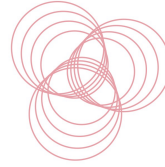


Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



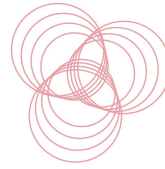
Universitätsmedizin
Rostock

AUS DEM OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. MED. R. KÖHLING

Die Entwicklung eines Biomarkersets zur Differenzierung von
Glioblastomen und ZNS-Metastasen anhand der Expression
von Glutamatrezeptoren und Schlüsselproteinen der
Glutamathomöostase

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
RICHARD VINCENT GADE | GEB. AM 21.05.1997 IN LANDSHUT
ROSTOCK | JUNI 2024



Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Kirschstein,
Universitätsmedizin Rostock Oscar Langendorff Institut für Physiologie

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters,
Universitätsmedizin Rostock Zentrum für Medizinische Forschung, Institut für Zellbiologie

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Gliemroth,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Klinik für Neurochirurgie

Datum der Verteidigung: 08.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
I. Einleitung	1
1.1 Glioblastom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Molekularbiologische Aspekte des Glioblastoms	1
1.2 ZNS-Metastasen	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Ätiologie und Pathomechanismus für die Entstehung von ZNS-Metastasen.....	4
1.3 Klinisches Erscheinungsbild von Glioblastomen und ZNS-Metastasen	6
1.4 Diagnostik und Therapie bei ZNS-Malignomen	6
1.4.1 Histologie und Klassifikation des Glioblastoms.....	8
1.4.2 Therapie des Glioblastoms.....	10
1.4.3 Diagnostik und Therapie von ZNS-Metastasen	11
1.5 Epilepsie bei malignen Erkrankungen des Zentralnervensystems	11
1.6 Glutamaterge Mechanismen im Glioblastom	12
1.7 Glutamatrezeptoren	14
1.7.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren	14
1.7.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren	16
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	18
II. Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Geräte und Zubehör.....	19
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Software.....	21
2.2 Studienkollektiv und Herkunft der Proben	21
2.3 Methoden	22

2.3.1	Probenvorbereitung und RNA Isolierung	22
2.3.2	Quantifizierung und Reinheitskontrolle der RNA und cDNA.....	23
2.3.3	cDNA Synthese	24
2.3.4	Quantitative Real-Time PCR	25
2.3.5	Schmelzkurvenanalyse	29
2.3.6	Gelelektrophorese	29
2.4	Statistische Auswertung	30
2.4.1	U-Test und ROC-Analyse	30
III.	<i>Ergebnisse</i>	31
3.1	Patientenkollektiv	31
3.2	Korrelation zwischen den Housekeeping Genen	32
3.3	Gelelektrophorese	33
3.4	Ergebnisse des U-Tests	34
3.4.1	Glutamatrezeptorexpression in Glioblastomen und ZNS-Metastasen	34
3.4.2	Glutamatrezeptorexpression in Glioblastomen mit und ohne Epilepsie	40
3.5	Ergebnisse der ROC-analyse	44
3.5.1	ROC-Analyse in Glioblastomen und ZNS-Metastasen	44
3.5.2	ROC-Analyse des Markers Epilepsie in Glioblastomen	47
3.6	Biomarker	47
IV.	<i>Diskussion</i>	50
4.1	Die Nutzung von Glutamatrezeptoren als Biomarker in der Diagnostik.....	50
4.2	Diskussion des Einflusses der Expressionsdaten auf die tumorassoziierte Epilepsie	52
4.3	Diskussion der Verwendeten Housekeeping Gene	53
4.4	Diskussion ausgewählter Gene von Glutamatrezeptoren und der Glutamathomöostase	54
4.5	Methoden und Limitationen der Arbeit	60
4.6	Ausblick	60
V.	<i>Zusammenfassung</i>	62
VI.	<i>Anhang</i>	64
6.1	Patientendaten der Patienten mit einem Glioblastom.....	64
6.2	Patientendaten der Patienten mit einer ZNS-Metastase	65

6.3	Schmelzkurven	66
6.4	ROC-Kurven AUC mit einer AUC kleiner 0,8	68
6.5	Expressionsdaten	69
6.5.1	GAPDH-Glioblastom	69
6.5.2	GAPDH ZNS-Metastasen	72
6.5.3	TBP Glioblastom	74
6.5.4	TBP ZNS-Metastasen	77
6.5.5	Abgleich der Proben der Kohorte mit den ermittelten Cutoff-Grenzwerten	79
VII.	Literaturverzeichnis	81
VIII.	Thesen	94
IX.	Danksagung	95
X.	Lebenslauf	96
XI.	Eidesstattliche Versicherung	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung des Ablaufes der hämatogenen Metastasierung vom Ursprungsgewebe bis zur klinisch nachweisbaren etablierten ZNS-Metastase.	5
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung des Glioblastoms in der Bildgebung.	7
Abbildung 3: Histologische Diagnostik und Einordnung von Glioblastomen in die Gruppe der high grade ZNS-Malignome, sowie die Abgrenzung von anderen ZNS-Tumoren im WHO-Klassifikationssystem. ...	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufes der RNA-Extraktion nach der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-single-step-Methode.	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der PCR.	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der RT-qPCR.	26
Abbildung 7: Ergebnisse der Gelelektrophorese.	33
Abbildung 8: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten.	35
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der AMPA-Rezeptoruntereinheiten.	36
Abbildung 10: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der KAINAT-Rezeptoruntereinheiten.	37
Abbildung 11: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der metabotropen Glutamatrezeptoren.	38
Abbildung 12: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der in den Glutamattransport und Metabolismus involvierten Gene.	39
Abbildung 13: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten (obere Abbildung), sowie der AMPA-Rezeptoruntereinheiten (untere Abbildung).	41
Abbildung 14: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der KAINAT-Rezeptoruntereinheiten (obere Abbildung), sowie der metabotropen Glutamatrezeptoren (untere Abbildung).	42
Abbildung 15: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der in den Glutamattransport und Metabolismus involvierten Gene.	43
Abbildung 16: Darstellung der ROC-Kurven mit einer AUC größer 0,8.	45
Abbildung 17: Abbildung von ROC-Kurven im U-Test signifikant unterschiedlicher Gene mit einer AUC<0,8.	46
Abbildung 18: Übersicht über die pathophysiologische Funktion der identifizierten Biomarker und die glutamatassoziierten Mechanismen in Glioblastomzellen.	59
Abbildung 19: Darstellung der Schmelzkurven aller untersuchten Gene.	67
Abbildung 20: ROC-Kurven der Gene mit einer AUC unter 0,8.	68

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	<i>Erkrankungen im Zusammenhang mit der Entstehung von Glioblastomen</i>	<i>2</i>
Tabelle 2:	<i>Übersicht über die Metabotropen Glutamatrezeptoren.....</i>	<i>17</i>
Tabelle 3:	<i>Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte</i>	<i>19</i>
Tabelle 4:	<i>Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und der deren Hersteller</i>	<i>20</i>
Tabelle 5:	<i>Auflistung der für diese Arbeit verwendete Software.....</i>	<i>21</i>
Tabelle 6:	<i>Reagenzien zur Vorbereitung der cDNA-Synthese.....</i>	<i>24</i>
Tabelle 7:	<i>Reagenzien des Mastermixes für die cDNA-Synthese.....</i>	<i>24</i>
Tabelle 8:	<i>Verwendete Reagenzien für die RT-qPCR.</i>	<i>27</i>
Tabelle 9:	<i>Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.....</i>	<i>28</i>
Tabelle 10:	<i>Tabellarische Auflistung der mittels Youden Index ermittelten Cutoff Grenzwerte.....</i>	<i>47</i>
Tabelle 11:	<i>Anteil der präzise zugeordneten Expressionsergebnisse der jeweiligen Tumorentität der untersuchten Kohorte.....</i>	<i>48</i>
Tabelle 12:	<i>Erhobenen Patientendaten mit der Diagnose eines Glioblastoms.....</i>	<i>64</i>
Tabelle 13:	<i>Erhobenen Patientendaten mit der Diagnose einer ZNS-Metastase.</i>	<i>65</i>
Tabelle 14:	<i>Expressionsdaten der Glioblastomproben mit dem Housekeeping Gen GAPDH.</i>	<i>69</i>
Tabelle 15:	<i>Expressionsdaten der ZNS-Metastasenproben mit dem Housekeeping Gen GAPDH.</i>	<i>72</i>
Tabelle 16:	<i>Expressionsdaten der Glioblastomproben mit dem Housekeeping Gen TBP.....</i>	<i>74</i>
Tabelle 17:	<i>Expressionsdaten der ZNS-Metastasenproben mit dem Housekeeping Gen TBP.....</i>	<i>77</i>
Tabelle 18:	<i>Überprüfung der Untersuchten Proben auf die ermittelten Cutoff Werte.....</i>	<i>79</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung:	Bedeutung:
4F2hc	4F2 cell-surface antigen heavy chain
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AC	Adenylatzyklase
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
<i>BCAT1</i>	branched chain amino acid transaminase 1
cDNA	complementary DNA
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerin
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>EAAT2</i>	excitatory amino acid transporter 2
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<i>GLUL</i>	glutamate-ammonia ligase
<i>GRIA1-4</i>	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1-4
<i>GRIK1-5</i>	glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1-5
<i>GRIN1</i>	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1
<i>GRIN2A-D</i>	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A-D
<i>GRIN3A+B</i>	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A+B
<i>GRM1-8</i>	glutamate metabotropic receptor 1-8
<i>IDH1</i>	Isocitratdehydrogenase 1
IP3	Inositoltrisphosphat
KM	Kontrastmittel
LAT1	L-amino acid transporter-1
mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoren
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom „non-small-cell lung cancer“
NTC	„No template Control“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ - Polymerasekettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Proteinkinase A

Abkürzung:	Bedeutung:
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	„ <i>revolutions per minute</i> “ - Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom „small cell lung cancer“
<i>SLC1A2</i>	solute carrier family 1 member 2
<i>SLC3A2</i>	solute carrier family 3 member 2
<i>SLC7A11</i>	solute carrier family 7 member 11
<i>TBP</i>	TATA-box binding protein
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
TERT-Promotor	Telomerase-reverse-Transkriptase- Promotor
TTF	Tumortheraiefelder
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

1.1 GLIOBLASTOM

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Glioblastom ist mit einem Anteil von circa 48% der aggressivste und häufigste Tumor unter allen malignen Tumorerkrankungen mit zerebralem Ursprung. Unter allen primären Zentralnervensystem (ZNS)-Tumoren macht das Glioblastom einen Anteil von 14,5% aus (Ostrom et al., 2020). Bei Kindern ist eine niedrige Inzidenz mit 0,85 Fällen je 100.000 pro Jahr zu beobachten, wobei die Inzidenz im Erwachsenenalter bei circa drei bis fünf Fällen je 100.000 pro Jahr liegt (Grochans et al., 2022; Ostrom et al., 2020). Bei Glioblastomen bei Erwachsenen steigt mit zunehmendem Alter die Inzidenz signifikant an und erreicht zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr mit circa 15 Fällen je 100.000 Einwohner den Altersgipfel (Gittleman et al., 2018; S. Hansen et al., 2018; Wirsching et al., 2016). Nach dem 80. Lebensjahr kommt es hingegen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Inzidenz (Grochans et al., 2022).

Das mediane Überleben unter leitliniengerechter Therapie mit chirurgischer Versorgung und Radiochemotherapie liegt aktuell bei lediglich circa 14 Monaten nach Diagnosestellung. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben ist mit circa 5%, im Vergleich mit anderen Malignomen nur sehr gering (Delgado-López & Corrales-García, 2016). Außerdem nimmt die mittlere Überlebenszeit mit zunehmendem Alter bei Patienten, welche älter als 75 Jahre alt sind, ab und liegt trotz optimaler leitliniengerechter Therapie nicht über 9,3 Monaten (Scott et al., 2012).

Glioblastome kommen in mehr als 95% der Fälle primär supratentoriell vor und weisen nur äußerst selten eine primäre Lokalisation im Hirnstamm, Kleinhirn oder Rückenmark auf (Nakada et al., 2011).

1.1.2 ÄTIOLOGIE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE ASPEKTE DES GLIOBLASTOMS

Über die genaue Ätiologie des Glioblastoms gibt es zum aktuellen Forschungsstand noch viele Unklarheiten. In mehr als 95% der Fälle wird eine idiopathische Entstehung von Glioblastomen angenommen (Alifieris & Trafalis, 2015).

In lediglich ein bis fünf Prozent der Fälle entsteht das Glioblastom aufgrund eines hereditären Krankheitsbildes, darunter sind die Neurofibromatose Typ 1 und Typ 2 zu erwähnen, aber auch seltenere genetische Erkrankungen (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Erkrankungen im Zusammenhang mit der Entstehung von Glioblastomen (Alifieris & Trafalis, 2015).

Legende: TP53: tumor protein p53, MEN1: Multiple endokrine Neoplasie vom Typ 1, PTCH1: Protein patched homolog 1; TSC: Tuberöse Sklerose Komplex

Erkrankung:	Betroffenes Gen:
Neurofibromatose Typ 1	<i>NF1</i>
Neurofibromatose Typ 2	<i>NF2</i>
Li-Fraumeni Syndrom	<i>TP53</i>
HNPCC/Lynch Syndrom	Mikrosatelliteninstabilität
MEN1	<i>MEN1</i>
Gorlitz-Gotz Syndrom	<i>PTCH1</i>
TSC	<i>TSC1, TSC2</i>

Den durch eine genetische Erkrankung entstandenen Glioblastomen geht in den meisten Fällen die Diagnose eines *low-grade* Glioms voraus (Alifieris & Trafalis, 2015; Wirsching et al., 2016).

Das Glioblastom kommt, abhängig von der Abstammung des Patienten, circa 2-mal häufiger bei der weißen Bevölkerung gegenüber der schwarzen Bevölkerung vor, sowie circa 3-mal häufiger bei der weißen Bevölkerung gegenüber der asiatischen Bevölkerung in der US-amerikanischen Öffentlichkeit vor (Ostrom et al., 2020).

Bis heute konnten nur sehr wenige Umweltfaktoren identifiziert werden, die zu einer Risikoerhöhung für ein Glioblastom führen. Die therapeutische Bestrahlung von Kindern mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) kann das Risiko für die Entstehung eines Glioblastoms erhöhen (Ohgaki & Kleihues, 2005). Für das Rauchen, sowie für andere bekannte Kanzerogene konnte bis dato kein erhöhtes Risiko nachgewiesen werden, ebenso wie für den Einsatz von Röntgenstrahlung für diagnostische Zwecke (Wirsching et al., 2016). Dies lässt sich durch die sehr speziellen Standortbedingungen, welches das ZNS bietet, erklären. Das ZNS ist durch die Blut-Hirn-Schranke vor einem Großteil von mutagenen und kanzerogenen Stoffen geschützt. Zudem handelt es sich bei neuronalem Gewebe um Zellen, welche sich im postmitotischen Zustand befinden. (Wirsching et al., 2016).

Bis heute konnte der genaue zelluläre Ursprung des Glioblastoms noch nicht abschließend geklärt werden. Vor rund zwei Jahrzehnten wurde die Tumorstammzellenhypothese aufgestellt. Die damals wichtigste Entdeckung war die Tumorinduktion von Glioblastomen durch CD133-positive Stammzellen (Singh et al., 2004). Seither hat eine intensive Forschung mit Tumorstammzellen stattgefunden. Die Tumorgenese und eine große Heterogenität im Tumorgewebe sollen auf die Stammzellen zurückzuführen sein (Cheray et al., 2017). Die Tumorstammzellen in Glioblastomen werden durch sechs wesentliche Mechanismen

reguliert. Dabei unterscheidet man zwischen intrinsischen Faktoren, wie der Tumorgenetik, Epigenetik und des Metabolismus, sowie den extrinsischen Faktoren, wie das Immunsystem, die umgebenden Umweltfaktoren des Gewebes und Nischenfaktoren (Lathia et al., 2015). Der genaue zelluläre Ursprung bleibt allerdings trotz intensiver Forschung noch nicht völlig geklärt und ist Gegenstand weiterer aktueller Forschung.

1.2 ZNS-METASTASEN

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE

Metastasen sind für einen Großteil der tumorassoziierten Todesfälle verantwortlich. Nur selten führt der Primärtumor bei Vorliegen einer zerebralen Metastasierung zum Tod des Patienten. Insgesamt sind ZNS-Metastasen von größter Bedeutung, da diese eine besonders infauste Prognose für den Patienten haben (Lambert et al., 2017). Metastasen im ZNS sind mit Abstand die häufigsten intrakraniellen Neoplasien. Diese kommen bis zu zehnmal häufiger vor als primäre maligne Neoplasien des ZNS (Ostrom et al., 2018).

In den letzten Jahrzehnten stieg die Inzidenz der ZNS-Metastasen, dies ist am ehesten auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Zum einen hat sich die Bildgebung in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt, da beispielsweise nun Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen des Schädels in der Routinediagnostik von Tumoren, wie dem Lungenkarzinomen, eingesetzt werden (Langer, 2022). Zum anderen hat sich die Therapie des Primärmalignoms stetig verbessert. Dies führt zu einem längeren Gesamtüberleben der betroffenen Patienten, jedoch steigt damit verbunden auch das Risiko im Verlauf der Erkrankung, ZNS-Metastasen zu entwickeln (Nayak et al., 2012).

Etwa 12% aller Patienten im metastasierten Stadium ihrer Tumorerkrankung sind von einer zerebralen Metastasierung betroffen. Besonders häufig von einer primären initialen ZNS-Metastasierung bei Erstdiagnose des Malignoms betroffen sind Patienten, welche an einem Lungenkarzinom erkrankt sind. Bei 12 bis 16 % der betroffenen Patienten liegt eine initiale ZNS-Metastasierung vor, während bei Patienten mit Nierenkarzinom (1,5%), Melanom (0,7%) und mit Mammakarzinom (0,4%) eine initiale Metastasierung deutlich seltener beschrieben wird (Cagney et al., 2017).

Die meisten Patienten erkranken zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr an einer ZNS-Metastase. Der Altersgipfel der Patienten mit Lungenkarzinom liegt beispielweise zwischen dem 60. und 69. Lebensjahr, der für Patienten mit einem Melanom, Mammakarzinom und Nierenkarzinom deutlich früher, zwischen dem 50. und 59. Lebensjahr (Barnholtz-Sloan et al., 2004).

1.2.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOMECHANISMUS FÜR DIE ENTSTEHUNG VON ZNS-METASTASEN

Die Metastasierung von Tumoren ist ein häufiger Prozess im Verlauf einer Tumorerkrankung. Dabei durchlaufen die Zellen des Primärtumors einen mehrstufigen Prozess. Im ersten Schritt erfolgen die Ausbreitung und die Vermehrung des Primärtumors im umliegenden Gewebe. Dies wird sowohl durch die genetische als auch durch die epigenetische Transformation, sowie den Verlust von Tumorsuppressorgenen, ausgelöst.

Durch die epithelial-mesenchymale Transition der Malignomzellen kommt es zu einer Veränderung der Zellen von einem epithelialen Phänotypus hin zu einem mesenchymal geprägten Phänotypus. Dies geschieht aufgrund zahlreicher Veränderungen, wie den Verlust der Zellpolarität, den Verlust von epithelialen Markern, sowie dem Verlust von zellulären Adhäsionsmolekülen, wie E-Cadherin (Kalluri & Weinberg, 2009; Lah et al., 2020). Es wird angenommen, dass zumindest eine partielle epithelial-mesenchymale Transition den Grundstein für eine weitere metastatische Ausbreitung des Primarius bildet, jedoch kommt es nicht bei allen Tumoren zu einer vollständigen mesenchymalen Transformation. Im zweiten Schritt erfolgt die Ausbreitung einzelner Zellen entweder über das Lymphsystem oder hämatogen, entweder durch bestehende Gefäße oder durch eine Neovaskularisierung des Primärtumors (Gupta & Massagué, 2006; Lambert et al., 2017). Bei ZNS-Metastasen ist allerdings eine hämatogene Metastasierung von entscheidender Bedeutung. Eine lymphogene ZNS-Metastasierung findet nur selten statt (Lah et al., 2020). Nur ein Bruchteil der im Blutstrom migrierten Tumorzellen überleben im Blutstrom und zeigen eine Resistenz gegenüber dem Immunsystem. Das Überleben der Tumorzelle gelingt durch eine Interaktion mit Thrombozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und tumorassoziierten Fibroblasten (Garrido-Navas et al., 2019). Gegenstand aktueller Studien ist, die zirkulierenden Tumorzellen zur Diagnostik von Tumoren zu nutzen (D. Lin et al., 2021). Im peripheren Gewebe erfolgt dann die Extravasation aus dem Gefäß in das Parenchym, in dem sich lokale Mikrometastasen etablieren und eine Progression bis zu klinisch nachweisbaren Metastasen durchlaufen. Im ZNS kann die Metastasierung dann sowohl im Hirnparenchym als auch entlang der Meningen erfolgen (Gupta & Massagué, 2006). Abbildung 1 illustriert den Ablauf des Metastasierungsprozesses.

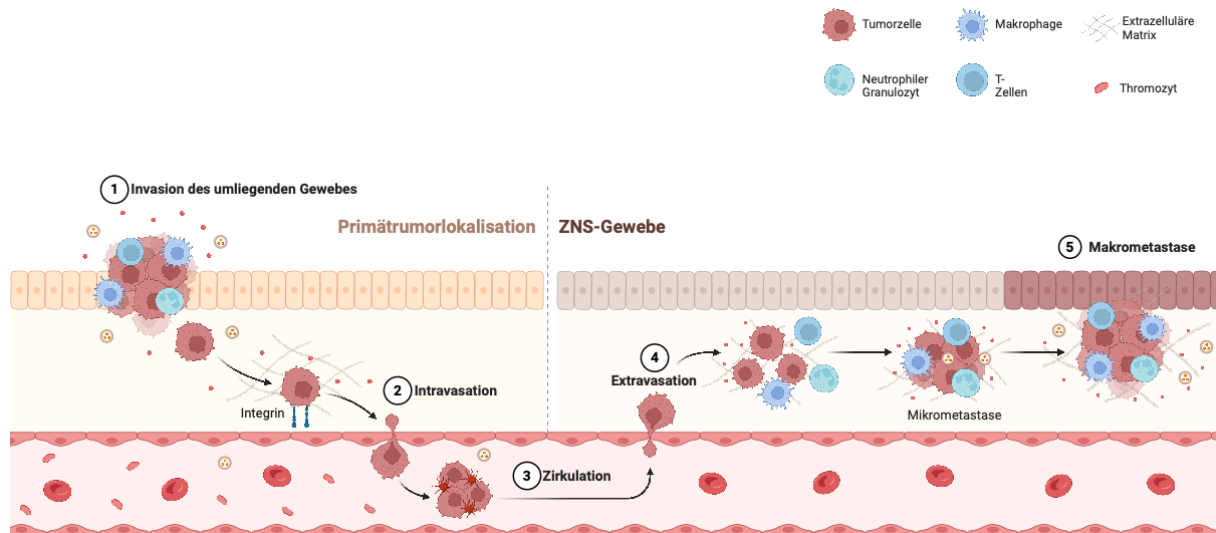


Abbildung 1: Darstellung des Ablaufes der hämatogenen Metastasierung vom Ursprungsgewebe bis zur klinisch nachweisbaren etablierten ZNS-Metastase.

① Infiltration der Malignomzellen in das umliegende Gewebe des Primärtumors. ② Intravasation der Malignomzellen in das Gefäßsystem mit anschließender ③ Zirkulation durch das Gefäßsystem. ④ Extravasation der Tumorzelle im ZNS und Etablierung einer Mikrometastase und Wachstum bis zu einer klinisch und diagnostisch nachweisbaren ⑤ Makrometastase. „Created with BioRender.com“

Das Hirnparenchym stellt eine komplexe Umgebung dar und ist von der zellulären Zusammensetzung, der Immunologie und dem Metabolismus hoch spezialisiert. Über die genaue Interaktion von Metastasenzellen und Zellen des Hirnparenchyms ist bislang nur wenig bekannt. Für Metastasen stellten diese Bedingungen jedoch eine Schwierigkeit bei der Implantation und Migration dar (Schulz et al., 2019). Es konnten bis heute viele Gene identifiziert werden, welche im Zusammenhang mit einer Metastasierung stehen. Hingegen gibt es nur unzureichend viele Ergebnisse für Gene, welche im spezifischen Zusammenhang mit einer ZNS-Metastasierung stehen. Im Tiermodell mit Mammakarzinomzellen wurden in ZNS-Metastasen eine erhöhte Expression von MMP-2 (Matrix-Metalloproteinase-2) gefunden (Mendes et al., 2007). In Studien mit Gewebe von ZNS-Metastasen von Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Expression von GABA-Rezeptoren kommt. Es wird vermutet, dass der Katabolismus von GABA zu erhöhtem NADH-Spiegeln führt und somit ein Überlebens- und Proliferationsvorteil der metastasierten Mammakarzinomzellen besteht (Neman et al., 2014).

1.3 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD VON GLIOBLASTOMEN UND ZNS-METASTASEN

Die Symptome von malignen Tumorerkrankungen des ZNS, sowohl bei Glioblastomen als auch bei ZNS-Metastasen, sind in erster Linie von der primären Lokalisation des Tumors abhängig. Symptome, wie neu aufgetretene neurologische Herdsymptomatik, aber auch fokale und generalisierte Krampfanfälle, können hinweisend auf einen malignen ZNS-Tumor sein. Bei einem mit dem Tumor einhergehenden erhöhten intrakraniellen Druck kann es zu Hirndruckzeichen, wie Kopfschmerz, Übelkeit, Erbrechen bis hin zur Bewusstseinsstörung kommen. Zunächst kann es auch zu eher unscheinbaren Veränderungen, wie einer Leistungsminderung oder pseudodementiellen Entwicklung, kommen (Wick, 2021). Außerdem können psychische Störungen des Patienten im Rahmen eines hirnganischen Psychosyndroms bestehen, welche sich im akuten Stadium durch Verwirrtheit, Halluzinationen und Denkstörungen, bis hin zum Delir und Koma, äußern können. Im chronischen Stadium zeigen sich Symptome in Form einer Wesensänderung oder in Form eines Frontalhirnsyndroms (Bartusik-Aebisher et al., 2022).

1.4 DIAGNOSTIK UND THERAPIE BEI ZNS-MALIGNOMEN

Die Diagnostik maligner ZNS-Prozesse umfasst meist schon bei Verdacht die neuroradiologische Bildgebung. Der Goldstandard in der Darstellung ist hierbei die MRT-Bildgebung des Schädels mit Kontrastmittel (KM). Die Computertomographie (CT)-Bildgebung spielt bei der Diagnostik maligner ZNS-Erkrankungen eine eher untergeordnete Rolle. In der Routinediagnostik werden bei unklaren neurologischen Symptomen aufgrund der breiten und schnellen Verfügbarkeit häufig CT-Untersuchungen angefertigt. Die Darstellung von ZNS-Metastasen und Glioblastomen kann in Abhängigkeit von der Größe und der Lage des Tumors auch mit einer CT-Untersuchung gelingen. Bei Verdacht auf ein Malignom des ZNS in der CT-Untersuchung sollte nach den aktuellen Leitlinien eine anschließende MRT-Untersuchung durchgeführt werden (Fink & Fink, 2013; Wick, 2021).

In der CT stellt sich das Glioblastom zentral hypodens dar, welches histologisch der Nekrosezone entspricht. Der Randbereich des Glioblastoms, welcher typischerweise ring- oder girlandenförmig Kontrastmittel aufnimmt, entspricht histologisch dem vitalen Tumorgewebe. In der MRT-Diagnostik werden multiplanare T1 Sequenzen nativ und nach KM-Gabe, sowie T2/FLAIR Sequenzen, für die Diagnostik akquiriert (Weller et al., 2020a; Wick, 2021). Das Glioblastom stellt sich in der T1 Sequenz hypointens zum restlichen Hirnparenchym dar. Nach KM-Gabe kommt es, ebenso wie in der CT-Untersuchung, zu einer girlandenförmigen KM-Aufnahme in den peripheren Anteilen des Glioblastoms. In der T2/FLAIR Sequenz kommt es zu einer hyperintensiven Signalanreicherung im Glioblastom.

Besonders gut gelingt in dieser Sequenz die Darstellung des tumorumrandenden Perifokalödems (Fordham et al., 2021). Darstellung der typischen Befunde in der CT und MRT-Bildgebung in Abbildung 2.

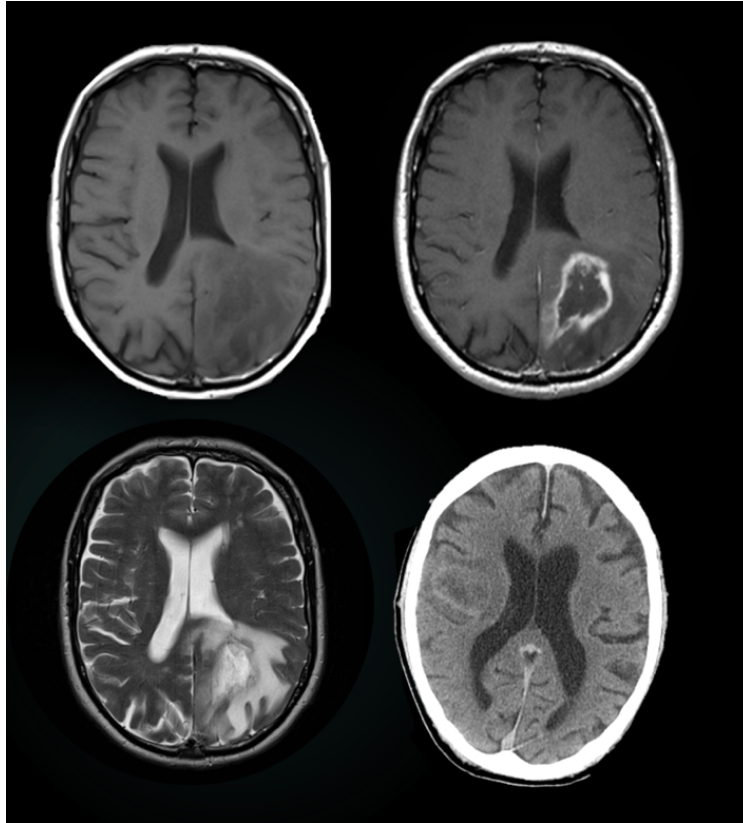


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung des Glioblastoms in der Bildgebung.

Oben links MRT in T1 Sequenz ohne KM. Oben rechts MRT in T1 Sequenz mit KM. Unten links MRT in T2 Wichtung. Unten rechts CT mit KM. Quelle: Case courtesy of Frank Gaillard, Radiopaedia.org, rID: 22205

Hinweisend auf eine ZNS-Metastase ist meist ein multifokales Auftreten, in circa 50% der Fälle sind mindestens zwei Tumorlokalisationen vorhanden. ZNS-Metastasen stellen sich in der CT-Bildgebung meistens mit einem dem Tumor umschließenden vasogenen Ödem dar und sind je nach Ursprungsgewebe hypo-, iso- oder hyperdens im Vergleich zum Hirnparenchym (Fink & Fink, 2013). Bei der MRT-Bildgebung werden bei ZNS-Metastasen die gleichen Sequenzen wie im Glioblastom akquiriert. In der T1 -Sequenz stellen sich Metastasen meist iso- bis hypointens dar. Nach der Kontrastmittelgabe zeigt sich eine ringförmige Anreicherung im Randbereich der Metastasen. In der T2- Sequenz zeigen sich Metastasen typischerweise hyperintens (Fink & Fink, 2013).

In den letzten Jahren erfolgte in der MRT-Diagnostik der stärkere Fokus auf funktionelle MRT-Sequenzen, wie der Darstellung der MR-Perfusion, der MR-Diffusion und der MR-

Spektroskopie. Dies spielt besonders in der Beurteilung der vitalen Tumorareale vor einer Biopsie und der Differenzierung zwischen Glioblastom und Metastasen eine Rolle (Fink & Fink, 2013; Kickingereeder & Radbruch, 2017; Tong et al., 2020). Trotz zunehmend besseren Möglichkeiten in der radiologischen Bildgebung ist die Unterscheidung von Glioblastomen und ZNS-Metastasen in vielen Fällen nicht immer eindeutig. So zeigen beide Tumore in der MRT-Bildgebung ähnliche Signalmuster (Fordham et al., 2021). Daher ist die alleinige Diagnostik bildgebender Verfahren nicht ausreichend. Eine histologische Aufarbeitung des Gewebes ist bei jedem Verdacht auf ein ZNS-Malignom obligat (Weller et al., 2020b; Wick, 2021).

Abseits der Bildgebung kann zur weiteren Diagnostik auch eine Liquorpunktion durchgeführt werden, diese dient zur weiteren Abgrenzung von entzündlichen Erkrankungen, sowie zum Ausschluss einer Meningeosis carcinomatosa und ZNS-Lymphomen. Bei epileptischen Anfällen als Erstsymptom oder im Verlauf kann eine EEG-Untersuchung sowohl zur Erstdiagnostik, als auch zur weiteren Diagnostik und zum Einstellen der antiepileptischen Medikation durchgeführt werden (Wick, 2021). Die Diagnostik von tumorassoziierten Epilepsien bleibt jedoch meist eine klinische Diagnose, welche aufgrund eines beobachteten Anfallsgeschehens gestellt wird (Böhm & Leibetseder, 2024).

1.4.1 HISTOLOGIE UND KLASSIFIKATION DES GLIOBLASTOMS

Das Tumorgewebe von Glioblastomen zeigt histologisch eine große Heterogenität. Charakteristische histologische Merkmale für das Glioblastom sind mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen. Zudem lassen sich weitere Merkmale eines malignen Wachstums, wie eine hohe mitotische Aktivität, Kerndeformation, Invasion in das umliegende Gewebe, in den meisten Fällen nachweisen. In der Routinediagnostik werden meist auch immunhistologische Untersuchungen, sowie eine Bestimmung des Ki-67 Mitoseindex, durchgeführt (Bienkowski et al., 2018; Perry & Wesseling, 2016; Wirsching et al., 2016).

Tumore des zentralen Nervensystems werden nach der WHO-Klassifikation in vier Grade unterteilt. Das Glioblastom fällt dabei in die Kategorie eines Grad 4 Tumors. Im Jahr 2021 unterlag die WHO-Klassifikation einer umfassenden Überarbeitung, um die molekularen Biomarker in die Klassifikation einzuarbeiten.

Die histologischen Kriterien sind nicht mehr alleinig entscheidend für die Diagnose eines Glioblastoms, vielmehr kann die Diagnose nun bei Nachweis von Mutationen im Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT)-Promotor, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Gen und einer Veränderung der Anzahl von Kopien auf dem Chromosom 7 mit Zugewinn an Kopien und den Verlust von Kopien auf dem Chromosom 10, trotz fehlender histologischer Korrelate, gestellt werden. Der TERT-Promotor ist für die Transkription des TERT-Gens

zuständig. Eine Mutation in diesem Promotor sorgt für erhöhte Telomerase Aktivität. Am häufigsten kommt eine TERT-Mutation in Zellen mit einer niedrigen Zellteilungsrate, wie in neuronalen Geweben, vor (E. M. Liu et al., 2022). Eine Mutation des TERT-Promotors gehört zu den häufigsten Mutationen in Malignomen, bei Glioblastomen kommt diese bei ca. 80-90% vor. Mutationen im TERT-Promotor können aber auch bei verschiedenen anderen Malignomen, wie dem Melanom, dem hepatozellulären Karzinom, dem Urothelkarzinom, nachgewiesen werden (Olympios et al., 2021). Die +7/-10 zytogenetischer Signatur ist ein Marker für das Vorliegen eines Glioblastoms und ist definiert durch eine Trisomie 7 und eine Monosomie 10. Zum aktuellen Stand der Forschung ist noch wenig über die klinische Relevanz der chromosomalen Aberration bekannt. Studien haben eine Inzidenz von +7/-10 oder eine partielle Deletion bei ca. 70-80% der Patienten mit einem Glioblastom nachweisen können (Stichel et al., 2018; Weller et al., 2020a). Eine Amplifikation des EGFR-Genes kommt in circa 60% der Glioblastome vor. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors und somit zu einer Proliferation des Glioblastoms (Sasmita et al., 2018; Senhaji et al., 2022). Abbildung 3 zeigt eine auszugsweise die neuen WHO-Klassifikation (Wick, 2021).

