

Aus der Klinik für Neurochirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. I. E. Sandalcioglu)
der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Prognostische Relevanz von p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10 auf das
Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

David Schmidt
Lüneburg
2024

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

David Schmidt: **Prognostische Relevanz von p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10 auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen – 2024.** - 76 Blätter, 18 Abbildungen, 19 Tabellen.

Kurzreferat:

Glioblastome stellen eine der häufigsten primären intrakraniellen Neoplasien dar und gehen trotz maximaler Therapie mit einer ausgeprägt hohen 5-Jahres-Mortalität einher. Aus diesem Grund werden neue Biomarker und Therapieansätze benötigt, um das Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen zu verbessern.

In dieser Arbeit wurden vier Biomarker (p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10) und deren Expression in Glioblastomen durch die Tissue-Microarray-Methode untersucht. Das Gewebe stammt von Patienten aus den Patientenkohorten Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2, die zwischen 1999 und 2014 in der Klinik für Neurochirurgie im Nordstadt Krankenhaus Hannover operativ behandelt worden sind.

Die Patientenproben wurden dichotomisiert (Biomarker^{high}, Biomarker^{low}) und das Gesamtüberleben nach 60 Monaten (Hannover Kohorte 1) bzw. nach 24 Monaten (Hannover Kohorte 2) mit Hilfe der Kaplan-Meyer-Methode in den Patientengruppen analysiert. Zusammenfassend zeigte sich ein signifikanter Überlebensnachteil bei hoher Expression von p120-Catenin (Hannover Kohorte 1: $p=0,002$; Hannover Kohorte 2: $p=0,023$) und bei hoher Expression von CD99 (Hannover Kohorte 1: $p=0,008$; Hannover Kohorte 2: $p=0,001$). Dieser Effekt war unabhängig von den Confoundern Therapie, Karnofsky-Index, Alter und Resektionsumfang. Die Biomarker-Kandidaten SOX10 und COL4A2 zeigten keine Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Glioblastompatienten.

Schlüsselwörter:

Glioblastome (GBM) – Biomarker - p120-Catenin - CD99 - COL4A2 - SOX10

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Definition	7
1.2. Ätiologie.....	7
1.3. Epidemiologie.....	8
1.4. Symptome und klinischer Befund des Glioblastoms	8
1.5. Einteilung der Glioblastome.....	9
1.6. Therapie	11
1.7. Biomarker	12
1.7.1. p120-Catenin.....	13
1.7.2. CD99.....	14
1.7.3. COL4A2.....	15
1.7.4.SOX10	15
1.8. Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Studienaufbau	17
2.2. Materialien	20
2.3. Tissue microarrays (TMA): Konstruktion.....	22
2.4. Immunhistochemische Färbung	22
2.5. Marker Expression und Scoring-System	23
2.6. Statistische Auswertung	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Assoziation der Expression von p120 Catenin mit dem WHO-Grad. 26	
3.1.1. Assoziation der Expression von p120-Catenin mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1	28
3.1.2. Assoziation der Expression von p120-Catenin mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 2.....	29
3.1.3. p120-Catenin: Multivariatenanalyse mittels COX-Regression bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohore 1 und Hannover Kohorte 2	30
3.1.4. Korrelation zwischen p120-Catenin und weiteren Parametern	32
3.2. Assoziation des Expression von CD99 mit dem WHO-Grad	33

3.2.1. Assoziation der Expression von CD99 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1	35
3.2.2. Assoziation der Expression von CD99 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 2	36
3.2.3. CD99: Multivariatenanalyse mittels COX-Regression bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2	37
3.2.4. Korrelation zwischen CD99 und weiteren Parametern	39
3.3. Assoziation der Expression von COL4A2 mit dem WHO-Grad.....	40
3.3.1. Assoziation der Expression von COL4A2 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1	42
3.3.2. Korrelation zwischen COL4A2 und weiteren Parametern	43
3.4. Assoziation der Expression von SOX10 mit dem WHO-Grad	44
3.4.1. Assoziation der Expression von SOX10 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1	46
3.4.2. Korrelation zwischen SOX10 und weiteren Parametern.....	47
4. Diskussion.....	48
4.1. Grundlage	48
4.2. Diskussion: p120-Catenin	48
4.3. Diskussion: CD99.....	52
4.4. Diskussion: COL4A2.....	55
4.5. Diskussion: SOX10	56
4.6. Diskussion der Methoden und Limitationen.....	58
4.6.1. Tumorproben und Patientenkollektiv	58
4.6.2. Tissue-Microarray	58
4.6.3. Immunhistochemie	59
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Abbildungsverzeichnis	69
8. Dankagung	71
9. Ehrenerklärung.....	72
10. Bildungsweg.....	73
11. Anlagen.....	74

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
CBTRUS	The Central Brain Tumor Registry of the United States
CD133	Cluster of differentiation 133, prominin-1
CD31	Cluster of differentiation 31, PECAM-1
CD99	Cluster of differentiation 99, MIC2
COL4A2	Alpha-2-Typ-IV-Kollagen
CTX	Chemotherapie
DAB	Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
EWS	Ewing-Sarkom
FFPE	Formalin-fixiertem/in paraffin-eingebettetes Gewebe
GBM	Glioblastom
Gy	Gray
HER2-neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIER	heat-induced epitope retrieval
HR	Hazard-Ratio
HRP	Horseradish peroxidase
H-Score	histology-score
IDH	Isocitratdehydrogenase
KI	Konfidenzintervall
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
n.d.	not determinable
NLBP	novel LZaP-binding protein
OP	Operation
p120-Catenin	Catenin-Delta-1, CTNND1
PDGFB	Platelet Derived Growth Factor Subunit B
PFS	progressionsfreies Überleben
pH	pondus hydrogenii

PNET	Primitive neuroektodermale Tumoren
PNS	Peripheres Nervensystem
p-value	Fehlerwahrscheinlichkeit
r/rho	Korrelationskoeffizient
RCTX	(kombinierte) Radiochemotherapie
RTX	Radiotherapie
SAP	Systemanalyse Programmentwicklung
SKFs	the Src family of protein tyrosine kinases
SOX10	SRY-related HMG-box 10
SPSS	Superior Performing Software System
TMA	Tissue microarrays
u. v. m.	und vieles mehr
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Definition

Glioblastome (GBM) zählen zu den hirneigenen Tumoren und werden nach der WHO-Klassifikation von 2021 zu den astrozytär oder oligodendroglial differenzierten diffusen Gliomen des Erwachsenenalters gezählt (1). Gliome zählen mit einem Anteil von etwa 80% zu den häufigsten malignen hirneigenen intrazerebralen Neoplasien (2). Es handelt sich vorwiegend um infiltrativ wachsende Zellen, die vom Stützgewebe des Gehirns, den Gliazellen, ausgehen. Vor Publikation der aktuellen WHO-Klassifikation von 2021 wurden sogenannte sekundäre GBM unterschieden, welche in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch ihre IDH-Mutation gekennzeichnet sind und im Laufe der Jahre sekundär aus einem niedriggradigen Gliom entstehen, während sich das GBM vom IDH-Wildtyp in der überwiegenden Zahl der Fälle „de-novo“, ohne bisher bekannte Vorläuferläsion in der Krankengeschichte entwickelte (3). Nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2021 werden IDH-mutierte, ehemals als sekundäre Glioblastome bezeichnete hirneigene Tumoren als Astrozytom, IDH-mutiert, ZNS-WHO-Grad 4 bezeichnet, während Glioblastome vom IDH-Wildtyp als Glioblastom, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4, bezeichnet werden (4).

Da die Arbeit zum Großteil vor der WHO-Klassifikation von 2021 durchgeführt wurde, werden die WHO-Grade nachfolgend mit den römischen Ziffern (I-IV) bezeichnet. Außerdem wurden auch IDH-mutierte Tumoren in die Überlebensanalysen miteinbezogen.

1.2. Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung von GBM sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Zwar bestehen seltene genetische Formen, die zu familiären Häufungen führen können, jedoch stellen diese in Bezug auf alle Fälle eine deutliche Minderheit dar (2). Zudem unterscheiden sich die familiären Glioblastome gegenüber den Glioblastomen, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 in ihrer genetischen Signatur. Auch in Rahmen der sogenannten „Neurokutanen Syndrome“ (z.B.: Neurofibromatose 1 und 2, Tuberoöse Sklerose oder das Li-Fraumeni-Syndrom) kann es zur Entwicklung

genetisch atypischer GBM kommen (5). Als Umweltfaktor, der zur Entwicklung von Glioblastomen beitragen könnte, wird unter anderem die ionisierende Strahlung diskutiert (6).

1.3. Epidemiologie

Glioblastome, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 stellen die häufigste maligne intrakranielle Neoplasie im Erwachsenenalter dar. In Europa und Nordamerika liegt die Inzidenz bei etwa 3-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern, während sie im asiatischen Raum, basierend auf koreanischen Daten, mit nur etwa 0,59 Fällen pro 100.000 Einwohnern deutlich geringer ausfällt (1). Glioblastome vom IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 treten vor allem im höheren Lebensalter auf, mit einem Durchschnittsalter von etwa 64 Jahren bei Diagnosestellung (7). Des Weiteren zeigt sich ein erhöhtes Auftreten bei Männern im Vergleich zu prämenopausalen Frauen, mit einer Ratio von 1,5:1 – 2:1, wobei dieses Verhältnis im höheren Alter bei postmenopausalen Frauen wieder leicht abnimmt (8).

Aufgrund der beschränkten Therapiemöglichkeiten besteht bei Glioblastomen, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 eine hohe Mortalität. Laut aktuellen Studien liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Maximaltherapie bei etwa 5,6% - 9,8% (9,10), während das durchschnittliche Überleben etwa 12,4 - 17,1 Monate nach Diagnosestellung beträgt (11). Als prognostisch unabhängige Faktoren für ein verlängertes Überleben gelten: Alter < 61 Jahren, kein multifokales Auftreten, präoperativer Karnofsky Index \geq 70, totale Tumoresektion, Radiotherapie, Chemotherapie oder kombinierte Radio-/Chemotherapie (12).

1.4. Symptome und klinische Befunde des Glioblastoms

Die Symptome mit denen sich Glioblastome im klinischen Kontext präsentieren, variieren von Patient zu Patient und je nach Lage und Größe des Tumors. Als typische Symptome, die bei vielen Patienten im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte auftreten, gelten: Kopfschmerzen, Übelkeit und (frühmorgendliches) Nüchternerebrechen, epileptische Anfälle, Persönlichkeitsveränderungen, Veränderungen der kognitiven Fähigkeiten, Gleichgewichtsprobleme sowie Sprach-

oder Sehstörungen (13). Viele der Symptome, wie beispielsweise das Nüchternerebrechen oder fokale-neurologische Defizite sind auf den durch die Tumormasse erhöhten intrakraniellen Druck zurückzuführen (14). Im Laufe der Erkrankung entwickeln etwa 30-50% der Patienten epileptische Symptome, die mit antikonvulsiver Medikation therapiert werden sollten (15).

1.5. Einteilung der Glioblastome

Auch nach der neuesten WHO-Klassifikation (2021), erfolgt die Einteilung der Hirntumore in die WHO-Grade I bis IV. Die Einteilung in den WHO-Grad erfolgt anhand der durchschnittlichen Überlebenszeit, die Patienten mit der entsprechenden Tumorentität nach Diagnosestellung erreichen, wobei die Prognose und damit das Überleben besser ist, je niedriger der WHO-Grad des Hirntumors ausfällt. Dem Glioblastom wird der WHO-Grad IV zugeordnet, womit es zu den aggressivsten Hirntumoren gehört und mit einer schlechten Prognose einhergeht. Das durchschnittliche Überleben beträgt bei maximaler Therapie etwa 12,4 –17,1 Monate (11).

Um die Diagnose eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 zu stellen, sind im Rahmen der aktuellen WHO-Klassifikation von 2021 vor allem genetische Analysen durchzuführen. Hierfür erfolgt bei klinischem und/oder histologischem Verdacht auf ein Glioblastom zunächst die Bestimmung von IDH1 R132H (16). Dieser genetische Abschnitt von IDH1, welcher für das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase codiert, ist in mehr als 95% aller IDH-mutierten diffus infiltrierenden Astrozytome betroffen und dient daher der Abgrenzung von IDH-Wildtyp-GBM gegenüber Gliomen vom Grad II und III sowie gegenüber Astrozytomen, IDH-mutiert, ZNS-WHO-Grad IV, die in 70% aller Fälle eine IDH-Mutation aufweisen (17). Dem gegenüber sind nur etwa 7% aller „de-novo“ entstandenen Glioblastome von einer IDH-Mutation betroffen (18). Bei fehlender IDH1-Mutation erfolgt nachfolgend eine Sequenzierung von IDH2.

Zur Diagnose eines IDH-Wildtyp Glioblastoms sind nach der neuesten WHO-Klassifikation weitere genetische Analysen notwendig (z.B.: ATRX, TERTp, +7/-10 und EGFR). Sollte zusätzlich zum IDH-Wildtyp eine TERTp-Mutation vorliegen, eine Amplifikation von EGFR und/oder eine +7/-10-Kopienanzahl-Veränderung bestehen,

so können die Tumorproben als IDH-Wildtyp Glioblastom klassifiziert werden, auch wenn keine typischen histologischen Merkmale (Nekrosen, Gefäßproliferate) vorliegen (4). In Abbildung 1 ist die diagnostische Einteilung anhand der aktuellen WHO-Klassifikation dargestellt.

Eine weitere Einteilung der Glioblastome erfolgte im Jahr 2010 von Roel G.W. Verhaak. Verhaak und sein Team differenzierten mithilfe von genetischen Sequenzierungen vier verschiedene Subtypen des Glioblastoms (Proneural, Neural, Klassisch und Mesenchymal), die sich alle in ihrer genetischen Expression unterscheiden und unterschiedlich sensibel auf die aktuellen Therapieregimen reagieren (19). Diese Einteilung hat bislang jedoch noch keinen Eingang in die WHO-Klassifikation gefunden.

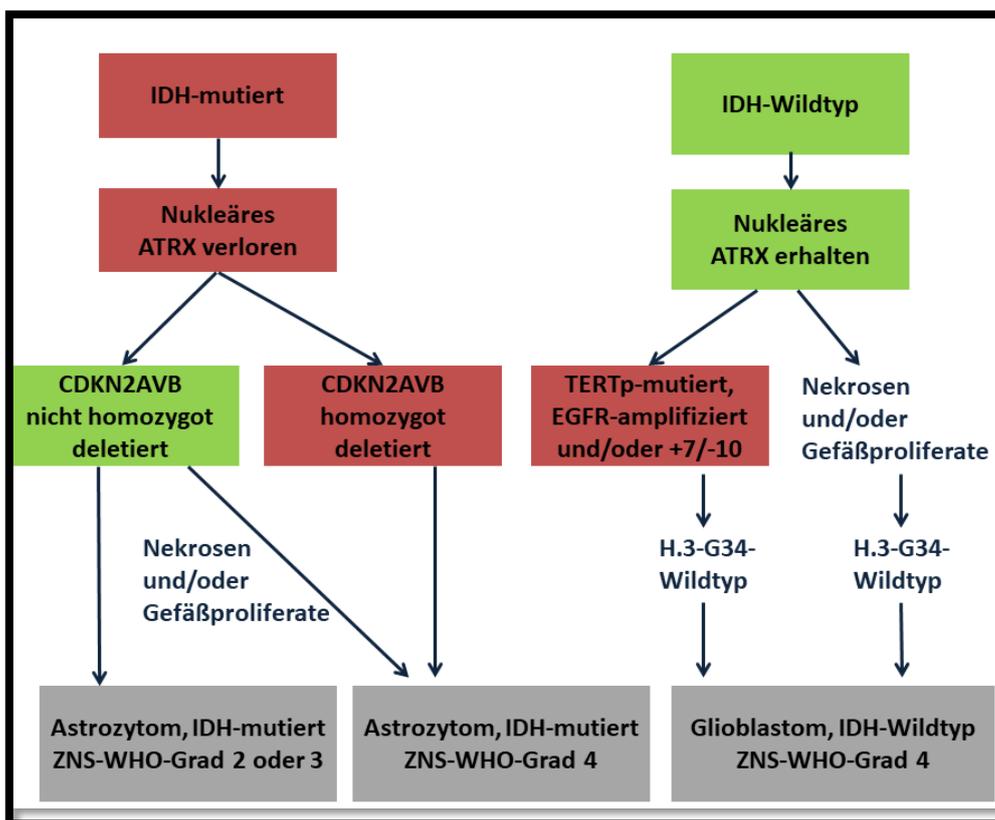


Abbildung 1: Genetische Einteilung der Gliome, modifiziert nach: Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021- The WHO classification of tumors of the central nervous system 2021 (4).

1.6. Therapie des Glioblastoms

Aufgrund seines rasch infiltrativ-destruierenden Wachstums gilt in der Behandlung des Glioblastoms die Kombinationstherapie aus maximal funktionserhaltender operativer Resektion, sowie die kombinierte Radio-Chemotherapie nach dem Stupp-Schema als Goldstandard (20).

Der Umfang der operativen Resektion gilt als unabhängiger Prognosemarker für das Gesamtüberleben bei Glioblastomen (12). Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung von mindestens 98% des Tumolvolumens gegenüber der Kontrollgruppe, bei der dieses Ausmaß der Resektion nicht möglich war, zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens führte (21). Eine Arbeitsgruppe um Timothy J. Brown hat im Rahmen einer Meta-Analyse 37 Studien analysiert, die den Einfluss des Resektionsumfangs auf das Gesamtüberleben nach einem bzw. nach zwei Jahren ausgewertet haben. Hier zeigte sich, beim Vergleich von totaler gegenüber der subtotalen Resektion, ein deutlicher Überlebensvorteil sowohl nach einem als auch nach zwei Jahren (22).

Als weitere Ergänzung des chirurgischen Repertoires dient die fluoreszenzgestützte Resektion, für die unter anderem 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) genutzt wird. Diese Technik erhöht das durchschnittliche Ausmaß der Resektion und verlängert das progressionsfreie Überleben (PFS) (23).

Auch im Rahmen eines Rezidivs scheint die wiederholte Resektion des Tumors das Überleben des Patienten signifikant zu verlängern, weshalb eine erneute Resektion bei gegebener operabler Konstellation empfohlen wird (24).

Die Radiotherapie erfolgt nach der operativen Resektion im Rahmen einer fraktionierten fokalen Bestrahlung mit 2Gy, fünf Tage die Woche, über einen Zeitraum von 6 Wochen, so dass die applizierte Strahlendosis insgesamt 60Gy beträgt (20). Bei älteren Patienten (Alter >65 Jahre), die aufgrund von Vorerkrankungen oder wegen ihres allgemeinen Gesundheitszustands keine kombinierte Radio-Chemotherapie tolerieren, besteht die Möglichkeit entweder eine hypofraktionierte Strahlentherapie oder eine alleinige Chemotherapie mit Temozolomid durchzuführen (25). Die Entscheidung, ob ein Patient eher mit einer alleinigen Strahlentherapie oder einer Chemotherapie behandelt werden sollte, hängt in erster Linie vom erhobenen MGMT-Status (MGMT = O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase) ab (25). Bei positivem MGMT-Status spricht der Patient besser

auf die Chemotherapie mit Temozolomid an. Bei negativem MGMT-Status sollte eine hypofraktionierte Strahlentherapie vorgezogen werden. Im Falle eines Rezidivs ist keine Standardtherapie definiert. Auf individueller Basis sollte die Indikation zur erneuten Strahlentherapie nach Re-Operation überprüft werden (26).

