

aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des  
Universitätsklinikums Halle (Saale)  
Direktor : Prof. Dr. med. Dieter Körholz

**Untersuchungen zur Expression von Genen mit Beteiligung am epithelial-  
mesenchymalen Übergang in Glioblastomen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg

von  
Claudia Wohlfarth, geborene Lober  
geboren am 07.06.1983  
in Schwäbisch Hall

Betreuer: Prof. Dr. Christof Kramm  
PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger

Gutachter: Prof. Dr. Christof Kramm  
Prof. Dr. Carl Friedrich Classen  
Prof. Dr. Malte Kornhuber

09.09.2014

12.06.2015

# Referat

Hintergrund: Ziel der Untersuchungen war, die Theorie der epithelial-mesenchymalen Transition anhand von Genanalysen bei Glioblastompatienten zu überprüfen. Es wurde zum einen untersucht, ob eine erhöhte Expression bekannter Schlüsselgene vorliegt, zum anderen, ob ein Zusammenhang zwischen Genexpression und dem Gesamtüberleben besteht.

Methodik: Es handelt sich um eine retrospektive Metaanalyse von 381 Glioblastomdaten aus verschiedenen Forschungszentren verglichen mit 207 Proben aus normalem Hirngewebe und 98 Proben aus niedriggradigen Gliomen. Dabei wurde die Expression bekannter Schlüsselgene der epithelial- mesenchymalen Transition zwischen den Proben von Glioblastompatienten und der Kontrollgruppe verglichen. Über Kaplan-Meier-Analysen wurde ein Zusammenhang zwischen Genexpression und Überlebensprognose überprüft. Dabei wurden auch mehrere Subgruppenanalysen durchgeführt.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Schlüsselgene bei den Glioblastomproben im Vergleich zum normalen Hirngewebe signifikant höher exprimiert ist. Im Vergleich zu den niedriggradigen Gliomen stellt das Gen ZEB1 eine Sonderrolle dar. Dies ist hier signifikant höher als im Glioblastomgewebe exprimiert.

Bezüglich der zweiten Fragestellung der Korrelation der Genexpression zur Überlebensprognose zeigen sich kaum statistisch signifikante Ergebnisse, welche die EMT-Theorie als Grundlage für invasives Wachstum und damit für eine verkürzte Überlebenszeit stützen. Es zeichnen sich lediglich Tendenzen ab. In der Subgruppenanalyse gibt es bei der altersgeschichteten Analyse Hinweise, dass vor allem bei der jüngeren Patientenpopulation die Genexpression einen Einfluss auf das Überleben hat.

Schlussfolgerung: Die Schlüsselgene der epithelial- mesenchymalen Transition sind im Glioblastom zwar signifikant erhöht, für eindeutige signifikante Aussagen zu der prognostischen Bedeutung müssen noch weitere Untersuchungen angestellt werden, um entsprechende zielgerichtete Therapien entwickeln zu können.

Wohlfarth, Claudia: Untersuchungen zur Expression von Genen mit Beteiligung am epithelial-mesenchymalen Übergang in Glioblastomen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss, 79 Seiten, 2014.

# **INHALTSVERZEICHNIS**

I	Abkürzungsverzeichnis	III
	<b>1 Einleitung</b>	
	<b>1.1 Glioblastom</b>	
	1.1.1 Epidemiologie	1
	1.1.2 Ätiologie	2
	1.1.3 Histopathologie	2
	1.1.4 Histologische Einteilung	3
	1.1.5 Klinischer Verlauf	4
	1.1.6 Therapie	5
	1.1.7 Infiltration der Gliomzellen	6
	<b>1.2 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)</b>	
	1.2.1 Zelluläre Charakteristika während der EMT	6
	1.2.2 Physiologische Bedeutung	8
	1.2.3 Schlüsselereignisse der EMT	8
	1.2.4 Induktionssignale und Signalkaskaden der EMT	9
	1.2.5 Schlüsselgene der EMT	11
	1.2.6 Kontroversen der EMT	13
	<b>1.3 Microarray-Analyse</b>	13
	<b>1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	14
	<b>2 Material und Methoden</b>	
	<b>2.1 Materialien</b>	
	2.1.1 Einschluss-/ Ausschlusskriterien	15
	2.1.2 Datengrundlage	15
	<b>2.2 Methoden</b>	
	2.2.1 Datenerfassung	20
	2.2.2 Dokumentation der Daten	22
	2.2.3 Auswertung und statistische Tests	24

<b>3 Ergebnisse</b>	
<b>3.1 Charakterisierung der klinischen Daten</b>	27
<b>3.2 Expression</b>	
3.2.1 Glioblastom versus Normalgewebe	27
3.2.2 Glioblastom versus niedriggradigere Gliomen	30
<b>3.3 Kaplan Meier</b>	
3.3.1 Einteilung nach Perzentilen	32
3.3.2 Einteilung nach Median	41
3.3.3 Subgruppenanalyse	45
<b>4 Diskussion</b>	52
<b>5 Zusammenfassung</b>	62
<b>6 Ausblick</b>	64
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	65
<b>8 Anhang</b>	74
<b>9 Thesen</b>	79
<b>10 Anlagen</b>	
10.1 Tabellarischer Lebenslauf	
10.2 Selbständigkeitserklärung	
10.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche	
10.4 Danksagung	

## I. Abkürzungsverzeichnis

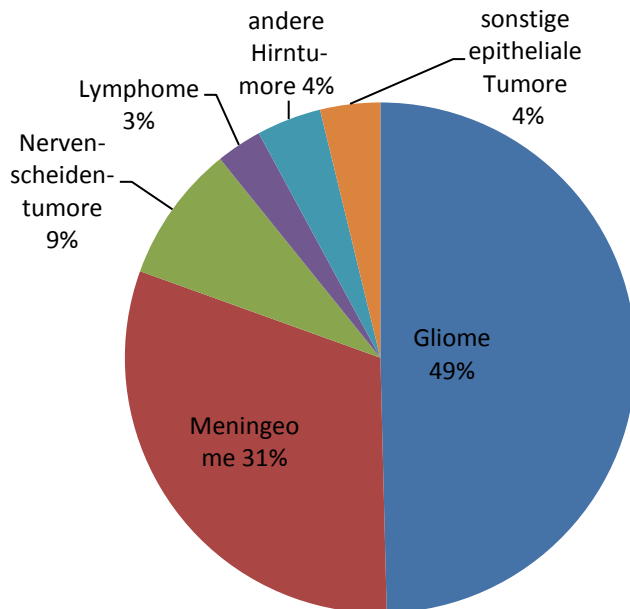
%	Prozent
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECM	extra cellular matrix (extrazelluläre Matrix)
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
et al.	et alii (und andere)
GBM	Glioblastoma Multiforme
GPL	GEO platform
GEO	Gene Expression Omnibus
GSE	GEO series
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
MGMT	O(6)-Methylguanin-DNA-Mmethyltransferase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
miRNA	micro Ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NG	Normalgewebe
PGE2	Prostaglandin E2
PMI	post mortem interval
RT-PCR	real time Polymerase Chain Reaction
SPSS	statistical package for social studies
TMZ	Temozolomide
UCLA	University of California, Los Angeles
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom

### 1.1.1 Epidemiologie

Primäre Hirntumore, d.h. hirneigene Tumore, machen mit einer Inzidenz von 7 pro 100 000 Einwohner pro Jahr weniger als 2% aller malignen Neoplasien aus (Furnari et al., 2007). Bei Kindern sind Hirntumorerkrankungen absolut gesehen mit 2-4 Erkrankungen pro 100 000 Kinder deutlich seltener (Mehta et al., 2002; Keene et al., 1999). Sie stellen hier aber nach der Leukämie die zweithäufigste Malignomentität und häufigste Todesursache beim Malignom dar (Kleihues et al., 2002).



**Abb.1. Häufigkeitsverteilung der Primären Tumore des ZNS,** (Angaben aus Bauchet et al., 2007)

zu den Gliomen gehören (Anteil der gesamten ZNS-Tumore)	
<u>Astrozytische Tumore:</u>	
- pilozytische Astrozytome, WHO I	(30%)
- pilomyxoide Astrozytome, WHO II	(12%)
- diffuse Astrozytome, WHO II	(12%)
- pleomorphes Xanthoastrozytom WHO II	(<1%)
-anaplastische Astrozytome, WHO III	(<2%)
- Glioblastom, WHO IV	(3%)
<u>Oligodendrogliale Tumore:</u>	
- Oligodendrogliome, WHO II	(<1%)
- anaplast. Oligodendrogliome, WHO III	(<1%)

**Abb.2 Einteilung der Gliome,** modifiziert nach Frühwald et al., 2011.

Die Gliome, wozu auch das Glioblastoma multiforme, im Folgenden kurz "Glioblastom" genannt, gehört, stellen mit einem Anteil von etwa 50% die größte Gruppe der primären Hirntumore dar (Bauchet et al., 2007; Elia-Pasquet et al., 2004; Dresemann, 2010). Das Glioblastom stellt eine der aggressivsten Tumorerkrankung des Menschen dar. Deshalb wird das Glioblastom nach der WHO (world health organisation) unter dem höchsten Malignitätsgrad, dem Grad IV, eingestuft (Louis et al., 2007). Es tritt mit einer Inzidenz von 4-5 Fällen pro 100 000 Einwohner pro Jahr in industrialisierten Ländern wie Europa, den USA und Australien auf (Dresemann, 2010). Das Erkrankungsalter liegt meist über dem 50. Lebensjahr. Männer sind dabei fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Hacke et al., 2010). Bei Kindern ist das Glioblastom allerdings deutlich seltener. In Deutschland werden pro Jahr etwa 20-30 Neuerkrankungen gemeldet. Hier liegt das Erkrankungsalter bei ca. 10 Jahren (Kramm et al., 2008; Wolff et al., 2008).

#### 1.1.2 Ätiologie

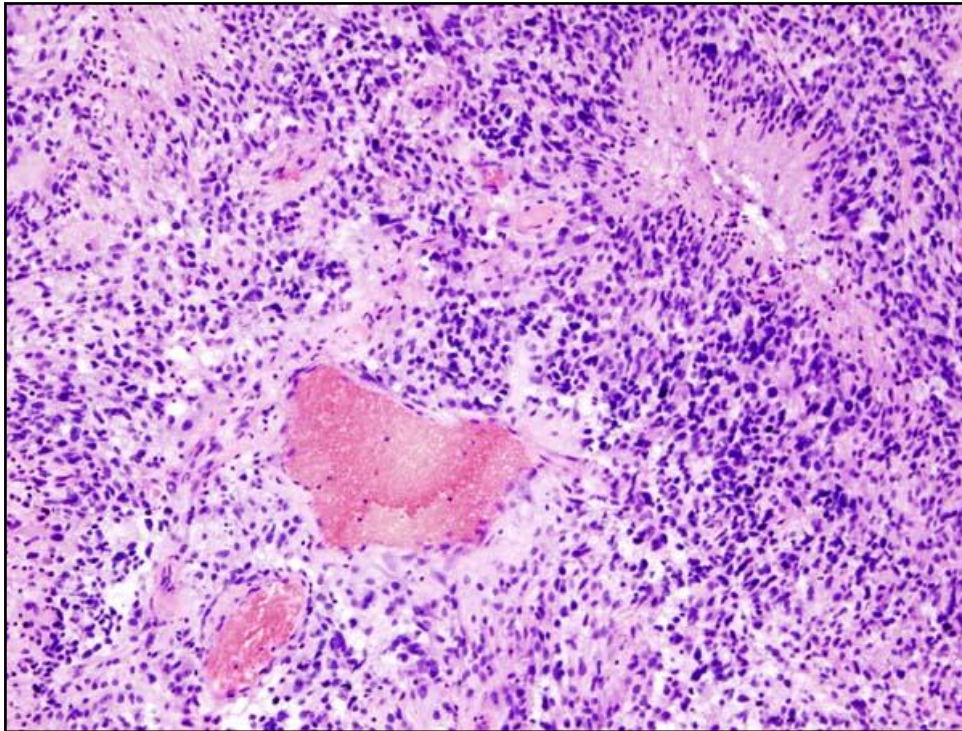
Nur 1-5% der Gliome haben eine bekannte hereditäre Ursache (Schneider et al., 2010), so zum Beispiel im Rahmen des Turcot-Syndroms, des Li-Fraumeni Syndroms oder der Neurofibromatose Typ 1 (Iza et al., 2006). Die große Mehrheit tritt jedoch sporadisch auf und ihre Ätiologie ist in den meisten Fällen unbekannt. Der einzige allgemein akzeptierte Risikofaktor für die Entwicklung eines Glioblastoms ist die Einwirkung von ionisierender Strahlung auf Gehirn bzw. Rückenmark. (Schneider et al., 2010)

#### 1.1.3 Histopathologie

Das Glioblastom ist ein glialer Tumor, zumeist astrozytären Ursprungs. Histologisch handelt es sich um zellreiche, meist polymorphe Tumore mit sehr hoher Mitoserate. Für die Diagnose entscheidend ist das Vorkommen flächenhafter oder strichförmiger Nekrosen, um die sich die Tumorzellkerne palisadenartig anordnen. Oft besteht eine ausgeprägte Gefäßproliferation, insbesondere in der Infiltrationszone des Tumors (Böcker, 2004). Die Zusatzbezeichnung "multiforme" bezieht sich auf das durch Einblutungen und Nekrosen gekennzeichnete "bunte" Bild der Tumorschnittfläche (Schirmer et al., 2008). Umgeben wird der Tumor gewöhnlich von einem ausgeprägten Ödem (Schneider et al., 2010).

Charakteristisch für das Glioblastom ist weiterhin auch die ausgeprägte Neigung zum diffus-infiltrativen Wachstum. Besonders rasch breitet es sich entlang kompakter Myelinbahnen aus. Charakteristisch im weiteren Verlauf der Erkrankung ist eine Ausdehnung über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre. (Böcker et al., 2004)

Oft sind überwiegend die Großhirnhemisphären betroffen. Glioblastome sind meist supratentoriell, hier oft subcortikal lokalisiert. Weitere Lokalisationen umfassen auch den Fornix, den Thalamus, selten auch den mittleren Hirnstamm. (Hacke et al., 2010). 5-10% der GBM haben sich bei Diagnosestellung bereits multifokal manifestiert (Wiestler, 1998).



**Abb.3. Histologisches Präparat eines Glioblastoms** von Wikipedia mit typischen strichförmigen Nekrosen und palisadenartiger Anordnung pleomorpher Tumorzellen um die Nekrosen <sup>1</sup>

#### 1.1.4 Histologische Einteilung

Astrozytome werden nach der WHO-Klassifikation in Grad I bis Grad IV eingeteilt. Grad I beschreibt Tumore mit einer benignen histologischen Dignität, wie z.B. das pilozytische Astrozytom.

Neoplasien des Grades II sind zwar auch noch histologisch als benigne eingestuft, mit relativ geringer Proliferationsrate, zeichnen sich aber schon im Vergleich zu den Grad I-Tumoren durch ein deutlich infiltrativeres Wachstum mit relativ hoher Rezidivrate aus. Zu dieser Gruppe gehört das diffus infiltrierende Astrozytom. Manche WHO-Grad II-Tumore tendieren zur sogenannten malignen Transformation, d.h. dem Übergang in einen höhergradigen, dann malignen Tumor. (Louis et al., 2007)

---

<sup>1</sup> [http://de.wikipedia.org/wiki/Glioblastom#mediaviewer/Datei:Glioblastoma\\_\(3\).jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Glioblastom#mediaviewer/Datei:Glioblastoma_(3).jpg) (23.07.2014)



WHO-Grad III wird für gliale Tumore mit histologischen Malignitätskriterien, wie nukleärer Atypie und starker mitotischer Aktivität verwendet. Nekrosen werden dagegen noch nicht nachgewiesen. Der häufigste Vertreter ist das anaplastische Astrozytom.

Der typische gliale WHO Grad IV-Tumor ist das bereits oben beschriebene Glioblastom. Beim Glioblastom unterscheidet man *de novo*-Tumore, die primär als Glioblastome entstehen, und sekundäre Glioblastome, die aus einem niedriggradigeren glialen Tumor durch maligne Transformation entstanden sind. (Furnari et al., 2007)

Sekundäre Glioblastome machen nur ca. 5% aller Glioblastome aus und unterscheiden sich in klinischen Parametern und im molekulargenetischen Profil von *de novo* Glioblastomen (Ohgaki and Kleihues, 2005).

#### 1.1.5 Klinischer Verlauf

Charakteristische Erstsymptome sind Hirndruckzeichen mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen bei ca. 60% der Patienten. 20-25% der Glioblastompatienten werden durch epileptische Anfälle symptomatisch, vor allem bei Befall der Großhirnhemisphären. Insgesamt erleiden mindestens ein Drittel der Patienten im Krankheitsverlauf einen epileptischen Anfall. Wesensveränderungen und Verhaltensstörungen können ebenso auftreten. Im Kindesalter ist dies sogar oft das einzige Frühsymptom. Als Folge von Hirndruck, lokalem Ödem und tumorbedingter Gewebedestruktion, treten je nach Tumorlokalisation fokale neurologische Defizite, wie zum Beispiel Paresen, Visusverlust, sensible Ausfälle oder eine Aphasie auf. Nicht selten ist eine insultartige Verschlechterung "apoplektisches Gliom" zu beobachten, was mit einer akuten Blutung des Tumor zusammenhängen kann. (Hacke et al., 2010; Schneider et al., 2010)

Während die 10-Jahres Überlebensrate für pilozytische Astrozytome bei ca. 96% liegt, ist die Prognose von diffus infiltrierenden Gliomen schlechter. Das mediane Überleben liegt bei Astrozytomen vom WHO Grad II bei ca. 5,6 und bei anaplastischen Astrozytomen bei etwa 1,6 Jahren. (Ohgaki und Kleihues, 2005)

Die Prognose von Glioblastomen hängt stark von der Möglichkeit einer effektiven Behandlung ab. Die Mehrheit der Glioblastompatienten, insbesondere der älteren, erliegen ihrer Erkrankung aber meist innerhalb eines Jahres (Louis et al., 2007).

### 1.1.6 Therapie

Angeichts der schlechten Prognose ist bei der Behandlung des Glioblastoms ein multidisziplinäres Team erforderlich (Stupp et al., 2005).

Der erste Behandlungsschritt nach Entdeckung des Tumors ist die neurochirurgische Resektion, welche so vollständig wie möglich durchgeführt werden soll, da das Überleben direkt mit der kompletten makroskopischen Tumorentfernung korreliert (Kramm et al., 2008; Sanai et al., 2008 ).

Allerdings kann das Glioblastom in der Regel nicht durch eine alleinige komplette Tumorsektion geheilt werden, da einzelne Glioblastomzellen zum Zeitpunkt der Tumoroperation schon infiltrativ in das umgebende gesunde Hirngewebe ausgewandert sind und damit von der Tumoroperation nicht erfasst werden. Diese Tumorzellen befinden sich in der Regel zunächst in einem proliferativ inaktiven Zustand und entziehen sich damit meistens auch dem zytotoxischen Effekt der Radiotherapie, die sich unmittelbar an die Tumoroperation anschließt. Nach wenigen Monaten fangen die Glioblastomzellen aber wieder an zu proliferieren und bedingen dann das therapeutisch meist nicht mehr beherrschbare Lokalrezidiv. (Jellinger, 1978)

So ergibt sich das sehr schlechte mittlere Gesamtüberleben von 12 Monaten mit Operation und Bestrahlung bei Glioblastompatienten (Dresemann, 2010). Erst durch die Einführung des oralen Chemotherapeutikums Temozolomid, einem Alkylans, konnte erstmalig bei erwachsenen Glioblastompatienten eine Verbesserung dieser ungünstigen Gesamtprognose durch Chemotherapie in Kombination mit Tumoroperation und Bestrahlung erzielt werden (Stupp et al., 2005). Die Prognose, insbesondere des progressionsfreien Überlebens hat sich durch Temozolomid jedoch vor allem in bestimmten Tumorsubgruppen, bei denen das DNA-Reparaturenzym MGMT, meist nachgewiesen durch den Surrogatparameter eines methylierten MGMT-Promotors, weniger aktiv ist, deutlich verbessert. Ein Verdienst des Temozolomids ist vor allem, dass das Auftreten von sogenannten Langzeitüberlebenden, die auch 5 Jahre nach Diagnosestellung eines Glioblastoms noch am Leben sind, mittlerweile nicht mehr auf eine mögliche initiale Fehldiagnose, sondern auf die Behandlung zurück geführt wird. (Stupp et al., 2009)

Da aber das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten immer noch sehr schlecht ist, versucht man neue Therapiekonzepte, die auf molekularbiologische Eigenschaften der Glioblastomzellen ausgerichtet sind, in die Standardbehandlung zu integrieren. Diese sogenannten "targeted therapies" richten ihre Angriffspunkte aus auf die Hemmung der Tumorgefäßneubildung ("Anti-Angiogenese"), die Hemmung von Signaltransduktionskaskaden, die an der Tumorgenese, dem Tumorwachstum und der Tumorausbreitung und

Tumormetastasierung beteiligt sind (Beal et al., 2011; CBTRUS, 2010), und auch auf die Aktivierung von Immunantworten gegen Glioblastomzellen (Heimberger et al., 2011). Obwohl schon viele "targeted therapies" an Glioblastompatienten getestet wurden, steht dem großen Hoffnungsvorschub bisher noch kein eindeutiger klinischer Durchbruch solcher innovativer Therapiekonzepte gegenüber. Die erfolgreiche Kombination mehrerer solcher Therapiekonzepte, zusammen mit konventionellen Therapien und vielleicht auch einer Immuntherapie bedarf wahrscheinlich immer noch vieler Jahre klinischer Forschung, bevor man von einem echten therapeutischen Durchbruch sprechen kann.