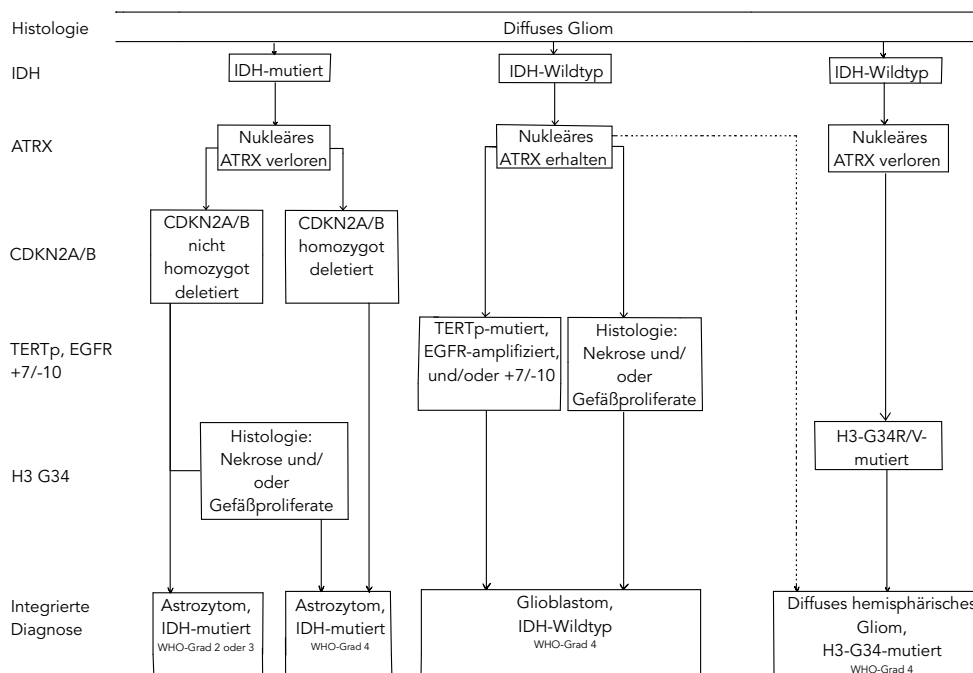


Abbildung 3: Histologische Diagnostik und Einordnung von Glioblastomen in die Gruppe der high grade ZNS-Malignome, sowie die Abgrenzung von anderen ZNS-Tumoren im WHO-Klassifikationssystem. Abbildung modifiziert nach der Klassifikation von Weller et al., 2022. IDH: Isocitratdehydrogenase, ATRX: ATRX chromatin remodeler, TERTp: Telomerase reverse transcriptase promoter, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, CDKN2A/B: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B.

Das Glioblastom ist der einzige Tumor des Zentralnervensystems, welcher nach der neuen Klassifikation zwingend einen Isocitratdehydrogenase (IDH) Wildtyp aufweist. IDH mutierte Tumore werden nun als Astrozytom Grad 2 bis 4 eingeteilt (Weller et al., 2022, p. 159).

1.4.2 THERAPIE DES GLIOBLASTOMS

Eine chirurgische Behandlung wird bei jedem Patienten mit Glioblastom, soweit es der Zustand und die Lokalisation des Glioblastoms zulassen, angestrebt. Durch das stark infiltrative Wachstum des Glioblastoms ist eine vollständige Entfernung in vielen Fällen nicht möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, welche eine Tumoroperation durchlaufen haben, trotz unvollständiger Tumorentfernung eine bessere Prognose haben (Kees et al., 2022). In den letzten Jahren entwickelten und verbesserten sich zahlreiche Techniken, um das verbleibende postoperative Tumolvolumen zu reduzieren. Dazu zählen eine stetig verbesserte Neuronavigation, sowie die intraoperative Bildgebung mittels MRT und Ultraschall (Weller et al., 2020a). In den letzten Jahren kam die intraoperative Fluoreszenzmarkierung zunehmend zum Einsatz. Dabei wird das Glioblastom mittels 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) fluoreszierend markiert (Kaneko & Kaneko, 2016). Damit ist es dem Chirurgen möglich, den verbleibenden Resttumor besser von gesundem Gewebe abzugrenzen (Stapp & Stummer, 2018). Postoperativ werden eine histologische Untersuchung und ein Grading des Gewebes vorgenommen. Des Weiteren wird eine molekulargenetische Analyse gemäß den Leitlinien und der neuen WHO-Klassifikation durchgeführt. Dabei wird das Gewebe auf für Glioblastome typische Mutationen untersucht (Weller et al., 2022).

Ein wichtiger molekularbiologischer Marker ist hierbei MGMT, welches ein entscheidendes DNA-Reparaturprotein ist. Es handelt sich dabei um eine Methyltransferase, welche Alkylgruppen von der O6 Position der DNA entfernt. Dadurch kommt es zum Wirkungsverlust von alkylierenden Chemotherapeutika, wie beispielsweise dem in der Behandlung von Glioblastomen wichtigsten Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) (Anel et al., 2000). Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors ist ein wichtiger Marker für die Prognose des Patienten und dessen Ansprechen auf die Chemotherapie. Bei circa 30-60% der Glioblastompatienten kommt der MGMT-Promotor in der methylierten Form vor (Butler et al., 2020; Riemenschneider et al., 2010).

Die Auswahl an Chemotherapeutika in der Behandlung der Glioblastoms ist aufgrund der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke äußerst eingeschränkt. TMZ ist eines der bedeutendsten Chemotherapeutika in der Behandlung zahlreicher primärer ZNS-Malignome. Es gehört in die Gruppe der alkylierenden Chemotherapeutika und kann aufgrund seiner

geringen molekularen Größe und Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Es sorgt für eine Methylierung der O6 und N7 Position des Guanins in der DNA, welches zu einem Crosslink der DNA führt und schlussendlich zur Apoptose der Zelle (Afonso & Brito, 2022).

Das Standardprotokoll für die Behandlung von Glioblastomen hat sich seit 2005 nicht wesentlich geändert. Die Patienten erhalten im Anschluss an die operative Versorgung eine fraktionierte Strahlentherapie mit insgesamt 60 Gy, in Fraktionen von 1,8 bis 2 Gy. Zusätzlich zur Bestrahlung wird TMZ in einer Dosierung von 75 mg je m² Körperoberfläche während der Strahlentherapie verabreicht. Im Anschluss erfolgt eine Erhaltungstherapie mit TMZ (Stupp et al., 2005). Bei Patienten mit einem schlechten Allgemeinzustand wird eine alleinige Radiotherapie, entweder fraktioniert oder hypofraktioniert, empfohlen. Bei Patienten mit einem ausgeprägt schlechten Allgemeinzustand wird eine alleinig palliative Behandlung empfohlen (Weller et al., 2020a; Wick, 2021).

Der Einsatz von Biologicals oder Multikinaseinhibitoren in der Therapie des Glioblastoms ist Ziel aktueller Forschung. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Beeinflussung multipler Signalwege im Glioblastom (Le Rhun et al., 2019). Studien zu EGFR-Inhibitoren zeigten, aufgrund der geringen Penetration der Medikamente durch die Blut-Hirn-Schranke, bislang noch keine vielversprechenden Ergebnisse (Sareen et al., 2022).

1.4.3 DIAGNOSTIK UND THERAPIE VON ZNS-METASTASEN

Die Entscheidung zwischen einer stereotaktischen Biopsie und einer operativen Entfernung einer ZNS-Metastase ist meist eine individuelle Entscheidung und wird je nach Nutzen/Risiko-Verhältnis abgewogen. Die Behandlung von ZNS-Metastasen ist abhängig vom Zustand des Patienten, dem Status der Primärerkrankung, sowie der Lokalisation der Metastasen. Prinzipiell stehen neben der chirurgischen Therapie, je nach Primarius, verschiedene ZNS-gängige Chemotherapeutika zur Verfügung. Der Einsatz von nicht ZNS-gängigen Chemotherapeutika kann bei einer nachgewiesenen Schrankenstörung ebenso erwogen werden. Zudem kann bei singulären Metastasen eine stereotaktische Bestrahlung in Betracht gezogen werden. Bei multiplen Metastasen kann eine Ganzhirnbestrahlung durchgeführt werden (Schmieder et al., 2016).

1.5 EPILEPSIE BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN DES ZENTRALNERVENSYSTEMS

Bei primären Tumoren des zentralen Nervensystems ist eine Epilepsie oftmals eines der ersten Symptome. Bei niedrigmalignen Tumoren (ZNS WHO-Grad 1-3) kommt eine Epilepsie häufiger vor als bei Glioblastomen. Die tumorassoziierte Epilepsie kann in verschiedenen Stadien der Erkrankung auftreten. Insgesamt macht die tumorassoziierte Epilepsie circa vier

bis zehn Prozent aller Epilepsien aus. In Glioblastomen tritt die Epilepsie in circa 25% bis 45% der Fälle initial auf, während sich bei 15% bis 45% der Patienten die Epilepsie im Verlauf der Erkrankung entwickelt. Bei Patienten mit ZNS-Metastasen konnte bei rund einem Viertel der Patienten eine Epilepsie initial oder im Verlauf der Erkrankung festgestellt werden (Böhm & Leibetseder, 2024; Englot et al., 2016; Liang et al., 2016).

Eine wesentliche Rolle bei der Epileptogenese spielt der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat. In Glioblastomen konnte eine erhöhte Glutamatkonzentration im Tumorgewebe, sowie im tumorumgebenden Gewebe, nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass eine erhöhte Glutamatkonzentration mit dem häufigeren Auftreten eine Epilepsie in Verbindung gebracht werden konnte (Yuen et al., 2012). Dabei fördert Glutamat nicht nur die Entstehung von Epilepsien, sondern führt auch über verstärkte Aktivierung von Glutamatrezeptoren zur Aktivierung von sekundären Signalwegen der Glioblastome und des umgebenden Gewebes (Stefani Leivas Pereira et al., 2017; H. Yi et al., 2020).

Die Behandlung von Patienten mit einer tumorassoziierten Epilepsie ist äußerst diffizil. Die antiepileptische Medikation richtet sich besonders nach der Anfallsart, dem Wirkmechanismus des Medikamentes, sowie den möglichen Nebenwirkungen der Medikation. Zudem müssen jeweilige Komorbiditäten des Patienten mit in Betracht gezogen werden.

Aktuell wird im europäischen Raum meist Levetiracetam, aufgrund einer guten Verträglichkeit, in der primären Behandlung einer tumorassoziierten Epilepsie eingesetzt (Böhm & Leibetseder, 2024; Wick, 2021).

In der aktuellen Leitlinie wird bei Patienten, die bereits präoperativ durch Krampfanfälle aufgefallen sind, sowohl eine prä- als auch perioperative antikonvulsive Therapie empfohlen. Nach erfolgter OP kann nach einem Zeitraum von circa drei Monaten die antikonvulsive Therapie ausgeschlichen werden. Eine Primärprophylaxe bei dem Vorliegen einer zerebralen Neoplasie wird aktuell nicht empfohlen. In vielen Fällen ist im Krankheitsverlauf eine antikonvulsive Polytherapie notwendig, um eine Anfallsfreiheit zu gewährleisten (Kerkhof et al., 2013). Circa 20 % der Patienten mit einem Glioblastom und einer begleitenden Epilepsie leiden an wiederkehrenden epileptischen Anfällen trotz einer adäquaten antiepileptischen Polytherapie (De Bruin et al., 2021).

1.6 GLUTAMATERGE MECHANISMEN IM GLIOBLASTOM

Ein wesentlicher Faktor für die Progression und das Wachstum von Glioblastomen ist der Neurotransmitter Glutamat. Es konnte sowohl in Studien an Zelllinien als auch an humanen Proben gezeigt werden, dass in Glioblastomen und auch im umliegenden Gewebe eine erhöhte Glutamatkonzentration vorkommt (Roslin et al., 2003). Im gesunden Hirngewebe ist

eine niedrige extrazelluläre Glutamatkonzentration von entscheidender Bedeutung für die normale Hirnfunktion. Für die Aufrechterhaltung dieser, ist ein enges Zusammenspiel zwischen Ausschüttung und Aufnahme von Glutamat notwendig. Dabei spielen Glutamattransporter eine entscheidende Rolle (Robert & Sontheimer, 2014).

Ein entscheidender, an der Glutamatausschüttung beteiligter Transporter ist das Antiportersystem XC-. Der Antiporter besteht aus den zwei Transmembranproteinen, 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc) (Codiert auf dem Gen *SLC3A2* (solute carrier family 3 member 2) Gen) und xCT (Codiert auf dem Gen *SLC7A11* (solute carrier family 7 member 11) Gen). Das Transportsystem xCT bildet dabei die Untereinheit, welche für die Transportaktivität verantwortlich ist. Es handelt sich um einen Na⁺ unabhängigen aber Cl⁻ abhängigen Aminosäure Antiport mit Glutamatausscheidung aus der Zelle und Cystin Aufnahme im Verhältnis 1:1 (Bridges et al., 2012; Massie et al., 2015). Das XC- System ist nicht nur ausschlaggebend für den Glutamatstoffwechsel, sondern zeigt sich auch bei Tumorzellen essenziell für die Versorgung mit Cystein, welches ein grundlegender Bestandteil von Glutathion ist. Glutathion ist für alle eukaryotischen Zellen von Bedeutung, da es die Zellen vor oxidativem Stress, ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), schützt. Eine Imbalance in den ROS/Glutathion Spiegeln führt zu einer niedrigeren Proliferation (T. Liu et al., 2022).

Eine erhöhte Expression des Gens *SLC7A11* konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ist in vielen Tumoren mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten verknüpft (W. Lin et al., 2020). In Glioblastomen zeigt sich durch die erhöhte Expression von *SLC7A11* eine erhöhte Tumorprogression. Zudem wird eine erhöhte Chemoresistenz aufgrund des erhöhten Abbaus von ROS durch vermehrte Synthese von Glutathion angenommen (Polewski et al., 2017).

Der Transporter excitatory amino acid transporter 2 (*EAAT2*), codiert auf dem Gen solute carrier family 1 member 2 (*SLC1A2*), ist ebenfalls eng mit der extrazellulären Glutamatkonzentration assoziiert. Dieser Transporter ist hauptsächlich auf der Zellmembran von Astrozyten lokalisiert, welcher im gesunden Hirngewebe für ca. 90% der Glutamat Wiederaufnahme in Astrozyten verantwortlich ist (Rao et al., 2015). Es handelt sich hierbei um einen Na⁺ anhängigen Transporter, welcher Glutamat in die Zelle aufnimmt (Robert & Sontheimer, 2014).

Im Hirngewebe sind nicht nur Glutamattransporter von wesentlicher Bedeutung für die extrazelluläre Glutamatkonzentration. Zwei Enzyme spielen eine wesentliche Rolle bei der Biosynthese und dem Abbau von Glutamat. Zum einen die branched-chain amino acid aminotransferase (*BCAT*) und zum anderen die Glutamat Ammonium Ligase (*GS*).

Die *BCAT1*, kodiert durch das gleichnamige Gen *BCAT1*, ist ein Enzym der de-novo Glutamat Synthese, welches circa 30 % des Glutamates im Hirngewebe synthetisiert (Hull et

al., 2012). Verzweigt-kettige Aminosäuren sind essenziell für die Tumorpheriferation. Sie sind ein wichtiger Stickstoffspender im Glutamat/Glutamin Zyklus. Eine Inhibition der *BCAT1* führt zu einer deutlichen Abnahme der Glutamatausscheidung aus den Zellen und zu einer Verringerung der Proliferation (Tönjes et al., 2013). Das Enzym katalysiert die reversible Reaktion von verzweigt-kettigen Aminosäuren (Leucine, Valin und Isoleucin) mit α -Ketoglutarat zu Glutamat und verzweigt-kettigen- α -Ketosäuren (Suh et al., 2019).

Die Glutamat-Ammonium-Ligase, kodiert durch das Gen *GLUL*, ist ein Enzym, welches die Umwandlung von Glutamat und Ammonium in Glutamin katalysiert. Im gesunden Gewebe ist dieses Enzym essenziell für die Bindung von toxischem Ammoniak, besonders im Muskelgewebe und im Hirngewebe (Castegna & Menga, 2018). Im Glioblastom konnten Expressionsdaten des Gens *GLUL* mit der Entstehung einer Epilepsie in Glioblastomen in Zusammenhang gebracht werden (Rosati et al., 2013).

Bislang konnte nur für einige Gene ein Überlebensvorteil im Glioblastom nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten von Glutamatrezeptoren und am Glutamatstoffwechsel beteiligte Gene sind bis heute in der Forschung nur wenig beleuchtet worden (Alexander & Cloughesy, 2017). Eine Zusammenfassung der glutamatergen Mechanismen im Glioblastom ist in Abbildung 18 in der Diskussion dargestellt.

1.7 GLUTAMATREZEPTOREN

Glutamatrezeptoren sind ein wichtiger Teil der Neurotransmission. Man unterscheidet die Rezeptoren in zwei Gruppen. Zum einen in die exzitatorischen ionotropen Glutamatrezeptoren und zum anderen in die entweder inhibitorischen oder exzitatorischen metabotropen Glutamatrezeptoren.

1.7.1 IONOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN

Die ionotropen Glutamatrezeptoren unterteilen sich in drei Gruppen. Die einzelnen Rezeptoren sind dabei nach ihren jeweiligen charakteristischen Agonisten benannt. Sie unterteilen sich nach Agonisten in die Gruppen der AMPA-Rezeptoren (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), die Kainat-Rezeptoren (Kainsäure) und die NMDA - Rezeptoren (N-methyl-D-aspartate). Allen ionotropen Rezeptoren ist gemein, dass sie kationenpermeabel sind. Der Unterschied in den Untereinheiten und in der Zusammensetzung der Untereinheiten in einem Rezeptorsystem führt zu einer Varianz in Struktur und Funktionen der einzelnen Rezeptoren. Dabei können die Untereinheiten eines Rezeptors nur mit den Untereinheiten desselben Rezeptors eine funktionale Einheit bilden. Ein Austausch von funktionalen Untereinheiten zwischen den verschiedenen Gruppen

AMPA, Kainat und NMDA der ionotropen Rezeptoren ist nicht möglich. (K. B. Hansen et al., 2021).

AMPA-Rezeptoren:

AMPA-Rezeptoren sind auf der postsynaptischen Membran lokalisiert. Der Rezeptor besitzt einen tetramerischen Aufbau. Die Rezeptoren können aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut werden. Insgesamt sind bis heute vier Untereinheiten des AMPA-Rezeptors beschrieben, GluR1 bis GluR4, welche durch die Gene *GRIA1* bis *GRIA4* kodiert werden (K. B. Hansen et al., 2007, 2021). Die Untereinheiten können entweder als Homotetramer oder Heterotetramer vorkommen.

AMPA-Rezeptoren besitzen eine schnelle Öffnungskinetik. Die Ionendurchlässigkeit des Rezeptors wird im Wesentlichen durch die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt. Dabei ist die Untereinheit GluR2 der entscheidende Schlüssel für eine mögliche Calciumpermeabilität des fertigen Rezeptors. Kommt diese Untereinheit in einer posttranskriptionellen Modifikation in einem AMPA-Rezeptor vor, wird dieser nicht mehr calciumpermeabel. Ein Großteil der im Hirngewebe vorkommenden AMPA-Rezeptoren besitzt allerdings die editierte GluR2 Untereinheit und ist somit nicht calciumpermeabel (Chen et al., 2023; Herguedas et al., 2016).

Das exzitatorische postsynaptische Signal besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten. Zum einen die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte schnelle Aktivierung, Deaktivierung und Desensibilisierung innerhalb weniger Millisekunden, zum anderen eine durch NMDA-Rezeptoren vermittelte langsame Aktivierung, Deaktivierung und Desensibilisierung über zehn bis mehrere hundert Millisekunden (K. B. Hansen et al., 2007, 2018).

NMDA-Rezeptoren:

NMDA-Rezeptoren sind heterotetramerisch aufgebaut und bestehen aus vier zusammengesetzten Untereinheiten. Der typische Zusammenbau des Rezeptors besteht aus je zwei Untereinheiten *GluN1* (kodiert durch das Gen *GRIN1*), sowie zwei Untereinheiten *GluN2A-D* (kodiert auf den Genen *GRIN2A* bis *GRIN2D*) oder *GluN3A* oder *GluN3B* (kodiert auf den Genen *GRIN3A* und *GRIN3B*). NMDA-Rezeptoren können sowohl durch den Liganden Glutamat als auch spannungsabhängig aktiviert werden. Im Ruhezustand ist der Rezeptor mit einem Magnesiumion verschlossen, welcher durch die Depolarisation der Zellmembran entfernt wird. Zusätzlich zu der Natriumpermeabilität und Kaliumpermeabilität sind NMDA Rezeptoren Calciumpermeabel. Dies spielt eine besondere Rolle bei der synaptischen Plastizität und dem damit verbundenen Lernen von Informationen (Chen et al., 2023). Im umliegenden Gewebe sorgen hohe Glutamat Spiegel für eine NMDA Rezeptoraktivierung der umliegenden Neurone. Dies wirkt sich neurotoxisch auf die Neurone

aus, sodass es zu Apoptose des neuronalen Gewebes kommt (Stefani Leivas Pereira et al., 2017).

Kainat-Rezeptoren:

Funktionelle Kainat-Rezeptoren sind Tetramere, welche aus den Untereinheiten GluK1 bis GluK5 (kodiert durch die Gene *GRIK1* bis *GRIK5*) aufgebaut sind. Die Untereinheiten GluK1 bis GluK3 können dabei jeweils als homo- oder heterotetramere vorkommen. Die Untereinheiten GluK4 und GluK5 benötigen mindestens eine Untereinheit GluK1 bis GluK3 für die Funktionalität (K. B. Hansen et al., 2021). Die Untereinheiten GluK1 bis GluK3 haben eine niedrige Affinität zu Glutamat, wohingegen die Untereinheiten GluK4 und GluK5 eine hohe Affinität aufweisen. Über die Expression und die Pathophysiologie der Kainat-Rezeptoren bei Glioblastomen und in ZNS-Metastasen ist bis dato nur wenig bekannt.

1.7.2 METABOTROPE GLUTAMATREZEPTOREN

Die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Membranrezeptoren. Insgesamt gelang bis heute der Nachweis von acht Rezeptoren, mGluR1 bis mGluR8 (kodiert durch die Gene *GRM1* bis *GRM8*), welche zur Familie der mGluR gehören. (Niswender & Conn, 2010, p. 2) Die Rezeptoren werden nach ihren Eigenschaften in Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 2). Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt bei Rezeptoren der Gruppe 1 G_q gekoppelt. Nach der Bindung von Glutamat extrazellulär erfolgt die Aktivierung der intrazellulären Phospholipase C (PLC). Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 dient als Ligand am IP_3 Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums, welches nach der Aktivierung des Rezeptors zu einem Ca^{2+} Ausstrom in das Zytoplasma der Zelle führt. Durch die Erhöhung des Diacylglycerins wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Durch die erhöhten Ca^{2+} Spiegel und die aktivierte PKC werden diverse sekundäre Signalwege aktiviert (Mao et al., 2022). Die Rezeptoren der Gruppe II und der Gruppe III sind $G_{i/o}$ gekoppelte Rezeptoren. Nach der Rezeptoraktivierung erfolgt die Inhibition der Adenylatcyclase (AC). Dies führt im Wesentlichen über die Inaktivierung der Proteinkinase A (PKA) zu einer Regulierung verschiedener Stoffwechsellzyme.

Über die metabotropen Rezeptoren ist nach aktuellem Forschungsstand noch recht wenig im Zusammenhang mit der tumorassoziierten Epilepsie bekannt. Die Forschung hat sich in den letzten Jahren zunehmend auf das Verhältnis der Signaltransduktion der mGluR in Glioblastomen konzentriert. Über Rezeptoren der Gruppe 1 ist aktuell nur wenig bekannt. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Blockierung von mGluR1 in Zelllinien von Glioblastomen in vitro einen antiproliferativen Effekt besitzt. Dies geschieht am ehesten

durch eine geringe Aktivierung des PI3K / Akt / mTOR Signalkaskade (Zhang et al., 2015). Ein Nachweis einer Expression von mGluR5 gelang bis dato lediglich in Studien in Glioblastomen. Über die Funktion von mGluR5 in Glioblastomen ist noch wenig bekannt (Stefani Leivas Pereira et al., 2017). Die Rezeptoren der Gruppe 2 sind die am meisten betrachteten mGluR in Studien. Es konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien von Glioblastomstammzellen eine niedrige Expression oder eine gezielte Blockade von mGluR2/3 oder das knock-out von mGluR3 zu einem höheren Ansprechen auf die Chemotherapie mit TMZ geführt hat (Ciceroni et al., 2013a). Diese Effekte werden dadurch ausgelöst, da Rezeptoren der Gruppe 2 eine Vielzahl von Signalkaskaden auslösen. Zum einen wird der Signalweg über die MAP-Kinase, zum anderen über die PI3-Kinase ausgelöst. Dies führt bei einer gesteigerten Expression der Rezeptoren zu einer stärkeren Proliferation und zu einem Verweilen der Zellen im undifferenzierten Stadium (Stefani Leivas Pereira et al., 2017). Die Rezeptoren der Gruppe 3 sind im Zusammenhang mit Glioblastomen und ZNS-Metastasen noch nicht hinreichend weit erforscht.

Tabelle 2:

Übersicht über die Metabotropen Glutamaterezeptoren.

Tabelle in Anlehnung an Niswender & Conn, 2010.

Gruppe	Rezeptor	Expressionsort	Signalweg
<i>Gruppe I</i>	mGluR1	Neurone, Geschmacksknospen vorwiegend postsynaptische Expression	G _q Signalweg
	mGluR5	Neurone, Astrozyten vorwiegend postsynaptische Expression	
<i>Gruppe II</i>	mGluR2	Neurone prä-und postsynaptische Expression	G _i Signalweg
	mGluR3	Neurone, Astrozyten prä-und postsynaptische Expression	
<i>Gruppe III</i>	mGluR4	Neurone vorwiegend präsynaptische Expression	G _i Signalweg
	mGluR6	Retina postsynaptische Expression in ON- bipolar Zellen	
	mGluR7	Neurone präsynaptische Expression	
	mGluR8	vorwiegend präsynaptische Expression	

1.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Das Glioblastom und ZNS-Metastasen sind trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung maligne Tumorerkrankungen des ZNS, welche mit einer der schlechtesten Prognosen unter allen Tumorerkrankungen für den Patienten einhergehen.

Bis heute gibt es nur wenige Informationen über die Expression und den Einfluss von Glutamatrezeptoren in ZNS-Metastasen. Bei Glioblastomen gibt es einige Daten in Bezug auf Glutamatrezeptoren, allerdings wurden diese in der Gesamtheit von nur wenigen Arbeiten bis dato untersucht.

Ein entscheidendes Ziel dieser Arbeit ist es, Glutamatrezeptoren mit einem signifikanten Unterschied in der Expression für Glioblastome und ZNS-Metastasen zu identifizieren und als Biomarker nutzbar zu machen, welcher dann Einzug in die molekularbiologische klinische Routinediagnostik finden könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Erkenntnisse über die Ätiologie der tumorassoziierten Epilepsie zu gewinnen. Häufig stehen für an zerebralen Malignomen erkrankten Patienten nicht nur die Tumorerkrankung selbst im Fokus, sondern die begleitenden Symptome, die mit der schwerwiegenden Erkrankung einhergehen.

Eines der häufigsten initialen und auch im Verlauf auftretenden Begleitsymptome ist die tumorassoziierte Epilepsie. Es gibt viele Ansatzpunkte, welche die Entstehung der Epilepsie versuchen nachzuvollziehen. Es gibt jedoch bis heute nur wenige genaue Forschungsergebnisse, welche über den Kontext von Glutamat im Zusammenhang mit der tumorbedingten Epilepsie berichteten. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, wie der Zusammenhang zwischen der Expression von Glutamatrezeptoren und Transportern/Enzymen des Glutamatstoffwechsels und dem Auftreten von Epilepsie bei Patienten mit Glioblastomen ist.

Folgende Fragestellungen wurden für die Arbeit definiert:

1. Wie unterscheiden sich Expressionsmuster der Gene von Glutamatrezeptoren und Genen des Glutamattransports und Glutamatstoffwechsels von Glioblastomen und ZNS-Metastasen?
2. Können Gene identifiziert werden, welche spezifisch mit der tumorassoziierten Epilepsie in Zusammenhang stehen?
3. Welche Gene bieten die beste Spezifität und Sensitivität zur Differenzierung von Glioblastomen und ZNS-Metastasen?

II. MATERIAL UND METHODEN
2.1 MATERIALIEN**2.1.1 GERÄTE UND ZUBEHÖR**

Tabelle 3:

Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Cuvette	µCuvette G1.0	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Gelelektrophorese	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Oszillationsmörser	Xenox MHX/E	Xenox/PROXXON GmbH Föhren, Deutschland
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Reference 2,5µl - 1000µl	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Termocycler	Realplex2	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Termocycler	qTOWER ³ G	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Versiegelungsgerät 96-well Platte	HeatSealer S100	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
UV-Arbeitsplatz	E-Box CX5 TS	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland

2.1.2 REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 4:

Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und der deren Hersteller

Reagenz	Hersteller
Trizol® Reagent / Guanidiniumthiocyanat	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
AceQ qPCR SYBR Green Master Mix	Vazyme™ Nanjing, China
M-MLV Reverse Transcriptase, Rnase (H-), Point Mutant	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Ethanol 70% steril	Zentralapotheke Universität Rostock Rostock, Deutschland
Isopropanol, steril	Zentralapotheke Universität Rostock Rostock, Deutschland
Wasser, Nulease-Free, autoclaved and 0,2 µm filtered	Ambion The RNA Company, Austin, Texas, USA
dNTP-Mix	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
M-MLV Puffer	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega Corporation Madison, Wisconsin, USA
Random hexamere	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
DNA-Ladepuffer: 60% Glycerin + 0,25% Bromphenolblau in TAE	Zentralapotheke Universität Rostock Rostock, Deutschland
Invitrogen TrackIt™: 100, 50 bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH Düren, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße: 3810X, 1.5 ml, PCR clean	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes: 2 ml, 0,5 ml PCR clean	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Biosphere® Filter Tips: 0,1-2,5 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Primer RT-qPCR	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
Twin.tec real-time PCR Plate 96, skirted	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland

Reagenz	Hersteller
TopVision Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
RNase AWAY®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 SOFTWARE

Tabelle 5:

Auflistung der für diese Arbeit verwendete Software

Programm	Verwendungszweck
qPCRsoft	PCR-Tower Software
Sigmaplot 13.0	Statistik / Grafikerstellung
SPSS 27.0	Statistik / Grafikerstellung
Biorender / Goodnotes / Matlab	Grafikerstellung

2.2 STUDIENKOLLEKTIV UND HERKUNFT DER PROBEN

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden Gewebeproben von Patienten verwendet, welche während geplanter Tumoroperationen der Neurochirurgie der Universitätsmedizin Rostock entnommen worden sind. Die Durchführung der Operationen erfolgte entsprechend den Leitlinien der Neurochirurgie. Die Proben waren postoperativ pathologisch untersucht, klassifiziert und wurden für die weitere Verwendung asserviert. Anschließend war ein Teil der Gesamtprobe für diese Arbeit in das Institut für Physiologie überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert worden.

Die Studie ist von der Ethikkommission geprüft und genehmigt worden.

Registrationsnummern der Ethikkommission ID: A45-2007, A2018-0167, A2019-0187

2.3 METHODEN

2.3.1 PROBENVORBEREITUNG UND RNA ISOLIERUNG

Der Umgang mit RNA erfordert größte Sorgfalt, da ubiquitär vorkommende RNasen eine qualitativ hochwertige RNA-Gewinnung beeinträchtigen können. Aufgrund dessen geschah die RNA-Isolation an einem separaten Arbeitsplatz, welcher mit RNase AWAY® vor Arbeitsbeginn behandelt wurde. Bei allen Einwegmaterialien handelte es sich um RNase-freie Produkte.

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurde von der bei -80°C gelagerten Patientenprobe, je ein ca. 3x3x3 mm großes Gewebestück entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß (2ml PCR-Clean) überführt. Nach der Auftrennung der Probe in mehrere Bruchstücke wurde das verbleibende Material unverzüglich wieder eingefroren.

Die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform single-step Methode fand für die RNA-Isolation Anwendung (Chomczynski & Sacchi, 2006). Die Abbildung 4 illustriert den schematischen Ablauf der RNA-Isolation.

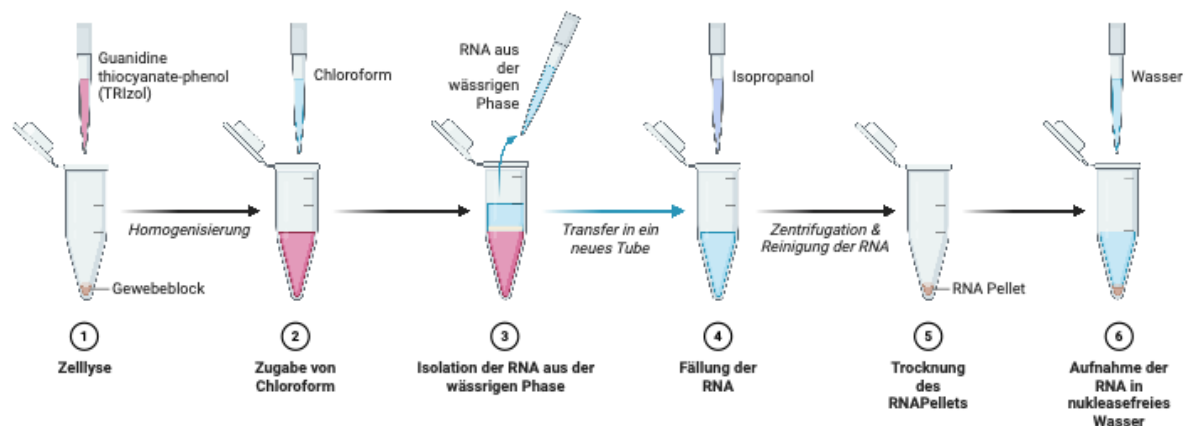


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufes der RNA-Extraktion nach der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-single-step-Methode.

① Durchführung der Zellyse mittels mechanischer Zertrümmerung des Gewebes und Zugabe von Trizol. ② Zugabe von Chloroform zur Phasentrennung, um in Schritt ③ die wässrige Phase mit RNA zu entnehmen. Schritt ④ bis ⑥ Fällung der RNA durch Zugabe von Isopropanol und Reinigung der RNA. “Created with BioRender.com”

Unter Zuhilfenahme des elektrischen Oszillationswerkzeuges Xenox MHX/E gelang die feine Zertrümmerung der Gewebeprobe in Vorbereitung auf die RNA-Isolation. Die Zugabe von 700 µl Trizol® Reagent zu jeder Probe und die anschließende gründliche Homogenisierung mittels des Oszillationswerkzeug Xenox MHX/E waren die nächsten Arbeitsschritte. Alle Arbeitsschritte wurden in einer gekühlten Probenhalterung, sowie zusätzlich auf Eis

durchgeführt, um eine zu starke Erhitzung der Probe durch den Oszillator zu verhindern. Im Anschluss an die Homogenisierung des Gewebes mit Trizol wurde dieses für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Phasentrennung erfolgte mittels der Beigabe von 200 µl Chloroform zu dem Trizol® Reagent-Probengemisch. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Probe für 15 Minuten bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert werden. Hierbei bildeten sich drei Phasen. Die oberste wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol versetzt. Daraufhin erfolgte bei Raumtemperatur eine Inkubationszeit von zehn Minuten. Dieser Schritt führte zur Fällung der RNA aus der Lösung. Für die anschließende Herstellung der RNA-Pellets erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation der Eppendorf Tubes bei 25.000 g bei Raumtemperatur.

Im Anschluss ist der Überstand verworfen worden. Das Pellet ist daraufhin in 700 µl Ethanol gewaschen und mit 25.000 g für fünf Minuten zentrifugiert worden. Um eine möglichst reine RNA zu erhalten, ist die Zugabe von Ethanol und Zentrifugation drei weitere Male wiederholt worden. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäß bis zur vollständigen Verflüchtigung des Ethanols zum Trocknen gelegt und in 30 µl nukleasefreies Wasser aufgenommen. Die weitere Lagerung der RNA und der nicht verwendeten Trizol Phasen erfolgte bei -80°C.

