

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Synowitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur epithelialen-mesenchymalen
Transition im Glioblastom und Glioblastomrezidiv**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CAROLIN KUBELT

aus Kassel

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Held-Feindt

2. Berichterstatter: PD Dr. Hattermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.09.2016

gez.: _____

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Präfixe für die üblichen Längen-, Maß- und Gewichtseinheiten	VI

Kapitel 1: Einleitung	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Pathologie	1
1.1.3 Klinik und Diagnostik	2
1.1.4 Therapie und Prognose	2
1.2 EMT	3
1.2.1 Marker im Prozess der EMT	4
1.2.1.1 Twist1	5
1.2.1.2 Akirin2	5
1.2.1.3 Snail-Familie	6
1.2.1.4 Desmoplakin	6
1.2.1.5 Biglykan	7
1.2.1.6 β -Catenin	7
1.2.1.7 L1CAM	8
1.2.1.8 Fibronectin	8
1.2.1.9 Vimentin	9
1.2.1.10 TGF β 1, TGF β R1, TGF β R2	9
1.3 Zielsetzung	10
Kapitel 2: Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Patientenmaterial	11
2.1.2 Zelllinie	11
2.1.3 Chemikalien	11
2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	13
2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial	16
2.1.6 Puffer und Lösungen	17
2.1.7 Antikörper	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA	19
2.2.1.1 Durchführung der RNA-Isolation mittels Trizol	19
2.2.1.2 Durchführung der RNA-Isolation mittels <i>PicoPure™ RNA Isolations Kit</i>	20

2.2.2	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung	21
2.2.3	DNA-Verdau und Herstellung von cDNA	22
2.2.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qPCR)	23
2.2.5	Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte	26
2.2.6	Immunfluoreszenzfärbung	27
2.2.6.1	Antikörpertitrierung	28
2.2.6.1.1	Durchführung der Antikörpertitrierung	28
2.2.6.2	Immunfluoreszenzdoppelfärbung	29
2.2.7	Stimulation der Zelllinie T98G	31
2.2.7.1	Kulturbedingungen und Kultivierung	31
2.2.7.2	Aussaat der Zellen	31
2.2.7.3	Zellzählung	32
2.2.7.4	Stimulation	32
2.2.7.4.1	Stimulation mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid	33
2.2.7.4.2	Stimulation mit dem EMT-Induktor TGFβ1	33
2.2.7.4.3	Beendigung der Stimulation und Vorbereitung auf die RNA-Isolation	33
2.3	Statistische Analyse	34
Kapitel 3:	Ergebnisse	35
3.1	Genexpressionsanalyse von Primär- und Rezidiv-Tumorpaaren auf mRNA-Ebene	35
3.1.1	Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Marker auf mRNA-Ebene	35
3.1.2	Genexpression von GFAP, Iba1 und Pecam1 auf mRNA-Ebene	39
3.2	Korrelationsanalysen	40
3.3	Gruppenmerkmale	42
3.4	Immunfluoreszenzdoppelfärbung	44
3.4.1	Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Twist1	46
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Desmoplakin	50
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper β-Catenin	52
3.4.4	Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper LICAM	55
3.4.5	Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Vimentin	57
3.5	Stimulation der Zelllinie T98G	59
3.5.1	Grundexpression verschiedener EMT-Marker in T98G-Zellen	60
3.5.2	Stimulation der Zelllinie T98G mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid	61

3.5.3 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem EMT-Induktor TGFβ1	62
3.6 Patientencharakteristika	64
Kapitel 4: Diskussion	65
4.1 Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Marker auf mRNA-Ebene	66
4.2 Zellentitäten und Korrelationsanalyse	67
4.3 Gruppenmerkmale	69
4.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbung	70
4.5 Stimulation der Zelllinie T98G	72
4.5.1 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid	72
4.5.2 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem EMT-Induktor TGFβ1	72
Kapitel 5: Zusammenfassung	74
Kapitel 6: Literaturverzeichnis	VII
Kapitel 7: Anlagen	XIV
7.1 Patientencharakteristika	XIV
7.2 Danksagung	XVII
7.3 Lebenslauf	XVIII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	<i>PicoPureTM</i> , modifiziert nach Benutzerhandbuch Firma Arctur	20
Abb. 2:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Twist1, Akirin2, Snail1 und Snail2, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe	36
Abb. 3:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von DSP, BGN, β -Catenin und L1CAM, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe	37
Abb. 4:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Fibronectin1 und Vimentin, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe	38
Abb. 5:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von TGF β 1, TGF β R1 und TGF β R2, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe	38
Abb. 6:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von GFAP, Iba1 und Pecam1, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe	39
Abb. 7:	Gruppenmerkmale in der Veränderung des Genexpressionsprofils verschiedener Marker von Primär- und Rezidiv-Tumoren	44
Abb. 8:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Twist1 und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	46
Abb. 9:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Desmoplakin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	50
Abb. 10:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper β -Catenin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	52
Abb. 11:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper L1CAM und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	55

Abb. 12:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Vimentin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	57
Abb. 13:	Grundexpressionen verschiedener EMT-Marker in T98G-Zellen	60
Abb. 14:	Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid für 24 Stunden	61
Abb. 15:	Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid für 48 Stunden	62
Abb. 16:	Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem EMT-Induktor TGFβ1 für 24 Stunden	63
Abb. 17:	Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem EMT-Induktor TGFβ1 für 48 Stunden	63
Abb. 18:	Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Patientenalter	XIV
Abb. 19:	Differenz der Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall	XIV
Abb. 20:	Genexpression der EMT-Marker im Primärtumor in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall	XIV
Abb. 21:	Genexpression der EMT-Marker im Rezidivtumor in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall	XV
Abb. 22:	Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit des Resektionsausmaßes	XV
Abb. 23:	Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Proliferationsindex (Primärtumore)	XV
Abb. 24:	Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Proliferationsindex (Rezidivtumore)	XV
Abb. 25:	Proliferationsindex im Vergleich von Primär- und Rezidivtumoren	XVI
Abb. 26:	Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom MGMT-Status (Primärtumore)	XVI

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Chemikalien und dazugehörige Bezugsquellen	12
Tab. 2:	Gebrauchsfertige Reagenziensysteme und zugehörige Bezugsquellen	13
Tab. 3:	<i>Target Assay</i> mit Kontext-Sequenz, Amplikon-Länge und <i>Annealing</i> -Temperatur	14
Tab. 4:	Geräte und Verbrauchsmaterial inklusive ihrer Bezugsquellen	16
Tab. 5:	Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung	17
Tab. 6:	Antikörper der Immunfluoreszenzfärbungen mit Bezugsquelle	18
Tab. 7:	Ansatz zur Herstellung von cDNA	23
Tab. 8:	Ansatz für TaqMan-PCR	25
Tab. 9:	<i>Real-Time</i> PCR-Programm	26
Tab. 10:	Verdünnung der ersten Primärantikörper zur Antikörpertitrierung	28
Tab. 11:	Verdünnung der ersten Primärantikörper zur Doppelfärbung	29
Tab. 12:	Verdünnung der zweiten Primärantikörper zur Doppelfärbung	30
Tab. 13:	Übersicht über die Stimulationen mit Temozolomid und TGF β 1	31
Tab. 14:	Korrelationsanalyse der ΔC_T -Werte der EMT-Marker im Gesamt-, Rezidiv- und Primär-Kollektiv mit GFAP, Iba1 und Pecam1, Teil 1	41
Tab. 15:	Korrelationsanalyse der ΔC_T -Werte der EMT-Marker im Gesamt-, Rezidiv- und Primär-Kollektiv mit GFAP, Iba1 und Pecam1, Teil 2	42
Tab. 16:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Twist1 und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	47

Tab. 17:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Desmoplakin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	51
Tab. 18:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper β -Catenin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	53
Tab. 19:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper L1CAM und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	56
Tab. 20:	Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Vimentin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+	Färbung in einer Zelle	EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
-	keine Färbung in einer Zelle	et al.	<i>et alii</i> (lat. und andere)
*, **, ***	statistische Signifikanzgrade	EtOH	Ethanol
°C	Grad Celsius	FET	Fluoreszenz-Energietransfer
Δ	Delta	FKS	fötales Kälberserum
%	Prozent	fMRT	funktionelle MRT
A	Adenin	FN1	Fibronectin 1
A	Fläche	G	Guanin
AB	<i>Applied Biosystems</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Abb.	Abbildung	GBM	Glioblastom
AF	Alexa Fluor	GFAP	saures Gliafaserprotein
5-Ala	5-Aminolävulinsäure	GITC	Guanidinisothiocyanat
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillatum</i> (lat. doppelt destilliertes Wasser)	GMT	gliale-mesenchymale Transition
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso Urea	G-Phase	<i>Gap</i> -Phase
BGN	Biglykan	H	Höhe
bp	Basenpaare	h	<i>hour</i> (engl. Stunde)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule</i>
C	Cytosin	ICAMs	intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	IDH-1	Isocitratdehydrogenase-1
CD11b	Makrophagen-Mikroglia marker	Ig	Immunglobulin
CD44	Stammzellmarker	KCl	Kaliumchlorid
CD133	Stammzellmarker	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
cDNA	<i>copy</i> (engl. Kopie)-DNA	L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
CO ₂	Kohlendioxid	MET	mesenchymale-epitheliale Transition
C _T	<i>cycle of Threshold</i> (engl. Schwellenwertzyklus)	MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
C-Terminus	Carboxy-Terminus	min	Minute
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	mRNA	<i>messenger</i> (engl. Boten-) RNA
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NaCl	Natriumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	N-Cadherin	neuronales Cadherin
DNase	Desoxyribonuklease	ns	nicht signifikant
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	N-Terminus	Amino-Terminus
DSP	Desmoplakin	OD	optische Dichte
E-Cadherin	epitheliales Cadherin		
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat		

OP	Operation
P	<i>Primer</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P1,..	Patient1,..
P53	Tumorsuppressorprotein
PBS	<i>Phosphored buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (engl. Polymerase-Kettenreaktion)
Pecam1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
pH	<i>Potentia hydrogenii</i> (lat. Stärke des Wasserstoffs), negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
qPCR	quantitative PCR
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (engl. relative Zentrifugalkraft)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (engl. Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
S2-Abfall	Sicherheitsstufe2 Abfall
S-Phase	Synthese-Phase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS (T)	<i>Tris-buffered saline</i> , (Tween®)
TGFB1, (R)	<i>Transforming Growth Factor β1, (Receptor)</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNG	Uracil N-Glykosylase
Vol.	Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.T.	zum Teil

Die chemischen Elemente in Formeln wurden mit den üblichen Symbolen dargestellt.

PRÄFIXE FÜR DIE ÜBLICHEN LÄNGEN-, MAß- UND GEWICHTSEINHEITEN

c	Centi	n	Nano	l	Liter
m	Milli	m	Meter	M	Mol
μ	Mikro	g	Gramm	U	Unit

KAPITEL 1: EINLEITUNG

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Glioblastoma multiforme (GBM) stellt die häufigste hirneigene Neoplasie des erwachsenen Menschen dar⁽¹⁾. Aufgrund seiner Aggressivität und Rezidiv-Freudigkeit wird dieser Tumor des zentralen Nervensystems von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Grad IV klassifiziert⁽²⁾. Bevorzugt betroffen sind Patienten höheren Alters, bei einem Median von 64 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, wobei das männliche Geschlecht in einem Verhältnis von 1,57:1 häufiger an dieser Neubildung erkrankt⁽³⁾. Das Glioblastom kann zum einen *de novo* entstehen oder als sogenanntes sekundäres Glioblastom aus Tumoren niedrigeren Malignitätsgrades hervorgehen^(4,5). Häufig befindet sich der Tumor im Marklager des Frontal- und Temporallappens, nicht selten wächst er jedoch auch über den Balken hinaus auf die Gegenseite, welches als „Schmetterlingsgliom“ bezeichnet wird. In 10% der Fälle kann ein multizentrisches Wachstum beobachtet werden⁽⁶⁾.

1.1.2 Pathologie

Die Namensgebung des Glioblastoma multiforme erfolgte 1926 von Percival Bailey und Harvey Cushing. Der Begriff spiegelte dabei die Vorstellungen, dass Tumorzellen aus Vorläuferzellen, den Glioblasten entstehen würden sowie das makroskopische Erscheinungsbild wieder, welches geprägt ist von Nekrosen, Tumorblutungen und pathologisch thrombosierten Gefäßen⁽⁷⁾. Als histologische Charakteristika des glialen Tumors astrozytären Ursprungs können ausgeprägte Kern- und Zellpleomorphien, eine erhöhte Mitose- und Proliferationsrate, strichförmige Nekrosen mit Palisadenstellung der Tumorzellen im Randbereich und glomerulumartige Gefäßproliferate ausgemacht werden. Immunhistologisch zeigt sich meist eine Expression von saurem Gliafaserprotein (GFAP), welches als Tumormarker herangezogen werden kann⁽⁸⁾. Es können Mutationen in verschiedenen Genen, u.a. des p53⁽⁹⁾, beobachtet werden, bei denen sich der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Status⁽¹⁰⁾ und die Isocitratdehydrogenase (IDH)-1 Mutation⁽¹¹⁾ als prognostisch relevant zeigten. Durch Vergleiche von Genexpressionsprofilen und der jeweils korrespondierenden Klinik einer großen Anzahl an GBM-Proben konnte eine Einteilung in 4 Untergruppen erfolgen. Zu unterscheiden sind dabei eine klassische, neurale, proneurale und mesenchymale Gruppe, wobei letztere mit einem aggressiveren Phänotyp und einer daher besonders schlechten Prognose vergesellschaftet ist^(12,13). Im Zuge der Rezidiv-Entwicklung konnte regelmäßig einer Verlagerung hin zum mesenchymalen Subtyp ausgemacht werden. Die proneurale Untergruppe, gekennzeichnet durch eine hohe Expression in der Neurogenese

eingebundener Gene, war mit einem besseren klinischen *Outcome* verbunden, besonders in Kombination mit der IDH-1 Mutation⁽¹³⁾.

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Da die Lokalisation des Tumors, wie eingangs bereits erwähnt, variiert, fallen dementsprechend auch die neurologischen Symptome der Erkrankung unterschiedlich aus. Generell sind Wesensveränderung, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Gedächtnisstörungen, Krampfanfälle, Hemiparesen und Aphasie häufig zu verzeichnende Erstmanifestationen⁽¹⁴⁾. Zur Diagnostik werden derzeit hauptsächlich Schnittbildverfahren mit Kontrastmittelapplikation eingesetzt. Als präoperatives Standardverfahren wird eine Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) angefertigt, welche eine gute Beurteilung der Weichteile ermöglicht^(14,15). Um funktionell bedeutsame Hirnareale besser eingrenzen zu können, gewinnt auch die funktionelle MRT (fMRT) zunehmend an Bedeutung. Zur histologischen Sicherung der Diagnose wird schließlich meist eine stereotaktische Biopsie durchgeführt⁽¹⁴⁾.

1.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapie der Wahl stellt derzeit die Resektion des Tumors und darauf folgende Radiochemotherapie dar. Zunächst erfolgt die präoperative Gabe von Dexamethason, welches als Ödemtherapie meist zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome führt. Im Anschluss daran erfolgt die Resektion mit dem Ziel, den Tumor makroskopisch komplett zu entfernen⁽¹⁴⁾. Das Ausmaß der Resektion zeigt dabei einen Zusammenhang mit der Überlebensrate, die nach erfolgter Operation von 6,8 Monaten (nach alleiniger Biopsie) auf 12 Monate angehoben werden kann^(15,16). Zur Optimierung des Resektionsausmaßes wird zudem 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) eingesetzt, die sich nach Umwandlung zu Protoporphyrin IX im Tumorgewebe anreichert und schließlich durch Fluoreszenz, nach Anregung mit Licht (407nm), residuales Tumorgewebe enttarnt^(17,18). Da durch die lokal invasive Ausbreitung immer einzelne Tumorzellen *in situ* verbleiben, schließt sich der Operation eine concomitante Radiochemotherapie mit Temozolomid nach dem Stupp-Schema an⁽¹⁴⁾. Radiatio und Chemotherapie werden dabei zeitgleich begonnen, während die Chemotherapie nach Beendigung der Bestrahlung weitergeführt wird. Die Zwei-Jahres-Überlebensrate konnte dabei von 10,9% nach alleiniger Bestrahlung auf 27,2% nach zusätzlicher Temozolomid-Therapie angehoben werden⁽¹⁹⁾. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit positivem MGMT-Status - d.h. es liegt eine Methylierung in der Promotorregion des MGMT-Gens vor - besonders von dieser Chemotherapie profitierten⁽²⁰⁾.

Eine weitere Therapieoption stellen Gliadel-Wafer® dar, die intraoperativ in die Resektionshöhle eingebracht werden und dort hohe Konzentrationen von Bis-Chlorethyl-Nitroso Urea (BCNU), einem alkylierenden Chemotherapeutikum freilassen⁽²¹⁾. Auch antiangiogenetische Substanzen wie Bevacizumab⁽²²⁾ oder Integrin-Inhibitoren wie Cilengitid⁽²³⁾ werden unter anderem eingesetzt und durch klinische Studien überprüft. Trotz intensiver Forschungsbemühungen, Individualisierung und Modifizierung der verfügbaren Therapien handelt es sich beim Glioblastoma multiforme jedoch dennoch um eine infauste Erkrankung mit einem medianen Überleben von nur 9,8% nach 5 Jahren⁽²⁰⁾.

1.2 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Nach Identifikation der sogenannten Tumorstammzellen - einer Subpopulation von sich selbst regenerierender Zellen mit stammzellartigen Eigenschaften - wurde das Konzept der Entstehung vieler solider Tumore, darunter auch das des Glioblastoms, überdacht⁽²⁴⁻²⁸⁾. Regeneration und Tumorentstehung gehen nach der Tumorstammzell-Theorie von diesen besagten Zellen aus⁽²⁴⁻²⁸⁾. Die Tumorstammzellen können sich differenzieren und die zu beobachtende Heterogenität vieler Tumorzellen erklären, die auch für das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf die Therapie verantwortlich sein könnte⁽²⁹⁾. Auch im GBM konnten Resistenzen gegenüber ionisierender Strahlung und Standardchemotherapie, welche schließlich die Bildung eines Rezidivs begünstigen mit GBM-Stammzellen in Verbindung gebracht werden^(30,31). Bei der Erforschung der Pathogenese unterschiedlicher Neoplasien konnte ein Mechanismus ausgemacht werden, der selbst zur Generierung von Zellen mit stammzellartigem Charakter führt und dessen Bedeutung in unterschiedlichen Zusammenhängen Gegenstand aktueller Forschung ist, nämlich die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)⁽³²⁾. Generell handelt es sich bei der EMT um einen komplexen biologischen Prozess, der es Epithelzellen nach biochemischen Veränderungen erlaubt, einen mesenchymalen Phänotyp zu entwickeln⁽³³⁾. Erstmals beschrieben wurde der Mechanismus im Rahmen der Embryogenese, wobei Elizabeth Hay Pionierarbeit leistete⁽³⁴⁾. Ebenfalls kommt der EMT auch im Kontext der Wundheilung, Geweberegeneration⁽³⁵⁾ und Organfibrose⁽³⁶⁾ eine bedeutende Rolle zu. Im Laufe des Prozesses kommt es zu einem Verlust der Zellpolarität und Zellkontakte, während die Beweglichkeit und Invasivität der Zellen erhöht wird. Es resultiert zudem eine vermehrte Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod⁽³³⁾. Trotz Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Kontexten, in denen der Mechanismus ausgemacht werden konnte, zeigte sich ein übergreifendes Muster an molekularen Veränderungen, wobei epitheliale Marker vermindert exprimiert sowie mesenchymale Gene aktiviert werden⁽³⁷⁾. Die schlechte Prognose vieler maligner Erkrank-

ungen basiert auf der lokalen Ausbreitung der Tumorzellen im Körper sowie dem Setzen von Fernmetastasen⁽³⁸⁾. Beides macht deutlich, dass es auch im Laufe der Pathogenese von Tumoren zu einer erhöhten Mobilität der Zellen kommt. Es existiert mittlerweile eine Vielzahl von Publikationen, die den Prozess der EMT in der Progression und Metastasierung von epithelialen- und nicht-epithelialen Neoplasien, darunter auch maligne Gliome, beschreiben⁽³⁹⁻⁴²⁾. Nachdem sich Tumorzellen mit mesenchymaler Charakteristik ausgebreitet haben, können sie den Prozess der EMT umkehren und schließlich wieder die Pathologie ihres korrespondierenden Primärtumors aufweisen^(41,43). Diese Umkehr des Prozesses wird auch als MET (mesenchymale-epitheliale Transition) bezeichnet. Durch intensive Forschungsbemühungen im Bereich der molekularen Mechanismen der EMT, konnten wichtige Elemente dieses Prozesses identifiziert werden. Es zeigte sich in Neoplasien unterschiedlicher Entität ein tumorübergreifendes, stadiumabhängiges Genexpressionsmuster, welches verschiedene EMT-Marker, darunter Snail2, Biglykan (BGN) und Fibronectin1 (FN1) beinhaltet⁽⁴⁴⁾. Dieses mit einer schlechten Prognose verbundene Expressionsprofil konnte auch im Glioblastom ausgemacht werden. Bei GBM-Patienten, die gut auf die Therapie ansprechen und dadurch erst zu einem späteren Zeitpunkt ein Rezidiv entwickelten, konnte ein niedriger Spiegel des mesenchymalen Expressionsmusters in den Gewebeproben nachgewiesen werden⁽⁴⁵⁾. Ebenfalls korrelierte die Signatur mit dem potentiellen Stammzellmarker CD44 (*Cluster of Differentiation*)⁽⁴⁵⁾ und zeigte eine verstärkte Expression in höheren Malignitätsgraden. Auch eine vermehrte Angiogenese war mit der mesenchymalen Signatur verbunden⁽⁴⁶⁾. Besonders stark zu beobachten ist die EMT an der invasiven Front von Tumoren, was der Mikroumgebung eine besondere Rolle zuzuweisen scheint⁽⁴⁷⁾. So sind neben einer Vielzahl von zellulären Signalmolekülen auch die hypoxische Umgebung der Tumorzellen, proinflammatorische Zytokine lokal aktivierter Stromazellen, extrazelluläre Matrixkomponenten und mechanische Einflüsse an der Induktion des Prozesses beteiligt⁽³⁷⁾. Die EMT scheint als Reaktivierung eines embryologischen Entwicklungsprogramms ein universaler biologischer Mechanismus solider Tumore zu sein⁽⁴⁵⁾.

1.2.1 Marker im Prozess der EMT

Es folgt nun die kurze Erläuterung verschiedener Proteine, die im Zusammenhang mit der EMT bereits beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit weitergehend analysiert werden. Diese epithelialen oder mesenchymalen Marker könnten als Ansatzpunkt zukünftiger Therapien fungieren und damit schließlich eine Chance zur Verbesserung der noch desaströsen Prognose des Glioblastoms darstellen.

1.2.1.1 Twist1

Es handelt sich bei Twist1 um einen basischen *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor zur Determinierung und Differenzierung von Zellen, der seine stärkste Expression auf Boten-Ribonukleinsäure-Ebene (*messenger* RNA, mRNA) in Plazentagewebe und bei Erwachsenen in Geweben mesodermaler Herkunft zeigt⁽⁴⁸⁾. Eine wichtige Rolle spielt die Überexpression von Twist1 auch im Rahmen vieler neoplastischer Prozesse, die in Verbindung mit der EMT stehen. Der Transkriptionsfaktor ist dabei als EMT-Aktivator in den Vorgang der Metastasierung involviert, schützt Tumorstammzellen vor Apoptose und führt schließlich zu einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie⁽⁴⁹⁾. Während er in vielen Tumoren zum sogenannten *Cadherin switch*, einem EMT-kennzeichnenden Expressionswechsel von epithelialem E-Cadherin zu mesenchymalem N-Cadherin führt⁽⁵⁰⁾, konnte dies im Glioblastom nicht nachgewiesen werden⁽⁵¹⁾. Eine Überexpression von Twist1 war jedoch auch im Glioblastom mit mesenchymalen Veränderungen der Zellen verbunden, die letztendlich zu einer erhöhten Invasivität und ebenfalls zu einer vermehrten Anzahl von Tumorstammzellen führte. Diese wiesen selbst eine Expression des Markers auf⁽⁵²⁾. Ein Vergleich von Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade zeigte eine vermehrte Expression des Markers mit zunehmendem Malignitätsgrad⁽⁵¹⁾. Der Transkriptionsfaktor erhöhte auch die Expression anderer Proteine, wie Fibronectin1 und Snail2, die selbst zu der verstärkten Invasivität des Tumors beitrugen⁽³³⁾. Im Gliosarkom, einer seltenen, vermehrt Bindegewebe enthaltende Variante des Glioblastoms, konnte nukleäres Twist1 als Charakteristikum mesenchymaler Areale ausgemacht werden⁽⁵³⁾. Auch im Zusammenhang mit einer durch Hypoxie ausgelösten EMT konnte der Transkriptionsfaktor als Signalmolekül gefunden werden⁽³⁷⁾. Eine Publikation aus dem Jahre 2007 beschrieb eine Hochregulation von Twist1 auch unter der Verabreichung von Chemotherapeutika⁽⁵⁴⁾. Nicht zuletzt auch deshalb gewinnt Twist als Ziel möglicher neuer Therapien an Interesse⁽⁴⁹⁾.

1.2.1.2 Akirin2

Akirine wurden erstmals 2008 als eine hoch konservierte Proteinfamilie beschrieben und seither in unterschiedlichen Organismen untersucht⁽⁵⁵⁾. Das aus der Wanderratte unter dem Namen FBI1 untersuchte Akirin2 zeigte eine vermehrte Expression in zahlreichen Ratten-Tumorzelllinien. Es fungierte dabei als Transkriptionsrepressor und vermittelte in Ratten-Hepatomzellen verankerungsunabhängiges Wachstum, Tumorgenität und Metastasierung⁽⁵⁶⁾. Da Akirin erst kürzlich als essentieller Twist-Kofaktor in der embryonalen Myogenese von *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde⁽⁵⁷⁾, wird die Rolle des Proteins nun im Rahmen der Pathogenese des Glioblastoms in der neurochirurgischen Forschungsabteilung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, in Zusammenarbeit mit dem Zoologischen

Institut, Abteilung Strukturbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, untersucht. Erste Ergebnisse zeigten eine deutliche Expression von Akirin2 im Tumorgewebe. Stimulationsversuche an zwei verschiedenen Glioblastom-Zelllinien konnten eine massive Induktion der Akirin2- und Twist1-Expression durch Temozolomid auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Eine Betrachtung des apoptotischen Verhaltens von Glioblastom-Zellen nach Akirin2 *knock-down* deuten zudem auf die funktionelle Rolle von Akirin2 als Tumorpromotor hin (unveröffentlichte Daten).

1.2.1.3 Snail-Familie

Die Snail-Familie besteht aus den Transkriptionsrepressoren Snail1 (zuerst als Snail identifiziert), Snail2 (Slug) sowie Snail3 (Smuc) und stellt einen wichtigen Regulator und Aktivator der EMT im Zuge der Embryonalentwicklung und Tumorphagenese dar⁽⁵⁸⁾. Während der C-Terminus der Proteine die Zink-Finger-Domäne zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen enthält, weist der N-Terminus die sogenannte SNAG-Domäne auf, welche essentiell für ihre Wirkungsentfaltung ist⁽⁵⁹⁾. Das Einbringen von Snail1 in Tumore epithelialen Ursprungs führte zur weiteren Dissemination der Tumorzellen, Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie, fehlender Wahrnehmung durch das Immunsystem und dem Expressieren von Stammzellmarkern^(32,60-62). Im Glioblastom führte der *knock-down* von Snail1 zu einer Verminderung der Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen sowie zu einem vermehrten Übergang der Zellen von der Synthese (S)- in die Gap (G)1-Phase des Zellzyklus⁽⁶³⁾. Da, wie unter Kapitel 1.2.1.1 bereits erwähnt, die Expression von Twist1 und Snail2 in Glioblastom-Gewebe korrelierte, fand sich auch für Snail2 eine Überexpression in Gliomen hoher Malignität und eine verstärkte Invasivität der Zellen⁽⁵¹⁾. Ähnliche Eigenschaften innerhalb des Glioblastoms wurden auch für Snail1 publiziert, welches zu einer verminderten Expression epithelialer Marker, bei gleichzeitiger Anhebung der Expression mesenchymaler Marker, darunter Vimentin und Fibronectin führte^(64,65).

1.2.1.4 Desmoplakin (DSP)

Das Protein Desmoplakin (DSP) ist Bestandteil von desmosomalen Plaques. Es stellt dabei mittels Plakoglobin und Plakophilin den Kontakt von Intermediärfilamenten zu den Proteinen der Desmosomen, den Cadherinen, her und schafft somit eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakten⁽⁶⁶⁾. Untersuchungen von DSP im Rahmen der EMT verschiedener Neoplasien konnten eine verminderte Expression des epithelialen Markers im Zuge des Prozesses ausmachen⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Dieses könnte damit erklärt werden, dass Zell-Zell-Verbindungen im Laufe der EMT zugunsten eines mobileren Phänotyps abgebaut werden⁽⁴⁷⁾.

1.2.1.5 Biglykan (BGN)

Bei Biglykan (BGN) handelt es sich um ein kleines Proteoglykan, welches unter anderem stark in der Extrazellulärmatrix von Knorpel, Sehnen und wachsendem Skelett exprimiert wird⁽⁷⁰⁾. BGN bindet spezifisch an Kollagenfibrillen und moduliert dadurch ihren Durchmesser⁽⁷¹⁾. Ebenfalls ist es funktionell in die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die zelluläre Migration, die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Apoptose eingebunden^(72,73). In Stromazellen einiger solider Tumore, welche Wachstum und Überleben neoplastischer Zellen durch unterschiedliche Mechanismen fördern können, konnte eine vermehrte Expression von BGN ausgemacht werden^(74,75). Nichts desto trotz scheint dies zwischen Tumorentitäten zu variieren, so zeigte zum Beispiel das Osteosarkom eine geringere Expression des Markers auf mRNA-Ebene⁽⁷⁶⁾. Von Interesse war das Proteoglykan auch bei der Betrachtung von extrazellulären Mediatoren der EMT und ihrer Rolle in der verstärkten Motilität der Zellen. Es konnte dabei unter den mesenchymalen Veränderungen der EMT eine verstärkte Produktion verschiedener Proteine, darunter Biglykan, nachgewiesen werden⁽⁷⁷⁾. Die BGN-Expression war dabei mit für die EMT charakteristischen morphologischen Veränderungen verbunden⁽⁷⁸⁾. Als einer der Induktoren des Proteoglykans konnte der EMT-Aktivator *Transforming Growth Factor* β 1 (TGF β 1) im Rahmen des Fibrose-, Desmoplasie-, und Tumorgeschehens identifiziert werden⁽⁷⁹⁾. Nach Bindung des Kernproteins von BGN an TGF β 1 konnte sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine vermehrte Expression des Proteoglykans ausgemacht werden⁽⁸⁰⁾.

