059 Art.-Nr.: 4920000024 Art.-Nr.: 4920000016
Hettich Zentrifuge Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen	420R

ZUSÄTZLICHE MATERIALIEN

Name	Hersteller	Nummer
Klebefolie, optisch klar	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co. D- 51588 Nümbrecht	Art.-Nr.: 95.1994
Eppendorf Safe-Lock	Eppendorf AG, Hamburg	Art.-Nr.: 0030123328

Tubes, 1,5 ml, PCR-clean	Germany	
ep Dualfilter T.I.P.S.®, PCR clean & sterile, 2 – 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.-Nr.: 0030077.547
epT.I.P.S. Reloads, PCR clean, 0.1 – 20 µL	Eppendorf AG, Hamburg Germany	Art.Nr.: 0030073.762
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml	Applied Biosystems by life technologies, Forster City, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika	Art.-Nr.: 4346907 (by Fischer)

MATERIALIEN IMMUNHISTOCHEMIE

CHEMIKALIEN

Name	Hersteller	Nummer
DCS LabLine Waschpuffer, 20x, 500 ml	DCS Innovative Diagnostik Systeme 22397 Hamburg	REF/ Art: WL583C0500
Wasserstoffperoxid 30% 1.08597.1000	MERCK KGaA Darmstadt Germany	Charge: K31833497310 REF/Art.-Nr.: 3-26- 36/37/39-45
DCS LabLine Citrat-Puffer, 10x, 500ml	DCS Innovative Diagnostik Systeme 22397 Hamburg	REF/ Art: CL009C500 Rev.-Nr: CEA0611
Ampuwa Spüllösung 1000ml Plastipur	Fresenius Kabi France	Ch.-B.: 13KCP191
Titriplex III 372g/l	MERCK KGaA Darmstadt Germany	Charge : K32895118417 REF/ Art: 1.08418.0100

TitriPUR Hydrochloric acid 1mol/l 1.09057.1000	MERCK KGaA Darmstadt Germany	UN1789 HC55419037
TitriPUR Sodium hydroxide solution 1mol/l 1.09137.1000	MERCK KGaA Darmstadt Germany	HC55419037
Isopropylalkohol (Isopropanol) 100%, 20 KG	Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH& Co.KG	Charge: 0000508661 0000514155 UN1219 ISOPROPANOL Materialnr.: 1000452629000
Xylol (Isomere) 10l	Carl ROTH GmbH&Co.KG Karlsruhe	Charge: 046238630 UN1307 Art.Nr.: 9713.2
Richard-Allan Scientific Cytoseal XYL	Thermo Scientific, UK	Charge: 348976 REF/ Art: 8312-4
DCS LabLine Antikörper- Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik Systeme 22397 Hamburg	REF/ Art.-Nr.: ALI20R100
Eosin AG 1B-419	Waldeck GmbH&Co.KG Münster	Art.Nr.: C20H6Br4Na205
Kaliumaluminiumsulfat EMSURE	MERCK KGaA Darmstadt Germany	Cas.-No: 7784-24-9 A0365247247
Chloralhydrat EMPROVE	MERCK KGaA Darmstadt Germany	Charge: K4572825430 Index-No: 605-014-00-6
Zitronensäure, Granulat 100% rein	Serva Feinbiochemica Heidelberg	Art.Nr.: 38642
Hämatoxylin cryst. C.I.75290	MERCK KGaA Darmstadt	Cas-No: 517-28-2

	Germany	1.04302.0100
Natriumjodat	MERCK KgaA Darmstadt Germany	Art.Nr.: 6525
Essigsäure , 100%	MERCK KgaA Darmstadt Germany	Charge: K36522863636 1.00063.1000 UN2789
HRP-Polymerenhancer Kit DCS SuperVision 2 (2-Schritt HRP-Polymer-Kit mit DAB)	DCS Innovative Diagnostik Systeme 22397 Hamburg	REF/ Art.: ALI20R100
Paraffin Surgipath Paraplast, Tissue Embedding Medium 1kg	Leica Biosystems Richmond, Inc., USA	REF.: 39601006
Formaldehydlösung, Roti- Histofix 4%	Carl ROTH GmbH&CoKG. Karlsruhe	Art.-Nr.: P087.3
DAB-2-Komponenten-Kit 1x6 ml DAB-Konzentrat R573 1x100 ml DAB-Substratpuffer R574	DCS Innovative Diagnostik Systeme 22397 Hamburg	Kat.-Nr.: DC137C100 Ch.-B.: DC221

GERÄTE UND SOFTWARE

Name	Hersteller	Nummer
Hettich Zentrifuge	Hettich Zentrifugen D- 78532 Tuttlingen	Typ: 1402 Werk-Nr.: 3847-03 Baujahr: 1994
pH-Meter inoLab pH Level 1	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG,	Ser.-Nr.: 01510008

	WTW D-82362 Weilheim	
Schlittenmikrotom HM 355 S	Micorm GmbH 69190 Walldorf Germany	Type: HM 355 S Ser.No.: 26122 Cat.No.: 905450
Glison Pipetten 0,2-2 µl 2-20 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Glison Made in France	Art.-Nr.: P2N GK22408 P20N GL23065 P200N GM20399 P1000N GL29615
Braun Multi Gourmet Dampfgarer	Braun GmbH Deutschland	Typ: 3216
Feuchte Kammer	Keutz Labortechnik D- 35447 Reichskirchen	Typ: ABOG Geräte-Nr.: 111129
Digi-Lock Timer	Carl ROTH GmbH&CoKG. Karlsruhe	Model No.: TR119
Mikroskop Leica DMLB	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH Wetzlar	Type: 020-519.511 501091/180168 Hergestellt: 02/1996
Digital Kamera zur Aufnahme von Präparaten: Digital Sight Nikon DS-L2	Nikon Corporation Made in Japan	Nr.: 213302
Tissue-Tek Mesh Biopsy Cassette U.S. Patent	Sakura Finetek Europe B.V. 2408AV Alphen aan den Rijn, Niederlande	No.: 5,427,742
Heizplatte	Medax Nagel GmbH Kiel	Type: SK-12 F.Nr.: 20563
Ofen Medite TDO Sahara	Medite GmbH D-31303 Burgdorf	Ser.No.: 9101030515
Entwässerungsgerät Tissue	Sakura Finetek Europe	Serie: 59050140

Tek VIP 5 Jr.	B.V. 2408AV Alphen aan den Rijn, Niederlande	
Wasserbad	Medax Nagel GmbH Kiel	Type: SK12 F.Nr.: 26530
Software zur Bestimmung der Signaldichte einzelner Antikörper : ImageJ	Public Domain/ Open Source, Entwickler Wayne Rasband (National Institutes of Health)	Version 2 (Dezember 2009)
Bildbearbeitungsprogramm: Fotos von Apple Marke up Funktion	Apple	Version 2.0 (3130.0.240)

ZUSÄTZLICHE MATERIALIEN

Name	Hersteller	Nummer
SuperFrost Plus-Objektträger Microscope Slides	R. Langenbrinck Labor-u. Medizintechnik Emmendingen-Deutschland	Art.-Nr.: 03-0060
Deckgläser 24x36 mm (Stärke 0,13-0,16 mm)	R. Langenbrinck Labor-u. Medizintechnik Emmendingen-Deutschland	Art.-Nr.: 01-2436/1
Deckgläser 24x50 mm (Stärke 0,13-0,16 mm)	R. Langenbrinck Labor-u. Medizintechnik Emmendingen-Deutschland	Art.-Nr.: 01-2450/1
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 0,5-20 µl 2-200 µl	Eppendorf AG Hamburg Germany	LOT: 021088151105 Order-Nr.: 0030000.854 LOT:031116063510

50-1000 µl		Order-Nr.: 0030000.870 LOT: E163410P2442 Order-Nr.: 0030000.919
Reagiergefäß 1,5 ml	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co. D- 51588 Nümbrecht	LOT: 0000/0008001 REF 72.690.001
Reagiergefäß 2,0 ml	SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co. D- 51588 Nümbrecht	LOT: 5081711 REF 72.691
DCS LabLine Pap Pen	DCS Innovative Diagnostik Systeme	REF/ Art.: PL002R015 Rev.Nr.: A09II
KP Marker	HistoLab Products AB 421 32 Göteborg	Art.-Nr.: 08105

Protokolle RT-PCR

RNA-Isolation

1. Das in flüssigem Stickstoff asservierte Glioblastomgewebe wurde abgewogen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gefüllt, wobei jeweils eine Probenmenge von 40 mg verwertet wurde.
2. Anschließend wurde 1 ml einer Qiazol-Lösung auf die Probe gegeben. Diese Substanz, auch TRIzol-Reagenz genannt, ist eine monophasische Lösung aus Guanidiniumthiocyanat sowie Phenol. Mit Hilfe dieser Lösung werden sowohl Proteine denaturiert, RNasen inaktiviert, Zellen lysiert, und es wird die Möglichkeit für die RNA geschaffen, sich zu lösen unter Beibehaltung der RNA-Integrität. Phenol löst sogar kleine DNA-Fragmente auf, da es den pH-Wert in ein saures Milieu senkt.

3. Zur Homogenisierung wurde das Kugelmühlensystem Mixer Mill MM301 mit einer Frequenz von 30 Hz verwendet, in dem das Gewebe 2x3 Minuten lang durch eine Mahlkugel zerkleinert wurde.
4. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei einer Raumtemperatur von 22°C stehen gelassen, ohne mit den weiteren Schritten fortzufahren, was als eine Art Inkubation bezeichnet werden kann.
5. Bei einer Temperatur von 22°C erfolgte im Anschluss eine Zentrifugierung der Probe mit 20.000x g für 3 Minuten mit dem Ziel, die sich abgesetzten Zelltrümmer eliminieren zu können. So wurde lediglich der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt.
6. Das Gemisch wurde im Anschluss für 15 Sekunden gevortext.
7. Nun erfolgte eine zweite Inkubation bei 22°C Raumtemperatur für 3 Minuten.
8. Eine zweite Zentrifugierung der Probe erfolgte bei einer Temperatur von 4°C und einer Umdrehungszahl von 10.000x g für 15 Minuten, bis sich die Probe in drei Phasen aufgeteilt hatte, wobei die Phasenbildung durch das vorher hinzugegebene Chloroform katalysiert wird. In der untersten Phase, welche eine rötliche Farbe hatte, befanden sich die Proteine, die mittlere Phase, welche sich trüb präsentierte, enthielt die DNA und die oberste Phase enthielt unsere gesuchte RNA, welche vorsichtig in 100 µl Schritten abpipettiert wurde. Der übriggebliebene Rest wurde verworfen.
9. Im Anschluss wurde in das bereits mit dem flüssigen Überstand befüllte Eppendorfgefäß 70%iges Ethanol (Menge 1 VT) pipettiert und das Gemisch gevortext um eine gleichmäßige Durchmischung der beiden Reagenzien zu gewährleisten. VT meint in diesem Fall, dass die Menge des Ethanols sich an die Menge der jeweils gewonnenen wässrigen Phase adaptierte. So schwankte die Menge des wässrigen Überstandes zwischen 350 und 500 µl. Entsprechend wurden bei einer wässrigen Menge von 300 µl auch 300 µl Ethanol zugeführt, bzw. bei 450 entsprechend 450 µl Ethanol.
10. In einem 2 ml Collection Tube wurden nun 700 µl der Probe auf eine RNeasy Säule aufgetragen, gefolgt von einer dritten Zentrifugierung bei 8000x g und einer Temperatur von 22 C° für 30 Sekunden. Das Silikagel bindet RNA ab einer Nukleotidlänge von 200 Nukleotiden. Dadurch wird gewährleistet, dass kleinere Moleküle, wie beispielsweise die tRNA mit ca. 90 Nukleotiden, nicht gebunden werden.
11. Der Durchfluss der Säule wurde verworfen, der Collection Tube beibehalten und der Rest der Probe auf die RNeasy-Säule aufgetragen.

12. Unter den gleichen Bedingungen wie bei Punkt 10. wurde im Anschluss zentrifugiert, der Durchfluss erneut verworfen, unter Beibehaltung des Collection Tubes.
13. Nun wurden 700 µl eines Waschbuffers RW1 auf die Säule pipettiert, wieder gefolgt von einer Zentrifugierung unter den Bedingungen von 10. bzw. 12., allerdings nur für 15 anstatt der vorherigen 30 Sekunden (wieder Durchfluss verwerfen und den Collection Tube beibehalten).
14. Nun wurden 500 µl eines RPE-Buffers auf die Säule gegeben. Bei diesem Puffer handelt es sich wie bei dem vorherigen RW1-Buffer um einen Reinigungspuffer, der dazu dient, die RNA von den übrigen Bestandteilen zu isolieren.
15. Erneut wurde für 2 Minuten bei 8000x g und einer Temperatur von 22°C zentrifugiert.
16. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert.
17. Hinzupipettiert wurden nun 50 µl des RNase-freien Wassers. Dieser Schritt löst die RNA von der Silikonmembran.
18. Wieder wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur und mit 8000x g zentrifugiert.
19. Das gewonnene Material enthielt nun unsere isolierte RNA und konnte entweder sofort für den nächsten Schritt, der Überführung in cDNA, verwendet werden oder, falls dies nicht zeitnah angedacht war, bei -80°C in einem geeigneten Kühlschrank gelagert werden.