Als Chemotherapeutikum der Wahl zur Behandlung von Glioblastomen werden in erster Linie alkylierende Substanzen verwendet, allen voran Temozolomid. Diese Substanz zeigt eine sehr gute ZNS-Gängigkeit und interagiert mit der DNA der Tumorzellen, indem sie sich an die O6-Position der Base Guanin bindet und so bei mangelnder Reparaturfähigkeit der Zelle zum programmierten Zelltod beiträgt. Ersteller et. al beschrieben im Jahr 2000 zum ersten Mal, dass die Wirksamkeit der alkylierenden Chemotherapeutika wesentlich von der Aktivität der O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferasen abhängt (27). Die Aktivität dieser Enzyme hängt wiederum stark von der Promotor-Methylierung des MGMT-Gens ab. Durch eine starke Methylierung der Promotor-Region kommt es zu einer sehr geringen körpereigenen Produktion von O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferasen. Patienten deren MGMT-Promotor stark methyliert ist, profitieren daher deutlich stärker von einer alkylierenden Chemotherapie, als solche mit gering oder gar nicht methyliertem MGMT-Promotor (27).

Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie erfolgt nach erfolgter Operation zunächst eine sechswöchige kombinierte Radiochemotherapie, in der jeden Tag Temozolomid verabreicht wird. Nach einer kurzen Erholungspause von etwa vier Wochen, folgen sechs Zyklen Temozolomid ohne Bestrahlung, wobei ein Zyklus die fünftägige Gabe von Temozolomid mit anschließender 23-tägiger Pause umfasst (20).

1.7. Biomarker

Bei Biomarkern handelt es sich um „charakteristische objektiv messbare Indikatoren von normalen biologischen Prozessen, pathologischen Prozessen oder pharmakologischen Reaktionen auf therapeutische Interventionen“ (28). Im Rahmen der medizinischen Diagnostik werden Biomarker auf vielfältige Art und Weise eingesetzt: Als Screening-Parameter im Rahmen der Sekundärprävention, als Prognose-Parameter für Aussagen zum weiteren Krankheitsverlauf oder als

Parameter für die Anwendung moderner Therapieverfahren. Des Weiteren wird zwischen zellulären, molekularen oder genetischen Biomarkern unterschieden.

Auch im Rahmen der Routinediagnostik von Glioblastomen kommt es zur Bestimmung von Biomarkern. Ein typischer Biomarker, der bei jedem entfernten Glioblastomgewebe untersucht wird, ist die bereits erwähnte Methylierung des MGMT-Gens. Einen weiteren Biomarker stellt die Mutation in einem der beiden Gene IDH1/IDH2 dar. Darüber hinaus besitzen nach der neuesten WHO-Klassifikation von 2021 die Biomarker ATRX, TERTp, +7/-10 und EGFR ebenfalls eine diagnostische Relevanz.

1.7.1. p120-Catenin

Bei p120-Catenin handelt es sich um ein Strukturprotein, das zur Familie der Armadillo-domain-Proteine gehört und sich in Zwischenzellverbindungen sowie im Zellkern nachweisen lässt (29). Es interagiert mit den klassischen Cadherinen via adherens junctions und spielt eine Rolle in der Adhäsion zwischen Zellverbänden (29). Auch in der nukleären Signaltransduktion spielt p120 Catenin eine Rolle, indem es mit Kaiso interagiert und darüber Gene des Wnt-Signalwegs beeinflusst (30). In anderen Tumoren, wie z.B.: im Kolon-Karzinom spielt p120-Catenin eine Rolle als Tumorsuppressor, indem es die Funktion der E-Cadherine aufrechterhält (31). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass p120-Catenin die Aktivität der Signalmoleküle RhoA, Rac, und Cdc42 moduliert und somit Veränderungen im Actin-Zytoskelett hervorruft, was im Rahmen der Karzinogenese Einfluss auf die Zellmotilität ausübt (32). Die Rolle von p120-Catenin in Glioblastomen ist bislang noch unzureichend erforscht. Bekannt ist, dass Y228-phosphoryliertes p120-Catenin in Tumorproben von Patienten in Astrozytomen und Glioblastomen höher exprimiert ist, als in anderen Krebsformen, wie Brust- oder Prostatakarzinomen (33). In Zellkulturen von Gliomen scheinen die Familie der Tyrosinkinasen Src zur Modulation von p120-Catenin beizutragen (33). Zusätzlich scheint N6-Isopentenyladenosine in GBM-Zelllinien die Migration und Invasion zu inhibieren, indem es den p120-Catenin Signalweg moduliert (34). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PLOD2 die Expression von p120-Catenin in GBM-Zelllinien modulieren kann (35).

1.7.2. CD99

CD99 wird auch als MIC2 bezeichnet und spielt in seiner erhöhten oder verminderten Expression eine Rolle in vielen verschiedenen Krebsformen, wie z.B.: im anaplastischen Großzellularlymphom, in hämatopoetischen Neoplasien, in Mamma-Karzinomen, im Ewing-Sarkom, im primitiven neuroectodermalem Tumor, Gallenblasenkarzinomen, Hepatocelluläre Karzinome, Bronchial-Karzinome, im Lymphoblastischen Lymphom, Osteosarkom, Magenkrebs u. v. m.. (36). Es handelt sich um ein transmembranes Glykoprotein, das in Zellkulturen bei Überexpression zu einer verstärkten Migration und Invasion von High-grade-Glioma-Zellen führt (37). Diese Überexpression führt zu einer verminderten Rac-Aktivität und einer verstärkten Rho-Aktivität, über welche die Umwandlung vom epithelialen Zelltyp zum mesenchymalen Zelltyp deutlich gesteigert wird (37).

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression von CD99 in Glioblastomen im Vergleich zum normalen Hirngewebe (36). Diese Expression von CD99 steigt mit dem Malignitätsgrad der Gliome (36).

Das Ausschalten von CD99 führt in GBM-Zelllinien zu einer sichtbaren Veränderung des Aktin-Zytoskeletts, wodurch die Migration und Invasion der Tumorzellen reduziert werden (38). Darüber hinaus führt eine erhöhte Expression von CD99 zu dem früheren Auftreten von Rezidiv-Glioblastomen und zu einer insgesamt schlechteren Überlebensprognose (39).

In manchen tumorösen Geweben zeigt CD99 ein charakteristisches paranukleäres Färbemuster, welches auch als „dot-like-pattern“ bezeichnet wird. Dieses Färbeverhalten ist bereits für folgende Tumorentitäten beschrieben: solide pseudopapilläre Tumoren des Pankreas, Adenokarzinome des Colons, Merkelzell-Karzinome, Neuroendokrine Tumoren, Ewing Sarkome, primitive neuroectodermale Tumoren, Melanome, Kleinzellige Bronchialkarzinome, Lymphoblastische Lymphome und Rhabdomyosarkome (40). Im Glioblastom ist dieses Färbemuster von CD99 bislang noch nicht beschrieben.

1.7.3. COL4A2

Kollagen-Typ4-alpha-2-Kette (COL4A2) spielt eine Rolle als Komponente in der Extrazellulären Matrix. Durch Interaktionen mit PDGF nimmt es Einfluss auf die Entstehung von Gliomen und Glioblastomen (41). COL4A2 zeigt eine deutliche Überexpression in GBM-Biopsien und in GBM-Zelllinien (42). Im Vergleich von diffusen Grad II Astrozytomen zu anaplastischen Grad III Astrozytomen und Grad IV Glioblastomen zeigen Grad II Astrozytome eine deutlich verminderte Expression von COL4A2 (43). In der Behandlung einer Kohorte mit rekurrenten Glioblastomen mit Bevacizumab (VEGF-Inhibitor) zeigte die Gruppe mit einer starken Expression der mRNA von COL4A2 ein signifikant schlechteres Überleben im Vergleich zur Gruppe mit einer niedrigen Expression der mRNA von COL4A2 (44). Dieses signifikante Ergebnis zeigte sich jedoch nicht in einer anderen Kohorte, die nach der Standardtherapie behandelt worden ist.

1.7.4. SOX10

Bei SOX10 handelt es sich um einen regulatorischen Co-Transkriptionsfaktor, der eine vielfältige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems spielt. Er spielt eine Rolle in der Differenzierung und Proliferation von Neuronen und Gliazellen im peripheren Nervensystem (PNS), in Melanozyten und in Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) (45). In Kaukasiern ist, im Vergleich zu Nicht-Kaukasiern, das Risiko an einem High-grade-Gliom zu versterben vermindert, wenn SOX10 vom Tumorgewebe verstärkt exprimiert wird (46). Die Mehrheit der Oligodendrogliome exprimiert SOX10, aber auch in niedriggradigen Astrozytomen und auch Glioblastomen wird SOX10 in einem geringeren Anteil exprimiert (47).

In Mäusen führt die Überexpression von SOX10 in Kombination mit dem Wachstumsfaktor PDGFB zu einer verstärkten Gliomagenesis, während SOX10 alleine diesen Effekt nicht erzielt (48). Interessanterweise zeigen diese Tumoren Eigenschaften von PNET-like Tumoren und Oligodendrogliomen. Zudem zeigen Low-grade-Gliome im Vergleich zu High-grade Gliomen eine deutlich stärkere Expression von SOX10 (48). Dies ist bedingt durch eine Hypermethylierung des Promotors von SOX10, die in cerebralen Gliomen wesentlich häufiger nachweisbar ist, als in diffusen cerebellären Gliomen oder in H3 K27-mutierten diffusen Mittelliniengliomen

(49). Eine verminderte Expression von SOX10 durch Hypermethylierung der Promotorregion in Patienten mit Glioblastomen, führt zu einem signifikant schlechteren Überleben (50).

In neuronalen Stammzellen weisen invasive Zellen eine verminderte Expression von SOX10 auf (51). Auch in GBM spielen Tumor-Stammzellen eine wichtige Rolle in der Proliferation und Therapieresistenz (52). Darüber hinaus scheint SOX10 in Gliomen einen immunmodulatorischen Einfluss auf Makrophagen auszuüben, was bei erhöhter Expression zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen in Gliome führt (53). Ein Ausschalten von SOX10 führt im Mausmodell zu einem verstärkten Tumorwachstum und einem signifikant reduzierten Gesamtüberleben (54).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit haben wir den prognostischen Wert von vier Biomarkern (p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10) untersucht und analysieren inwiefern diese das Überleben von Patienten mit Glioblastomen voraussagen können.

2. Material und Methoden

2.1. Studienaufbau

Die vorliegende Studie stellt eine retrospektive Kohortenanalyse aus gewonnenem FFPE-Tumormaterial (formalin-fixiertem/in paraffin-eingebettetem Gewebe) von Glioblastompatienten dar.

Es wurden die folgenden zwei unabhängigen Kohorten untersucht: Hannover Kohorte 1 (n=166) und Hannover Kohorte 2 (n=122) als Validationskohorte. Die Hannover Kohorte 1 umfasst 166 Patienten, davon 24 mit einem Astrozytom Grad II, 22 mit einem Astrozytom Grad III und 120 mit einem Glioblastom. Das Durchschnittsalter lag bei 60 Jahren. Diese Patienten wurden in der Klinik für Neurochirurgie im Nordstadt Krankenhaus Hannover zwischen 1999 und 2010 behandelt. Die Hannover Kohorte 2 umfasst 122 Glioblastom Patienten mit einem Durchschnittsalter von 66 Jahren. Diese Patienten wurden in der Klinik für Neurochirurgie im Nordstadt Krankenhaus Hannover zwischen 2010 und 2014 behandelt

Insgesamt wurden von den Probanden verschiedene krankheitsbezogene Daten erfasst (siehe **Tabelle 1** und **Tabelle 2**). Diese beinhalten unter anderem das Geschlecht, den Karnofsky-Index sowie die Therapie und sind in der Tabelle 1 und 2 gesondert dargestellt. Durch immunhistochemische Färbungen wurde die Expression der Biomarker p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10 auf den erhaltenen Gewebeproben analysiert. Außerdem erfolgte zur Beurteilung der mikrovaskulären Proliferation eine immunhistochemische Färbung gegen CD31. Die verwendeten Materialien sind in Kapitel 2.2. tabellarisch aufgeführt. Zur Bestimmung von Tumolvolumen und Ödemvolumen wurde die MRT-Bildgebung der Probanden digital analysiert und ausgewertet.

Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigt. Die Patientendaten wurden für die Auswertung anonymisiert. Eine explizite Zustimmung der Patienten zur Teilnahme an der Studie war nicht notwendig.

	WHO Grad II		WHO Grad III		WHO Grad IV	
	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)
Gesamtanzahl	24	100	22	100	120	100
Geschlecht						
männlich	10	41,7	11	50,0	51	42,5
weiblich	14	58,3	11	50,0	69	57,5
Karnofsky-Index						
0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	0,8
20	0	0	0	0	1	0,8
30	1	4,2	1	4,5	1	0,8
40	0	0	0	9	3	2,5
50	0	0	1	4,5	13	10,8
60	0	0	3	13,6	15	12,5
70	1	4,2	6	27,3	16	13,3
80	11	45,8	6	27,3	41	34,2
90	9	37,5	5	22,7	21	17,5
100	0	0	0	0	0	0
n.d.	2	8,3	0	0	8	6,7
Therapie						
OP	10	41,7	1	4,5	11	9,2
CTX	0	0	0	0	1	,8
OP+RTX	4	16,7	3	13,6	19	15,8
OP+CTX	1	4,2	3	13,6	3	2,5
OP+RCTX	7	29,2	15	68,2	82	68,3
n.d.	2	8,3	0	0	4	3,3
Resektionsstatus						
Subtotal/Biopsie	6	25,0	7	31,8	57	47,5
Total	13	54,2	11	50,0	51	42,5
n.d.	5	20,8	4	18,2	12	10,0
MGMT-Methylierung						
methyliert	11	45,8	7	31,8	55	45,8
unmethyliert	6	25,0	12	54,5	53	44,2
n.d.	7	29,2	3	13,6	12	10,0
IDH1						
negativ	10	41,7	12	54,5	96	80,0
positiv	13	54,2	8	36,4	9	7,5
n.d.	1	4,2	2	9,1	15	12,5

Tabelle 1: Tabellarische Kohortenbeschreibung von Hannover Kohorte 1. Aufgeführt werden prognostisch relevante Daten wie: Karnofsky-Index, Therapie, Resektion, MGMT-Methylierung und IDH1-Mutation. RTX: Radiotherapie, CTX: Chemotherapie, RCTX: Radiochemotherapie, n.d.: not determinable

	WHO Grad II		WHO Grad III		WHO Grad IV	
	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)
Gesamtanzahl	0	0	0	0	122	100
Geschlecht						
männlich	0	0	0	0	49	40,2
weiblich	0	0	0	0	73	59,8
Karnofsky-Index						
0	0	0	0	0	1	0,8
10	0	0	0	0	1	0,8
20	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	2	1,6
40	0	0	0	0	13	10,7
50	0	0	0	0	22	18
60	0	0	0	0	34	27,9
70	0	0	0	0	33	27,0
80	0	0	0	0	3	2,5
90	0	0	0	0	12	9,8
100	0	0	0	0	1	0,8
n.d.	0	0	0	0	0	0
Therapie						
OP	0	0	0	0	15	12,3
CTX	0	0	0	0	0	0
OP+RTX	0	0	0	0	10	8,2
OP+CTX	0	0	0	0	3	2,5
OP+RCTX	0	0	0	0	86	70,5
n.d.	0	0	0	0	8	6,6
Resektionsstatus						
Subtotal/Biopsie	0	0	0	0	85	69,7
Total	0	0	0	0	36	29,5
n.d.	0	0	0	0	1	0,8
MGMT-Methylierung						
methyliert	0	0	0	0	58	47,5
unmethyliert	0	0	0	0	59	48,4
n.d.	0	0	0	0	5	4,1
IDH1						
negativ	0	0	0	0	108	88,5
positiv	0	0	0	0	14	11,5
n.d.	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2: Tabellarische Kohortenbeschreibung von Hannover Kohorte 2. Aufgeführt werden prognostisch relevante Daten wie: Karnofsky-Index, Therapie, Resektion, MGMT-Methylierung und IDH1-Mutation. RTX: Radiotherapie, CTX: Chemotherapie, RCTX: Radiochemotherapie, n.d.: not determinable

2.2. Materialien

Laborausstattung

Aperio AT2 high resolution scanner	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Arraymold kit E	Arraymold, Riverton, UT, USA
BioDoc Analyse Systems	Biometra, Göttingen, Deutschland
Mikrotom	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Paraffin-Gießmaschine	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ventana Benchmark XT immunostainer	Ventana Medical Systems, Tucson, USA

Chemikalien

AB Diluent OP Quanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
LE Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Citratpuffer (PT Module Buffer 1)	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
DAB Quanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
EpiTect bisulfite	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HotStar Tag Plus Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mountex	Medite, Burgdorf, Deutschland

Paraffin	Sasol Wax, Hamburg, Deutschland
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantitas DNA marker	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
TBS Tween-20 Waschpuffer	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
UltraView™ Universal DAB Detection kit	Ventana Medical Systems, Tucson, USA
Ultravision™ LP Detection System	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CD99, MIC2 Gene Product	FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human, Dako
p120 Catenin (MRQ-5) Mouse Monoclonal Antibody	Cell Marque, Sigma-Aldrich company
SOX-10 Rabbit Polyclonal Antibody	Cell Marque, Sigma-Aldrich company
COL4A2	Novus Biologicals / Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
CD31 (PECAM-1) monoclonal Antibody	eBioscience™

Software

Aperio ImageScope	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Biometra BioDoc Analysis	Biometra, Göttingen, Deutschland
Image J	https://imagej.nih.gov/ij/index.html
SAP	SAP, Walldorf, Deutschland
SPSS version 24.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

2.3. Tissue microarrays (TMA): Konstruktion

Die immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes wurde mithilfe der Tissue Microarray Methode (TMA) durchgeführt. Durch diese Methode ist es möglich eine große Anzahl an Gewebeproben simultan zu analysieren. Die Herstellung der TMA-Blocks erfolgte mittels Arraymold kit E(Riverton, UT, USA). Die Gewebestandteile wurden mithilfe von 3mm Biopsie-Stanzen aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE) Glioblastomgewebe gewonnen. Hierfür wurden solide tumoröse Bereiche mit möglichst wenig Nekroseanteilen ausgewählt. Das aus der Stanze gewonnene Material wurde in einen Empfängerblock transferiert und in 2 µm dünne Schnitte zurechtgeschnitten.

2.4. Immunhistochemische Färbung

Bevor die Schnitte gefärbt wurden, erfolgte zunächst eine Entparaffinierung mittels Xylol und eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mithilfe von Isopropanol. Um die Immunreaktivität der Antigene wiederherzustellen wurden sie durch heat-induced epitope retrieval (HIER) in Citrat-Puffer mit einem pH von 6,0 (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) hitzebehandelt und demaskiert. Die endogene Peroxidase wurde blockiert und das Gewebe mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Das daran gekoppelte Enzym Horseradish peroxidase (HRP) ermöglichte mit dem Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) eine braune Färbung. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Proben mit Mountex eingedeckt. Die Färbungen erfolgten für p120-Catenin mit einem Mouse Monoclonal Antibody (MRQ-5) (Cell Marque, Sigma-Aldrich company), für CD99 mit einem FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Antibody (Dako), für SOX10 mit einem Rabbit Polyclonal Antibody (Cell Marque, Sigma-Aldrich company) und für COL4A2 mit einem Antikörper von Novus Biologicals / Bio-Techne. Alle TMAs wurden mit Aperio AT2 Scanner digitalisiert und mit Aperio ImageScope analysiert.