1.2.1.6 β -Catenin

Das Protein β -Catenin ist in die Koordination der Zelladhäsion und Gen-Transkription eingebunden, wobei es als intrazelluläres Signalmolekül im WNT-Signalweg fungiert⁽⁸¹⁾. Mutation und Überexpression des Proteins sind mit vielen Neoplasien assoziiert⁽⁸²⁾. Während der EMT konnte ein Expressionsverlust an β -Catenin in den Zellkontakten ausgemacht werden, wobei es in den Zellkern translozierte und dort EMT-Signale verstärkte⁽⁴⁷⁾. Die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges, untersucht in Glioblastom-Zelllinien, konnte die Expression einiger EMT-Marker, wie Twist1, Snail1 und Snail2 modulieren und dadurch einen mesenchymalen Phänotyp erzeugen. Auch die Expression von CD133, als mutmaßlicher Tumorstammzellmarker bekannt, korrelierte mit der Aktivität des Signalweges. In einer Untergruppe von Glioblastom-Zelllinien konnten Zellen mit überaktiviertem WNT-Signalweg, differenzierbar anhand der intranukleären Translokation des β -Catenins, in einer Mehrzahl an der invasiven Front der Tumore gefunden werden⁽⁸³⁾. Ebenfalls war eine Aktivierung des Signalweges mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben verbunden⁽⁸⁴⁾. Auch im Zusammenhang mit den für das Glioblastom charakteristischen glomeruloiden Gefäßen scheint β -Catenin eine

Bedeutung zuzukommen. In einem Vergleich der pathologischen Tumorgefäße mit Gefäßen des gesunden Hirnparenchyms zeigte sich eine unterschiedliche Lokalisation des β -Catenins, welches nicht mehr in den Zellkontakten, sondern vielmehr homogen im Zytoplasma und intranukleär zu finden war⁽⁸⁵⁾.

1.2.1.7 L1CAM (*cell adhesion molecule*)

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM (*cell adhesion molecule*) wird als Transmembran- und Glykoprotein hauptsächlich in Nerven- und Schwannzellen gebildet und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems⁽⁸⁶⁾. Eine Überexpression des Moleküls konnte in vielen Tumorentitäten, wie dem Ovarial- und Endometriumkarzinom, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und dem Glioblastom gefunden werden, wobei die Expression generell mit einer schlechten Prognose, einem aggressiven Phänotyp und hohen Malignitätsstadien verbunden war. Im Zusammenhang mit Neoplasien induzierte L1CAM eine erhöhte Motilität, ein aggressiveres Tumorwachstum, Metastisierung und Resistenz gegenüber der Chemotherapie⁽⁸⁷⁾. In 2006 publizierten Shtutman et al. erstmals eine Verbindung von L1CAM und der EMT, bei der L1CAM über eine Störung von *Adherens Junctions* zu einer erhöhten Zellmotilität in einer Brustkrebszelllinie führte⁽⁸⁸⁾. Untersuchungen des Glioblastoms konnten aufzeigen, dass die vermehrte Expression von L1CAM, die schließlich zu einem verminderten Ansprechen auf das Chemotherapeutikum Temozolomid führte, vom EMT-Aktivator TGF β 1 abhängig war⁽⁸⁹⁾. Weitere Untersuchungen identifizierten L1CAM als einen vermeintlichen Marker für Glioblastom-Stammzellen, die sich vermehrt an der invasiven Front des Tumors befanden⁽⁹⁰⁾.

1.2.1.8 Fibronektin (FN)

Fibronektin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das auf der einen Seite Rezeptormoleküle der Zellen, die sogenannten Integrine bindet, auf der anderen Seite auch mit Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen verbunden ist. In Vertebraten existieren dabei eine lösliche Form des Proteins im Blutplasma sowie eine unlösliche, zelluläre Form als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, welche hauptsächlich von Fibroblasten sezerniert wird. Fibronektin spielt eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, dem Zellwachstum, der Migration und Differenzierung und stellt somit eine wichtige Komponente in Prozessen, wie der Wundheilung und der embryonalen Entwicklung dar⁽⁹¹⁾. Im Kontext neoplastischer Prozesse wurde das Protein ebenfalls beschrieben. Während der EMT konnte eine veränderte Synthese der extrazellulären Matrixkomponenten fest-

gestellt werden, bei der weniger Basallamina-Proteine, dafür mehr interstitielle Formen, wie Fibronectin gebildet werden⁽⁴⁷⁾. Im Rahmen der EMT stellt Fibronectin daher einen mesenchymalen Marker dar⁽⁹²⁾. Als Teil der Mikroumwelt kann Fibronectin dabei selbst zur Entwicklung des mesenchymalen Phänotyps der Tumorzellen beitragen⁽³⁷⁾. Neuere Untersuchungen von Fibronectin in Tumorzellen des Glioblastoms ergaben, dass eine Erniedrigung des Proteins zu starken Veränderungen in der Zelladhäsion und der Motilität führten. Obwohl einige Zellen verstärkt migratorisch aktiv wurden, wurde die kollektive Invasivität herabgesetzt und die Empfindlichkeit gegenüber radioaktiver Strahlung erhöht. In orthotropen *Grafts* führte die Verringerung von Fibronectin zu signifikant weniger Tumorzellwachstum und Angiogenese⁽⁹³⁾.

1.2.1.9 Vimentin

Vimentin ist ein Typ III Intermediärfilamentprotein, welches in Zellen mesenchymaler Herkunft als Hauptanteil des Zytoskelettes exprimiert wird. Aufgrund dieser Tatsache findet es als Marker mesenchymaler Zellen auch bei Betrachtungen der EMT Verwendung, bei der die Expression dementsprechend verstärkt wird. Wie zuvor bereits erwähnt, ist damit auch Vimentin als Teil der EMT-Signatur am Prozess der Tumorphagenese diverser Neoplasien, so auch des Glioblastoms, beteiligt⁽⁶⁵⁾. Als Intermediärfilament besitzt es eine wichtige Rolle in der Positionierung der Organellen im Zytosol der Zelle, es ist dabei mit dem Nukleus, dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien verbunden⁽⁹⁴⁾.

1.2.1.10 TGF β 1, TGF β R1, TGF β R2 (*Transforming Growth Factor - Receptor*)

Das zur Gruppe der *Transforming Growth Factors* gehörende Protein TGF β 1 ist involviert in die Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Apoptose, Migration sowie in die Homöostase von Zellen und spielt eine Rolle im Rahmen von Reparaturprozessen. Seine Bindung an den TGF β -Rezeptor2 (TGF β R2) kann zu dessen Aktivierung und Heterodimerisierung sowie zur Phosphorylierung des TGF β -Rezeptor1 (TGF β R1) führen, der wiederum meist über Smad-Proteine die transkriptionelle Aktivität des TGF β 1 entfaltet^(95,96). Der Transkriptionsfaktor kann seine Wirkung im Rahmen der malignen Transformation jedoch auch Smad-unabhängig entfalten, so beispielsweise über Matrix-Metallo-Proteasen⁽⁹⁵⁾. Obwohl das Protein in den meisten Epithelzellen einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum ausübte, zeigte es sich im Zusammenhang mit unterschiedlichen Neoplasien als wachstums- und damit Tumor-fördernd⁽⁹⁷⁾. TGF β , welches reichlich von Tumor-assoziierten Fibroblasten, Blutplättchen und Tumorzellen sezerniert wird,

stellt den am besten charakterisierten EMT-Induktor dar. Seine Aktivierung führt zu einem Verlust der *Tight Junctions* und Zellpolarität und induziert die Expression anderer EMT-Marker, wie Twist1 und Snail2 in unterschiedlichen Neoplasien^(37,95). Aufgrund der zentralen Rolle des TGFβ-Signalwegs im Tumorgeschehen dient dieser bereits als Ziel neuer Therapiestrategien. So erwies sich ein TGFβ-neutralisierender Antikörper in einer Phase I Studie im metastasierten Melanom und Nierenzellkarzinom als eine sichere und gut verträgliche neue Behandlungsmöglichkeit⁽³⁷⁾.

1.3 Zielsetzung

Die starke Invasivität der GBM-Zellen ist eine der Hauptursachen für das Auftreten von Rezidiven und die damit verbundene hohe Letalität der betroffenen Patienten. Die Parenchym-infiltrierenden Tumorzellen sind durch die derzeitigen Therapiemodalitäten nur schwer zu entfernen. Da der progressive Charakter der Tumore durch die epitheliale-mesenchymale Transition hervorgerufen wird, stellt die Erforschung der dabei ablaufenden Prozesse einen wichtigen Schritt zur Entwicklung neuer Therapiestrategien dar. Bisherige Betrachtungen von EMT-Markern bezogen sich meist auf Primärtumore oder Glioblastom-Zelllinien.

Meine Arbeit soll einen Vergleich von Primär- und Rezidiv-Tumorpaaren hinsichtlich ihrer EMT-Signatur vornehmen. Ziel ist es, dadurch Einblicke in die Dynamik des Prozesses im Rahmen der Pathogenese des Glioblastoms zu erhalten. Um dies zu realisieren habe ich Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, *Real-Time* PCR) durchgeführt. Dem schloss sich die morphologische Untersuchung relevanter EMT-Marker im Gewebe an, bei der Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung mikroskopisch verglichen wurden.

In einem zweiten Teil der Arbeit habe ich das EMT-Genexpressionsprofil von Glioblastom-Zellen nach Stimulation mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid sowie dem EMT-Induktor TGFβ1 betrachtet. Wieder erfolgte die Begutachtung auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *Real-Time* PCR.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sollen das Verständnis für die EMT erweitern, sowie mögliche Erklärungen für das schlechte Ansprechen auf die Standardchemotherapie liefern.

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenmaterial

Das von insgesamt 17 Patienten in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, entnommene Glioblastom-Material - jeweils Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe - wurde direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die anschließenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die histologische Befundung der Materialien erfolgte durch den Neuropathologen. Die Materialien dienten hierbei zur Isolation der Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure) oder, nach Anfertigung entsprechender Kryostatschnitte, zur Durchführung von Fluoreszenzfärbungen. Das Gewebe selbst und die daraus isolierte RNA wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Die Patienten hatten der Gewebeentnahme sowie der feingeweblichen Untersuchung der Materialien für wissenschaftliche Zwecke zugestimmt. Zudem erfolgte eine Zustimmung zur Verwendung der Patientendaten für wissenschaftliche Zwecke.

Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors war in einer Altersspanne von 49- 76 Jahren angesiedelt und das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 1,5:1.

2.1.2 Zelllinie

Für die Stimulationsversuche in einer kommerziell erhältlichen Tumorzelllinie wurden T98G-Zellen verwendet. Diese entstammten ursprünglich einem männlichen Kaukasier, der im Alter von 61 Jahren operiert wurde. Die Zellen weisen als Besonderheit eine hyperpentaploide Chromosomenzahl auf. Die *European Collection of Cell Cultures* in Salisbury, England, war dabei die Bezugsquelle.

2.1.3 Chemikalien

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Chemikalien, gebrauchsfertige Reagenziensysteme, Geräte und Verbrauchsmaterialien und ihre jeweiligen Bezugsquellen.

Tab. 1: Chemikalien und dazugehörige Bezugsquellen

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton (CH ₃) ₂ CO	Avantor (J.T. Baker), Center Valley, USA
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Chloroform/ Trichlormethan CHCl ₃	ROTH, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat) C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ * 2 H ₂ O	ROTH, Karlsruhe
Ethanol (vergällt) C ₂ H ₆ O	ROTH, Karlsruhe
FKS (fötale Kälberserum), 10%	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Glycin C ₂ H ₅ NO ₂	ROTH, Karlsruhe
Immu-Mount®-Eindeckelmedium	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isopropanol CH ₃ CH(OH)CH ₃	MERCK, Darmstadt
Kaliumchlorid KCl	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	MERCK, Darmstadt
L-Glutamin 1% (200mM)	BIOCHROM AG, Berlin
Methanol CH ₃ OH	Avantor (J.T. Baker), Center Valley, USA
Natriumchlorid NaCl	ROTH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	MERCK, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin 1% (100U/ml)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
<i>Random Hexamer Primer</i> (100ng/μl)	Amersham Biosciences, Teil von GE, Glattbrugg, Schweiz

Sudanschwarz C ₂₉ H ₂₄ N ₆ (1g/100ml, 1% in 70% Ethanol)	ROTH, Karlsruhe
Temozolomid (≥ 98%, angesetzt auf 400µg/ml)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
TGFβ1 (<i>Transforming Growth Factor-β1</i>) (angesetzt auf 10ng/ml)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) C ₄ H ₁₁ NO ₃	ROTH, Karlsruhe
Trypanblau (0,4%)	MERCK, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1%, 10x)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Tween [®] 20 C ₅₈ H ₁₄₄ O ₂₈	MERCK, Darmstadt

2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Die genaue Zusammensetzung der Reagenziensysteme wird durch den Hersteller geschützt und kann daher im Folgenden nicht weiter angegeben werden.

Tab. 2: Gebrauchsfertige Reagenziensysteme und zugehörige Bezugsquellen

Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	Bezugsquelle
DNase (Konzentration.: 1U/µl) DNase-Puffer (10x), DNase <i>Stop</i>	Promega, Madison, WI, USA
dNTP Mix 10mM, 1ml	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>PicoPure[™]</i> , <i>RNA Isolation Kit</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Conditioning Buffer</i> • <i>Extraction Buffer</i> • 70% EtOH • <i>Washing Buffer1</i> • <i>Washing Buffer2</i> • <i>Elution Buffer</i> 	ARCTURUS Bioscience, Mountain View, California, USA
<i>RevertAid[™] H Minus Reverse</i> <i>Transkriptase</i> , Reaktionspuffer (5x) (Konzentration: 200U/µl)	Thermo Scientific, Waltham, USA

TaqMan®-Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Scotland
TRIZol® Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA

Target Assay mix:

Um spezifische c (*copy*)-DNA-Sequenzen im Rahmen der *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan-Methode vervielfältigen zu können, kamen sogenannte *Target Assays* der Firma AB (*applied biosystems*) zum Einsatz. Diese enthalten spezifische *Primer* und Sonden.

Die Sequenzen der aus 15- 30 Basen bestehenden *Primer* müssen jeweils so gewählt werden, dass sie komplementär zu Zielsequenzen der zu vervielfachenden DNA sind. Die exakte Basenanordnung der *Primer* wurde vom Hersteller nicht herausgegeben.

Veröffentlicht wird jedoch eine 25 Basenpaar (Bp)-lange *Context Sequence*, die die 15- 18 Bp-lange Sonden-Sequenz beinhaltet. Die Kontext-Sequenz kann auch selbständig ermittelt werden, dafür gibt der Hersteller die *Assay Location* als Mittelpunkt der Sequenz an. Die Basenanordnung des gesamten Genes aus der Gendatenbank *Nucleotide* des *National Center of Biotechnology Information* kann nun mit den Angaben der *Assay Location* und Sequenzlänge abgeglichen werden.

Die nachfolgende Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten *Target Assays*, die Kontext-Sequenzen, Amplikon-Längen sowie PCR-*Annealing*-Temperaturen. Die *Annealing*-Temperaturen der verschiedenen Primer wurden auf 60°C standardisiert, um das parallele Amplifizieren von verschiedenen DNA-Sequenzen zu ermöglichen.

Tab. 3: *Target Assay* mit Kontext-Sequenz, Amplikon-Länge und *Annealing*-Temperatur

<i>Target Assay</i>	Kontext-Sequenz	Amplikon-Länge (bp)	<i>Annealing</i> -Temperatur
Akirin2 HS- 00363236_m1	GAACAGCCTGCTAGCTATGTTTCAT	92	60° C
β-Catenin HS- 00172016_m1	CCATCGACCAGGGTGCAGAGGACGT	105	60° C
BGN HS- 00156076_m1	GCCTCCCCTCTCCAGGTCCATCCGC	100	60° C

DPN HS- 00950591_m1	AGACAAAATTGAGGCCTATATGGAC	59	60° C
FN1 HS- 00277509_m1	TGTCACCACTCTGGAGAATGTCAGC	88	60° C
GAPDH HS- 99999905_m1	GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT	122	60° C
GFAP HS- 00157674_m1	ACCTGCAGATTTCGAGAAACCAGCCT	75	60° C
Iba1 HS- 00610419_g1	GCTGGATGAGATCAACAAGCAATTC	92	60° C
L1CAM HS- 00240928_m1	GCCGAGGGTGCCCCCAAGTGGCCAA	102	60° C
Pecam1 HS- 00169777_m1	AAAGCTGTCCCTGATGCCGTGGAAA	65	60° C
Snai1 HS- 00195591_m1	GACTCTAATCCAGAGTTTACCTTCC	66	60° C
Snai2 HS- 00950344_m1	TTAGAACTCACACGGGGGAGAAGCC	86	60° C
TGFβ1 HS- 00171257_m1	ACCCACAACGAAATCTATGACAAGT	63	60° C
TGFβR1 HS- 00610319_m1	AGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTG	126	60° C
TGFβR2 HS- 00234253_m1	GCTCAACCACCAGGGCATCCAGATG	70	60° C
Twist1 HS- 01675818_s1	CCATGTCCGCGTCCCCTAGCAGGC	85	60° C
Vimentin HS- 00185584_m1	CTCCGGGAGAAATTGCAGGAGGAA	73	60° C

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tab. 4: Geräte und Verbrauchsmaterial inklusive ihrer Bezugsquellen

Geräte und Verbrausmaterialien	Bezugsquelle
Autoklav (Lösungen)	Goessner, Hamburg
Autoklav (S2 Abfall)	Syntec, Hamburg
Brutschrank, Heracell 240	Hereaus GmbH, Langenselbold
Digitalkamera, AxioCam MRm	Carl Zeiss GmbH, Jena
Einmalpipette (10ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Eismaschine: AF-10	Scotsman, Glasgow, Schottland
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss GmbH, Jena
Fluoreszenzmikroskop Observer.Z + ApoTome.2, Power Supply 232	Carl Zeiss GmbH, Jena
Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln
Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gefrierschrank	Kryotec, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr
Kühlschrank	National Lab GmbH, Mölln
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler®	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwachbach
Messzylinder	Duran/Schott-Glas, Mainz
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss GmbH, Jena
optische Folie	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR-Detektionssystem, <i>iQ5™ Multi Color real-time PCR Detection System + Laptop</i> und <i>iCycler Optical System Power Supply</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH- Meter: WTW, pH 526	WTW, Weilheim
Photometer, Ultrospec 3100 pro	Amersham Bioscience Europe GmbH
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstadt AG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,2ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt AG, Nürnberg

Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Ultra-Turrax®T25 <i>basic</i>	IKA- Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortexer, REAX top	Heidolph, Schwachbach
96-Well-Platten	Sarstadt AG, Nümbrecht
6-Well-Platten	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Waage EW600-2M	KERN & Sohn GmbH, Balingen
Waage CP224S-OCE	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstadt AG, Nümbrecht
Zentrifuge, Biofuge pico	Hereaus GmbH, Osterode
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg

Alle weiteren nicht näher bezeichneten Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprechen dem üblichen Standard.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
BSA/ 0,2% Glycin in TBS	200ml TBS 0,2g BSA 0,4g Glyzin
PBS (<i>Phosphored buffered saline</i>)	pH 7,2, für 3l 0,6g KCl 24g NaCl 4,32g Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O 0,72g KH ₂ PO ₄
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	pH 7,5, für 5l 500ml Stammlösung (6,1g TRIS, ad 1000ml ddH2O (pH 7,6)) 38,25g NaCl ad 5000ml ddH2O
TBST	1l TBS 1000µl Tween®20

2.1.7 Antikörper

Für die Fluoreszenzfärbungen der Tumorgewebeschnitte kamen die in Tabelle 6 aufgelisteten Antikörper zum Einsatz.

Tab. 6: Antikörper der Immunfluoreszenzfärbungen mit Bezugsquelle

Antikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488, A21202 <i>labeled Donkey Anti-mouse IgG (H+L)</i> Konzentration: 2mg/ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 555, A31570 <i>labeled Donkey Anti-mouse IgG (H+L)</i> Konzentration: 2mg/ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
β -Catenin, 610153 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 250 μ g/ml	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD11b (Integrin α M (44)), sc-1186 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 200 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, inc., Heidelberg
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) C ₁₆ H ₁₅ N ₅ *2HCl Konzentration: 10mg/ml	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Desmoplakin 1& 2, 651109 <i>Monoclonal mouse, IgG2b</i>	Progen Biotechnology GmbH, Heidelberg
FAB, 715-007-003 <i>Affini Pure Fab Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)</i> Konzentration: 1,3mg/ml	Jackson Immuno Research Laboratories, inc., West Grove, PA, USA
GFAP, #MAB3402 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 1mg/ml	Merck Millipore, Darmstadt
L1CAM	Prof. Gerd Moldenhauer, DKFZ Heidelberg
Twist1, H00007291-M03 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 1mg/ml	Abnova, Taipei, Taiwan
Vimentin (V9), sc-6260 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 200 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, inc., Heidelberg
vWF (F8/44/20) (von-Willebrand-Faktor), sc-53465 <i>Monoclonal mouse, IgG₁</i> Konzentration: 200 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, inc., Heidelberg West Grove, PA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Um Rückschlüsse auf die Genexpression verschiedener Marker im Patientengewebe und in den Zelllinien ziehen zu können, wurde die Gesamt-RNA isoliert und im Anschluss die Menge der exprimierten mRNA mittels quantitativer PCR verifiziert.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA kamen dabei zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz, die beide routinemäßig im Labor angewendet werden. Für mengenmäßig größere Zellkulturproben sowie Gewebeproben wird standardmäßig das TRIzol[®]-Verfahren eingesetzt, während geringe Mengen an Material, wie sie in der Zellkultur meist gewonnen werden, mittels Mikrokit behandelt werden.

Das OP-Material sowie drei der Stimulationen-Proben wurden mit dem klassischen Reagenz TRIzol[®] behandelt, einer bereits gebrauchsfertigen Lösung aus Phenol, Chloroform und Guanidiniumisothiocyanat. Chomczynski und Sacchi beschrieben 1987 erstmals das Grundprinzip dieser Einschrittmethode, welches auf der quantitativen Denaturierung von RNAsen durch Guanidinisothiocyanat (GITC), einer sauren Phenolextraktion sowie einer Isopropanfällung beruht⁽⁹⁸⁾.

Die Isolation der RNA aus den stimulierten Zelllinien wurde größtenteils mit dem *PicoPure™ RNA Isolations Kit* durchgeführt, einem Reinigungskit, welcher auf kleinen Silica-Säulen basiert. An der Säulenoberfläche bleibt die RNA in Gegenwart von strukturzerstörenden Salzen, wie Guanidiniumisothiocyanat, haften und kann nach wenigen Wasch- und Zentrifugationsschritten von der Säule gespült und schließlich mit verschiedenen Reagenzien gefällt werden.

Da RNA sehr anfällig für den Abbau durch RNase ist, wurden für die folgenden Arbeitsschritte ausschließlich RNase-freie Materialien verwendet.

2.2.1.1 Durchführung der RNA-Isolation mittels TRIzol[®]:

Bei der Bearbeitung von kryokonserviertem Gewebe musste dieses zunächst mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend mit TRIzol[®] in einem Verhältnis von 100mg Gewebe zu 1ml TRIzol[®] versetzt werden. Das Homogenisat wurde darauf folgend in ein steriles *Cup* überführt. Die Proben der stimulierten Zelllinien waren bereits direkt nach der Stimulation mit TRIzol[®] behandelt und in ein Reaktionsgefäß überführt worden (siehe Kapitel 2.2.7.4.3).

Zur Trennung der löslichen Bestandteile von Zelldetritus wurden die Proben für zehn Minuten bei 12.000rcf (*Relative Centrifugal Force*, relative Zentrifugalkraft) und 4°C

zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Überführung dessen in ein neues *Cup* erfolgte eine Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT).

Nun wurden die Proben mit 200µl Chloroform versetzt und per Hand durchgemischt. Nach einer weiteren Inkubation von zwei bis drei Minuten (RT) folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000rcf und 4°C. Es bildeten sich hierbei drei Phasen aus, eine obere wässrige Phase mit RNA, eine Interphase mit DNA und eine untere Chloroform/Phenol-Phase, die Proteine und Zelldetritus enthielt. Zur weiteren Verarbeitung wurde die obere Phase (circa 60% des Gesamtvolumens) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Ausfällung mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach einer 40-minütigen Inkubation auf Eis und darauf folgender Zentrifugation für fünf Minuten bei 12.000rcf und 4°C setzte sich die RNA in Form eines weißen, gelartigen *Pellets* am Boden des *Cups* ab. Der Überstand des *Pellets* wurde nun entfernt und verworfen, das *Pellet* selbst durch Zugabe von 1ml 75%-igem Ethanol und Vortexen gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 7500rcf und 4°C wurde die dabei entstandene wässrige Phase entfernt und das *Pellet* für fünf bis zehn Minuten getrocknet. Nach Lösen in RNase-freiem ddH₂O (zweifach destilliertes Wasser), abhängig von der Materialmasse zwischen 30 und 50µl, mehrmaligem Durchmischen und anschließender Inkubation für zehn Minuten bei 58°C, konnte die gewonnene RNA nun bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.2.1.2 Durchführung der RNA-Isolation mittels *PicoPure™ RNA Isolations Kit*:



Abb. 1: *PicoPure™*, modifiziert nach Benutzerhandbuch Firma Arctur

Zunächst wurden die RNA-Reinigungssäulen (Abb. 1) durch Zugabe von 250µl *Conditioning Buffer* (1x), 5-minütige Inkubation und anschließende Zentrifugation bei 16.000rcf für eine Minute vorbereitet. Die Zellproben wurden mit 50µl 70%-igem Ethanol versetzt (in äquivalentem Volumen zum *Extraction Buffer*) und dabei durch mehrmaliges Aufpipettieren gemischt. Im Anschluss wurden die Proben auf die Säulen gegeben. Die Bindung der RNA an den Filter der jeweiligen Säule konnte durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 100rcf erreicht werden, gefolgt von einer sofort anschließenden 30-sekündigen Zentrifugation bei 16.000rcf, die der Beseitigung von Restflüssigkeit diente. Im Weiteren wurden 100µl *Washing Buffer1* (1x) auf die Säulen gegeben, gefolgt von einer Zentrifugation für eine Minute bei 8000rcf. Dieselbe Prozedur fand daraufhin mit *Washing Buffer2* (1x) statt. Nach diesem Waschgang erfolgte die erneute Zugabe von 100µl *Washing Buffer2*, danach eine

Zentrifugation von zwei Minuten bei 16.000rcf und einer weiteren Minute, die zur Trocknung der Membran und Entfernung aller Reste des *Washing Buffers* führen sollte. Nun wurden die Säulen in ein jeweils neues Reaktionsgefäß überführt, mit 15µl *Elution Buffer* (1x) versetzt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation von einer Minute bei 1000rcf zum gleichmäßigen Verteilen des *Elution Buffers* sowie im sofortigen Anschluss für drei Minuten bei 16.000rcf zur Elution der RNA, konnte die RNA isoliert und im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.2.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung

Um äquivalente Mengen an RNA im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion verwenden zu können, musste der RNA-Gehalt der Proben bekannt sein. Zur Ermittlung der RNA-Konzentration wurde eine photometrische Messung vorgenommen. Hierbei wird die Schwächung von Strahlung bei Durchgang von Materie benutzt, um die Konzentration eines Stoffes in einer Lösung zu bestimmen.

Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260nm, das von potentiell verunreinigenden Proteinen bei 280nm.

Die Quantifizierung der RNA in der Probe errechnet sich aus der Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht 40µl/ml RNA bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1cm. Zur Konzentrationsbestimmung einer RNA-Lösung findet somit folgende Gleichung Anwendung⁽⁹⁹⁾:

$$[1] \quad \text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnung}_{\text{Küvette}} = \text{RNA} [\mu\text{g/ml}]$$

Um eine Aussage über Verunreinigungen der Probe durch Proteine oder Phenol treffen zu können, musste der Quotient aus den Absorptionsmaxima von 260nm und 280nm gebildet werden:

$$[2] \quad \text{Extinktionswert}_{260\text{nm}} / \text{Extinktionswert}_{280\text{nm}}$$

Ein Quotient von 1,8- 2,0 lässt auf eine saubere RNA-Isolierung schließen, während ein Wert kleiner 1,8 auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen, ein Wert größer 2,0 auf eine Verunreinigung mit Phenol hinweist.

Durchführung der Konzentrationsbestimmung:

Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Photometers anhand einer mit *Aqua dest.* gefüllten Küvette auf den Nullwert. Alle zu messenden Proben wurden auf einen Gehalt von 1:100 (5µl RNA-Isolat zu 495µl *Aqua dest.*) verdünnt und im Anschluss daran bei 260nm und 280nm nacheinander gemessen.

2.2.3 DNA-Verdau und Herstellung von cDNA

Da ausschließlich cDNA oder DNA durch die quantitative *Real-Time* PCR detektiert werden kann, musste die aus den Tumormaterialien und Zellkulturen gewonnene Gesamt-RNA durch Reverse Transkription in cDNA überführt werden. Dies erfolgte mittels *RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase*.

Vor der Herstellung der cDNA erfolgte ein DNA-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA, da diese sonst im Rahmen der PCR eine Fehlerquelle darstellen würde. Da beide Arbeitsschritte im Gradienten-Cycler durchgeführt wurden und einander angeschlossen waren, werden sie im Folgenden auch im direkten Übergang abgehandelt.

Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA:

Zur Herstellung identischer Konzentrationen aller Proben und Erreichen des für diesen Arbeitsschritt geforderten Mengenverhältnisses wurden Verdünnungen von 2µg RNA ad 7µl *Aqua bidest.* angefertigt. Im Falle der mit TRIzol® gewonnenen RNA musste das dafür einzusetzende RNA-Volumen (x) zuerst aus den ermittelten Konzentrationen der Proben (RNA) berechnet werden ($2\mu\text{g} / \text{RNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = x [\mu\text{l}]$). Von der mit *PicoPure™ RNA Isolations Kit* isolierten RNA konnten direkt 7µl verwendet werden; kein weiteres Verdünnen war mehr erforderlich.

Zu jeder RNA-Probe wurde ein *MasterMix* bestehend aus je 1µl DNase-Puffer (10x) sowie 1µl DNase (1u/µl) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 37°C und im Anschluss die Zugabe von jeweils 1µl EDTA (20mM, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat) zum Stoppen des Verdauungsprozesses. Bei 65°C erfolgte eine weitere Inkubation für zehn Minuten.

Herstellung von cDNA (reverse Transkription):

Den Proben wurden nun jeweils 2µl *Random Hexamer-Primer*-Gemisch - auf das Verhältnis von 1:10 verdünnt – hinzugefügt. Dieses Gemisch besteht aus willkürlich ausgewählten kurzen Oligonukleotidsequenzen, welche über die gesamte Länge der RNA unspezifisch binden und somit der Reversen Transkription als Startpunkt dienen. Es erfolgte eine

Inkubation von fünf Minuten bei 70°C, um ein Schmelzen der RNA-Sekundärstrukturen zu ermöglichen. Direkt im Anschluss kühlten die Proben zwei Minuten auf Eis aus. Nach kurzer Zentrifugation der Proben bei 10.000ref wurden jeweils 8µl *Mastermix* hinzugefügt.