Rezepte und Ansätze der Immunhistochemie

1. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Ansatz: Hämatoxylin

- 1g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. unter Erwärmen lösen
- 0,2g Natriumjodat
- 50g Kaliumaluminiumsulfat
- 50g Chloralhydrat
- 1g Zitronensäure

→ Filtrieren, dann ist das Hämalaun einsatzbereit

Ansatz: Eosin

- 0,1%iges wässriges Eosin mit 5 Tropfen 100%iger Essigsäure vermischen

2. EDTA-Puffer

Ansatz: Auf 0,372g Titriplex III von Merck wird 1 Liter Aqua dest. gegeben. Danach wird 40%iges NaOH mit einer 10 µl Pipette solange hinzugegeben, bis ein pH-Wert von 9,0 erreicht wird.

3. Citrat-Puffer

Ansatz: Es wurde die Gebrauchsanweisung von DCS (Innovative Diagnostik-Systeme) befolgt. Da es sich um eine 10x konzentrierte Lösung handelte, wurde 100 ml auf 1 Liter Wasser gegeben. Danach musste mittels eines pH-Meters der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls auf 6,0 korrigiert werden.

4. Waschpuffer

Ansatz: Es wurde die Gebrauchsanweisung von DCS (s.oben) befolgt. Danach musste gegebenenfalls mittels eines pH-Meters der pH-Wert überprüft und auf 7,5 eingestellt werden.

5. DAB

Ansatz: Es wurde die Gebrauchsanweisung von DCS befolgt, wobei auf 1 ml DAB-Substratpuffer 1 Tropfen DAB-Konzentrat kam.

Herstellung der Paraffinschnitte

1. Entnommenes Gewebe wurde für 24 Stunden in einer 4%igen Formalinlösung zur Fixierung belassen.
2. Zurechtschneiden des Gewebes und Positionierung in einer Biopsie-Kassette der Firma Sakura.
3. Über Nacht wurden die Kassetten in ein Entwässerungsgerät gestellt, welches in folgenden Schritten arbeitet:
 - 1h 30 min in 4%igem Formalin
 - 1h in Leitungswasser

- 45 min in 50%igem Alkohol
 - 45 min in 70%igem Alkohol
 - 1h in 96%igem Alkohol
 - 1h in 96%igem Alkohol 2
 - 1h in 100%igem Alkohol
 - 1h in 100%igem Alkohol 2
 - 1h in Xylol
 - 1h in Xylol 2
 - 30 min 1.Paraffinstufe
 - 30 min 2. Paraffinstufe
 - 30 min 3. Paraffinstufe
 - 30 min 4. Paraffinstufe
4. Nach Beendigung der Entwässerung und Paraffineinbettung wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms der Firma Microm Schnitte in einer Dicke von 3 μ angefertigt.
 5. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein Wasserbad bei 40°C gegeben und nach einigen Minuten auf einen Objektträger aufgebracht. Zuvor wurden diese beschriftet, um eine weitere Identifikation der Probe zu gewährleisten.
 6. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 60°C getrocknet. Nun standen sie zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Entparaffinierung der Schnitte

Die Schnitte wurden mit einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert:

1. Xylol für 5 Minuten
2. Xylol für 5 Minuten
3. Ethanol 100% für 2 Minuten
4. Ethanol 100% für 2 Minuten
5. Ethanol 96% für 2 Minuten
6. Ethanol 70% für 2 Minuten
7. Aqua destilliert für 2 Minuten

Herstellung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurde jeweils einer der Schnitte als HE-Färbung angefertigt. Dieser diente der Unterscheidung und differenzierten Darstellung einzelner Gewebe- und Zellstrukturen.

Hierfür wurde folgendes Protokoll befolgt:

1. Schnitte wurden für 5 min in Hämalaun nach Meyer belassen. Es zeigte sich eine rot-braune Färbung der basophilen Strukturen, insbesondere der Zellkerne, da diese große Mengen an basophiler DNA besitzen.
2. Aus dem Hämalaun entnommen wurden die Präparate für 5 min in Leitungswasser zum Bläuen gestellt; pH-Wert-bedingt erfolgt der Farbumschlag von rot-braun zu blau.
3. 5 min in Eosin gegeben, welches azidophile Strukturen wie Mitochondrien rot färbt.
4. Transport der Schnitte in Aqua dest. zur aufsteigenden Alkoholreihe.
5. Ethanol 70 % für 2 Minuten.
6. Ethanol 96 % für 2 Minuten.
7. Ethanol 100% für 2 Minuten.
8. Ethanol 100% für 2 Minuten.
9. Xylol für 2 Minuten.
10. Xylol für 2 Minuten.

Kernfärbung

Im Anschluss an die Chromogenreaktion wurden die Präparate noch einmal mit Aqua dest. (3-mal für jeweils 2 Minuten) gewaschen und eine Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt:

- Schnitte eine Minute lang in Hämalaun nach Meyer (Ansatz siehe Anhang) belassen.
- Bläuen der Schnitte in Leitungswasser; bedingt durch die pH-Wert Änderung kommt es zu einem Farbumschlag.
- Überführung der Präparate in Aqua dest. zwecks Transportes zum Schutz vor Austrocknung.

Die Kernfärbung wird als eine Art Gegenfärbung gewertet und erlaubt eine Orientierung im Präparat, in Bezug auf die Lokalisation der Zellkompartimente.

Entwässern und Eindecken

Um die Präparate mikroskopieren zu können, müssen diese zunächst wieder entwässert werden. Dies geschieht mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe.

9. Ethanol 70 % für 2 Minuten
10. Ethanol 96 % für 2 Minuten
11. Ethanol 100% für 2 Minuten
12. Ethanol 100% für 2 Minuten
13. Xylol für 2 Minuten
14. Xylol für 2 Minuten

Nachdem die Schnitte aus dem Xylol genommen wurden, werden sie zunächst mit einem Tuch trocken getupft. Dann wird ein Tropfen des Cytoseal-Klebers auf den Objektträger getropft und vorsichtig das Präparat mit einem Deckglas bedeckt, ohne dass es zum Einschluss von Luftblasen kommt. Danach werden die nun fertigen Schnitte für circa 10 Minuten auf einer Heizplatte getrocknet.

Rohdaten der qPCR

Normalhirngewebe CT Werte

	Gen	CT-Werte Template			CT-Werte ACTB			Standardabweichung Template			Standardabweichung ACTB			CT-Mean Gen	CT-Mean ACTB	Δ-CT	Ratio 2 ^Δ -Delta CT
NH1	ZEB1	27,750	27,260	29,970	24,420	24,060	24,170	0,245	1,355	1,11	0,18	0,055	0,125	27,5050	24,2167	3,2883	0,1024
NH2	ZEB1	29,620	28,810	28,820	25,870	25,740	26,100	0,405	0,005	0,4	0,065	0,18	0,115	28,8150	25,9033	2,9117	0,1329
NH3	ZEB1	29,960	29,690	29,510	28,010	28,030	28,050	0,135	0,09	0,225	0,01	0,01	0,02	29,7200	28,0300	1,6900	0,3099
NH4	ZEB1	31,750	31,440	31,380	30,610	30,590	30,620	0,155	0,03	0,185	0,01	0,015	0,005	31,5233	30,6067	0,9167	0,5297
NH5	ZEB1	24,860	24,730	/	25,898	26,250	/	0,14	0,135	0,02	0,02	0,01	0,112	24,7950	26,0740	-1,2780	2,4250
NH1	CDK1	37,670	36,620	37,380	26,970	27,130	27,890	0,525	0,38	0,145	0,08	0,38	0,46	37,5250	27,0500	10,4750	0,0007
NH2	CDK1	33,670	33,020	33,440	22,700	22,710	22,900	0,325	0,21	0,115	0,005	0,095	0,1	33,5500	22,7700	10,7800	0,0006
NH3	CDK1	37,060	37,010	36,180	28,010	28,030	28,050	0,025	0,415	0,44	0,01	0,01	0,02	37,0350	28,0300	9,0050	0,0019
NH4	CDK1	39,880	39,690	/	30,610	30,590	30,620	0,095	0	0	0,01	0,015	0,005	39,7850	30,6067	9,1783	0,0017
NH5	CDK1	33,980	33,950	/	23,770	23,350	/	0,09	0	0	0,01	0	0	33,9700	23,5600	10,4100	0,0007
NH1	CDH1	35,960	34,580	35,650	29,980	29,990	29,170	0,69	0,535	0,155	0,295	0,11	0,405	35,8050	29,2800	6,5250	0,0109
NH2	CDH1	35,420	35,890	35,180	28,500	28,320	/	0,235	0,355	0,12	0,09	0	0	35,3000	28,4100	6,8900	0,0084
NH3	CDH1	35,970	34,030	34,030	26,270	25,560	25,930	0,97	0	0,97	0,355	0,185	0,17	34,0300	34,0300	26,1000	0,0000
NH4	CDH1	37,110	36,900	30,640	34,110	33,970	33,280	0,105	3,13	3,235	0,07	0,345	0,415	37,0050	34,0400	2,9650	0,1281
NH5	CDH1	36,970	36,530	/	29,580	29,730	/	0,24	0,133	0,12	0,08	0	0	36,7500	29,6600	7,0900	0,0073
NH1	CDH2	32,960	33,680	33,210	24,420	24,060	24,170	0,36	0,235	0,125	0,18	0,055	0,125	33,4400	24,2167	9,2233	0,0017
NH2	CDH2	31,150	29,650	29,270	28,500	28,320	/	0,75	0,19	0,94	0,09	0	0	29,4600	28,4100	1,0500	0,4830
NH3	CDH2	31,600	31,160	29,570	28,010	28,030	28,050	0,22	0,795	1,015	0,01	0,01	0,02	31,3800	28,0300	3,3500	0,0981
NH4	CDH2	37,050	32,770	33,200	34,110	33,970	33,280	2,14	0,215	1,925	0,07	0,345	0,415	32,9850	34,0400	-1,0550	2,0777
NH5	CDH2	29,660	29,970	/	26,360	26,690	/	0,23	0,366	0,21	0,07	0,08	0,13	29,8200	26,5300	3,2900	0,1020

Glioblastomgewebe CT-Werte

B-Nummer	Gen	Patient				Berechnete Werte			
		Wert1 Gen	Wert 2 Gen	Wert 1 ACTB	Wert 2 ACTB	CT Mean Gen	CT Mean ACTB	Delta CT Patient	Ratio 2 ^Δ - Delta CT Patient
B 1312-06	ZEB1	29,7503	30,1055	26,2811	26,1234	29,9279	26,2023	3,7256	0,0756
B 77-07	ZEB1	28,1213	27,9195	23,4548	23,7470	28,0204	23,6009	4,4195	0,0467
B 1819-07	ZEB1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 1895-07	ZEB1	30,1751	29,7550	32,0864	31,9345	29,9650	32,0105	-2,0454	4,1279
B 2099-07	ZEB1	36,7776	36,8865	36,9814	37,0440	36,8320	37,0127	-0,1807	1,1334
B 2247-07	ZEB1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 10-08	ZEB1	34,2991	34,3302	33,5815	33,5659	34,3147	33,5737	0,7409	0,5984
B 283-08	ZEB1	34,9839	35,2977	35,0267	34,8818	35,1408	34,9542	0,1866	0,8787
B 334-08	ZEB1	29,6014	29,8063	33,3806	33,0673	29,7038	33,2240	-3,5201	11,4728
B 362-08	ZEB1	36,0114	35,7247	31,2856	31,7310	35,8680	31,5083	4,3597	0,0487
B 365-08	ZEB1	/	/	/	/	/	/	/	/
B-420-08	ZEB1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 89-09	ZEB1	34,1928	33,7311	34,5580	34,9575	33,9619	34,7577	-0,7958	1,7360
B 169-09	ZEB1	28,7697	28,9349	24,7632	24,4200	28,8523	24,5916	4,2607	0,0522
B 245-09	ZEB1	32,6883	32,9598	25,9800	25,4135	32,8240	25,6967	7,1273	0,0072
B 369-09	ZEB1	27,3137	27,5817	26,4130	26,9847	27,4477	26,6989	0,7489	0,5951
B 393-09	ZEB1	31,6982	31,8810	30,3866	30,4827	31,7896	30,4346	1,3549	0,3910
B 526-09	ZEB1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 649-09	ZEB1	30,7821	30,9563	25,6287	25,5659	30,8692	25,5973	5,2719	0,0259
B 704-09	ZEB1	29,9916	29,7490	26,9937	27,3984	29,8703	27,1961	2,6742	0,1567
B 774-09	ZEB1	35,9987	35,6059	24,6208	24,7584	35,8023	24,6896	11,1127	0,0005
B 125-10	ZEB1	34,5739	34,3335	30,4804	30,2680	34,4537	30,3742	4,0795	0,0592
B 280-10	ZEB1	31,9717	32,1894	26,6696	26,6132	32,0805	26,6414	5,4391	0,0230
B 664-10	ZEB1	35,4812	35,9592	32,8576	32,8746	35,7202	32,8661	2,8540	0,1383
B 705-10	ZEB1	34,0183	34,1315	30,6142	30,5832	34,0749	30,5987	3,4763	0,0899
B 730-10	ZEB1	32,8932	33,0642	25,3024	25,0900	32,9787	25,1962	7,7825	0,0045
B 598-12	ZEB1	/	/	29,2283	29,0685	/	29,1484	/	/
B 07-13	ZEB1	35,9652	33,9405	31,1843	30,9482	34,9528	31,0663	3,8866	0,0676
B 711-12	ZEB1	30,8506	30,8589	28,4624	28,9755	30,8548	28,7190	2,1358	0,2275
B 249-13	ZEB1	29,1044	29,1224	20,9633	20,4485	29,1134	20,7059	8,4075	0,0029
B 712-13	ZEB1	30,7088	30,5297	30,9647	31,3061	30,6193	31,1354	-0,5162	1,4301
B 731-13	ZEB1	27,1314	27,5836	28,1849	28,1104	27,3575	28,1476	-0,7901	1,7292
B 1141-13	ZEB1	35,9503	35,9418	29,3227	29,2519	35,9461	29,2873	6,6588	0,0099
B 1272-13	ZEB1	34,9860	34,7084	28,2136	28,7536	34,8472	28,4836	6,3636	0,0121
B 456-15	ZEB1	29,0414	29,5297	27,9336	27,9364	29,2856	27,9350	1,3505	0,3921
B 406-15	ZEB1	30,5068	30,5824	31,3060	31,7436	30,5446	31,5248	-0,9802	1,9727
B 238-15	ZEB1	32,7709	32,5802	29,2417	29,7686	32,6755	29,5051	3,1704	0,1111
B 231-15	ZEB1	30,0309	30,2998	26,7721	26,7606	30,1653	26,7664	3,3990	0,0948
B 210-15	ZEB1	27,8460	27,5850	24,9446	24,5506	27,7155	24,7476	2,9679	0,1278
B 1307-14	ZEB1	30,9757	31,1758	27,9404	27,9848	31,0758	27,9626	3,1131	0,1156
B 645-14	ZEB1	30,3307	30,0294	27,6920	27,9176	30,1800	27,8048	2,3753	0,1927
B 274-14	ZEB1	31,3789	31,5540	26,9835	27,3592	31,4664	27,1713	4,2951	0,0509
B 122-14	ZEB1	32,1232	31,9739	28,1527	28,1706	32,0486	28,1616	3,8869	0,0676

