



**Universitätsmedizin
Rostock**

Aus dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Professor Dr. rer. nat. M. Kipp

Kanzerogene Einflüsse auf die alternierende Expression der plasticity-related genes im Gliom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

am Institut für Anatomie

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Saskia Wernsdorf-Scheel

geb. Wernsdorf

aus Berlin

Rostock, 2025

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. medic. Anja Bräuer,
Department für Humanmedizin,
Fakultät VI Medizin und Gesundheitswissenschaften,
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

2. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher,
Arbeitsbereich der Molekularen Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie,
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Mirko H.H. Schmidt,
Institut für Anatomie,
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus,
Technische Universität Dresden

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

Widmung

Diese Arbeit widme ich meinen geliebten Eltern und meinem wundervollen Ehemann, die mich während dieses langen Weges unerschütterlich unterstützt und mit ihren Ermutigungen, ihrer Geduld und Liebe diese Dissertation möglich gemacht haben.

Zusammenfassung

Als häufigste primär maligne Hirntumore gelten die aggressiv und diffus infiltrierend wachsenden Glioblastome. Die begrenzte mediane Überlebenszeit von 15 Monaten nach einer aggressiven multimodalen Therapie rückt die dringliche Suche nach neuen molekulargenetischen Therapieansätzen für Glioblastompatienten in den Fokus der aktuellen Forschung. Ziel neuer therapeutischer Behandlungsstrategien sind aufgrund des hohen Bedarfs an Lipiden für das Tumorstadium, Ansatzpunkte im Lipidmetabolismus, speziell dem Phospholipidmetabolismus. Eine wesentliche Rolle können die membranständigen Proteine Plasticity-related Genes mit ihren kanzerogenen Expressionsmustern spielen. Für die Durchführung der translationalen Grundlagenforschung zur Erfassung der alternierenden Expression der plasticity-related genes (*PRG/Prg*) des Glioms galt es, eine umfassende Analyse von humanem Gewebe sowie den präklinischen Modellen der humanen HROG-Zelllinien und dem Fischer-F98-Gliom-Modell der Ratte durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der quantitativen Real Time-Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression zu charakterisieren. Eine Besonderheit bestand in der erstmaligen Erfassung der Genexpression der fünf *PRGs* im humanen Glioblastom. Analysen der humanen HROG-Zelllinien hatten die Absicht, die humanen *in vivo*-Daten zu stützen, Hinweise auf spezifische Koexpressionsmuster der *PRGs* zu ermitteln und ihren Einfluss auf morphologische Veränderungen der Zellen zu prüfen. Schlussendlich galt es, die Adaptation der implementierten F98-Gliomzellen im Organismus der Ratte darzustellen. Die Resultate zeigen deutlich, dass die malignen Prozesse des Glioblastoms die Expression der *PRGs/Prgs* signifikant regulieren, aber ebenfalls interne und externe Faktoren die Genexpression maßgeblich bestimmen. Dabei konnten erste Hinweise für geschlechtsspezifische Tendenzen einer geringeren *PRG2*-Expression im weiblichen Organismus des Menschen festgestellt werden. Erstmals konnte der unmethylierte O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promoter im humanen Glioblastom mit einer Hochregulation der *PRG1*- und Reduktion der *PRG2*-Genexpression in Verbindung gebracht werden. Einen zentralen Dreh- und Angelpunkt dieser Arbeit nehmen *PRG3* und *PRG5* ein. Sie scheinen beim Glioblastom im Vergleich zu nicht maligne verändertem Kontrollgewebe reguliert zu sein, wobei eine zusätzliche Assoziation mit dem Rezidiv-Glioblastom hergestellt werden konnte. Während bei Glioblastompatienten im jüngeren Alter *PRG3* dominiert, gewinnt im höheren Alter *PRG5* an Relevanz. Zusätzlich führt die zeitgleiche Koexpression beider *PRGs* zu einer höheren mRNA-Expression des jeweils anderen *PRG* und kann strukturelle Umwandlungsprozesse der Gliomzelle hervorrufen. Darüber hinaus resultiert die Implantation der Tumorzellen in einem lebenden Organismus in einer Hochregulation der Gene *in vivo* und es ergeben sich Hinweise auf eine generelle Herunterregulation der *Prgs* im Gliom. Die vorliegenden Ergebnisse liefern wichtige Einblicke in die Grundlagenforschung der Glioblastompatienten und in die präklinischen Modelle des Glioblastoms. Das bevorzugte Auftreten des Glioblastoms in der männlichen Bevölkerung und das Wissen um geschlechtsspezifische Expressionsmuster von Genen im Gehirn rücken die Untersuchung einer geschlechtsabhängigen Genexpression zunehmend in den Vordergrund. Die nachgewiesene geschlechtsspezifische Expression kann durch eine Interaktion der *PRGs* mit Sexualhormonen begründet werden, in dem Zytoskelett-

proteine, die zur Plastizität des Gehirns beitragen, durch Sexualhormone reguliert werden. Für zukünftige individuelle Therapiestrategien können veränderte Genexpressionsmuster in Abhängigkeit von der Methylierung des MGMT-Promoters wichtige Ansatzpunkte bei Therapieversagen darstellen, da der methylierte MGMT-Promoter ein höheres Ansprechen gegenüber alkylierenden Chemotherapien wie Temozolomid ermöglicht. Ähnlich den dargestellten altersabhängigen *PRG*-Expressionsmustern im Glioblastom, weisen Tiermodelle auf einen Wechsel der Expression von vermehrt *Prg3* in frühen zu *Prg5* in späten Entwicklungsphasen hin. Neben molekulargenetischen Ansatzpunkten spielen morphologische Veränderungen eine relevante Rolle in der Ausbildung von Medikamentenresistenzen des Glioblastoms. An dieser Stelle wurden phänotypische Modifikationen der Tumorzellen in Abhängigkeit der *PRG3*- und *PRG5*-Expression beobachtet, die zu der Frage führen, ob ein schlechteres Ansprechen auf Temozolomid durch die reduzierte *PRG3*- und *PRG5*-Expression und durch morphologische Zellveränderungen bei unmethyliertem MGMT-Promoter-Status begründet werden kann. Diese Überlegung konnte noch nicht bestätigt werden. Dennoch zeigen sich bei fehlender Detektion von *PRG3* und *PRG5* morphologische Veränderungen, die der typischen Zellstruktur chemotherapieresistenter Glioblastomzellen entsprechen. Dies könnte ein Hinweis für die vermehrte Tendenz zur Reduktion von *PRG3* und *PRG5* beim Rezidiv-Glioblastom sein. Ziel präklinischer Modelle von Tumorerkrankungen ist die realitätsgetreue Abbildung humaner Tumorverhältnisse. Obgleich der hohen Übereinstimmungen des Fischer-F98-Glioms mit dem humanen Glioblastom spiegelt die Anwendung präklinischer Modelle zur translationalen Forschung nur begrenzt die Komplexität und die Breite der genetischen Variabilität, umweltbedingte und weitere Einflussfaktoren auf den Menschen wider. Während präklinische Tiermodelle in der translationalen Forschung einen hohen Stellenwert einnehmen, konnte diese Arbeit aufgrund der nachgewiesenen molekulargenetischen Unterschiede, fehlender histopathologischer Untersuchungen und des geringen Kenntnisstands über externe und interne Einflussfaktoren, durch die präklinischen Modelle keine klare Voraussage für humangenetische Expressionsmuster der *PRGs* und ihre Auswirkung auf den menschlichen Organismus ableiten. Sollten sich die Aussagen dieser Arbeit in weiteren Studien bestätigen, können präklinische Modelle optimiert und neue Therapiestrategien entwickelt werden.

III. Inhaltsverzeichnis

Widmung	III
Zusammenfassung	IV
III. Inhaltsverzeichnis	VI
IV. Abbildungsverzeichnis	X
V. Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. Diffuse Gliome	1
1.1.1. Glioblastom	1
1.1.2. Epidemiologie	1
1.1.3. Ätiologie	2
1.1.4. Molekulare Pathogenese	2
1.1.5. Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation	2
1.1.6. Lokalisation	3
1.1.7. Klinik	4
1.1.8. Diagnostik	4
1.1.9. Therapie	4
1.1.10. Prognose, Einflussfaktoren und Progress	5
1.2. Lipid-Phosphat-Phosphatase	6
1.2.1. Tumorprogression durch Lipid-Phosphat-Phosphatasen	7
1.3. Plasticity-related Genes	9
1.3.1. Ein Überblick	9
1.3.2. Organexpression	10
1.3.3. Neuronale Lokalisation der Plasticity-related Genes	11
1.3.4. Neuronale Plastizität – Interaktionen der Neurone und Gliomzellen	12
1.3.5. Regenerative Prozesse nach Läsionen	14
1.3.6. Epilepsie	15
1.3.7. Tumore	15
2. Thesen	17
3. Material und Methoden	19
3.1. Materialien	19
3.1.1. Gewebe und Zelllinien	20
3.1.1.1. Humane Gewebeproben	20
3.1.1.2. HROG – Humane Tumorzelllinien	20
3.1.1.3. Tiermodelle: Fischer-F98-Gliom-Modell und Wistar-Ratte	20
3.1.2. PCR-Primer	21

Inhaltsverzeichnis

3.1.3.	TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR.....	22
3.1.4.	Kits und Assays.....	22
3.1.5.	Geräte	23
3.1.6.	Software und Datenbanken.....	24
3.1.7.	Glossar der regelmäßig verwendeten Einweg- und Mehrwegmaterialien.....	24
3.1.8.	Glossar der angewandten Verbrauchskemikalien.....	25
3.2.	Methoden	26
3.2.1.	Prozess der Bereitstellung der zu untersuchenden Gewebe und Zellpellets.....	26
3.2.1.1.	Gewinnung von humanem Glioblastomgewebe und humanem Kontrollgewebe	26
3.2.1.2.	Generierung von Zellpellets der HROG-Zelllinie	26
3.2.1.3.	Methoden-Etablierung für das Rattenmodell.....	27
3.2.1.4.	Stereotaktische Etablierung des Fischer-F98-Gliom-Modells	27
3.2.2.	Molekularbiologische Gewebeaufarbeitung	28
3.2.2.1.	RNA-Isolation mit Bestimmung der Konzentration und Reinheit.....	28
3.2.2.2.	gDNA-Isolation	29
3.2.2.3.	cDNA-Synthese.....	30
3.2.2.4.	PCR und Gelelektrophorese	30
3.2.2.5.	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	31
3.2.2.6.	Datenauswertung und Statistik	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Messung der <i>PRG</i> -/ <i>Prg</i> -Expression.....	36
4.2.	Patientencharakteristika humaner Gewebe und Zelllinien	37
4.3.	<i>PRG</i> -Expression im humanen Glioblastom <i>in vivo</i>	38
4.3.1.	Signifikate veränderte <i>PRG</i> -Expressionsmuster bei Glioblastompatienten	38
4.3.2.	Altersspezifische <i>PRG</i> -Expressionssignale im Glioblastom	39
4.3.3.	<i>PRG2</i> -Expression im weiblichen Organismus	41
4.3.4.	Regulation der <i>PRG</i> -Expression durch die Methylierung des <i>MGMT</i> -Promoters beim Glioblastom	43
4.3.4.1.	Bestätigen sich die humanen <i>in vivo</i> <i>PRG</i> -Expressionsmuster in Abhängigkeit des Methylierungsstatus des <i>MGMT</i> -Promoters <i>in vitro</i> ?	44
4.3.4.2.	Kein Überlebensvorteil durch die Methylierung des <i>MGMT</i> -Promoters beim Glioblastom der HROG-Zelllinienkohorte	45
4.4.	Expressionsmuster der <i>PRGs</i> in humanen Gliom-Zelllinien	46
4.4.1.	<i>PRG</i> -Koexpression in Abhängigkeit der <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Detektion beim Glioblastom und Rezidiv-Glioblastom <i>in vitro</i>	46
4.4.1.1.	Besonderheiten entsprechend der <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -mRNA-Detektion am Beispiel der HROG06- und HROG15-Zelllinie	48
4.4.2.	Reduzierte <i>PRG5</i> -Level im Rezidiv-Glioblastom bei HROG-Zelllinien	50

Inhaltsverzeichnis

4.5. Präklinisches Tiermodell zur Identifizierung der Modifikation der <i>Prg</i> -Expression durch Implantation der F98-Gliomzellen <i>in vivo</i>	52
4.5.1. Validierung der TaqMan® Gene Expression Assays im Fischer-F98-Gliom-Modell.....	52
4.5.2. Evaluierung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell	52
4.5.3. Expression der <i>Prgs</i> im Fischer-F98-Gliom-Modell	53
5. Diskussion.....	55
5.1. Ermöglichen präklinische Modelle eine Voraussage humaner <i>PRG</i> -Expressionsmuster?... 55	
5.2. Limitierende Einflussfaktoren der Expressionsanalysen.....	58
5.2.1. Beeinflusst die Handhabung der Proben und die Durchführung der Experimente die Resultate?	58
5.2.2. Regulation einzelner Referenzgene	60
5.2.3. Limitationen der Datenanalyse für die Auswertung der qPCR-Ergebnisse.....	62
5.3. Genexpression der <i>PRGs</i> im humanen Glioblastom	63
5.3.1. Molekulargenetische Besonderheiten humaner Glioblastompatienten	63
5.3.2. <i>PRG1</i> , <i>PRG2</i> und <i>PRG3</i> im Mittelpunkt altersspezifischer Expressionsunterschiede..	64
5.3.3. Geschlechtsspezifische <i>PRG2</i> -Expression des weiblichen Organismus.....	65
5.3.4. Therapieresistenz des Glioblastoms – Wechselwirkungen zwischen dem Methylierungsstatus des <i>MGMT</i> -Promoters und dem Sphingolipidmetabolismus.....	66
5.3.5. Koexpressionsmuster in Abhängigkeit von der <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Expression im Glioblastom	68
5.3.6. <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Deregulation beim Rezidiv-Glioblastom	69
5.4. Fischer-F98-Gliom-Modell.....	70
5.4.1. Validierung der kontralateralen Hemisphäre als Kontrollgruppe.....	70
5.4.2. Ist das Fischer-F98-Gliom-Modell trotz Wechselwirkungen mit internen und externen Stimuli ein optimales präklinisches Modell, um die <i>Prg</i> -Expression im Gliom veranschaulichen zu können?.....	71
5.5. Ausblick.....	73
6. Appendix	XIII
6.1. Patientencharakteristika	XIII
6.2. Individuelle Patienteninformationen der humanen Tumorproben	XIV
6.3. Individuelle Patienteninformationen der humanen Kontrollproben.....	XIV
6.4. Patienteninformationen der HROG-Zelllinien und Einteilung entsprechend ihrer <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Expressionsmuster.....	XV
6.5. Informationen zu den F98-Zelllinien und den Geweben des Fischer-F98-Gliom-Modells ..	XIX
6.6. Etablierung des humanen <i>ACTB</i> -Primers	XX
6.7. Etablierung des <i>Actb</i> -Primers für das Fischer-F98-Gliom-Modell.....	XXI
6.8. Etablierung des neuen <i>Prg3</i> TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR.....	XXII
6.9. Ergänzende statistische Analysen mit grafischer Darstellung	XXIII
6.9.1. Signifikante Veränderungen der <i>PRG</i> -Expressionsmuster bei Glioblastom- und Kontrollpatienten aller Altersgruppen	XXIII

Inhaltsverzeichnis

6.9.2.	Fehlende signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen jungen und alten Glioblastopatienten	XXIII
6.9.3.	Fehlende <i>PRG</i> -Regulation bei zunehmender Passage der HROG-Zelllinien	XXIII
6.9.4.	Darstellung aller analysierten Gruppen zur Beurteilung des Fischer-F98-Gliom-Modells	XXV
6.10.	Verwendete Proben-Identifikation der Diagramme	XXVI
6.11.	Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese.....	XXVII
6.12.	Darstellung der verwendeten Rohdaten.....	XXXIII
6.12.1.	Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA in humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>	XXXIII
6.12.2.	Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>	XXXIV
6.12.3.	Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen <i>PRG</i> -Expression mit Darstellung der einzelnen C_T -Werte humaner Proben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>	XXXV
6.12.4.	Durchschnittliche relative <i>PRG</i> -Expression entsprechend den Abbildungen der humanen Proben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>	XXXVII
6.12.5.	Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der humanen Zelllinien.....	XXXIX
6.12.6.	Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der humanen Zelllinien.....	XL
6.12.7.	Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen <i>PRG</i> -Expression mit Darstellung der einzelnen C_T -Werte humaner Zelllinien	XLII
6.12.8.	Durchschnittliche relative <i>PRG</i> -Expression der einzelnen Gruppen der Abbildungen der humanen Zelllinien	XLVI
6.12.9.	Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells	XLVIII
6.12.10.	Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der F98-Gliomzellen und des Gewebes der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells	XLIX
6.12.11.	Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen <i>Prg</i> -Expression mit Darstellung der einzelnen C_T -Werte der F98-Gliomzellen und der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells	L
6.12.12.	Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression der einzelnen Gruppen der Abbildungen der F98-Gliomzellen und der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells	LVII
VI.	Abkürzungsverzeichnis.....	LIX
VII.	Literaturverzeichnis	LX
VIII.	Eidesstattliche Erklärung	LXXII
IX.	Lebenslauf	LXXIII
X.	Danksagung	LXXV

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des LPA-Metabolismus.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Neurons.	12
Abbildung 3: Verwendete Gliom-Modelle dieser Arbeit.....	21
Abbildung 4: Mikroskopische Betrachtung der F98-Zelllinien.	27
Abbildung 5: Stereotaktische Implantation der F98-Gliomzellen in die Fischer Ratte.	27
Abbildung 6: Digitale Darstellung der humanen gDNA nach der Gelelektrophorese.....	29
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung einer Gelelektrophorese mit Gegenüberstellung des HyperLadder™ 1Kb.....	31
Abbildung 8: Effizienztestung der TaqMan® Gene Expression Assay.	32
Abbildung 9: Prozesse der Quantifizierung der mRNA während der qRT-PCR.....	33
Abbildung 10: Bestimmung der C _T -Werte.	34
Abbildung 11: Relative <i>PRG</i> -mRNA-Expression der Glioblastom- und Kontrollkohorte bei Patienten ≥ 18 Jahre.	39
Abbildung 12: Altersabhängige <i>PRG</i> -Expression im Glioblastom.....	41
Abbildung 13: Relative <i>PRG</i> -mRNA-Expression im Glioblastom entsprechend des biologischen Geschlechts.....	43
Abbildung 14: Humane <i>PRG</i> -Expressionsmuster entsprechend dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters.....	44
Abbildung 15: <i>PRG</i> -Expressionsmuster der Patienten mit methylierten und unmethyliertem MGMT-Promoter der HROG-Zelllinien.....	45
Abbildung 16: Kein signifikanter Einfluss der Methylierung des MGMT-Promoters auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.....	46
Abbildung 17: Darstellung der <i>PRG</i> -Expression der HROG-Zelllinien entsprechend der Detektion der <i>PRG3</i> -und <i>PRG5</i> -mRNA.	48
Abbildung 18: Einfluss der Konfluenz der Zellen und des für die Kultivierung verwendeten Nährmediums auf die <i>PRG</i> -Expression.	50
Abbildung 19: Mikroskopische Abbildung der HROG-Zelllinien in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen sowie dem für die Kultivierung verwendeten Nährmedium.	50
Abbildung 20: <i>PRG</i> -mRNA-Expression im humanen <i>In-vitro</i> -Modell mit erstmaligem Glioblastom-Nachweis und mit Rezidiv-Glioblastom.....	51
Abbildung 21: Validierung der TaqMan® Gene Expression Assays für das Fischer-F98-Gliom-Modell.....	52
Abbildung 22: Bestimmung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell.	53
Abbildung 23: <i>Prg</i> -Expression im Fischer-F98-Gliom-Modell.	55
Abbildung 24: Digitale Abbildung der Gelelektrophorese der gDNA.....	59
Abbildung 25: Sphingolipidmetabolismus von Ceramid.	66
Abbildung 26: Nukleotidsequenzen der humanen und der Maus-mRNA des <i>ACTB</i> -/ <i>Actb</i> -Gens.	XX
Abbildung 27: Gelelektrophorese unter Anwendung des nicht erfolgreichen humanen <i>ACTB</i> -Primers.....	XX

Abbildung 28: Darstellung des Maus- <i>Actb</i> -forward-Primers auf der Maus-mRNA- <i>Actb</i> -Referenzsequenz auf Chromosom 5.....	XXI
Abbildung 29: Darstellung des Maus- <i>Actb</i> -forward-Primers auf der Ratten-mRNA- <i>Actb</i> -Referenzsequenz auf Chromosom 7.....	XXII
Abbildung 30: Relative <i>PRG</i> -mRNA-Expression der Glioblastom- und Kontrollkohorte aller Altersgruppen.....	XXIII
Abbildung 31: Nicht signifikante Unterschiede der <i>PRG</i> -Expression bei jungen und alten Glioblastompatienten.....	XXIII
Abbildung 32: Relative <i>PRG</i> -mRNA-Expression dargestellt entsprechend der Passage der HROG-Zelllinien.....	XXIV
Abbildung 33: Relative <i>Prg</i> -mRNA-Expression des Fischer-F98-Gliom-Modells.....	XXVI

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu den fünf PRGs.....	10
Tabelle 2: Eingesetzte DNA-Oligonukleotide als Primer der PCR.....	22
Tabelle 3: Angewandte TaqMan® Gene Expression Assays in der qRT-PCR.....	22
Tabelle 4: Kits und Assays dieser Arbeit.....	23
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte und ihre Hersteller.....	24
Tabelle 6: Verwendete Software von Geräten, online Software und Datenbanken.....	24
Tabelle 7: Nennung der regelmäßig verwendeten Ein- und Mehrwegmaterialien.....	25
Tabelle 8: Listung der angewandten Verbrauchskemikalien mit der Einordnung ihrer methodischen Verwendung.....	25
Tabelle 9: Mastermix-Reaktionsansätze für das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.....	30
Tabelle 10: Programmierte Reaktionsschritte des PCR-Programms.....	30
Tabelle 11: Reaktionsschritte zur Amplifikation der cDNA-Produkte.....	34
Tabelle 12: Humane Patientencharakteristika der Glioblastom- und Kontrollkohorte.....	39
Tabelle 13: Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Alters der Glioblastompatienten.....	40
Tabelle 14: Geschlechtsabhängige Altersverteilung im Glioblastom.....	42
Tabelle 15: Humane Patientencharakteristika abhängig von dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters.....	44
Tabelle 16: Patientencharakteristika der HROG-Zelllinien entsprechend der Methylierung des MGMT-Promoters.....	45
Tabelle 17: Patientencharakteristika des humanen <i>In-vitro</i> -Modells zur Evaluierung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der vorliegenden Methylierung des MGMT-Promoters.....	46
Tabelle 18: Gruppencharakteristika der HROG-Zellen entsprechend ihren <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Expressionsmustern.....	47
Tabelle 19: Patientencharakteristika gruppiert nach erstmaligem Glioblastom-Nachweis und Rezidiv-Glioblastom im HROG-Modell.....	51

Tabelle 20: Darstellung der humanen Patientencharakteristika <i>in vivo</i> , <i>post mortem</i> und <i>in vitro</i>	XIII
Tabelle 21: Individuelle Patienteninformationen der humanen Tumorproben.....	XIV
Tabelle 22: Individuelle Patientendaten der humanen Gewebeproben der Kontrollgruppe..	XV
Tabelle 23: Listung der individuellen Patientendaten der HROG-Zelllinien.	XVII
Tabelle 24: Gruppierung der HROG-Zelllinien im Bezug zur Detektion der relativen <i>PRG3</i> - und <i>PRG5</i> -Expression.....	XVIII
Tabelle 25: Informationen zu dem Fischer-F98-Gliom-Modell.	XIX
Tabelle 26: Auflistung der verwendeten Proben-ID in den Diagrammen.	XXVII
Tabelle 27: Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese aller verwendeten Proben.	XXXII
Tabelle 28: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA in humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>	XXXIV
Tabelle 29: Rohdaten der qRT-PCR der humanen Tumor- und Kontrollproben.....	XXXV
Tabelle 30: C _T -Werte und kalkulierte Mittelwerte der relativen Expression der <i>PRGs</i> humaner Gewebeproben.....	XXXVII
Tabelle 31: Durchschnittlichen relative <i>PRG</i> -Expression $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts der Abbildung der humanen Gewebeproben.	XXXIX
Tabelle 32: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der humanen Zelllinien.....	XL
Tabelle 33: Darstellung der Mittelwerte der relativen <i>PRG</i> -Expression der HROG-Zelllinien.	XLI
Tabelle 34: Auflistung der C _T -Messwerte der HROG-Zelllinien.....	XLV
Tabelle 35: Durchschnittliche relative mRNA-Expression der HROG-Zelllinien der einzelnen Abbildungen.	XLVII
Tabelle 36: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der F98-Gliomzellen und des Gewebes der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells.	XLVIII
Tabelle 37: Daten der relativen <i>Prg</i> -Expression der entsprechenden Proben-ID im Fischer-F98-Gliom-Modell.....	L
Tabelle 38: Ermittelte C _T -Werte im Fischer-F98-Gliom-Modell.	LV
Tabelle 39: Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression der einzelnen Abbildungen des Fischer-F98-Gliom-Modells.....	LVIII

1. Einleitung

Zur verbesserten Lesbarkeit wird die generische Form verwendet. Für die Nomenklatur und Schreibweise von Genen und Proteinen werden in dieser Arbeit humane Gene kursiv und in Großbuchstaben dargestellt und Gene nicht humanen Ursprungs beginnen mit einem Großbuchstaben und werden kursiv dargestellt [1,2]. Proteine werden in Großbuchstaben, nicht kursiv geschrieben [3].

1.1. Diffuse Gliome

Gliome sind hirneigene Tumore, die aus sogenannten Gliazellen, den Stützzellen des Zentralen Nervensystems (ZNS), entstehen. In Abhängigkeit von der Ursprungszelle (Astrozyten, Ependymzellen, Oligodendrozyten) unterscheidet man zwischen Astrozytomen, Ependymomen oder Oligodendrogliomen, welche anhand ihrer Histologie entsprechend ihrer Aggressivität und entsprechend ihren molekularen Eigenschaften in die Untergruppen unterteilt werden können [4,5]. Die Klassifikation der Tumore des ZNS erfolgt mithilfe der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO), anhand molekulargenetischer, histologischer und immunhistochemischer Aspekte [4]. Bei 80 % der primär malignen Hirntumore im Erwachsenenalter handelt es sich um astrozytische und oligodendrogliale Tumore [5-7].

1.1.1. Glioblastom

Glioblastome (GBM) sind die häufigsten primär malignen Hirntumore. Sie zählen zu den aggressivsten, diffus infiltrierend wachsenden und stark vaskularisierten Tumoren der weißen Hirnsubstanz [7-10]. Glioblastome fordern die Mehrheit der Todesopfer primärer Hirntumore [9]. Das mediane Überleben liegt aktuell trotz aggressiver multimodaler Therapie bei ungefähr 15 Monaten [11].

1.1.2. Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 3,11/100.000 sind Glioblastome die am häufigsten auftretenden Hirntumore in den Vereinigten Staaten von Amerika [12]. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter [9]. Das mediane Alter von Glioblastompatienten beträgt 65 Jahre [9,12]. Bei der geschlechtsabhängigen Verteilung zu Ungunsten des männlichen Geschlechts erkranken Männer bis zu 1,6-mal häufiger als Frauen an einem Glioblastom [9,12]. Regionale Unterschiede im Auftreten maligner Hirntumore konnten unter anderem (u.a.) in Japan, mit einer halb so hohen Inzidenzrate wie in Nordeuropa, festgestellt werden [13]. Gründe hierfür können neben den verschiedenen Gesundheitssystemen, kulturelle, ethnische oder geographische Faktoren sein [13]. Die geringere Gliom-Erkrankungsrate bei dunkelhäutigen Patienten kann auch durch einen geringeren Zugang zum Gesundheitssystem dieser Personengruppe begründet werden [13].

1.1.3. Ätiologie

Klare Einflussfaktoren sind bisher nicht bekannt. Ionisierende Strahlung wurde als Risikofaktor und anamnestisch bestehende atopische Erkrankungen als protektiver Faktor für die Entstehung von Gliomen beschrieben [9,14]. Ein vermehrtes familiäres Auftreten für Glioblastome wurde bei 5 % der Betroffenen nachgewiesen, meist im Zusammenhang mit familiären Tumor-Syndromen (z. B. Neurofibromatose Typ 1, Tuberöse Sklerose, Lynch Syndrom, Li-Fraumeni Syndrom) [14]. Mittlerweile wurden 11 Einzelnukleotid-Polymorphismen mit Glioblastom-Erkrankungen in Verbindung gebracht [9]. Kritische Genlokationen für Gliome sind die Telomerase reverse transcriptase (TERT), der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und der Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2B (CDKN2B) [9].

1.1.4. Molekulare Pathogenese

Während der Prozesse der Initiierung des Tumorwachstums, Umgehung der Seneszenz und der Ermöglichung des unsterblichen Wachstums sind für die Gliom-Entstehung genomische Anomalien einzelner Signalwege wie u.a. des PI3K/mTOR Signalwegs oder des Ras/MAPK-Signalwegs von Bedeutung [9]. Glioblastome können anhand molekularer Subtypen unterteilt werden, deren klinischer Nutzen jedoch noch unklar ist [9]. Rekurrente Tumore weisen in 80 % die initial detektierten Mutationen und Varianten auf, ohne wesentliche Sekundärveränderungen durch adjuvante Therapien zu zeigen [9].

1.1.5. Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation

Neben der Histopathologie hat sich der zentrale Fokus der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation der ZNS-Tumore in den vergangenen Jahren auf die Molekulargenetik fokussiert, die die Prognose, mögliches Therapieansprechen und Aggressivität des Tumorwachstums noch klarer definiert [5]. Mit Hinblick auf die 2021 veröffentlichte fünfte WHO-Klassifikation für Hirntumore des ZNS wurden neue Errungenschaften in der molekularen Diagnostik, zusätzlich zu der Histologie und Immunhistochemie, für die integrierte Diagnose und Charakterisierung der Hirntumore zusammengefasst [4]. Basierend auf histologischen Kriterien gelang bisher eine prognostische Einschätzung der Überlebenszeit. Diese wird nun zunehmend durch weitere Parameter ergänzt, um anhand einer integrierten Diagnose die phäno- und genotypischen Merkmale gemäß der WHO zu klassifizieren [4,5]. Entsprechend der neuen Klassifikation von 2021 werden Gliome, glioneuronale Tumore und neuronale Tumore in sechs verschiedene Familien eingeteilt, bei denen z. B. Astrozytome, Isocitratdehydrogenase (IDH)-mutiert (WHO ZNS Grad 2-4), Glioblastome, IDH-Wildtyp (WHO ZNS Grad 4), als auch Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (WHO ZNS Grad 2-3), zu der Familie der diffusen Gliome vom Erwachsenentyp („Adult-type diffuse gliomas“) zählen [4]. Modifizierende Begriffe wie „anaplastisch“ werden in der aktuellen WHO-Klassifikation nicht mehr für die einzelnen Grade verwendet [4]. Laut neueren Erkenntnissen können TERT-Promoter-Mutationen, die Kombination des Zugewinns von Chromosom 7 und der Verlust von Chromosom 10 oder die EGFR-Amplifikation auch in Abwesenheit von der IDH-Mutation zur Diagnose eines Glioblastoms verhelfen [4].

Da die Patientendaten vor Veröffentlichung der aktuellen WHO-Klassifikation erhoben wurden, wird innerhalb dieser Dissertation insbesondere auf die WHO-Klassifikation von 2016 und

vorangehende zurückgegriffen, bei der mitunter die Gradierung der Tumore das Überleben der Patienten charakterisierte [4]. Bereits in der WHO-Klassifikation von 2016 nahm die Bedeutung an molekularen Parametern zur Klassifikation der ZNS-Tumore zu [4,5]. 2016 stand die „integrierte“ Diagnose der ZNS-Tumore anhand ihrer phäno- und genotypischen Parameter im Mittelpunkt [5]. Die Gradierung der ZNS-Tumore wurde weiterhin entsprechend ihrer histologischen Kriterien getätigt [5]. Eine wesentliche Einschränkung dieser Einteilung war, dass einige Tumore nicht in die eng beschriebenen Entitäten passten oder wegen fehlender genetischer Testungsmöglichkeiten der Entität NOS (not otherwise specified) zugeteilt wurden [5]. Damals zählten neben dem Glioblastom (WHO Grad IV), diffuse (WHO Grad II) und anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) sowie das anaplastische Oligodendrogliom (WHO Grad III) zu den diffusen astrozytischen und oligodendroglialen Tumoren, die aufgrund histologischer und molekularer Aspekte wie der gemeinsamen genetischen Treibermutationen, der IDH1- und IDH2-Gene, in verschiedene Entitäten und Varianten eingeteilt wurden [4,5]. Bei den diffusen Gliomen richteten sich die Therapiemaßnahmen nach der phäno- und genotypischen Gruppierung [5]. Als IDH-Wildtyp wurden die Läsionen bezeichnet, die eine negative Immunhistochemie für die Mutation IDH1 R132H und die Sequenzierung für IDH1 Codon 132- und/oder IDH2 Codon 172-Genmutationen vorweisen [5]. Fehlende IDH-Evaluierungen führten zu einer Zuordnung als Glioblastom, NOS [5]. IDH-Mutationen zeigen exzessive Genommethylierungen mit dem Resultat gliomspezifischer CpG-Insel-Methylator-Phänotypen (G-CIMP) [15]. Die Hypermethylierung der Histone und Desoxyribonukleinsäure (DNA) resultiert aus der Inhibition der alpha-Ketoglutarat-Enzyme, durch 2-Hydroxyglutarat der mutierten IDH [16]. Ein weiterer wichtiger prädiktiver Faktor für Glioblastome, die Methylierung des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promoters, findet bisher keine Wertigkeit in der WHO-Klassifikation [4]. Das alkylierende Zytostatikum Temozolomid macht sich die Methylierung des MGMT-Promoters zunutze. Temozolomid ruft DNA-Schäden durch Bindung von Alkylgruppen an der Guanin O⁶-Position hervor [15]. Die DNA-Schäden werden mithilfe des Enzyms MGMT repariert [17]. Durch die Methylierung des MGMT-Promoters wird vermindert MGMT exprimiert und als Folge dessen entstandene DNA-Schäden nicht repariert [15]. Dieser Prozess ermöglicht eine höhere Sensitivität des Tumors für das Chemotherapeutikum [17]. Die Anwendung des Zytostatikums verbessert das mediane Überleben von Glioblastompatienten mit MGMT-Promoter-Methylierung um 50 % [9,11,18,19].

1.1.6. Lokalisation

Glioblastome treten zumeist supratentoriell, frontal in der weißen Hirnsubstanz lokalisiert, seltener temporal oder in den Basalganglien auf [20]. Im Bereich des Hirnstamms werden Glioblastome häufiger im Kindesalter als bei Erwachsenen diagnostiziert [20]. Glioblastome können sowohl mit einer Läsion als auch multifokal auftreten. Typisch für Glioblastome ist die Infiltration des Corpus callosum und damit einhergehendem bifrontalen Wachstum im Sinne eines sogenannten Schmetterlingsglioms [20]. In äußerst seltenen Fällen können spinale Läsionen, meist zervikal oder thorakal, nachgewiesen werden [20]. Spinale Manifestationen können als Abtropf-Metastasierung durch Befall des Ventrikelsystems betrachtet werden [20].