Der *Mastermix* enthielt die folgenden Komponenten:

Tab. 7: Ansatz zur Herstellung von cDNA

Volumen	Reagenz
4µl	Reaktionspuffer (5x)
2µl	dNTP- Mix (10mM)
1µl	ddH ₂ O
1µl	Reverse Transskriptase

Es folgten nacheinander Inkubationen von 10 Minuten bei 25°C (*Annealing*), 60 Minuten bei 42°C (Elongation) und schließlich 10 Minuten bei 70°C (Denaturierung der Reversen Transkriptase), um die Reaktion zu beenden. Erneut wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gelegt. Durch Zugabe von 20µl ddH₂O konnte schließlich eine Endkonzentration der cDNA-Verdünnung von 50ng/µl erreicht werden, in der die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C stattfand. Die durch Reverse Transkription hergestellte cDNA konnte nun im Weiteren als *Template* für die PCR dienen.

2.2.4 Quantitative *Real-Time* PCR (qPCR)

Nach Isolierung der RNA, photometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung sowie dem genomischen DNA-Verdau und der Reversen Transkription waren die Voraussetzungen zur Untersuchung der Probe mittels quantitativer *Real-Time* PCR erfüllt.

Die quantitative *Real-Time* PCR stellt eine sensitive, reproduzierbare und spezifische Methode dar, welche die Expression eines Genes mittels Echtzeit-PCR nachweist. Im Unterschied zur konventionellen PCR ermöglicht die *Real-Time*-Methodik eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte sowie deren Visualisierung. Die Quantifizierung und Visualisierung werden dabei mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen realisiert, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, lassen sich über die Fluoreszenzzunahme direkte Rückschlüsse auf die Zunahme der PCR-Amplifikate

ziehen. Zur Auswertung wird die logarithmisch-lineare Phase des Fluoreszenz-Anstiegs verwendet, da hier optimale Reaktionsbedingungen angenommen werden. Somit liefert jeder einzelne Zyklus bereits Informationen zur quantitativen Auswertung.

Die hier verwendete Methode basierte auf dem TaqMan-Prinzip und wurde mittels eines „*iQ5™ Multi Color Real-Time PCR Detection System*“, einer Kombination aus *Thermocycler* und Fluoreszenzoptik durchgeführt. Dieses homogene System ermöglicht die Amplifikation und die simultane Messung der Fluoreszenzzunahme, somit den Nachweis des PCR-Produktes. Die Quantifizierung der PCR-Amplifikate wurde durch softwaregestützte Berechnung des Fluoreszenzschwellenzyklus, auch *Cycle of Threshold*, oder C_T -Wert genannt, angegeben. Dieser Wert beschreibt die Zykluszahl, bei der die Reporterfluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert, für diese Arbeit standardmäßig 340,19, überschreitet. Vorzugsweise wurde ein *Threshold*-Wert gewählt, der in der logarithmischen Amplifikationsphase aller Proben lag. Je höher der C_T -Wert einer Probe ausfällt desto geringer ist der Gehalt an mRNA der untersuchten Zielsequenz.

Für die TaqMan-Methode wird dem Ansatz der PCR zusätzlich zu den für die Amplifikation erforderlichen spezifischen *Primern* eine sequenzspezifische Hybridisierungs-sonde zugegeben, die an die zu amplifizierende cDNA bindet. Diese TaqMan-Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen *Quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist, der die Extension dieses Endes während der PCR vermeiden soll. Wird die intakte TaqMan-Sonde durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt, so kommt es durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) aufgrund der räumlichen Nähe zum *Quencher* zur Unterdrückung des Reporter-Farbstoffes.

Zunächst hybridisiert die Sonde während der PCR mit den *Primern* an den Matrizen-Strang, sie wird jedoch im Rahmen der Extensionsphase durch Aktivierung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der TaqMan-Polymerase hydrolysiert. Dieser Prozess führt zu einer Aufhebung der räumlichen Nähe von Reporter und *Quencher* und damit des FET. Somit steigt entsprechend der Akkumulation der PCR-Amplifikate die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus der PCR. Da nicht-hybridisierte freie Sonden keine Spaltung erfahren, ist das entstehende Fluoreszenz-Signal sequenzspezifisch und zu jedem Zeitpunkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Um einen besseren Vergleich der C_T -Werte der Proben ermöglichen zu können, wurde zusätzlich zu den spezifischen *Primern* auch jeweils auf den Gehalt des Haushaltgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in einem eigenen Ansatz untersucht.

Dieses Haushaltsgen soll als nicht reguliertes Gen unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und diene daher als interner Standard. Für jeden *Primer* wurden sogenannte *no-template-controls* angefertigt, Negativkontrollen, die bei ordnungsgemäßer Arbeitsweise keine PCR-Amplifikate aufweisen sollten, ansonsten jedoch als Zeichen einer *Primer*-Verunreinigung interpretiert werden können. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Durchführung der PCR:

Vor der Verwendung der Proben wurden erneut Verdünnungen der cDNA mit ddH₂O von 1:10 angefertigt, um einen cDNA-Gehalt von 10ng in jedem *Well* zu erreichen.

Auf jede 96-*Well*-Platte wurden nun zunächst jeweils 2µl cDNA-Verdünnung pro *Well* als Doppelbestimmung vorgelegt. Es folgte die Zugabe von jeweils 18µl eines *Primer*-spezifischen Reaktionsansatzes. Somit resultierte ein Gesamtvolumen von 20µl pro *Well*.

Der Reaktionsansatz wird in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Ansatz für TaqMan-PCR

Volumen	Reagenz
10µl	TaqMan <i>Universal Master Mix</i>
7µl	ddH ₂ O
1µl	<i>Target Assay Mix</i>

Alle cDNA-Proben wurden jeweils auf den Gehalt der folgenden *Primer* untersucht:

Akirin2, β-Catenin, BGN, Desmoplakin, Fibronectin1, GAPDH, GFAP, Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*), L1CAM, Pecam1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*), Snail1, Snail2, TGFβ1, TGFβR1, TGFβR2, Twist1, Vimentin.

Für jeden *Primer* erfolgte, wie zuvor bereits beschrieben, eine Negativkontrolle. In die hierfür vorgesehenen *Wells* wurde daher ausschließlich der jeweilige *Primer*-spezifische Reaktionsansatz ohne cDNA pipettiert. Für die Untersuchung von GAPDH fand zusätzlich eine Positivkontrolle statt, um den internen Standard zu validieren.

Schließlich wurden die Platten mit einer optischen Folie verschlossen, zur Analyse in das „iQ5™ *Multi Color Real-Time PCR Detection System*“ eingelegt und das Programm am hierfür vorgesehenen Laptop gestartet.

Das Programm beinhaltet die folgenden Schritte:

Tab. 9: Real-Time PCR-Programm

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Prozessbeschreibung
1		30s	95°C	Denaturierung
2	2	1min	95°C	“_“
3 Stufe1		2min	50°C	UNG (Uracil N-Glykosylase)-Aktivierung
Stufe 2		10min	95°C	Polymerase-Aktivierung
4 Stufe1	40	15s	95°C	Denaturierung
Stufe 2	40	1min	60°C	Annealing und Kettenverlängerung

2.2.5 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte

Wie bereits zuvor erwähnt, sollten die ermittelten Genexpressionswerte aller Marker nicht nur rein quantitativ erfasst, sondern zusätzlich in Relation zu der GAPDH-Expression der gleichen Probe gesetzt werden.

Diese Vorgehensweise ermöglichte schließlich den Vergleich zwischen den relativen Genexpressionen im Primärtumorgewebe und Rezidiv sowie zwischen den unterschiedlich stimulierten Proben der Zelllinien.

Die relative Quantifizierung erfolgte über die Ermittlung der sogenannten ΔC_T -Werte, deren Berechnung folgende Formel zugrundeliegt:

$$[3] \quad \Delta C_{T_p} = ({}_1C_{T_p} + {}_2C_{T_p}) / 2 - ({}_1C_{T_{GAPDH}} + {}_2C_{T_{GAPDH}}) / 2$$

Dabei steht C_{T_p} für die erforderlichen *Threshold*-Zyklen der jeweiligen *Primer*-Ansätze und $C_{T_{GAPDH}}$ dementsprechend für die *Threshold*-Zyklen des GAPDH-Ansatzes, die zur Überschreitung des festgelegten Schwellenwertes führen. Die Zahlen 1 und 2 stellen die Doppelbestimmungen der jeweiligen Probe da, aus denen somit jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Der Mittelwert des C_T -Wertes von GAPDH wurde jeweils von den Mittelwerten der anderen *Primer*-Ansätze subtrahiert um schließlich den ΔC_{T_p} -Wert des jeweiligen *Primer*-Ansatzes zu erhalten.

Da sich der ΔC_T -Wert umgekehrt proportional zu Fluoreszenzzunahme der Probe verhält, steht er in diesem Verhältnis auch zu den PCR-Amplifikaten. Durch den cDNA-Gehalt von 10ng pro *Well* entspricht eine Zunahme des ΔC_T -Wertes um den Faktor 3,3 einer Abnahme der relativen Genexpression um den Faktor 10^{-1} .

Zur weiteren Auswertung der PCR-Ergebnisse wurde im Rahmen der Stimulationen der n-fache Unterschied der Genexpression zwischen den unterschiedlich stimulierten Zellen nach folgender Formel ermittelt:

$$[4] \quad \text{n-facher Unterschied}_p = 2^{-\Delta\text{CT}_p \text{ stimuliert}} / 2^{-\Delta\text{CT}_p \text{ unstimuliert}}$$

Der n-fache Unterschied p , der für jeden Marker (P, *Primer*-Ansatz) in allen Stimulationsversuchen berechnet wurde, stellt also die n-fache Über- oder Unterexpression der untersuchten Marker nach stattgefundener Stimulation dar. Es wird das Verhältnis der ΔC_T -Werte von unstimulierter (ΔCT_p unstimuliert) zu stimulierter (ΔCT_p stimuliert) Probe gebildet.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels quantitativer *Real-Time* PCR konnte ein Eindruck über Unterschiede der Expression verschiedener EMT-Marker zwischen Primärtumor und Rezidiv gewonnen werden. Allerdings enthielt das hierfür genutzte Gewebe natürlich verschiedene weitere Zelltypen zusätzlich zu den Tumorzellen. Um die Ergebnisse der PCR weitergehend interpretieren zu können und einen Eindruck über die Lokalisation der Marker im Gewebe zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Bei dieser werden Proteine über *gelabelte* Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und schließlich unter einem Mikroskop beurteilt. Bei einer Doppelfärbung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, werden zwei unterschiedliche Primärantikörper genutzt um zwei verschiedene Proteine zu detektieren. Als erste Primärantikörper wurden vier der bereits mittels PCR untersuchten EMT-Marker eingesetzt (β -Catenin, Desmoplakin, L1CAM und Twist1), als zweite Primärantikörper dienten Marker für Mikroglia/Makrophagen (CD11b), Astrozyten/ Tumorzellen (GFAP) und Endothelzellen (vWF, von-Willebrand-Faktor). Das Spektrum an im Gewebe enthaltenen Zellen sollte durch die zweite Gruppe der primären Antikörper abgedeckt werden.

Die Färbungen können mögliche Koexpressionen aufzeigen und auch eventuell vorhandene morphologische Unterschiede zwischen Primärtumor und Rezidiv eines Patienten-spezifischen Glioblastoms sichtbar machen.

Von den soliden Tumormaterialien wurden dafür Kryostatschnitte mit einer Dicke von 5 μm auf „*SuperFrostPlus*“ Objektträger aufgebracht.

2.2.6.1 Antikörpertitrierung

Bevor die eigentlichen Färbungen angefertigt wurden, erfolgte eine Titrierung der Antikörper zur Bestimmung der Verdünnung mit den besten Färbereigenschaften. Dafür wurden *Single*-Färbungen mit den ersten primären Antikörpern in unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt, die im Anschluss durch Mikroskopieren verglichen wurden.

Die Verdünnungen der zweiten Primärantikörper wurden als Erfahrungswerte aus anderen Projekten übernommen. Die Verdünnungen der Sekundärantikörper richteten sich dabei nach den Empfehlungen des Herstellers.

Um auch Unterschiede zwischen den Gewebeschnitten der Patienten zu berücksichtigen, kamen für die Antikörpertitrierung Schnitte zweier unterschiedlicher Patienten zur Verwendung.

2.2.6.1.1 Durchführung der Antikörpertitrierung

Nachdem die Schnitte für zehn Minuten in einer -20°C kalten Mischung aus Aceton und Methanol (Verhältnis 1:1) bei Raumtemperatur (RT) fixiert wurden, erfolgte das dreimalige Waschen der Proben in TBST-Puffer (*Tris-buffered saline* mit Tween®, 1x) für jeweils zehn Minuten. Danach wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe, 20% und 70% Ethanol, inkubiert und schließlich für zehn Minuten in Sudanschwarz (1% gelöst in 70%igem Ethanol) gelagert, beides bei Raumtemperatur. Sudanschwarz diente dabei zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Im Anschluss wurden die Schnitte zwei- bis dreimal in 70%iges Ethanol getaucht und schließlich wieder zwei Minuten in 20%igem Ethanol inkubiert. Dem folgten erneut drei Waschgänge mit TBST (1x) für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Durch Benetzen der Schnitte mit 0,1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) / 0,2% Glycin in TBS (1x) und eine Einwirkzeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, wurden erneut unspezifische Bindungspartner blockiert.

Für den jeweils zu untersuchenden Primärantikörper wurden nun unterschiedliche Verdünnungen mit TBST (1x) angefertigt, die im Anschluss bis zur vollständigen Benetzung auf die Gewebeproben gegeben wurden.

Tabelle 10 zeigt die dabei verwendeten Konzentrationen der Antikörper. Die Gewebeschnitte inkubierten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Tab. 10: Verdünnung der ersten Primärantikörper zur Antikörpertitrierung

erster Primärantikörper	eingesetzte Verdünnungen mit TBST
β-Catenin	1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:500
Desmoplakin	pur, 1:1, 1:2

L1CAM	1:100, 1:200, 1:400
Twist1	1:100, 1:250, 1:500
Vimentin	1:50, 1:100, 1:200

Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal mit TBST (1x) für zehn Minuten gespült (RT) und mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST (1x) versehen. Alle weiteren Schritte erfolgten in abgedunkelter Umgebung, um die Präparate vor Lichteinfluss zu schützen. Die Deckgläschen wurden bei 37°C eine Stunde in den Inkubator gestellt.

Zur Entfernung der Antikörperlösung schlossen sich ein Waschgang mit TBST (1x) sowie zwei Waschgänge mit TBS (1x) für jeweils zehn Minuten (RT) an. Der Wechsel auf den Puffer TBS war dabei erforderlich, da das zur Färbung der Kerne verwendete 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) in TBS (1x) gelöst vorlag. Es handelt sich dabei um einen blau fluoreszierenden Farbstoff, der in die kleine Furche der DNA interkaliert und Licht bei einer Wellenlänge von 358nm emittiert. Die Schnitte wurden nun dreißig Minuten in der 333µ-molaren DAPI-Lösung inkubiert (RT). Nach dreimaligem Spülen für jeweils zehn Minuten in TBS (1x) bei Raumtemperatur sowie kurzem Eintauchen in *Aqua dest.* zur Entsalzung erfolgte das Eindeckeln der Gewebeschnitte mittels Immu-Mount®-Eindeckelmedium.

Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden bei -20°C konnten die gefärbten Schnitte ausgewertet werden. Auch die weitere Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei -20°C.

2.2.6.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Die Fluoreszenzdoppelfärbung der EMT-Marker erfolgte zunächst entsprechend der Antikörpertitrierung (2.2.6.1.1), wobei nun die Verdünnungen der Antikörper, welche die besten Färbereigenschaften aufgewiesen hatten, zum Einsatz kamen.

Die präferierten Konzentrationen sind Tabelle 11 aufgelistet.

Tab. 11: Verdünnungen der ersten Primäantikörper zur Doppelfärbung

erste Primäantikörper	eingesetzte Verdünnungen mit TBST
β-Catenin	1:150
Desmoplakin	pur
L1CAM	1:100

Twist1	1:500
Vimentin	1:50

Nach Einwirkung des ersten Sekundärantikörpers bei 37°C differierten die Arbeitsschritte der Antikörpertitrierung und Doppelfärbung.

Bei der Doppelfärbung schlossen sich zur Entfernung der Antikörperlösung drei 10-minütige Waschgänge mit TBST (1x) an (RT). Da es sich bei allen Primärantikörpern um Erzeugnisse aus der gleichen Spezies (Maus) handelte, musste vor Zugabe des zweiten Primärantikörpers eine Blockierung der noch freien Bindungsstellen erfolgen, der sogenannte FAB-Schritt. Hierbei wurden die Schnitte mit *Affini Pure Fab Donkey Anti-Mouse IgG* in einer Verdünnung von 1:1000 mit TBST (1x) für eine Stunde inkubiert (RT). Nach abermals dreimaligem Waschen der Schnitte für je 10 Minuten in TBST (1x, RT), wurde der entsprechende, in TBST (1x)-gelöste, zweite Primärantikörper hinzugegeben und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die verwendeten zweiten Primärantikörper mit der jeweils eingesetzten Konzentration sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Verdünnungen der zweiten Primärantikörper zur Doppelfärbung

zweite Primärantikörper	eingesetzte Verdünnungen mit TBST
CD11b	1:100
GFAP	1:500
vWF	1:1000

Nach der Inkubation wurden die Schnitte wiederum dreimal in TBST (1x) für 10 Minuten gewaschen (RT). Im Anschluss konnte der zweite Sekundärantikörper (Alexa Fluor 555) in einem Verhältnis von 1:1000 in TBST (1x) gelöst, auf die Deckgläschen gegeben werden. Für eine Stunde wurden die Schnitte bei 37°C in einer feuchten Kammer im Inkubator behandelt.

Das weitere Vorgehen entsprach wieder dem der Antikörpertitrierung, bei der nach drei Waschgängen, einmal in TBST (1x), zweimal in TBS (1x), die Kernfärbung und schließlich die Eindeckelung mittels Immu-Mount® folgten.

Entsprechende Negativkontrollen wurden analog ohne Verwendung der Primärantikörper durchgeführt.

Im Anschluss an die Färbung erfolgte die Mikroskopie mittels zweier Fluoreszenzmikroskope (Axiovert 200, Observer.Z), eines dabei ausgestattet mit Apotom. Durch eine integrierte digitale Kamera konnten repräsentative Aufnahmen angefertigt werden.

2.2.7 Stimulation der Zelllinie T98G

Die Stimationsversuche wurden jeweils auf 6-Well-Platten durchgeführt.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche.

Tab. 13: Übersicht über die Stimulationen mit Temozolomid und TGFβ1

Stimulans	Zelllinie	Stimulationsdauer	Versuchsanzahl
Temozolomid gelöst in DMSO (400µg/ml)	T98G	24h	5
		48h	7
TGFβ1 (10ng/ml)	T98G	24h	8
		48h	9

2.2.7.1 Kulturbedingungen und Kultivierung

Die Arbeit mit den Zellkulturen fand in sterilen Zellkulturflaschen eines Volumens von 75cm³ unter einer Sterilbank statt. Die zu verwendenden Materialien wurden über einem Bunsenbrenner abgeflammt.

Zur Kultivierung befanden sich die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 5%-iger CO₂-Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90%. Als Wachstumsmedium diente die Zusammensetzung aus DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 10% FKS (fötales Kälberserum), 1% L-Glutamin (200mM) und 1% Penicillin/ Streptomycin. Der relativ hohe Anteil von FKS sollte dabei das Zellwachstum und die Adhärenz der Zellen fördern, die für die Zellkultivierung essentiell sind. Dies ermöglicht der große Gehalt an Proteinen, darunter Wachstumsfaktoren, den FKS aufweist.

Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin sollten eine Kontamination der Zellkultur durch Bakterien verhindern, während L-Glutamin als universeller Aminogruppendonator fungierte und daher in seiner Konzentration im Medium extern erhöht wurde. Das Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt.

2.2.7.2 Aussaat der Zellen

Nach dem Absaugen des Kulturmediums mit einer sterilen Glaspipette wurden die Zellen einmal mit PBS (*Phosphored buffered saline*, 1x) gespült, um Kulturmedium-Rückstände zu beseitigen. Das PBS (1x) wurde schließlich entfernt und es folgte die Zugabe von Trypsin (1x), welches durch ein kurzes Schwenken gleichmäßig, alle Zellen bedeckend, verteilt

wurde. Die überschüssige Flüssigkeit wurde im Anschluss abgesaugt und die Zellkulturflaschen für drei bis fünf Minuten im Brutschrank gelagert. Durch Abklopfen konnten die Zellen nun vom Flaschenboden gelöst in ein steriles Eppendorfgefäß mit 5ml Wachstumsmedium überführt werden. Das Medium führte dabei zur Inaktivierung des Trypsins. Das Reaktionsgefäß mit den sogenannten trypsinisierten Zellen wurde bei 1400rpm für zehn Minuten abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das zurückbleibende *Pellet* in wenig Kulturmedium resuspendiert.

Um optimale räumliche Bedingungen für die Zellen auf der 6-*Well*-Platte zu ermöglichen, sollte ein *Well* mit 180.000 Zellen bestückt werden. Dies machte zunächst eine Zellzählung erforderlich.

2.2.7.3 Zellzählung

Zur Vorbereitung der Zellzählung wurden 20µl des in Kulturmedium resuspendierten *Pellets* in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde mit einer Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 versetzt, um abgestorbene von vitalen Zellen unterscheiden zu können. Nun konnte die Auszählung durch Lichtmikroskopie (Mikroskop Axiovert 40 CFL) mittels Neubauer Zählkammer, in die das Gemisch pipettiert wurde, vorgenommen werden. Von den unter dem Mikroskop sichtbaren Quadraten der Zählkammer wurden die vier Eckquadrate im inneren großen Quadrat sowie ein weiteres aus dem mittleren Feld zu Auszählung genutzt. Die Berechnung der Zellanzahl pro µl Volumen erfolgte durch die folgende Formel:

$$[5] \quad x / \text{Vol.} = \text{gezählte Zellzahl} / (A \cdot h \cdot \text{Verdünnung})$$

„A“ entspricht dabei der Fläche eines der fünf zuvor ausgewählten Quadrate in der Neubauer Zählkammer, welche sich durch Quadrieren der Kantenlänge von 0,2mm zu 0,4mm² berechnen ließ. Bei einer Höhe (h) der Zählkammer von 0,1mm und einer hier vorliegenden Verdünnung von 1:2 konnte die Zellzahl pro µl Volumen ermittelt werden.

Im Weiteren konnten die 180.000 in Wachstumsmedium gelösten Zellen in jedes *Well* der 6-*Well*-Platte pipettiert werden.

2.2.7.4 Stimulation

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurde das Medium der 6-*Well*-Platte für die Stimulationsversuche gewechselt. Dabei wurde zunächst erneut das alte

Kulturmedium abgesaugt und anschließend zweimalig mit PBS-Puffer (1x) gespült, um Rückstände des Mediums zu entfernen.

2.2.7.4.1 Stimulation mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid

Das für diese Versuchsreihe neu verwendete Medium enthielt 0,8% Temozolomid einer 400µg/ml Stammkonzentration sowie eine Lösung aus DMEM, 0,5% FKS, 1% L-Glutamin (200mM) und 1% Penicillin/ Streptomycin. Diese Lösung wird auch als Mangelmedium bezeichnet. Ursächlich für die Namensgebung ist dabei die geringe Konzentration von FKS, welche eine überschießende Zellproliferation verhindern soll.

Da das Chemotherapeutikum Temozolomid in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst vorlag, wurden zusätzlich Kontrollen mit einer entsprechenden Menge von DMSO ohne Temozolomid im Kulturmedium durchgeführt.

Die Kontrollen waren notwendig, da DMSO selbst eine zellschädigende Wirkung besitzt. Durch diese Vorgehensweise wirkte DMSO auf alle Proben gleichermaßen ein; so konnte die Auswirkung der Stimulation mit Temozolomid durch einen späteren Vergleich von stimulierten und unstimulierten Zellproben betrachtet werden.

Zusätzlich wurden Negativkontrollen mitgeführt, deren Zellen weder mit Temozolomid, noch mit DMSO behandelt wurden. Sie wurden nur mit dem zuvor beschriebenen Mangelmedium versetzt.

2.2.7.4.2 Stimulation mit dem EMT-Induktor TGFβ1

Zur Stimulation der Zelllinie mit dem EMT-Induktor TGFβ1 wurde das neue Medium aus DMEM, 0,5% FKS, 1% L-Glutamin (200mM) und 1% Penicillin/ Streptomycin mit 0,1% TGFβ1 einer 10ng/ml Stammlösung versetzt. Wie bei den Stimulationsversuchen mit Temozolomid wurden Negativkontrollen ohne TGFβ1-Anteil im Mangelmedium durchgeführt. Eine DMSO-Kontrolle war dabei nicht erforderlich, da TGFβ1 in *Aqua dest.* gelöst vorlag.

2.2.7.4.3 Beendigung der Stimulation und Vorbereitung auf die RNA-Isolation

Wie in Tabelle 13 illustriert, wurden die Zellen jeweils für 24 oder 48 Stunden stimuliert. Zur Beendigung der Stimulation wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Zellen anschließend einmalig mit PBS (1x) gespült.

Im Falle einer RNA-Isolierung mittels TRIzol®-Reagenz wurden 800µl TRIzol® auf die *Wells* gegeben und die Platte bis zur weiteren Verarbeitung bei -30°C eingefroren. Am nächsten Tag

konnten die Zellen mit einem Zellschaber von der 6-Well-Platte gelöst und in Reaktionsgefäße überführt werden.

Kapitel 2.2.1.1 beschreibt die weiteren Arbeitsschritte dieser Methode.

In den meisten Fällen erfolgte jedoch, wie eingangs bereits erwähnt, eine Isolation der RNA durch den *PicoPure™ RNA Isolations Kit*. Hierzu wurden die Zellen durch kräftiges Spülen mit PBS (1x) von der 6-Well-Platte gelöst und anschließend in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Über das Zentrifugieren bei 3000rcf für fünf Minuten wurden die Zellen pelletiert; der Überstand konnte im Anschluss entfernt werden (RT). Die Zellen wurden nun behutsam in 50µl *Extraction Buffer* resuspendiert und bei 42°C im Thermomixer für 30 Minuten inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation für zwei Minuten bei 3000rcf (RT) konnten Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

Die Proben wurden zur weiteren Verarbeitung bei -80°C schockgefroren.

Das weitere Vorgehen des Mikro-Kit-Verfahrens wird in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Die zur zweiten Versuchsreihe gehörenden Proben wurden erst nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden ausgewertet. Die dafür erforderlichen Arbeitsschritte entsprachen denen der Verarbeitung nach 24 Stunden.

2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichungen gemäß den üblichen Methoden verwendet. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte einerseits mittels zweiseitigem, gepaarten Student'schen T-Test und andererseits durch Korrelationsanalysen unter Zuhilfenahme des Datenanalyseprogramms „*Graph Pad Prism*“. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p galt ab $p < 0,05$ als statistisch signifikant. Als sehr signifikant wurde ein $p < 0,01$ und als hoch signifikant ein $p < 0,001$ bezeichnet. Die Markierung der jeweiligen Signifikanzgrade erfolgte aufsteigend durch die dargestellten Symbole: *, **, ***.

KAPITEL 3: ERGEBNISSE

3.1 Genexpressionsanalyse von Primär- und Rezidiv-Tumorpaaren auf mRNA-Ebene

Um einen Einblick in den Prozess der EMT in der Pathogenese des Glioblastoma multiforme erhalten zu können wurden 13 Marker mittels quantitativer *Real-Time* PCR auf Genexpressionsunterschiede zwischen soliden Primär- und Rezidiv-Gewebe untersucht.

Wie im Kapitel 2 beschrieben, mussten zunächst die Isolierung der RNA aus den kryokonservierten Gewebeproben (2.2.1), die photometrische Bestimmung ihrer Konzentration (2.2.2), der DNA-Verdau und die Umschreibung in cDNA erfolgen (2.2.3), bevor die Messung der Genexpression auf mRNA-Ebene durchgeführt werden konnte (2.2.4). Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der quantitativen *Real-Time* PCR, bei der jeweils die ΔC_T -Werte, also abgeglichen mit dem internen Standard GAPDH, graphisch zur Darstellung kommen. Wie bereits im Kapitel 2.2.4 beschrieben, stellt ein hoher ΔC_T -Wert dabei eine geringe mRNA-Expression dar, wobei eine 3,3-fache ΔC_T -Wert-Differenz einem 10-fachen Expressionsunterschied des untersuchten Markers entspricht. In den Graphiken wurden die Achsen zur besseren Übersicht so ausgerichtet, dass niedrige ΔC_T -Werte und damit hohe Genexpressionen einem hohen y-Wert des Koordinatensystems entsprechen. Proben, die bei der quantitativen *Real-Time* PCR-Begutachtung nicht nachweisbare C_T -Werte lieferten, sind nachfolgend dementsprechend mit „Unterhalb der Nachweisgrenze“ gekennzeichnet. Die 17 untersuchten Patienten wurden in den Abbildungen jeweils einer konstanten Farbe zugeordnet, um sie in allen Versuchen identifizieren zu können. Primärtumore kommen jeweils links durch ein Kreissymbol zur Darstellung, Rezidive sind rechts davon durch ein Dreieck gekennzeichnet. Wurde die Patientenprobe für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet, so findet sich eine kleine, der Probe zugeordnete Zahl, innerhalb des Symbols. Eine horizontale Linie in Höhe der Probensymbole gibt den arithmetischen Mittelwert der Proben an. Im folgenden Text werden zusätzlich die Irrtumswahrscheinlichkeiten in Form des in Klammern gesetzten „p“ angegeben.

3.1.1 Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Marker auf mRNA-Ebene

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen EMT-Marker *per se* in allen soliden Gewebeproben, ungeachtet, ob Primär- oder Rezidiv-Tumoren, in unterschiedlichen Genexpressionsstärken vorliegen. Die dabei höchste mittlere mRNA-Expression, berechnet aus den gemittelten ΔC_T -Werten zwischen Primär- und Rezidiv-Proben für die einzelnen EMT-Marker, konnte für Vimentin (mittlerer ΔC_T -Wert = -0,46), Fibronectin

(mittlerer ΔC_T -Wert = 2,64) und TGF β 1 (mittlerer ΔC_T -Wert = 3,79) ausgemacht werden. TGF β 2 (mittlerer ΔC_T -Wert = 5,22), Akirin2 (mittlerer ΔC_T -Wert = 5,36), β -Catenin (mittlerer ΔC_T -Wert = 5,86) und BGN (mittlerer ΔC_T -Wert = 6,24) zeigten ebenfalls markante Genexpressionspiegel. Im Gegensatz dazu wiesen die Marker Snail2 (mittlerer ΔC_T -Wert = 8,67), TGF β 1 (mittlerer ΔC_T -Wert = 8,99) und Desmoplakin (mittlerer ΔC_T -Wert = 9,09) niedrigere Genexpressionsstärken auf. Die geringsten Genexpressionspiegel konnten bei L1CAM (mittlerer ΔC_T -Wert = 9,46), Twist1 (mittlerer ΔC_T -Wert = 10,80) sowie Snail1 (mittlerer ΔC_T -Wert = 11,14) beobachtet werden. Insgesamt zeigten sich dabei deutliche interindividuelle Unterschiede des Genexpressionsprofils der Primär- und Rezidiv-Paare. Ein Vergleich der Genexpression des Transkriptionsfaktors Twist1 zwischen Primär- und Rezidiv-Kollektiv zeigte eine statistisch sehr signifikant ($p = 0,003$) geringere Expression im Rezidiv-Gewebe. Dabei lag der mittlere ΔC_T -Wert der Primärtumorproben bei 9,97, der der Rezidive bei 11,63. Ebenfalls eine statistisch signifikant verringerte Genexpression war für die EMT-Marker Snail1 ($p = 0,049$) und Snail2 ($p = 0,037$) auszumachen, deren ΔC_T -Mittelwerte sich für Snail1 von 10,66 auf 11,62, für Snail2 von 8,11 auf 9,22 änderten. Akirin2 hingegen wies keine deutliche Diskrepanz zwischen den ΔC_T -Werten der Primär- und Rezidiv-Tumorpaaire auf, mit einem mittleren ΔC_T -Wert der Primärtumorproben von 5,27, der Rezidive von 5,45.