B-Nummer	Gen	Patient				Berechnete Werte			
		Wert1 Gen	Wert 2 Gen	Wert 1 ACTB	Wert 2 ACTB	CT Mean Gen	CT Mean ACTB	Delta CT Patient	Ratio 2^Δ- Delta CT Patient
B 1312-06	CDK1	32,0643	31,6528	26,2811	26,1234	31,8585	26,2023	5,6563	0,0198
B 77-07	CDK1	29,7174	29,5577	23,4548	23,7470	29,6376	23,6009	6,0367	0,0152
B 1819-07	CDK1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 1895-07	CDK1	30,5576	30,9526	31,7270	32,1814	30,7551	31,9542	-1,1991	2,2960
B 2099-07	CDK1	35,2794	35,2223	36,9814	37,0440	35,2509	37,0127	-1,7618	3,3913
B 2247-07	CDK1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 10-08	CDK1	35,5192	35,3335	33,5815	33,5659	35,4264	33,5737	1,8526	0,2769
B 283-08	CDK1	29,9894	29,9857	35,0267	34,8818	29,9876	34,9542	-4,9667	31,2692
B 334-08	CDK1	32,6011	32,8750	33,3806	33,0673	32,7381	33,2240	-0,4859	1,4005
B 362-08	CDK1	34,5462	34,7073	32,9479	32,9524	34,6268	32,9502	1,6766	0,3128
B 365-08	CDK1	36,3006	36,3388	31,2856	31,7310	36,3197	31,5083	4,8113	0,0356
B 420-08	CDK1	34,2204	34,0849	31,3135	31,2045	34,1526	31,2590	2,8936	0,1346
B 89-09	CDK1	35,6329	35,7352	34,5580	34,9575	35,6841	34,7577	0,9263	0,5262
B 169-09	CDK1	32,9461	33,1472	34,1854	34,2477	33,0466	34,2165	-1,1699	2,2500
B 245-09	CDK1	32,9023	33,2682	25,9800	25,4135	33,0852	25,6967	7,3885	0,0060
B 369-09	CDK1	32,9565	33,0880	26,4130	26,9847	33,0223	26,6989	6,3234	0,0125
B 393-09	CDK1	35,9178	36,3891	30,3866	30,4827	36,1534	30,4346	5,7188	0,0190
B 526-09	CDK1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 649-09	CDK1	33,9689	33,9379	25,6287	25,5659	33,9534	25,5973	8,3561	0,0031
B 704-09	CDK1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 774-09	CDK1	32,5843	32,4449	24,6208	24,7584	32,5146	24,6896	7,8250	0,0044
B 125-10	CDK1	33,4559	33,5332	30,4804	30,2680	33,4946	30,3742	3,1203	0,1150
B 280-10	CDK1	35,8968	35,4044	26,6696	26,6132	35,6506	26,6414	9,0092	0,0019
B 664-10	CDK1	35,9715	35,6552	25,2822	25,0913	35,8134	25,1867	10,6266	0,0006
B 705-10	CDK1	33,3696	33,4159	30,6142	/	33,3928	30,6142	/	/
B 730-10	CDK1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 598-12	CDK1	33,9547	34,1273	29,2283	29,0685	34,0410	29,1484	4,8926	0,0337
B 07-13	CDK1	36,7836	36,7013	31,1843	30,9482	36,7425	31,0663	5,6762	0,0196
B 711-12	CDK1	35,9751	36,0231	25,4151	25,6620	35,9991	25,5385	10,4605	0,0007
B 249-13	CDK1	31,3089	31,1954	20,9633	20,4485	31,2522	20,7059	10,5463	0,0007
B 712-13	CDK1	37,9703	38,3577	30,9647	31,3061	38,1640	31,1354	7,0286	0,0077
B 731-13	CDK1	30,8092	30,7995	27,5501	27,4966	30,8043	27,5233	3,2810	0,1029
B 1141-13	CDK1	36,7026	36,7444	29,3227	29,2519	36,7235	29,2873	7,4362	0,0058
B 1272-13	CDK1	36,4491	36,5515	30,3027	30,4980	36,5003	30,4003	6,0999	0,0146
B 456-15	CDK1	32,1299	32,5988	27,9336	27,9364	32,3643	27,9350	4,4293	0,0464
B 406-15	CDK1	31,0918	31,2737	31,3060	31,7436	31,1828	31,5248	-0,3420	1,2675
B 238-15	CDK1	29,6328	29,3603	29,2417	29,7686	29,4966	29,5051	-0,0085	1,0059
B 231-15	CDK1	33,9422	34,3869	26,7721	26,7606	34,1646	26,7664	7,3982	0,0059
B 210-15	CDK1	31,1012	30,9448	24,5506	24,7302	31,0230	24,6404	6,3826	0,0120
B 1307-14	CDK1	30,6184	30,2488	26,0686	26,0549	30,4336	26,0618	4,3718	0,0483
B 645-14	CDK1	31,5575	31,8100	27,6920	27,9176	31,6837	27,8048	3,8790	0,0680
B 274-14	CDK1	31,2498	31,3046	26,9835	27,3592	31,2772	27,1713	4,1059	0,0581
B 122-14	CDK1	36,9561	36,6911	28,1527	28,1706	36,8236	28,1616	8,6620	0,0025

B-Nummer	Gen	Patient				Berechnete Werte			
		Wert1 Gen	Wert 2 Gen	Wert 1 ACTB	Wert 2 ACTB	CT Mean Gen	CT Mean ACTB	Delta CT Patient	Ratio 2 [^] - Delta CT Patient
B 1312-06	CDH1	34,5785	35,0949	26,9764	26,9450	34,8367	26,9607	7,8760	0,0043
B 77-07	CDH1	30,3350	30,2698	22,1713	22,0329	30,3024	22,1021	8,2003	0,0034
B 1819-07	CDH1	32,8460	32,5784	28,4205	28,4882	32,7122	28,4544	4,2578	0,0523
B 1895-07	CDH1	35,2980	35,3829	25,5312	25,7292	35,3404	25,6302	9,7102	0,0012
B 2099-07	CDH1	33,8150	33,2997	26,2298	26,2354	33,5574	26,2326	7,3248	0,0062
B 2247-07	CDH1	36,8295	36,5271	30,7915	30,6753	36,6783	30,7334	5,9449	0,0162
B 10-08	CDH1	34,4951	34,5674	33,3056	33,4504	34,5312	33,3780	1,1533	0,4496
B 283-08	CDH1	36,9863	36,7745	26,6365	26,2182	36,8804	26,4273	10,4531	0,0007
B 334-08	CDH1	36,2138	36,3245	31,9904	31,6599	36,2691	31,8252	4,4440	0,0459
B 362-08	CDH1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 365-08	CDH1	36,3339	36,5058	31,9904	31,6599	36,4199	31,8252	4,5947	0,0414
B 420-08	CDH1	34,2490	34,2736	26,8324	26,7161	34,2613	26,7742	7,4871	0,0056
B 89-09	CDH1	36,6551	36,3607	31,2277	31,7856	36,5079	31,5066	5,0013	0,0312
B 169-09	CDH1	30,4349	30,3822	26,5127	26,7048	30,4085	26,6087	3,7998	0,0718
B 245-09	CDH1	36,8656	36,9942	24,0765	24,5011	36,9299	24,2888	12,6411	0,0002
B 369-09	CDH1	33,8050	33,6943	22,8765	22,6500	33,7497	22,7633	10,9864	0,0005
B 393-09	CDH1	33,4579	33,7029	29,6413	29,9926	33,5804	29,8169	3,7635	0,0736
B 526-09	CDH1	30,4909	30,7610	22,7639	23,0904	30,6260	22,9271	7,6989	0,0048
B 649-09	CDH1	29,4384	29,1572	26,8793	26,7171	29,2978	26,7982	2,4996	0,1768
B 704-09	CDH1	30,9629	30,8040	34,4343	34,6111	30,8834	34,5227	-3,6393	12,4603
B 774-09	CDH1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 125-10	CDH1	35,1560	34,7786	30,3075	30,8065	34,9673	30,5570	4,4103	0,0470
B 280-10	CDH1	33,4174	33,7249	31,3446	31,1909	33,5711	31,2677	2,3034	0,2026
B 664-10	CDH1	26,1817	26,2098	20,6471	20,7523	26,1958	20,6997	5,4961	0,0222
B 705-10	CDH1	36,5394	36,9733	31,8810	31,9961	36,7563	31,9386	4,8178	0,0355
B 730-10	CDH1	35,8395	35,5507	29,5954	29,9496	35,6951	29,7725	5,9226	0,0165
B 598-12	CDH1	32,4016	32,5309	24,2271	24,1967	32,4662	24,2119	8,2543	0,0033
B 07-13	CDH1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 711-12	CDH1	34,6759	34,6803	26,7442	26,8651	34,6781	26,8047	7,8734	0,0043
B 249-13	CDH1	30,9685	30,9823	24,1987	24,5019	30,9754	24,3503	6,6251	0,0101
B 712-13	CDH1	32,2690	31,9735	28,0289	28,2736	32,1212	28,1512	3,9700	0,0638
B 731-13	CDH1	32,7593	32,2247	22,2304	22,4374	32,4920	22,3339	10,1582	0,0009
B 1141-13	CDH1	/	/	/	/	/	/	/	/
B 1272-13	CDH1	30,6461	30,8849	31,1946	31,0104	30,7655	31,1025	-0,3370	1,2632
B 456-15	CDH1	30,2638	30,1936	20,4162	20,4951	30,2287	20,4557	9,7730	0,0011
B 406-15	CDH1	35,9700	35,8584	31,3060	31,7436	35,9142	31,5248	4,3894	0,0477
B 238-15	CDH1	35,4033	35,7347	29,2417	29,7686	35,5690	29,5051	6,0639	0,0149
B 231-15	CDH1	34,9989	35,2664	29,1359	29,3233	35,1326	29,2296	5,9031	0,0167
B 210-15	CDH1	32,9719	33,1360	25,9915	26,0396	33,0540	26,0156	7,0384	0,0076
B 1307-14	CDH1	26,1053	26,3556	27,6217	27,7867	26,2304	27,7042	-1,4738	2,7775
B 645-14	CDH1	33,8781	34,3624	27,6920	27,9176	34,1203	27,8048	6,3155	0,0126
B 274-14	CDH1	33,6087	33,3398	27,4231	27,1881	33,4742	27,3056	6,1686	0,0139
B 122-14	CDH1	33,6172	33,7413	28,1527	28,1706	33,6793	28,1616	5,5176	0,0218