#### 1.1.7 Infiltration der Gliomzellen

Infiltratives Wachstum der Gliomzellen wird durch Zellinvasion, Zellmotilität und Interaktion mit Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren ermöglicht. Bei Tumoren außerhalb des ZNS, vor allem Karzinomen, bestehen hierzu weitreichende Erklärungskonzepte. Am bekanntesten ist das Konzept der sogenannten Epithelial-Mesenchymalen Transition, die im Folgenden erklärt werden soll und deren mögliche Bedeutung bei Gliomen der thematische Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

### **1.2 EMT (Epithelial-Mesenchymale Transition)**

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) kennzeichnet bei Karzinomen den Übergang eines lokalisierten, nicht invasiven Tumors in einen infiltrierend wachsenden und schließlich metastasierenden Tumor. Bei der EMT handelt es sich um mehrere intra- und extrazelluläre Ereignisse, während welcher epitheloide Karzinomzellen viele ihrer epithelialen Eigenschaften verlieren und Charakteristika mesenchymaler Zellen erlangen. Die EMT in Karzinomen werden durch verschiedene Schlüsselgene initiiert und sind durch Signalkaskaden gekennzeichnet, die teilweise auch im Glioblastom beschrieben wurden. (Thiery und Sleeman, 2006)

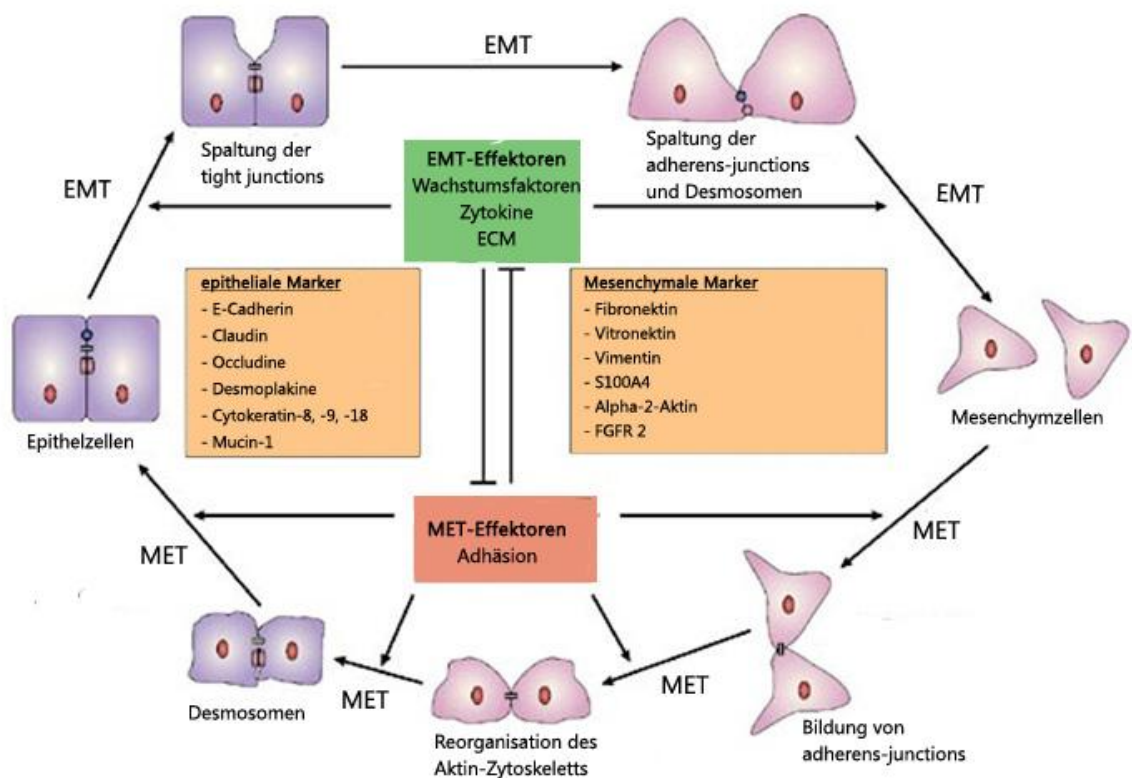
#### 1.2.1 Zelluläre Charakteristika während der EMT

Epitheliale und mesenchymale Zellen unterscheiden sich in mehreren funktionellen und phänotypischen Eigenschaften. Epithelzellen sind durch spezielle Membranstrukturen, wie sogenannten "Tight junctions", Desmosomen und sogenannten "Gap junctions" miteinander verbunden. Desweiteren haben Epithelzellen eine apikal-basolaterale Polarität, was sich durch die polarisierte Organisation des Aktin-Zytoskeletts und das Vorhandensein einer Basallamina auszeichnet. (Schock et al., 2002)

Epithelzellen sind beweglich und können sich von ihrem nächsten Umfeld lösen, verlassen normalerweise jedoch nicht den Zellverband (Thiery und Sleeman, 2006).

Dem gegenübergestellt bilden die Mesenchymzellen weder einen organisierten Zellverband, noch existiert eine apikal-basolaterale Organisation. Ihre Form ist spindelförmig, fibroblastenähnlich. Mesenchymale Zellen in Kulturen sind sehr beweglich, was *in vivo* nicht unbedingt der Fall sein muss. (Thompson et al., 2005)

Es existieren außerdem deutliche Unterschiede auf molekularer Ebene. Epitheliale Zellen weisen typischerweise mehr E-Cadherin, Claudin, Okkludin, Desmoplakin, Mucin-1 und Zytokeratin-8, -9, -18 auf. Mesenchymale Marker dagegen sind Vimentin, Fibronektin, Vitronektin, S100A4 (S100 calcium binding protein A4), Alpha-2-Aktin, FGFR2 (fibroblast-growth-factor-receptor-2). (Thiery und Sleeman, 2006)



**Abb. 4: Epithelial-mesenchymale Transition** (modifiziert nach Thiery und Sleeman, 2006). In der Abbildung werden die einzelnen Schritte der Umwandlung von Epithelzellen in Mesenchymzellen und die dazu gehörigen epithelialen Marker dargestellt. Gleichzeitig wird hier gezeigt, dass der Prozess in Form der MET (Mesenchymal-Epitheliale Transition) auch wieder umkehrbar ist.

### 1.2.2 physiologische Bedeutung

Die EMT ist ein Phänomen, das in verschiedenen Stadien des Lebens physiologischerweise auftritt, insbesondere während der Embryonalentwicklung (Hugo et al., 2011). Beobachtet wurde dieser Vorgang beispielsweise bei der Entstehung des Mesoderms, der Entwicklung der Neuralleiste, der Herzklappen und auch bei der Regression des Müller-Gangs beim männlichen Embryo. Die Entstehung des Mesoderms und der Neuralleiste finden zu einem sehr frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung statt. Die beteiligten Zellen sind noch oligopotent und ermöglichen eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen. Dagegen entstehen Herzklappen aus relativ gut differenziertem Epithelgewebe. Diese Tatsache impliziert, dass dieser Vorgang unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen auch im Gewebe Erwachsener vorkommen kann. (Yang und Weinberg, 2008)

So wurden EMT-ähnliche Vorgänge beispielsweise bei der Entwicklung der Brustdrüse beobachtet. Im pathologischen Kontext findet EMT nicht nur bei der Wundheilung und Fibrosierungsvorgängen verschiedener Organsysteme, sondern vor allem im Rahmen der Tumorinvasion und bei Metastasierungsprozessen statt. (Hollier et al., 2009)

Auf letzteres ist der Fokus dieser Arbeit gerichtet.

### 1.2.3 Schlüsselereignisse der EMT

Entscheidende funktionelle Änderungen, die embryonale Zellen genauso wie Tumorzellen während der EMT durchlaufen, sind zum einen die Lösung von Nachbarzellen, zum anderen die Migration in angrenzendes Gewebe (Guarino, 2007). Als der molekulare Meilenstein der EMT wird die Reduktion von Zell-Zelladhäsion durch eine transkriptionelle Repression der Cadherine angesehen (De Wever, 2008). Bei Cadherinen handelt es sich um Calciumionen-abhängige transmembrane Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine. Sie gehören zu einer Superfamilie, von der allein beim Menschen mehr als 80 Mitglieder bekannt sind. E-Cadherin, ein typischer Marker für Epithelzellen, stellt dabei einen der Hauptkomponenten der Adherens junctions dar und ist in Cadherin-Catenin-Komplexen organisiert (Peinado et al., 2007). N-Cadherin kann bei Überexpression mit einem erhöhten Potential für invasives Wachstum assoziiert sein. Dies deckt sich mit der Umwandlung von E-Cadherin zu N-Cadherin, die in manchen Tumoren gezeigt werden konnte. Die verstärkte Invasivität und Metastasierung kann durch Destabilisierung der Zell-Zellkontakte durch N-Cadherin erklärt werden. (Peinado, 2004)

Durch Suppression der Cadherine lösen sich nicht nur die zellulären Kontakte, auch die Morphologie der Zellen verändert sich. Die Epithelzellen verlieren ihre Polarität, lösen sich aus

dem Zellverband und werden zu fibroblastenförmigen, mesenchymalen Zellen. Außerdem bilden sie Zellfortsätze, sogenannte Pseudo- und Filopodien, die eine Migration in umgebendes Gewebe erleichtern sollen. (Yang und Weinberg, 2008)

Weitere molekulare Veränderungen sind die Hochregulierung von Matrix-abbauenden Proteasen und mesenchymalen Proteinen, wie Vimentin und N-Cadherin (Guarino, 2007). Insgesamt wird im Rahmen der EMT die Expression epithelialer Marker reduziert, während die Expression mesenchymaler Marker zunimmt. Dieser Wandel steht im Zentrum der Epithelial-Mesenchymalen Transition. (Yang und Weinberg, 2008)

#### 1.2.4 Induktionssignale und Signalkaskaden der EMT

Die EMT kann durch verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst werden. Einige Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel EGF (epidermal growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor), aber auch andere Moleküle, wie  $TNF\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha),  $TGF\beta$  (Transforming growth factor beta), oder der Wingless (Wnt)- und Hedgehog-Signalweg sind in der Lage, die EMT zu induzieren. (Christiansen und Rajasekaran, 2006; Hollier et al., 2009)

Wachstumsfaktoren wirken über Tyrosinkinase-Rezeptoren (Christiansen und Rajasekaran, 2006) und verstärken über eine Aktivierung des Enzyms PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) und die GTPase RAS, die ihrerseits wieder die MAPK (Mitogen-activated protein kinases) aktivieren, schließlich die SNAI1- und SNAI2-Expression (Peinado et al., 2003).

$TGF\beta$  ist einer der am besten untersuchten EMT-Induktoren (Wyatt und Khew-Goodall, 2008), es agiert durch Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, wodurch das Signalmolekül Smad (small mothers against decapentaplegic) phosphoryliert wird, welches wiederum SNAI1 (snail family zinc finger 1), ZEB1 (Zinc finger e-box-binding homebox 1) und ZEB2 (Zinc finger E-box-binding homebox 2) induziert (Guarino, 2007; Miyazono, 2009).

Desweiteren kann  $TGF\beta$  durch ILK (Integrin-linked Kinase), MAPK und PI3K Signalwege agieren. ILK ist ein Signalprotein, welches sowohl von Integrinen als auch Wachstumsfaktorrezeptoren stimuliert wird. Aktiviertes ILK kann direkt Akt, auch als Protein Kinase B bezeichnet, und GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) phosphorylieren, was eine Hemmung der GSK-3 $\beta$  Aktivität zur Folge hat. Dies stimuliert den Wnt- $\beta$ Catenin Signalweg und reguliert SNAI1 hoch. (Guarino, 2007)

Jedoch auch andere Signale, wie Hypoxie, PGE2 (Prostaglandin E2) oder auch die Exposition stroma-typischen Kollagens, können als Induktoren fungieren (Guarino, 1995; Peinado et al. 2007). Diese hypoxische Antwort wird beispielsweise durch HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1

alpha) reguliert. Über die Notch-Signalkette wird es in ein Snail-abhängiges EMT-Programm konvertiert. (Sahlgren et al., 2008)

Hypoxie bzw. Überexpression von HIF-1 $\alpha$  kann EMT auch über direkte Bindung von HIF-1 $\alpha$  an den TWIST (Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1)-Promoter induzieren (Yang und Weinberg, 2008).

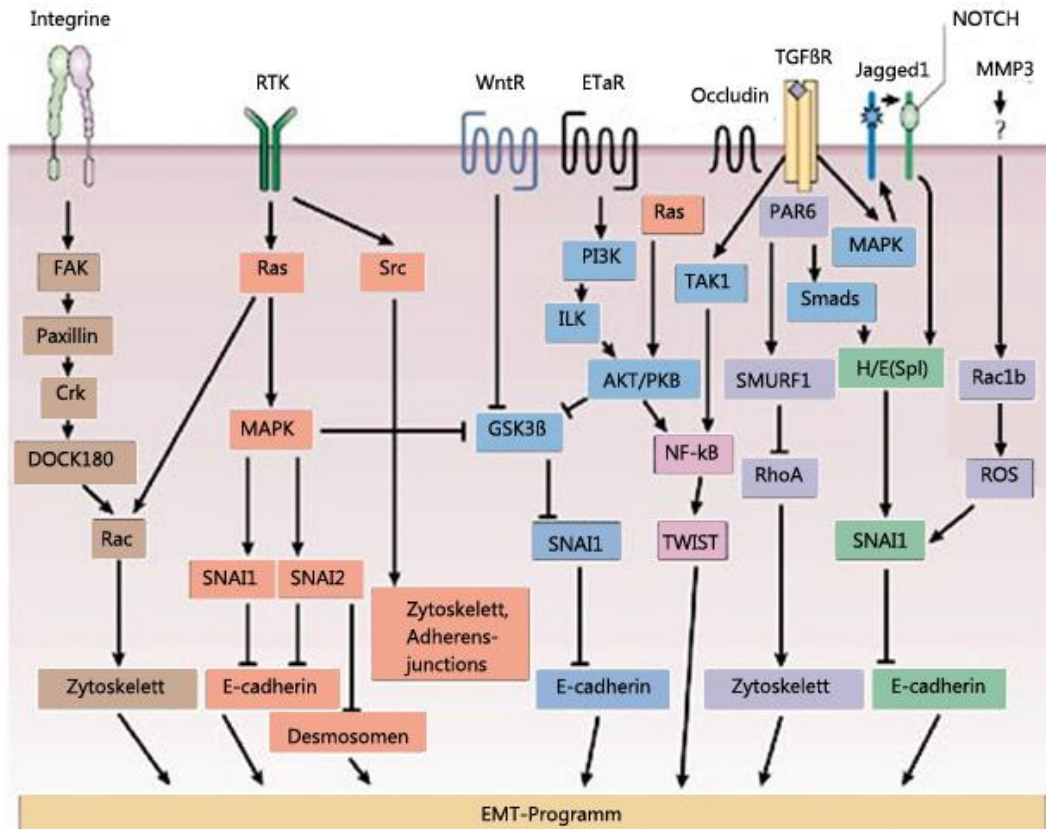
Bei vielen der oben genannten Moleküle handelt es sich um direkte oder indirekte Repressoren von E-Cadherin.

Direkte Repressoren sind Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), ZEB1, ZEB2 und KLF8 (Krüppel-like factor 8).

Indirekte E-Cadherinrepressoren, welche wiederum die direkten Repressoren aktivieren, sind beispielsweise FOXC2 (Forkhead Box C2), TCF3 (Transcription factor 3), TCF4 (Transcription factor 4), NF $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) und Goosecoid. (Hugo et al., 2011)

Die Zugehörigkeit von TWIST wird kontrovers diskutiert, dieser Faktor gehört möglicherweise zu beiden Gruppen (Peinado et al., 2007; Vesuna et al., 2008).

Nicht nur auf prätranskriptionellem, auch auf posttranskriptionellem Weg kann die EMT gefördert werden. Sogenannte Mikro-RNAs, miR-141, 200b, 205, hemmen die Expression von ZEB1 und ZEB2. Eine selektive Herunterregulierung dieser miRNAs kann die E-Cadherin-Expression hemmen. (Park et al., 2008; Gregory et al., 2008)



**Abb. 5: Zusammenfassung der bisher bekannten Signalwege, die zur Initialisierung der EMT führen** (modifiziert nach Thiery und Sleeman, 2006)

FAK (focal adhesion kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinase), RhoA (ras-homolog family member A), ROS (reactive oxygen species), PAR 6 (partitioning-defective Protein 6), EtAR (Endothelin-A-Rezeptor), ILK (Integrin-linked kinase) RTK (Rezeptor-Tyrosinkinase), WntR (Wnt-Rezeptor), TGFBR (Transforming growth factor beta – Rezeptor), MMP3 (Matrix-metalloproteinase 3), GSK3β (Glykogen-Synthase Kinase-3β) PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase), TAK1 (TGFβ-activated kinase-1), AKT (auch PKB (Protein Kinase-B) genannt), H/E (Spl) (= hairy/enhancer of split), DOCK180 (Dedicator of Cytokinesis), SMAD (small mothers against decapentaplegic).

### 1.2.5 Schlüsselgene der EMT

Zu einigen EMT-Schlüsselgenen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sollen nun ein paar Ausführungen zu bisher bekannten Funktionen folgen.

Ein Schlüsselmolekül, welches das Zusammenspiel verschiedener Repressoren während der EMT fördert, ist TGFβ, indem es die Expression von SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2 und TWIST fördert (Peinado et al., 2007).

Snail und ZEB stellen Transkriptionsrepressoren dar (Yang und Weinberg, 2008). Snail bindet direkt an den E-Cadherin-Promoter und hemmt damit die Transkription dieses Gens (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). SNAI1 kann außerdem HDACs (=Histondeacetylasen) zum

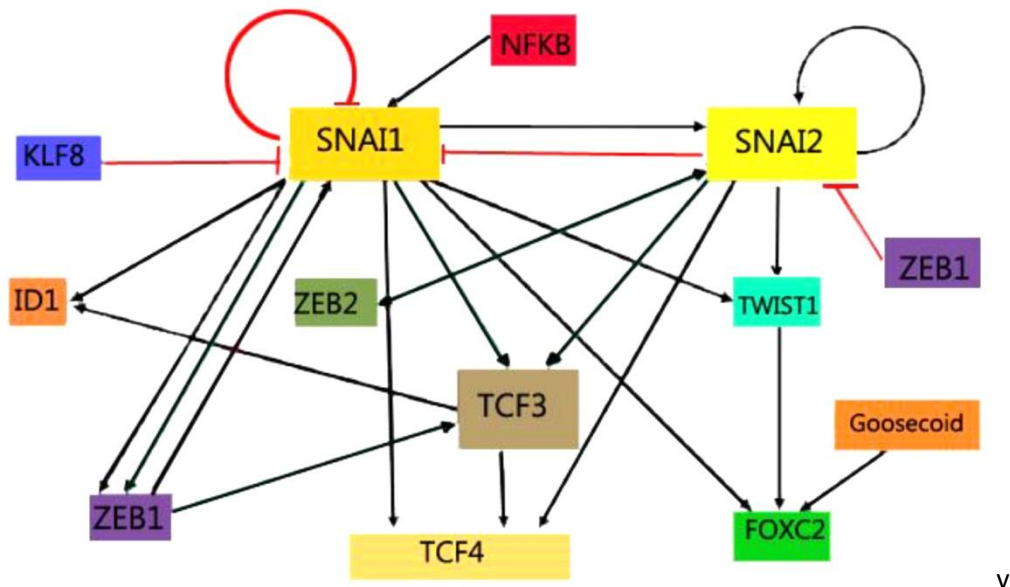


E-Cadherin-Promoter rekrutieren, um die E-Cadherin-Transkription zu hemmen (Hemavathy et al., 2000).

Die mesenchymalen Gene Vimentin und Fibronektin werden, wie auch ZEB1, durch SNAI1 hoch reguliert (Hugo et al., 2011). Auch die Transkription von verschiedenen Polaritätsfaktoren, eingeschlossen dem Transmembranprotein Crumbs3 und LLGL2 können durch SNAI1, SNAI2 und auch durch ZEB1 unterdrückt werden (Aigner et al., 2007; Spaderna et al., 2008). SNAI1 induziert MMPs (Matrixmetalloproteasen) durch Stimulation des Wachstumsfaktors Wnt5a, durch ZEB1 und LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor1) (Yokoyama et al., 2003).