2.3.2 QUANTIFIZIERUNG UND REINHEITSKONTROLLE DER RNA UND CDNA

Zur Ermittlung der Konzentration und der Reinheit an gewonnener RNA und der im weiteren Schritt gewonnenen cDNA wurde jede Probe am Biophotometer (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) untersucht. Zunächst erfolgte mit nukleasefreiem Wasser eine Leermessung. Daraufhin wurden je 1 µl der gewonnen RNA oder cDNA auf die Testküvette gegeben und in das Gerät gestellt. Auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte die Berechnung der Konzentration der RNA und cDNA für jede Probe durch folgende Formel durchgeführt werden.

$$\text{Transmission}(T) = \frac{I_1}{I_0}$$

$$\text{Absorption}(A) = -\log T$$

Lambert – Beersches Gesetz:

$$A = \text{Absorptionskoeffizient}(e) \times c \times \text{Optische Schichtdicke (OS)}$$

$$\text{Konzentration}(c) = \frac{A}{e} \times \text{OS}$$

Die Extinktion wurde bei $\lambda=260$ nm, $\lambda=280$ nm und $\lambda=230$ nm bestimmt. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei $\lambda=260$ nm, das für Proteine und Phenole bei $\lambda=280$ nm, das Absorptionsmaximum von anderen organischen Substanzen liegt bei $\lambda=230$ nm. Die daraus ermittelten Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} geben dabei Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäure. Der Grenzwert für die Ermittlung von verunreinigten Proben beträgt in der Literatur für A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 (Armbrecht, 2013). Verunreinigte Proben mit einem Grenzwert von unter 1,8 oder mit einem nur sehr geringen Gehalt an RNA oder cDNA wurden in diesem Schritt aussortiert.

2.3.3 cDNA SYNTHESE

Die extrahierte RNA muss für die weitere Analyse mittels qPCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies geschieht durch eine Reverse Transkriptase. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Dadurch wird die vorhandene RNA als Matrize genutzt, um diese in cDNA umzuschreiben. Für den Ansatz der Reversen Transkription wurden in eine Eppendorf Tube (0,5 ml, PCR-Clean) folgende Reagenzien gemischt gegeben:

Tabelle 6:

Reagenzien zur Vorbereitung der cDNA-Synthese

Reagenzien	Volumen
RNA	1 μ g
Oligo-(dT)-Primer (50 pmol/ μ l)	2 μ l
Nucleasefreies Wasser	auf 20 μ l aufgefüllt

Diese Mischung wurde bei 70°C für sechs Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung unverzüglich auf Eis. Daraufhin wurde folgender Mastermix zu der auf Eis stehenden Probe zugegeben.

Tabelle 7:

Reagenzien des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenzien	Volumen
M-MLV Reaktionspuffer	4 μ l
dNTP-Mix	1 μ l
RNasin Plus RNase Inhibitor (40U/ μ l)	0,5 μ l
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/ μ l)	1 μ l

Der fertige Mix kam anschließend in den Eppendorf realplex² Cycler. Für die optimalen Bedingungen für die Reverse Transkription ist der Cycler für zehn Minuten bei 20,0°C und für 40 Minuten bei 50,0°C eingestellt worden. Anschließend erfolgte die unter Abschnitt 2.3.2 erklärte Mengen- und Reinheitsbestimmung mit der gewonnenen cDNA. Nachfolgend wurde der cDNA nukleasefreies Wasser zugegeben, sodass diese in Vorbereitung auf die anschließende RT-qPCR die cDNA eine Konzentration von 1µg/µl aufgewiesen hat. Die entstandene cDNA lagerte bis zur weiteren Nutzung bei -20°C.

2.3.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, welche genutzt werden kann, um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Die quantitative real time PCR (qRT-PCR) ist eine Weiterentwicklung der klassischen PCR. Das grundlegende Prinzip der PCR ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

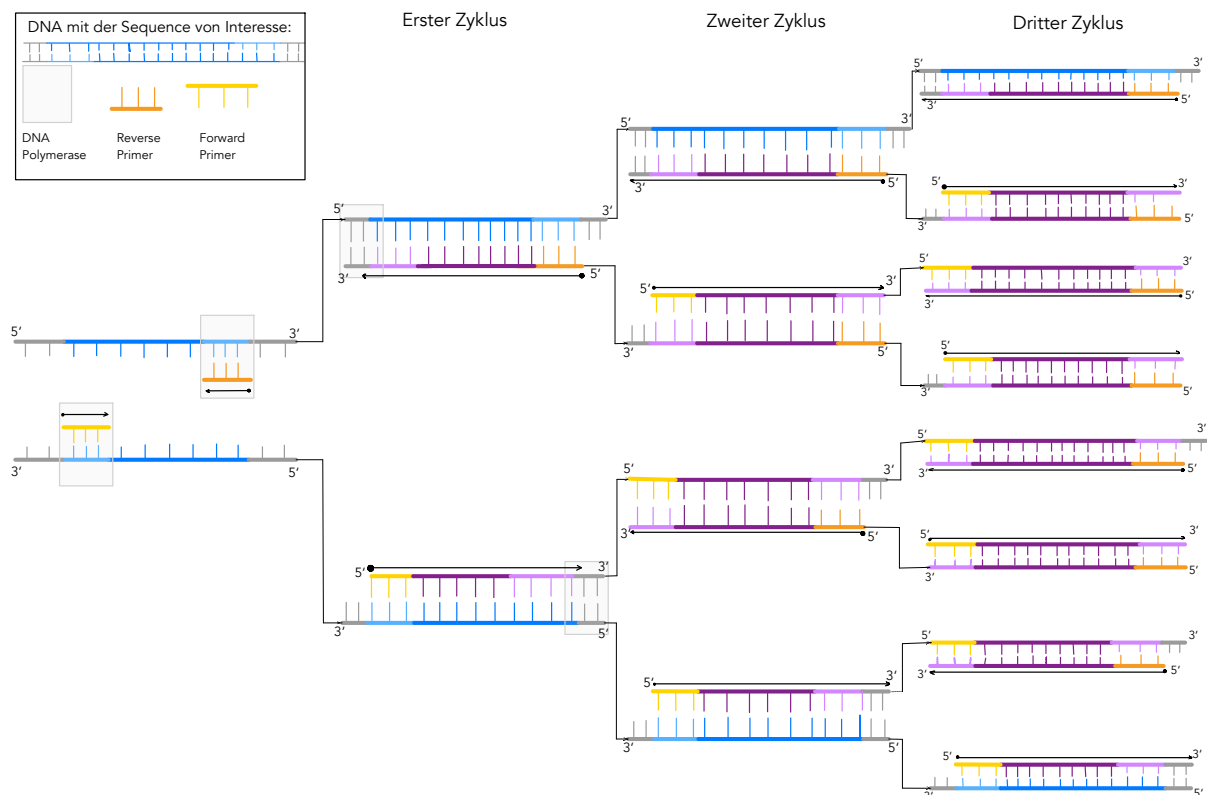


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der PCR.

Das Prinzip der quantitative real time PCR (RT-qPCR) ist die Quantifizierung des gesuchten DNA-Abschnittes und der daraus resultierende Nachweis in Echtzeit einer Expression bestimmter Gene. Dies wird erst möglich durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen, wie SYBR-Green. Diese Farbstoffe, welche im Wirkprinzip auf einer spezifischen Bindung an Doppelstränge DNA beruhen und in Verbindung mit der DNA ein fluoreszierendes Signal emittieren können, sind dafür essenziell. Das fluoreszierende Signal kann dann vom entsprechenden RT-qPCR Cyclus erfasst werden, wodurch eine Aussage zum vorhandenen DNA-Material in Echtzeit möglich wird. Das Prinzip der RT-qPCR ist in Abbildung 6 gezeigt.

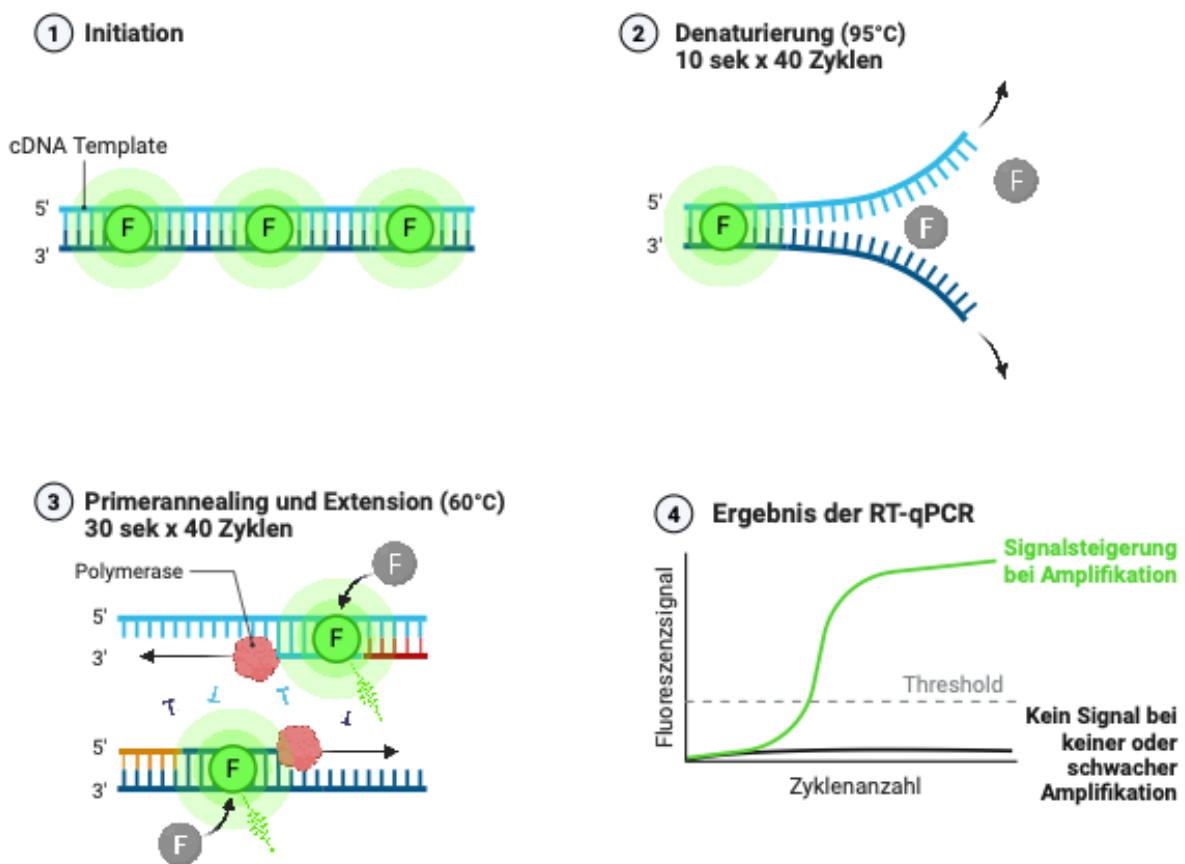


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der RT-qPCR.

① Bindung von SYBR-Green an die doppelsträngige DNA. ② Denaturierung der DNA bei 95°C und Lösung des SYBR-GREEN aus der Bindung mit der DNA. ③ Primerannealing und Extension der DNA und erneute Bindung von SYBR-Green an die DNA. ④ Durch die Vervielfältigung der DNA mit jedem Zyklus der PCR erfolgt eine kontinuierliche Steigerung des Fluoreszenzsignals. Übersteigt die Fluoreszenz einen Schwellenwert (Threshold), wird an diesem Punkt der ct-Wert abgelesen. Wird kein Signal über alle Zyklen der PCR nachgewiesen, dann wird keine Expression des Gens in der untersuchten Probe angenommen. „Created with BioRender.com“

Für die RT-qPCR griff man auf eine 96-Well-Platte von Eppendorf zurück. Jedes Well entsprach dabei einem untersuchten Gen einer Probe. Alle Gene sind in einer doppelten Versuchsreihe untersucht worden, um mögliche Verunreinigungen und Abweichungen einzelner Ergebnisse auszuschließen.

Eine Befüllung der einzelnen Wells der Platte erfolgte mit:

Tabelle 8:

Verwendete Reagenzien für die RT-qPCR.

Reagenz	Volumen
Forward + Reverse Primer	Je 0,5 µl
Sybr Green Mastermix	10 µl
cDNA	1 µl
Nuklease-freies Wasser	8 µl

Für die RT-qPCR kam der qTOWER³ G (Analytik Jena, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Das PCR-Protokoll bestand aus den folgenden Schritten: Initial erfolgte eine Erhitzung der Proben auf 95°C über fünf Minuten. Anschließend folgten 40 Zyklen mit je zehn Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C.

Die Berechnung des ΔCt Wertes der jeweiligen Proben erfolgte über die Formel:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Housekeepinggen(GAPDH/TBP)}}$$

Anschließend berechnete sich die relative Expression gegenüber dem Housekeepinggenen über die Formel $10^3 \times 2^{-\Delta Ct}$.

2.3.4.1 LISTE DER VERWENDETEN PRIMER SEQUENZEN

Die in dieser Studie verwendeten Primersequenzen, leiteten sich für die ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren aus der Arbeit von Brocke et al., 2010 ab. Die Sequenzen für die Gene des Glutamattransportes und Glutamatmetabolismus wurden aus der Arbeit von Lange et al., 2019 für diese Arbeit übernommen.

Tabelle 9:

Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

GEN	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)
<i>GRIN1</i>	5'-AGG AAC CCC TCG GAC AAG TT-3'	5'-CTC TCC AGT CGT CAC CAG GT-3'
<i>GRIN2A</i>	5'-TGG ACG TGA ACG TGG TAG C-3'	5'-CCC CCA TGA ATG CCC AAG AT-3'
<i>GRIN2B</i>	5'-TTC CGT AAT GCT CAA CAT CAT GG-3'	5'-TGC TGC GGA TCT TGT TTA CAA A-3'
<i>GRIN2C</i>	5'-ACC TGC CAT TTT GCT GGG G-3'	5'-GGC TAC ACT GCT GAT CTC GT-3'
<i>GRIN2D</i>	5'-CTG GCC TCA CTG GAT CTG G-3'	5'-GGA AGG AAA CCA TAA TCA CGCA-3'
<i>GRIN3A</i>	5'-GAC GCC CTC CTA TTT GCC G-3'	5'-CCA CGG TAT GGC ACA CAC T-3'
<i>GRIN3B</i>	5'-TGT CTC GGC ACT TTA AGG TGT-3'	5'-GGT GTT CCA ACA GCG TTA CCA-3'
<i>GRIA1</i>	5'-GGT CTG CCC TGA GAA ATC CAG-3'	5'-CTC GCC CTT GTC GTA CCA C-3'
<i>GRIA2</i>	5'-TGT TGG AGT CCA CGA TGA ACG-3'	5'-GCA AGA TTT ACT GGG GTT CCT AA-3'
<i>GRIA3</i>	5'-CGA GAG GGG TGT ATG CCA TC-3'	5'-GAA GCT AGG CGT AAC AAA GGA T-3'
<i>GRIA4</i>	5'-ATT GGT GTC AGC GTG GTC TTA-3'	5'-CCA GGG AAA ACC AGA GGC T-3'
<i>GRIK4</i>	5'-TGA GGA TCG CTG CTA TCT TGG-3'	5'-CGT ACT CGC TGT CTC TGA GAA-3'
<i>GRIK5</i>	5'-GAT CAA CGG GAT CAT CGA GGT-3'	5'-GTG TCC GTG GTC TCG TAC TG-3'
<i>GRIK1</i>	5'-ACT CAG GAT CGG AGG GAT TTT-3'	5'-GGT GAC TGC AAA CTT GAA AGC-3'
<i>GRIK2</i>	5'-AGC GTC GGT TAA AAC ATA AGC C-3'	5'-GTT TCT TTA CCT GGC AAC CTT CT-3'
<i>GRIK3</i>	5'-AGA GAG CAG CGT TCC TTC TG-3'	5'-CGG CGG TCA TTG AAT GTG T-3'
<i>GRM1</i>	5'-CAG CCG ATT CGC TTT AGC C-3'	5'-GGG ATC GCG GTA CTG AAG TTG-3'
<i>GRM2</i>	5'-CTA TGG CGA GAC AGG CAT TGA-3'	5'-CAT CCT CAG AAC GGG TGA ACA-3'
<i>GRM3</i>	5'-GCA CCT CAA CAG GTT CAG TGT-3'	5'-TGG TGG AGT CGA GGA CTT CC-3'
<i>GRM4</i>	5'-GAC AAC AGC CGC TAC GAC TT-3'	5'-GAG GCC ACT GTG GAC ACA T-3'
<i>GRM5</i>	5'-AAT CTC CCG ATG TCA AGT GGT-3'	5'-AGG GTT TCG GTG GTT TGT TTC-3'
<i>GRM6</i>	5'-CCA CAC AGC GTG ATT GAC TAT-3'	5'-GCA GCC GAT GAG AGA CAG AT-3'
<i>GRM7</i>	5'-GGC TGG AAG CGA TGC TCT AC-3'	5'-TGT TCG AGC GCG TAA GTG TC-3'
<i>GRM8</i>	5'-CCA GAG CTA AGT GAT AAC ACC AG-3'	5'-TCT GTG ACT GAG CAA TGC AAA-3'
<i>SLC1A2</i>	5'-CCT CTT AAG CCC CGT CAA GG-3'	5'-CAG ACT AGT GCT CCT GCG AT-3'
<i>GLUL</i>	5'-TCA TCT TGC ATC GTG TGT GTG-3'	5'-CTT CAG ACC ATT CTC CTC CGG-3'
<i>BCAT</i>	5'-CAA CTA TGG AGA ATG GTC CTA AGCT-3'	5'-TGT CCA GTC GCT CTC TTC TCT TC-3'
<i>IDH1</i>	5'-CGG TCT TCA GAG AAG CCA TT-3'	5'-GCA AAA TCA CAT TAT TGC CAA C-3'
<i>SLC7A11</i>	5'-TGC TGG GCT GAT TTA TCT TCG-3'	5'-GAA AGG GCA ACC ATG AAG AGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3'	5'-ACC CTG TTG CTG TAG CCA-3'
<i>TBP</i>	5'-TCG GAG AGT TCT GGG ATT GT-3'	5'-CAC GAA GTG CAA TGG TCT TT-3'

2.3.5 SCHMELZKURVENANALYSE

Die Schmelzkurvenanalyse wurde genutzt, um eine Validierung der qPCR durchzuführen und um eine spezifische Detektion von Produkt, Primerdimeren, sowie Verunreinigungen in der Leerkontrolle sicherzustellen. Bei der Erstellung der Schmelzkurve macht man sich das Prinzip zunutze, dass die Doppelhelixstruktur der DNA in wässrigen Lösungen nur bis zu einer bestimmten Temperaturgrenze stabil ist. Dies liegt an den Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Einzelstränge der DNA verbinden. Durch die kontinuierliche Erhitzung wird die Doppelhelix der DNA aufgeschmolzen. Je länger das zu untersuchende Produkt ist und dadurch auch mehr Basenpaare enthält und je höher der Anteil an Guanin und Cytosin in den Basenpaaren vorhanden ist, desto höher ist die resultierende Schmelztemperatur.

Die Schmelzkurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf mit einem Peak/Wendepunkt der Kurve, an dem 50% der cDNA einzelsträngig und 50% doppelsträngig vorliegen. Die Erstellung der Schmelzkurve basiert ebenso wie die photometrische Bestimmung der DNA auf einer Lichtabsorption bei 260 nm (Arnemann, 2019).

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde in dieser Arbeit das PCR-Reaktionsprodukt am Ende des 40. Zyklus ein weiteres Mal auf 95°C für 15 Sekunden erhitzt. Daraufhin folgte eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur um 2°C/min mit 15 Sekunden Plateauphasen alle 0,5 °C, sowie eine Detektion der Lichtabsorption bei 260 nm. Abbildung 19 im Anhang zeigt beispielhaft die Schmelzkurven aller untersuchten Gene für drei untersuchte Proben. Eine Erstellung und Kontrolle der Schmelzkurve fand bei jeder durchgeführten RT-qPCR statt.

2.3.6 GELELEKTROPHORESE

Die Methode der Gelelektrophorese ist angewendet worden, um die entstandenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufzutrennen. Die Technik basiert darauf, dass die DNA-Fragmente negativ geladen sind und sich in einem elektrischen Feld zur positiven Elektrode durch das Agarosegel bewegen.

Für die Herstellung eines 2% Agarose-Gels wurden 2g TopVision Agarose Tablets, Thermo Scientific™ in 100ml TAE-Puffer gelöst. Anschließend erfolgte die Erhitzung der entstandenen Suspension für circa drei Minuten in der Mikrowelle, und nach leichter Abkühlung konnten 6µl Mandori Green, Nippon Genetics zugegeben werden. Nach Homogenisierung der Suspension erfolgte das Gießen in die vorbereitete Form von Biorad. Nach vollständigem Auskühlen und Erstarren des Agarosegels wurde dieses samt Träger in die Elektrophoresekammer von Biorad überführt und anschließend die gesamte Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer befüllt. In jede Tasche des Gels sind je 10µl DNA aus

der qPCR und 2µl Ladepuffer gegeben worden. Die erste und die letzte Tasche des jeweiligen Agarosegels wurden mit je einer DNA-Leiter Invitrogen TrackIt™ beladen, um anschließend die Produktgröße ermitteln zu können. Die Elektrophorese erfolgte für circa 30 bis 40 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Zur Analyse der Agarosegelplatten wurde der UV-Arbeitsplatz E-BOX CX5 TS, Vilber Lourmat Deutschland GmbH genutzt. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese dargestellt.

2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die primäre Datenerfassung der RT-qPCR geschah mit dem Programm qPCRsoft (Analytik Jena), die Vorauswertung und Datenzusammenfassung erfolgten mittels Microsoft Office. Mittels Sigmaplot 13.0 und SPSS 27.0 wurden die statistische Auswertung und grafische Darstellung durchgeführt.

2.4.1 U-TEST UND ROC-ANALYSE

Der U-Test nach Mann und Whitney ist ein Test für Stichproben, für die eine Verteilung in der Grundgesamtheit wenig oder nicht bekannt ist. Mit diesem Test wird überprüft, ob sich zwei Stichproben in Bezug auf ihre zentrale Tendenz unterscheiden. Die ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic-Kurve) ist ein statistisches Mittel zur grafischen Darstellung, um die Leistungsfähigkeit von Klassifikatoren, wie in dieser Arbeit die untersuchten Gene, zu bewerten. Eine ROC-Kurve zeigt die Beziehung zwischen der Sensitivität (TPR (true positive rate)) und der 1-Spezifität (falsch Negativrate) eines Genes für verschiedene Schwellenwerte. Ein Gen, welches die perfekte Trennung zwischen zwei Gruppen herstellt, hätte einen annähernd geraden Verlauf von 0 ausgehend entlang der Y-Achse bis $y=1$ und anschließend einen nahezu parallelen Verlauf zur X-Achse mit einer möglichst großen Fläche unterhalb der Kurve (AUC - area under the curve). Bei einem maximalen Unterschied der untersuchten Gruppen geht man bei der ROC-Kurve von einer möglichst großen Annäherung der AUC in Richtung 1 oder 0 aus.

Eine unklare Abgrenzung zwischen zwei Gruppen würde sich durch eine Kurve verdeutlichen, welche sich $y=x$ annähert. Daraus resultiert eine AUC nahe 0,5, welche als kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen definiert werden kann.

Die Proben wurden für die statischen Tests jeweils in die Gruppen Glioblastom und ZNS-Metastase aufgeteilt und untersucht. Eine weitere Betrachtung innerhalb der Gruppe der Glioblastome erfolgte aufgrund des Merkmales Epilepsie.

III. ERGEBNISSE

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Alle eingeschlossenen Proben wurden auf die Expression der 29 Gene (Tabelle 9) von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren, sowie Genprodukten mit Beteiligung am Transport und Metabolismus von Glutamat untersucht.

In die Studie wurden insgesamt 55 Proben von Patienten mit einem ZNS-Malignom eingeschlossen [29 Männer (52,7%) und 26 Frauen (47,3%)]. Davon stammten 35 Proben [21 Männer (60 %) und 14 Frauen (40 %)] von Patienten mit diagnostiziertem Glioblastom. Das Verhältnis zwischen den Geschlechtern entspricht den Literaturangaben mit einem Verhältnis zwischen Männern und Frauen von circa 1,5:1 (Ostrom et al., 2020). Des Weiteren stammten 20 Proben [8 Männer (40 %) und 12 Frauen (60 %)] von Patienten mit einer primären ZNS-Metastase. Die Proben wurden stufenweise in Gruppen von je sechs bis acht Proben aufgearbeitet.

Unter den Proben von Patienten mit einem Glioblastom konnte bei 53% (18 Patienten) der Patienten eine im Krankheitsverlauf aufgetretene Epilepsie oder als Erstsymptom aufgetretene Epilepsie festgestellt werden. Hingegen konnte bei 16 Patienten keine Epilepsie nachgewiesen werden. Bei fünf Patienten zeigte sich der epileptische Anfall als Erstsymptom des Glioblastoms, und bei 13 Patienten gab es mindestens eine epileptische Episode im Krankheitsverlauf. Patienten mit einer Epilepsie waren dabei signifikant jünger als Patienten ohne Epilepsie (Medianes Alter 52 vs. 72 Jahre bei ED; p-Wert 0,015). Bei 13 Proben zeigte die molekularbiologische Untersuchung einen methylierten MGMT-Promotor. Bei 20 Proben konnte kein methylierter MGMT-Promotor nachgewiesen werden, und zwei Proben waren grenzwertig methyliert.

In der Gruppe der ZNS-Metastasen entfiel der größte Anteil mit elf Proben auf Lungenkarzinome (9 NSCLC und 2 SCLC), gefolgt von je drei Kolonkarzinomen und Mammakarzinomen. Einen geringeren Anteil bildeten mit je einer Probe ein Melanom, ein Cervixkarzinom und ein Nierenzellkarzinom.

Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose betrug bei Patienten mit einem Glioblastom durchschnittlich 13,3 Monate. Bei Patienten mit der Diagnose einer ZNS-Metastase lag das mittlere Überleben nach Erstdiagnose des Primärtumors bei 60,4 Monaten. Bei an einem Glioblastom erkrankten Patienten gab es in einem Fall eine spinale Metastasierung des Glioblastoms. Bei den Patienten mit einem Malignom zeigten insgesamt fünf von 20 eine initiale ZNS-Metastasierung bei Diagnosestellung des Primärtumors. Zum Stichtag, dem 30.10.2023, waren insgesamt 36 Patienten verstorben. Von zwölf Patienten liegen keine weiteren Überlebensdaten vor, während zwei Patienten noch am Leben sind. In der Studienkohorte des Glioblastoms liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren mit einer

Spanne zwischen dem 29. und 91. Lebensjahr, die höchste Inzidenz liegt zwischen dem 70. und 79. Lebensjahr. Die höchste Inzidenz für ZNS-Metastasen liegt zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr.

Die Lokalisation der Tumore unterscheidet sich zwischen Glioblastomen und Metastasen. Bei Patienten mit der Diagnose eines Glioblastoms zeigten sich initial die meisten Tumore in frontaler (12/35) und temporaler (10/35) Lage. Seltener konnte eine parietale (5/35) und multifokale Lage (2/35) festgestellt werden. In 5 von 35 Fällen zeigte sich eine einzelne Hirnregion überschreitende große Tumormasse mit Ausdehnung über mindestens zwei Hirnregionen.

Bei Patienten mit ZNS-Metastasen traten diese in acht von 20 Fällen überwiegend cerebellär auf, gefolgt von je vier Fällen mit frontaler und occipitaler Lage. Eine multifokale Ausbreitung konnte in drei Fällen nachgewiesen werden. Eine Metastase kam nicht näher bezeichnet aus dem Cerebrum.

Die meisten Patienten (25 von 35) sind mittels einer Radiochemotherapie, 14 Patienten davon sind nach dem STUPP-Schema mit Radiotherapie und TMZ behandelt worden (Stupp et al., 2005). Sieben Patienten erhielten bei methylierten MGMT-Promotor zusätzlich Lomustin (CCNU). Bei vier Patienten erfolgte die weitere Behandlung in einer externen Klinik. Weitere vier Patienten sind mit einer alleinigen Radiotherapie behandelt worden. Sechs Patienten verstarben vor der weiteren Behandlung, oder es wurde sich für ein palliatives Vorgehen entschieden. Bei den Patienten mit ZNS-Metastasen war die weitere Behandlung in Abhängigkeit vom Tumorprogress, Primärtumor und wurde dem entsprechenden Zustand des Patienten individuell angepasst. Allen gemein war die postoperative Bestrahlung des Tumorbetts. Einige Patienten erhielten in Abhängigkeit vom Primärtumor eine postoperative Chemotherapie. Die Patientendaten befinden sich im Anhang in Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengefasst.

3.2 KORRELATION ZWISCHEN DEN HOUSEKEEPING GENEN

Für die Expressionsanalyse des gesamten Probenkollektives wurden stets zwei Housekeeping Gene genutzt. Dazu wurde zum einen das Gen des Enzyms Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) sowie das Gen des Proteins TATA-binding protein (*TBP*) als Housekeeping-Gen gewählt.

Im ersten Schritt der Analyse der Expressionsdaten der Housekeeping Gene wurde eine Korrelation zwischen den Expressionsergebnissen der Proben mit den jeweiligen Housekeeping Genen erstellt. Dabei konnte stets eine hohe Korrelation von mindestens $r > 0,98$ bei allen eingeschlossenen Proben errechnet werden. Das Signifikanzniveau lag bei

allen Proben bei $\alpha < 0,05$. Wegen fehlender oder geringer Korrelation zwischen *GAPDH* und *TBP* von $r < 0,95$ mussten insgesamt zwei Proben ausgeschlossen werden.

Aufgrund einer allgemein starken Korrelation beider Housekeeping Gene wurde die weitere Analyse und statistische Auswertung mit *GAPDH* durchgeführt.

3.3 GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese wurde mit den Endprodukten der RT-qPCR durchgeführt. Diese wurde zum einen zur weiteren Bestätigung der kalkulierten Produktlänge des Primers verwendet, sowie zum anderen zur Prüfung der Proben auf Verunreinigungen.

In der Gelelektrophorese konnte bei allen Primern die kalkulierte Basenpaarlänge innerhalb eines Toleranzbereiches von 25% ermittelt werden. Für jedes untersuchte Gen konnte in der Gelelektrophorese zudem nur eine Bande, und somit nur ein PCR-Produkt, nachgewiesen werden. In Abbildung 7 werden die Banden der einzelnen untersuchten Gene, die bei der Gelelektrophorese entstanden sind, anhand einer Probe eines Glioblastoms beispielhaft dargestellt.

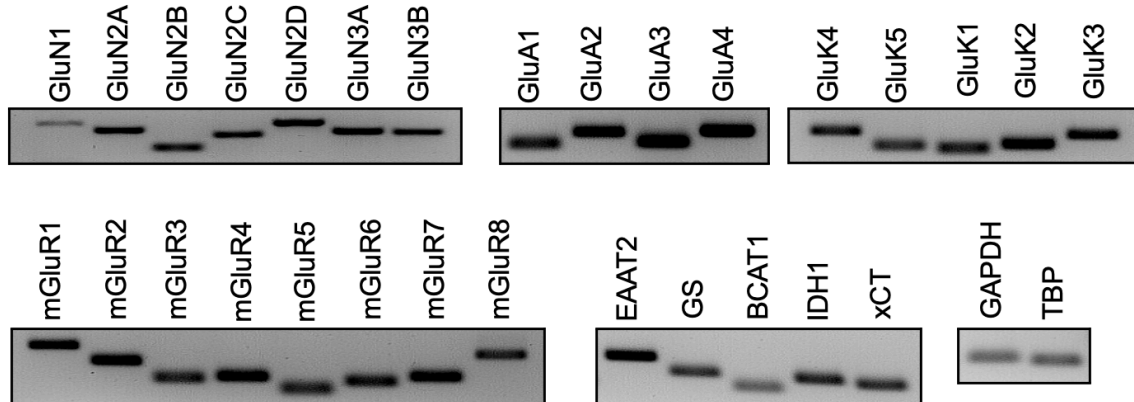


Abbildung 7: Ergebnisse der Gelelektrophorese. Abbildung von einer beispielhaft gewählten Probe eines Glioblastoms. Anhand der Banden wurde die Basenpaarlänge der in der RT-qPCR entstanden Produkte ermittelt.

3.4 ERGEBNISSE DES U-TESTS

3.4.1 GLUTAMATREZEPTOREXPRESSION IN GLIOBLASTOMEN UND ZNS-METASTASEN

Im Folgenden werden alle ausgewerteten Ergebnisse mit den Housekeeping Gen *GAPDH* gezeigt. Eine Auswertung mit dem Housekeeping Gen *TBP* fand im Rahmen der Publikation der Ergebnisse statt. Diese wurden im Journal *Frontiers of Oncology* veröffentlicht (Lange, Gade, et al., 2024). Die Expressionsdaten auf Grundlage des TBP-Abgleich als *housekeeping gene* sind im Anhang tabellarisch hinterlegt.

NMDA-Rezeptoren:

Bei der Expression von NMDA-Rezeptoren zeigte sich kein signifikanter Unterschied im U-Test zwischen der Gruppe der Glioblastome und der Gruppe der ZNS-Metastasen. Der p-Wert berechnete sich zwischen 0,067 für *GRIN3B* und 0,937 für *GRIN2B*. In Abbildung 8 sind die Expressionswerte der einzelnen NMDA-Untereinheiten zu sehen. Im Median zeigen sich die Werte von Glioblastomen und ZNS-Metastasen auf annähernd einem Niveau.

Insgesamt war bei den Metastasen eine breite Streuung der Expressionswerte der Gene aller NMDA-Rezeptoruntereinheiten feststellbar. In der Gruppe der Glioblastome konnte eine besonders breite Streuung der Expressionswerte in den Genen *GRIN1* (Glioblastome: Mittelwert \pm SEM: 17,09 \pm 7,84) und bei den Metastasen im Gen *GRIN2B* (ZNS-Metastasen: 88,81 \pm 49,49) nachgewiesen werden.

Das Gen *GRIN1* zeigte sowohl in der Gruppe der Glioblastome als auch in der Gruppe der Metastasen eine niedrigere mediane Expression, sie lag 1,6 – 17,3-mal niedriger im Vergleich zu der medianen Expression der Gene der anderen NMDA-Untereinheiten.

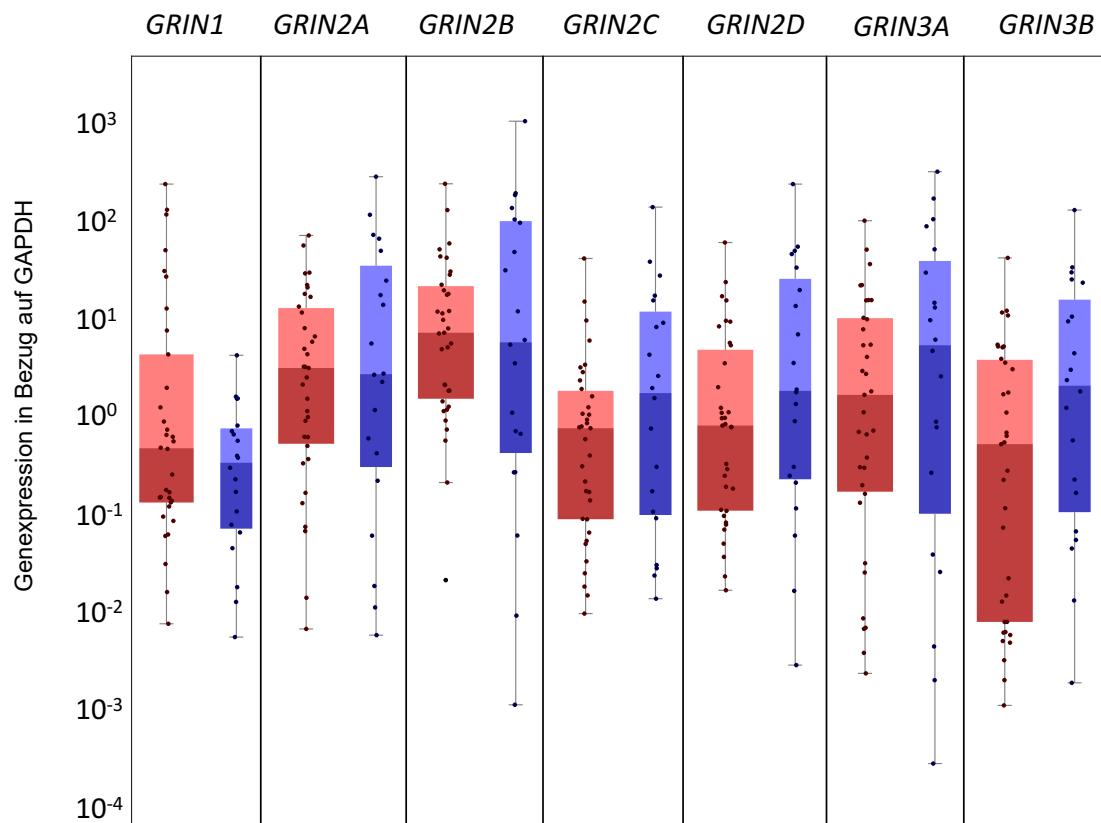


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen und ZNS-Metastasen werden auf der X-Achse vergleichend dargestellt. Legende: rot = Glioblastom; blau = ZNS-Metastase; GRIN: glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit.