B-Nummer	Gen	Patient				Berechnete Werte			
		Wert1 Gen	Wert 2 Gen	Wert 1 ACTB	Wert 2 ACTB	CT Mean Gen	CT Mean ACTB	Delta CT Patient	Ratio 2^ - Delta CT Patient
B 1312-06	CDH2	28,4494	28,2471	26,2811	26,1234	28,3483	26,2023	2,1460	0,2259
B 77-07	CDH2	26,2739	26,1819	23,4548	23,7470	26,2279	23,6009	2,6270	0,1619
B 1819-07	CDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
B 1895-07	CDH2	28,9663	29,0289	32,1814	32,0864	28,9976	32,1339	-3,1363	8,7927
B 2099-07	CDH2	26,4625	26,3685	23,3002	23,2598	26,4155	23,2800	3,1355	0,1138
B 2247-07	CDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
B 10-08	CDH2	35,2398	34,7396	33,5815	33,5659	34,9897	33,5737	1,4160	0,3748
B 283-08	CDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
B 334-08	CDH2	30,9515	31,1643	31,3254	31,5374	31,0579	31,4314	-0,3735	1,2955
B 362-08	CDH2	33,7449	33,9660	32,9479	32,9524	33,8554	32,9502	0,9053	0,5339
B 365-08	CDH2	35,2867	35,2300	31,2856	31,7310	35,2583	31,5083	3,7500	0,0743
B 420-08	CDH2	29,7898	29,9595	31,3135	31,2045	29,8747	31,2590	-1,3843	2,6105
B 89-09	CDH2	33,4058	33,3805	34,5580	34,9575	33,3931	34,7577	-1,3646	2,5750
B 169-09	CDH2	27,8662	27,9933	24,7632	24,4200	27,9297	24,5916	3,3382	0,0989
B 245-09	CDH2	29,7416	30,0610	25,9800	25,4135	29,9013	25,6967	4,2046	0,0542
B 369-09	CDH2	28,7160	28,8848	26,4130	26,9847	28,8004	26,6989	2,1016	0,2330
B 393-09	CDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
B 526-09	CDH2	29,2588	29,2249	31,2664	31,2315	29,2419	31,2489	-2,0071	4,0196
B 649-09	CDH2	28,5036	28,5383	25,6287	25,5659	28,5210	25,5973	2,9237	0,1318
B 704-09	CDH2	32,0171	32,1193	26,9937	27,3984	32,0682	27,1961	4,8721	0,0341
B 774-09	CDH2	34,2125	34,4682	24,6208	24,7584	34,3403	24,6896	9,6507	0,0012
B 125-10	CDH2	33,9724	33,6880	30,0081	30,2680	33,8302	30,1380	3,6922	0,0774
B 280-10	CDH2	26,2257	26,6962	26,6696	26,6132	26,4609	26,6414	-0,1805	1,1333
B 664-10	CDH2	34,5009	34,8760	32,8576	32,8746	34,6885	32,8661	1,8224	0,2828
B 705-10	CDH2	34,9672	34,7632	30,6142	30,5832	34,8652	30,5987	4,2665	0,0520
B 730-10	CDH2	26,6935	26,6176	25,3024	25,0900	26,6556	25,1962	1,4594	0,3637
B 598-12	CDH2	31,9597	31,7584	29,2283	29,0685	31,8590	29,1484	2,7106	0,1528
B 07-13	CDH2	/	/	/	/	/	/	/	/
B 711-12	CDH2	29,0177	28,8566	25,8391	25,6620	28,9372	25,7505	3,1866	0,1098
B 249-13	CDH2	27,2744	27,0597	20,9633	20,4485	27,1671	20,7059	6,4612	0,0113
B 712-13	CDH2	32,3064	31,8958	30,9647	31,3061	32,1011	31,1354	0,9657	0,5120
B 731-13	CDH2	29,8904	29,8831	28,1849	28,1104	29,8867	28,1476	1,7391	0,2996
B 1141-13	CDH2	30,9191	30,6533	29,3227	29,2519	30,7862	29,2873	1,4989	0,3538
B 1272-13	CDH2	30,2489	30,1982	30,3027	30,4980	30,2235	30,4003	-0,1768	1,1304
B 456-15	CDH2	27,7513	28,0764	27,9336	27,9364	27,9138	27,9350	-0,0212	1,0148
B 406-15	CDH2	28,2379	28,0108	/	/	28,1244	/	/	/
B 238-15	CDH2	30,8225	31,0614	29,2417	29,7686	30,9420	29,5051	1,4368	0,3694
B 231-15	CDH2	28,6348	28,9609	26,7721	26,7606	28,7979	26,7664	2,0315	0,2446
B 210-15	CDH2	25,3341	25,3523	24,5506	24,7302	25,3432	24,6404	0,7028	0,6144
B 1307-14	CDH2	27,5800	27,8132	27,9404	27,9848	27,6966	27,9626	-0,2660	1,2025
B 645-14	CDH2	24,9139	24,7343	/	/	24,8241	/	/	/
B 274-14	CDH2	25,3569	25,4327	26,9835	27,3592	25,3948	27,1713	-1,7765	3,4260
B 122-14	CDH2	27,2646	27,7534	28,1527	28,1706	27,5090	28,1616	-0,6527	1,5721

Rohdaten der Immunhistochemie

IHC-Score im Normalhirngewebe

B-Nummer	Protein	Anzahl gefärbte Zellen	Anzahl nicht gefärbte Zellen	Gesamtzahl der Zellen	Prozentual gefärbt	Prozentual nicht gefärbt	Intensität der Färbung	Intensität x Prozentzahl
NH1	ZEB1	485	673	1158	41,88	58,12	2	10
NH2	ZEB1	22	228	250	8,8	91,2	1	1
NH3	ZEB1	49	709	758	6,46	93,54	1	1
NH4	ZEB1	43	210	253	17	83	1	2
NH5	ZEB1	24	276	300	8	92	1	1
NH1	CDK1	0	100	100	0	100	0	0
NH2	CDK1	14	316	330	4,24	95,76	1	1
NH3	CDK1	21	551	571	3,68	96,32	1	1
NH4	CDK1	39	221	260	15	85	1	2
NH5	CDK1	13	176	189	6,88	93,12	1	1
NH1	E-Cadherin	0	100	0	0	100	0	0
NH2	E-Cadherin	0	100	100	0	100	0	0
NH3	E-Cadherin	0	100	100	0	100	0	0
NH4	E-Cadherin	14	220	234	5,98	94,02	1	1
NH5	E-Cadherin	23	239	262	8,78	91,22	1	1
NH1	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
NH2	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
NH3	N-Cadherin	/	/	/	/	/	0	0
NH4	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
NH5	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1

IHC-Score im Glioblastomgewebe

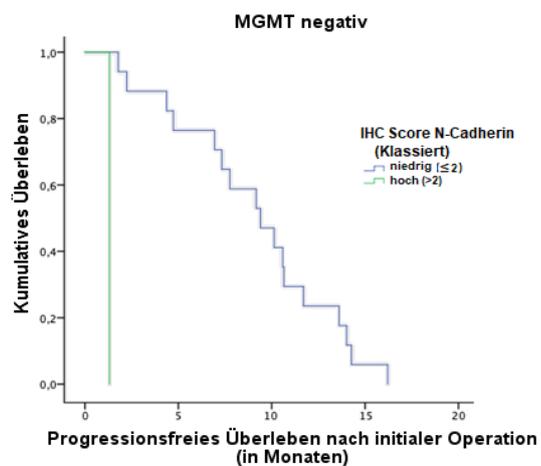
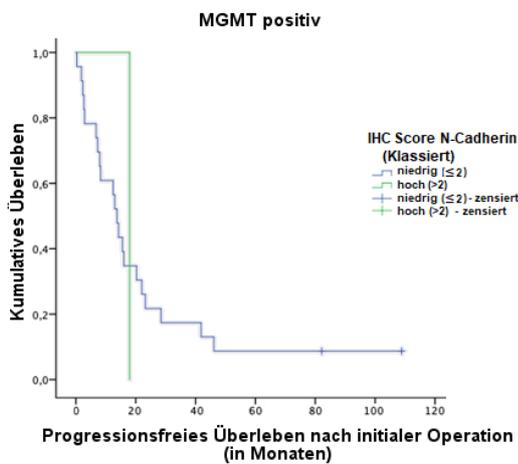
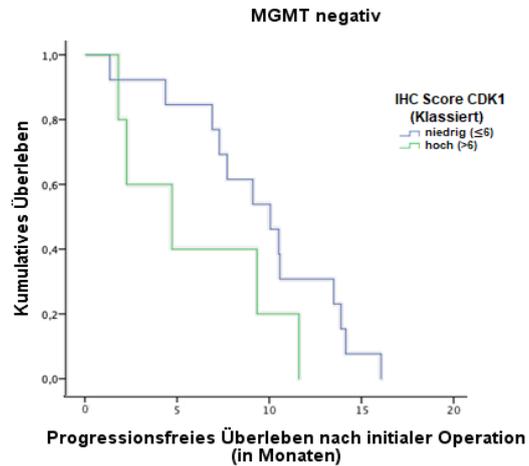
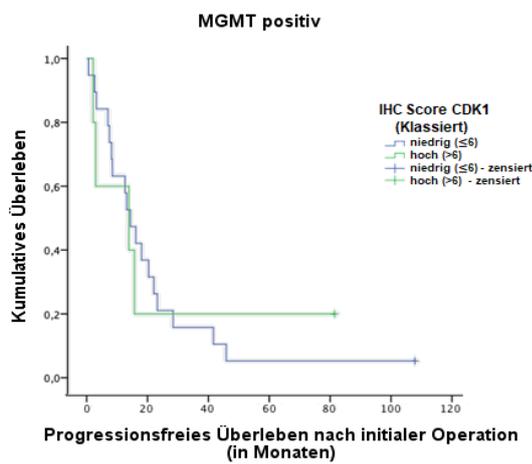
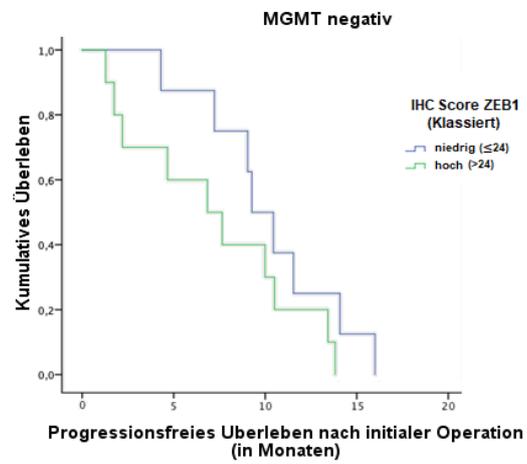
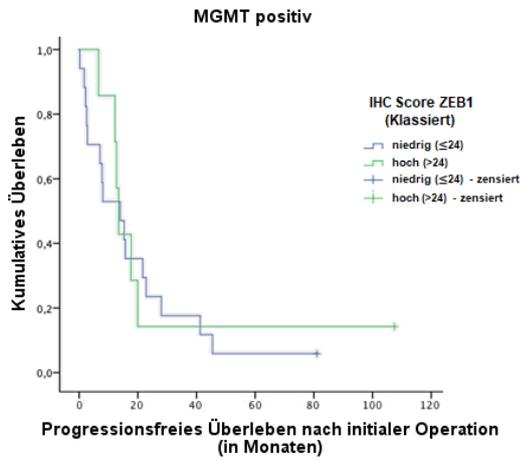
B-Nummer	Protein	Anzahl gefärbte Zellen	Anzahl nicht gefärbte Zellen	Gesamtzahl der Zellen	Prozentual gefärbt	Prozentual nicht gefärbt	Intensität der Färbung	Intensität x Prozentzahl
7	ZEB1	326	336	662	49,24	50,75	2	10
10	ZEB1	396	201	597	66,33	33,66	3	21
77	ZEB1	422	113	535	78,88	21,12	3	24
89	ZEB1	734	277	1011	72,6	27,39	3	24
122	ZEB1	629	147	776	81,06	19,94	3	27
125	ZEB1	614	112	726	84,57	15,43	3	27
169	ZEB1	292	321	613	47,63	52,37	3	15
210	ZEB1	917	502	1419	64,62	35,37	2	14
231	ZEB1	376	311	687	54,73	45,27	2	12
238	ZEB1	1239	107	1346	92,05	7,95	3	30
245	ZEB1	715	335	1050	68,1	31,9	2	14
249	ZEB1	490	105	595	82,35	17,65	3	27
250	ZEB1	983	191	1174	83,73	16,27	3	27
274	ZEB1	484	195	679	71,28	28,72	2	16
280	ZEB1	390	362	752	51,86	48,24	2	12
283	ZEB1	735	238	973	75,54	24,46	3	24
334	ZEB1	791	84	875	90,4	10,6	3	30
353	ZEB1	338	418	756	44,71	55,29	2	10
362	ZEB1	281	515	796	35,3	64,7	3	12
365	ZEB1	138	863	1001	13,79	86,21	2	4
369	ZEB1	436	262	698	62,46	37,54	3	21
393	ZEB1	776	116	892	87	13	2	18
406	ZEB1	719	198	917	78,41	21,59	3	24
420	ZEB1	428	98	518	82,63	22,9	3	27
456	ZEB1	293	280	573	51,13	48,87	3	18
526	ZEB1	461	104	565	81,59	18,41	3	27
598	ZEB1	612	165	777	78,76	21,24	2	16
645	ZEB1	889	214	1103	80,59	19,41	3	27
649	ZEB1	461	306	767	60,11	39,9	2	14
664	ZEB1	1365	118	1483	92,04	7,96	3	30
704	ZEB1	794	83	877	90,55	9,45	3	30
705	ZEB1	1116	88	1204	92,69	7,89	3	30
711	ZEB1	574	192	766	74,93	25,07	2	16
712	ZEB1	682	103	785	86,88	13,12	3	27
730	ZEB1	699	183	882	79,25	20,75	3	24
731	ZEB1	554	222	776	71,39	28,61	3	24
774	ZEB1	654	277	931	70,25	29,75	3	24
1141	ZEB1	553	368	921	60,04	39,96	2	14
1272	ZEB1	777	78	855	90,88	9,12	3	30
1307	ZEB1	767	189	956	80,23	19,77	3	27
1312	ZEB1	474	272	746	63,53	36,46	3	21
1819	ZEB1	676	62	738	91,6	8,4	3	30
1895	ZEB1	813	68	881	92,28	7,72	3	30
2099	ZEB1	676	268	944	71,61	28,39	3	24
2247	ZEB1	455	150	605	75,2	24,79	3	24