1.1.7. Klinik

Durch den Masseneffekt des Tumors und ein ausgeprägtes Umgebungsödem entsteht eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks, die häufig mit akuten, unspezifischen, neurologischen Symptomen einhergeht [14,20]. Neurologische Symptome treten in Abhängigkeit der Tumorlokalisation, -größe und Wachstumsgeschwindigkeit auf [20]. Betroffene Patienten leiden neben fokalen oder generalisierten epileptischen Krampfanfällen an Kopfschmerzen, kognitiven Defiziten, kontralateralen Hemiparesen bis hin zu Hemiplegien, sensorischen Defiziten, Persönlichkeitsveränderungen, Gesichtsfelddefekten, Sprach- und Sprechstörungen, Übelkeit und Vigilanzminderungen [14,20,21]. Patienten präsentieren sich seltener primär mit psychiatrischen Symptomen [21]. Zudem können Liquorzirkulationsstörungen einen Hydrozephalus verursachen und durch eine leptomeningeale Aussaat können periphere neurologische Defizite wie beispielsweise Polyradikulopathien auftreten [9,20].

1.1.8. Diagnostik

Bei plötzlich auftretenden neuen neurologischen Defiziten erfolgt in der Akutsituation zuerst eine native Computertomographie (CT), die bei einem konkreten Verdacht auf einen Hirntumor mit Kontrastmittel durchgeführt werden kann [14]. Eine ergänzende Magnetresonanztomographie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel ist die sensitivste und spezifischste Darstellung zur Bestätigung der Tumoraläsion [14,20]. T₁-bildgebend zeigt sich eine kapsellose Läsion mit geringer Intensität und meist zentraler hypointenser Nekrose, girlandenförmiger Kontrastmittelaufnahme und teils zystischer Formatierung [20]. In der T₂-Sequenz können hyperintense Läsionen mit geringerer Abgrenzbarkeit und periläsionalem Ödem dargestellt werden [20]. Fluid attenuated inversion recovery (FLAIR)-Sequenzen stellen das vasogene Ödem oder den infiltrierenden Tumor dar, während Diffusion weighted imaging (DWI)-Sequenzen dabei helfen, das Glioblastom von Abszessen zu unterscheiden [14]. Anhand des Tumor-Metabolismus besteht die Möglichkeit mittels Magnetresonanzspektroskopie die Diagnose eines Glioblastoms weiter einzuordnen [9]. Eine Aminosäure-Positron-Emissions-Tomographie (PET) unterscheidet spezifischer zwischen Differentialdiagnosen und wird vermehrt zur Feststellung eines erneuten Tumorprogresses nach der Behandlung eines Glioblastoms genutzt [9]. Zur weiteren Abklärung einzelner neurologischer Symptome können spezifische Diagnostikmethoden wie ein Elektroenzephalogramm angewandt werden [14]. Eine endgültige Diagnose wird anhand der feingeweblichen Untersuchungen mit molekularen, histologischen und immunhistochemischen Markern gestellt [4].

1.1.9. Therapie

Entsprechend der Leitlinientherapie wird eine maximal aggressive Tumorresektion mit anschließender kombinierter adjuvanter Radio-Chemotherapie in Abhängigkeit des Alters, der Tumorlokalisation und des Allgemeinzustandes des Patienten empfohlen [8,14]. Die limitierten Therapiemöglichkeiten sind aktuell Bestandteil zahlreicher Forschungsprojekte. Obwohl sich in den letzten Jahren vermehrt potenzielle Therapiemöglichkeiten aufgezeigt haben, bleibt das Glioblastom weiterhin eine unheilbare Erkrankung [6,8]. Eine möglichst aggressive Resektion im Sinne einer Totalresektion bewirkt ein verbessertes progressionsfreies Überleben und steigert die mediane Überlebenszeit [22]. Durch fluoreszenzgesteuerte Resektion mit 5-

Aminolävulinsäure kann das Ausmaß der Resektion noch weiter verbessert werden [23,24]. Mithilfe von präoperativem kortikalen Mapping (Transkranielle Magnetstimulation (TMS)), intraoperativer MRT-Navigation sowie intraoperativem Monitoring der motorisch und sensibel evozierten Potenziale kann das Risiko postoperativer, neurologischer Defizite minimiert und eine möglichst aggressive Tumorresektion realisiert werden [25-28]. Zur Standardtherapie sich selbstständig versorgender Patienten mit einem Karnofsky performance status (KPS) ≥ 70 % und jünger als 70 Jahre gehört die kombinierte Radio-Chemotherapie nach Stupp-Schema [11,14]. Patienten über 70 Jahre mit einem KPS ≥ 70 % erhalten eine verkürzte hypofraktionierte Strahlentherapie mit adjuvanter Temozolomid-Therapie [14]. Bei einem reduzierten KPS können Patienten über 70 Jahre eine bestmögliche unterstützende Behandlung (Best Supportive Care) erhalten [14]. Als weitere adjuvante Therapiemöglichkeit wird beispielsweise Bevacizumab (Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Antikörper) angeboten, welcher eine Hemmung der Angiogenese bewirkt [20]. Obwohl hierdurch kein klarer Überlebensvorteil erzielt werden konnte, findet es vor allem Anwendung zur effektiven Reduktion des peritumoralen Ödems und einer entstandenen Strahlennekrose [9]. Zur symptomatischen Therapie können entsprechend der Klinik weitere Maßnahmen begonnen werden. Zum Beispiel werden anfallssupprimierende Medikamente bei epileptischen Krampfanfällen verabreicht [14]. Für Patienten mit rezidivierendem Tumor gibt es keine klare Standardtherapie [9]. Aufgrund der schnellen Entwicklung und zahlreicher Forschungsprojekte besteht die Möglichkeit weitere Therapieoptionen mit zunehmender Fokussierung auf zielgerichtete molekulare Behandlungen oder Immuntherapien wahrzunehmen [8,9].

1.1.10. Prognose, Einflussfaktoren und Progress

Die Standardtherapie kann durch die Kombination aus operativer Resektion mit zusätzlicher adjuvanter Therapie eine durchschnittliche Überlebenszeit von 14,6 Monate erzielen [9,11]. Glioblastome zeigen ein relatives 5-Jahres Gesamtüberleben von 6,8 % in Abhängigkeit des Alters bei Diagnosestellung und des biologischen Geschlechts [9]. Unbehandelte Patienten unter 70 Jahren haben eine mediane Überlebenserwartung von 3 bis 4,5 Monaten [14]. Bei Anwendung einer Best Supportive Care-Therapie bei Patienten über 70 Jahren kann nur ein medianes Überleben von weniger als 4 Monaten erzielt werden [14]. 10 bis 20 % der langzeitüberlebenden (mindestens zwei Jahre nach Diagnosezeitpunkt) Glioblastompatienten weisen prognostisch günstige Faktoren wie ein junges Alter und mitunter einen methylierten MGMT-Promoter auf [15,29].

Nach subtotaler Tumorresektion sind die Tumorreste oft nicht für adjuvante Therapien zugänglich und zeigen mit der Zeit einen Tumorprogress [20]. Nach einer kompletten Resektion treten Rezidive meist lokal auf, in circa 10 % der Fälle kommt es jedoch zum Nachweis neuer weiter entfernt liegender Tumorkläsionen [20]. Zumeist treten Rezidiv-Tumore

6,9 Monate nach Erstdiagnose des Patienten auf [7]. Nach Auftreten eines Rezidivs beträgt das mediane Gesamtüberleben 24 bis 44 Wochen [9].

1.2. Lipid-Phosphat-Phosphatase

Die Enzyme der Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPP) unterteilen sich in drei Isoformen (LPP1-3) sowie eine Spleißvariante und gehören zu einer großen Familie an Phosphatasen [30,37]. Bei LPPs handelt es sich um integrale Membranproteine, die sowohl in Plasmamembranen als auch in intrazellulären Membranen lokalisiert sind [32]. LPPs werden bevorzugt im Gehirn, aber auch anderen Organen exprimiert und zeigen sowohl überlappende katalytische Aktivitäten als auch Substratpräferenzen auf [30,37]. Die Ekto-Phosphatasen-Aktivität ermöglicht den LPPs in die Lipidphosphat-Signalwege einzugreifen und die extrazelluläre Konzentration und Signaltransduktion von Lipidphosphatestern wie Lysophosphatid (LPA) durch Dephosphorylierung zu regulieren [30,33]. Extrazelluläres LPA entsteht durch die Umsetzung von Lysophosphatidylcholin (LPC) durch Autotaxin (ATX, Lysophospholipase D) [30,31] (siehe „Abbildung (Abb.) 1“). Das Sphingolipid-Analogon Sphingosylphosphorylcholin wird ebenfalls durch ATX zu Sphingosin 1-Phosphat (S1P) dephosphoryliert [30,31]. ATX ist ein im Gehirn exprimiertes Enzym, das ebenfalls in Tumorzellen produziert wird und dort den Progress des Tumors, der Metastasen und der Angiogenese über LPA fördert [30,38]. Zur Minimierung der LPA- und S1P-Wirkung degradieren LPPs die Lipidphosphatester wie LPA zu Monoacylglycerol (MAG) (siehe „Abb. 1“) und S1P zu Sphingosin [30-32]. Weiterhin setzen die LPPs Ceramid-1-Phosphat (C1P) zu Ceramid und Phosphatidat zu Diacylglycerol (DAG) um [30]. Interessanterweise bedeutet eine Erhöhung der LPPs nicht

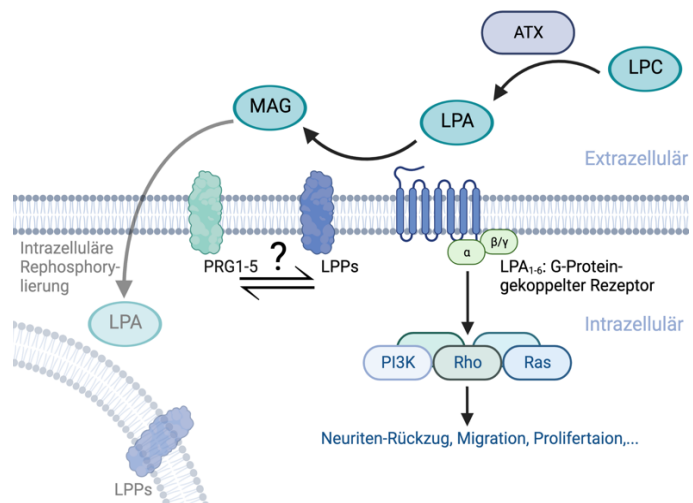


Abbildung 1: Schematische Darstellung des LPA-Metabolismus.

Das Sphingolipid-Analogon Sphingosylphosphorylcholin wird zu Sphingosin 1-Phosphat und Lysophosphatidylcholin (LPC) zu Lysophosphatidat (LPA) durch Autotaxin (ATX, Lysophospholipase D) umgesetzt [30,31]. Die Lipid-Phosphate-Phosphatasen (LPP) können diese Lipidphosphatester degradieren, z. B. LPA zu Monoacylglycerol (MAG) [30]. Bei Aufnahme nach intrazellulär kann MAG rephosphoryliert werden, um intrazelluläre LPA-Rezeptoren zu aktivieren [30,32]. Durch Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktivieren LPA und S1P verschiedene Signaltransduktionswege und induzieren somit Zellwachstum, -motilität, -proliferation und -überleben sowie Migration, Angiogenese und Inflammation [30-34]. Dadurch kann LPA die neuronale Plastizität modifizieren [35] oder mit tumorösen Signalwegen interagieren [36]. Beispielsweise wird über LPA-Rezeptoren Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Ras und Rho stimuliert [30]. Insbesondere genomische Anomalien des PI3K/mTOR Signalwegs oder des Ras/MAPK-Signalwegs sind für die Entwicklung von Gliomen von Bedeutung [9]. Durch LPA-Rezeptoren (LPA₁₋₆) ausgelöste Signalkaskaden können mithilfe intrazellulär gelegener LPPs, die sich meist in Membranen der Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat befinden, abgeschwächt werden [32]. Die hochgradig hirnspezifischen Plasticity-related Genes (PRG) gehören als Unterklasse zu der LPP-Superfamilie und weisen eine starke Homologie zu LPP1 auf, fördern neben regenerativen Prozessen die Verbesserung des Neuriten-Wachstums und schwächen LPA-induzierte Effekte ab [30,31,33,34]. Kreiert mit BioRender.com

automatisch eine Reduktion seiner Substrate [32].

Die Abbauprodukte der Lipidphosphatester beeinflussen den Organismus. Über das Abbauprodukt MAG können die LPPs 2-Arachidonoylglycerol Cannabinoid-Rezeptoren des Gehirns aktivieren und über intrazelluläre Rephosphorylisierungsprozesse lokale LPA-Rezeptoren aktivieren [30,32]. Die Abbauprodukte Sphingosin, DAG und Ceramid können nach ihrer Aufnahme ebenfalls intrazellulär rephosphoryliert werden und Signalwege beeinflussen [30].

Mit der Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren LPA und S1P Signaltransduktionswege und induzieren somit Zellwachstum, -teilung, -motilität, -proliferation und -überleben sowie Migration, Neurogenese, Angiogenese und Inflammation [30-34]. Über die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren LPA und S1P zusätzlich mit tumorösen Signalwegen [36]. Zu den LPA-Rezeptoren zählen mindestens sechs G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (LPA₁₋₆) mit sieben Transmembrandomänen [32,39]. Durch die fluktuierenden Expressionsmuster dieser Rezeptoren kann LPA die Astrogenese, Oligogenese, das Neuriten-, Axon- und Dendriten-Wachstum sowie die Synapsenbildung, aber auch -reifung beeinflussen [30,31,34,35]. Diese Prozesse ermöglichen LPA die neuronale Plastizität zu modifizieren [35]. Über LPA-Rezeptoren ausgelöste Signalkaskaden können durch intrazellulär gelegene LPPs, die sich meist in Membranen der Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat befinden, abgeschwächt werden [32]. Ähnlich dem LPA aktiviert S1P fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P₁₋₅), über die Prozesse der Angiogenese und Immunantwort reguliert werden [30,32].

1.2.1. Tumorprogression durch Lipid-Phosphat-Phosphatasen

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse der Expressionsmuster der plasticity-related genes (*PRG/Prg*) im Gliom. Noch bevor Wechselwirkungen zwischen den PRG und dem Tumorprogress in der Forschung Beachtung fanden, wurde die Assoziation ihrer übergeordneten Klasse [31], den LPPs, mit Tumoren untersucht. Nicht nur die LPPs, auch ihre Substrate und die Prozesse der Substratbildung beeinflussen die Signalwege von Tumorzellen. Die LPPs übermitteln Signale in Tumorzellen und regulieren mithilfe des Lipidmetabolismus den Tumorprogress [32]. LPPs können einen fördernden sowie hemmenden Effekt auf das Tumorstadium erzielen und die Ausbildung von Metastasen unterbinden [30,32]. Dabei können LPP1 und LPP3 eine Reduktion bis zur kompletten Hemmung des Tumorstadiums erzielen [30,32]. Einzelne Glioblastom-Zelllinien weisen vermehrt LPP3 auf [40]. Entgegen den zuvor beschriebenen Annahmen kann ein *Lpp3*-Knockdown eine verminderte Glioblastom-Zelllinien-Proliferation sowie ein reduziertes Tumorstadium bewirken [32,40]. Eine zentrale Stellung in der Modifikation des Tumorstadiums nehmen die beiden Substrate der LPPs, LPA und S1P, ein [41-43]. Während LPA das Tumorstadium, die Migration, die Motilität, den Phänotyp der Tumorzellen, das Zellüberleben und Metastasen modifiziert und S1P die Angiogenese, die Reparatur von Gewebe und das Wachstum aggressiver Tumore stimuliert, können beide pathologische Prozesse negativ beeinflussen [10,32,38,44,45]. Die einzelnen Signalwege werden durch Bindung der LPP-Substrate an ihre Rezeptoren initiiert. Mithilfe der LPA-Rezeptoren kann LPA über G_{qi} die Reduktion der cAMP-Konzentration, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und

Ras aktivieren, zum anderen stimuliert es über den $G_{12/13}$ -Rezeptor die Phospholipase D und Rho und kann die Phospholipase C, Ca^{2+} -Transienten und Proteinkinase-C-Isoformen über G_q aktivieren [30]. LPA steigert durch die Aktivierung der PI3K den proteosomalen Abbau von p53, einem Tumor-Promoter [30]. Als Folge kommt es zu einer verminderten p53-vermittelten Transkriptionsregulation [30]. Zunehmend zeigen sich Assoziationen der Malignität von Astrozytomen mit den Rezeptoren der LPP-Substrate. Mit Zunahme der Malignität des Astrozytoms kommt es zu einer vermehrten *Lpa1*-Rezeptor-Expression, die sogar mit einem geringeren Überleben bei Grad III Astrozytomen assoziiert wurde [46]. Eine für die Glioblastomzellen vorteilhafte Wirkung erzielt LPA durch die Initiierung motilitätsfördernde und überlebensfördernder Prozesse, die durch Antagonisten der LPA-Rezeptoren unterbunden werden [38,47]. Es konnten weitere Mechanismen festgestellt werden, die die Wirkung von LPA auf den Tumorprogress minimieren. Die Unterbindung der Generierung von LPA und die Hemmung des LPA_2 -Rezeptors bewirken ein vermindertes Tumorwachstum [32].

Auch S1P wird zunehmend mit dem Glioblastom in Verbindung gebracht [36]. Über die einzelnen S1P-Rezeptoren werden bei Glioblastomzellen Funktionen der Migration und Invasion gefördert [48]. Während $S1P_1$ und $S1P_3$ die Glioblastom-Zell-Migration unterstützen, wirkt $S1P_2$ eher gegenteilig [48]. Durch eine genaue Analyse des Einflusses der integralen Membranproteine der LPPs und ihrer Substrate können eventuell Rückschlüsse auf zukünftige Behandlungsmethoden für Tumore geschlossen werden. Medikamente zur Modulation des Sphingolipid-Signalwegs wurden bereits für andere neurologische Krankheitsbilder zugelassen. 2010 wurde der funktionelle S1P-Rezeptor-Antagonist Fingolimod zur Behandlung der schubförmig remittierenden Multiple Sklerose auf den Markt gebracht [34,49]. Durch vielversprechende erste Ergebnisse wird es als mögliches Medikament zur Glioblastom-Behandlung gesehen, indem es die Blut-Hirn-Schranke überwindet, die Apoptose von Glioblastomzellen fördert und ihre Migration sowie Invasion unterbindet [48]. Zur Tumorthherapie werden weitere Medikamente, die den Sphingolipidmetabolismus modifizieren, untersucht [49]. Dabei können sich möglicherweise die proangiogenetischen Effekte von S1P und LPA zunutze gemacht und Medikamente mit dem Ziel der Hemmung des Glioblastomprogresses evaluiert werden, ähnlich der angiogenesehemmenden Wirkung des Medikaments Bevacizumab [38,42].

Wichtig für die Entwicklung weiterer Medikamente wird der Einfluss des Lipidmetabolismus auf das Therapie-Ansprechen sein. Es wird angenommen, dass die Überexpression von LPP1 und LPP2 indirekt den Signalweg von p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) hemmt, wodurch die in Glioblastomzellen geförderte Resistenz gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie unterbunden wird [50-52]. Medikamentenresistenzen konnten bereits mit der Hochregulation von *Lpp1*, *Lpp2* und *Prg4* anderer Tumore assoziiert werden [33,50,53]. Außerdem vermindert LPA über den LPA_1 -Rezeptor die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika und Radiotherapie [32,42].

Im Hinblick darauf, dass unter pathophysiologischen Bedingungen die Expressionen der LPPs, LPA, LPA-Rezeptoren, aber auch die der PRGs variieren können [31], ist es relevant, die Beteiligung dieser Achse bei der Entwicklung des Glioblastoms besser zu beurteilen [54]. Als Unterfamilie der LPPs stehen die PRGs im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel ist es, zu ermitteln,

ob ihre Expression in Zusammenhang mit dem Glioblastom gebracht werden kann und somit als neuer Ansatzpunkt für potenzielle Therapiestrategien beim Glioblastom zu evaluieren ist.

1.3. Plasticity-related Genes

1.3.1. Ein Überblick

Die natürliche Entwicklung des ZNS, im Speziellen die neuronale Plastizität, kann durch Deregulation und genetische Mutation von Proteinen und Lipiden der molekularen Prozesse wesentlich verändert werden und in schweren neurologischen Defiziten resultieren [55]. Zu diesen Proteinen zählen die Plasticity-related Genes (PRG, PRGs). Die hochgradig im Gehirn exprimierten Proteinfamilie der PRGs (PRG1 bis PRG5) gehören mit ihren fünf wirbeltierspezifischen Proteinen als Untergruppe zu der LPP-Superfamilie und weisen dabei eine starke Homologie zu LPP1 auf [30,31,55]. Die *PRG-/Prg*-Gene für die Kodierung der PRGs sind bei verschiedenen Spezies an unterschiedlichen Positionen auf den Chromosomen lokalisiert („Tabelle 1“) [33,56]. PRGs fungieren als Modulatoren zahlreicher zellulärer Prozesse, der neuronalen Differenzierung und regulieren bioaktive Lipide wie LPA und S1P [55,57]. Dabei beeinflussen die PRGs neben regenerativen Mechanismen die Verzweigung axonaler Strukturen, die Verbesserung des Neuriten-Wachstums, Ausbildung dendritischer Fortsätze, Modifizierung der Entwicklung und Funktion von Synapsen und das Abschwächen LPA-induzierter Effekte [30,31,33,34,55]. Trotz ihrer starken Homologie zu LPP1 weisen die PRGs im Gegensatz zu den LPPs veränderte konservierte Aminosäuren in den extrazellulären Domänen (C1, C2 und C3) auf, die essenziell für die katalytische Aktivität von LPPs verantwortlich sind [55]. Diese Veränderung führt zu einer fehlenden enzymatischen Aktivität [30,33,55,57]. Zum Beispiel konnte bei PRG1 und PRG3 keine enzymatische Aktivität zur Dephosphorylierung spezifischer Substrate festgestellt werden [31,58-60]. Auf bisher noch unverstandene Weise besitzen die PRGs dennoch die Fähigkeit, Signalwege der Lipide zu modulieren [55]. Es wird angenommen, dass PRG1 die Funktion der bioaktiven Lipide wie LPA über präsynaptische LPA₂-Rezeptoren steuert und die intrazelluläre Aufnahme der bioaktiven Lipide fördert [58,61].

Als membranständige Proteine besitzen die PRGs ein konserviertes Faltmuster mit sechs Transmembranregionen, drei extrazellulären Schleifen und zwei intrazellulären Enden, dem C- und N-Terminus [30,55]. Analysen ergaben jedoch, dass die beiden C- und N-Termini von PRG1 und PRG2 sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert sein können [55]. Auf Grundlage ihrer Struktur können PRGs in zwei Gruppen eingeteilt werden [55]. Während PRG1 und PRG2 durch ausgedehnte extra- und intrazelluläre Schleifen gekennzeichnet sind, zeigen sich die Strukturen von PRG3 bis PRG5 kompakter und weisen kleinere intrazelluläre Regionen und extrazelluläre Domänen auf [55]. Eine wichtige Position scheinen die C-Termini einzunehmen. Sie können das Auftreten der PRGs in der Membran beeinflussen [62] und auf strukturelle Unterschiede zwischen den PRGs hinweisen. Die sich in ihren Aminosäure-Sequenzen sehr ähnelnden PRG3, PRG4 und PRG5 zeigen mitunter ihre größten Differenzen bei ihren intrazellulären C-Termini [59]. Der C-Terminus von PRG3 und PRG4 gilt dabei als unstrukturiert und der von PRG5 weist eine Alpha-Helix-Faltung auf [55]. Die C-Termini können durch Interaktionen mit LPA zelluläre Prozesse modulieren [59,62].

Die Primärstruktur der PRG-Proteine setzt sich aus unterschiedlichen Aminosäureanzahlen zusammen („Tabelle 1“) [31]. In Abhängigkeit der Aminosäuresequenz konnten strukturelle Ähnlichkeiten der PRGs bei Mäusen analysiert werden. In 49,1 % stimmt die Aminosäuresequenz von PRG1 und PRG2 der Nagetiere überein [59]. Die höchste Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen wurden zwischen PRG3 und PRG5 mit 55,24 % bei Mäusen [59] und 57 % beim Menschen ermittelt [63]. Dieser hohe Verwandtschaftsgrad zwischen PRG3 und PRG5 lässt sich anhand phylogenetischer Analysen bestätigen [64]. Außerdem weist PRG4 eine hohe Übereinstimmung seiner Aminosäuresequenz mit PRG3 und PRG5 auf [59].

PRG	Chromosom [33,56]			Gen- Identi- fikations- nummer [55]	Protein- Identi- fikations- nummer [55]	Amino- säuren des humanen Proteins [31,59]	Lokalisation in/ neuronalen Strukturen an des ZNS
	Human	Ratte	Maus				
PRG1	3	2	1	9890	Q7Z2D5-1	763	Lokalisation an post-synaptischen Dendriten glutamaterger Neurone [33,58,61].
PRG2	19	7	10	79.948	Q6T4P5-1	746	In submikrometergroßen Clustern entlang der axonalen Membran lokalisiert [65,66].
PRG3	9	5	4	54.886	Q8TBJ4	325	Vermeht an präsynaptischen Endspitzen, Wachstumskegeln von Neuronen oder Protrusionen des Neuritenschafts vorzufinden [63,67].
PRG4	19	8	9	64.748	Q96GM1-1	343	Primär in intrazellulären Membranen und geringer in Plasmamembranen des Zellkörpers, aber nicht in der Plasmamembran von Filopodien detektierbar [59].
PRG5	1	2	3	163.404	Q32ZL2-1	316	In der Maus konnte PRG5 vermehrt in den Zellkörpern und dendritischen Strukturen der kortikalen Neurone lokalisiert werden [68]. PRG5 befindet sich an der Basis der Synapsen, dem Nacken, nicht dem Kopf, der Dendritenfortsätze, mit daraus folgendem geringerem Einfluss auf die synaptische Transmission [68].

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu den fünf PRGs.

Zusammenfassung der Lokalisationsorte auf den Chromosomen der verschiedenen Spezies, Gen- und Protein-Identifikationsnummer, Anzahl der Aminosäuren und Lokalisation innerhalb des ZNS.

1.3.2. Organexpression

Die primär hirnspezifischen PRGs sind Membranproteine, die mittlerweile auch in geringer Rate in anderen Organen nachgewiesen wurden [31]. Beispielsweise ergaben sich Nachweise sehr geringer Mengen an *Prg1* im Hoden und *Prg3* in Nieren, Leber und Hoden [67,69,70]. Speziell in Lunge, Herz und Hoden zeigten sich geringe Level von *Prg5* [71,72].

Der Entwicklungszustand des Organismus prägt maßgeblich den Grad der Expression der *PrGs* im ZNS, insbesondere ihre genaue Lokalisation in den einzelnen Hirnarealen [30,31,59]. Vor allem in den frühen Entwicklungsphasen von Nagetieren ergeben sich erhöhte zerebelläre Expressionsmuster von *Prg3* [59,67,69,73], *Prg2* [59] und *Prg5* [68]. Als besondere Hirnregion des ZNS, die für ihre einzigartige Regeneration der Nervenfasern nach Schädigung bekannt ist, gilt der olfaktorische Bulbus [74-76]. Während der Gehirnentwicklung wurden sehr stabile *Prg4*-Level im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen [59]. Relevante Strukturen unseres Gedächtnisses befinden sich im Hippocampus [77]. Die Fähigkeit, ein Gedächtnis ausbilden zu können, wird mit der aktivitäts-abhängigen synaptischen Plastizität des Hippocampus begründet [77]. Als wichtiger Modulator neuronaler Strukturen und mit ihr der neuronalen Plastizität können alle fünf PRGs im Hippocampus nachgewiesen werden. Insbesondere *Prg1* weist hier eine mit der Nagetier-Entwicklung steigende Expression auf [59]. In den frühen Entwicklungsphasen kommt es vielmehr zur Detektion von *Prg2*, *Prg3* und *Prg4* [30,59,67,73]. In den hippocampalen Strukturen zeigte sich ebenfalls *Prg5* [59,64,68]. Der Neokortex ist für grundlegende und abstrakte kognitive Funktionen, z. B. Motorik, verantwortlich [78,79]. Diese Funktionen beruhen auf der Fähigkeit des Gehirns, aus Erfahrungen und Anwendung zu lernen und mithilfe von Änderungen Optimierungen durchzuführen [79]. Plastizität stellt in diesem Sinne eine wesentliche Komponente für die Entwicklung des Neokortex dar [79]. Abhängig von dem Entwicklungszustand werden im Neokortex *Prg1* und *Prg2* exprimiert [59], wobei zumeist nur PRG1 mit Fähigkeiten der neuronalen Plastizität [31,59,61,64] und Regeneration [30,31,33,44,69,80,81] des ZNS in Verbindung gebracht wird. Die Funktion von PRG2 scheint an dieser Stelle noch ungeklärt. Der zerebrale Kortex ist für das Bewusstsein und komplexe Hirnfunktionen verantwortlich [82]. Der Verlust dieser Regionen kann zu erheblichen neurologischen Defiziten führen [82]. Durch die Fähigkeit, neuronale Entwicklung und Umstrukturierungsprozesse hervorzurufen [31,59,64], kann die lokale Expression von *Prg3* [30] und *Prg5* [59,64,68] in diesen Kortexarealen möglicherweise die Ausbildung dieser komplexen Strukturen unterstützen. Nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark, wurden bereits PRGs nachgewiesen. Vor allem während der Ausbildung der Rückenmarksstrukturen konnte *Prg5* detektiert werden [33].

1.3.3. Neuronale Lokalisation der Plasticity-related Genes

Für die Umgestaltung neuronaler Strukturen ist die Lokalisation der PRGs von Bedeutung. Vorangehende Studien konnten die Expressionsorte der Proteine an neuronalen Strukturen ermitteln („Tabelle 1“). PRG1 kommt an postsynaptischen Dendriten glutamaterger Neurone vor [33,58,61]. Fehlt PRG1, verändert dies die glutamaterge Übertragung und führt zu einer erhöhten epileptischen Aktivität [33,61,83]. Zusätzlich kann *Prg1* insbesondere in der Membran auswachsender Axonen detektiert werden [69]. Leider liegen zum aktuellen Zeitpunkt nur begrenzte Forschungsergebnisse für PRG2 vor. Entlang der axonalen Membran wurde PRG2 in Nanoclustern lokalisiert [65]. PRG3 wird vermehrt bei neuronalen Prozessen detektiert [63]. Bei präsynaptischen Endspitzen, Wachstumskegeln von Neuronen oder Protrusionen des Neuritenschafts handelt es sich somit um relevante Lokalisationen, an denen PRG3 vorzufinden ist [63,67]. Es wird vermutet, dass sich die Lokalisation von PRG3 abhängig von der neuronalen Entwicklung ändert [67]. Neben seiner hauptsächlich neuronalen

Expression kommt *Prg4* vermehrt in Astrozyten vor [59]. Im Gegensatz zu den anderen vier *PrGs* ist *Prg4* dort zumeist in intrazellulären Membranen lokalisiert und in geringerer Menge in der Plasmamembran der Zellkörper vorzufinden [59]. *Prg5* kann in den Zellkörpern, an der Basis von Synapsen und dem Nacken der Dendritenfortsätze detektiert werden [68]. Neuronale Entwicklungsprozesse verschieben die vermehrte Expression im Bereich des Zellkörpers und den Neuriten zu einer ausschließlichen Lokalisation in den Neuriten [68,71].

1.3.4. Neuronale Plastizität – Interaktionen der Neurone und Gliazellen

Neuronale Plastizität ist die Fähigkeit des Nervensystems, sich selbst funktionell und strukturell als Antwort auf Erfahrung oder Verletzungen zu modifizieren, um neue funktionelle Eigenschaften zu erwerben oder robust und stabil zu bleiben [84,85]. Maligne Entartungen werden dabei als Verletzungen gewertet [85]. Zu den Mechanismen der neuronalen Plastizität zählen mitunter die Neurogenese, Neurotransmission mit Adaptation der neuronalen Erregbarkeit sowie die Umstrukturierung der Synapsen, Umgestaltung der dendritischen Verzweigung und die axonale Sprossung [84]. Um ein besseres Grundverständnis für die Fähigkeiten der PRGs zu entwickeln, gilt es, die Strukturen neuronaler Plastizität besser kennen zu lernen und die Wechselwirkung dieser mit den PRGs zu verstehen. Eine Form der neuronalen Plastizität, die synaptische Plastizität, definiert die Modulation der synaptischen Transmission zur Optimierung der synaptischen Vernetzungen [86,87]. Morphologische Prozesse der Synapse im Sinne der Ausbildung neuer oder der Umgestaltung bestehender Dornfortsätze sind dafür von Bedeutung [88,89].

Filopodien bezeichnen dünne, dynamische und kopflose aktinreiche Protrusionen der dendritischen Schäfte ohne ausgebildete synaptische Funktion, die sich zu Dornfortsätzen mit Synapsen oder zu Synapsen am dendritischen Schaft entwickeln [90-92]. Dornfortsätze (Abb. 2) beschreiben kleine, dünne Ausstülpungen reifer neuronaler Dendriten, die zumeist die postsynaptische Regionen exzitatorischer Synapsen bilden und dabei eine relevante Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse spielen [68,71,90,92,93]. Wichtig dafür ist ihre Fähigkeit, sich kontinuierlich in ihrer Morphologie, Anzahl, Dichte und Beweglichkeit anzupassen [89]. Eine pathologische Morphologie der Dornfortsätze wird mit dem Auftreten neurologischer Erkrankungen assoziiert [90,92]. Zu den Hauptbestandteilen von Dornfortsätzen gehören neben membrangekoppelten Proteinen, die G-Proteine [92]. Tiefergehende Untersuchungen

erbrachten zunehmend Hinweise der strukturellen Modifikation von Filopodien und Dornfortsätzen durch PRG-Membranproteine, die mithilfe von LPA über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Signalwege regulieren [31,34,62,71]. Ebenso

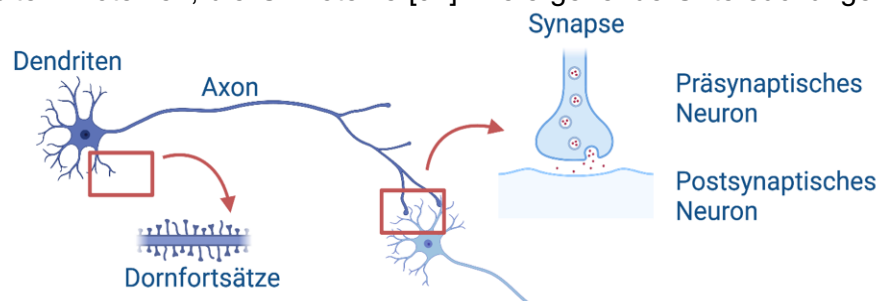


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Neurons.