AMPA-Rezeptoren:

Bei den Genen der AMPA-Rezeptoruntereinheiten konnte im U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen Glioblastomen und Metastasen, bei den Genen der Untereinheiten *GRIA1*, *GRIA2* und *GRIA3*, nachgewiesen werden. In Abbildung 9 sind die Boxplots der AMPA-Untereinheiten dargestellt.

Der U-Test ergab für die Untereinheiten *GRIA1* (Glioblastome: $5,56 \pm 1,47$ ZNS-Metastasen: $0,26 \pm 0,14$) und *GRIA2* (Glioblastome: $11,37 \pm 2,12$ ZNS-Metastasen: $0,09 \pm 0,03$) eine höhere Expression in Glioblastomen mit einem p-Wert von $<0,001$.

Die Untereinheit *GRIA3* (Glioblastome: $36,78 \pm 6,1$ ZNS-Metastasen: $53,59 \pm 26,3$) wies im Durchschnitt in Glioblastomen eine geringere Expression als in ZNS- Metastasen auf. Der U-Test ergab einen p-Wert von 0,021. Im Median zeigte sich hingegen eine höhere Expression in Glioblastomen (Glioblastome: 30,18 ZNS-Metastasen: 7,04). Dies ist vor allem auf die

erhöhte Expression des Gens in Lungenkarzinomen und Kolonkarzinomen in der untersuchten Kohorte zurückzuführen, welches eine deutlich höhere durchschnittliche Expression gegenüber anderen Tumorentitäten aufgewiesen hat.

In je vier von 20 Proben von ZNS-Metastasen gelang kein Nachweis einer Expression der Gene *GRIA1* und *GRIA2*.

Insgesamt zeigte sich bei der Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheiten dennoch eine deutlich höhere durchschnittliche Expression der Untereinheiten *GRIA3* und *GRIA4* gegenüber den Untereinheiten *GRIA1* und *GRIA2*, sowohl bei Glioblastomen als auch bei ZNS-Metastasen.

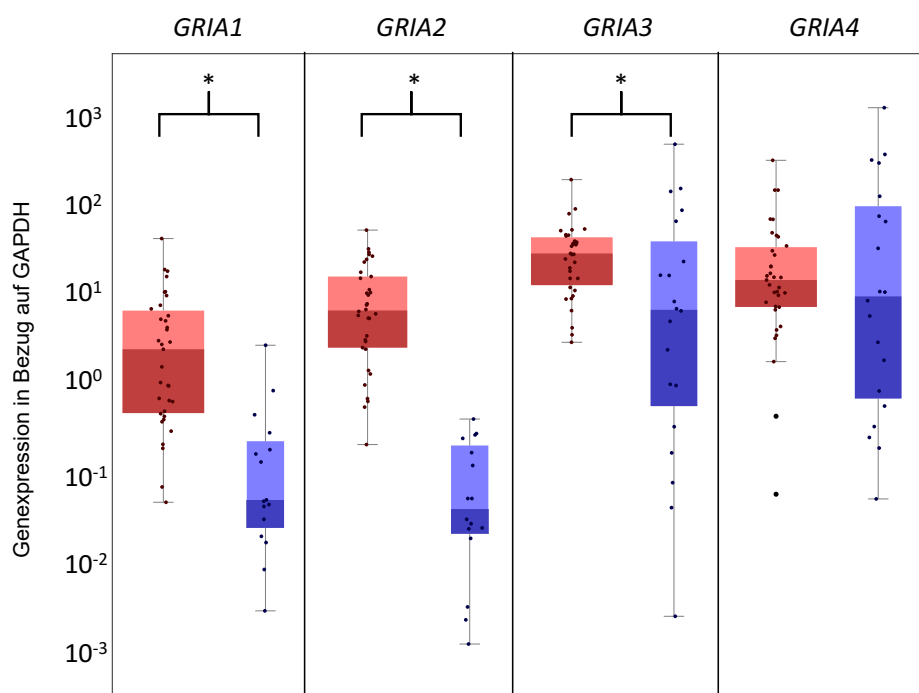


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der AMPA-Rezeptoruntereinheiten.

Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen und ZNS-Metastasen werden auf der X-Achse vergleichend dargestellt. * = Signifikanter Unterschied in der Expression der Untereinheiten *GRIA1*, *GRIA2* und *GRIA3*.
 Legende: rot = Glioblastom; blau = ZNS-Metastase; GRIA: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit.

KAINAT-Rezeptoren:

Signifikante Unterschiede zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen zeigten sich bei der Genexpression der KAINAT-Rezeptoruntereinheiten, besonders bei den beiden Genen *GRIK1* und *GRIK4*. In Abbildung 10 sind die Boxplots der Expressionsergebnisse

gegeneinander aufgetragen. Für die Gene beider Untereinheiten *GRIK1* und *GRIK4* konnte im U-Test ein P-Wert von $<0,001$ ermittelt werden.

Bei der Expression der Untereinheit *GRIK1* (Glioblastome: $10,86 \pm 2,61$ ZNS-Metastasen: $0,09 \pm 0,03$) zeigte sich ein besonders großer Unterschied zwischen den Gruppen. Die mediane Expression in ZNS-Metastasen lag rund 170-fach unter der Expression in Glioblastomen. In zwei Proben von ZNS-Metastasen konnte zudem keine Expression der *GRIK1*-Rezeptoruntereinheit nachgewiesen werden.

Eine Expression von *GRIK4* war hingegen in allen Proben nachweisbar. *GRIK4* (Glioblastome: $7,96 \pm 1,32$ ZNS-Metastasen: $2,71 \pm 1,04$) zeigte im Vergleich zu *GRIK1* einen geringeren Unterschied zwischen beiden Gruppen.

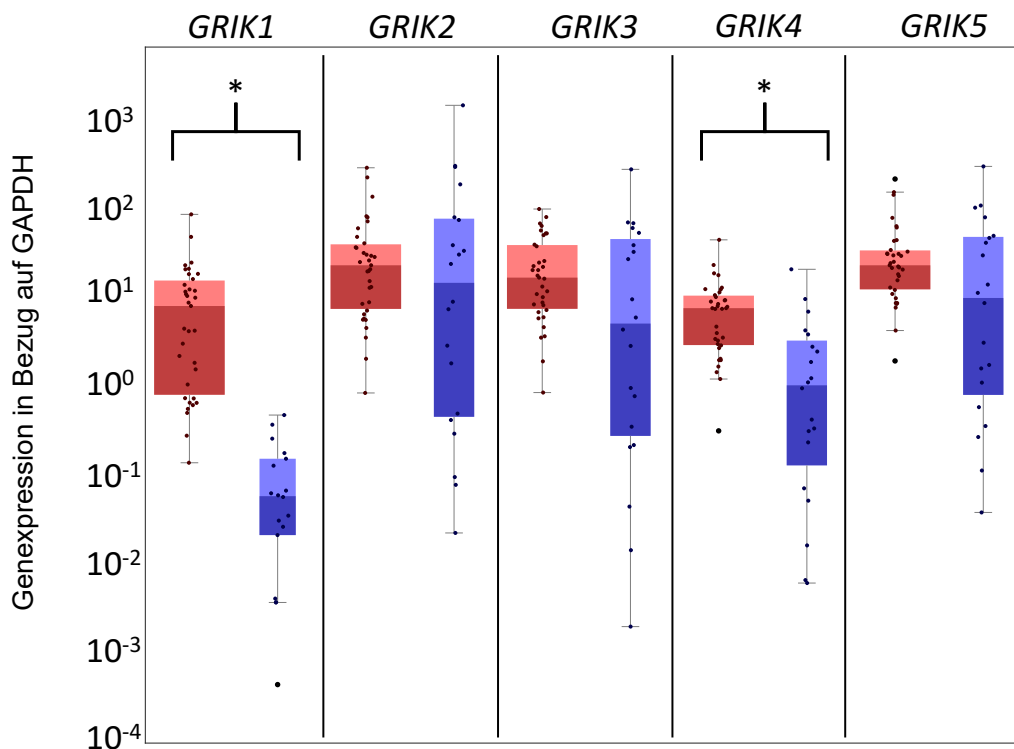


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der KAINAT-Rezeptoruntereinheiten. Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen und ZNS-Metastasen werden auf der X-Achse vergleichend dargestellt. * = Signifikanter Unterschied in der Expression der Untereinheiten *GRIK1* und *GRIK4*. Legende: rot = Glioblastom; blau = ZNS-Metastase; GRIK: glutamate ionotropic receptor kainate type subunit.

Metabotrope Glutamatrezeptoren:

Unter allen acht Genen der metabotropen Glutamatrezeptoren konnte allein in der Expression des Genes *GRM3* ein entscheidender Unterschied in der Expression festgestellt werden.

Die Expression von *GRM3* (Glioblastome: $5,77 \pm 1,75$ ZNS-Metastasen: $0,28 \pm 0,1$) wurde in den ZNS-Metastasen nur auf einem geringen Niveau, im Vergleich zum Glioblastom, nachgewiesen. Der p-Wert lag bei $<0,001$.

Interessanterweise konnte in ZNS-Metastasen in allen anderen Genen der metabotropen Glutamatrezeptoren (*GRM1*, *GRM2*; sowie *GRM4-GRM8*) eine im Durchschnitt höhere Expression gegenüber Glioblastomen gefunden werden. Lediglich *GRM3* bildet in dieser Gruppe eine Ausnahme. Die beschriebenen Unterschiede sind in Abbildung 11 nachvollziehbar. Die geringe Expression der ZNS-Metastasen von *GRM3* stellt sich auch grafisch in Boxplots dar, ebenso wie die beschriebene höhere Expression der anderen metabotropen Rezeptoren.

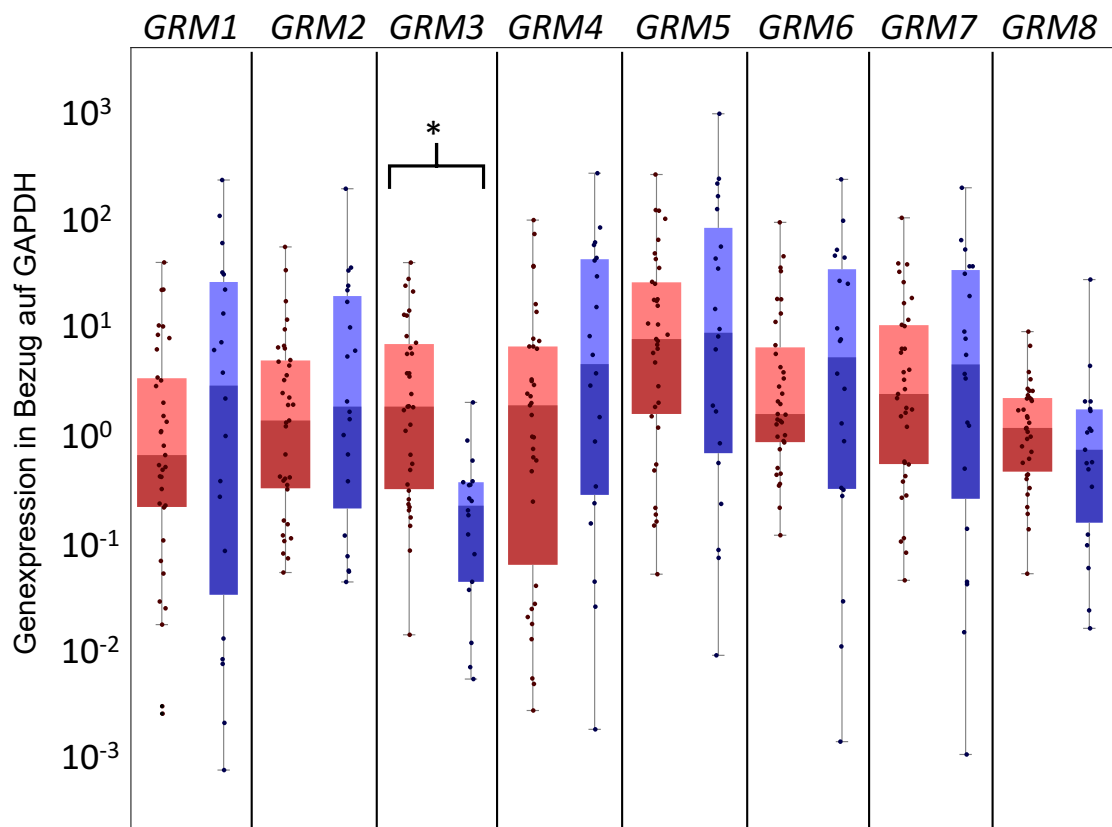


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der metabotropen Glutamatrezeptoren. Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen

und ZNS-Metastasen werden auf der X-Achse vergleichend dargestellt. * = Signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors mGluR3. Legende: rot = Glioblastom; blau = ZNS-Metastase; GRM: glutamate metabotropic receptor.

Gene des Transports und Metabolismus von Glutamat:

Bei Genen des Metabolismus und des Transports von Glutamat konnte bei drei Genen eine signifikant erhöhte Expression in der Gruppe der Glioblastome nachgewiesen werden. Bei den Genen *BCAT1* (Glioblastome: $24,07 \pm 3,99$ ZNS-Metastasen: $4,8 \pm 1,33$) und *GLUL* (Glioblastome: $784,87 \pm 94,47$ ZNS-Metastasen: $297,63 \pm 54,2$) errechnete sich ein p-Wert von $<0,001$, und für das Gen *SLC7A11* (Glioblastome: $22,92 \pm 4,96$ ZNS-Metastasen: $12,44 \pm 5,53$) errechnete sich der p-Wert bei 0,011.

Im Vergleich, über alle in dieser Arbeit untersuchten Gene hinweg, zeigte sich bei dem Gen *GLUL* die höchste Expression im Kollektiv. Diese erhöhte Expression kann man der grafischen Darstellung in Abbildung 12 entnehmen.

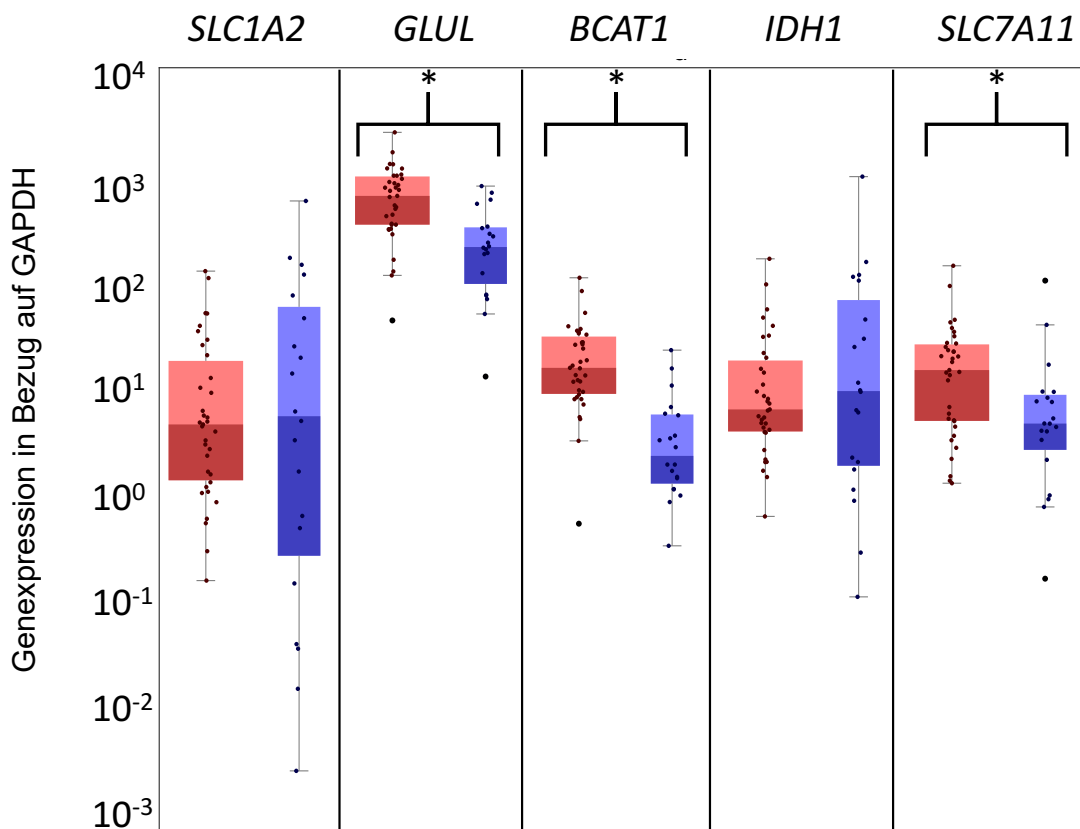


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der in den Glutamattransport und Metabolismus involvierten Gene.

Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen

und ZNS-Metastasen werden auf der X-Achse vergleichend dargestellt. *: Signifikanter Unterschied in der Expression bei den Untereinheiten *GRIK1* und *GRIK4*. Legende: rot = Glioblastom; blau = ZNS-Metastase; SLC1A2: solute carrier family 1 member 2, GLUL: glutamate-ammonia ligase, BCAT1: branched chain amino acid transaminase 1, IDH1: Isocitratdehydrogenase 1, SLC7A11: solute carrier family 7 member 11.

3.4.2 GLUTAMATREZEPTOREXPRESSION IN GLIOBLASTOMEN MIT UND OHNE EPILEPSIE

In der Gruppe der Glioblastome fand eine Aufteilung sowie eine Untersuchung des Merkmals Epilepsie statt. Bei dieser Untersuchung wurden insgesamt 34 Proben von Glioblastomen berücksichtigt. Eine Probe schloss man aufgrund mangelhafter klinischer Dokumentation der Epilepsie aus der Betrachtung aus. Insgesamt wurden 18 Proben von Patienten mit Glioblastom und nachgewiesener Epilepsie (53%) und 16 Proben von Patienten mit Glioblastom ohne Nachweis einer Epilepsie (47%) eingeschlossen.

Bei der Kalkulation des U-Tests konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression der Subgruppe von Glioblastomen mit initialer Epilepsie und im Verlauf aufgetretener Epilepsie und der Subgruppe von Glioblastomen ohne im Krankheitsverlauf aufgetretener Epilepsie festgestellt werden.

Besonders bei dem Gen der NMDA-Rezeptoruntereinheit *GRIN1* errechnete sich eine hohe Variabilität der Expressionsergebnisse innerhalb des Kollektivs der Glioblastome ohne Epilepsie mit einer hohen Streuung der Expressionswerte. Dies zeigte sich bei *GRIN1* durch einen hohen Standardfehler (Epilepsie (+): $14,52 \pm 9,2$ Epilepsie (-): $14,04 \pm 12,31$).

Bei den AMPA-Rezeptoren zeigte sich im Vergleich innerhalb der Gruppe eine geringe Expression der Untereinheiten GluR1 (Epilepsie (+): $5,33 \pm 1,98$ Epilepsie (-): $3,919 \pm 1,51$) und GluR2 (Epilepsie (+): $8,72 \pm 2,62$ Epilepsie (-): $5,08 \pm 1,25$) im Vergleich zu GluR3 (Epilepsie (+): $49,92 \pm 15,56$ Epilepsie (-): $31,08 \pm 5,95$) und GluR4 (Epilepsie (+): $59,83 \pm 26,74$ Epilepsie (-): $40,07 \pm 13,98$). Letztere wiesen im Median eine etwa zehnmal höhere Expression auf.

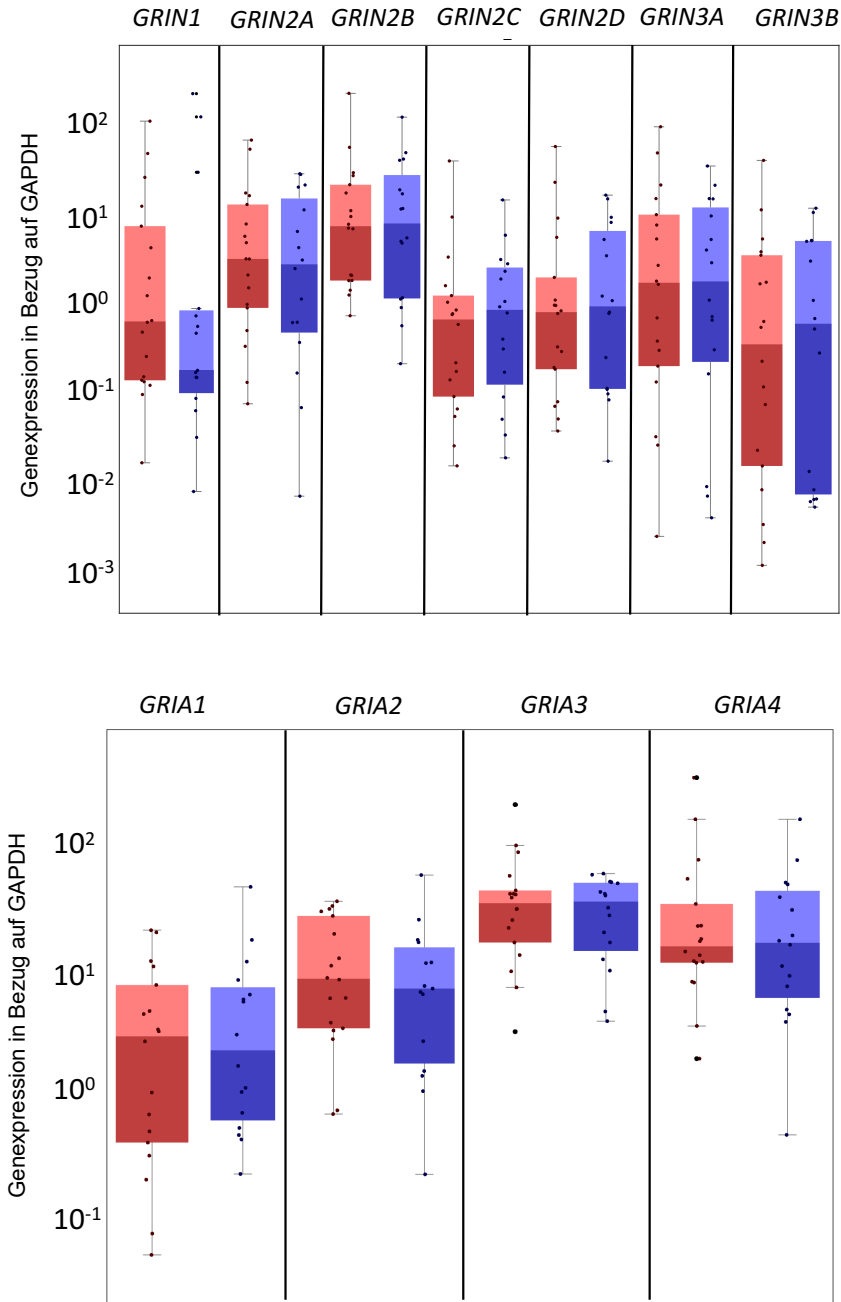


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten (obere Abbildung), sowie der AMPA-Rezeptoruntereinheiten (untere Abbildung).

Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Auf der X-Achse jeweils vergleichende Darstellung des Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen mit Epilepsie in rot und ohne Epilepsie in blau. Legende: GRIN: glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit, GRIA: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit.

Bei der Gruppe der Kainat-Rezeptoruntereinheiten, sowie bei den metabotropen Glutamatrezeptoren, konnten keine signifikanten unterschiedlichen Ergebnisse ermittelt werden.

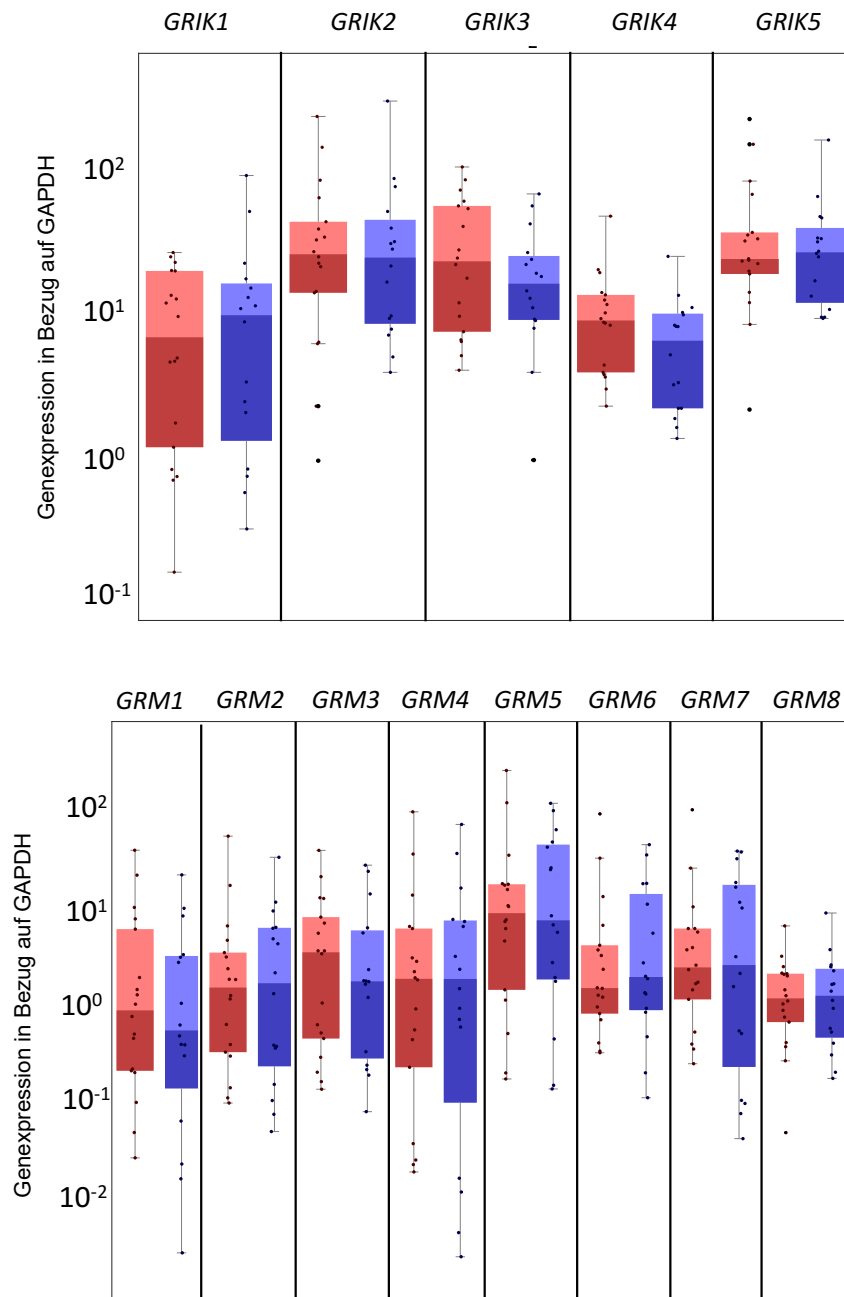


Abbildung 14: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der KAINAT-Rezeptoruntereinheiten (obere Abbildung), sowie der metabotropen Glutamatrezeptoren (untere Abbildung).

Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Auf der x-Achse jeweils vergleichende Darstellung des Boxplotes der Genexpression der Proben von Glioblastomen mit Epilepsie in rot und ohne Epilepsie in blau. Legende: GRIN: glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit, GRIK: glutamate ionotropic receptor kainate type subunit, GRM: glutamate metabotropic receptor.

Bei den Enzymen und Transportern im Glutamatstoffwechsel stach das Gen *GLUL* durch eine deutlich höhere mediane Expression (Epilepsie (+): $709,34 \pm 12,86$ Epilepsie (-): $791,12 \pm 6,28$) im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen heraus. Grafisch kann man die Ergebnisse zusammengefasst in Abbildung 13 bis 15 nachvollziehen.

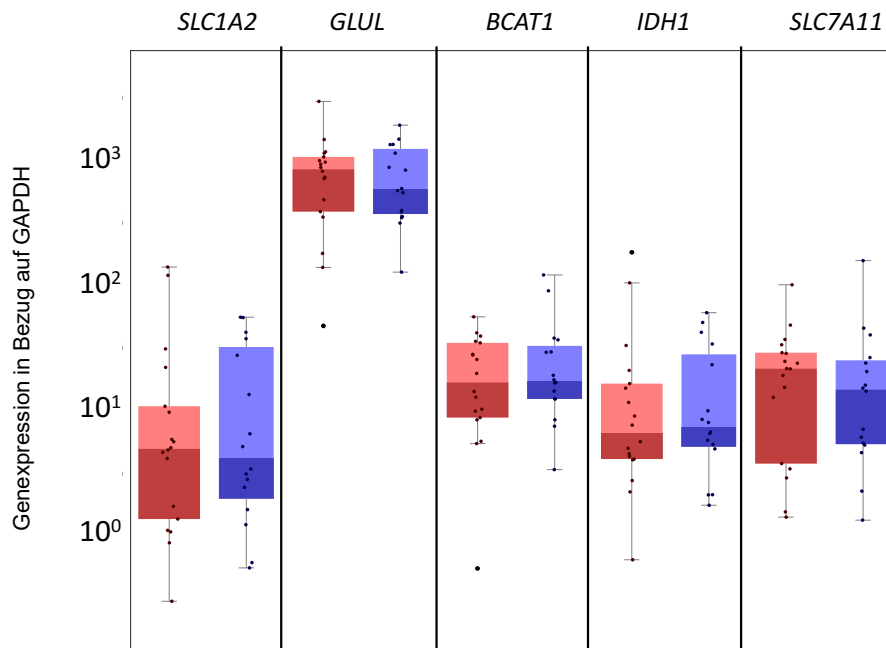


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Expressionsdaten der in den Glutamattransport und Metabolismus involvierten Gene.

Auftragung der logarithmisch errechneten Genexpression auf der Y-Achse, in Bezug auf das Housekeeping Gen GAPDH. Auf der x-Achse jeweils vergleichende Darstellung des Boxplots der Genexpression der Proben von Glioblastomen mit Epilepsie in rot und ohne Epilepsie in blau. Legende: SLC1A2: solute carrier family 1 member 2, GLUL: glutamate-ammonia ligase, BCAT1: branched chain amino acid transaminase 1, IDH1: Isocitratdehydrogenase 1, SLC7A11: solute carrier family 7 member 11.

3.5 ERGEBNISSE DER ROC-ANALYSE

In dieser Arbeit wurde die ROC-Analyse verwendet, um einen optimalen Trennwert zwischen den Genen von Glioblastomen und ZNS-Metastasen zu identifizieren, um potenzielle Biomarker zu erschließen. Im ersten Schritt wurde von jedem untersuchten Gen mithilfe der errechneten Expressionswerte eine ROC-Kurve erstellt und sowohl grafisch dargestellt als auch nach der errechneten AUC in Gruppen sortiert.

3.5.1 ROC-ANALYSE IN GLIOBLASTOMEN UND ZNS-METASTASEN

Auf den im U-Test bereits signifikant unterschiedlichen Genen lag bei der Erstellung der ROC-Kurven das Augenmerk. Beim Vergleich von Glioblastomen und Metastasen zeigten sich in der ROC-Analyse deutlichere Unterschiede zwischen den Gruppen. Die in der ROC-Analyse berechnete AUC wurde zur weiteren Gruppenbildung für die Auswahl möglicher Biomarker herangezogen.

Die Gene sind nach der errechneten AUC in zwei Gruppen eingeteilt worden. Die Gruppe der Gene mit einer AUC < 0,8, welche nur eine schwache Differenzierung zwischen beiden Gruppen ermöglicht, wurde als möglicher Biomarker verworfen. Die Gruppe der Gene mit einer AUC >0,8 konnte als möglicher Biomarker in die weitere Betrachtung eingeschlossen werden.

Zusammengefasst wurde bei den folgenden neun Genen ein signifikanter Unterschied im U-Test festgestellt: AMPA: *GRIA1-GRIA3*; KAINAT: *GRIK1, GRIK4*; mGluR: *GRM3*; Glutamatmetabolismus: *GLUL, BCAT1, SLC7A11*. Von diesen neun Genen konnte für sechs Gene in der ROC-Analyse eine AUC > 0,8 errechnet werden, siehe Abbildung 16.

Die größte AUC, somit auch der größte Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen, konnte bei den Genen, welche für die Expression von AMPA-Rezeptoren codieren, gefunden werden. Sowohl *GRIA1* als auch *GRIA2* wiesen eine AUC >0,92 auf. Des Weiteren zeigte sich bei den KAINAT-Rezeptoren das Gen *GRIK1* als vielversprechender Biomarker mit einer AUC von 0,95.

Ein etwas geringeres AUC wurde bei den Genen des Glutamatmetabolismus und des Transports gefunden. Hierbei konnte als möglicher Biomarker *GLUL* (0,819) und *BCAT1* (0,891) identifiziert werden.

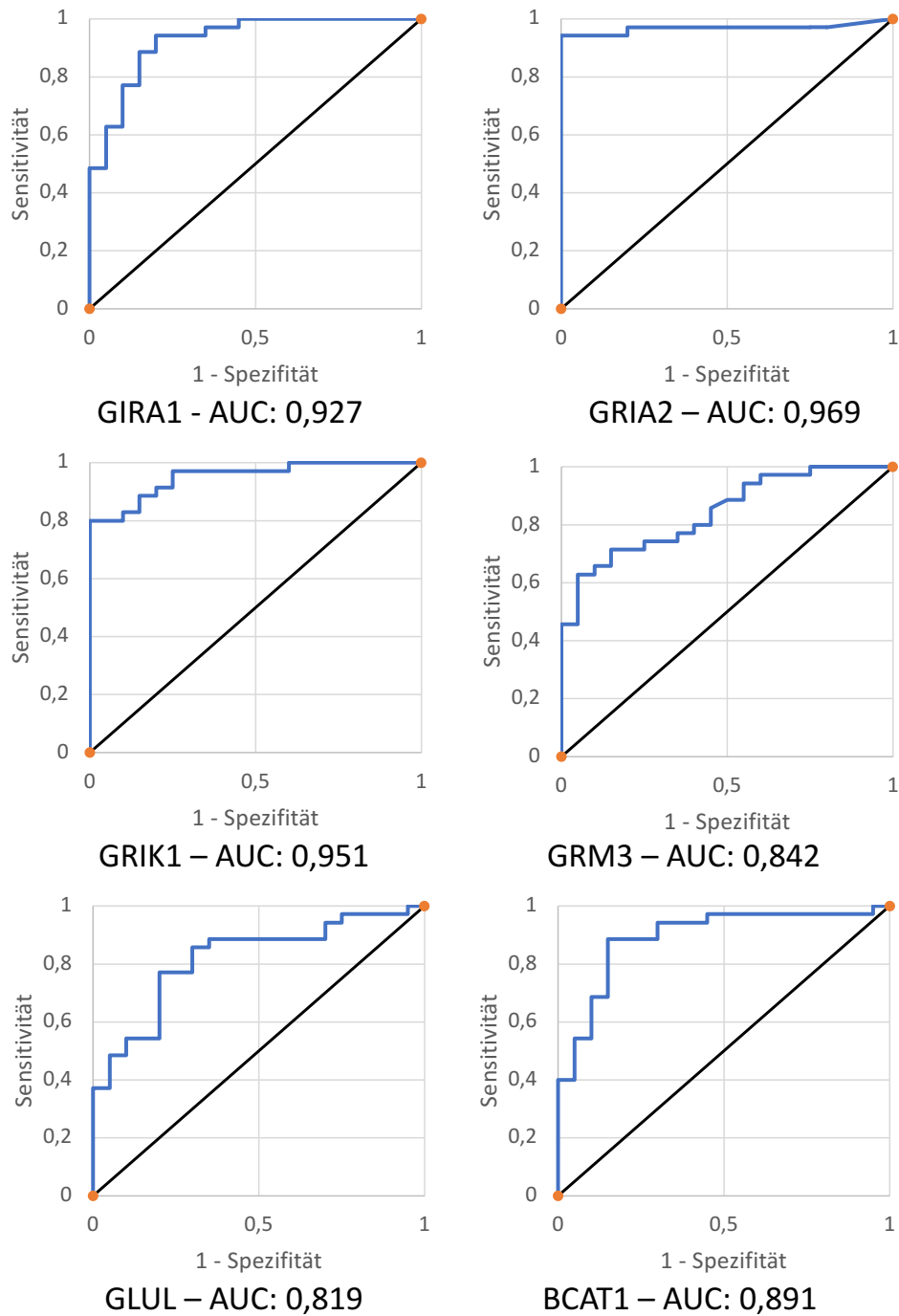


Abbildung 16: Darstellung der ROC-Kurven mit einer AUC größer 0,8.