B-Nummer	Protein	Anzahl gefärbte Zellen	Anzahl nicht gefärbte Zellen	Gesamtzahl der Zellen	Prozentual gefärbt	Prozentual nicht gefärbt	Intensität der Färbung	Intensität x Prozentzahl
7	CDK1	125	562	687	18,2	81,8	1	2
10	CDK1	122	400	522	23,37	76,63	3	9
77	CDK1	545	293	838	65,04	34,96	3	21
89	CDK1	156	1065	1221	12,78	87,22	2	4
122	CDK1	122	577	699	17,45	82,55	3	6
125	CDK1	122	836	958	12,73	87,27	3	6
169	CDK1	155	513	668	23,2	76,8	2	6
210	CDK1	162	1068	1230	13,17	86,83	2	4
231	CDK1	75	643	718	10,45	89,55	2	4
238	CDK1	329	783	1112	29,58	70,42	3	9
245	CDK1	296	416	712	41,57	58,43	3	15
249	CDK1	95	549	644	14,75	85,25	2	4
250	CDK1	240	994	1234	19,45	80,55	3	6
274	CDK1	277	679	956	28,97	71,03	3	9
280	CDK1	127	871	998	12,73	87,27	2	4
283	CDK1	245	898	1143	21,43	78,57	2	6
334	CDK1	102	754	856	11,92	88,08	2	4
353	CDK1	106	583	689	15,38	84,62	2	4
362	CDK1	48	522	570	8,42	91,58	2	2
365	CDK1	114	553	667	17,09	82,91	2	4
369	CDK1	137	431	568	24,12	75,88	3	9
393	CDK1	99	460	559	17,71	82,29	2	4
406	CDK1	131	876	1007	13,01	86,99	2	4
420	CDK1	57	579	636	8,96	91,04	2	2
456	CDK1	110	533	643	17,12	82,88	1	2
526	CDK1	120	451	571	21,02	78,98	2	6
598	CDK1	126	794	920	13,7	86,3	3	6
645	CDK1	203	549	752	27	73	2	6
649	CDK1	0	100	100	0	100	0	0
664	CDK1	458	860	1318	34,75	65,25	3	12
704	CDK1	55	798	853	6,45	93,55	1	1
705	CDK1	351	389	740	47,43	52,57	3	15
711	CDK1	150	808	958	15,66	84,34	3	6
712	CDK1	61	637	698	8,74	91,26	1	1
730	CDK1	201	423	624	32,21	67,79	3	12
731	CDK1	33	659	692	4,77	95,23	1	1
774	CDK1	65	543	608	10,69	89,31	2	4
1141	CDK1	86	745	831	10,35	89,65	2	4
1272	CDK1	188	739	927	20,28	79,72	2	6
1307	CDK1	167	1055	1222	13,67	86,33	3	6
1312	CDK1	124	754	878	14,12	85,88	2	4
1819	CDK1	92	368	460	20	80	3	9
1895	CDK1	93	401	494	18,83	81,17	2	4
2099	CDK1	114	545	659	17,3	82,7	3	6
2247	CDK1	100	515	615	19,42	80,58	2	4

B-Nummer	Protein	Anzahl gefärbte Zellen	Anzahl nicht gefärbte Zellen	Gesamtzahl der Zellen	Prozentual gefärbt	Prozentual nicht gefärbt	Intensität der Färbung	Intensität x Prozentzahl
7	E-Cadherin	82	497	579	14,16	85,84	1	2
10	E-Cadherin	51	566	617	8,27	91,73	2	2
77	E-Cadherin	54	691	745	7,23	92,75	1	1
89	E-Cadherin	191	201	392	48,72	51,28	3	15
122	E-Cadherin	203	360	563	36,06	63,94	2	8
125	E-Cadherin	205	548	753	27,22	72,78	2	6
169	E-Cadherin	185	301	486	38,07	61,93	3	12
210	E-Cadherin	152	1366	1518	10,01	89,99	2	4
231	E-Cadherin	45	626	671	6,71	93,29	1	1
238	E-Cadherin	103	1277	1380	7,46	92,54	2	2
245	E-Cadherin	425	380	805	52,8	47,2	3	18
249	E-Cadherin	51	658	709	7,19	92,8	1	1
250	E-Cadherin	29	906	935	3,1	96,9	1	1
274	E-Cadherin	219	810	1029	21,28	78,72	2	6
280	E-Cadherin	138	663	801	17,23	82,77	3	6
283	E-Cadherin	66	912	978	6,75	93,25	1	1
334	E-Cadherin	75	641	716	10,47	89,52	2	4
353	E-Cadherin	238	424	662	35,95	64,05	3	12
362	E-Cadherin	223	273	496	44,96	55,04	2	10
365	E-Cadherin	191	434	625	30,56	69,44	2	8
369	E-Cadherin	130	475	605	21,49	78,51	2	6
393	E-Cadherin	140	849	989	14,16	85,84	2	4
406	E-Cadherin	105	842	947	11,09	88,91	1	2
420	E-Cadherin	156	272	428	36,45	63,55	2	8
456	E-Cadherin	138	555	693	19,91	80,08	2	4
526	E-Cadherin	77	464	541	14,23	85,77	1	2
598	E-Cadherin	62	830	892	6,95	93,05	1	1
645	E-Cadherin	82	831	913	8,98	91,02	2	2
649	E-Cadherin	43	925	968	4,44	95,56	1	1
664	E-Cadherin	209	1114	1323	15,8	84,2	2	4
704	E-Cadherin	151	872	1023	14,76	85,24	1	2
705	E-Cadherin	68	843	911	7,46	92,54	2	2
711	E-Cadherin	230	356	586	39,25	60,75	3	12
712	E-Cadherin	102	496	598	17,06	82,94	1	2
730	E-Cadherin	190	692	882	21,54	78,46	1	3
731	E-Cadherin	83	1105	1188	6,97	93,01	1	1
774	E-Cadherin	191	489	680	28,09	71,91	3	9
1141	E-Cadherin	203	668	871	23,31	76,69	1	3
1272	E-Cadherin	157	784	941	16,68	83,32	2	4
1307	E-Cadherin	243	1054	1297	18,74	81,26	2	4
1312	E-Cadherin	208	576	784	26,53	73,47	2	6
1819	E-Cadherin	84	462	546	15,38	84,62	1	2
1895	E-Cadherin	220	242	462	47,62	52,38	2	10
2099	E-Cadherin	210	505	715	29,37	70,63	3	9
2247	E-Cadherin	0	986	986	0	100	0	0

B-Nummer	Protein	Anzahl gefärbte Zellen	Anzahl nicht gefärbte Zellen	Gesamtzahl der Zellen	Prozentual gefärbt	Prozentual nicht gefärbt	Intensität der Färbung	Intensität x Prozentzahl
7	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
10	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
77	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
89	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
122	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
125	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
169	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
210	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
231	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
238	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
245	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
249	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
250	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
274	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
280	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
283	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
334	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
353	N-Cadherin	/	/	/	/	/	3	3
362	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
365	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
369	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
393	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
406	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
420	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
456	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
526	N-Cadherin	/	/	/	/	/	3	3
598	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
645	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
649	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
664	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
704	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
705	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
711	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
712	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
730	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
731	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
774	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
1141	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
1272	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
1307	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
1312	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
1819	N-Cadherin	/	/	/	/	/	1	1
1895	N-Cadherin	/	/	/	/	/	3	3
2099	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2
2247	N-Cadherin	/	/	/	/	/	2	2

Restliche Kaplan-Meyer-Kurven der verschiedenen Gene in Bezug auf Progress und Gesamtüberleben stratifiziert nach MGMT-Methylierungsstatus



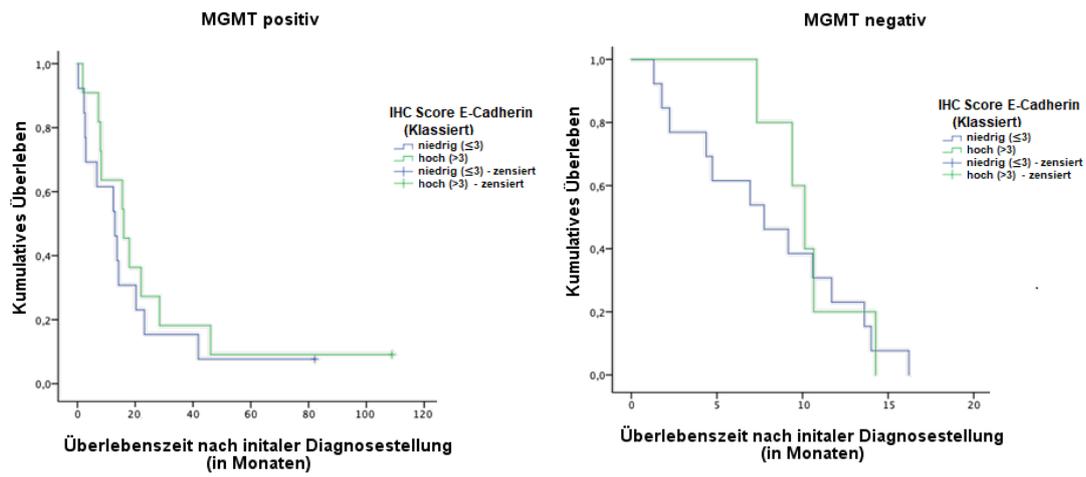


Abbildung 17 Kaplan-Meier Kurven der restlichen bereits oben im Haupttext beschriebenen Proteinexpression im GBM in der Immunhistochemie in Bezug auf ein progressionsfreies und das Gesamtüberleben; Einteilung nach jeweils individuellem Median jedes Gens in eine low und eine high Expressionsgruppe stratifiziert nach MGMT Methylierungsstatus

Korrelationsmatrix nach Pearson

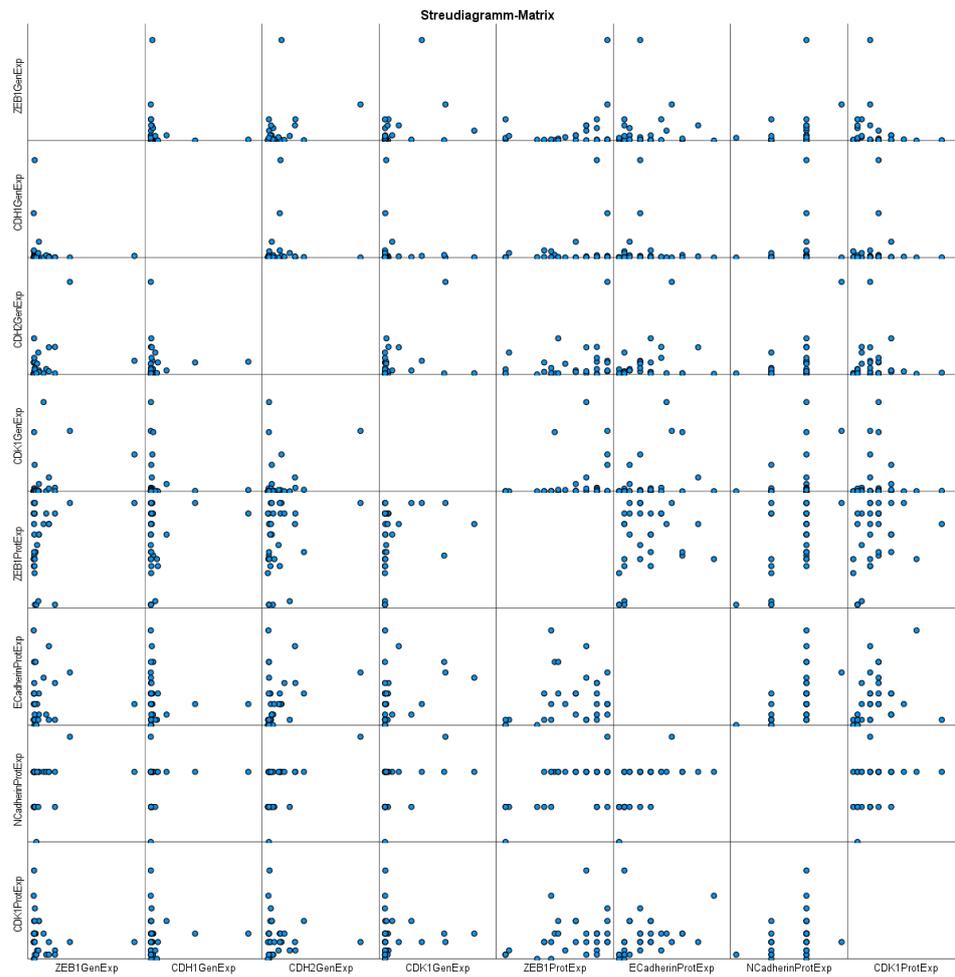


Abbildung 18 Korrelationsmatrix nach Pearson: Dargestellt sind die linearen Zusammenhänge zwischen den Genen und ihrer Genprodukte; ProtExp= Proteinexpression, GenExp= Genexpression