Die Nervenzelle setzt sich aus verschiedenen Abschnitten wie den Dendriten, dem Soma und dem Axon (Neurit) zusammen. Die synaptischen Endknöpfchen am Ende des Axons bilden den präsynaptischen Bereich der Synapse aus, wohingegen die Dornfortsätze der Dendriten im Bereich der postsynaptischen Region liegen. Zwischen dem präsynaptischen und dem postsynaptischen Bereich findet sich der synaptische Spalt. Kreiert mit BioRender.com.

können die PRGs Prozesse der strukturellen Plastizität modifizieren, dabei handelt es sich mitunter um Änderungen der Form oder Anzahl zellulärer Strukturen [94]. Im Speziellen fördern die PRGs das Neuritenwachstum und gelten als wichtiger Überlebensfaktor für Neurone [30,95]. Eine besondere Rolle für die neuronale Reorganisation ergibt sich durch die sich strukturell stark ähnelnden PRGs, PRG3 und PRG5 [31,55,59]. Insbesondere die frühe Phase der neuronalen Differenzierung wird durch diese beiden PRGs maßgeblich geprägt [62]. PRG3 wurde dabei die stärkste neuronale Wachstumsförderung innerhalb der PRG-Familie zugesprochen [63]. Es wird vermutet, dass PRG3 vielmehr die Struktur der Filopodien und PRG5 die Ausbildung, Modifikation der Morphologie und Förderung der Dornfortsätze beeinflusst [68,71]. Der positive Einfluss von PRG3 und PRG5 auf das Neuritenwachstum wird mit beiden C-Termini in Verbindung gebracht, bei denen Überschneidungen zweier Domänen vorliegen [62,64]. Durch PRG3 wird die Ausbildung von Membranprotrusionen gefördert, die als Filopodien ein vermehrt feines, längliches Wachstum aufweisen [63,96]. Ein vermehrter PRG3-Nachweis fördert strukturelle Veränderungen durch Ausbildung verzweigter Neurone mit einem sich „spreizenden“ Zellkörper, längerem Neuritenwachstum und steigert die Neuritenzahl [30,73,97]. Vermutungen legen nahe, dass diese Prozesse LPA-unabhängig ablaufen [31,33,67]. In reduziertem Maße bewirkt ebenfalls PRG5 ein verstärktes Neuriten- und Filopodienwachstum [31,63,64,67,68]. Die übermäßige *Prg5*-Expression erzielt vielmehr eine Ausbildung von dornfortsatzartigen Strukturen bei jungen Neuronen, erhöht die Anzahl und vergrößert die Durchmesser der Köpfe der Dornfortsätze bei reifen Neuronen [68,71]. Dornfortsätze, die scheinbar durch PRG5 modifiziert werden, sind zumeist Bestandteil exzitatorischer Synapsen [68]. Dies unterstützt die Annahme, dass PRG5 die neuronale Plastizität moduliert.

In einem deutlich geringeren Ausmaß modifizieren ebenfalls die anderen PRGs die neuronale Morphologie. Wachstumsprozesse der Nervenfasern und der Axone werden durch PRG1 gefördert [69,73]. Durch membranstabilisierende Mechanismen unterstützt PRG2 die Filopodien-Ausbildung und axonale Verzweigung durch Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-Antagonisierung [65,66]. Medikamentöse Manipulationen des PTEN-Signalweges gleichen die Auswirkungen durch den Verlust oder die Überexpression von *Prg2* aus [65,66]. Dies könnte ein möglicher Hinweis für zukünftige therapeutische Anknüpfungspunkte der Phospholipide bei neurologischen Erkrankungen mit veränderter neuronaler Struktur sein. Einzelne Studien belegen phänotypische Veränderungen neuronaler Zellen durch PRG4 [63]. Im Hinblick auf jüngere Forschungsergebnisse wird PRG4 jedoch vielmehr als intrazelluläres Membranprotein gesehen, das in den intrazellulären Lipidmetabolismus eingreift und weniger eine Zellmorphologie-beeinflussende Funktion besitzt [59].

Mit Fokus auf das in dieser Arbeit untersuchte Thema stellt sich die Frage, ob die Fähigkeit der PRGs, die neuronale Plastizität durch strukturelle Umgestaltung zu beeinflussen, Auswirkungen auf die Entwicklung oder das Wachstum glialer Tumore hat. In den vergangenen Jahren wurde zunehmend der Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der synaptischen Plastizität von Neuronen mit dem aggressiven Wachstum von Gliomen untersucht [98]. Gliazellen gelten als essenzielle Partner für die Ausbildung von Synapsen, der synaptischen Transmission und Plastizität [87,99]. Dabei umgeben Astrozyten die synaptischen Strukturen und beeinflussen ihre neuronale Kommunikation [87,100]. Dies führt

zu der Annahme, dass Glioblastomzellen aktiv mit neuronaler Plastizität interagieren. Die Mikroumgebung des Glioblastomes besteht aus mehr als nur Tumorzellen [101]. Es handelt sich dabei vielmehr um ein Zusammenspiel verschiedener Zellen wie den Astrozyten, Endothelzellen, Immunzellen, Mikroglia und Neuronen [101]. Interaktionen zwischen Neuronen und Glioblastomzellen sind seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt [101]. Den Tumorzellen wird ein Wachstum entlang und um die Neurone nachgesagt, das durch bidirektionale Signalübertragung gefördert wird [101]. Die Signalübertragung wird über funktionelle echte chemische Synapsen (Functional bona fide chemical synapses) zwischen präsynaptischen Neuronen und postsynaptischen Gliomzellen mit Glutamat-Rezeptoren ermöglicht [99,101,102]. Bekanntermaßen spielt die glutamaterge Übertragung eine wichtige Rolle bei dem Tumorprogress und der Beweglichkeit von Gliomzellen [103]. Ein verstärktes Tumorstadium kann insbesondere im Rahmen epileptischer Krampfanfälle beobachtet werden [98,102-104]. Die Lokalisation von PRG1 an postsynaptischen Dendriten glutamaterger Neurone [33,58,61] spielt bei epileptischen Ereignissen eine wesentliche Rolle, auf die an späterer Stelle dieser Arbeit eingegangen werden soll.

Nachweislich gibt es immer mehr Belege dafür, dass eine gestörte gliale und neuronale Interaktion den Progress von Gliomen fördert [99]. Daher werden für neue therapeutische Ansätze zunehmend Neuron-Gliom-Interaktionen identifiziert, die eine medikamentöse Modulation der Abhängigkeit der Tumorzellen von der aktiven Mikroumgebung ermöglichen [99]. In präklinischen Untersuchungen wurden positive Resultate nach der medikamentösen Blockierung postsynaptischer Strukturen von Gliompatienten beobachtet [99]. Aufgrund ihrer einzigartigen Rolle bei der neuronalen Plastizität sollten PRGs als potenzielle Ansatzstruktur für die medikamentöse Beeinflussung der Interaktion mit glialen Tumorzellen eingehender untersucht werden. Ebenso sollte die Relevanz der neuronalen Plastizität zur Reorganisation beim Auftreten eines Hirntumors im Hinblick auf die Prognose beachtet werden [94]. Vorteilhaft an der postoperativen Fähigkeit zur Plastizität wäre mitunter eine verbesserte Regeneration neurologischer Defizite [94]. Bedauerlicherweise gibt es zusätzlich die Annahme, dass die neuronale Plastizität den Tumorprogress bei Gliompatienten fördern kann [98,102-104].

Zusammenfassend kann die neuronale Plastizität und die Kommunikation zwischen Neuronen und Gliomzellen den Tumorprogress und das klinische Ergebnis wesentlich beeinflussen. Der bisher fehlende Erfolg der gezielten Bekämpfung von Gliomzellen führt zu der Fragestellung, ob Therapiemaßnahmen gegen Strukturen der neuronalen Plastizität erfolgsversprechender sind. Die zentrale Rolle der PRGs, speziell PRG1, PRG3 und PRG5, als Regulatoren der neuronalen Plastizität bei der neuronalen Entwicklung und den neuronalen Umstrukturierungsprozessen [31,59,61,64], bietet daher eventuell einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt.

1.3.5. Regenerative Prozesse nach Läsionen

Externe Stimuli wie Hirnschädigung wirken modulierend auf die *Prg*-Expression [30]. Obwohl im Erwachsenenalter vermindert *Prg1* exprimiert wird, beteiligt sich PRG1 möglicherweise an der Regeneration des adulten ZNS [30,69]. Während regenerativer Prozesse, die mit einem axonalen Auswuchs und regenerativer Sprossung verbunden sind, konnte in deafferenzierten Hirnregionen mit Ausbildung neuer Synapsen und in nachwachsenden Fasern nach Läsionen

peripherer Nerven eine erhöhte *Prg1*-Expression an den auswachsenden Axonen und ihren Wachstumskegeln detektiert werden [30,31,33,69,81]. Nach neuronaler Schädigung unterstützt ebenfalls PRG3 das axonale Neuronenwachstum, erhöht die Regeneration und die funktionelle Erholung nach Rückenmarksläsionen [56,63,97].

1.3.6. Epilepsie

Wie bereits zuvor beschrieben, zeigen Patienten mit Glioblastom häufig epileptische Krampfanfälle. Neuronale Plastizität kann die Stabilität gegenüber epileptischen Anfällen aufrechterhalten [84]. Bei Patienten mit Epilepsie konnten Malformation oder Verluste von Dornfortsätzen *post mortem* nachgewiesen und Veränderungen von Strukturen der neuronalen Plastizität während der Epileptogenese bemerkt werden [55,92]. Kann die Modulation der Expression von *Prgs* in Beziehung mit der Epilepsie gebracht werden? Untersuchungen ergaben, dass Moosfaserbahnen des Hippocampus eine Rolle bei der Kognition sowie beim Lernen spielen und dass ihre Aussprossung durch PRG1 beeinflusst werden könnte [105]. Die Sprossung dieser Moosfaserbahnen induziert entwicklungsbedingte Krampfanfälle [106]. PRG1 löst durch sein Fehlen juvenile epileptische Anfälle aus, während zeitgleich epileptische Anfälle die *Prg1*-Expressionslevel modifizieren können [33,61]. Die erhöhte epileptische Aktivität durch schwere hippocampale Übererregbarkeit der juvenilen Mäuse erklärte sich durch die Potenzierung der glutamatergen Übertragung durch *Prg1*-Deletion [61,83]. Es wird vermutet, dass postsynaptisches PRG1 die neuronale Transmission durch bioaktive Lipide wie LPA im synaptischen Spalt über präsynaptische LPA₂-Rezeptoren modifiziert [34,55,61]. Die Übererregbarkeit glutamaterger Neurone wird bei *Prg1*-Mangel durch *Lpa₂*-Rezeptor-Deletion normalisiert [61]. Interessanterweise besitzen Gliomzellen die Fähigkeit zur Glutamat-Produktion und Ausbildung von postsynaptischen Glutamaterezeptoren [98]. Die Lokalisation von PRG1 an postsynaptischen Strukturen glutamaterger Neurone [33,58,61] könnte auf eine Verknüpfung mit dem Gliom hinweisen. Unterstützend für diese Annahme können epileptische Krampfanfälle einen Gliomprogress durch massive glutamaterge synaptische Erregung zwischen präsynaptischen Neuronen und postsynaptischen Gliomzellen fördern [98,102-104]. Ähnlich wie bei *Prg1* besteht durch *Prg5*-Knockdown eine Übererregbarkeit für juvenile epileptische Krampfanfälle [107]. Nach epileptischen Ereignissen sind die Expressionslevel von *Prg3* vorübergehend reduziert [33,73].

1.3.7. Tumore

Ziel dieser Arbeit ist es, die Einflüsse hirneigener Tumore auf die Expression der *Prgs* aufzudecken. Bekanntermaßen kann eine gestörte Regulierung des Lipidmetabolismus zu einem erhöhten Überleben von Tumorzellen führen [55]. Glioblastome zeigen eine Dysregulation des Lipid-, speziell des Lysophospholipidmetabolismus [10]. Es stellt sich daher die Frage, ob die Modulation der Signalwege des neuronalen Lipidmetabolismus Einfluss auf die neuronale Regeneration und vielleicht auch den Progress primärer Hirntumore nehmen kann. Bereits vorangehende Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass das Auftreten der PRGs in Tumoren variiert und sogar paraneoplastische Antikörper gegen PRG5 ausgebildet werden [33,108,109]. Reduzierte PRG1-Level wurden mit leukämogenen

Prozessen und erhöhte Expressionslevel mit Metastasen solider Tumore assoziiert [55]. Ferner zeigten sich Assoziationen zwischen PRG2, PRG3 und PRG4 mit kanzerogenen Prozessen [55]. Neben direkten Assoziationen mit Tumoren wird über Wechselwirkungen zwischen den *PRG4*-Expressionsmustern und Arzneimittelresistenzen diskutiert [33,50], die somit potenzielle Anknüpfungspunkte für die Therapie von Tumorkranken darstellen. Das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung liegt auf der *PRG-/Prg*-Expression im Glioblastom. Wachsende Glioblastome weisen eine hohe Heterogenität auf, die durch das zeitgleiche Vorliegen verschiedener Zellstadien und Veränderungen im Sinne der Plastizität erklärt werden können [110]. Neben den PRGs sind Gliazellen mitunter für die neuronale Entwicklung und Plastizität von Bedeutung und beeinflussen das neuronale Wachstum sowie die Bildung und Modifikation von Synapsen [84]. Dabei nutzen sie die synaptische Plastizität zusätzlich für ihr eigenes Wachstum [98]. Es stellt sich daher die Frage, ob die Regulation der *Prg*-Expression gliale Tumore in ihrer Fähigkeit der neuronalen Plastizität und dem Tumorstadium verändern kann. Ein vermehrt protektiver Effekt bei Tumorerkrankungen wird möglicherweise durch PRG1 erzielt. Zum einen führt die *Prg1*-Überexpression und der daraus resultierende vermehrt extrazelluläre LPA-Abbau zu einer Abschwächung der LPA-induzierten Neuriten-Retraktion in Neuroblastomzellen [33,69,111]. Zum anderen beeinflusst die *Prg1*-Überexpression positiv pathologisch veränderte Strukturen der Neurone und Dornfortsätze [108]. Erhöhte *Prg1*-Spiegel wirken sich außerdem lindernd auf klinische Symptome wie Schmerzen oder depressionsähnliches Verhalten bei Tumorerkrankungen aus [108]. Bereits nachgewiesene Zusammenhänge zwischen pathologisch modifizierten Dornfortsätzen mit neurologischen Erkrankungen [92] können diese Auswirkungen vielleicht erläutern und somit eine Assoziation zwischen strukturellen und neuronalen Veränderungen durch PRG1 herleiten.

Verknüpfungen zwischen malignem Gliom und PRG3 wurden bereits in tierischen und humanen Modellen beobachtet [112]. Deregulation der *PRG3-/Prg3*-Expression beim malignen Gliom ging mit verstärkter Proliferation, Invasion, reduzierter Apoptose, größerer perifokaler Ödembildung, schlechterem klinischen Ergebnis im Tiermodell und schlechterer Überlebensrate von Patienten und Nagetieren einher [112]. Bei der Deregulation kommt es zu einer breiten Spanne der *PRG3*-Expressionslevel im humanen Glioblastomgewebe [112]. Als Folge der extremen Schwankungen kam es zur Ausbildung länglicher und fusiformer F98-Gliomzellen im Gegensatz zu den polygonalen Gliomzellen der Kontrollgruppe [112]. Neuronale Plastizität, Filopodien- und Neuritenwachstum werden durch PRG3 über die RasGRF1-Signalkaskade induziert [63]. Eine Modifikation der *Prg3*-Expression im malignen Gliom erhöhte die onkogene Ras-Aktivierung über die RasGRF1-Interaktion und resultierte in einer erhöhten Sensitivität für Ras-Inhibitoren [112]. Sogar das Tumorstadium maligner Gliome konnte bei *Prg3*-Überexpression durch Ras-Inhibitoren reduziert werden [112].

Wie bereits vorangehend beschrieben modifizieren die beiden PRGs, PRG3 und PRG5, die neuronale Plastizität. Diese Prozesse können mit dem Rho-Signalweg und Tumorstadium in Verbindung gebracht werden. Mitunter kann der Rho-Signalweg die Morphologie und Dynamik von Dornfortsätzen beeinflussen [92,93]. Darüber hinaus verändert die Aktivierung von Rho durch LPA das Aussehen neuronaler Zellen [35]. Exemplarisch induziert die

Aktivierung des RhoA/ Rho-Kinase Signalwegs durch die Neuritenwachstumsinhibitoren LPA und Nogo-A eine Neuriten- und Filopodien-Retraktion und Rundung der Zelle mit folgendem Axon-Kollaps [64,93]. Bei Applikation von Neuritenwachstumsinhibitoren in PRG3-Neuronen konnte diese Wirkung nicht beibehalten werden [63]. Ebenso kann dieser Mechanismus durch PRG5 abgeschwächt werden [64]. Die Modulation des Rho-GTPase-Signalwegs durch *Prg5*-Überexpression resultierte in einem verzögerten Tumorwachstum, Ausbildung dysfunktionaler kleiner Blutgefäße, vermehrter Tumorzellapoptose und konnte so einen positiven Einfluss auf Gliome ausüben [64,72].

In Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten hirneigene Tumore können spezifische *Prg*-Expressionsmuster mit steigendem Grad der WHO-Klassifikationen assoziiert werden. Die Zunahme des WHO-Grads, insbesondere beim Glioblastom, geht mit einer Reduktion der *PRG5*-Expression einher [72], die durch die minimale bis fehlende geringe *Prg5*-Expression in Astrozyten begründet werden kann [59,68,71]. Ein Zusammenhang zwischen der niedrigen *PRG5*-Expression in humanen Gliomzellen und dem Patientenüberleben ergibt sich nicht [72]. Dagegen resultieren erhöhte *Prg5*-Spiegel in einem verzögerten Gliomwachstum und einer dysfunktionalen Gefäßarchitektur [55]. Erstmalig bieten sich die modifizierten *Prg*-Expressionsmuster für therapeutische Ansatzpunkte bei Gliomen an. Pharmakologische Interventionen mit Sunitinib, mit dem Ziel der Eindämmung der Tumorproliferation des Glioms, blieben bei *Prg5*-Überexpression nicht erhalten [72]. Hingegen konnte Sunitinib positive Effekte auf die Gefäßstruktur der Gliome mit *Prg5*-Überexpression bewirken [72]. *Prg5* kann somit als prädiktiver und prognostischer Biomarker für Patienten mit diffusem Gliom genutzt werden, um Patienten zu identifizieren, die von einer Therapie gegen die kanzerogene Gefäßbildung profitieren würden [72]. Im Rahmen der Ermittlung neuer Therapieansätze dürfen Medikamentenresistenzen nicht unbeachtet bleiben. Therapieresistenz der Gliome gegenüber multimodalen Therapien wird durch die zelluläre Heterogenität, schnelle Proliferation und ihr invasives Wachstum erklärt [55]. Die vorangehend beschriebenen Studienergebnisse führen zu der Fragestellung, ob die Modulation von *Prg5* oder eines anderen *Prgs* Therapieresistenzen umgehen kann und daraus folgend eine Behandlungsstrategie für Gliompatienten darstellt. Ziel sollte dabei die Optimierung der schlechten prognostischen Aussichten für Glioblastompatienten sein [9,14]. Aufgrund des globalen Vorkommens der PRGs im Gehirn und der teils peripheren Expression können unerwünschte Nebenwirkungen der Therapeutika nicht außer Acht gelassen werden [55]. Ein tiefergehendes Verständnis der physiologischen und pathologischen Mechanismen der PRGs gilt es, hierbei in den Vordergrund zu stellen [55].

2. Thesen

Wie vorangehend beschrieben, wurden in gegenwärtigen Forschungsergebnissen zunehmend Zusammenhänge zwischen den PRGs und Tumoren nachgewiesen. Die Bedeutung der PRGs im Glioblastom *in vivo* ist bisher ungeklärt. In diesem Kontext wurde zur Grundlagenforschung in der vorliegenden experimentellen Arbeit die alternierende Phospholipid-Expression aller fünf *PRGs* im humanen Glioblastom *in vivo* bestimmt. Folgende

Thesen sollten im Rahmen dieses Forschungsprojektes bei humanem Gewebe überprüft werden:

1. Zur Beurteilung und für die Entwicklung medizinischer Behandlungsmethoden des Glioblastoms werden zunehmend molekulargenetische Prozesse untersucht. Dadurch gewinnt die Relevanz der einzelnen molekulargenetischen Parameter für die WHO-Klassifikation hirneigener Tumore an Bedeutung. Aktuelle Forschungsergebnisse werfen die Frage auf, welche Rolle den *PRGs* in der Entwicklung beziehungsweise bei dem Progress des Glioblastoms zukommt. Die maligne Transformation des Hirngewebes bewirkt eine signifikante Regulation der messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Level der *PRGs* im humanen Glioblastomgewebe *in vivo* im Vergleich zum Kontrollgewebe *post mortem*.
2. Bisher ist unklar, inwieweit entwicklungsabhängige Expressionsveränderungen der *PrGs* [59,67,68,71] auf den Alterungsprozess des Menschen, insbesondere Tumore, übertragen werden können. Es ist anzunehmen, dass signifikante altersspezifische Unterschiede im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe vorliegen und sich eine Zunahme dieser Unterschiede insbesondere bei älteren Glioblastompatienten aufzeigt.
3. Es liegt eine geschlechtsspezifische Verteilung des Glioblastoms zu Ungunsten der männlichen Bevölkerung vor. Eine geschlechtsspezifische *PRG*-Expression ist zu erwarten.
4. Die Methylierung des MGMT-Promoters ist ein Vorteil für das Therapieansprechen auf Temozolomid und wirkt sich somit positiv auf das Überleben der Patienten aus [15,19,113]. Der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters beeinflusst die *PRG*-Expression.

Unterstützend galt es zu ermitteln, inwiefern die *in vitro*-Bedingungen Einfluss auf die *PRG*-Expression in Glioblastomzellen haben. Im Mittelpunkt steht dabei die Untersuchung eines humanen *In-vitro*-Modells durch Analyse der HROG-Zelllinien. In Anbetracht dessen erfolgte die Prüfung der folgenden Thesen:

5. Mit dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters assoziierte Änderungen der *PRG*-mRNA *in vivo* können im *In-vitro*-Modell bestätigt werden.
6. Unabhängig von der Behandlungsmethode wird ein methylierter MGMT-Promoter mit einer längeren medianen Überlebenszeit assoziiert [114]. Die Patientenpopulation des humanen *In-vitro*-Modells zeigt eine längere Überlebenszeit bei Vorliegen eines methylierten MGMT-Promoters.
7. Die kombinierte Expression der *PrGs* führt zu einer zeitgleichen Erhöhung einzelner *PRG*-Proteinkonzentrationen [115]. Durch gleichzeitige Koexpression einer weiteren *PRG*-mRNA wird die Detektion des untersuchten *PRG*-Signals gesteigert.

8. Die Modifikation der Prozesse der neuronalen Plastizität ist eine elementare Fähigkeit der PRGs. Dabei beeinflussen die PRGs den Phänotyp, indem sie strukturelle Veränderungen an neuronalen Zellen hervorrufen. Insbesondere die Koexpression von *PRG3* und *PRG5* kann strukturelle Modifikationen glialer Zellen hervorrufen.
9. Derzeit gibt es keine Empfehlungen für eine Standardbehandlung von Patienten mit einem Rezidiv-Glioblastom [9]. Mit Hinblick auf Ansatzpunkte für zukünftige molekulargenetische Behandlungsmethoden, kann bei einem Tumorrezidiv im Gegensatz zu einem erstmaligen Glioblastom-Nachweis eine Veränderung der *PRG*-Expression festgestellt werden.

Im Sinne der translationalen Forschung gilt es zu ermitteln, welche Auswirkungen die Implantation der F98-Gliomzelllinie in die Ratte auf molekulargenetischer Ebene hat.

10. Auf Grund der frühzeitigen Entnahme der Gewebe ist kein infiltratives Tumorstadium in der kontralateralen Hemisphäre des F98-Gliom-Modells zu erwarten. Dadurch liegen zwischen der kontralateralen Hemisphäre des F98-Gliom-Modells und den Sham-behandelten Tieren vergleichbare *Prg*-Expressionsmuster vor. Durch das fehlende infiltrative Gliomwachstum der F98-Gliomzelllinie in der kontralateralen Hemisphäre des F98-Gliom-Modells kann diese als Kontrollgruppe etabliert werden.
11. Externe und interne Faktoren beeinflussen die Genexpression und verhindern eine Übereinstimmung der *Prg*-Expression der Tumorzelle *in vitro* mit der implementierten F98-Gliomzelllinie *in vivo* (ipsilateralen Hemisphäre des F98-Gliom-Modells).
12. Die Implementierung der F98-Gliomzelllinie im Rattengewebe führt zur signifikanten Regulation der *Prg*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre des F98-Gliom-Modells im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die vorliegende experimentelle Arbeit widmet sich außerdem der Fragestellung, ob ein Vergleich der drei Modelle untereinander möglich ist.

13. Die Grundlagenforschung durch Anwendung des humanen *In-vitro*-Modells sowie des *In-vivo*-Tiermodells kann nicht im Sinne der translationalen Medizin auf den Menschen übertragen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Die Nennung zahlreicher Materialien ohne ® und ™ Zeichen, schließt nicht aus, dass es sich hierbei um geschützte Produkte handelt.

3.1.1. Gewebe und Zelllinien

3.1.1.1. Humane Gewebeproben

Zur Expressionsanalyse humaner Tumorproben des Cerebrums wurden durch das Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin Hirngewebe aus 25 neurochirurgischen Eingriffen mit Tumorerkrankung zur Verfügung gestellt. Die humanen Gewebeproben der Kontrollgruppe wurden durch das Institut für Rechtsmedizin und das Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock sowie das Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin bereitgestellt. Die Patienteninformationen sind im Appendix „Tabelle 21“ und „Tabelle 22“ zusammengefasst. Die Vorgänge bis zu der Gewebeaufarbeitung und die Bereitstellung der Patienteninformationen lagen in der Verantwortung der entsprechenden Institute. Die Arbeit wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki in der Version von 2013 von Fortaleza, nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung durchgeführt. Für Prozeduren lag ein positives Votum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Referenznummer: A2015-0143 und A2016-0083 (Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock)) und der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Referenznummer: EA2/101/08) unter den generell akzeptierten Richtlinien für die Nutzung humaner Materialien vor.

3.1.1.2. HROG – Humane Tumorzelllinien

Die durch den Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock etablierten HROG-Zelllinien aus humanem Gliomen [116-118] und ihre Patienteninformationen (siehe „Tabelle 23“) wurden für die präklinische Analyse humaner *PRG*-Expressionsmuster durch den Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie zur Verfügung gestellt (Abb. 3). Die Verantwortung bis zum Zeitpunkt der Verarbeitung der Zellpellets oder isolierten Ribonukleinsäure (RNA) sowie Bereitstellung der Patienteninformationen und Angaben zur RNA-Masse (siehe „Tabelle 23“ und „Tabelle 32“) lag bei dem Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie. Für die Bearbeitung der Proben lag ein Ethikvotum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vor (Referenznummer: A 2009/34 (Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie)).

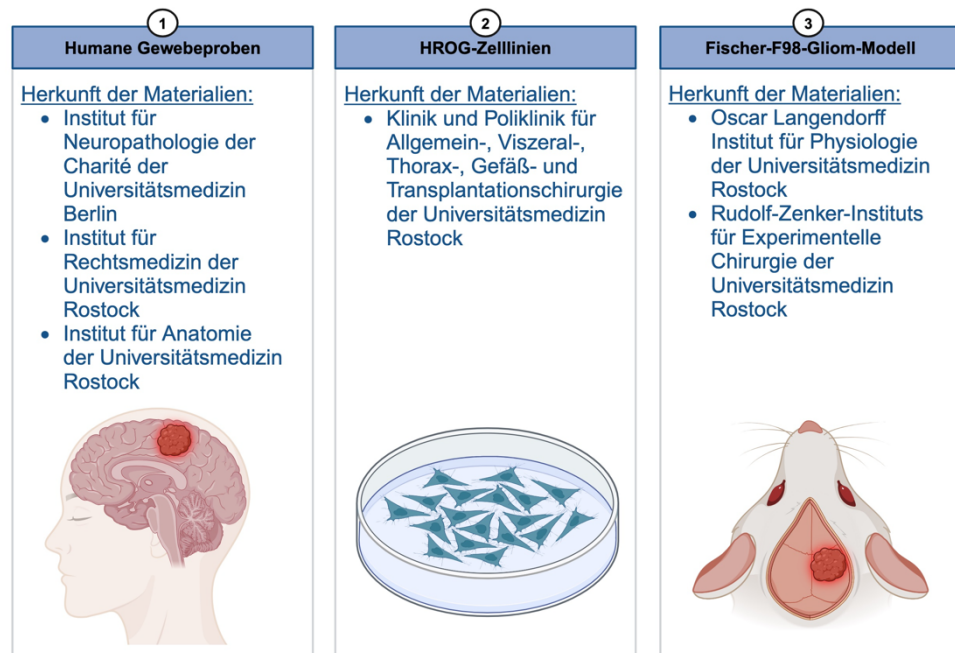
3.1.1.3. Tiermodelle: Fischer-F98-Gliom-Modell und Wistar-Ratte

Das Cerebrum der unbehandelten Wistar-Ratte für die experimentelle Etablierung der Methoden am Rattenmodell wurde durch das Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock und dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Das Oscar Langendorff Institut für Physiologie stellte zur Validierung der humanen Daten neun männliche Versuchstiere (Fischer-Ratten) für intrazerebrale Gen-Analysen bereit und führte nach etwa zwei Wochen die stereotaktische Implantation der F98-Gliomzelllinie mit späterer Dekapation der Ratte durch (Abb. 3). Die Zellpellets („Tabelle 25“) von acht implantierten F98-Gliomzelllinien wurden dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock durch das Oscar Langendorff

Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen mit Beachtung der deutschen Gesetze, des Tierschutzrechtes und der Tierversuchsverordnung und den Richtlinien der Europäischen Kommission (Direktive 86/609/EEC und 2010/63/EU) gehalten. Für das Fischer-F98-Gliom-Modell wurden die Prozeduren durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (Referenznummer für das Fischer-F98-Gliom-Modell: LALLF M–V/TSD/7221.3-1.1-017/14) unter den generell akzeptierten gesetzlichen Bestimmungen der örtlichen Kontrollbehörde für die Nutzung tierischer Materialien genehmigt. Die Tiertötung der unbehandelten Wistar-Ratte erfolgte nach § 4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes zu wissenschaftlichen Zwecken für die Organentnahme des Gehirns.

Abbildung 3:
Verwendete Gliom-Modelle dieser Arbeit.

Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten prä-klinischen und humanen Gliom-Modelle. Die Verantwortung der Bereitstellung der jeweiligen Materialien in Form von Geweben, Zellpellets, in seltenen Fällen isolierter RNA oder in einzelnen Fällen cDNA lag bei den entsprechenden Kooperationspartnern. Die humanen Gewebeproben wurden von



dem Institut für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin sowie dem Institut für Rechtsmedizin und dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Aliquotierte Proben oder RNA der HROG-Zelllinien wurden durch die Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die F98-Gliomzelllinien und die in vivo Gewebeproben der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells wurden durch das Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Vorab wurde eine unbehandelte Wistar-Ratte durch das Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die relative mRNA-Expression der *PRGs/PrGs* wurde mithilfe der quantitativen Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) dieser einzelnen Proben quantifiziert. Diese Graphik wurde mit Biorender.com kreiert.

3.1.2. PCR-Primer

Primer	Spe-zies	Hersteller	DNA-Oligonukleotid-Sequenz	Annealing-Tempe-ratur I [°C]	GC-Ge-halt [%]
<i>ACTB</i> 3', Forward Primer	Human	Eurofins Genomics GmbH, Deutschland	5'-ACCACGGCCGAGCGGGAAATCGT GCGTGA-3' (Basenanzahl: 29)	73,7	65,50
<i>ACTB</i> 5', Reverse Primer	Human		5'-TGCGGTGGACGATGGAGGGGCCG GACT-3' (Basenanzahl: 27)	74,1	70,40

Primer	Spezies	Hersteller	DNA-Oligonukleotid-Sequenz	Annealing-Temperatur I [°C]	GC-Gehalt [%]
<i>ACTB</i> 3 (neu), Forward Primer	Human	metabion international AG, Deutschland	5'-CCGAGCGGGAAATCGTGCGTGA-3' (Basenanzahl: 22)	65,8	63,60
<i>ACTB</i> 5' (neu), Reverse Primer	Human		5'-GGGCCGGACTCGTCATACTCCT-3' (Basenanzahl: 22)	65,8	63,60
30 mer β -Aktin 3' (<i>Actb</i>), Reverse Primer	Maus/Ratte		5'-TGCGGTGCACGATGGAGGGGCGG GACT-3' (Basenanzahl: 27)	77	70,40
30 mer β -Aktin (<i>Actb</i>) 5'; Forward Primer	Maus/Ratte		5'-CACCACAGCTGAGAGGGAAATCGT GCGTGA-3' (Basenanzahl: 30)	75	56,70

Tabelle 2: Eingesetzte DNA-Oligonukleotide als Primer der PCR.

Auflistung der in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzten Oligonukleotide. Die Etablierung des humanen und des rodenten Aktin, Beta (*ACTB/Actb*)-Primer wird im Appendix näher erläutert (siehe „Etablierung des humanen *ACTB*-Primers“ und „Etablierung des *Actb*-Primers für das Fischer-F98-Gliom-Modell“).

3.1.3. TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR

Primer	Spezies	Assay-ID	Größenordnung/ Katalog-Nr.	Farbstoff	Amplifikationslänge
<i>Prg1</i>	Ratte	Rn01522267_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	95
<i>Prg2</i>	Ratte	Rn00710831_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	70
<i>Prg3*</i>	Ratte	Rn01640210_m1	XS: 75 rxns/ 4448892	FAM-MGB	77
<i>Prg3#</i>	Ratte	Rn01640214_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	72
<i>Prg4</i>	Ratte	Rn00460732_g1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	62
<i>Prg5</i>	Ratte	Rn01523296_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	63
<i>Gapdh</i>	Ratte	Rn99999916_s1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	87
<i>Hprt1</i>	Ratte	Rn01527838_g1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	100
<i>PRG1</i>	Human	Hs01592363_m1	M: 750 rxns/ 4351370	FAM-MGB	75
<i>PRG2</i>	Human	Hs00227602_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	96
<i>PRG3</i>	Human	Hs01121344_m1	M: 750 rxns/ 4351370	FAM-MGB	78
<i>PRG4</i>	Human	Hs01106565_m1	S: 250 rxns/ 4331182	FAM-MGB	76
<i>PRG5</i>	Human	Hs01396533_m1	M: 750 rxns/ 4351370	FAM-MGB	91
<i>HPRT1</i>	Human	Hs01003270_g1	M: 750 rxns/ 4351370	FAM-MGB	127
<i>TBP</i>	Human	Hs00427620_m1	M: 750 rxns/ 4351370	FAM-MGB	91

Tabelle 3: Angewandte TaqMan® Gene Expression Assays in der qRT-PCR.

Kennzeichnung der angewendeten TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR, die von dem Hersteller Thermo Fisher Scientific Inc., USA bezogen wurden. *Prg3#* ist der primär genutzte Primer im Fischer-F98-Gliom-Modell und bei *Prg3** handelt es sich um den zweiten Primer, der hauptsächlich Verwendung bei dem Fischer-F98-Gliom-Modell fand. Erläuterung der Namensgebung der Assay-ID: Die ersten zwei Positionen beschreiben die Spezies, für die der Assay hergestellt wurde (Rn = *Rattus norvegicus*, Hs = *Homo sapiens*) [119]. Das Suffix der Assay-ID kennzeichnet die Assay-Platzierung (_m = Sonde überspannt einen Exon-Exon-Übergang und detektiert somit keine gDNA; _s = Sonde ist mit einem einzigen Exon konzipiert und kann gDNA detektieren; _g = Sonde überspannt einen Exon-Exon-Übergang, kann aber unter Umständen gDNA detektieren) [119].

3.1.4. Kits und Assays

Kits und Assays	Hersteller	Katalog-Nr./ ID
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	4368814

Kits und Assays	Hersteller	Katalog-Nr./ ID
TaqMan® Gene Expression Assays		Siehe „Tabelle 3“, Absatz „TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“
Invisorb® Spin Tissue Mini Kit*	STRATEC Biomedical AG, Deutschland	1032100300
Rneasy Plus Mini Kit	QIAGEN GmbH, Deutschland	74136
GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit	EURx Ltd, Polen	E3598-02

Tabelle 4: Kits und Assays dieser Arbeit.

Es erfolgte die experimentelle Anwendung dieser Kits und Assays. *Bei dem Invisorb® Spin Tissue Mini Kit mit Anwendung der Proteinase K.