Es ist bekannt, dass SNAI1 und SNAI2 sich sehr ähnlich sind und sich unter bestimmten Umständen gegenseitig ersetzen können. SNAI1 induziert die SNAI2-Expression, wohingegen SNAI2 einen Komplex mit dem Protein p53 und MDM2 (murine double minute oncogene2) bildet, um SNAI1 zu hemmen. (Wu et al., 2009)

SNAI1 hemmt seine eigene Transkription (Peiro et al., 2006), während SNAI2 den eigenen Promoter aktiviert (Sakai et al., 2006). Außerdem gibt es Anzeichen dafür, dass SNAI2 Twist induziert, bzw. sich diese beiden Gene funktionell gegenseitig ersetzen können (Hugo et al., 2011). Die folgende Abbildung soll ein Überblick über das Zusammenspiel verschiedener Gene geben.



**Abb. 6: Zusammenspiel verschiedener Schlüsselgene der EMT** (modifiziert nach Hugo et al., 2011) dabei stellen die schwarzen Verbindungspfeile einen fördernden, die roten einen hemmende Einfluss dar.

### 1.2.6 Kontroversen der EMT

Trotz dieser verschiedenen Beobachtungen wird der tatsächliche Einfluss der EMT auf die Biologie von Tumorzellen immer noch debattiert. Dies resultiert zum Beispiel aus der klinischen Beobachtung, dass ein Großteil beispielsweise der Mammakarzinom-Metastasen E-Cadherin exprimieren und ihre epitheliale Morphologie behalten, was impliziert, dass sie disseminiert sind, sich dabei aber nicht in einen mesenchymalen Phänotyp verwandelt haben (Tarin et al., 2005; Thompson et al., 2005). Verschiedene Studien am Mäusemodell haben ebenso gezeigt, dass Tumorinvasion und Metastasierung auch ohne offensichtlichen EMT-Phänotyp erreicht werden kann (Wicki et al., 2006; Gaggioli et al., 2007).

## 1.3 Microarray-Analyse

Da in der vorliegenden Arbeit mit Microarray-Daten gearbeitet wurde, sollen an dieser Stelle ein paar Hintergrundinformationen folgen.

Die Affymetrix GeneChip Technologie wurde in den späten 1980er Jahren von Stephen P.A. Fodor und Mitarbeitern eingeführt. Die revolutionäre Idee der Microarray-Analyse war, mit Hilfe einer von der Halbleiterfertigung bekannten Technologie, große Mengen an Molekülen auf kleinen Platten aus Glas, den sogenannten Microarray-Chips, zu platzieren.

Man muss sich das so vorstellen, dass auf dem Chip Nukleotidsequenzen (Oligonukleotide oder cDNA-Fragmente) in sehr geringem Abstand und grosser Dichte immobilisiert werden und für Hybridisierungsreaktionen zum Nachweis spezifischer RNA dienen. Unter Hybridisierung versteht man den Prozess der Bindung zweier komplementärer DNA-Stränge bzw. eines DNA-Stranges mit seiner komplementären RNA.

Um Genexpression zu quantifizieren, werden die zu hybridisierenden RNA-Sequenzen zunächst fluoreszierend markiert, danach folgt die Hybridisierung an die immobilisierten Sonden auf dem Chip. Dabei gilt: Ist eine große Menge an Zielsequenz in der RNA der aufgetragenen Gewebeprobe, so findet eine starke Bindungsreaktion an der zur Zielsequenz passenden Sonde statt.

Durch die Markierung mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes führt dies zu einem hellen Signal. Ist die Zielsequenz in der RNA nicht vorhanden, so findet keine Bindung an die Sonde statt, und es wird kein Helligkeitssignal abgegeben. So kann die Menge der hybridisierungsspezifischen RNA durch Ermittlung der Helligkeitsverteilung auf einem Chip oder Array durch Scannen bestimmt werden. (Boes et al., 2005)

In der vorliegenden Arbeit wurden die veröffentlichten Genexpressionsdaten von insgesamt 3 verschiedenen Microarray-Typen untersucht: GPL96, GPL570 und GPL8300. Da für jeden der

drei genannten Genchip-Typen jeweils verschiedene Sondensätze vorlagen, wurden die jeweiligen Genexpressionsdaten für jeden dieser 3 Genchiptypen gesondert ausgewertet.

#### **1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Wie oben ausgeführt, kann die Epithelial-Mesenchymale Transition zum infiltrativen Wachstum und der Metastasierung von Karzinomen beitragen. Während dieses Prozesses geschehen genetische Veränderungen, die eine gesteigerte Proliferation und Migration zulassen. Die Frage stellt sich nun, ob EMT-ähnliche Vorgänge auch in Tumoren wie dem Glioblastom stattfinden, die weder epithelialen noch mesenchymalen Ursprungs sind. Es soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob auch in Glioblastomen, deren Prognose nach wie vor u.a. durch infiltratives Zellwachstum und Migration limitiert ist, derartige Vorgänge eine Rolle spielen.

Daher wurden Gene, die bei EMT-Signalwegen in Karzinomen eine Schlüsselrolle spielen und/oder epitheliale bzw. mesenchymale Marker darstellen, in Glioblastomen und anderen glialen Tumoren untersucht. Dazu wurde die Expression dieser Gene bei Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirngewebe und anderen, prognostisch günstigeren glialen Tumoren (=WHO Grad I, II, III-Gliomen) analysiert. Außerdem soll gezeigt werden, ob eine mögliche Korrelation zwischen der Expression dieser EMT-Schlüsselgene in Glioblastomen und dem Gesamtüberleben besteht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Einschluss-/Ausschlusskriterien

Für die Auswertungen wurden Ein- und Ausschlusskriterien formuliert, um möglichst homogene Patientengruppen miteinander vergleichen zu können

Folgende Einschlusskriterien wurden definiert:

- Patientenalter bei Diagnose > 18 Jahre
- Neudiagnostiziertes Glioblastom oder Gliome der WHO-Grade I-III  
(dies gilt nur für die Expressionsanalyse; für die Kaplan Meier Analysen wurde sowohl Proben von neu diagnostizierter Glioblastomen als auch Glioblastomrezidive für Vergleichsanalysen verwendet, aber keine Daten von Gliomen der WHO-Grade I-III)

Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert:

- Glioblastomrezidive (dies gilt nur für den Expressionsteil)
- Daten, die nicht definitiv einem der drei Microarrays GPL96/570/8300 zugeordnet werden konnten

#### 2.1.2 Datengrundlage

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Metaanalyse von veröffentlichten Genexpressionsdaten in Normalhirngewebe, Glioblastomen (WHO Grad IV) und glialen Tumoren mit WHO-Grad I-III durchgeführt. Die genutzten Patientendaten und Genexpressionsdaten wurden in verschiedenen Studien nach PubMed-Datenbankrecherche identifiziert, die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt werden. Zu finden sind diese veröffentlichten Studiendaten als Genexpressionsdateien bei "GeoDataSets" auf der Homepage "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>" unter der jeweils erwähnten GSE-Nummer. Bei dieser Bezeichnung handelt es sich um eine Gruppe von Proben, welche innerhalb einer Studie zusammengefasst wurden. Eine genaue Beschreibung der Studie und ein Link zur zugehörigen Literatur wird dabei mit angegeben ("<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/overview.html>").

Zur Bestimmung der Genexpression wurden in allen folgenden Studien standardisierte Protokolle, welche vom Hersteller (Affymetrix, Santa Clara, CA) vorgegeben werden,

durchgeführt. Die ausführlichen Protokolle und Hintergrundinformationen sind auf der Homepage zu finden <sup>2</sup>.

a) Daten von Patienten mit Glioblastom bzw. niedriggradigeren Astrozytomen

**Tabelle 1:** Quellen der verwendeten Gliomdaten

Studienkenn- nummer	Anzahl der verwendeten Datensätze	Anzahl der Datensätze mit Genexpression	Anzahl der Datensätze mit klinischen Daten	jeweiliger Microarraytyp (Anzahl der Datensätze)
<b>GSE7696</b> (aus Murat et al., 2008)	70 GBM	70	70	GPL570
<b>GSE13041</b> (aus Lee et al., 2008)	223 GBM	223	223	GPL 96 (162) GPL 570 (12) GPL 8300 (49)
<b>GSE8692</b> (aus Liu et al., 2007)	8 GBM	8	0	GPL96
<b>GSE4290</b> (aus Sun et al., 2006)	80 GBM **** 38 ODGII* 19 AstroIII**	137	0	GPL570
<b>GSE5675</b> (aus Sharma et al., 2007)	41 Pilozyt. Astro I***	41	0	GPL570

\* ODGII = Oligodendrogliom WHO Grad II

\*\* AstroIII= Anplastisches Astrozytom WHO Grad III

\*\*\* Pilozyt Astro (I)= Pilozytisches Astrozytom WHO Grad I

\*\*\*\* GBM = Glioblastoma multiforme WHO-Grad IV

<sup>2</sup> [http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression\\_analysis\\_technical\\_manual.pdf](http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf) (24.08.13)

1. zu GSE 7696:  
Genexpressionsprofile von 80 Glioblastomproben, davon 70 neudiagnostizierte und 10 Rezidivtumore von insgesamt 76 Patienten. Verwendet wurden die Proben der 70 neudiagnostizierten Glioblastompatienten mit den dazugehörigen klinischen Daten.  
Herkunftsinstitution:  
European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/  
National Cancer Institute of Canada (NCIC)
  
2. zu GSE 13041:  
Genexpressionsprofile und dazugehörige klinische Daten von 267 Glioblastomproben, wobei es sich bei 44 Proben um Glioblastomrezidive handelt, sodass in der vorliegenden Arbeit insgesamt 223 Proben verwendet werden konnten.  
Herkunftsinstitutionen:  
UCLA Neurology Program (n=55)  
Barrow Neurological Institute (n=31)  
aus verschiedenen Studien, welche zwischen 2003-2006 stattgefunden haben (n=181)  
(Freije et al., 2004, n= 46; Phillips et al., 2006, n= 55; Rich et al., 2005, n=31; Mischel et al., 2003, n=2; Shai et al., 2003, n=19; Nutt et al., 2003, n=28)
  
3. zu GSE 8692:  
Genexpressionsprofile von ZNS-Gewebeproben von 12 Patienten, davon 8 Glioblastompatienten  
Herkunftsinstitution: UCLA
  
4. zu GSE 4290:  
Genexpressionsdaten von 80 Glioblastomgewebeproben, 38 mit einem Oligodendrogliom II und 19 Proben von Astrozytom Grad III.  
Herkunftsinstitutionen:  
Sciencell Research Laboratories, San Diego, CA  
Europe collection of cell cultures, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO

5. zu GSE 5675:

Genexpressionsprofile von 41 Pilozytischen Astrozytomen

Herkunftsinstitutionen: Siteman Cancer Center Tissue Procurement Core Facility an der Universität in Washington, von der Universität in Texas M. D. Anderson Cancer Center und dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf.

b) Kontrolldaten

**Tabelle 2:** Quellen der Kontrolldaten

Studienkennnummer	Anzahl der verwendeten Proben	Anzahl der Individuen	jeweiliger Microarraytyp
<b>GSE 12649</b> (aus Iwamoto et al., 2005)	34	34	GPL96
<b>GSE 12654</b> (aus Iwamoto et al., 2004)	15	15	GPL8300
<b>GSE 3526</b> (aus Roth et al., 2006)	136	10	GPL570
<b>GSE 7540</b> (Caceres et al., 2003)	22	5	GPL 8300

1. zu GSE 12649:

**34 Kontrollproben von 34 Patienten** (Alter 32-60 Jahre)

Insgesamt wurden von 105 Patienten postmortal aus dem präfrontalen Kortex (Brodmann's Area 46) Proben entnommen. In der Studie waren Patienten mit bipolarer Störung, mit Schizophrenie und eine gesunde Kontrollgruppe von 34 Personen eingeschlossen. Um irgendwelche Einflüsse der psychiatrischen Erkrankungen auf die untersuchte Genexpression auszuschließen, fanden ausschließlich nur die Genexpressionsdaten der gesunden Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Die Todesursache war bis auf Ausnahme von 2 Patienten Herzversagen. Insgesamt waren 9 der in die vorliegende Untersuchung eingegangenen Kontrollpersonen weiblich, 25 männlich. Das Alter wurde nicht angegeben, das durchschnittliche PMI (postmortale Intervall) zwischen Tod und Probenverarbeitung lag bei 28,7 h.

2. zu GSE 12654:

Die Proben wurden postmortal von Patienten mit bipolaren Störungen, schwerer Depression, Schizophrenie und einer gesunde Kontrollgruppe aus dem präfrontalen Kortex (Brodmann's Area 10) entnommen. Jede Gruppe bestand aus 15 Individuen. Für die vorliegende Studie wurden ausschließlich die Genexpressionsdaten der 15 Kontrollpatienten einbezogen. Dabei handelte es sich um 9 Männer und 6 Frauen. Das mittlere Alter lag bei 48 (+/-11) Jahre, und die PMI entsprach durchschnittlich 24 (+/- 10) h.

3. zu GSE 3526:

Die **136 Gewebeproben** stammten **von 10 Organspendern**, die alle kaukasischer Herkunft waren und deren Alter zwischen 23 und 53 Jahren lag. Fünf Individuen waren weiblich, fünf männlich. Alle Spender waren frei von chronischen Erkrankungen, und in allen Fällen trat der Tod aufgrund eines plötzlichen Ereignisses ein. Die Autopsie wurde innerhalb von 3 Stunden post mortem durchgeführt (PMI=3h) und alle Gewebeproben Innerhalb von 8,5 h verarbeitet.

4. zu GSE 7540:

In dieser Studie wurde die Genexpression in Hirnnormalgewebe von Menschen als auch nicht menschlichen Primaten per Microarray untersucht. Aus den insgesamt **fünf menschlichen Individuen** wurden insgesamt **22 Proben** entnommen. Bei drei Patienten fand die Entnahme im Rahmen einer Autopsie statt, bei den anderen beiden konnten die Proben im Rahmen einer Operation entnommen werden. Das Gewebe wurde aus verschiedenen Bereichen des Gehirns gewonnen, aus dem Frontal-, dem Parietal- und dem Temporallappen. Das Durchschnittsalter lag bei den Menschen bei 43,4 Jahren, das PMI war in dieser Studie nicht angegeben.

Zusammengefasst sind also folgende Daten Gegenstand der Untersuchung:

381 Datensätze von Glioblastompatienten, wobei zu 293 Proben auch detailliertere klinische Daten vorhanden sind, bei 88 sind dagegen nur Genexpressionsdaten verfügbar. Da diese mit drei verschiedenen Genchips (GPL 570, GPL 8300 und GPL96) bearbeitet wurden, wurden die Daten nochmals in drei Genchip-Gruppen aufgeteilt und jeweils gesondert ausgewertet.



GPL570-Gruppe: 82 mit zusätzlichen klinischen Daten, 80 mit reinen Genexpressionsdaten  
GPL 96-Gruppe: 162 mit zusätzlichen klinischen Daten, 8 mit reinen Genexpressionsdaten  
GPL8300-Gruppe: 49 mit zusätzlichen klinischen Daten

Desweiteren sind Gliome der WHO-Grade I-III untersucht worden:

41 pilozytische Astrozytome WHO I,

38 Oligodendrogliome WHO II,

19 Anaplastische Astrozytome WHO III

Diese wurden alle mit dem Genchip GPL570 bearbeitet, damit können diese Daten auch miteinander in Bezug gesetzt werden.

Dem werden 207 Kontrolldaten von Individuen ohne eine Neoplasie des ZNS gegenübergestellt. Entsprechend der Patientenkollektive wurden Daten mit entsprechenden Genchipdaten herausgesucht.

GPL 96: 34 Individuen

GPL570: 136 Individuen

GPL8300 37 Individuen

Datenumwandlung:

Nachdem diese Daten identifiziert und zugeordnet worden waren, wurden die entsprechenden Rohdaten als cel-Dateien von der GEO-Datenbank heruntergeladen. Die anschließende Primärdatenanalyse und Umwandlung in Text-Dateien wurde mithilfe der "Affymetrix Expression Console Software" durchgeführt. Hierbei wurde der MikroarraySuite5.0-Algorithmus verwendet und die Daten auf eine mittlere Targetintensität von 500 skaliert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Datenerfassung**

Von allen oben genannten Datensätzen wurden Genexpressionsdaten der folgenden, vorher festgelegten Auswahl an Schlüsselgenen der EMT erfasst:

ZEB1, ZEB2, CDH1, VIM, LLGL-2, SNAI1, SNAI2, SNAI3, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TWIST1, TWIST2, NFKB1, NFKB2, TCF3, TNF, PTEN, ITGA4 und LEF1, EP300.

(TNF und PTEN wurden nachträglich wieder ausgeschlossen. Dieser Vorgang wird weiter unten begründet)

Sonden, mit welchen die entsprechenden EMT-Schlüsselgene detektiert wurden, werden im Folgenden für jeden Mikroarraytyp aufgelistet. Dabei existieren pro Gen häufig mehrere

Sondensätze, sogenannte "probe sets". Zu finden sind diese auf der Homepage

"<http://www.affymetrix.com/estore>" Dabei entspricht GPL 570 dem Arraytyp

HG\_U133plus2.0, GPL96 dem Typ HG\_U133A und GPL8300 dem Typ HG\_U95A.

Es handelt sich dabei um Gruppen von Sonden, die dazu entwickelt wurden, eine bestimmte

Gensequenz zu untersuchen (Affymetrix, 24.08. 2013<sup>3</sup>) Dies bedeutet z.B. bei dem

Microarraytyp GPL570, dass für das Gen ZEB1 die drei Probe sets 212758\_s\_at, 210875\_s\_at

und 212764\_at vorhanden sind. Eine Auswahl der verschiedenen Sondensätze für ausgewählte

Gene wird Microarray-spezifisch in den Tabellen 3-5 aufgeführt. Die vollständigen Tabellen mit

allen untersuchten Sondensätzen befinden sich im Anhang.

**Tabelle3:** Probesets des Microarrays **GPL 570**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
212758_s_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
210875_s_at	ZEB1	.(B)	zink fingerE-box
212764_at	ZEB1	.(C)	zink fingerE-box
239952_at	ZEB1	.(D)	zink fingerE-box
203603_s_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
233031_at	ZEB2	.(B)	zink fingerE-box
235593_at	ZEB2	.(C)	zink fingerE-box
201130_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
201131_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
201426_s_at	VIM	.(A)	vimentin

<sup>3</sup> [http://www.affymetrix.com/support/help/faqs/mouse\\_430/faq\\_8.jsp](http://www.affymetrix.com/support/help/faqs/mouse_430/faq_8.jsp) (24.08.2013)

**Tabelle 4:** Probesets des Microarrays **GPL 96**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
212758_s_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
210875_s_at	ZEB1	.(B)	zink fingerE-box
212764_at	ZEB1	.(C)	zink fingerE-box
203603_s_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
201130_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
201131_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
201426_s_at	VIM	.(A)	vimentin

**Tabelle 5:** Probesets des Microarrays **GPL 8300**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
33440_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
35681_r_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
2082_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
977_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
34091_s_at	VIM	.(A)	vimentin

Für eine einfachere Zuordnung der Sondensätze bei der Datenauswertung werden im Folgenden die Gene, für die mehrere dieser Sondensätze existieren, der Reihe nach alphabetisch nummeriert. So, dass beispielsweise ZEB1.(A) für "212758\_s\_at" und VIM.(B) für "1555938\_x\_at" innerhalb des Genchips GPL 570 steht.

Neben der Genexpression wurden, soweit verfügbar, die folgenden klinischen Daten erhoben:

1. Alter bei Diagnosestellung
2. Geschlecht
3. Therapie
4. Überlebensstatus zum Zeitpunkt der Untersuchung
5. Gesamtüberleben nach Diagnosestellung

### 2.2.2 Dokumentation der Daten

Für die Dokumentation der Daten wurden Tabellen mit Hilfe der Excel-Software (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten) und SPSS-Software (SPSS= statistical package for social studies; IBM, Armonk, Vereinigte Staaten) erstellt. Dabei wurden die Versionen "Microsoft Office Excel 2007" und "SPSS 12.0 für Windows" verwendet.

Mit dem Programm Excel wurden die Expressionsunterschiede zwischen Glioblastomen und Normalgewebe, bzw. zwischen Glioblastomen und Gliomen der WHO-Grade I-III ermittelt. Hierbei kam der Welch-Tests und Fold Change (siehe unten) zum Einsatz. In dem Programm SPSS wurden mit Hilfe von Häufigkeits- und Kaplan-Meier-Analysen mögliche Zusammenhänge zwischen der Genexpression und den klinischen Daten bzw. Überlebenszeiten analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Studiendaten waren bereits anonymisiert worden. Die einzelnen Datensätze ließen sich lediglich anhand ihrer GSM-Nummer der GEO-Datenbank zuordnen. Diese wurden auch für folgende Einteilung übernommen.

Für jede Variable wurde in den SPSS-Tabellen, soweit dies sinnvoll war, ein Variablenlabel, ein Wertelabel und ein Messniveau definiert und deklariert. Mit dem Variablenlabel wurde der in die Tabelle eingehende Parameters definiert, durch das Wertelabel wurden die möglichen Werte, die eine Variable annehmen kann, festgelegt und durch das Messniveau wurde angegeben, ob die Daten nominal, metrisch oder ordinal dokumentiert wurden. Bei numerischen Daten war das Messniveau metrisch, bei Stringdaten nominal.

Die Genexpression wurde für die Auswertung über Excel mit den tatsächlichen Werten dokumentiert.