13. Literaturverzeichnis

- [1] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Epidemiology and etiology of gliomas," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 109, no. 1, pp. 93–108, Jan. 2005, doi: 10.1007/s00401-005-0991-y.
- [2] Q. T. Ostrom *et al.*, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011," *Neuro-Oncol.*, vol. 16, no. Suppl 4, pp. iv1–iv63, Oct. 2014, doi: 10.1093/neuonc/nou223.
- [3] Thakkar *et al.*, "Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Oct., 23(10):1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- [4] M. E. Davis, "Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment," *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 20, no. 5, pp. S2–S8, Oct. 2016, doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- [5] C. Adamson *et al.*, "Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, no. 8, pp. 1061–1083, Aug. 2009, doi: 10.1517/13543780903052764.
- [6] M. Wrensch, Y. Minn, T. Chew, M. Bondy, and M. S. Berger, "Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature," *Neuro-Oncol.*, vol. 4, no. 4, pp. 278–299, Oct. 2002.
- [7] E. Grips *et al.*, "[Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome]," *Nervenarzt*, vol. 73, no. 2, pp. 177–182, Feb. 2002.
- [8] M. Wrensch *et al.*, "Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 145, no. 7, pp. 581–593, Apr. 1997.
- [9] T. Schneider, C. Mawrin, C. Scherlach, M. Skalej, and R. Firsching, "Gliomas in Adults," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 107, no. 45, pp. 799–808, Nov. 2010, doi: 10.3238/arztebl.2010.0799.
- [10] W. Stummer *et al.*, "Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias," *Neurosurgery*, vol. 62, no. 3, pp. 564–576; discussion 564–576, Mar. 2008, doi: 10.1227/01.neu.0000317304.31579.17.
- [11] M. Lacroix *et al.*, "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival," *J. Neurosurg.*, vol. 95, no. 2, pp. 190–198, Aug. 2001, doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190.
- [12] M. Weller *et al.*, "Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 34, pp. 5743–5750, Dec. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.23.0805.
- [13] H. Hur, S. Jung, T.-Y. Jung, and I.-Y. Kim, "Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult," *J. Korean Neurosurg. Soc.*, vol. 43, no. 4, pp. 194–197, Apr. 2008, doi: 10.3340/jkns.2008.43.4.194.
- [14] S. E. Lakhan and L. Harle, "Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature," *J. Med. Case Reports*, vol. 3, p. 87, 2009, doi: 10.1186/1752-1947-3-87.
- [15] L. DN, O. H, W. OD, and C. WK, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Accessed: Oct. 17, 2017. [Online]. Available:

<http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-The-Central-Nervous-System-2016>

- [16] K. Urbańska, J. Sokołowska, M. Szmidt, and P. Sysa, “Glioblastoma multiforme – an overview,” *Contemp. Oncol.*, vol. 18, no. 5, pp. 307–312, 2014, doi: 10.5114/wo.2014.40559.
- [17] C. M. de Castro-Costa, R. W. de Araújo, M. A. de Arruda, P. M. de Araújo, and E. G. de Figueiredo, “Increased intracranial pressure in a case of spinal cervical glioblastoma multiforme. Analysis of these two rare conditions,” *Arq. Neuropsiquiatr.*, vol. 52, no. 1, pp. 64–68, Mar. 1994.
- [18] J. Bianco, C. Bastiancich, A. Jankovski, A. des Rieux, V. Prémat, and F. Danhier, “On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand?,” *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 74, no. 13, pp. 2451–2466, Jul. 2017, doi: 10.1007/s00018-017-2483-3.
- [19] H.-G. Wirsching, E. Galanis, and M. Weller, “Glioblastoma,” *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 134, pp. 381–397, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.
- [20] T. Acker and H. Acker, “Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications,” *J. Exp. Biol.*, vol. 207, no. Pt 18, pp. 3171–3188, Aug. 2004, doi: 10.1242/jeb.01075.
- [21] A. Filatova, T. Acker, and B. K. Garvalov, “The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 2, pp. 2496–2508, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.008.
- [22] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, Jun. 2016, doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [23] J. van den Boom *et al.*, “Characterization of Gene Expression Profiles Associated with Glioma Progression Using Oligonucleotide-Based Microarray Analysis and Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, no. 3, pp. 1033–1043, Sep. 2003.
- [24] D. N. Louis *et al.*, “The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System,” *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Aug. 2007, doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- [25] M. Weller *et al.*, “MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 6, no. 1, pp. 39–51, Jan. 2010, doi: 10.1038/nrneurol.2009.197.
- [26] R. B. Jenkins *et al.*, “A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 20, pp. 9852–9861, Oct. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.
- [27] R. G. W. Verhaak *et al.*, “Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1,” *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98–110, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- [28] H. S. Phillips *et al.*, “Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis,” *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 157–173, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.
- [29] M. E. Hegi *et al.*, “MGMT gene silencing and benefit from temozolomide

- in glioblastoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 997–1003, Mar. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043331.
- [30] K. Vigneswaran, S. Neill, and C. G. Hadjipanayis, "Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification," *Ann. Transl. Med.*, vol. 3, no. 7, p. 95, May 2015, doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57.
- [31] M. Weller *et al.*, "Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 34, pp. 5743–5750, Dezember 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.23.0805.
- [32] P. J. Pollard and P. J. Ratcliffe, "Puzzling Patterns of Predisposition," *Science*, vol. 324, no. 5924, pp. 192–194, 2009.
- [33] L. Dang, K. Yen, and E. C. Attar, "IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 27, no. 4, pp. 599–608, Apr. 2016, doi: 10.1093/annonc/mdw013.
- [34] H. Yan *et al.*, "IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 8, pp. 765–773, Feb. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- [35] Z. J. Reitman and H. Yan, "Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 102, no. 13, pp. 932–941, Jul. 2010, doi: 10.1093/jnci/djq187.
- [36] L. Dang *et al.*, "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate," *Nature*, vol. 462, no. 7274, p. 739, Dec. 2009, doi: 10.1038/nature08617.
- [37] Z. Turkalp, J. Karamchandani, and S. Das, "IDH Mutation in Glioma: New Insights and Promises for the Future," *JAMA Neurol.*, vol. 71, no. 10, pp. 1319–1325, Oct. 2014, doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1205.
- [38] K. M. Kurian, H. R. Haynes, C. Crosby, K. Hopkins, and M. Williams, "IDH mutation analysis in gliomas as a diagnostic and prognostic biomarker," *Br. J. Neurosurg.*, vol. 27, no. 4, pp. 442–445, Aug. 2013, doi: 10.3109/02688697.2013.771139.
- [39] C. L. Appin and D. J. Brat, "Molecular genetics of gliomas," *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 20, no. 1, pp. 66–72, Feb. 2014, doi: 10.1097/PPO.000000000000020.
- [40] S. Nobusawa, T. Watanabe, P. Kleihues, and H. Ohgaki, "IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 19, pp. 6002–6007, Oct. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
- [41] H. Ohgaki and P. Kleihues, "The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma," *Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 764–772, Feb. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
- [42] D. Xie *et al.*, "Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma," *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 1, pp. 108–114, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjc.6602904.
- [43] S. Karcher *et al.*, "Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas," *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 9, pp. 2182–2189, May 2006, doi: 10.1002/ijc.21648.
- [44] S. Godard *et al.*, "Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 20, pp.

6613–6625, Oct. 2003.

[45] T. A. Wilson, M. A. Karajannis, and D. H. Harter, “Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics,” *Surg. Neurol. Int.*, vol. 5, p. 64, 2014, doi: 10.4103/2152-7806.132138.

[46] E. Kazner, S. Wende, T. Grumme, W. Lanksch, and O. Stochdorph, *Computertomographie intrakranieller Tumoren aus klinischer Sicht*. Springer-Verlag, 2013.

[47] J. R. Haaga and D. Boll, *Computed Tomography & Magnetic Resonance Imaging Of The Whole Body E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2008.

[48] M. Forsting and O. Jansen, *MRT des Zentralnervensystems*. Georg Thieme Verlag, 2014.

[49] D. R. Macdonald, T. L. Cascino, S. C. Schold, and J. G. Cairncross, “Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 7, pp. 1277–1280, Jul. 1990, doi: 10.1200/JCO.1990.8.7.1277.

[50] P. Y. Wen *et al.*, “Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1963–1972, Apr. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.26.3541.

[51] B. M. Mazoyer, W. D. Heiss, and D. Comar, *PET Studies on Amino Acid Metabolism and Protein Synthesis: Proceedings of a Workshop held in Lyon, France within the framework of the European Community Medical and Public Health Research*. Springer Science & Business Media, 2012.

[52] S. Basu and W. Chen, *PET Imaging of Brain Tumors, An Issue of PET Clinics, E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2013.

[53] S. Hess, *Contribution of FDG to Modern Medicine, Part II, An Issue of PET Clinics, E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2014.

[54] N. Sanai and M. S. Berger, “Glioma extent of resection and its impact on patient outcome,” *Neurosurgery*, vol. 62, no. 4, pp. 753–764; discussion 264–266, Apr. 2008, doi: 10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf.

[55] D. Kuhnt, A. Becker, O. Ganslandt, M. Bauer, M. Buchfelder, and C. Nimsky, “Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance,” *Neuro-Oncol.*, vol. 13, no. 12, pp. 1339–1348, Dec. 2011, doi: 10.1093/neuonc/nor133.

[56] A. Kowalczyk *et al.*, “Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas,” *Neurosurgery*, vol. 41, no. 5, pp. 1028–1036; discussion 1036–1038, Nov. 1997.

[57] H. Duffau and E. Mandonnet, “The ‘onco-functional balance’ in surgery for diffuse low-grade glioma: integrating the extent of resection with quality of life,” *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 155, no. 6, pp. 951–957, Jun. 2013, doi: 10.1007/s00701-013-1653-9.

[58] J. P. Almeida, K. L. Chaichana, J. Rincon-Torroella, and A. Quinones-Hinojosa, “The Value of Extent of Resection of Glioblastomas: Clinical Evidence and Current Approach,” *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 15, no. 2, p. 517, Feb. 2015, doi: 10.1007/s11910-014-0517-x.

[59] F.-W. Kreth *et al.*, “Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy,” *Ann. Oncol.*, vol. 24, no. 12, pp. 3117–3123, Dec. 2013, doi: 10.1093/annonc/mdt388.

[60] W. Stummer *et al.*, “Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic

- acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 7, no. 5, pp. 392–401, May 2006, doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
- [61] M. Hefti, G. von Campe, M. Moschopoulos, A. Siegner, H. Looser, and H. Landolt, “5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institution,” *Swiss Med. Wkly.*, vol. 138, no. 11–12, pp. 180–185, Mar. 2008, doi: 2008/11/smw-12077.
- [62] F. Cornaz, M. C. Neidert, M. Piccirelli, O. Bozinov, L. Regli, and J. Sarnthein, “Compatibility of intraoperative 3 T MR imaging and intraoperative neurophysiological monitoring,” *Clin. Neurophysiol.*, vol. 126, no. 1, pp. 218–220, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.clinph.2014.04.018.
- [63] “Intraoperative Neuromonitoring During Glioma Surgery: Bring... : Journal of Clinical Neurophysiology,” *LWW*.
http://journals.lww.com/clinicalneurophys/Fulltext/2012/04000/Intraoperative_Neuromonitoring_During_Glioma.7.aspx (accessed Mar. 13, 2017).
- [64] W. S. R. Wirtz *et al.*, “The benefit of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery,” *Neurol. Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 354–360, Jun. 2000, doi: 10.1080/01616412.2000.11740684.
- [65] E. Shiban *et al.*, “Intraoperative subcortical motor evoked potential stimulation: how close is the corticospinal tract?,” *J. Neurosurg.*, vol. 123, no. 3, pp. 711–720, Sep. 2015, doi: 10.3171/2014.10.JNS141289.
- [66] S. M. Krieg *et al.*, “Preoperative motor mapping by navigated transcranial magnetic brain stimulation improves outcome for motor eloquent lesions,” *Neuro-Oncol.*, vol. 16, no. 9, pp. 1274–1282, Sep. 2014, doi: 10.1093/neuonc/nou007.
- [67] S. Schultz, G. S. Pinsky, N. C. Wu, M. C. Chamberlain, A. S. Rodrigo, and S. E. Martin, “Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature,” *CytoJournal*, vol. 2, p. 19, 2005, doi: 10.1186/1742-6413-2-19.
- [68] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 987–996, März 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- [69] L. Rosso *et al.*, “A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 120–127, Jan. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2356.
- [70] A. Chakravarti *et al.*, “Temozolomide-Mediated Radiation Enhancement in Glioblastoma: A Report on Underlying Mechanisms,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 15, pp. 4738–4746, Aug. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0596.
- [71] R. Stupp *et al.*, “Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 10, no. 5, pp. 459–466, May 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- [72] I. J. Barani and D. A. Larson, “Radiation therapy of glioblastoma,” *Cancer Treat. Res.*, vol. 163, pp. 49–73, 2015, doi: 10.1007/978-3-319-12048-5_4.
- [73] “Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC): Leitlinien.”
<http://www.dgnc.de/mitgliederbereich/fort-und-weiterbildung/leitlinien.html> (accessed Oct. 01, 2016).