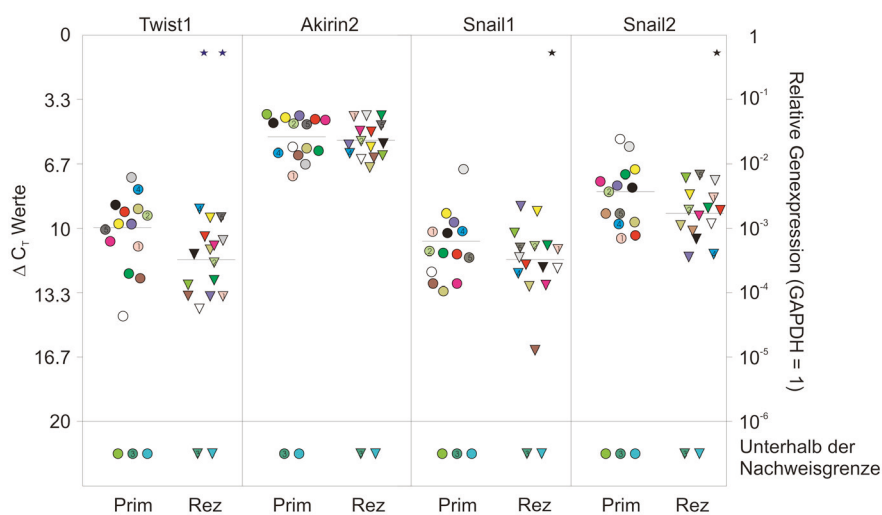


Abb. 2:
Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Twist1, Akirin2, Snail1 und Snail2, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe

Darstellung der mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelten ΔC_T -Werte. Die horizontale Linie in der Mitte des Probenkollektivs gibt deren arithmetischen Mittelwert an, eine kleine Zahl innerhalb des Probensymbols repräsentiert die Zugehörigkeit zur durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung. Ein niedriger ΔC_T -Wert korrespondiert mit einer hohen Expression von mRNA. Aufgrund der logarithmischen Verhältnisse gibt ein 3,3-facher Unterschied des ΔC_T -wertes eine 10-fache Genexpressionsdifferenz (Über- oder Unterexpression) an. Dies

gilt auch für die folgenden Abbildungen dieses Unterkapitels. Twist1, Snail1 sowie Snail2 wiesen statistisch signifikant niedrigere Genexpressionen im Rezidiv-Kollektiv auf, für Akirin2 war dies nicht zu beobachten. $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **.

Während der epitheliale Marker Desmoplakin keine manifesten Unterschiede hinsichtlich der Genexpression zwischen Primarius und Rezidiv aufwies, mit einem mittleren ΔC_T -Wert der Primärtumorproben von 8,96, der Rezidive von 9,20, konnte eine statistisch signifikante Verringerung des Proteoglykans BGN ($p = 0,029$) im Rezidiv beobachtet werden.

Der mittlere ΔC_T -Wert stieg dabei von 5,82 (Primär) auf 6,64 (Rezidiv) an. Auch das aus dem WNT-Signalweg bekannte β -Catenin ($p = 0,017$) war im Rezidiv statistisch signifikant vermindert exprimiert, mit einer Veränderung der ΔC_T -Werte von 5,49 (Primär) auf 6,23 (Rezidiv). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Markern konnte für das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM ($p = 0,046$) eine statistisch signifikant vermehrte Genexpression im Rezidiv beobachtet werden. Dies entsprach einer Verminderung des mittleren ΔC_T -Wertes von 10,35 im Primarius auf 8,57 im Rezidiv. Die Sachverhalte sind in Abbildung 3 dargestellt.

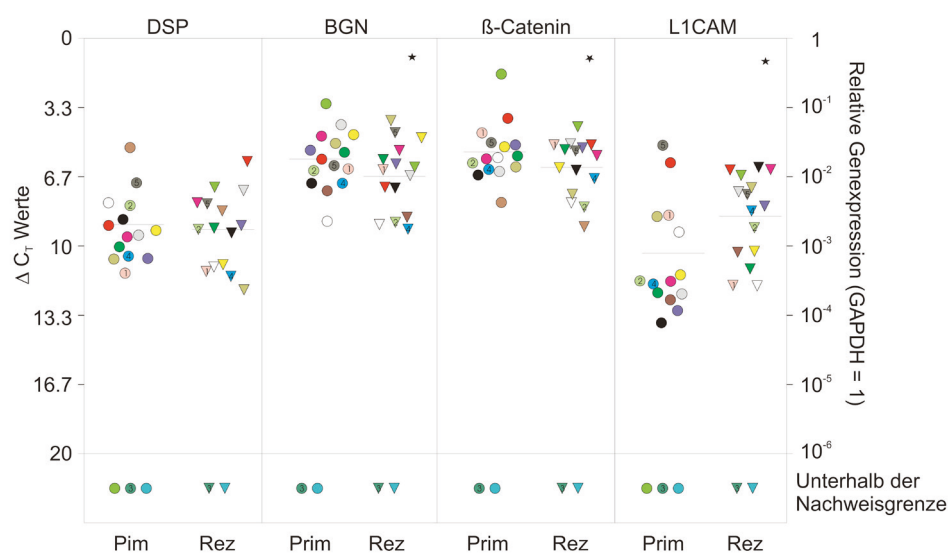


Abb. 3:
Graphische Darstellung der relativen Genexpression von DSP, BGN, β -Catenin und L1CAM, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe

Während die mRNA-Expression von DSP (Desmoplakin) keine statistisch signifikante Veränderung erfuhr, zeigten BGN (Biglykan) und β -Catenin eine verminderte, L1CAM (*cell adhesion molecule*) eine vermehrte Genexpression im Rezidiv-Kollektiv. $p < 0,05$: *.

Die mesenchymalen Marker Fibronectin1 und Vimentin wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Genexpression zwischen den Primär- und Rezidiv-Tumorgewebeproben auf, wie Abbildung 4 illustriert. Die mittleren ΔC_T -Werte lagen dabei im Primärtumorgewebe bei 2,68 für Fibronectin und -0,70 für Vimentin, im Rezidiv bei 2,59 und -0,22.

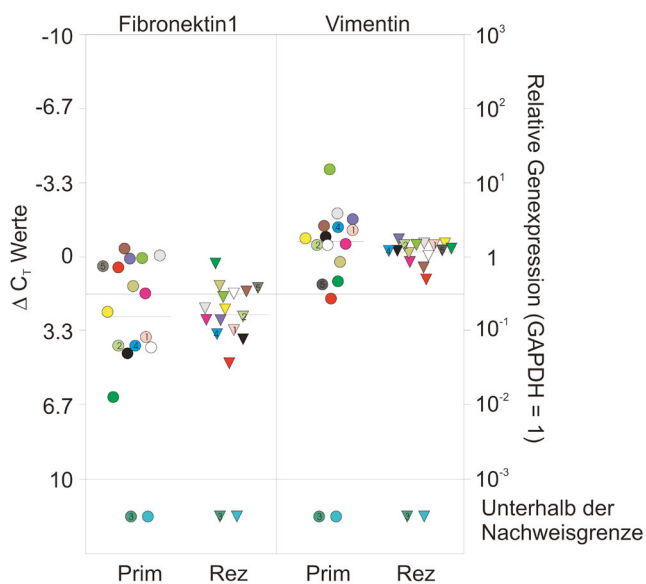


Abb. 4:
Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Fibronectin1 und Vimentin, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe

Für Fibronectin1 und Vimentin konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe ausgemacht werden.

Ebenso konnten, wie in Abbildung 5 dargestellt, keine deutlichen Differenzen der Genexpressionen zwischen den Tumorkollektiven für den EMT-Induktor TGF β 1 und seine Rezeptoren TGF β R1 und TGF β R2 ausgemacht werden. Die mittleren ΔC_T -Werte entsprachen für TGF β 1 3,64 im Primär-Gewebe, 3,94 im Rezidiv-Kollektiv, für TGF β R1 9,01 im Primär-Gewebe und 8,98 im Rezidiv-Kollektiv sowie für TGF β R2 4,98 im Primär-Gewebe und 5,45 im Rezidiv-Kollektiv.

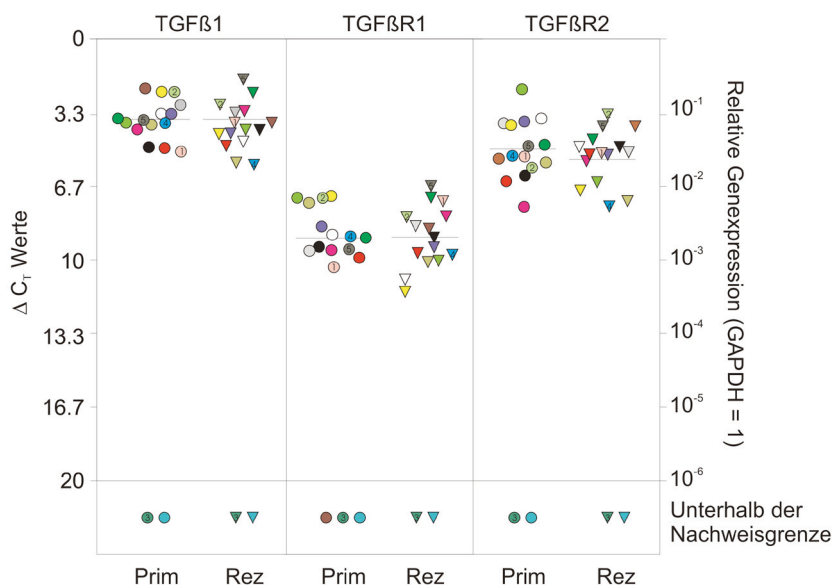


Abb. 5:
Graphische Darstellung der relativen Genexpression von TGF β 1, TGF β R1 und TGF β R2, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe

TGF β 1 (*Transforming Growth Factor*) und seine Rezeptoren wiesen keine statistisch signifikant veränderte Genexpression im Vergleich von Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe auf.

3.1.2 Genexpression von GFAP, Iba1 und Pecam1 auf mRNA-Ebene

Um parallel einen ersten Eindruck über Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung von soliden Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe erhalten zu können, erfolgte die Untersuchung von Markern für gliale Zellen in Form von GFAP, Makrophagen, bzw. Mikroglia durch Iba1 und Endothelzellen mit dem Marker Pecam1. Während das saure Gliafaserprotein (GFAP) vor allem in Gliazellen, dabei als Hauptbestandteil von Intermediärfilamenten im Zytoplasma zu finden ist und dort für die mechanischen Eigenschaften, Beweglichkeit und Zellform verantwortlich sein soll, wird das Kalzium-bindende Protein Iba1 spezifisch in Makrophagen, bzw. Mikroglia exprimiert. Da es zu einer verstärkten Genexpression nach Aktivierung der Zellen kommt wird Iba1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Makrophagen- und Mikroglia-Funktion zugeschrieben⁽¹⁰⁰⁾. Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül Pecam1 befindet sich konzentriert an den Zellkontakten von Endothelzellen, jedoch auch in hohen Mengen auf der Oberfläche von Monozyten, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten. Auf Endothelzellen dient es der Steuerung der Leukozyten-Transmigration⁽¹⁰¹⁾.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der mit den beschriebenen zellulären Markern durchgeführten quantitativen *Real-Time* PCR. Die stärkste Genexpression zeigte dabei GFAP mit einem mittleren ΔC_T -Wert der Primärtumorproben von -4,01, der Rezidive von -3,41. Deutlich niedrigere, dennoch markante Genexpressionen wiesen Iba1 und Pecam1 auf, bei mittleren ΔC_T -Werten der Primär-Tumore von 5,21 für Iba1 und 3,52 für Pecam1, der Rezidive von 5,0 und 4,15. Es ergaben sich zwischen Primär- und Rezidiv-Tumoren keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede der drei zellulären Marker, wobei GFAP eine leichte statistisch nicht signifikante Abnahme der Genexpression im Rezidiv zeigte.

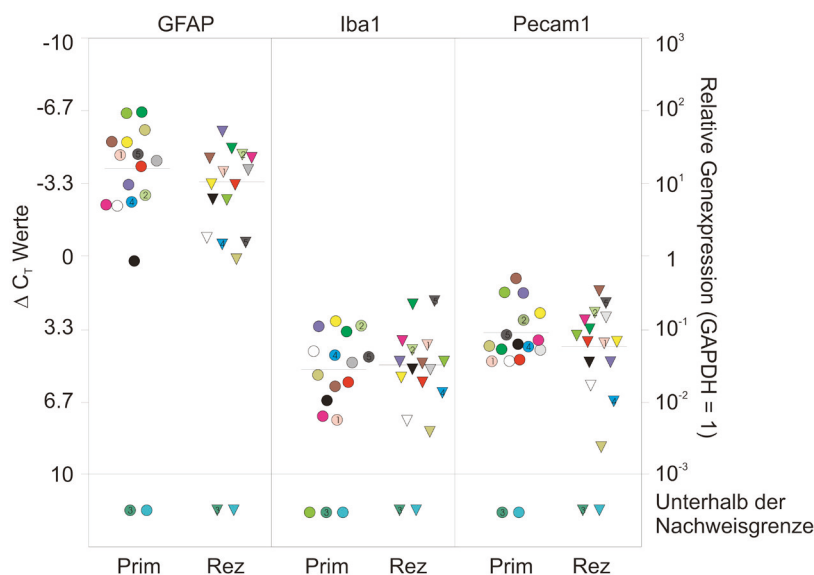


Abb. 6:
Graphische Darstellung der relativen Genexpression von GFAP, Iba1 und Pecam1, jeweils im Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe

Die mRNA-Expression der Marker GFAP (saures Gliafaserprotein), Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*) und Pecam1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von Primär- und Rezidiv-Gewebeproben.

Fazit:

Insgesamt schien die mRNA-Expression einiger EMT-Marker im Vergleich von Primär- und Rezidiv-Tumoren abzunehmen, sichtbar ausgedrückt durch die statistisch signifikant erhöhten ΔC_T -Mittelwerte von Twist1, Snail1, Snail2, Biglykan sowie β -Catenin im Rezidiv-Kollektiv. Das neuroepitheliale L1CAM hingegen wies als einziger Marker eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression im Rezidiv-Gewebe auf. Bezüglich der zellulären Komposition ließen sich zudem in den soliden Primär- und Rezidiv-Tumorgeweben keine deutlichen Unterschiede detektieren.

3.2 Korrelationsanalyse

In einem nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der PCR der EMT-Marker mit den PCR Resultaten der zellulären Marker einer Korrelationsanalyse unterzogen. Diese hatte zum Ziel, mögliche - negative oder positive - Korrelationen der Expression der zellulären Marker mit der der jeweils einzelnen EMT-Marker zu analysieren. Es wurden hierbei mit dem Statistik-Programm „*Graph Pad Prism*“ die ΔC_T -Werte aller epithelialen und mesenchymalen Marker mit jeweils GFAP, Iba1 und Pecam1 als Repräsentanten der zuvor erwähnten Zellentitäten korreliert. Dabei wurde diese Korrelation für das gesamte Kollektiv an Tumorproben und zusätzlich separat für jeweils Primär- und Rezidiv-Gewebe untersucht. Die Ergebnisse sind in Form ihrer statistischen Signifikanzen in den Tabellen 14 und 15 dargestellt (dabei gilt die Irrtumswahrscheinlichkeit: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***).

Insgesamt konnten Korrelationen der Marker vor allem im Rezidiv-Kollektiv ausgemacht werden. Es handelte sich bei allen zu beobachtenden Zusammenhängen um positive Korrelationen. Im Einzelnen zeigten sich folgende Ergebnisse:

Für Akirin2 zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation mit GFAP, Iba1 und Pecam1. Dabei ergab sich für Akirin2 mit GFAP ausschließlich eine Signifikanz hinsichtlich der Rezidive ($p_{\text{rezidiv}} = 0,012$), für Iba1 und Pecam1 zusätzlich eine statistisch signifikante Korrelation im Gesamtkollektiv (Iba1: $p_{\text{gesamt}} = 0,005$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,003$; Pecam1: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,036$). Für Twist1 konnten keine Korrelationen beobachtet werden. Unter den Proteinen der Snail-Familie wies Snail2 einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Mikroglia-Marker Iba1 im Gesamtkollektiv auf ($p_{\text{gesamt}} = 0,041$), für Snail1 waren keine Korrelationen messbar. Das aus den Desmosomen bekannte Desmoplakin korrelierte in den Tumor-Rezidiven sowohl mit GFAP ($p_{\text{rezidiv}} = 0,034$), als auch in den Rezidiven ($p_{\text{rezidiv}} = 0,006$) und im Gesamtkollektiv ($p_{\text{gesamt}} < 0,001$) mit Pecam1. Bei dem kleinen Proteoglykan Biglykan konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang im Gesamt- und Rezidiv-Kollektiv mit jedem der drei untersuchten Marker beobachtet

werden (GFAP: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,002$; Iba1: $p_{\text{gesamt}} = 0,005$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,003$; Pecam1: $p_{\text{gesamt}} = 0,003$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,015$).

Tab. 14: Korrelationsanalyse der ΔC_T -Werte der EMT-Marker im Gesamt-, Rezidiv- und Primär-Kollektiv mit GFAP, Iba1 und Pecam1, Teil I
 „ns“ steht dabei für nicht signifikant. Signifikanzen sind durch Symbole nach folgendem Schema gekennzeichnet: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***. Es handelt sich dabei immer um positive Korrelationen. Die Erklärungen gelten auch für die darauf folgende Tabelle. Abkürzungen: GFAP (saures Gliafaserprotein), Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*), Pecam1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*), DSP (Desmoplakin), BGN (Biglykan).

		Twist1	Akirin2	Snail1	Snail2	DSP	BGN
GFAP	alle	ns	ns	ns	ns	ns	***
	primär	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	rezidiv	ns	*	ns	ns	*	**
Iba1	alle	ns	**	ns	*	ns	**
	primär	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	rezidiv	ns	**	ns	ns	ns	**
Pecam1	alle	ns	**	ns	ns	***	**
	primär	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	rezidiv	ns	*	ns	ns	**	*

Während β -Catenin nur im Gesamtkollektiv mit GFAP signifikant korrelierte ($p_{\text{gesamt}} = 0,027$), konnte keine solche Beobachtung für L1CAM gemacht werden. Die mesenchymalen Marker Fibronectin1 und Vimentin wiesen einen solchen Zusammenhang nur mit dem Endothelmarker Pecam1 auf. Während Fibronectin1 dies sowohl im Gesamtkollektiv ($p_{\text{gesamt}} = 0,016$), als auch im Kollektiv der Primärtumore ($p_{\text{primär}} = 0,005$) zeigte, war eine signifikante Korrelation für Vimentin nur in letzterem zu verzeichnen ($p_{\text{gesamt}} = 0,046$). Die häufigsten Korrelationen konnten für den Transkriptionsfaktor TGF β 1 und seine Rezeptoren ausgemacht werden. Dieser wies eine hoch signifikante Korrelation im Gesamt- ($p_{\text{gesamt}} < 0,001$) und im Rezidiv-Kollektiv ($p_{\text{rezidiv}} < 0,001$) mit GFAP auf. Gleiches zeigte sich auch mit dem Mirkoglia- und dem Endothelmarker, wobei zusätzlich signifikante Zusammenhänge auch im Primär-Kollektiv auftraten (Iba1: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{primär}} = 0,01$, $p_{\text{rezidiv}} < 0,001$; Pecam1: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{primär}} = 0,02$, $p_{\text{rezidiv}} < 0,001$). Ebenfalls konnte bei den Rezeptoren TGF β R1 ($p_{\text{gesamt}} = 0,011$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,006$) und TGF β R2 ($p_{\text{gesamt}} = 0,001$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,005$) eine Korrelation mit GFAP im Gesamt- und Rezidiv-Kollektiv beobachtet werden. Für Iba1 war dies für alle Kollektive auszumachen (TGF β R1: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{primär}} = 0,012$, $p_{\text{rezidiv}} < 0,001$; TGF β R2: $p_{\text{gesamt}} < 0,001$, $p_{\text{primär}} = 0,011$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,015$). Während auch der TGF β R1 eine Korrelation in allen Kollektiven mit Pecam1 aufwies ($p_{\text{gesamt}} = 0,002$, $p_{\text{primär}} = 0,035$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,031$), konnte dies für TGF β R2 nur innerhalb des Gesamt- und Rezidiv-Kollektivs ($p_{\text{gesamt}} = 0,005$, $p_{\text{rezidiv}} = 0,014$) beobachtet werden.

Tab. 15: Korrelationsanalyse der ΔC_T -Werte der EMT-Marker im Gesamt-, Rezidiv- und Primär-Kollektiv mit GFAP, Iba1 und Pecam1, Teil2

Abkürzungen: L1CAM (*cell adhesion molecule*), FN (Fibronektin), TGF β -R (*Transforming Growth Factor β -Receptor*).

	β -Catenin	L1CAM	FN1	Vimentin	TGF β 1	TGF β R1	TGF β R2	
GFAP	alle	*	ns	ns	ns	***	*	**
	primär	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	rezidiv	ns	ns	ns	ns	***	**	**
Iba1	alle	ns	ns	ns	ns	***	***	***
	primär	ns	ns	ns	ns	*	*	*
	rezidiv	ns	ns	ns	ns	***	***	*
Pecam1	alle	ns	ns	*	ns	***	**	**
	primär	ns	ns	**	*	*	*	ns
	rezidiv	ns	ns	ns	ns	***	*	*

Fazit:

Es ergaben sich statistisch signifikante positive Korrelationen bezüglich der mRNA-Expression verschiedener EMT-Marker mit Markern der unterschiedlichen Zellentitäten. Dabei wiesen vor allem Mitglieder der TGF β -Familie, Biglykan und Desmoplakin Korrelationen auf, wobei dies insgesamt im Rezidiv-Kollektiv vermehrt zu beobachten war.

3.3 Gruppenmerkmale

Da überraschenderweise nur ein Teil der EMT-Marker zwischen den Primär- und Rezidiv-Geweben eine statistisch signifikante Änderung ihrer Genexpression erfuhr und innerhalb des jeweiligen Kollektivs große Unterschiede zu beobachten waren, schloss sich eine weitere Analyse der ΔC_T -Werte an, welche die Patientenproben individueller betrachten und dabei die Veränderung der Expressionssignatur für jedes einzelne Patientenprobenpaar überprüfen sollte. Zwei Patientenprobenpaare, die konstant keine mRNA-Expression der verschiedenen Marker aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Zunächst erfolgte die Berechnung des n-fachen Genexpressionsunterschiedes aus den ΔC_T -Werten nach Formel [4] aus Kapitel 2.2.5. Nun wurden den n-fachen Zahlenwerten des Expressionsunterschiedes zwischen Primär- und Rezidiv-Tumoren unterschiedliche Graufarbtöne zugeordnet, siehe Abbildung 7. Ein n-facher Wert von 1 (gleiche Genexpression in Primär- und Rezidiv-Tumor) wurde einer Graustufe von 30% zugewiesen, niedrigere Werte (niedrigere Genexpression im Rezidiv) einer zunehmend helleren Färbung, bis hin zu weiß, welches einem Wert von 0 entsprach. Genexpressionsunterschiede größer als 1 (verstärkte Genexpression im Rezidiv) wurden mit dunkleren Graustufen markiert bis zum Farbton Schwarz, welcher einem 3-fachen Genexpressionsunterschied entsprach. Im Anschluss wurde eine *Heatmap*-ähnliche Gruppierung der Primär-Rezidiv-Probenpaare vorgenommen, welche sich vorzugsweise an den

n-fachen Expressionsunterschieden von GFAP, Desmoplakin, Snail1, Snail2, Twist1 und Vimentin orientierte. Die untersuchten Proben konnten so bezüglich ihres EMT-Expressionsunterschiedes zwischen Primär- und Rezidiv-Geweben in 5 Gruppen diskriminiert werden. Jede Gruppe war dabei durch ein bestimmtes Genexpressionsmuster gekennzeichnet. Die erste Gruppe, welche 5 Primär-Rezidiv-Paare enthielt, war charakterisiert durch einen generellen Genexpressionsverlust der untersuchten Marker im Rezidiv, mit Ausnahme von L1CAM, welches eine höhere Genexpression in den Tumor-Rezidiven aufwies. Dabei war nicht nur eine verminderte Genexpression des glialen Markers GFAP auszumachen, auch Desmoplakin, als klassischer epithelialer Marker zeigte eine solche Veränderung. Da ebenfalls mesenchymale Marker, wie Snail1, Snail2, Twist1 sowie Vimentin eine niedrigere Genexpression im Rezidiv-Gewebe aufwiesen, wurde diese Gruppe als „generell-entdifferenzierend“ bezeichnet. Die zweite Gruppe, 4 Tumorpaaare enthaltend, war neben einer Induktion von L1CAM durch eine deutlich erhöhte GFAP-Genexpression in den Rezidiv-Geweben und zusätzlich in den meisten Fällen durch einen vermehrten Gehalt an Desmoplakin und Mitgliedern der TGF β -Familie (TGF β 1, TGF β R1, TGF β R2) sowie Biglykan gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu wiesen die mesenchymalen Marker meist eine verminderte Genexpression in den Rezidiv-Tumoren auf. Die Proben wurden daher unter dem Namen „mesenchymale-epitheliale/ gliale Transition“ subsumiert. Die „gliale Transition“ orientiert sich dabei primär an den GFAP-Ergebnissen. Da Gruppe 3, aus 2 Glioblastom-Paaren bestehend, hauptsächlich eine vermehrte DSP-Genexpression bei einem Verlust an GFAP sowie ein inkonsistentes mesenchymales Genexpressionsprofil in einem Vergleich von Primär- und Rezidiv-Proben aufwies, erfolgte die Namensgebung zu „mesenchymale-epitheliale Transition“. Gruppe 4 zeigte die Kombination aus einem inkonsistenten Verlust an GFAP sowie DSP und deutlich höheren Genexpressionsspiegeln mesenchymaler Marker im Rezidiv-Gewebe, wurde daher als „epitheliale/ gliale-mesenchymale Transition“ bezeichnet. Die letzte zu unterscheidende Gruppe 5 war durch einen deutlichen Verlust an GFAP und DSP in Kombination mit inkonsistent höheren Genexpressionsspiegeln mesenchymaler Marker im Rezidiv-Gewebe geprägt. Zusammengefasst wurden die Mitglieder dieser Gruppe daher unter dem Namen „mesenchymaler Trend“.

Fazit:

Das untersuchte Kollektiv an gepaarten Primär- und Rezidiv-Tumoren wies eine weite Spanne an Genexpressionsprofiländerungen auf, wobei verschiedene Variationen von Verlust oder Gewinn an EMT-Markern zwischen Primär- und Rezidiv-Tumoren zu beobachten waren. Die Betrachtung der individuellen Tumorpaaare selbst macht es somit möglich den jeweiligen Transitions-Prozess identifizieren zu können, welcher bei der Entwicklung eines Tumor-Rezidivs stattfindet.

Gruppe 1- „generell-entdifferenzierend“

Nr.	n-fache Expression														
	Twist 1	Vimentin	β-Catenin	Snail1	Snail2	BGN	FN1	TGFβ1	TGFR1	TGFR2	L1CAM	DSP	GFAP	Iba1	Pecam
4	0,50	0,48	0,73	0,22	0,34	0,22	1,43	0,27	0,56	0,20	11,46	0,51	0,26	0,56	0,18
10	0,23	1,32	0,23	1,19	0,88	0,18	2,47	0,30	0,16	0,30	5,88	0,36	0,02	0,16	0,04
12	0,53	0,28	0,44	0,08	0,25	0,41	0,26	0,34	16,00	0,92	4,89	0,12	0,59	2,07	0,67
6	1,24	0,85	0,50	1,07	0,40	0,90	1,07	0,26	0,05	0,13	2,18	0,32	0,26	0,17	0,40
11	0,02	0,09	0,17	0,12	0,87	0,12	0,30	0,80	0,14	0,05	1,51	1,01	0,06	5,06	0,25

Gruppe 2- „mesenchymale-epitheliale/ gliale Transition“

Nr.	n-fache Expression														
	Twist 1	Vimentin	β-Catenin	Snail1	Snail2	BGN	FN1	TGFβ1	TGFR1	TGFR2	L1CAM	DSP	GFAP	Iba1	Pecam
14	0,18	0,99	0,40	1,19	0,52	2,14	1,01	0,67	0,55	5,31	2,61	0,45	3,63	0,46	1,27
1	0,17	0,65	1,17	0,29	0,16	0,85	1,56	1,72	1,33	2,46	179,18	0,64	7,11	2,69	0,56
8	0,08	0,53	0,91	1,77	0,08	0,64	0,15	0,54	0,52	0,36	32,69	3,02	5,43	0,33	0,11
15	0,86	0,57	1,12	0,95	0,29	0,62	0,44	1,78	2,88	5,15	41,69	3,12	4,44	10,93	1,88

Gruppe 3- „mesenchymale- epitheliale Transition“

Nr.	n-fache Expression														
	Twist 1	Vimentin	β-Catenin	Snail1	Snail2	BGN	FN1	TGFβ1	TGFR1	TGFR2	L1CAM	DSP	GFAP	Iba1	Pecam
7	0,41	1,81	0,41	0,68	2,46	0,39	0,95	1,07	1,16	1,87	0,78	8,47	0,55	0,99	1,75
2	0,10	0,39	2,51	0,04	0,30	0,18	0,19	0,79	2,18	0,40	30,25	4,46	0,74	0,80	2,81

Gruppe 4- „epitheliale-/gliale-mesenchymale Transition“

Nr.	n-fache Expression														
	Twist 1	Vimentin	β-Catenin	Snail1	Snail2	BGN	FN1	TGFβ1	TGFR1	TGFR2	L1CAM	DSP	GFAP	Iba1	Pecam
13	1,54	2,88	0,76	1,42	4,00	3,02	6,72	3,58	7,26	1,87	0,19	0,49	2,91	5,90	2,75
5	0,79	2,78	1,23	1,31	0,30	0,79	10,29	2,24	3,54	1,19	2,22	1,88	0,31	2,38	1,89

Gruppe 5- „mesenchymaler Trend“

Nr.	n-fache Expression														
	Twist 1	Vimentin	β-Catenin	Snail1	Snail2	BGN	FN1	TGFβ1	TGFR1	TGFR2	L1CAM	DSP	GFAP	Iba1	Pecam
9	0,17	0,61	0,68	0,53	4,26	0,97	1,25	2,50	7,92	1,11	0,10	1,06	0,58	10,78	1,77
3	1,30	0,71	0,22	1,14	0,05	0,90	5,35	0,41	0,25	0,41	0,17	0,12	0,36	0,11	0,46

Abb. 7:

Gruppenmerkmale in der Veränderung des Genexpressionsprofils verschiedener Marker von Primär- und Rezidiv-Tumoren

Auflistung der aus den ΔC_T -Werten berechneten n-fachen Unterschiede zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe. Die Patienten konnten dabei in 5 Gruppen unterteilt werden, abhängig von dem Muster der Genexpressionsänderung epithelialer, glialer sowie mesenchymaler Marker. Abkürzungen: BGN (Biglykan), FN1 (Fibronectin), TGFβ-R (*Transforming Growth Factor-Receptor*), L1CAM (*L1-cell adhesion molecule*), DSP (Desmoplakin), GFAP (saures Gliafaserprotein), Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*), Pecam1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*).