Jeweils Auftragung der Sensitivität auf der y-Achse und 1-Spezifität (Falsch-Positiv-Rate) auf der x-Achse. Legende: GRIA1: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1, GRIA2: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1, GRIK1: glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1, GRM3: glutamate metabotropic receptor 3, GLUL: glutamate-ammonia ligase, BCAT1: branched chain amino acid transaminase 1.

Im Vergleich zum U-Test zeigten die Gene der AMPA-Untereinheit *GRIA3* mit einer AUC von 0,689, der KAINAT Untereinheit *GRIK4* mit einer AUC von 0,684, sowie des Transportproteins *SLC7A11* mit einer AUC von 0,707, keine hinreichend hohe Trennschärfe zwischen der Gruppe der Glioblastome und der ZNS-Metastasen. Somit wurden diese drei Gene aus der weiteren Betrachtung als Biomarker trotz signifikanter Unterschiede im U-Test ausgeschlossen (Abbildung 17).

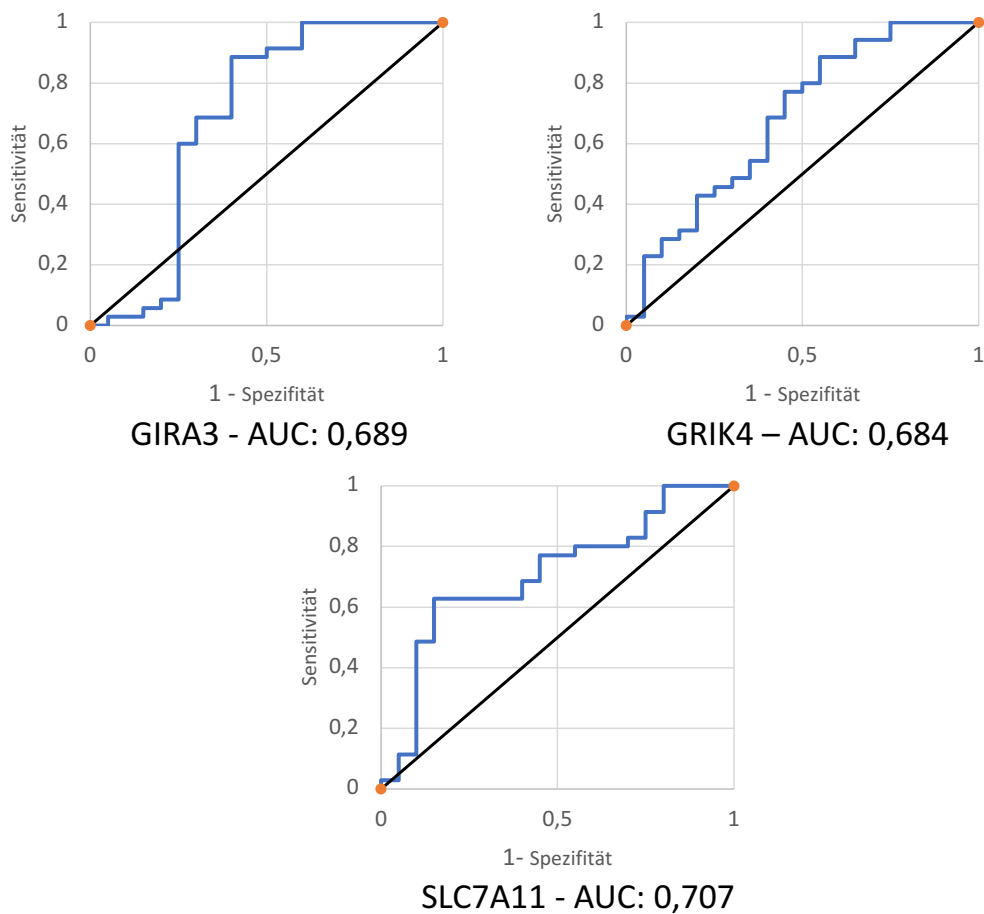


Abbildung 17: Abbildung von ROC-Kurven im U-Test signifikant unterschiedlicher Gene mit einer $AUC < 0,8$.

Jeweils Auftragung der Sensitivität auf der y-Achse und 1-Spezifität (Falsch-Positiv-Rate) auf der X-Achse. Legende: *GRIA3*: glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3, *GRIK4*: glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 4, *SLC7A11*: solute carrier family 7 member 11.

3.5.2 ROC-ANALYSE DES MARKERS EPILEPSIE IN GLIOBLASTOMEN

In der Gruppe der Glioblastome mit Epilepsie und der Gruppe der ohne Epilepsie konnten keine relevanten Unterschiede in der ROC-Analyse herausgearbeitet werden.

Es fanden sich lediglich schwache positive Zusammenhänge des Merkmales Epilepsie bei den Genen *GRIN1*, *GRIK4*, *mGluR3* und *SCL7A11*. Ein schwach negativer Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Epilepsie fand sich in den ROC-Analysen für die Gene *GRIN2C*, *GRIN2D*, *SLC1A2*, *BCAT* sowie *IDH1*.

Insgesamt fällt bei der Betrachtung der AUC und in Zusammenschau mit den Ergebnissen des U-Tests nur ein schwacher Zusammenhang auf.

Rückschlüsse auf einen möglichen Biomarker für das Vorliegen einer Epilepsie wurden aufgrund der Ergebnisse des U-Testes und der ROC-Analyse verworfen.

3.6 BIOMARKER

Für die Ermittlung eines geeigneten Cutoff-Wertes für die Expression eines jeweiligen Genes wurde für jeden Biomarkerkandidat, welcher in der ROC-Analyse eine AUC > 0,8 aufwies, der Youden-Index aus den Daten errechnet. Der Youden-Index ist ein statistischer Test, der sich aus der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Youden Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$$

Je näher der Test -1 oder +1 erreicht, desto besser ist der Test in der Lage, zwei Gruppen zu trennen. Der Youden-Index wurde für alle untersuchten Gene errechnet. Bei den Genen, für die in der ROC-Analyse eine AUC >0,8 gefunden wurde, konnten folgende maximale Werte für den Youden-Index ermittelt werden (Tabelle 10).

Tabelle 10:

Tabellarische Auflistung der mittels Youden Index ermittelten Cutoff Grenzwerte.

<i>Gen</i>	Cutoff-Wert Expression	Youden Index
<i>GRIA1</i>	0,1936	0,743
<i>GRIA2</i>	0,495	0,943
<i>GRIK1</i>	0,4653	0,943
<i>GRM3</i>	0,9289	0,578
<i>GLUL</i>	322,2972	0,557
<i>BCAT</i>	7,0927	0,736

Bei den Cutoff-Werten handelt es sich um die ermittelte relative Expression der Gene in Bezug auf das Housekeeping Gen *GAPDH*. Die ermittelten Cutoff-Werte wurden daraufhin auf die ermittelten Expressionswerte der Glioblastome und ZNS-Metastasen des untersuchten Kollektivs angewendet. Tabelle 18 im Anhang zeigt die vollständige Anwendung der ermittelten Cutoff-Werte auf das untersuchte Kollektiv.

Insgesamt konnten bei Betrachtung der Gene, die als möglicher Biomarker ausgewählt worden waren, 87,5% der Expressionsergebnisse der richtigen Tumorentität zugeordnet werden.

In der Auswertung zeigte sich insgesamt eine hohe Sensitivität der Gene *GRIA1*, *GRIA2* und *GRIK1* für das Vorliegen eines Glioblastoms. Dabei konnten für 33 von 35 Proben des Kollektivs ein Expressionswert oberhalb der Cutoff-Grenze ermittelt werden. Für diese drei Gene beträgt die Sensitivität in diesem Kollektiv je 94,3%. Die Gene *GLUL* und *BCAT1* wiesen eine etwas geringere Sensitivität mit 85,7% und 88,6% auf. Hingegen zeigte sich unter den Metastasen bei diesen beiden Genen eine geringere Sensitivität mit 70% und 85%.

Bei den ZNS-Metastasen stellte sich eine besonders hohe Sensitivität bei den Genen *GRIA2* und *GRIK1* heraus. Hier lagen alle Proben des Kollektivs unterhalb der Cutoff-Grenze. Bei dem Gen *GRM3* ergab sich eine geringere Sensitivität bei der Gruppe der Glioblastome, ZNS-Metastasen zeigten hingegen eine hohe Sensitivität dieses Gens. Tabelle 11 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Anwendung des Biomarkerpanels auf das untersuchte Kollektiv.

Tabelle 11:

Anteil der präzise zugeordneten Expressionsergebnisse der jeweiligen Tumorentität der untersuchten Kohorte.

<i>Gene</i>	Glioblastom		Metastase	
	Expression > Cutoff	% der Kohorte	Expression < Cutoff	% der Kohorte
<i>GRIA1</i>	33/35	94,3	16/20	80
<i>GRIA2</i>	33/35	94,3	20/20	100
<i>GRIK1</i>	33/35	94,3	20/20	100
<i>GRM3</i>	22/35	62,9	19/20	95
<i>GLUL</i>	30/35	85,7	14/20	70
<i>BCAT1</i>	31/35	88,6	17/20	85

Insgesamt konnte im Kollektiv der Glioblastome 97% (34 Proben von 35 Proben) mit mindestens vier von sechs positiven Markern identifiziert werden. 16 Proben von 35 Proben zeigten sich in sechs von sechs Markern positiv, 13 Proben von 35 Proben zeigten fünf von

sechs positive Marker, und fünf von 35 Proben zeigten vier von sechs positiven Markern. Lediglich eine Probe zeigte mit nur einem von sechs positiven Genen ein gegenläufiges Ergebnis.

Bei der Gruppe der ZNS-Metastasen konnten 95% der Proben mit mindestens vier von sechs Markern der richtigen Tumorentität zugeordnet werden. In 11 von 20 Proben konnten alle sechs Marker identifiziert werden, in 5 von 20 Proben wurden fünf von sechs Biomarker gefunden und in drei von 20 Proben konnten jeweils 4 Marker nachgewiesen werden. Lediglich in einer Probe waren nur drei von sechs Markern positiv.

IV. DISKUSSION

Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, die Expression von allen Glutamatrezeptorgenen, sowie von ausgewählten Genen des Glutamatmetabolismus und Transportern, in Glioblastomen und in ZNS-Metastasen zu untersuchen.

Eine Besonderheit dieser Arbeit besteht in der Untersuchung von ZNS-Metastasen, da für diese, im Gegensatz zu Glioblastomen, keine Daten über die Glutamatrezeptorexpression existieren. Bis dato gibt es für die Diagnostik von Glioblastomen nur wenige molekularbiologisch genutzte Marker. Auch für den Einsatz in der Diagnostik von ZNS-Metastasen ist bislang kein diagnostischer Marker bekannt. Die Differenzierung zwischen beiden Tumorentitäten wird für die endgültige Diagnosestellung meist in Zusammenschau von radiologischen oder histologischen Gesichtspunkten getroffen (Langer, 2022; Ostrom et al., 2018; Wick, 2021). In der Literatur ist bislang nur wenig über die Verwendung von Glutamatrezeptoren und Gene des Glutamatstoffwechsels als diagnostischer Biomarker bekannt. Lediglich eine Arbeitsgruppe um Tönjes et al., 2013 untersuchte bereits die Expression und Funktion der *BCAT1* in Glioblastomen und leitete daraus einen möglichen diagnostischen Nutzen ab. Die Arbeitsgruppe schlug *BCAT1* als diagnostischen Marker in der Unterscheidung der Gruppe der Glioblastome vor, so konnte ein Unterschied in der Expression der *BCAT1* zwischen *IDH* mutieren und *IDH* Wildtyp Gliomen festgestellt werden. Bei nicht eindeutigen Befunden in der radiologischen Bildgebung oder in der Histologie kann eine endgültige Diagnose meist nicht sicher gestellt werden, sodass hier der Ansatzpunkt dieser Arbeit liegt, um in Zukunft mit weiteren molekularbiologischen Untersuchungen die Diagnosestellung zu vereinfachen oder als zusätzlichen Schritt die Diagnose weiter zu bestätigen.

4.1 DIE NUTZUNG VON GLUTAMATREZEPTOREN ALS BIOMARKER IN DER DIAGNOSTIK

Im klinischen Kontext wurden Biomarker im Glioblastom, aber auch in anderen ZNS-Malignomen, hauptsächlich als prognostischer oder prädiktiver Marker genutzt. Bislang haben lediglich wenige Biomarker Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden. Die meisten bisher durchgeführten Studien haben sich mit dem MGMT-Promotor, *IDH1* und EGFR-Expression befasst (Riemenschneider et al., 2010). MGMT gehört im Kontext des Glioblastoms zu den am besten untersuchten prognostischen Biomarkern, in mehreren Studien wurde ein Überlebensvorteil für Patienten mit methylierten MGMT-Promotor nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass diese Patientengruppe ein verbessertes Ansprechverhalten auf alkylierende Chemotherapeutika wie TMZ hat (Sareen et al., 2022; Senhaji et al., 2022).

In den letzten Jahren wurde an der Erforschung neuer Biomarker für den diagnostischen Einsatz gearbeitet. So hatte man bei der Überarbeitung der WHO-Klassifikation 2021 erstmals neben der klassischen histologischen Diagnostik eine molekularbiologische Diagnostik mit in die Diagnosekriterien aufgenommen (Weller et al., 2022). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich Glioblastome, welche sich histologisch als ZNS WHO-Grad 2 oder 3 Tumor präsentieren, ohne die typischen histologischen Kriterien eines Glioblastoms, sich mit dem Vorhandensein einer TERT-Promotor Mutation, EGFR-Amplifikation oder +7/-10 Zytogenetik klinisch wie ein Glioblastom ZNS WHO Grad 4 verhalten (Brat et al., 2018).

In circa 50% der Glioblastome konnte eine Mutation im EGFR-Gen nachgewiesen werden. Verschiedene Studien wurden zu EGFR durchgeführt, bei denen kein sicherer prognostischer Wert von EGFR nachgewiesen werden konnte. Manche Studien fanden eine Assoziation zwischen einer vermehrten Expression von EGFR mit einer schlechten Prognose und einem reduzierten Gesamtüberleben. Andere Studien haben keinen Zusammenhang mit einem Überlebensvorteil für die Patienten nachweisen können (Sareen et al., 2022).

Spezifische diagnostische Biomarker sind bei ZNS-Metastasen noch nicht ausreichend untersucht worden. Für einige extrakranielle Tumorentitäten liegen bereits Erkenntnisse über die Glutamatrezeptorexpression der Primärtumore vor. Eine gesonderte spezifische Untersuchung von Gewebe von ZNS-Metastasen fand in anderen Studien bislang noch nicht statt. Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist die Identifizierung von insgesamt sechs Genen, welche als mögliche diagnostische Biomarker zur Unterscheidung zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen in Zukunft genutzt werden könnten.

Bei der Auswertung der ROC-Analyse wurden alle Kurven mit einer AUC von $>0,8$ für die weitere Betrachtung als Biomarker ausgewählt. Für die Ermittlung der Cutoff Grenzwerte wurde eine Youden-Analyse durchgeführt. In der Literatur wird diese Methode als die beste Methode beschrieben, da diese sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität zu gleichen Teilen in die Wichtung einbezieht. Zudem wird durch die Verwendung des Youden-Index die Misklassifikationsrate gesenkt (Unal, 2017). Die in der Youden- Analyse ermittelten Cutoff-Werte der relativen Expression konnten genutzt werden, um jede Probe der Kohorte nach den ermittelten relativen Expressionswerten zu sortieren und zu klassifizieren. Insgesamt konnten 87,5% der Expressionsdaten dem richtigen Tumor zugeordnet werden.

Eine Reduktion, der für den diagnostischen Test genutzten Gene oder eine Veränderung des Cutoff-Wertes in der ROC-Analyse auf 0,9 würde zu einem Ausschluss der drei Gene *GRM3*, *GLUL* und *BCAT1* führen. Als mögliche Biomarker würden somit *GRIA1*, *GRIA2* und *GRIK1* verbleiben. Eine Reduzierung der Gene für den diagnostischen Einsatz müsste Gegenstand weiterer Forschung sein, um das Biomarkerpanel zu verbessern oder gegebenenfalls mit weiteren potenziellen Biomarkern zu erweitern.

4.2 DISKUSSION DES EINFLUSSES DER EXPRESSIONSDATEN AUF DIE TUMORASSOZIIERTE EPILEPSIE

In dieser Studie zeigten insgesamt 53 % der an einem Glioblastom erkrankten Patienten eine initiale als Erstsymptom oder im Verlauf der Erkrankung aufgetretene Epilepsie. In anderen Studien konnte eine Epilepsie in circa einem bis zwei Dritteln der an einem Glioblastom erkrankten Patienten initial oder im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden (Liang et al., 2016; Rossi et al., 2022).

In der Gruppe der ZNS-Metastasen erkrankten hingegen mit 25% der Patienten deutlich weniger an einer Epilepsie initial oder im Verlauf der Erkrankung. Zwischen den zwei Patientengruppen mit einem Glioblastom und einer Epilepsie, sowie den Patienten mit Glioblastom ohne Epilepsie, konnte in dieser Arbeit ein Altersunterschied festgestellt werden. So konnte bei Patienten mit Epilepsie ein geringeres medianes Alter (52 Jahre bei ED) nachgewiesen werden, hingegen waren Patienten ohne Nachweis einer Epilepsie (72 Jahre bei ED) im Median älter. In anderen Studien konnte bisher kein signifikanter Altersunterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden (Berendsen et al., 2016; Dührsen et al., 2019). In dieser Studie zeigten besonders häufig Tumore mit temporalen Tumoralage, gefolgt von frontaler Tumoralage, eine Epilepsie. Dies deckt sich mit vorhandenen Studien, in welchen bei high grade ZNS-Malignomen ein besonders häufiges Vorkommen einer Epilepsie in denselben Hirnregionen beobachtet werden konnte (Lee et al., 2010; Lynam et al., 2007).

In den letzten Jahren wurden durch verschiedene Studien neue Zusammenhänge der Entstehung der Epilepsie in Glioblastomen in den Fokus gestellt (Hills et al., 2022; Liang et al., 2016; Rossi et al., 2022). Der Prozess der tumorassozierten Epilepsie bei malignen Erkrankungen des Zentralnervensystems ist aber stets ein multifaktorieller Prozess, an dem viele Strukturen beteiligt sind. Hills et al., 2022 beschreibt die Epileptogenese in Glioblastomen als einen *Circulus Virtuoses*, welcher sich aus verschiedenen Faktoren zusammensetzt. Entscheidende Faktoren für das epileptogene Potenzial in Glioblastomen sind hierbei die Neuroinflammation, erhöhte Glutamatspiegel, sowie eine Störung der Blut-Hirn-Schranke. Diese werden durch das Tumorwachstum des Glioblastoms ausgelöst, dabei wird durch vermehrte xCT-Expression in Glioblastomen Glutamat freigesetzt, welches eine Übererregbarkeit des Gewebes auslösen kann. Zusätzlich findet durch die Tumorausbreitung und Invasion eine inflammatorische Reaktion des neuronalen Gewebes statt, welche in Verbindung mit K^+ und Glutamat zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke führt. Dadurch kann es zu einem vasogenen Ödem kommen und zu einer weiteren Schädigung des peritumoralen Gewebes, was in einer erweiterten Anfallsneigung münden kann (Hills et al., 2022; Rossi et al., 2022). In einer Studie von Yuen et al. 2012 konnte nachgewiesen werden,

dass es einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Glutamatkonzentration in Glioblastomen und dem Auftreten einer Epilepsie gibt. So bestand eine erhöhte Glutamatkonzentration im Tumorgewebe und im Peritumorgewebe in Proben von Patienten mit nachgewiesener Epilepsie gegenüber Proben von Patienten ohne Epilepsie (Yuen et al., 2012).

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in Expression der untersuchten Gene zwischen den Gruppen der Glioblastome mit Epilepsie und der Gruppe der Glioblastome ohne Epilepsie gefunden werden. In anderen Studien konnte eine erhöhte Expression von AMPA und NMDA-Rezeptoren an der Invasionsfront des Glioblastoms nachgewiesen werden (Puchalski et al., 2018), was möglicherweise in einer epileptogenen Wirkung durch Aktivierung des umliegenden neuronalen Gewebes gelegen haben könnte (Rossi 2022). In weiteren Ergebnissen anderer Studien konnte ein Unterschied in der Expression von Genen des Glutamatmetabolismus gefunden werden. So wurde in einer Studie mit zehn Patienten mit Epilepsie und zehn Patienten ohne Epilepsie ein Unterschied in der Expression der *GLUL* gefunden. Die Expression der *GLUL* war in der Gruppe der Patienten mit Epilepsie signifikant geringer als in der Gruppe der Patienten ohne Epilepsie (Rosati et al., 2009). In dieser Arbeit zeigte sich hingegen lediglich eine Expression von *GLUL* auf einem hohen Niveau, ohne Nachweis eines signifikanten Unterschiedes zwischen beiden Gruppen.

4.3 DISKUSSION DER VERWENDETEN HOUSEKEEPING GENE

Die Auswahl der Housekeeping Gene erfolgte aufgrund durchgeführter Studien, welche verschiedene Housekeeping Gene für den Einsatz bei Glioblastomen validiert haben (Aithal & Rajeswari, 2015; Hernández-Ochoa et al., 2021; Valente et al., 2009). Eine Validierung von Housekeeping Genen für den Einsatz bei Gewebe von ZNS-Metastasen wurde bislang noch durch keine Studie durchgeführt. *GAPDH* zeigte sich als Housekeeping Gen vorteilhaft, da dieses bereits seit vielen Jahren routinemäßig als Housekeeping Gen eingesetzt wird (Kozera & Rapacz, 2013). In einer Studie von Hernández-Ochoa et al. 2021 wird der Zusammenhang von *GAPDH* und der gesteigerten Glykolyse von Glioblastomen beschrieben. In dieser Studie konnte eine vermehrte Produktion von Enzymen, darunter auch *GAPDH* mit Beteiligung an der Glykolyse in humanen Glioblastomproben im Vergleich zu gesundem Hirngewebe gefunden werden (Hernández-Ochoa et al., 2021). Aufgrund dessen wurde sich für diese Studie entschieden, ein zweites Housekeeping Gen heranzuziehen. *TBP* zeigte sich vorteilhaft als zusätzliches Housekeeping Gen aufgrund seiner in humanen Proben äußerst guten Stabilität und geringen Variabilität (Aithal & Rajeswari, 2015).

Eine für *TBP* durchgeführte Auswertung zeigte nur geringe Unterschiede im Vergleich zu der Auswertung mit *GAPDH*, lediglich für das Gen *GRIK4* konnte in der ROC-Analyse im Gegensatz zu der Auswertung mit *GAPDH* eine $AUC > 0,8$ gefunden werden. Ein Biomarkerpanel auf Grundlage von *TBP* würde somit insgesamt sieben Gene umfassen. Alle Expressionsergebnisse der untersuchten Gene mit den Housekeepinggen *TBP* befinden sich im Anhang in Tabelle 16 und Tabelle 17. Eine umfassende Auswertung auf Grundlage von *TBP* als primäres Housekeepinggen wurde von der Arbeitsgruppe in der Studie Lange, Gade, et al. 2024 veröffentlicht (Lange et al., 2024).

4.4 DISKUSSION AUSGEWÄHLTER GENE VON GLUTAMATREZEPTOREN UND DER GLUTAMATHOMÖOSTASE

AMPA-Rezeptoren:

In dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede in der Expression zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen in den Genen der Untereinheiten *GRIA1*, *GRIA2* und *GRIA3* festgestellt werden. Im Median wurden die Untereinheiten *GRIA1* und *GRIA2* etwa zehnmal geringer exprimiert als die Untereinheiten *GRIA3* und *GRIA4*.

In der Literatur finden sich Daten, dass alle AMPA-Untereinheiten in humanem Gewebe von Glioblastomen nachgewiesen werden konnten. Vornehmlich erfolgte der Nachweis der calciumpermeablen Untereinheiten GluR1 und GluR4 in Glioblastomen, diese haben eine wichtige Rolle in der Proliferation und Migration des Tumors durch einen Calciuminflux in die Zellen (Ishiuchi et al., 2002). Ebenso konnten erhöhte Expressionsniveaus von *GRIA1* in Glioblastomen im Vergleich zu low grade Gliomen festgestellt werden. In vivo konnte eine MAPK-Aktivierung nach Stimulation der AMPA-Rezeptoren mit Glutamat und AMPA nachgewiesen werden. Somit führte ein spezifischer Knockdown von GluR1 zu einer verminderten Proliferation der Zelllinie (Groot et al., 2008).

Diese Rolle in der Proliferation und Migration wird in einer neueren Studie bestätigt, welche einen differenzierten Unterschied in der intertumoralen Verteilung der AMPA-Rezeptoren gefunden hat. Die höchste Expression von AMPA-Rezeptoren findet sich im Randgewebe an der Invasionsfront des Glioblastoms (Puchalski et al., 2018).

In einer Studie von van Vuurden et al., 2009 an gesundem Hirngewebe und Gewebe von Glioblastomen konnte eine niedrigere Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheit *GRIA1* gegenüber *GRIA2* nachgewiesen werden. Dies spiegeln auch die Daten dieser Studie wider. Darüber hinaus konnte insgesamt eine niedrigere Expression von allen Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren im Vergleich zu gesundem Gewebe aufgezeigt werden (van Vuurden et al., 2009).

Für die Expression von Glutamatrezeptoren in Gewebe von humanen ZNS-Metastasen gibt es nur wenige Informationen. In der Literatur finden sich Daten, welche die Glutamatrezeptorexpression anhand von Zelllinien der einzelnen Ursprungsgewebe beschreiben. So konnte in Zelllinien von Lungenkarzinomen, Kolonkarzinomen und Mammakarzinomen eine Expression von AMPA-Rezeptoren nachgewiesen werden (Stepulak et al., 2009). Dies deckt sich mit den erhobenen Daten, hier konnten in fast allen Proben von humanen ZNS-Metastasen eine Expression von AMPA-Rezeptoren nachgewiesen werden. In je 4 von 20 Proben für die Untereinheiten *GRIA1* und *GRIA2* war jedoch keine Expression dieser Gene nachweisbar.

Weiterhin zeigten sich signifikant niedrigere Expressionsniveaus in den Metastasen gegenüber den Glioblastomen. Die Expression der Untereinheiten GluR3 und GluR4 zeigte zwischen den Metastasen eine große Heterogenität, welche sich auch in den Daten zwischen den Zelllinien in der Studie von Stepulak et al. wiederfindet (Stepulak et al., 2009).

NMDA-Rezeptoren:

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von NMDA-Rezeptoruntereinheiten zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen nachgewiesen werden. In einer Studie von van Vuurden et al. konnte im Vergleich von gesundem Hirngewebe und Gewebe von Glioblastomen eine niedrigere Expression in fast allen NMDA-Untereinheiten in Glioblastomen aufgezeigt werden (van Vuurden et al., 2009).

In Zellen und Zelllinien von Malignomen (Magenkarzinomen, Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, Lungenkarzinomen und Pankreaskarzinomen) wurden bereits verschiedene Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren nachgewiesen. Meistens konnten diese mit einer verstärkten Migration und Proliferation in Verbindung gebracht werden (Gallo et al., 2023).

NMDA-Rezeptoren sind erst in den letzten Jahren Gegenstand der aktuellen Forschung geworden. So konnte in einer Studie zuletzt gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren einen Einfluss auf die Chemoresistenz der Tumore gegenüber TMZ haben. Die Expression von MGMT wird durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren gesteigert, was zu einer steigenden Chemoresistenz führt, gegensätzlich führt ein Knockdown von NMDA-Rezeptoren zu einer verstärkten Wirkung von TMZ (Tsuji et al., 2022).

Kainat-Rezeptoren:

In der Literatur ist die Rolle von Kainat-Rezeptoren in Glioblastomen weitgehend noch unerforscht. Die Expressionsdaten dieser Studie haben eine deutlich stärkere Expression von *GRIK1* in Glioblastomen gegenüber ZNS-Metastasen gezeigt. Die Expression von *GRIK1* in ZNS-Metastasen stellte sich in allen Proben aller Tumorentitäten als sehr gering dar. Bisher konnten in Zelllinien von verschiedenen Malignomen, wie in Lungenkarzinomen, in Mammakarzinomen und in Kolonkarzinomen alle KAINAT-Untereinheiten nachgewiesen werden, jedoch gab es auch hier eine niedrige Expression von *GRIK1* in verschiedenen Zelllinien der verschiedenen Tumore (Stepulak et al., 2009).

Für die Rolle von *GRIK1* in Malignomen gibt es einzelne Studien, welche einem herunterregulierten Expressionslevel dieser Untereinheit in Kolonkarzinomen im Vergleich zu gesundem Kolongewebe belegen. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine niedrige Expression von *GRIK1* in Kolonkarzinomen mit einem kürzeren Gesamtüberleben, sowie einer vermehrten Metastasierung, einer größeren Infiltration und mit einer größeren Tumorgöße zusammenhängt (Ren et al., 2020).

Metabotrope Glutamatrezeptoren:

Ein signifikanter Unterschied der Expression metabotroper Glutamatrezeptoren zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen konnte in dieser Studie lediglich für das Gen *GRM3*, welches für mGluR3 codiert, nachgewiesen werden. In Bezug auf die Expression der anderen untersuchten metabotropen Glutamatrezeptoren scheint mGluR3 in Glioblastomen nicht höher exprimiert zu sein im Vergleich zu den anderen untersuchten metabotropen Rezeptoren, die Expression von mGluR3 scheint hingegen in ZNS-Metastasen erniedrigt zu sein. Die Rolle *GRM3* beleuchtete eine Studie von Wirsching et al., dabei konnte eine erhöhte mediane Expression des Gens *GRM3* im Gewebe von Glioblastomen gegenüber dem Gewebe von anderen Malignomen gefunden werden (Wirsching et al., 2021). Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen dieser Arbeit.

In anderen Studien konnte für das Glioblastom gezeigt werden, dass die Expression von mGluR3 einen Einfluss auf die Proliferation und Migration hat (Ciceroni et al., 2013b; Stefani Leivas Pereira et al., 2017). Dieser Effekt könnte durch eine autokrine Aktivierung der Rezeptoren mGluR1 und mGluR3 durch einen erhöhten Glutamatspiegel im Glioblastom begründet sein. In Vitro wurde eine Aktivierung des MAPK- und PI3K Signalwegs durch die Aktivierung dieser metabotropen Rezeptoren in Studien gefunden (Stefani Leivas Pereira et al., 2017).

Weitere Studien konnten feststellen, dass eine niedrigere mGluR3 -Expression mit einem längeren Gesamtüberleben der Patienten verknüpft ist. Zudem führt eine pharmakologische

Blockade von mGluR3 zu einem reduzierten Tumorwachstum und einer verbesserten Chemosensitivität gegenüber TMZ (Ciceroni et al., 2013b; Maier et al., 2021).

Metabotrope Glutamatrezeptoren werden nicht nur von neuronalem Gewebe exprimiert, sondern können auch in verschiedenen anderen Geweben gefunden werden. In humanem Gewebe von Kolonkarzinomen, Melanomen, Larynxkarzinomen und Mammakarzinomen konnte eine vermehrte Expression von *GRM4* (mGluR4) gefunden werden (Chang et al., 2005). Dies konnte auch in den Daten dieser Studie bestätigt werden, die mediane Expression von *GRM4* ist im Gewebe von ZNS-Metastasen höher als im Gewebe von Glioblastomen. Bei Aufschlüsselung nach Ursprungsgewebe der ZNS-Metastasen konnte in dieser Arbeit eine besonders hohe Expression von *GRM4* im Gewebe von Lungenkarzinomen, Kolonkarzinomen und Melanomen gefunden werden, wohingegen die Expression im Gewebe von Mammakarzinomen, Cervixkarzinomen und Nierenzellkarzinomen sich niedriger darstellte.

Transporter und Metabolismus:

Es gibt verschiedene Transporter und Enzyme, welche am Transport und am Metabolismus von Glutamat beteiligt sind. In dieser Studie wurde eine Auswahl von fünf Genen des Metabolismus und Transports untersucht, und dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Gene *GLUL* und *BCAT1* eine signifikant höhere Expression in Glioblastomen gegenüber ZNS-Metastasen aufweisen.

BCAT1 ist ein Enzym, welches eine essenzielle Rolle im Metabolismus von verzweigt-kettigen Aminosäuren im Zellstoffwechsel einnimmt. Die Metabolite aus diesem Prozess sind wiederum an vielen Prozessen wie Signaltransduktion, Proteinkatabolismus/Anabolismus, sowie der Energieversorgung beteiligt (Wang et al., 2022).

Für das Gen *BCAT1* konnte durch andere Arbeitsgruppen im gesunden Hirngewebe und in low-grade Gliomen eine erheblich niedrigere Expression im Vergleich zu Glioblastomen ermittelt werden. Zudem konnte in vitro-Versuchen ein *BCAT1* abhängiges Tumorwachstum nachgewiesen werden (Tönjes et al., 2013; L. Yi et al., 2021). In der Studie von Yi et al 2021 zeigte sich, dass eine höhere *BCAT1*-Expression mit einem geringeren Überleben des Patienten verknüpft ist. *BCAT1* wurde in Tumoren verschiedener extrakranieller Tumore nachgewiesen. Besonders in Endometriumkarzinomen, Glioblastomen und Melanomen konnte eine hohe Expression festgestellt werden (L. Yi et al., 2021). In dieser Arbeit zeigte sich hingegen im Vergleich mit den Expressionsniveaus der anderen untersuchten Gene eine konstant niedrige Expression von *BCAT1* in allen untersuchten ZNS-Metastasen.

Es konnte für das Gen *GLUL* eine starke Expression in Glioblastomen und ZNS-Metastasen gefunden werden. Insgesamt war bei diesem Gen die stärkste Expression unter allen untersuchten Genen nachweisbar.

Das Enzym GS (Gen: *GLUL*) spielt in Glioblastomen eine große Rolle für die Versorgung des Tumors mit Nukleotiden und Energie (Tardito et al., 2015).

Für das Gen *GLUL* können in der Literatur unterschiedliche Daten zum Überlebensvorteil gefunden werden, so konnte in der Studie von Rosati et al 2013 ein Überlebensvorteil für eine niedrige Expression von *GLUL* herausgearbeitet werden (Rosati et al., 2013), wohingegen die Studie von Tardito et al. 2015 keine Unterschiede im Überleben der Patienten finden konnte (Tardito et al., 2015). In extrakraniellen Tumoren ist eine Versorgung mit Glutamin durch die GS für die Proliferation ebenso entscheidend, in Mammakarzinomen konnte eine vermehrte Apoptose in vitro bei knockout des *GLUL*-Gens nachvollzogen werden (Karimpur Zahmatkesh et al., 2023).

Interessanterweise konnten in dieser Studie keine Unterschiede in der Expression in Glioblastomen und Hirnmetastasen bei den Glutamattransporter *EAAT2* und dem Transportsystem XC- gefunden werden.

Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Glioblastome eine signifikant niedrige oder keine Expression des Genes *SLC1A2* des Transporters *EAAT2*, im Vergleich mit ZNS WHO Grad 1-3 Tumoren, aufweisen sollen (De Groot et al., 2005).