2.5. Marker Expression und Scoring-System

Die verblindete immunhistologische Analyse wurde von zwei unabhängigen Betrachtern durchgeführt. Die Intensität der Expression für p120-Catenin, CD99 und COL4A2 wurden anhand von drei Kategorien unterschieden (schwach, medium und stark) die jeweils mit unterschiedlichen Punkten (1, 2 und 3 Punkte) bewertet wurden. Für den Fall einer heterogenen Expression erfolgte die Bewertung mithilfe des H-Scores anhand der Formel: $(1*x)+(2*y)+(3*z)$, wobei $x+y+z=100\%$ der Tumor-Fläche darstellen (siehe **Abbildung 2-4**).

Da SOX10 als Transkriptionsfaktor vor allem im Zellkern vorliegt, haben wir für diesen Biomarker ein nukleäres Scoring-System verwendet. Insgesamt wurden vier gleich große Blickfelder (in je 20facher Vergrößerung) für jeden Tumor-Spot verwendet und die Einzelergebnisse in einem Gesamtdurchschnitt zusammengefasst. Dabei wurde die quantitative Menge der gefärbten Zellkerne in Prozent mit dem Wert 0,1,2,3 oder 4 bewertet. Wobei 4 die stärkste Expression anzeigt und 0 gar keine Expression (siehe **Abbildung 5**).

Nachfolgend wurden die Scoring-Werte aller vier Biomarker anhand der Median-Split Methode dichotomisiert. Es erfolgte eine Einteilung in eine der Gruppen (Biomarker^{high} oder Biomarker^{low}).



Abbildung 2: Scoring-System und Färbeabverhalten von p120-Catenin. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“.



Abbildung 3: Scoring-System und Färbeverhalten von CD99. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“.



Abbildung 4: Scoring-System und Färbeverhalten von COL4A2. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“.

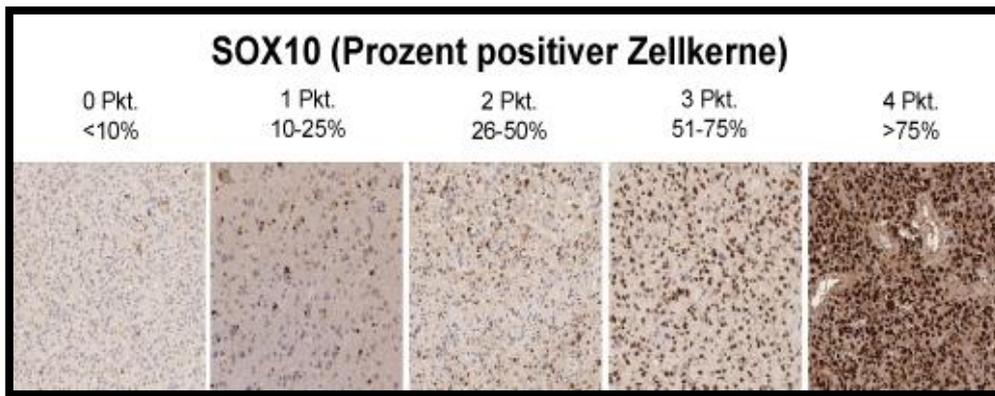


Abbildung 5: Das Scoring-System und Färbeverhalten von SOX10. Es zeigt sich eine nukleäre Färbung (braunes Kolorit). Die Einteilung erfolgt anhand der prozentual gefärbten Zellkerne in die Kategorien 0 bis 4.

2.6. Statistische Auswertung

Die Analyse aller Patientendaten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware Statistical Software Version 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Analysen zum Gesamtüberleben wurden mittels Kaplan-Meyer-Methode durchgeführt, mit Cut-Off-Werten von 60 Monate für die Hannover Kohorte 1 und 24 Monate für die Hannover Kohorte 2. Die Signifikanztestung erfolgte mit der Durchführung des univariaten Log-rank-tests. Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitpunkt zwischen der ersten Diagnosestellung und dem Ausscheiden aus der Studie durch den eingetretenen Tod oder den Zeitpunkt der letzten Datenerhebung. Außerdem wurden zusätzliche multivariate Analysen durchgeführt, um mögliche Confounder auszuschließen. Hierbei wurde die Cox's proportional hazard linear regression für Faktoren bestimmt, die in vorherigen Studien als prognostisch bedeutsam für das Gesamtüberleben von Glioblastom-Patienten identifiziert worden sind: Alter, Karnofsky-Index, Therapie und das Ausmaß der chirurgischen Resektion. Bei allen Untersuchungen wurde die Grenze der Signifikanz auf $p \leq 0.05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden vier Biomarker und die Assoziation ihrer Expression auf das Gesamtüberleben von Patienten mit histologisch gesicherten Glioblastomen untersucht. Zu den untersuchten Biomarkern zählen: p120-Catenin, CD99, SOX10 und COL4A2. Für alle Biomarker liegen Betrachtungszeiträume von 60 Monaten für Hannover Kohorte 1, sowie von 24 Monaten für Hannover Kohorte 2 vor. Abhängig von den jeweiligen Cut-Off-Werten, die wir mithilfe der Median-Split-Methode ermittelten, wurden zwei Gruppen gebildet, die den entsprechenden Biomarker „hoch/high“ beziehungsweise „niedrig/low“ exprimieren und diese dann miteinander verglichen.

3.1 Assoziation der Expression von p120-Catenin mit dem WHO-Grad

Zur Untersuchung der Korrelation zwischen WHO-Grad und Expression des Biomarkers erfolgte zunächst eine statistische Analyse des ermittelten H-Scores in Abhängigkeit vom WHO-Grad mittels Spearman's Rho.

In der Hannover Kohorte 1 wurden 23 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad II eingeschlossen, 19 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad III und 113 Patienten mit einem Glioblastom WHO Grad IV (siehe **Tabelle 3**). Insgesamt 11 Patienten mussten aus vorwiegend technischen Gründen ausgeschlossen werden (z.B.: zu wenig solides Tumorgewebe, zu viele nekrotische Anteile). In der Korrelationsanalyse zeigt sich eine signifikante Zunahme der Expressionsintensität von p120-Catenin mit steigendem WHO Grad ($p < 0,001$), wobei WHO-Grad II den geringsten Median (1,6) und WHO-Grad IV den höchsten Median (2,0) aufweist (siehe **Abbildung 6**). Insgesamt zeigt sich jedoch eine breite Streuung der Werte, wobei ein Minimalwert von 1,00 in allen WHO-Graden auftritt, während der höhere Maximalwert (2,95) nur beim WHO-Grad III und IV gefunden wird (siehe **Tabelle 4**). Der Korrelationskoeffizient zwischen der Expression von p120-Catenin und dem WHO-Grad liegt bei $Rho = 0,335$.

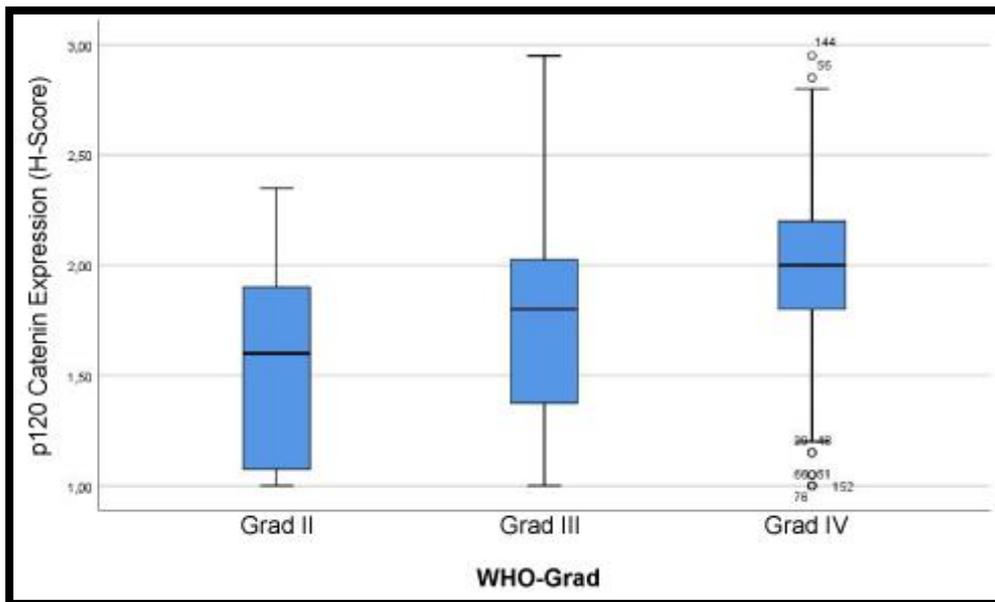


Abbildung 6: Expression von p120-Catenin in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

p120-Catenin H-Score	WHO-Grad	Valide		Fehlend		Total	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	II	23	95,8%	1	4,2%	24	100,0%
	III	19	86,4%	3	13,6%	22	100,0%
	IV	113	94,2%	7	5,8%	120	100,0%

Tabelle 3: p120-Catenin Proben in Hannover Kohorte 1 – Anzahl der Tumorproben nach WHO-Grad, die in die Studie eingeschlossen worden sind (N=Anzahl).

WHO-Grad	Median	Minimum	Maximum	N
II	1,6	1,00	2,35	23
III	1,8	1,00	2,95	19
IV	2,0	1,00	2,95	113
Total	1,95	1,00	2,95	155

Tabelle 4: Hannover Kohorte 1 – Median-, Minimum- und Maximumwerte der p120-Catenin-Expression nach WHO-Grad. N=Anzahl der Patienten.

3.1.1. Assoziation der Expression von p120-Catenin mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1

In Bezug auf das Gesamtüberleben zeigen die Ergebnisse der univariaten Analyse, dass eine hohe Expression von p120-Catenin (p120-Catenin^{high}) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben in der Hannover Kohorte 1 assoziiert ist ($p=0,002$). Bereits nach 10 Monaten zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen den Gruppen, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (60 Monate) bestehen bleibt (siehe **Abbildung 7**).

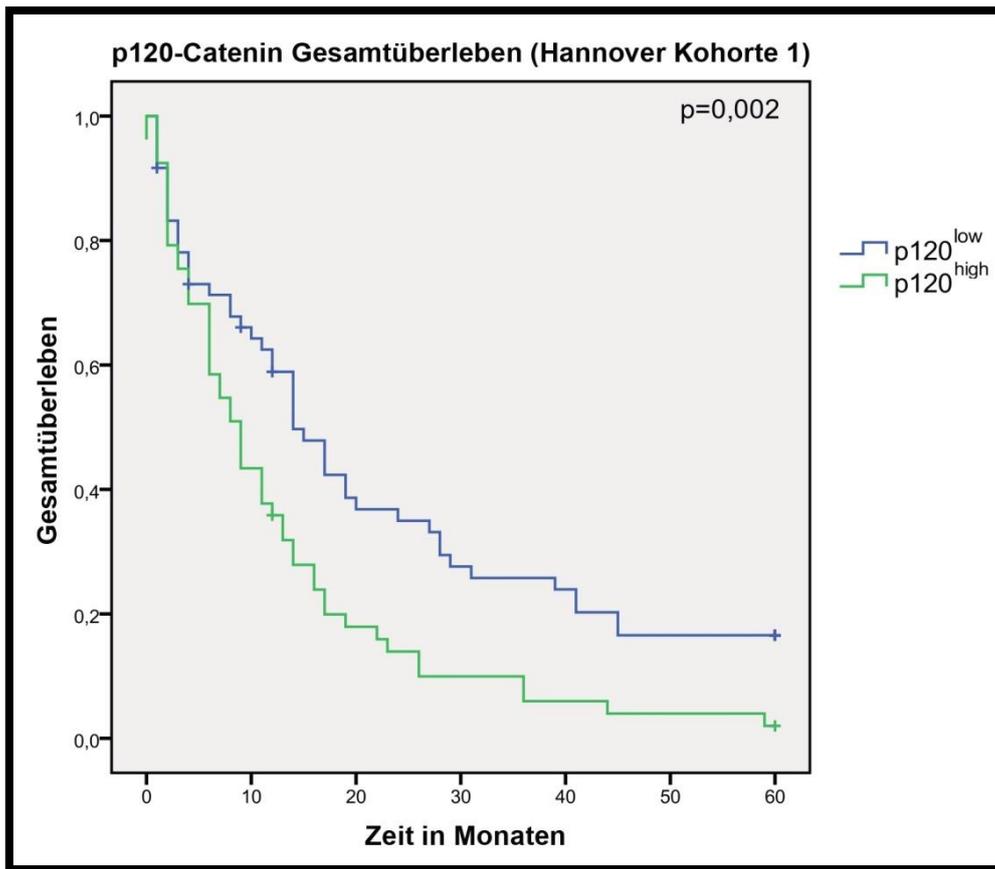


Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 60 Monaten bei hoher und niedriger p120-Catenin Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.1.2. Assoziation der Expression von p120-Catenin mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 2

Nachdem in Hannover Kohorte 1 ein schlechteres Gesamtüberleben für Patienten gezeigt werden konnte, deren Tumorproben eine hohe Expression von p120-Catenin aufwiesen, führten wir auch in unserer Validierungskohorte (Hannover Kohorte 2) die univariate Analyse durch. Die Validierungskohorte bestätigte die Ergebnisse von Hannover Kohorte 1, auch hier führt eine erhöhte Expression von p120-Catenin (p120-Catenin^{high}) zu einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der Patienten (p=0,023) (siehe **Abbildung 8**).

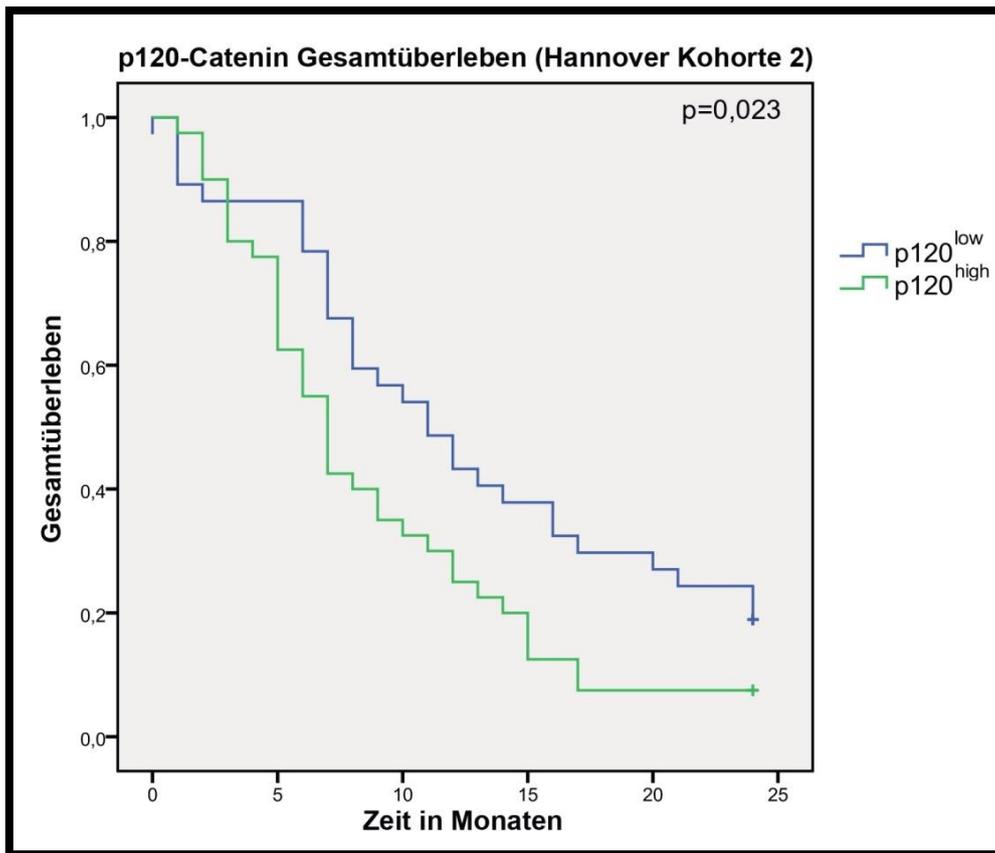


Abbildung 8: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 24 Monaten bei hoher und niedriger p120-Catenin Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 2. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.1.3. p120-Catenin: Multivariatenanalyse mittels COX-Regression bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2

Zur weiteren Analyse der Überlebensdaten erfolgte eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression. Hierfür wurden mögliche Confounder berücksichtigt, die sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren bei Glioblastomen erwiesen haben: Karnofsky-Index, das Alter, die Therapie und der Umfang der Resektion.

Die multivariate Analyse zeigt, dass p120-Catenin unabhängig von den typischen Confoundern als prognostischer Marker für das Gesamtüberleben in Glioblastompatienten angesehen werden kann. **Tabelle 5** stellt die Hazard-Ratio für p120-Catenin dar, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion in Hannover Kohorte 1. In **Tabelle 6** werden die Ergebnisse für die Validationskohorte Hannover Kohorte 2 dargestellt. Auch hier stellt sich die

Expression von p120-Catenin als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Glioblastompatienten dar.

Multivariate Cox-Regression (Hannover Kohorte 1)	Gesamtüberleben		
	HR	KI (95%)	P-Wert
Alter	1		
p120-Catenin ^{low}	1,686	1,11-2,54	0,013
p120-Catenin ^{high}			
Karnofsky-Index	1		
p120-Catenin ^{low}	1,707	1,12-2,58	0,012
p120-Catenin ^{high}			
Therapie	1		
p120-Catenin ^{low}	1,904	1,25-2,88	0,002
p120-Catenin ^{high}			
Resektion	1		
p120-Catenin ^{low}	1,812	1,20-2,72	0,004
p120-Catenin ^{high}			

Tabelle 5: Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens von Patienten aus Hannover Kohorte 1 in Abhängigkeit der Expression von p120-Catenin, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion (HR=Hazard-Ratio, KI=Konfidenzintervall)

Multivariate Cox-Regression (Hannover Kohorte 2)	Gesamtüberleben		
	HR	KI (95%)	P-Wert
Alter	1		
p120-Catenin ^{low}	1,783	1,09-2,91	0,021
p120-Catenin ^{high}			
Karnofsky-Index	1		
p120-Catenin ^{low}	1,848	1,12-3,03	0,015
p120-Catenin ^{high}			
Therapie	1		
p120-Catenin ^{low}	2,055	1,22-3,45	0,006
p120-Catenin ^{high}			
Resektion	1		
p120-Catenin ^{low}	1,696	1,03-2,77	0,035
p120-Catenin ^{high}			

Tabelle 6: Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens von Patienten aus Hannover Kohorte 2 in Abhängigkeit der Expression von p120-Catenin, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion (HR=Hazard-Ratio, KI=Konfidenzintervall).