3.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Wie in Kapitel 2.2.6 bereits erläutert kann die quantitative *Real-Time* PCR in dem hier durchgeführten Ansatz nur die Genexpression in der Gesamtmasse des Tumorgewebes wiedergeben und dabei nicht zwischen bestimmten Zelltypen innerhalb des soliden Tumors unterscheiden. Durch Immunfluoreszenzdoppelfärbung sollte nun die Präsenz der Marker in den unterschiedlichen Zellentitäten selbst (Tumor-, Immun-, Endothelzelle) überprüft und somit mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten bezüglich der Lokalisation der EMT-Marker in Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe analysiert werden. Insgesamt wurden dabei fünf der zuvor mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersuchten Marker, Twist1, β-Catenin, Desmoplakin, L1CAM und Vimentin auf ihre Expression in Endothelzellen, Gliazellen sowie Makrophagen, bzw. Mikroglia überprüft. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der insgesamt 150 gefärbten Gewebeschnitte aller Marker. Auf der linken Seite der Abbildungen befinden sich Bilder der Primärtumorgewebe, mit „Prim“ gekennzeichnet, auf der

rechten Seite Gewebeschnitte der Rezidiv-Tumore, mit „Rez“ versehen. Wie zuvor in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden die zur Färbung eingesetzten fünf Probenpaare durchnummeriert, was in den folgenden Abbildungen durch die Zeichen P1 bis P5 ersichtlich ist. Zur rechten Seite eines jeden Summationsbildes kommen die Kanäle der sekundären Antikörper separat zur Darstellung. Diese entsprechen - grün dargestellt - jeweils den Markern Twist1, β -Catenin, Desmoplakin, L1CAM oder Vimentin und - rot markiert - jeweils den Markern CD11b, GFAP oder vWF. CD11b, auch als Integrin α M bezeichnet, ist ein Bestandteil des Makrophagen-1-Antigens, welches als Rezeptor für Zelloberflächenliganden, wie intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) und lösliche Liganden, fungiert. Es kann daher sowohl membranös als auch zytoplasmatisch angefärbt werden. CD11b ist in das Anheften von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an stimuliertes Endothel, wie in die Phagozytose von Komplementbedeckten Partikeln involviert⁽¹⁰³⁾. Bei dem von Willebrand Faktor (vWF) handelt es sich um ein Glykoprotein, welches in Endothelzellen, Blutplasma und Thrombozyten gefunden werden kann und dabei eine Rolle bei der Koagulation des Blutes nach Verletzung spielt. VWF fungiert als Trägerprotein für Faktor VIII, einem Kofaktor der Koagulation und fördert die Thrombozyten-Adhäsion sowie ihre Aggregation⁽¹⁰³⁾. Das saure Gliafaserfilamentprotein (GFAP) detektiert wie zuvor beschrieben gliale Zellen, in diesem Fall tumoröser Genese.

Einzelne Bilder wurden als sogenannte Multi-Intensions-Projektionen angefertigt, was an ihrem abweichenden Rand erkennbar wird. Diese Bilder wurden mittels eines Schichtstapels aufgenommen und anschließend durch einen Algorithmus zu den fertigen Aufnahmen mit minimalem Hintergrund verrechnet. Da unterschiedliche Objektive zur Anwendung kamen, dient ein Maßstabbalken zur Orientierung der Größenordnungen. Zur besseren Übersicht sind die Charakteristika aller gefärbten Präparate noch einmal in Tabellenform zusammengefasst. Die erste der folgenden Tabellen (Tab. 16) enthält zusätzlich eine Gesamtbeschreibung der Tumorgewebeschnitte einer jeweiligen Probe.

Die erste Spalte der Tabelle gibt die Probe an. Die drei darauf folgenden Spalten beziehen sich auf das Verhältnis der Marker der Doppelfärbung zueinander. Während ein „+“ eine Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle aufzeigt, illustriert ein „-“ eine in verschiedenen Zellen auszumachende Expression. Liegt eine Expression nur in einem sehr geringen Maße vor, so wird dies nicht per Symbol angezeigt, sondern im Text weiter erläutert. Die letzte Spalte, „Bemerkung zum Präparat“, beschreibt die Färbung näher. Eine Kofärbung wird im Folgenden so definiert, dass sich durch die Überlagerung der Fluoreszenzen beider Marker im Summationsbild als Mischfarbe aus grün und rot - gelb ergibt.

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Twist1

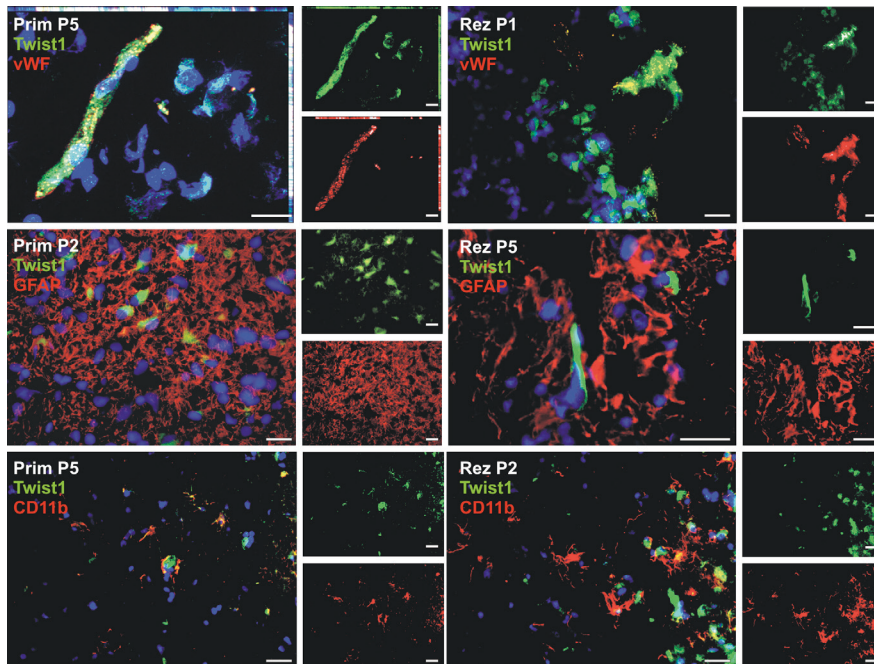


Abb. 8: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Twist1 und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Twist1 kommt grün, vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen) und CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker) kommen rot zur Darstellung. Abkürzungen: Prim (Primärtumor), Rez (Rezidiv), P (Patient). Der Maßstabbalken entspricht 20µm.

Eine Betrachtung der durch vWF markierten Gefäße zeigte die für das Glioblastom typischen glomeruloiden Formationen. Hinsichtlich der Vaskularisierung variierten die Tumorschnitte, es ließ sich kein bestimmtes Schema ausmachen.

Twist1 konnte in den Gefäßen der Präparate nachgewiesen werden. Ungeachtet ob Primär- oder Rezidiv-Tumorgewebe, lagen innerhalb der Endothelzellen kogefärbte Bereiche vor. Twist1 zeigte sich insgesamt flächiger angefärbt als vWF, dessen Fluoreszenz zumeist einen punktförmigen Charakter aufwies. Zusätzlich konnten neben kogefärbten Bereichen beide Marker, wenn auch deutlich seltener, an unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb einer Endothelzelle gefunden werden. Insgesamt scheinen daher verschiedene, lokal naheliegende, Strukturen durch die Marker angefärbt zu werden. Die GFAP-positiven Intermediärfilamente glialer Zellen zeigten innerhalb der Präparate sowie zwischen den Tumorschnitten eindruckliche Dichteunterschiede. Einige Präparate wiesen gehäuft unverkennbar astrozytäre Formen auf. Twist1 konnte dabei sowohl im Zytoplasma als auch intranukleär in einigen der GFAP-positiven Zellen der Primär- und Rezidiv-Gewebeschnitte ausgemacht werden. Zytoplasmatisch wirkte die Färbung von Twist1 meist flächig, seltener konnte dort jedoch auch eine filigrane Fluoreszenz des Markers ausgemacht werden. Da das zumeist deutlich filamentär fluoreszierende GFAP und Twist1 nicht in denselben Strukturen innerhalb einer Zelle lokalisiert zu sein schienen, vermischten sich die Fluoreszenzen nur selten, auch wenn gliale Zellen eine Twist1-positive Färbung aufwiesen. Insgesamt variierte die Anzahl der Twist1-positiven glialen Zellen unter den Präparaten. Teilweise zeigten Gewebeschnitte dabei Areale mit

massenhaft intranukleärem oder zytoplasmatischem Twist1 in glialen Zellen. Viele der GFAP-positiven Zellen wiesen jedoch keine Expression von Twist1 auf. Ebenfalls konnten viele lediglich Twist1-positive, aber GFAP-negative Zellen vorgefunden werden, sowie Zellen, welche keinen der Marker exprimierten. Die durch CD11b gekennzeichnete/n Mikroglia, bzw. Makrophagen war/en häufig in Gefäßnähe zu finden. Es zeigte sich unter den CD11b-positiven Zellen eine unterschiedliche Morphologie. Zum Einen waren die Zellen rundlich konfiguriert, es lagen jedoch auch Zellen mit deutlichen Fortsätzen vor. In vielen Fällen konnte eine territoriale Häufung verzeichnet werden. Die verschiedenen Konfigurationen der CD11b-positiven Zellen konnten bei den Präparaten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen beobachtet werden. Die CD11b-positiven Zellen wiesen dabei ebenfalls eine Expression von Twist1 auf. Besonders in CD11b-positiven Zellen mit Fortsätzen konnte eine Koexpression der Marker beobachtet werden. Zudem schienen unterschiedliche Strukturen innerhalb einer Zelle durch die verschiedenen Marker angefärbt zu sein, wobei Twist1 oft flächig gefärbt wirkte, CD11b eher filigran membranös. Die Färbung von Twist1 in CD11b-positiven Zellen war insgesamt deutlich schwächer ausgeprägt als die Färbung innerhalb vWF-positiver Zellen. Einige mikrogliale Zellen, bzw. Makrophagen schienen keine Expression des Markers aufzuweisen, wobei ihre Anzahl stark zwischen den Präparaten variierte. Insgesamt ergaben sich für den Färbegang mit CD11b keine generellen Unterschiede zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe. Abbildung 8 illustriert die zuvor beschriebenen Sachverhalte, während Tabelle 16 detailliertere Informationen zu den jeweils gefärbten gepaarten Primär- und Rezidiv-Tumoren enthält.

Tab. 16: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Twist1 und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Abkürzungen: vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen), CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker). Ein „+“ symbolisiert die Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle, ein „-“ die fehlende Expression des jeweiligen Markers in der entsprechenden Zellentität.

Patient	vWF (a)	GFAP (b)	CD11b (c)	Bemerkung zum Präparat
1 Primär	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. in Gefäßen punktförmig sowie häufiger flächig vorzufinden b. viele GFAP-positive Fasern, einige Twist-positive Zellen in GFAP-positiven Regionen, dabei auch z.T. kogefärbte Bereiche und an unterschiedlichen Lokalisationen vermutlich innerhalb einer Zelle zu finden, Areale mit reichlich intranukleärem Twist c. insgesamt viel Mikroglia, z.T. territorial gehäuft, CD11b-Färbung oftmals in Gefäßnähe, viele Zellen mit rundlicher Konfiguration, mit wenigen oder keinen Fortsätzen (mit aktivierter Mikroglia zu vereinbaren), viele

				solitär CD11b-positive Zellen, Twist erscheint nur sehr schwach in der Kofärbung
Rezidiv	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. massig Gefäßproliferate b. ein Teilgebiet enthält vermehrt GFAP, Bereiche mit viel intranukleärem Twist, jedoch insgesamt geringeres Vorkommen als in Primärtumor (Twist-Senkung entspricht PCR) c. insgesamt weniger CD11b-positive Zellen, dabei vermehrt Kofärbungen
2				
Primär	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. sehr gefäßreich, Twist außerhalb von Gefäßen meist zytoplasmatisch, Bereiche mit viel intranukleärem Twist, auch zusammen mit zytoplasmatischer Färbung b. z.T. dichtes GFAP-Fasernetz, in GFAP-positiven Bereichen findet sich oftmals zytoplasmatisches Twist, teilweise kogefärbte Bereiche oder an unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb einer Zelle zu finden c. starke territoriale Häufung von Mikroglia in der Nähe von Gefäßen, meist gruppiertes Vorliegen über das gesamte Präparat verteilt, CD11b-positive Zellen besitzen oftmals Fortsätze (vermutlich ruhende Mikroglia), beide Marker in einer Zelle vorzufinden, dabei kogefärbt oder unterschiedlich lokalisiert, einige Zellen sind allein CD11b-positiv
Rezidiv	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. relativ großer Zellabstand, gesamtes Tumorpräparat gut vaskularisiert b. deutlich astrozytäre Formen sichtbar, viele GFAP-positive Fasern, vermehrt kogefärbte Bereiche zu beobachten, insgesamt wenig intranukleäres Twist (PCR zeigt Twist-Senkung) c. sehr makrophagen- und gefäßreich, Makrophagen in Gefäßnähe, wenig kogefärbte Bereiche auszumachen, oder sehr schwache Twist-Färbung
3				
Primär	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> b. im Vergleich zu restlichen Präparaten wenig GFAP-positive Fasern, Twist1-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen, dabei massenhaft intranukleäre sowie zytoplasmatische Färbung von Twist, einige Zellen zeigen kogefärbte Bereiche oder unterschiedliche Lokalisation der Marker innerhalb einer Zelle, zusätzlich auch in einigen Arealen filigrane Fluoreszenz von Twist c. CD11b-positive Zellen über Gewebe verteilt (Morphologie größtenteils ruhender Mikroglia entsprechend), viele kogefärbte Zellen
Rezidiv	+	+/-	nicht beurteilbar	<ul style="list-style-type: none"> a. relativ wenig Gefäße im Vergleich zum Primärtumor b. wenig GFAP-Filamente, intranukleäre und zytoplasmatische Twist-Färbung sowie filigrane Fluoreszenz außerhalb des Zellkerns

4	Primär	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. sehr zell dicht b. wieder vermehrt GFAP-positive Fasern im Vergleich zu Probe 3, Twist-Färbung erneut intranukleär sowie flächig im Zytoplasma c. CD11b zytoplasmatisch positiv, oftmals gruppiertes Vorkommen (Form: aktivierter Mikroglia entsprechend), am Präparatrand massenhaft, oftmals beide Marker in einer Zelle, dabei kogefärbte Bereiche oder an scheinbar unterschiedlichen Lokalisation in einer Zelle
	Rezidiv	(+)	-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. wie Primärtumor, sehr zell dicht, nur schwache Färbung von Twist in Gefäßen b. nur einzelne GFAP-positive Fasern, insgesamt sehr geringer GFAP-Gehalt (entspricht PCR) sowie wenige Twist-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen, keine Kofärbungen und parallele Expressionen der Marker innerhalb einer Zelle auszumachen c. wenig CD11b-positive Zellen (passend zur PCR), z.T. Kofärbungen oder unterschiedliche Lokalisationen in vermutlich einer Zelle
5	Primär	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. außerhalb von Gefäßen Areale mit massenhaft intranukleärem Twist sowie Zellen mit zytoplasmatischer Färbung b. neben Fasern auch viele GFAP-positive sternförmige Zellen, selten Kofärbungen oder generell parallele Expressionen innerhalb einer Zelle c. Areale mit viel CD11b-positiven Zellen, z.T. unterschiedliche Strukturen in einer Zellen mit Twist und CD11b gefärbt, auch kogefärbte Bereiche
	Rezidiv	+	+/-	+/-	<ul style="list-style-type: none"> a. kaum Twist außerhalb von Gefäßen (PCR beschreibt leichten Anstieg von Twist, jedoch auch von Pecam), z.T. Bereiche mit filigraner Twist-Färbung b. territorial teilweise hohe Dichte von GFAP-positiven Fasern, zusätzlich zur flächigen zytoplasmatischen Färbung von Twist auch z.T. filigranere Fluoreszenz des Markes in GFAP-positiven Arealen c. großes Areal mit massenhaft ruhender Mikroglia, d.h. CD11b-positiven Zellen mit Fortsätzen

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Desmoplakin

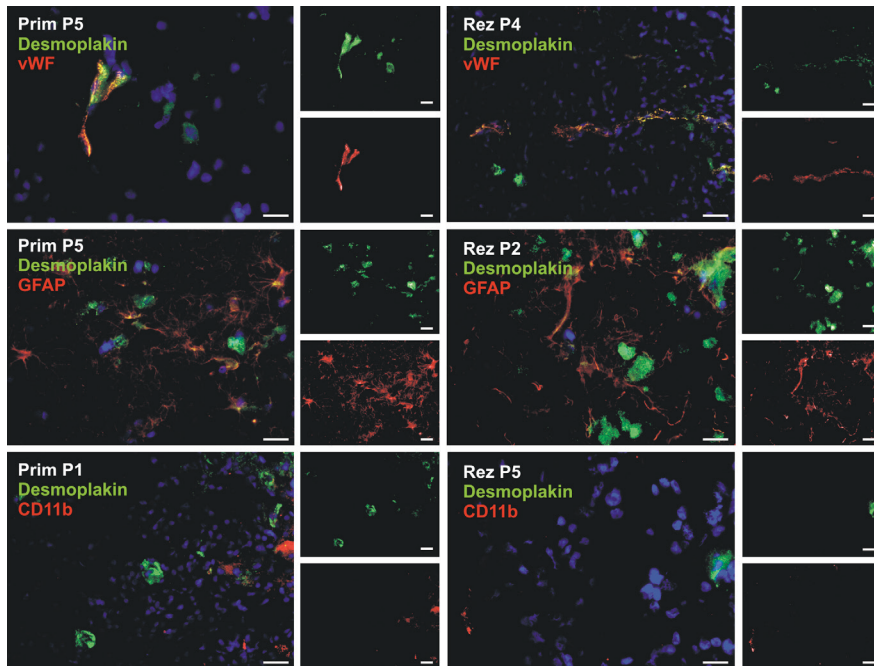


Abb. 9: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Desmoplakin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Die grüne Färbung repräsentiert Desmoplakin, rot sind vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen) und CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker) dargestellt. DAPI diente zum Anfärben der Zellkerne. Abkürzungen: Prim (Primärtumor), Rez (Rezidiv), P (Patient). Der Maßstab balken entspricht 20µm.

Desmoplakin, ein obligater Bestandteil von Desmosomen, konnte sowohl in den Gefäßen der Primär- als auch Rezidiv-Präparate ausgemacht werden. Es wies dabei eine granulaartige, filamentäre oder flächige Fluoreszenz innerhalb der Endothelzellen auf und lag größtenteils kogefärbt mit vWF vor. Im Gegensatz zu dem Transkriptionsfaktor Twist1 konnten DSP-positive Zellen außerhalb von Gefäßen meist nur selten beobachtet werden. Allerdings zeigten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen den Präparaten, ohne jedoch einem speziellen Schema zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe zu folgen. Zum Teil wiesen Gewebeschnitte Bereiche mit einem homogenen Muster zytoplasmatisch DSP-positiver Zellen in GFAP-positiven Arealen auf. In anderen Präparaten wiederum konnten dort nur vereinzelt DSP-positive Zellen ausgemacht werden, wobei insgesamt immer wieder kleine Zellgruppen vorgefunden werden konnten. Neben der flächigen zytoplasmatischen Färbung konnte zusätzlich auch eine filamentartige, vermutlich membranöse Fluoreszenz des Markers in GFAP-positiven Bereichen ausgemacht werden. Aufgrund der räumlich nahen Fluoreszenz der Marker ist von einzelnen DSP-positiven glialen Zellen auszugehen, wobei GFAP und DSP insgesamt betrachtet in unterschiedlichen Strukturen der Zellen vorzuliegen scheinen, somit wenige direkt kogefärbte Bereiche aufzufinden waren. CD11b-positive Zellen wiesen in der Regel keine Expression des epithelialen Markers auf. Allerdings konnten Anhäufungen von CD11b-Fluoreszenzen auch in der Nähe von gefäßartig angeordneten DSP-positiven Zellen beobachtet werden, wobei es sich vermutlich um gefäßnahe Mikroglia, bzw. Makrophagen handelt. Insgesamt konnten in den Tumor-

schnitten auch allein GFAP-, vWF- oder Desmoplakin-exprimierende Zellen vorgefunden werden, oder solche, welche keine Expression eines Markes innerhalb der Doppelfärbung zeigten. Es konnten keine grundsätzlichen Unterschiede in Lokalisation und Expression zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe ausgemacht werden. Die beschriebene Färbung ist in Abbildung 9 dargestellt, Tabelle 17 gibt die zugehörigen Merkmale an.

Tab. 17: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Desmoplakin und der sekundären Antikörper vWF, GFAP und CD11b

Abkürzungen: vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen), CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker), DSP (Desmoplakin). Ein „+“ symbolisiert die Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle, ein „-“ die fehlende Expression des jeweiligen Markers in der entsprechenden Zellentität.

Patient	vWF (a)	GFAP (b)	CD11b (c)	Bemerkung zum Präparat
1 Primär	+	+/-	-	a. punktförmig sowie flächig in Gefäßen, außerhalb der Gefäße nur vereinzelt DSP-positive Zellen (zytoplasmatisch, z.T. membranös/ filamentartig) b. wenige DSP-positive Zellen in GFAP-positiven Arealen, wenig kogefärbte Bereiche
	+	nicht beurteilbar	-	a. sehr selten einzelne DSP-positive Zellen außerhalb von Gefäßen
2 Primär	+	+/-	-	b. vermehrt zytoplasmatisch DSP-positive Zellen in GFAP-positiven Arealen, Areale mit fleckenartigem Bild der DSP-Färbung c. viele CD11b-positive Zellen in der Nähe von DSP-positiven Arealen, vermutlich Gefäße
	+	+/-	-	b. viele DSP-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen (kogefärbt oder nah lokalisiert) c. CD11b-positive Zellen vermehrt in Bereichen mit DSP-positiven Zellen
3 Primär	+	+/-	-	b. wenige DSP-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen, teilweise territorial gehäuftes, zytoplasmatisches DSP, einige Kofärbungen
	+	+/-	-	b. wenig einzelne oder kleine Gruppen DSP-positiver Zellen in GFAP-positiven Arealen
4 Primär	+	+/-	-	b. einzelne, zytoplasmatisch-DSP-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen sowie selten Kofärbungen
	+	nicht beurteilbar	-	a. außerhalb der Gefäße schwach zytoplasmatisches DSP, einzelne DSP-positive Zellen sind dabei diffus über den Tumor verteilt

5	Primär	+	+/-	-	b. innerhalb von GFAP-positiven Arealen Bereiche mit homogen verteilten DSP-positiven Zellen, einzeln oder in kleinen Gruppen, z.T. Kofärbung
	Rezidiv	+	+/-	-	b. viel filigrane Fluoreszenz von DSP, Tumoreale mit homogen zytoplasmatisch gefärbtem DSP in GFAP-positiven Bereichen, in anderen Arealen nur einzelne positive Zellen, z.T. Kofärbungen zu verzeichnen

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper β -Catenin

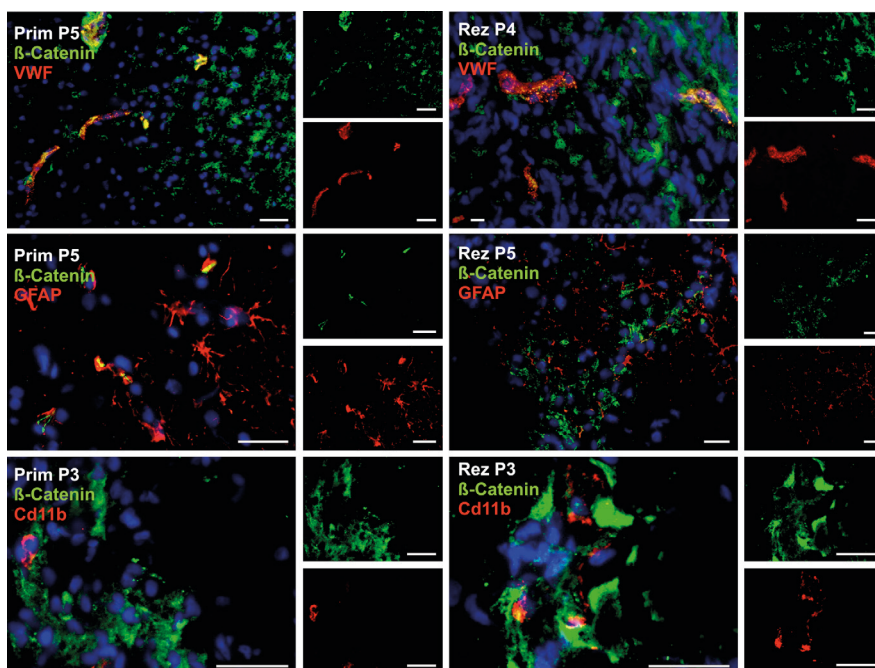


Abb. 10: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper β -Catenin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b
 β -Catenin kommt grün, vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen) und CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker) rot zur Darstellung. Zur Kernfärbung wurde DAPI eingesetzt. Abkürzungen: Prim (Primärtumor), Rez (Rezidiv), P (Patient). Der Maßstabbalken entspricht 20 μ m.

Das in die Koordination der Zelladhäsion und Gen-Transkription eingebundene Protein β -Catenin konnte in vWF-positiven Zellen sowohl in den Primär- als auch Rezidiv-Gewebepaaren gefunden werden. Dieses äußerte sich zumeist in einer Kofärbung der Marker, wobei zusätzlich auch unterschiedliche Strukturen innerhalb der Endothelzellen eine Expression aufzuweisen schienen. Dabei zeigte β -Catenin zum Teil filigrane, fadenförmige Fluoreszenzen, vermutlich als Zeichen einer membranösen Lokalisation. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Markern Twist1 und Desmoplakin konnten insgesamt vermehrt β -Catenin-positive Zellen ausgemacht werden, wobei eine große Dispersität zwischen den Präparaten, ungeachtet ob Primär- und Rezidiv-Gewebe, bestand. Dabei waren in GFAP-positiven Arealen teilweise homogene Verteilungsmuster zytoplasmatisch- β -Catenin-positiver Zellen vorzufinden. Zudem zeigten sich lokale Anhäufungen der Zellen. Neben der flächigen zytoplasmatischen Expression wiesen einige Zellen auch eine

intranukleäre oder filigrane extranukleäre, vermutlich membranöse Expression des Markers auf. Insgesamt konnten nur wenige kogefärbte Bereiche von GFAP und β -Catenin beobachtet werden. Allerdings handelt es sich bei GFAP um ein Filamentprotein, während für β -Catenin membranöse, zytoplasmatische und intranukleäre Expressionen in GBM-Zellen beschrieben sind. Selbst bei einer Expression der Marker innerhalb einer Zelle müssten somit Überlagerungen der Fluoreszenzen nicht obligatorisch vorhanden sein. Da CD11b-positive Zellen in der Regel keine Färbung für β -Catenin aufwiesen, scheint es sich bei den beschriebenen β -Catenin-positiven Zellen außerhalb des Endothels, in GFAP-positiven Bereichen gelegen, um gliale Zellen zu handeln. Somit scheinen einige gliale Zellen β -Catenin zu exprimieren, wobei viele GFAP-positive Zellen keine Expression des Markers aufwiesen. Ähnlich zur Färbung mit Desmoplakin waren CD11b-positive Zellen auch in räumlicher Nähe zu gefäßartig angeordneten β -Catenin-positiven Zellen zu finden, wobei zum Teil auch kogefärbte Bereiche entstanden. Allerdings schien der Marker in der Regel nicht in räumlicher Nähe zu gefäßferner Mikroglia vorzuliegen, wenn, dann nur sehr schwach gefärbt. Da auch in Gefäßnähe zumeist keine Kofärbungen zu verzeichnen waren, handelt es sich vermutlich um β -Catenin-negative gefäßnahe Mikroglia. Abbildung 10 zeigt die beschriebenen Sachverhalte, Tabelle 18 sind Details der Färbung zu entnehmen.

Tab. 18: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper β -Catenin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Abkürzungen: vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen), CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker). Ein „+“ symbolisiert die Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle, ein „-“ die fehlende Expression des jeweiligen Markers in der entsprechenden Zellentität.