3.1.5. Geräte

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
Gelelektrophorese Kammer	Stratagene, USA	Pipetten	Gilson, Inc., USA
BioAir 1.8	Nalge Nunc International Cooperation, USA	PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
7900HT Fast-Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Präzisionswaage 440-33N	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Advanced Vortex Mixer – ZX3	VELP Scientifica Srl, Italien	Primus 25 advanced® Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Eppendorf BioSpectrometer® basic	Eppendorf, Deutschland	Reagenzglasschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Deutschland
Heraeus® Biofuge® Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland	Rotilabo®-Signal-Timer mit Zeituhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Inkubationsschüttler, Thriller®	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	Samsung WB850F Smart-Digitalkamera	Samsung Group, Südkorea
Manitowoc Flockeneisbereiter RF 0244 A	Manitowoc Ice, Inc., USA	Sunlab Rollenmischer SU 1400	Sunlab Germany, Labdiscount GmbH, Deutschland
Mastercycler® nexus gradient (Mastercycler nexus Software: 3.4.0.0)	Eppendorf, Deutschland	ThermoMixer® C	Eppendorf AG, Deutschland
Mighty Bright Transilluminator Modell UVTL – 40	Hoefer Scientific Instruments, USA	Tiefkälte-Lagertruhen KLT 4785 – 1	Krytec-Kryosafe GmbH, Deutschland
MiniStar silverline	VWR International GmbH, Deutschland	Ultra-Turrax® T8	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Universalzentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0	Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland
Panasonic NN – K129M Mikrowelle	Panasonic Corporation, Japan	Varioklav® Dampfsterilisator 400	H + P Lbortechnik GmbH, Deutschland
PCR-Cooler 0.2ml	Eppendorf, Deutschland	VWR® Standard Hot Plate Stirrer	VWR International GmbH, Deutschland
PerfectBlue™ Gelsystem Mini M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	Wasserbad WB20	P-D Industriegesellschaft GmbH Prüfungsgerätewerk Dresden, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland	Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
Pipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	-	-

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte und ihre Hersteller.

3.1.6. Software und Datenbanken

Software/ Datenbank	Firma/ Anbieter
ApE – A plasmid editor Version 2.0.47	M. Wayne, Davis, USA; http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
Applied Biosystems 7900HT Fast-Real Time PCR System Software (SDS 2.3 und RQ Manager 1.2)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
AxioVision, Release 4.9.1 SE64	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
BioRender in der jeweils aktuellsten Online-Version	Science Suite Inc., Kanada
Blast® Blastn Suite	NCBI, U.S. National Library of Medicine, USA
CLC Sequence Viewer 7.8.1	QIAGEN GmbH, Deutschland
Microsoft Office 2016 (Microsoft Excel 2016)	Microsoft, USA
NanoDrop 1000 Software, Version 3.3	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
GaphPad Prism Version 5.01 bis Version 9.3.1 (350)	GaphPad Software, Inc., USA

Tabelle 6: Verwendete Software von Geräten, online Software und Datenbanken.

3.1.7. Glossar der regelmäßig verwendeten Einweg- und Mehrwegmaterialien

Produkt	Hersteller	Produkt	Hersteller
Einmalspritzen BD Discardit™ II 5ml	Becton, Dickinson and Company, USA	Pipettenkarussell 2	Eppendorf AG, Deutschland
UV-durchlässiger Gelträger mit Dichtungen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	Pipettenspitzen „Bevel Point™“	VWR International GmbH, Deutschland
Combs for PerfectBlue™ Gel System Mini M, Standardkamm, 1,5 mm, 10 Zähne, 38 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland	Pipettenspitzen „UltraFine™“	VWR International GmbH, Deutschland
Duran® Erlenmeyerkolben, 200ml	DWK Life Sciences GmbH, Deutschland	Pipettenspitzen, Standard	VWR International GmbH, Deutschland
Duran® Messzylinder, 100ml	DWK Life Sciences GmbH, Deutschland	Rasierklängen, Carbonstahl, GEM, extra scharf	Campden Instruments LTD, Großbritannien
ep Dualfilter T.I.P.S.®	Eppendorf AG, Deutschland	Rotilabo®-Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Knochensplitterzange	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Deutschland	Rotilabo®-Cryoboxen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
ep Dualfilter T.I.P.S.® SealMax	Eppendorf AG, Deutschland	Rotilabo®-Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Deutschland	Rotilabo®-Reaktionsgefäßständer 2 in 1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
KIMTECH SCIENCE® Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional TM, USA	Skalpelle, Präzisa Plus, Einweg	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Deutschland
Multi®-Ultra PCR-Tubes 0,2 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	Spezialvernichtungsbeutel CPP	nerbe plus GmbH, Deutschland

Produkt	Hersteller	Produkt	Hersteller
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1mL	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Stegeinsätze aus Karton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Sterican® Tief-intramuskulär, 20G x 2 3/4"	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Multi-Safe euroMatic® 6000	Sarstedt AG & Co, Deutschland	Sterican® zur Neuraltherapie, 23G x 23/8"	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
PIPETMAN TIPS Diamond – Sterilized Filter Tips	Gilson, Inc., USA	Zentrifugenröhrchen, Falcon® 50ml	VWR International GmbH, Deutschland

Tabelle 7: Nennung der regelmäßig verwendeten Ein- und Mehrwegmaterialien.

3.1.8. Glossar der angewandten Verbrauchskemikalien

Substanzbezeichnung	Hersteller	Anwendungsgebiet
BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	multiple
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland	Gelelektrophorese
Borsäure ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	Gelelektrophorese
Ethylenediaminetetraacetic acid BioUltra, ≥ 99.0 % (KT)	Merck KgaA, Deutschland	Gelelektrophorese
HyperLadder™ 1Kb	BIOLINE Reagents Ltd, Großbritannien	Gelelektrophorese
Natriumhydroxid z.A.	Erba Lachema, s.r.o., Tschechien	Gelelektrophorese
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 1 ml	iNtRON Biotechnology, Korea	Gelelektrophorese
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	Gelelektrophorese
5X Green GoTaq® Flexi Buffer*	PROMEGA GmbH, Deutschland	PCR
dNTP Mix, 10mM	PROMEGA GmbH, Deutschland	PCR
GoTaq® Hot Start Polymerase	PROMEGA GmbH, Deutschland	PCR
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid), 25mM	PROMEGA GmbH, Deutschland	PCR
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	qPCR
Chloroform for gas chromatography ECD and FID SupraSolv®	Merck KgaA, Deutschland	RNA-Isolation
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	RNA-Isolation
Ethanol 96 % vergällt mit ca. 1 % MEK	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	RNA-Isolation
USP WFI bulk Sterile filtered 500ml	LONZA, Belgien	RNA-Isolation
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	RNA-Isolation, gDNA-Isolation
Rnase AWAY®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland	RNA-Isolation, qPCR
RnaseZap™ Rnase Decontamination Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	RNA-Isolation, qPCR

Tabelle 8: Listung der angewandten Verbrauchskemikalien mit der Einordnung ihrer methodischen Verwendung.

*Im Green GoTaq® Flexi Buffer war der Loading Dye enthalten.

3.2. Methoden

3.2.1. Prozess der Bereitstellung der zu untersuchenden Gewebe und Zellpellets

3.2.1.1. Gewinnung von humanem Glioblastomgewebe und humanem Kontrollgewebe

25 humane Glioblastomgewebe wurden nach neurochirurgischer Resektion durch PD Dr. med. Arend Koch vom Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Als Kontrollgruppe wurden 17 humane Hirngewebeproben aus Autopsien neurologisch unauffälliger Patienten durch Prof. Dr. med. Andreas Büttner vom Institut für Rechtsmedizin, Prof. Dr. med. Andreas Wree vom Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock und PD Dr. med. Arend Koch vom Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin bereitgestellt. Humanes Tumorgewebe wurde postoperativ und humanes Kontrollgewebe *post mortem* nach der Entnahme mit flüssigem Stickstoff kryoasserviert. Für die Überprüfung des Gewebes wurden nach Durchführung eines Schnellschnitts repräsentative Gewebeanteile an einem Kryostaten geraspelt und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.1.2. Generierung von Zellpellets der HROG-Zelllinie

Ergänzend zu den humanen Gewebeproben wurden humane Zelllinien von PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher vom Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Quantifizierung der Genexpression bereitgestellt. Zum besseren Verständnis der Methodik im Umgang mit diesen Zellkulturen durch die Kooperationspartner wird in diesem Abschnitt näher darauf eingegangen. Bereits vorangehend war die Etablierung der HROG-Zelllinien erfolgt [118]. Die Kultivierung der Zellen fand in T 175-Zellkulturflaschen mit einem Kulturmedium (Flüssigmedium DMEM/Ham's F12, 10 % Fetalem Kälberserum (FCS, Fetal calf serum) und 2 mM L-Glutamin, PAN-Biotech GmbH, Deutschland) bei 37 °C in einem 5 %-CO₂-Inkubator statt [116,118]. Die jeweiligen Zellen wurden ein- bis dreimal pro Woche passagiert. Die Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgten unter einer Sterilwerkbank (BioAir 1.8; Nalge Nunc International, USA) der Sicherheitsstufe II [118]. Durch Inkubation von Trypsin wurden die Zellen getrennt und die Zellzahl anschließend mithilfe der Neubauer-Kammer gezählt [118]. Für die Gewinnung des Zellpellets erfolgte die Waschung der Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) [118]. Anschließend wurden 1 Million Zellen des Zellpellets in 1,5 ml Gefriermedium (Fetales Kälberserum (FCS) (PAN-Biotech GmbH, Deutschland) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem GmbH, Deutschland)) in einem Kryoröhrchen resuspendiert und stufenweise mit einer Temperaturreduktion von 1 °C pro Minute in einem Gefrierbehälter abgekühlt und bei -80 °C gelagert [118]. Neben den regulär etablierten HROG-Zelllinien aus humanen Gliomen [116-118] wurden zur Überprüfung des Einflusses der Konfluenz der Zellen sowie des Zellmediums auf die Genregulation in den HROG-Zelllinien, die Zelllinien HROG06 sowie HROG15 in Zellkulturen mit modifizierter Konfluenz der Zellen und in unterschiedlichen Kulturmedien durch geschultes Personal angelegt. Die erste Gruppe wurde in einem normalen Kulturmedium (10 % FCS) mit einer Konfluenz von 90 % angesetzt [116,117]. Bei der zweiten Gruppe wurde eine Konfluenz von 50 % in dem „standardisierten“ Kulturmedium angelegt.

Innerhalb der dritten Zellkultur erfolgte die Nutzung eines Kulturmediums ohne FCS-Zusatz mit einer Konfluenz von 50 %. Der dritten Gruppe wurde nach 4 bis 5 Stunden (h) das „standardisierte“ Kulturmedium als Nährmedium entzogen. Die Zellen der dritten Gruppe wurden mit sterilem PBS gewaschen, um die Überreste des FCS zu entfernen. Nach dem Absaugen des ehemaligen Mediums wurde ein Kulturmedium ohne FCS verwendet. Sofern nicht anders erwähnt wurden die Zellen als Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und als 90 % konfluente Zellpellets oder als isolierte RNA bei -80 °C in einem Mikroreaktionsgefäß gelagert zur Verfügung gestellt.

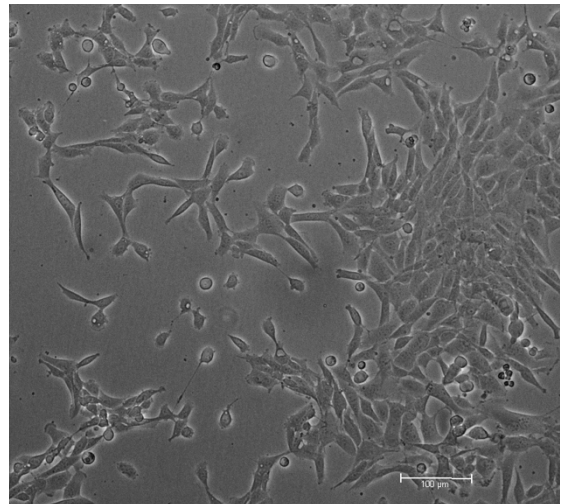


Abbildung 4: Mikroskopische Betrachtung der F98-Zelllinien.

Visualisierung der F98-Gliomzellen (Passage 44). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock.

3.2.1.3. Methoden-Etablierung für das Rattenmodell

Die Großhirnhemisphären einer weiblichen, unbehandelten Wistar-Ratte vom Wildtyp wurden durch Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar vom Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die Hirngewebeproben dienten der experimentellen Etablierung der einzelnen Methoden des Rattenmodells.

3.2.1.4. Stereotaktische Etablierung des Fischer-F98-Gliom-Modells

Die Gewebeproben und Zellpellets des Fischer-F98-Gliom-Modells wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. med. Timo Kirschstein und Dr. rer. nat. Falko Lange vom Oscar Langendorff Institut für Physiologie bereitgestellt. Für das bessere Grundverständnis des Fischer-F98-Gliom-Modells wird der operative Eingriff durch die Kooperationspartner an dieser Stelle erläutert. Die F98-Gliomzelllinie (Abb. 4) wurde im Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)/F-12 (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 10 % FCS (Bio&SELL GmbH, Deutschland) bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ gezüchtet [120]. Die entsprechenden Zellpellets wurden im Gefriermedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem GmbH, Deutschland)) bei -80 °C gelagert. Die männlichen Versuchstiere wurden in einem künstlichen 12 Stunden hell-dunkel-Rhythmus und einer Raumtemperatur von 24 °C ($\pm$ 2 °C) in den Tierställen gehalten [120]. Zur Etablierung des Fischer-F98-Gliom-Modells wurden die Fischer-Ratten im Alter von 8-10 Wochen operativ

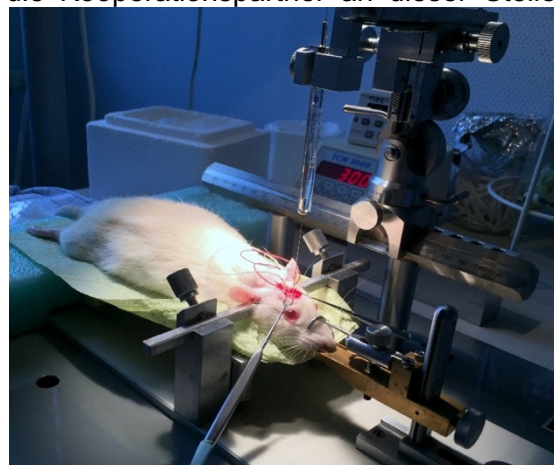


Abbildung 5: Stereotaktische Implantation der F98-Gliomzellen in die Fischer Ratte.

Darstellung der stereotaktischen Implantation der F98-Zellsuspension in die Großhirnhemisphäre der männlichen Fischer-Ratte im Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock.

durch geschultes Personal behandelt. Unter intraperitonealer Verwendung eines gewichtsadaptierten Narkosegemischs (Ketanest® S (25 mg/ml Esketaminhydrochlorid; Pfizer Deutschland GmbH, Deutschland), Rompun® 2 % Injektionslösung (Xylazin-hydrochlorid 23,32 mg/ml; Bayer Vital GmbH, Deutschland)) von 0,5 ml pro 100 g Körpergewicht erfolgte die Fixierung des Kopfes in einem stereotaktischen Rahmen (Narishige Group, Japan) [120]. Durch das Auffinden von Bregma und Bestimmung der regulären Bohrloch-Koordinaten (relativ zum Bregma: posterior -1,8 mm (Long, X); 2,5 mm links (Trans, Y); und 2 mm tief (Vertikal, Z)) konnte, nach Eröffnung der Schädelkalotte, die unilaterale, stereotaktische Implantation der F98-Gliomzelllinien in den Hippocampus erfolgen (Abb. 5). Tumortragenden Tieren wurde über 20 Minuten 0,5 µl/min der Zellsuspension mit 10^5 F98-Zellen in 10 µl PBS injiziert. Die verwendeten Tiere präsentierten alle ein sichtbares Tumorwachstum an der Injektionsseite. Den scheinoperierten Tieren wurden im Vergleich zu den tumortragenden Ratten nur 10 µl PBS injiziert. Anschließend wurden die Bohrlöcher mittels eines lichterhärtenden Haftvermittlers (Heliobond; Ivoclar Vivadent AG, Fürstentum Liechtenstein) und Naht verschlossen [120]. Zwei Wochen postoperativ erfolgte die Dekapitation der Versuchstiere mit Entnahme der ipsi- und kontralateralen Großhirnhemisphäre und anschließender Kryokonservierung der jeweiligen Gewebeproben bei -80 °C.

3.2.2. Molekularbiologische Gewebeaufarbeitung

3.2.2.1. RNA-Isolation mit Bestimmung der Konzentration und Reinheit

Die unterschiedlichen Gewebe und Zellen wurden mit drei verschiedenen Methoden der RNA-Isolation unter Verwendung von RNase-freien Materialien aufgearbeitet. Die RNA wurde sofern nicht anders beschrieben entsprechend den Angaben und Empfehlungen der Hersteller isoliert und anschließend bei -80 °C gelagert:

1. Humane Gewebeproben, Gewebeproben der Ratte, F98-Gliomzellen sowie die HROG06- und HROG15-Zellpellets mit modifizierter Konfluenz der Zellen und Zellmedium wurden mit dem TRIzol™ Reagent bearbeitet. Bei den HROG-Zellpellets mit einer Konfluenz von 90 % lagen circa 3 Millionen und bei 50 % circa 1,5 Millionen Zellen vor. Zur RNA-Isolation der F98-Zellpellets wurden 10^5 Zellen verwendet. Die Zellpellets wurden in 1 ml und die Gewebeproben in Abhängigkeit von ihrer Menge in gefrorener Form in TRIzol™ Reagent lysiert. Homogenisiert wurde das Lysat durch den Ultra-Turrax® T8 oder durch Einmalspritzen mit anschließender zehnminütiger Inkubation auf dem Sunlab Rollenmischer SU 1400. Am Ende der Isolation wurde das RNA-Pellet 30 Minuten (min) getrocknet und anschließend in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.
2. Die RNA-Isolation des HROG02-Zellpellets erfolgte nach Angaben des Herstellers des Protokolls für die Reinigung totaler RNA von tierischen Zellen („Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells“) mithilfe des Rneasy Plus Mini Kit. Nach der Isolation wurde die RNA in 60 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.
3. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle weiteren HROG-Zelllinien durch Anwendung des GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx Ltd, Polen) mit dem Zellkultur RNA-Reinigungsprotokoll (Cell Culture RNA Purification Protocol) bei der Nutzung von 3 Millionen Zellen pro Zellpellet durch den Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-,

Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock aufgearbeitet. Ebenfalls wurde auch der Schritt des optionalen DNase-Verdaus durchgeführt.

Zur Nukleinsäure-Quantifizierung erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation die fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Proben anhand der Absorption im UV-Bereich bei 260 und 280 nm [121] mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer und dem Eppendorf BioSpectrometer® basic unter Nutzung von 1,4 µl oder 2 µl RNA-Suspension. Für die Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient mit dem Zielbereich $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$ verwendet [121]. In experimentellen Studien werden mitunter Werte außerhalb dieses Normbereichs akzeptiert [121], da abweichende Werte mitunter durch veränderte pH-Konzentrationen hervorgerufen werden können [122]. Ergebnisse unter 1,8 sprechen für eine Verunreinigung durch Eiweiße [121]. Aufgrund einer eingeschränkten Verfügbarkeit der Gewebeproben und Zellen für diese Arbeit wurden ebenfalls Resultate außerhalb dieses Normbereichs toleriert (siehe „Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA in humanen Gewebeproben *in vivo* und *post mortem*“, „Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der humanen Zelllinien“ und „Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells“). Es liegen nicht für alle RNA-Proben der zur Verfügung gestellten HROG-Zelllinien die A_{260}/A_{280} -Werte vor. Die RNA-Konzentration wird fotometrisch mithilfe der Formel $C_{RNA} [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$ [40] ermittelt [121]. Anhand der Bestimmung der RNA-Konzentration wurde zur Erreichung einer optimalen Ausgangskonzentration von 1 µg/µl für die cDNA-Synthese eine weitere Verdünnung der RNA mit Nuklease-freiem Wasser vorgenommen.

3.2.2.2. gDNA-Isolation

Zur Isolierung der genomischen DNA (gDNA) mit dem Invisorb® Spin Tissue Mini Kit aus dem humanen (graue Hirnsubstanz von Proben-ID 301) und rodenten Cerebrum (unbehandelte Wistar-Ratte) wurde nach den Angaben des Herstellers entsprechend dem Protokoll der „DNA-Isolation für 0,5 – 40 mg eingefrorenes Biopsiegewebe“ (Protocol 1: DNA isolation from 0.5 – 40 mg tissue, biopsy sample frozen section, insects, rodent tail (up to 1.2cm) and food sample from animal origin) gearbeitet. Eluiert wurde die gDNA in 200 µl Elution-Puffer D. Die isolierte gDNA diente der Evaluation einer Kontamination der umgeschriebenen RNA in cDNA während der PCR und Gelelektrophorese. Exemplarisch konnte die Gelelektrophorese der isolierten humanen gDNA unter Verwendung verschiedener gDNA-Mengen dargestellt werden (siehe „Abb. 6“).

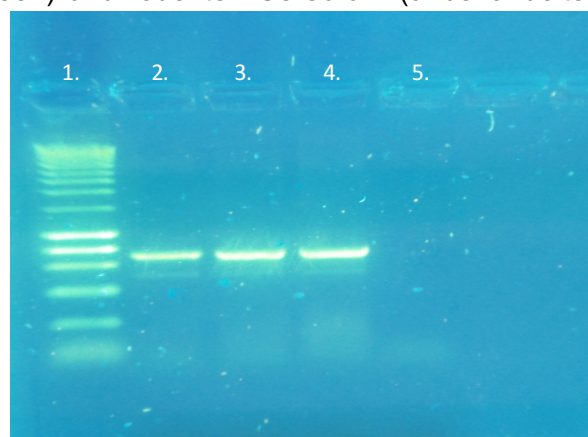


Abbildung 6: Digitale Darstellung der humanen gDNA nach der Gelelektrophorese.

Gelelektrophorese der isolierten humanen gDNA (weiblich, Temporallappen) mit unterschiedlichen Volumina der gDNA. 1. Hyperladder, 2. gDNA 0,5 µl, 3. gDNA 1 µl, 4. gDNA 2 µl, 5. Nuklease-freies Wasser. Die deutlichste Bande ist bei einer Menge von 2 µl gDNA zu sehen.

3.2.2.3. cDNA-Synthese

In abgewandelter Form der Herstellerangaben wurde der Schritt der reversen Transkription zur Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit durchgeführt. In Abhängigkeit von der isolierten RNA-Masse wurden drei verschiedene cDNA-Mastermix-Ansätze genutzt (siehe „Tabelle 9“). Bei dem Vorliegen von > 3,5 µg RNA wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl vorbereitet. Ein 30 µl-Reaktionsansatz wurde bei den humanen Gewebeproben < 3,5 µg RNA hergestellt. Für die reverse Transkription der HROG-Zelllinien-RNA wurde bei RNA-Masse ≤ 2 µg ein Reaktionsvolumen mit 20 µl angesetzt. Das beizufügende RNA-Volumen wurde wie folgt berechnet: $\text{RNA - Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{optimale RNA-Masse } [\mu\text{g}]}{\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$. Zum Erreichen des gewünschten Reaktionsvolumens wurde RNase-freies Wasser hinzugegeben. Für den Schritt der reversen Transkription wurden die Reaktionsgefäße zuerst 10 min bei 25 °C und 300 rpm und danach für 120 min bei 37 °C und 0 rpm in dem ThermoMixer® C inkubiert. Die Einzelstrang-cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Zum Ausschluss einer DNA-Kontamination konnte ein zeitgleicher Ansatz mit Zugabe des Enzyms MultiScribe™ Reverse Transcriptase, nur experimentell beim Vorliegen einer RNA-Masse über 1 µg durchgeführt werden.

Substanz	20 µl-Reaktionsansatz	30 µl-Reaktionsansatz	50 µl-Reaktionsansatz
10X RT Buffer	2 µl	3 µl	5 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0,8 µl	1,2 µl	2 µl
10X Random Primers	2 µl	3 µl	5 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl	1,5 µl	2,5 µl
optimal genutzte RNA-Masse	2 µg	3 µg	5 µg

Tabelle 9: Mastermix-Reaktionsansätze für das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

3.2.2.4. PCR und Gelelektrophorese

Die Amplifikation des Referenzgens (Housekeeping-Gen, Kontrollgen) beta Aktin (*ACTB/Actb*) diente durch seine konstitutive nicht regulierte Expression der Verifikation der umschriebenen RNA in cDNA. Für diesen Prozess wurden neue *ACTB-/Actb*-Primer etabliert (siehe „Etablierung des humanen *ACTB-Primers*“, „Etablierung des *Actb-Primers* für das Fischer-F98-Gliom-Modell“). Der PCR-Ansatz setzte sich aus 5 µl 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), je 1 µl 3'- und 5'-ACTB-Primer (10 mM), 0,2 µl GoTaq® Hot Start Polymerase, 15,8 µl Nuklease-freies Wasser sowie 1 µl der zu evaluierenden cDNA zusammen. Die PCR des Reaktionsansatzes wurde entsprechend den unten genannten Abläufen (siehe „Tabelle 10“) durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	30
Anlagerung (Annealing) der Primer	<i>Actb</i> -Primer Ratte: 70 Humaner <i>ACTB</i> -Primer: 68	30 s	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	5 min	1
Holding	10	∞	-

Tabelle 10: Programmierte Reaktionsschritte des PCR-Programms.

Die genannten PCR-Reaktionsschritte wurden in dem Mastercycler® nexus gradient programmiert. Aufgrund der Verwendung *ACTB*-/*Actb*-Primer unterschiedlicher Spezies wurden während des Reaktionsschritts „Anlagerung der Primer“ unterschiedliche Temperaturen verwendet.

Nachfolgend wurden die synthetisierten PCR-Produkte in 1 %igen Agarose-Gel untersucht und fotografisch festgehalten („Abb. 7“). Die Zusammensetzung des 1 %igen Agarose-Gels bestand aus: 1 g Biozym LE Agarose in 10X TBE (108g TRIS PUFFERAN® ≥99,9 %, p.a.; 55g Borsäure ≥99,8 % in 900 ml destilliertem Wasser (Aqua destillata, Aqua

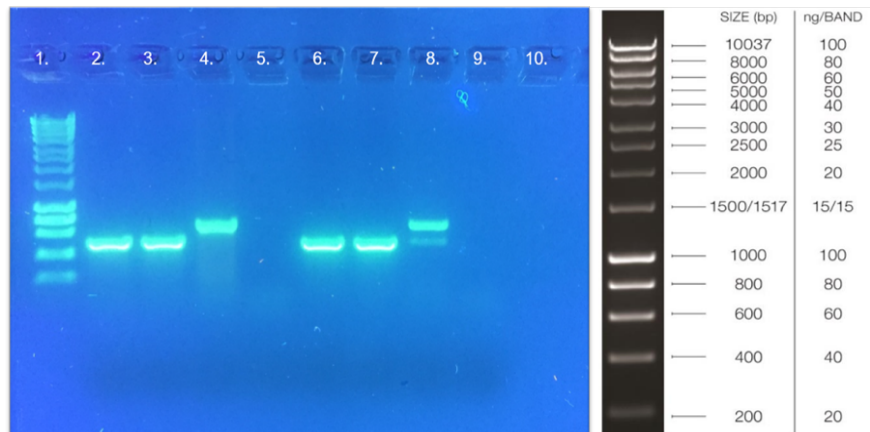


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung einer Gelelektrophorese mit Gegenüberstellung des HyperLadder™ 1Kb.

Linke Fotografie: Expression des konstitutiv exprimierten, amplifizierten *ACTB*-/*Actb*-Gens der verschiedenen Spezies. 1. HyperLadder™ 1Kb, 2. F98-Gliomzellen, 3. Unbehandelte Wistar-Ratte, 4. gDNA der Ratte, 5. Nuklease-freies Wasser des Ratten-Reaktionsansatzes, 6. HROG04, 7. HROG06, 8. Humane gDNA, 9. Nuklease-freies Wasser des humanen Reaktionsansatzes.

Rechtes Bild: Darstellung der Banden des HyperLadder™ 1kb [123].

dest.)) gelöst), 40 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung, aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua dest.. Im Anschluss an das zweimalige Aufkochen (600 Watt) wurden 5 µl RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 1 ml hinzugegeben. Das Gel wurde in einen UV-durchlässigen Gelträger mit endständig platziertem Probenkamm (Combs for PerfectBlue™ Gel System Mini M, Standardkamm) gegossen und härtete in 30 min aus. Der Probenkamm wurde entfernt, der Schlitten in dem mit 10X TBE befüllten PerfectBlue™ Gelsystem Mini M positioniert und in die Geltaschen wurden jeweils 5 µl HyperLadder™ 1Kb und 5 µl der einzelnen PCR-Produkte pipettiert. Anhand des HyperLadder™ 1kb (Abb. 7, rechtes Bild) kann das molekulare Gewicht der PCR-Produkte identifiziert werden. Deutlich wird hierbei, dass die Bande der gDNA bei ungefähr 700 bp und die der cDNA des amplifizierten *ACTB*-/*Actb*-Gens bei ungefähr 500 bp sichtbar wird. In einer Geltasche wurde das im Reaktionsansatz der PCR verwendete Nuklease-freies Wasser als Negativkontrolle mitgeführt. Mithilfe der PowerPac 200 wurden bei 80 V die cDNA-Produkte über 40 min aufgetrennt und das Gel anschließend mithilfe von UV-Licht digital dokumentiert. Die digitale Dokumentation der Gelelektrophorese ist im Anhang unter „Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese“ erkenntlich.

3.2.2.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Vorangehend wurde die PCR-Amplifikationseffizienz der TaqMan® Gene Expression Assays bestimmt. Sofern nicht anders beschrieben, wurde die Effizienz der kommerziell erworbenen Assays mit 100 % (± 10 %) bei einer Verdünnungsreihe (1:1, 1:4, 1:4², 1:4³, 1:4⁴) dankenswerterweise durch die Kooperationspartner des Instituts für Anatomie der Charité der Universitätsmedizin Berlin validiert und als Standardkurve einer Regressionsgerade (Zyklenzahl [Threshold Cycle (C_T)-Wert] versus (vs) eingesetzter cDNA-Menge [logInput

cDNA]) dargestellt und zur Verfügung gestellt [119]. Die Effizienz (E) wurde anhand des Anstiegs (slope) der Standardkurve mit folgender Formel berechnet:

$$E = \left(10^{-\frac{1}{\text{slope}}} - 1\right) \times 100$$

[119,124]. Die Effizienztastung für das TaqMan® Gene Expression

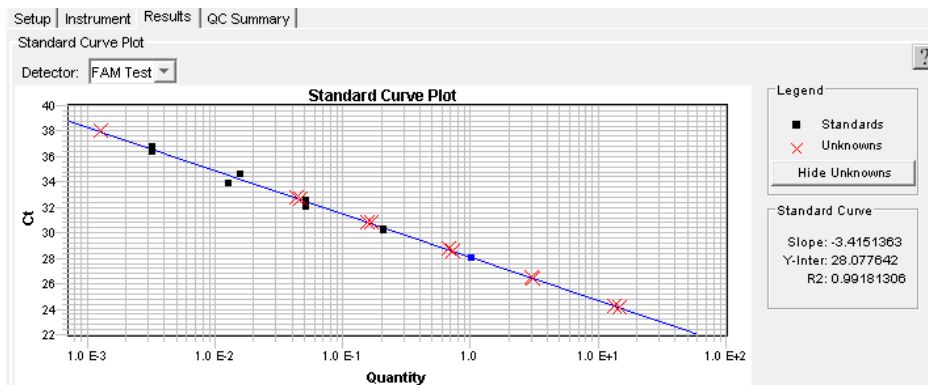


Abbildung 8: Effizienztastung der TaqMan® Gene Expression Assay.

Darstellung der Effizienztastung des Referenzgens *TBP* (human) durch die Time PCR System Software SDS 2.3. Anhand der Steigung der Standardkurve kann für die C_T -Werte die relative Anfangskonzentration auf der X-Achse ermittelt werden [125]. Mithilfe der blauen Standardkurve wird die Effizienz des TaqMan® Gene Expression Assay anhand der Formel $E = \left(10^{-\frac{1}{\text{slope}}} - 1\right) \times 100$ bestimmt [119,124]. Die Effizienz für den TaqMan® Gene Expression Assay *TBP* beträgt 96,25 %.

Assay des Referenzgens *TBP* (human) und des zweiten TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640210_m1 (Ratte) wurden für diese Arbeit mithilfe der Time PCR System Software SDS 2.3 ermittelt („Abb. 8“). Zur Bestimmung der einzelnen Amplifikationsraten wurde eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:5, 1:20, 1:80, 1:320) der cDNA in Duplikaten analysiert [125]. Es wurde mithilfe einer logarithmischen Form die Standardkurve berechnet und diese graphisch mittels des C_T -Wertes in Abhängigkeit von der logarithmischen Kopienzahl dargestellt [126]. Anschließend wurde anhand des Anstiegs („slope“) der Standardkurve die Effizienz durch die Time PCR System Software SDS 2.3 ($E = \left(10^{-\frac{1}{\text{slope}}} - 1\right) \times 100$) bestimmt [119,124]. Es ergab sich für den humanen TaqMan® Gene Expression Assay *TBP* eine Effizienz von 96,25 % und für den zweiten rodenten TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* eine Effizienz von 95,39 %. Dies entspricht den gängigen Erwartungen einer akzeptablen PCR-Effizienz [127]. Für diese Arbeit wurde zur relativen Quantifizierung und zum Nachweis der *PRG-/Prg*-Expression die qRT-PCR, unter Verwendung der kommerziell erworbenen TaqMan® Gene Expression Assays (siehe „TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“), nach Herstellerangaben verwendet. Spezifische TaqMan® Gene Expression Assays für die Zielgene bestehen aus einer TaqMan® Sonde und einem Vorwärts- und Rückwärtsprimer [128]. An die TaqMan® Sonde gebunden sind der 5'-Reporter-Farbstoff (FAMTM-Fluoreszenzfarbstoff) und am 3'-Ende der nicht fluoreszierende Quencher Farbstoff (NFQ), der mit dem Minor Groove Binder (MGB) markiert ist [119,128]. Die qPCR-Ansätze wurden mit einem Volumen von insgesamt 20 µl paarweise in je eine Vertiefung (Well) pipettiert. Davon setzten sich 4 µl aus einer 1:4 Verdünnung der zu untersuchenden cDNA zusammen. Zusätzliche Kontrollen, bei denen die cDNA-Zugabe durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde, dienten der Überprüfung der Reaktionsansätze. Ergänzend wurden je 16 µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde aus 5 µl Nuklease-freiem Wasser, 10 µl TaqManTM Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpEraseTM UNG und 1 µl des entsprechenden TaqMan® Gene Expression Assays angesetzt. Nach experimenteller Testung bei den zu quantifizierenden Ratten-Proben wurde aufgrund nicht-detektierbarer Zielgene (siehe Abb. 33) bei Verwendung der TaqMan® Gene Expression

Assay *Prg3* Rn01640214_m1 die Experimente mit dem TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640210_m1 wiederholt (siehe „Etablierung des neuen *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“). Für die Ermittlung der Gen-Expressionen der *PRGs/PrGs* wurden auch die Referenzgene der konstitutiv exprimierten Referenzgene detektiert. Die weitläufig anerkannten Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (*HPRT1/Hpprt1*), TATA-Box Bindeprotein (*TBP/Tbp*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) wurden verwendet.