3.1.4. Korrelation zwischen p120-Catenin und weiteren Parametern

Ergänzend erfolgte eine Korrelations-Analyse zwischen p120-Catenin und weiteren neuroradiologischen und histologischen Parametern (Tumorzvolumen, Ödem-Volumen und dem Marker der mikrovaskulären Proliferation CD31). Für diese Analyse wurden ausschließlich Glioblastomproben aus beiden Kohorten (Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2) verwendet. Es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der p120-Catenin-Expression und dem Tumorzvolumen, dem Ödemvolumen oder dem Marker der mikrovaskulären Proliferation CD31 (siehe **Tabelle 7**).

Korrelationen p120-Catenin (Spearman's Rho)	Tumor- Volumen [cm ³]	Ödem- Volumen [cm ³]	MVP (CD31)
Korrelationskoeffizient	0,032	0,136	-0,047
Signifikanz (2-seitig)	0,687	0,089	0,623
N	165	157	112

Tabelle 7: Bivariate Analyse durch Spearman's Rangkorrelationskoeffizient. Ermittelt wurde die Korrelation des Biomarkers mit weiteren Parametern (Tumor-Volumen, Ödem-Volumen und CD31). Aufgeführt sind Spearman's Rho, die Signifikanz und die Patientenzahl. Die Proben stammen ausschließlich von Glioblastom-Patienten (WHO Grad IV) aus beiden Kohorten.

3.2. Assoziation der Expression von CD99 mit dem WHO-Grad

In die Analyse wurden 21 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad II, 19 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad III und 99 Glioblastompatienten eingeschlossen (siehe **Tabelle 8**). 27 Patientenproben mussten aus vorwiegend technischen Gründen ausgeschlossen werden (z.B.: zu wenig solides Tumorgewebe, zu viele nekrotische Anteile). Darüber hinaus mussten aufgrund der insgesamt geringen Anzahl auch Patientenproben ausgeschlossen werden, die ein sogenanntes „dot-like“ Färbemuster aufwiesen und deren Färbemuster nicht gleichmäßig in den Zellen verteilt war (siehe **Abbildung 9**). Auch CD99 zeigt eine stärkere Expression bei höherem WHO-Grad (siehe **Abbildung 10**). So ist der höchste Median bei WHO-Grad IV zu finden (2,5), während der niedrigste Median bei WHO-Grad II auftritt (1,85) (siehe **Tabelle 9**). Insgesamt zeigt sich bei allen WHO-Graden eine große Spannweite der Werte mit einem Minimum von 0 bis zu einem Maximum von 3 in fast allen WHO-Graden. Der Korrelationskoeffizient zwischen CD99-Expression und dem WHO-Grad liegt bei $Rho = 0,130$. Die Korrelation ist jedoch nicht ausreichend signifikant ($p = 0,127$).

CD99-H-Score	WHO-Grad	Valide		Fehlend		Total	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	II	21	87,5%	3	12,5%	24	100,0%
	III	19	86,4%	3	13,6%	22	100,0%
	IV	99	82,5%	21	17,5%	120	100,0%

Tabelle 8: CD99 Hannover Kohorte 1 – Anzahl der Tumorproben nach WHO-Grad, die in die Studie eingeschlossen worden sind (N=Anzahl).

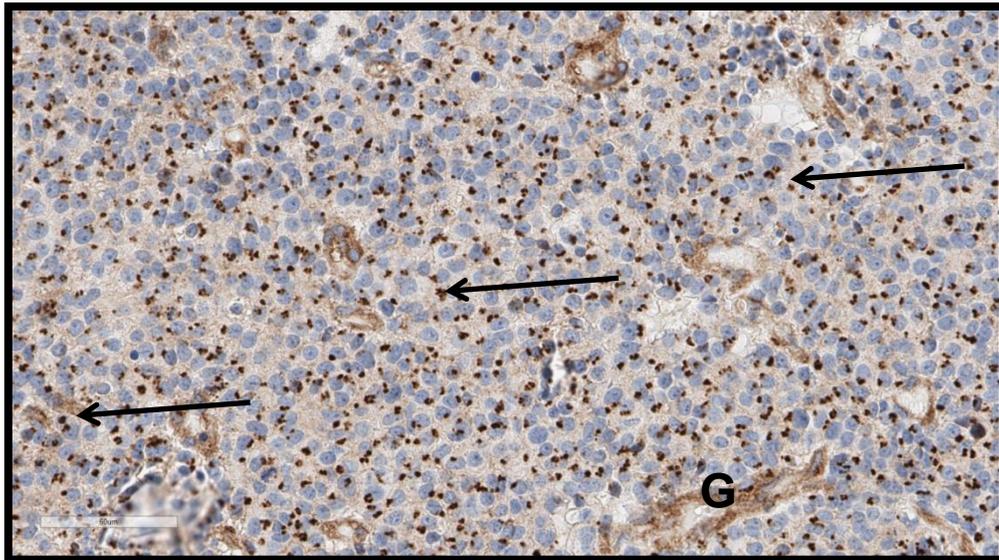


Abbildung 9: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit intrazellulären Clustern/“dot-like pattern“ (schmale Pfeile). Fehlende membranöse oder homogene Lokalisation. Bei den länglichen bräunlich gefärbten Strukturen mit Lumen handelt es sich um Gefäße (G).

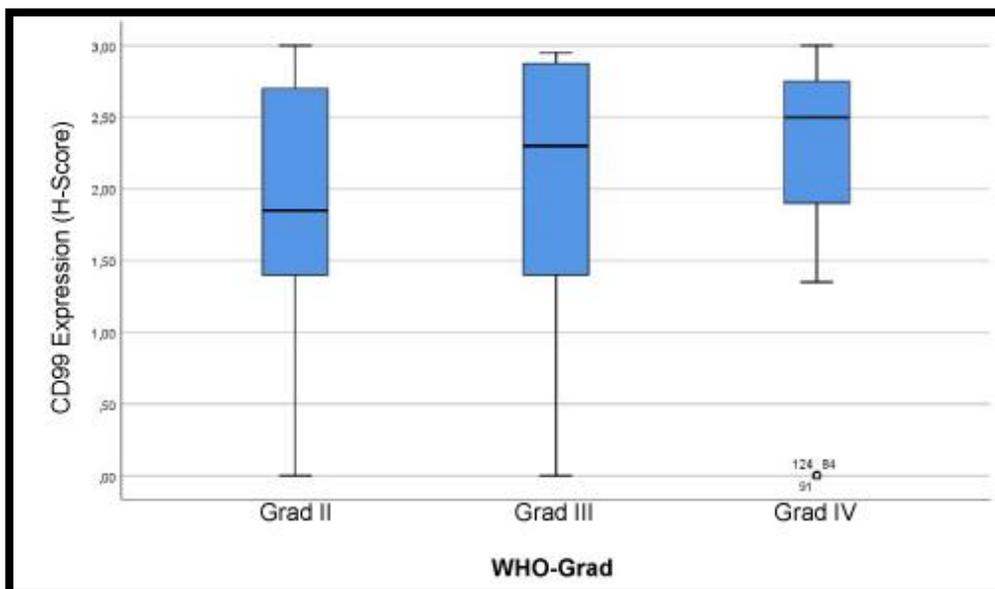


Abbildung 10: Expression von CD99 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

WHO-Grad	Median	Minimum	Maximum	N
II	1,85	0,00	3,00	21
III	2,3	0,00	2,95	19
IV	2,5	0,00	3,00	99
Total	2,35	0,00	3,00	139

Tabelle 9: Hannover Kohorte 1 – Median-, Minimum- und Maximumwerte der CD99 Expression nach WHO-Grad. N=Anzahl der Patienten

3.2.1. Assoziation der Expression von CD99 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1

In Bezug auf das Gesamtüberleben zeigen die Ergebnisse der univariaten Analyse, dass eine hohe Expression von CD99 (CD99^{high}) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben in der Hannover Kohorte 1 assoziiert ist ($p=0,008$) (siehe **Abbildung 11**). Bereits nach 10 Monaten zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen den Gruppen, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (60 Monate) bestehen bleibt.

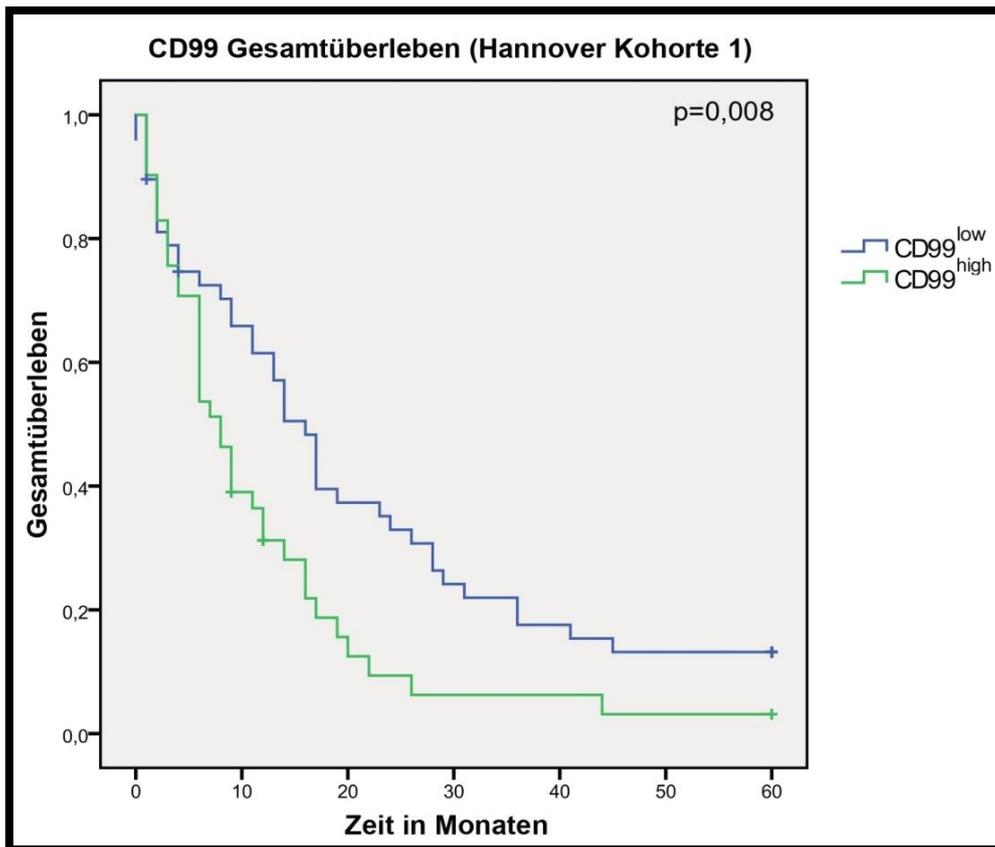


Abbildung 11: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 60 Monaten bei hoher und niedriger CD99-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.2.2. Assoziation der Expression von CD99 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 2

Nachdem in Hannover Kohorte 1 ein schlechteres Gesamtüberleben für Patienten gezeigt werden konnte, deren Tumorproben eine hohe Expression von CD99 aufwiesen, führten wir auch in unserer Validierungskohorte (Hannover Kohorte 2) die univariate Analyse durch. Die Validierungskohorte bestätigte die Ergebnisse von Hannover Kohorte 1. Auch hier führt eine erhöhte Expression von CD99 (CD99^{high}) zu einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben ($p=0,001$) (siehe **Abbildung 12**). Es zeigt sich bereits nach weniger als 5 Monaten eine deutliche Differenz zwischen den Gruppen, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (24 Monate) bestehen bleibt.

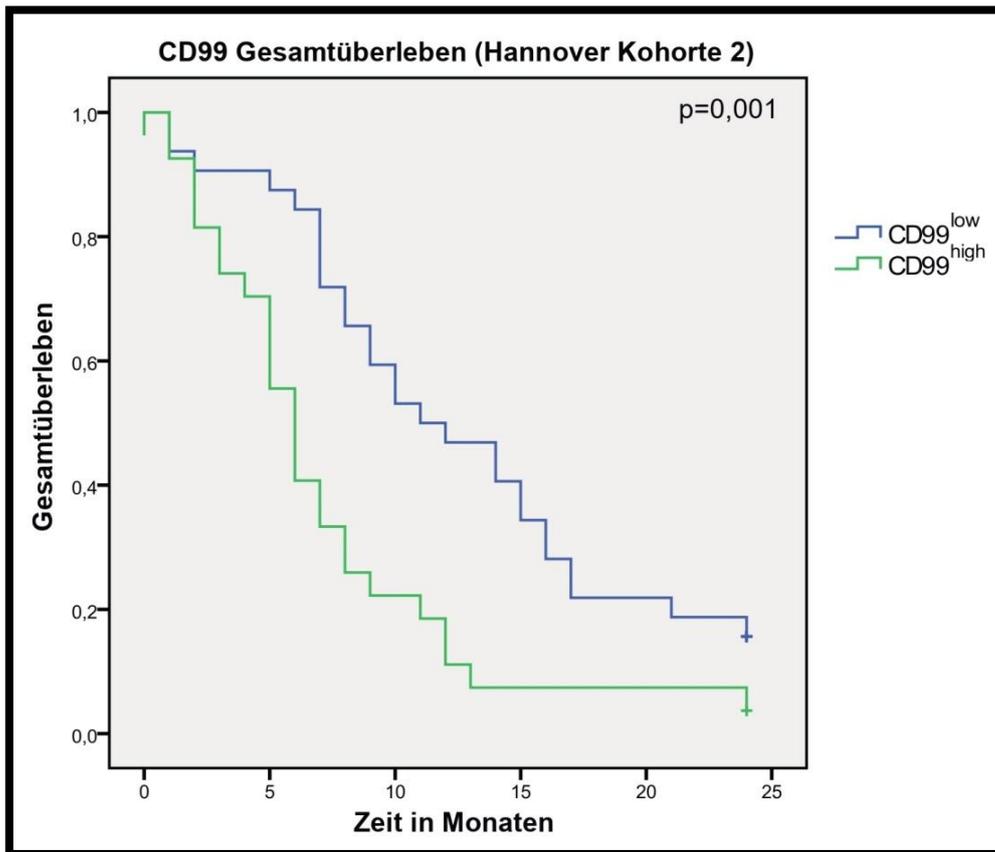


Abbildung 12: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 24 Monaten bei hoher und niedriger CD99-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 2. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.2.3. CD99: Multivariatenanalyse mittels COX-Regression bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2

Zur weiteren Analyse der Überlebensdaten erfolgte eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression. Hierfür wurden mögliche Confounder berücksichtigt, die sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren bei Glioblastomen erweisen haben: Karnofsky-Index, das Alter, die Therapie und der Umfang der Resektion.

Die multivariate Analyse zeigt, dass CD99 unabhängig von den typischen Confoundern als prognostischer Marker für das Gesamtüberleben in Glioblastompatienten angesehen werden kann. **Tabelle 10** stellt die Hazard-Ratio für CD99 dar, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion in Hannover Kohorte 1. In **Tabelle 11** werden die Ergebnisse für die

Validierungskohorte Hannover Kohorte 2 dargestellt. Auch hier zeigt sich die Expression von CD99 als unabhängiger Prognosefaktor von den üblichen Confoundern.

Multivariate Cox-Regression (Hannover Kohorte 1)	Gesamtüberleben		
	HR	KI (95%)	P-Wert
Alter	1		
CD99 ^{low}	1,87	1,16-3,00	0,01
CD99 ^{high}			
Karnofsky-Index	1		
CD99 ^{low}	1,713	1,05-2,77	0,029
CD99 ^{high}			
Therapie	1		
CD99 ^{low}	1,726	1,06-2,79	0,026
CD99 ^{high}			
Resektion	1		
CD99 ^{low}	1,865	1,16-2,97	0,009
CD99 ^{high}			

Tabelle 10: Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens von Patienten aus Hannover Kohorte 1 in Abhängigkeit der Expression von CD99, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion (HR=Hazard-Ratio, KI=Konfidenzintervall, p-Wert=Fehlerwahrscheinlichkeit)

Multivariate Cox-Regression (Hannover Kohorte 2)	Gesamtüberleben		
	HR	KI (95%)	P-Wert
Alter	1		
CD99 ^{low}	2,28	1,30-3,97	0,004
CD99 ^{high}			
Karnofsky-Index	1		
CD99 ^{low}	2,01	1,14-3,54	0,016
CD99 ^{high}			
Therapie	1		
CD99 ^{low}	3,223	1,77-5,86	<0,001
CD99 ^{high}			
Resektion	1		
CD99 ^{low}	2,346	1,34-4,10	0,003
CD99 ^{high}			

Tabelle 11: Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens von Patienten aus Hannover Kohorte 1 in Abhängigkeit der Expression von CD99, adjustiert mit den Prognosefaktoren Alter, Karnofsky-Index, Therapie und Resektion (HR=Hazard-Ratio, KI=Konfidenzintervall, p-Wert=Fehlerwahrscheinlichkeit)

3.2.4. Korrelation zwischen CD99 und weiteren Parametern

Ergänzend erfolgte eine Korrelations-Analyse zwischen CD99 und weiteren neuroradiologischen und histologischen Parametern (Tumorzvolumen, Ödem-Volumen und dem Marker der mikrovaskulären Proliferation CD31). Für diese Analyse wurden ausschließlich Glioblastom-Proben aus beiden Kohorten (Hannover Kohorte 1 und Hannover Kohorte 2) verwendet. Es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der CD99 Expression und dem Tumorzvolumen, dem Ödemvolumen oder dem Marker der mikrovaskulären Proliferation CD31 (siehe **Tabelle 12**).

Korrelationen CD99 (Spearman's Rho)	Tumor- Volumen [cm ³]	Ödem - Volumen [cm ³]	MVP (CD31)
Korrelationskoeffizient	-0,098	0,078	-0,051
Signifikanz (2-seitig)	0,243	0,366	0,621
N	143	135	98

Tabelle 12: Bivariate Analyse durch Spearman's Rangkorrelationskoeffizient. Ermittelt wurde die Korrelation des Biomarkers mit weiteren Parametern (Tumor-Volumen, Ödem-Volumen und CD31). Aufgeführt sind Spearman's Rho, die Signifikanz und die Patientenzahl. Die Proben stammen ausschließlich von Glioblastom-Patienten (WHO Grad IV) aus beiden Kohorten.

3.3 Assoziation der Expression von COL4A2 mit dem WHO-Grad

In die Analyse wurden 24 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad II, 21 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad III und 114 Glioblastompatienten eingeschlossen (siehe **Tabelle 13**). 7 Patientenproben mussten aus vorwiegend technischen Gründen ausgeschlossen werden (z.B.: zu wenig solides Tumorgewebe, zu viele nekrotische Anteile). COL4A2 zeigt eine stärkere Expression bei niedrigem WHO-Grad (siehe **Abbildung 13**). So ist der höchste Median bei WHO-Grad II zu finden (2,1), während die Mediane bei WHO-Grad III und IV niedriger sind (1,7) (siehe **Tabelle 14**). Insgesamt zeigt sich bei allen WHO-Graden eine große Spannweite der Werte mit einem Minimum von 0 bis zu einem Maximum von 3 in fast allen WHO-Graden. Der Korrelationskoeffizient zwischen COL4A2 und dem WHO-Grad liegt bei $Rho = -0,249$. Die Korrelation zwischen COL4A2 und dem WHO-Grad ist signifikant ($p = 0,002$).

COL4A2 H-Score	WHO- Grad	Valide		Fehlend		Total	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	II	24	100,0%	0	0,0%	24	100,0%
	III	21	95,5%	1	4,5%	22	100,0%
	IV	114	95,0%	6	5,0%	120	100,0%

Tabelle 13: COL4A2 Hannover Kohorte 1 – Anzahl der Tumorproben nach WHO-Grad, die in die Studie eingeschlossen worden sind (N=Anzahl).