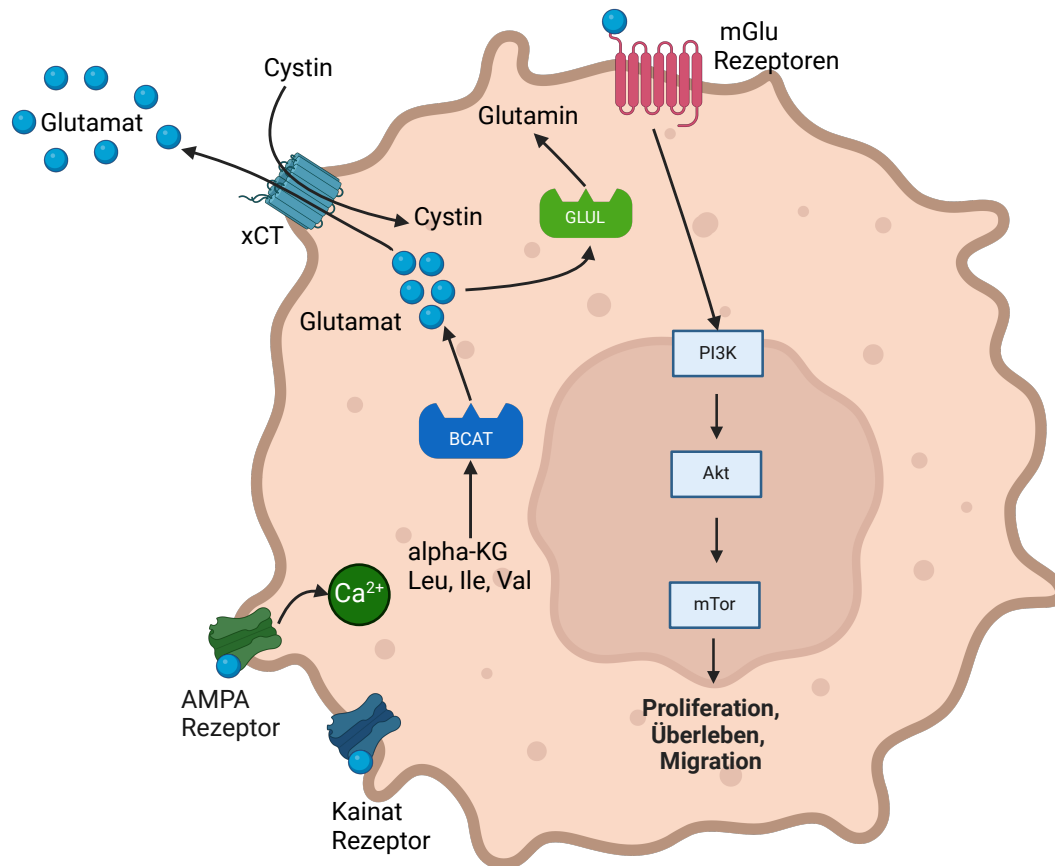


Abbildung 18: Übersicht über die pathophysiologische Funktion der identifizierten Biomarker und die glutamatassoziierten Mechanismen in Glioblastomzellen.

Im Extrazellulärraum um Glioblastomzellen befindet sich eine erhöhte Glutamatkonzentration. Diese wird durch Glutamattransporter und Proteine des Glutamatmetabolismus aufrechterhalten. Große Mengen Glutamat werden in Glioblastomen intrazellulär durch die branched chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) aus alpha-Ketoglutarat und verzweigtkettigen Aminosäuren synthetisiert. Ein Transport von Glutamat in den Extrazellulärraum erfolgt hauptsächlich durch den Glutamat und Cystin Antiporter xCT. Der Antiport von Glutamat dient nicht nur zur Freisetzung des Glutamats, sondern auch zur Aufnahme des für Glioblastome essenziellen Cystins. Zusätzlich wird Glutamat in Glutamin durch die Glutamin Ammonium Ligase (GLUL) synthetisiert. Die hohe extrazelluläre Glutamatkonzentration aktiviert die ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren. Dies führt zu einer sekundären Aktivierung weiterer Signalkaskaden. So führt eine Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zu einer Aktivierung von Signalketten, durch die es einen erhöhten Influx von Calcium in das Zytoplasma gibt. Die Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren, wie mGluR3, führt zu der sekundären Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges, welcher eine entscheidende Rolle in der Migration und Proliferation von Glioblastomen hat. Über sekundäre Signalwege bei Kainat Rezeptoren im Glioblastom liegen bis dato noch keine Daten vor. Legende: Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Valin (Val). „Created with BioRender.com“

4.5 METHODEN UND LIMITATIONEN DER ARBEIT

Trotz sorgfältiger Arbeitsweise und aller durchgeführten Hygienemaßnahmen ist die Methodik der RT-qPCR störanfällig für verschiedene Faktoren. Aufgrund dessen wurde für jedes Gen einer Probe eine doppelte Versuchsreihe angelegt, und nur bei Übereinstimmung beider Messwerte (Standardabweichung zwischen beiden Ct-Werten $<0,5$) wurden die Daten für die weitere Untersuchung verwendet. So konnten mögliche Fehlerquellen, wie technische Artefakte oder kontaminierte Materialien, bestmöglich ausgeschlossen werden.

Weitere Limitationen bestanden in der Auswahl der Proben. Da es sich um eine unizentrische Studie handelte, wurden die Daten nur aus einem Patientenkollektiv bezogen. In weiteren Arbeiten sollten die Daten mit anderen Patientenkollektiven, am besten im Rahmen einer multizentrischen Studie, abgeglichen werden.

Zudem sollte in weiteren Arbeiten die Anzahl der untersuchten Proben vergrößert werden. Die Limitation in dieser Arbeit bestand darin, dass ZNS-Metastasen zwar ein sehr häufiger ZNS-Tumor sind, aber welcher nur selten operiert wird. So zeigte sich die zur Verfügung stehende Gesamtauswahl an Proben von ZNS-Metastasen eingeschränkt.

4.6 AUSBLICK

Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind noch viele Fragen rund um das Glioblastom sowie die tumorassoziierte Epilepsie und eine ZNS-Metastasierung von Tumoren ungeklärt. In den nächsten Jahren wird eine intensive Forschung auf diesem Gebiet nötig sein, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen. Man kann aber bereits heute einen Ausblick auf die Diagnostik der Zukunft geben.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Biomarker ein grundlegender Bestandteil der modernen Diagnostik sind. Wie in der aktuellen WHO-Klassifikation zu finden, spielen schon heute Biomarker wie TERT-Promotor, EGFR-Gen und *IDH1* eine wesentliche Rolle in der pathologischen Diagnostik (Weller et al., 2022). Aber auch in der Behandlung des Glioblastoms haben Biomarker, wie der MGMT-Promotor, bereits Einzug in die klinische Routine gehalten (Wick, 2021).

Aktuell haben Malignome des ZNS noch immer eine der schlechtesten Prognosen aller Tumorerkrankungen. Mit steigendem wissenschaftlichem Fortschritt und auch mit Einzug der personalisierten Medizin in die Behandlung des Glioblastoms, sowie von ZNS-Metastasen kann das Ziel sein, eine suffiziente Verlängerung des Überlebens der Patienten zu erreichen. Aufgrund dessen sind weitere Studien unverzichtbar. Weitere Methoden zur Einordnung der Ergebnisse könnten eine Proteinanalyse der Glutamatrezeptoren und der am Metabolismus und Transport beteiligten Proteine sein. Aufgrund zahlreicher Mechanismen, wie RNA-

Editing und verschiedener posttranslationalen Modifikationen, kann nicht zwingend von der Expression eines Gens auf das fertige und funktionsfähige Protein geschlossen werden. Wie bereits bei den AMPA-Rezeptoren bekannt, gibt es posttranslationale Prozesse, die den Rezeptor verändern können. So konnte durch Maas et al. 2001 nachgewiesen werden, dass es im Gewebe von humanen Gliomen zu einer verminten Q/R RNA-Editing der AMPA Rezeptoruntereinheit GRIA2 kommt, welche sonst im gesunden Hirngewebe nahezu zu 100% editiert vorzufinden ist (Maas et al., 2001).

Ebenfalls sollte es Ziel von zukünftigen Arbeiten sein, die Ergebnisse der Expression auch in einer Single-Cell-PCR, spezifisch für die Zellen des ZNS-Malignoms, nachzuweisen. Der Ansatz dieser Arbeit war es, einen möglichst an die klinische Diagnostik angepassten Ansatz zu verfolgen. So wurde aufgrund der besseren klinischen Anwendbarkeit der Ergebnisse entschieden, eine RT-qPCR der gesamten Probe anzufertigen. In der Routinediagnostik werden die Proben jedoch meist biochemisch und molekularbiologisch im Gesamten untersucht. Dabei muss allerdings der Aspekt berücksichtigt werden, dass es sich bei Gewebeproben von Patienten immer um ein heterogenes Gewebe von verschiedenen Zellen, wie Tumorzellen, Endothelzellen, Zellen des Blutsystems sowie des Stützgewebes handelt. Somit wird eine Single-Cell-PCR im diagnostischen Umfeld in Zukunft eher nicht zu finden sein. Aktuell sind die Behandlungsmöglichkeiten von ZNS-Malignomen noch sehr eingeschränkt. Es steht zumeist nur eine Radiochemotherapie zur Behandlung der Erkrankung bereit. Während es bei anderen Malignomen bis dato stetige Fortschritte in der Behandlung gab, sind diese bei Glioblastomen und ZNS-Metastasen nur sehr klein. Eine weitere Erforschung von Biomarkern kann sich aber auch positiv auf die Behandlung auswirken. So könnten neue spezifische Therapieformen entwickelt werden, welche womöglich das Gesamtüberleben verbessern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: In der klinischen Diagnostik ist eine Differenzierung zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen manchmal mit Herausforderungen verbunden. Aktuell gibt es noch keinen validierten Biomarker, welcher zwischen beiden Tumorentitäten unterscheiden kann. Für diesen Zweck wurde in dieser Arbeit die Expression von insgesamt 24 Genen von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren untersucht. Proteine der Glutathomöostase haben zusätzlich einen wesentlichen Einfluss auf die Versorgung des Glioblastoms und der ZNS-Metastasen mit dem Neurotransmitter Glutamat. Aufgrund dessen wurden zusätzlich zu den Glutamatrezeptoren fünf Gene des Glutamattransports und des Glutamatmetabolismus untersucht.

Methoden: Für die Untersuchung der Genexpression von Glutamatrezeptoren und ausgewählter Gene der Glutathomöostase wurde in dieser Arbeit eine RT-qPCR von insgesamt 55 Patientenproben (35 Glioblastome, 20 ZNS-Metastasen) durchgeführt. Die in der qPCR amplifizierten Produkte wurden anschließend in der Gelelektrophorese auf Verunreinigungen untersucht.

Ergebnisse: Insgesamt konnten von den 29 untersuchten Genen nach Analyse der Ergebnisse des U-Tests, sowie nach Anfertigung einer ROC-Analyse, ein Panel von insgesamt sechs Genen identifiziert werden, darunter die Gene der AMPA-Untereinheiten *GRIA1*, *GRIA2*, der Kainat-Untereinheit *GRIK1*, des metabotropen Glutamatrezeptors *GRM3*, der Verzweigtkettigenaminotransferase *BCAT1* und der Glutaminsynthetase *GLUL*. Für die Ermittlung geeigneter Cutoff-Grenzwerte wurde jeweils der Youden-Index berechnet. Diese Auswahl an Genen zeigte über alle statistischen Tests hinweg ein gutes Trennungsverhalten zwischen beiden Tumorkohorten und wird somit als mögliches zukünftiges Biomarkerpanel für die molekularbiologische Diagnostik vorgeschlagen. Über alle untersuchten Tumorproben hinweg konnten mittels der ermittelten Biomarker 87,5% der Expressionsergebnisse der richtigen Tumorentität zugeordnet werden.

Zusätzlich zur Auswertung für diagnostische Zwecke wurde auch der Einfluss der Expression auf das Merkmal der Epilepsie untersucht. Hierbei konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Glioblastomen mit und ohne Epilepsie im Krankheitsverlauf herausgearbeitet werden. So zeigten sich die Expressionen der Proben mit bekannter Epilepsie gegenüber den Proben, ohne bekannte Epilepsie stets auf konstantem nicht signifikantem Niveau. Bei der Durchführung weiterer statistischer Tests konnte ebenfalls keine Unterscheidung der Gruppen in der ROC-Analyse herausgearbeitet werden.

Schlussfolgerung: Die Unterscheidung zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen bleibt eine bedeutende Herausforderung in der klinischen Praxis. Die Identifizierung potenzieller Biomarker für diese Tumorentitäten könnte jedoch einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der Diagnose und Behandlung darstellen. Durch die Anwendung dieser Biomarker in der klinischen Praxis könnte eine verbesserte Differenzierung zwischen Glioblastomen und ZNS-Metastasen vorgenommen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Genen von Glutamatrezeptoren, Transportproteinen und Proteinen des Glutamatmetabolismus in Glioblastomen und ZNS-Metastasen die Grundlage dafür bilden kann, als Biomarker für die molekularbiologische Unterscheidung beider ZNS-Malignome in Zukunft genutzt werden zu können. Jedoch ist eine weitere Forschung erforderlich, um die Robustheit und Zuverlässigkeit dieser Biomarker zu validieren und ihre klinische Anwendbarkeit zu bestätigen.

VI. ANHANG

6.1 PATIENTENDATEN DER PATIENTEN MIT EINEM GLIOBLASTOM

Tabelle 12:

Erhobenen Patientendaten mit der Diagnose eines Glioblastoms.

ID	Geschlecht	Alter bei ED	Tumorlokalisation	Epilepsie	IDH1	MGMT
GBM_01	f	69	links frontal	nein	WT	methyliert
GBM_02	m	68	links frontal	ja	WT	methyliert
GBM_03	m	80	links parietal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_04	m	29	rechts frontal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_05	m	53	rechts temporal	nein	WT	methyliert
GBM_06	m	63	links temporoparietal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_07	m	39	links parietal	nein	R132H	nicht methyliert
GBM_08	m	62	links parietooccipital	ja	WT	nicht methyliert
GBM_09	m	50	links temporal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_10	f	65	multifocal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_11	f	54	rechts temporal	ja	WT	methyliert
GBM_12	f	91	rechts temporal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_13	m	62	rechts parietal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_14	m	70	rechts frontal	ja	WT	methyliert
GBM_15	f	76	rechts frontal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_16	f	77	rechts frontal	nein	WT	methyliert
GBM_17	f	79	bifrontal	nein	WT	methyliert
GBM_18	f	66	links temporal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_19	m	44	rechts parietooccipital	ja	R132H	methyliert
GBM_20	m	84	rechts temporal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_21	f	43	rechts frontal	ja	WT	methyliert
GBM_22	m	73	links temporal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_23	m	71	rechts frontotemporal	nein	WT	methyliert
GBM_24	f	47	links parietal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_25	m	79	rechts frontal	nein	WT	N/A
GBM_26	f	72	links frontal	nein	WT	methyliert
GBM_27	f	69	rechts temporal	N/A	WT	nicht methyliert
GBM_28	m	40	links parietal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_29	m	49	rechts frontal	ja	WT	methyliert
GBM_30	m	50	links frontal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_31	f	72	rechts frontal	nein	WT	nicht methyliert
GBM_32	m	79	links temporal	ja	WT	nicht methyliert
GBM_33	m	73	rechts temporal	nein	WT	methyliert
GBM_34	m	43	rechts tempoooccipital	ja	WT	nicht methyliert
GBM_35	f	72	rechts tempoparieto-occipital	nein	WT	methyliert

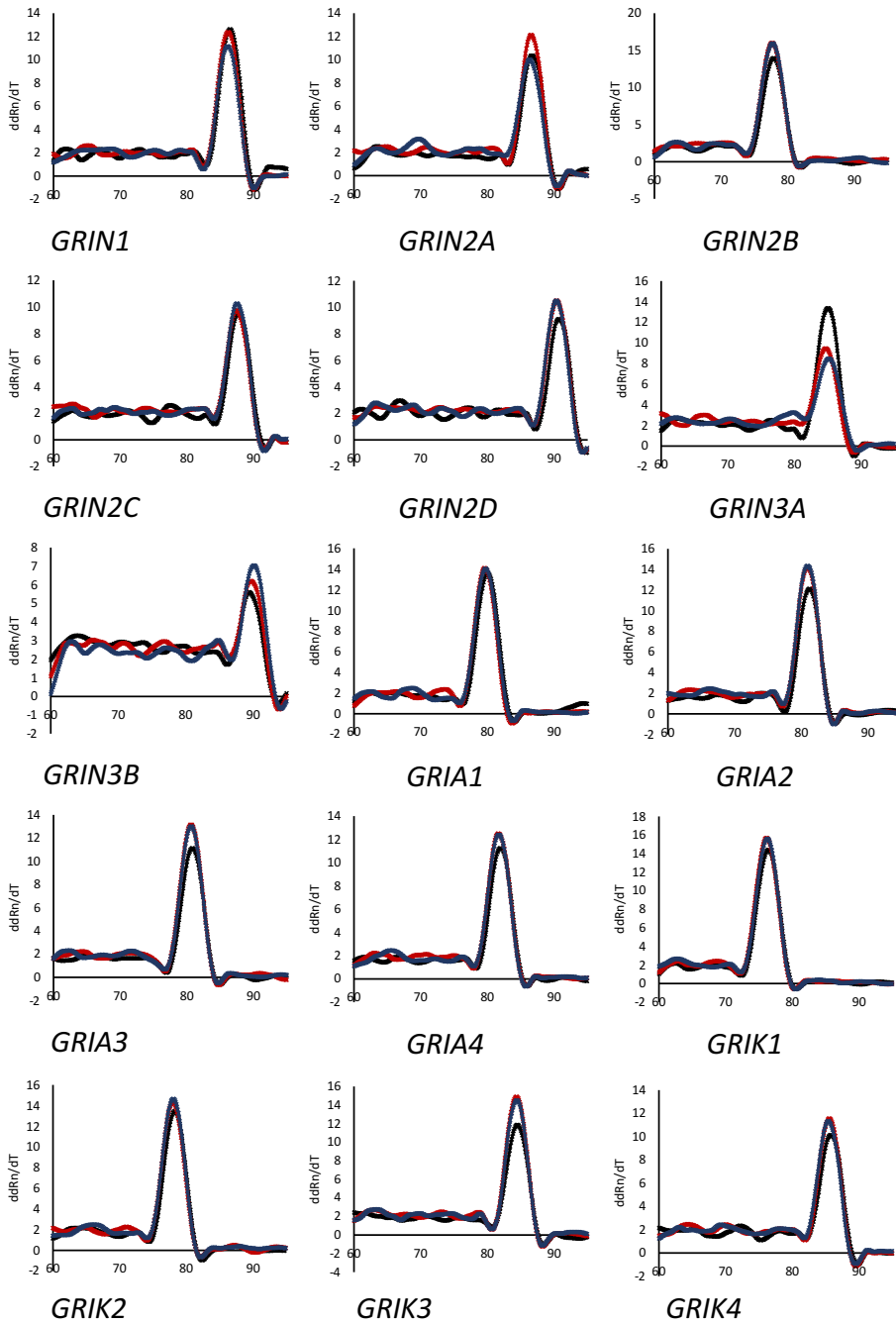
6.2 PATIENTENDATEN DER PATIENTEN MIT EINER ZNS-METASTASE

Tabelle 13:

Erhobenen Patientendaten mit der Diagnose einer ZNS-Metastase.

ID	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Metastasenlokalisation	Epilepsie	Primärtumor
MET_01	f	66	rechts parietal, links temporal	ja	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_02	f	60	links frontal	nein	Kolonkarzinom
MET_03	f	49	rechts frontal	ja	Kolonkarzinom
MET_04	f	43	links cerebellar	nein	Mammakarzinom
MET_05	f	49	links frontal	ja	Melanom
MET_06	f	54	rechts cerebellar	ja	Lungenkarzinom (SCLC)
MET_07	f	75	links occipital	nein	Zervixkarzinom
MET_08	m	71	links temporal, rechts occipital	nein	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_09	f	67	links frontotemporal	nein	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_10	m	58	rechts cerebellar	nein	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_11	f	59	rechts occipital	nein	Lungenkarzinom (SCLC)
MET_12	m	58	rechts cerebellar	nein	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_13	f	66	links cerebellar	nein	Mammakarzinom
MET_14	f	49	cerebellar	nein	Lungenkarzinom (NSCLC)
MET_15	m	52	cerebellar	nein	Lungenkarzinom
MET_16	m	N/A	corcial	N/A	Lungenkarzinom
MET_17	m	N/A	rechts occipital	nein	Lungenkarzinom
MET_18	m	75	rechts frontal	nein	Kolonkarzinom
MET_19	f	42	links cerebellar	nein	Mammakarzinom
MET_20	m	N/A	occipital	N/A	Nierenzellkarzinom

6.3 SCHMELZKURVEN



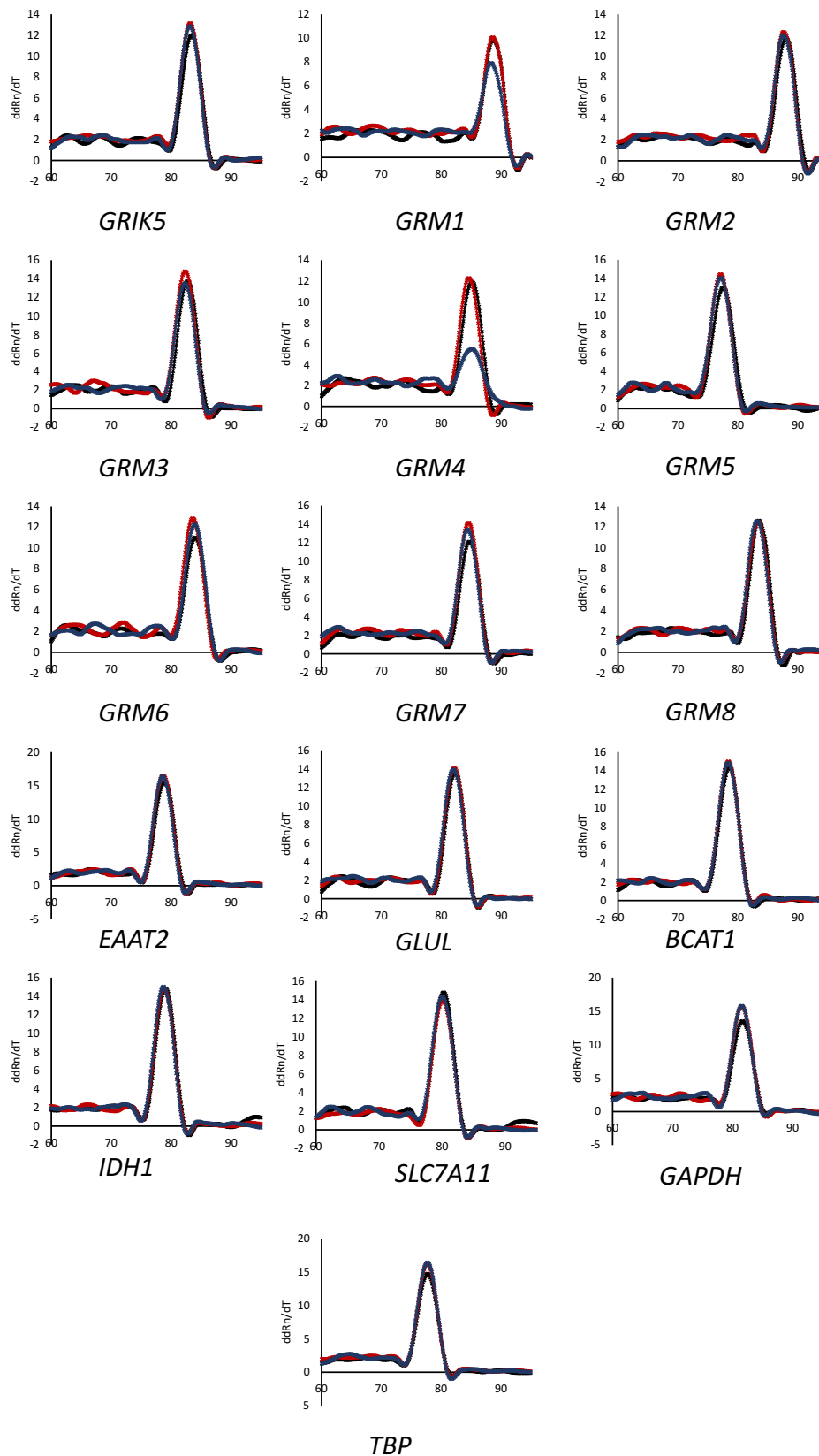


Abbildung 19: Darstellung der Schmelzkurven aller untersuchten Gene. Verlauf der Schmelzkurven von je exemplarischen 3 Patientenproben. Auftragung des jeweiligen relativen Fluoreszenzsignals ($ddRn/dT$) auf der Y-Achse, gegenübergestellt der schrittweisen Erhöhung der Temperatur auf der X-Achse.

6.4 ROC-KURVEN AUC MIT EINER AUC KLEINER 0,8

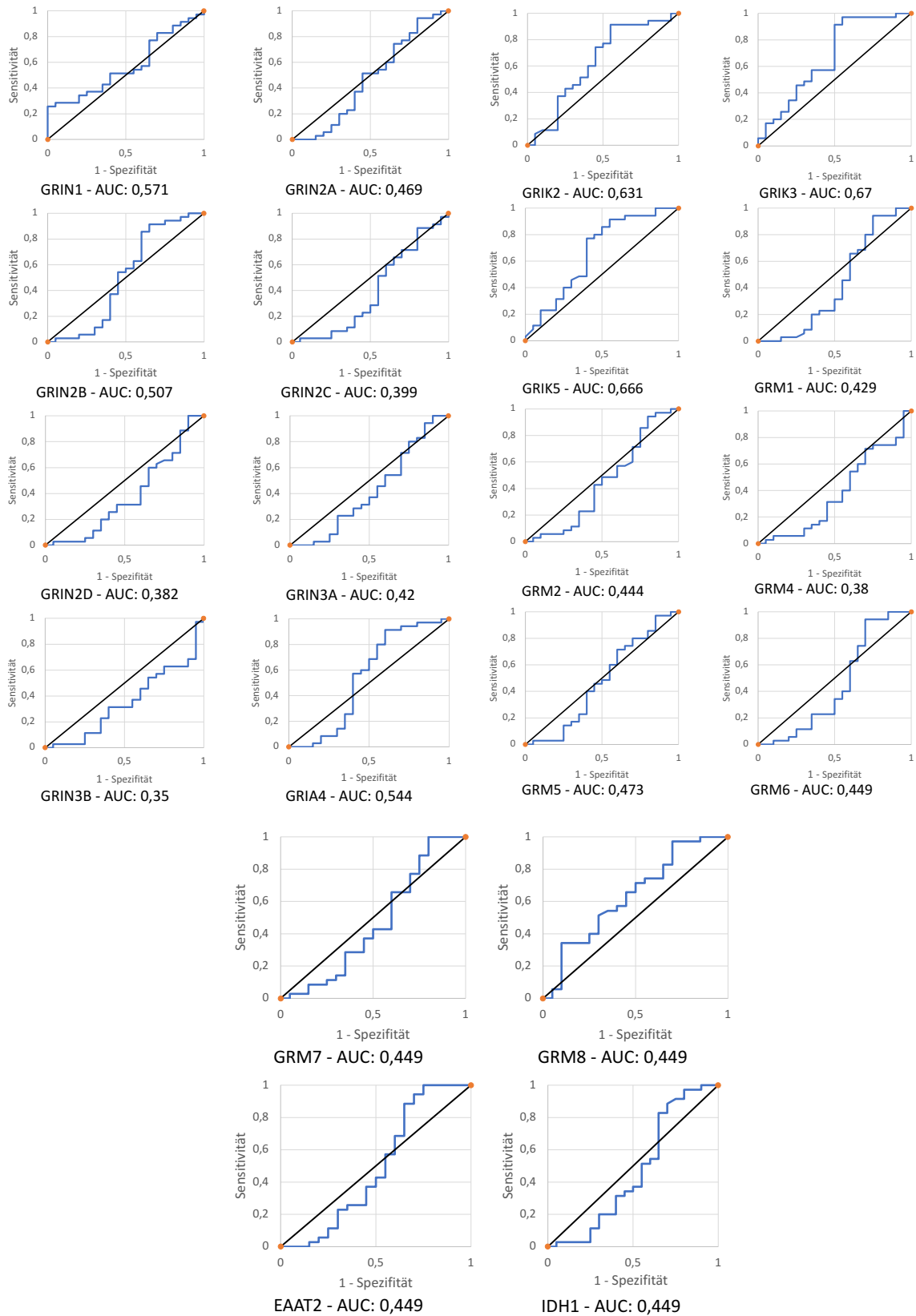


Abbildung 20: ROC-Kurven der Gene mit einer AUC unter 0,8.

6.5 EXPRESSIONSDATEN

6.5.1 GAPDH-GLIOBLASTOM

Tabelle 14:

Expressionsdaten der Glioblastomproben mit dem Housekeeping Gen GAPDH.

G_10	G_09	G_08	G_07	G_06	G_05	G_04	G_03	G_02	G_01	Patienten- ID
0,1432	48,0273	1,8997	0,0303	0,7099	0,0834	111,1053	0,0000	0,0157	0,1633	GRIN1
2,4213	12,7797	53,6603	11,1254	6,3457	3,0226	17,2173	20,0535	0,4849	0,6011	GRIN2A
5,3732	29,1573	56,3282	18,7106	49,0365	11,3592	27,0168	123,2791	1,3811	1,0987	GRIN2B
1,0322	0,7504	9,2265	2,2592	5,7589	2,7431	1,0110	14,3779	0,1679	0,3006	GRIN2C
1,1857	1,0686	22,7183	8,0321	9,1628	16,2885	0,7556	14,7822	0,3177	0,7823	GRIN2D
2,8202	5,2263	48,6978	14,7822	14,8850	5,1543	7,4943	34,6740	0,2903	0,6354	GRIN3A
1,0613	0,5270	11,1254	5,0134	10,3804	5,0134	0,1123	11,5978	0,2185	0,2709	GRIN3B
0,2185	19,9150	3,0648	5,2992	0,6763	2,8794	19,1038	6,0452	0,1969	0,4134	GRIA1
1,3433	18,5814	5,6403	10,9722	1,0110	6,7542	11,8415	0,0000	3,5945	7,0900	GRIA2
15,8431	24,0137	95,3912	40,3860	30,1855	48,3614	29,3601	39,0103	6,8961	11,5978	GRIA3
8,5492	12,5167	154,9635	48,0273	46,3914	36,6511	7,5464	154,9635	1,8478	7,0410	GRIA4
0,4782	17,4576	19,9150	45,4366	0,7002	81,3339	17,3370	1,7481	0,6953	0,2653	GRIK1
8,3732	23,6831	211,6863	45,4366	67,9209	8,0321	21,7929	271,6837	5,3361	14,4779	GRIK2
9,5519	4,3948	53,6603	23,3570	15,8431	6,8485	5,6796	60,3710	5,5243	7,9216	GRIK3
4,4561	10,8212	16,8629	21,9445	2,8398	1,3715	7,5464	7,1890	2,5594	11,6785	GRIK4
14,7822	28,1641	134,9035	40,9498	41,8102	57,9118	20,3335	144,5860	10,3804	21,7929	GRIK5
1,0180	1,4101	21,0505	9,6183	3,0226	0,4716	0,7452	21,1969	0,1983	0,3858	GRM1
1,2797	1,7972	16,5159	6,0034	11,1254	4,1577	3,3771	32,1286	0,2924	0,3525	GRM2
0,1863	7,8125	3,5205	5,3732	0,2125	1,7003	20,3335	0,2358	0,2844	1,7360	GRM3
2,2749	1,8606	34,6740	7,3911	35,1581	6,2584	1,7725	69,8304	0,4310	0,6953	GRM4
5,4482	10,2374	116,6291	24,0137	61,6395	115,0235	17,2173	96,7228	1,4003	1,7121	GRM5
2,6496	1,4497	31,4674	10,5985	17,2173	33,9605	1,1775	43,2847	0,6905	1,2708	GRM6
2,0645	5,4861	24,8605	9,6852	31,0341	36,3979	1,6198	37,1627	0,5161	0,4985	GRM7
0,3006	0,6533	1,0761	0,1997	0,1726	1,3573	2,0502	0,3966	0,0479	2,1974	GRM8
5,0134	4,5183	116,6291	26,8302	40,9498	53,6603	10,5253	54,0336	1,0761	2,3715	EAAT2
343,8855	933,0330	1028,1138	1840,3753	376,3117	1292,3528	1101,9051	336,8084	134,9035	806,6418	GLUL
13,8882	5,5243	13,7922	3,2848	28,5572	117,4403	9,9575	8,2009	9,6183	12,0068	BCAT1
4,8092	4,3948	101,5316	22,5614	40,9498	58,7202	3,9883	49,0365	2,1822	5,6403	IDH1
4,4871	24,0137	98,0730	152,8300	2,2127	13,8882	23,1957	1,2975	3,6700	5,9620	SLC7A11

G_23	G_22	G_21	G_20	G_19	G_18	G_17	G_16	G_15	G_14	G_13	G_12	G_11	Patienten- ID
0,5399	0,0606	0,1171	0,4652	4,1577	0,2475	0,1726	124,1366	0,8590	0,1462	7,2893	0,1286	0,6011	GRIN1
0,1611	1,0987	0,0726	2,0502	5,6014	1,4700	0,5970	28,3600	21,1969	3,1076	16,0643	7,7049	67,9209	GRIN2A
0,5493	4,9102	1,2191	1,7725	17,2173	2,0502	0,8801	41,5214	11,5177	7,6517	21,3444	9,3553	228,4579	GRIN2B
0,0866	0,7662	0,0875	0,7350	1,2023	0,5687	0,8986	1,8478	3,0648	0,8269	3,2621	1,5538	39,5549	GRIN2C
0,0803	0,7556	0,0489	0,9303	1,9262	0,9368	1,0539	3,3771	5,1543	0,8099	8,9742	5,4482	57,5117	GRIN2D
0,1576	1,0686	0,1929	1,7481	9,8204	1,6086	0,6953	9,4859	21,0505	2,6313	21,1969	14,8850	96,0547	GRIN3A
0,0125	0,5055	0,0711	3,7471	1,6310	0,6138	0,6624	2,9399	4,9102	1,7003	5,2263	3,4242	40,1071	GRIN3B
1,6142	0,9971	0,0489	10,1667	2,5417	0,3911	0,5126	16,6308	5,5243	0,3069	4,4561	3,1729	0,6578	GRIA1
15,8981	1,4700	2,6496	0,6624	33,9605	7,9767	0,2170	10,8212	6,0872	3,1076	10,3087	5,6796	0,7099	GRIA2
48,8669	3,6955	3,0436	54,4094	84,2021	20,7607	9,4204	56,7199	55,5527	9,2907	39,0103	29,5643	203,0631	GRIA3
28,9559	3,6447	3,3771	11,0485	73,3022	32,3520	4,5814	18,0733	72,7958	13,4151	51,4744	21,6423	334,4819	GRIA4
11,2807	0,6223	0,1317	3,9608	4,0161	21,7929	13,1390	19,6408	9,4204	0,5847	23,3570	11,6785	0,6202	GRIK1
24,6888	6,1296	12,1744	38,4733	128,5142	34,1967	3,3538	27,0168	77,4817	12,4303	56,7199	29,9770	75,3630	GRIK2
49,7210	3,3538	3,4720	6,4791	64,2571	35,6489	0,8099	7,7585	37,1627	24,3489	15,4099	19,2366	75,8872	GRIK3
8,5196	1,5864	3,2395	8,7895	42,1010	17,7013	1,8736	7,0410	2,7431	1,9396	7,1890	3,3538	7,4425	GRIK4
23,8478	9,2907	1,8350	29,1573	74,3254	12,2591	11,5177	23,0355	27,7763	7,2893	32,3520	19,5052	203,0631	GRIK5
0,0630	0,6095	0,2155	1,8736	9,8204	1,2447	0,2944	3,2172	8,0321	0,9971	7,4943	5,8799	37,9436	GRM1
0,1498	0,3675	0,1383	1,7848	3,0436	0,6180	0,3778	4,6777	6,1296	1,1296	6,3457	4,5183	52,9216	GRM2
6,0662	0,3244	0,1336	0,4431	3,5205	3,2848	2,2592	13,5084	1,7240	0,1600	12,3444	5,3361	0,1997	GRM3
0,0118	0,5807	0,2247	2,7431	5,9620	2,1522	1,4397	7,0410	15,5171	2,9810	13,1390	6,2584	94,0779	GRM4
6,5016	2,6680	0,4985	5,9620	14,9885	7,3400	1,8736	25,0334	46,0709	10,0268	33,7259	16,9802	250,0000	GRM5
1,8223	0,9049	0,3289	2,2749	3,1509	4,0161	1,9262	5,3361	17,3370	3,5945	12,6914	6,4343	89,6222	GRM6
0,1026	1,5113	0,2441	2,2592	5,9620	1,6769	0,5306	17,7013	15,8431	1,4003	9,9575	5,9620	98,7552	GRM7
2,4129	0,5161	0,4021	0,8620	2,4213	1,4003	0,9049	2,5241	1,0911	0,3650	6,3457	0,2617	1,2191	GRM8
1,1940	2,7431	0,2924	4,9102	9,4204	5,4861	6,3457	13,0482	36,3979	4,7102	30,1855	21,4928	135,8419	EAAT2
848,7756	532,1851	174,3430	959,2641	790,0413	846,7453	574,3492	1424,0502	384,2188	46,0709	1414,2136	707,1068	376,3117	GLUL
16,1200	16,2885	0,5343	34,6740	5,2992	12,4303	7,2893	12,0904	87,7778	8,2009	27,0168	33,7259	8,5492	BCAT1
8,2580	6,3899	0,6267	3,9334	8,7895	11,2807	5,2263	9,6852	33,0318	4,1866	32,1286	20,3335	178,0063	IDH1
25,7372	14,6800	1,5113	3,3306	20,9051	46,7140	5,3361	19,9150	5,1543	1,3715	32,5771	28,1641	2,8202	SLC7A11

