Expressionsanalyse und klinische Bedeutung des High-mobility Group AT-hook 2 Antigens (HMGA2) in humanen Glioblastomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Frank Patrick Schwarm

aus Nürnberg

Gießen 2017

Aus der Klinik für Neurochirurgie des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Eberhard Uhl

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Eberhard Uhl

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ludger Fink

Tag der Disputation: 27.02.2018

Für meine Eltern und Barbara

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **IV**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 DAS GLIOBLASTOM 1

1.2 DIAGNOSTIK DER GLIOBLASTOME 3

1.3 PRÄOPERATIVE BEHANDLUNG DES GLIOBLASTOMS 5

1.4 OPERATIVE THERAPIE DES GLIOBLASTOMS 5

1.5 POSTOPERATIVE BEHANDLUNG DES GLIOBLASTOMS 7

1.6 MOLEKULARE NEUROONKOLOGIE BEI GLIOBLASTOMEN 12

1.7 HIGH-MOBILITY GROUP AT-HOOK 2 (HMGA2) 17

1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 23

2 MATERIAL UND METHODEN **24**

2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN 24

2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN 25

2.3 PATIENTENKOLLEKTIV 27

2.4 KONTROLLKOLLEKTIV 27

2.5 REAL-TIME-QUANTITATIVE PCR 28

2.6 IMMUNHISTOCHEMIE 35

2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG 39

3 ERGEBNISSE **40**

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV 40

3.2 MGMT-EXPRESSION 42

3.3 IDH1-EXPRESSION 42

3.4 HMGA2-EXPRESSION IN GLIOBLASTOMEN UND NORMALEM HIRNGEWEBE IN DER QRT-PCR ANALYSE 43

3.5 HMGA2-EXPRESSION IN GLIOBLASTOMEN UND NORMALEM HIRNGEWEBE IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANALYSE 43

3.6 HMGA2-EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS: VERGLEICH QRT-PCR UND IMMUNHISTOCHEMIE 44

3.7 PROGRESSIONSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS UND DER HMGA2-EXPRESSION AUF DER MRNA- UND PROTEINEBENE 45

3.8 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus und der HMGA2-Expression auf der mRNA- und Proteinebene 47
3.9 Multivariate Analyse 48
4 Diskussion 49
4.1 Methodenkritik 49
4.2 Ergebnisse 51
4.3 Ausblick 61
5 Zusammenfassung 63
6 Summary 64
7 Abbildungsverzeichnis 65
8 Tabellenverzeichnis 66
9 Abkürzungsverzeichnis 67
10 Literaturverzeichnis 69
11 Publikationsverzeichnis 87
12 Erklärung zur Dissertation 88
13 Danksagung 89
14 Curriculum vitae 90

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Das Glioblastoma (GBM) ist der aggressivste, gliale Hirntumor astrozytären Ursprungs und endet immer letal (Wilson *et al.*, 2014). Glioblastome wachsen diffus, infiltrativ und proliferativ in das umliegende gesunde Hirngewebe. Somit ist eine Komplettresektion nicht möglich. Ein Tumorprogress kann deshalb durch eine maximale Tumorresektion und eine anschließende konkomitante Radiochemotherapie sowie adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid nur verzögert, jedoch nicht verhindert werden (Lacroix *et al.*, 2001; Stupp *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2014; Y. M. Li *et al.*, 2015; Perry and Wesseling, 2016). In der Diagnostik von Glioblastomen spielen die Früherkennung oder ein allgemeines Screening keine Rolle. Die Tumore entwickeln sich oftmals in sehr kurzer Zeit. Sollten jedoch hereditäre, sehr seltene Syndrome (Neurofibromatose Typ I, Li-Fraumeni-Syndrom, Turcort-Syndrom) mit einer Neigung zur Entwicklung glialer Tumore vorliegen, so werden bildgebende Verfahren zum Screening der betroffenen Patienten eingesetzt (‘AWMF: Detail’, n.d.; Mandonnet *et al.*, 2014).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Glioblastome gelten als die häufigsten primären Hirntumore mit einer Inzidenz von 3,2 pro 100000/Jahr. Sie machen 15,4% aller primären und 45,6% aller primären, malignen Hirntumore aus. Das Auftreten von Glioblastomen steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 75. und 84. Lebensjahr. Männer sind häufiger als Frauen betroffen (Ohgaki and Kleihues, 2005). Glioblastome können jedoch in jedem Lebensalter auftreten. Bei Kindern und jungen Erwachsenen bis zum 19. Lebensjahr machen sie nur 3% aller Hirntumore aus. Männer sind häufiger als Frauen betroffen (Ohgaki and Kleihues, 2005). Das mittlere Lebensalter für das Auftreten eines Glioblastoms ist 64 Jahre (Ostrom *et al.*, 2014). Das mediane Überleben beträgt zwischen 12,5 und 14,6 Monaten, das mediane progressionsfreie Intervall 6,8 Monate (Lacroix *et al.*, 2001; Stummer *et al.*, 2008; Stupp *et al.*, 2009; Weller *et al.*, 2009).

Glioblastome entstehen sowohl de novo als auch durch Malignisierung niedriggradiger Tumoren. So können zum Beispiel niedriggradige Tumoren eine Tendenz zur Malignisierung aufweisen und von einem WHO Grad II in einen höhergradigen anaplastischen Tumor (WHO III) und letztendlich sogar in ein Glioblastom (WHO IV) übergehen

(Ohgaki and Kleihues, 2007). Das progressionsfreie Intervall bei der Entstehung eines Glioblastoms aus einem WHO Grad II Tumor ist länger als bei der Entstehung aus einem WHO Grad III Tumor (ca. 5 vs. 2 Jahre) (Ohgaki and Kleihues, 2005). Das primäre Glioblastom stellt mit ca. 90% den häufigsten Erscheinungstyp dar. Es entsteht de novo ohne eine Vorläuferläsion (Ohgaki and Kleihues, 2007). In primären Glioblastomen sind genetische Alterationen wie die Überexpression des Epidermal Growth Faktor Rezeptors (EGFR), CDKN2A (p16) Deletionen, Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) Mutationen und der Verlust des Chromosom 10 typisch (Kleihues and Ohgaki, 1999; Fujisawa *et al.*, 2000; Ohgaki *et al.*, 2004; Ohgaki and Kleihues, 2007; Verhaak *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2014). Sekundäre Glioblastome zeigen vermehrt Mutationen der Isozitratdehydrogenase-1 (IDH1), des Tumorproteins 53 (TP53) und einen 19q-Verlust (Watanabe *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2000; Ohgaki *et al.*, 2004; Arjona *et al.*, 2006; Furnari *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009; Ohgaki and Kleihues, 2013; Wilson *et al.*, 2014). Durch den IDH1-Verlust kann zwischen einem primärem und sekundärem Glioblastom eindeutig unterschieden werden (Nobusawa *et al.*, 2009).

1.1.2 Histologisches Bild

Makroskopisch weisen Glioblastome eine „bunte Schnittfläche“ auf. Histologisch wird die Malignität anhand ausgeprägter Zell- und Gewebepolymorphien, Mitosen, Kernatypien, Gefäßepithelproliferationen, Nekrosen und einer diffusen Invasion von gesundem, benachbartem Hirnparenchym bestimmt. Die Tumore sind meist schnell wachsend. Flächenhafte, strichförmige Nekrosen sind für die histopathologische Diagnose entscheidend. Meist lassen sich auch mehrkernige Riesenzellen nachweisen. Die intratumoralen Gefäße zeigen oft eine ausgeprägte Neigung zur Thrombosierung (Weller *et al.*, 2003; Böcker, 2008; Osborn *et al.*, 2012; Ostrom *et al.*, 2014).

1.1.3 Histologische Einteilung des Glioblastoms in der WHO-Klassifikation

Die histologische Einteilung erfolgt nach der 2016 aktualisierten WHO-Klassifikation der Tumore des Nervensystems (Louis *et al.*, 2016). Diese wurde erstmals 1979 von *Zülch* publiziert (Zülch, 1979). Es erfolgten darauf überarbeitete und modifizierte Auflagen durch Kleihues *et al., 1993* und *Kleihues et Cavanee, 2000* (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues and Cavenee, 2000) sowie durch *Louis et al., 2007* (Louis *et al.*, 2007). Tumore werden in Grad I- IV anhand der Ausprägung von Zell- und Gewebepolymorphien, Mitosen, Kernatypien, Gefäßepithelproliferationen, Nekrosen und dem Vorhandensein

einer diffusen Invasion von gesundem, benachbartem Hirnparenchym eingeteilt (Weller *et al.*, 2003). Grad I Tumore sind benigne, hochdifferenziert, wachsen sehr langsam und haben meist eine gute Prognose. Grad II Tumore sind semibenigne, zeigen sich ebenso hochdifferenziert und wachsen langsam. Auch ihre Prognose ist meist gut. Grad III Tumore sind wenig differenziert, zeigen ein schnelles Wachstum und sind deshalb von der Prognose ungünstiger sowie als semimaligne einzustufen. Glioblastome werden Grad IV Tumoren zugerechnet. Sie sind hoch maligne, undifferenziert, mit hohem Proliferationspotenzial und einer sehr schlechten Prognose verbunden (Shapiro *et al.*, 1989; Kleihues *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 2003). Anhand der neuen WHO-Klassifikation wird nun zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-mutierten Glioblastomen unterschieden. IDH1-Wildtyp Glioblastome entwickeln sich meist de novo, bei einem mutierten IDH1 meist als sekundäres Glioblastom auf Grundlage eines anaplastischen oder diffusen Astrozytoms (Louis *et al.*, 2016).

Wie aus der neuen WHO-Klassifikation glialer Tumore ersichtlich wird zunehmend die histologische Einteilung durch immunohistochemische und molekulargenetische Gewebeuntersuchungen ergänzt (Louis *et al.*, 2016). Nach *Verhaak et al.* werden Glioblastome in vier Subtypen unterteilt: proneural, mesenchymal, proliferativ und klassisch (Verhaak *et al.*, 2010). Ziel dieser neuen Unterteilungen ist es mehr unterschiedliche Tumorentitäten unterscheiden zu können, um eine bessere „Target orientierte“ Therapie zu wählen und neue, für die Prognose entscheidende Informationen zu erhalten (Weller *et al.*, 2013). Zur klinischen Routine gehören dabei bereits der MGMT-Methylierungsstatus, die 1p/19q co-Deletion und IDH-Mutationen (Hegi *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2009, Louis *et al.*, 2016).

1.2 Diagnostik der Glioblastome

Die primäre Diagnostik erfolgt mittels Magnetresonanztomographie (MRT), wenn klinische Verdachtssymptome auf einen Hirntumor vorliegen. Diese umfassen neu auftretende fokale oder generalisierte epileptische Krampfanfälle, neurologische Ausfallserscheinungen, Persönlichkeitsveränderungen und allgemeine Zeichen erhöhten Hirndrucks wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Bewusstseinstrübung. Die Symptomatik und deren Dynamik sind abhängig von der Lokalisation des Tumors (Greenberg, 2010; Samandouras, 2010). Oft werden Gliome auch im Rahmen einer an-

deren cerebralen Abklärung wie zum Bespiel Schwindel oder Kopfschmerzen als Zufallsbefund diagnostiziert (Lund-Johansen, 2013; Sandeman *et al.*, 2013).

1.2.1 Computertomographie

Die Computertomographie (CT) wird meistens bei Patienten mit einer akut auftretenden zerebralen Symptomatik als initiale Bildgebungsmodalität genutzt. Weiter kann sie ergänzend zur MRT Bildgebung wertvolle Hinweise bezüglich einer Unterteilung der unterschiedlichen Tumorentitäten geben. So zeigen zum Beispiel Oligodendrogliome in der CT meist Verkalkungen und lassen sich so von anderen Tumoren abgrenzen (Osborn *et al.*, 2010; Linn *et al.*, 2011). In der nativen CT sind Glioblastome iso- bis hypodens mit einer zentralen Hypodensität. Bei Kontrastmittelgabe erscheint diese meist irregulär, kräftig und ringförmig in den Randbereichen (Osborn *et al.*, 2010; Linn *et al.*, 2011).

1.2.2 Magnetresonanztomographie

Die MRT-Bildgebung ist der Goldstandard in der Hirntumordiagnostik (Rees, 2003; Sanai *et al.*, 2011). Die Darstellung des Tumors erfolgt in 3 Ebenen. Hiermit lassen sich die Größe und Lokalisation, der Bezug zu eloquenten Arealen und Gefäßen, die raumfordernde Wirkung, das Ausmaß des perifokalen Ödems, nekrotische und zystische Anteile sowie die Kontrastmittelaufnahme des Tumors am besten darstellen. Die MRT dient neben der Diagnosestellung und Operationsplanung weiter im postoperativen Verlauf der Beurteilung des Therapieerfolgs. Um eine optimale Verlaufsbeurteilung zu gewährleisten, sollten die durchgeführten MRT-Kontrollen ebenfalls möglichst einheitliche Kriterien erfüllen (Macdonald *et al.*, 1990; Wen *et al.*, 2010; Vogelbaum *et al.*, 2012). Die Verlaufskriterien für die Beurteilung eines Therapieansprechens, beziehungsweise einer Rezidivbildung im MRT werden als sogenannten RANO-Kriterien (RANO= Response Assessment in Neuro-Oncology) bezeichnet (Macdonald *et al.*, 1990; Wen *et al.*, 2010). Glioblastome sind meist supratentoriell in der weißen Substanz der Großhemisphären gelegen. Sie wachsen diffus infiltrierend und lassen sich schlecht vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Meist lassen sich zystische, hämorrhagische Anteile erkennen. Glioblastome sind größtenteils sehr raumfordernd und weisen in den meisten Fällen ein perifokales Ödem auf. In der T1-Wichtung zeigen sie sich meist als iso- bis hypointens. In T2 und FLAIR zeigen sie ein heterogenes und hyperintenses Bildmuster. Die Kontrastmittelaufnahme (KM) mittels Gadolinium ist typischerweise

kräftig und randständig um eine zentrale Nekrose. Die KM-Aufnahme kann sich aber als äußerst variabel zeigen. In der Diffusionsgewichtung zeigen Glioblastome keine Diffusionsrestriktion, jedoch niedrigere ADC-Werte als niedriggradige Gliome (Greenberg, 2010; Osborn *et al.*, 2010; Linn *et al.*, 2011).

1.2.3 Ergänzende Bildgebungsmodalitäten

Die genannten Bildgebungsmodalitäten können je nach Erfordernissen durch die Positronenemissiontomographie (PET) und Singlephotonemissionscomputertomographie (SPECT) ergänzt werden. Weiter können funktionelle MRT-Aufnahmen oder die MRT-Spektroskopie sowie Gefäßdarstellungen mittels einer konventionellen Angiographie (DSA) hilfreiche Informationen liefern (Linn *et al.*, 2011). Mittels Positronenemissionstomographie (PET) ist in der FDG-PET ein deutlich erhöhter Glukosemetabolismus sichtbar. Hier lassen sich v.a. für stereotaktische Biopsien hypermetabole Tumoranteile identifizieren. Differentialdiagnostisch stehen Abszesse, Blutungen, Infarzierungen, demyelierende und reaktive Läsionen ebenfalls bei diesem Befund zur Diskussion. Zur besseren Abgrenzung benigner von malignen Läsionen dient eine PET mit Aminosäuretracern (la Fougère *et al.*, 2011). Eine genaue Abgrenzung von primären Hirntumoren gegenüber Metastasen und Lymphomen ist aber auch damit nicht möglich (la Fougère *et al.*, 2011; Linn *et al.*, 2011).

1.3 Präoperative Behandlung des Glioblastoms

Die präoperative Behandlung von Patienten mit Glioblatomen umfasst die Gabe von Kortikosteroiden, um der raumfordernden Wirkung des perifokalen Ödems entgegenzuwirken. Bei Patienten, die durch einen fokalen oder generalisierten Krampfanfall klinisch auffällig wurden, ist die Gabe eines Antikonvulsivums indiziert (Greenberg, 2010; Samandouras, 2010).

1.4 Operative Therapie des Glioblastoms

Abhängig vom Allgemeinzustand, dem neurologischen Zustand und Alter des Patienten sowie der Lage des Tumors in Bezug auf eloquente Areale, wird die Entscheidung über die Art des operativen Vorgehens getroffen. Höchste Priorität vor der Radikalität der Operation muss immer der Erhalt neurologischer Funktionen haben (Duffau and Mandonnet, 2013; Chambless *et al.*, 2015). Eine Operation dient der Gewebegewinnung zur

histologischen Beurteilung. Daneben wird bei einer offenen Operation die Zytoreduktion angestrebt, um die raumfordernde Wirkung des Tumors zu minimieren und durch Reduktion des intrakraniellen Drucks eine Erholung gestörter neurologischer Funktionen zu ermöglichen. Auch eine radikale Operation ist nicht kurativ, da das umliegende Hirngewebe durch Tumorzellen infiltriert wird (siehe Abb. 1) und damit ein Ursprung für Rezidive gegeben ist (Scherer, 1940; Weller *et al.*, 2003). Bei neurochirurgischen Eingriffen in motorischen, eloquenten Hirnarealen werden Verfahren wie das intraoperative Neuromonitoring (IONM) mittels evozierter motorischer und sensibler Potentiale, die bildgebende Neuronavigation sowie die präoperativ durchgeführte navigierte transkranielle Magnetstimulation (nTMS) dazu verwendet, die Funktion der jeweiligen Hirnregion so weit als möglich zu erhalten (Haglund *et al.*, 1994; Duffau *et al.*, 1999; Kombos *et al.*, 2009; Duffau, 2010; Sanai and Berger, 2010; Krieg *et al.*, 2014; Shiban *et al.*, 2015). Weitere Verfahren wie die intraoperative Ultraschalldiagnostik (Moiyadi and Shetty, 2016; Prada *et al.*, 2016), das intraoperative MRT (Senft *et al.*, 2011; Jolesz and McDannold, 2014; Zhang *et al.*, 2016) und fluoreszenzgestützte Verfahren wie die Resektion nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) dienen dazu, die Resektion zu maximieren (Stummer *et al.*, 2006, 2008; Schucht *et al.*, 2014).

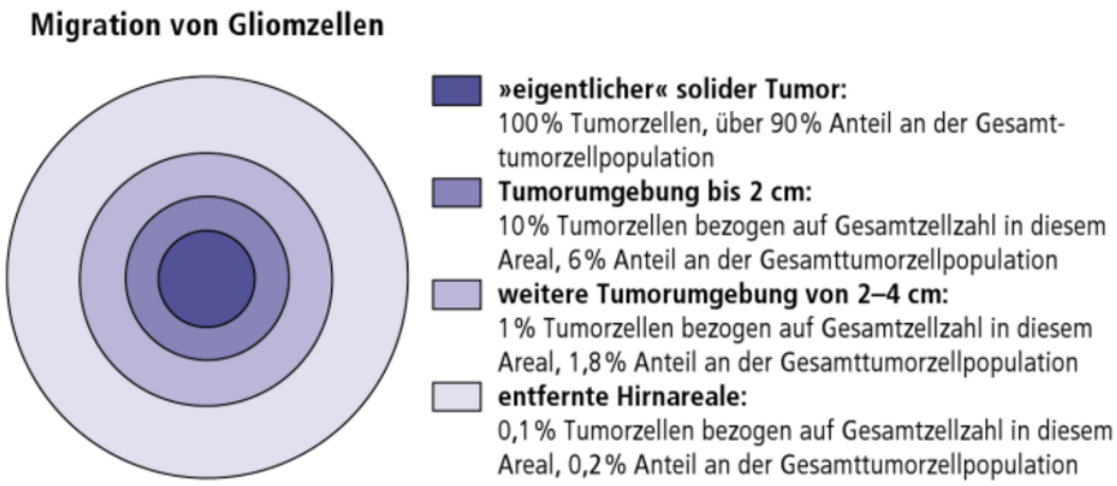

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Problematik der operativen Resektion von Glioblastomen durch die Migration von Tumorzellen. Den soliden, im MRT kontrastmittelaufnehmenden Anteilen stehen weitere für den Operateur nicht sichtbare Tumorbereiche gegenüber. Eine Komplettresektion ist somit nicht möglich (Moskopp und Wassmann, 2015).

Lediglich für die fluoreszenzgestützte Resektion mit 5-ALA und die intraoperative MRT existieren randomisierte Daten, die mit einer Verbesserung der Tumorresektion aufgrund dieser Techniken einhergehen (Stummer *et al.*, 2006, 2008; Senft *et al.*, 2011; Schucht *et al.*, 2012, 2014; Jan Coburger *et al.*, 2015; J. Coburger *et al.*, 2015). *Stummer et al.* zeigten, dass unter 5-ALA Bedingungen im Vergleich zum Weißlicht eine signifikant höhere Komplettresektion eines Glioblastoms erreicht werden kann (65% vs. 36%), woraus ein verlängertes progressionfreies Überleben resultiert (Stummer *et al.*, 2006). In einer anschließenden Studie konnten *Stummer et al.* nachweisen, dass Patienten mit komplett resezierten Glioblastomen signifikant länger überleben (16,7 vs. 11,8 Monate) (Stummer *et al.*, 2008). Eine nahezu komplette Resektion (gross total resection, GTR) eines Glioblastoms ist also mit einer besseren Prognose verbunden (Lacroix *et al.*, 2001; Sanai and Berger, 2008; Chaichana *et al.*, 2013; Kreth *et al.*, 2013). Auch bei Rezidiv-Glioblastomen erscheint das Ausmaß der Resektion von großer Bedeutung. Patienten, die kein kontrastmittelaufnehmendes Tumorvolumen nach der ersten Re-Operation aufweisen, hatten ein statistisch signifikant verlängertes Überleben als ohne eine vollständige Resektion der kontrastmittelaufnehmenden Tumoranteile (Ringel *et al.*, 2016). Inkomplett operierte Patienten mit einem Rezidiv-Glioblastom können sogar eine schlechtere Gesamtprognose zeigen als nicht-operierte Patienten (Suchorska *et al.*, 2016). Ein stereotaktischer Eingriff hingegen dient nur der Gewebegewinnung. Dieser wird vor allem bei ungünstig gelegenen Raumforderungen, multiplen Läsionen mit Verdacht auf Metastasen sowie bei Patienten mit niedrigem Karnofsky-Index, welche sehr gering bis gar nicht von einer offenen Operation profitieren würden, durchgeführt (Barker *et al.*, 2001). Patienten, bei denen keine GTR erreicht werden konnte, zeigten kein besseres Überleben als Patienten die nur biopsiert wurden (Kreth *et al.*, 2013).

1.5 Postoperative Behandlung des Glioblastoms

Als Standardtherapie von Glioblastomen gilt das von *Stupp et al*. publizierte EORTC/ NCIC Schema mit einer Radiotherapie und konkomitanten Chemotherapie mit Temozolomid für 6 Wochen sowie im Anschluß mit 6 Zyklen Temozolomid (Stupp *et al.*, 2009). Im Rezidivfall sollte eine erneute OP geprüft werden sowie über eine erneute Chemotherapie und ggf. Strahlentherapie (Intervall 6 Monate) entschieden werden (Gallego, 2015; Navarria *et al.*, 2016; Ringel *et al.*, 2016; Suchorska *et al.*, 2016).

1.5.1 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie spielt sowohl in der Primärbehandlung als auch bei Rezidiven seit Jahren eine entscheidende Rolle (Chautard *et al.*, 2010) Über Jahre galt eine operative Resektion des Tumors und anschließende Bestrahlung als Standardtherapie. 2005 konnten *Stupp et al.* die Überlegenheit einer konkomitaten Strahlentherapie mit Temozolomid gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie nachweisen (siehe Abb. 2). Im 2 Jahres Überleben zeigte sich hierbei ein signifikanter Überlebensvorteil (26.5% *versus* 10.4%) (Stupp *et al.*, 2009; Quick *et al.*, 2010). Eine Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid wirkt synergistisch, da hierdurch die Wahrscheinlichkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen erhöht wird (Chakravarti *et al.*, 2006; Zhang and Chakravarti, 2006).