- [74] “Degro – DEGRO – Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V.” <https://www.degro.org/> (accessed Oct. 01, 2016).
- [75] A. Narayana *et al.*, “Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 64, no. 3, pp. 892–897, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.05.067.
- [76] T. I. Yock *et al.*, “Long-term toxic effects of proton radiotherapy for paediatric medulloblastoma: a phase 2 single-arm study,” *Lancet Oncol.*, vol. 17, no. 3, pp. 287–298, Mar. 2016, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00167-9.
- [77] N. Gera, A. Yang, T. S. Holtzman, S. X. Lee, E. T. Wong, and K. D. Swanson, “Tumor Treating Fields Perturb the Localization of Septins and Cause Aberrant Mitotic Exit,” *PLOS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0125269, May 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125269.
- [78] R. Stupp *et al.*, “Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial,” *JAMA*, vol. 318, no. 23, pp. 2306–2316, 19 2017, doi: 10.1001/jama.2017.18718.
- [79] U. Herrlinger *et al.*, “Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial,” *The Lancet*, vol. 393, no. 10172, pp. 678–688, Feb. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31791-4.
- [80] M. Weller *et al.*, “Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma,” *Neurology*, vol. 77, no. 12, pp. 1156–1164, Sep. 2011, doi: 10.1212/WNL.0b013e31822f02e1.
- [81] B. Pollo, “Neuropathological diagnosis of brain tumours,” *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*, vol. 32 Suppl 2, pp. S209–211, Nov. 2011, doi: 10.1007/s10072-011-0802-2.
- [82] F. G. Barker *et al.*, “Age and radiation response in glioblastoma multiforme,” *Neurosurgery*, vol. 49, no. 6, pp. 1288–1297; discussion 1297–1298, Dec. 2001.
- [83] O. Bloch *et al.*, “Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article,” *J. Neurosurg.*, vol. 117, no. 6, pp. 1032–1038, Dec. 2012, doi: 10.3171/2012.9.JNS12504.
- [84] E. Franceschi *et al.*, “The effect of re-operation on survival in patients with recurrent glioblastoma,” *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 1743–1748, Mar. 2015.
- [85] “030099_DGN_LL_Gliome_final.pdf.” http://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2014/PDFs_Download/030099_DGN_LL_Gliome_final.pdf (accessed Oct. 01, 2016).
- [86] K. Anton, J. M. Baehring, and T. Mayer, “Glioblastoma Multiforme: Overview of Current Treatment and Future Perspectives,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 26, no. 4, pp. 825–853, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.hoc.2012.04.006.
- [87] R. Stupp *et al.*, “NovoTTF-100A versus physician’s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality,” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 48, no. 14, pp. 2192–2202, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.ejca.2012.04.011.
- [88] T. N. Kreisl *et al.*, “A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM),” *J. Neurooncol.*, vol. 92, no. 1, pp. 99–105, Mar. 2009, doi: 10.1007/s11060-008-9741-z.

- [89] J. N. Sarkaria *et al.*, “North Central Cancer Treatment Group Phase I trial N057K of everolimus (RAD001) and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 81, no. 2, pp. 468–475, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.05.064.
- [90] K. M *et al.*, “Roscovitine Has Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects on Glioblastoma Cell Lines: A Pilot Study,” *Oncology reports*, Sep. 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151768/> (accessed Jun. 11, 2020).
- [91] R. Kalluri and R. A. Weinberg, “The basics of epithelial-mesenchymal transition,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI39104.
- [92] A. Pala, G. Karpel-Massler, C. R. Wirtz, and M.-E. Halatsch, “Epithelial to Mesenchymal Transition and Progression of Glioblastoma,” 2013, doi: 10.5772/53183.
- [93] J. P. Thiery and J. P. Sleeman, “Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 131–142, Feb. 2006, doi: 10.1038/nrm1835.
- [94] E. D. Hay, “An overview of epithelio-mesenchymal transformation,” *Acta Anat. (Basel)*, vol. 154, no. 1, pp. 8–20, 1995.
- [95] J.-K. Lee, K. M. Joo, J. Lee, Y. Yoon, and D.-H. Nam, “Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling,” *OncoTargets Ther.*, vol. 7, pp. 1933–1944, Oct. 2014, doi: 10.2147/OTT.S36582.
- [96] “Taschenlehrbuch Histologie | Buch | 9783132425293,” *Thieme*. <https://shop.thieme.de/Taschenlehrbuch-Histologie/9783132425293> (accessed Mar. 14, 2021).
- [97] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, Mar. 2014, doi: 10.1038/nrm3758.
- [98] Y. Iwadate, “Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression,” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 1615–1620, Mar. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4113.
- [99] M. Garg, “Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer,” *World J. Stem Cells*, vol. 5, no. 4, pp. 188–195, Oct. 2013, doi: 10.4252/wjsc.v5.i4.188.
- [100] S. Lindsey and S. A. Langhans, “Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial–Mesenchymal Transition,” *Front. Oncol.*, vol. 4, Dec. 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00358.
- [101] M. Zeisberg and E. G. Neilson, “Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1429–1437, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI36183.
- [102] R. Kalluri and E. G. Neilson, “Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 12, pp. 1776–1784, Dec. 2003, doi: 10.1172/JCI20530.
- [103] S. Rc *et al.*, “Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis,” *Cell and tissue research*, Sep. 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27461257/> (accessed Mar. 21, 2021).
- [104] C. Pa, “Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery,” *The Journal of investigative dermatology*, Aug. 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12880412/> (accessed Mar. 21, 2021).

- [105] S. F *et al.*, “Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation,” *Kidney international*, May 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11967021/> (accessed Mar. 14, 2021).
- [106] M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson, “Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 3, pp. 341–350, Aug. 2002, doi: 10.1172/JCI15518.
- [107] M. Zeisberg *et al.*, “Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 32, pp. 23337–23347, Aug. 2007, doi: 10.1074/jbc.M700194200.
- [108] K. K. Kim *et al.*, “Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 35, pp. 13180–13185, Aug. 2006, doi: 10.1073/pnas.0605669103.
- [109] E. M. Zeisberg *et al.*, “Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 952–961, Aug. 2007, doi: 10.1038/nm1613.
- [110] S. Potenta, E. Zeisberg, and R. Kalluri, “The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression,” *Br. J. Cancer*, vol. 99, no. 9, pp. 1375–1379, Nov. 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604662.
- [111] H. Aclouque, J. P. Thiery, and M. A. Nieto, “The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition,” *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 4, pp. 322–326, Apr. 2008, doi: 10.1038/embor.2008.30.
- [112] M. Takeichi, “Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 59, pp. 237–252, 1990, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.001321.
- [113] M. Takeichi, K. Hatta, A. Nose, and A. Nagafuchi, “Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules,” *Cell Differ. Dev.*, vol. 25, pp. 91–94, Nov. 1988, doi: 10.1016/0922-3371(88)90104-9.
- [114] K. Tamura, W.-S. Shan, W. A. Hendrickson, D. R. Colman, and L. Shapiro, “Structure-Function Analysis of Cell Adhesion by Neural (N-) Cadherin,” *Neuron*, vol. 20, no. 6, pp. 1153–1163, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80496-1.
- [115] A. Girardi *et al.*, “E-CADHERIN CODING GENE (CDH1) AND NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR WITHOUT CLEFT PALATE: IS THERE ANY ASSOCIATION?,” *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 29, no. 3 Suppl 1, pp. 117–122, Sep. 2015.
- [116] P. R. Moya *et al.*, “Rare missense neuronal cadherin gene (CDH2) variants in specific obsessive-compulsive disorder and Tourette disorder phenotypes,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 21, no. 8, pp. 850–854, Aug. 2013, doi: 10.1038/ejhg.2012.245.
- [117] G. Berx and F. van Roy, “Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 6, Dec. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a003129.
- [118] L. Larue, M. Ohsugi, J. Hirchenhain, and R. Kemler, “E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 17, pp. 8263–8267, Aug. 1994.
- [119] K. M. Mrozik, O. W. Blaschuk, C. M. Cheong, A. C. W. Zannettino, and K. Vandyke, “N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer,” *BMC Cancer*, vol. 18, Oct. 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4845-0.

- [120] H. Muta, M. Noguchi, Y. Kanai, A. Ochiai, H. Nawata, and S. Hirohashi, "E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach," *Jpn. J. Cancer Res. Gann*, vol. 87, no. 8, pp. 843–848, Aug. 1996.
- [121] S. Hirohashi, "Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers," *Am. J. Pathol.*, vol. 153, no. 2, pp. 333–339, Aug. 1998, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65575-7.
- [122] T. H *et al.*, "Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity," *Neuron*, Jan. 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10707975/> (accessed Apr. 11, 2021).
- [123] J.-H. Paik *et al.*, "Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 19, pp. 2392–2403, Oct. 2004, doi: 10.1101/gad.1227804.
- [124] F. F *et al.*, "N-cadherin Regulation of Bone Growth and Homeostasis Is Osteolineage Stage-Specific.," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 32, no. 6, pp. 1332–1342, Mar. 2017, doi: 10.1002/jbmr.3112.
- [125] R. B. Hazan, G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton, and S. A. Aaronson, "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis," *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 4, pp. 779–790, Feb. 2000.
- [126] T. Alarcón, H. M. Byrne, and P. K. Maini, "A mathematical model of the effects of hypoxia on the cell-cycle of normal and cancer cells," *J. Theor. Biol.*, vol. 229, no. 3, pp. 395–411, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jtbi.2004.04.016.
- [127] G. K. Schwartz and M. A. Shah, "Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 36, pp. 9408–9421, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.01.5594.
- [128] L. Bo, B. Wei, C. Li, Z. Wang, Z. Gao, and Z. Miao, "Identification of potential key genes associated with glioblastoma based on the gene expression profile," *Oncol. Lett.*, vol. 14, no. 2, pp. 2045–2052, Aug. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.6460.
- [129] J. M. Enserink and R. D. Kolodner, "An overview of Cdk1-controlled targets and processes," *Cell Div.*, vol. 5, p. 11, May 2010, doi: 10.1186/1747-1028-5-11.
- [130] Q. Shi, Z. Zhou, N. Ye, Q. Chen, X. Zheng, and M. Fang, "MiR-181a inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting CDK1," *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers*, Sep. 2017, doi: 10.3233/CBM-170350.
- [131] R. Zhang *et al.*, "The aberrant upstream pathway regulations of CDK1 protein were implicated in the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells," *J. Ovarian Res.*, vol. 10, no. 1, p. 60, Sep. 2017, doi: 10.1186/s13048-017-0356-x.
- [132] Z. Liu, G. Liang, L. Tan, A. N. Su, W. Jiang, and C. Gong, "High-efficient Screening Method for Identification of Key Genes in Breast Cancer Through Microarray and Bioinformatics," *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 8, pp. 4329–4335, 2017, doi: 10.21873/anticancer.11826.
- [133] H. Chen, Q. Huang, D. Zhai, J. Dong, A. Wang, and Q. Lan, "[CDK1 expression and effects of CDK1 silencing on the malignant phenotype of glioma cells]," *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, vol. 29, no. 7, pp. 484–488, Jul. 2007.
- [134] A. J. Levine, W. Hu, and Z. Feng, "The P53 pathway: what questions remain to be explored?," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 6, pp. 1027–1036, Jun. 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401910.
- [135] H. Mao, D. G. LeBrun, J. Yang, V. F. Zhu, and M. Li, "Deregulated

Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets,” *Cancer Invest.*, vol. 30, no. 1, pp. 48–56, Jan. 2012, doi: 10.3109/07357907.2011.630050.

[136] A. H. Stegh *et al.*, “Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor,” *Genes Dev.*, vol. 24, no. 19, pp. 2194–2204, Oct. 2010, doi: 10.1101/gad.1924710.

[137] C. Chen, C. Sun, D. Tang, G. Yang, X. Zhou, and D. Wang, “Identification of key genes in glioblastoma-associated stromal cells using bioinformatics analysis,” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 6, pp. 3999–4007, Jun. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4526.

[138] C. Vandewalle, F. V. Roy, and G. Berx, “The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 5, pp. 773–787, Mar. 2009, doi: 10.1007/s00018-008-8465-8.

[139] E. Sánchez-Tilló *et al.*, “Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 1, no. 7, pp. 897–912, Aug. 2011.

[140] J. E. Remacle *et al.*, “New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 18, pp. 5073–5084, Sep. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.18.5073.

[141] A. A. Postigo, “Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF β /BMP signaling pathway,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 10, pp. 2443–2452, May 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg225.

[142] J. Comijn *et al.*, “The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion,” *Mol. Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 1267–1278, Jun. 2001.

[143] J. V. Joseph *et al.*, “Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis,” *Cancer Lett.*, vol. 359, no. 1, pp. 107–116, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010.

[144] T. R. Graham *et al.*, “Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 7, pp. 2479–2488, Apr. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2559.

[145] S. Bindels *et al.*, “Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells,” *Oncogene*, vol. 25, no. 36, pp. 4975–4985, Mar. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209511.

[146] M. Dohadwala *et al.*, “Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 10, pp. 5338–5345, May 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3635.

[147] S. Spaderna *et al.*, “The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 537–544, Jan. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5682.

[148] K. Aigner *et al.*, “The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity,” *Oncogene*, vol. 26, no. 49, pp. 6979–6988, Oct. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210508.

[149] F. A. Siebzehnrubl *et al.*, “The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 8, pp.