G_35	G_34	G_33	G_32	G_31	G_30	G_29	G_28	G_27	G_26	G_25	G_24	Patienten- ID
0,0074	0,1336	226,8798	0,6280	29,4620	0,0922	25,8266	1,1981	0,0585	0,1442	0,4524	12,2167	GRIN1
0,0066	0,3221	27,8728	0,1264	4,1721	0,9565	4,7429	0,8740	0,0137	0,0656	0,3562	3,1184	GRIN2A
1,1374	0,7124	40,2463	2,0290	16,8629	1,7787	10,8964	6,8012	0,0208	0,2053	4,6939	6,9201	GRIN2B
0,0323	0,0145	0,3871	0,1350	0,1645	0,0244	0,0634	0,0522	0,0095	0,0178	0,0486	0,2103	GRIN2C
0,0938	0,0765	0,2408	0,2814	0,1081	0,0680	0,1858	0,0358	0,0227	0,0164	0,1055	0,1781	GRIN2D
0,0038	0,0023	3,9198	0,0309	0,2944	0,1277	0,6740	0,0248	0,0068	0,0066	0,0085	0,3688	GRIN3A
0,0057	0,0032	0,0060	0,0144	0,0061	0,0078	0,0020	0,0011	0,0048	0,0078	0,0050	0,0217	GRIN3B
1,0761	0,0726	44,3476	0,4816	7,9216	4,2157	11,2417	0,9868	0,7149	0,4493	11,1254	7,2139	GRIA1
2,5505	3,2395	55,1689	31,1419	24,1807	8,2294	25,9162	28,1641	0,5707	6,3457	16,6308	29,4620	GRIA2
4,4253	12,5602	47,3661	39,0103	26,1871	15,8431	36,3979	41,5214	10,0616	19,1038	37,8123	38,4733	GRIA3
4,1866	11,2417	16,3451	10,8964	15,1977	7,6783	16,2322	21,4928	0,0602	0,4509	10,2374	16,9215	GRIA4
2,8695	1,4751	15,2505	0,9971	9,8545	11,0103	10,3087	4,2304	0,5306	2,0861	7,5989	8,2866	GRIK1
4,3043	1,9396	34,6740	0,8015	18,7756	5,4671	18,5814	28,6564	5,2992	6,7542	27,8728	19,6408	GRIK2
16,6885	10,3444	12,5602	93,4281	20,9051	8,3154	49,7210	47,5306	1,8160	11,1254	19,2366	21,3444	GRIK3
1,8736	3,1076	7,0655	11,7597	9,5850	3,7732	8,0044	10,0616	0,3006	1,1493	8,8507	12,2167	GRIK4
8,0321	16,5159	29,2585	59,9540	29,5643	20,6173	31,0341	17,2770	4,0300	8,2009	8,2009	21,1236	GRIK5
0,0028	0,0264	2,6773	0,0978	0,3818	0,2067	0,4447	0,0481	0,0024	0,0161	0,0228	0,4917	GRM1
0,0739	0,0964	9,0366	0,1089	2,0933	0,3210	2,3066	0,3844	0,0666	0,0491	0,1023	1,2233	GRM2
0,0786	0,6138	23,0355	0,5055	26,6448	12,1323	6,7776	1,0251	0,0129	1,5975	1,1694	37,8123	GRM3
0,0025	0,0225	3,0861	0,0251	0,9049	0,0189	0,8924	0,0369	0,0051	0,0045	0,0163	0,5437	GRM4
0,1345	0,1703	40,8081	0,1964	8,0600	1,0987	7,0410	4,4407	0,0474	0,1467	0,4385	16,6308	GRM5
0,1969	0,3166	0,4619	1,4700	0,8240	0,3994	0,9335	0,7987	0,4092	0,1093	1,3066	1,2318	GRM6
0,0954	0,3884	11,0869	3,7994	3,0648	1,1179	2,5067	0,3453	0,2563	0,0751	0,0415	3,6070	GRM7
0,5628	0,7350	8,6086	1,9464	3,6195	2,0788	3,0968	1,0040	0,1242	1,5919	1,6142	2,0220	GRM8
0,5399	1,0467	3,0331	4,0300	3,3191	1,3248	1,6711	0,8561	0,1534	0,5949	1,5755	5,7191	EAAT2
123,7071	690,1587	1287,8816	898,1324	1101,9051	1128,9644	468,1361	340,3285	453,7596	304,6026	552,8653	2848,1004	GLUL
17,0983	19,2366	18,5814	27,2992	28,3600	38,2075	54,4094	40,5262	9,0680	36,7783	35,6489	24,8605	BCAT1
2,0717	2,6866	2,0645	14,6800	6,5468	4,8594	7,4425	5,4861	1,4853	1,7062	7,8125	15,9533	IDH1
15,5171	18,5171	39,0103	27,7763	44,1942	21,0505	14,8850	12,3873	5,0658	6,8961	23,2762	35,8968	SLC7A11

6.5.2 GAPDH ZNS-METASTASEN

Tabelle 15:

Expressionsdaten der ZNS-Metastasenproben mit dem Housekeeping Gen GAPDH.

M_10	M_09	M_08	M_07	M_06	M_05	M_04	M_03	M_02	M_01	Patienten- ID
4,0721	1,5430	1,4802	0,2216	0,3675	0,6354	0,0636	0,0762	0,7823	1,4700	GRIN1
23,5195	0,4078	16,7465	2,1822	110,3379	62,9347	13,3224	47,3661	269,8071	68,8691	GRIN2A
46,0709	0,6858	98,7552	11,4382	183,0107	129,4081	29,9770	91,5054	993,0925	175,5556	GRIN2B
8,7288	0,2964	7,9216	1,8866	26,4608	14,7822	4,1290	16,5159	132,1273	36,6511	GRIN2C
12,9581	0,2408	18,8407	1,7121	43,8889	47,3661	6,6612	31,9066	226,8798	52,1930	GRIN2D
28,3600	0,7504	13,9848	2,4894	161,5441	99,4421	12,5167	49,0365	303,5487	84,2021	GRIN3A
10,0965	0,2200	9,0366	1,1857	24,1807	32,1286	4,2746	28,5572	123,2791	22,4056	GRIN3B
0,8740	0,0520	0,0503	0,0173	2,8202	0,0000	0,4684	0,0203	0,1902	0,0000	GRIA1
0,1763	0,2545	0,0000	0,0246	0,0539	0,0000	0,2883	0,1264	0,0000	0,4192	GRIA2
24,5183	0,9971	17,2173	5,2263	149,6848	69,3481	17,0983	92,1418	506,9797	161,5441	GRIA3
68,8691	1,9129	34,4345	8,9122	312,0826	389,5823	79,1098	132,1273	1301,3419	336,8084	GRIA4
0,3525	0,1221	0,0335	0,0251	0,2458	0,0295	0,1462	0,0568	0,1691	0,0641	GRIK1
75,3630	2,7241	36,6511	22,5614	70,3162	285,1909	31,6862	176,7767	1366,0403	277,3924	GRIK2
25,5594	0,9112	36,6511	5,6403	64,7041	57,1145	9,0366	50,4151	260,6164	66,0636	GRIK3
2,3388	0,4021	3,6447	0,2985	9,0995	2,6496	1,7848	4,0440	19,6408	6,5695	GRIK4
39,0103	1,5113	44,1942	13,2304	96,7228	46,7140	8,2009	75,3630	281,2646	102,2378	GRIK5
12,6914	0,2493	29,3601	2,0502	102,9489	57,5117	5,7989	21,1969	222,2107	30,6069	GRM1
9,4204	0,9368	23,0355	1,5430	16,2885	31,9066	5,7191	20,9051	184,2837	33,9605	GRM2
0,2408	0,5418	0,0339	0,2278	0,3199	0,0109	0,8327	0,3477	0,1679	1,8866	GRM3
28,1641	0,3112	39,5549	3,5205	55,1689	41,8102	14,5786	58,3146	257,0285	80,2141	GRM4
53,2897	1,5538	41,2346	13,9848	205,8978	157,1267	33,2616	119,0798	920,1877	228,4579	GRM5
25,5594	0,8212	42,1010	7,0410	24,0137	43,8889	7,2893	49,7210	225,3126	92,7827	GRM6
18,4530	1,1453	29,7699	3,1509	50,0669	34,9152	7,3911	34,9152	188,1558	61,2138	GRM7
1,0761	0,5233	0,5126	0,1108	0,9902	0,0000	1,9262	1,6424	4,1290	0,4493	GRM8
48,3614	1,6769	26,0965	5,0834	156,0413	125,8694	20,3335	79,6600	632,8783	181,7466	EAAT2
360,9823	307,7861	253,4899	79,6600	197,5103	226,8798	650,6709	291,1834	876,6057	757,8583	GLUL
5,9620	24,0137	3,3306	1,4905	1,1374	0,3289	2,8595	1,7003	1,4497	16,0643	BCAT1
47,0390	11,7597	30,8198	6,1296	119,9080	125,0000	25,7372	110,3379	1079,2282	166,0857	IDH1
4,8092	9,6852	4,1005	110,3379	5,3732	0,1600	7,7049	4,0440	0,7715	4,4561	SLC7A11

M_20	M_19	M_18	M_17	M_16	M_15	M_14	M_13	M_12	M_11	Patienten- ID
0,0055	0,0439	0,0176	0,5474	0,0124	0,3844	0,1649	0,2903	0,1041	0,6858	GRIN1
0,5787	0,0590	0,0109	0,0057	0,2140	0,0181	1,1257	5,3732	2,6496	2,5772	GRIN2A
0,0592	0,0090	1,0576	0,0011	0,2617	0,2608	0,6443	3,3771	5,8393	5,2263	GRIN2B
0,0274	0,1034	0,0134	0,0231	0,0296	0,0887	0,1673	0,7299	2,5067	1,4905	GRIN2C
0,0591	0,0161	0,8680	0,0028	0,2046	0,2964	0,1118	3,4006	1,8223	1,2975	GRIN2D
0,0378	0,0044	0,0020	0,0003	0,2581	0,0251	0,8565	5,8799	4,5183	9,2907	GRIN3A
0,0533	0,0129	0,0019	0,0436	0,5532	0,0652	0,1611	2,8995	2,2749	1,7481	GRIN3B
0,0461	0,0315	0,0086	0,0000	0,0030	0,0000	0,0439	0,1383	0,1703	0,2944	GRIA1
0,0023	0,0252	0,0192	0,0012	0,0033	0,0000	0,0315	0,2785	0,0281	0,0539	GRIA2
1,0287	0,3441	0,0811	0,0026	0,1750	0,0426	2,5067	8,7288	6,8485	7,2390	GRIA3
0,0533	0,3453	0,2608	0,1983	0,5867	0,8650	3,0436	11,1254	6,0034	11,2807	GRIA4
0,0036	0,0035	0,0039	0,0000	0,0004	0,4524	0,0000	0,0598	0,0203	0,0543	GRIK1
0,0744	0,0909	0,0214	0,2795	0,4700	0,3980	1,7240	8,4901	6,9924	28,7559	GRIK2
0,2082	0,0424	0,0137	0,0019	0,3347	0,1976	0,7375	2,7053	4,1290	30,8198	GRIK3
0,2231	1,1735	0,0494	0,0059	0,0155	0,0063	0,0680	1,0539	0,3199	0,9049	GRIK4
0,2563	0,5551	0,1078	0,0364	0,3405	1,0467	1,6538	2,9399	10,6722	28,1641	GRIK5
0,0069	0,0077	0,0020	0,0007	0,0781	0,0119	0,3489	6,8485	0,9175	3,5697	GRM1
0,0696	0,6180	0,0501	0,0511	0,1085	0,0401	0,3477	1,3157	1,9262	5,0483	GRM2
0,1112	0,3221	0,0728	0,0065	0,0050	0,0000	0,0403	0,3405	0,0000	0,1863	GRM3
0,0404	1,3763	0,0236	0,0017	0,2170	0,1407	0,8155	2,7053	5,2263	7,8125	GRM4
0,0797	0,0673	0,0083	0,2140	0,7850	0,5143	1,7603	5,8799	9,0995	7,7585	GRM5
0,2536	0,0265	0,0101	0,0013	0,3016	0,2893	1,2023	2,5241	9,2265	3,4962	GRM6
0,0403	0,0137	0,0382	0,0010	0,1255	1,2233	0,4556	3,4720	8,6086	5,2263	GRM7
1,5700	1,0287	0,0541	0,0881	0,0148	0,0218	0,6834	1,9262	0,3090	26,2780	GRM8
0,1442	0,0381	0,0143	0,0024	0,4849	0,0345	0,6332	6,2584	14,3779	3,3306	EAAT2
53,1053	234,0681	73,5567	129,8574	13,4617	81,0525	202,3606	594,6036	219,1514	348,6859	GLUL
3,6828	3,4720	1,1414	11,0485	0,9902	0,8590	6,8961	5,7589	1,9531	1,9531	BCAT1
0,8832	1,7542	2,0645	1,1257	0,2834	0,1074	2,2749	9,9575	9,6183	6,4343	IDH1
0,9936	9,6183	8,4607	4,7925	0,9143	7,8125	3,3538	2,1671	41,8102	17,4576	SLC7A11

6.5.3 TBP GLIOBLASTOM

Tabelle 16:

Expressionsdaten der Glioblastomproben mit dem Housekeeping Gen TBP.

G_10	G_09	G_08	G_07	G_06	G_05	G_04	G_03	G_02	G_01	Patienten-ID
96,723	9513,657	169,576	2,421	318,640	10,309	15889,480	0,000	4,425	19,237	GRIN1
1635,804	2531,513	4789,915	888,843	3530,812	389,582	2462,289	11157,949	135,842	70,805	GRIN2A
3630,077	5775,717	4924,578	1494,849	27284,317	1464,086	3863,745	68593,502	386,891	129,408	GRIN2B
697,372	148,651	806,642	180,491	3204,280	353,553	144,586	8000,000	47,039	35,403	GRIN2C
801,070	211,686	1986,185	641,713	4112,455	1866,066	108,067	8224,911	119,908	92,142	GRIN2D
1905,276	1035,265	4257,481	1180,993	8282,119	664,343	1071,773	19292,925	81,334	74,842	GRIN3A
716,978	104,386	972,655	400,535	5775,717	646,176	16,064	6453,134	61,640	31,907	GRIN3B
147,624	3944,931	267,943	423,373	376,312	371,131	2732,081	3363,586	55,169	48,698	GRIA1
907,519	3680,751	493,116	876,606	562,529	870,551	1693,491	0,000	1006,956	835,088	GRIA2
10703,420	4756,828	8339,726	3226,567	16795,467	5063,026	4198,867	21705,669	1931,873	1366,040	GRIA3
5775,717	2479,415	13547,925	3837,056	20392,970	4823,231	1057,018	65799,285	598,739	1006,956	GRIA4
283,221	4000,000	1790,050	2948,538	169,576	10703,420	2428,390	650,671	225,313	37,944	GRIK1
4257,481	5426,417	19027,314	2948,538	29857,056	1057,018	3052,518	101125,288	1729,074	2070,530	GRIK2
5656,854	1006,956	4823,231	1515,717	6964,405	901,250	795,536	22471,118	1790,050	1132,884	GRIK3
2639,016	2479,415	1515,717	1424,050	1248,331	143,587	742,262	2675,855	829,320	1064,370	GRIK4
8754,350	6453,134	12125,733	2657,372	18379,174	7621,104	2848,100	53817,371	3363,586	3116,658	GRIK5
602,904	323,088	1892,115	624,165	1328,686	62,068	73,302	7889,862	64,257	55,169	GRM1
757,858	411,796	1484,524	389,582	4890,561	435,275	473,029	11958,794	94,732	50,415	GRM2
133,046	1866,066	316,439	441,351	95,391	178,006	2848,100	100,134	92,142	248,273	GRM3
1347,234	389,582	3116,658	466,516	8514,961	823,591	205,898	25992,077	139,661	96,723	GRM4
3226,567	2345,670	10483,147	1505,247	27665,191	13177,456	2000,000	40224,428	528,509	238,159	GRM5
1569,168	332,171	2828,427	687,771	7727,491	3890,620	136,787	18000,936	260,616	176,777	GRM6
1222,640	1257,013	2219,139	628,507	13928,809	4169,863	188,156	15454,981	194,791	69,348	GRM7
214,641	156,041	96,055	16,402	77,482	109,197	194,791	162,668	18,073	305,660	GRM8
3580,100	1079,228	10410,735	2203,810	18379,174	6147,501	1222,640	22471,118	406,126	329,877	EAAT2
245571,615	222860,944	91773,136	151167,061	122785,807	148056,088	128000,000	140069,594	50914,335	79893,155	GLUL
9917,662	1319,508	1231,144	269,807	6916,298	13454,343	1156,688	3410,540	3630,077	1670,176	BCAT1
3434,262	1049,717	9063,071	1853,176	18379,174	6727,171	463,294	20392,970	823,591	784,584	IDH1
3204,280	5735,821	8754,350	12553,346	993,092	1591,073	2694,467	539,614	1385,109	829,320	SLC7A11

G_22	G_21	G_20	G_19	G_18	G_17	G_16	G_15	G_14	G_13	G_12	G_11	Patienten-ID
19,104	62,500	60,791	277,392	19,104	27,394	20966,294	128,070	67,452	611,320	13,185	266,093	GRIN1
346,277	38,741	267,943	373,712	113,440	105,843	4789,915	3363,586	1433,955	1347,234	1049,717	30064,728	GRIN2A
1918,528	615,572	287,175	1231,144	234,881	146,604	7310,652	1753,211	4027,822	2027,919	1028,114	101125,288	GRIN2B
241,484	46,714	96,055	80,214	43,889	142,595	312,083	486,327	381,565	273,573	170,755	17508,699	GRIN2C
238,159	26,096	121,582	128,514	72,293	167,241	570,382	817,902	373,712	752,623	598,739	25457,167	GRIN2D
336,808	70,316	185,565	543,367	124,137	110,338	1602,140	3340,352	1214,195	1777,685	1635,804	42517,946	GRIN3A
159,320	37,944	489,710	108,819	47,366	105,112	496,546	779,165	784,584	438,303	376,312	17753,112	GRIN3B
314,253	26,096	1328,686	169,576	30,186	81,334	2808,890	876,606	141,610	373,712	348,686	260,616	GRIA1
463,294	1414,214	86,569	2265,768	615,572	34,435	1827,663	965,936	1433,955	864,537	624,165	403,321	GRIA2
1164,734	1624,505	7110,741	5617,780	1602,140	1494,849	9579,830	8815,241	4287,094	3271,608	3249,010	89884,472	GRIA3
1337,928	1558,329	1283,426	2948,538	2361,985	650,671	2445,281	11551,434	6190,260	4316,913	2378,414	148056,088	GRIA4
228,458	60,791	460,094	161,544	1591,073	1866,066	2657,372	1945,310	216,134	1972,465	1328,686	250,868	GRIK1
1729,074	5617,780	4469,149	5169,411	2496,661	476,319	3655,326	12553,346	6543,216	5388,934	3410,540	24761,040	GRIK2
1231,144	1602,140	752,623	2584,706	2602,684	115,023	1049,717	7674,113	9000,468	1301,342	2188,587	39124,489	GRIK3
582,367	1494,849	1021,012	1693,491	1292,353	266,093	952,638	566,442	716,978	607,097	381,565	3837,056	GRIK4
2620,787	668,964	3095,130	4112,455	1741,101	2042,024	3363,586	4228,072	3837,056	3073,750	2219,139	104691,463	GRIK5
223,756	99,442	217,638	395,021	90,873	41,810	435,275	1658,639	368,567	632,878	668,964	21555,737	GRM1
134,904	63,813	207,330	122,428	45,123	53,660	632,878	1265,757	417,544	535,887	514,057	27284,317	GRM2
119,080	61,640	51,474	141,610	239,816	320,856	1827,663	356,013	59,129	1042,466	607,097	166,086	GRM3
213,159	103,665	318,640	239,816	170,755	216,134	852,635	3204,280	1101,905	1109,569	712,025	48502,930	GRM4
712,025	417,544	1580,083	1658,639	582,367	281,265	3031,433	9513,657	3706,352	2848,100	1931,873	128890,310	GRM5
241,484	119,908	602,904	348,686	318,640	289,172	646,176	3580,100	1328,686	1071,773	732,043	46205,734	GRM6
403,321	204,476	598,739	659,754	133,046	79,660	2143,547	2566,852	747,425	979,420	812,252	50914,335	GRM7
137,738	336,808	228,458	267,943	111,105	135,842	305,660	176,777	194,791	624,165	35,649	482,968	GRM8
732,043	132,127	602,904	528,509	628,507	952,638	1580,083	5897,077	2514,027	2969,047	2928,171	53817,371	EAAT2
142024,892	146017,756	254231,679	87426,576	67181,868	86222,949	172445,898	62249,917	24590,003	139102,062	96335,792	149085,899	GLUL
4346,939	447,513	9189,587	586,417	986,233	1094,294	1464,086	14221,483	4377,175	2657,372	4594,793	3386,981	BCAT1
1705,270	524,858	1042,466	972,655	895,025	784,584	1172,835	5351,710	2234,574	3160,165	2770,219	70521,927	IDH1
3917,681	1265,757	882,703	2313,376	3706,352	801,070	2411,616	835,088	732,043	3204,280	3837,056	1117,287	SLC7A11

G_34	G_33	G_32	G_31	G_30	G_29	G_28	G_27	G_26	G_25	G_24	G_23	Patienten-ID
54,598	26172,866	42,247	3470,155	13,602	4169,863	190,122	17,337	34,078	57,313	949,342	35,773	GRIN1
131,670	3215,404	8,943	491,410	141,121	765,779	138,696	4,487	15,517	45,123	242,322	10,672	GRIN2A
291,183	4642,816	143,587	1986,185	262,429	1759,298	1079,228	6,151	48,529	594,604	537,747	36,398	GRIN2B
5,921	44,656	9,552	19,370	3,594	10,237	8,287	2,801	4,216	6,151	16,345	5,739	GRIN2C
31,250	27,776	19,915	12,736	10,027	33,377	5,680	6,708	3,866	13,369	13,840	5,318	GRIN2D
0,950	452,190	2,840	34,674	18,841	108,819	3,721	2,008	1,625	0,644	28,656	11,719	GRIN3A
1,293	0,698	1,118	0,862	1,069	0,219	0,128	1,450	0,997	0,577	1,637	0,883	GRIN3B
23,115	5676,493	30,927	993,092	578,344	1723,092	115,023	216,885	92,142	1292,353	510,506	111,105	GRIA1
1031,683	7061,624	2000	3031,433	1128,964	3972,370	3282,966	173,139	1301,342	1931,873	2084,932	1094,294	GRIA2
4000	6062,866	2505,329	3282,966	2173,470	5578,975	4839,976	3052,518	3917,681	4392,371	2722,628	3363,586	GRIA3
3580,100	2092,170	699,793	1905,276	1053,361	2488,023	2505,329	18,262	92,462	1189,207	1197,479	1993,081	GRIA4
469,761	1952,064	41,378	781,870	1218,410	955,945	375,010	110,721	386,891	771,105	460,094	742,262	GRIK1
617,709	4438,278	33,262	1489,677	604,997	1723,092	2540,302	1105,731	1252,664	2828,427	1090,508	1624,505	GRIK2
4112,455	1681,793	3877,159	1658,639	920,188	4610,745	4213,444	378,929	2063,366	1952,064	1185,093	3271,608	GRIK3
989,657	904,379	755,236	1201,636	517,632	1226,885	1172,835	91,189	235,696	1028,114	864,537	586,417	GRIK4
5259,771	3745,089	2488,023	2345,670	2281,527	2877,867	1531,558	840,896	1520,979	832,199	1172,835	1569,168	GRIK5
10,489	358,489	4,058	30,290	22,876	41,235	4,260	0,497	2,981	2,315	27,299	4,143	GRM1
38,340	1209,994	4,518	166,086	35,526	213,899	34,078	13,888	16,516	10,380	67,921	9,855	GRM2
244,008	3084,422	18,906	2128,740	1531,558	683,020	106,949	2,622	273,573	125,434	2070,530	390,935	GRM3
8,943	413,225	1,258	72,293	2,323	89,933	4,410	1,076	0,772	1,816	29,770	0,758	GRM4
67,686	5464,161	8,699	643,941	138,696	709,562	463,294	9,618	25,120	47,039	910,670	418,994	GRM5
125,869	61,854	54,978	65,835	50,415	94,078	83,331	83,043	18,711	140,146	67,452	117,440	GRM6
154,427	1484,524	142,102	244,855	141,121	252,613	36,021	52,012	12,869	4,456	197,510	6,615	GRM7
253,490	923,382	72,796	289,172	262,429	312,083	104,748	25,208	272,627	173,139	110,721	155,501	GRM8
360,982	325,335	274,523	321,970	186,856	257,028	99,442	36,651	142,595	190,782	396,392	126,306	EAAT2
238030,065	138141,214	61180,500	106891,254	159233,492	72003,743	39533,396	108383,400	73008,878	66949,436	197402,986	75845,937	GLUL
6634,556	1993,081	1859,610	2751,084	5388,934	8368,680	4707,627	2165,950	8815,241	4316,913	1723,092	1705,270	BCAT1
926,588	221,442	1000,000	635,075	685,391	1144,724	637,280	354,781	408,951	946,058	1105,731	873,573	IDH1
6386,387	4184,340	1892,115	4287,094	2969,047	2289,448	1438,934	1209,994	1652,901	2818,642	2488,023	2722,628	SLC7A11

G_35	Patienten-ID
2,869	GRIN1
2,542	GRIN2A
438,303	GRIN2B
12,430	GRIN2C
36,147	GRIN2D
1,450	GRIN3A
2,205	GRIN3B
380,245	GRIA1
901,250	GRIA2
1563,739	GRIA3
1479,388	GRIA4
1013,959	GRIK1
1520,979	GRIK2
5676,493	GRIK3
662,044	GRIK4
2838,247	GRIK5
0,868	GRM1
25,120	GRM2
26,737	GRM3
0,844	GRM4
45,753	GRM5
66,986	GRM6
32,464	GRM7
147,624	GRM8
141,610	EAAT2
32446,703	GLUL
4484,664	BCAT1
543,367	IDH1
4069,919	SLC7A11

6.5.4 TBP ZNS-METASTASEN

Tabelle 17:

Expressionsdaten der ZNS-Metastasenproben mit dem Housekeeping Gen TBP.

M_07	M_06	M_05	M_04	M_03	M_02	M_01	Patienten-ID
54,034	44,811	49,037	5,563	31,686	373,712	318,640	GRIN1
532,185	13454,343	4856,780	1071,773	19698,311	128890,310	14928,528	GRIN2A
2281,527	22315,899	9986,644	2411,616	38054,628	474413,088	38054,628	GRIN2B
460,094	3226,567	1140,764	332,171	6868,523	63118,893	7944,740	GRIN2C
417,544	5351,710	3655,326	535,887	13269,113	108383,400	11313,708	GRIN2D
607,097	19698,311	7674,113	1006,956	20392,970	145009,137	18252,219	GRIN3A
289,172	2948,538	2479,415	343,885	11876,189	58892,010	4856,780	GRIN3B
4,216	343,885	0,000	37,681	7,442	90,873	0,000	GRIA1
4,487	6,258	0,000	23,196	49,037	0,000	111,878	GRIA2
1274,561	18252,219	5351,710	1375,542	38319,319	242190,758	35017,398	GRIA3
2173,470	38054,628	30064,728	6364,292	54948,188	621667,781	73008,878	GRIA4
4,678	27,776	2,524	12,780	20,833	57,114	14,680	GRIK1
3758,091	7835,362	24420,147	2428,390	58081,226	461440,237	58081,226	GRIK2
939,523	7361,501	5028,053	721,965	16564,239	88034,676	13832,596	GRIK3
49,721	1035,265	233,258	142,595	1328,686	6634,556	1375,542	GRIK4
2203,810	11004,335	4112,455	655,197	24761,040	95009,509	21406,841	GRIK5
341,510	11712,686	5063,026	463,294	6964,405	75061,437	6408,559	GRM1
257,028	1853,176	2808,890	456,916	6868,523	62249,917	7110,741	GRM2
48,698	36,147	0,930	72,796	134,904	52,922	503,478	GRM3
641,713	6276,673	3680,751	1164,734	19159,659	86822,677	16795,467	GRM4
2329,467	23425,371	13832,596	2657,372	39124,489	310833,890	47835,176	GRM5
1172,835	2732,081	3863,745	582,367	16336,194	76109,255	19427,118	GRM6
524,858	5696,201	3073,750	590,496	11471,642	63557,920	12817,118	GRM7
23,683	111,878	0,000	168,404	637,280	1569,168	119,908	GRM8
1086,735	17630,482	10777,869	1777,685	30909,963	240517,824	48502,930	EAAT2
17029,923	22315,899	19427,118	56885,932	112985,984	333143,515	202250,576	GLUL
318,640	128,514	28,164	250,000	659,754	550,953	4287,094	BCAT1
1310,393	13547,925	10703,420	2250,117	42813,682	410147,777	44323,503	IDH1
23588,307	607,097	13,697	673,617	1569,168	293,209	1189,207	SLC7A11

M_19	M_18	M_17	M_16	M_15	M_14	M_13	M_12	M_11	M_10	M_09	M_08	Patienten-ID
5,601	7,065	283,221	40,107	515,842	11,320	34,915	25,737	45,437	1094,294	104,386	139,661	GRIN1
7,840	4,395	2,950	690,159	12,691	145,088	646,176	655,197	170,755	6320,330	27,584	1580,083	GRIN2A
1,149	424,842	0,353	843,816	349,896	83,043	888,843	2084,932	539,614	12380,520	46,391	9253,505	GRIN2B
13,745	5,392	11,965	95,391	119,080	21,567	87,778	619,854	98,755	2345,670	20,054	747,425	GRIN2C
2,145	328,736	1,460	659,754	397,768	4,380	408,951	450,625	85,971	3482,202	16,289	1777,685	GRIN2D
0,156	0,796	0,087	832,199	33,726	59,747	1319,508	1214,195	747,425	7621,104	41,521	1319,508	GRIN3A
1,712	0,748	13,230	707,107	42,101	12,869	348,686	562,529	115,824	2713,209	14,885	852,635	GRIN3B
4,187	3,460	0,000	7,573	0,000	3,683	16,631	38,473	19,505	234,881	3,521	3,773	GRIA1
3,354	11,518	0,462	4,962	0,000	2,640	33,493	6,944	3,570	37,421	17,217	0,000	GRIA2
45,753	32,577	1,061	223,756	27,489	200,267	1049,717	1693,491	479,632	6588,728	67,452	1624,505	GRIA3
45,912	104,748	60,162	750,019	558,644	243,164	1301,342	1356,604	702,222	18507,011	129,408	3249,010	GRIA4
0,472	1,575	0,000	1,173	268,874	0,000	15,734	4,581	3,377	115,023	8,144	2,380	GRIK1
12,090	8,609	95,061	650,671	236,514	138,696	1905,276	1879,045	2313,376	16000,000	150,726	2657,372	GRIK2
6,151	4,826	0,589	463,294	117,440	59,334	316,439	933,033	1918,528	8339,726	60,791	2657,372	GRIK3
156,041	19,846	1,779	19,846	4,143	5,429	123,279	72,293	56,328	763,130	26,830	264,255	GRIK4
73,812	43,285	12,387	471,392	622,006	133,046	773,782	3810,552	2265,768	7889,862	84,788	3204,280	GRIK5
0,977	0,720	0,326	108,067	7,090	28,067	1536,875	246,558	287,175	4141,060	16,631	2128,740	GRM1
78,836	18,453	17,397	150,205	23,848	27,970	153,893	435,275	314,253	3073,750	62,500	1670,176	GRM2
41,092	26,830	1,730	6,151	0,000	3,023	76,415	0,000	14,989	78,563	36,147	2,542	GRM3
175,556	8,699	0,456	262,429	88,695	61,214	607,097	1404,445	628,507	9189,587	20,761	2907,945	GRM4
8,579	3,065	57,313	949,342	324,210	132,127	598,739	1827,663	543,367	17387,758	103,665	2989,698	GRM5
3,377	3,708	0,350	364,755	182,378	90,246	257,028	1853,176	244,855	8339,726	54,788	3052,518	GRM6
1,742	14,082	0,398	151,774	771,105	34,197	353,553	1729,074	366,021	4756,828	63,372	2158,456	GRM7
131,215	19,915	23,601	17,948	13,745	51,296	196,146	62,068	1840,375	277,392	28,956	45,753	GRM8
4,859	9,552	0,488	659,754	22,097	54,409	637,280	2887,858	233,258	12466,633	92,783	2329,467	EAAT2
29857,056	27095,850	36252,284	18315,587	51984,153	17387,758	60547,689	44017,338	24420,147	93054,241	17029,923	22627,417	GLUL
442,884	420,448	3084,422	1347,234	550,953	592,546	586,417	392,292	136,787	1536,875	1328,686	297,302	BCAT1
223,756	760,489	314,253	385,553	68,869	195,467	1013,959	1931,873	450,625	12125,733	650,671	2751,084	IDH1
1226,885	3116,658	1337,928	1244,012	5010,658	288,172	220,676	8397,733	1222,640	1239,708	535,887	366,021	SLC7A11

Patienten-ID	GRIN1	GRIN2A	GRIN2B	GRIN2C	GRIN2D	GRIN3A	GRIN3B	GRIA1	GRIA2	GRIA3	GRIA4	GRIK1	GRIK2	GRIK3	GRIK4	GRIK5	GRM1	GRM2	GRM3	GRM4	GRM5	GRM6	GRM7	GRM8	EAAT2	GLUL	BCAT1	IDH1	SLC7A11
M_20	2,167	230,047	23,519	8,943	8,004	15,041	10,934	18,906	1,182	210,954	10,934	0,633	17,763	49,721	45,753	61,214	1,654	16,631	21,944	7,041	15,734	50,067	7,949	309,927	32,804	12083,781	837,987	200,963	226,095

6.5.5 ABGLEICH DER PROBEN DER KOHORTE MIT DEN ERMITTELTEN CUTOFF-GREZWERTEN

Tabelle 18:

Überprüfung der Untersuchten Proben auf die ermittelten Cutoff Werte.