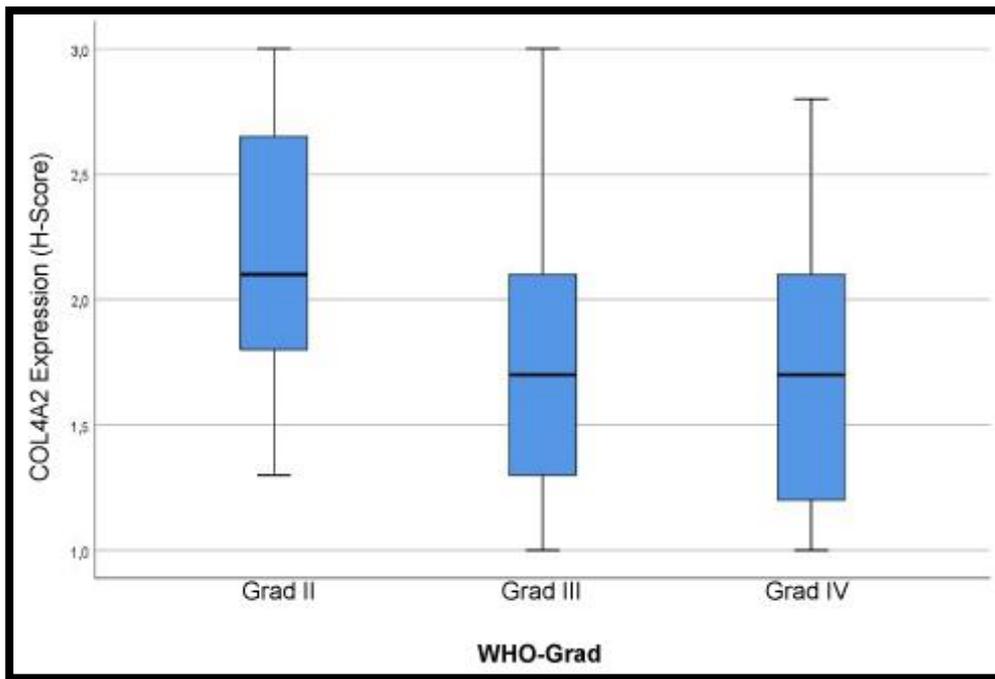


Abbildung 13: Expression von COL4A2 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

WHO-Grad	Median	Minimum	Maximum	N
II	2,1	1,3	3,0	24
III	1,7	1,0	3,0	21
IV	1,7	1,0	2,8	114
Total	1,7	1,0	3,0	159

Tabelle 14: Hannover Kohorte 1 – Median-, Minimum- und Maximumwerte der COL4A2 Expression nach WHO-Grad. N=Anzahl der Patienten.

3.3.1. Assoziation der Expression von COL4A2 auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1

In Hannover Kohorte 1 zeigen die Ergebnisse der univariaten Analyse keinen Unterschied im Gesamtüberleben zwischen den Gruppen COL4A2^{high} und COL4A2^{low} (p-Wert=0,634). Nach 60 Monaten liegt das Gesamtüberleben der Gruppe COL4A2^{high} etwas über dem der Gruppe COL4A2^{low}, das Ergebnis ist aber statistisch nicht signifikant (siehe **Abbildung 14**). Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz wurde auf eine zusätzliche multivariate Analyse und eine univariate Analyse der Validationskohorte Hannover Kohorte 2 verzichtet.

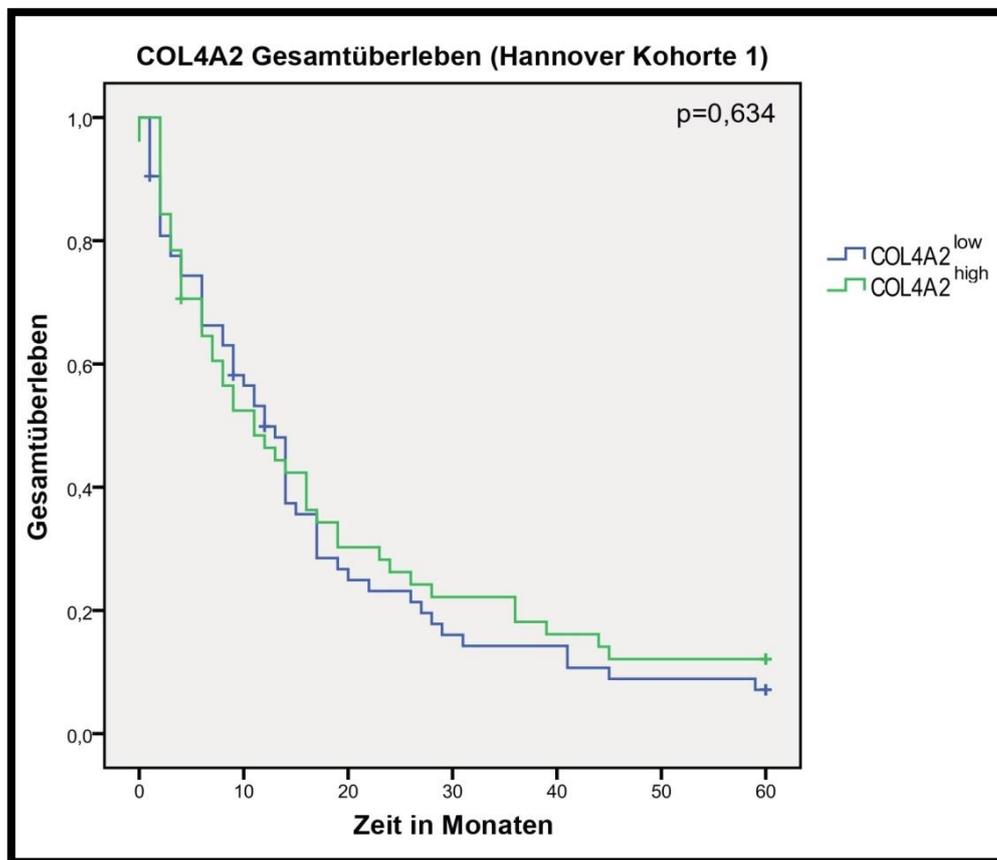


Abbildung 14: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 60 Monaten bei hoher und niedriger COL4A2-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.3.2. Korrelation zwischen COL4A2 und weiteren Parametern

Eine Korrelation zwischen der COL4A2-Expression und dem Tumolvolumen, dem Ödemvolumen und dem Marker der mikrovaskulären Proliferation CD31 zeigt keine statistische Signifikanz (siehe **Tabelle 15**).

Korrelationen COL4A2 (Spearman's Rho)	Tumor-Volumen [cm ³]	Ödem - Volumen [cm ³]	MVP (CD31)
Korrelationskoeffizient	0,107	<0,001	-0,002
Signifikanz (2-seitig)	0,172	1,000	0,987
N	163	154	113

Tabelle 15: Bivariate Analyse durch Spearman's Rangkorrelationskoeffizient. Ermittelt wurde die Korrelation des Biomarkers mit weiteren Parametern (Tumor-Volumen, Ödem-Volumen und CD31). Aufgeführt sind Spearman's Rho, die Signifikanz und die Patientenzahl. Die Proben stammen ausschließlich von Glioblastom-Patienten (WHO Grad IV) aus beiden Kohorten.

3.4. Assoziation der Expression von SOX10 mit dem WHO-Grad

In die Analyse wurden 23 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad II, 20 Patienten mit einem Gliom WHO-Grad III und 114 Glioblastompatienten eingeschlossen (siehe **Tabelle 16**). 9 Patientenproben mussten aus vorwiegend technischen Gründen ausgeschlossen werden (z.B.: zu wenig solides Tumorgewebe, zu viele nekrotische Anteile). SOX10 zeigt eine stärkere Expression bei niedrigem WHO-Grad (siehe **Abbildung 15**). So ist der höchste Median bei WHO-Grad II zu finden (0,5), während der niedrigste Median bei WHO-Grad IV vorliegt (0,12) (siehe **Tabelle 17**). Insgesamt zeigt sich bei allen WHO-Graden eine große Spannweite der Werte mit einem Minimum von 0 bis zu einem Maximum von 4 in fast allen WHO-Graden. Der Korrelationskoeffizient zwischen SOX10 und dem WHO-Grad liegt bei $Rho = -0,083$. Die Assoziation zwischen SOX10 und dem WHO-Grad ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,302$).

SOX10 H-Score	WHO- Grad	Valide		Fehlend		Total	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	II	23	95,8%	1	4,2%	24	100,0%
	III	20	90,9%	2	9,1%	22	100,0%
	IV	114	95,0%	6	5,0%	120	100,0%

Tabelle 16: SOX10 Hannover Kohorte 1 – Anzahl der Tumorproben nach WHO-Grad, die in die Studie eingeschlossen worden sind (N=Anzahl).

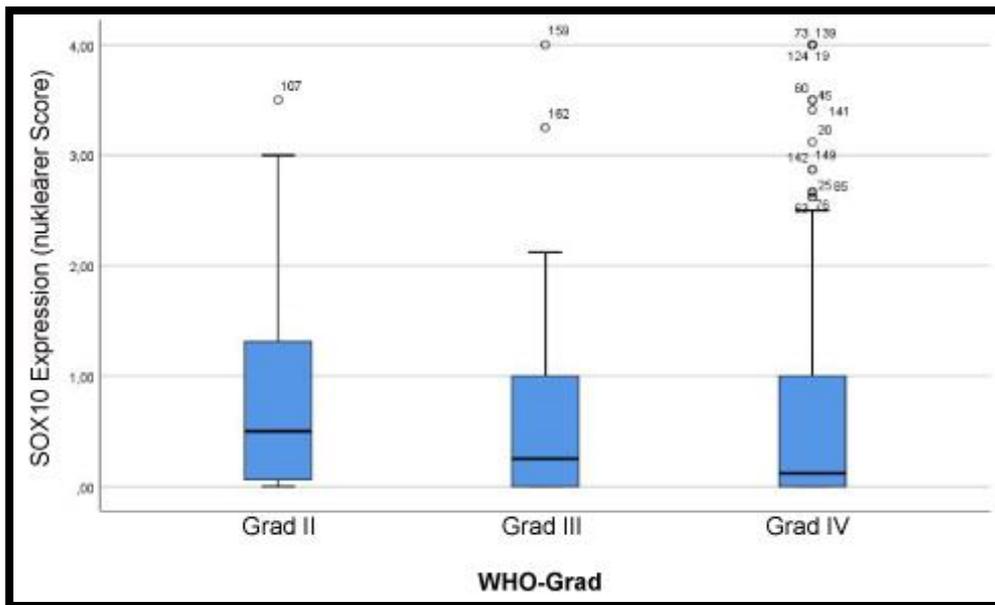


Abbildung 15: Expression von SOX10 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

WHO-Grad	Median	Minimum	Maximum	N
II	0,5	0,00	3,50	23
III	0,25	0,00	4,00	20
IV	0,12	0,00	4,00	114
Total	0,25	0,00	4,00	157

Tabelle 17: Hannover Kohorte 1 – Median-, Minimum und Maximumwerte der SOX10 Expression nach WHO-Grad. N=Anzahl Patienten

3.4.1. Assoziation der Expression von SOX10 mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit Glioblastomen in Hannover Kohorte 1

In den Überlebenskurven nach der Kaplan-Maier-Methode zeigt sich in Hannover Kohorte 1 nach 60 Monaten kein Überlebensvorteil für eine der beiden Gruppen $\text{SOX10}^{\text{low}}$ und $\text{SOX10}^{\text{high}}$ ($p\text{-Wert}=0,455$) (siehe **Abbildung 16**). Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz wurde auf eine zusätzliche multivariate Analyse und eine univariate Analyse der Validationskohorte Hannover Kohorte 2 verzichtet.

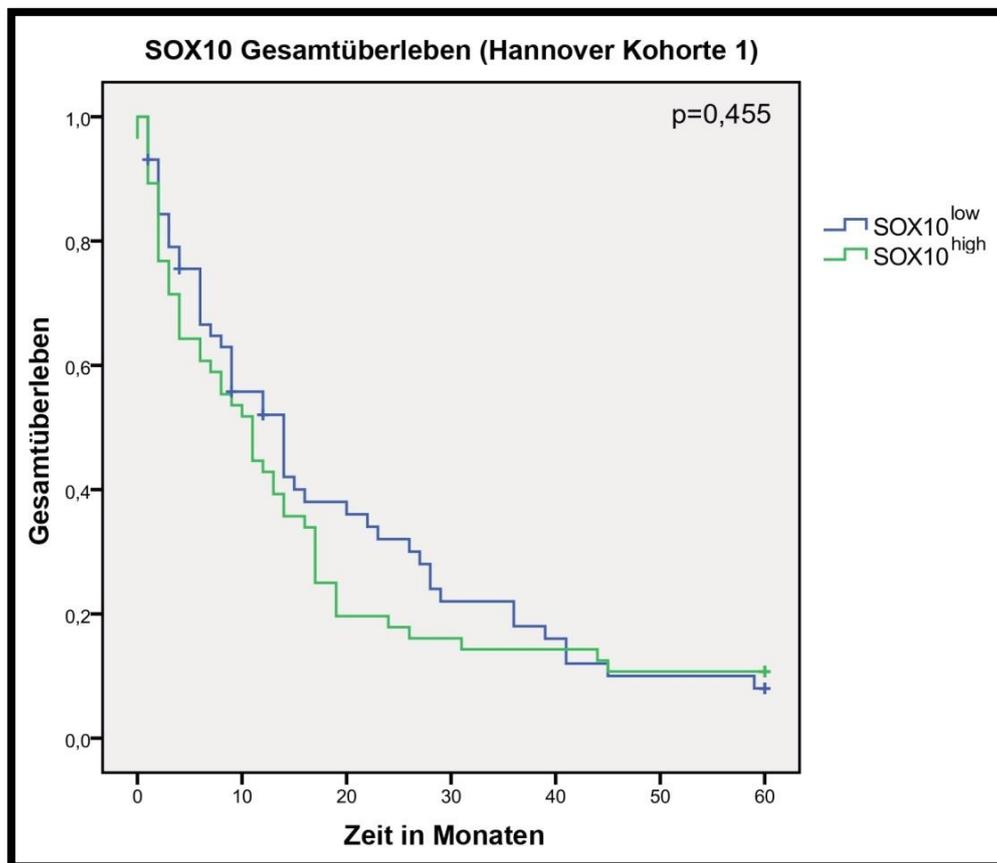


Abbildung 16: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach 60 Monaten bei hoher und niedriger SOX10-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

3.4.2. Korrelation zwischen SOX10 und weiteren Parametern

In den Korrelationen zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der SOX10-Expression und der mikrovaskulären Proliferation (MVP) (Rho=-0,222; p=0,019) der Tumoren. Die anderen zwei Parameter (Tumorzellen und Ödemvolumen) zeigten keine statistisch signifikante Korrelation mit der Expression von SOX10 (siehe **Tabelle 18**).

Korrelationen SOX10 (Spearman's Rho)	Tumor-Volumen [cm ³]	Ödem - Volumen [cm ³]	MVP (CD31)
Korrelationskoeffizient	-0,110	0,009	-0,222
Signifikanz (2-seitig)	0,148	0,905	0,019
N	174	166	111

Tabelle 18: Bivariate Analyse durch Spearman's Rangkorrelationskoeffizient. Ermittelt wurde die Korrelation des Biomarkers mit weiteren Parametern (Tumor-Volumen, Ödem-Volumen und CD31). Aufgeführt sind Spearman's rho, die Signifikanz und die Patientenzahl. Die Proben stammen ausschließlich von Glioblastom-Patienten (WHO Grad IV) aus beiden Kohorten.

4. Diskussion

4.1. Grundlage

Das durchschnittliche Überleben von Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastom, beträgt heutzutage bei maximaler Therapie durchschnittlich etwa 16-20 Monate (55). Damit zählt das Glioblastom zu den aggressivsten und am schnellsten zum Tode führenden Tumoren des Menschen. Aus diesem Grund ist es notwendig die molekularen Mechanismen von Glioblastomen besser zu verstehen und neue spezifische Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, die ein verlängertes Überleben nach Diagnosestellung ermöglichen können.

Moderne Biomarker bieten die Möglichkeit einer individuellen, auf die molekularen Mechanismen des Tumors zugeschnittenen Therapie, die spezifisch solche Zellen eliminiert, die den entsprechenden Biomarker in großem Maße exprimieren. Ein Beispiel hierfür ist die Antikörpertherapie bei Mamma-Karzinomen, die sich mit dem Antikörper Trastuzumab spezifisch gegen den Biomarker HER2-neu richtet und zu einem signifikant besseren Gesamtüberleben führt (56). Bei Glioblastomen ist eine solche spezifische Antikörpertherapie bislang noch nicht entwickelt worden. Hierfür werden neue Biomarker benötigt, die spezifisch auf Glioblastomzellen vorkommen und deren Expression zu einem signifikant besseren oder schlechteren Überleben führt.

In dieser Arbeit haben wir vier potentielle neue Biomarker (p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10) untersucht und deren Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit Glioblastomen analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der jeweiligen Biomarker einzeln diskutiert.

4.2. Diskussion: p120-Catenin

Wir konnten zeigen, dass p120-Catenin (cadherin-associated protein delta 1, CTNND1) einen signifikant unabhängigen Prädiktor für das Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen darstellt. Patienten aus der Gruppe p120-Catenin^{high} zeigen in beiden Kohorten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben, verglichen mit der Gruppe p120-Catenin^{low}. Dieser Unterschied ist unabhängig von den prognoserelevanten Faktoren Karnofsky-Index, Therapie, Alter und Resektion.

Außerdem konnte eine Zunahme der Expression von p120-Catenin mit steigendem WHO-Grad festgestellt werden.

p120-Catenin und seine intrazellulären Funktionen sind vor allen in Epithelien umfangreich erforscht worden. In Gliazellen wurde der Biomarker bislang nur unzureichend charakterisiert. In Epithelien nimmt p120-Catenin Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakte indem es über die intrazelluläre Domäne in der Juxtamembran-Region die Funktion klassischer Cadherine moduliert (29). Eine Darstellung der Interaktion von p120 Catenin mit dem Zytoskelett ist in **Abbildung 17** ersichtlich. In epithelialen Tumoren spielt p120-Catenin häufig eine Rolle als Tumorsuppressor. In Kolonkarzinomen, Harnblasenkarzinomen, Magenkarzinomen, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen, Bronchialkarzinomen und Pankreaskarzinomen zeigen sich häufig Verminderungen der p120-Catenin Expression, bis hin zum vollständigen Verlust von p120-Catenin (57).