Bei dem Prozess der Quantifizierung der mRNA während der qRT-PCR wird zu Beginn die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA mithilfe einer Temperaturerhöhung erzielt („Abb. 9“) [129]. Zu diesem Zeitpunkt wird das fluoreszierende Signal des 5'-Reporter-Farbstoffs am 5'-Ende der TaqMan® Sonde durch den nicht fluoreszierenden Quencher Farbstoff unterdrückt [119,128,129]. Während der „Annealing“-Phase können sich Primer und die TaqMan® Sonde an ihre spezifischen Zielsequenzen anlagern [129]. Die AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang (Amplicon) des cDNA-Einzelstranges (Template) [129]. Mit Erreichen der TaqMan® Sonde spaltet die AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase mit ihrer endogenen 5'-Nukleaseaktivität den 5'-Reporter-Farbstoff vom 3'-Quencher-Farbstoff (MGB-NFQ-Farbstoff) [129]. Die Freisetzung

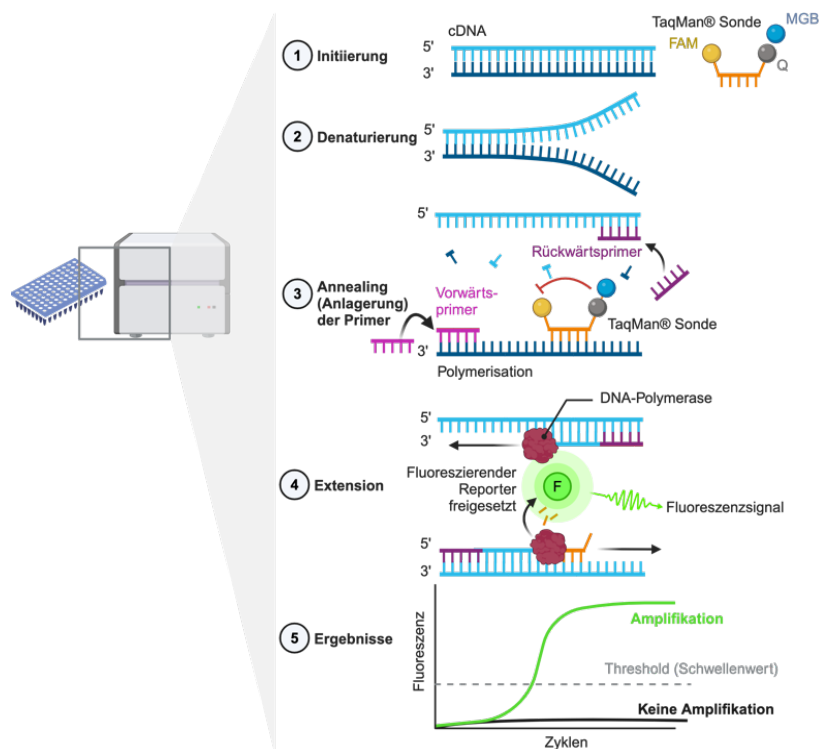


Abbildung 9: Prozesse der Quantifizierung der mRNA während der qRT-PCR.

Die Quantifizierung der mRNA während der qRT-PCR erfolgt mithilfe mehrerer Reaktionsschritte zur Amplifikation der cDNA. Die Grundeinstellungen der Reaktionsschritte werden in „Tabelle 11“ erkenntlich. Zu Beginn wird mithilfe der Temperaturerhöhung die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA erzielt [129]. Zu diesem Zeitpunkt wird das fluoreszierende Signal des 5'-Reporter-Farbstoffs am 5'-Ende der TaqMan® Sonde durch den nicht fluoreszierenden Quencher Farbstoff, der mit dem Minor Groove Binder markiert ist, unterbunden [119,128]. Während der „Annealing“-Phase (Anlagerungsphase) können sich Primer und die TaqMan® Sonde an ihre spezifischen Zielsequenzen anlagern [129]. Die AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang (Amplicon) des cDNA-Einzelstranges (Template) [129]. Sobald die AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase die TaqMan® Sonde erreicht, spaltet sie durch ihre endogene 5'-Nukleaseaktivität die TaqMan® Sonde in 5'-Reporter-Farbstoff und Quencher Farbstoff [129]. Die Freisetzung der Farbstoffmoleküle führt zu einem Fluoreszenzsignal [129]. Mit jedem PCR-Zyklus werden mehr Farbstoffmoleküle freigesetzt und dadurch ein Anstieg der Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der synthetisierten Amplicons detektiert [119]. FAM (FAM™-Fluoreszenzfarbstoff), Q (Nicht fluoreszierender Quencher-Farbstoff, NFQ), MGB (Minor Groove Binder) [129]. Kreiert mit BioRender.com.

Farbstoffmoleküle

führt zu einem Fluoreszenzsignal im Bereich von 500 bis 660 nm Wellenlängen [119,129]. Mit jedem PCR-Zyklus werden mehr Farbstoffmoleküle freigesetzt und somit ein Anstieg der Fluoreszenzintensität

proportional zur Menge der amplifizierten cDNA-Abschnitte detektiert [119,129]. Dadurch konnte die anfängliche Konzentration der Nukleotidsequenzen ermittelt werden. Die PCR-

Produkte wurden durch das 7900HT Fast-Real Time PCR System detektiert. Die Grundeinstellungen der Reaktionsschritte zur Amplifikation der cDNA werden in „Tabelle 11“ erkenntlich. Die vorangehende Einstellung sowie Analyseergebnisse wurden mit der Applied Biosystems 7900HT Fast-Real Time PCR System Software SDS 2.3 erfasst und mit Applied Biosystems 7900HT Fast-Real Time PCR System Software RQ Manager 1.2 („Abb. 10“) dargestellt.

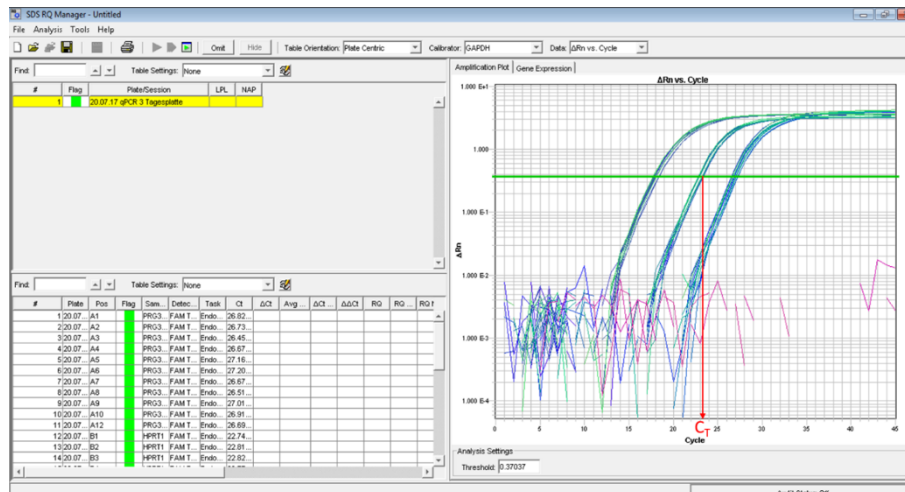


Abbildung 10: Bestimmung der C_T -Werte.

Digitale Abbildung der Nutzung des Applied Biosystems 7900HT Fast-Real Time PCR System Software RQ Manager 1.2 zur Ermittlung der C_T -Werte für die weiteren Berechnungen. Es erfolgte die paarweise Bestimmung der zu untersuchenden Proben (linker Bildabschnitt).

In dem Diagramm wird ΔRn (Y-Achse) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (X-Achse) aufgetragen [127] (rechter Bildabschnitt). Dabei ist Rn die Fluoreszenz des 5'-Reporter-Farbstoffs geteilt durch die Fluoreszenz eines passiven Referenzfarbstoffs [127]. Das bedeutet, dass Rn das Reportersignal darstellt und zum passiven Referenzfarbstoff normalisiert wird [127]. ΔRn berechnet sich aus Rn minus der Grundlinie (Baseline) [127]. Die Baseline der Amplifikationskurve definiert sich durch die ersten Zyklen der PCR, in denen es nur eine geringe Veränderung des Fluoreszenzsignals gibt [127].

Der Schnittpunkt zwischen der Amplifikationskurve (exponentielles Wachstum) und einer Schwellenwertlinie (grüne Linie) definiert C_T (Threshold Cycle) [127]. C_T ist ein relatives Maß für die Konzentration der Zielsequenz in der PCR-Reaktion [127].

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95	20	1
Denaturierung	95	1	45
Anlagerung (Annealing) der Primer und Elongation	60	20	

Tabelle 11: Reaktionsschritte zur Amplifikation der cDNA-Produkte.

Programmierung zur Amplifikation der cDNA-Produkte während der qRT-PCR. Verwendung der Einstellung „Fast-Mode“. Die qPCR-Reaktionsschritte wurden mit dem 7900HT Fast-Real Time PCR System durchgeführt.

Zur Analyse der relativen Veränderung der *PRG-IPrg*-mRNA-Expression wurde die $2^{-\Delta C_T}$ -Methode [128,130,131] mit Normalisierung der relativen *PRG-IPrg*-mRNA-Expression auf die relativen mRNA-Expression der Referenzgene verwendet. Die in dieser Arbeit graphisch dargestellten Ergebnisse präsentieren die Mittelwerte der relativen Expression (Mittelwert $2^{-\Delta C_T} \pm SEM$ der Doppelbestimmungen [128]. Die Doppelbestimmungen der Reaktionsansätze wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet (siehe „Darstellung der verwendeten Rohdaten“), mit

ΔC_T -Differenz der Doppelbestimmung: $0,5 \geq C_{T\text{-Zielgen-Erstbestimmung}} - C_{T\text{-Zielgen-Zweitbestimmung}}$
toleriert. Die anschließende Berechnung erfolgte wie folgt:

1. $\Delta C_T = C_{T\text{ (Gen von Interesse)}} - C_{T\text{ (Referenzgen)}}$
2. Relative Expression = $2^{-\Delta C_T}$
3. Mittelwert der relativen Expression =
 $(2^{-\Delta C_{T\text{ (Erste Duplikat-Messung)}}} + 2^{-\Delta C_{T\text{ (Zweite Duplikat-Messung)}}}) : 2$

Der C_T -Wert wird definiert als die Anzahl der Zyklen, die benötigt wird, um ein bestimmtes Threshold-Detektions-Level bei dem Fluoreszenzsignal zu erreichen [132]. Der C_T -Wert korreliert invers mit der Menge der ursprünglich vorliegenden Nukleinsäuremenge [132]. Anhand der Bestimmung des ΔC_T -Wertes kann eine Normalisierung des C_T -Wertes auf das Referenzgen erfolgen (1. Gleichung). Der ΔC_T -Wert dient der Ermittlung der relativen mRNA-Expression des Gens (2. Gleichung). Die Bestimmung von Duplikaten ermöglicht die Berechnung des Mittelwerts der relativen mRNA-Expression (3. Gleichung).

3.2.2.6. Datenauswertung und Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben (siehe auch „Quantitative Echtzeit-“). Für die statistischen Berechnungen wurde der $2^{-\Delta C_T}$ -Mittelwert der Duplikat-Messungen verwendet, ähnlich den Empfehlungen von Schmittgen *et aliter (et al.)* [131]. Sofern möglich wurden die Datensätze innerhalb der jeweiligen Gruppe mit der Durchführung des Shapiro-Wilk Normality Tests sowie des Kolmogorov-Smirnov-Tests für die Homogenität der Normalverteilung überprüft. Bei einzelnen Gruppen konnte aufgrund der sehr geringen n-Zahlen keine Überprüfung der Normalität durchgeführt werden. Daher wurden innerhalb der Gruppen die weiteren Testverfahren im Sinne einer nicht vorliegenden Normalverteilung durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen, nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test (t-Test) bestimmt. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit dem ungepaarten, nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test (One-way ANOVA on ranks) berechnet, gefolgt von dem Post-Hoc-Test nach Dunn's für Mehrfachvergleiche. Entsprechend der jeweiligen Untersuchungen erfolgte bei dem Kruskal-Wallis-Test ein Vergleich zwischen den durchschnittlichen Rängen der einzelnen Gruppen oder der Vergleich jedes durchschnittlichen Rangs der einzelnen Gruppe mit dem durchschnittlichen Rang der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede der Geschlechtsverteilung, des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters und dem IDH-Mutations-Status zwischen den einzelnen Gruppen wurden bei dem Vergleich von zwei Gruppen mit dem Fisher's exact Test untersucht. Bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Chi-square Test angewandt. Zur Bestimmung signifikanter Differenzen bei den Überlebenszeiten der HROG-Zelllinien wurde der Log-Rank-Test (Mantel-Cox Test) verwendet.

Die Berechnung erfolgte mittels GraphPad Prism 9.3.1 (350). Werte mit $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet für alle Untersuchungen ohne Dunn's-Mehrfachvergleichstest. Das Konfidenz-Intervall betrug 95 %.

4. Ergebnisse

4.1. Messung der *PRG-/Prg*-Expression

Vorangehende Forschungsergebnisse führten zu der Überlegung die alternierende Expression der fünf humanen *PRGs* und der *Prgs* im Tiermodell im Gliom zu erheben. Auf Grundlage bereits etablierter Methoden für Proben tierischer Herkunft erfolgte eine Anpassung der Abläufe entsprechend den neuen Anforderungen – insbesondere der Verfügbarkeit geringer Mengen humanen Gewebes (siehe „Methoden“). Beginnend erfolgte die RNA-Isolation aus den Geweben und Zellen mit dem TRIzol™ Reagent, dem Rneasy Plus Mini Kit oder die Aufarbeitung durch den Kooperationspartner des Arbeitsbereichs Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock. Mithilfe der Amplifikation des konstitutiv, nicht regulierten Referenzgens beta Aktin, wurde die synthetisierte cDNA verifiziert. Für diesen Prozess wurden neue *ACTB-/Actb*-Primer etabliert (siehe „Etablierung des humanen *ACTB*-Primers“, „Etablierung des *Actb*-Primers für das Fischer-F98-Gliom-Modell“). Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der cDNA ermöglichte eine Identifikation anhand des molekularen Gewichts im Vergleich mit dem HyperLadder™ 1kb (siehe „PCR und Gelelektrophorese“). Eine digitale, gelelektrophoretische Dokumentation konnte den Erfolg der cDNA-Synthese bestätigen (siehe „Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese“) und eine gDNA-Kontamination ausschließen. Proben mit nachweislicher gDNA-Kontamination wurden von dieser Arbeit ausgeschlossen. Für die Proben-ID 116 zeigte sich in der gelelektrophoretischen Darstellung keine erwartete Bande der PCR-Produkte. Zur relativen Quantifizierung und zur Detektion der *PRG-/Prg*-Expressionssignale wurde die qRT-PCR unter Verwendung der kommerziell erworbenen TaqMan® Gene Expression Assays durchgeführt. Im Vorfeld an die Messung der Expressionssignale wurde eine akzeptable PCR-Amplifikationseffizienz für die TaqMan® Gene Expression Assays im Rahmen dieser Arbeit und durch die Kooperationspartner des Instituts für Anatomie der Charité der Universitätsmedizin Berlin validiert (siehe „Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)“). Durch eine Verifizierung anhand der Standardverdünnungsreihe sollte die Übereinstimmung der Effizienz der zu untersuchenden Gene und der Referenzgene verifiziert werden, um eine Fehleinschätzung bei niedriger Genexpression zu vermeiden [125]. Dem aktuellen Wissensstand entsprechend wurden die Analyse der relativen Veränderung der mRNA-Expression mit der $2^{-\Delta C_T}$ -Methode [128,130,131] mithilfe der Messergebnisse der qRT-PCR ermittelt. Dafür galt es die ΔC_T -Differenz der Doppelbestimmung zu bestimmen (siehe „Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)“). Die ΔC_T -Differenz der Doppelbestimmung finden zumeist keine statische Begutachtung bei Differenzen der C_T -Werte der Duplikate über 0,5 Zyklen [133]. Aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit der zu untersuchenden Gewebe und Zellen, wurden in einzelnen Fällen ΔC_T -Differenz der Doppelbestimmung außerhalb dieses Zielbereichs akzeptiert (siehe „Tabelle 30“, „Tabelle 34“, „Tabelle 38“). Sofern die Material-Ressourcen der Proben dies erlaubten, wurden wiederholte Bestimmungen der C_T -Werte angestrebt. Daraus resultierend lagen die akzeptierten Differenzen der C_T -Werte bei der humanen *in vivo*-Kohorte bei bis zu 0,57 Zyklen (Proben-Identifikation (Proben-ID) 109 *PRG5*, G56/16 *PRG2*), bei den humanen Zellkulturen

bis zu 0,6057 Zyklen (Proben-ID HROG04 PRG3, HROG17 PRG5) und bei der F98-Gliomzelllinie „ZK F98-Probe“ bei der *Prg1*-Messung bis zu 0,670339 Zyklen. Auch unter Berücksichtigung wiederholter Messergebnisse zeigten sich in einzelnen Fällen die mRNA-Expression einzelner PRGs/*Prgs* unterhalb der Detektionsgrenze. Zusätzlich erfolgte die Annahme einer fehlenden Messung der Expressionssignale bei Ergebnissen mit einer ΔC_T -Differenz der Doppelbestimmung der Duplikate mit Resultaten von über 0,62 Zyklen und hohen Schwellenwert-Zyklen (Threshold Cyclen) mit mehr als 35 Zyklen [134]. Daher wurde für die relative Expression der mRNA in beiden Fällen der Wert „Null“ für die folgenden statistischen Untersuchungen verwendet (siehe „Tabelle 29“, „Tabelle 33“, „Tabelle 37“). Keine PRG2-Expressionssignale konnten mitunter bei den humanen Proben-ID 101, 108 (lediglich bei Normierung auf *HPRT1*) und 113 ausgemacht werden (siehe „Tabelle 30“). Ähnliche Phänomene wurden bei den ergänzenden präklinischen Modellen beobachtet (siehe „Tabelle 34“ und „Tabelle 38“). Auf die Ergebnisse der qRT-PCR wird im Folgenden eingegangen.

4.2. Patientencharakteristika humaner Gewebe und Zelllinien

Für die Gegenüberstellung der Expressionsmuster der PRGs im humanen Glioblastom mit einer Kontrollgruppe wurden Gewebeproben *in vivo* (folgend als *in vivo*-Kohorte beschrieben) gewonnen und mit einer Kontrollgruppe (*post mortem*) ohne Glioblastom-Wachstum verglichen (siehe „Patientencharakteristika“). Ziel dieser Analysen war es, die Ergebnisse mit Daten eines *In-vitro*-Gliommodells (HROG-Zelllinien, folgend als *in vitro*-Kohorte beschrieben) zu unterstützen. Innerhalb der *in vivo*-Tumorkohorte lagen keine Rezidiv-Tumore vor. Im Gegensatz dazu wurden innerhalb der *in vitro*-Kohorte in 35,71 % der Fälle Rezidiv-Tumore eingeschlossen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den drei Gruppen bezüglich des durchschnittlichen Alters und des Anteils weiblicher Patienten. Zur Untersuchung altersspezifischer Unterschiede wurden die humanen Gewebeproben in zwei Altersgruppen unterteilt. „Ältere Patienten“ werden in der klinischen Forschung zumeist als Patienten in einem Alter ab 60 bis 70 Jahren definiert [135]. Entsprechend dieser Angaben erfolgte die Einteilung der Patienten in die Gruppe der jüngeren Patienten mit 31-65 Jahren und der älteren Patienten ab 66 Jahren. Zwischen den jeweiligen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Patientenanzahl. Die Gegenüberstellung der *in vivo*- und der *in vitro*-Kohorte erbrachte keinen signifikanten Unterschied bei der Methylierung des MGMT-Promoters. Zu den Limitationen zählt, dass bei den *in vivo*-Proben 100 und 124 keine Kenntnis zu dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters durch den Kooperationspartner mitgeteilt werden konnte. In 93,33 % der Fälle in der *in vivo*-Kohorte und in 83,33 % der Fälle in der *in vitro*-Kohorte konnte ein IDH-Wildtyp-Status festgestellt werden. Demzufolge ergab sich kein Nachweis eines signifikanten Unterschieds. Es gilt zu berücksichtigen, dass das Signifikanzniveau bei dieser Untersuchung nur begrenzt beurteilt werden kann, da der IDH-Status bei der *in vivo*-Probe 124 und den Zelllinien HROG04, HROG07, HROG10, HROG13, HROG15, HROG24, HROG38 und HROG59 nicht bekannt ist. Bei Betrachtung der Gesamtpopulation ergibt sich demzufolge eine Verzerrung der dargestellten Ergebnisse der „Patientencharakteristika“. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorlokalisationen beider Tumor-Kohorten. Bei mangelnder Kenntnis über die Lokalisation der Gewebeentnahme des humanen Kontrollgewebes konnte kein Vergleich mit den beiden

anderen Kohorten durchgeführt werden. Zusammenfassend ergaben sich zwischen den drei Gruppen (Kontrollgruppe, humane Tumorgewebeproben und den HROG-Zelllinien) keine relevanten signifikanten Unterschiede, mit Ausnahme der Anzahl eingeschlossener Rezidiv-Tumore.

4.3. *PRG*-Expression im humanen Glioblastom *in vivo*

4.3.1. Signifikate veränderte *PRG*-Expressionsmuster bei Glioblastompatienten

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Gegenüberstellung der *PRG*-Expressionssignale bei Glioblastompatienten mit nicht-malignem Hirngewebe einer Kontrollgruppe. Für diesen Vergleich wurde die Methode der qRT-PCR angewandt. In dieser Untersuchung wurde auf den Einschluss von Tumor-Rezidiven verzichtet. Um die statistische Verzerrung durch jugendliche Kontrollpatienten beurteilen zu können, erfolgte die Gegenüberstellung mit und ohne Ausschluss unter 18-jähriger Patienten in der Kontrollgruppe (Einschluss aller Patienten: Abb. 30, A und B; Ausschluss der Patienten unter 18 Jahre: Abb. 11, A und B). Beide Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede im durchschnittlichen Alter, unter Anwendung des Post-hoc-Tests nach Dunn's, und bei dem Anteil weiblicher Patientinnen in den einzelnen Gruppen („Tabelle 12“). Innerhalb der Untersuchung konnte eine Rangfolge der *PRG*-Expressionsniveaus festgestellt werden. Für Tumor- und Kontrollpatienten ergab sich die folgende Rangfolge: *Prg4* > *Prg1* > *Prg3* > *Prg5* > *Prg2* (Abb. 11, Abb. 30). Unabhängig von der ausgewählten Kontrollgruppe ergaben sich ähnliche Tendenzen beziehungsweise (bzw.) Signifikanzniveaus bei dem Vergleich der Glioblastompatienten mit den nach Alter stratifizierten Kontrollgruppen (Abb. 11, Abb. 30). Dennoch scheint die Auswahl der Referenzgene Einfluss auf die Darstellung der Genexpression zu nehmen. Die Normalisierung auf das Referenzgen *HPRT1* (*PRG1*, *PRG2*, *PRG4*, *PRG5* in Abb. 11, A und Abb. 30, A) führte zu einem tendenziell erhöhten *PRG*-Nachweis im Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu wurden reduzierte *PRG*-Signale bei der Normalisierung auf Referenzgen *TBP* (*PRG1*, *PRG2*, *PRG3*, *PRG5* in Abb. 11, B und Abb. 30, B) im Tumorgewebe gemessen. Bei *PRG2* konnten im Vergleich zu den anderen vier *PRGs* keine signifikanten Expressionsveränderungen beobachtet werden. Durch die maligne Transformation des Hirngewebes kann eine signifikante Reduktion der Genexpression von *PRG3* und eine Tendenz für eine erhöhte *PRG4*-Expression (signifikant bei *HPRT1*, nicht signifikant (ns) bei *TBP*) dargestellt werden. Signifikant erhöhte Expressionssignale im Tumorgewebe wurden unter Verwendung des Referenzgens *HPRT1* bei *PRG1* und *PRG4* nachgewiesen (Abb. 11, A, Abb. 30, A). Bei der Normalisierung auf das Referenzgen *TBP* ergab sich neben der bereits beschriebenen Reduktion von *PRG3* auch eine signifikante Minderung der *PRG5*-Level im Glioblastom (Abb. 11, B, Abb. 30, B).

Gruppe	Kontrollgruppe mit Probe 201 und 202 (n = 16)	Kontrollgruppe ohne Probe 201 und 202 (n = 15)	Glioblastom (n = 16)	p-Wert
Durchschnittsalter ± Standard Abweichung (Standard	54,81 ± 21,12	59,53 ± 15,26	65,06 ± 14,23	0,2005, ns

Gruppe	Kontrollgruppe mit Probe 201 und 202 (n = 16)	Kontrollgruppe ohne Probe 201 und 202 (n = 15)	Glioblastom (n = 16)	p-Wert
Deviation, SD) (Jahre)				
Weiblich (%)	9 (56,25 %)	7 (50 %)	6 (37,5 %)	0,5584, ns

Tabelle 12: Humane Patientencharakteristika der Glioblastom- und Kontrollkohorte.

Darstellung der zwei Kontrollgruppen, mit und ohne Proben-ID 201 und 202, zum Ausschluss der Beeinflussung der mRNA-Expression durch das jugendliche Alter der Kontrollpatienten. Es erfolgte die Gegenüberstellung der Kontrollgruppen mit der Glioblastomkohorte. Kein Hinweis auf signifikante durchschnittliche Altersunterschiede oder eine geschlechtsspezifische Verteilung zwischen den drei Patientengruppen. Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests mit Post-hoc Test nach Dunn's für das Durchschnittsalter und Chi-Quadrats für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Patienten.

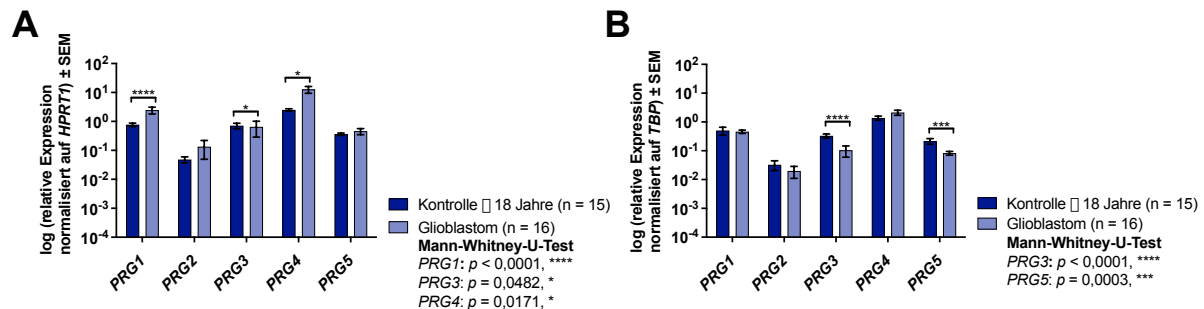


Abbildung 11: Relative PRG-mRNA-Expression der Glioblastom- und Kontrollkohorte bei Patienten ≥ 18 Jahre.

Relative mRNA-Expression der PRGs im humanen Glioblastom *in vivo* im Vergleich zu nicht-malignem Hirngewebe (Kontrollgruppe) *post mortem*. (A und B) Zum statistischen Vergleich wurden im Gegensatz zu Abb. 30 zwei Patientinnen < 18 Jahren **nicht** in die Kontrollgruppe eingeschlossen.

mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A) und *TBP* (B) normalisiert.

4.3.2. Altersspezifische PRG-Expressionssignale im Glioblastom

Aktuelle wissenschaftliche Studien weisen auf entwicklungsabhängige Expressionsmuster der *Prgs* in Tiermodellen hin [31,59]. Anknüpfend an den gegenwärtigen Kenntnisstand galt es im Rahmen dieser experimentellen Arbeit die PRG-Expression in Abhängigkeit von dem Alter der Patienten zu beurteilen. Es erfolgte die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen anhand ihres Alters (31 bis 65 Jahre und über 65 Jahre). Rezidive wurden von der Analyse ausgeschlossen (Abb. 12, Abb. 31). Daraus resultieren kleine Gruppengrößen mit geringen n-Zahlen. Zwischen den vier Kohorten zeigt sich kein signifikanter Unterschied des Anteils weiblicher Patientinnen („Tabelle 13“). Die analytische Gegenüberstellung (Abb. 12 E bis H) der PRGs macht deutlich signifikante Expressionsunterschiede sichtbar. Es erfolgt bei Abb. 12 E bis H die Darstellung der PRG-Expression der Glioblastompatienten beider Altersgruppen mit Normalisierung auf die ausgewählten Referenzgene. Es ergibt sich eine altersabhängige Rangfolge der PRGs. Während jüngere Patienten mehr PRG3 als PRG5 exprimieren, kehrt sich diese Tendenz im höheren Alter um (Abb. 12 E und F, jüngere Generation: $Prg4 > Prg1 > \textbf{Prg3} > \textbf{Prg5} > Prg2$; Abb. 12 G und H, ältere Generation: $Prg4 > Prg1 > \textbf{Prg5} > \textbf{Prg3} > Prg2$). Die Darstellung der Signifikanzniveaus zwischen den PRGs wird in geringem Maße durch die Auswahl des Referenzgens ($TBP > HPRT1$) beeinflusst. Beispielsweise zeigen sich stärker signifikante Unterschiede bei dem Referenzgen TBP bei PRG2 und PRG4 (Abb. 12 E, *HPRT1* < Abb. 12 F, *TBP*) sowie PRG3 und PRG4 (Abb. 12 G, *HPRT1* < Abb. 12 H, *TBP*). Zwischen den einzelnen PRGs nehmen die signifikant unterschiedlichen Expressionssignale mit steigendem Alter zu. Während bei jüngeren Patienten signifikante Expressionsunterschiede zwischen PRG2 und PRG4, PRG3 und PRG4 sowie bei dem Referenzgen *TBP* zwischen PRG4 und

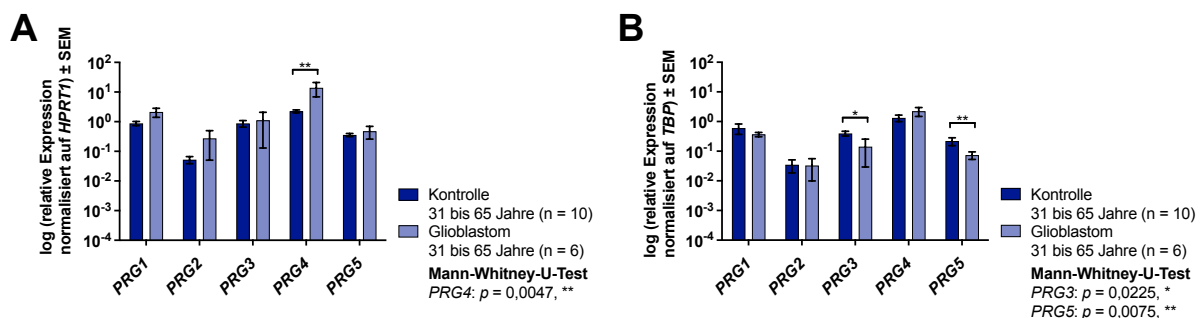
PRG5 zu erkennen sind, werden bei der älteren Kohorte zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen *PRG1* und *PRG2* messbar.

Ergänzend wurden die *PRGs* zwischen der Glioblastom- und Kontrollkohorte im Rahmen der definierten Altersgrenzen untersucht (Abb. 12 A bis D). Keine signifikanten Unterschiede wurden unter Verwendung beider Referenzgene bei *PRG1* und *PRG2* in der jüngeren Population sowie bei *PRG2*, *PRG4* und *PRG5* in der älteren Population ermittelt. Interessanterweise ergab sich bei den Vergleichen der jüngeren Tumorpatienten mit den Kontrollpatienten bei der Normalisierung auf *HPRT1* eine zunehmende Hochregulationen der *PRGs* im Tumorgewebe (Abb. 12, A und B). Gegensätzlich kam es bei der Normalisierung auf *TBP* zu einer Herunterregulation der mRNA-Expression im Tumorgewebe. Unabhängig von der Altersgruppe wurde mittels der Normalisierung auf *TBP* eine signifikante Reduktion der *PRG3*-Expression im malignen Gewebe ermittelt (Abb. 12 B und D, Reduktion um den Reduktionsfaktor 0,3584 bei der jüngeren Patientenpopulation und um Reduktionsfaktor 0,4199 bei der älteren Patientenpopulation). Jüngere Patienten ohne hirneigenen Tumor neigen zu einer verminderten *PRG4*-Expression. Dieses Phänomen kann auch in der älteren Kohorte beobachtet werden. Ältere Patienten ohne hirneigenen Tumor exprimieren deutlich weniger *PRG1* als erkrankte Patienten. Interessanterweise wurden zwischen den Referenzgenen gegensätzliche Expressionsmuster der weiteren *PRGs* gemessen. Während die *PRG5* bei der Normalisierung auf *TBP* signifikant vermindert in jungen Tumorpatienten vorliegt, konnte keine analoge Tendenz bei der Normalisierung auf *HPRT1* festgestellt werden. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glioblastomkohorten beider Altersgruppen ermittelt werden (Abb. 31 A und B). Jedoch sind Tendenzen einer erhöhten *PRG1*- sowie reduzierten *PRG2*- (auf weniger als 1/5) und *PRG3*-Genexpression (auf circa 1/3) bei älteren Patienten messbar.

Gruppe	Kontrollgruppe 31-65 Jahre (n = 10)	Kontrollgruppe ≥ 66 Jahre (n = 5)	Glioblastom 31- 65 Jahre (n = 6)	Glioblastom ≥ 66 Jahre (n = 10)	p-Wert
Weiblich (%)	4 (40 %)	3 (60 %)	2 (33,33 %)	4 (40 %)	0,8295, ns

Tabelle 13: Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Alters der Glioblastompatienten.

Statistischer Vergleich der weiblichen Geschlechtsverteilung der Glioblastomkohorte mit den Kontrollpatienten in Abhängigkeit der entsprechenden Altersgruppe, ohne signifikante Darstellung von Unterschieden in der Verteilung. Anwendung des Chi-Quadrats für die Ermittlung der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Patienten.



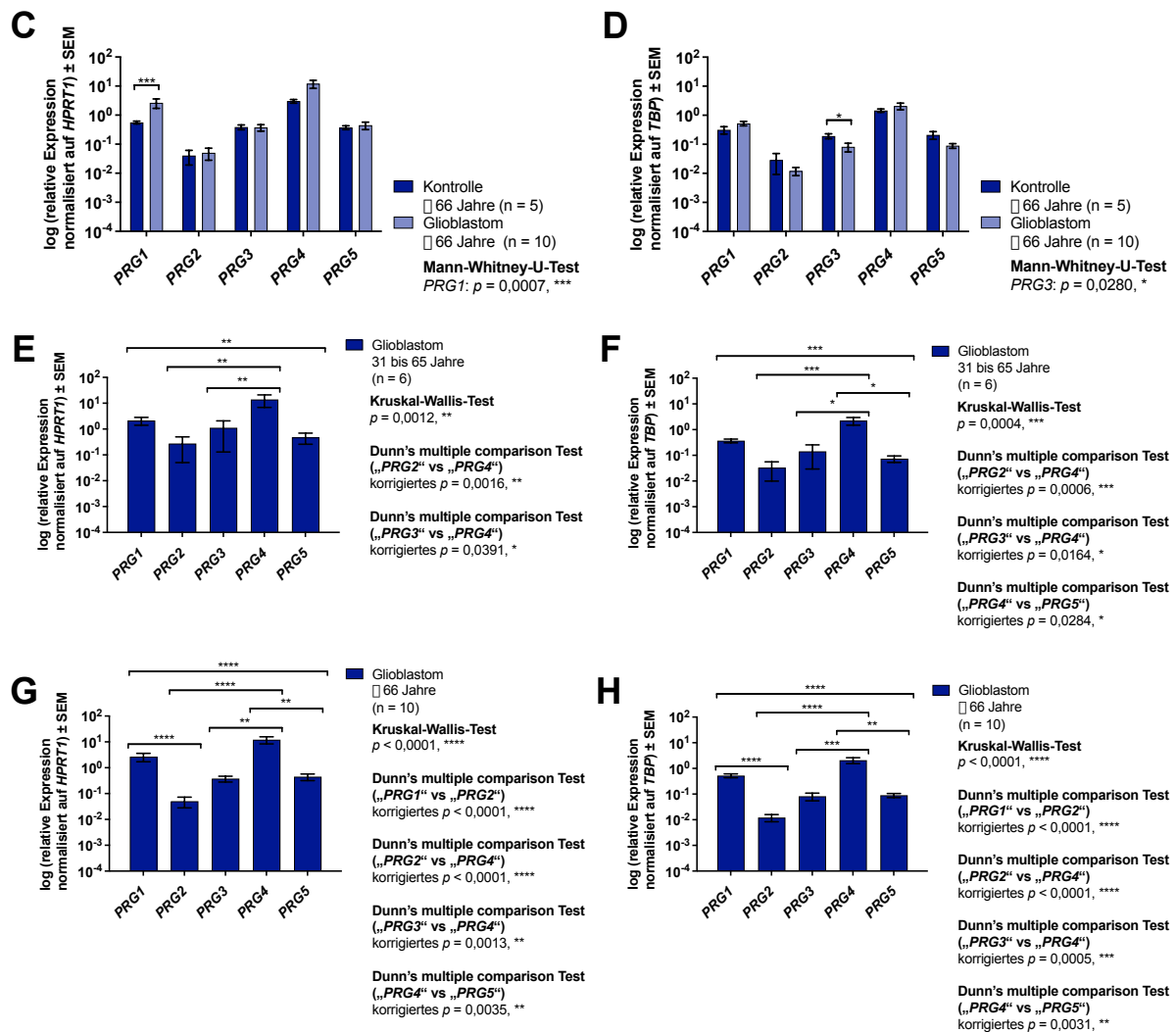


Abbildung 12: Altersabhängige PRG-Expression im Glioblastom.