Für die Kaplan Meier-Analysen wurden Matrizen erstellt, für die vorab definiert wurde, wann ein bestimmtes Gen einer bestimmten Gewebeprobe im Vergleich zu einer definierten Bezugsgröße erhöht, erniedrigt (entspricht jeweils der Zahl 1) oder gleich (entspricht der Ziffer 0) ist. Zur Bestimmung der Bezugsgröße wurden 2 verschiedene Methoden angewandt.

1.Methode: das Normalgewebe der Kontrollgruppen wurde zur Bestimmung der Bezugsgröße gewählt. Hierbei wurden die Expressionsdaten der Datensätze des Normalgewebes in Perzentilen eingeteilt. Dazu wählten wir die 50., die 80. und die 97. Perzentile, welche jeweils mit den Faktoren 1,5; 2; 3 multipliziert wurden. Das Ergebnis daraus stellte jeweils die Bezugsgröße dar. Dies diente jeweils als Grenze, über welcher die Expression der zu testenden Glioblastomdatensätze als erhöht (entspricht der Zahl 1), als nicht erhöht (entspricht der Zahl 0) eingestuft wurde. Zusätzlich wählten wir die 3., 20. und nochmals die 50. Perzentile. Dieses Mal wurde jedoch mit den Faktoren 0,75; 0,5; 0,33 multipliziert. Das Ergebnis daraus stellte jeweils die Bezugsgröße dar, die jeweils als Grenze diente, unter welcher die Expression der zu

testenden Glioblastomdatensätze als erniedrigt (entspricht der Zahl 1) bzw. nicht erniedrigt (entspricht der Ziffer 0) eingestuft wurde.

Insgesamt entstanden über diese Methode pro Mikroarraytyp 18 Matrizen. Für GPL570, GPL96 und GPL8300 wurden insgesamt 54 Matrizen zur weiteren Analyse erstellt.

2.Methode: Die Patienten wurden selbst als Bezugsgröße gewählt, indem die jeweiligen Expressionsdaten der einzelnen Gene der Größe nach in Excel sortiert wurden und Werte unterhalb des Medians als nicht erhöht (0) und oberhalb des Medians als erhöht (1) definiert wurden. Diese 2. Methode resultierte aus der Tatsache, dass bei der ersten Variante sehr starke Unterschiede bezüglich der Gruppengröße auftraten und deshalb vergleichende Auswertungen nicht immer möglich waren.

### 2.2.3 Auswertung und statistische Tests

#### a) Welch-Test

Für die Fragestellung, ob bei Glioblastompatienten die Expression der Schlüsselgene der EMT im Vergleich zu Kontrollproben statistisch signifikant verändert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Welch-Test gewählt.

Der Welch-Test ist ein Signifikanztest für den Unterschied zweier Gruppen. Im Gegensatz zum t-Test ist die Voraussetzung dahingehend abgeschwächt, dass die Gleichheit der Varianzen, auch Homoskedastizität genannt, der beiden Grundgesamtheiten nicht vorausgesetzt wird.

Die Prüfgröße berechnet sich dabei folgendermaßen:

$$t' = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n_x} + \frac{s_y^2}{n_y}}} \quad (\text{Weiß, 2010}).$$

Desweiteren existiert bei Excel eine Funktion für den Welch-Test:

TTEST(Bereich1; Bereich2; 2; 3)

In der vorliegenden Arbeit kamen beide Versionen für die Ergebnisermittlung zur Anwendung. Aus der großen Anzahl an Möglichkeiten statistischer Tests fiel aus verschiedenen Gründen die Wahl auf den eben beschriebenen Welch-Test:

1. der Test ist an relativ wenige Voraussetzungen gebunden, er wird daher als sehr robust eingestuft (Weiß C 2010).

2. der Welch-Test wird von verschiedenen aktuellen Studien als der in den meisten Fällen anwendbare (Fagerland et al., 2009), in einer Arbeit von Rasch et al. (2011) sogar als Standardtest empfohlen.

Häufig wird die Voraussetzung der Normalverteilung, die sowohl für T-Tests als auch für den Welch-Test gilt, beispielsweise über den Kolmogoroff-Smirnov-Test oder andere Anpassungstests vorab getestet. Auf solche Vorgehensweisen wurde in dieser Arbeit verzichtet, da dies laut aktuellen Forschungsergebnissen obsolet ist (Rasch et al., 2011). Desweiteren würde sich durch Vortestungen der  $\beta$ -Fehler unnötigerweise erhöhen. Von einem  $\beta$ -Fehler spricht man, wenn in Wirklichkeit die Alternativhypothese richtig ist und man sich fälschlicherweise für die Nullhypothese entscheidet.

#### b) Fold change

Durch den Fold change war es möglich, die Expressionsunterschiede quantitativ anzugeben. In der Literatur wurden zwar mehrere Definitionen zum Fold-change gefunden, die Standard-Definition für das Gen  $j$  geht auf Tusher et al. (2001) zurück:

$$FC_j = \frac{\bar{x}_{i1j}}{\bar{x}_{i2j}}$$

wobei  $\bar{x}_{i1j}$  der Mittelwert des  $j$ -ten Gens über die Arrays der ersten Gruppe und  $\bar{x}_{i2j}$  der Mittelwert des  $j$ -ten Gens über die Arrays der zweiten Gruppe ist.

Der Fold Change ist letztlich ein statistisches Verfahren, welches das Verhältnis zweier Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Datenmengen darstellt.

Es ist also mit einer quantitativen Angabe des Expressionsunterschiedes gleichzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Grenzen für die Daten mit einem deutlichen Expressionsunterschied bei  $> 2$  bzw.  $< 0,5$  gewählt.

#### c) Kaplan-Meier-Analyse

Der Kaplan-Meier-Schätzer dient zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt. Es handelt sich um einen nichtparametrischen Test der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse.

Für diese Analyse wurden eine "Zeitvariable", eine "Statusvariable" und ein Faktor gefordert. Optional konnten außerdem noch verschiedene "Schichten" angegeben werden. Als "Zeitvariable" wurde eine Variable gewählt, die angibt, wie lange die jeweiligen Beobachtungsobjekte jeweils überlebt haben (nichtzensierte Fälle) oder verfolgt wurden (zensierte Fälle).

Die "Statusvariable" gibt an, ob für die jeweilige Beobachtungseinheit ein Event eingetreten ist oder nicht. Welche Ausprägungen dabei einem Event entsprechen, musste über die Dialogbox "Ereignis definieren" festgelegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ereignis mit dem eingetretenen Tod definiert.

Als Faktor wurden die einzelnen Gene eingegeben.

Sollten die Daten schließlich bezüglich einer Variable, beispielsweise des Alters, gesondert betrachtet werden, so wurde dies als zusätzliche Variable unter Schichten eingegeben. Als statistischer Signifikanztest wurde der üblicherweise hier eingesetzte logrank-Test verwendet.

#### d) Bonferroni-Korrektur

Eine Bonferroni-Korrektur muss dann durchgeführt werden, wenn an einem Datensatz mehrere Signifikanztests durchgeführt werden. Dabei muss die Signifikanzgrenze, die bei  $\alpha=0,05$  liegt, durch die Anzahl der durchgeführten Tests geteilt werden (Weiß, 2010). Diese Korrektur kam in der vorliegenden Arbeit mehrfach zum Einsatz. Die dabei jeweils ermittelten Signifikanzgrenzen werden im Ergebnisteil genannt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der klinischen Daten

Klinische Daten konnten bei insgesamt 293 Glioblastompatienten erhoben werden.

Folgendermaßen lässt sich das Patientenkollektiv charakterisieren:

Die Patienten der untersuchten Gewebeproben waren zwischen 22 und 86 Jahre alt mit einem medianen Alter von 54 Jahren.

93 der Patienten waren weiblich, 170 männlich, und von 28 Patienten war das Geschlecht nicht angegeben.

Die Therapie konnte nur bei 73 Patienten nachvollzogen werden. Davon erhielten 45 Patienten die derzeitige "Goldstandardtherapie" (Operation, dann Bestrahlung und Chemotherapie mit Temozolomid). 27 der Patienten erhielten nach der OP nur eine Radiatio und ein Patient bekam nach chirurgischem Eingriff nur eine Chemotherapie.

Zum Zeitpunkt des jeweiligen Studienendes lebten noch 26 von 292 Patienten, bei denen der Überlebensstatus angegeben war.

Das mediane Überleben der bereits 266 zu Studienende Gestorbenen betrug 12 Monate.

Rechnet man die zum Studienende noch Lebenden mit ein, so kommt man auf ein medianes Überleben von 13,05 Monaten.

### 3.2 Expression

#### 3.2.1 Glioblastom versus Normalgewebe

Die in Excel-Tabellen angelegten Expressionswerte wurden zunächst auf signifikante Unterschiede zwischen den Glioblastomdaten und den Kontrolldaten untersucht. Dazu wurde der Welch-Test verwendet. Anschließend wurde noch ein Fold change mit den festgelegten Grenzen  $>2$  bzw.  $<0,5$  gefordert. In den folgenden Tabellen sollen für die Übersichtlichkeit nur die signifikanten Ergebnisse, die auch den oben genannten Fold change- Bedingungen entsprechen, dargestellt werden. Ausgeschlossen wurden außerdem Daten, bei der sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe die Expressionsgrenze von 100 nicht erreicht wurde. Nachträglich ausgeschlossen wurden desweiteren die Gene  $TNF\alpha$  und PTEN. Bei PTEN handelt es sich um ein Tumorsupressorgen. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses insbesondere beim Glioblastom neben einer hemizygoten bzw. homozygoten Deletion nicht nur oft vermindert ist bzw. fehlt, sondern oft auch durch eine Mutation inaktiv ist (Gont et al., 2013) und damit die von uns angewandte Methode der Expressionsanalyse kein



zielführender Ansatz ist. TNF $\alpha$  haben wir aufgrund seiner vielfältigen anderweitigen Funktionen ausgeschlossen, da der Zusammenhang einer erhöhten Expression mit dem Einfluss auf die EMT nicht sicher nachgewiesen werden kann. Als Signifikanzgrenze haben wir zunächst  $p=0,05$  festgesetzt, diese musste jedoch aufgrund der vielen einzelnen Tests, die an den jeweiligen Proben durchgeführt wurden, nach Bonferroni korrigiert werden. Der jeweilige Wert ist je nach Anzahl von probe sets unterschiedlich und wird daher bei jeder Tabelle neu angegeben. Wie bereits im vorangehenden Kapitel erläutert, müssen die Daten der drei Microarraytypen gesondert ausgewertet werden. Es wird hier in EMT-fördernde Gene bzw. Marker für mesenchymale Zellen und EMT-Repressoren bzw. Marker für epitheliale Zellen eingeteilt, diese seien hier kurz aufgelistet:

EMT-fördernde Gene bzw. Marker für mesenchymale Zellen:

ZEB1, ZEB2, VIM, SNAI1, SNAI2, SNAI3, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TWIST1, TWIST2, NFKB1, NFKB2, TCF3, (TNF $\alpha$ ), (PTEN), ITGA4 und LEF1.

EMT-Repressoren bzw. Marker für epitheliale Zellen:

CDH1, LLGL-2, EP300.

**Tabelle 6:** Glioblastomproben versus gesunde Gewesbeproben nach Microarraytyp GPL96

GBM (n=170) versus Normalgewebe (n=34)	erhöht gegenüber NG*	erniedrigt gegenüber NG
EMT-fördernde Gene	<b>TGF<math>\beta</math>2.</b> (A),.(B) <b>TGF<math>\beta</math>1.</b> (B) <b>Zeb1.</b> (A), .(B), <b>SNAI2.</b> (A), <b>TCF3.</b> (B), .(D), .(E), .(F) <b>ITGA4.</b> (B) <b>LEF1.</b> (B) <b>VIM.</b> (A)	
EMT-Repressoren		

GPL 96: nach Bonferroni-Korrektur liegt hier die Signifikanzgrenze (bei 22 Sondensätzen):  $p=0,0022$

\*NG = Normalgewebe

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik)

**Tabelle 7:** Glioblastomproben versus gesunde Gewesbepuben nach Microarraytyp GPL 570

GBM (n=82) versus Normalgewebe (n=137)	erhöht gegenüber NG	erniedrigt gegenüber NG
EMT-fördernde Gene	<b>TGFβ2.</b> (B), .(C),.(D) <b>Zeb1.</b> (C), .(D) <b>SNAI2.</b> (A) <b>TCF3.</b> (D), .(F) <b>ITGA4.</b> (B) <b>VIM.</b> (A), .(B)	<b>Zeb2.</b> (B)
EMT-Repressoren		<b>LLGL2.</b> (A) <b>EP300.</b> (A)

GPL570: nach Bonferroni-Korrektur Signifikanzgrenze (bei 37 Sondensätzen)  $p=0,00135$   
 Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze  
 (siehe Kapitel Material und Methodik)

**Tabelle 8:** Glioblastomproben versus gesunde Gewesbepuben nach Microarraytyp GPL 8300

GBM (n=49) versus Normalgewebe (n=37)	erhöht gegenüber NG	erniedrigt gegenüber NG
EMT-fördernde Gene	<b>TGFβ2.</b> (A), .(B) <b>TGFβ1.</b> (B) <b>TCF3.</b> (A), .(B), .(C) <b>VIM.</b> (A) <b>NFKB2.</b> (B), .(E)	
EMT-Repressoren	<b>CDH1.</b> (A)	

GPL8300: nach Bonferroni-Korrektur: Signifikanzgrenze (bei 20 Sondensätzen)  $p=0,0025$   
 Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze  
 (siehe Kapitel Material und Methodik)

Nach dem EMT-Konzept für Karzinome könnte man eigentlich erwarten, dass bei der hier  
 gewählten Einteilung für das sehr infiltrierend wachsende Glioblastom EMT fördernde Gene im  
 Feld "erhöht" und EMT-Repressoren im Feld "erniedrigt" erscheinen würden. Mit kleineren  
 Abweichungen trifft dies auch zu. Auffällig ist dabei, dass vor allem EMT-fördernde Gene  
 signifikant verändert sind. Repressoren scheinen offensichtlich beim Glioblastom eine kleinere

Rolle zu spielen. Idealerweise würde man auch erwarten, dass bei allen drei Microarraytypen die gleichen Schlüsselgene der Glioblastome im Vergleich zu den Kontrollproben erhöht sind. GPL96 und GPL570 weisen eine deutliche Übereinstimmung auf. Sowohl TGFβ2, ZEB1, SNAIL2, TCF3, ITGA4, LEF1 und VIM sind in beiden Genchips im Vergleich zum Normalgewebe erhöht. Bei GPL96 ist zusätzlich TGFβ1 signifikant erhöht, bei GPL570 sind ZEB2, LLGL2 und EP300 zusätzlich signifikant erniedrigt. Bei GPL8300 sind zwar ähnliche Tendenzen und ähnliche signifikante Ergebnisse zu sehen, die jedoch aufgrund der fehlenden Erfüllung der Fold change-Kriterien hier keine Erwähnung finden. Übereinstimmend mit GPL96 sind hier TGFβ1, TGFβ2, TCF3, VIM erhöht. Als zusätzliche Gene sind hier NFKB2 und CDH1 signifikant gegenüber dem Normalgewebe erhöht. Als gemeinsamen Nenner aller 3 Microarrays bleiben: TGFβ2, TCF3 und VIM.

### 3.2.2 Expression von Glioblastom versus niedriggradige Gliome

Als nächster Schritt wurden die Expressionsdaten der Glioblastomgruppe mit denen der Gliome der WHO-Gruppen I-III verglichen. Hierbei wurde aufgrund ausreichend großer Gruppenstärken ausschließlich mit Daten des Microarrays GPL570 gearbeitet.

Auch hier wurden die Fold change Grenzen 2 bzw. 0,5 eingehalten und Expression unter der Grenze von 100 in beiden Gruppen ausgeschlossen.

#### a) Glioblastome WHO IV versus pilozytische Astrozytome WHO Grad I

**Tabelle 9:** Glioblastome versus pilozytische Astrozytome nach Microarraytyp GPL 570

<b>GBM (n=82) versus Grad1 (n=40)</b>	<b>erhöht gegenüber Grad I</b>	<b>erniedrigt gegenüber Grad I</b>
EMT-fördernde Gene	<b>TGFβ2.</b> (B),.(D) <b>TCF3.</b> (D), .(J)	<b>Zeb1.</b> (A),.(B),.(C) <b>VIM.</b> (A)
EMT-Repressoren		

Signifikanzgrenze nach Bonferroni-Korrektur ist (mit 37 Sondensätzen)  $p=0,00135$   
Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik)

b) Glioblastome WHO IV versus Oligodendrogliome WHO Grad II

**Tabelle 10:** Glioblastome versus Oligodendrogliome nach Microarraytyp GPL 570

<b>GBM (n=82) versus Oligos (n= 38)</b>	<b>erhöht gegenüber Grad II</b>	<b>erniedrigt gegenüber Grad II</b>
EMT-fördernde Gene	<b>TGFβ2.(C),.(D)</b> <b>TWIST1.(A)</b> <b>TCF3.(F)</b> <b>ITGA4.(B)</b> <b>VIM.(A),.(B)</b>	<b>Zeb1.(B)</b>
EMT-Repressoren		

Signifikanzgrenze nach Bonferroni-Korrektur (mit 37 Sondensätzen):  $p=0,00135$   
 Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik)

c) Glioblastome WHO Grad IV versus anaplastische Astrozytome WHO Grad III

**Tabelle 11:** Glioblastome versus anaplastische Astrozytome nach Microarraytyp GPL570

<b>GBM (n= 82) vs. Anaplastische Astrozytome (n=19)</b>	<b>erhöht gegenüber Grad III</b>	<b>erniedrigt gegenüber Grad III</b>
EMT-fördernde Gene	<b>ITGA4.(B)</b> <b>TCF3.(D)</b> <b>VIM .(B)</b>	<b>Zeb1.(B)</b>
EMT-Repressoren		

Signifikanzgrenze nach Bonferroni-Korrektur (mit 37 Sondensätzen):  $p=0,00135$   
 Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik)

Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen GBM und Grad I Gliomen bei weitem nicht so groß, wie zwischen GBM und dem Kontrollgewebe bzw. Grad II Gliomen. Mögliche Ursachen hierfür sollen im Diskussionsteil weiter beleuchtet werden. Dagegen spiegelt sich die in der Einleitung beschriebene Entwicklung von Grad II über Grad III zu GBM in den immer geringeren Unterschieden innerhalb der Genexpression wider.

Auffällig ist außerdem, dass bei den niedriggradigeren Gliomen durchweg Zeb1 deutlich signifikant gegenüber GBM erhöht ist. Bei den pilozytischen Astrozytomen ist Vimentin signifikant, Zeb2 bei den Grad II Gliomen im Vergleich zu den Glioblastomen häufiger vertreten.

Als Grad 2 Gliome wurden ausschließlich Oligodendrogliome Grad2 ausgewählt, da Grad2 Astrozytome in einer zu geringen Zahl vorhanden war.

Gleiches gilt für Grad 3 Gliome: Hier wurden ausschließlich Anaplastische Astrozytome ausgewählt, da Oligodendrogliome Grad 3 in zu geringer Anzahl vorhanden war.

### 3.3 Kaplan-Meier-Analyse

Um eine Korrelation zwischen den Expressionsdaten und der Überlebenszeit zu untersuchen wurden Kaplan-Meier-Überlebensanalysen durchgeführt. Wie bereits im Methodik-Teil erwähnt, wurden für das Erstellen der Matrizen zwei Methoden angewandt, eine Bezugsgröße zu ermitteln.