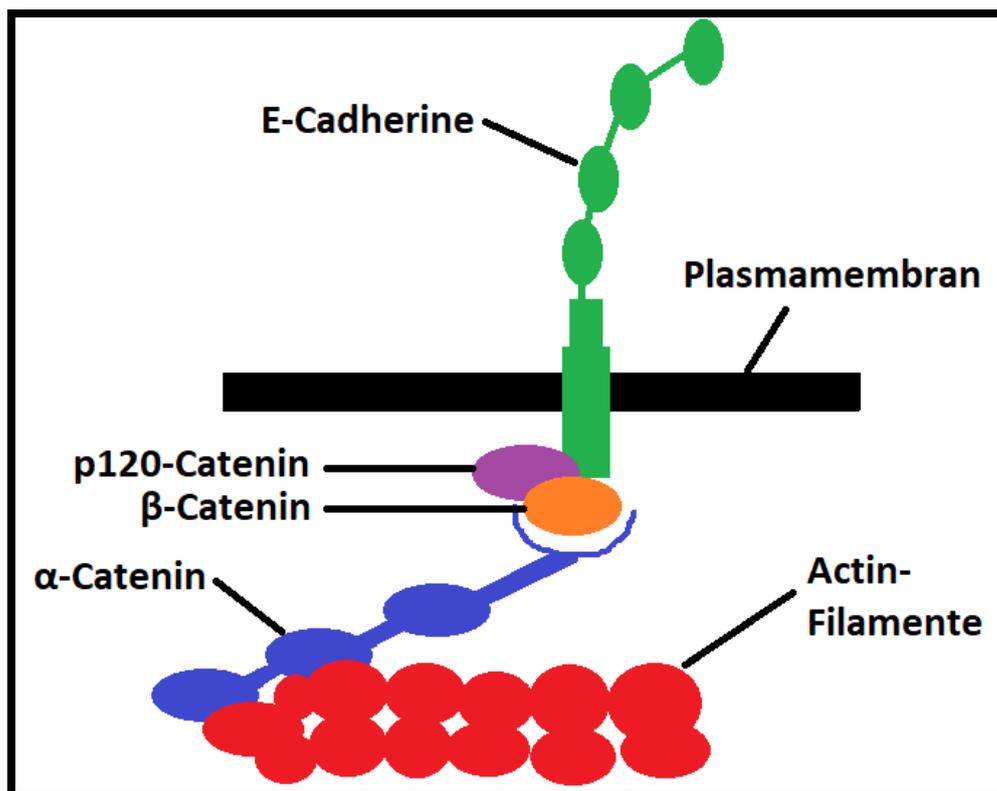


Abbildung 17: Interaktion von p120-Catenin mit dem Catenin-Komplex und den Actin-Filamenten. Modifiziert aus Molecular Biology of the Cell 6e (Garland Science 2015).

Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse ein längeres Überleben in der Gruppe p120-Catenin^{low}, in welcher p120-Catenin weniger stark exprimiert wird, als in der Gruppe p120-Catenin^{high}. Deborah Huvelde et al. konnten zeigen, dass die Hyperphosphorylierung von p120-Catenin im Bereich von Y228 von wesentlicher Bedeutung für die Invasivität von Glioblastomen in vivo und in vitro ist. Diese Phosphorylierung von p120-Catenin scheint in anderen epithelialen Tumoren, wie Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen deutlich weniger stark ausgeprägt zu sein (33). Die Hyperphosphorylierung hängt mit der Überaktivität von Kinasen der Src Familie (SFKs) zusammen und führt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, mit nachweislicher Zunahme der Invasivität (33). Aus diesem Grund scheint p120-Catenin in Gliazellen nicht wie in epithelialen Tumoren primär als Tumorsuppressor aufzutreten. Zumal p120-Catenin in unseren immunhistochemischen Färbungen ubiquitär im Zytoplasma verbreitet auftrat, obwohl es ursprünglich, in Epithelien, vor allem im Bereich der Zellmembran vorkommt. In manchen epithelialen Tumoren ist diese Mislokalisierung von p120-Catenin ein Resultat des Verlusts von E-Cadherin und geht mit einer verstärkten Tumorprogression einher (30). Dies führt im Kolonkarzinom beispielsweise zu einer Inhibition der Rho-Aktivität durch das mislokalisierte p120-Catenin und damit zu einer verstärkten Metastasierung der Tumoren mit nachgewiesen reduziertem Gesamtüberleben der Kohorte (58).

Auch in hippocampalen Pyramidenzellen führt der Verlust von p120-Catenin zu einer Reduktion der Cadherin-Level und zu einer Misregulation der Familie der Rho-GTPasen, mit verminderter Rac1- und verstärkter RhoA-Aktivität (59).

p120-Catenin fungiert jedoch auch in epithelialen Tumoren nicht nur als Tumorsuppressor. Eine Arbeit von Chang Hee Kim et al. aus dem Jahre 2013 identifizierte NLBP (novel LZaP-binding protein) als wesentliches Regulatorprotein zur Modulation von p120-Catenin in Adenokarzinomen der Lunge (60). Dort führt die Bindung von NLBP an die regulatorische Untereinheit von p120-Catenin zu einer Verhinderung der Ubiquitinierung von p120-Catenin und damit zu einer zellulären Überexpression durch Verminderung des Abbaus. Bereits im Jahr 2001 konnten Inna Grosheva et al. nachweisen, dass eine Überexpression von p120-Catenin in Fibroblasten und Epithelzellen zu Veränderungen der Zellform, Zellbeweglichkeit und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix führen (61).

In gesunden Gliazellen der Ratte ist p120-Catenin in Astrozyten fast nicht nachweisbar, während Oligodendrozyten im Durchschnitt eine deutlich stärkere Expression von p120-Catenin aufweisen (62). Interessanterweise zeigen neuronale Vorläuferzellen der Ratte aus dem Gyrus dentatus des Hippocampus und aus der subventrikulären Zone (in welcher eine größere intrazerebrale Stammzellenpopulation vermutet wird) eine besonders starke Expression von p120-Catenin, was darauf hindeuten könnte, dass die starke Expression von p120-Catenin eine wesentliche Voraussetzung für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone in die jeweiligen Bereiche des adulten Gehirns darstellt (63). Es ist bekannt, dass in Glioblastomen nicht nur CD133⁺ Tumor-Stammzellen existieren, sondern dass es einige Gemeinsamkeiten von neuronalen Vorläuferzellen und Glioblastomzellen in Bezug auf die Expression von Genen und die aktiven intrazellulären Signalwege gibt (64). Auch dies weist darauf hin, dass Glioblastome mit einer ausgeprägten Expression von p120-Catenin zu einem deutlich kürzeren Überleben führen könnten, wenn sie eine größere Menge von Tumorstammzellen enthalten, die bekanntlich weniger sensitiv auf Chemo- und Radiotherapie reagieren (65).

Eine publizierte Arbeit von Gritsenko et al. konnte zeigen, dass p120-Catenin einen wichtigen Angriffspunkt in Glioma-Zell-Netzwerken darstellt. Passend zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen führte eine Herunterregulation von p120-Catenin zu verminderten Zell-Zell-Interaktionen und zu einer Verringerung des bestehenden Gliomnetzwerkes in vivo. Außerdem zeigte eine genetische Analyse von 3875 Genen in humanen Gliomen einen signifikanten Vorteil des Gesamtüberlebens von Patienten mit einer geringen Expression von p120-Catenin (66).

Eine monoklonale antikörperbasierte Immuntherapie gegen p120-Catenin ist bislang noch nicht etabliert und es ist fraglich, ob ein Antikörper gegen p120-Catenin aufgrund der ubiquitären Expression in Epithelien jemals Anwendung finden wird. Es werden daher weitere Studien benötigen, um Sicherheit und Wirkung einer solchen Therapie in vitro und vivo zu charakterisieren.

4.3. Diskussion: CD99

Wir konnten zeigen, dass CD99 einen signifikant unabhängigen Prädiktor für das Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen darstellt. Patienten der Gruppe CD99^{high} zeigen ein signifikant schlechteres Überleben, verglichen mit der Gruppe CD99^{low}. Dieser Unterschied ist unabhängig von den prognoserelevanten Faktoren Karnofsky-Index, Therapie, Alter und Resektion.

CD99 ist als Transmembranprotein in Leukozyten und im aktivierten Endothel bekannt, außerdem ist es ein diagnostischer Marker beim Ewing-Sarkom (67). CD99 spielt in Tumoren eine ambivalente Rolle. So verhält es sich in manchen Tumoren wie ein Onkogen (Gliome, Lymphome, Melanome, Mammakarzinome), während es in anderen Tumoren als Tumorsuppressor fungiert (Hodgkin-Lymphom, Osteosarkom, Pankreaskarzinom) (68).

Ursula Urias et al. konnten 2014 zeigen, dass die Expression von CD99 in Glioblastomen im Vergleich zu nicht neoplastischem Gewebe signifikant erhöht ist (36). Außerdem zeigte sich eine veränderte Lokalisation von CD99 in high-grade Gliomen (WHO Grad III und IV), in welchen CD99 häufig im Zytoplasma oder in den Membranen vorkommt, im Vergleich zu Low-grade Tumoren (WHO Grad I und II), in welchen es vor allem im Zellkern vorkommt (36).

Mehrere immunhistochemische Studien haben bereits ein charakteristisches Färbeverhalten von CD99 in einer Vielzahl von Malignomen festgestellt. So wurden in neuroendokrinen Tumoren, Ewing-Sarkomen, primitiven neuroektodermalen Tumoren, Melanomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Merkelzellkarzinomen und in vielen anderen Tumorentitäten sogenannte paranukleäre „dot-like pattern“ festgestellt, welche auch in einzelnen unserer Proben zu finden waren (40). Dabei kommt es zu Ansammlungen von CD99 in punktförmigen Clustern im Zytoplasma. Die Ursache für dieses charakteristische Färbeverhalten, das nicht in allen Tumoren der beschriebenen Entitäten zur Darstellung kommt, ist aktuell noch unzureichend verstanden. Es gibt Vermutungen, dass es sich bei den Clustern um defekte Proteine handelt, die vom Golgi-Apparat oder vom rauen Endoplasmatischen Retikulum nicht zu den Zellmembranen transportiert werden können, wo CD99 eigentlich vorkommt (69). Bislang sind die paranukleären dot-like pattern in Glioblastomen noch nicht beschrieben worden. Wenn es sich bei den dot-like pattern wirklich um Defekte Proteine handeln sollte, und CD99 in Glioblastomen als Onkogen auftritt, wäre zu

erwarten, dass Patienten mit CD99-Clustern einen Überlebensvorteil gegenüber solchen haben, bei denen das Protein überexprimiert wird. Aufgrund der geringen Probenanzahl von CD99-Clustern war in unserer Studie eine Subgruppenanalyse zur Beurteilung der Bedeutung auf das Gesamtüberleben allerdings nicht möglich.

Das CD99-Gen codiert zwei verschiedene Isoformen: Die erste Isoform entspricht der vollständigen Proteinelänge (CD99wt), während die zweite Isoform einer verkürzten Version der ersten Isoform entspricht (CD99sh) (70). Zucchini et al. konnten zeigen, dass die beiden Isoformen unterschiedliche Effekte in Zellkulturen und in Tiermodellen aufweisen: Während die lange Isoform CD99wt in Osteosarkomen und Prostatakarzinomen Wachstum, Migration und Metastasierung vermindert, führt die kurze Isoform CD99sh zu einer Verstärkung dieser Prozesse (71). Die intrazellulären Effekte der beiden Isoformen sind in **Abbildung 18** dargestellt.

Eine 2019 publizierte Arbeit von Lais C. Cardoso et al. konnte zeigen, dass unabhängig vom Malignitätsgrad von den zwei bekannten CD99-Isoformen in Astrozytomen nur die erste lange Isoform (CD99wt) exprimiert wird und dass diese Isoform im mesenchymalen und klassischen GBM höher exprimiert wird, als im proneuralen Subtyp (38). Interessanterweise führte in dieser Studie ein Knock-down von CD99 zu einer verminderten Migration von Glioblastomzellen in der Zellkultur. Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse unserer Studie, in welcher eine hohe Expression von CD99 mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht.

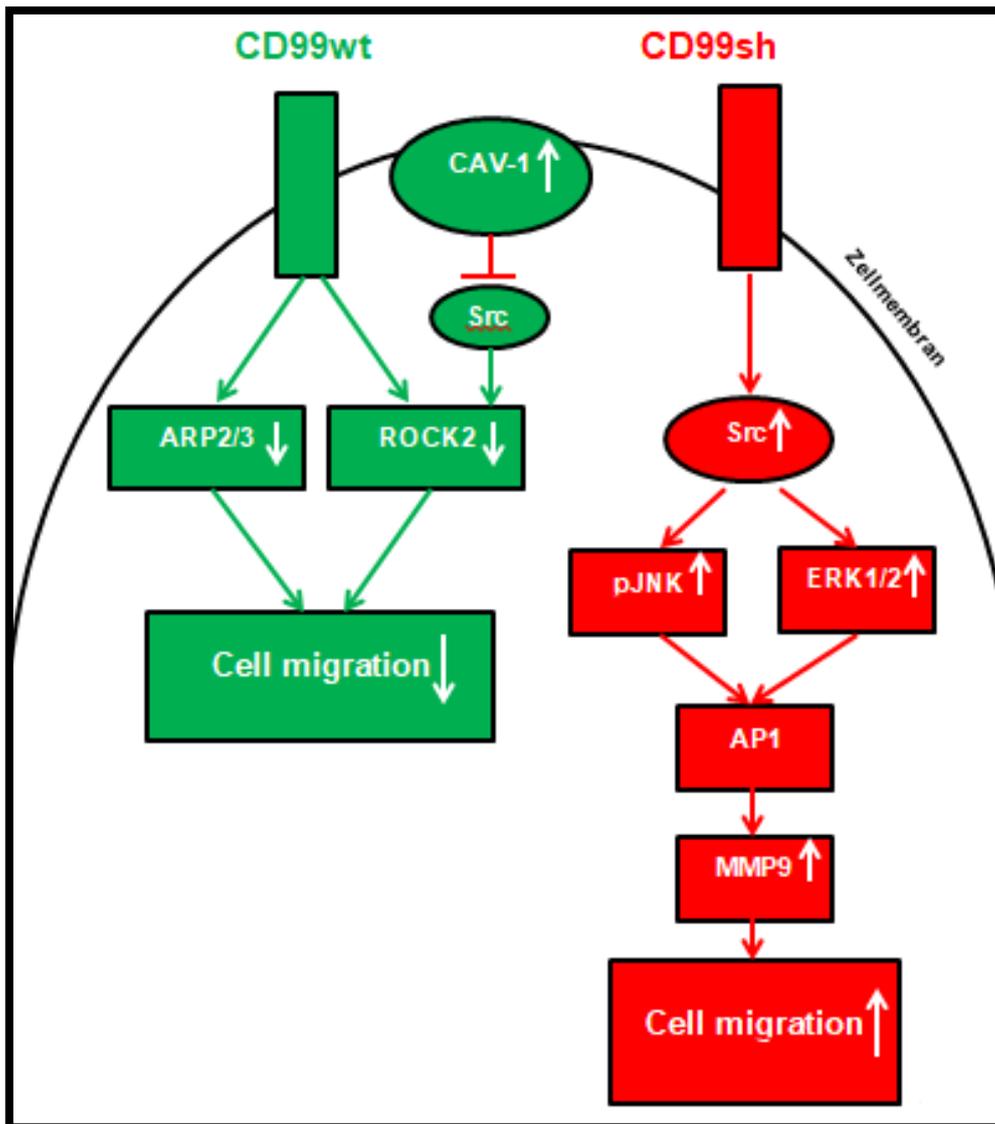


Abbildung 18: Schematische Darstellung der CD99 Subtypen in Tumorzellen, modifiziert nach Manara MC, Pasello M, Scotlandi K. CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. Genes (Basel). 2018 Mar 13;9(3):159. doi: 10.3390/genes9030159. PMID: 29534016; PMCID: PMC5867880

Tae-Young Jung et al. konnten zeigen, dass CD99 aufgrund der ausgeprägten Expression in Glioblastomzellen ein potentielles Target im Rahmen einer Immuntherapie darstellen könnte (72). Young-Hee Kim et al. konnten in einer Studie zeigen, dass modifizierte zytotoxische T-Lymphozyten in Zellkulturen gegen CD99 gerichtet werden können (73).

Da CD99 allerdings im Knochenmark, im Pankreas, in Nasopharynx, Ösophagus und in den Genitalien stark exprimiert ist, könnte eine Immuntherapie gegen CD99 zu zahlreichen Nebenwirkungen führen. Zusätzliche Studien müssen daher einen

effektiven Nutzen mit tolerierbaren Nebenwirkungen zeigen, damit es in Zukunft zu einer klinischen Anwendung kommen kann.

4.4. Diskussion: COL4A2

Unsere Studie konnte keine signifikante Assoziation zwischen der Expression von COL4A2 und dem Gesamtüberleben von Glioblastompatienten feststellen. Es zeigte sich aber eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Expression von COL4A2 und dem WHO-Grad der Tumoren.

Diese Ergebnisse werden durch funktionelle *in vitro* Studien unterstützt, in welchen die Stimulation von Glioblastomzellen durch Interleukin-1 tendenziell zu einer Herunterregulation von COL4A2 führt (74). Da Interleukin-1 in Glioblastomen überexprimiert ist könnte die von uns beobachtete niedrige COL4A2 Expression bei Gliomen WHO-Grad III und Glioblastomen zumindest teilweise dadurch erklärt werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen haben andere Studien gezeigt, dass Glioblastome und anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) im Vergleich zu diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) eine erhöhte Expression von COL4A2 aufweisen (42, 43). Es ist jedoch anzumerken, dass die o.g. Studien die Genexpression von COL4A2 untersucht haben, während unsere Studie die Proteinexpression von COL4A2 analysierte. Des Weiteren zeigt sich in der Literatur eine Assoziation zwischen COL4A2 und der Vaskularisation eines Tumors (75). In unseren Analysen besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Gefäßmarkers CD31 und COL4A2.

Choi et al. haben beobachtet, dass Patienten mit rezidiviertem Glioblastom, die mit Bevacizumab behandelt wurden und eine hohe Expression von COL4A2 aufwiesen, signifikant schlechter überleben, als Patientin mit geringer Expression von COL4A2 (44). In der gesamten Kohorte, also unabhängig von der Therapie, zeigte sich jedoch kein Überlebensvorteil in Abhängigkeit von der Expression von COL4A2. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus unseren untersuchten Kohorten. Diese Studie schloss allerdings nur 9 Patienten ein, weshalb die Aussagekraft nur eingeschränkt beurteilt werden kann. Insgesamt muss kritisch angemerkt werden, dass aktuell zu wenig signifikante Daten vorliegen, um die Rolle von COL4A2 in Glioblastomen abschließend zu beurteilen. Hier sind in Zukunft weitere Studien nötig.

4.5. Diskussion: SOX10

Wir konnten keine signifikante Assoziation zwischen der Expression von SOX10 und dem Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen feststellen. Nebenbefundlich zeigte sich aber eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen der nukleären Expression von SOX10 und der mikrovaskulären Proliferation (MVP).

SOX10 liegt als Transkriptionsfaktor ausschließlich intranukleär vor. Bekannt ist die Expression von SOX10 insbesondere in Melanomen, in welchen es stark exprimiert wird und mit einer Tumorprogression einhergeht (76).