- 1196–1212, Aug. 2013, doi: 10.1002/emmm.201302827.
- [150] U. D. Kahlert *et al.*, “Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition,” *Cancer Lett.*, vol. 325, no. 1, pp. 42–53, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.024.
- [151] L. A. Edwards *et al.*, “Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 15, pp. 1162–1178, Aug. 2011, doi: 10.1093/jnci/djr224.
- [152] U. D. Kahlert, G. Nikkhah, and J. Maciaczyk, “Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas,” *Cancer Lett.*, vol. 331, no. 2, pp. 131–138, May 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.010.
- [153] I. C. Iser, M. B. Pereira, G. Lenz, and M. R. Wink, “The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation,” *Med. Res. Rev.*, vol. 37, no. 2, pp. 271–313, Mar. 2017, doi: 10.1002/med.21408.
- [154] L. J. Lewis-Tuffin *et al.*, “Misregulated E-Cadherin Expression Associated with an Aggressive Brain Tumor Phenotype,” *PLOS ONE*, vol. 5, no. 10, p. e13665, Oct. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013665.
- [155] K. Asano *et al.*, “Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion,” *J. Neurooncol.*, vol. 70, no. 1, pp. 3–15, Oct. 2004.
- [156] N. Shinoura *et al.*, “Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas,” *Br. J. Cancer*, vol. 72, no. 3, pp. 627–633, Sep. 1995.
- [157] K. Schwechheimer, L. Zhou, and W. Birchmeier, “E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas,” *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, vol. 432, no. 2, pp. 163–167, Feb. 1998.
- [158] J. Theys *et al.*, “E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells,” *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 99, no. 3, pp. 392–397, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.044.
- [159] Y.-H. Kim *et al.*, “Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 α stabilization,” *Cancer Lett.*, vol. 354, no. 1, pp. 132–141, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.048.
- [160] E. E. Bar, A. Lin, V. Mahairaki, W. Matsui, and C. G. Eberhart, “Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres,” *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 3, pp. 1491–1502, Sep. 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.091021.
- [161] L. A. D. Cooper *et al.*, “The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma,” *Am. J. Pathol.*, vol. 180, no. 5, pp. 2108–2119, May 2012, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.040.
- [162] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, “Real time quantitative PCR,” *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 986–994, Oct. 1996, doi: 10.1101/gr.6.10.986.
- [163] “Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> (accessed Oct. 11, 2016).
- [164] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, pp. e45–e45, May 2001,

doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

[165] M. A. Valasek and J. J. Repa, "The power of real-time PCR," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 29, no. 3, pp. 151–159, Sep. 2005, doi: 10.1152/advan.00019.2005.

[166] "Polymerase Chain Reaction (PCR)."

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> (accessed Oct. 11, 2016).

[167] E. Zietkiewicz, A. Rafalski, and D. Labuda, "Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification," *Genomics*, vol. 20, no. 2, pp. 176–183, März 1994, doi: 10.1006/geno.1994.1151.

[168] L. Raeymaekers, "A commentary on the practical applications of competitive PCR.," *Genome Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 91–94, Aug. 1995, doi: 10.1101/gr.5.1.91.

[169] U. E. Gibson, C. A. Heid, and P. M. Williams, "A novel method for real time quantitative RT-PCR.," *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 995–1001, Oct. 1996, doi: 10.1101/gr.6.10.995.

[170] "The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody," *J. Immunol.*, vol. 45, no. 3, pp. 159–170, Nov. 1942.

[171] "Overview of Immunohistochemistry."

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html> (accessed Oct. 12, 2016).

[172] "Overview of Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) Techniques and Devices." http://www.ihcworld.com/_protocols/epitope_retrieval/overview.htm (accessed Oct. 12, 2016).

[173] D. K. Bhattacharyya, S. Adak, U. Bandyopadhyay, and R. K. Banerjee, "Mechanism of inhibition of horseradish peroxidase-catalysed iodide oxidation by EDTA," *Biochem. J.*, vol. 298 (Pt 2), pp. 281–288, Mar. 1994.

[174] B. Morawski, Z. Lin, P. Cirino, H. Joo, G. Bandara, and F. H. Arnold, "Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*," *Protein Eng.*, vol. 13, no. 5, pp. 377–384, May 2000, doi: 10.1093/protein/13.5.377.

[175] S. Manikandan, "Measures of central tendency: Median and mode," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 2, no. 3, pp. 214–215, 2011, doi: 10.4103/0976-500X.83300.

[176] F. Sahm *et al.*, "DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis," *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 5, pp. 682–694, 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30155-9.

[177] M. Weller *et al.*, "Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice," *Neuro-Oncol.*, vol. 14 Suppl 4, pp. iv100–108, Sep. 2012, doi: 10.1093/neuonc/nos206.

[178] A. E. Wakeling *et al.*, "ZD1839 (Iressa): An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Factor Signaling with Potential for Cancer Therapy," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 20, pp. 5749–5754, Oct. 2002.

[179] D. A. Haber *et al.*, "Molecular Targeted Therapy of Lung Cancer: EGFR Mutations and Response to EGFR Inhibitors," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 70, pp. 419–426, Jan. 2005, doi: 10.1101/sqb.2005.70.043.

[180] D. W. Parsons *et al.*, "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme," *Science*, vol. 321, no. 5897, pp. 1807–1812, Sep.

- 2008, doi: 10.1126/science.1164382.
- [181] J. P. Thiery, “Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 6, pp. 442–454, Jun. 2002, doi: 10.1038/nrc822.
- [182] U. Wellner *et al.*, “The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 12, pp. 1487–1495, Dec. 2009, doi: 10.1038/ncb1998.
- [183] S. Brabletz and T. Brabletz, “The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer?,” *EMBO Rep.*, vol. 11, no. 9, pp. 670–677, Sep. 2010, doi: 10.1038/embor.2010.117.
- [184] U. Wellner, T. Brabletz, and T. Keck, “ZEB1 in Pancreatic Cancer,” *Cancers*, vol. 2, no. 3, pp. 1617–1628, Aug. 2010, doi: 10.3390/cancers2031617.
- [185] K. Suzuki, T. Kawataki, K. Endo, K. Miyazawa, H. Kinouchi, and M. Saitoh, “Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade,” *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 2, pp. 1758–1764, Aug. 2018, doi: 10.3892/ol.2018.8852.
- [186] C. L. Nesvick *et al.*, “ZEB1 expression is increased in IDH1-mutant lower-grade gliomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 130, no. 1, pp. 111–122, Oct. 2016, doi: 10.1007/s11060-016-2240-8.
- [187] M. Madany, T. Thomas, and L. A. Edwards, “The Curious Case of ZEB1,” *Discoveries*, vol. 6, no. 4, doi: 10.15190/d.2018.7.
- [188] L. A. Edwards *et al.*, “ZEB1 regulates glioma stemness through LIF repression,” *Sci. Rep.*, vol. 7, Feb. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00106-x.
- [189] S.-L. Hwang *et al.*, “Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors,” *Cancer Lett.*, vol. 183, no. 1, pp. 95–101, Sep. 2002, doi: 10.1016/s0304-3835(02)00085-x.
- [190] S. Utsuki, Y. Sato, H. Oka, B. Tsuchiya, S. Suzuki, and K. Fujii, “Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 57, no. 3, pp. 187–192, May 2002, doi: 10.1023/a:1015720220602.
- [191] E. Camand, F. Peglion, N. Osmani, M. Sanson, and S. Etienne-Manneville, “N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 4, pp. 844–857, Feb. 2012, doi: 10.1242/jcs.087668.
- [192] Y. Tian *et al.*, “Radioactive 125I seeds inhibit cell growth and epithelial-mesenchymal transition in human glioblastoma multiforme via a ROS-mediated signaling pathway,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 1, Feb. 2015, doi: 10.1186/1471-2407-15-1.
- [193] A. Eger *et al.*, “DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells,” *Oncogene*, vol. 24, no. 14, pp. 2375–2385, Mar. 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208429.
- [194] Y. Liu, S. El-Naggar, D. S. Darling, Y. Higashi, and D. C. Dean, “Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence,” *Development*, vol. 135, no. 3, pp. 579–588, Feb. 2008, doi: 10.1242/dev.007047.
- [195] S. Qi *et al.*, “ZEB2 Mediates Multiple Pathways Regulating Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis in Glioma,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038842.
- [196] W. M. Grady *et al.*, “Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer,” *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 1, pp. 16–17, Sep. 2000, doi: 10.1038/79120.

- [197] G. Berx *et al.*, “E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.,” *EMBO J.*, vol. 14, no. 24, pp. 6107–6115, Dec. 1995.
- [198] K. Sundfeldt, “Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 202, no. 1–2, pp. 89–96, Apr. 2003, doi: 10.1016/s0303-7207(03)00068-6.
- [199] K. Asano *et al.*, “Expression and role of cadherins in astrocytic tumors,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 14, no. 1, pp. 27–33, Mar. 1997, doi: 10.1007/BF02478865.
- [200] K. Asano, O. Kubo, Y. Tajika, K. Takakura, and S. Suzuki, “Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors,” *Neurosurg. Rev.*, vol. 23, no. 1, pp. 39–44, Mar. 2000, doi: 10.1007/s101430050030.
- [201] R. Mahabir *et al.*, “Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma,” *Neuro-Oncol.*, vol. 16, no. 5, pp. 671–685, May 2014, doi: 10.1093/neuonc/not239.
- [202] T. Otto and P. Sicinski, “Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 2, pp. 93–115, Jan. 2017, doi: 10.1038/nrc.2016.138.
- [203] Y. Piao, J. Liang, L. Holmes, V. Henry, E. Sulman, and J. F. de Groot, “Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 16, pp. 4392–4403, Aug. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1557.
- [204] G. Chen *et al.*, “Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas *,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 4, pp. 304–313, Apr. 2002, doi: 10.1074/mcp.M200008-MCP200.
- [205] Q. Tian *et al.*, “Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells *,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 3, no. 10, pp. 960–969, Oct. 2004, doi: 10.1074/mcp.M400055-MCP200.
- [206] R. de S. Abreu, L. O. Penalva, E. M. Marcotte, and C. Vogel, “Global signatures of protein and mRNA expression levels,” *Mol. Biosyst.*, vol. 5, no. 12, pp. 1512–1526, Dec. 2009, doi: 10.1039/b908315d.
- [207] C. Vogel and E. M. Marcotte, “Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 227–232, Apr. 2012, doi: 10.1038/nrg3185.
- [208] J. Duraiyan, R. Govindarajan, K. Kaliyappan, and M. Palanisamy, “Applications of immunohistochemistry,” *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 4, no. Suppl 2, pp. S307–S309, Aug. 2012, doi: 10.4103/0975-7406.100281.
- [209] I. K. Mellingerhoff *et al.*, “Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 19, pp. 2012–2024, Nov. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa051918.
- [210] H.-W. Lo, “EGFR-Targeted Therapy in Malignant Glioma: Novel Aspects and Mechanisms of Drug Resistance,” *Curr. Mol. Pharmacol.*, vol. 3, no. 1, pp. 37–52, Jan. 2010.
- [211] Z. Shi *et al.*, “AC1MMYR2, an inhibitor of dicer-mediated biogenesis of Oncomir miR-21, reverses epithelial-mesenchymal transition and suppresses tumor growth and progression,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 17, pp. 5519–5531, Sep. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0280.
- [212] Y.-C. Lin *et al.*, “Osthole inhibits insulin-like growth factor-1-induced epithelial to mesenchymal transition via the inhibition of PI3K/Akt signaling

pathway in human brain cancer cells," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 22, pp. 5061–5071, Jun. 2014, doi: 10.1021/jf501047g.

14. Publikationsverzeichnis

Publizierte Abstracts:

Frank P. Schwarm; Frederike Hagedorn; Samuel Thomas; Christian Koch; Marco Stein; Eberhard Uhl; Malgorzata Kolodziej

„ZEB1 expression has an influence on survival time of patients with glioblastoma“

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Joint Meeting mit der Mexikanischen und Kolumbianischen Gesellschaft für Neurochirurgie. Münster, 03.-06.06.2018. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2018. DocP096

Frank P.Schwarm; Samuel Thomas; Frederike Hagedorn; Christian Koch; Marco Stein; Eberhard Uhl, Malgorzata Kolodziej

„The crucial role of SNAIL 1 and 2 in the EMT-pathway of glioblastoma patients“

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Joint Meeting mit der Mexikanischen und Kolumbianischen Gesellschaft für Neurochirurgie. Münster, 03.-06.06.2018. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2018. DocV263

15. Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

16. Danksagung

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. med. E. Uhl für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Abteilung und die Bereitstellung der logistischen, materiellen und personellen Infrastruktur.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. M. Kolodziej für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Nutzung des Labors sowie die geduldige und sorgfältige Betreuung als Doktormutter. Danke für Ihre Engagement und zahlreiche Stunden des Auswertens und Korrigierens.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. med. F. Schwarm für die Unterstützung und die Einarbeitung in die verwendeten experimentellen Methoden und für das Beantworten zahlreicher Fragen, sowie Frau Nagel bezüglich der graphischen Ausarbeitung der Doktorarbeit.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen Betreuern im Labor für Neuropathologie, sowohl von ärztlicher als auch von MTA Seite, allen voran Frau PD Dr. med. A. Schänzer. Vielen Dank für die unzähligen Stunden in denen Sie mir tatkräftig bei Färbeprotokollen, sowie der Auswertung der Schnittpräparate zur Seite standen und dass sie stets ein offenes Ohr und motivierenden Zuspruch für mich fanden, auch dann, wenn mal alles nicht so lief wie es sollte.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors für Neurochirurgie, vor allem Frau Kierok, sowie des Labors für Anästhesie, vor allem Herrn Dr. med. Koch, bedanken, die mir bei Problemen und Rückfragen jeglicher Art stets hilfreich zur Seite gestanden haben und mich bei vielen Aufgaben tatkräftig unterstützten.

Dank gilt auch meinem Mitstreiterdoktoranten Herrn Samuel Thomas, für die kooperative Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund Carlos danken. Danke für die fortwährende Unterstützung, die Geduld, die lieben Worte, den Zuspruch, die Motivation, das Vertrauen und das ewige nie enden wollende Korrektur lesen.