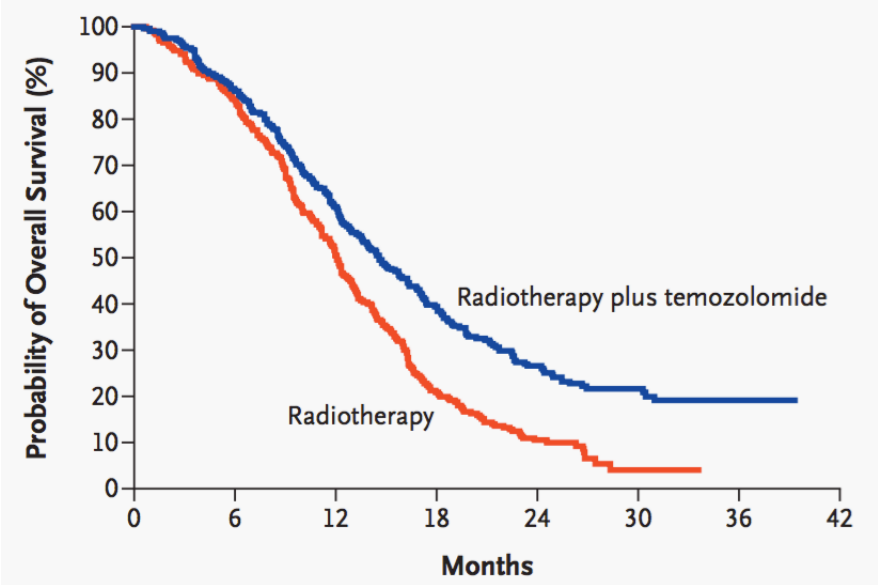

Abbildung 2: Überlebenskurven von Patienten mit alleiniger Radiotherapie im Vergleich zu Patienten mit Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolomid. Die kombinierte Therapie führt zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebensdauer (Stupp et al., 2005). ***(Reproduced with permission from Stupp et al., 2005, Copyright Massachusetts Medical Society)***

Die Standarddosierung beträgt 60Gy und ist aufgeteilt in Gaben von 2Gy über 6 Wochen (30 Sitzungen). Sie wird fokal in die Resektionhöhle mit einem 2 cm Abstand zum umliegenden Hirngewebe appliziert und führt bei den proliferierenden Tumorzellen zu DNA Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (Leibel and Sheline, 1987; Shapiro *et al.*, 1989). Bei älteren Patienten kann, um potenzielle Nebenwirkungen in Bezug auf kognitive Fähigkeiten und die Lebensqualität zu minimieren, eine geringere Dosis mit 50Gy

in 28 Fraktionen verwendet werden (Keime-Guibert *et al.*, 2007).

1.5.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie bei Glioblastomen hatte bislang in Bezug auf das mediane Überleben im Gegensatz zur Operation und Strahlentherapie einen geringeren Stellenwert. Die Blut-Hirnschranke und Blut-Liquorschranke erschweren eine ausreichende Konzentration der systemisch gegebenen Zytostatika im Zielgewebe (Aiken, 2014). Bis 2004 galt die operative Resektion des Glioblastoms und adjuvante Bestrahlung des Tumorbetts als Standardtherapie (Walker *et al.*, 1978, 1980; Stupp *et al.*, 2005).

Temozolomid ist ein alkylierendes Zytostatikum, welches oral verabreicht wird. Es induziert einen Arrest in der strahlensensitiven G2/M-Phase des Zellzyklus sowie eine Apoptose durch das Anfügen von Alkylgruppen an die O6-Position des DNA-Reparaturproteins O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) (Hirose *et al.*, 2001). Des weiteren wirkt Temozolomid als Strahlensensitizer (van Rijn *et al.*, 2000; Chakravarti *et al.*, 2006; Zhang and Chakravarti, 2006). Temozolomid wird oral verabreicht und kann die Blut-Hirnschranke passieren, um dann in hohen Konzentrationen im Gehirn und v.a. dem hochvaskularisierten Glioblastom akkumulieren (Patel *et al.*, 2003; Reyderman *et al.*, 2004; Rosso *et al.*, 2009)

Hegi et al. konnten nachweisen, dass es bei einer positiven Methylierung der Promotorregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Gens zu einem besseren Ansprechen auf Temozolomid kommt, da dies zu einer geringeren MGMT-Expression und dadurch geringen DNA-Reparaturaktivität führt. Positiv methylierte Patienten zeigten ein signifikant längeres Überleben im Vergleich zu nicht-methylierten Patienten (siehe Abb. 3, Hegi *et al.*, 2005).

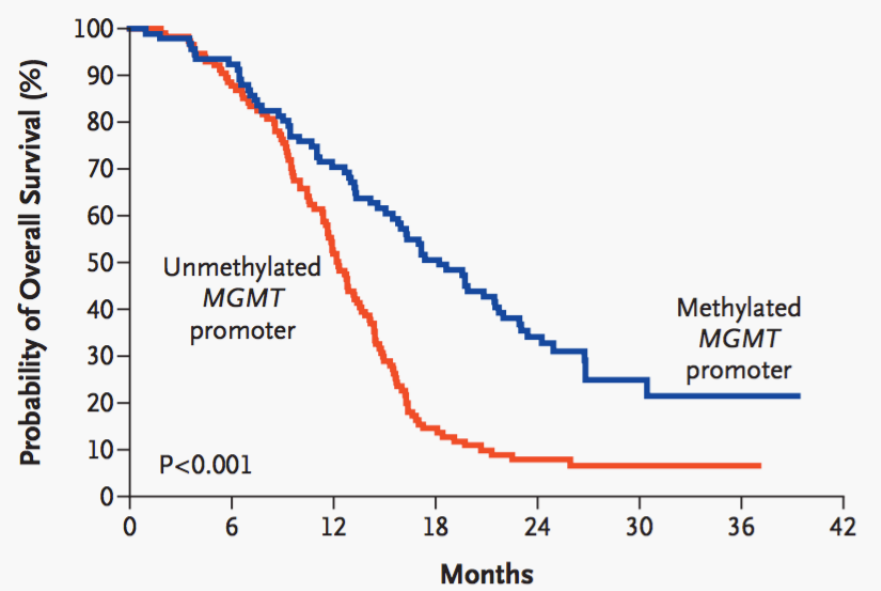

Abbildung 3: Überlebenskurven der Patienten mit und ohne MGMT-Oromotormethylierung. Die Überlebendauer mit MGMT-Promotormethylierung ist signfikant länger. Der MGMT Methylierungsstatus hat somit eine prognostische Aussagekraft (Hegi et al., 2005). ***(Reproduced with permission from Hegi et al., 2005, Copyright Massachusetts Medical Society)***

Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich die Standardtherapie von Glioblastomen nach dem von *Stupp et al*. publizierten EORTC/ NCIC Schema („Stupp Schema“) bestehend aus einer Radiotherapie und konkomitanten Chemotherapie mit Temozolomid für 6 Wochen sowie anschließend 6 Zyklen Temozolomid (Stupp *et al.*, 2009).

1.5.3 Therapie im Rezidivfall

Im Falle eines Rezidivs gibt es keine Standardtherapie. Die Grundlage der ausgewählten Therapieform sollte abhängig vom Alter und dem Allgemeinyustand, dem MGMT-Methylierungsstatus und dem Ansprechen auf vorausgegangene Therapien getroffen werden. Weiter sollten die Lebensqualität und etwaige Nebenwirkungen der einzelnen Therapieformen berücksichtigt werden (Seystahl *et al.*, 2016). Eine Reoperation und Rebestrahlung können durchgeführt werden (Combs *et al.*, 2005; Fogh *et al.*, 2010; Ringel *et al.*, 2016; Seystahl *et al.*, 2016). Weiter können Nitrosoharnstoffe wie CCNU (Lomustin) adjuvant verabreicht werden (Gallego, 2015). Bei positiv methylierten Patienten kann auch die Therapie mit Temozolomid erneut begonnen werden (Wick *et al.*, 2009; Perry *et al.*, 2010). Hierbei ist, wie schon bei der initialen Behandlung, der MGMT-Methylierungsstatus ein in die Entscheidung mit einzubeziehender Parameter.

Sollten diese beiden Chemotherapeutika keine Wirkung zeigen, kann der Einsatz von Bevacizumab (Avastin), ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor, diskutiert werden. Eine Kombination von CCNU und Bevacizumab ergab einen Überlebensvorteil gegenüber Bevacizumab alleine (Taal *et al.*, 2014). Der Einsatz von Carmustin-wafers (Gliadel) in das Tumorbett bei der Operation kann in Rezidivsituationen erfolgen. Studienergebnisse zeigen eine Verlängerung des PFS, jedoch nicht des OS (Pallud *et al.*, 2015).

1.6 Molekulare Neuroonkologie bei Glioblastomen

1.6.1 MGMT-Methylierungstatus

Die Hypermethylierung der Promotorregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens führt zu einem besseren Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika (Temozolomid). Der MGMT-Methylierungsstatus stellt somit einen der wichtigsten Faktoren zur Vorhersage der progressionfreien Überlebens- und Gesamtüberlebenszeit dar (Hegi *et al.*, 2005). MGMT ist ein funktionelles DNA-Reparaturprotein, welches durch Entfernung von Alkylgruppen an der O6-Position des Guanins DNA Schäden repariert, die durch ein fehlerhaftes Anfügen von Alkylgruppen entstanden sind. Chemotherapeutika wie Temozolomid, die an der O6-Position des Guanins durch Alkylierung ihre Wirkung entfalten, würden durch eine funktionierende O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase in ihrer Wirkung gehemmt. Besteht jedoch an dieser Stelle eine Hypermethylierung der Promotorregion, kann durch die fehlende Aktivität des MGMT-Reparaturproteins eine Sensibilisierung für alkylierende chemotherapeutische Substanzen erfolgen (Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005).

1.6.2 IDH-Mutationen

Mutationen im Gen der Isozitratdehydrogenase-1 finden sich bei 12% der Glioblastome vor allem bei sekundären Glioblastomen. Patienten mit einer IDH1-Mutation zeigen ein verbessertes Outcome im Vergleich zum Wildtyp (Parsons *et al.*, 2008).

Fünf Gene kodieren für die drei humanen katalytischen Enzyme IDH1, IDH2 und IDH3. IDH1 ist eine Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NAPH) abhängige Isozitratdehydrogenase, welche die oxydative Dekarboxylierung von Isozitrat zu α–Ketoglutarat (α-KG) katalysiert (Pollard and Ratcliffe, 2009). Mutationen von IDH1 in Gliomen betreffen in 85% der Fälle die Aminosäurenposition R132 mit der Mutation Arginin zu Histidin (T. Watanabe *et al.*, 2009). Hierdurch geht die katalytische Aktivität des Proteins durch Verhinderung der Isozitratbindung verloren und es kommt zur Produktion von D2-Hydroxyglutarat (Dang *et al.*, 2010; Turkalp *et al.*, 2014). Eine vermehrte Anhäufung D2-Hydroxyglutarat führt durch epigenetische Dysregulation zur Entstehung und Progression von glialen Hirntumoren (Dang *et al.*, 2010, 2016). Mutiertes IDH1 wird als ein „Onkogen“, D2-Hydroxyglutarat als „Onkometabolit“ gesehen (Garber, 2010).

Eine Unterscheidung zwischen einem primärem und sekundärem Glioblastom kann eindeutig durch das Vorliegen eines IDH1-Verlustes getroffen werden (Nobusawa *et al.*, 2009). Punktmutationen im Gen der IDH1 zeigen einen Überlebensvorteil bei Glioblastompatienten (Parsons *et al.*, 2008; Wirsching *et al.*, 2016). Weiter sind diese Mutationen mit einer erhöhten Sensitivität für das Ansprechen einer Radiotherapie bei Gliomen verbunden (Taal *et al.*, 2011). Die Erkenntnisse führen dazu, mutiertes IDH1 als prognostisch günstigen Marker ansehen zu können (Parsons *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009).

1.6.3 Andere molekularpathologische Veränderungen

Genetische Alterationen sind vor allem für primäre Glioblastome typisch. Hier zeigt sich vor allem eine Überexpression des Epidermal Growth Faktor Rezeptors (EGFR) in über 40-60% der Fälle. Durch Ligandenbindung an der Zelloberfläche kommt es zu Aktivierung einer Tyrosinkinase intrazellulär mit Phosphorylierung intrazellulärer Substrate. Es resultieren durch eine andauernde Stimulation ein unkontrolliertes Zellwachstum, DNA-Synthese sowie die Expression von Onkogenen (Libermann *et al.*, 1985; Voldborg *et al.*, 1997; Liffers *et al.*, 2015). Aberrationen des Chromosom 10 zählen zu den häufigsten Aberrationen beim Glioblastom (Karlbom *et al.*, 1993; Kimmelman *et al.*, 1996; Balesaria *et al.*, 1999). Der Verlust eines oder beider Arme sowie eine Punktmutation können zum Funktionsverlust führen (Ichimura *et al.*, 1998). Das Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) ist auf Chromosom 10 codiert und wirkt als Tumorsuppressor. Kommt es zu einer Fehlfunktion des Chromosom 10, kann PTEN seine suppressive Wirkung nicht mehr ausüben, was ein Tumorwachstum ebenfalls begünstigt (Duan *et al.*, 2015). Neben den beschriebenen IDH1-Mutationen zeigen sich beim sekundären Glioblastom TP53-Mutationen und der 19q-Verlust (Watanabe *et al.*, 1996; Kleihues and Ohgaki, 1999; Nakamura *et al.*, 2000; Furnari *et al.*, 2007; Ohgaki and Kleihues, 2007). H3F3A-Mutationen zeigen sich vor allem bei kindlichen Glioblastomen (Sturm *et al.*, 2012).

1.6.4 Glioblastom Pathways

Eine Vielzahl an Tumorsuppressorgenen und Onkogenen ist bei der Entstehung von Glioblastomen aktiviert oder inaktiviert. Die am häufigsten betroffenen Signaling Pathways sind der TP53-, der Retinoblastom 1- (RB1) und der EGFR/PTEN-Pathway. Der TP53-Pathway ist bei 80% aller Tumore mutiert. TP53 ist an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. Eine DNA-Schädigung führt zum Zellzyklusarrest und daraus resultierend zur Apoptose. Abnormale Veränderungen in diesem Signaling Pathway führen zu einer genetischen Instabilität, verminderten Apoptoserate, Neoangiogenese und damit verbunden zur Tumorgenese (Shiraishi *et al.*, 2002; Furnari *et al.*, 2007; McLendon *et al.*, 2008; Belden *et al.*, 2011; Mabray *et al.*, 2015).

Der Retinoblastom 1-Pathway ist gekennzeichnet durch eine Hemmung des Zellzyklus durch RB1. Veränderungen am RB1-Gen oder eine Überexpression von CDK4 führen zu unkontrolliertem Zellwachstum (Shiraishi *et al.*, 2002; McLendon *et al.*, 2008; Belden *et al.*, 2011).

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Teil des RTK/PTEN/PI3K-Proliferationspathways, führt durch Aktivierung von intrazellulären Tyrosinkinasen zur Phosphorylierung intrazellulärer Substrate. Es resultieren ein unkontrolliertes Zellwachstum, eine verstärkte DNA-Synthese sowie die Expression von Onkogenen (Belden *et al.*, 2011). PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, das ebenfalls in den RTK/PTEN/PI3K Proliferationspathway involviert ist. PTEN Mutationen treten in 15-40% aller primären Glioblastome auf. Bis zu 80% weisen einen Verlust des Chromosom 10q auf. In dieser Genregion wird PTEN codiert (10q23) (Ohgaki and Kleihues, 2009; Belden *et al.*, 2011; Gupta and Salunke, 2012). Ein Chromosom 10q-Verlust, PTEN-Mutationen und Amplifikationen des EGFRs werden häufig gemeinsam im Zellphänotyp eines Glioblastoms gesehen (Louis *et al.*, 2007; Gupta and Salunke, 2012). Primäre Glioblastome sind durch EGFR-Amplifikationen, PTEN-Mutationen und das Fehlen von IDH-Mutationen gekennzeichnet, während sekundäre Glioblastome durch Mutationen von TP53, IDH und einer fehlenden EGFR-Amplifikation charakterisiert sind (Watanabe *et al.*, 1996; Kleihues and Ohgaki, 1999; Fujisawa *et al.*, 2000; Ohgaki *et al.*, 2004; Arjona *et al.*, 2006; Furnari *et al.*, 2007; Ohgaki and Kleihues, 2007; Yan *et al.*, 2009; Verhaak *et al.*, 2010).

1.6.5 Subtypeneinteilung des Glioblastoms

Durch genomweite Analysen von Glioblastomzellen konnten *Verhaak et al.* Glioblastome in vier Subtypen einteilen: mesenchymaler, neuraler, proneuraler und klassischer Subtyp. Jeder Subtyp zeigt spezielle Markergene und genetische Aberrationen. Der klassische Subtyp ist im Vergleich zu den drei anderen Subtypen durch stark erhöhte EGFR-Level (97%) und Verluste auf Chromosom 10 und 9p21.3 gekennzeichnet. Weiter bestehen Amplifikationen auf Chromosom 7. TP53 ist bei diesem Subtyp nicht mutiert. Der klassische Subtyp zeigte in der Analyse das längste Überleben bei einem aggressiven Therapieregime (konkomitante Radiochemotherapie und mindestens 3 Zyklen Temozolomid adjuvant). Proneurale Glioblastome zeigen ein signifikant mutiertes TP53, die häufigsten Mutationen im IDH1-Gen und im Platelet-derived-growth-factor-receptor-alpha (PDGFRA). Im Vergleich zu den anderen Subtypen waren die Patienten mit einem proneuralen Subtyp signifikant jünger. Hier zeigte sich auch der größte Anteil sekundärer Glioblastome. Ein längeres Überleben wurde in dieser Gruppe nachgewiesen. Patienten, die ein aggressives Behandlungskonzept erhielten, zeigen jedoch kein verlängertes Überleben im Vergleich zur weniger aggressiv behandelten Gruppe. Beim mesenchymalen Subtyp treten am häufigsten Mutationen des NF1-Tumorsuppressorgens auf. Ebenso traten zahlreiche Mutationen der PTEN und des TP53 auf. Ein signifikant verlängertes Überleben durch eine aggressive Therapie konnte in dieser Gruppe nachgewiesen werden. Die neurale Subgruppe ist gekennzeichnet durch die Expression von Genen, welche normalerweise auch im gesunden Nervenzellen und Neuronen nachgewiesen werden können. Die Patienten dieser Subgruppe waren am ältesten. Sie zeigten durch eine aggressive Therapie eine Verbesserung der Überlebenszeit, jedoch weitaus weniger ausgeprägt als in der klassischen und mesenchymalen Subgruppe (Verhaak *et al.*, 2010).

Die Subgruppenanalyse von *Verhaak et al.* zeigt die Möglichkeit und Notwendigkeit der Einteilung von Glioblastomen nach molekularpathologischen Kriterien, da sich hieraus direkt therapeutische Konsequenzen und Prognosekriterien ableiten (Verhaak *et al.*, 2010). Eine molekulare Phänotypisierung würde eine targetorientierte Therapie ermöglichen. Hierbei spielen auch microRNAs (miRNAs) eine entscheidende Rolle. Diese sind kleine mRNA Moleküle von ca. 20-23 Nucleotiden, welche die mRNA-Translation modulieren (Winter *et al.*, 2009). Bei Glioblastomen sind 256 miRNS im

Vergleich zum gesunden Hirngewebe signifikant überexprimiert, von denen ein Großteil nicht genauer spezifiziert wurde. MiRNAs können in Zukunft eine große Rolle in der Therapie von Glioblastomen spielen (Møller *et al.*, 2013).

Eine weitere intensive Suche nach relevanten molekularen Markern und ihre Interaktion mit bereits bekannten Pathways erscheint bei der aktuell immer noch infausten Prognose eines Glioblastoms mehr als elementar. Zukünftige Therapiekonzepte sollen individuell nach molekularpathologischen Kriterien erstellt werden.

1.7 High-mobility group AT-hook 2 (HMGA2)

HMGA-Proteine sind Chromatinproteine, die durch Veränderung der Chromatinstruktur die Transkription modulieren (Grosschedl *et al.*, 1994). Erstmals wurden sie 1973 von *Goodwin et al.* beschrieben (Goodwin *et al.*, 1973). Sie können hemmend als auch verstärkend wirken (Wolffe, 1994; Bustin and Reeves, 1996). Aus dem primären Transkript des HMGA1-Gens entstehen die Isoformen HMGA1a, HMGA1b und HMGA1c (Friedmann *et al.*, 1993).

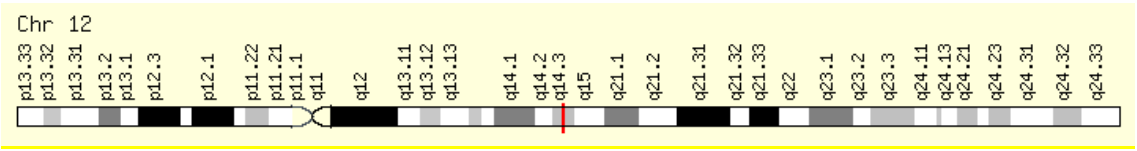

Abbildung 4: Die Lage des HMGA2-Gens wird auf Chromosom 12q14 beschrieben. Es kodiert 109 Aminosäuren ('HMGA2 Gene - GeneCards | HMGA2 Protein | HMGA2 Antibody', n.d.).

Das HMGA2-Gen wurde erstmals bei Genrearrangements in benignen mesenchymalen Tumoren von *Schönmakers et al.* beschrieben (Schoenmakers *et al.*, 1995). Es kodiert das vierte Protein der HMGA-Proteinfamilie, High-mobility group AT-hook 2 (HMGA2) und gehört der non-histone chromosomal high mobility group (HMG) Proteinfamilie an. Die funktionelle Einheit eines jeden HMGA-Proteins besteht aus drei strukturellen DNA-Bindungsdomänen (AT-hooks), die eine Bindung an Adenin-Thymin (AT-) reiche Regionen der nuklearen DNA ermöglichen sowie einer sauren C-terminale Domäne, die in der Protein-Protein- und DNA-Bindung eine Rolle spielt (Reeves and Nissen, 1990; Monzen *et al.*, 2008; Sgarra *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Durch Veränderungen in der Chromatinstruktur fungiert es indirekt als Transkriptionsfaktor (Fedele *et al.*, 2002). Durch die spezifische Bindung von HMGA2 an die Promotorregionen werden bestimmte Gene transkriptionell aktiviert oder inhibiert (Thanos and Maniatis, 1995; Klein-Hessling *et al.*, 1996; Borrmann *et al.*, 2003). Beim Menschen ist das HMGA2-Gen auf dem Chromosom 12q14 lokalisiert und kodiert 109 Aminosäuren (siehe Abb. 4). Es wird während der Embryogenese bei Differenzierungsprozessen ausgeschüttet und zeigt keine oder nur eine sehr geringe Expression in adulten, differenzierten Zellen (Chiappetta *et al.*, 1996; Rogalla *et al.*, 1996; Hirning-Folz *et al.*, 1998; Fedele *et al.*, 2002; Monzen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Die Funktion

von HMGA2 ist von großer Bedeutung für Zellwachstum, -proliferation, differenzierung und den Zelltod (Hetland *et al.*, 2012). Weiter findet sich im Tierversuch eine sehr schwach ausgeprägte Expression in Spermatiden und Spermatozyten bei Mäusen (Chieffi *et al.*, 2002).

1.7.1 HMGA2 in Zusammenhang mit benigen und malignen Tumoren

HMGA2 steht des weiteren in Zusammenhang mit der Expression von Onkogenen und tumorsupressiven Genen bei benignen und malignen Tumoren (siehe Abb. 5) (Fusco and Fedele, 2007). Eine Expression wird in Tumoren wie dem Lipom, Leiomyom und Hypophysentumoren nachgewiesen, die als benigne, jedoch oftmals als sehr verdrängend wachsende Tumoren angesehen werden (Fedele *et al.*, 2002; Fusco and Fedele, 2007; Qian *et al.*, 2009).

HMGA2 wird ebenso bei vielen malignen Neoplasien wie Lungentumoren (Di Cello *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014), dem Ovarialkarzinom (Malek *et al.*, 2008; Mahajan *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Hetland *et al.*, 2012; Califano *et al.*, 2014), Mammakarzinom (Jones *et al.*, 2008; Wend *et al.*, 2013), kolorektalen Tumoren (Wang *et al.*, 2011; Helmke *et al.*, 2012; Rizzi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014) und oralen squamösen Zellkarzinomen (Sterenczak *et al.*, 2014) überexprimiert und als prognostisch ungünstiger Faktor gesehen (Wang *et al.*, 2011). Ein Anstieg der HMGA2-Expression korreliert mit dem Malignitätsgrad und der Metastasierungsneigung (Miyazawa *et al.*, 2004; Chiappetta *et al.*, 2008).

Meist kommt es sowohl bei benignen als malignen Tumoren durch Dysregulation zu chromosomalen Aberrationen auf dem Chromosom 12q13-15, woraus trunkierte Varianten oder Fusionsgene entstehen, die mit einer onkogenen Transformation verbunden sind (Schoenmakers *et al.*, 1995; Borrmann *et al.*, 2003; Fusco and Fedele, 2007; Boyerinas *et al.*, 2010). Diese Varianten sind immer noch in der Lage DNA zu binden und mit Proteinen zu interagieren, jedoch entsteht ein Verlust des C-terminalen Anteils mit der 3’ UTR Einheit (Fedele 2007). Eine Suppression von Onkogenen, die normalerweise durch miRNAs durch Deletion der 3’ UTR Einheit erfolgt, ist nun unmöglich (Lee and Dutta, 2007; Mayr *et al.*, 2007).