Relative mRNA-Expression der PRGs im humanen Glioblastom *in vivo* und nicht-malignem Hirngewebe (Kontrollgruppe). Die Altersgrenzen wurden für Tumorpatienten und Kontrollpatienten eingehalten. (A und B) Darstellung der jeweiligen Patientengruppen im Alter von 31 bis 65 Jahren. (C und D) Betrachtung der beiden Patientengruppen im Alter von ≥ 66 Jahren. (E und F) Vergleich der PRG-Expressionsmuster der Glioblastompatienten zwischen 31-65 Jahren. (G und H) Vergleich der PRG-Expressionsmuster der Glioblastompatienten ab 66 Jahren. mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf HPRT1 (A, C, E und G) und TBP (B, D, F und H) normalisiert.

4.3.3. PRG2-Expression im weiblichen Organismus

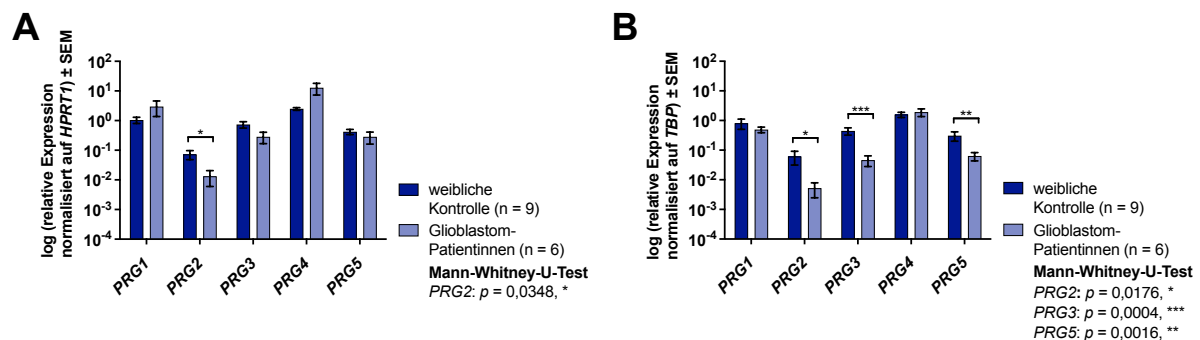
Das Glioblastom weist eine männliche Prädominanz der Erkrankungsverteilung auf [5,9,12]. Auf Basis dieses Wissens erfolgte die Betrachtung der PRG-Expression in Abhängigkeit vom biologischen Geschlecht zur Darstellung möglicher Unterschiede. Es ließen sich keine signifikanten Altersunterschiede zwischen den einzelnen Kohorten feststellen („Tabelle 14“). Zur weiteren Beurteilung der mRNA-Expression erfolgte die direkte Gegenüberstellung der weiblichen oder männlichen Tumorpatienten mit den nach Geschlecht stratifizierten Kontrollpatienten, ergänzend wurden männliche und weibliche Tumorpatienten miteinander verglichen (Abb. 13). Es wurde die Rangfolge der PRG-Expression ermittelt. Während weibliche Glioblastompatientinnen eine stärkere PRG5- als PRG3-Expression aufweisen ($PRG4 > PRG1 > PRG5 > PRG3 > PRG2$), wurde bei den anderen drei Gruppen eine vermehrte PRG3-Expression innerhalb der Rangfolge gemessen (weibliche

Kontrollpatientinnen, männliche Glioblastom- und männliche Kontrollpatienten: $PRG4 > PRG1 > PRG3 > PRG5 > PRG2$). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tumorpatienten (Abb. 13 E und F). Im direkten Vergleich zwischen Glioblastompatientinnen und -patienten mit der entsprechenden Kontrollgruppe konnten signifikante *PRG*-Expressionsunterschiede bestimmt werden (Abb. 13, A bis D). Übereinstimmend ergab sich im Glioblastomgewebe eine Tendenz zur Hochregulation von *PRG4* um das 1,2- bis 5,14-fache gegenüber tumorfreiem Hirngewebe (Abb. 13, A bis D). Abhängig von der Auswahl des Referenzgens konnten teils entgegengesetzte Expressionsmuster mit einer zunehmenden Hochregulation bei der Verwendung von *HPRT1* und Herunterregulation bei *TBP* im Tumorgewebe beobachtet werden. Speziell bei der Untersuchung männlicher Patienten (Abb. 13, C und D) ergaben sich Diskrepanzen zwischen Hoch- und Herunterregulation der einzelnen *PRGs*. Bei der Verwendung des Referenzgens *HPRT1* ergibt sich eine geschlechtsunabhängige, erhöhte *PRG1*-Expression im Tumorgewebe (nicht signifikant im weiblichen und signifikant im männlichen Organismus). Ein gegensätzlicher Trend ergab sich bei der Auswahl des Referenzgens *TBP*. Ebenfalls konnte bei der Normierung auf das Referenzgen *TBP* eine geschlechtsunabhängige, signifikante Herunterregulation der *PRG3*- und *PRG5*-Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 13, B und D). Eine ähnliche Tendenz wurde auch bei den weiblichen Glioblastompatientinnen (Referenzgen *HPRT1*) beobachtet (Abb. 13, A). Im weiblichen Organismus konnte eine signifikant reduzierte *PRG2*-Genexpressionen mit einer malignen Transformation assoziiert werden. Dieses geschlechtsspezifische *PRG2*-Expressionsmuster der weiblichen Glioblastompatientinnen kann auch im direkten Vergleich mit dem männlichen Geschlecht beobachtet werden (Abb. 13 E und F). Zusammenfassend bestätigt sich die Beobachtung, dass der weibliche Glioblastom-Organismus ein tendenziell niedrigeres *PRG2*-Expressionslevel aufweist.

Gruppe	weibliche Kontrolle (n = 9)	männliche Kontrolle (n = 8)	Glioblastompatientinnen (n = 6)	Glioblastompatienten (n = 10)	p-Wert
Durchschnittsalter $\pm$ SD (Jahre)	52,56 $\pm$ 25,82	56,25 $\pm$ 13,99	68,5 $\pm$ 13,98	63 $\pm$ 14,7	0,2453, ns

Tabelle 14: Geschlechtsabhängige Altersverteilung im Glioblastom.

Betrachtung des durchschnittlichen Alters der Glioblastomkohorte im Vergleich mit der Kontrollgruppe in Abhängigkeit ihres jeweiligen Geschlechts ohne Darstellung signifikanter Unterschiede. Anwendung des Kruskal-Wallis mit Post-hoc Test nach Dunn's für die Ermittlung der altersspezifischen Unterschiede der Patienten.



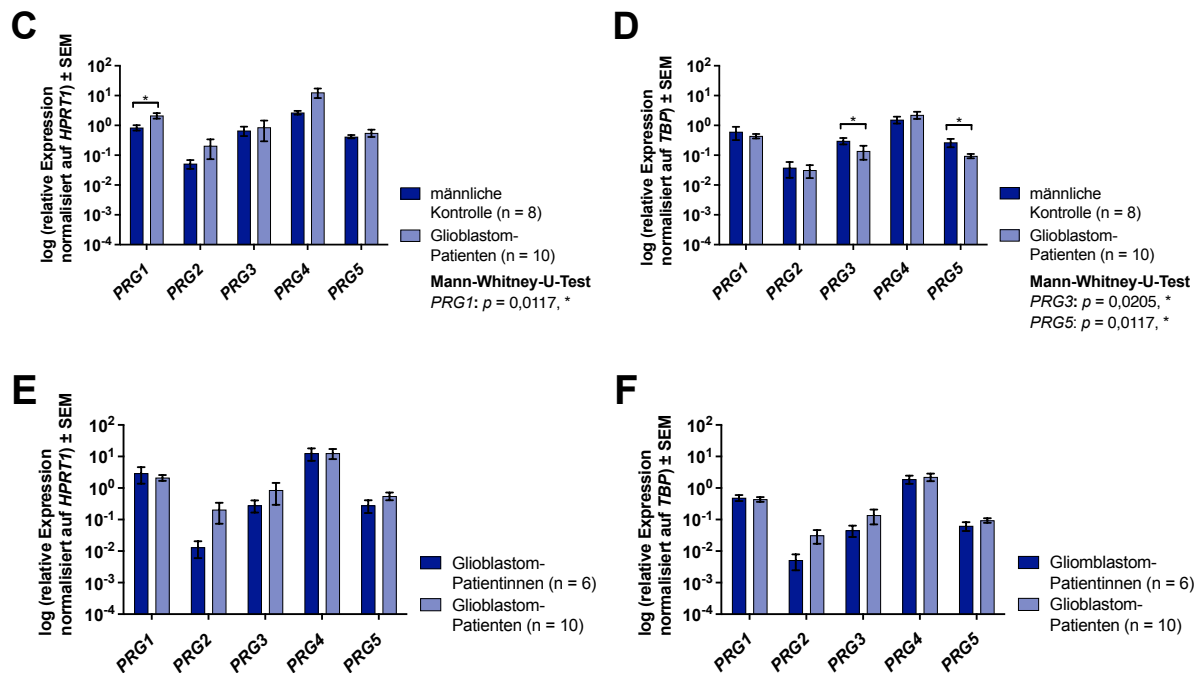


Abbildung 13: Relative PRG-mRNA-Expression im Glioblastom entsprechend des biologischen Geschlechts.

Relative mRNA-Expression der PRGs im humanen Glioblastom *in vivo* im Vergleich zu nicht-malignem Hirngewebe (Kontrollgruppe) entsprechend des biologischen Geschlechts. (A und B) Vergleich zwischen den weiblichen Tumorpatientinnen und der weiblichen Kontrollgruppe. (C und D) Betrachtung der männlichen Glioblastompatienten im Vergleich mit der männlichen Kontrollgruppe. (E und F) Gegenüberstellung der weiblichen Glioblastompatientinnen mit den männlichen Glioblastompatienten.

mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A, C und E) und *TBP* (B, D und F) normalisiert.

4.3.4. Regulation der PRG-Expression durch die Methylierung des MGMT-Promoters beim Glioblastom

Der Fokus dieser Analyse wurde auf den Methylierungsstatus des MGMT-Promoters gelegt, welcher den Patienten im methylierten Zustand einen deutlichen Vorteil gegenüber einer Temozolomid-Therapie ermöglicht [15,19]. Zwischen den beiden Gruppen mit methyliertem und nicht-methylierten MGMT-Promoter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des durchschnittlichen Alters und der Geschlechtsverteilung der Patienten („Tabelle 15“) sowie der PRG-Expression (Abb. 14). Für PRG1 wurde eine nicht signifikant erhöhte und für die PRG2 bis PRG5 eine gering verminderte Genexpression für Patienten ohne methylierten MGMT-Promoter gemessen. Es kann angenommen werden, dass die zugrundeliegende Tendenz für Expressionsunterschiede bei Betrachtung größerer Gruppengrößen Signifikanzen aufweisen kann. Insbesondere bei PRG2 und PRG3 zeigen die Daten deutlich, dass die Methylierung des MGMT-Promoters zu einer vermehrten Detektion beider Genexpressionssignale führt. Die Expression von PRG2 bei nicht-methylierten MGMT-Promoter macht nur ungefähr 8,5 % (Referenzgen *HPRT1*) bzw. ungefähr 18,4 % (Referenzgen *TBP*) von der mRNA-Expression im methylierten Zustand aus. Bei der Normierung auf *HPRT1* werden in der Gruppe mit nicht-methyliertem MGMT-Promoter nur etwa 26,8 % des PRG3 im Vergleich zu der Gruppe mit dem methylierten MGMT-Promoter exprimiert. Gleichzeitig weisen die Untersuchungen bei PRG3 (Referenzgen *TBP*) bei unmethyliertem MGMT-Promoter 44,8 % der Genexpression im Gegensatz zur Gruppe mit dem methylierten MGMT-Promoter auf.

Gruppe	Methylierter MGMT-Promoter (n = 5)	Unmethylierter MGMT-Promoter (n = 9)	p-Wert
Durchschnittsalter $\pm$ SD (Jahre)	60,8 $\pm$ 15,77	68,67 $\pm$ 9,747	0,4570, ns
Weiblich (%)	3 (60 %)	3 (33,33 %)	0,5804, ns

Tabelle 15: Humane Patientencharakteristika abhängig von dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters.

Betrachtung des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters der Glioblastom-Kohorte, ohne Darstellung signifikanter Unterschiede. Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für das Durchschnittsalter und Fisher exact-Tests für die geschlechtsspezifischen Unterschiede.

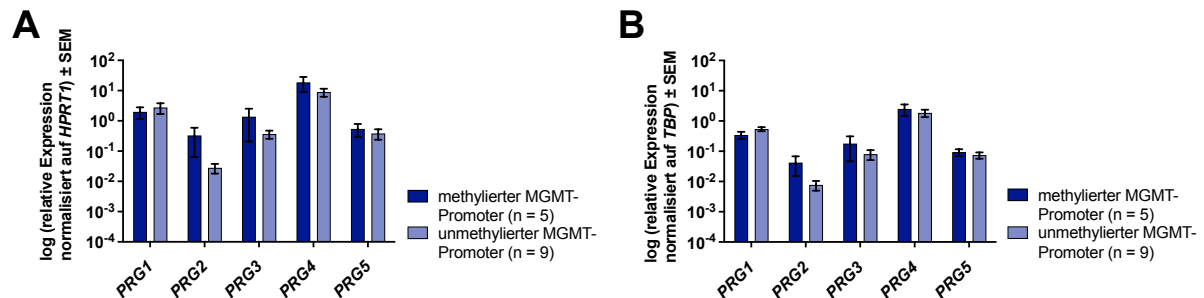


Abbildung 14: Humane PRG-Expressionsmuster entsprechend dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters.

Relative mRNA-Expression der PRGs im humanen Glioblastom *in vivo* in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A) und *TBP* (B) normalisiert.

4.3.4.1. Bestätigen sich die humanen *in vivo* PRG-Expressionsmuster in Abhängigkeit des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters *in vitro*?

Auf Basis vorangehender mRNA-Expressions-Analysen der Glioblastompatienten abhängig von dem vorliegenden Methylierungsstatus des MGMT-Promoters (Abb. 14) erfolgte eine äquivalente Analyse der humanen HROG-Zelllinien. Zwischen den Zelllinien ergaben sich zwischen den jeweiligen Methylierungsstatus des MGMT-Promoters keine signifikanten Unterschiede der weiblichen Geschlechtsverteilung oder des durchschnittlichen Alters („Tabelle 16“). Der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters bewirkte keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression von *PRG3*, *PRG4* und *PRG5* *in vitro* (Abb. 15). Zeitgleich lagen tendenziell erhöhte Expressionslevel bei fehlender Methylierung des MGMT-Promoters vor (Abb. 15). Im Vergleich zu Patienten mit Glioblastom (Abb. 14) wurden bei den HROG-Zelllinien teils konträre sowie deutlich signifikante Unterschiede dargestellt (Abb. 15). Es bestätigen sich erste Hinweise auf eine signifikante Hochregulation von *PRG1* bei unmethyliertem MGMT-Promoter *in vitro*. Entsprechend der Analyseergebnisse der Tendenz humaner *in vivo* Proben konnte eine signifikante Reduktion von *PRG2* bei einem unmethylierten MGMT-Promoter *in vitro* beobachtet werden. HROG-Zelllinien mit methyliertem MGMT-Promoter weisen eine um Faktor 1,67 (*HPRT1*) oder 2,08 (*TBP*) signifikant erhöhte *PRG2*-Expression auf. Somit ergibt sich für humane *in vivo*- und *in vitro*-Gewebe eine einheitliche Tendenz für eine Hochregulationen der *PRG1*- und Reduktionen der *PRG2*-mRNA-Expression bei einem unmethylierten MGMT-Promoter.

Gruppe	Methylierter Promoter (n = 4)	MGMT- Unmethylierter Promoter (n = 8)	MGMT- p-Wert
Durchschnittsalter ± SD (Jahre)	67 ± 7,694	62,13 ± 11,79	0,4316, ns
Weiblich (%)	2 (33,33 %)	4 (50 %)	0,6270, ns

Tabelle 16: Patientencharakteristika der HROG-Zelllinien entsprechend der Methylierung des MGMT-Promoters.

Humane HROG-Zelllinien weisen unterschiedliche Methylierungsmuster des MGMT-Promoters auf. Zwischen den beiden Gruppen mit dem methylierten und unmethylierten MGMT-Promoter zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im durchschnittlichen Alter oder in der Geschlechtsverteilung. Es erfolgte für die statistische Auswertung die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für das Durchschnittsalter und der Fisher exact-Test für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Patienten.

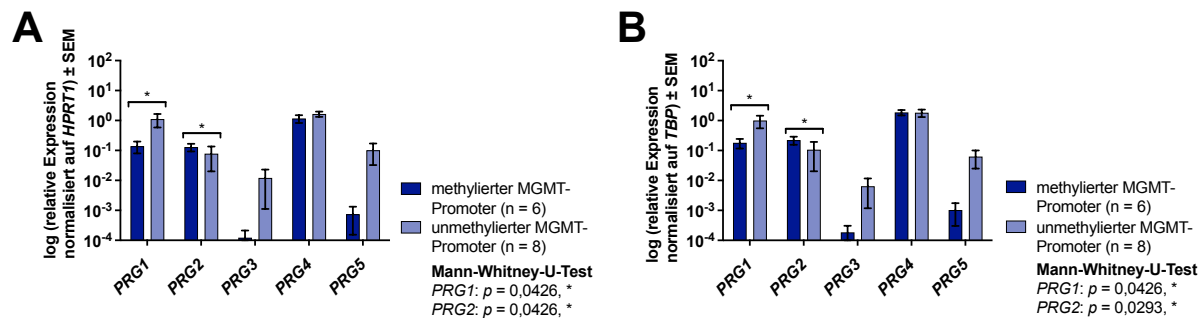


Abbildung 15: PRG-Expressionsmuster der Patienten mit methylierten und unmethyliertem MGMT-Promoter der HROG-Zelllinien.

Grafische Darstellung der relativen mRNA-Expression der PRGs der HROG-Zelllinien gruppiert entsprechend ihrem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters. Signifikante Erhöhung der PRG1-Expression und Reduktion der PRG2-Expression bei Vorliegen eines unmethylierten MGMT-Promoters. Tendenz zur deutlich erhöhten Expression von PRG3 und PRG5 bei unmethyliertem MGMT-Promoter. mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf HPRT1 (A) und TBP (B) normalisiert.

4.3.4.2. Kein Überlebensvorteil durch die Methylierung des MGMT-Promoters beim Glioblastom der HROG-Zelllinienkohorte

Bekanntermaßen liegt ein Therapievorteil gegenüber einer Behandlung mit Temozolomid bei einem methylierten MGMT-Promoters des Glioblastoms vor [15,19]. In diesem Sinne galt es den Einfluss des Methylierungsstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zu beurteilen. Abb. 16 stellt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Glioblastompatienten in den Monaten nach der Tumorresektion bis zum letzten Tag der Datenerfassung am 25. Januar 2013 dar. Am Stichtag der Datenerhebung lebt in beiden Gruppen noch je ein Patient, dies wird als kleinerer Balken dargestellt. Zwischen den Zelllinien mit und ohne methyliertem MGMT-Promoter liegen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das durchschnittliche Alter oder die weibliche Geschlechtsverteilung vor („Tabelle 17“). Das alleinige Vorliegen eines methylierten MGMT-Promoters nimmt in den vorliegenden Daten keinen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten nach der Tumorresektion und bewirkt keinen Überlebensvorteil. Bei der analysierten Gruppengröße wurde nur eine geringe n-Zahl an Patienten betrachtet. Es lagen bei der Auswertung der Daten keine Informationen zum Resektionsgrad des Tumors oder zur adjuvanten medizinischen Behandlung der Patienten vor.

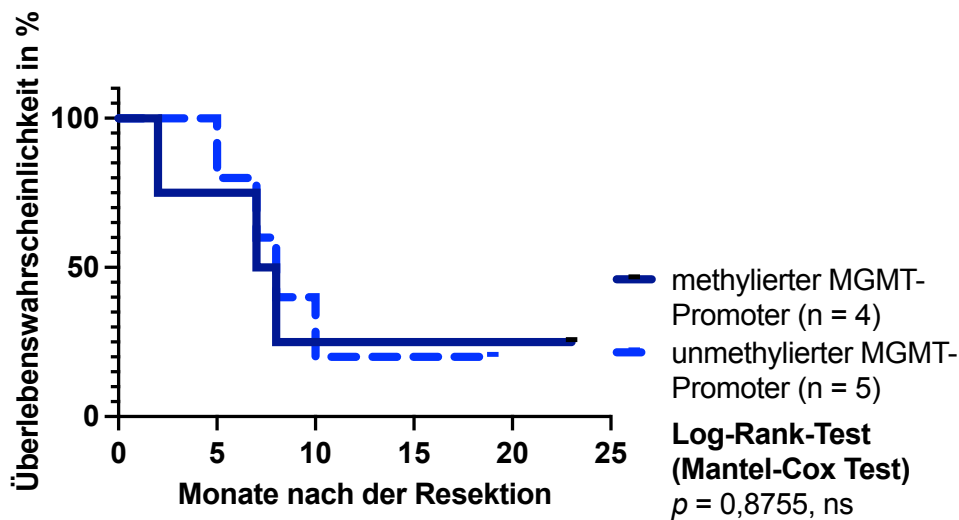


Abbildung 16: Kein signifikanter Einfluss der Methylierung des MGMT-Promoters auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.

Grafische Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten der HROG-Zelllinien nach der Glioblastomresektion in Abhängigkeit der vorliegenden Methylierung des MGMT-Promoters bis zum Stichtag der letzten Datenerfassung (25. Januar 2013) [116]. Das mediane Überleben der Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter beträgt 7,5 Monate, bei Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter 8 Monate nach der Resektion. In jeder Gruppe lebt einer der Patienten am Stichtag der Datenerhebung (Kennzeichnung mit kleinerem Balken). Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen der Kaplan-Meier-Kurve wurden mithilfe des Log-Rank-Test (Mantel-Cox Test) als nicht signifikant (ns) bewertet.

Gruppe	Methylierter MGMT-Promoter (n = 4)	Unmethylierter MGMT-Promoter (n = 5)	p-Wert
Durchschnittsalter ± SD (Jahre)	68 ± 8,832	65,8 ± 13,85	> 0.9999, ns
Weiblich (%)	1 (25 %)	3 (60 %)	0,5238, ns

Tabelle 17: Patientencharakteristika des humanen *In-vitro*-Modells zur Evaluierung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der vorliegenden Methylierung des MGMT-Promoters.

Abhängig von der Methylierung des MGMT-Promoters wurden zwei verschiedene Gruppen der HROG-Zelllinien gebildet. Es wurden ausschließlich Glioblastomzelllinien, keine Rezidiven, eingeschlossen. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in ihrem durchschnittlichen Alter oder in der Geschlechtsverteilung erkannt werden. Es erfolgte für die statistische Analyse des Durchschnittsalters die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests und des Fisher exact-Tests für die Analyse der geschlechtsspezifischen Unterschiede.

4.4. Expressionsmuster der PRGs in humanen Gliom-Zelllinien

4.4.1. PRG-Koexpression in Abhängigkeit der PRG3- und PRG5-Detektion beim Glioblastom und Rezidiv-Glioblastom *in vitro*

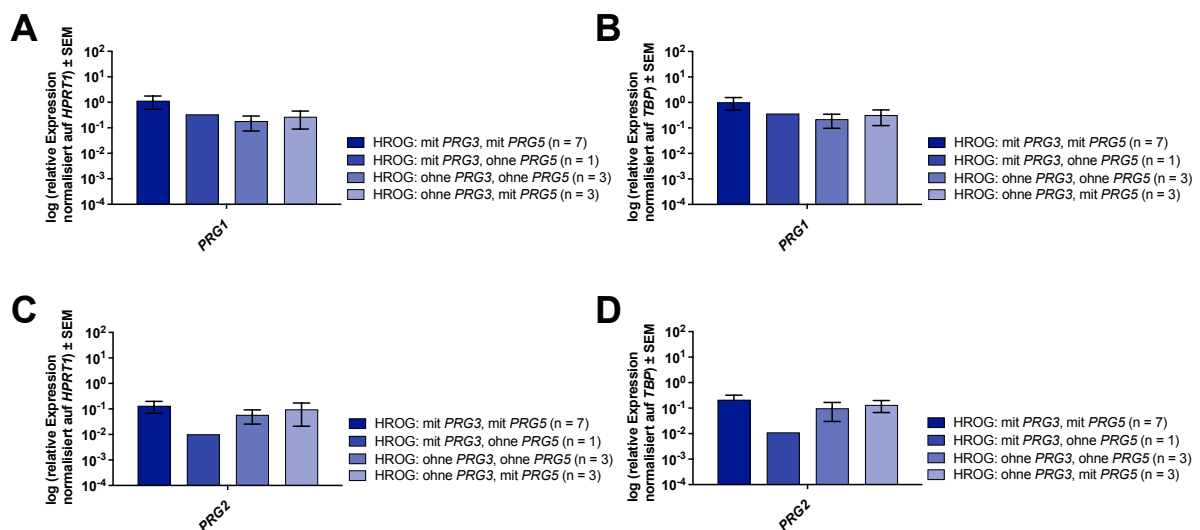
Bei Erfassung relevanter Unterschiede innerhalb der humanen HROG-Zelllinien fielen distinkte PRG3- und PRG5-Expressionsmuster auf. Der Fokus dieses Abschnitts liegt auf der teils nicht messbaren *PRG3*- und/oder *PRG5*-mRNA-Expression (Abb. 17). Entsprechend der Detektion dieser beiden *PRGs* erfolgte die Einteilung der HROG-Zelllinien in vier Gruppen. Gruppen mit der Kennzeichnung „mit *PRG3*“ integrierten HROG-Zelllinien, bei denen ein entsprechendes *PRG*-Expressionssignal detektiert werden konnte. Konnte kein *PRG3*-Signal gemessen werden, erhielt die Gruppe den Namen „ohne *PRG3*“. Äquivalent werden die Bezeichnungen für die *PRG5*-Expression angewandt. Auf Grundlage der geringen Stichprobengröße ist die statistische Beurteilung nur stark eingeschränkt möglich. Daher erfolgte der Einschluss von HROG-Zelllinien mit einer Herkunft aus Gewebe eines erstmaligen Glioblastom-Nachweises

und eines Rezidiv-Glioblastoms. Zwischen den jeweiligen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das durchschnittliche Alter oder weibliche Geschlecht („Tabelle 18“). Statistisch sind bei *PRG1*, *PRG2* und *PRG4* keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen ermittelbar. Bei genauerer Beobachtung fällt auf, dass die einzelnen *PRGs* in Abhängigkeit von der fehlenden oder vorhandenen Detektion von *PRG3* und *PRG5* verschiedene Tendenzen im Sinne einer sich verstärkenden Koexpression aufzeigen. Während einerseits die Koexpression von *PRG3* und *PRG5* zu einer vermehrten *PRG1*-Detektion führt, kommt es bei fehlender Detektion beider *PRGs* zu einer deutlichen Reduktion der *PRG1*-Expression (Abb. 17 A und B). Im Kontrast zu der Gruppe ohne messbare *PRG3*- und *PRG5*-mRNA, weist die Gruppe mit Detektion dieser beider *PRGs* eine 6,26-fach (Referenzgen *HPRT1*) und 4,63-fach (Referenzgen *TBP*) erhöhte *PRG1*-Expression auf. Ebenfalls ergibt sich eine nicht signifikant verminderte *PRG2*-Expression bei mangelnder Detektion von *PRG5* (Abb. 17, C und D). An dieser Stelle scheint der Einfluss des *PRG3* auf die *PRG2*-mRNA gering zu sein. Interessanterweise zeigen sich bei *PRG4* keine wesentlichen Differenzen in Abhängigkeit der *PRG3*- und *PRG5*-Koexpression. Die gleichzeitige *PRG3*- und *PRG5*-Koexpression verstärkte die mRNA-Level von *PRG3* oder *PRG5* (Abb. 17 E, F, I und J). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Modulation der Expression einzelner *PRGs* bei Koexpression von *PRG3* und/oder *PRG5* hin.

Gruppe	HROG: ohne <i>PRG3</i> , mit <i>PRG5</i> (n = 3)	HROG: mit <i>PRG3</i> , mit <i>PRG5</i> (n = 7)	HROG: mit <i>PRG3</i> , ohne <i>PRG5</i> (n = 1)	HROG: ohne <i>PRG3</i> , ohne <i>PRG5</i> (n = 3)	p-Wert
Durchschnittsalter ± SD (Jahre)	67 ± 6,557	65,14 ± 13,03	55	62,33 ± 7,767	0,8781, ns
Weiblich (%)	2 (66,67 %)	4 (57,14 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0,2330, ns

Tabelle 18: Gruppencharakteristika der HROG-Zellen entsprechend ihren *PRG3*- und *PRG5*-Expressionsmustern.

Die Gruppenstatistik wurde entsprechend der Gruppierung der HROG-Zelllinien nach möglicher *PRG3*- und/oder *PRG5*-Detektion eingeteilt und weist keine signifikanten Unterschiede bei dem durchschnittlichen Alter oder der Geschlechtsverteilung der Patienten auf. Gruppen mit der Kennzeichnung „mit *PRG3*“ integrierten HROG-Zelllinien, bei denen ein entsprechendes *PRG*-Expressionssignal detektiert werden konnte. Konnte kein *PRG3*-Signal gemessen werden, erhielt die Gruppe den Namen „ohne *PRG3*“. Äquivalent werden die Bezeichnungen für die *PRG5*-Expression angewandt. Anwendung des Kruskal-Wallis mit Post-hoc Test nach Dunn's für die Ermittlung der altersspezifischen Unterschiede und des Chi-Quadrats für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Patienten.



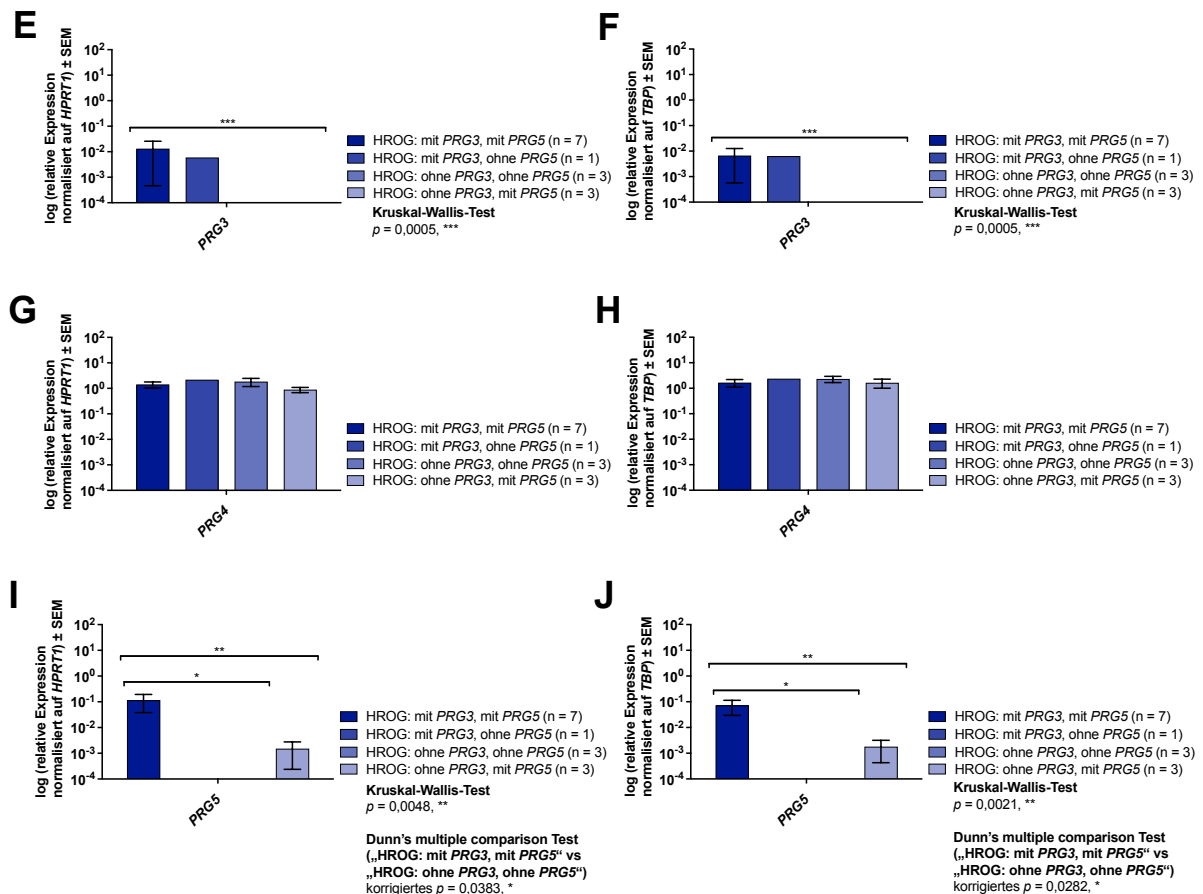


Abbildung 17: Darstellung der PRG-Expression der HROG-Zelllinien entsprechend der Detektion der PRG3- und PRG5-mRNA.

Grafische Darstellung der relativen mRNA-Expression der PRGs der HROG-Zelllinien, mit der Einteilung der Zelllinien entsprechend der Detektion der PRG3- und PRG5-mRNA. Bei dieser Analyse wurden Zelllinien mit Herkunft aus einem erstmaligen Glioblastom-Nachweis und einem Rezidiv-Glioblastom untersucht. Gruppen mit der Kennzeichnung „mit PRG3“ integrierten HROG-Zelllinien, bei denen ein entsprechendes PRG-Expressionssignal detektiert werden konnte. Konnte kein PRG3-Signal gemessen werden, erhielt die Gruppe den Namen „ohne PRG3“. Äquivalent werden die Bezeichnungen für die PRG5-Expression angewandt. Eine gesteigerte relative mRNA-Expression von PRG1, PRG3 und PRG5 tritt bei Koexpression von PRG3 und PRG5 bei den HROG-Zelllinien auf. Die mRNA-Expression von PRG3 und PRG5 war in den einzelnen Gruppen (E, F, I, J) unterhalb des Detektionslevels. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf HPRT1 (A) und TBP (B) normalisiert. Anwendung des Kruskal-Wallis mit Post-hoc Test nach Dunn's für die Ermittlung signifikanter Differenzen.