Gliome aller Malignitätsgrade exprimieren SOX10. Auch in dieser Studie zeigten sich in allen Proben mindestens geringe Mengen von SOX10. Allerdings ist die Expression von Low-grade Gliomen im Vergleich zu High-grade Gliomen deutlich erhöht (48). **Tabelle 20** stellt eine Übersicht der Expression von SOX10 in den verschiedenen Tumorentitäten dar:

Fallnummer	Tumorentität	WHO-Grad	Zelldichte	SOX10 Expression
1	Astrozytom	2	++	+++
2	Astrozytom	2	+	+++
3	Astrozytom	2	+	+++
4	Astrozytom	2	+	+++
5	Oligodendrogliom	2	++	+++
6	Oligodendrogliom	2	++	++
7	Oligodendrogliom	3	++	+
8	Oligodendrogliom	3	+++	+
9	Ependymom	3	+++	+
10	Ependymom	3	+++	++
11	Glioblastom	4	++	++
12	Glioblastom	4	+++	+
13	Glioblastom	4	+++	+
14	Glioblastom	4	+++	-

Tabelle 19: Expression von SOX10 in verschiedenen Tumor-Entitäten des ZNS, modifiziert nach Ferletta M, Uhrbom L, Olofsson T, Pontén F, Westermarck B. Sox10 has a broad expression pattern in gliomas and enhances platelet-derived growth factor-B--induced gliomagenesis. Mol Cancer Res. 2007 Sep;5(9):891-7. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0113. PMID: 17855658.

Im gesunden erwachsenen Gehirn kommt SOX10 fast ausschließlich in Oligodendrozyten vor. Bei einer Hypermethylierung des Promoters von SOX10 und einer daraus resultierenden geringeren Expression von SOX10 kam es in einer Studie mit 50 Glioblastom-Patienten, die nach dem Stupp-Schema therapiert worden sind, zu einem signifikant kürzeren Überleben (50).

Bekanntermaßen gibt es Glioblastome, die in der histologischen Untersuchung eine oligodendrogliale Komponente aufweisen. Goda et al. konnten 2015 zeigen, dass Patienten mit einem GBM und einer oligodendroglialen Komponente ein signifikant besseres Überleben zeigen, als Patienten mit GBM ohne oligodendrogliale Komponente (77). Möglicherweise spricht eine hohe Expression von SOX10 für eine oligodendrogliale Komponente innerhalb des Tumors.

Ellingson et al. konnten zeigen, dass das Tumolvolumen im Fall eines Rezidivs einen signifikanten prognostischen Faktor darstellt (78). Möglicherweise zeigen schnell wachsende Tumoren mit daraus resultierenden großen Tumorumfängen eine geringere Expression von SOX10. Dies könnte dafür sprechen, dass derartig „entwickelte“ Tumoren immer mehr Eigenschaften des gesunden Glia-Zellsystems ablegen und durch zunehmende Mutationen die Fähigkeit zur Produktion von SOX10 verlieren.

Insgesamt sprechen die bisherigen Daten dafür, dass eine hohe Expression von SOX10 mit einem besseren Gesamtüberleben in Glioblastomen assoziiert sein kann. Dies konnte in unserer Studie aber nicht bestätigt werden. Um die Rolle von SOX10 in Glioblastomen endgültig zu klären, werden daher weitere Studien nötig sein.

4.6. Diskussion der Methoden und Limitationen

4.6.1. Tumorproben und Patientenkollektiv

Limitationen ergeben sich bereits durch die verfügbaren archivierten Proben. Diese stellen nicht den vollständigen Umfang des Tumors dar, so dass keine Aussage über die Grundgesamtheit gemacht werden kann, sondern nur über eine Stichprobe. Diese Stichprobe wurde wiederum anhand von morphologischen Kriterien ausgewählt. Es ist jedoch bekannt, dass gerade Glioblastome über eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität verfügen, so dass der von uns untersuchte Bereich deutliche Unterschiede zu einem anderen, chirurgisch oder histopathologisch nicht erfassten Bereich aufweisen könnte. Des Weiteren zeigten manche Tumorproben Einblutungen oder große Nekrosezonen, weshalb ein paar Patientenproben, bei fehlendem vitalem Tumorgewebe, ausgeschlossen werden mussten.

Zusätzlich mussten manche Patienten aus der Studie ausgeschlossen werden, da durch unvollständige Patientenakten oder -daten eine Erhebung des Überlebensstatus nicht möglich war. Es bestanden außerdem methodenbedingte Ungenauigkeiten in der Erfassung des Volumens der Tumoren. Durch Auswertung der MRT-Bilder und Messung des Tumolvolumens und Volumen des Ödems mittels Breite x Höhe x Länge lassen sich ungleich wachsende Tumoren nur eingeschränkt analysieren. Diese Limitation könnte durch moderne Computerprogramme umgangen werden, die das dreidimensionale Volumen besser erfassen können, als es manuell durch menschliche Beurteiler möglich ist.

4.6.2. Tissue-Microarray

Die Einschränkung der Tissue-Microarray-Methode besteht offensichtlich darin, dass nur geringe Gewebeanteile aus einer Gesamtprobe untersucht werden können. Insbesondere in Tumoren mit hoher intratumoraler Heterogenität, wie dem Glioblastom, kann dies zu einer fehlerhaften Beurteilung des Gesamttumors führen. Dem versuchten wir entgegenzuwirken, indem wir mehrere Abschnitte aus dem erhaltenen Tumorgewebe analysierten. Des Weiteren ist durch Studien belegt, dass Ergebnisse von TMA und Gewebsschnitten meist konkordant sind (79). Dennoch

gingen bei Durchführung der Methode einige Proben verloren oder konnten nicht richtig angefärbt oder ausgewertet werden.

4.6.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt grundsätzlich ein etabliertes Verfahren in der Analyse von Gewebeproben dar. Limitationen ergeben sich durch methodisch bedingte fehlende oder fehlerhafte Anfärbungen. Die Bewertung der Proben erfolgte durch erfahrene unabhängige Untersucher, um einen möglichst hohen Grad an Objektivität zu erreichen. Bei großen Unterschieden in der Bewertung der Proben wurde eine dritte unabhängige Person zur endgültigen Beurteilung hinzugezogen. Gegebenenfalls könnte eine computergestützte Erfassung und Analyse der Tumorzellen und des Gewebes zu einer noch objektivieren Bewertung der Proben führen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Assoziation von vier Biomarkern (p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10) mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit gesichertem Glioblastom. Hierfür wurde das Tumorgewebe von zwei Patientenkohorten (Hannover Kohorte 1 (166 Patienten) und Hannover Kohorte 2 (122 Patienten)) mithilfe der Tissue-microarray-Methode (TMA) untersucht. Die daraus resultierenden „Spots“ wurden immunhistochemisch mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt, digitalisiert und von zwei verblindeten unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der univariaten Kaplan-Meyer-Methode und der multivariaten Cox-regression. Es erfolgte eine Dichotomisierung der Expression des Biomarkers in die Gruppen Biomarker^{high} und Biomarker^{low}.

Im Rahmen dieser Auswertung zeigte sich in Hannover Kohorte 1 nach 60 Monaten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben von Patienten mit hoher Expression von p120-Catenin (p120-Catenin^{high}) im Vergleich zur Patientengruppe mit niedriger Expression von p120-Catenin (p120-Catenin^{low}). In der Validierungskohorte Hannover Kohorte 2 konnte dieses Ergebnis nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten bestätigt werden. Ebenso zeigte sich in Hannover Kohorte 1 nach 60 Monaten ein signifikant kürzeres Überleben in der Patientengruppe CD99^{high} im Vergleich zur Patientengruppe CD99^{low}. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in Hannover Kohorte 2 nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten bestätigt werden. Die Relevanz dieser beiden Biomarker in Bezug auf das Überleben bei Patienten mit Glioblastomen ist in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben worden. Die Biomarker COL4A2 und SOX10 zeigten in Hannover Kohorte 1 keine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Glioblastompatienten. Zusammenfassend haben wir in dieser Arbeit neue prognostisch relevante Biomarker identifiziert, welche auch als Basis für weiterführende molekulare und therapeutische Studien bei Glioblastomen dienen könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021
2. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice Neurology*. 2006;2(9):494-503; quiz 1 p following 516. doi:<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>
3. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2012;19(4):764-772. doi:<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3002>
4. Weller M, Knobbe-Thomsen CB, Le Rhun E, Reifenberger G. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Der Onkologe*. 2022;28(2):155-163. doi:<https://doi.org/10.1007/s00761-021-01083-7>
5. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Review Glioblastoma multiforme – an overview. *Współczesna Onkologia*. 2014;5(18):307-312. doi:<https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
6. Spinelli V, Chinot O, Cabaniols C, Giorgi R, Alla P, Lehucher-Michel MP. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*. 2010;39(2):e35-44. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2009.06.020>
7. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2014;23(10):1985-1996. doi:<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0275>
8. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(10):2421-2427. doi:<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0658>
9. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86. doi:<https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
10. Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA*. 2023;329(7):574-587. doi:<https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>
11. Ostrom QT, Shoaf ML, Cioffi G, et al. National-level overall survival patterns for molecularly-defined diffuse glioma types in the United States. *Neuro-Oncology*.

- 2022;25(4):799-807. doi:<https://doi.org/10.1093/neuonc/noac198>
12. Stark AM, van de Bergh J, Hedderich J, Mehdorn HM, Nabavi A. Glioblastoma: Clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2012;114(7):840-845.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.026>
 13. Omuro A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*. 2013;310(17):1842.
doi:<https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
 14. Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2016;20(5):S2-S8. doi:<https://doi.org/10.1188/16.cjon.s1.2-8>
 15. Schiff D, Lee EQ, Nayak L, Norden AD, Reardon DA, Wen PY. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro-Oncology*. 2014;17(4):488-504.
doi:<https://doi.org/10.1093/neuonc/nou304>
 16. Rouzbeh Banan, Hartmann C. The new WHO 2016 classification of brain tumors—what neurosurgeons need to know. *Acta neurochirurgica*. 2017;159(3):403-418.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00701-016-3062-3>
 17. Esmaeili M, Hamans BC, Navis AC, et al. IDH1 R132H Mutation Generates a Distinct Phospholipid Metabolite Profile in Glioma. *Cancer Research*. 2014;74(17):4898-4907.
doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-0008>
 18. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*. 2008;116(6):597-602. doi:<https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2>
 19. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. 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.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
 20. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-996. doi:<https://doi.org/10.1056/nejmoa043330>
 21. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*. 2001;95(2):190-198. doi:<https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>
 22. Brown TJ, Brennan MC, Li M, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma. *JAMA Oncology*. 2016;2(11):1460.
doi:<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1373>
 23. Leroy HA, Vermandel M, Lejeune JP, Mordon S, Reyens N. Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. *Lasers in Surgery and Medicine*.

- 2015;47(5):441-451. doi:<https://doi.org/10.1002/ism.22359>
24. Quick J, Gessler F, Dützmänn S, et al. Benefit of tumor resection for recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014;117(2):365-372. doi:<https://doi.org/10.1007/s11060-014-1397-2>
25. Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(7):707-715. doi:[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(12\)70164-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(12)70164-x)
26. Fogh SE, Andrews DW, Glass J, et al. Hypofractionated Stereotactic Radiation Therapy: An Effective Therapy for Recurrent High-Grade Gliomas. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(18):3048-3053. doi:<https://doi.org/10.1200/jco.2009.25.6941>
27. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-Repair GeneMGMTand the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(19):1350-1354. doi:<https://doi.org/10.1056/nejm200011093431901>
28. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and Surrogate endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69(3):89-95. doi:<https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
29. Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, et al. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nature Cell Biology*. 2000;2(9):637-644. doi:<https://doi.org/10.1038/35023588>
30. Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. p120 Catenin. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Published online 2013:409-432. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394311-8.00018-2>
31. Liu L, Zhang C, Li X, et al. miR-223 promotes colon cancer by directly targeting p120 catenin. *Oncotarget*. 2017;8(38):63764-63779. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19541>
32. Reynolds AB, Roczniak-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004;23(48):7947-7956. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208161>
33. Huvelde D, Lewis-Tuffin LJ, Carlson BL, et al. Targeting Src Family Kinases Inhibits Bevacizumab-Induced Glioma Cell Invasion. Lee JW, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56505. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056505>
34. Pagano C, Navarra G, Pastorino O, et al. N6-Isopentenyladenosine Hinders the Vasculogenic Mimicry in Human Glioblastoma Cells through Src-120 Catenin Pathway Modulation and RhoA Activity Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10530-10530. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms221910530>

35. Kreße N, Schröder H, Stein KP, et al. PLOD2 Is a Prognostic Marker in Glioblastoma That Modulates the Immune Microenvironment and Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):6037-6037.
doi:<https://doi.org/10.3390/ijms23116037>
36. Urias Ú, SK M, Uno M, et al. CD99 is upregulated in placenta and astrocytomas with a differential subcellular distribution according to the malignancy stage. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014;119(1):59-70. doi:<https://doi.org/10.1007/s11060-014-1462-x>
37. Ho Jun Seol, Jong Hee Chang, Yamamoto J, et al. Overexpression of CD99 Increases the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells. *Genes & Cancer*. 2012;3(9-10):535-549. doi:<https://doi.org/10.1177/1947601912473603>
38. Cardoso LC, da R, de T, Lerario AM, SKN M, Sueli Mieko Oba-Shinjo. CD99 Expression in Glioblastoma Molecular Subtypes and Role in Migration and Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1137-1137.
doi:<https://doi.org/10.3390/ijms20051137>
39. Shang E, Sun S, Zhang R, et al. Overexpression of CD99 is associated with tumor adaptiveness and indicates the tumor recurrence and therapeutic responses in gliomas. *Translational Oncology*. 2023;37:101759-101759.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101759>
40. Domínguez-Malagón HR, Michal M, Kazakov DV, Caro-Sánchez CH, Lino-Silva LS. Utility of CD99 Paranuclear Expression in the Differential Diagnosis of Merkel Cell Carcinoma. *International Journal of Surgical Pathology*. 2016;24(4):293-296.
doi:<https://doi.org/10.1177/1066896915623361>
41. Vastrad B, Vastrad C, Godavarthi A, Chandrashekar R. Molecular mechanisms underlying gliomas and glioblastoma pathogenesis revealed by bioinformatics analysis of microarray data. *Medical Oncology*. 2017;34(11).
doi:<https://doi.org/10.1007/s12032-017-1043-x>
42. Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, et al. Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Molecular Cancer*. 2006;5(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-39>
43. van den Boom J, Wolter M, Kuick R, et al. Characterization of Gene Expression Profiles Associated with Glioma Progression Using Oligonucleotide-Based Microarray Analysis and Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Pathology*. 2003;163(3):1033-1043.
doi:[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63463-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63463-3)
44. Seung Won Choi, Shin H, Sa JK, et al. Identification of transcriptome signature for

- predicting clinical response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. *Cancer Medicine*. 2018;7(5):1774-1783. doi:<https://doi.org/10.1002/cam4.1439>
45. Cronin JC, Loftus SK, Baxter LL, Swatkoski S, Gucek M, Pavan WJ. Identification and functional analysis of SOX10 phosphorylation sites in melanoma. Chen S, ed. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0190834. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190834>
 46. Serão NV, Delfino K, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Medical Genomics*. 2011;4(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-49>
 47. Bannykh SI, Stolt CC, Kim J, Perry A, Wegner M. Oligodendroglial-specific Transcriptional Factor SOX10 is Ubiquitously Expressed in Human Gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2005;76(2):115-127. doi:<https://doi.org/10.1007/s11060-005-5533-x>
 48. Ferletta M, Lene Uhrbom, Olofsson T, Fredrik Pontén, Bengt Westermark. Sox10 Has a Broad Expression Pattern in Gliomas and Enhances Platelet-Derived Growth Factor-B–Induced Gliomagenesis. *Molecular Cancer Research*. 2007;5(9):891-897. doi:<https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-07-0113>
 49. Nomura M, Mukasa A, Nagae G, et al. Distinct molecular profile of diffuse cerebellar gliomas. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(6):941-956. doi:<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1771-1>
 50. Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics*. 2010;11(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-701>
 51. Sailer MHM, Gerber A, Tostado C, et al. Non-invasive neural stem cells become invasive in vitro by combinatorial FGF2 and BMP4 signaling. *Journal of Cell Science*. Published online January 1, 2013. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.125757>
 52. Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells*. 2021;10(3):621. doi:<https://doi.org/10.3390/cells10030621>
 53. Xiao G, Wang K, Wang Z, et al. Machine learning-based identification of SOX10 as an immune regulator of macrophage in gliomas. *Frontiers in Immunology*. 2022;13. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007461>
 54. Wu Y, Fletcher M, Gu Z, et al. Glioblastoma epigenome profiling identifies SOX10 as a master regulator of molecular tumour subtype. *Nature Communications*. 2020;11(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20225-w>

55. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma. *JAMA*. 2017;318(23):2306.
doi:<https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
56. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(1):92-98.
doi:<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.9844>
57. Thoreson MA, Reynolds AB. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. *Differentiation*. 2002;70(9-10):583-589.
doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700911.x>
58. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered Localization of p120 Catenin During Epithelial to Mesenchymal Transition of Colon Carcinoma Is Prognostic for Aggressive Disease. *Cancer Research*. 2005;65(23):10938-10945.
doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1947>
59. Elia LP, Yamamoto M, Zang K, Reichardt LF. p120 Catenin Regulates Dendritic Spine and Synapse Development through Rho-Family GTPases and Cadherins. *Neuron*. 2006;51(1):43-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.018>
60. Hee Kim C, Nam HS, Hee Lee E, et al. Overexpression of a novel regulator of p120 catenin, NLBP, promotes lung adenocarcinoma proliferation. *Cell Cycle*. 2013;12(15):2443-2453. doi:<https://doi.org/10.4161/cc.25451>
61. Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *Journal of Cell Science*. 2001;114(4):695-707. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.695>
62. Chauvet N, Privat A, Prieto M. Differential expression of p120 catenin in glial cells of the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 2004;479(1):15-29.
doi:<https://doi.org/10.1002/cne.20301>
63. Chauvet N, Prieto M, Fabre C, Noren NK, Privat A. Distribution of p120 catenin during rat brain development. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003;22(4):467-486.
doi:[https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00030-7)
64. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*. 2015;29(12):1203-1217.
doi:<https://doi.org/10.1101/gad.261982.115>
65. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by

- preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. doi:<https://doi.org/10.1038/nature05236>
66. Gritsenko PG, Nader Atlasy, Dieteren CE, et al. p120-catenin-dependent collective brain infiltration by glioma cell networks. *Nature Cell Biology*. 2020;22(1):97-107. doi:<https://doi.org/10.1038/s41556-019-0443-x>
67. Huijbers EJM, Faber LD, Sialino LD, et al. Targeting Tumor Vascular CD99 Inhibits Tumor Growth. *Frontiers in Immunology*. 2019;10. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00651>
68. Manara M, Pasello M, Scotlandi K. CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. *Genes*. 2018;9(3):159. doi:<https://doi.org/10.3390/genes9030159>
69. Makhoul R, Schwartz AM, Williams R, Lee NH. Paranuclear Dot-Like Immunostaining for CD99. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2011;35(11):1749-1750. doi:<https://doi.org/10.1097/pas.0b013e31822bb546>
70. Hahn J, Kim M, Choi E. CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *J Immunol*. Published online September 1, 1997:9278313.
71. Cinzia Zucchini, Mc Manara, Rs Pinca, et al. CD99 suppresses osteosarcoma cell migration through inhibition of ROCK2 activity. *Oncogene*. 2013;33(15):1912-1921. doi:<https://doi.org/10.1038/onc.2013.152>
72. Jung T, Choi Y, Kim Y. Immunological characterization of glioblastoma cells for immunotherapy. *Anticancer Res*. 2013;2525-33(23749904).
73. Kim Y, Tran TAT, Lee H, et al. Branched multipeptide immunotherapy for glioblastoma using human leukocyte antigen-A*0201-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes from ERBB2, BIRC5 and CD99. *Oncotarget*. 2016;7(31):50535-50547. doi:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10495>
74. Fathima Hurmath K, Ramaswamy P, Nandakumar DN. IL-1 β microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *Cell Biology International*. 2014;38(12):1415-1422. doi:<https://doi.org/10.1002/cbin.10353>
75. Bellon G, Caulet T, Cam Y, et al. Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathologica*. 1985;66(3):245-252. doi:<https://doi.org/10.1007/bf00688590>
76. Shakhova O, Zingg D, Schaefer SM, et al. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nature Cell Biology*. 2012;14(8):882-890. doi:<https://doi.org/10.1038/ncb2535>
77. Goda JS, Lewis S, Agarwal A, et al. Impact of oligodendroglial component in

glioblastoma (GBM-O): Is the outcome favourable than glioblastoma? *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2015;135:46-53.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.05.005>

78. Ellingson BM, Harris RJ, Woodworth DC, et al. Baseline pretreatment contrast enhancing tumor volume including central necrosis is a prognostic factor in recurrent glioblastoma: evidence from single and multicenter trials. *Neuro-Oncology*.