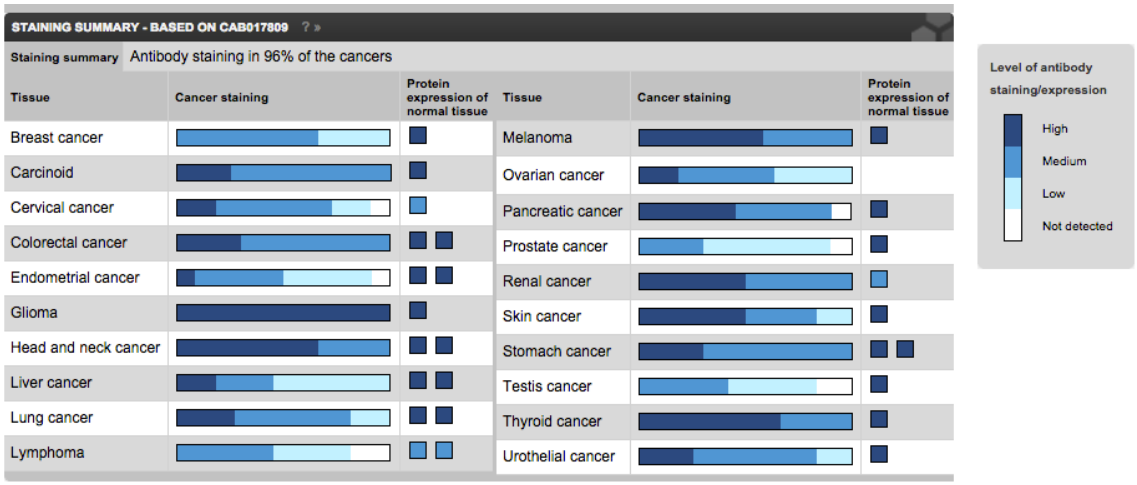

Abbildung 5: HMGA2-Expressionen in immunohistochemisch untersuchten Tumorgeweben. In Gliomen findet sich eine sehr hohe Expression von HMGA2 ('Expression of HMGA2 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas', n.d., Uhlen et al., 2015).

HMGA2 wird von let-7, einer tumorsuppressiven, regulatorischen microRNA (miRNA) gesteuert. Eine erhöhte HMGA2- und erniedrigte let-7-Expression stehen für ein fortgeschrittenes Tumorgeschehen (Shell *et al.*, 2007; Motoyama *et al.*, 2008). Eine direkte Verbindung zwischen let-7a (Mitglied der let-7 Familie) und HMGA2 konnte in Lungen-, Mamma- und Ösophagustumoren nachgewiesen werden (Lee and Dutta, 2007; Guo *et al.*, 2013; Q. Liu *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass miRNA-142-3p, eine miRNA in pluripotenten Stammzellen, die HMGA2-Expression über die Bindung an die 3' UTR Einheit supprimiert. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Expression von Sox2, einem Transkriptionsfaktor in Stammzellen. HMGA2 erhöht die Transkription von Sox2 durch die direkte Bindung an die Sox2 Promotorgenregion. Patienten mit überexprimiertem HMGA2 zeigen ein schlechteres Gesamtüberleben (Chiou *et al.*, 2013). MiRNA Veränderungen sind in die Initierung und Progression tumoröser Prozesse involviert (Shell *et al.*, 2007).

Morishita et al. konnten eine Rolle von HMGA2 durch Aktivierung des TGFβ-Signaling-Pfades nachweisen. Bei Karzinomen führt dieser Signalweg zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) (Morishita *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Rolle von HMGA2 in Bezug auf das invasive Wachstumsverhalten von Tumoren und die Bildung von Metastasen durch die EMT mittels des TGFβ Signaling Pfades. *Lee et al.* zeigten durch HMGA2 „knockdown" eine verminderte Migration und Invasivität der Tumorzellen. EMT-Faktoren wie N-cadherin, beta- cadherin

und Transkriptionsfaktoren wie Snail und Zeb 1 waren dabei herunterreguliert, E-cadherin hochreguliert. Somit scheint HMGA2 über die EMT zu einer Verstärkung der Tumormigration und –invasivität beizutragen (Lee *et al.*, 2015).

Durch eine HMGA2-Überexpression kommt es weiter zu einer Zelltransformation durch Aktivierung des Zellzyklus durch Bindung an pRB und Entfernung der Histon Deacetylase 1 (HDAC1) vom pRB/E2F1-Komplex. Hierdurch kommt es zur Aktivierung von E2F1 und DNA assoziierten Histonen (Fedele *et al.*, 2006).

Die Rolle von HMGA2 bei Zelltransformationen ist wesentlich von der Fähigkeit einer Up- und Downregulation der Expression von Genen abhängig, die eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation/- invasion haben (Fedele and Fusco, 2010).

1.7.2 Die Rolle des HMGA2 in humanen Glioblastomen

Die Rolle von HMGA2 in humanen Glioblastomen wurde bisher wenig untersucht. *Liu et al.* untersuchten in ihrer Studie 2010 verschiedene Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP), unter anderem von HMGA2, die in die Doppelstrangbruchreparatur involviert sind. Patienten mit einem varianten HMGA2 zeigten ein längeres Gesamtüberleben (Liu *et al.*, 2010). *Mao et al.* konnten eine starke Expression von LIN28A, einem miRNA regulierenden Protein, welches auch in anderen Tumoren wie dem Magen-, Mamma- und Prostatakarzinom eine Rolle spielt, in Glioblastomen nachweisen (Ben-Porath *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Nadiminty *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). Eine erhöhte LIN28A-Expression in Tumoren ist mit einer schlechten Gesamtprognose verbunden (Viswanathan *et al.*, 2009). Durch Aktvierung von LIN28A kommt es zu einer verminderten let-7-Expression. Diese spielt bei der Steuerung der HMGA2-Expression im Sinne einer hemmenden Wirkung eine entscheidende Rolle. Proonkogene Faktoren wie HMGA2 werden aktiviert und steuern über die Aktivierung von SNAI die Tumorentstehung (S. Watanabe *et al.*, 2009; Viswanathan *et al.*, 2009). Über einen knockdown des in Glioblastomen exprimierten LIN28A oder einer Überexpression von let-7 kommt es in der Untersuchung von Glioblastomzelllinien zu einer weniger ausgeprägten Invasivität. Durch die Modulation der LIN28A und let-7-Level konnte auch die HMGA2-Expression beeinflusst werden (Mao *et al.*, 2013).

Chiou et al. zeigten die epigenetische Regulation von HMGA2 über die microRNA miRNA-142-3p, die eine HMGA2-Expression durch Bindung an die 3’ UTR-Einheit

supprimiert. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Expression von Sox2. Glioblastompatienten mit einer erhöhten Expression von HMGA2 und Sox2 sowie einer Hypermethylierung der miRNA-142-3p zeigten ein schlechteres Gesamtüberleben (Chiou *et al.*, 2013).

Liu et al. konnten eine signifikant erhöhte Expression von HMGA2 in Glioblastomen (WHO Grad IV) in Vergleich zu anderen Gliomen (WHO Grad II und III) nachweisen (siehe Abb. 6). Weiter bestand eine signifikante Korrelation zur Expression von Ki-67, einem Proliferationmarker in Tumorzellen und der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), die als Zytokin eine Rolle in der Tumorexpansion spielt. Das progressionsfreie Überleben sowie auch das Gesamtüberleben waren bei einer HMGA2-Überexpression in Glioblastomen signifikant vermindert (B. Liu *et al.*, 2014).

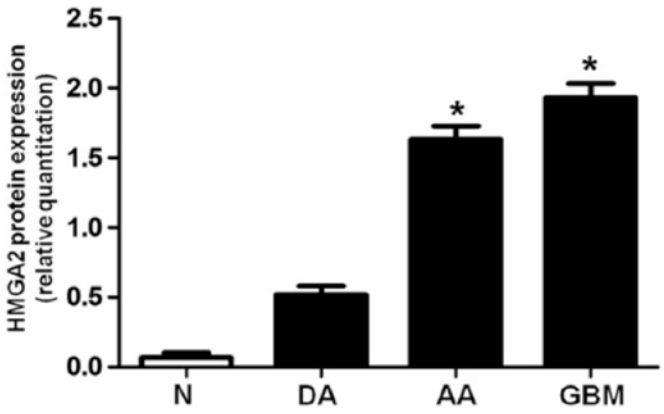

Abbildung 6: HMGA2-Expression im normalen Hirngewebe (N) und glialen Tumoren. Die höchste Expression zeigte sich im Glioblastom (GBM) und anaplastischem Astrozytom (AA) (B. Liu et al., 2014).

Eine eventuelle Möglichkeit, die HMGA2-miRNA-Level regulieren zu können, zeigten *Halle et al.* durch gezielte Hemmung überexprimierter miRNAs. Durch die Unterdrückung von let-7a durch direkte Medikamentenapplikation mittels der convection-enhanced delivery (CED) Technik kam es sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Derepression der mRNA-Level von HMGA2. Über eine gezielte Hemmung von miRNAs kann eventuell in Zukunft eine Hemmung der HMGA2-Expression erreicht wer-

den (Halle *et al.*, 2015).

Die bisherigen Daten zeigen, dass HMGA2 als Biomarker und potenzielles Ziel der Glioblastomtherapie dienen kann. Eine Steuerung der HMGA2-Expression über den let-7-Signalweg mittels miRNAs wäre eine vielversprechende Möglichkeit (Halle *et al.*, 2015).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Gesamtprognose bei Glioblastomen ist trotz großer wissenschaftlicher Anstrengungen weiterhin schlecht. Dennoch zeigen molekularpathologische Entdeckungen wie der MGMT-Promotormethylierungsstatus, die IDH1-Punktmutation sowie eine Einteilung nach den vier Subtypen neural, proneural, mesenchymal und klassisch, dass die heute gültige WHO-Klassifikation glialer Tumore trotz ständiger Neuerungen nicht die Komplexität dieser Erkrankung in ihrer Gesamtheit erfassen kann. Eine weitere molekulare Aufschlüsselung des Glioblastoms ist daher ein wichtiges Ziel, um in Zukunft den Betroffenen durch eine individualisierte Therapie besser helfen zu.

HMGA2 steht in Zusammenhang mit der Expression von Onkogenen und tumorsupressiven Genen bei benignen und malignen Tumoren, verbunden mit einem invasiveren Wachstum und einer schlechteren Gesamtprognose. Das Vorkommen des Gens konnte bereits in Glioblastomen nachgewiesen werden. Seine Funktion wurde jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Dieses Protein stellt eventuell in Zukunft ein probates Zielprotein in der Therapie von Glioblastomen dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchung der/ des:

- HMGA2-Expression in Glioblastomen im Vergleich zum gesunden Hirngewebe.
- HMGA2-Expression in Glioblastomen stratifiziert nach dem MGMT-Promotormethylierungsstatus.
- Einflusses der HMGA2-Expression in Glioblastomen auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1: Geräte und Materialien für die q-PCR

Hardware	**Hersteller**
Applied Biosystems Real-Time PCR Systems	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, USA
Eppendorf Reference® (adjustable-volume) Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Gradient Thermal Cycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mini Zentrifuge	ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Deutschland
Minishaker	KA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mixer Mill MM301	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß PP natur 0,2 ml, mit anhängendem Deckel (flach), RNase-, DNase-, DNA,und pyrogenfrei	nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe) Deutschland
peqLab NanoDrop® 1000 Spectrophotometer	VWR International GmbH, Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
peqLab Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	VWR International GmbH, Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen 100ul Maxymum Recovery Filter Tips, RNase DNase & pyrogen safe	VWR International LLC, Radnor, USA
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S.®, PCR clean/Sterile	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen SafeSeal Tips Professional 10 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tubes (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mikro 220 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
96-well high sided low profile PCR Plate AB-1900	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA

Tabelle 2: Geräte zur Bereitung der Paraffinschnitte sowie Immunhistochemie

Hardware	**Firma**
Ventana BenchMark XT IHC Färbemodul	Roche, Basel, Schweiz
Mikroskop Modell DMLB	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objekträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Schlittenmikrotom, Modell SM2010R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Wasserbad für Paraffinschnittbereitung, WB 693	Vogel Medizintechnik, Fernwald, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Reagenzien für die q-PCR

Reagenzien	**Zusammensetzung**	**Hersteller**
QuantiTect Rev. Transcription Kit	gDNA Wipeout BufferQuantiscript ReverseTranscriptase Quantiscript RT Buffer RT Primer Mix RNase-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	50 RNeasy Mini Spin Columns Collection Tubes (1.5ml, 2 ml) QIAzol Lysis Reagent RNase-free Reagents Buffers	QIAGEN GmbH, Hilden Deutschland
TaqMan Gene Expression Assays	Actin-β, human Hs99999903 IPO8, human Hs00914040 TBP, human Hs00427620 HMGA2, human Hs00171569_m1	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, USA
TaqMan Gene Expression Master Mix	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Ultra Pure) Uracil-DNA glycosylase dNTPs (with dUTP) ROX™ Passive Reference optimized buffer components	Life Technologies Inc., Carlsbad Kalifornien, US

Tabelle 4: Detailangaben zum HMGA2 Antikörper

Überblick HMGA2 Antikörper	
Hersteller	Abcam, Cambridge, UK
Bestellnummer	ab52039
Produktname	Anti HMGA2 Antikörper
Reaktionsspezifität	Maus, Human
Immunogen	Synthetisches Peptid, C- terminale Komponente des humanen HMGA2
Positivkontrolle	Mammakarzinom
Verdünnung	1:25

Tabelle 5: Detektionskits, Reagenzien und Zubehör für die immunhistochemische Analyse mittels Ventana Vollautomat

Detektion Immunhistochemie	
Seriennummer	**Artikelbezeichnung**
760-500	UltraView Universal DAB Detektions Kit, Roche, Basel, Schweiz
Reagenzien und Zubehör	
Seriennummer	**Artikelbezeichnung**
760-080	Amplification Kit, CE
251-01	Antibody Diluent
760-2037 950-124	Bluing Reagent Cell Conditioning Solution 1 (CC1), 2l
950-102	10x EZ Prep Solution, 2l
760-2021	Hämotoxylin
650-010	Liquid Coverslip Technology (LCS)
950-300	Reaction Buffer Concentrate (10x)
950-110	10x SSC Solution, 2l

2.3 Patientenkollektiv

Die histologischen Proben wurden vom Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bereitgestellt und umfassten 44 Patienten mit einem histologisch nachgewiesenen primären oder sekundären Glioblastom (WHO Grad IV) in einem Untersuchungszeitraum von 2006 bis 2012.

Alle Gewebspräparate lagen sowohl in Paraffin fixierte als auch in flüssigem Stickstoff asservierte Kryopräparate vor und wurden vom Institut für Neuropathologie Gießen histopathologisch beurteilt. Die Studie wurde von der medizinischen Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Aktenzeichen: 07/09). Die Einverständniserklärung der Patienten zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Gewebeproben liegt vor.

Es erfolgte die retrospektive Analyse der Patientenakten und die Anlage einer Datenbank mit Erfassung des Geburtsdatums, des Geschlechts, des Datums der Erstdiagnose, des Zeitpunktes der Operation/Reoperation, des Zeitpunktes und der Art der Chemo-/Strahlentherapie, der MRT-Verlaufskontrollen, des Zeitpunktes eines Rezidivs, des Zeitpunktes der letzten Nachuntersuchung und Sterbedatums. Die Dauer der Nachuntersuchung (Follow up) wurde als Zeit zwischen erster Operation und letztem Patientenkontakt bzw. Sterbedatum definiert. Fehlende Sterbedaten wurden über formelle Anfragen bei der zuständigen Krankenkasse in Erfahrung gebracht. Als progressionsfreies Überleben (PFS) wurde die Zeit nach der ersten Operation bis zum ersten Tumrorezidiv gewertet.

2.4 Kontrollkollektiv

Als Kontrolle wurden 5 pathologisch unauffällige Hirne aus supratentoriellen Biopsien verwendet. Eine Kleinehirnmetastase eines Mammakarzinoms diente als Positivkontrolle. Diese Gewebspräparate lagen ebenso sowohl in Paraffin fixierter als auch in flüssigem Stickstoff asservierter Form vor und wurden vom Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bereitgestellt.

2.5 Real-time-quantitative PCR

Die Real-time-quantitative PCR (q-PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur DNA-Analyse. Sie basiert auf der in den 1980er Jahren entwickelten Polymerasekettenreaktion (PCR) von Karl Mullis (Saiki *et al.*, 1985). Im Unterschied zur konventionellen PCR erfolgt bei der q-PCR eine zusätzliche DNA-Quantifizierung des jeweiligen Zyklus des PCR-Prozesses in Echtzeit mittels Fluoreszenzmessung nach dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (Forster, 1946). Es werden spezielle DNA-Oligonucleotid basierte Sonden verwendet, welche teilweise eine Komplementarität gegenüber der zu amplifizierenden DNA zeigen (siehe Abb. 7 A und B).

Eine DNA-Polymerase besitzt die Fähigkeit einen neuen komplementären DNA-Strang aus dem zu untersuchenden DNA-Strang (template) zu bilden. Diese kann jedoch nur an die vorbestehende 3'-OH Gruppe ein Nucleotid anfügen, weshalb ein Primer notwendig ist. Die Basenabfolge am Anfang und Ende der zu untersuchenden Sequenz muss daher bekannt sein. Diese spezifische Sequenz kann dann am Ende einer PCR in billionenfacher Kopie vorliegen (siehe Abb. 7 A und B). Für die PCR sind hitzestabile DNA-abhängige Polymerasen (Taq-Polymerase) sowie Desoxyribonukleotide zur Doppelstrangsynthese der DNA notwendig.

Die Reaktion wird mit der Temperaturerhöhung der in Doppelstrang vorliegenden cDNA auf 95ºC begonnen. Hierbei erfolgt das „Schmelzen“ der Doppelstränge in Einzelstränge (Denaturierung). Darauf wird die Temperatur auf ca. 60ºC reduziert, um das Anlagern des Primers zu ermöglichen (Annealing). Nun kann die Elongation in 5'-3' Richtung im Bereich des freien OH- Endes erfolgen (Temperatur 60ºC). Bei der Durchführung einer q-PCR werden Hydrolysesonden in Form von Taq-Man-Sonden verwendet. Diese werden chemisch modifiziert, indem am einen Ende ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R, Donor-Fluorochrom) und am anderen ein Quencher (Q, Akzeptor-Fluorochrom) angebracht werden (siehe Abb. 7 B).

In dieser Studie wurde 6-FAM-phosphoramidit verwendet. Die Anlagerung erfolgt in der Annealing Phase zwischen den Primern. Die Taq-Polymerase baut durch ihre zusätzliche 5'-3' Exonucleaseaktivität die Sonde am 5'- Ende ab, während andererseits der Gegenstrang synthetisiert wird. Reporter und Quencher entfernen sich nun voneinander.

Im Rahmen der Fluoreszenzmessung nach dem FRET erfolgt die Anregung des Farbstoffes mittels einer Lichtquelle. Kommt es zu einer Erhöhung des Abstandes zwischen Akzeptor und Donor, nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, der des Donors zu (siehe Abb. 7 B). Diese Messung findet in jedem Zyklus statt. Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge der PCR Produkte an.

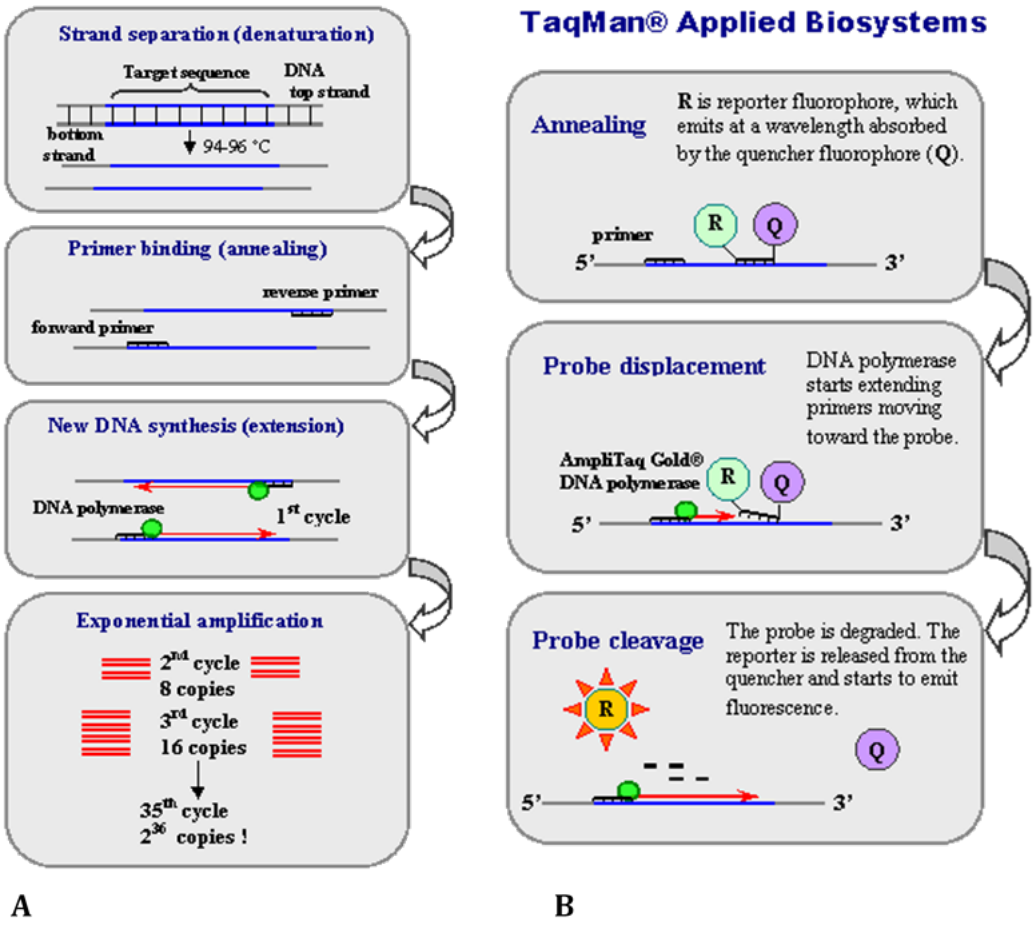

Abbildung 7: A zeigt den Ablauf der PCR. Die DNA-Polymerase kann komplemetäre DNA Stränge synthetisieren, benötigt jedoch einen Primer, um das erste Nucleotid an eine vorbestehende OH-Gruppe zu anzufügen. Somit kann eine spezifische und beliebige DNA Sequenz mittels einer Template Sequenz, welche die Zielsequenz enthält, ausgewählt und billionenfach amplifiziert werden Die am häufigsten verwendeten Polymerasen sind die sogenannten Taq-Polymerasen (Thermis aquaticus). Mittels der TaqMan-Assay, einer Methode zum Monitoring der real-time-quantitative PCR, wird die 5'-Endonukleaseaktiviät der Taq-Polymerase genutzt, da während der PCR eine Oligonucleotidsonde gespalten wird, wodurch ein detektierbares Signal erzeugt wird. Am einen Ende ist ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R, Donor-Fluorochrom) und am anderen ein Quencher (Q, Akzeptor-Fluorochrom) angebracht. Die Taq- Polymerase baut durch ihre 5'-3' Exonucleaseaktivität die Sonde am 5'- Ende ab. Andererseits wird der Gegenstrang synthetisiert. Reporter und Quencher entfernen sich nun voneinander. Die Fluoreszenzmessung erfolgt nach dem Förster- Resonanzenergietransfer (FRET); ('Polymerase Chain Reaction (PCR)', n.d.).

Eine relative Quantifizierung wurde mit Hilfe dreier House-keeping-Gene (Kontroll-/ Referenzgene) durchgeführt. Sie dienen der Aufrechterhaltung des Zellhaushaltes und stehen unter konstitutiver Exprimierung. Die hier verwendeten endogenen Kontrollen waren: ACTB, IPO8 und TBP (siehe Tab. 6). Die Primer der endogenen Kontrollen und HMGA2 warenTaqMan® Gene Expression Assays der Firma Life Technologies Inc. ®, USA. IPO und TBP zeigten sich als die am stabilsten exprimierte Gene in humanen Glioblastomzelllinien (Kreth *et al.*, 2010).

Tabelle 6: Übersicht der endogenen Kontrollgene und deren Funktion.

Gen	**Funktion**
Actin-beta (ACTB)	Zellmotilität, - struktur und – integrität Encodiert 6 verschiedene Actinproteine ubiquitär vorkommend
Importin 8 (IPO8)	Importin-alpha/beta Komplex GTPase Ran gesteuerter nukleärer Import von Proteinen
TATA Box binding Protein (TBP)	Initiierung der Transkription Modulation der DNA- Bindungsaktivität

2.5.1 RNA-Isolation

Die 44 Glioblastom- sowie 5 Kontrollpräparate waren in flüssigem Stickstoff asserviert. Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des Rneasy Lipid Tissue Mini Kit® der Firma Quiagen® (‘RNeasy Lipid Tissue Handbook - QIAGEN’, n.d.).