Patient	vWF (a)	GFAP (b)	CD11b (c)	Bemerkung zum Präparat
1 Primär	+	+/-	-	<ul style="list-style-type: none"> a. β-Catenin liegt in den Gefäßen kogefärbt vor sowie zudem scheinbar an unterschiedlicher Lokalisation innerhalb der Zellen b. Kofärbungen β-Catenin-positiver Zellen zu beobachten c. nur sehr vereinzelt auch kogefärbte Bereiche, wenn in räumlicher Nähe zu gefäßartig angeordnetem β-Catenin
	+	+/-	-	<ul style="list-style-type: none"> b. sehr vereinzelt starke, filigrane, am ehesten zytoplasmatische, bzw. membranöse Fluoreszenz von β-Catenin, z.T. Kofärbungen sowie β-Catenin-positiv zytoplasmatische Anfärbung in GFAP-positiven Bereichen, in vielen Arealen intranukleäre Lokalisation
2 Primär	+	+/-	-	<ul style="list-style-type: none"> b. flächig-, zytoplasmatisch-, β-Catenin-positiv Zellen in GFAP-positiven Bereichen, fleckiges Bild, vereinzelt filigrane zytoplasmatische, bzw. membranöse Fluoreszenz von β-Catenin in oftmals gefäßartigem Verlauf c. CD11b-positive Zellen teilweise in räumlich sehr engem Bezug zu gefäßartig angeordneter β-Catenin-Fluoreszenz

Rezidiv	+	+/-	-	b. in Tumorarealen gehäuft intranukleäre Fluoreszenz von β -Catenin, generell nur einzelne Zellen oder wenige kleine Gruppen positiv für β -Catenin in GFAP-positiven Bereichen im Unterschied zum Primärtumor (passend zur PCR), wenige stark β -Catenin-positive Zellen nah an Gefäßen, z.T. filigrane Färbung
3 Primär	+	+/-	-	b. wenig filigrane und zytoplasmatische Fluoreszenz von β -Catenin in GFAP-positiven Bereichen c. in einem Gewebeareal vermehrte Annäherung der Fluoreszenzen, sehr selten kogefärbte Bereiche
	+	+/-	-	b. insgesamt mehr β -Catenin als Primärtumor, jeweils territorial gehäuft in GFAP-positiven Bereichen, teilweise fleckartig zytoplasmatisch positiv, vereinzelt Areale mit filigraner β -Catenin-Färbung, selten Kofärbungen c. z.T. nahe räumliche Beziehung vermutlich an Gefäßen
4 Primär	+	+/-	-	b. GFAP-positive Areale z.T. filigran-fadenförmige, fleckförmig-zytoplasmatische und z.T. intranukleäre Färbung von β -Catenin, selten Kofärbungen auszumachen
	+	+/-	-	b. GFAP-positives Areal mit fleckig-zytoplasmatischer β -Catenin-Färbung sowie filigraner Färbung, diese filigrane Färbung erscheint öfter im Vergleich zum Primarius, z.T. Kofärbungen
5 Primär	+	+/-	-	b. vermehrt intranukleäres β -Catenin in einem Bereich des Tumorpräparates, viel zytoplasmatisch positive Zellen in GFAP-positiven Arealen, fleckiges Bild, viel filigrane Färbung von β -Catenin, z.T. längliche Formationen c. z.T. räumlich nahe Färbung von β -Catenin und CD11b
	+	+/-	-	b. intranukleäres β -Catenin nicht auszumachen, insgesamt wenig β -Catenin-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen (mit PCR übereinstimmend)

3.4.4 Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper L1CAM

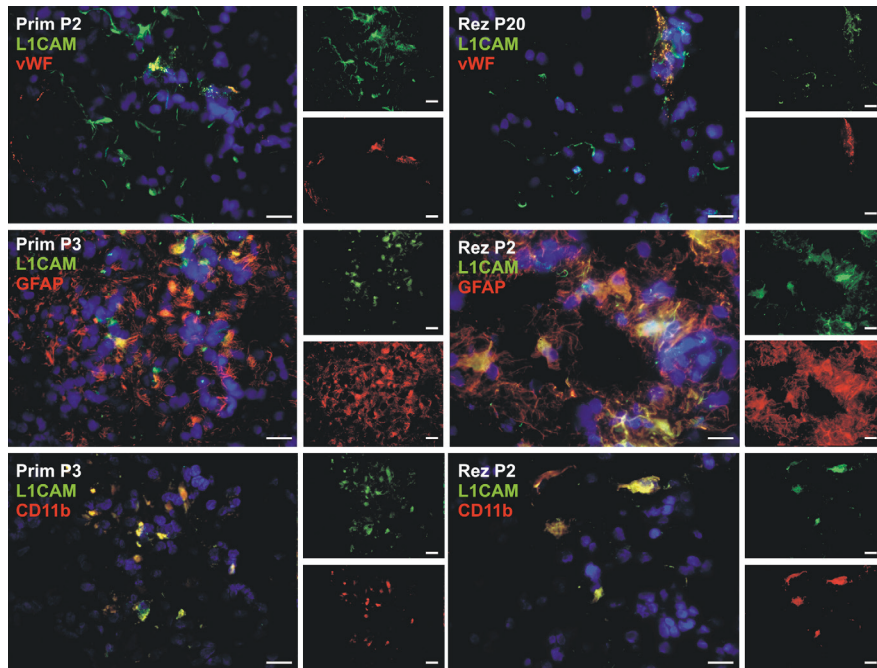


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper L1CAM und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül) ist grün dargestellt, die rote Farbe visualisiert vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen) und CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Abkürzungen: Prim (Primärtumor), Rez (Rezidiv), P (Patient). Der Maßstab entspricht 20µm.

Wie die zuvor beschriebenen Marker konnte auch das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM in der Mehrzahl der Endothelzellen gefunden werden. Dabei ergaben sich innerhalb sowie zwischen den Präparaten deutliche Unterschiede, jedoch ohne generelles Muster in Primär- und Rezidivgeweben. Während vWF-positive Zellen zumeist eine Kofärbung mit L1CAM aufwiesen, schienen zudem auch unterschiedliche Strukturen innerhalb der Zellen gefärbt zu sein. Ebenfalls waren einzelne für L1CAM-negative Endothelzellen auszumachen. Auch außerhalb der Gefäße - in GFAP-positiven Bereichen gelegen - waren regelmäßig L1CAM-positive Zellen vorzufinden. Oftmals war dies mit einer Kofärbung der Marker verbunden. Ebenfalls konnten in den gefärbten Gewebeschnitten auch allein GFAP- oder L1CAM-positive Zellen ausgemacht werden. Die Färbung des Adhäsionsmoleküls zeigte sich insgesamt sowohl faserartig als auch flächig. CD11b-positive Zellen zeigten in der Regel eine Expression von L1CAM, welches sich durch die zumeist vorfindbare Kofärbung der Marker erkennen lässt. Nur selten konnte/n einzelne L1CAM-negative Mikroglia- bzw. Makrophagen in den Gewebeschnitten ausgemacht werden. In einigen Präparaten konnte eine territoriale Häufung der Ko- oder nur einfach-positiven Färbung der Marker beobachtet werden. Es ließen sich keine generellen Unterschiede zwischen Primär- und Rezidiv-Gewebe verzeichnen. In Abbildung 11 ist die Färbung illustriert, Tabelle 19 liefert nähere Informationen dazu.

Tab. 19: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper L1CAM und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Abkürzungen: vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen), CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker), L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül). Ein „+“ symbolisiert die Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle, ein „-“ die fehlende Expression des jeweiligen Markers in der entsprechenden Zellentität.

Patient	vWF (a)	GFAP (b)	CD11b (c)	Bemerkung zum Präparat	
1	Primär	+	+/-	+	a. Gefäße sind zusätzlich zu einer Kofärbung teilweise in weiteren Bereichen solitär gefärbt, wenige Endothelzellen zeigen sich negativ für L1CAM
					b. L1CAM-positive Zellen finden sich in GFAP-positiven Arealen, regelmäßig sind auch Kofärbungen zu beobachten in der Regel Kofärbung
2	Rezidiv	+	+/-	+	b. weniger L1CAM-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen als Primarius, dabei wieder regelmäßig Kofärbungen zu beobachten (entspricht PCR)
3	Primär	+	+/-	+	a. Mehrzahl der Gefäße zeigen Kofärbungen, selten nur an unterschiedlichen Orten im Gefäßbereich positiv
					b. Faserartig, territorial gehäuft viel flächig gefärbtes L1CAM in GFAP-positiven Bereichen, oftmals kofärbt
4	Rezidiv	+	+/-	+	b. faserartig und vermehrt flächig gefärbtes L1CAM in GFAP-positiven Bereichen, vielfach zeigt sich eine Kofärbung
5	Primär	+	+/-	+	b. L1CAM-positive Zellen (flächig und faserartig) in GFAP-positiven Bereichen, z.T. territorial gehäufte Kofärbung
6	Rezidiv	+	+/-	+	b. in GFAP-positiven Bereichen viel, ebenfalls flächig und faserartig gefärbtes L1CAM, z.T. territorial gehäuft kofärbt
7	Primär	+	+/-	+/-	b. wenig L1CAM-positive Zellen, territoriale Häufung von Kofärbung und solitär gefärbten Markern
					c. z.T. Kofärbung, jedoch auch vermehrt solitäre CD11b-Fluoreszenz auszumachen
8	Rezidiv	nicht beurteilbar	+/-	nicht beurteilbar	b. viele L1CAM-positive Zellen in GFAP-positiven Arealen, viele kofärbte Zellen (entspricht PCR)
9	Primär	+	+/-	+/-	b. GFAP-positive Zellen zeigen vielfach Kofärbung
					c. kofärbte Zellen sowie solitär CD11b-positive Zellen vorfindbar, solitäres CD11b zeigt sich z.T. in enger räumlicher Beziehung zu L1CAM, vermutlich gefäßnahe Zellen
10	Rezidiv	+	+/-	+/-	b. weniger L1CAM-positive Zellen in GFAP-positiven Bereichen als Primärtumor (entspricht PCR), z.T. Kofärbungen
					c. ebenfalls Kofärbungen zu verzeichnen und z.T. nur in räumlicher Nähe zu L1CAM vorzufinden

3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung mit dem ersten primären Antikörper Vimentin

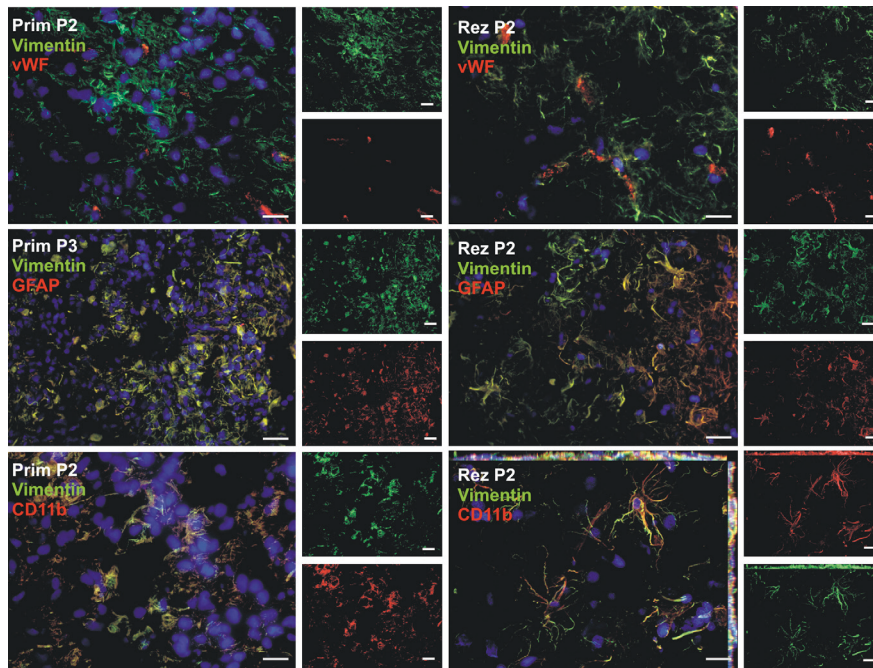


Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Vimentin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Eine grüne Färbung repräsentiert Vimentin. VWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen) und CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker) sind rot dargestellt. Zur Kernfärbung wurde DAPI eingesetzt. Abkürzungen: Prim (Primärtumor), Rez (Rezidiv), P (Patient). Der Maßstabblock entspricht 20µm.

Wie alle zuvor beschriebenen Marker konnte auch Vimentin in den Endothelzellen der Primär- und Rezidiv-Gewebeschnitte gefunden werden. Im Unterschied zu den bisher vorgestellten Färbungen war die Expression des Markers innerhalb der Gefäße jedoch weniger prominent und variierte zum Teil deutlich zwischen den Präparaten, ohne dabei eine Systematik aufzuweisen. Während einige Endothelzellen eine Kofärbung der Marker zeigten, lagen die Vimentin-positiven Filamente zudem auch ohne Überlagerung der Fluoreszenzen von vWF und Vimentin eindeutig im Gefäßverlauf lokalisiert vor. Auch außerhalb der Gefäße zeigte sich eine vergleichsweise große Anzahl Vimentin-positiver Zellen mit deutlichen Dichteunterschieden der gefärbten Fasern innerhalb und unter den Präparaten. Beinahe alle GFAP-positiven Zellen wiesen dabei eine Expression des mesenchymalen Markers auf, erkennbar an einer Kofärbung. Ebenfalls zeigten CD11b-positiv Zellen in der Regel eine Kofärbung mit Vimentin. Es scheint daher auch von der Mehrzahl der Mikroglia, bzw. Makrophagen exprimiert zu werden. Wie in den zuvor beschriebenen Färbungen konnten zudem auch allein CD11b-, Vimentin- sowie vWF-positiv Zellen vorgefunden werden. Alle Sachverhalte kommen in Abbildung 12 zur Darstellung. Die dazugehörige Tabelle 20 gibt die Details der Färbung an.

Tab. 20: Immunfluoreszenzfärbung in Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Material mit dem primären Antikörper Vimentin und den sekundären Antikörpern vWF, GFAP und CD11b

Abkürzungen: vWF (von-Willebrand-Faktor, Endothelzellmarker), GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker glialer Zellen), CD11b (*Cluster of Differentiation*, Mikroglia-, bzw. Makrophagenmarker). Ein „+“ symbolisiert die Färbung beider Marker innerhalb einer Zelle, ein „-“ die fehlende Expression des jeweiligen Markers in der entsprechenden Zellentität.

Patient	vWF (a)	GFAP (b)	CD11b (c)	Bemerkung zum Präparat
1 Primär	+	+	+	a. Bereiche mit sehr wenigen Vimentin-positiven Fasern, wenige kofarbte Bereiche, oftmals unterschiedliche räumliche Fluoreszenz der Marker im Gefäß oder räumliche Assoziation, Vimentin dort auch oft filamentär b. Kofärbung c. Kofärbung
	+	+	nicht beurteilbar	a./b. Areale mit unterschiedlicher Vimentin-Faserdichte
2 Primär	+	+	+	a./b./c. z.T. dichtes Vimentin-Netz
	+	+	+	a./b./c. Vimentin wirkt im Gegensatz zum Primärtumor aufgelockert, Areale mit sehr wenig Vimentin auszumachen (PCR zeigt minimale Abnahme), jedoch auch relativ großer Zellabstand zu beobachten
3 Primär	+	+	+	a./b./c. stark variierende Vimentin-Faserdichte innerhalb des Gewebes, generell weniger positive Fasern als restliche Präparate
	+	+	+	a./b./c. wenig Vimentin-positive Fasern
4 Primär	+	+	+	a./b./c. im Vergleich zu Probe 3 viele Vimentin-positive Fasern, Areale mit anderer Morphologie, hier regelrecht ganze Zelleiber angefärbt
	+	+	+	a./b./c. Vimentin weniger faserartig, regelrecht ganze Zelleiber angefärbt
5 Primär	+	+	+	a./b./c. Präparat durchzogen von Vimentin-positiven Fasern territorial unterschiedlicher Dichte
	+	+	+	a./b./c. insgesamt weniger faserartiges Erscheinen von Vimentin

Fazit:

Die EMT-Marker Twist1, DSP, β -Catenin, L1CAM und Vimentin konnten im Rahmen der Immunfluoreszenzdoppelfärbung in verschiedenen Zellentitäten gefunden werden. Es handelt

sich bei den durch GFAP-, vWF- und CD11b-markierten Zellen daher um mögliche Quellen der EMT-Marker-Genexpression. Insgesamt konnten keine generellen Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation und Expression der EMT-Marker im Vergleich von Primär- und Rezidiv-Gewebeschnitten ausgemacht werden.

3.5 Stimulation der Zelllinie T98G

In einem weiteren Versuch sollte die Auswirkung des Chemotherapeutikums Temozolomid sowie die des EMT-Induktors TGF β 1 auf die Expression der verschiedenen epithelialen und mesenchymalen Marker der EMT überprüft werden. Nachdem die T98G-Zellen wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben stimuliert wurden, erfolgte auch in dieser Untersuchung zunächst die Isolierung der RNA aus dem Gewebe (2.2.1), wenn erforderlich, die photometrische Bestimmung ihrer Konzentration (2.2.2), der DNA-Verdau und die Umschreibung in cDNA (2.2.3). Nun konnte die quantitative *Real-Time* PCR zum Vergleich der Genexpression unstimulierter und stimulierter Proben durchgeführt werden. Zur Beurteilung herangezogen wurden die n-fachen Expressionsunterschiede der verschiedenen EMT-Marker, welche nach der in Kapitel 2.2.5 vorgestellten Formel [4] aus den GAPDH-korrigierten ΔC_T -Werten berechnet wurden. Der Expressionsunterschied der Temozolomid-Versuche errechnete sich dabei aus den ausschließlich mit DMSO-behandelten Proben und denen, welche eine Stimulation mit dem in DMSO gelösten Temozolomid erfahren hatten. Die schließlich zu interpretierenden Genexpressionsveränderungen konnten dadurch eindeutig dem Chemotherapeutikum Temozolomid zugeordnet werden. Zur Auswertung der TGF β -Versuchsreihe konnten die ΔC_T -Werte der stimulierten und unstimulierten Proben zur Berechnung des n-fachen Expressionsunterschiedes eingesetzt werden. Zusätzlich erfolgte die Messung der Grundexpressionen der unterschiedlichen EMT-Marker in der T98G-Zelllinie, illustriert in Abbildung 13. Die Mittelwerte der n-fachen Expressionsunterschiede sowie die zugehörigen Standardabweichungen sind in den folgenden Graphiken als Balken und Fehler-Linie jeweils für die unterschiedlichen Stimulationszeiten abgebildet. Die DMSO-Kontrolle im Falle der Temozolomid-Versuchsreihe sowie die Kontrollgruppe im TGF β -Versuchsarm sind durch eine Linie bei der Expressionshöhe von „1“ gekennzeichnet. Im folgenden Text werden, in Klammern gesetzt, die Mittelwerte und ihre zugehörigen Standardabweichungen sowie mittels T-Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeiten „p“ angegeben.

3.5.1 Grundexpression verschiedener EMT-Marker in T98G-Zellen

Mit der Ausnahme von Desmoplakin (mittlerer ΔC_T -Wert: 15,97 +/- 2,02) und Biglykan (17,22 +/- 1,61) konnte eine deutliche Genexpression aller untersuchten EMT-Marker in T98G-Zellen beobachtet werden (Abbildung 13). Die höchsten mRNA-Expressionen wiesen dabei Vimentin (1,75 +/- 0,99), TGF β 1 (3,88 +/- 0,86) sowie Fibronectin (4,11 +/- 1) auf. Eine moderate Genexpression war für Akirin2 (6,95 +/- 1,42), Snail2 (6,15 +/- 0,70), L1CAM (6,68 +/- 1,07), Twist1 (8,56 +/- 1,93) und TGF β R2 (7,89 +/- 0,78) festzustellen, während Snail1 (10,31 +/- 0,73), β -Catenin (9,19 +/- 1,32) und TGF β R1 (10,29 +/- 1,70) eher niedrigere Expressionsspiegel zeigten.

Vergleicht man die Expression der EMT-Marker in der Zelllinie T98G mit der Expression der EMT-Marker in den soliden Primär- und Rezidiv-Tumorproben (PCR-Ergebnisse der Tumorpaa-re sind Kapitel 3.1.1 zu entnehmen) ergeben sich folgende Aspekte:

Übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich der Genexpressionen wiesen besonders Marker mit einer hohen mRNA-Expression auf, wie Fibronectin, Vimentin und TGF β 1 (PCR-Ergebnisse der Tumorpaa-re siehe Abbildungen 4 und 5). Ebenfalls war eine vermehrte Expression von Snail2 gegenüber Snail1 sowie des TGF β R2 gegenüber TGF β R1 sowohl in T98G Zellen als auch in den Ergebnissen der Primär- und Rezidiv-Gewebeuntersuchungen zu finden. Die Genexpressionsstärken von L1CAM und β -Catenin differierten hingegen zwischen Zelllinie und Gesamtkollektiv der Tumorpaa-re. Während L1CAM in den T98G-Zellen stärker als im Patientengewebe exprimiert war, verhielt es sich für β -Catenin umgekehrt. Insgesamt betrachtet können die T98G-Zellen daher als ein gutes Modell zur Überprüfung der Einflüsse von Temozolomid oder TGF β 1 auf Glioblastom-Zellen betrachtet werden.

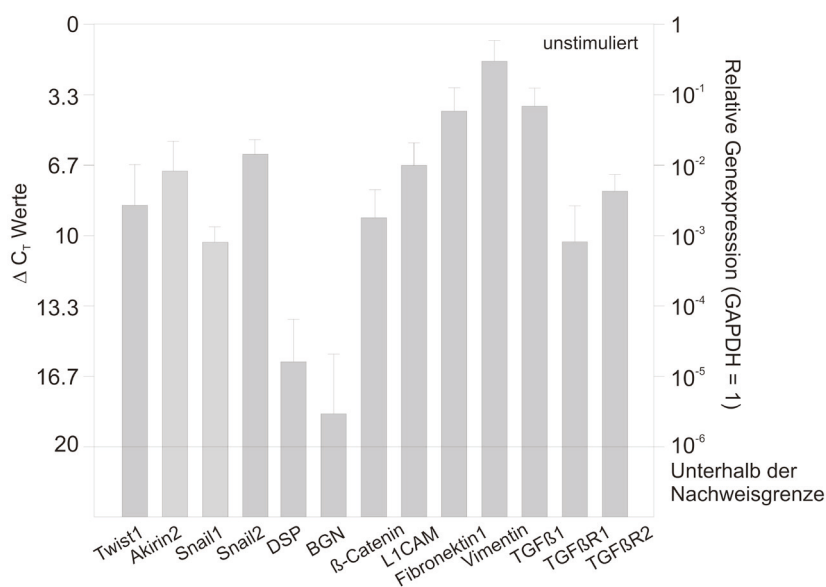


Abb. 13:
Grundexpressionen verschiedener EMT-Marker in T98G-Zellen
 Darstellung der mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelten ΔC_T -Werte und ihrer Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken. Ein niedriger ΔC_T -Wert korrespondiert dabei mit einer hohen Expression von mRNA. Aufgrund der logarithmischen Verhältnisse gibt ein 3,3-facher Unterschied des ΔC_T -Wertes eine 10-fache Genexpressionsdifferenz (Über- oder Unterexpression) an. L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül), TGF β 1-R (*Transforming Growth Factor* β 1-Receptor).

3.5.2 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid

Da das Proteoglykan Biglykan bereits in seiner Grundexpression sowie unter Einwirkung von DMSO, in welchem das Chemotherapeutikum Temozolomid gelöst vorlag, eine kaum detektierbare Genexpression aufwies, wurde es in der Versuchsreihe nicht weiter untersucht. Alle anderen untersuchten EMT-Marker fanden sich nach Temozolomid-Behandlung vermehrt exprimiert. Nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden zeigten sich dabei bereits statistisch signifikante Induktionen der Expressionen der Marker Snail1 und β -Catenin. Im Vergleich zur Kontrolle ergab sich für Snail1 eine 3-fache (n-facher Expressionsunterschied: $2,73 \pm 0,79$, $p = 0,009$), für β -Catenin eine 2-fache ($1,87 \pm 0,53$, $p = 0,036$) Induktion. Abbildung 14 illustriert die zuvor beschriebenen Sachverhalte.

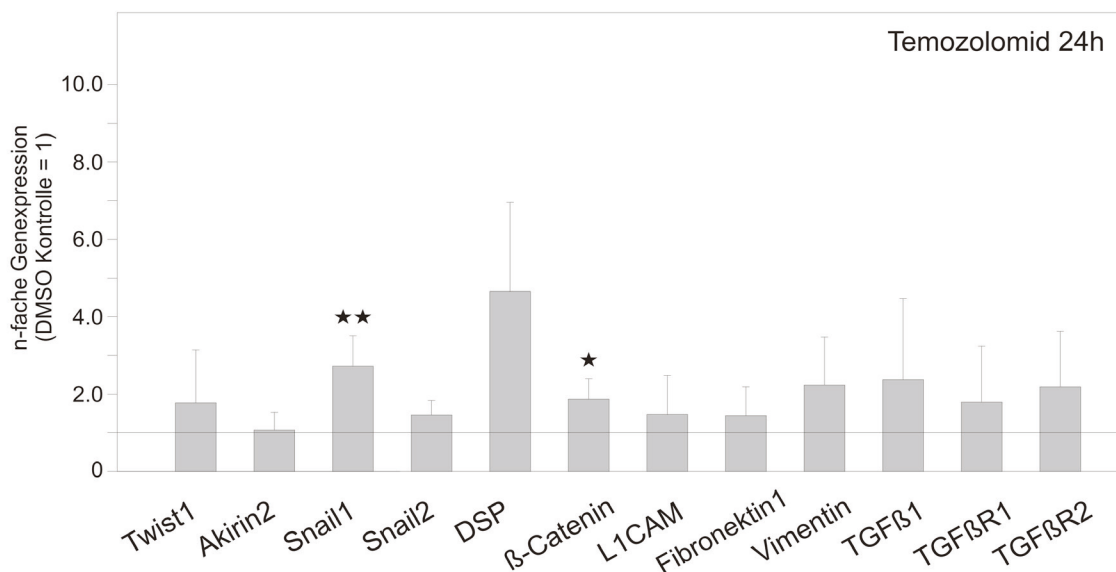


Abb. 14:

Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid für 24 Stunden
Darstellung der Mittelwerte des n-fachen Expressionsunterschiedes sowie der jeweiligen Standardabweichungen der verschiedenen Marker. Beides wurde aus den mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelten ΔC_T -Werten berechnet. Eine horizontale Linie bei der n-fachen Expression 1 spiegelt die DMSO-Kontrolle wieder. $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***. DSP (Desmoplakin), L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül), TGF β 1-R (*Transforming Growth Factor* β 1-*Receptor*). Dieses gilt auch für die folgende Abbildung. Es zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation mit Temozolomid eine statistisch signifikante Induktion der mRNA-Expression für Snail1 und β -Catenin.

Die Auswertung des Versuches nach 48 Stunden konnte noch eindrucklichere Ergebnisse liefern. Aus Abbildung 15 geht hervor, dass die Marker Twist1 (n-facher Expressionsunterschied: $5,98 \pm 3,52$), Desmoplakin ($5,46 \pm 1,99$) und Vimentin ($3,47 \pm 1,6$) auf den Stimulus mit Temozolomid mit einer statistisch hoch signifikanten ($p < 0,001$) Expressionssteigerung reagierten. Sehr signifikante Induktionen konnten auch für Snail1 ($4,67 \pm 2,26$, $p = 0,002$), β -Catenin ($2,93 \pm 1,67$, $p = 0,004$) und TGF β R1 ($2,10 \pm 0,95$,

p = 0,007) ausgemacht werden. Ebenfalls fand sich eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1CAM (2,93 +/- 2,39, p = 0,023). Die mRNA-Expression von Snail2, Fibronektin, TGFβ1 und TGFβR2 wurden ebenfalls induziert, allerdings ergaben sich dabei keine statistischen Signifikanzen.

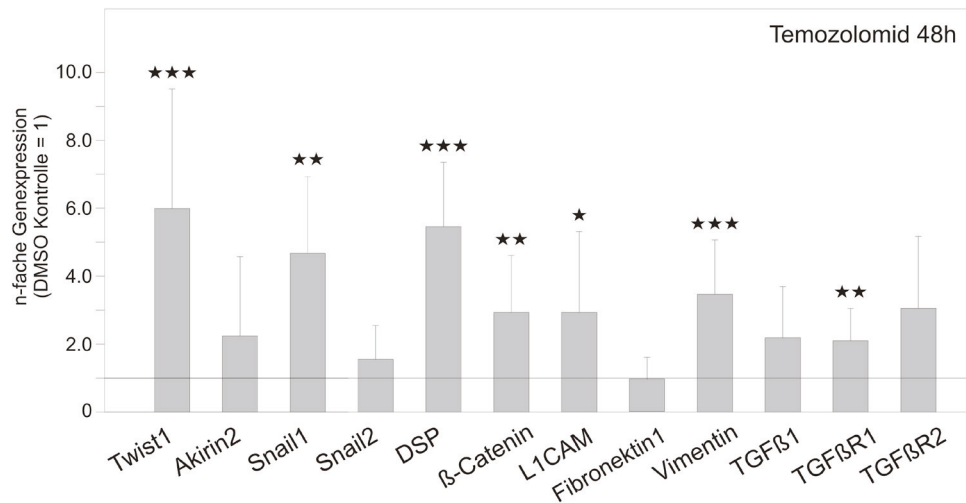


Abb. 15:

Stimulation der T98G-Zellreihe mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid für 48 Stunden

Es ließen sich statistisch signifikante Induktionen von Twist1, Snail1, DSP (Desmoplakin), β-Catenin, L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül), Vimentin sowie TGFβR1 (*Transforming Growth Factor β1-Receptor*) nachweisen.

Fazit:

Die Ergebnisse machen deutlich, dass das Chemotherapeutikum Temozolomid verschiedene mit dem EMT in Zusammenhang stehende Marker statistisch signifikant induziert, bevorzugt nach 48 Stunden.

3.5.3 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem EMT-Induktor TGFβ1

Auch die Stimulationsversuche mit dem EMT-Induktor TGFβ1 führten zur Induktion unterschiedlicher EMT-Marker. So konnte nach 24 Stunden Einwirkungszeit des Reagenz eine statistisch sehr signifikante Erhöhung der Genexpression von Vimentin um das 1,6-fache (n-facher Expressionsunterschied: 1,58 +/- 0,4, p = 0,008) beobachtet werden. Mit gleicher Signifikanz war eine Induktion von TGFβ1 um das 3-fache (3,01 +/- 1,69, p = 0,003) auszumachen. TGFβR2 wies eine 2-fache Induktion (1,83 +/- 0,78, p = 0,04) der Genexpression auf.

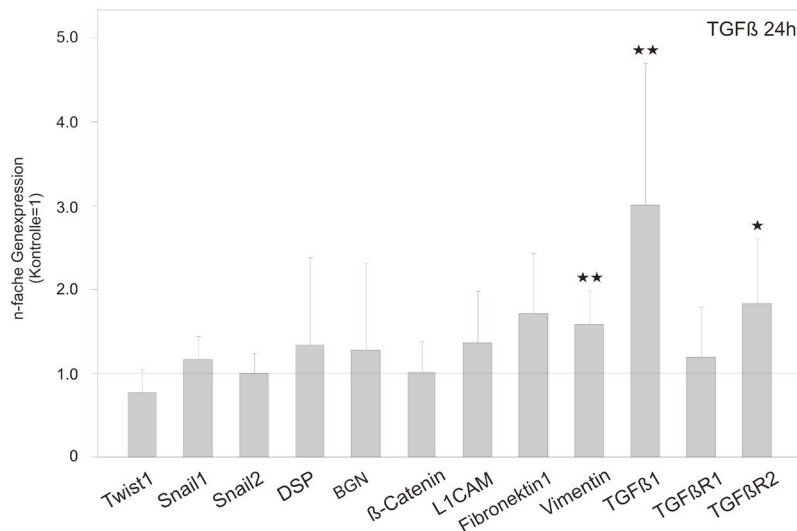


Abb. 16:

Stimulation der T98G-Zelllinie mit dem EMT-Induktor TGFβ1 für 24 Stunden

Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte des n-fachen Expressionsunterschiedes mit jeweiliger Standardabweichung. Zur Ermittlung dieser Werte wurden die aus der quantitativen *Real-Time* PCR gewonnenen ΔC_T -Werte verwendet. Eine horizontale Linie auf der n-fachen Expressionshöhe 1.0 stellt die Kontrolle der Stimulation dar. DSP (Desmoplakin), BGN (Biglykan), L1CAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül), TGFβ-R (*Transforming Growth Factor* β1-*Receptor*). $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***. Die Erklärung gilt auch für die folgende Abbildung.

Nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden konnten bereits statistisch signifikante Induktionen der Marker Vimentin, TGFβ1 und TGFβR2 ausgemacht werden.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte kein statistisch signifikanter Effekt des Stimulans auf TGFβR2 mehr festgestellt werden, dafür wiesen die Marker Snail1 sowie Biglykan nun statistisch signifikante Hochregulationen ihrer Genexpressionen auf. Snail1 (1,81 +/- 0,86, $p = 0,03$) und Biglykan (2,1 +/- 0,74, $p = 0,017$) zeigten dabei beide eine 2-fache Induktion. Die bereits nach 24 Stunden signifikant regulierten Marker Vimentin und TGFβ1 lieferten ähnliche Ergebnisse auch nach längerer Inkubation mit jeweils geringfügig erhöhten Induktionen (Vimentin: 1,77 +/- 0,82, $p = 0,04$; TGFβ1: 3,35 +/- 1,49, $p < 0,001$).