#### 3.3.1 Nach Perzentilen-Einteilung

Hierfür wurde das Normalgewebe in Perzentilen eingeteilt, die wiederum mit verschiedenen Faktoren multipliziert wurden. Daraus ergab sich letztlich die jeweilige festgelegte Grenze für erhöht, erniedrigt, nicht erhöht/nicht erniedrigt.

nach Bonferroni-Korrektur wurden folgende Signifikanzgrenzen festgelegt:

GPL96: 0,05/22  $p=0,0022$

GPL570:0,05/37  $p=0,00135$

GPL8300:0,05/20  $p=0,0025$

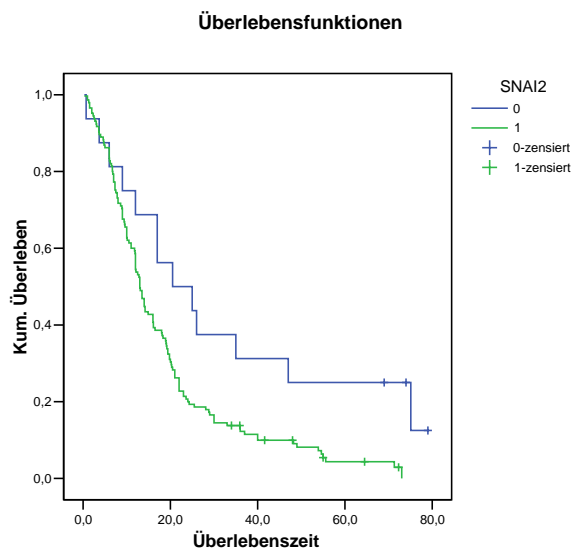
Nach Bonferroni-Korrektur sind nahezu keine der Ergebnisse signifikant, sodass diese Ergebnisse nur Tendenzen darstellen. Bis zu einer Grenze von  $p=0,05$  wurden die Ergebnisse hier aufgeführt.

a) größer 50. bis größer 97. Perzentile

**Tabelle 12:** Genexpression der Glioblastome >50. Perzentile x 1,5 der Expression des NG

>50.Perzentile x 1,5	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL96: <b>SNAI2</b> .(A) ( $p=0,01$ )	GPL8300: <b>ZEB1</b> .(A) ( $p=0,03$ )
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

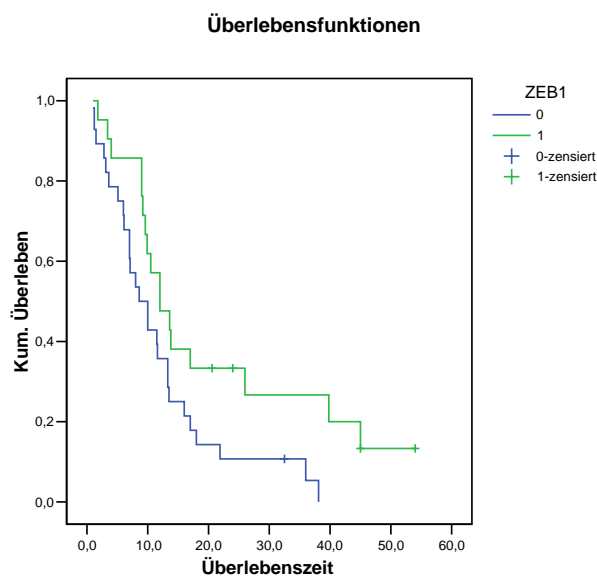


**Abb. 7: SNAI2.(A), > 50.Perzentile Faktor 1,5 GPL96, Log Rank (p=0,01)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von SNAI2 der angegebenen Bedingung (>50. Perzentile x 1,5) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von SNAI2 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.



**Abb. 8: ZEB1.(A), > 50.Perzentile Faktor 1,5 GPL 8300, Log rank (p=0,0296)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der angegebenen Bedingung (>50. Perzentile x 1,5 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnproben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

Im Folgenden werden aufgrund der großen Datenmenge lediglich die Übersichtstabellen aufgeführt. Nur vereinzelt werden zusätzlich Kaplan-Meier-Diagramme dargestellt.

**Tabelle 13:** Genexpression der Glioblastome >50. Perzentile x 2 der Expression des NG

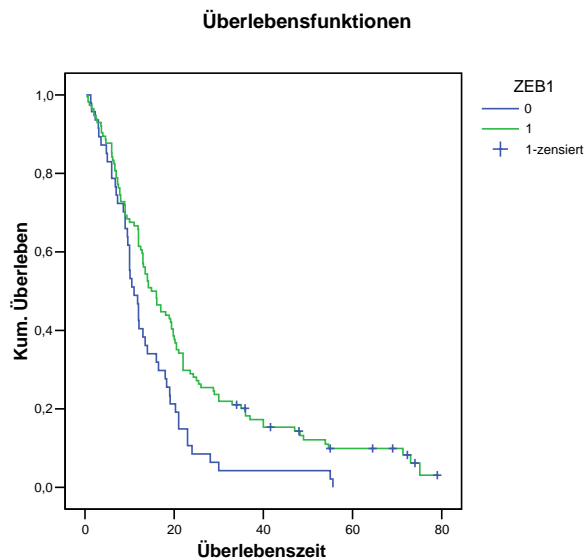
>50.Perzentile x2	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL96: <b>SNAI2</b> .(A) (p=0,02)	GPL96: <b>Zeb1</b> .(A) (p=0,03) <b>Zeb2</b> .(A) (p=0,01) GPL570: <b>TGFβ2</b> .(B) (p=0,04)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 14:** Genexpression der Glioblastome >50. Perzentile x 3 der Expression des NG

>50.Perzentile x 3	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL96: <b>LEF1</b> .(B) (p=0,04) GPL570: <b>TCF3</b> .(F) (p=0,03)	GPL96: <b>Zeb1</b> .(A),.(C) (p=0,003/0,04) GPL570: <b>TGFβ2</b> .(B) (p=0,04)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 9: Zeb1.(A), >50.Perzentile Faktor3 GPL96, Log Rank (p=0,0033)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der angegebenen Bedingung (>50. Perzentile x 3 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnprouben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 15:** Genexpression der Glioblastome >80. Perzentile x 1,5 der Expression des NG

>80.Perzentile x1,5	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL96: <b>SNAI2</b> .(A) (0,007)	GPL96: <b>Zeb1</b> .(A),.(B),.(C) (0,04/0,03/0,02) GPL570: <b>TGFβ2</b> .(B) (0,04)
EMT-Repressoren		

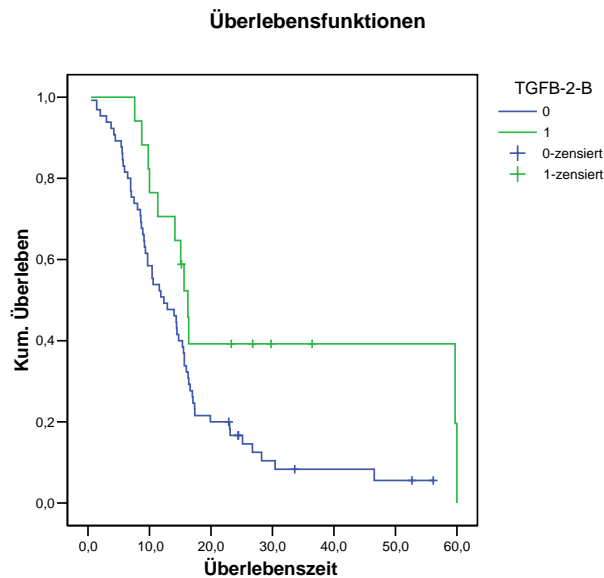
Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Tabelle 16:** Genexpression der Glioblastome >80. Perzentile x 2 der Expression des NG

> 80.Perzentile x 2	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL96: <b>SNAI2</b> .(A) (p=0,01) GPL8300: <b>VIM</b> .(A) (p=0,02)	GPL96: <b>Zeb1</b> .(A),.(C) (p=0,02/0,04) GPL570: <b>TGFβ-2</b> .(B) (p=0,02)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 10 TGFB-2.(B), >80.Perzentile Faktor 2 GPL570, Log Rank (p=0,019)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von TGFB-2 der angegebenen Bedingung (>80. Perzentile x 2 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnproben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von TGFB-2 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 17:** Genexpression der Glioblastome >80. Perzentile x 3 der Expression des NG

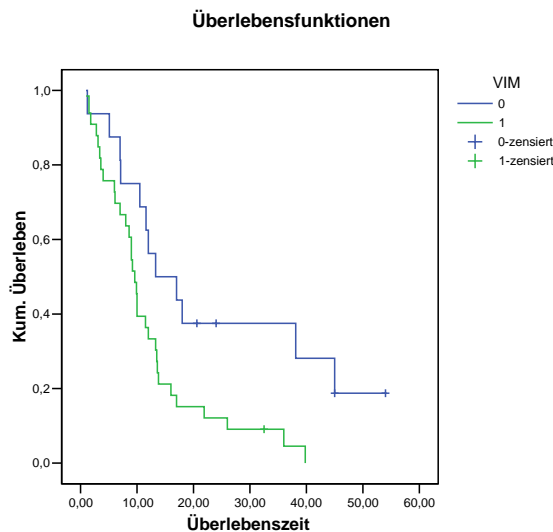
> 80.Perzentile x 3	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren		GPL96: <b>ZEB1</b> .(A) (p=0,02)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 18:** Genexpression der Glioblastome >97. Perzentile x 1,5 der Expression des NG

> 97. Perzentile x 1,5	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL570: <b>TCF3</b> .(F) (p=0,03) GPL8300: <b>VIM</b> .(A) (p=0,01)	GPL96: <b>Zeb1</b> .(A) (p=0,03)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 11: VIM.(A), >97. Perzentile Faktor 1,5, GPL8300, Log Rank (p=0,01)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von VIM der angegebenen Bedingung (>90. Perzentile x 1,5 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnprouben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von VIM der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 19: Genexpression der Glioblastome >97. Perzentile x 2 der Expression des NG**

> 97. Perzentile x2	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren		GPL96: <b>Zeb1</b> .(A) (p=0,006)
EMT-Repressoren		

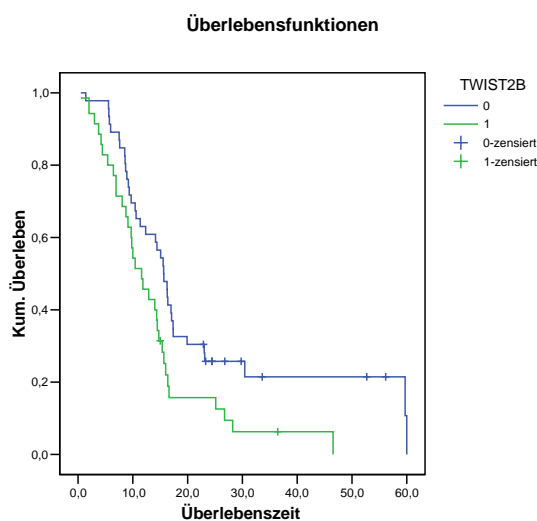
Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

b) kleiner 50. bis kleiner 3. Perzentile

**Tabelle 20:** Genexpression der Glioblastome <50. Perzentile x 0,67 der Expression des NG

< 50.Perzentile x 0,67	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL570: <b>TWIST2.(B)</b> (p=0,01)	
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 12 TWIST2.(B), < 50. Perzentile Faktor 0,67, (GPL 570), Log Rank (p=0,012)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeproben bezüglich der Expressionsstärke von TWIST2 der angegebenen Bedingung (<50. Perzentile x 0,67 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnprouben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeproube bezüglich der Expressionsstärke von TWIST2 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 21:** Genexpression der Glioblastome <50. Perzentile x 0,5 der Expression des NG

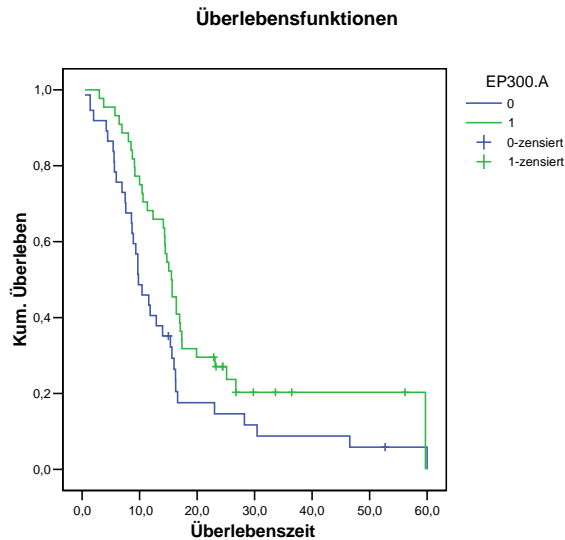
< 50.Perzentile x 0,5	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	GPL570: <b>Zeb2.(A),.(C)</b> (p=0,04),(p=0,04)	
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 22:** Genexpression der Glioblastome <50. Perzentile x 0,33 der Expression des NG

< 50.Perzentile x 0,33	Überleben schlechter	Überleben besser
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren		GPL570: <b>EP300.(A)</b> (p=0,03)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 13: EP300.(A), < 50.Perzentile Faktor 0,33, GPL 570, Log Rank (p=0,033)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von EP300 der angegebenen Bedingung (<50. Perzentile x 0,33 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnprouben) entsprechen.

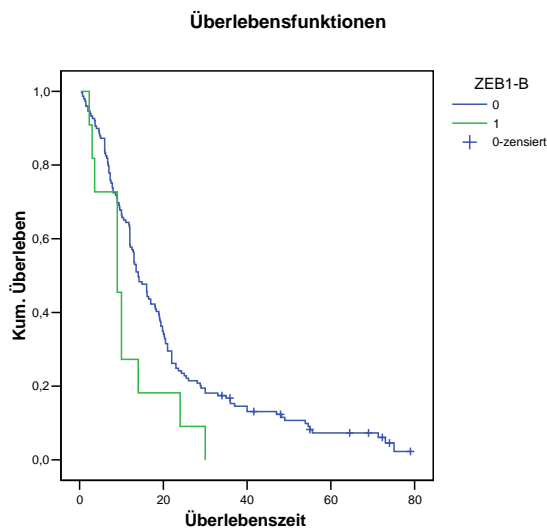
0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von EP300 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 23:** Genexpression der Glioblastome <20. Perzentile x 0,67 der Expression des NG

< 20.Perzentile x 0,67	Überleben schlechter	Überleben besser
EMT-Induktoren	GPL96: <b>ZEB1.(B)</b> (p=0,044)	
EMT-Repressoren	GPL570: <b>LLGL2.(A)</b> (p=0,029)	

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 14: Zeb1.(B), <20.Perzentile Faktor 0,67, GPL96, Log Rank (p=0,044)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der angegebenen Bedingung (<50. Perzentile x 0,33 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnproben) entsprechen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 der Bedingung nicht entsprechen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 24:** Genexpression der Glioblastome <20. Perzentile x 0,5 der Expression des NG

< 20.Perzentile x 0,5	Überleben schlechter	Überleben besser
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren		GPL570: <b>EP300.(A)</b> (p=0,055)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 25:** Genexpression der Glioblastome <20. Perzentile x 0,33 der Expression des NG

< 20.Perzentile x 0,33	Überleben schlechter	Überleben besser
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren		GPL570: <b>EP300.(A)</b> (p=0,0086)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 26:** Genexpression der Glioblastome <3. Perzentile x 0,67 der Expression des NG

< 3.Perzentile x 0,67	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren		GPL570: <b>EP300</b> .(A) (p=0,0105)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 27:** Genexpression der Glioblastome <3. Perzentile x 0,5 der Expression des NG

< 3.Perzentile x 0,5	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren		GPL570: <b>EP300</b> .(A) (p=0,0086)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

Insgesamt sind vereinzelte Korrelationen zwischen Genexpressionsunterschieden und dem Überleben festzustellen. Deutlich durch die verschiedenen Perzentilen und auch durch die verschiedenen Microarrays zieht sich die Tatsache, dass ein erhöhtes Zeb1 mit einem verbesserten Überleben zu korrelieren scheint. Auch eine erhöhte Expression von Zeb2 und TGF $\beta$ -2 korrelieren in den vorliegenden Ergebnissen mit einem längeren Gesamtüberleben. Dies würde nach dem EMT-Konzept bei Karzinomen eigentlich umgekehrt erwartet werden, da EMT-Schlüsselgene das infiltrativere Wachstum fördern und damit ein schlechteres Überleben zur Folge haben müssten.

TCF3, VIM, vor allem aber SNAI2 zeigen bei erhöhter Expression einen Überlebensnachteil, was wiederum mit der EMT-Theorie eines hierdurch bedingteren infiltrativeren Wachstums übereinstimmt.

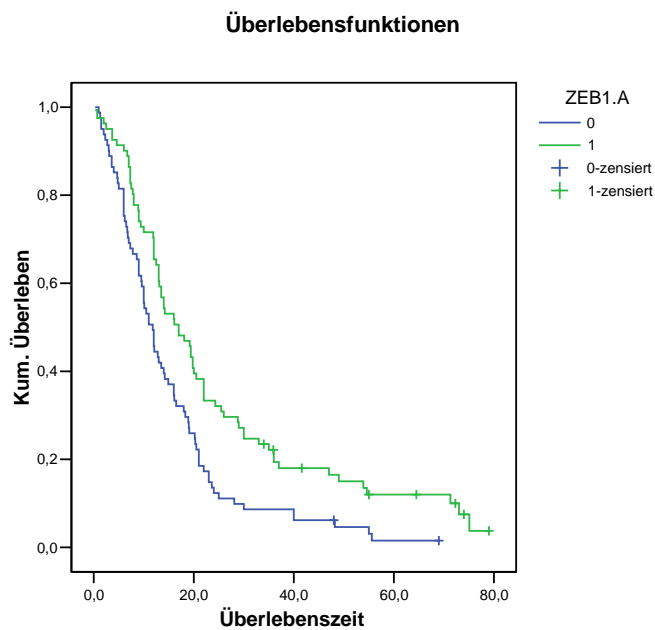
### 3.3.2 Einteilung nach Median

Hierfür wurden die Glioblastopatients selbst als Bezugsgröße gewählt. Die Expression jedes Gens wurde dabei der Größe nach sortiert und bis zum Median als nicht erhöht, darüber als erhöht definiert. Diese Methode wurde zusätzlich zur Perzentilenvariante gewählt, da bei der ersten Variante teilweise sehr unterschiedliche Gruppengrößen entstanden sind.

**Tabelle 28:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome nach Microarraytyp GPL 96

GPL96	erhöht → schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren	<b>TGFB2.</b> (B) (p=0,0248) <b>LEF1.</b> (B) (p=0,0498)	<b>ZEB1.</b> (A),.(B) (p=0,001/0,029)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

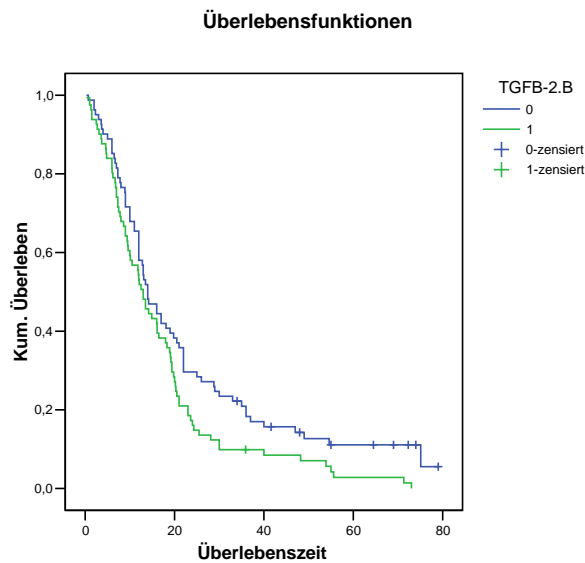


**Abb. 15: ZEB1. (A) GPL 96, Log Rank (p=0,001)**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeproben bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 oberhalb des Medians der Expressionsstärke von ZEB1 bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1 unterhalb des Medians der Expressionsstärke von ZEB1 bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

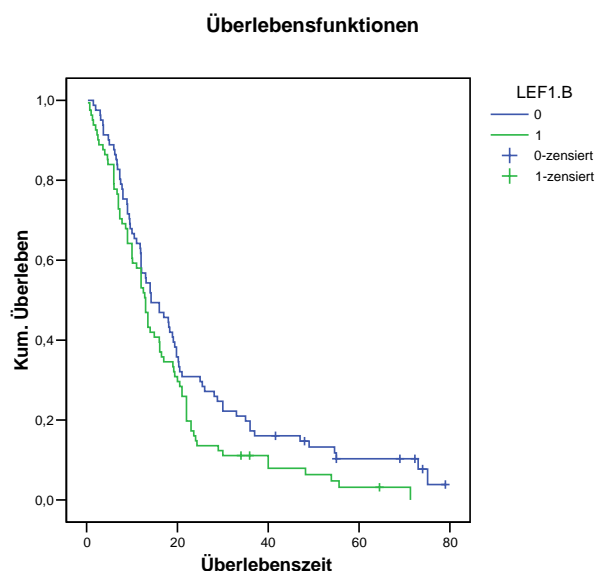


**Abb. 16: TGFB-2.(B), GPL 96, Log Rank ( $p=0,0248$ )**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeproben bezüglich der Expressionsstärke von TGFB-2 oberhalb des Medians der Expressionsstärke von TGFB-2 bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von TGFB-2 unterhalb des Medians der Expressionsstärke von TGFB-2 bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.



**Abb. 17: LEF1.(B), GPL96, Log Rank ( $p=0,0498$ )**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeproben bezüglich der Expressionsstärke von LEF1.(B) oberhalb des Medians der Expressionsstärke von LEF1.(B) bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.



0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von LEF1.(B) unterhalb des Medians der Expressionsstärke von LEF1.(B) bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegt.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 29:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome nach Microarraytyp GPL 570

<b>GPL570</b>	erhöht→schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren		<b>TGFB2.(B)</b> (p=0,0214)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 30:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome nach Microarraytyp GPL 8300

<b>GPL8300</b>	erhöht→schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren	<b>NFKB1.(C)</b> (p=0,0388)	
EMT-Repressoren		<b>LLGL-2</b> (p=0,0040)

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

Auch hier bestätigt sich die Beobachtung, dass Zeb1 bei einer erhöhten Expression mit einem längerem Überleben zu korrelieren scheint. LEF1 und NFKB1 scheinen dagegen ein verkürztes Überleben zu bewirken. Der EMT-Repressor LLGL2 hat beim Microarray GPL 8300 bei erhöhter Expression nach unseren Ergebnissen ein längeres Überleben zur Folge. Widersprüchliche Ergebnisse sind dagegen bei TGFβ2 zu sehen.