Die Gewebeproben wurden in kleine Stücke zwischen 30 und 100mg zugeschnitten. Nach Vermischung mit 1ml QIAzol Lysis Reagent und zwei Edelstahlkugeln erfolgte die mechanische Homogenisierung in der Mixer Mill MM301. Die QIAzol-Lösung besteht aus Phenol und Guanidinniumthiocyanat. Sie ermöglicht eine Denaturierung von Proteinen und inhibiert RNasen. Im Falle einer starken Schaumbildung wurde jeweils für eine Minute unter 2000 Umdrehungen ein Abzentrifugieren durchgeführt. Das Lysat wurde im Anschluss in eine 1,5ml messende Tube gefüllt und 5 Minuten bei Raumtemperatur abgestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 200µl Chloroform und das Schütteln der Probe für 15 Sekunden. Anschließend erneutes Ruhen bei Raumtemperatur für ca. 3

Minuten. Die erneute Zentrifugation erfolgte bei 4ºC und 11200 Umdrehungen für 15 Minuten. Es bildeten sich daraufhin 3 Phasen: 1) eine obere, wässrige, klare Phase, 2) eine DNA-haltige Interphase und 3) eine proteinhaltige, organische untere Phase. Phase 1) wurde mit ca. 400µl abpipettiert und in eine 1,5ml Tube gegeben. Nach Zugabe von ca. 400µl 70%em Ethanol wurde durch Vortexen die RNA ausgefällt und 700µl der Probe wurden in ein Rneasy Mini spin column (in 2ml collection Tube) überführt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 20ºC und 13000 Umdrehungen zentrifugiert, bis der entstandene Durchfluss entfernt werden konnte. Die in der spin column gelegenen Silikagel-Membran verbliebene RNA wurde mit 700µl Waschbuffer RW1 bei 13000 Umdrehungen für eine Minute zur Entfernung etwaiger Verunreinigungen zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die zweimalige Zentrifugation mit jeweils 500µl RPE Buffer für 1 Minute.

Um eventuelle Rückstände entfernen zu können, erfolgte eine nochmalige Zentrifugierung ohne Buffer. Zum Auswaschen (Eluieren) der RNA aus der Membran wurde die spin column in ein 1,5ml Tube gefüllt und nach Zugabe von 30-50µl RNase-freiem Wasser bei 10000 Umdrehungen für eine Minute zentrifugiert.

Die weiteren Bestimmungen bezüglich Konzentration und Reinheitsgrad der RNA erfolgten photometrisch am peqLab NanoDrop® 1000 Spectrophotometer aus einem 1µl Probenmaterial. Die optische Dichte (OD) wurde bei Wellenlängen von λ260nm, dem Bereich des Absorptionsmaximums für Nukleinsäuren, und λ280nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine, bestimmt. Der Reinheitsgrad der Probe wurde aus dem Quotienten OD260/ OD280 gemessen.

Die Konzentration der Proben sollte 1000ng/µl nicht überschreiten und wurde gegebenenfalls mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um keine zu kleinen Verdünnungen verwenden zu müssen. Die RNA wurde bei -80ºC gelagert.

2.5.2 Umschreiben der RNA in DNA

Die RNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Firma Quiagen®, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll am Mastercycler Gradient Thermal Cycler® (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in DNA umgeschrieben.

Die isolierte RNA wurde zu einem 14µl umfassenden Mix in einem Verhältnis von 2µl gDNA Wipeout Buffer, 1000 ng/µl RNA und variabel ergänztem RNase-freiem Wasser zusammengeführt. Es erfolgte die Zentrifugation der Proben für jeweils 2 Minuten und die anschließende Inkubation im Mastercykler bei 42ºC. Danach wurden diese auf Eis gelagert.

Mittels Reverse Transcriptase (RT) wird die RNA in DNA umgeschrieben.

Hierfür wurden die einzelnen Komponenten in einem Mix aus Reverse Transcriptase Mastermix 1µl, Reverse Transcriptase Buffer 4µl, Reverse Transcriptase Primer Mix 1µl und dem RNA Template 14µl für 20 Minuten bei 42ºC im Mastercykler als 20µl umfassende Probe inkubiert.

Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte das Einfrieren bei -20ºC.

2.5.3 Real-time-quantitative PCR- Messung

Auf leere 96-well-Platten (Firma Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde pro well ein 20µl Mix bestehend aus 10µl Gene Expression Mastermix, 8µl Nuclease- freies Wasser, Assay 1µl und 1µl DNA Template pipetiert. Zur Reinheitsgradkontrolle wurde eine “no-template-control”, also ein nicht befülltes well, in jedem Durchgang verwendet.

Weiter wurden der TaqMan® Gene Expression Mastermix, bestehend aus den für die PCR notwendigen Substraten Taq- Polymerase und Desoxyribonucleosidphosphaten, sowie die TaqMan® Gene Expression Assays für ACTB, IPO8, TBP und HMGA2 mit den jeweiligen Primern und Sonden, verwendet (siehe Tab. 7). Die 96-well-Platten wurden bei 500G für 5 Minuten zentrifugatiert. Anschließend wurde die PCR mit dem StepOne Real- Time PCR System- Cykler (Firma Applied Biosystems) ausgewertet.

Tabelle 7: TaqMan® Gene Expression Assays für ACTB, IPO8, TBP und HMGA2. Die jeweiligen Sets dienen dazu, eine Kontrolle und Messwertkorrektur zu ermöglichen.

Probe 1			**Probe 2**			**Probe 3**			**Probe 4**		
ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB
IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8	IPO8
TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP
HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2	HMGA2
No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template	No Template

2.5.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte anhand der durch die StepOne Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gemessenen Cykle-Treshold-Werte (CT-Werte). Hierbei wird der Anfang des exponentiellen Kurvenwachstums gemessen, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Die Fluoreszenz übersteigt diesen Schwellenwert umso schneller, je mehr Desoxyribonukleinsäure vor der PCR in den Proben vorlag und folglich mehr Kopien in den Polymerisierungszyklen entstanden sind.

Es wurden pro Gen und Probe jeweils drei CT-Werte ermittelt. Von diesen sollten mindestens zwei eine kleinere Abweichung als die Standardabweichung von 0,25 aufweisen. Bei einer höheren Abweichung erfolgte der Ausschluss dieser Werte aus der Berechnung. Bei Abweichungen in allen drei Werten erfolgt die Wiederholung der PCR.

Aus den gemessenen CT-Werten wurde ein mittlerer CT-Wert für die jeweiligen Messungen des HMGA2 ermittelt. Die drei endogenen Kontrollen wurden gemittelt und es wurde ein Durchschnittswert berechnet. Daraus konnte für alle drei endogenen Kontrollen ein CT-Mean-Wert je Probe bei der weiteren Berechnung benutzt werden. Mittels NormFinder Software (MOMA, Aarhus, Dänemark) konnte eine stabile Expression der endogenen Kontrollen nachgewiesen werden (‘NormFinder software’, n.d.).

Vom HMGA2-CT-Mean-Wert wurde jeweils der CT-Mean-Wert der endogenen Kontrolle abgezogen, um den ΔCT-Wert zu erhalten, der dann die unterschiedliche Expression als n-fache Expression angibt. Es wird der relative Zyklusunterschied zwischen HMGA2 und endogener Kontrolle der jeweiligen Probe beschrieben. Ein negativer ΔCT-Wert gibt an, dass zur Fluoreszenzmessung der endogenen Kontrolle im Vergleich zum Template mehre Zyklen notwendig waren. Je negativer der ΔCT-Wert ist, umso höher ist der Anteil der Template RNA im Vergleich zur RNA der endogenen Kontrolle.

Da die CT-Werte somit umgekehrt proportional zur Anzahl der Zielgen Nucleinsäuren sind, wurde die Exponentialfunktion gebildet: $2^{-\Delta CT}$= Expressionswert (siehe Tab. 8).

Je niedriger der ΔCT-Wert um so höher ist der Gehalt an Nucleinsäuren des Templates im jeweiligen Sample und um so höher der Expressionswert. Bei höherem ΔCT-Wert verhält es sich genau umgekehrt.

Tabelle 8: Formel zur Berechnung des ΔCT- Wertes und Expressionswertes.

Berechnung Expression
ΔCT- Wert= CT Mean Template- CT Mean endogene Kontrolle
Expressionswert= $2^{-\Delta CT}$

2.6 Immunhistochemie

Durch die Entwicklung und Weiterentwicklung immunhistochemischer Methoden wurde die Validität und Reliabilität der pathologischen Diagnosefindung in den letzten Jahrzehnten wesentlich verbessert.

Hierbei werden an Proteine gekoppelte Antikörper, die mit einem bestimmten Farbstoff versehen sind, genutzt, um immunhistochemisch Proteine in bestimmten Geweben und Zellkompartimenten nachzuweisen. Die Reaktion (Antigen-Antikörperkomplex Bildung) findet zwischen Antigenen und spezifischen monoklonalen oder poliklonalen Antikörpern statt.

Man unterscheidet dabei zwei Methoden (siehe Abb. 8). Bei der direkten Immunhistochemie sind die Markermoleküle direkt an den spezifischen Primärantikörper gebunden. Bei der indirekten Methode werden zusätzliche immunologische oder chemische Reaktionen in den Prozess zwischengeschaltet, um dann später ein Färbeergebnis zu erhalten.

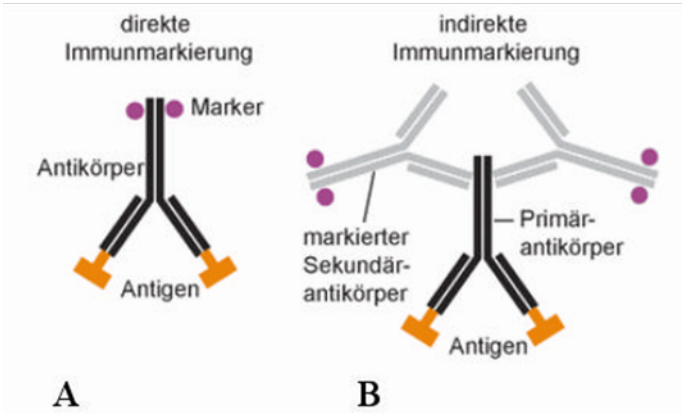

Abbildung 8: Schematische Darstellung der A) direkten und B) der indirekten Immunhistochemie (Mulisch, 2014).

2.6.1 Probenmaterialbereitung Immunhistochemie

Die Glioblastom- und Kontrollpräparate wurden mit einem Schlittenmikrotom (Firma Leica, Wetzlar, Deutschland, Modell SM2010R) zu jeweils 3 µm dicken Gewebeschnitten manuell zugeschnitten und jeweils nach dem Einlegen in ein Wasserbad (WB693, Vogel Medizintechnik, Fernwald, Deutschland) zur besseren Entfaltung auf einem Ob-

jektträger (Firma R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurden diese für die weitere Identifikation mit der bestehenden Seriennummer beschriftet.

2.6.2 Immunhistochemische Analyse mittels BenchMark XT IHC Färbemodul

Die komplette immunhistochemische Analyse erfolgte mittels Ventana BenchMark XT IHC Färbemodul (Roche, Basel, Schweiz) am Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierfür wurde ein spezielles Färbeprotokoll erstellt und verwendet (Protokollnummer 882).

Die 44 histologischen, in Paraffin fixierter Form vorliegenden Schnitte sowie die 5 pathologisch unauffälligen Kontrollschnitte wurden in das Färbemodul nach Herstellervorgaben eingelegt, um den Prozess streng nach dem Färbeprotokoll starten zu können.

Als Positivkontrolle diente ein Gewebeschnitt einer Kleinhirnmetastase eines Mammakarzinoms, als Negativkontrolle derselbige mit Verdünnungsmedium ohne Zugabe des HMGA2-Antikörpers.

Der verwendete HMGA2-Antikörper (Firma Abcam, Cambridge, UK, Bestellnummer ab52039) wurde nach der Austestung mehrerer Verdünnungsreihen in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt, um eine ausreichend intensive Färbung zu erhalten (siehe Tab. 4).

Der Antikörper wurde in 4ºC geliefert und konnte anschließend bei bis zu -20ºC eingelagert werden. Nach dem einmaligen Auftauen musste dieser sofort verwendet werden.

Die wesentlichen Schritte der Immunhistochemie bestanden aus der initialen Entparaffinierung der Schnitte und Hitzvorbehandlung. Anschließend wurde das Cell Conditioning 1 (CC1) als weitere Vorbehandlung der Schnitte gestartet (30 Min). Danach wurde der HMGA2-Antikörper (Firma Abcam, Bestellnummer ab52039) aufgetragen und für 60 Min inkubiert. Weitere Schritte waren die Verstärkung der Färbung sowie die Gegenfärbung mit Hämotoxylin und das Auftragen der Liquid-Coverslip-Technology (LCS) für 8 Minuten. Abschließend wurde eine Nachgegenfärbung und das Auftragen von Bluing Reagent und LCS für wiederrum 8 Minuten durchgeführt.

Ein Großteil der Schritte ist von der Firma Roche patentiert und somit dem Anwender nicht zugänglich.

2.6.3 Auswertung Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte am binokularen Mikroskop Leica DMLB (Leica, Wetzlar, Deutschland). Der abphotographierte Bereich wurde mit Hilfe eines eingeblendeten Rechtecks mehrfach unterteilt, um die Zählung zu erleichtern. Es erfolgte initial die komplette Begutachtung der korrespondierenden Hämatoxylinfärbungen, um anschließend eine repräsentative, tumorreiche Stelle (region of interest) im HMGA2-Schnitt in 200-facher und 400-facher Vergrößerung abphotographieren zu können. Dabei wurde die Vergrößerung ohne Verschieben des Präparates am Mikroskop verstellt, um beim folgenden Vergleich der ausgezählten Zellen eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Die Schnitte zeigten eine unterschiedliche Qualität. Stellen mit Schnittartefakten, ausgeprägten Tumorblutungen, Nekrosen sowie stark vaskularisierten Regionen wurden soweit möglich zur Auswertung ausgeschlossen. Im Falle schwächerer Färbungen oder durch Überbelichtung überlagerter Regionen im Bild erfolgte eine Bildanpassung mittels Kontrast- und/ oder Farb- sowie Helligkeitsanpassung in iPhoto (Firma Apple Inc., Cupertino, USA).

Die Auswertung jedes einzelnen Schnittes bestand aus zwei Schritten (siehe Abb. 9):

1.) Beurteilung der Farbintensität mit 0= keine Färbung, 1= schwache Färbeintensität, 2= mäßige Färbeintensität und 3= starke Färbeintensität.

2.) Auszählen aller gefärbten Zellen sowie der nicht gefärbten Zellen im Tumorbereich der repräsentativen Stelle. Daraus wurde im Anschluss der Anteil gefärbter Zellen in Prozent aller Zellen berechnet. Der Expressionswert wurde durch das Produkt aus Färbeintensität (Wert 0-3) und dem zugeordnetem Gesamtzellzahlwert der Färbung (-10%= 1, >10%-20%=2, etc.) errechnet.

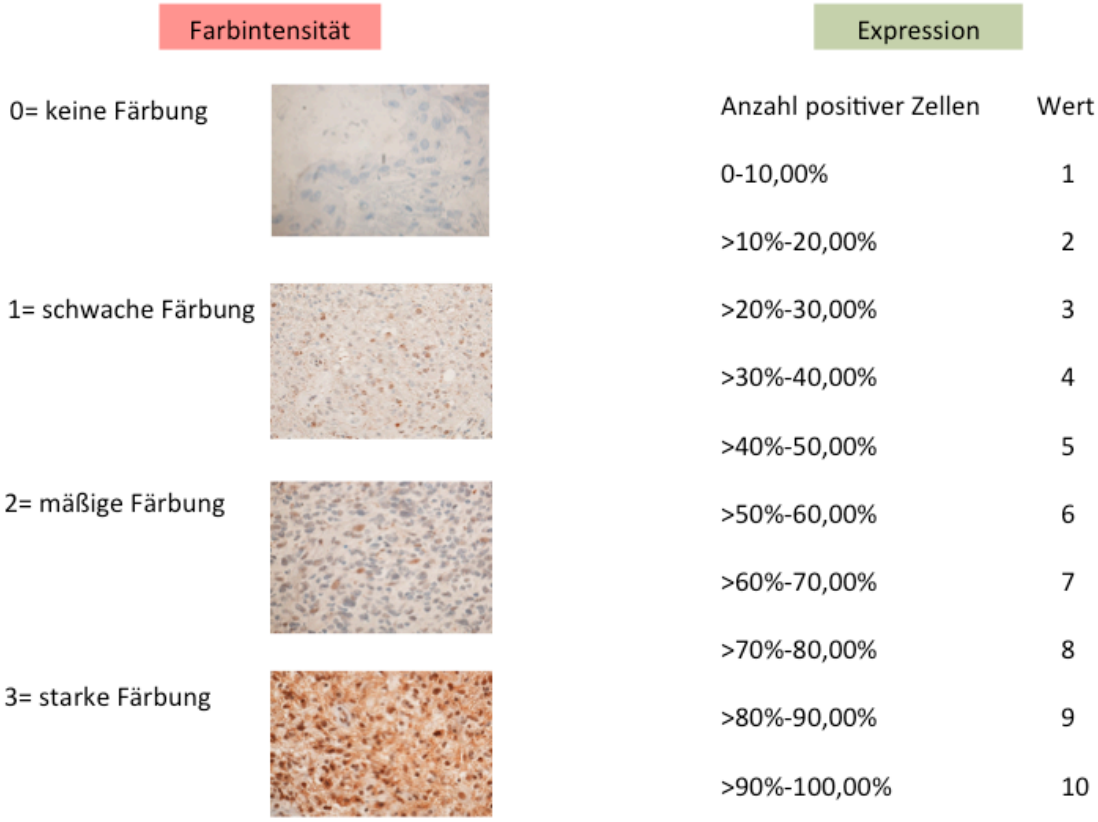

Abbildung 9: Links ist die jeweilige Färbeintensität der Präparate dargestellt. Diese wird in keine, schwache, mäßige und starke Färbung unterteilt (Wert 0-3). Die auf dem Bild ausgezählten positiv gefärbten Zellen werden prozentual zu den nicht-gefärbten Zellen im repräsentativen Bereich gesehen. Es ergibt sich je nach Prozentsatz ein Faktor zwischen 1 und 10. Der Expressionswert wird durch das Produkt aus Färbeintensität (Wert 0-3) und dem zugeordnetem Gesamtzellzahlwert der Färbung (-10%= 1, >10%-20%=2, etc.) errechnet.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (IBM® Software, Armonk, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA) sowie Microsoft Excel 2011 (Micorsoft Corporation, Redmond, USA).

Folgende statistische Auswertungen erfolgten mittels Verwendung des Mann-Whitney U Tests: Genexpressionslevel bei MGMT-methylierten versus nicht-methylierten Patienten, Genexpressionslevel zwischen den einzelnen Patientengruppen aus qPCR- und immunohistochemischen Daten. Die Beziehung zwischen HMGA2-Expression, progressionsfreiem- und Gesamtüberleben wurden mit der Kaplan-Meier-Methode und dem log-rank-Test analysiert. Die Überlebensanalyse erfolgte durch Einteilung der Patienten in Gruppen mit niederiger versus hoher HMGA2-Expression. Unter einer geringen Expression wurden Genexpressionswerte von gleicher oder niedrigerer Expression in Bezug auf den Mittelwert gesehen. Werte darüber wurden als hohe Expression gesehen. Ebenso wurde zur weiteren Analyse des Einflusses der HMGA2-Expression eine Multi-Varianzanalyse (MANOVA) stratifiziert nach Alter, HMGA2-Genexpression auf mRNA- und Protein-Ebene, MGMT-Methylierungsstatus sowie progressionsfreiem- (PFS) und Gesamtüberleben (OS).

P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 44 komplett resezierten Glioblastom Patienten. Darunter waren 40 primäre und 4 sekundäre Glioblastome. Die Studienpopulation bestand aus 13 weiblichen und 31 männlichen Patienten mit einem mittleren Alter von 57,4 ± 15,7 Jahren. Das mediane Gesamtüberleben der gesamten Kohorte betrug 16 Monate (SE 2,8; 95% CI 10,6-21,4). MGMT-methylierte Patienten (n=24) hatten ein medianes Gesamtüberleben von 22 Monaten (SE: 3,7; 95% CI: 14,8 – 29,2), nicht-methylierte Patienten (n=18) von 11 Monaten (SE: 2,2; 95% CI: 6,7 – 15,3). Bei 2 Patienten wurde vor der Operation eine neoadjuvante Therapie durchgeführt (Details siehe Tab. 9). Der IDH1-Status wurde bei 15 Patienten bestimmt (IDH1-Wildtyp: n=14, IDH1-Punktmutation: n=1). Fünf Präparate von Normalhirnen wurden als Referenz für tumorfreies Kontrollgewebe verwendet. Eine Kleinhirnmetastase eines Mammakarzinoms diente als Positivkontrolle (siehe Abb. 12). Tabelle 9 zeigt eine Zusammenfassung der Patientencharakteristika.

Tabelle 9: Patientencharakteristika

			N	%
FALLZAHL			44	100
ALTER BEI DIAGNOSE	Jahre	57.4± 15.7		
GESCHLECHT	männlich		31	70.5
	weiblich		13	29.5
TUMORART	Glioblastom		44	100
		primär	40	90.9
		sekundär	4	9.1
METHYLIERUNGSSTATUS	MGMT	hypermethyliert	24	54.5
		nicht hypermethyliert	19	43.2
		Keine Angabe	1	2.3
NEOADJUVANTE BEHANDLUNG VOR DER ERSTEN OP	Chemotherapie	Temozolomid	2	4.5
	Radiatio	60 Gy	3	6.8
INITIAL	Resektion		41	93.2
	Fehlende Angaben		3	6.8
ADJUVANTE BEHANDLUNG NACH INITIALER RESEKTION	Chemotherapie	Insgesamt behandelt in Gruppe	37	100
		Temozolomid	37	100
	Radiatio	Insgesamt behandelt in Gruppe	38	100
		60 Gy konkomitant	36	94.7
		60 Gy stereotaktisch	2	5.3
ERSTES REZIDIV	Insgesamt betroffene Patienten		24	54.5

3.2 MGMT-Expression

Bei 43 Glioblastompatienten wurde der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus bestimmt.

Die MGMT-Methylierung zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. MGMT-methylierte Patienten überlebten im Median 22 Monate (SE: 3,7; 95% CI: 14,8- 29,2). Im Vergleich hierzu betrug das mediane Gesamtüberleben bei nicht-methylierten Patienten 11 Monate (SE: 2,2; 95% CI: 6,7- 15,3); (p=0,001).

Ebenso war das progressionsfreie Überleben nach operativer Komplettresektion und adjuvanter Radiochemotherapie (Temozolomid und 60 Gy Strahlentherapie) signifikant vom MGMT-Methylierungsstatus abhängig. Methylierte Patienten hatten ein medianes PFS von 14 Monaten (SE: 3,2; 95% CI: 7,7- 20,3). Bei den nicht-methylierten Patienten betrug das PFS 5 Monate (SE: 2,8; 95% CI: 0,0- 10,5); (p=0,007) (Abb. 10).

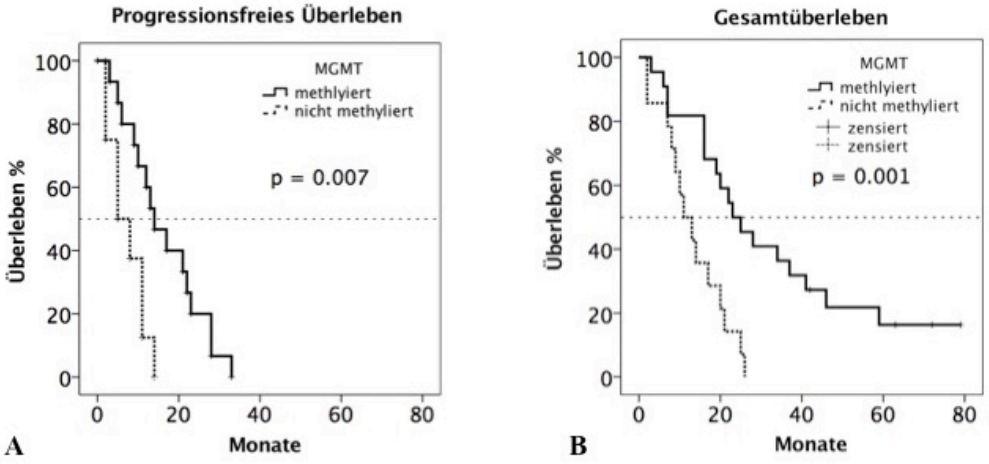

Abbildung 10: Progressionsfreies und Gesamtüberleben von methylierten und nichtmethylierten Patienten. Sowohl das PFS (A) als auch das OS (B) sind bei positiv methylierten Patienten signifikant verlängert.