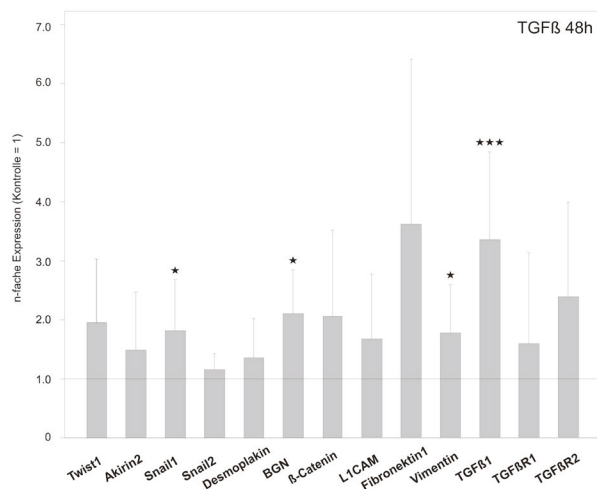


Abb. 17:

Stimulation der T98G-Zellreihe mit dem EMT-Induktor TGFβ1 für 48 Stunden

Nach 48-stündiger Stimulation der Zellen mit TGFβ1 (*Transforming Growth Factor* β1) konnten statistisch signifikante Induktionen der Marker Snail1, BGN (Biglykan), Vimentin und TGFβ1 beobachtet werden.

Fazit:

Es lässt sich im Rahmen dieses Versuches erkennen, dass der EMT-Induktor TGFβ1 abhängig von seiner Einwirkungszeit sich selbst, seinen Rezeptor TGFβR2 sowie weitere EMT-Marker positiv reguliert.

3.6 Patientencharakteristika

Von 9 der insgesamt 17 gepaarten Primär- und Rezidiv-Tumorproben konnten klinische Daten erhoben werden. Aufgrund der geringen Größe des Kollektivs ließen sich jedoch keine eindeutigen Aussagen aus der Analyse ableiten. Die Illustrationen der durchgeführten Untersuchungen sind in Kapitel 7.1 angeführt.

KAPITEL 4: DISKUSSION

Das Glioblastoma multiforme gilt als bösartigster hirneigener Tumor, der die Lebenszeit massiv verkürzt, mit einem medianen Überleben von 1,5 Jahren nach Diagnosestellung⁽¹⁰⁴⁾. Derzeit besteht das Therapiekonzept aus einer möglichst kompletten Resektion des neoplastischen Gewebes und sich anschließender concomitanter Radiochemotherapie mit Temozolomid nach dem Stupp-Schema. Trotz Fortschritten auf den Gebieten der operativen Versorgung und adjuvanten Behandlungskonzepte handelt es sich bei allen Therapie-modalitäten um palliative Ansätze⁽²⁰⁾. Eine wichtige Ursache für die schlechte Prognose der Erkrankung ist der stark invasive Charakter der Tumorzellen. Dieser macht eine mikroskopisch komplette Resektion, auch R₀-Resektion genannt, des Gewebes unmöglich und liefert damit Ausgangsmaterial für Tumorrezidive⁽¹⁴⁾. Ebenfalls trägt die oftmals zu beobachtende Resistenz der genetisch heterogenen Tumorzellen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie zum schlechten Ansprechen auf die Behandlung bei⁽¹⁰⁴⁾.

Das infiltrierende Wachstum der Tumorzellen und deren zum Teil fehlendes Ansprechen auf derzeitige Therapiestrategien wurden in verschiedenen Untersuchungen neben anderen Aspekten auf die epitheliale-mesenchymale Transition zurückgeführt⁽⁴⁵⁾. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Twist1 sowie Mitglieder der Snail-Familie die Beweglichkeit und Invasivität von Glioblastom-Tumorzellen fördern und β -Catenin dabei einen Beitrag durch Spaltung der extrazellulären Matrix leistet⁽³⁸⁾. Der klassische E-Cadherin zu N-Cadherin *switch*, welcher bei anderen Tumoren als Kennzeichen der EMT beschrieben und durch Twist1 vermittelt wird, konnte im Glioblastom bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden⁽⁵¹⁾. E-Cadherin scheint zwar eine Rolle in der Progression neuroepithelialer Tumoren zu spielen⁽¹⁰⁵⁾, im Glioblastom selbst ist es allerdings nur schwach nachweisbar. Insofern stellt es bei dem EMT-*switch*, den man zum Beispiel in der Entwicklung von Primär- und Rezidivtumoren analysieren möchte, im Falle der Glioblastome kein geeignetes *read-out* Molekül dar. Vor diesem Hintergrund wurde der Begriff der glialen-mesenchymalen Transition (GMT) als eine mögliche Bezeichnung der EMT im Rahmen des Glioblastoms durch Mahabir et al. eingeführt⁽¹³⁾.

Ziel dieser Arbeit war es, epitheliale- und mesenchymale Marker der EMT in der Pathogenese des Glioblastoms zu überprüfen und in einem zweiten Teil mögliche Veränderungen ihrer Genexpression unter Standardchemotherapie und Einfluss des EMT-Induktors *Transforming Growth Factor* β 1 (TGF β 1) zu dokumentieren.

4.1 Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Marker auf mRNA-Ebene

Der im ersten Abschnitt durchgeführte Vergleich von Genexpressionen verschiedener Marker in solidem Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe zeigte eine im Mittel statistisch signifikant geringere Genexpression der EMT-Marker Twist1, Snail1, Snail2, Biglykan (BGN) sowie von β -Catenin im Zweitumor. Eine wichtige Rolle wurde diesen Markern in der EMT im Glioblastom in Veröffentlichungen bereits zugeschrieben. So führte ein *knock-down* von Snail1 in Glioblastom-Zelllinien zu einer verminderten Proliferation, Entwicklungsfähigkeit und Invasivität der Zellen sowie zur Blockierung der Zell-Zyklus-Progression⁽¹⁰⁶⁾.

Ebenfalls führte Snail1 im Glioblastom zu einer verminderten Expression epithelialer, gleichzeitig verstärkten Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin und Fibronectin^(64, 65). Snail2 und BGN wurden unter anderem als Teil einer Stadium-abhängigen Genexpressionssignatur von EMT-Markern beschrieben, welche bei Glioblastom-Patienten mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie und verkürztem rezidivfreiem Intervall verbunden war⁽⁴⁵⁾. Während BGN als extrazellulärer Mediator der EMT durch TGF β 1 induziert zu werden scheint⁽⁷⁹⁾, konnte für Snail2 eine Korrelation mit Twist1 in GBM-Zelllinien beobachtet werden, wobei die in Gliomen hoher Malignität gefundene Überexpression der Marker mit einer verstärkten Invasivität der Zellen verbunden war⁽⁵¹⁾. Auch für Twist1 existiert eine Vielzahl an Publikationen, die dem Marker eine wichtige Rolle in der EMT im Glioblastom zukommen lassen^(49, 51). Neben der bereits beschriebenen Überexpression des Markers in GBM-Zelllinien führte Twist1 zu einer vermehrten Expression der funktional in die Zelladhäsion, -beweglichkeit und -migration eingebundenen Proteine. Eine Hemmung des Transkriptionsfaktors wiederum setzte die Invasivität und das Wachstum von GBM-Stammzellen herab⁽⁵¹⁾. β -Catenin hingegen konnte eine wichtige Funktion als intrazelluläres Signalmolekül im WNT-Signalweg zugeschrieben werden, der in der Pathogenese des Glioblastoms aktiviert zu sein scheint, besonders in Zellen der invasiven Front. So führte der aktivierte Signalweg in Glioblastom-Zelllinien zu einer vermehrten Expression von EMT-Markern, wie Twist1, Snail1 und Snail2, wobei letztendlich ein mesenchymaler Phänotyp entstand. Ebenfalls korrelierte seine Expression mit dem mutmaßlichen Stammzellmarker CD133⁽⁸³⁾ und war zudem mit einem verkürzten Gesamtüberleben der GBM-Patienten verbunden⁽⁸⁴⁾.

Auch das in der Progression des Glioblastoms bereits beschriebene neuronale Zelladhäsionsmolekül L1CAM wies überraschenderweise deutliche Genexpressionsunterschiede zwischen Primär- und Rezidiv-Kollektiv auf. Im Rezidiv-Gewebe zeigte sich dabei eine im Schnitt verstärkte Genexpression. Eine verstärkte Expression des Markers in GBM-Zellen konnte zuvor bereits beobachtet werden, wobei diese mit einer schlechten Prognose, einem aggressiven

Phänotyp und hohen Malignitätsstadien assoziiert war⁽⁸⁹⁾. Bisherige Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass L1CAM durch eine exogene Stimulation mit TGFβ1 in T98G Zellen vermehrt exprimiert wird, was zu einem schlechteren Ansprechen auf die Chemotherapie führte⁽⁸⁹⁾. In humanen duktalem Pankreasepithel- und Pankreasadenokarzinomzellen erwies sich die Bindung von Snail2 als essentiell für diese Induktion⁽¹⁰⁷⁾. Zusammengefasst unterstützen die beschriebenen Publikationen die wichtige Rolle der Marker in der EMT des Glioblastoms, wie sie auch in dieser Arbeit durch die beobachteten Genexpressionsunterschiede in Primär- und Rezidiv-Tumorgewebe deutlich wird. Überraschend scheint jedoch, dass in den vorliegenden Untersuchungen in den meisten Fällen eine geringere Expression der EMT-Marker im Rezidiv-Kollektiv zu beobachten war. Hierfür kommen mehrere Aspekte in Betracht. Zum einen könnte sich die zelluläre Komposition des Primär- und Rezidiv-Kollektivs stark voneinander unterscheiden. Wenn man davon ausgeht, dass nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern auch Endothel- sowie infiltrierende Immunzellen Träger der entsprechenden Marker sind, handelt es sich hierbei sicherlich um einen wichtigen Aspekt. Zum anderen könnte ein weiteres, in der Literatur als mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bekanntes Phänomen eine Rolle spielen⁽¹⁰⁸⁾. Hierbei kommt es im Rahmen der Rezidiventstehung zu einer Umkehr der EMT mit einem Verlust der mesenchymalen Marker.

Um zu überprüfen, inwiefern diese Mechanismen auch in der Progression des Glioblastoms eine Rolle spielen und um zusätzlich die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu erhärten sowie ein detaillierteres Verständnis der EMT in der Progression des Glioblastoms zu erhalten, wurden, wie im Folgenden diskutiert, weitere Analysen durchgeführt.

4.2 Zellentitäten und Korrelationsanalyse

Da das Tumorgewebe neben den neoplastischen Zellen natürlich auch andere Zellentitäten enthielt, welche eine mögliche Quelle der EMT-Marker-Expression darstellen, könnte auch eine Veränderung ihrer Anzahl oder eine veränderte Genexpressionsstärke den Gehalt der EMT-Marker im Gewebe beeinflusst haben. Daher erfolgte eine Untersuchung der Primär- und Rezidiv-Tumorproben auf den mRNA-Gehalt eines jeweils glialen, endothelialen sowie mikroglialen Markers. Im Anschluss sollte eine Korrelationsanalyse aller EMT-Marker mit den Markern der verschiedenen Zellentitäten Hinweise auf mögliche Zusammenhänge geben. Die Überprüfung der Primär- und Rezidiv-Kollektive auf eine Veränderung ihrer Zellzusammensetzung auf mRNA-Ebene mittels qPCR ergab keine deutlichen Unterschiede. Die anschließende Korrelationsanalyse zeigte jedoch insbesondere für das Rezidiv-Kollektiv für verschiedene Marker, darunter TGFβ1 und seine Rezeptoren, Akirin2, BGN, Desmoplakin

(DSP) und Fibronectin1 (FN1) statistisch signifikant positive Korrelationen mit der Genexpression der Marker der unterschiedlichen Zellentitäten. Besonders TGFβ1 und seine Rezeptoren wiesen deutliche Korrelationen bezüglich der beschriebenen Expressionen auf. Dies unterstützend sind eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors im Glioblastom sowie seine dort entfaltete Angiogenese-fördernde Wirkung in der Literatur bereits beschrieben^(109, 110). Ebenfalls finden sich Daten über einen Zusammenhang von TGFβ1 und Tumor-assoziierten Makrophagen, den sogenannten „TAMs“, wobei eine Sekretion des Transkriptionsfaktors von mikroglialen Zellen beobachtet werden konnte, welches letztendlich zu einer Förderung der Invasivität des Glioblastoms führte⁽¹¹¹⁾. Auch für das erst kürzlich als essentieller Twist-Kofaktor in der embryonalen Myogenese von *Drosophila melanogaster* beschriebene Akirin2⁽⁵⁷⁾ finden sich die Ergebnisse der Arbeit stützende Daten. So konnte eine deutliche Expression des Proteins im Glioblastom-Gewebe durch Untersuchungen der neurochirurgischen Forschungsabteilung am UKSH Kiel beobachtet werden. Eine Begutachtung des apoptotischen Verhaltens von Glioblastom-Zellen nach Akirin2 *knock-down* deutete zudem auf eine funktionelle Rolle des Proteins als Tumorpromotor hin (unveröffentlichte Daten). Die BGN-Korrelationen betreffend existieren neben den bereits vorgestellten Publikationen zu BGN im Glioblastom⁽⁴⁵⁾ ebenfalls Studien, die einen Zusammenhang des Markers zu Tumor-Endothelzellen ausmachen konnten. Dabei fand sich eine vermehrte Expression von BGN in Tumor-Endothelzellen (humane Melanom-Xenotransplantate der Maus) im Vergleich zu physiologischen Endothelzellen (Maus), verbunden mit einer erhöhten Migration⁽¹¹²⁾. Die vorgefundene Korrelation von DSP mit Pecam1 (Endothelzellenmarker) wird durch Abbott et al. unterstützt, die das zytoplasmatische Plaqueprotein im Endothel der physiologischen Blut-Hirn-Schranke beschrieben haben⁽¹¹³⁾. Ferner zeigten Untersuchungen von DSP im Zusammenhang mit der EMT verschiedener Neoplasien eine verminderte Expression des epithelialen Markers im Zuge des Prozesses⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Demgegenüber postulieren Ljubimova et al. eine erhöhte Expression des Proteins in humanen Gliomen, wobei insgesamt nur 5 primäre Glioblastome untersucht wurden. Das zum Vergleich eingesetzte „gesunde“ Hirnparenchym wurde Trauma-Patienten entnommen und war daher vermutlich auch anderen einflussnehmenden Faktoren ausgesetzt⁽¹¹⁴⁾. Bislang existierten jedoch noch keine Studien, die den Marker im Glioblastom im Bezug auf die jeweiligen Expressionsquellen betrachteten, wie es in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung erfolgte. Ebenfalls in Übereinstimmung mit der beobachteten Korrelation von FN1 mit Pecam1 beschrieben Serres et al. eine signifikant reduzierte Angiogenese nach Depletion des Glykoproteins in orthotropen *Grafts*, wobei sich auch das GBM-Wachstum verringerte. Zudem führte die Reduktion des Proteins in den kultivierten Tumorzellen zu starken Veränderungen

in der Zelladhäsion und Motilität, welches insgesamt zu einer verminderten Invasivität der Zellen und Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber radioaktiver Strahlung führte⁽⁹³⁾.

4.3 Gruppenmerkmale

Wie eingangs beschrieben war in der PCR in den meisten Fällen eine geringere Genexpression der EMT-Marker im Rezidiv-Kollektiv zu beobachten. Dieses könnte auf den bereits beschriebenen Prozessen beruhen (MET, zelluläre Komposition des jeweiligen Gewebes), aber auch darin begründet sein, dass das Primär- und Rezidiv-Kollektiv jeweils in seiner Gesamtheit betrachtet wurde. Vor diesem Hintergrund erfolgte eine sogenannte Gruppenanalyse der vorliegenden PCR-Ergebnisse, im Rahmen derer die individuellen Primär- und Rezidivpaare einzeln bezüglich ihrer EMT-Marker-Expression analysiert wurden. Es ließen sich insgesamt fünf Gruppen ausmachen, die ein unterschiedliches Muster in der Veränderung ihrer Genexpression im Vergleich von Primär- zu Rezidiv-Tumorgewebe aufwiesen. Während die Mehrzahl der Proben einen Verlust der Genexpression epithelialer, glialer sowie mesenchymaler Marker erfuhr, ließen sich auch Gruppen mit einer Zunahme der unterschiedlichen Marker ausmachen. Zudem konnten Subgruppen identifiziert werden, die neben der EMT eine regelrechte Umkehr dieses Prozesses, also die MET⁽¹⁰⁸⁾, aufwiesen oder die Änderung glialer Marker zeigten, im Sinne einer GMT⁽¹³⁾. Diese Ergebnisse stützen zuvor publizierte Daten, die das Vorkommen von bestimmten „EMT-Phänotypen“ in der Progression des Glioblastoms beschreiben. Die Phänotypen waren dabei durch einander entsprechende Genexpressionsprofile verschiedener EMT-Marker gekennzeichnet⁽⁴⁵⁾. Ebenfalls stimmen die Beobachtungen auch mit einer erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Zarkoob et al. überein, welche die Korrelation der verschiedenen molekularen Glioblastom-Subtypen mit dem potentiellen Stammzellmarker CD133 untersuchte. Die stärksten Korrelationen mit dem Zelloberflächenmolekül konnten dabei mit der mesenchymalen und neuralen Subgruppe verzeichnet werden; diese Beobachtungen identifizierte sie als aggressive Subpopulationen. Während die mesenchymale Subgruppe der Glioblastome Ähnlichkeiten mit den Signaturen der EMT sowie des CD133 aufwies, zeigten sich auch einige Unterschiede zwischen den Gruppen, sicherlich auch aufgrund des gegensätzlichen Verhaltens der EMT- und CD133-Signatur⁽¹¹⁵⁾.

In der Literatur gibt es zu dem Vergleich der Expression von EMT-Markern im Primär- und Rezidiv-Kollektiv bislang nur eine Veröffentlichung. So beschrieb eine erst kürzlich erschienene Publikation eine Zunahme von solitär mesenchymalen Markern im Rezidiv, wobei das Auftreten mesenchymaler Marker in Rezidiven maligner Gliome im Hinblick auf die Effekte einer Strahlentherapie untersucht wurde. Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings

nur 7 Paare maligner Gliome mittels quantitativer *Real-Time* PCR und ein größeres Kollektiv von 22 gepaarten GBM-Proben ausschließlich mittels *single*-Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Vier der in der vorliegenden Arbeit mittels PCR überprüften Marker wurden auch in dieser Arbeit betrachtet, Twist1, Snail1, Snail2 sowie Fibronectin. Es ergaben sich dabei einfach statistisch signifikant höhere Expressionen für Snail1 und Fibronectin⁽¹³⁾. Aufgrund fehlender Berücksichtigung eines eventuell differierenden Verhaltens innerhalb von Subgruppen der Tumorpaaare und der geringeren Fallzahl, könnten die Resultate der Arbeitsgruppe allerdings auch nur für ein von EMT geprägtes Kollektiv sprechen. Auch gliale Marker wurden in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Ebenso muss, wie eingangs bereits beschrieben, bei einer Bewertung der PCR-Ergebnisse bedacht werden, dass die Marker in verschiedenen Zellarten des untersuchten Gewebes vorkommen könnten und somit auch eine Änderung der Anzahl dieser Zellentitäten oder eine veränderte Genexpression der EMT-Marker innerhalb der Zellen die Ergebnisse erklären könnten. Dieser Sachverhalt wurde in der zuvor angeführten Publikation⁽¹³⁾ nicht überprüft. Zusammengefasst lässt sich bereits jetzt feststellen, dass das Phänomen EMT im Glioblastom ein hochkomplexes Geschehen darstellt, das eine detaillierte Analyse für individuelle Primär- und Rezidivpaare erfordert.

4.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Die zuvor dargestellte Korrelationsanalyse konnte bereits Hinweise auf einen Zusammenhang verschiedener Marker zu Zellentitäten liefern. Eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung sollte nun eine Bestimmung der Lokalisation und Expression der Marker sowie Beurteilung eventueller morphologischer Unterschiede von Primär- und Rezidiv-Gewebe möglich machen. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung von fünf der zuvor mittels qPCR untersuchten Patientenproben zeigte innerhalb des kleinen Kollektivs deutliche interindividuelle Unterschiede. Ein immunhistochemischer Nachweis einer pauschal veränderten Genexpression von Vimentin (erhöht) oder GFAP (vermindert), wie er in einer subjektiven Beurteilung von GBM-Rezidiven in der bereits angeführten Studie ausgemacht wurde⁽¹³⁾, konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Vor dem Hintergrund, dass die gefärbten Gewebeproben, bis auf die Gewebeschnitte der Probe P3, allesamt unterschiedlichen Gruppen der zuvor durchgeführten PCR-Gruppenanalyse zuzuordnen waren, scheint dies jedoch nicht verwunderlich. Oftmals ließen sich mittels PCR zu verzeichnende interindividuelle Expressionsunterschiede auch im jeweiligen Präparat erkennen. In der mittels Doppelfärbung überprüften Lokalisation der Marker konnte ihre Präsenz in den GFAP-, vWF- sowie CD11b-positiven Zellen beobachtet werden, welches alle drei Zellentitäten als Quellen einer potentiellen EMT-Marker-Expression identifiziert. Es existieren viele Publikationen, in denen die Lokalisationen der Marker in den in dieser Arbeit

positiv gefärbten Zellarten beschrieben sind. So konnte beispielsweise für β -Catenin eine zytoplasmatische, membranöse und nukleäre Färbung im GBM beobachtet werden, wobei Tumorzellen und Endothelzellen eine deutliche Färbung aufwiesen⁽¹¹⁶⁾. Zudem beschrieb eine andere Forschergruppe eine veränderte Lokalisation des Markers in einem Vergleich von Gefäßen des normalen Hirnparenchyms zu proliferierenden Endothelzellen des GBMs, welches Auswirkungen auf die Angiogenese haben könnte⁽⁸⁵⁾. Ebenfalls wurde auch ein Zusammenhang mit CD11b-positiven Zellen von Sielska et al. beschrieben, in denen der Marker in der frühen Phase der Mikroglia-Rekrutierung entdeckt werden konnte⁽¹¹⁷⁾. Untersuchungen von L1CAM konnten eine Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls auf Endothelzellen neoplastischen Gewebes beobachten⁽¹¹⁸⁾, wie es sich auch in dieser Arbeit gezeigt hat. Das Typ III Intermediärfilamentprotein Vimentin, welches in Zellen mesenchymaler Herkunft den Hauptanteil des Zytoskelettes bildet, ist als Teil der EMT-Signatur am Prozess der Tumorphogenese diverser Neoplasien, darunter auch des Glioblastoms, beteiligt⁽⁶⁵⁾. Der Marker zeigte sich in vorhergehenden Studien in proliferierenden Endothelzellen von Endothelknospen und Glomeruli des GBMs sowie in anderen Zelltypen der Gefäßwand intensiv gefärbt⁽¹¹⁹⁾. Da Mikroglia, bzw. Makrophagen Zellen mesenchymalen Ursprungs darstellen, ist die in dieser Arbeit größtenteils zu beobachtete Kofärbung (Überlagerung der Fluoreszenzen beider Marker) von Vimentin und CD11b nicht verwunderlich. Dies stützend sind Publikationen verfügbar⁽¹²⁰⁾. Nichts desto trotz beschrieb eine spanische Forschergruppe Vimentin-negative Makrophagen im Glioblastom, wobei erneut nur eine kleine Fallzahl von vier Patienten untersucht wurde⁽¹²¹⁾.

Insgesamt deuten auch diese Ergebnisse deutlich darauf hin, dass die EMT kein homogen in der Pathogenese des Glioblastoms fortschreitender Prozess ist. Die in die Progression des Glioblastoms involvierten Vorgänge scheinen auf eine spezialisierte und individuelle Art in den Primär-Rezidiv-Paaren aufzutreten. Da die zelluläre Architektur des Glioblastoms als sehr heterogen beschrieben ist, scheint dies nicht verwunderlich, besonders vor dem Hintergrund, dass unterschiedliche Zellentitäten als potentielle Quellen der EMT-Marker-Expression dienen.

4.5 Stimulation der Zelllinie T98G

4.5.1 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid

Da das alkylierende Zytostatikum Temozolomid als Standardchemotherapeutikum in der Glioblastom-Therapie eingesetzt wird, sind dessen Auswirkungen auf die EMT von besonderem Interesse. Um den Einfluss des Reagenz testen zu können, wurden T98G-Zellen mit dem Zytostatikum inkubiert und auf ihren Gehalt an EMT-Markern vor und nach Stimulation überprüft. Dabei führte das Zytostatikum zu deutlichen Induktionen der Expressionen beinahe aller untersuchten EMT-Marker. Stimulationsversuche an zwei verschiedenen Glioblastom-Zelllinien, die in der neurochirurgischen Forschungsabteilung des UKSH Kiel durchgeführt wurden, konnten bereits eine massive Induktion der Akirin2- und Twist1-Expression durch das Chemotherapeutikum auf mRNA- und Proteinebene nachweisen (unveröffentlichte Daten). Eine Untersuchung verschiedener EMT-Marker auf Bestrahlung konnte ebenfalls die Induktion der Genexpression unterschiedlicher mit der EMT in Zusammenhang stehender Marker, wie Snail1 ausmachen. Zusätzlich war nach der Bestrahlung eine vermehrte Migration, Invasion und Matrix-Metalloprotease2-Produktion der Zellen zu beobachten, Eigenschaften, welche allesamt durch *Snail1-knock-down* aufgehoben waren⁽¹³⁾. Ebenfalls publizierte eine Forschergruppe 2006 eine vermehrte Genexpression von Vimentin unter Temozolomid-, Radio- sowie kombinierter Radio-Chemotherapie in Glioblastom-Zelllinien und beschrieb dies als korrelierend mit den klinisch zu beobachteten aggressiveren Phänotypen der Rezidiv-Tumore nach Therapie⁽¹²²⁾.

Die Beobachtungen machen deutlich, dass die derzeitig als Standardverfahren eingesetzten Therapien selbst Einfluss auf den Prozess der EMT nehmen und damit neben dem gewünschten tumormassereduzierenden Effekt gleichzeitig eine Progression des Tumors fördern könnten. Da die Ergebnisse einen Beitrag zur Erklärung des schlechten Ansprechens auf die Behandlungsstrategien liefern, könnte die weiterführende Erforschung der durch die Therapien angestoßenen Signalwege und den damit verbundenen Konsequenzen für den Phänotyp der Tumorzellen ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Behandlungsoptionen darstellen.

4.5.2 Stimulation der Zelllinie T98G mit dem EMT-Induktor TGFβ1

Untersuchungen der T98G-GBM-Zelllinie auf die Auswirkungen des EMT-Induktors TGFβ1 konnten statistisch signifikante Induktionen der Expression des Markers selbst sowie seines Rezeptors2 aufzeigen. Ebenfalls erhöht waren die Genexpressionen der EMT-Marker Snail1, Biglykan und Vimentin. Die Beobachtungen dieser Arbeit stützend publizierten Moustakas et al., dass der Transkriptionsfaktor über eine Regulation der Proteine Twist1, Snail1 sowie Snail2

die EMT zu fördern und zudem über Snail1/2 Einfluss auf die Genexpression mesenchymaler Marker, wie Vimentin und Fibronectin zu nehmen scheint⁽⁹⁵⁾. Ebenfalls ist auch eine Induktion des Proteoglykans Biglykan durch TGF β in der Literatur beschrieben⁽⁷⁹⁾. Da die Tumorzellen sowie deren Mikroumgebung den EMT-Induktor reichlich sezernieren, stellt TGF β 1 einen wichtigen molekularbiologischen Einflussfaktor der Pathogenese hin zur Entwicklung eines Tumor-Rezidivs dar⁽³⁷⁾.

Schlussfolgernd scheint es sich bei den Prozessen der epithelialen/ glialen-mesenchymalen Transition und mesenchymalen-epithelialen Transition um komplex in die Progression des Glioblastoms involvierte Vorgänge zu handeln, auf welche die derzeit angewandten Standardtherapien in der Glioblastom-Behandlung Einfluss zu nehmen scheinen. Die zu erwartenden tumorsuppressiven Effekte der Therapie könnten dadurch herabsetzt werden und eine mögliche Erklärung für die hohe Rezidivrate der Tumorentität trotz Behandlung darstellen. Daher bedarf es weitergehender, individualisierter Untersuchungen, um ein besseres Verständnis für die in der Progression ablaufenden Prozesse zu gewinnen und damit letztendlich die derzeit schlechte Prognose der Erkrankung verbessern zu können.

KAPITEL 5: ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastoma multiforme zählt zu den Tumorarten, für die derzeit keine kurativen Therapien verfügbar sind. In der Tumorentwicklung und dem Fortschreiten der Erkrankung wurden molekularbiologische Prozesse beschrieben, wie die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), die einen Beitrag zur erhöhten Invasivität der Tumorzellen leisten und letztendlich das Ansprechen auf die Behandlung reduzieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Marker der EMT in einem Vergleich von solidem gepaartem Primär- und Rezidiv-Glioblastom-Gewebe mittels quantitativer *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (PCR) und Immunfluoreszenzdoppelfärbung untersucht, um die in der Progression des Tumors ablaufenden Prozesse weiter erforschen zu können. Zudem erfolgte eine Testung der Glioblastom-Zelllinie T98G auf Einflüsse, denen Tumorzellen auch im Organismus ausgeliefert sind. Dabei wurden die Auswirkungen des Standardchemotherapeutikums Temozolomid untersucht, welches leitliniengerecht in der Therapie des Glioblastoms angewandt wird sowie die des Proteins *Transforming Growth Factor* β 1, das von Tumorzellen und der Mikroumgebung sezerniert wird und als Induktor der epithelialen-mesenchymalen Transition fungiert.

Die Ergebnisse der PCR zeigten eine im Mittel verminderte Expression von Twist1, Snail1, Snail2, Biglykan und β -Catenin sowie eine verstärkte Expression von L1CAM im Rezidiv-Kollektiv. Um zu überprüfen, ob ein Genexpressionsunterschied der Marker zwischen solidem Primär- und Rezidiv-Gewebe auch durch andere Zellentitäten neben den Tumorzellen hervorgerufen worden sein könnte, wurde eine Korrelationsanalyse mit den Daten der PCR angefertigt. Diese zeigte besonders im Rezidiv-Kollektiv für verschiedene Marker, darunter *Transforming Growth Factor* β 1 und seine Rezeptoren, Akirin2, Biglykan, Desmoplakin und Fibronectin1 statistisch signifikant positive Korrelationen der Expression der genannten Marker mit der Expression von Markern für Tumor-, Endothel- und Immunzellen. Detailliertere Betrachtungen der individuellen Primär- und Rezidiv-Paare konnten zudem fünf Untergruppen identifizieren, welche eine weite Spanne an Genexpressionsprofiländerungen der EMT-Marker aufwiesen, wobei verschiedene Variationen von Verlust oder Zunahme der Marker zu beobachten waren. Während die Mehrheit des untersuchten Kollektivs einer „generell entdifferenzierenden“ Gruppe mit Verlust epithelialer, glialer sowie mesenchymaler Marker angehörte, konnten unter anderem auch Gruppen mit einem beinahe gegenteiligen Charakter ausgemacht werden. Um die Ergebnisse der Korrelationsanalyse weitergehend zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung angefertigt, die neben den Tumorzellen auch Endothelzellen sowie Mikroglia, bzw. Makrophagen als potentielle Quelle einer EMT-Genexpression

identifizierte. Die Stimulationsversuche der Glioblastom-Zelllinie zeigten eine Induktion der Genexpression beinahe aller EMT-Marker durch Temozolomid. Auch *Transforming Growth Factor* β 1 führte zur Induktion der Expression einiger Marker, darunter Snail1, Biglykan und Vimentin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die epitheliale/ gliale-mesenchymale Transition und ebenfalls die mesenchymale-epitheliale Transition auf eine komplexe Art und Weise in die Progression des Glioblastoms involviert zu sein scheinen. Ebenfalls scheinen die Prozesse durch derzeit als Standardverfahren eingesetzte Therapiemodalitäten beeinflusst zu werden, was die zu erwartenden Tumor-reduzierenden Effekte herabsetzen und eine Erklärung für die hohe Rezidivrate der Tumorentität liefern könnte.