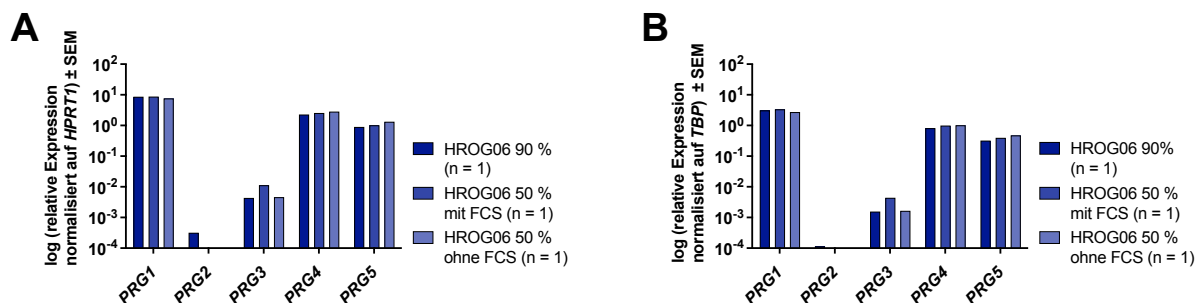
4.4.1.1. Besonderheiten entsprechend der PRG3- und PRG5-mRNA-Detektion am Beispiel der HROG06- und HROG15-Zelllinie

Vorangehend wurde bei einzelnen HROG-Zelllinien während der qRT-PCR keine PRG3- und PRG5-mRNA-Expression über der Nachweisgrenze gemessen. Um externe Einflussfaktoren auf die Kulturbedingungen als Modulator der Genexpression auszuschließen, wurden die zwei Zelllinien HROG06 und HROG15 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen analysiert (Abb. 18). Modifiziert wurden die Konfluenz der Zellen und das für die Kultivierung verwendete Nährmedium. Während bei der HROG06-Zelllinie PRG3- und PRG5-mRNA-Level messbar waren, blieb der Nachweis dieser PRGs für die HROG15-Zelllinie aus. Die statistische Analyse unter Anwendung einer solch geringen Stichprobengröße ist nicht möglich. Insgesamt sind keine deutlichen, einheitlichen Veränderungen mit folgender Hoch- oder Herunterregulation der Genexpression in Abhängigkeit von der Konfluenz oder dem Nährmedium nachweisbar. Die Auswahl der Referenzgene scheint bei HROG06 keinen wesentlichen Einfluss auf die

Expressionsmuster auszuüben. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei HROG15 in Abhängigkeit des verwendeten Referenzgens diskret unterschiedliche Expressionsmuster für *PRG1*, *PRG2* und *PRG4*. Unter Verwendung beider Referenzgene konnte jeweils eine geringe Reduktion der *PRG2*-mRNA bei verminderter Konfluenz der HROG15-Zellen beobachtet werden (Abb. 18 C und D). Verstärkend auf diese Reduktion wirkte die zeitgleiche Verwendung des Nährmediums mit 10 % FCS kultivierten Zellen. Im prozentualen Vergleich betrug die *PRG2*-mRNA der HROG15-Zelllinie mit 50 % konfluenten und mit 10 % FCS kultivierten Zellen zwischen 20-26 % der *PRG2*-mRNA der HROG15-Zelllinie mit 90 % konfluenten Zellen, kultiviert in einem Medium mit 10 % FCS. Wenngleich bei HROG06 insgesamt geringere *PRG2*-Level detektiert wurden, ergaben sich ebenfalls für diese Zelllinie zunehmend verminderte *PRG2*-mRNA-Nachweise bei Reduktion der Konfluenz (Abb. 18 A und B). Bei der HROG06-Zelllinie resultierte eine Reduktion der Konfluenz auf 50 % in einer nicht messbaren *PRG2*-Expression (Abb. 18 A und B). Die höchsten messbaren *PRG3*-mRNA-Level wurden bei 50 % konfluenten, mit 10 % FCS kultivierten Zellen ermittelt (Abb. 18, A und B).

Die Fähigkeit, morphologische Veränderungen in Abhängigkeit ihrer Expression hervorrufen zu können, obliegt *PRG3* und *PRG5* [31,59,63,64,67,97]. Zur Veranschaulichung ihres Einflusses wurden die phänotypischen Erscheinungsbilder der beiden Zelllinien HROG06 und HROG15 untersucht (Abb. 19). Die Auswahl der zwei HROG-Zelllinien für die Untersuchung der morphologischen Veränderungen erfolgte aufgrund der besonderen mRNA-Expression von *PRG3* und *PRG5* (Abb. 18). Mikrofotografisch konnte der bekanntermaßen fibroblastenähnliche Phänotyp [117] bei den beiden Zelllinien mit optischen Unterschieden gezeigt werden (Abb. 19). Wie bereits zuvor von Mullins *et al.* beschrieben, wies HROG06 jedoch kleinere Zellkörper mit langen Ausläufern [118] (Abb. 19, A – C) im Vergleich zu HROG15 (Abb. 19, D – F) auf. Die HROG15-Zellen zeigen einen langgestreckten, vergrößerten Zellkörper.

In Zusammenschau der Befunde konnte kein klarer Hinweis auf eine gleichgerichtete Regulation der *PRGs* durch die Modulation der verwendeten Konfluenz und dem für die Kultivierung verwendete Nährmedium festgestellt werden. Die Detektion von *PRG3* und *PRG5* kann morphologische Veränderungen hervorrufen. Ein Fehlen beider *PRGs* resultierte in der Ausbildung von zunehmend länglichen, vergrößerten Zellkörpern.



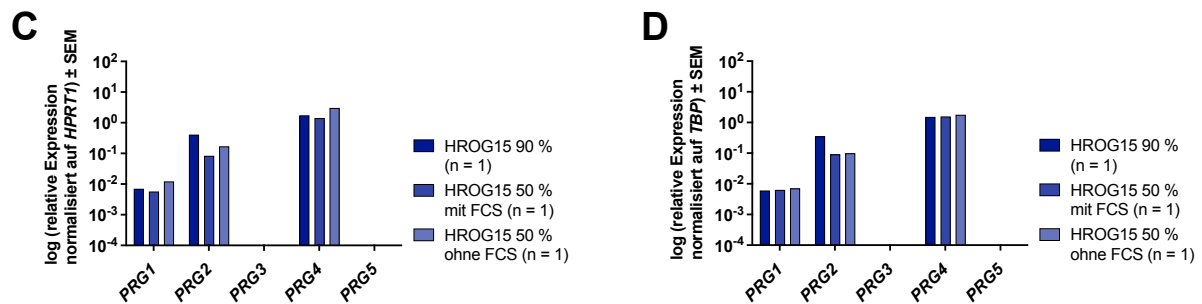


Abbildung 18: Einfluss der Konfluenz der Zellen und des für die Kultivierung verwendeten Nährmediums auf die PRG-Expression.

Relative mRNA-Expression der PRGs der Zelllinien HROG06 (A und B) und HROG15 (C und D) in Abhängigkeit von der Konfluenz sowie dem für die Kultivierung verwendeten Nährmedium. Dabei lagen jeweils folgende Konditionen vor: (I) 90 % konfluente Zellen, kultiviert in Medium mit 10 % FCS, (II) 50 % konfluente Zellen, kultiviert mit 10 % FCS, (III) 50 % konfluente Zellen, kultiviert in Serum-freiem Medium (kein FCS). Die Anzahl der Zelllinien ermöglichte keine statistische Analyse und konnte keine klaren Tendenzen zur Hoch- oder Herunterregulation der mRNA-Expression durch zwei modulierende Faktoren identifizieren. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A, C) und *TBP* (B, D) normalisiert.

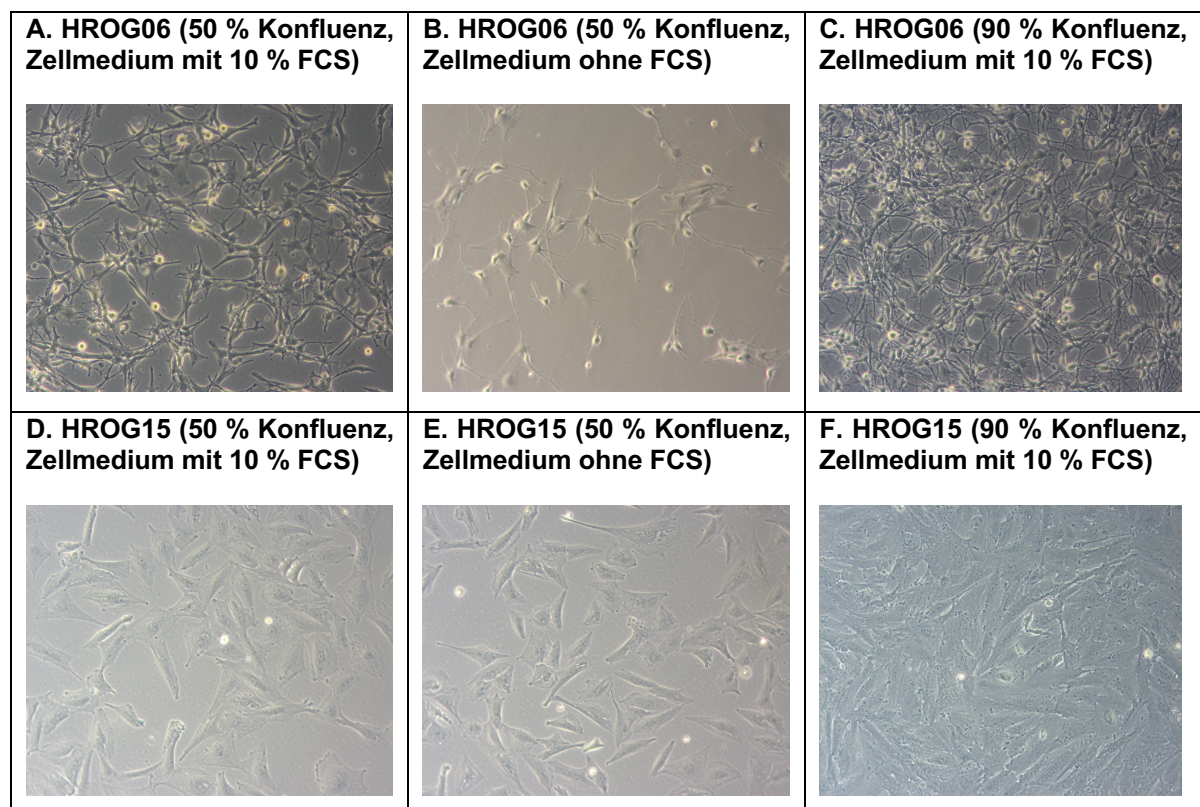


Abbildung 19: Mikroskopische Abbildung der HROG-Zelllinien in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen sowie dem für die Kultivierung verwendeten Nährmedium.

In dieser Abbildung zeigen mikrofotografierte Bilder, in 100-facher Vergrößerung, die Morphologie der HROG06- und HROG15-Zelllinie in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen sowie dem für die Kultivierung verwendeten Nährmedium. Während HROG06 zum Zeitpunkt der Passage P29 betrachtet wurde, erfolgte die Untersuchung von HROG15 zum Zeitpunkt der Passage P25. Die Bilder wurden freundlicherweise durch den Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt.

4.4.2. Reduzierte PRG5-Level im Rezidiv-Glioblastom bei HROG-Zelllinien

Die Frage nach molekulargenetischen Besonderheiten der Tumorpatienten ist für zukünftige Behandlungsstrategien von enormem Interesse [7-9]. Um therapeutische Ansatzpunkte auch für Rezidiv-Glioblastome aufzuzeigen, widmet sich dieser Abschnitt den unterschiedlichen PRG-Expressionsmustern des erstmaligen Glioblastom-Nachweises und dem Rezidiv-

Glioblastom der HROG-Zelllinien (Abb. 20). Zwischen beiden untersuchten Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der weiblichen Patientenzahlen oder des durchschnittlichen Alters („Tabelle 19“). Innerhalb dieser Analyse und im Vergleich zu den humanen *in vivo* Untersuchungen ergibt sich eine geringfügige Veränderung bei der Rangfolge der PRG-Level. *In vitro* weisen die Primärtumore die Rangfolge **PRG4 > PRG1 > PRG5 > PRG2 > PRG3** (Referenzgen *HPRT1*) oder **PRG4 > PRG1 > PRG2 > PRG5 > PRG3** (Referenzgen *TBP*) auf. Für Rezidiv-Tumore ergibt sich die folgende Rangfolge: **PRG4 > PRG1 > PRG2 > PRG3 > PRG5**. Der erneute Tumorbefall (Rezidiv) vermindert somit potenziell die PRG5-Expression im Verhältnis zu den anderen vier PRGs. PRG1 bis PRG4 wiesen keine messbaren, signifikanten Unterschiede zwischen dem erstmaligen Tumornachweis und dem Rezidiv-Glioblastom auf. Allerdings konnten moderate Abweichungen dargestellt werden. Statistisch signifikante Unterschiede beider Gruppen wurden lediglich bei der PRG5-Expression unter Auswahl des Referenzgens *TBP* ermittelt, die sich bereits in nicht signifikanter Form bei Verwendung des Referenzgens *HPRT1* beobachten ließen. Es zeigte sich im Rezidiv-Glioblastom eine verminderte PRG5-mRNA. In ähnlicher Weise konnten bei einem erneuten Tumorbefall reduzierte PRG3-Level beobachtet werden. Die Resultate weisen darauf hin, dass das Rezidiv-Glioblastom mit einer Tendenz zur verminderten PRG3- und insbesondere PRG5-Expression gegenüber Patienten mit erstmaligem Glioblastom-Nachweis einhergeht.

Gruppe	Glioblastom (n = 8)	Rezidiv (n = 5)	p-Wert
Durchschnittsalter ± SD (Jahre)	66,25 ± 11,90	59,60 ± 6,580	0,3745, ns
Weiblich (%)	4 (50 %)	2 (40 %)	> 0,9999, ns

Tabelle 19: Patientencharakteristika gruppiert nach erstmaligem Glioblastom-Nachweis und Rezidiv-Glioblastom im HROG-Modell.

Zwischen der Gruppe mit dem erstmaligen Auftreten des Glioblastoms und der Gruppe mit dem Rezidiv-Glioblastom konnten keine signifikanten Unterschiede bei dem durchschnittlichen Alter oder der Geschlechtsverteilung festgestellt werden. Für die statistischen Analysen der Altersunterschiede erfolgte die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests und für die der Geschlechtsverteilung der Fisher exact-Test.

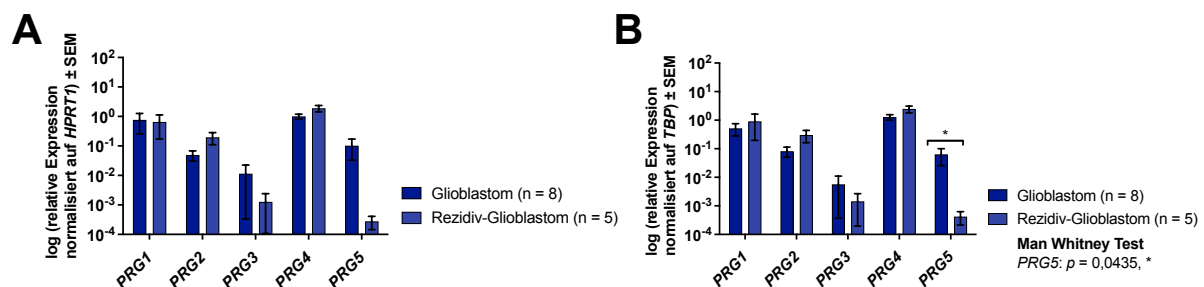


Abbildung 20: PRG-mRNA-Expression im humanen *In-vitro*-Modell mit erstmaligem Glioblastom-Nachweis und mit Rezidiv-Glioblastom.

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von Glioblastompatienten und Patienten mit Rezidiv-Glioblastom der HROG-Zelllinie. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A) und *TBP* (B) normalisiert.

4.5. Präklinisches Tiermodell zur Identifizierung der Modifikation der *Prg*-Expression durch Implantation der F98-Gliomzellen *in vivo*

4.5.1. Validierung der TaqMan® Gene Expression Assays im Fischer-F98-Gliom-Modell

Vor ihrer Anwendung in der qRT-PCR wurden die Primer und Sonden des TaqMan® Gene Expression Assays validiert. Die Validierung erfolgte unter Verwendung einer F98-Zelllinie und einer unbehandelten Wistar-Ratte (Abb. 21). Mittels des ersten rodenten *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays konnte erfolgreich die *Prg3*-Expression erfasst werden. Spätere Analysen der *Prg3*-Expression im Fischer-F98-Modell wiesen darauf hin, dass die Erfassung des zu detektierenden Zielgens durch diesen TaqMan® Gene Expression Assay nicht möglich war (Abb. 33). Es erfolgte demzufolge, unter Anwendung eines neu generierten zweiten TaqMan® Gene Expression Assays (siehe „Etablierung des neuen *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“), die erfolgreiche Messung des *Prg3*-Zielgens (Abb. 21). Für die folgenden Analysen wurde der neu generierte TaqMan® Gene Expression Assay verwendet.

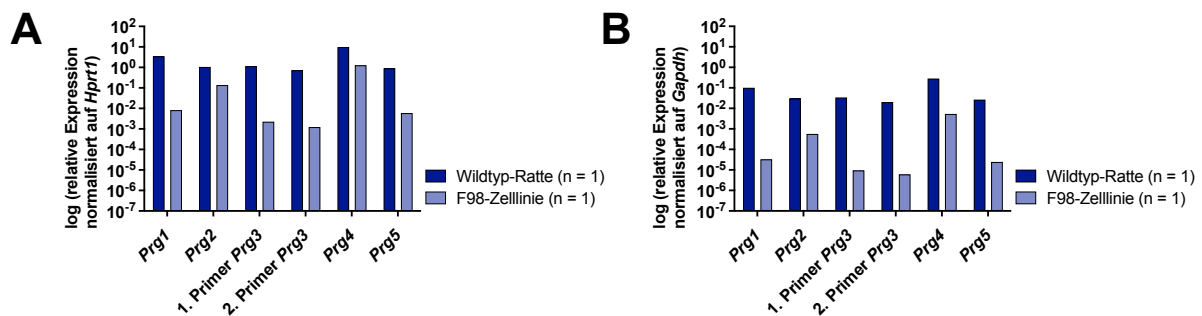


Abbildung 21: Validierung der TaqMan® Gene Expression Assays für das Fischer-F98-Gliom-Modell.

Vor Analysierung der *Prg*-Expression im Fischer-F98-Gliom-Modell wurde die Erfolgreiche Detektion der *Prg*-Expression mithilfe des TaqMan® Gene Expression Assays in einer unbehandelten Wistar-Ratte und einer F98-Zelllinie überprüft. Nach fehlendem Erfolg des ersten *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays in späteren Analysen, wurde ein zweiter TaqMan® Gene Expression Assay untersucht. Bei einer n-Zahl von jeweils 1 erfolgte keine weitere statistische Bewertung. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *Hprt1* (A) und *Gapdh* (B) normalisiert.

4.5.2. Evaluierung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell

Zur Evaluierung einer adäquaten Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell wurden neben den ipsilateralen und kontralateral behandelten Großhirnhemisphären der Sham-Ratte, die kontralateralen Hemisphären der Fischer-Ratte nach Implantation der F98-Zelllinie untersucht (Abb. 22). Aufgrund einer geringen n-Zahl wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die behandelte ipsilaterale und kontralaterale Hemisphäre der Sham-Ratten weist nahezu identische *Prg*-mRNA-Level entsprechend der kontralateralen Hemisphäre der Fischer-F98-Gliom-Ratte auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die kontralaterale Hemisphäre der Fischer-F98-Gliom-Ratte nicht durch ein infiltratives Tumorstadium beeinflusst wird und sie somit als adäquate Kontrollgruppe für die Expressionsanalysen bei malignen Gliomen genutzt werden kann.

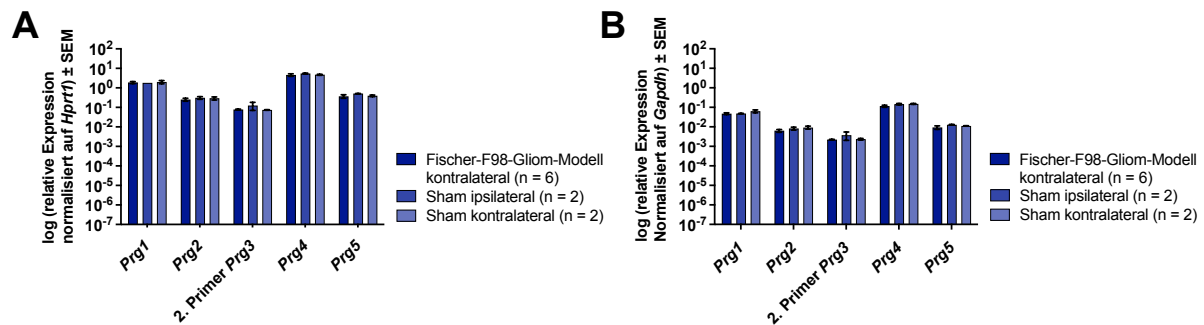


Abbildung 22: Bestimmung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell.

Graphische Darstellung der *Prg*-Expressionsmuster der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären der Sham-Ratten sowie der kontralateralen Hemisphäre des Fischer-F98-Modells. Es zeigt sich ein Trend für ähnliche Expressionslevel zwischen drei Gruppen. Bei $n < 3$ erfolgte keine statistische Auswertung. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *Hprt1* (A) und *Gapdh* (B) normalisiert.

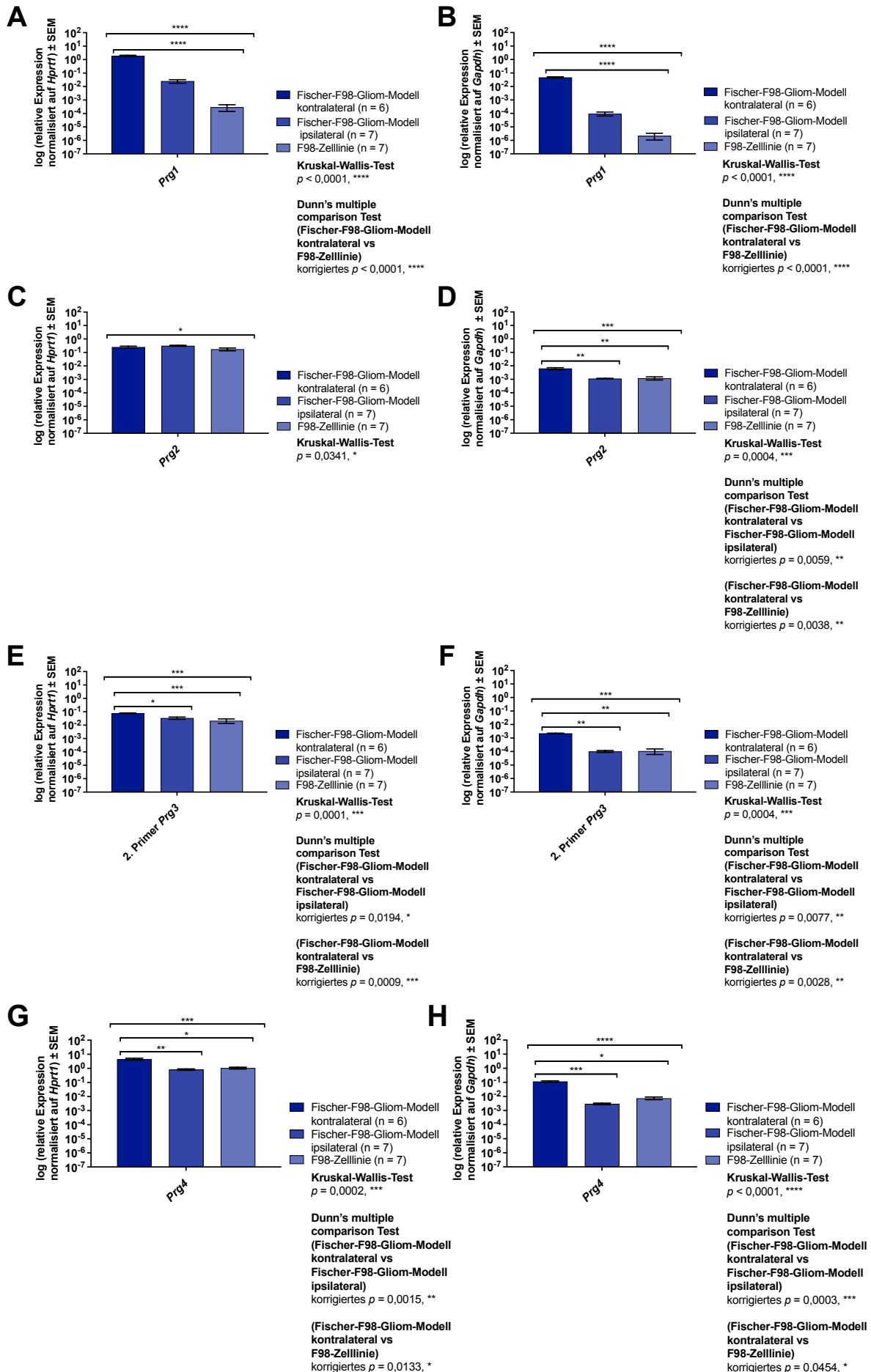
4.5.3. Expression der *Prgs* im Fischer-F98-Gliom-Modell

Erstmals werden die *in vitro* Expressionsmuster der fünf *Prgs* einer Zelllinie, eines *in vivo*-wachsenden Glioms mit einer *in vivo* Kontrolle verglichen (Abb. 23). Um ein besseres Verständnis für die Auswirkungen des Organismus auf die Genexpression der Gewebe erhalten zu können, wurden die Hirngewebe etwa zwei Wochen nach der operativen Behandlung entnommen. Ziel dieser Untersuchung war es, die Veränderung der *Prg*-Expression der F98-Gliomzelllinie (*in vitro*) nach der Implantation im Hirngewebe der Ratte (*in vivo*) zu untersuchen. Diese Ergebnisse wurden mit der Kontrollgruppe (Fischer-F98-Gliom-Modell kontralateral, siehe Abschnitt „Evaluierung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell“) verglichen. Interessanterweise stellten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression zwischen der F98-Gliomzelllinie und dem wachsenden Tumor nach Implantation dieser malignen Zelllinie dar. Allerdings sind leichte Abweichungen mit geringeren *Prg*-mRNA-Leveln *ex vivo* bei *Prg1*, *Prg2* (Referenzgen *Hprt1*), *Prg3* (Referenzgen *Hprt1*) und *Prg5* zu erkennen. Während bei *Prg1* die Expression im Tumorgewebe *in vivo* um Faktor 85,53 (Referenzgen *Hprt1*) oder 43,50 (Referenzgen *Gapdh*) erhöht war, lag bei *Prg5* sogar eine Erhöhung um Faktor 486,94 (Referenzgen *Hprt1*) oder 264,21 (Referenzgen *Gapdh*) vor.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen bei allen *Prgs*, außer *Prg2* (Referenzgen *Hprt1*), eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression in der F98-Gliomzelllinie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum Beispiel konnte im Kontrollgewebe eine um Faktor bis zu 6542,90 (Referenzgen *Hprt1*) oder 22305,30 (Referenzgen *Gapdh*) erhöhte *PRG5*-mRNA ermittelt werden. Weniger häufig ergeben sich signifikante Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und dem Fischer-F98-Gliom der ipsilateralen Hemisphäre. Sichtbar wird die signifikante Reduktion der Genexpression im Tumorgewebe bei der Analyse von *Prg2* (Referenzgen *Gapdh*), *Prg3* und *Prg4*. Das Phänomen der verminderten Genexpression im Tumorgewebe konnte mit einem schwächeren Trend auch bei *Prg1* und *Prg5* beobachtet werden.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass *Prgs* im unbehandelten, nicht malignen veränderten Gewebe, stärker exprimiert werden als im Gliom (F98-Gliomzellen und ipsilaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells). Dies impliziert eine Herunterregulation der Genexpression bei den vorliegenden malignen Prozessen.

Ergebnisse



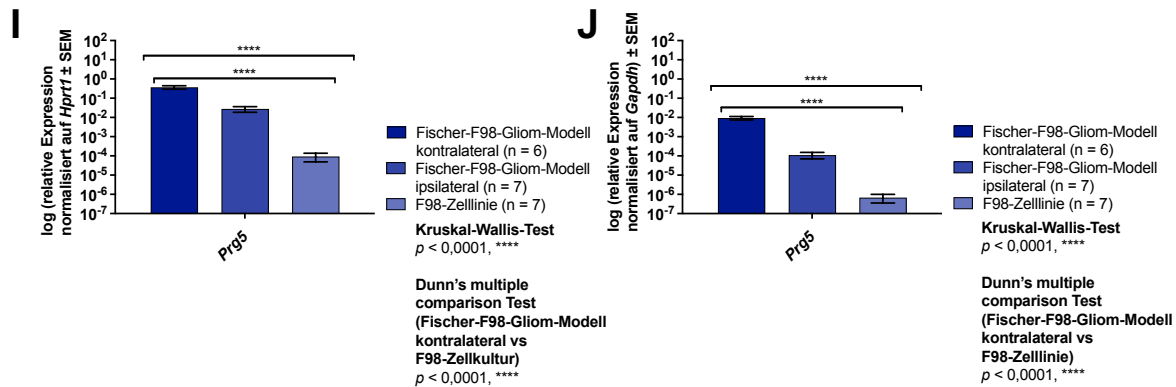


Abbildung 23: *Prg*-Expression im Fischer-F98-Gliom-Modell.

Darstellung der relativen *Prg*-mRNA-Expression des Fischer-F98-Gliom-Modells mit Darstellung der Hemisphäre mit Tumorwachstum („Fischer-F98-Gliom-Modell ipsilateral“), der kontralateralen Hemisphäre („Fischer-F98-Gliom-Modell kontralateral“, Kontrollgruppe) sowie der initialen F98-Zelllinien. Die *Prg*-mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *Hprt1* (**A, C, E, G, I**) und *Gapdh* (**B, D, F, H, J**) normalisiert.

5. Diskussion

5.1. Ermöglichen präklinische Modelle eine Voraussage humaner PRG-Expressionsmuster?

Wie vorangehend beschrieben wurden in gegenwärtigen Forschungsergebnissen zunehmend Zusammenhänge zwischen den PRGs und Tumoren nachgewiesen. PRGs beeinflussen die neuronale Plastizität und können unter Umständen dadurch das Wachstum von hirneigenen Tumoren verändern. Aufgrund des ungehinderten Progresses des Glioblastoms existieren ausschließlich lebensverlängernde Therapieansätze. Eine Heilung der Patienten ist bisher nicht möglich. Zur Beurteilung und für die Entwicklung medizinischer Behandlungsmethoden des Glioblastoms werden zunehmend molekulargenetische Prozesse untersucht. Aktuelle Forschungsergebnisse werfen die Frage auf, welche Rolle den PRGs in der Entwicklung und bei dem Progress des Glioblastoms zukommt. Die Bedeutung der PRGs im Glioblastom *in vivo* ist bisher ungeklärt. In diesem Kontext wurde zur Grundlagenforschung die alternierende Phospholipid-Expression aller fünf *PRGs/PrGs* im humanen Glioblastom *in vivo* und in zwei präklinischen Modellen in der vorliegenden experimentellen Arbeit bestimmt. Ziel ist es, Ansatzpunkte für zukünftige Projekte zur Erforschung von Therapieoptionen beim Glioblastom im Sinne der Grundlagenforschung zu liefern. Zur Verifizierung der alternierenden Genexpression erfolgte primär die RNA-Isolation der biologischen Proben und eine anschließende Bestimmung der Expression mittels qRT-PCR. Eine Gegenüberstellung dieser drei Modelle ist aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Proben aus tierischen und humanen Geweben nur begrenzt durchführbar. Die Übertragung der in präklinischen Modellen gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus, im Sinne der translationalen Forschung, ist nach Aufdeckung verschiedener Abweichungen innerhalb der einzelnen Modelle nicht uneingeschränkt möglich. Die Anwendung dreier verschiedener Referenzgene begrenzt zusätzlich die Möglichkeit eines direkten Vergleichs zwischen den drei Modellen. Zum aktuellen Zeitpunkt weisen nahezu alle dargebotenen Glioblastom-Modelle limitierende Faktoren zur realistischen Beurteilung humaner Genexpressionen auf. Insbesondere die Auswahl der Probenherkunft gilt als begrenzender Faktor. Heutzutage bietet sich neben der

freien unbegrenzten Verwendung von Zellkulturen mitunter die eingeschränkte Verfügbarkeit von humanem Tumor- und Kontrollgewebe an. Durch andere externe und interne Faktoren entwickeln sich Zellkulturen nicht im gleichen Sinne wie Gewebe *in vivo*. Vorteilhaft für diese Arbeit war die Verfügbarkeit beider Materialien zur differenzierten Analyse der *PRGs* im humanen Glioblastom. Aufgrund unterschiedlicher *PRG*-Expressionsmuster in beiden Modellen scheint eine translationale Übertragung der Ergebnisse der humanen Zelllinien nicht immer möglich. Während im humanen Tumorgewebe die Genexpression mit folgender Rangfolge *PRG4* > *PRG1* > ***PRG3*** > ***PRG5*** > ***PRG2*** (Abb. 11) detektiert wurde, weisen Zelllinien folgende Rangfolge auf: *PRG4* > *PRG1* > ***PRG5*** > ***PRG2*** > ***PRG3*** (Referenzgen *HPRT1*) oder *PRG4* > *PRG1* > ***PRG2*** > ***PRG5*** > ***PRG3*** (Referenzgen *TBP*) (Abb. 20). Welche Faktoren die Abweichungen der Expressionsmuster hervorrufen, ist unklar. Wesentlich kann die Lokalisation der Gewebegewinnung für die *in vivo* Gewebe oder Generierung der Zelllinien sein [117]. Dabei kann die zusätzliche neurochirurgische Gewinnung von peritumoralen Gewebe die Zusammensetzung der biologischen Proben modifizieren. Peritumorales Gewebe weist eine hohe Zellvariabilität auf [136], bei der die bereits infiltrierenden Glioblastomzellen einen anderen Phänotyp als im Tumorzentrum aufweisen und stark ausgeprägte genomische Veränderungen vorliegen [137]. Prospektive Studien sollten daher die Lokalisation der Probenentnahme erheben und mögliche Einflüsse auf die Genexpression prüfen.

Während ein Großteil der präklinischen Forschung Tiermodelle nutzt [138], spiegelt die Anwendung präklinischer Modelle zur translationalen Forschung nur begrenzt die Komplexität und die Breite der genetischen Variabilität, umweltbedingte und weitere Einflussfaktoren auf den Menschen wieder [138]. Ergebnisse von Tiermodellen ermöglichen folglich nur eine eingeschränkte Voraussagekraft für den Menschen. Zusätzlich setzt die reduzierte molekulare Bandbreite an Signalwegen den *In-vitro*-Modellen eine Grenze für die Vergleichsmöglichkeit mit humanen Forschungsergebnissen *in vivo* [138]. Bereits präklinische und klinisch toxikologische Studien des letzten Jahrhunderts wiesen auf diese Problematik hin [139]. Frühere Forschungsergebnisse konnten bei medikamentösen Therapien wie z. B. Thalidomid (Contergan) bei Tierversuchen keine toxischen Wirkungen nachweisen, wohingegen die Anwendung am Menschen mit deutlichen Fehlbildungen einherging [139,140]. Als bereits für die Gliom-Forschung etabliertes präklinisches Modell gilt das in dieser Arbeit angewandte Fischer-F98-Gliom-Modell. Grund für die bevorzugte Verwendung des Fischer-F98-Modells für Gliom-Studien ist zum einen das infiltrative Tumorstadium und zum anderen die geringe bis fehlende Immunogenität, die dem Glioblastom ähnelt [141,142]. Die geringe Immunogenität hilft, die Resistenz von Gliomen gegenüber Immuntherapien besser zu verstehen [141,142]. Außerdem wurden bereits molekulargenetische Veränderungen im Glioblastom mithilfe der F98-Gliomzelllinie beurteilt [142]. Molekulargenetisch weist die F98-Gliomzelllinie einen Anstieg der Expression des Ras-Wachstumsfaktors auf [142], ähnlich dem humanen Glioblastom [141]. In Relation mit einem *Prg3*-Ungleichgewicht fördert Ras in Gliomen die Proliferation sowie Invasion und somit Malignität der Tumore [112].