3.3 IDH1-Expression

Es lagen 14 Präparate einer Wildtypvariante und 1 Präparat mit IDH1-Mutation vor. Aufgrund dieser geringen Anzahl waren eine statistische Auswertung und Untersuchung nach IDH1-Expressionsgrad in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und

Gesamtüberleben sowie eine Korrelation mit der HMGA2-Expression in Glioblastomen nicht möglich.

3.4 HMGA2-Expression in Glioblastomen und normalem Hirngewebe in der qRT-PCR Analyse

Vierzig Glioblastompräparate und 5 gesunde Hirngewebepräparate wurden mittels qRT-PCR-Analyse bezüglich der HMGA2-Expression untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante (p=0,001) Überexpression von HMGA2 in Glioblastomen (MW: 0,35; SD: 0,27) im Vergleich zum normalen Hirngewebe (MW: 0,03; SD: 0,05); (Abb. 11 und 12).

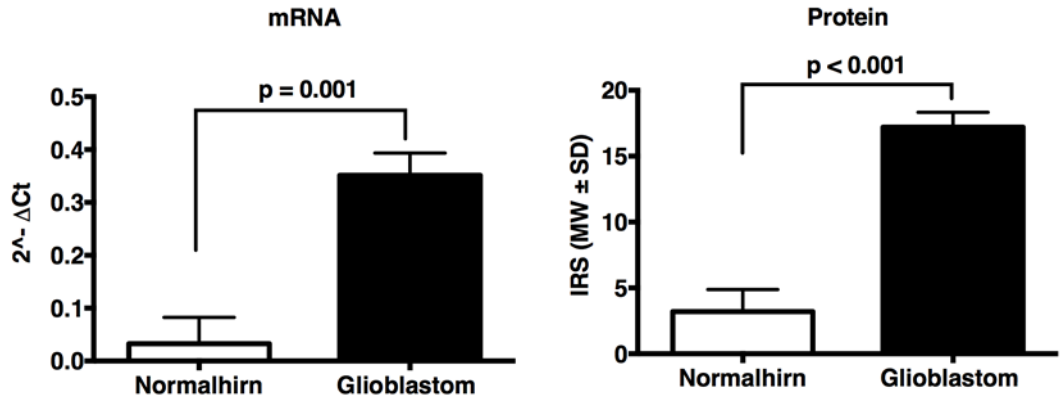

Abbildung 11: HMGA2 Expression im normalen Hirngewebe und Glioblastom. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigte sich eine signifikante Überexpression von HMGA2 in Glioblastomen im Vergleich zum normalen Hirngewebe (p<0,05).

3.5 HMGA2-Expression in Glioblastomen und normalem Hirngewebe in der immunhistochemischen Analyse

Vierundvierzig Glioblastompräparate und 5 gesunde Hirngewebepräparate wurden mittels immunhistochemischer Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, ähnlich wie in qRT-PCR, eine deutlich vermehrte HMGA2-Expression in Glioblastomen (siehe Abb. 11 und 12). Die IRS-Werte betrugen im Mittel 17,21 +/- 7,43 bei Glioblastomen im Vergleich zu 3,20 +/- 7,43 im normalen Hirngewebe. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p<0,001).

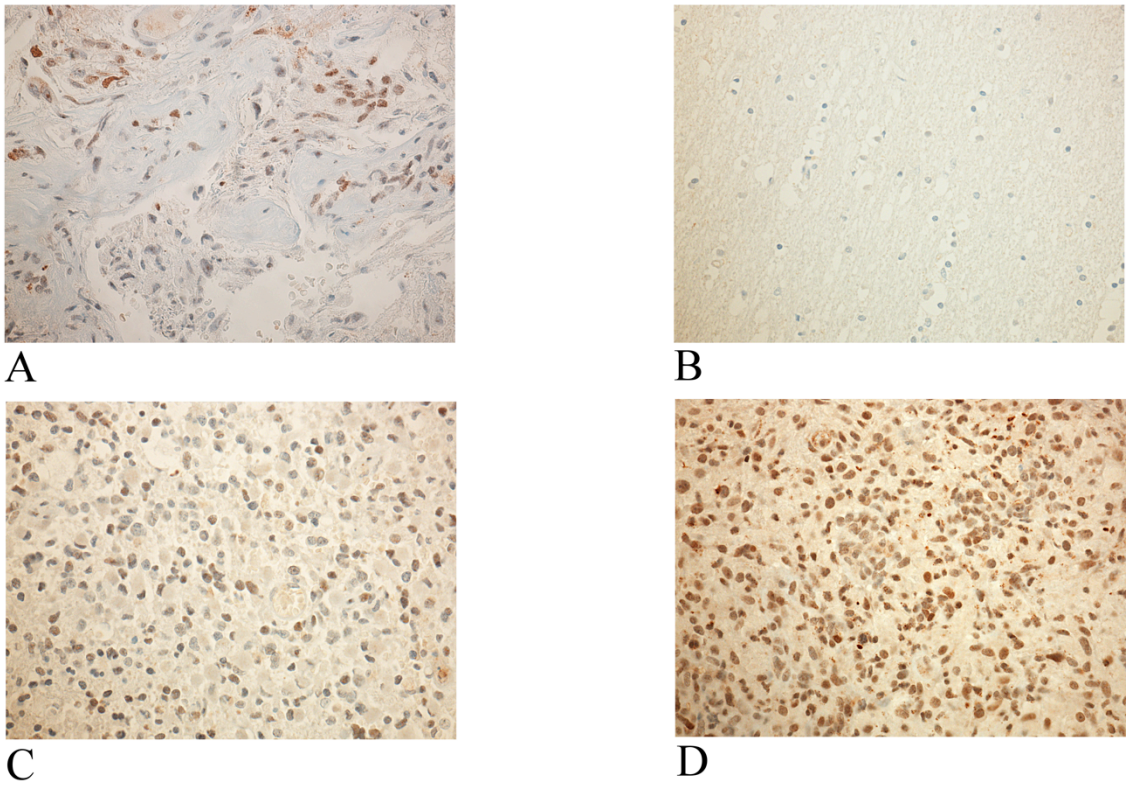

Abbildung 12: Immunhistochemie: A) HMGA2 Positivkontrolle einer Kleinhirnmetasase eines Mammakarzinoms, B) normales Hirngewebe ohne relevante Färbung, C) mittelgradige Färbung eines Glioblastomschnittes, D) starke Färbung eines Glioblastomschnittes.

3.6 HMGA2-Expression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus: Vergleich qRT-PCR und Immunhistochemie

In der qRT-PCR- und Immunhistochemieanalyse der HMGA2-Expression in Glioblastomen abhängig vom MGMT-Methylierungsstatus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p=0,87). Auf der mRNA Ebene ergab sich eine gering erhöhte Expression von HMGA2 bei nicht-methylierten Patienten, die aber statistisch nicht signifikant war (p=0,09, Abb. 13).

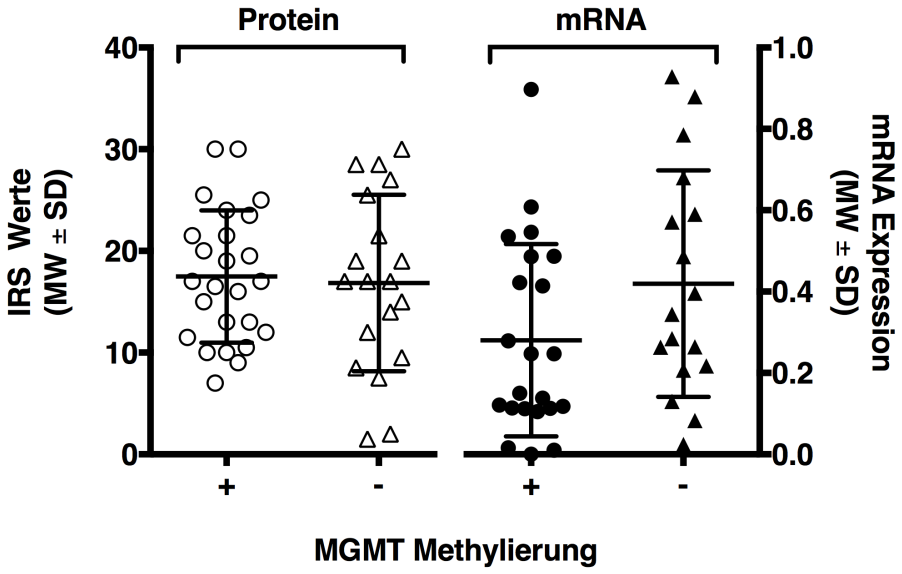

Abbildung 13: HMGA2-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Auf mRNA-Ebene findet sich eine geringradig erhöhte Expression von HMGA2 bei nicht-methylierten Patienten (n.s.).

3.7 Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungs status und der HMGA2-Expression auf der mRNA- und Proteinebene

Nach operativer Tumorresektion und adjuvanter Radiochemotherapie mit Temozolomid und 60 Gy Bestrahlung zeigten Patienten in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus bei einer vermehrten HMGA2-Expression ein kürzeres progressionsfreies Überleben. Auf mRNA-Ebene (Abb. 14 C und D) war bei 8 methylierten, primären Glioblastompatienten mit hoher HMGA2-Expression das mediane progressionsfreie Überleben 10 Monate (SE: 2,1; 95% CI: 5,8-14,2), bei 7 methylierten, primären Glioblastompatienten mit niedriger HMGA2-Expression das mediane progressionsfreie Überleben 21 Monate (SE: 5,2; 95% CI: 10,7-31,3); (p=0,14).

Die Überexpression von HMGA2 zeigte somit eine Tendenz zu einem kürzeren progressionsfreien Überleben.

Drei nicht-methylierte, primäre Glioblastompatienten mit hoher HMGA2-Expression zeigten ein medianes progressionfreies Überleben von 8 Monaten (SE: 2,4; 95% CI:

3,2- 12,8), 5 nicht-methylierte, primäre Glioblastompatienten mit niedriger HMGA2-Expression ein medianes progressionfreies Überleben von 5 Monaten (SE: 3,3; 95% CI: 0,0- 11,4); (p=0,90).

In der immunhistochemischen Analyse auf Proteinebene zeigten sich ähnliche Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede (Abb. 14 A und B).

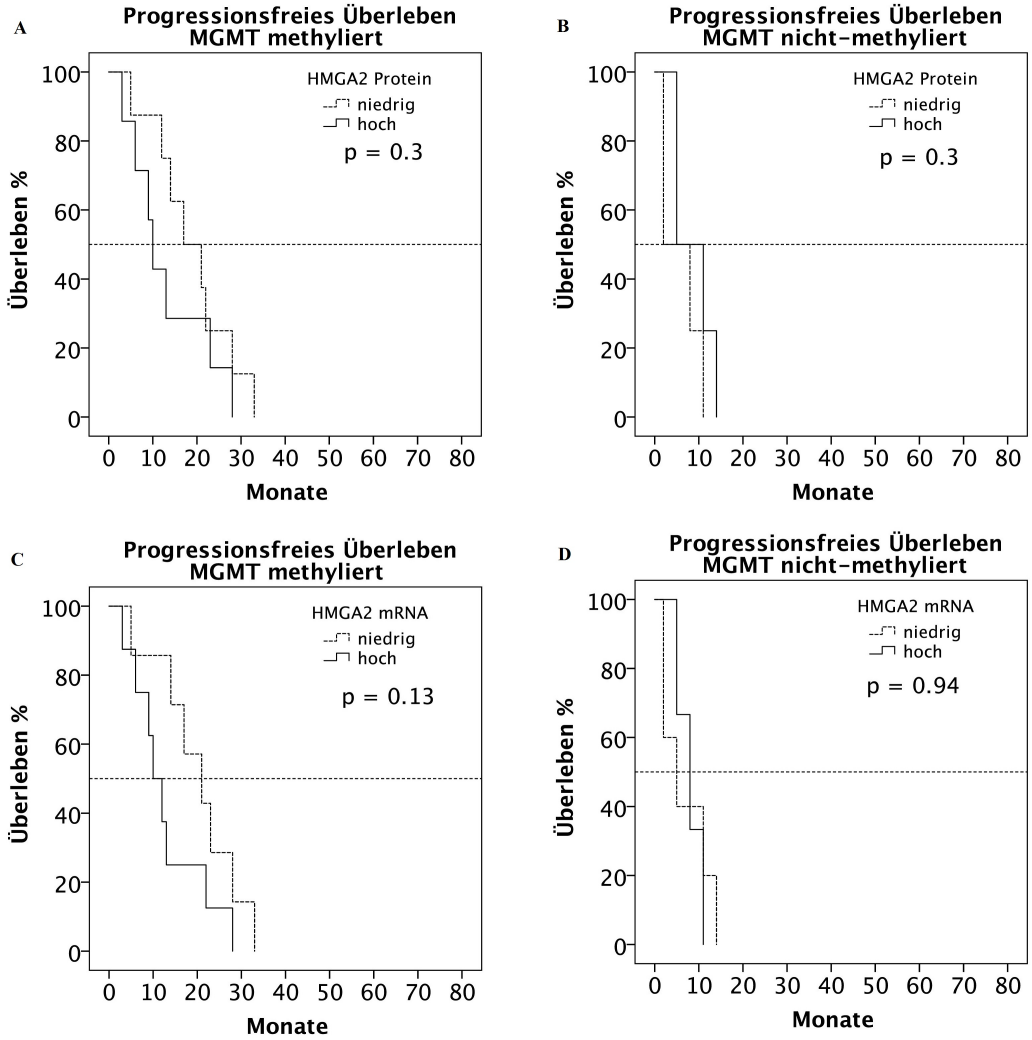

Abbildung 14: PFS der Glioblastompatienten in Monaten nach chirurgischer Therapie. Die Stratifizierung erfolgte in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. PFS nach HMGA2-Expression auf Protein- (A,B) und mRNA-Ebene (C,D) bei methylierten (A,C) und nicht-methylierten (B,D) Patienten. Bei einer erhöhten HMGA2-Expression zeigt sich sowohl auf Protein als auch mRNA-Ebene sowie unabhängig vom Promotormethylierungsstatus eine Tendenz zu einem verkürzten PFS.

3.8 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus und der HMGA2-Expression auf der mRNA- und Proteinebene

Nach operativer Tumorresektion und adjuvanter Radiochemotherapie mit Temozolomid und 60 Gy Bestrahlung zeigten Patienten in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus bei einer vermehrten HMGA2-Expression ein kürzeres Gesamtüberleben.

Auf mRNA-Ebene (Abb. 15 C und D) war bei 9 methylierten, primären Glioblastom-patienten mit hoher HMGA2-Expression das mediane Gesamtüberleben 20 Monate (SE: 6,0; 95% CI: 8,3-31,7), bei 12 methylierten, primären Glioblastompatienten mit niedriger HMGA2-Expression das mediane Gesamtüberleben 28 Monate (SE: 9,5; 95% CI: 9,3-46,7); (p=0,38). Die Überexpression von HMGA2 zeigte eine Tendenz zu einem kürzeren medianen Gesamtüberleben.

Acht nicht-methylierte, primäre Glioblastompatienten mit hoher HMGA2-Expression zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 11 Monaten (SE: 2,1; 95% CI: 6,8- 15,2), 6 nicht-methylierte, primäre Glioblastompatienten mit niedriger HMGA2-Expression ein medianes Gesamtüberleben von 8 Monaten (SE: 5,5; 95% CI: 0,0- 20,8); (p=0,52).

In der immunhistochemischen Analyse auf Proteinebene zeigten sich ähnliche Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede (Abb. 15 A und B).

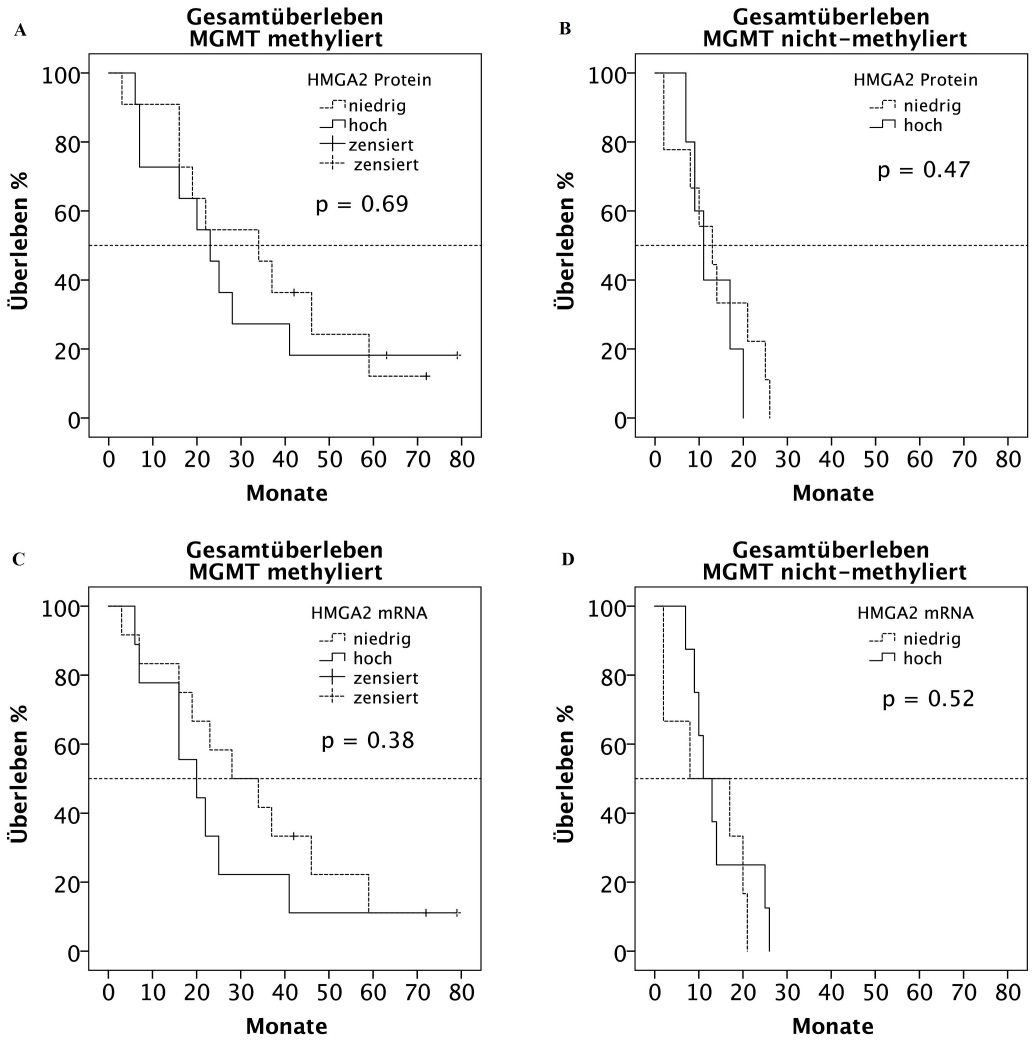

Abbildung 15: OS der Glioblastompatienten in Monaten nach chirurgischer Therapie. Die Stratifizierung erfolgte in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. OS nach HMGA2-Expression auf Protein- (A,B) und mRNA-Ebene (C,D) bei methylierten (A,C) und nicht-methylierten (B,D) Patienten. Bei einer erhöhten HMGA2-Expression zeigt sich sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene sowie unabhängig vom Promotormethylierungsstatus eine Tendenz zu einem verkürzten OS.

3.9 Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse (MANOVA) zeigten sich bis auf die erhöhte Expression von HMGA2 im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Hirngewebe keine signifikanten Unterschiede ($p>0.05$).

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Als potenzielle Limitierungen der vorliegenden Arbeit können der retrospektive Charakter sowie die kleinen und heterogenen Kohorten mit einem möglichen Selektionsbias angesehen werden. Es wurde als Pilotstudie ein kleines Kollektiv von Glioblastompatienten untersucht, jedoch sind bisherige vergleichbare Studien ebenfalls nur mit kleinen Patientengruppen durchgeführt worden. Bei den hier verwendeten Glioblastompräparaten ist es nicht möglich, zwischen zentralem Bereich oder Tumorrand zu unterscheiden. Dies kann eventuell zu einer unterschiedlichen HMGA2-Expression aufgrund einer Hypoxie im zentralen Bereich führen. Weiter wurde in der Glioblastomdiagnostik vor 2009 standardmäßig keine Mutationen im Gen der Isozitratdehydrogenase-1 untersucht. Somit konnte über eine eventuelle Verbindung zwischen IDH1-Mutationen und der HMGA2-Expression keine Aussage getroffen werden. Für zukünftige Untersuchungen wäre dies ein interessanter Gesichtspunkt.

Die qPCR wurde mit in flüssigem Stickstoff asservierten Kryopräparaten von Glioblastomen und normalem Hirngewebe durchgeführt. Vom Schritt der Probengewinnung, dem Transport, der Lagerung und der weiteren Verarbeitung der einzelnen Proben sowie der Durchführung der qPCR, kann es zu mehreren methodischen und systematischen Fehlern kommen. Durch die Verwendung von House-keeping-Genen (Kontroll-/Referenzgenen) wird versucht, die methodische Fehlerrate zu minimieren. Diese sind konstant in allen Proben exprimierte Gene und dienen als Referenz, da die RNA in gleicher Kopienzahl in den Zellen vorliegt (Bustin, 2000; Livak and Schmittgen, 2001; Hugget *et al.,* 2005; Kreth *et al.,* 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung mit Hilfe der House-keeping-Gene ACTB, IPO8 und TBT durchgeführt. Die Primer der endogenen Kontrollen sowie des HMGA2 waren TaqMan® Gene Expression Assays der Firma Life Technologies Inc. ®, USA. In humanen Glioblastomzelllinien zeigten sich IPO und TBP als die am stabilsten exprimierten Gene (Kreth *et al.*, 2010). Mittels NormFinder Software konnte eine stabile Expression der endogenen Kontrollen nachgewiesen werden (‘NormFinder software’, n.d.). Die HMGA2-Expression wurde gegenüber der House-keeping-Gene sowie der Expression im normalen Hirngewebe und in Glioblastomen

berechnet. Durch Ermittlung dreier CT-Werte pro Gen und Probe, von welchen mindestens zwei eine kleinere Abweichung als die Standardabweichung von 0,25 aufweisen sollten, wurde versucht, stabile Werte zu erhalten und bei einer höheren Abweichung diese Werte aus der Berechnung auszuschließen. Bei Abweichungen in allen drei Werten erfolgte die Wiederholung der PCR. Dennoch können hierbei Abweichungen bestehen. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels Normalisierung der HMGA2-Expressionsergebnisse anhand der House-keeping-Gene (Livak and Schmittgen, 2001). Mittels ΔCT-Wert wird der relative Zyklusunterschied zwischen HMGA2 und endogener Kontrolle der jeweiligen Probe beschrieben. Je negativer der ΔCT-Wert ist, umso höher ist der Anteil der Template RNA im Vergleich zur RNA der endogenen Kontrolle. Mittels Exponentialfunktion wurde der Expressionswert angegeben, da die CT-Werte umgekehrt proportional zur Anzahl der Zielgen Nucleinsäuren sind. Bei den einzelnen Schritten kann es zu Rechen- und Übertragungsfehlern kommen.

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Interpretation der Ergebnisse ist, dass die mRNA-Expression nicht der immunhistochemisch gemessenen Proteinexpression entsprechen muss, da es sich um zwei unterschiedliche Methoden handelt. Die mRNA-Expression wurde hier mittels qPCR, einem molekularbiologischen Verfahren zur DNA-Analyse ermittelt. Die Proteinexpression anhand der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft während des immunhistochemischen Prozesses. Die immunhistochemische Auswertung ist durch die Eigenschaften des jeweiligen Antikörpers beeinflusst. Weiter durch die Qualität der Schnitte und die Erfahrung, beziehungsweise subjektive Einschätzung des Untersuchers selbst. Die qPCR dagegen stellt eine sensitvere Methode mit einer geringeren intra- und interoberserver-Variabilität dar (Noske *et al.*, 2011; Sinn *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine moderate Korrelation nachgewiesen werden (kappa Wert 0,53). Durch speziell gewählte Antikörper wird durch immunhistochemische Verfahren die Untersuchung der Intensität und Häufigkeit von Oberflächenmolekülen an Tumorgeweben histopathologisch routinemäßig durchgeführt. Der hier verwendete Antikörper der Firma Abcam wurde nach Austestung mehrerer Verdünnungsreihen in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt, um eine ausreichend intensive Färbung zu erhalten. Der Hersteller bietet kein standardisiertes Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von HMGA2 bei Hirntumoren. Dies musste hier erarbeitet werden. Somit waren mehrere Versuche notwendig, um eine adäquate Färbung zu erreichen. Durch

die Erstellung eines Färbeprotokolls wurde gewährleistet, dass alle zu untersuchenden Schnitte auf die gleiche Art und Weise gefärbt wurden und somit vergleichbar ausgewertet werden konnten. Mögliche Fehlerquellen bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte waren eine falsche Auswahl der repräsentativen Stelle im jeweiligen Schnitt, ein erschwertes Auszählen durch Zellhäufungen sowie Artefakte durch Schnittungenauigkeiten oder stark ausgeprägte Nekrosen im Tumorgewebe. Weiter ist das Auswertungsverfahren der immunhistochemischen Schnitte subjektiv.