Insgesamt muss hierzu jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Ergebnisse nach der Bonferroni-Korrektur (bis auf Zeb 1. (A) beim Genchip GPL96 in der Einteilung nach Median) alle nicht signifikant sind. Außerdem sind diese Ergebnisse jeweils nur in einzelnen Microarrays zu finden.

### 3.3.3 Subgruppenanalyse

Um zu prüfen, ob die gewonnenen Ergebnisse tatsächlich durch den Einfluss der Genexpression zu Stande gekommen sind und nicht aufgrund von anderen Faktoren, wurden weitere Subgruppenanalysen durchgeführt. Hierbei wurde lediglich der Microarraytyp GPL570 verwendet.

#### a) Goldstandard-Therapie

Um einen Einfluss der Therapieunterschiede auf das Gesamtüberleben auszuschließen, wurde speziell die Gruppe von Patienten herausgegriffen, von denen man weiß, dass sie einheitlich mit Operation, Bestrahlung und Temozolomid-Chemotherapie behandelt wurden. Dies war allerdings eine relativ geringe Patientenzahl von nur 45 Individuen.

#### 1. Einteilung nach Perzentilen

**Tabelle 31:** Genexpression der Glioblastome >50. Perzentile der Expression des NG

> 50. Perzentile	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	Faktor 3: <b>TCF3</b> .(A) (p=0,034)	Faktor 1,5: <b>TGFβ2</b> .(E) (p=0,0435) Faktor 3: <b>TGFβ2</b> .(B) (p=0,0028)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 32:** Genexpression der Glioblastome >80. Perzentile der Expression des NG

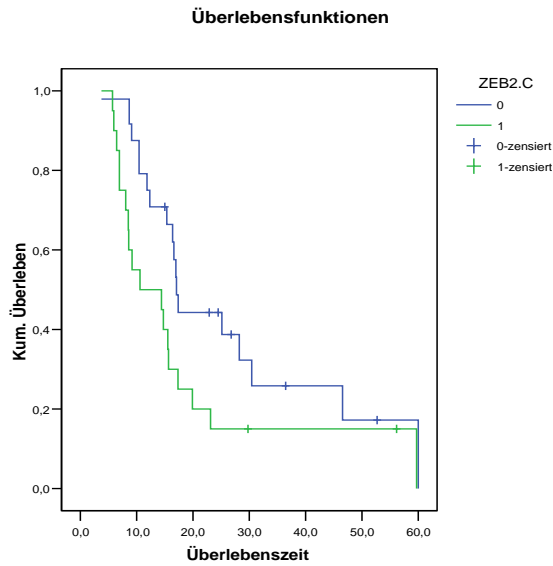
> 80. Perzentile	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	Faktor 2: <b>VIM</b> .(B) (p=0,04)	Faktor 2: <b>TGFβ2</b> .(B) (p=0,0008)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

**Tabelle 33:** Genexpression der Glioblastome <50. Perzentile der Expression des NG

< 50. Perzentile	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren	Faktor 0,5: <b>ZEB2</b> .(C) (p=0,05)	
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 18: Goldstandard Zeb2.(C), <50. Perzentile Faktor 0,5 (GPL 570), Log rank: 0,05**  
 1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB2.(C) der angegebenen Bedingung (<50. Perzentile x 0,5 bezogen auf die Vergleichsproben der gesunden Gehirnproben) entsprechen.  
 0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB2.(C) der Bedingung nicht entsprechen.  
 Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

**Tabelle 34:** Genexpression der Glioblastome <20. Perzentile der Expression des NG

< 20.Perzentile	schlechteres Überleben	besseres Überleben
EMT-Induktoren		
EMT-Repressoren	Faktor 0,67: <b>LLGL2.(A)</b> (0,0001)	

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

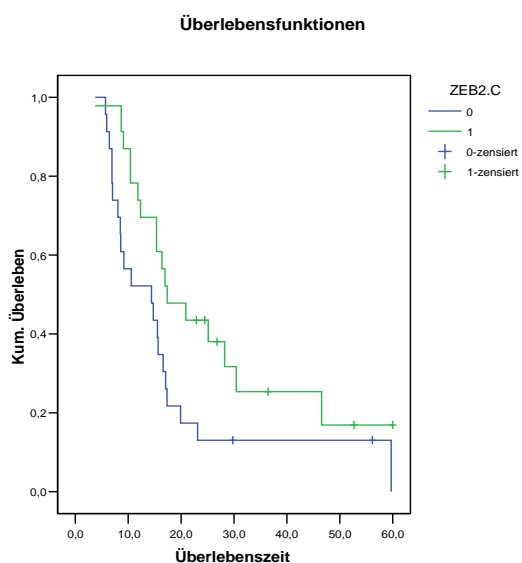
Zusammenfassend kann man sagen, dass auch diese Untergruppe von Patienten, die mit der Goldstandardtherapie behandelt wurden, ähnliche Tendenzen aufweist. Die einzelne Gruppengröße fällt zwar bis auf bei LLGL2.(A) und Zeb2.(C) unter die Grenze von 10, jedoch stimmt die Tendenz dennoch mit der Gesamtpatientengruppe überein, sodass man daraus schlussfolgern kann, dass trotz Therapieunterschieden ähnliche Phänomene bezüglich der Korrelation zwischen Überleben und Genexpression beobachtet werden können.

## 2. Einteilung nach Median (GPL570)

**Tabelle 35:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome in der Goldstandard-Gruppe

GPL570	erhöht → schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren		<b>Zeb2.(C)</b> ( $p=0,0467$ )
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).



**Abb. 19: Goldstandard, Einteilung nach Median, ZEB2.(C), Log Rank ( $p=0,0467$ )**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB2.(C) oberhalb des Medians der Expressionsstärke bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB2.(C) unterhalb des Medians der Expressionsstärke bezogen auf alle Patientendaten des GPL 96 liegen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist hierfür die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

Die Ergebnisse aus der Analyse nach Perzentileinteilung spiegeln sich in der Einteilung nach Median nicht wider. Lediglich ZEB2 zeigt bei erhöhter Expression ein besseres Überleben, was nicht zu der EMT-Theorie passt. Doch auch dieses Ergebnis ist nach Bonferoni-Korrektur nicht mehr signifikant. Um für diese Subgruppenanalyse eine eindeutige Aussage zu treffen, müssten mehr Daten miteinander verglichen werden.

b) Altersanalyse

Um zu sehen, inwieweit die Ergebnisse durch das Alter beeinflusst werden, wurden die Analysen nach Alter geschichtet nochmals durchgeführt. Hierbei kam für eine ausreichende Gruppengröße lediglich die Auswertung nach Median zum Einsatz. Dazu wurde zunächst der Altersmedian ermittelt, um anhand dessen zwei Gruppen zu bilden, die dann gesondert nach Kaplan Meier ausgewertet wurden. Der Microarraytyp 8300 hatte eine zu geringe Datengröße mit Altersangabe (n=21), sodass nur Daten der Microarraytypen GPL 96 (n=162) und GPL 570 (n=84) wie folgt ausgewertet wurden:

bei GPL96 war der Altersmedian 55. Damit wurden alle Glioblastomproben von Patienten mit <55.Lebensjahr als jung und >=55.LJ als alt eingestuft.

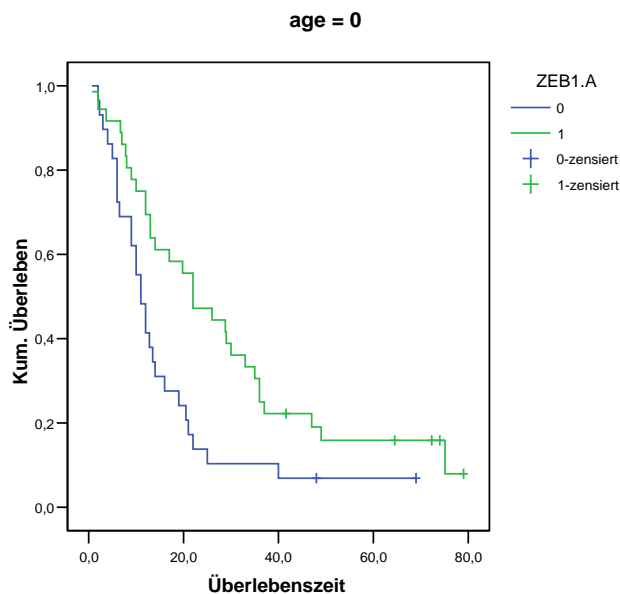
bei GPL570 lag der Altersmedian bei 52,5. Damit wurden alle Glioblastomproben von Patienten mit <52,5 Lebensjahr wurde als jung, >= 52,5.Lebensjahr als alt eingestuft.

**Tabelle 36:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome unter Berücksichtigung des Alters für Microarray GPL96

<b>GPL96</b>	erhöht → schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren	jung: SNAI2 (p=0,03) LEF1.(B) (p=0,001)	jung: ZEB1.(A),(C) (p=0,008/0,02) alt: ZEB1.(B) (p=0,03) TWIST1 (p=0,03)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

## Überlebensfunktionen



**Abb. 20 Altersanalyse (jung) Einteilung nach Median, ZEB2.(C), Log Rank 0,008**

1 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1.(A) oberhalb des Medians der Expressionsstärke bezogen auf die junge Patientengruppe (age=0) des GPL 96 liegen.

0 entspricht der Überlebenskurve von Glioblastompatienten, deren Gewebeprobe bezüglich der Expressionsstärke von ZEB1.(A) unterhalb des Medians der Expressionsstärke bezogen auf die junge Patientengruppe des GPL 96 liegen.

Zensiert wurden hierbei die Fälle, die zum Zeitpunkt des Studienendes noch lebten. Im Diagramm ist hierfür die Zeitspanne von Diagnosestellung zum Beobachtungsende eingetragen. Die Zeiteinheit für das Überleben ist in Monaten angegeben.

Insgesamt fällt auf, dass in der jüngeren Patientengruppe ein größerer Einfluss der Expression auf das Gesamtüberleben zu sehen ist. Auch entspricht dies eher den Resultaten des gesamten Patientenkollektivs. Dabei geht es jedoch nur um Tendenzen, da die Ergebnisse nach Bonferoni-Korrektur nicht mehr signifikant sind. Anhand der einzelnen Gene sollen die Ergebnisse genauer erläutert werden:

Bei **Zeb1.(A)** und **Zeb1.(B)** war ebenso in der Gesamtgruppe bei der Einteilung nach Median ein Unterschied zu erkennen. Bei der altersgeschichteten Analyse treten allerdings nur bei den jüngeren Patienten bei Zeb1. (A) und Zeb1.(C) deutliche Unterschiede auf. Bei Zeb1.(B) dagegen traten ausschließlich bei den älteren Patienten deutliche Unterschiede auf.

Für **SNAI2** gab es bei der Gesamtgruppe in der Einteilung nach Median keine signifikanten Resultate, jedoch bei der Einteilung in Perzentilen sowohl bei >50.Perzentile Faktor 1,5 und

Faktor 2 als auch bei >80. Perzentile Faktor1,5 und 2. Bei der altersgeschichteten Analyse sieht man die Unterschiede nur bei den jüngeren Patienten. Hier zeigt sich wie auch in der Gesamtgruppe entsprechend der EMT-Theorie ein Überlebensnachteil bei erhöhtem SNAI 2. **TWIST1** hingegen zeigt im älteren Patientenkollektiv ein Überlebensvorteil. Diese Aussage kann weder für die jüngere Gruppe, noch für das Gesamtkollektiv getroffen werden. **LEF1.(B)** wiederum deutet auch in der Gesamtgruppe auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression und verkürztem Überleben hin. In der altersgeschichteten Analyse ist dieser Zusammenhang nur bei den jüngeren Patienten (bis 50. Lebensjahr) zu sehen.

**Tabelle 37:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome unter Berücksichtigung des Alters für Microarray GPL570

<b>GPL570</b>	erhöht→schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren		jung: TGFβ2.(B) (p=0,07)
EMT-Repressoren	alt: EP300.(A) (p=0,0007)	

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).

Zwischen den beiden Microarraytypen gibt es hier leider keine Übereinstimmungen in den Ergebnissen. Bei der Gesamtgruppe hatte TGFβ2.B als einziges Gen ein signifikantes Resultat. In der altersgeschichteten Analyse ist lediglich bei den jüngeren Patienten eine Tendenz zu finden, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Der hier gezeigte signifikante Unterschied für das Gen EP300.A, der lediglich bei den älteren Patienten auftritt, ist ebenso in einigen Gesamtgruppenanalysen nach Perzentileneinteilung zu finden, nicht jedoch in den Untersuchungen mit der Einteilung nach Median.

### c) Methylierungsstatus

Bei manchen Expressionsdaten von Gewebeproben war der zugehörige Methylierungsstatus des MGMT-Promotors angegeben. Da hierbei in der Literatur mehrfach ein großer Einfluss auf das Überleben gesehen wird (Etcheverry et al. 2010), entschieden wir uns, dies in der Subgruppenanalyse ebenso mit zu berücksichtigen. Die Angaben waren nur beim Microarraytyp GPL 570 zu finden. Aufgrund der geringen Gruppengrößen eignete sich hier lediglich die Analyse mit der Einteilung nach Median.

**Tabelle 38:** Einfluss der Genexpression auf das Outcome unter Berücksichtigung des Methylierungsstatus

<b>GPL570</b>	erhöht→schlechteres Überleben	erhöht → besseres Überleben
EMT-Induktoren	u: NFKB2.(A) (p=0,02)	u: ZEB2.(C) (p=0,01) TCF3.(F) (p=0,02) m: NFKB1 (p=0,005)
EMT-Repressoren		

Die Zusatzbezeichnungen .(A), .(B) etc. beziehen sich auf die entsprechenden Sondensätze (siehe Kapitel Material und Methodik).  
m=methyliert, u= nicht methyliert.

Diese Signifikanzen entsprechen größtenteils nicht der Gesamtgruppe. Lediglich in der Perzentileneinteilung kann man ein übereinstimmendes Ergebnis bezüglich des Gens ZEB2.(C) finden. In der Einteilung nach Median war in der Gesamtpatientengruppe ausschließlich bei TGFβ2.(B) Hinweise auf eine Korrelation zwischen Expression und Überleben zu erkennen.

Letztlich ist die Subgruppe mit 21 Probanden mit methyliertem MGMT und 21 Probanden mit nicht methyliertem MGMT relativ klein, sodass die Aussage, die damit getroffen werden kann, nicht sehr stichhaltig ist.



## 4 Diskussion

Die schlechte Prognose des Glioblastoms ist unter anderem durch das infiltrative Wachstum wesentlich bestimmt. Insbesondere die Tatsache, dass einzelne Zellen in das gesunde Umgebungshirngewebe wachsen und sich dort einer operativen Therapie entziehen, begründen die therapeutische Problematik. Diese Zellen proliferieren teilweise über Wochen und Monate kaum, sodass sie auch den postoperativen Therapien, wie Bestrahlung und Chemotherapien standhalten und schließlich Lokalrezidive bilden, welche nur noch schwer kontrollierbar sind und meist rasch zum Tode führen (Jellinger, 1978).

Die tumorbiologischen Grundlagen für das infiltrative Verhalten sind seit Jahren Gegenstand der Forschung. Die Entschlüsselung ist bislang nur in Ansätzen gelungen. Auch wurden viele Therapiebemühungen diesbezüglich unternommen. Es gibt jedoch noch keine Medikamente, welche nachweislich das infiltrative Wachstum der Tumorzellen inhibieren.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag in der Diskussion zur Frage der möglicherweise zugrunde liegenden Mechanismen der Migration und Infiltration von Glioblastomzellen leisten. Bei einer anderen Gruppe von Tumoren, den Karzinomen, findet die Frage der Metastasierungsmechanismen eine mögliche Antwort in der Hypothese der EMT (Epithelial-Mesenchymalen Transition). Dies wird in verschiedenen Arbeiten ausgeführt, so zum Beispiel in einer Studie von Rosivatz, in welcher die Rolle der EMT im Magenkarzinom erläutert wird (Rosivatz et al., 2002). Mehrfach war auch das Mammakarzinom, Prostatakarzinom oder auch das Lungenkarzinom Gegenstand der Forschung (Yang et al., 2004; Graham et al., 2008; Kamitani et al. 2009)

Zwar handelt es sich bei dem Glioblastom um einen neuroektodermalen, also weder um einen epithelialen noch um einen mesenchymalen Tumor, dennoch konnten bereits einige Signalkaskaden und Signalmoleküle, welche für die EMT entscheidend sind, auch in Glioblastomen nachgewiesen werden (Würfel, 2009).

Hierzu wurde bereits beispielsweise eine experimentelle Arbeit angefertigt, in welcher dies insbesondere in Bezug auf das Schlüsselgen SNAIL1 an 4 Tumorzelllinien untersucht wurde (Würfel, 2009). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass zahlreiche EMT-induzierende Gene und typische Signalwege auch im Gehirntumor exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand einer Metaanalyse der Genexpressionsdaten einer großen Anzahl von Glioblastomgewebeproben überprüft werden, inwieweit hieraus ggf.

Aussagen über die mögliche Bedeutung von EMT-Schlüsselgenen in menschlichen Glioblastomen getroffen werden können.

Darüber hinaus wird hier die Frage geprüft und diskutiert, ob eine entsprechend erhöhte, bzw. erniedrigte Expression von Genen, welche als EMT-fördernd oder -inhibierend gelten, möglicherweise auch mit klinischen Überlebensdaten korreliert.

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich hieraus die folgenden fünf Thesen:

### **These 1**

Im Glioblastom existiert, wie bei Karzinomen, ein EMT-ähnlicher Mechanismus.

### **These 2**

Gliome der Grade I-III weisen Parallelen zum Glioblastom in der Genexpression von EMT-Schlüsselgenen auf.

### **These 3**

ZEB1 spielt bei der Entstehung von Hirntumoren eine bedeutende Rolle.

### **These 4**

Eine veränderte Expression der EMT-fördernden und -hemmenden Gene hat eine Auswirkung auf die Gesamtprognose beim Glioblastom.

### **These 5**

Die Ergebnisse sind zwar durch andere Einflussfaktoren, wie Therapieunterschiede und Alter geprägt, jedoch auch unabhängig von diesen aussagekräftig.

## Zu These 1

Eine große Anzahl an Genexpressionsdaten von Glioblastomproben wurde gesammelt und den entsprechenden Genexpressionsanalysen von gesundem Hirngewebe gegenübergestellt.

Die hierfür ausgewählten Gene resultieren aus intensiven Literaturrecherchen. Dabei bezogen wir uns auf Quellen, in denen entsprechend den aus Karzinomen bekannten genetischen Zusammenhängen, welche bei der sogenannten EMT eine entscheidende Rolle spielen, eine Gruppe von EMT-fördernden und EMT-hemmenden Gene formiert wurde. Diese sollten in der vorliegenden Arbeit bezüglich einer möglicherweise ähnlichen Rolle beim Glioblastom geprüft werden.

Es sollte also in einem ersten Schritt getestet werden, inwieweit entsprechende Genexpressionsunterschiede zwischen dem normalen Hirngewebe und den veränderten Zellen eines Glioblastoma multiforme existieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genexpressionsdaten von insgesamt 293 Patienten mit einem Glioblastom 207 Gewebeproben einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Diese Daten wurden aus insgesamt 8 Studien zusammengetragen. Obwohl diese Analysen in verschiedenen Forschungszentren teilweise auch verschiedener Länder durchgeführt wurden, resultieren daraus viele Übereinstimmungen, die hier näher erläutert werden sollen.

Idealerweise sollte man erwarten, dass die Ergebnisse unabhängig von den verwendeten Sondensätzen, den unterschiedlichen Microarrays, zum gleichen Ergebnis kommen, zumal bei allen drei Microarrays nach den bekannten Protokollen von Affymetrix gearbeitet wurde. Dies ist jedoch nur eingeschränkt der Fall.

Bei der Auswertung der Sondensätze der Microarrays GPL96 und GPL570 wurden viele Übereinstimmungen gesehen.

In beiden gemeinsam sind TGF $\beta$ 2, Zeb1, SNAI2, TCF3, ITGA4, LEF1 und VIM erhöht gegenüber dem Normalgewebe. Diese Gene sind allesamt sogenannte EMT-fördernde Gene, kommen jedoch in unterschiedlichen Signalwegen der EMT vor. Zu einer widersprüchlichen Aussage kommt es im Microarray GPL570 beim EMT-Schlüsselgen Zeb2. Dieses gilt als sogenannter EMT-Induktor und müsste damit im infiltrativen Glioblastom deutlich stärker exprimiert sein als im Normalhirngewebe.

Zeb2 ist jedoch nach der vorliegenden Analyse erniedrigt im Vergleich zum normalen Hirngewebe. Solche dem Konzept der EMT eher widersprechende Ergebnisse scheinen jedoch in der vorliegenden Arbeit insgesamt eine Ausnahme darzustellen.

Eine weitere Beobachtung ist, dass EMT-Repressoren gegenüber den EMT-fördernden Genen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen, da lediglich bei der Auswertung von Microarray GPL570 die EMT-Repressoren LLGL2 und EP300 eine erniedrigte Expression

aufweisen, während erhöht exprimierte EMT-Induktoren durchweg in einer deutlich höheren Zahl zu finden sind.