Grün= oberhalb des ermittelten Cutoff Wert; Orange=unterhalb des ermittelten Cutoff Wert

Patienten-ID	GRIA1	GRIA2	GRIK1	GRM3	GLUL	BCAT1
G_01	0,4134	7,0900	0,2653	1,7360	806,6418	12,0068
G_02	0,1969	3,5945	0,6953	0,2844	134,9035	9,6183
G_03	6,0452	0,0000	1,7481	0,2358	336,8084	8,2009
G_04	19,1038	11,8415	17,3370	20,3335	1101,9051	9,9575
G_05	2,8794	6,7542	81,3339	1,7003	1292,3528	117,4403
G_06	0,6763	1,0110	0,7002	0,2125	376,3117	28,5572
G_07	5,2992	10,9722	45,4366	5,3732	1840,3753	3,2848
G_08	3,0648	5,6403	19,9150	3,5205	1028,1138	13,7922
G_09	19,9150	18,5814	17,4576	7,8125	933,0330	5,5243
G_10	0,2185	1,3433	0,4782	0,1863	343,8855	13,8882
G_11	0,6578	0,7099	0,6202	0,1997	376,3117	8,5492
G_12	3,1729	5,6796	11,6785	5,3361	707,1068	33,7259
G_13	4,4561	10,3087	23,3570	12,3444	1414,2136	27,0168
G_14	0,3069	3,1076	0,5847	0,1600	46,0709	8,2009
G_15	5,5243	6,0872	9,4204	1,7240	384,2188	87,7778
G_16	16,6308	10,8212	19,6408	13,5084	1424,0502	12,0904
G_17	0,5126	0,2170	13,1390	2,2592	574,3492	7,2893
G_18	0,3911	7,9767	21,7929	3,2848	846,7453	12,4303
G_19	2,5417	33,9605	4,0161	3,5205	790,0413	5,2992
G_20	10,1667	0,6624	3,9608	0,4431	959,2641	34,6740
G_21	0,0489	2,6496	0,1317	0,1336	174,3430	0,5343
G_22	0,9971	1,4700	0,6223	0,3244	532,1851	16,2885
G_23	1,6142	15,8981	11,2807	6,0662	848,7756	16,1200
G_24	7,2139	29,4620	8,2866	37,8123	2848,1004	24,8605
G_25	11,1254	16,6308	7,5989	1,1694	552,8653	35,6489

G_26	0,4493	6,3457	2,0861	1,5975	304,6026	36,7783
G_27	0,7149	0,5707	0,5306	0,0129	453,7596	9,0680
G_28	0,9868	28,1641	4,2304	1,0251	340,3285	40,5262
G_29	11,2417	25,9162	10,3087	6,7776	468,1361	54,4094
G_30	4,2157	8,2294	11,0103	12,1323	1128,9644	38,2075
G_31	7,9216	24,1807	9,8545	26,6448	1101,9051	28,3600
G_32	0,4816	31,1419	0,9971	0,5055	898,1324	27,2992
G_33	44,3476	55,1689	15,2505	23,0355	1287,8816	18,5814
G_34	0,0726	3,2395	1,4751	0,6138	690,1587	19,2366
G_35	1,0761	2,5505	2,8695	0,0786	123,7071	17,0983
M_01	0,0000	0,4192	0,0641	1,8866	757,8583	16,0643
M_02	0,1902	0,0000	0,1691	0,1679	876,6057	1,4497
M_03	0,0203	0,1264	0,0568	0,3477	291,1834	1,7003
M_04	0,4684	0,2883	0,1462	0,8327	650,6709	2,8595
M_05	0,0000	0,0000	0,0295	0,0109	226,8798	0,3289
M_06	2,8202	0,0539	0,2458	0,3199	197,5103	1,1374
M_07	0,0173	0,0246	0,0251	0,2278	79,6600	1,4905
M_08	0,0503	0,0000	0,0335	0,0339	253,4899	3,3306
M_09	0,0520	0,2545	0,1221	0,5418	307,7861	24,0137
M_10	0,8740	0,1763	0,3525	0,2408	360,9823	5,9620
M_11	0,2944	0,0539	0,0543	0,1863	348,6859	1,9531
M_12	0,1703	0,0281	0,0203	0,0000	219,1514	1,9531
M_13	0,1383	0,2785	0,0598	0,3405	594,6036	5,7589
M_14	0,0439	0,0315	0,0000	0,0403	202,3606	6,8961
M_15	0,0000	0,0000	0,4524	0,0000	81,0525	0,8590
M_16	0,0030	0,0033	0,0004	0,0050	13,4617	0,9902
M_17	0,0000	0,0013	0,0000	0,0065	129,8574	11,0485
M_18	0,0086	0,0192	0,0039	0,0728	73,5567	1,1414
M_19	0,0315	0,0252	0,0035	0,3221	234,0681	3,4720
M_20	0,0461	0,0023	0,0036	0,1112	53,1053	3,6828

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Afonso, M., & Brito, M. A. (2022). Therapeutic Options in Neuro-Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS23105351>
- Aithal, M. G. S., & Rajeswari, N. (2015). Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Research and Treatment*, 3(1), 24. <https://doi.org/10.14791/btrt.2015.3.1.24>
- Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. (2017). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol*, 35, 2402–2409. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 152, pp. 63–82). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
- Anel, M., Steller, E., Esus, J., Arcia -F Oncillas, G., Ndion, S. A., Teven, S., Oodman, N. G., Icente, V., Anaclocha, V., Tephén, S., Aylin, B. B., Ames, J., & Erman, G. H. (2000). Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>, 343(19), 1350–1354. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>
- Armbrecht, M. (2013). *Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen*.
- Arnemann, J. (2019). *Schmelzkurvenanalyse*. 2121–2121. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3577
- Barnholtz-Sloan, J. S., Sloan, A. E., Davis, F. G., Vigneau, F. D., Lai, P., & Sawaya, R. E. (2004). Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14), 2865–2872. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.12.149>
- Bartusik-Aebisher, D., Żołyński, A., Barnaś, E., Machorowska-Pieniążek, A., Oleś, P., Kawczyk-Krupka, A., & Aebisher, D. (2022). The Use of Photodynamic Therapy in the Treatment of Brain Tumors—A Review of the Literature. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27206847>
- Berendsen, S., Varkila, M., Kroonen, J., Seute, T., Snijders, T. J., Kauw, F., Spliet, W. G. M., Willems, M., Poulet, C., Broekman, M. L., Bours, V., & Robe, P. A. (2016). Prognostic relevance of epilepsy at presentation in glioblastoma patients. *Neuro-Oncology*, 18(5), 700–706. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov238>
- Bienkowski, M., Furtner, J., & Hainfellner, J. A. (2018). Clinical neuropathology of brain tumors. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 145, pp. 477–534). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00032-8>
-

- Böhm, V., & Leibetseder, A. (2024). Tumorassoziierte Epilepsie bei Gliomen. *Psychopraxis. Neuropraxis*. <https://doi.org/10.1007/s00739-023-00970-5>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Holland, E. C., Louis, D. N., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Perry, A., Reifenberger, G., Stupp, R., von Deimling, A., & Weller, M. (2018). cIMPACT-NOW Update 3: Recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathologica*, *136*(5), 805. <https://doi.org/10.1007/S00401-018-1913-0>
- Bridges, R. J., Natale, N. R., & Patel, S. A. (2012). System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British Journal of Pharmacology*, *165*(1), 20. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01480.X>
- Brocke, K. S., Stauffer, C., Luksch, H., Geiger, K. D., Stepulak, A., Marzahn, J., Schackert, G., Temme, A., & Ikonomidou, C. (2010). Glutamate receptors in pediatric tumors of the central nervous system. *Cancer Biology and Therapy*, *9*(6), 455–468. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.6.10898>
- Butler, M., Pongor, L., Su, Y. T., Xi, L., Raffeld, M., Quezado, M., Trepel, J., Aldape, K., Pommier, Y., & Wu, J. (2020). MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma. *Trends in Cancer*, *6*(5), 380. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2020.02.010>
- Cagney, D. N., Martin, A. M., Catalano, P. J., Redig, A. J., Lin, N. U., Lee, E. Q., Wen, P. Y., Dunn, I. F., Bi, W. L., Weiss, S. E., Haas-Kogan, D. A., Alexander, B. M., & Aizer, A. A. (2017). Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro-Oncology*, *19*(11), 1511. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX077>
- Castegna, A., & Menga, A. (2018). Glutamine Synthetase: Localization Dictates Outcome. *Genes*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/GENES9020108>
- Chang, H. J., Yoo, B. C., Lim, S. B., Jeong, S. Y., Kim, W. H., & Park, J. G. (2005). Metabotropic Glutamate Receptor 4 Expression in Colorectal Carcinoma and Its Prognostic Significance. *Clinical Cancer Research*, *11*(9), 3288–3295. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1912>
- Chen, T. S., Huang, T. H., Lai, M. C., & Huang, C. W. (2023). The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomedicines*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11030783>
- Cheray, M., Bégaud, G., Deluche, E., Nivet, A., Battu, S., Lalloué, F., Verdier, M., & Bessette, B. (2017). Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. *Exon Publications*, 59–71. <https://doi.org/10.15586/CODON.GLIOMASTOMA.2017.CH4>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
-

- Ciceroni, C., Bonelli, M., Mastrantoni, E., Niccolini, C., Laurenza, M., Larocca, L. M., Pallini, R., Traficante, A., Spinsanti, P., Ricci-Vitiani, L., Arcella, A., De Maria, R., Nicoletti, F., Battaglia, G., & Melchiorri, D. (2013a). Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death and Differentiation*, 20(3), 396. <https://doi.org/10.1038/CDD.2012.150>
- Ciceroni, C., Bonelli, M., Mastrantoni, E., Niccolini, C., Laurenza, M., Larocca, L. M., Pallini, R., Traficante, A., Spinsanti, P., Ricci-Vitiani, L., Arcella, A., De Maria, R., Nicoletti, F., Battaglia, G., & Melchiorri, D. (2013b). Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death and Differentiation*, 20(3), 396. <https://doi.org/10.1038/CDD.2012.150>
- De Bruin, M. E., Van Der Meer, P. B., Dirven, L., Taphoorn, M. J. B., & Koekkoek, J. A. F. (2021). Efficacy of antiepileptic drugs in glioma patients with epilepsy: A systematic review. In *Neuro-Oncology Practice* (Vol. 8, Issue 5, pp. 501–517). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nop/npab030>
- De Groot, J. F., Ta, J. L., Fuller, G., & Yung, W. K. A. (2005). The Excitatory Amino Acid Transporter-2 Induces Apoptosis and Decreases Glioma Growth In vitro and In vivo. *Cancer Research*, 65(5), 1934–1940. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3626>
- Delgado-López, P. D., & Corrales-García, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. In *Clinical and Translational Oncology* (Vol. 18, Issue 11, pp. 1062–1071). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>
- Dührsen, L., Sauvigny, T., Ricklefs, F. L., Mende, K. C., Schaper, M., Matschke, J., Goebell, E., Westphal, M., & Martens, T. (2019). Seizures as presenting symptom in patients with glioblastoma. *Epilepsia*, 60(1), 149–154. <https://doi.org/10.1111/epi.14615>
- Englot, D. J., Chang, E. F., & Vecht, C. J. (2016). Epilepsy and brain tumors. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 267. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00016-5>
- Fink, K., & Fink, J. (2013). Imaging of brain metastases. *Surgical Neurology International*, 4(SUPPL4). <https://doi.org/10.4103/2152-7806.111298>
- Fordham, A. J., Hacherl, C. C., Patel, N., Jones, K., Myers, B., Abraham, M., & Gendreau, J. (2021). Differentiating glioblastomas from solitary brain metastases: An update on the current literature of advanced imaging modalities. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13122960>
- Gallo, S., Vitacolonna, A., & Crepaldi, T. (2023). NMDA Receptor and Its Emerging Role in Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24032540>
-

- Garrido-Navas, C., de Miguel-Pérez, D., Exposito-Hernandez, J., Bayarri, C., Amezcua, V., Ortigosa, A., Valdivia, J., Guerrero, R., Puche, J. L. G., Lorente, J. A., & Serrano, M. J. (2019). Cooperative and Escaping Mechanisms between Circulating Tumor Cells and Blood Constituents. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS8111382>
- Gittleman, H., Boscia, A., Ostrom, Q. T., Truitt, G., Fritz, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Survivorship in adults with malignant brain and other central nervous system tumor from 2000–2014. *Neuro-Oncology*, 20(Suppl 7), vii6. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOY090>
- Grochans, S., Cybulska, A. M., Simí Nska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). *Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review*. <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>
- Groot, J. F., Piao, Y., Lu, L., Fuller, G. N., & Yung, W. K. A. (2008). Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *Journal of Neuro-Oncology*, 88(2), 121–133. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9552-2>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679–695. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.11.001>
- Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., Swanson, G. T., Swanger, S. A., Greger, I. H., Nakagawa, T., McBain, C. J., Jayaraman, V., Low, C.-M., Dell'Acqua, M. L., Diamond, J. S., Camp, C. R., Perszyk, R. E., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2021). Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 1469–1658. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology*, 150(8), 1081. <https://doi.org/10.1085/JGP.201812032>
- Hansen, K. B., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2007). Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 281–288). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.03.014>
- Hansen, S., Rasmussen, B. K., Laursen, R. J., Kosteljanetz, M., Schultz, H., Nørgård, B. M., Guldborg, R., & Gradel, K. O. (2018). Treatment and survival of glioblastoma patients in Denmark: The Danish Neuro-Oncology Registry 2009–2014. *Journal of Neuro-Oncology*, 139(2), 479–489. <https://doi.org/10.1007/S11060-018-2892-7/TABLES/4>
- Herguedas, B., García-Nafría, J., Cais, O., Fernández-Leiro, R., Krieger, J., Ho, H., & Greger, I. H. (2016). *Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors*. <https://doi.org/10.1126/science.aad3873>
- Hernández-Ochoa, B., Fernández-Rosario, F., Castillo-Rodríguez, R. A., Marhx-Bracho, A., Cárdenas-Rodríguez, N., Martínez-Rosas, V., Morales-Luna, L., González-Valdez, A.,
-

- Calderón-Jaimes, E., Pérez de la Cruz, V., Rivera-Gutiérrez, S., Meza-Toledo, S., Wong-Baeza, C., Baeza-Ramírez, I., & Gómez-Manzo, S. (2021). Validation and selection of new reference genes for rt-qpcr analysis in pediatric glioma of different grades. *Genes*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/genes12091335>
- Hills, K. E., Kostarelos, K., & Wykes, R. C. (2022). Converging Mechanisms of Epileptogenesis and Their Insight in Glioblastoma. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.903115>
- Hull, J., Hindy, M. El, Kehoe, P. G., Chalmers, K., Love, S., & Conway, M. E. (2012). Distribution of the branched chain aminotransferase proteins in the human brain and their role in glutamate regulation. *Journal of Neurochemistry*, *123*(6), 997–1009. <https://doi.org/10.1111/JNC.12044>
- Ishiuchi, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., Kurihara, H., Nakazato, Y., Sasaki, T., & Ozawa, S. (2002). Blockage of Ca²⁺-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nature Medicine* *2002* *8*:9, *8*(9), 971–978. <https://doi.org/10.1038/nm746>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kaneko, S., & Kaneko, S. (2016). Fluorescence-Guided Resection of Malignant Glioma with 5-ALA. *International Journal of Biomedical Imaging*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/6135293>
- Karimpur Zahmatkesh, A., Khalaj-Kondori, M., Hosseinpour Feizi, M. A., & Baradaran, B. (2023). GLUL GENE KNOCKDOWN AND RESTRICTED GLUCOSE LEVEL SHOW SYNERGISTIC INHIBITORY EFFECT ON THE LUMINAL SUBTYPE BREAST CANCER MCF7 CELLS' PROLIFERATION AND METASTASIS. *EXCLI Journal*, *22*, 847–861. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6287>
- Kees, J., Gerritsen, W., Lianne, M., Broekman, D., De Vleeschouwer, S., Schucht, P., Nahed, B. V., Berger, M. S., Jean, A., & Vincent, P. E. (2022). Safe surgery for glioblastoma: Recent advances and modern challenges. *Neuro-Oncology Practice*, *9*(5), 364–379. <https://doi.org/10.1093/NOP/NPAC019>
- Kerkhof, M., Dielemans, J. C. M., Van Breemen, M. S., Zwinkels, H., Walchenbach, R., Taphoorn, M. J., & Vecht, C. J. (2013). Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, *15*(7), 961–967. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not057>
- Kickingreder, P., & Radbruch, A. (2017). MR-Bildgebung bei Gliomen. *Tumor Diagnostik Und Therapie*, *38*(3), 178–184. <https://doi.org/10.1055/S-0043-101200/ID/JR233-52>
-

- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391. <https://doi.org/10.1007/S13353-013-0173-X>
- Lah, T. T., Novak, M., & Breznik, B. (2020). Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 262–273. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.10.010>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.037>
- Lange, F., Gade, R., Einsle, A., Porath, K., Reichart, G., Maletzki, C., Schneider, B., Henker, C., Dubinski, D., Linnebacher, M., Köhling, R., Freiman, T., & Kirschstein, T. (2024). A glutamatergic biomarker panel enables differentiating Grade 4 gliomas/astrocytomas from brain metastases. *Frontiers in Oncology*, 14, 1335401. <https://doi.org/10.3389/FONC.2024.1335401>
- Lange, F., Weßlau, K., Porath, K., Hörschemeyer, J., Bergner, C., Krause, B. J., Mullins, C. S., Linnebacher, M., Köhling, R., & Kirschstein, T. (2019). AMPA receptor antagonist perampanel affects glioblastoma cell growth and glutamate release in vitro. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211644>
- Langer, T. (2022). *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms Leitlinie (Langversion)*.
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L., & Rich, J. N. (2015). *Cancer stem cells in glioblastoma*. <https://doi.org/10.1101/gad.261982>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Le Rhun, Emilie; Preusser, Matthias; Roth, Patrick; Reardon, David A; van Den Bent, Martin; Wen, Patrick; Reifenberger, Guido; Weller, Michael (2019). Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma. Cancer Treatment Reviews, 80:101896., 80, 101896.* <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2019.101896>
- Lee, J. W., Wen, P. Y., Hurwitz, S., Black, P., Kesari, S., Drappatz, J., Golby, A. J., Wells, W. M., Warfield, S. K., Kikinis, R., & Bromfield, E. B. (2010). Morphological characteristics of brain tumors causing seizures. *Archives of Neurology*, 67(3), 336–342. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.2>
- Liang, S., Zhang, J., Zhang, S., & Fu, X. (2016). Epilepsy in adults with supratentorial glioblastoma: Incidence and influence factors and prophylaxis in 184 patients. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158206>
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00817-8>
-

- Lin, W., Wang, C., Liu, G., Bi, C., Wang, X., Zhou, Q., & Jin, H. (2020). SLC7A11/xCT in cancer: biological functions and therapeutic implications. *American Journal of Cancer Research*, 10(10), 3106. /pmc/articles/PMC7642655/
- Liu, E. M., Shi, Z. F., Li, K. K. W., Malta, T. M., Chung, N. Y. F., Chen, H., Chan, J. Y. T., Poon, M. F. M., Kwan, J. S. H., Chan, D. T. M., Noushmehr, H., Mao, Y., & Ng, H. K. (2022). Molecular landscape of IDH -wild type, pTERT -wild type adult glioblastomas. *Brain Pathology*, 32(6). <https://doi.org/10.1111/BPA.13107>
- Liu, T., Sun, L., Zhang, Y., Wang, Y., & Zheng, J. (2022). Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(1). <https://doi.org/10.1002/JBT.22942>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 131, Issue 6, pp. 803–820). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Lynam, L. M., Lyons, M. K., Drazkowski, J. F., Sirven, J. I., Noe, K. H., Zimmerman, R. S., & Wilkens, J. A. (2007). Frequency of seizures in patients with newly diagnosed brain tumors: A retrospective review. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 109(7), 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.05.017>
- Maas, S., Patt, S., Schrey, M., & Rich, A. (2001). *Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.251531398
- Maier, J. P., Ravi, V. M., Kueckelhaus, J., Behringer, S. P., Garrelfs, N., Will, P., Sun, N., von Ehr, J., Goeldner, J. M., Pfeifer, D., Follo, M., Hannibal, L., Walch, A. K., Hofmann, U. G., Beck, J., Heiland, D. H., Schnell, O., & Joseph, K. (2021). Inhibition of metabotropic glutamate receptor III facilitates sensitization to alkylating chemotherapeutics in glioblastoma. *Cell Death & Disease*, 12(8). <https://doi.org/10.1038/S41419-021-03937-9>
- Mao, L. M., Bodepudi, A., Chu, X. P., & Wang, J. Q. (2022). Group I Metabotropic Glutamate Receptors and Interacting Partners: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS23020840>
- Massie, A., Boillée, S., Hewett, S., Knackstedt, L., & Lewerenz, J. (2015). Main path and byways: Non-vesicular glutamate release by system xc- as an important modifier of glutamatergic neurotransmission. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 135, Issue 6, pp. 1062–1079). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13348>
- Mendes, O., Kim, H. T., Lungu, G., & Stoica, G. (2007). MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clinical and Experimental Metastasis*, 24(5), 341–351. <https://doi.org/10.1007/S10585-007-9071-0/FIGURES/8>
-

- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V., & Hamada, J. I. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers 2011, Vol. 3, Pages 3242-3278*, 3(3), 3242–3278. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3033242>
- Nayak, L., Lee, E. Q., & Wen, P. Y. (2012). Epidemiology of brain metastases. *Current Oncology Reports*, 14(1), 48–54. <https://doi.org/10.1007/S11912-011-0203-Y/TABLES/1>
- Neman, J., Termini, J., Wilczynski, S., Vaidehi, N., Choy, C., Kowolik, C. M., Li, H., Hambrecht, A. C., Roberts, E., & Jandial, R. (2014). Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 984–989. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1322098111/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 295. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.011008.145533>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 109, Issue 1, pp. 93–108). <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Olympios, N., Gilard, V., Marguet, F., Clatot, F., Fiore, F. Di, & Fontanilles, M. (2021). TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13051147>
- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncology*, 22(Supplement_1), iv1–iv96. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAA200>
- Ostrom, Q. T., Wright, C. H., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Brain metastases: epidemiology. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 149, pp. 27–42). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811161-1.00002-5>
- Perry, A., & Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 71–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>
- Polewski, M. D., Reveron-Thornton, R. F., Cherryholmes, G. A., Marinov, G. K., & Aboody, K. S. (2017). SLC7A11 Overexpression in Glioblastoma Is Associated with Increased Cancer Stem Cell-Like Properties. *Stem Cells and Development*, 26(17), 1236. <https://doi.org/10.1089/SCD.2017.0123>
- Puchalski, R. B., Shah, N., Miller, J., Dalley, R., Nomura, S. R., Yoon, J. G., Smith, K. A., Lankerovich, M., Bertagnolli, D., Bickley, K., Boe, A. F., Brouner, K., Butler, S., Caldejon, S., Chapin, M., Datta, S., Dee, N., Desta, T., Dolbeare, T., ... Foltz, G. D. (2018). An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma. *Science*, 360(6389), 660–663. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2666>
-

- Rao, P., Yallapu, M. M., Sari, Y., Fisher, P. B., & Kumar, S. (2015). Designing Novel Nanoformulations Targeting Glutamate Transporter Excitatory Amino Acid Transporter 2: Implications in Treating Drug Addiction. *Journal of Personalized Nanomedicine*, 1(1), 3. [/pmc/articles/PMC4666545/](https://doi.org/10.1007/s11523-010-0153-6)
- Ren, Z., Liu, J., Yao, L., Li, J., Qi, Z., & Li, B. (2020). Glutamate receptor ionotropic, kainate 1 serves as a novel tumor suppressor of colorectal carcinoma and predicts clinical prognosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 1–1. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.9296>
- Riemenschneider, M. J., Hegi, M. E., & Reifenberger, G. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas. In *Targeted Oncology* (Vol. 5, Issue 3, pp. 161–165). <https://doi.org/10.1007/s11523-010-0153-6>
- Robert, S. M., & Sontheimer, H. (2014). Glutamate Transporters in the Biology of Malignant Gliomas. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(10), 1839. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1521-Z>
- Rosati, A., Marconi, S., Pollo, B., Tomassini, A., Lovato, L., Maderna, E., Maier, K., Schwartz, A., Rizzuto, N., Padovani, A., & Bonetti, B. (2009). Epilepsy in glioblastoma multiforme: Correlation with glutamine synthetase levels. *Journal of Neuro-Oncology*, 93(3), 319–324. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9794-z>
- Rosati, A., Poliani, P. L., Todeschini, A., Cominelli, M., Medicina, D., Cenzato, M., Simoncini, E. L., Magrini, S. M., Buglione, M., Grisanti, S., & Padovani, A. (2013). Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 15(5), 618. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOS338>
- Roslin, M., Henriksson, R., Bergström, P., Ungerstedt, U., & Bergenheim, A. T. (2003). Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. *Journal of Neuro-Oncology*, 61(2), 151–160. <https://doi.org/10.1023/A:1022106910017/METRICS>
- Rossi, J., Cavallieri, F., Biagini, G., Rizzi, R., Russo, M., Cozzi, S., Giaccherini, L., Pisanello, A., & Valzania, F. (2022). Epileptogenesis and Tumorigenesis in Glioblastoma: Which Relationship? *Medicina*, 58(10). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA58101349>
- Sareen, H., Ma, Y., Becker, T. M., Roberts, T. L., de Souza, P., & Powter, B. (2022). Molecular Biomarkers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23168835>
- Sasmita, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 14(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/AJCO.12756>
-

- Schmieder, K., Keilholz, U., & Combs, S. (2016). Interdisziplinäre Therapie von Hirnmetastasen. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(24), 415–421. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2016.0415>
- Schulz, M., Salamero-Boix, A., Niesel, K., Alekseeva, T., & Sevenich, L. (2019). Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Therapeutic Response in Brain Metastasis. *Frontiers in Immunology*, 10, 1713. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01713>
- Scott, J. G., Bauchet, L., Fraum, T. J., Nayak, L., Cooper, A. R., Chao, S. T., Suh, J. H., Vogelbaum, M. A., Peereboom, D. M., Zouaoui, S., Mathieu-Daudé, H., Fabbro-Peray, P., Rigau, V., Taillandier, L., Abrey, L. E., Deangelis, L. M., Shih, J. H., & Iwamoto, F. M. (2012). Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. *Cancer*, 118(22), 5595–5600. <https://doi.org/10.1002/cncr.27570>
- Senhaji, N., Houssaini, A. S., Lamrabet, S., Louati, S., & Bennis, S. (2022). Molecular and Circulating Biomarkers in Patients with Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/IJMS23137474>
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004 432:7015, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Stefani Leivas Pereira, M., Klamt, F., Cássia Thomé, C., Valdeci Worm, P., & Losch de Oliveira, D. (2017). *Metabotropic glutamate receptors as a new therapeutic target for malignant gliomas* (Vol. 8, Issue 13). www.impactjournals.com/oncotarget
- Stapp, H., & Stummer, W. (2018). 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers in Surgery and Medicine*, 50(5), 399–419. <https://doi.org/10.1002/LSM.22933>
- Stepulak, A., Luksch, H., Gebhardt, C., Uckermann, O., Marzahn, J., Sifringer, M., Rzeski, W., Staufner, C., Brocke, K. S., Turski, L., & Ikonomidou, C. (2009). Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochemistry and Cell Biology*, 132(4), 435–445. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0613-1>
- Stichel, D., Ebrahimi, A., Reuss, D., Schrimpf, D., Ono, T., Shirahata, M., Reifenberger, G., Weller, M., Hänggi, D., Wick, W., Herold-Mende, C., Westphal, M., Brandner, S., Pfister, S. M., Capper, D., Sahm, F., & von Deimling, A. (2018). Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 793–803. <https://doi.org/10.1007/S00401-018-1905-0/TABLES/2>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C.,
-

- Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. https://doi.org/10.1056/NEJMOA043330/SUPPL_FILE/987SA1.PDF
- Suh, E. H., Hackett, E. P., Wynn, R. M., Chuang, D. T., Zhang, B., Luo, W., Sherry, A. D., & Park, J. M. (2019). In vivo assessment of increased oxidation of branched-chain amino acids in glioblastoma. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37390-0>
- Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S. U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., Miletic, H., Sakariassen, P. Ø., Weinstock, A., Wagner, A., Lindsay, S. L., Hock, A. K., Barnett, S. C., Ruppin, E., Harald Mørkve, S., Lund-Johansen, M., Chalmers, A. J., Bjerkvig, R., Niclou, S. P., & Gottlieb, E. (2015). Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nature Cell Biology*, 17(12), 1556–1568. <https://doi.org/10.1038/ncb3272>
- Tong, E., McCullagh, K. L., & Iv, M. (2020). Advanced Imaging of Brain Metastases: From Augmenting Visualization and Improving Diagnosis to Evaluating Treatment Response. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00270>
- Tönjes, M., Barbus, S., Park, Y. J., Wang, W., Schlotter, M., Lindroth, A. M., Pleier, S. V, Bai, A. H. C., Karra, D., Piro, R. M., Felsberg, J., Addington, A., Lemke, D., Weibrecht, I., Hovestadt, V., Rolli, C. G., Campos, B., Turcan, S., Sturm, D., ... Radlwimmer, B. (2013). *BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1*. <https://doi.org/10.1038/nm.3217>
- Tsuji, S., Nakamura, S., Shoda, K., Yamada, T., Shimazawa, M., Nakayama, N., Iwama, T., & Hara, H. (2022). NMDA receptor signaling induces the chemoresistance of temozolomide via upregulation of MGMT expression in glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 160(2), 375–388. <https://doi.org/10.1007/S11060-022-04154-W/FIGURES/5>
- Unal, I. (2017). Defining an optimal cut-point value in ROC analysis: An alternative approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3762651>
- Valente, V., Teixeira, S. A., Neder, L., Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K. N., Scrideli, C. A., Paço-Larson, M. L., & Carlotti, C. G. (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-17>
- van Vuurden, D. G., Yazdani, M., Bosma, I., Broekhuizen, A. J. F., Postma, T. J., Heimans, J. J., van der Valk, P., Aronica, E., Tannous, B. A., Würdinger, T., Kaspers, G. J. L., &
-

- Cloos, J. (2009). Attenuated AMPA receptor expression allows glioblastoma cell survival in glutamate-rich environment. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005953>
- Wang, J., Wang, W., Zhu, F., & Duan, Q. (2022). The role of branched chain amino acids metabolic disorders in tumorigenesis and progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113390. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113390>
- Weller, M., Knobbe-Thomsen, C. B., Le Rhun, E., & Reifenberger, G. (2022). The WHO classification of tumors of the central nervous system 2021: Changes in the diagnostics of diffuse gliomas and implications for clinical practice. In *Onkologie* (Vol. 28, Issue 2, pp. 155–163). Springer Medizin. <https://doi.org/10.1007/s00761-021-01083-7>
- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., ... Wick, W. (2020a). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020 18:3, 18(3), 170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>
- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., ... Wick, W. (2020b). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020 18:3, 18(3), 170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>
- Wick, W. (2021). *Gliome Entwicklungsstufe: S2k Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. www.awmf.org
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handbook of Clinical Neurology*, 134, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Wirsching, H. G., Silginer, M., Ventura, E., Macnair, W., Burghardt, I., Claassen, M., Gatti, S., Wichmann, J., Riemer, C., Schneider, H., & Weller, M. (2021). Negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 3 target the stem-like phenotype of glioblastoma. *Molecular Therapy Oncolytics*, 20, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.12.009>
- Yi, H., Talmon, G., & Wang, J. (2020). Glutamate in cancers: from metabolism to signaling. *Journal of Biomedical Research*, 34(4), 260. <https://doi.org/10.7555/JBR.34.20190037>
- Yi, L., Fan, X., Li, J., Yuan, F., Zhao, J., Nistér, M., & Yang, X. (2021). Enrichment of branched chain amino acid transaminase 1 correlates with multiple biological processes and contributes to poor survival of IDH1 wild-type gliomas. *Aging (Albany NY)*, 13(3), 3645. <https://doi.org/10.18632/AGING.202328>
-

- Yuen, T. I., Morokoff, A. P., Bjorksten, A., D'Abaco, G., Paradiso, L., Finch, S., Wong, D., Reid, C. A., Powell, K. L., Drummond, K. J., Rosenthal, M. A., Kaye, A. H., & O'Brien, T. J. (2012). Glutamate is associated with a higher risk of seizures in patients with gliomas. *Neurology*, *79*(9), 883–889. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E318266FA89>
- Zhang, C., Yuan, X. R., Li, H. Y., Zhao, Z. J., Liao, Y. W., Wang, X. Y., Su, J., Sang, S. S., & Liu, Q. (2015). Anti-cancer effect of metabotropic glutamate receptor 1 inhibition in human glioma U87 Cells: Involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *35*(2), 419–432. <https://doi.org/10.1159/000369707>

VIII. THESEN

1. Glioblastome sind die häufigsten primären ZNS-Neoplasien, ZNS-Metastasen sind die häufigsten malignen Erkrankungen des ZNS.
2. Bis dato werden nur wenige Biomarker in der Diagnostik und Behandlung des Glioblastoms genutzt. Ein Beispiel für einen routinemäßig genutzten Biomarker in der Behandlung des Glioblastoms ist MGMT.
3. Molekularbiologische Biomarker für die Diagnostik von ZNS-Malignomen sind noch nicht weit in der klinischen Diagnostik verbreitet. Erste Biomarker nach der neuen WHO-Klassifikation werden in der Diagnostik von primären ZNS-Malignomen eingesetzt.
4. Die RT-qPCR ist ein etabliertes Verfahren, um die Expression von Genen der Glutathomöostase und von Glutamatrezeptoren effektiv nachzuweisen.
5. ZNS-Metastasen können ebenfalls Veränderungen in der Expression glutamaterger Gene aufweisen, diese unterscheiden sich je nach der primären Tumorlokalisation.
6. Die Gene der AMPA-Untereinheiten *GRIA1*, *GRIA2*, der Kainat-Untereinheit *GRIK1*, des metabotropen Glutamatrezeptors *GRM3*, der Verzweigtkettigenaminotransferase *BCAT1* und der Glutaminsynthetase *GLUL* eignen sich als Biomarker zur Unterscheidung zwischen den Tumorentitäten Glioblastom und ZNS-Metastasen.
7. Beim untersuchten Studienkollektiv konnten insgesamt 87,5% der Expressionsergebnisse, der potenziellen Biomarker, richtig Glioblastomen oder ZNS-Metastasen zugeordnet werden.
8. Ein Altersunterschied konnte zwischen der Gruppe der Glioblastompatienten mit und ohne Epilepsie festgestellt werden, Patienten mit Epilepsie waren im Median jünger (52 Jahre) als Patienten ohne Epilepsie (72 Jahre).
9. In den Ergebnissen dieser Arbeit wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Gene zwischen Glioblastom-Patienten mit und ohne Epilepsie festgestellt.
10. Beide in der Studie verwendeten Housekeeping Gene GAPDH und TBP zeigten eine hohe Korrelation. Eine für TBP durchgeführte Auswertung zeigte nur geringe Unterschiede, lediglich für das Gen *GRIK4* konnte in der ROC-Analyse eine $AUC > 0,8$ gefunden werden. Ein Biomarkerpanel auf Grundlage von TBP würde insgesamt sieben Gene umfassen.
11. Zukünftig könnten molekularbiologische Biomarker in der Diagnostik und Abgrenzung verschiedener ZNS-Malignome genutzt werden.

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die auf unterschiedlichen Wegen zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst gebührt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Timo Kirschstein für die Vergabe des Themas und für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Mit hilfreichen Ideen und konstruktiver Kritik hat er mich durch diese gesamte Zeit begleitet.

Meinem Betreuer Dr. Falko Lange danke ich außerordentlich für seine umfassende Unterstützung. Mit seinem großen Engagement, seinen hilfreichen Anmerkungen und vor allem seinen schnellen Antworten auf meine Fragen half er mir sehr bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Katrin Porath und Frau Anne Einsle. Sie brachten mir die Grundlagen der Laborarbeit bei und begleiteten mit ihren großen Erfahrungen meine experimentellen Versuche. Ihre Hilfsbereitschaft und ihre umfassende kompetente Betreuung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit haben mir die Promotionsarbeit sehr erleichtert.

Natürlich gilt auch mein Dank dem gesamten Team des Oscar Langendorff Instituts für Physiologie. Ohne diese wäre meine Forschung nicht möglich gewesen.

Ich durfte eine wunderbare Zusammenarbeit erfahren, und es war für mich eine schöne unvergessliche Zeit.

Meiner Familie möchte ich einen tiefen Dank aussprechen, die mich während meines Studiums und während der Arbeit an dieser Dissertation mit sehr großer Geduld, mit Liebe, Verständnis und Ermutigung unterstützt hat.

X. LEBENS LAUF

XI. EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)