4.2 Ergebnisse

Der aktuelle Therapiestandard in der Glioblastomtherapie besteht aus der mikrochirurgischen, makroskopischen Komplettresektion des Tumors, soweit dies möglich ist, ohne neurologische Ausfallserscheinungen zu erzeugen. Anschließend folgen die konkomitante Radiochemotherapie mit Temozolomid sowie eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid. Der seit mehreren Jahren bestehende Therapiestandard mit Temozolomid verbesserte das mediane Gesamtüberleben nur marginal von 12 auf 14.6 Monate. Das 5-Jahres Überleben liegt bei <10% (Buckner, 2003; Stupp *et al.*, 2005). Trotz ständiger Forschung auf diesem neuroonkologischen Gebiet und des bereits aggressiven Behandelns von Glioblastomen ist die Gesamtprognose weiterhin schlecht. Eine Tumorkomplettresektion ist aufgrund des invasiven Wachstumsmusters und einer für den Neurochirurgen fehlenden, sichtbaren Tumorgrenze nicht möglich (Scherer, 1940; Weller *et al.*, 2003). In den letzten Jahrzehnten kam es zu zahlreichen Fortschritten in der Bildgebung und verschiedener Behandlungsmethoden von Glioblastomen (Cha, 2006; Belden *et al.*, 2011; Agnihotri *et al.*, 2014; Aum *et al.*, 2014; Bangiyev *et al.*, 2014; Barbagallo *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2014; Sundar *et al.*, 2014). Diese Entwicklungen führten insgesamt zu einem besseren Verständnis und verbesserten Therapiekonzepten dieses Krankheitsbildes. Die aktuelle Einteilung von Glioblastomen erfolgt offiziell nach dem WHO-Schema, in welchem das Glioblastom einen Grad IV Tumor und damit den höchsten Malignitätsgrad darstellt (Louis *et al.*, 2016). In der 2016 aktualisierten Version des WHO-Schemas fließen molekulare und immunhistochemische Parameter zur besseren Differenzierung in die Klassifizierung mit ein. Es wird nun zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-mutierten Glioblastomen unterschieden. Hierbei lässt sich dann zwischen de novo (IDH1-Wildtyp) und sekundärem Glioblastom (mutiertes IDH1) auf Grundlage eines anaplastischen oder diffusen Astrozytoms unterscheiden (Louis *et*

al., 2016). Aus der akutualisierten WHO-Klassifikation glialer Tumore wird ersichtlich, dass zunehmend die histologische Einteilung durch immunohistochemische und molekulargenetische Gewebeuntersuchungen ergänzt wird, weshalb die Untersuchung neuer molkularer Marker und die Überprüfung der klinischen Relevanz einen elementaren Bestandteil in der Glioblastomforschung darstellt.

Die alleinige histopathologische Beurteilung von Tumoren hat wie bereits erwähnt Limitationen und wird zunehmend durch immunohistochemische und molekulargenetische Gewebeuntersuchungen ergänzt und standardisiert (Sturm *et al.*, 2012; Sahm *et al.*, 2014; Wiestler *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2016). Ein weiterer wichtiger Ansatz wurde durch *Verhaak et al.* mit der Einteilung von Glioblastomen in die Subtypen „klassisch", „mesenchymal", „proneural" und „neural" erreicht. Diese molekulare Klassifikation beruht auf einer retrospektiven genetischen Analyse und macht wiederrum deutlich, dass Glioblastome ein sehr heterogenes Bild aufweisen und vor allem auf molekularer Ebene sehr unterschiedlich aufgebaut sein können, obwohl es sich von der Benennung „Glioblastom" um den gleichen Tumor handelt (Verhaak *et al.*, 2010). Ein weiter individualisiertes Therapiekonzept wäre somit ein künftig notwendiger Schritt, um betroffenen Patienten gezielter und effektiver helfen zu können. Ziele dieser neuen Unterteilungen sind dabei insbesondere eine bessere Unterscheidung glialer Tumore, um „Target orientierte" Modulationen gezielt auszuführen, um das Tumorwachstum zu verlangsamen oder sogar komplett zu verhindern. Weiter können für die Prognose entscheidende Informationen erhalten werden. Diese neuen Aspekte wären vor allem bei Glioblastomen, die histopathologisch ein ähnliches Erscheinungsbild haben, äußerst von Vorteil. Ein weiterer Vorteil wäre die Reduktion der Interoberservervariabilität in der histopathologischen Auswertung der Tumore (Weller *et al.*, 2012).

Die vorliegende Arbeit zielt mit der Untersuchung der HMGA2-Expression in Glioblastomen darauf ab, weitere prognostische und therapierelevante Informationen zu erhalten, um die Therapie weiter individualisieren zu können.

In der heute gängigen Glioblastomdiagnostik gehört der MGMT-Methylierungsstatus zum wichtigsten Prognoseparameter in der klinischen Routinediagnostik und soll daher in jeder Glioblastomstudie als Stratifizierungsfaktor angewandt werden (Hegi *et al.*, 2005; Weller *et al.*, 2013). *Stupp et al.* konnten die Überlegenheit einer konkomitanten Strahlentherapie mit Temozolomid gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie nach-

weisen. Hierbei war das 2 Jahres Überleben signifikant verlängert (26.5% versus 10.4%) (Stupp *et al.*, 2009; Quick *et al.*, 2010). Die Hypermethylierung der Promotorregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens führt zu einem verbesserten Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid. Der MGMT-Methylierungsstatus stellt somit den wichtigsten prognostischen und für die Therapiewahl relevanten Faktor dar (Hegi *et al.*, 2005). Das mediane PFS war 6,9 Monate (95% CI 5,8- 8,2), das mediane Gesamtüberleben der Patienten beträgt 14,6 Monate (95% CI 13,2- 16,8) mit einer konkomitanten Strahlentherapie mit Temozolomid (Stupp *et al.*, 2005). Bei positiv methylierten Patienten, welche eine Komplettresektion des Tumors erhielten und anschließend konkomitant behandelt wurden, zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 23,4 Monaten (95% CI 18,6- 32,8). Nicht-methylierte Patienten zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 12,6 Monaten (95% CI 11,6- 16,4) (Stupp *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit den aktuellen Literaturdaten übereinstimmend, bei positivem MGMT-Promotor-Methylierungsstatus ein längeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben nachgewiesenen werden. Es zeigte sich bei MGMT-Promotor methylierten Patienten ein medianes PFS von 14 Monaten, bei nicht-methylierten Patienten ein medianes PFS von 5 Monaten. Das mediane OS betrug bei MGMT-Promotor methylierten Patienten 22 Monate, bei nicht-methylierten Patienten 11 Monate.

Mutationen im Gen der Isozitratdehydrogenase-1 (IDH1) finden sich bei ca. 12% der Glioblastome und hierbei vor allem bei sekundären Glioblastomen (80%). Patienten mit einer IDH1-Mutation zeigen ein verbessertes Outcome im Vergleich zum Wildtyp (Parsons *et al.*, 2008). *Song-Tao et al.* konnten bei der Untersuchung sekundärer Glioblastome zeigen, dass eine Mutation der IDH1, eine 1p/19q Co-Deletion und ein positiver MGMT-Methylierungsstatus mit einem längeren progressionfreien Überleben einhergehen. Weiter zeigten positiv methylierte Patienten mit einer IDH1-Mutation ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie mit Temozolomid (SongTao *et al.*, 2012). Nach *Hartmann et al.* hat der IDH1-Status eine höhere prognostische Aussagekraft in WHO Grad III und IV Tumoren als die histologische Graduierung nach der WHO-Klassifikation (Hartmann *et al.*, 2010). In der hier durchgeführten Arbeit konnte keine Aussage bezüglich eines Zusammenhangs zwischen einer IDH1-Mutation und der HMGA2-Expression in Glioblastomen getroffen werden, da in zu wenigen Gewebepro-

ben die IDH1-Expression untersucht werden konnte. Es lagen 14 Präparate mit einer Wildtyp-Variante und ein Präparat mit einer IDH1-Mutation vor. Die Bestimmung ist erst seit Mitte 2009 in der histopathologischen Untersuchung der Glioblastome standardmäßig etabliert. Ein Großteil unserer Präparate stammt vor dieser Zeit. Vier von 44 Glioblastompräparaten stammten von sekundären Glioblastomen. Eine Aussage über etwaige Expressionsunterschiede bezüglich HMGA2 und eine sich daraus ergebende Relevanz kann auf Grund der geringen Anzahl nicht getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die HMGA2-Expression in Glioblastomen untersucht und anschließend mit dem MGMT-Methylierungsstatus korreliert. HMGA2 wird normalerweise nur während der Embryogenese in Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen ausgeschüttet und zeigt keine oder nur eine sehr geringe Expression in adulten, differenzierten Zellen (Chiappetta *et al.*, 1996; Fedele *et al.*, 2002; Monzen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Eine erhöhte HMGA2-Expression zu einem späteren Zeitpunkt steht in Zusammenhang mit der Expression von Onkogenen und tumorsuppressiven Genen bei benignen und malignen Tumoren (Fusco and Fedele, 2007).

Bisherige Studienergebnisse zeigten, dass HMGA2 im normalen Hirngewebe nicht oder sehr gering exprimiert ist (Liu *et al.*, 2010; B. Liu *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016). In den hier untersuchten 5 normalen Hirnschnitten zeigte sich ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe HMGA2-Expression in der qRT-PCR und der immunhistochemischen Analyse. Weiter besteht nach *Liu et al.* ein Zusammenhang zwischen der Expression von HMGA2 und dem Malignitätsgrad astrozytärer Tumore (siehe Abb. 15). Bei höhergradigen glialen Tumoren ist die Expression von HMGA2 stärker ausgeprägt. Die höchste HMGA2-Expression findet sich beim Glioblastom und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (B. Liu *et al.*, 2014). In 67% adulter und 70% kindlicher Glioblastome zeigten sich eine mittlere bis hohe Expressionswerte für HMGA2 (Kaur *et al.*, 2016).

In dieser Arbeit konnte, ebenfalls wie in aktuellen Studien, eine größtenteils sehr hohe und im Vergleich zum Normalhirngewebe signifikant erhöhte HMGA2-Expression in den untersuchten Glioblastompräparaten nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen dem invasiven Wachstumsmuster von Glioblastomen und einer HMGA2-Überexpression kann eventuell vermutet werden (Mao *et al.*, 2013).

In vorausgegangenen Untersuchungen anderer Tumore zeigte eine HMGA2-Überexpression einen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten. In sogenannten benignen Tumoren wie dem Lipom, Leiomyom und Hypophysentumoren zeigt sich bei einer erhöhten HMGA2-Expression oftmals ein sehr aggressives und invasives Tumorwachstumsverhalten (Fedele *et al.*, 2002; Fusco and Fedele, 2007; Qian *et al.*, 2009). *Quian et al.* konnten in Grad 4 Hypophysenadenomen eine signifikant höhere HMGA2-Expression als in Grad 1-3 Adenomen nachweisen. Des weiteren war die Expression in Makroadenomen im Vergleich zu Mikroadenomen erhöht und es bestand eine signifikante Korrelation zwischen HMGA2-Expression und Ki-67, einem Proliferationsmarker in Tumorzellen (Qian *et al.*, 2009). In Retinoblastomen besteht nach *Mu et al.* zwischen gut und weniger gut differenzierten Tumoren ein signifikanter Unterschied in der HMGA2-Expression. Auch hier spricht eine HMGA2-Überexpression für ein verstärkt invasives Wachstum (Mu *et al.*, 2010). Desweiteren werden durch HMGA2-Gene aktiviert, die mit einer Hemmung der Zelladhäsion einhergehen. Hierdurch wird eine Migration von Tumorzellen ermöglicht (S. Watanabe *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse deuten ebenfalls auf eine verstärkte Invasivität der Tumore mit HMGA2-Überexpression hin.

Weitere onkologische Studien zeigen, dass eine HMGA2 bei Tumoren wie dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Miyazawa *et al.*, 2004), dem Magen- und Lungenkarzinom (Meyer *et al.*, 2007; Di Cello *et al.*, 2008; Motoyama *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014), Karzinomen des Ovars und der Mamma (Jones *et al.*, 2008; Malek *et al.*, 2008; Mahajan *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Hetland *et al.*, 2012; Wend *et al.*, 2013; Califano *et al.*, 2014) sowie bei Retinoblastomen und Hypophysenadenomen (Finelli *et al.*, 2002; Fedele *et al.*, 2006; Mu *et al.*, 2010) überexprimiert ist und dass eine Überexpression mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Invasivität mit Metastasierungsneigung verbunden ist (Miyazawa *et al.*, 2004; Chiappetta *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach erfolgter HMGA2-Expressionsanalyse eine Korrelation mit dem MGMT-Methylierungsstatus durchgeführt. Bezüglich der HMGA2-Expression in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus liegen in der Literatur bisher keine Ergebnisse vor.

Liu et al. untersuchten anhand einer qRT-PCR, immunhistochemischen und Western

blot Analyse den prognostischen Wert der HMGA2-Expression bei glialen Tumoren (B. Liu *et al.*, 2014). Das progressionfreie Überleben (11,2 versus 18,8 Monate, p= 0,021) war bei einer HMGA2-Überexpression in Glioblastomen signifikant vermindert. Jedoch führten *Liu et al.* keine Korrelation nach dem MGMT-Methylierungsstatus durch, was man als Nachteil der Studie ansehen kann, da dieser Parameter als der wichtigste prognostische und therapierelevante Faktor in der Glioblastomdiagnostik angesehen wird (Weller *et al.*, 2009; B. Liu *et al.*, 2014).

In der hier durchgeführten Untersuchung zeigten die Patienten nach einer operativen Tumorresektion und adjuvanten Radiochemotherapie mit Temozolomid und 60 Gy Bestrahlung bei einer positiven MGMT-Methylierung und einer vermehrten HMGA2-Expression die deutliche Tendenz zu einem kürzerem progressionsfreiem Überleben (median 10 vs. 21 Monate, p= 0.14). Bei nicht-methylierten, primären Glioblastompatienten ergab sich auf Grund der geringen Fallzahl keine eindeutige Aussagemöglichkeit, jedoch zeigten sich in der Tumorgewebeanalyse auf mRNA- und Proteinebene keine signifikanten Unterschiede in der Expression von HMGA2 bei methylierten und nicht-methylierten Patienten. Das progressionsfreie Intervall bei HMGA2 überexprimierten Patienten war sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene tendenziell verkürzt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine HMGA2-Überexpression bei gleichzeitiger positiver Methylierung einen negativen Einfluß auf das PFS von Glioblastompatienten hat.

In der Studie *Y.Liu et al.* zeigte sich bei einer erhöhten HMGA2-Expression ein verkürztes Gesamtüberleben bei Gliomen. Patienten mit einem aberranten HMGA2-Gen, also einer nicht funktionsfähigen Variante, zeigten ein prozentual erhöhtes Gesamtüberleben. Das mediane Überleben lag in dieser Patientengruppe bei 7,8 Jahren. Ein aberrantes HMGA2-Gen wurde somit als prognostischer Faktor für ein längeres Überleben identifiziert (Liu *et al.*, 2010). Leider erfolgten in dieser Studie keinerlei Angaben über die Überlebenszeit bei Expression der Normvariante des HMGA2-Gens im Vergleich zum aberranten HMGA2-Gen. Weiter erfolgte keine Stratifizierung nach dem MGMT-Methylierungsstatus. Dennoch kann anhand dieser Studie die Relevanz des HMGA2-Gens in der Glioblastomdiagnostik gesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit war das Gesamtüberleben bei einer erhöhten HMGA2-Expression bei positiv methylierten Patienten tendenziell verkürzt (Median 20 vs. 28

Monate, p= 0.38). Bei nicht-methylierten, primären Glioblastompatienten ergab sich auf Grund der geringen Fallzahl keine eindeutige Aussagemöglichkeit, jedoch zeigten sich in der Tumorgewebeanalyse auf mRNA- und Proteinebene keine signifikanten Unterschiede in der Expression von HMGA2 bei methylierten und nicht-methylierten Patienten. Das Gesamtüberleben bei HMGA2 überexprimierenden Patienten war sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene tendenziell verkürzt. Es wäre somit möglich, dass eine HMGA2-Überexpression trotz positiver Methylierung einen negativen Einfluß auf das OS hat. In einer weiteren vergleichbaren Studie wurde eine signifikant erhöhte Expression von HMGA2 in Glioblastomen in Vergleich zu anderen Gliomen (diffuses und anaplastisches Astrozyotm) gezeigt. Die Expression von HMGA2 korreliert signifikant mit der Proliferation von Tumorzellen, Invasivität und dem Überleben von Gliompatienten (B. Liu *et al.*, 2014). Weiter besteht dort eine signifikante Korrelation zur Expression von Ki-67, einem Proliferationsmarker in Tumorzellen, und der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), die eine Rolle als Zytokin in der Tumorexpansion spielt.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die HMGA2-Expression in glialen Tumoren (Liu *et al.*, 2010; B. Liu *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016). Jedoch erfolgte keine Stratifizierung nach dem MGMT-Methylierungsstatus (Weller *et al.*, 2009). In der hier durchgeführten Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HMGA2-Expression bei methylierten und nicht-methylierten Glioblastomen. In der qRT-PCR Analyse zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Expression von HMGA2. Auf mRNA-Ebene lag eine geringgradig erhöhte Expression von HMGA2 bei nicht-methylierten Patienten vor. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist möglicherweise das kleine und heterogene Patientenkolletiv. Sollte sich bei einer größeren Patientengruppe selbiges Ergebnis zeigen, wäre dies eventuell von prognostischen Wert.

Die Steuerung von HMGA2 erfolgt durch let-7, einer tumorsuppressiven, regulatorischen miRNA. Die 3' UTR-Einheit des HMGA2-Proteins enthält mehrere let-7 komplementäre Bindungsstellen (Boyerinas *et al.*, 2010). Eine erhöhte HMGA2- und erniedrigte let-7-Expression sprechen für ein fortgeschrittenes Tumorgeschehen (Shell *et al.*, 2007; Motoyama *et al.*, 2008). Nach *Lee et al.* entsteht die verstärkte Expression von HMGA2 in Lungentumoren entweder durch „Trunkierung" der let-7-Bindungsstellen am HMGA2-Protein oder eine verminderte let-7 Expression (Lee and Dutta, 2007). Eine direkte Verbindung zwischen let-7a und HMGA2 konnte bereits in Lungen-, Mamma- und Ösophagustumoren nachgewiesen werden (Lee and Dutta,

2007; 2013; Q. Liu *et al.*, 2014).

Li et al. zeigten eine signifikante Downregulation von let-7a in Gliomen. Auch zeigte sich im Tumorgewebe, wie in der vorliegenden Arbeit, eine im Vergleich zum Normalhirngewebe verstärkte HMGA2-Expression. Die Expressionslevels von let-7a (Mitglied der let-7 Familie) und HMGA2 wurden nach dem Malignitätsgrad der untersuchten Gliome korreliert (Y. Li *et al.*, 2015). Am Beispiel von U87, einer humanen primären Glioblastomzelllinie, wurden entweder let-7a Mimics oder HMGA2-small-interfering-RNAs (siRNA) tranfiziert (Y. Li *et al.*, 2015). SiRNAs sind Ribonukleinsäuremoleküle, die sich mit komplemetären Ribonukleinsäuremolekülen verbinden und dadurch deren Funktion stören (Siomi and Siomi, 2009). Anhand von Gliom-Tumorxenograft-Modellen in Mäusen wurden die Effekte von let-7a und der HMGA2-siRNA auf den Tumor in vivo untersucht. Durch Transfektion von let-7a-Mimics und HMGA2-siRNA konnte eine signifikante Hemmung der Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate in der U87-Zelllinie herbeigeführt werden. Weiter konnte durch Zuführung eines exogenen HMGA2 die hemmende Wirkung von let-7a auf die Proliferation von Gliomzellen aufgehoben werden (Y. Li *et al.*, 2015). Diese Modelle zeigen vielversprechende Möglichkeiten der Hemmung von HMGA2 und untermauern die Relevanz dieses Proteins in der Entstehung von Glioblastomen.

Eine Supression der HMGA2-Expression durch miRNAs der let-7-Familie wurde durch *Mayr et al., Hebert et al.* sowie *Wang et al.* nachgewiesen (Hebert *et al.*, 2007; Mayr *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). *Halle et al.* zeigten in einer aktuellen Studie, dass die HMGA2 mRNA-Level durch eine gezielte Hemmung überexprimierter mRNAs mittels anti-mRNSs in Glioblastomen moduliert werden können. Durch die Unterdrückung von let-7a durch direkte Medikamentenapplikation mittels der convection-enhanced-delivery (CED) Technik konnte sowohl in vitro als auch in vivo eine De-repression der mRNA-Level von HMGA2 herbeigeführt werden. In Zukunft kann eventuell durch eine gezielte Modulation von mRNAs eine Hemmung der HMGA2-Expression erreicht werden (Halle *et al.*, 2015). Die beschriebenen Ansätze könnten in Zukunft weitere effektive Therapiemöglichkeiten bieten. Bisherige Ansätze zeigten mittels Einlage von Kathetern intrazerebral eine effektive Applikationsmöglichkeit von Medikamenten. Jedoch bestehen hier noch einige Schwachstellen v.a. in Bezug auf verschiedene Katheterdesigns, die radiologische Darstellung von Dosis/Wirkung, die regionalen Dosimetrie sowie die Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Methode im klinischen Setting

(Vogelbaum and Aghi, 2015).

Mao et al. zeigten eine HMGA2 Überexpression in Glioblastomen und neuralen Stammzellen durch eine Erhöhung der LIN28A Expression. LIN28A ist ein miRNA regulierendes Protein, welches an die let-7-miRNA bindet. Eine Expression findet sich in schlecht differenzierten Tumoren (Mao *et al.*, 2013). Durch eine LIN28A Überaktivierung werden let-7-miRNAs unterdrückt und vermehrt Proonkogene exprimiert (Viswanathan *et al.*, 2009). Proinvasive Transkriptionsfaktoren werden ausgeschüttet. HMGA2 verstärkt das invasive Verhalten von Tumoren durch Aktivierung des proinvasiven Transkriptionsfaktors Snail durch direkte Bindung an deren Promotorregion (Thuault *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2012). Durch einen Knockdown von LIN28A kam es zu einer verminderten Invasivität und Proliferation der Glioblastomzelllinien. Eine Hemmung von Snail führt zu einer Abnahme der Migration und Invasivität der Glioblastomzellen. LIN28A ist in Glioblastomzellen exprimiert, jedoch nicht im Normalhirngewebe und wirkt durch Hemmung von let-7-Proonkogenen. Durch die beschriebene let-7-Hemmung kommt es zu einer Verstärkung der HMGA2-Expression und unter anderem daraus resultierend zu einem Tumorprogress. LIN28A wäre ein weiteres Target, um die HMGA2-Expression zu hemmen (Mao *et al.*, 2013). *Kaur et al.* konnten bei der Untersuchung von (CD133+) GBM neurosphären Zelllinien im Vergleich zu (CD133-)-Zelllinien eine erhöhten HMGA2-Expression nachweisen. Alle GBM-Zelllinien zeigten eine HMGA2-Expression (Kaur *et al.*, 2016). CD133 ist ein Mitglied der Transmembran Glykoproteinfamilie. Initial wurde es in hämatopoetischen Progenitorzellen beschrieben. Im weiteren Verlauf wurde CD133 (+/-) als wichtiger Marker zur Identifikation und Isolierung von sogenannten Tumorstammzellen gesehen (Irollo and Pirozzi, 2013). Durch gezieltes Ansteuern von HMGA2 durch eine lentivirale short-hairpin-RNAs (shRNA) kam es zu einer verringterten GBM-Stammzellfähigkeit, einer verminderten Invasivität der Glioblastomzellen und einer geringeren Kanzerogenität. Eine ektopische HMGA2-Expression in GBM-Zelllinien führte zum entgegengesetzten Effekt (Kaur *et al.*, 2016). Zur genaueren Untersuchung des invasiven Verhaltens von Glioblastomen wurden die „GBM adherent cell lines“ U-87MG und LN-229 sowie die neurosphäre Zelllinie HRS-GBM1 untersucht. Diese Zellinien exprimieren HMGA2. Durch Gabe von HMGA2-shRNA kam es zu einer verminderten HMGA2-Expression. Weiter wurde eine transwell-migration-assay der Zellinien U-87MG, LN-229 und HRS-GBM1 durchgeführt. Hier zeigten HMGA2-shRNA

exprimierende Zellen ein geringer ausgeprägtes invasives Verhalten. *Kaur et al*. sehen HMGA2 als wichtigen Faktor für das invasive Verhalten von Glioblastomen und die Notwendigkeit der Entwicklung von HMGA2 hemmenden Medikamenten (Kaur *et al.*, 2016).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die miRNA-142-3p, eine miRNA pluripotenter Stammzellen, die HMGA2-Expression über Bindung an die 3' UTR-Einheit supprimiert. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Expression von Sox2, einem Transkriptionsfaktor in Stammzellen. HMGA2 erhöht die Transkription von Sox2 durch die direkte Bindung an die Sox2 Promotorgenregion. Patienten mit überexprimiertem HMGA2 zeigen ein schlechteres Gesamtüberleben (Chiou *et al.*, 2013). MiRNA-Veränderungen sind in die Initierung und Progression tumoröser Prozesse involviert (Shell *et al.*, 2007). *Morishita et al.* konnten eine Rolle von HMGA2 durch die Aktivierung des TGFβ-Signaling-Pfades nachweisen. Bei Karzinomen führt dieser Signalweg zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) (Morishita *et al.*, 2013). Zellen an der „invasiven Front" von Tumoren exprimieren HMGA2 wobei Tumorzellen EMT induzieren. Anhand dieser Ergebnisse wird HMGA2 an der "invasiven Front" von Tumoren gesehen und ermöglicht Tumorzellen zu migrieren. Hieraus kann man auf eine weitere mögliche Erklärung der Invasivität und einer nicht möglichen Komplettresektion von Glioblastomen schliessen. Diese Annahme ist aber spekulativ.