Dass nicht immer die Verteilung von EMT-Induktoren und EMT-Repressoren unseren Erwartungen entsprechen, bzw. die Übereinstimmungen zwischen den Microarrays teilweise sehr differieren, könnte folgende Ursachen haben:

1. Es könnten möglicherweise unterschiedliche Studienbedingungen für uneinheitliche Ergebnisse verantwortlich sein. Dies lässt sich retrospektiv nur unvollständig beurteilen, da die veröffentlichten Informationen nur einen eingeschränkten Zugang zu den Studienbedingungen zulassen.
2. Es könnte auch eine mögliche Variabilität in der Ausprägung des EMT-Phänotyps vorliegen, wie teilweise auch in Karzinomen beobachtet wurde. So zum Beispiel bei Mamma-Karzinomen, deren Metastasen teilweise eine epitheliale Morphologie aufweisen (Tarin et al., 2005; Thompson et al., 2005), was impliziert, dass nicht nur EMT-abhängige Mechanismen für die Metastasierung verantwortlich sind. Eine andere Erklärung hierfür könnte sein, dass Zellen ihre mesenchymalen Eigenschaften ablegen, sobald sie ihr Zielorgan erreicht haben (Yang und Weinberg, 2008).

Folgende Gene sind sowohl über die Vielzahl an Daten in den verschiedenen Studien und Auswertungen als auch über die verschiedenen SONDENSÄTZE übereinstimmend überexprimiert in den Glioblastomgewebeproben gegenüber dem Normalgewebe nachzuweisen: TGF $\beta$ 2, TCF3 und VIM.

TGF $\beta$ 2 nimmt dabei eine zentrale Rolle in den verschiedenen EMT-Signalwegen ein und induziert wiederum selbst andere EMT-Induktoren, u.a. SNAI1, Zeb1, Zeb2 und TCF3 (Thiery und Sleeman, 2006; Miyazono, 2009).

Vimentin (VIM) ist ein Marker mesenchymaler Zellen und der EMT sowie wichtiger Bestandteil des Aktin-Zytoskeletts (Thiery und Sleeman, 2006)

Ob die Höhe der Expression der einzelnen Gene eine Konsequenz für den Patienten und dessen Krankheitsverlauf hat, soll in den Erläuterungen zu der These 4 diskutiert werden.

Beurteilung These 1 ("Im Glioblastom existiert, wie bei Karzinomen, ein EMT-ähnlicher Mechanismus")

Insgesamt kann diese These angenommen werden. Viele der Gene und Signalwege, welche für eine EMT sprechen, konnten in einer erhöhten Expression im Glioblastom gefunden werden.

Im Gegenzug findet sich keine bedeutsame Expression von Genen, welche als EMT-Antagonisten fungieren.

### zu These 2

In einem zweiten Schritt wurde ein Vergleich zwischen der Genexpression von Glioblastomen und Gliomen der WHO-Grade I-III gezogen. Dabei wurden aus der Gruppe Grad I Pilozytische Astrozytome (n= 40) gewählt, aus der Gruppe Grad II Oligodendrogliome (n=38) aus der Gruppe Grad III Anaplastische Astrozytome gewählt (n=19). Oligodendrogliome der Gruppe Grad III (n=12) und Astrozytome aus der Gruppe Grad II (n=7) wurden hier aufgrund der geringen Anzahl aus der Wertung herausgenommen.

Dem gegenübergestellt wurden Daten aus Glioblastomgewebeprobe, welche nochmals in drei Gruppen unterteilt wurden, nämlich in Erstdiagnose (n=82), Rezidivdiagnose (n=20) und GBM-Gesamt (=Erstdiagnose + Rezidivdiagnose + unbekannter Diagnosezeitpunkt (n= 163) ). Diese Unterteilung wurde vor dem Hintergrund vorgenommen, dass Tumore unter Therapien Einflüssen ausgesetzt sind, welche die Tumorgenetik nachweislich beeinflussen.

Beispielsweise können auch manche routinemäßig eingesetzte Tumorbehandlungen die EMT und damit invasives Wachstum und Metastasierung fördern, so zum Beispiel eine Chemotherapie mit Oxaliplatin, welche eine EMT in kolorektalen Karzinomzelllinien induzieren kann (Yang et al., 2006).

Daher fand in dieser Arbeit lediglich eine Gegenüberstellung der niedriggradigen Gliome zu den erstdiagnostizierten Grad IV Glioblastomen statt.

Vielleicht würde man annehmen, dass die Unterschiede in der Genexpression vom normalen Hirngewebe über die Grade I-IV kontinuierlich zu nimmt. Da die Pathogenese jedoch zwischen den einzelnen Tumorentitäten sehr unterschiedlich ist und lediglich ein maligne Transformation zwischen Grad II über Grad III zu Grad IV bekannt ist, ist dies nicht zu erwarten.

Interessanterweise sind laut den vorliegenden Analysen die Unterschiede bezüglich der Gene, welche im Zusammenhang mit der EMT stehen, zwischen Grad I und Grad IV weniger signifikant als zwischen Grad IV und Grad II bzw. Grad III, was man aufgrund des pathogenetischen Hintergrundes so primär nicht erwarten würde.

So unterscheiden sich die beiden Tumorgruppen Grad I und Grad IV lediglich in fünf der untersuchten Gene signifikant. Die Expression der Gene TGF $\beta$ 2, TCF3 und TWIST1 sind im Glioblastom im Vergleich zu den pilozytischen Astrozytomen erhöht, umgekehrtes gilt für ZEB1 und VIM.

Dagegen können zwischen den Grad IV- und Grad II bzw. Grad III-Tumoren deutlichere Genexpressionsunterschiede gesehen werden.

Ähnlich wie auch im Vergleich zum Normalgewebe weist das Glioblastom auch gegenüber Grad I-III Gliomen eine erhöhte Expression von TGF $\beta$ 2 und TCF3 auf.

Besonders auffällig sind bei dieser Analyse folgende Gene:

Vimentin - ein mesenchymaler Marker: Dieser ist wider Erwarten beim pilozytischen Astrozytom deutlich gegenüber dem Glioblastom erhöht. Bei den Grad II- und III-Gliomen ist Vimentin dagegen erwartungsgemäß niedriger exprimiert als beim Glioblastom. Noch eindrucksvoller erscheint das Gen Zeb1, welches gegenüber dem Glioblastom in den Gliomen Grad I-III deutlich überexprimiert ist. Dazu folgen im nächsten Abschnitt nähere Erläuterungen.

Beurteilung der These 2: ("Gliome der Grade I-III weisen Parallelen zum Glioblastom in der Genexpression von EMT-Schlüsselgenen auf.")

Diese These kann nur bedingt bestätigt werden. Eher müsste man sagen, dass ähnlich wie im Vergleich zum Normalgewebe das Glioblastom eine signifikant erhöhte Expression der EMT-fördernden Gene gegenüber den Gliomen der Grade I-III aufweist, was wiederum mit der Tatsache korreliert, dass Grad II und Grad III-Tumore einen prognostisch deutlich günstigeren Verlauf aufweisen. Um jedoch eine genauere Einschätzung der Rolle der EMT in den Gliomen der Grade I-III vornehmen zu können, müsste zusätzlich ein Vergleich der Gliome I-III zum Normalgewebe gezogen werden.

### zu These 3

Es handelt sich bei TCF8 (Zeb1) um einen Zinkfingertranskriptionsfaktor, welcher Teil des TGF $\beta$ -Signalweges ist. Typischerweise induziert wird es unter anderem durch TGF $\beta$ , aber auch durch SNAI1 und Botenstoffen wie Prostaglandin E2, HIF1a und  $\beta$ . (Peinado et al., 2007; Hugo et al., 2011).

Zeb1 selbst ist in der Lage, E-Cadherin zu supprimieren und damit die EMT einzuleiten (Graham et al., 2008; Hugo et al., 2011). Umgekehrt konnte auch festgestellt werden, dass bei einer Herunterregulierung von Zeb1 epitheliale Marker wie E-Cadherin wieder exprimiert werden (De Wever et al., 2008)

Im Vergleich zum normalen Hirngewebe ist Zeb1 basierend auf Mikroarraydaten im Glioblastom oft erhöht (Staege MS, persönliche Mitteilung). Dies war der Ausgangspunkt, der

zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich dieses Themas veranlasste, was die besondere Aufmerksamkeit für dieses Gen begründet.

Zu erwarten wäre auch eine deutliche Überexpression gegenüber Gliomen der Grade I-III, wie es auch bei den meisten anderen EMT-induzierenden Genen nach den Analysen der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

Zeb 1 stellt hier jedoch eine Ausnahme dar. Es ist in allen 3 Gruppen der Gliome der Grade I-III signifikant höher exprimiert als im Glioblastom, am höchsten bei den pilozytischen Astrozytomen.

Zum einen kann hieraus möglicherweise geschlossen werden, dass für eine Induktion der EMT ein Signalweg nicht isoliert betrachtet werden kann, sondern erst das Zusammenspiel verschiedener Aspekte zielführend ist. Oder aber man könnte daraus folgende Interpretation formulieren:

Für die Entstehung und Pathogenese eines Hirntumors scheint Zeb1 eine wichtige Rolle zu spielen, jedoch für die Krankheitsprognose nicht von Nachteil zu sein. Im Gegenteil, ggf. hat es sogar einen positiven Effekt. So müsste man davon ausgehen, dass Zeb1 neben der Rolle in der EMT noch weitere wichtige Funktionen innehat.

In einer Arbeit (Postigo et al., 2003) wird beispielsweise erläutert, dass Zeb1 als Transkriptionsrepressor fungiert und dabei je nach Zelltyp unterschiedliche Effekte haben kann. So führt Zeb1 in hämatopoetischen Zellen zu einer Herunterregulierung von Interleukin 2, Immunglobulin und CD4, während in mesenchymalen Zellen das Gen p73 inhibiert wird.

Als zusätzlicher interessanter Aspekt kommt in den Experimenten zum Tragen, dass Zeb1 nur in der Anwesenheit von TGF $\beta$  seine Funktion als Transkriptionsrepressor ausübt (Postigo et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit kann man jedoch sehen, dass TGF $\beta$ 2 in den Gliomen der Grade I-III deutlich weniger hoch als im Glioblastom exprimiert ist. Dies könnte ein Erklärungsansatz dafür sein, weshalb hier der repressive Effekt von Zeb1 möglicherweise nicht zum Tragen kommt.

Beurteilung der These 3: " ZEB1 spielt bei der Entstehung von Hirntumoren eine bedeutende Rolle."

Es konnte in den durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass auch bei der Analyse einer großen Datenmenge das Gen Zeb 1 bei Glioblastomen gegenüber dem normalen Hirngewebe signifikant höher exprimiert wird. Die genaue Bedeutung des Gens und die Rolle,

welche es in der Entstehung von Glioblastomen hat, konnte nicht vollständig geklärt werden. Im Gegenteil, durch die Tatsache, dass Zeb 1 in niedriggradigen Gliomen sogar noch deutlich höher als im GBM exprimiert ist, wurden neue Fragen aufgeworfen. Die Antworten hierzu bleiben zum aktuellen Zeitpunkt spekulativ und bedürfen weiterer Untersuchungen.

#### zu These 4

Bereits in verschiedenen Tumoren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen einem EMT-ähnlichen Phänotyp und einer ungünstigen Krankheitsprognose besteht.

In diesem Zusammenhang wird unter anderem die Theorie aufgestellt, dass es eine Verknüpfung zwischen dem EMT-Programm und CSCs (Cancer Stem Cells) existiert, was bedingen könnte, dass auch das Durchlaufen der EMT zu Therapieresistenzen führt (Hollier et al., 2009). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Ovarialzellkarzinomzellen gegenüber Paclitaxel resistent waren, welche eine hohe Expression an Twist und Snail aufwiesen (Kajiyama et al., 2007). Dies mag beispielsweise daran liegen, dass der Eintritt der Apoptose, welche durch Therapien ausgelöst werden soll, nach Aktivierung der EMT in den Zellen eher verhindert wird (Hollier et al., 2009).

Um zu überprüfen, ob auch Zusammenhänge zwischen Genexpression der EMT-Marker und einer Krankheitsprognose bei Glioblastomen besteht, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Untersuchungen angestellt.

Über unterschiedliche Methoden wurden zunächst verschiedene Definitionen erstellt, um auszudrücken, wann ein Gen im Vergleich zum Normalgewebe als erhöht exprimiert gelten soll, um diese dann in Kaplan Meier-Überlebensanalysen mit klinischen Daten zu korrelieren und auszuwerten.

Zwar ergibt die durchgeführte Untersuchung leider kein einheitliches Bild zwischen den unterschiedlichen Microarrays, jedoch zeigt sich über verschiedene Methoden hinweg die Aussage, dass eine erhöhte Expression von TCF3, VIM und SNAI2 bei Patienten mit verkürztem Überleben zu finden ist. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass Zeb1, Zeb2 und TGFβ-2 erhöht exprimiert zu sein scheinen bei Patienten mit verlängertem Überleben.

Am deutlichsten ist diese Beobachtung bei Zeb1. Die Beobachtung, dass eine erhöhte Zeb1-Expression mit einem verlängerten Überleben korreliert, findet sich in allen Microarrays und lässt sich sowohl mit der Perzentilen- als auch mit der Median-Methode nachweisen. Dies



passt auch zu der vorab erläuterten Beobachtung, dass Zeb1 in Gliomen der Grade I-III eine deutlich höhere Expression aufweist als im prognostisch deutlich ungünstigeren Glioblastom.

Generell muss darauf hingewiesen werden, dass nach der durchgeführten Bonferroni-Korrektur nahezu keine der Ergebnisse signifikant waren, sodass hier insgesamt nur von Tendenzen gesprochen werden kann.

#### Beurteilung der These 4:

"Eine veränderte Expression der EMT-fördernden und -hemmenden Gene hat eine Auswirkung auf die Gesamtprognose beim Glioblastom."

Auch diese These trifft nicht uneingeschränkt zu. Es gibt durchaus Hinweise, dass eine hohe Expression EMT-fördernder Gene eine ungünstige Prognose bedeutet. Jedoch finden sich umgekehrt hierzu widersprechende Aussagen, sodass man wie auch bei den Karzinomen davon ausgehen kann, dass die EMT nur ein Mosaikstein in der Erklärung für invasives Wachstum, Metastasierung und ungünstigem Krankheitsverlauf darstellt.

#### zu These 5

Da bei der Frage nach der Prognose viele Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Therapie eine Rolle spielen, gingen wir zusätzlich darauf ein, ob die Tendenzen, welche wir in den Überlebensanalysen fanden, wirklich rein auf der unterschiedlichen Expression der Gene basiert, oder ob andere Einflussfaktoren wie ein unterschiedliches Alter oder eine bestimmte Therapie die beobachteten Unterschiede aufheben.

In einer Subgruppenanalyse wurden deshalb exklusiv Daten von Patienten ausgewertet, welche mit der sogenannten aktuellen "Goldstandardtherapie" behandelt wurde. Dabei konnten viele Übereinstimmungen mit den Auswertungen des gesamten Patientenkollektivs gesehen werden, auch wenn die Gruppengröße teilweise sehr klein war.

Interessante Resultate ergaben sich aus der altersgeschichteten Subgruppenanalyse: Hier fällt auf, dass sich insbesondere bei den jüngeren Patienten (<50.LJ) Expressionsunterschiede in der Überlebensprognose niederschlagen. Genauso wie in dem gesamten Patientenkollektiv scheint eine erhöhte Expression von ZEB1 mit einem verlängerten Überleben korreliert zu sein. Genauso verhält es sich mit TGF $\beta$ 2 und TWIST1, wobei letzteres im Gesamtkollektiv keine Übereinstimmung zeigte.

Umgekehrt hat eine erhöhte Expression von SNAI2 und LEF1 in der Gruppe der jüngeren Patienten eine verkürzte Überlebensdauer zur Folge. Bei den älteren Patienten war wiederum ein Unterschied bei der Expression des Gens EP300 auffällig, hierbei zeigte sich nur in diesem Patientenkollektiv die Tendenz eines schlechteren Überlebens bei Überexpression. Insgesamt ist dies jedoch eher eine Ausnahme, da ansonsten bei den von uns verwendeten Daten bei älteren Patienten keine relevante Korrelation von Genexpression der EMT-Marker und Überleben gesehen werden konnte.

Bereits seit mehreren Jahren ist bekannt, dass eine Methylierung des MGMT-Promotors mit einem längeren Überleben verbunden ist, da hierdurch das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Temozolomid entscheidend beeinflusst wird (Etcheverry et al., 2010). Für eine dritte Subgruppenanalyse wurde daher der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors berücksichtigt. Dabei zeigte sich keinerlei Korrelation zu den Auswertungen des gesamten Patientenkollektivs. Da sich für die MGMT-Promotoranalyse jedoch insgesamt nur 21 Proben eigneten, kann diese Analyse nicht als aussagekräftig gewertet werden.

Beurteilung der These 5: " Die Ergebnisse sind zwar durch andere Einflussfaktoren, Therapieunterschiede und Alter geprägt, sind jedoch auch unabhängig davon aussagekräftig."

Es wurden hier sicherlich nicht alle Einflussfaktoren berücksichtigt. Es zeigt sich jedoch, dass bei verschiedenen Subgruppenanalysen ähnliche Ergebnisse, wie im Gesamtkollektiv zu sehen sind. Die teilweise sehr kleinen Gruppengrößen erlauben hier nur von Tendenzen zu sprechen, um eine eindeutige Beurteilung der These abzugeben, müssten größere Gruppen miteinander verglichen werden. Hierfür waren zu wenige klinische Daten zu den entsprechenden Genexpressionsdaten verfügbar.

## 5. Zusammenfassung

Das Glioblastom stellt eine der aggressivsten Tumorarten des Menschen dar und bedeutet für den betroffenen Patienten zum aktuellen Zeitpunkt trotz intensiver Therapie meist eine sehr schlechte Prognose. Verantwortlich hierfür ist vor allem die charakteristische Eigenschaft des infiltrativen Wachstums.

Die molekularbiologische Grundlage der Auflösung von Zellverbänden hin zur Invasion in das benachbarte Gewebe, ist bei Karzinomen bereits oft Gegenstand der Forschung gewesen, deren Erkenntnisse als Grundlage dienten für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen. Eine wichtige Theorie stellt dabei die epithelial- mesenchymale Transition (EMT) dar, die in Karzinomen als Grundlage für das invasive Wachstum und damit auch der Metastasierung angesehen wird. Hierbei wandeln sich Epithelzellen in Zellen mit mesenchymaler Eigenschaft um, die es ihnen möglich macht zu migrieren und die Basallamina zu passieren. Es sind inzwischen eine Reihe von Signalwegen bekannt, die diesen Vorgang durch die Initiierung von Transkriptionsfaktoren auslösen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch im Glioblastom EMT-ähnliche Signalkaskaden vorkommen.

Dabei wurde zum einen anhand einer Datenanalyse von insgesamt 381 Glioblastomproben die Expression von entsprechenden EMT-fördernden Genen bzw. epithelialen und mesenchymalen Markern mit der Expression derselben Gene von Proben aus hirngesundem Gewebe verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Gene tatsächlich im Vergleich zum Normalgewebe deutlich überexprimiert ist. Insbesondere die Gene TGF $\beta$ 2, Zeb1, SNAI2, TCF3, ITGA4, LEF1 und VIM waren deutlich erhöht gegenüber dem Normalgewebe. Einige Gene zeigten auch keine signifikanten Unterschiede, Zeb 2 sogar ein der EMT-Theorie widersprüchliches Ergebnis.

Es wurden auch Vergleiche zwischen der Genexpression in Glioblastomen und in niedriggradigeren Gliomen durchgeführt. Hierbei zeigten sich einige überraschende Ergebnisse. Insbesondere das Gen Zeb1, welches zu den EMT-fördernden Genen gehört, zeigte wider Erwarten eine deutliche Überexpression in den niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu den Glioblastomen. Die Erklärung hierfür bleibt bislang spekulativ.

Die entscheidende Frage war nun, ob die nachgewiesenen Genexpressionsunterschiede im Glioblastom auch eine Konsequenz für das Überleben hat. In den diesbezüglich durchgeführten

Untersuchungen konnten keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden. Lediglich Tendenzen zeichneten sich ab.

Um etwaige Ergebnisverschiebungen durch verschiedene Einflussfaktoren wie das Alter, verschiedene Arten der Therapie und Prognoseparameter möglichst gering zu halten, erfolgten mehrere Subgruppenanalysen. In der altersgeschichteten Analyse konnte gezeigt werden, dass sich vor allem bei den jüngeren Patienten ein Einfluss der Expression auf die Prognose niederschlägt. Andere Subgruppenanalysen waren teilweise zu klein, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu liefern.

## 6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Anhaltspunkte gefunden werden, welche darauf hindeuten, dass entscheidende Induktoren und Repressoren der EMT-Programme auch in Glioblastomen eine Rolle spielen. Dies konnte durch eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression derselben im Vergleich zu gesundem Gehirngewebe gezeigt werden.

Um bezüglich der klinischen Korrelation, insbesondere der prognostischen Bedeutung dieser Faktoren valide Aussagen treffen zu können, müssen weiterführende Untersuchungen an grösseren Patientenzahlen und Tumorproben mit einheitlicheren Ausgangsbedingungen durchgeführt werden.