2016;19(1):89-98. doi:<https://doi.org/10.1093/neuonc/nov187>

79. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2003;3(4):421-430.

doi:<https://doi.org/10.1586/14737159.3.4.421>

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetische Einteilung der Gliome, modifiziert nach: Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021- The WHO classification of tumors of the central nervous system 2021

Abbildung 2: Scoring-System und Färbeverhalten von p120-Catenin. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“.

Abbildung 3: Scoring-System und Färbeverhalten von CD99. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“. Bei vollständig fehlender Färbung wurde die Probe als „negativ“ gescored.

Abbildung 4: Scoring-System und Färbeverhalten von COL4A2. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Färbeintensität erfolgte die Einsortierung in die Kategorie „schwach“, „mittel“ oder „stark“.

Abbildung 5: Sox10 zeigt ein ausschließlich nukleäres Färbeverhalten, so dass eine Braunfärbung der Zellkerne resultiert. Der prozentuale Anteil der positiven Zellkerne wurde analysiert und gescored.

Abbildung 6: Expression von p120-Catenin in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

Abbildung 7: Kaplan-Meier 60 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger p120-Catenin-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befinden sich oben rechts.

Abbildung 8: Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger p120-Catenin-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 2. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befinden sich oben rechts.

Abbildung 9: 40x Vergrößerung am digitalen Mikroskop: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit intrazellulären Clustern/„dot-like pattern“ (schmale Pfeile). Fehlende membranöse oder homogene Lokalisation. Bei den länglichen bräunlich gefärbten Strukturen mit Lumen handelt es sich um Gefäße (G).

Abbildung 10: Expression von CD99 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

Abbildung 11: Kaplan-Meier 60 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger CD99-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

Abbildung 12: Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger p120-Catenin-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 2. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

Abbildung 13: Expression von COL4A2 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

Abbildung 14: Kaplan-Meier 60 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger COL4A2-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

Abbildung 15: Expression von SOX10 in Abhängigkeit vom WHO-Grad (II-IV) in Hannover Kohorte 1. Die Mediane werden als schwarze horizontale Linien dargestellt. Die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fensterbalken.

Abbildung 16: Kaplan-Meier 60 Monate Überlebenskurve nach hoher und niedriger SOX10-Expression. Die Daten entstammen allesamt der Hannover Kohorte 1. Zur Analyse wurde der Log-rank Test verwendet. Der p-Wert befindet sich oben rechts.

Abbildung 17: Interaktion von p120-Catenin mit dem Catenin-Komplex und den Actin-Filamenten. Modifiziert aus Molecular Biology of the Cell 6e (Garland Science 2015)

Abbildung 18: Schematische Darstellung der CD99 Subtypen in Tumorzellen, modifiziert nach Manara MC, Pasello M, Scotlandi K. CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. Genes (Basel). 2018 Mar 13;9(3):159. doi: 10.3390/genes9030159. PMID: 29534016; PMCID: PMC5867880

8. Danksagung

Mit der Einreichung der Dissertationsschrift möchte ich mich bei allen bedanken, die mich besonders und in vielfältiger Weise begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. C. A. Dumitru bedanken, deren Art der Betreuung ich als vorbildlich empfunden habe.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. med. I. E. Sandalcioglu, Direktor der Klinik für Neurochirurgie, für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren und im Labor der Neurochirurgischen Klinik KRH Nordstadt Hannover arbeiten zu können. Die Arbeit wurde von ihm intensiv mit professionellem und kompetentem Rat begleitet.

Herrn Prof. Dr. med. L. Wilkens danke ich für die fachliche und methodische Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke den Teams der Neurochirurgischen Klinik und der Pathologie des KRH Nordstadt Hannover für die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung. Insbesondere möchte ich mich hier bei Herrn PD Dr. med. B. Neyazi und Herrn Dr. med. S. Orie bedanken.

Für die Erstellung und Bearbeitung der Grafiken möchte ich mich bei L. Jungnitz bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Rolf Schmidt und Sabine Schmidt danke ich für die jahrelange Unterstützung bei meinem Vorhaben. Sie gaben mir sinnvolle Hinweise, motivierten mich ganz besonders und leisten damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit.

9. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Prognostische Relevanz der Expression von p120-Catenin, CD99, COL4A2 und SOX10 auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastomen

in der Universitätsklinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. I. E. Sandalcioglu)

mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. C.A. Dumitru und ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 01.08.2024

David Schmidt

10. Bildungsweg

Persönliche Angaben:

Name: David Schmidt
Geburtstag: 09.05.1992
Geburtsort: Lüneburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und Studium:

07/2012 Abitur, Fachgymnasium Wirtschaft, Berufsbildende Schulen 1, Lüneburg
10/2012 – 05/2019 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
08/2019 Approbation als Arzt

Berufliche Laufbahn:

10/2019 – 10/2021: Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
10/2021 – 04/2022 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Asklepios St. Georg Hamburg
seit 04/2022 – Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Asklepios Barmbek Hamburg

Magdeburg, den 01.08.2024

David Schmidt

11. Anlagen

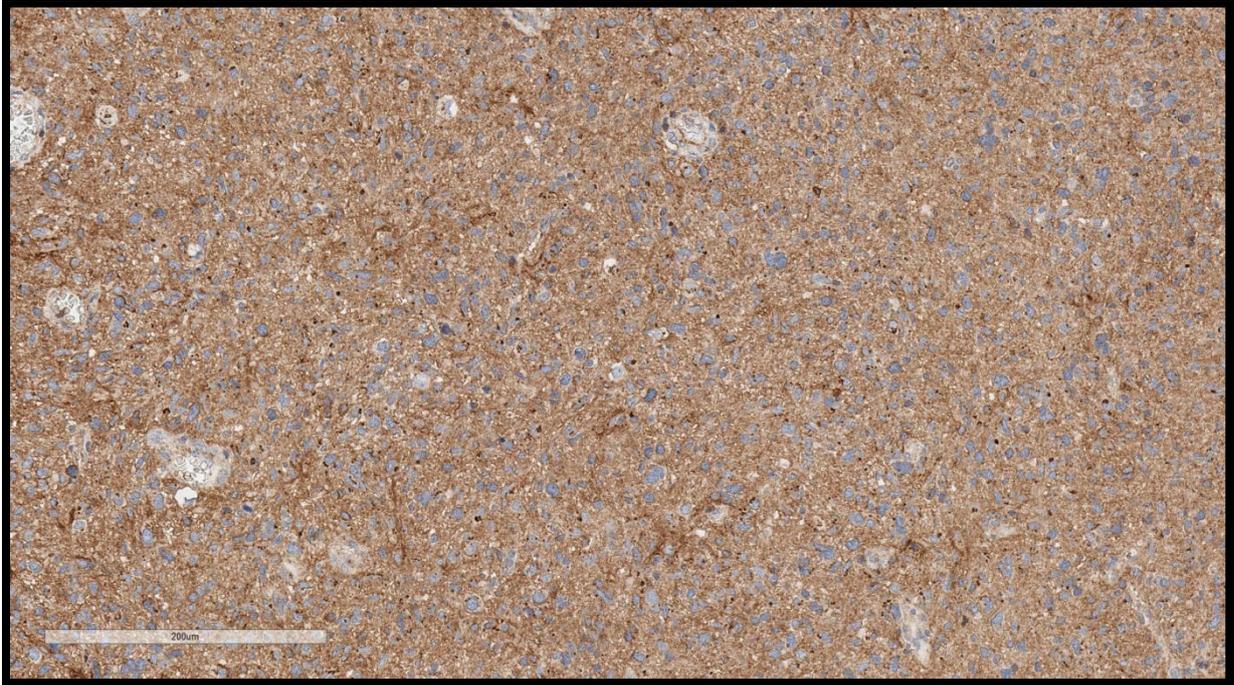
Korrelationen

Spearman-Rho	COL4A2 [H-Score]	CD99 total staining [H-Score]	p120 Catenin [H-Score]	SOX10 nuclear	Tumor volume [cm3]	Oedema volume [cm3] (tumor volume subtracted)	Microvessel density [CD31]
Korrelationskoeffizient	1,000						
Sig. (2-seitig)							
N	114						
Korrelationskoeffizient	-,145	1,000					
Sig. (2-seitig)	,158						
N	97	114					
Korrelationskoeffizient	-,145	,288**	1,000				
Sig. (2-seitig)	,158	,004					
N	97	99	112				
Korrelationskoeffizient	-,006	,288**	1,000				
Sig. (2-seitig)	,950	,004					
N	112	96	113				
Korrelationskoeffizient	,239*	-,170	-,241*	1,000			
Sig. (2-seitig)	,012	,098	,011				
N	111	96	112	114			
Korrelationskoeffizient	,025	-,209	,036	-,261*	1,000		
Sig. (2-seitig)	,816	,074	,739	,013			
N	90	74	89	89	84		
Korrelationskoeffizient	-,098	-,014	,230*	-,188	,529**	1,000	
Sig. (2-seitig)	,386	,910	,039	,092	,000		
N	81	66	81	81	84	84	
Korrelationskoeffizient	-,002	-,051	-,047	-,222*	,065	-,063	1,000
Sig. (2-seitig)	,987	,621	,623	,019	,544	,581	
N	113	98	112	111	89	80	114

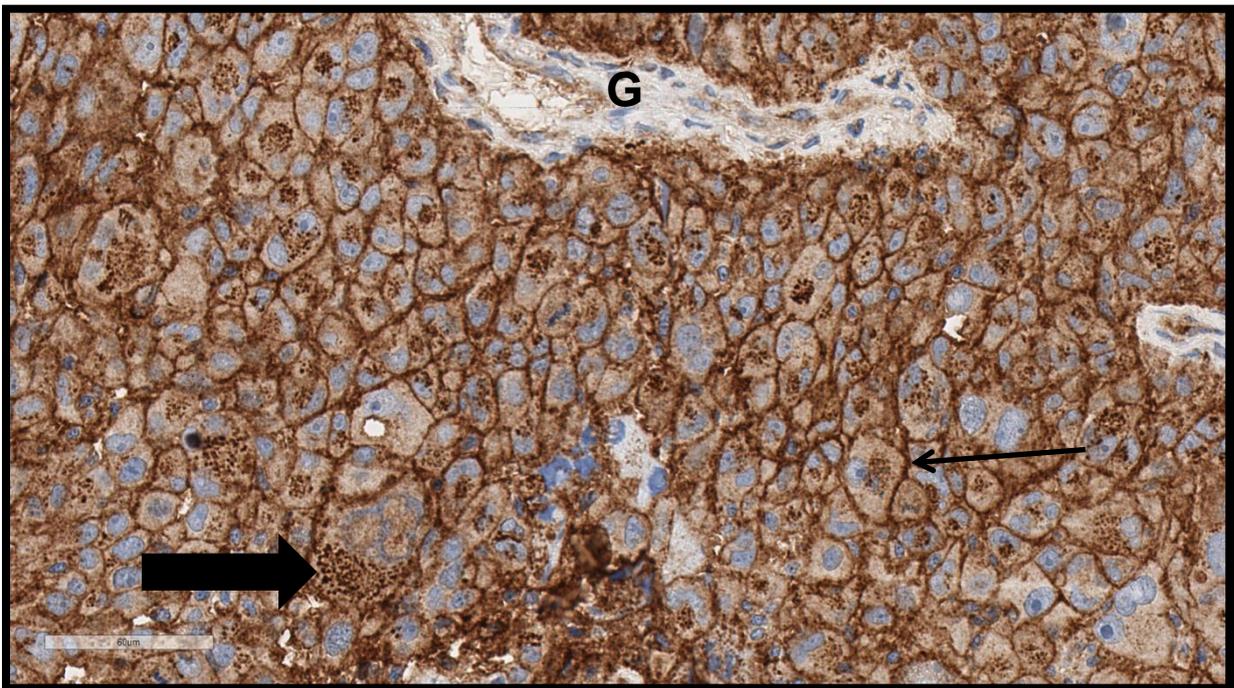
*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**.. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

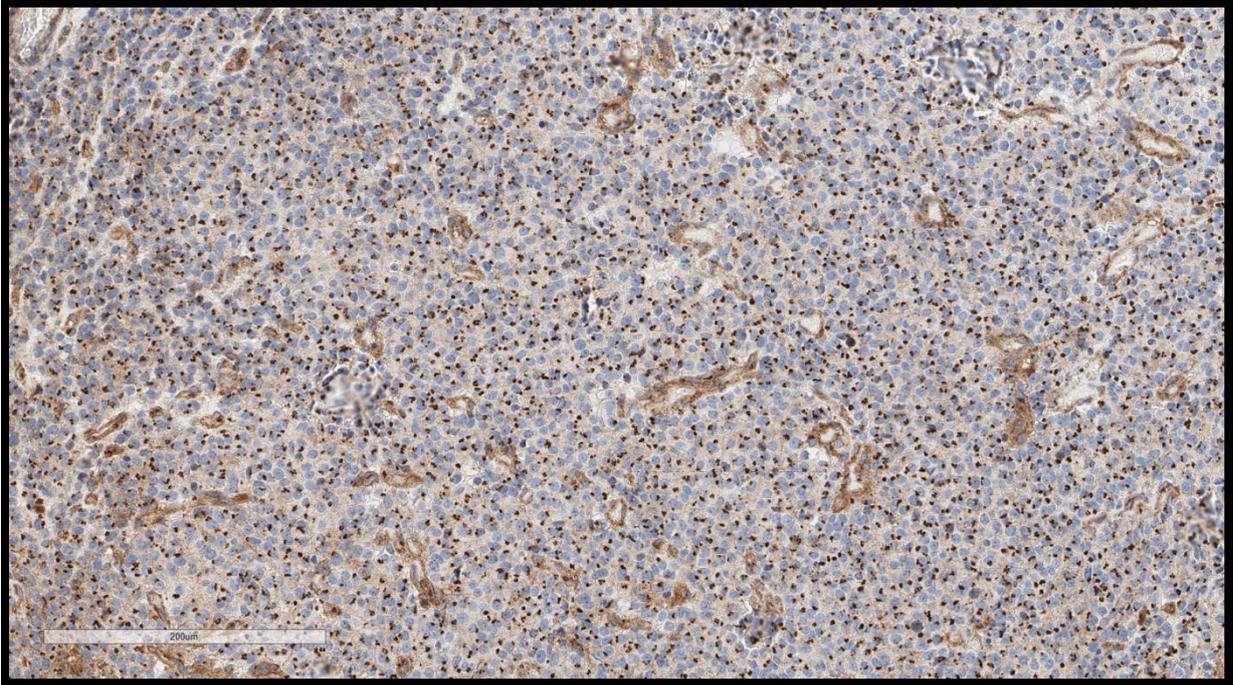
Anlage 1: Korrelationen nach Spearman-Rho der Parameter: COL4A2, CD99, p120-Catenin, SOX10, Tumor volume, Oedema volume, Microvessel density (CD31).



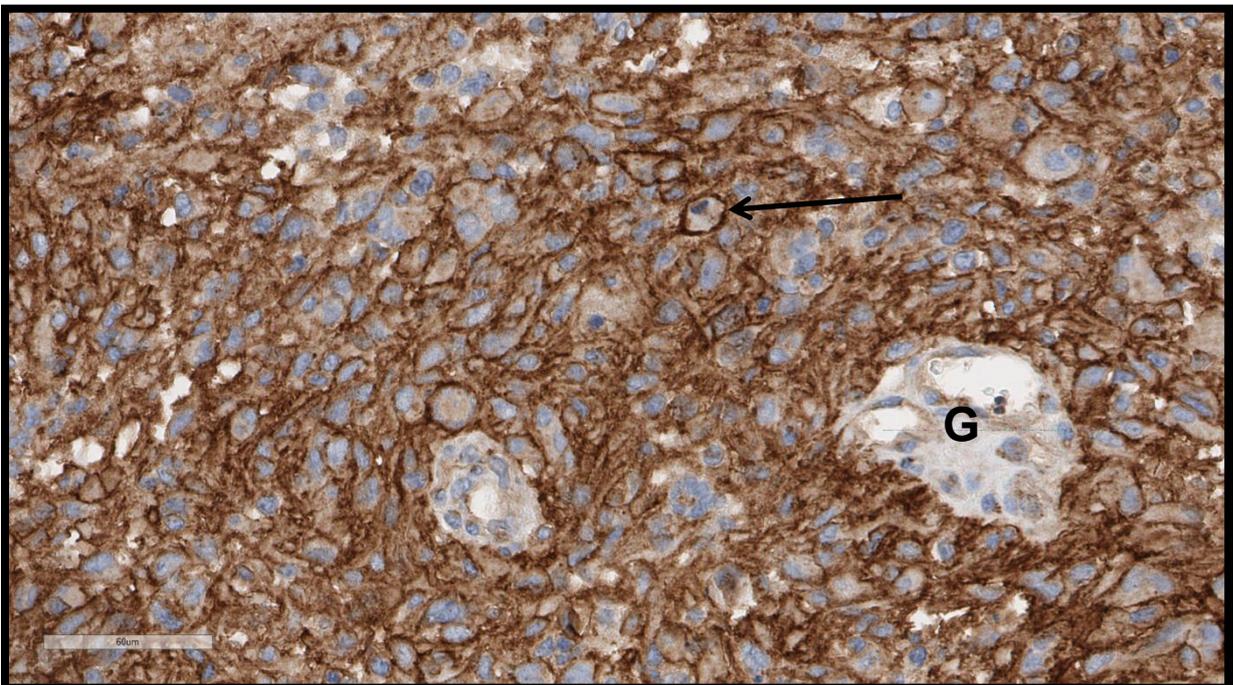
Anlage 2: Übersicht am digitalen Mikroskop: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit homogener und membranöser Verteilung.



Anlage 3: 20x Vergrößerung am digitalen Mikroskop: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit überwiegend membranöser Verteilung (schmaler Pfeil) und einzelnen intrazellulären CD99-Clustern (dicker Pfeil), G: Gefäß.



Anlage 4: Übersicht am digitalen Mikroskop: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit intrazellulären Clustern. Fehlende membranöse oder homogene Lokalisation. Bei den länglichen bräunlich gefärbten Strukturen mit Lumen handelt es sich um Gefäße.



Anlage 5: Höhere Vergrößerung am digitalen Mikroskop: CD99-Expression (braunes Kolorit) mit überwiegend membranöser Verteilung (schmaler Pfeil). G: Gefäß.