Diese Ergebnisse zeigen wiederum die wichtige Rolle HMGA2's in Bezug auf das invasive Wachstumsverhalten von Tumoren und die Bildung von Metastasen durch die EMT mittels des TGFβ-Signaling-Pfades. *Lee et al.* zeigten durch HMGA2 „knockdown" eine verminderte Migration und Invasivität der Tumorzellen. EMT-Faktoren wie N-cadherin, beta- cadherin und Transkriptionsfaktoren wie Snail und Zeb 1 waren dabei downreguliert, E-cadherin upreguliert. Somit scheint HMGA2 auch über die EMT zu einer Verstärkung der Tumormigration und –invasivität beizutragen (Lee *et al.*, 2015). Eventuell können diese Ansätze in Zukunft auch bei Glioblastompatienten überprüft werden und würden eventuell das Ansteuern und Modulieren neuer „Targets" ermöglichen.

4.3 Ausblick

Zusammfassend zeigt die vorliegende Arbeit in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur, dass eine HMGA2-Überexpression tendenziell mit einer schlechteren Gesamtprognose assoziiert ist. HMGA2 als Biomarker könnte sich daher in Zukunft sehr hilfreich für prognostische Zwecke und gegebenenfalls neue Therapiestrategien in der Behandlung von Glioblastomen erweisen. MiRNAs können in Zukunft eventuell eine wichtige Rolle in der Modulation von HMGA2 spielen. Die hier durchgeführte Analyse des HMGA2-Proteins zeigt, wie schon bei anderen Malignomen, die wichtige Rolle dieses Proteins bei der Entstehung und Ausdehnung von Tumoren. Bei der Analyse der hier untersuchten Glioblastompräparate ergab sich tendenziell bei methylierten Glioblastomen ein kürzeres PFS und OS bei einer vorliegenden HMGA2-Überexpression. Diese Ergebnisse zeigen keine statistische Signifikanz, deuten aber dennoch auf eine hohe Relevanz des HMGA2 in Glioblastomen hin. Im Rahmen der mehr und mehr relevanten molekularen Einteilung von Hirntumoren, insbesondere des Glioblastoms, und der Aktualisierung der WHO-Kriterien für Hirntumore, wird die Therapie weiter individualisiert werden und es werden zunehmend mehr „targets“ in die Therapie miteinbezogen, um eine optimale „molekulare Anpassung“ zu erreichen. Eine Entschlüsselung weiterer Pathways auf molekularer Ebene und deren gezielte Modulation (u.a. durch miRNAs), dürften die Tumortherapie weiter effektiver gestalten. Die Entstehung von Glioblastomen zeigt hoch komplexe Mechanismen und eine Vielzahl darin involvierter Moleküle. Eine simultane Multitargettherapie wird schwierig sein, zumal die eventuelle Toxizität der applizierten Medikamente nicht außer Betracht gelassen werden darf. Hier muss klar zwischen Risiko und Nutzen abgewogen werden. Die Entdeckung des MGMT-Methylierungsstatus und die Behandlung der Patienten nach dem von *Stupp et al.* entwickelten Schema waren in der äußerst schwierigen Glioblastomtherapie bahnbrechende Entwicklungen der letzten Jahre (Stupp *et al.*, 2005). Weiter zeigte die Entdeckung der Mutationen im Gen der Isozitratdehydrogenase-1 (IDH1) eine wesentliche Neuerkenntnis, da Patienten mit einer IDH1-Mutation ein verbessertes Outcome im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Yan *et al.*, 2009). Sieht man diese Entwicklungen auf einen langen Zeitraum und den großen Forschungsaufwand, dann wird deutlich, dass dies im Vergleich zu anderen onkologischen Fachbereichen nur kleine und mit einer nur geringen Lebenszeitverlängerung einhergehende Fortschritte sind. Oftmals ergibt sich dadurch für Patienten und neuroonkologisch tätige Ärzte ein

frustranes Gesamtbild. Hierdurch wird nochmals die Schwierigkeit der Glioblastomtherapie unterstrichen und die Notwendigkeit, dieses Krankheitsbild weiter zu entschlüssen. Dabei könnte eine weiterführende molekulare Untersuchung und möglicherweise gezielte Modulation von HMGA2 einen weiteren wesentlichen Aspekt darstellen.

5 Zusammenfassung

HMGA2 ist ein mit Malignomen und einer schlechten Gesamtprognose verbundener Transkriptionsfaktor in humanen Karzinomen. Ziel der Studie war die Untersuchung der HMGA2-Expression und der prognostische Wert hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls und der Gesamtüberlebenszeit in methylierten und nicht-methylierten humanen Glioblastomen.

In 44 Glioblastompräparaten und 5 nicht-tumorösen Normalhirnschnitten wurde die HMGA2-Expression mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) und Immunhistochemie (IHC) untersucht. Die Genexpressionslevel in MGMT-methylierten und nicht-methylierten Glioblastomzellen und zwischen Tumor- und Normalhirngewebe wurden mittels des Mann-Whitney U Tests miteinander verglichen. Die Beziehung zwischen HMGA2-Expression, progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben wurde mit der Kaplan-Meier Methode und dem log-rank test untersucht. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Zum Diagnosezeitpunkt hatten die Patienten ein mittleres Alter von 57,4 ± 15,7 Jahren. Das mediane Gesamtüberleben betrug 16 Monate (SE 2,8, 95% CI: 10,6-21,4). Die HMGA2-Genexpression war beim Glioblastom im Vergleich zum Normalhirngewebe sowohl in der qPCR (mean: 0,35, SD: 0,27 vs. 0,03, SD: 0,05) als auch IHC (IRS mean: 17,21, SD: 7,43 vs. 3,20, SD: 1,68) signifikant erhöht (p=0,001). Das mediane Gesamtüberleben bei Patienten mit einer HMGA2-Überexpression war 20 Monate im Vergleich zu 28 Monaten bei niedriger HMGA2-Expression (p=0,38). Die Überlebensanalyse bei methylierten Patienten (n=24) zeigte, dass eine erhöhter HMGA2-Expression im Vergleich zu einer niedrigen HMGA2-Expression tendenziell mit einem kürzeren medianen progressionsfreiem Überleben assoziiert ist (10,0 versus 21,0 Monate; p=0,14). Nicht-methylierte Patienten (n=18) mit einer HMGA2-Überexpression zeigten keine signifikanten Unterschiede zur methylierten Gruppe.

Eine HMGA2-Überexpression in Glioblastompatienten zeigt tendenziell eine schlechtere Gesamtprognose. Das untersuchte Protein könnte in Zukunft als informativer Biomarker und Prognosefaktor unabhängig vom MGMT-Promotermethylierungsstatus dienen.

6 Summary

HMGA2 is a transcription factor associated with malignancy and poor prognosis in a variety of human cancers. In this study we investigated the HMGA2 expression in methylated and unmethylated human glioblastomas and its prognostic value with regard to survival time of patients.

In 44 glioblastoma patients and 5 non-tumorous brain specimens as controls HMGA2 expression was determined by performing quantitative real-time PCR (qPCR) and immunohistochemistry (IHC). Gene expression levels in MGMT methylated vs. unmethylated glioblatoma cells and between tumors and normal brain tissue, were compared using the Mann-Whitney U test. The relationship between HMGA2 expression, progression-free, and overall survival was analyzed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. P-values of <0.05 were considered as statistically significant.

Patients' mean age at diagnosis was 57.4 ± 15.7 years. Median survival was 16 months (SE 2.8, 95% CI: 10.6-21.4). HMGA2 gene expression was significantly higher in glioblastoma compared to normal brain tissue on qPCR (mean: 0.35, SD: 0.27 vs. 0.03, SD: 0.05) and IHC level (IRS mean: 17.21, SD: 7.43 vs. 3.20, SD:1.68) (p=0.001). Median overall survival time in patients with HMGA 2 overexpression was 20 months compared to 28 months in HMGA2 low expression group (p=0.38). Survival analysis in methylated patients (n=24) showed that high HMGA 2 levels are associated with a shorter median progression free survival compared to patients with low HMGA2 expression (10.0 versus 21.0 months; p=0.14). Unmethylated (n=18) patients with HMGA2 overexpression showed no significant differences to the methylated group.

HMGA2 overexpression seems to be associated with a poor prognosis in glioblastoma patients. This protein may be an informative biomarker and prognostic factor independent of the MGMT promoter methylation status.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wachstumsmuster der Glioblastome aus *Moskopp und Wassmann* 6

Abbildung 2: Kaplan-Meier Kurven aus *Stupp et al.* mit Überleben in Monaten nach Behandlungsgruppe (Radiotherapie vs. Radiotherapie und Temozolomide).....8

Abbildung 3: MGMT Promotor Methylierung vs. nicht-methyliert nach Gesamtüberleben nach *Hegi et al*.....10

Abbildung 4: Die Lage des HMGA2 Gens auf Chromosom 12q14. 17

Abbildung 5: HMGA2 Expressionen in immunohistochemisch untersuchten Tumorgeweben.....19

Abbildung 6: Unterschiedliche HMGA2 Expression im normalen Hirngewebe und glialen Tumoren aus *Liu et al*.....21

Abbildung 7: A und B: Schematischer Ablauf der PCR und TaqMan Assay.....29

Abbildung 8: A und B: Model der direkten und indirekten Immunhistochemie. 35

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Auswertung der Immunhistochemie. 38

Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurven nach MGMT-Promotormethylierungsstatus mit PFS und OS 42

Abbildung 11: HMGA2 Expression auf mRNA- und Proteinebene in Glioblastomen im Vergleich zum normalen Hirngewebe 43

Abbildung 12: A-D: Immunhistochemische HMGA2 Färbebeispiele.....44

Abbildung 13: HMGA2 Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. 45

Abbildung 14: A-D: PFS nach HMGA2 Expression auf Protein- (A,B) und mRNA-Ebene (C,D) bei methylierten (A,C) und nicht-methylierten (B,D) Patienten.....46

Abbildung 15: A-D: OS nach HMGA2 Expression auf Protein- (A,B) und mRNA-Ebene (C,D) bei methylierten (A,C) und nicht-methylierten (B,D) Patienten.....48

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien während der q-PCR 24

Tabelle 2: Geräte zur Bereitung der Paraffinschnitte sowie Immunhistochemie.....24

Tabelle 3: Reagenzien während der q-PCR 25

Tabelle 4: Detailangaben zum HMGA2 Antikörper. 25

Tabelle 5: Detektionskits, Reagenzien und Zubehör für die immunhistochemische Analyse mittels Ventana Vollautomat.....26

Tabelle 6: Übersicht der endogenen Kontrollgene und deren Funktion. 30

Tabelle 7: Probensets PCR 33

Tabelle 8: Formel zur Berechnung des ΔCT- Wertes und Expressionswertes. 34

Tabelle 9: Patientencharakteristika 41

9 Abkürzungsverzeichnis

ALA	Aminolävulinsäure
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CDK4	Cyklin-dependent kinase 4
CDKN2A	Cyklin-dependent kinase inhibitor 2A
CED	Convection- enhanced delivery
CI	Confindence intervall
CT	Computertomographie
CT Wert	Cykle treshold Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Digitale Substraktionsangiographie
EGFR	Epidermal growth factor rezeptor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
EORTC	European Organisation for research and treatment of cancer
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-PET
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GBM	Glioblastoma multiforme
GTR	Gross total resection
Gy	Gray
HDAC1	Histone deacetylase 1
HMG	High-mobility group
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
IHC	Immunhistochemie
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IONM	Intraoperatives Neuromonitoring
MANOVA	Multivariate analysis of variance
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
miRNA	micro Ribonukleinsäure
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert

OD	Optische Dichte
OS	Overall survival
PCR/ qRT-PCR	Polimerase chain reaction/real time quantitative polimerase chain reaction
PDGFRA	Platelet-dervived growth factor receptor alpha
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progression free survival
PI3K	Phospho-inositid 3-kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RANO	Radiology Assessment in Neurooncology
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse transcriptase
SD	Standard deviation
SE	Standard error
sh RNA	short hairpin RNAs
siRNA	small interfering RNA
Snail/ SNAI1	Zinc finger protein SNAI1
SNP	Single nucleotide polimorphism
Sox2	Sex tetermining region Y (SRY)- box 2
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
TGF	Transforming Growth Factor
TMS	Transcranial Magnetic Stimulation
TP	Tumor Protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
Zeb1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

10 Literaturverzeichnis

Agnihotri S, Aldape KD and Zadeh G: Isocitrate dehydrogenase status and molecular subclasses of glioma and glioblastoma. Neurosurg Focus 37: E13, 2014.

Aiken R: Molecular neuro-oncology and the challenge of the blood-brain barrier. Semin Oncol 41: 438-445, 2014.

AWMF: Detail [Internet]. [cited 2016 Apr 4] Available from: http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/030-099.html

Arjona D, Rey JA and Taylor SM: Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development. Curr Mol Med 6: 645-650, 2006.

Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP and Kim AH: Molecular and cellular heterogeneity: The hallmark of glioblastoma. Neurosurg Focus 37: E11, 2014.

Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, de Sanctis S, Evans H, Peterson D, Mendoza N, *et al*: Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. Br J Cancer 81: 1371-1377, 1999.

Bangiyev L, Rossi Espagnet MC, Young R, Shepherd T, Knopp E, Friedman K, Boada F and Fatterpekar GM: Adult brain tumor imaging: State of the art. Semin Roentgenol 49: 39-52, 2014.

Barbagallo GMV, Paratore S, Caltabiano R, Palmucci S, Parra HS, Privitera G, Motta F, Lanzafame S, Scaglione G, Longo A, *et al*: Long-term therapy with temozolomide is a feasible option for newly diagnosed glioblastoma: A single-institution experience with as many as 101 temozolomide cycles. Neurosurg Focus 37: E4, 2014.

Barker FG II, Chang SM, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB and Prados MD: Age and radiation response in glioblastoma multiforme. Neurosurgery 49: 1288-1297, discussion 1297-1298, 2001.

Belden CJ, Valdes PA, Ran C, Pastel DA, Harris BT, Fadul CE, Israel MA, Paulsen K and Roberts DW: Genetics of glioblastoma: A window into its imaging and histopathologic variability. Radiographics 31: 1717-1740, 2011.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A and Weinberg RA: An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet 40: 499-507, 2008.

Böcker W. Pathologie: mit über 200 Tabellen. Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2008.

Borrmann L, Schwanbeck R, Heyduk T, Seebeck B, Rogalla P, Bullerdiek J and Wisniewski JR: High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity. Nucleic Acids Res 31: 6841-6851, 2003.

Boyerinas B, Park S-M, Hau A, Murmann AE and Peter ME: The role of let-7 in cell differentiation and cancer. Endocr Relat Cancer 17: F19-F36, 2010.

Buckner JC: Factors influencing survival in high-grade gliomas. Semin Oncol 30 (Suppl 19): 10-14, 2003.

Bustin M and Reeves R: High-mobility-group chromosomal proteins: Architectural components that facilitate chromatin function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 54: 35-100, 1996.

Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25(2), 169–193, 2000.

Califano D, Pignata S, Losito NS, Ottaiano A, Greggi S, De Simone V, Cecere S, Aiello C, Esposito F, Fusco A, *et al*: High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer. J Cell Physiol 229: 53-59, 2014.

Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, *et al*: Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. Neuro-oncology: not137, 2013.

Chakravarti A, Erkkinen MG, Nestler U, Stupp R, Mehta M, Aldape K, Gilbert MR, Black PM and Loeffler JS: Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: A report on underlying mechanisms. Clin Cancer Res 12: 4738-4746, 2006.

Chambless LB, Kistka HM, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ and Thompson RC: The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. J Neurooncol 121: 359-364, 2015.

Cha S: Update on brain tumor imaging: From anatomy to physiology. AJNR Am J Neuroradiol 27: 475-487, 2006.

Chautard E, Loubeau G, Tchirkov A, Chassagne J, Vermot-Desroches C, Morel L and Verrelle P: Akt signaling pathway: A for radiosensitizing human malignant glioma. Neuro Oncol 12: 434-443, 2010.

Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, Merciai BM, Fidanza V, Giancotti V, Santoro M, *et al*: High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. Oncogene 13: 2439-2446, 1996.

Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, De Simone V, et al. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 2008; 44: 1015-1021.

Chieffi P, Battista S, Barchi M, Di Agostino S, Pierantoni GM, Fedele M, Chiariotti L, Tramontano D and Fusco A: HMGA1 and HMGA2 protein expression in mouse spermatogenesis. Oncogene 21: 3644-3650, 2002.

Chiou G-Y, Chien C-S, Wang M-L, Chen M-T, Yang Y-P, Yu Y-L, Chien Y, Chang YC, Shen CC, Chio CC, *et al*: Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. Mol Cell 52: 693-706, 2013.

Coburger J, Merkel A, Scherer M, Schwartz F, Gessler F, Roder C, *et al*: Low-Grade Glioma Surgery in Intraoperative Magnetic Resonance Imaging I: Results of a Multicenter Retrospective Assessment of the German Study Group for Intraoperative Magnetic Resonance Imaging. Neurosurgery, 2015.

Coburger J, Wirtz CR and König RW: Impact of extent of resection and recurrent surgery on clinical outcome and overall survival in a consecutive series of 170 patients for glioblastoma in intraoperative high field iMRI. J Neurosurg Sci, 2015.

Combs SE, Thilmann C, Edler L, Debus J and Schulz-Ertner D: Efficacy of fractionated stereotactic reirradiation in recurrent gliomas: Long-term results in 172 patients treated in a single institution. J Clin Oncol 23: 8863-8869, 2005.

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, *et al*: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 465: 966, 2010.

Dang L, Yen K and Attar EC: IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. Ann Oncol 27: 599-608, 2016.

Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood LJ, Mukherjee M, Schuldenfrei A, Kowalski J, Bhattacharya R, Ashfaq R and Resar LM: HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. Mol Cancer Res 6: 743-750, 2008.

Duan S, Yuan G, Liu X, Ren R, Li J, Zhang W, Wu J, Xu X, Fu L, Li Y, *et al*: PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. Nat Commun 6: 10068, 2015.

Duffau H: Introduction. Surgery of gliomas in eloquent areas: From brain hodotopy and plasticity to functional neurooncology. Neurosurg Focus 28: Intro, 2010.

Duffau H, Capelle L, Sichez J, Faillot T, Abdennour L, Law Koune JD, Dadoun S, Bitar A, Arthuis F, Van Effenterre R, *et al*: Intra-operative direct electrical stimulations of the central nervous system: The Salpêtrière experience with 60 patients. Acta Neurochir (Wien) 141: 1157-1167, 1999.

Duffau H and Mandonnet E: The "onco-functional balance" in surgery for diffuse low-grade glioma: Integrating the extent of resection with quality of life. Acta Neurochir (Wien) 155: 951-957, 2013.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB and Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene

O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 60: 2368-2371, 2000.

Expression of HMGA2 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2016 Apr 23] Available from: http://www.proteinatlas.org/ENSG00000149948-HMGA2/cancer

Fedele M, Battista S, Kenyon L, Baldassarre G, Fidanza V, Klein-Szanto AJP, Parlow AF, Visone R, Pierantoni GM, Outwater E, *et al*: Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. Oncogene 21: 3190-3198, 2002.

Fedele M, Fusco A. HMGA and cancer. Biochim. Biophys. Acta 2010; 1799: 48–54.

Fedele M, Visone R, De Martino I, Troncone G, Palmieri D, Battista S, Ciarmiello A, Pallante P, Arra C, Melillo RM, *et al*: HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. Cancer Cell 9: 459-471, 2006.

Feng C, Neumeister V, Ma W, Xu J, Lu L, Bordeaux J, Maihle NJ, Rimm DL and Huang Y: Lin28 regulates HER2 and promotes malignancy through multiple mechanisms. Cell Cycle 11: 2486-2494, 2012.

Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, Valtorta E, Mortini P, Croce CM, Larizza L, *et al*: The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. Cancer Res 62: 2398-2405, 2002.

Fogh SE, Andrews DW, Glass J, Curran W, Glass C, Champ C, Evans JJ, Hyslop T, Pequignot E, Downes B, *et al*: Hypofractionated stereotactic radiation therapy: An effective therapy for recurrent high-grade gliomas. J Clin Oncol 28: 3048-3053, 2010.

Forster T: Energiewanderung und Fluoreszenz. Naturwissenschaften 33: 166-175, 1946.

la Fougère C, Suchorska B, Bartenstein P, Kreth F-W and Tonn J-C: Molecular imaging of gliomas with PET: Opportunities and limitations. Neuro-oncol 13: 806-819, 2011.

Friedmann M, Holth LT, Zoghbi HY and Reeves R: Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. Nucleic Acids Res 21: 4259-4267, 1993.

Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H: Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. Lab Invest 80: 65-72, 2000.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, *et al*: Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev 21: 2683-2710, 2007.

Fusco A and Fedele M: Roles of HMGA proteins in cancer. Nat Rev Cancer 7: 899-910, 2007.

Gallego O: Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. Curr Oncol 22: e273-e281, 2015.

Garber K: Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. J Natl Cancer Inst 102: 926-928, 2010.

Goodwin GH, Sanders C and Johns EW: A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem 38: 14-19, 1973.

Greenberg MS. Handbook of Neurosurgery. Thieme; 2010.

Grosschedl R, Giese K and Pagel J: HMG domain proteins: Architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. Trends Genet 10: 94-100, 1994.

Guo L, Chen C, Shi M, Wang F, Chen X, Diao D, Hu M, Yu M, Qian L and Guo N: Stat3-coordinated Lin-28-let-7-HMGA2 and miR-200-ZEB1 circuits initiate and maintain oncostatin M-driven epithelial-mesenchymal transition. Oncogene 32: 5272-5282, 2013.

Gupta K and Salunke P: Molecular markers of glioma: An update on recent progress and perspectives. J Cancer Res Clin Oncol 138: 1971-1981, 2012.

Haglund MM, Berger MS, Shamseldin M, Lettich E and Ojemann GA: Cortical localization of temporal lobe language sites in patients with gliomas. Neurosurgery 34: 567-576, discussion 576, 1994.

Halle B, Marcusson EG, Aaberg-Jessen C, Jensen SS, Meyer M, Schulz MK, *et al*: Convection-enhanced delivery of an anti-miR is well-tolerated, preserves anti-miR stability and causes efficient target de-repression: A proof of concept. J Neurooncol, 2015.

Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, *et al*: Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. Acta Neuropathol 120: 707-718, 2010.

Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N and Sauk JJ: High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. Mol Cancer 6: 5, 2007.

Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, *et al*: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med 352: 997-1003, 2005.

Helmke BM, Markowski DN, Meyer A and Bullerdiek J: The expression of HMGA2 varies strongly among colon carcinomas. Anticancer Res 32: 1589-1593, 2012.

Hetland TE, Holth A, Kærn J, Flørenes VA, Tropé CG and Davidson B: HMGA2 protein expression in ovarian serous carcinoma effusions, primary tumors, and solid metastases. Virchows Arch 460: 505-513, 2012.

Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J and Hameister H: The expression pattern of the Hmgic gene during development. Genes Chromosomes Cancer 23: 350-357, 1998.

Hirose Y, Berger MS and Pieper RO: p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res 61: 1957-1963, 2001.

HMGA2 Gene - GeneCards | HMGA2 Protein | HMGA2 Antibody [Internet]. [cited 2016 Mar 25] Available from: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HMGA2

Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity, 6(4), 279–284, 2005.

Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM and Collins VP: Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. Genes Chromosomes Cancer 22: 9-15, 1998.

Irollo E and Pirozzi G: CD133: To be or not to be, is this the real question? Am J Transl Res 5: 563-581, 2013.

Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, *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 66: 9852-9861, 2006.

Jolesz FA and McDannold NJ: Magnetic resonance-guided focused ultrasound: A new technology for clinical neurosciences. Neurol Clin 32: 253-269, 2014.

Jones AM, Mitter R, Poulsom R, Gillett C, Hanby AM, Tomlinson IPM and Sawyer EJ; Phyllodes Tumour Consortium: mRNA expression profiling of phyllodes tumours of the breast: Identification of genes important in the development of borderline and malignant phyllodes tumours. J Pathol 216: 408-417, 2008.

Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjöld M and Larsson C: Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. Hum Genet 92: 169-174, 1993.

Kaur H, Ali SZ, Huey L, Hütt-Cabezas M, Taylor I, Mao X-G, Weingart M, Chu Q, Rodriguez FJ, Eberhart CG, *et al*: The transcriptional modulator HMGA2 promotes stemness and tumorigenicity in glioblastoma. Cancer Lett 377: 55-64, 2016.

Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, Guillamo JS, Jadaud E, Colin P, Bondiau PY, et al; Association of French-Speaking Neuro-Oncologists: Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. N Engl J Med 356: 1527-1535, 2007.

Kimmelman AC, Ross DA and Liang BC: Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. Genomics 34: 250-254, 1996.

Kleihues P, Burger PC and Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol 3: 255-268, 1993.

Kleihues P and Cavenee WK: Pathology and genetics of tumours of the nervous system., 2000.

Kleihues P and Ohgaki H: Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol 1: 44-51, 1999.

Klein-Hessling S, Schneider G, Heinfling A, Chuvpilo S and Serfling E: HMG I(Y) interferes with the DNA binding of NF-AT factors and the induction of the interleukin 4 promoter in T cells. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15311-15316, 1996.

Kombos T, Picht T, Derdilopoulos A and Suess O: Impact of intraoperative neurophysiological monitoring on surgery of high-grade gliomas. J Clin Neurophysiol 26: 422-425, 2009.

Kreth F-W, Thon N, Simon M, Westphal M, Schackert G, Nikkhah G, Hentschel B, Reifenberger G, Pietsch T, Weller M, et al; German Glioma Network: Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. Ann Oncol 24: 3117-3123, 2013.

Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretzschmar HA, Egensperger R and Kreth FW: Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. Neuro-oncol 12: 570-579, 2010.

Krieg SM, Sabih J, Bulubasova L, Obermueller T, Negwer C, Janssen I, Shiban E, Meyer B and Ringel F: Preoperative motor mapping by navigated transcranial magnetic brain stimulation improves outcome for motor eloquent lesions. Neuro-oncol 16: 1274-1282, 2014.

Kumar MS, Armenteros-Monterroso E, East P, Chakravorty P, Matthews N, Winslow MM and Downward J: HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. Nature 505: 212-217, 2014.

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, *et al*: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg 95: 190-198, 2001.

Lau D, Magill ST and Aghi MK: Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: Current and future targets. Neurosurg Focus 37: E15, 2014.

Lee J, Ha S, Jung C-K and Lee HH: High-mobility-group A2 overexpression provokes a poor prognosis of gastric cancer through the epithelial-mesenchymal transition. Int J Oncol 46: 2431-2438, 2015.

Lee YS and Dutta A: The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev 21: 1025-1030, 2007.

Leibel SA and Sheline GE: Radiation therapy for neoplasms of the brain. J Neurosurg 66: 1-22, 1987.

Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A and Schlessinger J: Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. Nature 313: 144-147, 1985.

Liffers K, Lamszus K, Schulte A. EGFR Amplification and Glioblastoma Stem-Like Cells. Stem Cells Int. 2015; 2015: 427518.

Linn J, Wiesmann M and Brückmann H: Atlas Klinische Neuroradiologie Des Gehirns. Springer-Verlag, 2011.

Liu B, Pang B, Hou X, Fan H, Liang N, Zheng S, Feng B, Liu W, Guo H, Xu S, *et al*: Expression of high-mobility group AT-hook protein 2 and its prognostic significance in malignant gliomas. Hum Pathol 45: 1752-1758, 2014.

Liu Q, Liu T, Zheng S, Gao X, Lu M, Sheyhidin I and Lu X: HMGA2 is down-regulated by microRNA let-7 and associated with epithelial-mesenchymal transition in oesophageal squamous cell carcinomas of Kazakhs. Histopathology 65: 408-417, 2014.

Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, Tsavachidis S, Liang FW, Gilbert M, Aldape K, *et al*: Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. J Clin Oncol 28: 2467-2474, 2010.

Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408, 2001.

Li YM, Suki D, Hess K and Sawaya R: The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? J Neurosurg: 1-12, 2015.

Li Y, Zhang X, Chen D, Ma C. Let-7a suppresses glioma cell proliferation and invasion through TGF-β/Smad3 signaling pathway by targeting HMGA2. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. 2015

Li Y, Zhao Z, Xu C, Zhou Z, Zhu Z and You T: HMGA2 induces transcription factor Slug expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to colon cancer progression. Cancer Lett 355: 130-140, 2014.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 114: 97-109, 2007.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P and Ellison DW: The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. Acta Neuropathol 131: 803-820, 2016.

Lund-Johansen M: Expect the unexpected: Incidental findings on brain magnetic resonance imaging. World Neurosurg 80: e119-e120, 2013.

Mabray MC, Barajas RF Jr and Cha S: Modern brain tumor imaging. Brain Tumor Res Treat 3: 8-23, 2015.

Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr and Cairncross JG: Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. J Clin Oncol 8: 1277-1280, 1990.

Mahajan A, Liu Z, Gellert L, Zou X, Yang G, Lee P, Yang X and Wei JJ: HMGA2: A biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. Mod Pathol 23: 673-681, 2010.

Malek A, Bakhidze E, Noske A, Sers C, Aigner A, Schäfer R and Tchernitsa O: HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. Int J Cancer 123: 348-356, 2008.

Mandonnet E, de Witt Hamer P, Pallud J, Bauchet L, Whittle I and Duffau H: Silent diffuse low-grade glioma: Toward screening and preventive treatment? Cancer 120: 1758-1762, 2014.

Mao XG, Hütt-Cabezas M, Orr BA, Weingart M, Taylor I, Rajan AKD, Odia Y, Kahlert U, Maciaczyk J, Nikkhah G, *et al*: LIN28A facilitates the transformation of human neural stem cells and promotes glioblastoma tumorigenesis through a pro-invasive genetic program. Oncotarget 4: 1050-1064, 2013.

Mayr C, Hemann MT and Bartel DP: Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. Science 315: 1576-1579, 2007.

McLendon R, Friedman A, Bigner D, Meir EGV, Brat DJ, Mastrogianakis GM, et al; Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 455: 1061-1068, 2008.

Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M, Goldmann T, Vollmer E and Bullerdiek J: HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. Mol Carcinog 46: 503-511, 2007.

Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK and Imai K: Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. Cancer Res 64: 2024-2029, 2004.

Moiyadi AV and Shetty P: Direct navigated 3D ultrasound for resection of brain tumors: A useful tool for intraoperative image guidance. Neurosurg Focus 40: E5, 2016.

Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M and Duroux M: A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. Mol Neurobiol 47: 131-144, 2013.

Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, *et al*: A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. Nat Cell Biol 10: 567-574, 2008.

Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, Sankarasharma D, Szabolcs M, Okada Y, D'Armiento J and Chada K: HMGA2 is a driver of tumor metastasis. Cancer Res 73: 4289-4299, 2013.

Moskopp D and Wassmann H: Neurochirurgie: Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk. 2. Aufl. Stuttgart. Schattauer Verlag, 2015. 526.

Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K and Mori M: Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. Clin Cancer Res 14: 2334-2340, 2008.

Mu G, Liu H, Zhou F, Xu X, Jiang H, Wang Y and Qu Y: Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with let-7 down-regulation in retinoblastomas. Hum Pathol 41: 493-502, 2010.

Mulisch DM: Nachweisverfahren und Detektion [Internet]. In: Verfahren der Immunlokalisation. Springer Fachmedien Wiesbaden; 2014. p. 11–25.[cited 2016 Apr 26] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-658-03829-8_3

Nadiminty N, Tummala R, Lou W, Zhu Y, Shi X-B, Zou JX, Chen H, Zhang J, Chen X, Luo J, *et al*: MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. PLoS One 7: e32832, 2012.

Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H: Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 59: 539-543, 2000.

Navarria P, Ascolese AM, Tomatis S, Reggiori G, Clerici E, Villa E, Maggi G, Bello L, Pessina F, Cozzi L, *et al*: Hypofractionated Stereotactic Radiation Therapy in Recurrent High-Grade Glioma: A New Challenge. Cancer Res Treat 48: 37-44, 2016.

Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H: IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res 15: 6002-6007, 2009.

NormFinder software [Internet]. [cited 2016 Dec 5] Available from: http://moma.dk/normfinder-software

Noske A, Loibl S, Darb-Esfahani S, Roller M, Kronenwett R, Müller BM, Steffen J, von Toerne C, Wirtz R, Baumann I, *et al.*: Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). Breast Cancer Research and Treatment, 126(1), 2011.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, *et al*: Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. Cancer Res 64: 6892-6899, 2004.

Ohgaki H and Kleihues P: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 64: 479-489, 2005.

Ohgaki H and Kleihues P: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 170: 1445-1453, 2007.

Ohgaki H and Kleihues P: Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci 100: 2235-2241, 2009.

Ohgaki H and Kleihues P: The definition of primary and secondary glioblastoma. Clin Cancer Res 19: 764-772, 2013.

Osborn AG, Salzman KL and Barkovich AJ: Diagnostic Imaging: brain. Amirsys, 2010.

Osborn AG, Salzman KL, Thurnher MM, Rees JH and Castillo M: The new World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: What can the neuroradiologist really say? AJNR Am J Neuroradiol 33: 795-802, 2012.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C and Barnholtz-Sloan J: CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. Neuro-oncol 16 (Suppl 4): iv1-iv63, 2014.

Pallud J, Audureau E, Noel G, Corns R, Lechapt-Zalcman E, Duntze J, Pavlov V, Guyotat J, Hieu PD, Le Reste PJ, et al; Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie: Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: A controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. Neuro-oncol 17: 1609-1619, 2015.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, *et al*: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 321: 1807-1812, 2008.

Patel M, McCully C, Godwin K and Balis FM: Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. J Neurooncol 61: 203-207, 2003.

Perry A and Wesseling P: Histologic classification of gliomas. Handb Clin Neurol 134: 71-95, 2016.

Perry JR, Bélanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, Shields C, Kirby S, Macdonald DR, Eisenstat DD, *et al*: Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. J Clin Oncol 28: 2051-2057, 2010.

Pollard PJ and Ratcliffe PJ: Cancer. Puzzling patterns of predisposition. Science 324: 192-194, 2009.

Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [cited 2016 May 5] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/

Prada F, Bene MD, Fornaro R, Vetrano IG, Martegani A, Aiani L, Sconfienza LM, Mauri G, Solbiati L, Pollo B, *et al*: Identification of residual tumor with intraoperative contrast-enhanced ultrasound during glioblastoma resection. Neurosurg Focus 40: E7, 2016.

Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Wang EL, Rahman MM, Inoue H, Itakura M, *et al*: Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. Mod Pathol 22: 431-441, 2009.

Quick A, Patel D, Hadziahmetovic M, Chakravarti A and Mehta M: Current therapeutic paradigms in glioblastoma. Rev Recent Clin Trials 5: 14-27, 2010.

Rees J: Advances in magnetic resonance imaging of brain tumours. Curr Opin Neurol 16: 643-650, 2003.

Reeves R and Nissen MS: The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. J Biol Chem 265: 8573-8582, 1990.

Reyderman L, Statkevich P, Thonoor CM, Patrick J, Batra VK and Wirth M: Disposition and pharmacokinetics of temozolomide in rat. Xenobiotica 34: 487-500, 2004.

Rice SJ, Lai S-C, Wood LW, Helsley KR, Runkle EA, Winslow MM and Mu D: MicroRNA-33a mediates the regulation of high mobility group AT-hook 2 gene (HMGA2) by thyroid transcription factor 1 (TTF-1/NKX2-1). J Biol Chem 288: 16348-16360, 2013.

van Rijn J, Heimans JJ, van den Berg J, van der Valk P and Slotman BJ: Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. Int J Radiat Oncol Biol Phys 47: 779-784, 2000.

Ringel F, Pape H, Sabel M, Krex D, Bock HC, Misch M, Weyerbrock A, Westermaier T, Senft C, Schucht P, et al; SN1 study group: Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: Results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. Neuro-oncol 18: 96-104, 2016.

Rizzi C, Cataldi P, Iop A, Isola M, Sgarra R, Manfioletti G and Giancotti V: The expression of the high-mobility group A2 protein in colorectal cancer and surrounding fibroblasts is linked to tumor invasiveness. Hum Pathol 44: 122-132, 2013.

RNeasy Lipid Tissue Handbook - QIAGEN [Internet]. [cited 2016 May 5] Available from: https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=bcff828a-b4f0-4de0-9cc5-36331a5dc95f&lang=en

Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U and Bullerdiek J: HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. Am J Pathol 149: 775-779, 1996.

Rosso L, Brock CS, Gallo JM, Saleem A, Price PM, Turkheimer FE and Aboagye EO: A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: Pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. Cancer Res 69: 120-127, 2009.

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, *et al*: Farewell to oligoastrocytoma: In situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. Acta Neuropathol 128: 551-559, 2014.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354, 1985.

Samandouras G: The Neurosurgeon's Handbook. Oxford University Press, 2010.

Sanai N and Berger MS: Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery 62: 753-764, discussion 264-266, 2008.

Sanai N and Berger MS: Intraoperative stimulation techniques for functional pathway preservation and glioma resection. Neurosurg Focus 28: E1, 2010.

Sanai N, Chang S and Berger MS: Low-grade gliomas in adults. J Neurosurg 115: 948-965, 2011.

Sandeman EM, Hernandez MC, Morris Z, Bastin ME, Murray C, Gow AJ, Corley J, Henderson R, Deary IJ, Starr JM, *et al*: Incidental findings on brain MR imaging in older community-dwelling subjects are common but serious medical consequences are rare: A cohort study. PLoS One 8: e71467, 2013.

Scherer HJ: The Forms of Growth in Gliomas and Their Practical Significance. Brain 63: 1-35, 1940.

Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H and Van de Ven WJ: Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. Nat Genet 10: 436-444, 1995.

Schucht P, Beck J, Abu-Isa J, Andereggen L, Murek M, Seidel K, Stieglitz L and Raabe A: Gross total resection rates in contemporary glioblastoma surgery: Results of an

institutional protocol combining 5-aminolevulinic acid intraoperative fluorescence imaging and brain mapping. Neurosurgery 71: 927-935, discussion 935-936, 2012.

Schucht P, Knittel S, Slotboom J, Seidel K, Murek M, Jilch A, Raabe A and Beck J: 5-ALA complete resections go beyond MR contrast enhancement: Shift corrected volumetric analysis of the extent of resection in surgery for glioblastoma. Acta Neurochir (Wien) 156: 305-312, discussion 312, 2014.

Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T and Seifert V: Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: A randomised, controlled trial. Lancet Oncol 12: 997-1003, 2011.

Seystahl K, Wick W and Weller M: Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. Crit Rev Oncol Hematol 99: 389-408, 2016.

Sgarra R, Maurizio E, Zammitti S, Lo Sardo A, Giancotti V and Manfioletti G: Macroscopic differences in HMGA oncoproteins post-translational modifications: C-terminal phosphorylation of HMGA2 affects its DNA binding properties. J Proteome Res 8: 2978-2989, 2009.

Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS Jr, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J Jr, Strike TA, *et al*: Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. J Neurosurg 71: 1-9, 1989.

Shell S, Park S-M, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E and Peter ME: Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. Proc Natl Acad Sci USA 104: 11400-11405, 2007.

Shiban E, Krieg SM, Haller B, Buchmann N, Obermueller T, Boeckh-Behrens T, Wostrack M, Meyer B and Ringel F: Intraoperative subcortical motor evoked potential stimulation: How close is the corticospinal tract? J Neurosurg 123: 711-720, 2015.

Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, Makino K, Kochi M, Saya H, Kuratsu J and Ushio Y: Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. Cancer 95: 249-257, 2002.

Sinn, HP, Schneeweiss A, Keller M, Schlombs K, Laible M, Seitz, J, Lakis S, Veltrup E, Altevogt P, Eidt S, et al.: Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. BMC Cancer, 17. 2017.

Siomi H and Siomi MC: On the road to reading the RNA-interference code. Nature 457: 396-404, 2009.

SongTao Q, Lei Y, Si G, YanQing D, HuiXia H, XueLin Z, LanXiao W and Fei Y: IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma. Cancer Sci 103: 269-273, 2012.

Sterenczak KA, Eckardt A, Kampmann A, Willenbrock S, Eberle N, Länger F, Kleinschmidt S, Hewicker-Trautwein M, Kreipe H, Nolte I, *et al*: HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin28 and let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer 14: 694, 2014.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F and Reulen H-J; ALA-Glioma Study Group: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol 7: 392-401, 2006.

Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, et al; ALA-Glioma Study Group: Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. Neurosurgery 62: 564-576, discussion 564-576, 2008.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, et al; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: 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 10: 459-466, 2009.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352: 987-996, 2005.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang D-A, Jones DTW, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, *et al*: Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell 22: 425-437, 2012.

Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, Senft C, Hau P, Sabel MC, Herrlinger U, Ketter R, Schlegel U, Marosi C, *et al*: Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. Neuro-oncol 18: 549-556, 2016.

Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD and Sloan A: The role of cancer stem cells in glioblastoma. Neurosurg Focus 37: E6, 2014.

Taal W, Dubbink HJ, Zonnenberg CBL, Zonnenberg BA, Postma TJ, Gijtenbeek JMM, Boogerd W, Groenendijk FH, Kros JM, Kouwenhoven MC, et al; Dutch Society for Neuro-Oncology: First-line temozolomide chemotherapy in progressive low-grade astrocytomas after radiotherapy: Molecular characteristics in relation to response. Neuro-oncol 13: 235-241, 2011.

Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AME, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MCJ, Buter J, Honkoop AH, Boerman D, de Vos FY, *et al*: Single-agent bevacizumab or lo-

mustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): A randomised controlled phase 2 trial. Lancet Oncol 15: 943-953, 2014.

Tan E-J, Thuault S, Caja L, Carletti T, Heldin C-H and Moustakas A: Regulation of transcription factor Twist expression by the DNA architectural protein high mobility group A2 during epithelial-to-mesenchymal transition. J Biol Chem 287: 7134-7145, 2012.

Thanos D and Maniatis T: Virus induction of human IFN β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. Cell 83: 1091-1100, 1995.

Thuault S, Tan E-J, Peinado H, Cano A, Heldin C-H and Moustakas A: HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. J Biol Chem 283: 33437-33446, 2008.

Turkalp Z, Karamchandani J and Das S: IDH mutation in glioma: New insights and promises for the future. JAMA Neurol 71: 1319-1325, 2014.

Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigyarto CAK, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J and Ponten F: Tissue-based map of the human proteome. Science 347, 1260419, 2015.

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al; Cancer Genome Atlas Research Network: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell 17: 98-110, 2010.

Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, *et al*: Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. Nat Genet 41: 843-848, 2009.

Vogelbaum MA and Aghi MK: Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. Neuro-oncol 17 (Suppl 2): ii3-ii8, 2015.

Vogelbaum MA, Jost S, Aghi MK, Heimberger AB, Sampson JH, Wen PY, Macdonald DR, Van den Bent MJ and Chang SM: Application of novel response/progression measures for surgically delivered therapies for gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group. Neurosurgery 70: 234-243, discussion 243-244, 2012.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M and Poulsen HS: Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol 8: 1197-1206, 1997.

Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr,

Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, *et al*: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. J Neurosurg 49: 333-343, 1978.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, *et al*: Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. N Engl J Med 303: 1323-1329, 1980.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P and Wei JJ: A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. Genes Chromosomes Cancer 46: 336-347, 2007.

Wang X, Liu X, Li AY-J, Chen L, Lai L, Lin HH, Hu S, Yao L, Peng J, Loera S, *et al*: Overexpression of HMGA2 promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. Clin Cancer Res 17: 2570-2580, 2011.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. Brain Pathol. Zurich Switz.; 6: 217–223; discussion 23–24, 1996.

Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, Hino Y, Sekita Y and Nakao M: HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. Am J Pathol 174: 854-868, 2009.

Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H: Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. Acta Neuropathol 117: 653-656, 2009.

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, *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 27: 5743-5750, 2009.

Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G and Stupp R: Molecular neuro-oncology in clinical practice: A new horizon. Lancet Oncol 14: e370-e379, 2013.

Weller M, Schlegel U and Westphal M: Neuroonkologie. [Internet] Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003. [cited 2015 Mar 18]. Available from http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-10338.

Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W and Reifenberger G: Personalized care in neuro-oncology coming of age: Why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. Neuro-oncol 14 (Suppl 4): iv100-iv108, 2012.

Wend P, Runke S, Wend K, Anchondo B, Yesayan M, Jardon M, Hardie N, Loddenkemper C, Ulasov I, Lesniak MS, *et al*: WNT10B/β-catenin signalling induces HMGA2

and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer. EMBO Mol Med 5: 264-279, 2013.

Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, *et al*: Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. J Clin Oncol 28: 1963-1972, 2010.

Wick W, Platten M and Weller M: New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. Neuro-oncol 11: 69-79, 2009.

Wiestler B, Capper D, Sill M, Jones DTW, Hovestadt V, Sturm D, Koelsche C, Bertoni A, Schweizer L, Korshunov A, *et al*: Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. Acta Neuropathol 128: 561-571, 2014.

Wilson TA, Karajannis MA and Harter DH: Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. Surg Neurol Int 5: 64, 2014.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI and Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol 11: 228-234, 2009.

Wirsching H-G, Galanis E and Weller M: Glioblastoma. Handb Clin Neurol 134: 381-397, 2016.

Wolffe AP: Architectural transcription factors. Science 264: 1100-1101, 1994.

Wu J, Liu Z, Shao C, Gong Y, Hernando E, Lee P, Narita M, Muller W, Liu J and Wei JJ: HMGA2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes. Cancer Res 71: 349-359, 2011.

Xu C, Shen J, Xie S, Jiang Z, Huang L and Wang L: Positive expression of Lin28 is correlated with poor survival in gastric carcinoma. Med Oncol 30: 382, 2013.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, *et al*: IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 360: 765-773, 2009.

Zhang H, Ma L, Wang Q, Zheng X, Xue Z, Chen X-L, et al. Intraoperative high-field MRI maximizes the extent of resection in intraventricular central neurocytoma surgery. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas. 2016

Zhang M and Chakravarti A: Novel radiation-enhancing agents in malignant gliomas. Semin Radiat Oncol 16: 29-37, 2006.

Zülch KJ. Histological typing of tumours of the central nervous system. 1979

11 Publikationsverzeichnis

Orginalarbeit:

Schwarm FP, Uhle F, Schänzer A, Acker T, Stein M, Reinges MH, Weischer C, Weigand MA, Uhl E, Kolodziej MA

„High-mobility group AT-hook protein 2 expression and its prognostic significance in MGMT methylated and unmethylated glioblastoma“

Int J Oncol. 2016; 48(4):1485-92

Publizierte Abstracts:

Frank P. Schwarm, Eberhard Uhl, Cornelia Weischer, Marco Stein, Marcus H.T. Reinges, Cornelia Weischer, Malgorzata A. Kolodziej

„High-mobility Group AT-hook Protein (HMGA 2) expression in MGMT Methylated and Unmethylated Glioblastoma”

Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 1. Joint Meeting mit der Koreanischen Gesellschaft für Neurochirurgie (KNS). Frankfurt am Main, 12.-15.06.2016. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2016. DocMI.10.06

Sonstige Vorträge und Poster:

Frank P. Schwarm, Eberhard Uhl, Marco Stein, Marcus H.T. Reinges, Cornelia Weischer, Malgorzata A. Kolodziej

„Expression and Prognostic Significance of the High-mobility Group AT-hook Protein 2 (HMGA 2) in MGMT Methylated and Unmethylated Glioblastomas”

EANS Annual Meeting 2016 (Athen, Griechenland, 04.09.- 08.09.2016)

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. 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

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.