Diese Arbeit erweitert das Verständnis der ablaufenden Prozesse und stellt einen Ansatz für zukünftige Studien dar. Dieser Ansatz soll es ermöglichen, die derzeit verfügbaren Therapien weiterzuentwickeln oder neue Behandlungsstrategien zu finden, um die desaströse Prognose des Glioblastoma multiforme zu verbessern.

KAPITEL 6: LITERATURVERZEICHNIS

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2014. ENG.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109. eng.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology* 2013;15 Suppl 2:ii1-56. eng.
4. Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir, Erwin G. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J. Neurooncol.* 2004;70(2):229–43. eng.
5. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005;64(6):479–89. eng.
6. Hölper BM, Soldner F, Behr R. *Kompodium Neurochirurgie, 306 Tabellen.* 2nd ed. Rosenheim: ProINN-Verl.; 2007. XI, 567 S. ISBN: 978-3-00-020984-0.
7. Bailey P, Cushing H. *A Classification of Tumors of the Glioma Group.* Philadelphia: Lippincott 1926.
8. Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer* 1980;45(3):484–94. eng.
9. Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, Makino K, Kochi M, Saya H, Kuratsu J, Ushio Y. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer* 2002;95(2):249–57. eng.
10. Yang H, Wei D, Yang K, Tang W, Luo Y, Zhang J. The Prognosis of MGMT Promoter Methylation in Glioblastoma Patients of Different Race: A Meta-analysis. *Neurochem. Res.* 2014. ENG.
11. Cheng H, Yue W, Xie C, Zhang R, Hu S, Wang Z. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34(6):3555–9. eng.
12. Verhaak, Roel G W, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O’Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17(1):98–110. eng.
13. Mahabir R, Tanino M, Elmansuri A, Wang L, Kimura T, Itoh T, Ohba Y, Nishihara H, Shirato H, Tsuda M, Tanaka S. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-oncology* 2014;16(5): 671–85. eng.
14. Moskopp D, Moskopp-Wassmann, Wassmann H. *Neurochirurgie, Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk ; mit 206 Tabellen.* Stuttgart [u.a.]: Schattauer; 2005. XIX, 898 S. ISBN: 3794519914.
15. Tonn J, Westphal M, Rutka JT. *Oncology of CNS tumors.* 2nd ed. Heidelberg, New York: Springer; ©2010. 1 online resource (xxiii, 793. ISBN: 3642028748.
16. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* 2001;95(2):190–8. eng.
17. Colditz MJ, Jeffree RL. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *J Clin Neurosci* 2012;19(11):1471–4. eng.

18. Colditz MJ, van Leyen K, Jeffree RL. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects. *J Clin Neurosci* 2012;19(12):1611–6. eng.
19. Stupp R, Mason WP, van den Bent, Martin J, Weller M, Fisher B, Taphoorn, Martin J B, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(10):987–96. eng.
20. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent, Martin J, Taphoorn, Martin J B, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R. 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.* 2009;10(5):459–66. eng.
21. Perry J, Chambers A, Spithoff K, Laperriere N. Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol* 2007;14(5):189–94. eng.
22. Omuro A, Beal K, Gutin P, Karimi S, Correa DD, Kaley TJ, DeAngelis LM, Chan TA, Gavrilovic IT, Nolan C, Hormigo A, Lassman AB, Mellinghoff I, Grommes C, Reiner AS, Panageas KS, Baser RE, Tabar V, Pentsova E, Sanchez J, Barradas-Panchal R, Zhang J, Faivre G, Brennan CW, Abrey LE, Huse JT. Phase II Study of Bevacizumab, Temozolomide, and Hypofractionated Stereotactic Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2014. ENG.
23. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujicic D, Steinbach JP, Wick W, Tarnawski R, Nam D, Hau P, Weyerbrock A, Taphoorn, Martin J B, Shen C, Rao N, Thurzo L, Herrlinger U, Gupta T, Kortmann R, Adamska K, McBain C, Brandes AA, Tonn JC, Schnell O, Wiegel T, Kim C, Nabors LB, Reardon DA, van den Bent, Martin J, Hicking C, Markivskyy A, Picard M, Weller M. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1100–8. eng.
24. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367(6464):645–8. eng.
25. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(7):3983–8. eng.
26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401. eng.
27. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, Maria R de. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445(7123):111–5. eng.
28. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1(3):313–23. eng.
29. Zhou BS, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(10):806–23. eng.
30. Hide T, Takezaki T, Nakamura H, Kuratsu J, Kondo T. Brain tumor stem cells as research and treatment targets. *Brain Tumor Pathol* 2008;25(2):67–72. eng.
31. Bleau A, Huse JT, Holland EC. The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle* 2009;8(18):2936–44. eng.
32. Mani SA, Guo W, Liao M, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15. eng.
33. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1420–8. eng.
34. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995;154(1):8–20. eng.

35. Yan C, Grimm WA, Garner WL, Qin L, Travis T, Tan N, Han Y. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *Am. J. Pathol.* 2010;176(5):2247–58. eng.
36. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1776–84. eng.
37. Jung H, Fattet L, Yang J. Molecular Pathways: Linking Tumor Microenvironment to Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2014. ENG.
38. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 2013;331(2):131–8. eng.
39. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(18):10356–61. eng.
40. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2005;5(9):744–9. eng.
41. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(17):8319–26. eng.
42. Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14(1):29–43. eng.
43. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* 2007;213(2):374–83. eng.
44. Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics* 2010;3:51. eng.
45. Cheng W, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P, Anastassiou D. A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS ONE* 2012;7(4):e34705. eng.
46. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;9(3):157–73. eng.
47. Wever O de, Pauwels P, Craene B de, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Bex G. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem. Cell Biol.* 2008;130(3):481–94. eng.
48. Isenmann S, Arthur A, Zannettino, Andrew C W, Turner JL, Shi S, Glackin CA, Gronthos S. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells* 2009;27(10):2457–68. eng.
49. Khan MA, Chen H, Zhang D, Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol.* 2013;34(5):2497–506. eng.
50. Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br. J. Dermatol.* 2012;166(6):1184–97. eng.
51. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell J, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, Sánchez-García I, Silber JR, Horner PJ, Rostomily RC. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol. Cancer* 2010;9:194. eng.
52. Velpula KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Rao JS. Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1. *Oncotarget* 2011;2(12):1028–42. eng.
53. Nagaishi M, Paulus W, Brokinkel B, Vital A, Tanaka Y, Nakazato Y, Giangaspero F, Ohgaki H. Transcriptional factors for epithelial-mesenchymal transition are associated with mesenchymal differentiation in gliosarcoma. *Brain Pathol.* 2012;22(5):670–6. eng.

54. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Knabb JR, Papa S, Kuntzen C, Franzoso G. Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(11):3920–35. eng.
55. Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutteneuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart J. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat. Immunol.* 2008;9(1):97–104. eng.
56. Komiya Y, Kurabe N, Katagiri K, Ogawa M, Sugiyama A, Kawasaki Y, Tashiro F. A novel binding factor of 14-3-3beta functions as a transcriptional repressor and promotes anchorage-independent growth, tumorigenicity, and metastasis. *J. Biol. Chem.* 2008;283(27):18753–64. eng.
57. Nowak SJ, Aihara H, Gonzalez K, Nibu Y, Baylies MK. Akirin links twist-regulated transcription with the Brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002547. eng.
58. Harney AS, Meade TJ, LaBonne C. Targeted inactivation of Snail family EMT regulatory factors by a Co(III)-Ebox conjugate. *PLoS ONE* 2012;7(2):e32318. eng.
59. Pala A, Karpel-Massler G, Kast RE, Wirtz CR, Halatsch M. Epidermal to Mesenchymal Transition and Failure of EGFR-Targeted Therapy in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2012;4(2):523–30. eng.
60. Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004;18(10):1131–43. eng.
61. Wu W, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 2005;123(4):641–53. eng.
62. Goswami S, Philippar U, Sun D, Patsialou A, Avraham J, Wang W, Di Modugno F, Nistico P, Gertler FB, Condeelis JS. Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* 2009;26(2):153–9. eng.
63. Myung JK, Choi SA, Kim S, Wang K, Park S. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(5):1977–87. eng.
64. Han S, Kim J, Han M, Sim H, Kim K, Yoon S, Baek S, Kim B, Oh S. SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2011;31(3):489–96. eng.
65. Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2014;33(1):62. ENG.
66. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(2):a002543. eng.
67. Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, Gavrilovic J, Thiery JP. Reversible transition towards a fibroblastic phenotype in a rat carcinoma cell line. *Int. J. Cancer Suppl.* 1989;4:69–75. eng.
68. Wang Y, Yu G, Lee M, Lee S, Chu I, Leem S, Kim D. Lipocalin-2 negatively modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through the epidermal growth factor (TGF-beta1)/Lcn2/Twist1 pathway. *Hepatology* 2013;58(4):1349–61. eng.
69. Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, Maeda K, Hayashi T, Obara T, Miyazaki Y, Matsubara S, Natsugoe S, Takao S. Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum. Cell* 2012;25(1):1–8. eng.
70. Traupe H, van den Ouweland, A M, van Oost, B A, Vogel W, Vetter U, Warren ST, Rocchi M, Darlison MG, Ropers HH. Fine mapping of the human biglycan (BGN) gene within the Xq28 region employing a hybrid cell panel. *Genomics* 1992; 13(2):481–3. eng.
71. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin

- deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* 2002;17(7):1180–9. eng.
72. Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2004;14(3):203–34. eng.
73. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J.* 2010;277(19):3864–75. eng.
74. Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, Leder G, Adler G, Gress TM. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 2001;121(3):657–67. eng.
75. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2009;9(4):239–52. eng.
76. Benayahu D, Shur I, Marom R, Meller I, Issakov J. Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J. Cell. Biochem.* 2001;84(1):108–14. eng.
77. Mathias RA, Chen Y, Wang B, Ji H, Kapp EA, Moritz RL, Zhu H, Simpson RJ. Extracellular remodelling during oncogenic Ras-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates MDCK cell migration. *J. Proteome Res.* 2010;9(2):1007–19. eng.
78. Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J. Cell. Sci.* 2003;116(Pt 23):4857–64. eng.
79. Chen W, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J. Biol. Chem.* 2002;277(39):36118–28. eng.
80. Heegaard A, Xie Z, Young MF, Nielsen KL. Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors. *J. Cell. Biochem.* 2004;93(3):463–75. eng.
81. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 2009;17(1):9–26. eng.
82. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21(12):1021–30. eng.
83. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, Reithmeier T, Prinz M, Schubert J, Niedermann G, Brabletz T, Eberhart CG, Nikkhah G, Maciaczyk J. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 2012;325(1):42–53. eng.
84. Cooper, Lee A D, Kong J, Gutman DA, Wang F, Gao J, Appin C, Cholleti S, Pan T, Sharma A, Scarpace L, Mikkelsen T, Kurc T, Moreno CS, Brat DJ, Saltz JH. Integrated morphologic analysis for the identification and characterization of disease subtypes. *J Am Med Inform Assoc* 2012;19(2):317–23. eng.
85. Yano H, Hara A, Takenaka K, Nakatani K, Shinoda J, Shimokawa K, Yoshimi N, Mori H, Sakai N. Differential expression of beta-catenin in human glioblastoma multiforme and normal brain tissue. *Neurol. Res.* 2000;22(7):650–6. eng.
86. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 2008;7(12):1127–38. eng.
87. Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S, Altevogt P. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr* 2012;6(4):374–84. eng.
88. Shtutman M, Levina E, Ohouo P, Baig M, Roninson IB. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006;66(23):11370–80. eng.
89. Held-Feindt J, Schmelz S, Hattermann K, Mentlein R, Mehdorn HM, Sebens S. The neural adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance in human glioblastomas. *Neurochem. Int.* 2012;61(7):1183–91. eng.

90. Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, Huang Z, Huang Q, Rich JN, Bao S. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;406(4):643–8. eng.
91. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.* 2002;115(Pt 20):3861–3. eng.
92. Kim Y, Yi B, Kim N, Choi K. Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Exp. Mol. Med.* 2014;46:e108. eng.
93. Serres E, Debarbieux F, Stanchi F, Maggiorola L, Grall D, Turchi L, Burel-Vandenbos F, Figarella-Branger D, Virolle T, Rougon G, van Obberghen-Schilling E. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 2014;33(26):3451–62. eng.
94. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol. Cell* 1990;68(2):139–46. eng.
95. Moustakas A, Heldin C. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci.* 2005;118(Pt 16):3573–84. eng.
96. Chu IM, Lai W, Aprelikova O, El Touny, Lara H, Kouros-Mehr H, Green JE. Expression of GATA3 in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells induces a growth inhibitory response to TGFβ. *PLoS ONE* 2013;8(4):e61125. eng.
97. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002;12(1):22–9. eng.
98. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156–9. eng.
99. Sambrook J. *Molecular Cloning; a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. paginacao irregular v.1. ISBN: 9780879693091.
100. Ito, Daisuke; Imai, Yoshinori; Ohsawa, Keiko; Nakajima, Kazuyuki; Fukuuchi, Yasuo; Kohsaka, Shinichi (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. In: *Molecular Brain Research* 57 (1), S. 1–9. DOI: 10.1016/S0169-328X(98)00040-0.
101. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (Hg.): PECAM1 platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)]. Gene ID: 5175, updated on 19-Nov-2014. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175>.
102. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.: Integrin αM (44): sc-1186.
103. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.: VWF (F8/44/20): sc-53465.
104. Silvia Hofer, Roger Stupp. Systemtherapie bei Gliomen, Radio-(chemo-)therapeutische Ansätze bei Glioblastomen, anaplastischen Gliomen und low-grade-Gliomen. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie* 2007;5(5):26–31.
105. Motta, F J N; Valera, E. T.; Lucio-Eterovic, A K B; Queiroz, R G P; Neder, L.; Scrideli, C. A. et al. (2008): Differential expression of E-cadherin gene in human neuroepithelial tumors. In: *Genetics and molecular research : GMR* 7 (2), S. 295–304
106. Myung JK, Choi SA, Kim S, Wang K, Park S. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7(5):1977–87. eng.
107. Geismann C, Arlt A, Bauer I, Pfeifer M, Schirmer U, Altevogt P, Mürköster SS, Schäfer H. Binding of the transcription factor Slug to the L1CAM promoter is essential for transforming growth factor-β1 (TGF-β)-induced L1CAM expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *International journal of oncology* 2011;38(1):257–66. eng.
108. Yang, Jing; Weinberg, Robert A. (2008): Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. In: *Developmental cell* 14 (6), S. 818–829. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.

109. Joseph JV, Balasubramaniyan V, Walenkamp A, Kruyt, Frank A E. TGF- β as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochemical pharmacology* 2013;85(4):478–85. eng.
110. Kaminska B, Kocyc M, Kijewska M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 2013;986:171–87. eng.
111. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene* 2008;27(7):918–30. eng.
112. Yamamoto K, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Kawamoto T, Kitayama K, Akiyama K, Osawa T, Kondoh M, Matsuda K, Onodera Y, Fujie M, Kaga K, Hirano S, Shinohara N, Shindoh M, Hida K. Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *British journal of cancer* 2012;106(6):1214–23. eng.
113. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* 2006;7(1):41–53. eng.
114. Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, Yong WH, Riedinger MS, Miner JH, Sorokin LM, Ljubimov AV, Black KL. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer research* 2001;61(14):5601–10. eng.
115. Zarkoob H, Taube JH, Singh SK, Mani SA, Kohandel M. Investigating the link between molecular subtypes of glioblastoma, epithelial-mesenchymal transition, and CD133 cell surface protein. *PloS one* 2013;8(5):e64169. eng.
116. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A. β -catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer biology & therapy* 2011;11(8):753–61. eng.
117. Sielska, Malgorzata; Przanowski, Piotr; Wylot, Bartosz; Gabrusiewicz, Konrad; Maleszewska, Marta; Kijewska, Magdalena et al. (2013): Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. In: *The Journal of pathology* 230 (3), S. 310–321. DOI: 10.1002/path.4192.
118. Magrini, Elena; Villa, Alessandra; Angiolini, Francesca; Doni, Andrea; Mazzarol, Giovanni; Rudini, Noemi et al. (2014): Endothelial deficiency of L1 reduces tumor angiogenesis and promotes vessel normalization. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (10), S. 4335–4350. DOI: 10.1172/JCI70683.
119. Schiffer, D.; Giordana, M. T.; Mauro, A.; Migheli, A. (1986): Immunohistochemistry in neuro-oncology. In: *Basic and applied histochemistry* 30 (2), S. 253–265.
120. Mor-Vaknin, Nirit; Punturieri, Antonello; Sitwala, Kajal; Markovitz, David M. (2003): Vimentin is secreted by activated macrophages. In: *Nature cell biology* 5 (1), S. 59–63. DOI: 10.1038/ncb898.
121. Barcia, Carlos; Gomez, Aurora; Gallego-Sanchez, Jose M.; Perez-Valles, Ana; Castro, Maria G.; Lowenstein, Pedro R.; Herrero, Maria-Trinidad (2009): Infiltrating CTLs in Human Glioblastoma Establish Immunological Synapses with Tumorigenic Cells. In: *Am J Pathol* 175 (2), S. 786–798. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081034.
122. Trog, Daniela; Fountoulakis, Michael; Friedlein, Arno; Golubnitschaja, Olga (2006): Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions. In: *Proteomics* 6 (9), S. 2924–2930. DOI: 10.1002/pmic.200500587.

KAPITEL 7: ANLAGEN

7.1 Patientencharakteristika

Von 9 der insgesamt 17 Patienten konnten klinische Daten erhoben werden, deren graphische Auswertung im Folgenden dargestellt wird. Aufgrund des kleinen Patientenkollektives und der dadurch großen Standardabweichungen, konnten leider keine Aussagen aus den Untersuchungen abgeleitet werden

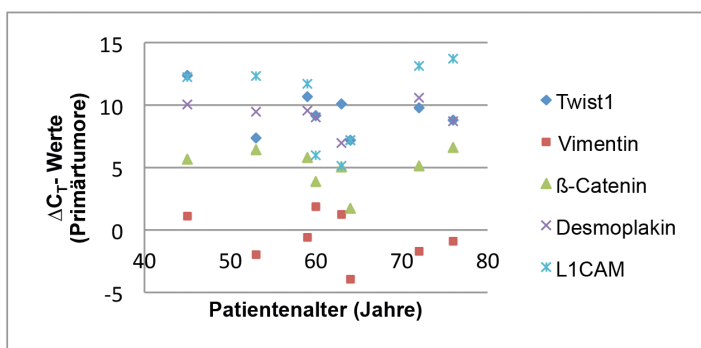


Abb. 18:
Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Patientenalter

Darstellung der mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelten ΔC_T -Werte (Primärtumore) in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Patienten in Jahren bei Erstdiagnose.

Ein hoher ΔC_T -Wert korrespondiert dabei mit einer niedrigen Genexpression, wobei aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs ein 3,3facher Werteunterschied einer 10fachen Expressionsdifferenz entspricht (Über- oder Unterexpression). Dies gilt auch für die folgenden Abbildungen dieses Unterkapitels.

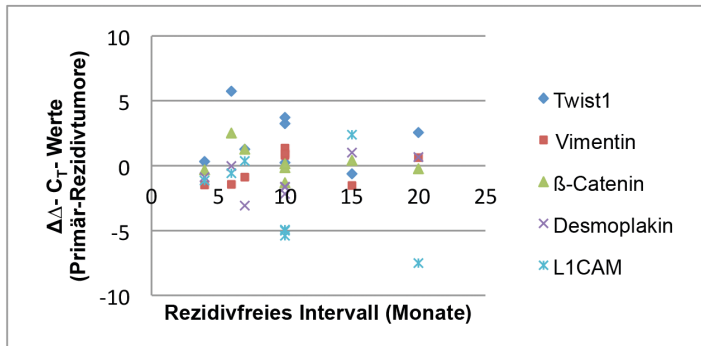


Abb. 19:
Differenz der Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall

Darstellung der Differenzen der ΔC_T -Werte von Primär- und Rezidivtumoren in Abhängigkeit von der tumorfreien Zeit in Monaten.

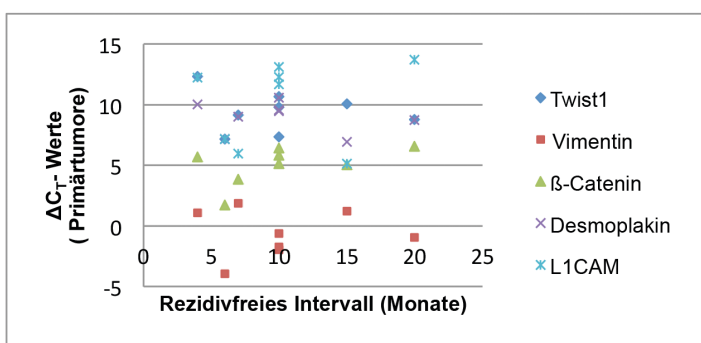


Abb. 20:
Genexpression der EMT-Marker im Primärtumor in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall

Darstellung der ΔC_T -Werte der Primärtumore in Abhängigkeit von der tumorfreien Zeit in Monaten.

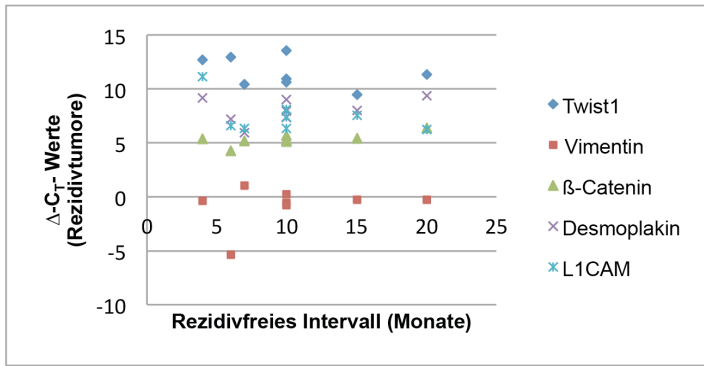


Abb. 21:
Genexpression der EMT-Marker im Rezidivtumor in Abhängigkeit vom rezidivfreien Intervall

Darstellung der ΔC_T -Wert der Rezidivtumore in Abhängigkeit von der tumorfreien Zeit in Monaten.

Rezidivfreies Intervall (Monate) in Abhängigkeit des Resektionsausmaßes	
vollständige Resektion:	unvollständige Resektion:
6	4
15	6
10	Mittelwert 5 Monate
20	
10	
7	
10	
Mittelwert 11,14 Monate	Differenz 6,14 Monate

Abb. 22:
Rezidivfreies Intervall in Abhängigkeit des Resektionsausmaßes

Darstellung der Monate bis zum Auftreten eines Rezidivs bei vollständiger oder unvollständiger Resektion inklusive Mittelwerte und Differenzen.

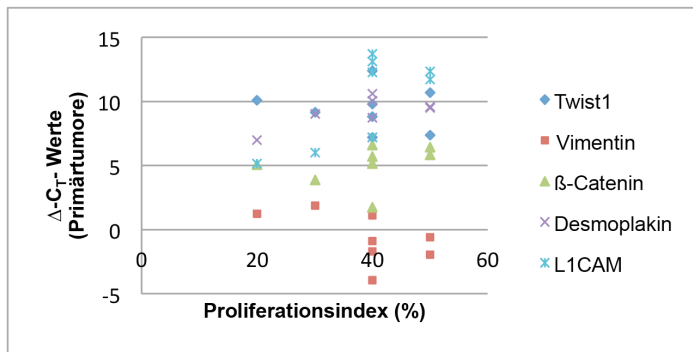


Abb. 23:
Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Proliferationsindex (Primärtumore)

Darstellung der ΔC_T -Werte der Primärtumore in Abhängigkeit vom Proliferationsindex in %.

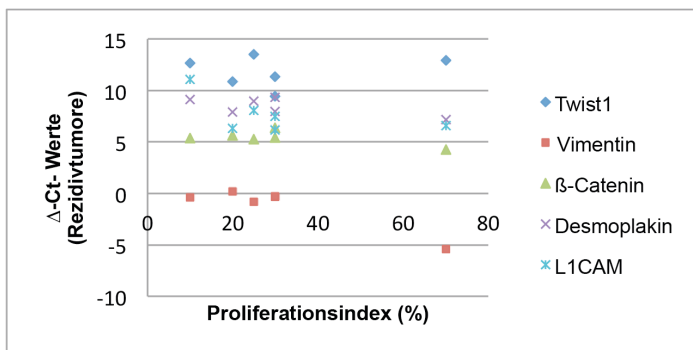


Abb. 24:
Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom Proliferationsindex (Rezidivtumore)

Darstellung der ΔC_T -Werte der Rezidivtumore in Abhängigkeit vom Proliferationsindex (%).

Proliferationsindex (%) im Vergleich von Primär- und Rezidivtumoren			
Primär:	20	Rezidiv:	20
	20		30
	50		20
	40		30
	50		
	40		10
	30		
	40		25
40	70		
Mittelwert:	36,67%	Mittelwert:	29,29%

Abb. 25:
Proliferationsindex im Vergleich von Primär- und Rezidivtumoren

Darstellung der unterschiedlichen Proliferationsindices (%) im Vergleich von Primär- und Rezidivtumoren mit Angabe der arithmetischen Mittelwerte der Kollektive.

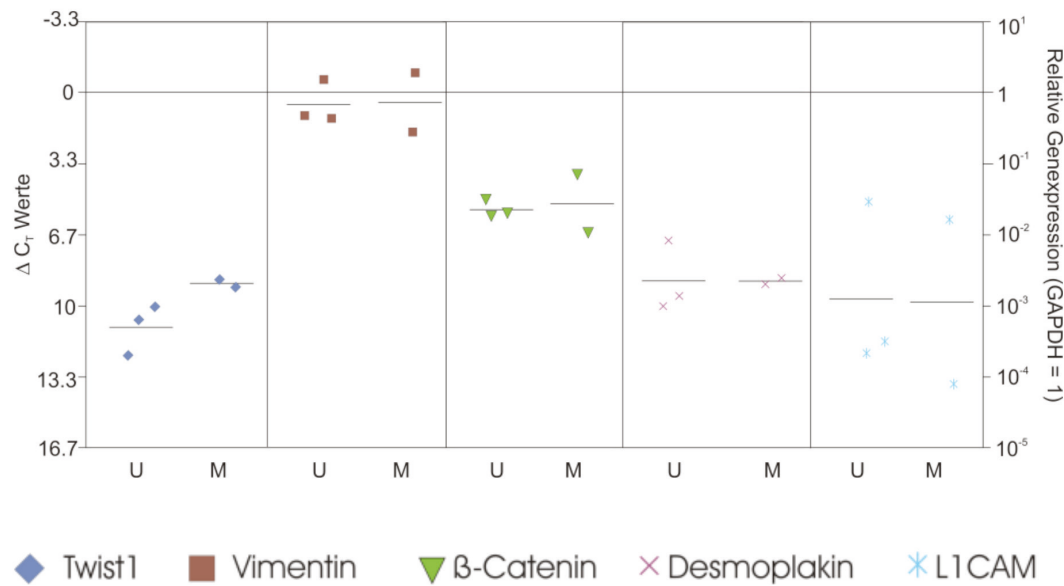


Abb. 26:
Genexpression der EMT-Marker in Abhängigkeit vom MGMT-Status (Primärtumore)

Darstellung der ΔC_T -Werte der Primärtumore bei unmethyliertem (U) und methyliertem (M) O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Status. Ein hoher ΔC_T -Wert korrespondiert dabei mit einer niedrigen Genexpression, wobei aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs ein 3,3facher Werteunterschied einer 10fachen Expressionsdifferenz entspricht (Über- oder Unterexpression). Der arithmetische Mittelwert des Kollektivs ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet.

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Mehdorn sowie Herrn Prof. Dr. med. Synowitz für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Held-Feindt, die mich stets durch ihr außerordentliches Engagement und ihre intensive Betreuung unterstützt hat. Ganz herzlichen Dank dafür.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. nat. Sebens sowie Frau PD Dr. rer. nat. Hattermann für die hilfsbereite Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Rehmke, Frau Ebrahim und Herrn Krause für die herzliche Aufnahme, das gute Arbeitsklima, die technische Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie, ohne deren Unterstützung in jeglicher Art ich diesen Weg nicht hätte gehen können.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Carolin Kubelt
Geburtstag: 23.06.1987
Geburtsort: Kassel
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1993–07/1997 Grundschule, Lotteschule Wetzlar
09/1997–07/2003 Gymnasialer Zweig der Kooperativen Gesamtschule
des Lahn-Dill-Kreises, Eichendorffschule Wetzlar
08/2003–06/2006 Oberstufengymnasium, Goetheschule Wetzlar
12.06.2006 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Ausbildung

10/2006–10/2009 Ausbildung zur Medizinisch-Technischen-
Radiologie Assistentin am UKGM Giessen
17.10.2009 Abschlussprüfung zur MTRA
10/2009–03/2010 Tätigkeit als MTRA in der Neuroradiologie,
UKGM Giessen

Studium

04/2010–09/2012 Studium der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Seit 10/2012 Fortsetzung des Studiums an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
04.04.2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.04.2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Originalpublikation

Kubelt, Carolin; Hattermann, Kirsten; Sebens, Susanne; Mehdorn, H. Maximilian; Held-Feindt, Janka (2015): Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. In: International journal of oncology 46 (6), S. 2515–2525. DOI: 10.3892/ijo.2015.2944.

Zitable Abstracts

Kubelt C, Sebens S, Mehdorn HM, Held-Feindt J, Hattermann K (2014) Comparative analysis of epithelial-to-mesenchymal transition in matched primary and recurrent glioblastomas. 109. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Salzburg, 24.-26. September 2014. Poster 90, DOI 10.337/anatges.2014.0022

Kubelt C, Hattermann K, Sebens S, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2015) Analysis of epithelial-to-mesenchymal transition in paired primary and recurrent glioblastomas. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie: Abstracts, Porstmann Kongresse GmbH, Berlin, p. 206.

Publikationen

Obert, Martin; Kubelt, Carolin; Schaaf, Thomas; Dassinger, Benjamin; Grams, Astrid; Gizewski, Elke R. et al. (2013): Aging adult skull remains through radiological density estimates: A comparison of different computed tomography systems and the use of computer simulations to judge the accuracy of results. In: Forensic science international 228 (1-3), S. 179. e1-7. DOI: 10.1016/j.forsciint.2013.02.006.

Promotion

Die Untersuchungen, Experimente und Auswertungen zu dieser Arbeit fanden im Zeitraum von Mai 2013 bis September 2014 statt.