Hieraus resultierende Ergebnisse könnten dann in der Tat weiterführende Grundlagen für die Entwicklung von neuen Therapien des Glioblastoms darstellen, die die zielgerichtete Beeinflussung der Tumormigration und -invasion zur Aufgabe hätten.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A (2007) The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26: 6979-6988.
- Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F (2007) French brain tumor data bank: Methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol* 84:189–199.
- Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89.
- Beal K, Abrey LE, Gutin PH (2011) Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnose glioblastoma: Analysis of single-agent and combined modality approaches. *Radiat Oncol* 6:2.
- Böcker W, Denk H, Heintz P (2004) *Pathologie*, Elsevier GmbH Urban und Fischer Verlag, München, 3. Auflage S.320ff.
- Boes T, Neuhäuser M (2005) Normalization for Affymetrix Gene Chips. *Methods Inf Med* 44(3), 414-417.
- Caceres M, Lachuer J, Zapala MA, Redmond J, Kudo L, Geschwind DH, Lockhart DJ, Preuss TM, Barlow C (2003) Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. *PNAS* 100:13030-13035.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco BJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto M (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) (2010) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004-2006. (<http://www.cbtrus.org/reports/reports.html>)
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research* 66:8319-8326.

- De Wever O, Pauwels P **(2008)** Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front- *Histochemical Cell Biology* 130:481-494
- Dresemann G, **(2010)** Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets and Therapy* 3: 139-146.
- Elia-Pasquet S, Provosta D, Jaffréa A, Loiseaub H, Vitalc A, Kantord G, Mairee, Dautheribes M, Darrouzetg V, Dartiguesh JF, Brocharda P, Baldia I **(2004)** Incidence of Central Nervous System Tumors in Gironde, France. *Neuroepidemiology* 23:110–117.
- Etcheverry A, Aubry M, deTayrac M, Vauleon E, Boniface R, Guenot F, Saikali S, Hamlat A, Riffaud L, Menei P, Quillien V, Mosser J **(2010)** DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 11: 701.
- Fagerland MW, Sandvik L **(2009)** Performance of five two-sample location tests for skewed distributions with unequal variances. *Contemporary Clinical Trials* 30: 490-496.
- Freije WA, Castro-Vargas E, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, Mischel PS, Nelson SF **(2004)** Gene Expression Profiling of Gliomas strongly predicts survival. *Cancer Research* 64: 6503-6510.
- Frühwald MC, Rutkowski S **(2011)** Tumors of the central nervous system in children and adolescents. *Dtsch Arztebl Int*; 108: 390-7.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Muskasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavée WK **(2007)** Malignant astrocytic glioma: genetics, biology and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-710.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E **(2007)** Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9:1392-1400.
- Gont A, Hanson JEL, Lavictoire SJ, Parolin DAE, Daneshmand M, Rstall IJ, Soucie M, Nicholas G, Woulfe J, Kassam A, Da Silva VF Lorimer IAJ **(2013)** PTEN loss represses glioblastoma tumor initiating cell differentiation via inactivation of Lgl1. *Oncotarget* 4:1266-1279.
- Graham RT, Zhou H, Odero-Marah V A, Osunkoya A O, Kimbro K S, Tighiouart M, Liu, T, Simons J W. and O'Reagan R **(2008)** Insulin-like Growth Factor-I-Dependent Up-regulation of ZEB1 drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 68:7.

- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10: 593-601.
- Guarino M (2007) Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *IJBCB (International Int J Biochem Cell Biol)* 39:2153-2160.
- Hacke W und Poeck K (2010) *Neurologie*, 13. Auflage S.295-300; 313-314.
- Heimberger AB, Sampson JH (2011) Immunotherapy coming of age: What will it take to make it standard of care for glioblastoma? *Neuro-Oncology* 13: 3-13.
- Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT (2000) Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257: 1-12.
- Hollier BG, Evans K, Mani SA (2009) The Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: A Coalition against cancer therapies, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14:29-43.
- Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, Ackland ML, Thompson EW, Newgreen DF (2011) Defining the E-Cadherin Repressor Interactome in Epithelial-Mesenchymal Transition: The PMC42 Model as a Case Study. *Cells Tissues Organs*, 193:23-40.
- Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Ikeda K Kato T (2004) Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry* 9: 406-416.
- Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet* 14:241-253.
- Iza B, Mateo-Sierra O, Ruiz-Juretszke F, Garbizu J, Guzmán de Villoria J, Carrillo R (2006) Familiar glioblastoma presenting as a true multicentric tumor: etiopathogenic and prognostic features. *Neurocirugia (Astur)*. 17(4):340-6; discussion 346-7.
- Jellinger K (1978) Glioblastoma multiforme: morphology and biology. *Acta Neurochir (Wien)*. 42:5-32.
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K Nawa A, Kikkawa F (2007) Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 31:3629-3637.



- Keene DL, Hsu E, Ventureyra E (1999) Brain tumors in childhood and adolescence. *Pediatr Neurol* 20: 198-203.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neuro* 61:215-25; discussion 226-9.
- Kramm C, Rausche U, Butenhoff S, Kühnöl C, Kunze C, Kortmann R, Wolff J, van Gool S (2008) Hochmaligne Gliome im Kindes- und Jugendalter. *Monatsschr Kinderheilkd.* 156:1201–1207.
- Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF, Lai A, Dong J, Farooqi HK, Liau LM, Horvath S, Mischel PS, Nelson SF (2008) Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Medical Genomics* 1:52.
- Liu T, Papagiannakopoulo T, Puskar K, Qi Shuping, Santiago F, Clay W, Lao K, Lee Y, Nelson SF, Konblum HI, Doyle F, Petzold L, Shraiman B, Kosik KS (2007) Detection of a MicroRNA Signal in an In Vivo Expression Set of mRNAs. *PLOS One* 2: e804.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
- Mehta V, Chapman A, McNeely PD, Walling S, Howes WJ (2002) Latency between symptom onset and diagnosis of pediatric brain tumors: an Eastern Canadian geographic study. *Neurosurgery* 51: 365-373.
- Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liau LM, Cloughesy TF, Nelson S (2003) Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* 22: 2361-2373.
- Miyazono K (2009) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 314-323.

- Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MCM, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PQ, Zimmer Y, Cairncross JG, Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P **(2004)** Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64:6892-9.
- Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN **(2003)** Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63(7):1602-7.
- Ohgaki H, Kleihues P **(2005)** Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:479-89.
- Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME **(2008)** The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22:894-907.
- Peinado H, Quintanilla M, Cano A **(2003)** Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines; mechanisms for epithelial mesenchymal transition. *J Biol Chem* 278: 21113-21123.
- Peinado H **(2004)** Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48: 365-375.
- Peinado H, Olmeda D, Cano, A **(2007)** Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype. *Nat Rev Cancer* 7(6):415-28.
- Peiro S, Escrivá M, Puig I, Barbera MJ, Dave N, Herranz N, Larriba MJ, Takkunen M, Franci C, Muñoz A, Virtanen I, Baulida J, Garcia de Herreros A **(2006)** Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.* 34: 2077-2084.

- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9(3):157-73.
- Postigo AA (2003) Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF $\beta$ /BMP signaling pathway. *EMBO J* 22:2443-2452.
- Rasch D, Kubinger KD, Moder K (2011) The two-sample t-test: pre-testing its assumptions does not pay off. *Stat Papers* 52:219-231.
- Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BKA, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M (2005) Gene Expression Profiling and Genetic Markers in Glioblastoma Survival. *Cancer Research* 65(10):4051-8.
- Roth RB, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, Zlotnik A (2006) Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics* 7:67-80.
- Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H, Becker KF (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161:1881-91.
- Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U (2008) Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6392-6397.
- Sanai N, Berger MS (2008) Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 62:753-64; discussion 264-6.
- Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y (2006) Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 133:1323-1333.
- Schirmer M (2004) *Neurochirurgie*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München 10. Auflage.
- Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R (2010) Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107: 799-808.

- Schock F, Perrimon N **(2002)** Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 463-493.
- Shai R, Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liao LM, Loughesy TF, Mischel PS, Nelson SF **(2003)** Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. *Oncogene* 22: 4918-4923.
- Sharma MK, Mansur DB, Reifenberger G, Perry A, Leonard JR, Aldape KD, Albin MG, Emmett RJ, Loeser S, Watson MA, Nagarajan R, Gutmann DH **(2007)** Distinct Genetic Signatures among pilocytic astrocytomas relate to their brain region origin. *Cancer Res* 67:3.
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T **(2008)** The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 68: 537-544.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO **(2005)** Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-96.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgier A, Fisher B, Blanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Masosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO **(2009)** Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* ;10:459-66.
- Sun L, Hui AM, Su Q, Vortmeyer A, Kotliarov Y, Pastorino S, Passaniti A, Menon J, Walling J, Bailey R, Rosenblum M, Mikkelsen T, Fine HA **(2006)** Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* 9:287-300.
- Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF **(2005)** The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 65:5996-6000.
- Thiery JP, Sleeman JP **(2006)**. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(2):131-42.

- Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D (**2005**). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 65:5991-5995.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (**2001**). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5116-21.
- Vesuna, F., P. van Diest, J.H. Chen, V. Raman (**2008**) Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* 11: 1318-1328.
- Weiß C (**2010**). *Basiswissen Medizinische Statistik*, Springerverlag 5. Auflage, S.200ff.
- Wicki A, Lehembte F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, and Christofori G (**2006**) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9: 261-272.
- Wiestler OD (**1998**) *Pathologische Anatomie und WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems.* Neuroonkologie, Thieme Verlag 4-46.
- Wolff J, Classen CF, Wagner S, Kortmann RD, Palla SL, Pietsch T, Ku J, Gnekow A, Kramm CM (**2008**) Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J Neurooncol* 87:155–164.
- Wu Y, Deng J, Rychalhou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP (**2009**) Stabilization of snail by NF-kappa B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 1: 416-428.
- Würfel C (**2009**) Untersuchungen zur Bedeutung von Schlüsselgenen der epithelial-mesenchymalen Transition in humanen Glioblastomen. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wyatt L, Khew-Goodall Y (**2008**) PTP-Pez: a novel regulator of TGFbeta signaling. *Cell Cycle* 7: 2290-2295.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (**2004**) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927-39.

Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM (2006) Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. Clin Cancer Research 12:4147-53.

Yang J, Weinberg RA (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: at the crossroad of Development and Tumor Metastasis. Developmental Cell 14:818-829.

Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hotly T, Ueda N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. Int J Oncol 22: 891-898.

## 8 Anhang

**Tabelle 39:** Probesets des Microarrays **GPL 570**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
212758_s_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
210875_s_at	ZEB1	.(B)	zink fingerE-box
212764_at	ZEB1	.(C)	zink fingerE-box
239952_at	ZEB1	.(D)	zink fingerE-box
203603_s_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
233031_at	ZEB2	.(B)	zink fingerE-box
235593_at	ZEB2	.(C)	zink fingerE-box
201130_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
201131_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
201426_s_at	VIM	.(A)	vimentin
1555938_x_at	VIM	.(B)	vimentin
1554006_a_at	LLGL-2	.(A)	lethal giant larvae homolog 2
203713_s_at	LLGL-2	.(B)	lethal giant larvae homolog 3
219480_at	SNAI1	.(A)	snail homolog 1
213139_at	SNAI2	.(A)	snail homolog 2
1560228_at	SNAI3	.(A)	snail homolog 3
220407_s_at	TGFB-2	.(A)	transforming growth factor, beta 2
209908_s_at	TGFB-2	.(B)	transforming growth factor, beta 2
209909_s_at	TGFB-2	.(C)	transforming growth factor, beta 2
228121_at	TGFB-2	.(D)	transforming growth factor, beta 2
220406_at	TGFB-2	.(E)	transforming growth factor, beta 2
213943_at	TWIST1	.(A)	twist homolog1 (Drosophila)
229404_at	TWIST2	.(A)	twist homolog2 (Drosophila)
1554163_at	TWIST2	.(B)	twist homolog2 (Drosophila)
209239_at	NFKB1	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
207535_s_at	NFKB2	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
209636_at	NFKB2	.(B)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2

211524_at	NFKB2	.(C)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
209151_x_at	TCF3	.(A)	transcription factor 3
215260_s_at	TCF3	.(B)	transcription factor 3
209152_s_at	TCF3	.(C)	transcription factor 3
209153_s_at	TCF3	.(D)	transcription factor 3
213811_x_at	TCF3	.(E)	transcription factor 3
210776_x_at	TCF3	.(F)	transcription factor 3
213731_s_at	TCF3	.(G)	transcription factor 3
228052_x_at	TCF3	.(H)	transcription factor 3
213732_at	TCF3	.(I)	transcription factor 3
216647_at	TCF3	.(J)	transcription factor 3
213809_x_at	TCF3	.(K)	transcription factor 3
207113_s_at	TNF	.(A)	tumor necrosis factor
211711_s_at	PTEN	.(A)	phosphatase and tensin homolog
204054_at	PTEN	.(B)	phosphatase and tensin homolog
233254_x_at	PTEN	.(C)	phosphatase and tensin homolog
225363_at	PTEN	.(D)	phosphatase and tensin homolog
233314_at	PTEN	.(E)	phosphatase and tensin homolog
222176_at	PTEN	.(F)	phosphatase and tensin homolog
227469_at	PTEN	.(G)	phosphatase and tensin homolog
242622_x_at	PTEN	.(H)	phosphatase and tensin homolog
213579_s_at	EP300	.(A)	E1A binding protein p300
202221_s_at	EP300	.(B)	E1A binding protein p301
205885_s_at	ITGA4	.(A)	integrin alpha 4
213416_at	ITGA4	.(B)	integrin alpha 4
205884_at	ITGA4	.(C)	integrin alpha 4
210948_s_at	LEF1	.(A)	lymphoid enhancer-binding factor 1
221558_s_at	LEF1	.(B)	lymphoid enhancer-binding factor 1
221557_s_at	LEF1	.(C)	lymphoid enhancer-binding factor 1
203084_at	TGFB-1	.(A)	transforming growth factor, beta 1
203085_s_at	TGFB-1	.(B)	transforming growth factor, beta 1



**Tabelle 40:** Probesets des Microarrays **GPL 96**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
212758_s_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
210875_s_at	ZEB1	.(B)	zink fingerE-box
212764_at	ZEB1	.(C)	zink fingerE-box
203603_s_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
201130_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
201131_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
201426_s_at	VIM	.(A)	vimentin
203713_s_at	LLGL-2	.(A)	lethal giant larvae homolog 2
219480_at	SNAI1	.(A)	snail homolog 1
213139_at	SNAI2	.(A)	snail homolog 2
220407_s_at	TGFB-2	.(A)	transforming growth factor, beta 2
209908_s_at	TGFB-2	.(B)	transforming growth factor, beta 2
209909_s_at	TGFB-2	.(C)	transforming growth factor, beta 2
220406_at	TGFB-2	.(D)	transforming growth factor, beta 2
213943_at	TWIST1	.(A)	twist homolog1 (Drosophila)
209239_at	NFKB1	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
207535_s_at	NFKB2	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
209636_at	NFKB2	.(B)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
211524_at	NFKB2	.(C)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
209151_x_at	TCF3	.(A)	transcription factor 3
215260_s_at	TCF3	.(B)	transcription factor 3
209152_s_at	TCF3	.(C)	transcription factor 3
209153_s_at	TCF3	.(D)	transcription factor 3
213811_x_at	TCF3	.(E)	transcription factor 3
210776_x_at	TCF3	.(F)	transcription factor 3
213731_s_at	TCF3	.(G)	transcription factor 3
213732_at	TCF3	.(H)	transcription factor 3

216647_at	TCF3	.(I)	transcription factor 3
213809_x_at	TCF3	.(J)	transcription factor 3
207113_s_at	TNF	.(A)	tumor necrosis factor
204053_x_at	PTEN	.(A)	phosphatase and tensin homolog
217492_s_at	PTEN	.(B)	phosphatase and tensin homolog
211711_s_at	PTEN	.(C)	phosphatase and tensin homolog
204054_at	PTEN	.(D)	phosphatase and tensin homolog
222176_at	PTEN	.(E)	phosphatase and tensin homolog
202221_s_at	EP300	.(A)	E1A binding protein p300
205885_s_at	ITGA4	.(A)	integrin alpha 4
213416_at	ITGA4	.(B)	integrin alpha 4
205884_at	ITGA4	.(C)	integrin alpha 4
210948_s_at	LEF1	.(A)	lymphoid enhancer-binding factor 1
221558_s_at	LEF1	.(B)	lymphoid enhancer-binding factor 1
221557_s_at	LEF1	.(C)	lymphoid enhancer-binding factor 1
203084_at	TGFB-1	.(A)	transforming growth factor, beta 1
203085_s_at	TGFB-1	.(B)	transforming growth factor, beta 1

**Tabelle 41:** Probesets des Microarrays **GPL 8300**

Probe set	Abkürzung	Zusatz	Name des Gens
33440_at	ZEB1	.(A)	zink fingerE-box
35681_r_at	ZEB2	.(A)	zink fingerE-box
2082_s_at	CDH1	.(A)	cadherin1,type1
977_s_at	CDH1	.(B)	cadherin1,type1
34091_s_at	VIM	.(A)	vimentin
35630_at	LLGL-2	.(A)	lethal giant larvae homolog 2
38288_at	SNAI2	.(A)	snail homolog 2
971_s_at	TGFB-2	.(A)	transforming growth factor, beta 2
1262_s_at	TGFB-2	.(B)	transforming growth factor, beta 2
40328_at	TWIST1	.(A)	twist homolog1 (Drosophila)
1378_g_at	NFKB1	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene

			enhancer in B-cells 1
38438_at	NFKB1	.(B)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
1377_at	NFKB1	.(C)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
535_s_at	NFKB2	.(A)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
40362_at	NFKB2	.(B)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
545_g_at	NFKB2	.(C)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
544_at	NFKB2	.(D)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
40363_r_at	NFKB2	.(E)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
32874_at	TCF3	.(A)	transcription factor 3
1374_g_at	TCF3	.(B)	transcription factor 3
1373_at	TCF3	.(C)	transcription factor 3
259_s_at	TNF	.(A)	tumor necrosis factor
1852_at	TNF	.(B)	tumor necrosis factor
1434_at	PTEN	.(A)	phosphatase and tensin homolog
39552_at	PTEN	.(B)	phosphatase and tensin homolog
551_at	EP300	.(A)	E1A binding protein p300
33896_at	EP300	.(B)	E1A binding protein p301
2061_at	ITGA4	.(A)	integrin alpha 4
35731_at	ITGA4	.(B)	integrin alpha 4
36021_at	LEF1	.(A)	lymphoid enhancer-binding factor 1
1634_s_at	TGFB-1	.(A)	transforming growth factor, beta 1
1830_s_at	TGFB-1	.(B)	transforming growth factor, beta 1
41445_at	TGFB-1	.(C)	transforming growth factor, beta 1

## **9 Thesen**

### **These 1**

Im Glioblastom existiert, wie bei Karzinomen, ein EMT-ähnlicher Mechanismus.

### **These 2**

Gliome der Grade I-III weisen Parallelen zum Glioblastom in der Genexpression von EMT-Schlüsselgenen auf.

### **These 3**

ZEB1 spielt bei der Entstehung von Hirntumoren eine bedeutende Rolle.

### **These 4**

Eine veränderte Expression der EMT-fördernden und -hemmenden Gene haben eine Auswirkung auf die Gesamtprognose beim Glioblastom.

### **These 5**

Die Ergebnisse sind zwar durch andere Einflussfaktoren, wie Therapieunterschiede und Alter geprägt, jedoch auch unabhängig von diesen aussagekräftig.

# 10 Anlagen

## 10.1 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Claudia Wohlfarth (geb. Lober)

Geburt: 07.06.1983, Schwäbisch Hall

Adresse: Zinkgartenstraße 6

06108 Halle

### Schul- und Hochschulausbildung:

10/2003-11/2010 Grund- und Hauptstudium Humanmedizin

an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/1994-06/2003 Erasmus-Widmann-Gymnasium in Schwäbisch Hall

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1990-06/1994 Grundschule Gailenkirchen, Schwäbisch Hall

### Beschäftigungsverhältnisse:

seit 08/2011 Facharztausbildung für Neurologie

im Martha Maria Krankenhaus Halle Dölau

09/2007-01/2009 BG Kliniken Bergmannstrost

studentische Hilfskraft im Zentrum für Rückenmarksverletzte

### wissenschaftliche Tätigkeit:

seit 03/2009 Doktorarbeit an der Universitätsklinik Halle

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Thema: Untersuchung zur Expression von Genen mit Beteiligung am epithelial- mesenchymalen Übergang in Glioblastomen.

Halle, den 02.08.2014

## **10.2 Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdienste in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 02.08.2014

### **10.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere, dass von mir, Claudia Wohlfarth, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle, den 02.08.2014

## **10.4 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Christof Kramm danke ich sowohl für die Überlassung des Promotionsthemas als auch für die hilfreiche Zusammenarbeit während der Forschungsarbeit sowie die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger danke ich für die beratende Unterstützung insbesondere bei molekularbiologischen und methodischen Fragen.

Darüber hinaus danke ich allen denjenigen, die direkt und indirekt zum Gelingen der Arbeit beitrugen, indem sie mir durch ihren Rat und ihre Unterstützung behilflich waren.