Obwohl es sich um verschiedene biologische Proben und Spezies handelt, konnte anhand dieser Studie festgestellt werden, dass die *PRG4*-Expression im humanen Gewebe *in vivo* (Abb. 11), in humanen HROG-Zelllinien *in vitro* (Abb. 20) und dem Fischer-F98-Gliommodell (Abb. 21, Abb. 23) im Vergleich zu den anderen *PRGs/PrGs* am stärksten exprimiert wird. Die

von Gross *et al.* beobachteten Ergebnisse zeigen Parallelen zu den hier dargestellten Ergebnissen [59]. Eine im Verhältnis zu den anderen vier *Prgs* erhöhte und stabile *Prg4*-mRNA-Expression war bereits in primär kultivierten Astrozyten der Maus beobachtet worden [59]. Dementsprechend kann die erhöhte *PRG4-/Prg4*-Expression im Glioblastom durch seine Zuordnung zu den Astrozytomen und die Entstehung aus Astrozyten [4,5] begründet werden. Es kann angenommen werden, dass die untersuchten Kontrollgewebe dieser Arbeit ebenfalls Astrozyten enthalten und sich dadurch erhöhte *PRG4-/Prg4*-Expressionsmuster zeigen. Die Rangfolge der anderen vier *PRGs/Prgs* unterschied sich in Abhängigkeit von den untersuchten Merkmalen sowie der Herkunft der untersuchten Materialien. Erklärend für die teils ausgeprägten Unterschiede zwischen den drei Modellen können externe und interne Störfaktoren sein, die die mRNA-Level beeinflussen. Zu diesen möglichen Störfaktoren zählen mitunter neurologische Krankheitsbilder, die als erste klinische Anzeichen bei Glioblastompatienten auftreten. Es wird vermutet, dass neurologischen Krankheitsbilder wie z. B. epileptische Krampfanfälle [9,14] die *Prg*-Level modulieren [33,61]. Als weiterer modulierender Faktor des Genotyps kann die Passage der Zelllinien in *In-vitro*-Modelle gesehen werden [143]. Ergänzende Untersuchungen konnten keine eindeutigen Veränderungen der *PRG*-mRNA-Expression in Abhängigkeit von dem Passage-Zeitpunkt feststellen (siehe „Fehlende *PRG*-Regulation bei zunehmender Passage der HROG-Zelllinien“), wenngleich nur eine eingeschränkte n-Zahl in den einzelnen Gruppen vorlag. Ob diese Faktoren ursächlich für die verschiedenen Expressionsmuster in den einzelnen Modellen sind, bleibt daher nicht sicher auszuschließen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Konfluenz der Zellen und das für die Kultivierung verwendete Nährmedium die *PRG*-Expression nicht maßgeblich beeinflussen (Abb. 18) und somit vermutlich keine potenziellen Störfaktoren darstellen. Als Limitation für diese Arbeit kann somit die fehlende Kenntnis all dieser potenziellen Störfaktoren, insbesondere das Wissen über neurologische Krankheitsbilder oder Umwelteinflüsse, gesehen werden. Die präklinische Untersuchung der Molekulargenetik des Glioblastoms ermöglicht dennoch, neue Anknüpfungspunkte für Forschungsprojekte zu entdecken. Eine zentrale Position für folgende molekulargenetischen Untersuchungen in der Gliomforschung können möglicherweise *PRG3* und *PRG5* einnehmen. Vorangegangene Studien brachten beide *PRGs* mit dem Glioblastom in Zusammenhang [72,112]. Diese Arbeit konnte erstmals auf morphologische Veränderungen durch spezifische Koexpressionsmuster beider *PRGs* in glialen Zellen hinweisen (Abb. 18, Abb. 19) und zusätzlich eine Deregulation der *PRG3*- und *PRG5*-Level mit einem Rezidiv-Glioblastom *in vitro* assoziieren (Abb. 20). Auf der Suche nach neuen molekulargenetischen Therapieansätzen des Glioblastoms können zukünftige Fragestellungen die Analyse dieser beiden *PRGs* verstärkt in den Mittelpunkt stellen. Der Schwerpunkt sollte dabei auf der Regulation der *PRG-/Prg*-Expression mit Bestimmung der folgenden Konsequenzen für Rezidive liegen. Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen molekulargenetischen Unterschiede, fehlender histopathologischer Untersuchungen und des geringen Kenntnisstands über zusätzliche externe und interne Einflussfaktoren lässt sich durch die präklinischen Modelle keine klare Voraussage zu humangenetischen Expressionsmustern der *PRGs* und ihrer Auswirkung auf den menschlichen Organismus ableiten.

5.2. Limitierende Einflussfaktoren der Expressionsanalysen

5.2.1. Beeinflusst die Handhabung der Proben und die Durchführung der Experimente die Resultate?

Diese Arbeit untersucht die *PRG-/Prg*-Genexpression im Glioblastom. Die Resultate dieser Analysen können durch Faktoren wie die Lagerung der biologischen Proben und die Durchführung der experimentellen Methodik beeinflusst werden. Besonders hervorgehoben werden sollte, dass die Proben durch die Kooperationspartner zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen und unter abweichenden Bedingungen gelagert wurden. Die Proben aus dem Institut für Anatomie der Charité der Universitätsmedizin Berlin wurden zu einem deutlich früheren Zeitpunkt gewonnen und dementsprechend über einen wesentlich längeren Zeitraum tiefgefroren gelagert als es am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock der Fall war. Wissenschaftlich ist nicht hinreichend belegt, inwieweit die vorangehende Kühlung der Proben Einfluss auf die sensible RNA-Isolation hat [144]. Neben der Lagerung spielt die methodische Umsetzung der Experimente und ihrer einzelnen Schritte eine relevante Rolle und kann durch ihre Abänderungen die Ergebnisse beeinträchtigen. An dieser Stelle sollen nur einzelne Beispiele genannt werden, die die Resultate modifizieren und zu einer missverständlichen Interpretation der Ergebnisse führen können. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR als wesentliche Methode zur Erfassung der Expressionsmuster verwendet. Entsprechend den „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ (MIQE)-Leitlinien können zahlreiche Aspekte in der Durchführung der qRT-PCR die Validität der Analyse und die Reproduzierbarkeit beeinflussen [144]. Als relevanter kritischer Punkt gilt die Generierung der RNA [144]. Der Prozess einer nahezu identischen RNA-Isolation ist bei Gebrauch von Materialien unterschiedlichster Herkunft schwer umsetzbar. Für die Datenerhebung wurden mitunter humane Gewebe aus vitalem (*in vivo* und *in situ*), *post mortem* Gewebe sowie Gewebe aus Ratten (*in vivo*) oder Zellkulturen (*in vitro*) verarbeitet. Demzufolge kann der Prozess der RNA-Isolation in Abhängigkeit von der Probenherkunft unterschiedlich erfolgreich durchgeführt worden sein [144]. Zur Minimierung dieser Fehlerquellen wurde die Umsetzung der RNA-Isolation entsprechend der Probenherkunft adaptiert (siehe „RNA-Isolation mit Bestimmung der Konzentration und Reinheit“). Aufgrund eingeschränkter technischer Möglichkeiten konnte das Gewebe-Volumen vorab nicht bestimmt werden, wenngleich es einen Vergleich der generierten Daten vereinfacht. Um die Vergleichbarkeit der Experimente weiterhin zu gewährleisten, wurden in der cDNA-Synthese festgelegte RNA-Massen verwendet (siehe „cDNA-Synthese“). Die benötigte RNA-Masse wurde vorab ermittelt. Dafür wurden die Konzentration und Reinheit der RNA mithilfe der Nukleinsäure-Quantifizierung fotometrisch bestimmt. Während die Konzentration für die weiteren Schritte der cDNA-Synthese benötigt wurde, bewirkte eine fehlende Reinheit der RNA im Zielbereich für den Reinheits-Quotienten [121] möglicherweise eine Disqualifikation der Probe für weitere Analysen. Wichtig ist hierbei, die Bedingungen für die Messungen nahezu identisch zu halten, da bereits diskrete Umgebungsveränderungen diese Quantifizierung beeinträchtigen können [122]. Aufgrund technischer Verfügbarkeiten erfolgte die Nukleinsäure-Quantifizierung mit verschiedenen Geräten. Die Bestimmung wurde bei den humanen Gewebeproben hauptsächlich mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, bei Fischer-F98-Gliom-Modell mit dem Eppendorf BioSpectrometer®

basic und bei den humanen Zelllinien durch den Kooperationspartner durchgeführt. Die nahezu einheitliche Verwendung der spektrophotometrischen Messmethode im humanen *In-vivo*-Modell und im Tiermodell vermied einen Methodenwechsel [144]. Zusätzlich gewährleistet die fast einheitliche Verwendung eines Messgeräts innerhalb eines Modells die Vergleichbarkeit der Daten. Die anschließend generierten cDNA-Synthese-Produkte wurden mithilfe der PCR amplifiziert. Verifiziert wurde der Erfolg dieser Amplifikation durch das Referenzgen beta Aktin. Zur Optimierung wurden die Nukleotidsequenzen der Primer für die Amplifikation des *ACTB*-/*Actb*-Gens überprüft und ausgewählt (siehe „Etablierung des humanen *ACTB*-Primers“, „Etablierung des *Actb*-Primers für das Fischer-F98-Gliom-Modell“). Bei fehlendem Erfolg der Etablierung der erstmals generierten humanen beta Aktin-Primer wurde die Temperatur für die Anlagerung (Annealing) der Primer nach vorangehender Denaturierung während der PCR [144] angepasst und eine Temperatur von 68 °C gewählt. Der rodente Primer wurde zuvor am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock unter Verwendung Annealing Temperatur von 70 °C etabliert. Eine weitere Reinheitsbestimmung generierter Produkte fand bei der darauf folgenden Gelelektrophorese der synthetisierten cDNA-Produkte statt („PCR und Gelelektrophorese“). Dieser Schritt ermöglicht den Ausschluss von mit gDNA kontaminierten Proben [144]. Proben mit positivem gDNA-Nachweis (siehe Abb. 24) disqualifizierten sich für weitere Analysen. Die qRT-PCR gilt als eine der sensitivsten Methoden zur Quantifizierung der Genexpressionslevel [145]. Dennoch ist dieser Schritt sensibel gegenüber verschiedenen Einflussfaktoren, die die Datenqualität und Auswertung der Messwerte prägen. Erläuternd wird die Auswahl der Referenzgene und Datenanalyse an späterer Stelle erörtert. Für die qRT-PCR wurden Primer und Sonden der *PRGs*/*Prgs* und Referenzgene („TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“) erfolgreich implementiert. Dabei waren erste Etablierungsversuche des TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640214_m1 Assay an der unbehandelten Wistar-Ratte vielversprechend (Abb. 21). Die darauffolgenden fehlenden adäquaten *Prg3*-Detektionen (Abb. 33) in Proben des Fischer-F98-Gliom-Modells ließen gleichwohl auf eine fehlende erfolgreiche Etablierung in dem Modell schließen. Daher wurde der adaptierte TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640210_m1 erfolgreich etabliert (siehe „Etablierung des neuen *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR“ und Abb. 21, 22 und 23). Somit konnten eine Fehlinterpretation mangelnder *Prg3*-Messungen, im Sinne einer Genexpression unter dem Detektionsniveau, im Fischer-F98-Gliom ausgeschlossen werden. Genetische Unterschiede beider Ratten-Stämme der Art *Rattus norvegicus* können als Grund für den fehlenden Erfolg der TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640214_m1 angenommen werden. Erklärend für den mangelnden Erfolg kann die Bindungsstelle und der Aufbau der Primer mit somit fehlender Sequenzhomologie für

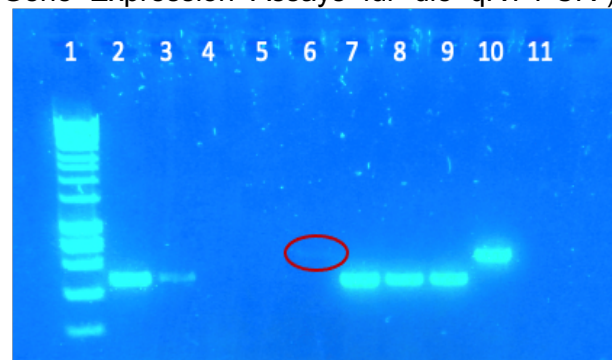


Abbildung 24: Digitale Gelelektrophorese der gDNA.

Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese. Diskreter Bandennachweis im Bereich der gDNA in Spalte 6. Spalte 1: Hyperladder; Spalte 6: Humane Probe mit gDNA-Nachweis; Spalte 10: gDNA; 11: Nuklease-freies Wasser. Bei den Spalten 2-5 und 7-10 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

Prg3 in der Fischer-Ratte sein. Der TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640210_m1 verwendet die Exon-Grenze zwischen dem Exon 1 und 2 mit einer Amplifikationslänge von 77 Basenpaaren und der TaqMan® Gene Expression Assay *PRG3* Rn01640214_m1 die Exon-Grenze zwischen 5 und 6 mit einer Amplifikationslänge von 72 Basenpaaren [146,147]. Leider wird die genaue TaqMan® Gene Expression Assay Sequenz durch Thermo Fisher Scientific Inc. nicht zur Verfügung gestellt, um diese Aussage zu überprüfen. Maßgeblich für die qRT-PCR ist ebenfalls die Erfassung der Effizienz der PCR-Reaktion [125,145]. Für eine akkurate Erfassung der Genexpression mit der Methode nach Livak *et al.* [130] wird eine annähernd gleiche Amplifikationseffizienz der Ziel- und Referenzgene von 100 % angenommen [125,126,145,148]. Die Amplifikationseffizienz der TaqMan® Gene Expression Assays wurde maßgeblich durch das Institut für Anatomie der Charité der Universitätsmedizin Berlin anhand einer Verdünnungsreihe validiert (siehe „Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)“) [125]. Die Effizienztestung für *TBP* und den zweiten rodenten *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assay wurde in dieser Arbeit durchgeführt und entspricht den aktuellen akzeptierten Erwartungen für die PCR-Effizienz [127]. Vorteilhaft in dem in dieser Arbeit angewandten experimentellen Setting der qRT-PCR war die Verwendung von Negativ-Kontrollen. Diese entsprechen dem Mastermix unter Verwendung von Nuklease-freiem Wasser und ermöglichen den Ausschluss einer potenziellen Kontamination [133,144]. Zusammenfassend limitiert der Zeitpunkt der Gewinnung, die Lagerung der Proben sowie die experimentelle Handhabung die Beurteilung der generierten Daten. Bei dem Vorsatz, offizielle Leitlinien und Empfehlungen bestmöglich umzusetzen, wurden die technischen Möglichkeiten der Labore größtmöglich in Anspruch genommen.

5.2.2. Regulation einzelner Referenzgene

Zur Quantifizierung der Genexpressionslevel der *PRGs/PrGs* fand die Methode der qRT-PCR Anwendung. Die Bandbreite an verschiedenen Probearten (z. B. festes Gewebe oder Zelllinien) ermöglichte keine standardisierte Untersuchung einer Zellmenge [149]. Demzufolge wurden anhand der genauen Quantifizierung eines Referenzgens unterschiedliche Ausgangsmengen normalisiert [150]. Für die adäquate Expressionsanalyse erfolgte die paarweise Bestimmung der C_T -Werte des zu untersuchenden Gens mit anschließender Normalisierung auf das Referenzgen [144,149]. Idealerweise handelt es sich bei Referenzgenen um nicht regulierte Gene, die identisch bei allen Proben und Zelltypen exprimiert werden [149,150]. Um einer Missinterpretation vorzubeugen, wurde mehr als ein Referenzgen betrachtet, damit Unterschiede in dem Genexpressionsverhältnis nicht den internen Referenzgenen, sondern der zu untersuchenden mRNA zugeschrieben werden können [151]. Vor Beginn der experimentellen Analysen wurde zur Auswahl des optimalen Referenzgens eine Literaturrecherche durchgeführt. Diese beleuchtete die unterschiedlichen Erfahrungen und Empfehlungen für die Auswahl der Referenzgene in den drei Modellen. Im Fokus standen dabei die drei Referenzgene *HPRT1*, *GAPDH* und *TBP*, die im Gehirngewebe exprimiert werden [149,150]. Während *HPRT1* und *GAPDH* als Referenzgen zu den Stoffwechsel-bezogenen Genen zählen, wird *TBP* den Transkriptions-bezogenen Genen zugeordnet [150]. *HPRT1* unterstützt die Purinsynthese im Salvage Pathway und befindet sich vor allem im Zytosol [149,152-155]. Das im Nukleoplasma lokalisierte *TBP* fungiert als

Transkriptionsfaktor für die RNA-Polymerase II [149,152,154-156]. Die GAPDH ist eine Oxidoreduktase, ein Enzym der Glykolyse und Glukoneogenese und kann in der Plasmamembran, im Zytosol, der Kernmembran und in Vesikeln nachgewiesen werden [149,152,154,155,157,158]. Im Rahmen der vergleichsweise konstanten Expressionslevel von *HPRT1* [149] wurde es bereits als Referenzgen von Tumorgewebe [159] und Rattengewebe [160] empfohlen. Dem gegenüberzustellen sind die Ergebnisse der Analyse vom Glioblastom- und nicht-neoplastischem Hirngewebe, bei denen *HPRT1* kein adäquates Referenzgen darstellt [158]. Für die Untersuchung der Genexpression in humanem Glioblastomgewebe wird *TBP* als vorteilhaftes Referenzgen diskutiert [154,155]. In Zusammenschau der Recherche wurden die Referenzgene *HPRT1* und *TBP* für humanes Gewebe und humane Zelllinien verwendet. Auf Grundlage vorangehender Forschungsarbeiten präsentiert sich *GAPDH/Gapdh* als ein stabiles Referenzgen, speziell in bestimmten Gehirn-Regionen der Ratte und im Glioblastom- und Kontrollgewebe [149,158,161,162]. Demzufolge wird *Gapdh* als valides Referenzgen für Rattengewebe und Astrozytome empfohlen und fand bereits Anwendung in Studien mit F98-Gliomzelllinien und wird für Expressionsanalysen bei Astrozytomen empfohlen [161,163,164]. Allerdings wiesen weitere Forschungsergebnisse auf signifikante Expressionsunterschiede zwischen humanem Glioblastom- und Kontrollgewebe hin [154] und sprechen keine Empfehlung für die Anwendung bei Zellkulturen aus [165]. Die daraus fehlende Empfehlung zur Nutzung von *GAPDH* bei humanem Gewebe und den humanen Zellkulturen wurde in dieser Studie umgesetzt und *Gapdh* an Stelle von *Tbp* im Fischer-F98-Gliom-Modell verwendet. Im Vergleich der auf die jeweiligen Referenzgene normalisierten Genexpressionsmuster ergaben sich einheitliche Richtungstendenzen innerhalb der jeweiligen präklinischen Modelle dieser Arbeit. Trotz der überlegten Auswahl der Referenzgene wurden in Abhängigkeit der Auswahl von *HPRT1* oder *TBP* ungleiche Signifikanzniveaus und teils entgegengesetzte Expressionsprofile der humanen Tumor- und Kontrollproben ermittelt (Abb. 11, 12 A bis D, Abb. 30). Valente *et al.* konnte ähnliche Phänomene beobachten und beschrieb heterogene, teils gegensätzliche Signifikanzniveaus beider Referenzgene [154]. Erklärend für die Unterschiede kann möglicherweise die Auswahl von Glioblastom- und Kontrollgewebe sein, wie es bereits für *HPRT1* aufgezeigt wurde [158]. Maligne Prozesse sowie das Alter von Gliompatienten können die Expression von Referenzgenen modifizieren [149,155,158,159,166].

Zusammenfassend wurden zum Zeitpunkt der *PRG-IPrg*-Expressionsanalyse *GAPDH*, *HPRT1* und *TBP* als meist genutzte Referenzgene bei Gliom-Studien verwendet, ohne dass eine Regulation der Referenzgene zu erwarten wäre [149,155,159-162,164]. Die jeweils individuelle Funktion der drei Referenzgene im Organismus ist ein zusätzlicher Vorteil für eine fehlende Regulation der Genexpression [159]. Dies führte zu dem Schluss, dass die drei stabilen Referenzgene *HPRT1/Hprt1*, *TBP* und *GAPDH* der Zielsetzung dieser experimentellen Untersuchung entsprachen. Die Analyse-Ergebnisse gaben jedoch Hinweise darauf, dass vor allem die Referenzgene *HPRT1* und *TBP* im humanen Glioblastom- und Kontrollgewebe reguliert sein können, wie es mittlerweile in der Literatur [154,155,158] beschrieben wurde. Da die Ergebnisse durch die Auswahl der Referenzgene beeinflusst werden [125], sollten im Sinne dieser neuen Erkenntnisse vor Durchführung von Folgeuntersuchungen an humanem Hirngewebe, multiple Referenzgene als endogene

Kontrolle mit einer stabilen Expression nach derzeitigen Standards validiert werden. Weiterhin sollte in Zukunft die Auswahl von mehr als einem optimalen Referenzgen zur akkuraten Ergebniserfassung priorisiert werden [149,151,154,166].

5.2.3. Limitationen der Datenanalyse für die Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Als abschließenden Punkt gilt es die Auswertung der Datensätze der qPCR („Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)“) zu beleuchten. Warum wurden die Daten mit der $2^{-\Delta C_T}$ - und nicht der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode analysiert? Die $2^{-\Delta C_T}$ -Methode wird insbesondere bei dem Vorliegen limitierter RNA-Mengen empfohlen [130], wie es bei den geringen Mengen humaner Gewebeproben der Fall war. Vorteilhaft ist bei der $2^{-\Delta C_T}$ -Methode ebenfalls die Tatsache, dass eine Kalibrierungsprobe (z. B. unbehandelte Kontrolle) nicht in die Berechnung der $2^{-\Delta C_T}$ -Werte einbezogen werden muss [130]. Beispielsweise lagen für das HROG-Modell keine adäquaten „unbehandelten Kontrollen“ vor, sodass die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode hier keine Anwendung findet und die $2^{-\Delta C_T}$ -Methode empfohlen wird [131]. Demzufolge wurden die Expressionsdaten von Duplikaten jeder Reaktion mithilfe der $2^{-\Delta C_T}$ -Methode, mit Normalisierung auf die Referenzgene *HPRT1* und *TBP* (humane Proben) oder *Hprt1* und *Gapdh* (Fischer-F98-Gliom-Modell), analysiert [59,128,130]. Die begrenzte Verfügbarkeit der Probenmaterialien schränkte die Möglichkeit, Triplet-Bestimmungen durchzuführen [131], stark ein, obwohl dies vorteilhaft zur Identifikation von Ausreißern und ihrem Ausschluss von der Auswertung ist [134]. Zu Beginn wurden für die nachfolgenden Analysen Duplikate für die Berechnung der Mittelwerte der relativen Expression ausgewählt, bei denen die Differenz zwischen den beiden C_T -Werten der Replikate $< 0,5$ (ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen) Zyklen [133] lag. Dieser Grenzwert wurde festgelegt, da zum einen die Variabilität mit höherem C_T -Wert steigt [133] und zum anderen, um integrierte Pippetierfehler in der Datenauswertung gering zu halten [134]. Geringere Konzentrationen der cDNA können mit höherer Wahrscheinlichkeit größere Variationen der ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen zwischen Duplikaten durch Pipettierungsgenauigkeiten hervorrufen [134]. Hierdurch veränderte Messergebnisse können zu einem Ausschluss von den weiteren Datenanalysen führen. Die Einhaltung eines exakten Grenzwerts der ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen von 0,5 Zyklen kann dementsprechend zu einer Verfälschung der statistischen Analyse führen [134]. Diese statistische Verzerrung kann eine Überschätzung der Herunterregulation der Gene implizieren [167]. Damit die statistische Aussagekraft nicht reduziert wird, wird dieses Vorgehen nicht unter allen Umständen empfohlen [134]. Sofern ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden erneute Messungen der Proben mit ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen $> 0,5$ Zyklen entsprechend der Empfehlung von Nolan *et al.* durchgeführt [133]. Kam es trotz wiederholter Messungen zu einer zu hohen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen, wurde der Expressionswert „Null“ festgelegt oder erhöhte ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen akzeptiert („Darstellung der verwendeten Rohdaten“). C_T -Werte > 35 Zyklen gelten meist als „nicht detektierbar“ [134]. Die fehlende Detektion der Genexpression kann durch eine mangelnde Expression eines Transkriptions-Produktes oder eine geringe bis fehlende Amplifikation des Transkriptions-Produktes bei C_T -Werten unter 40 erklärt werden [167]. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die statistische Auswertung gering zu halten, sollte für zukünftige Studien die Aufteilung fehlender Ergebnisse in die zwei Kategorien „undetektierbar“ (zu geringe Konzentration für die Messung oder

tatsächliche Konzentration von Null) und „nicht valide“ (technisches Versagen) entsprechend der aktuellen Empfehlungen unterteilt [134] werden. Um mögliche Pipettierungsgenauigkeiten auszuschließen, wird die mehrfache Wiederholung der Experimente vor Zuordnung in die jeweiligen Kategorien empfohlen. Zusätzlich zu der Methode der Datenauswertung ergeben sich weitere limitierende Faktoren für die Beurteilung der Daten. Mit der Beurteilung der humanen Ergebnisse zeigen sich Trends mit Expressionsunterschieden der *PRGs*, ohne Hinweise für signifikante Differenzen aufzuzeigen. Die geringen Gruppengrößen [168] sowie die Auswahl der Patientenkohorte [169] können diese Ergebnisse beeinflussen. Um die Grundgesamtheit der Glioblastompatienten besser abbilden zu können, wird für zukünftige Arbeiten eine Analyse größerer Fallzahlen empfohlen. Dadurch kann ebenfalls die statistische Power erhöht werden [168,169]. Neben den zuvor genannten statistischen Limitierungen kann die Auswahl der biologischen Proben die Interpretation der Ergebnisse beeinflusst haben. Für die Erfassung der mRNA-Unterschiede war mitunter eine Gegenüberstellung der malignen veränderten Gewebeproben (Human und Ratte) mit einer Kontrollgruppe notwendig. Aufgrund der heterogenen Herkunft der biologischen Proben existiert nur ein begrenztes Angebot an adäquaten Kontrollgruppen. Aufgrund ethischer Gründe sowie der begrenzten Verfügbarkeit humaner Hirngewebe, wurden beispielsweise bei dem Modell mit humanen Tumormustern keine „gesunden“ *in vivo* Gewebe als Kontrolle verwendet. Vielmehr wurde auf verfügbare *post mortem* Gewebe zurückgegriffen. Die Gewinnung „gesunder“ humaner *in vivo*-Proben oder Etablierung einer „gesunden“ humanen Zelllinie wird in der Zukunft weiterhin ein limitierender Faktor sein.

5.3. Genexpression der *PRGs* im humanen Glioblastom

5.3.1. Molekulargenetische Besonderheiten humaner Glioblastompatienten

Molekulargenetische Parameter gewinnen zunehmend an Relevanz für die WHO-Klassifikation hirneigener Tumore und ihrer therapeutischen Behandlungsmethoden [4,8,9]. Nach aktuellem Kenntnisstand werden die *PRGs* zunehmend mit Tumoren assoziiert [33,108,109]. Um neue molekulargenetische Ansatzpunkte des Glioblastoms zu erkennen, galt es die dort exprimierten *PRGs* im Vergleich zu nicht-malignem Hirngewebe zu beurteilen. Die maligne Transformation führt beim Menschen zu einer deutlichen Reduktion der *PRG3*-Level *in vivo* (Abb. 11). Ein solche Abweichung der Genexpression könnte mit der Herkunft des Glioblastoms aus Astrozyten [4,5] begründet werden, die sich durch die verminderte *Prg3*-Expression in Astrozyten erklären lässt [55]. Einhergehend mit der Zunahme des Tumorwachstums kann diese *PRG3*-Reduktion dadurch eventuell stärker im Glioblastom gemessen werden. Die aus der *Prg3*-Deregulation resultierende, vermehrte Migration und Invasion der Gliomzellen [112] kann zusätzlich einen Vorteil für das Tumorwachstum darstellen und das diffus infiltrative Wachstum [9] fördern. Das neben *PRG3* mit kanzerogenen Prozessen assoziierte *Prg4* [55] wird im Glioblastom (*PRG4*) stärker exprimiert als im Kontrollgewebe (Abb. 11). Mit erneutem Auftreten eines Glioblastoms (Rezidiv) verstärkt sich dieser Effekt (Abb. 20). Es kommt zu einer diskreten, nicht signifikanten Erhöhung der *PRG4*-mRNA *in vitro* (Abb. 20). Möglicherweise kann die Hochregulation von *PRG4* in Zukunft mit einer zunehmenden Therapieresistenz assoziiert werden, wie es bereits für medikamentenresistente humane Melanomzellen der Fall war [50]. Durch seine intrazelluläre

Lokalisation steht *PRG4* mit dem intrazellulären Lipidmetabolismus in Verbindung [59]. Intrazelluläre Prozesse des Lipidmetabolismus, speziell der Phospholipidmetabolismus, werden mit Medikamentenresistenzen bei Tumoren in Verbindung gebracht [170-172]. Dies könnte erklären, warum insbesondere das Rezidiv-Glioblastom von einer zunehmenden *PRG4*-Hochregulation profitieren würde. Um diese Theorie zu bestätigen, gilt es umfassende Untersuchungen einzuleiten, die neben den molekulargenetischen Aspekten ebenfalls das Therapieansprechen der Patienten erfassen. Weiterhin zeigten sich die Differenzen der *PRG*-Expression des Glioblastoms im Vergleich zum nicht-malignen Hirngewebe gegensätzlich in Abhängigkeit des ausgewählten Referenzgens. Zwar kann dies durch die Regulation der Referenzgene begründet werden (siehe „Regulation einzelner Referenzgene“), jedoch bestätigt die Reduktion von *PRG5* (Abb. 11, B, Referenzgen *TBP*) bereits wissenschaftlich nachgewiesene Expressionsveränderungen im Glioblastom [72]. Die mit erhöhten *Prg5*-Spiegeln einhergehende dysfunktionale Gefäßarchitektur ermöglicht es, eventuell Patienten zu identifizieren, die von einer Therapie gegen die kanzerogene Gefäßbildung profitieren würden [55,72]. Zusammenfassend nehmen *PRG3*, *PRG4* und *PRG5* eine relevante Rolle beim Glioblastom ein, die es mit Blick auf neue molekulargenetische Behandlungsmethoden eingehender zu untersuchen gilt.

5.3.2. *PRG1*, *PRG2* und *PRG3* im Mittelpunkt altersspezifischer Expressionsunterschiede

Wissenschaftliche Ergebnisse stellten bereits entwicklungsabhängige Unterschiede bei der *Prg*-Expression fest [30,31,59]. Die Grundlage dieser Forschungsergebnisse bietet die Chance altersspezifische Unterschiede bei Patienten zu evaluieren. Die wissenschaftlich verwendete neuroonkologische Definition für „ältere“ Patienten schließt Personen ab 60 bis 70 Jahren ein [135,173]. Diese Definition und das mediane Alter von 65 Jahren bei Glioblastompatienten [9] führten zu der Einteilung der Patienten in zwei Altersgruppen: 31-65 Jahren und ≥ 66 Jahren (Abb. 12 und Abb. 31). Die dieser Arbeit zugrunde liegende These, dass die *PRG*-Expression auf mRNA-Level im humanen Glioblastomgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe signifikante altersspezifische Unterschiede aufweist, konnte in einer kleinen humanen Kohorte mit zwei Altersgruppen nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 12 A bis D). Zum einen ergaben sich in den jeweiligen Altersgruppen entgegengesetzte Tendenzen der *PRG*-Expression entsprechend der Auswahl des Referenzgens, zum anderen wurden einheitliche Tendenzen in beiden Altersgruppen sichtbar (*PRG4*). Jedoch lassen sich bei isolierter Betrachtung der fünf *PRGs* altersabhängige Modifikationen der einzelnen mRNA-Expression im Verhältnis aller *PRGs* im Glioblastom vermuten (Abb. 12 E bis H). Innerhalb der einzelnen Patientengruppen ergeben sich nicht nur signifikante Unterschiede zwischen den *PRGs*, es können besonders im höheren Alter zunehmende Differenzen zwischen den Genen detektiert werden (Abb. 12 E bis H). Mit höherem Alter kommt es zu einer signifikant reduzierten *PRG2*-Expression im Vergleich zu *PRG1*. Neben diesen Auffälligkeiten scheint sich die Rangfolge der *PRGs* in ihren Expressionsniveaus anzupassen. Während bei älteren Patienten *PRG5* überwiegt, wird *PRG3* vielmehr im jüngeren Erwachsenenalter exprimiert. Wachstumsabhängige Wechsel der einzelnen *Prg*-Expression wurden zuvor im Tiermodell festgestellt. Es kommt zu einer vermehrten *Prg3*-Expression in frühen und vermehrt *Prg5*-

Expression in späteren Wachstumsphasen [59]. Da die Wachstumsphasen im Tiermodell nicht mit dem Alter der hier dargestellten Patienten übereinstimmen, ist es nur begrenzt möglich, diese Studien in Relation zu setzen. Trotz fehlender signifikanter Genexpressionsunterschiede zwischen den *PRGs* beider Altersgruppen ergibt sich ein marginaler Effekt (Abb. 31). Im Vergleich zu jüngeren Tumorpatienten, kommt es bei den älteren Patienten ab 66 Jahren zu einem geringen Anstieg der *PRG1*-Level mit zeitgleicher Reduktion von *PRG2* und *PRG3*. Die Erkenntnisse dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu der im Tiermodell beobachteten Reduktion der *Prg1*-Expression im Entwicklungsverlauf [30,69] und unterstützen vielmehr die wissenschaftlichen Ergebnisse, bei denen im Erwachsenenalter erhöhte *Prg1*-Nachweise detektiert werden konnten [59]. Vorangehende wissenschaftliche Arbeiten stützen zusätzlich die beobachtete Reduktion von *PRG2* und *PRG3* im Alter (Abb. 31). Frühe Entwicklungsstadien weisen erhöhte *Prg2*- und *Prg3*-Expressionen bei Tieren auf [30,59]. Dennoch lässt sich anhand der präklinischen Daten keine übereintreffende Vorhersage für die humane Genexpression festlegen, da die einzelnen Entwicklungsstadien der Tiere nicht dem Patientenalter entsprechen. Limitierend für die Übertragung der zuvor in präklinischen Modellen beobachteten altersspezifischen Genexpression auf den Patienten, ist die mangelnde Kenntnis, inwieweit maligne Prozesse zusätzlich die Genexpression modulieren. Die erstmalige Erfassung altersspezifischer *PRG*-Expressionsmuster im humanen Glioblastom erschwert somit die Interpretation der Befunde, da bisher nur einzelne Studien rodente *Prg*-Expressionsprofile im Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Entwicklung abbilden [59]. In Zusammenschau der Befunde ist zu schlussfolgern, dass sich im humanen Modell altersabhängige Modifikationen der *PRG*-Expressionsprofile möglicherweise ähnlich den Veränderungen im präklinischen Modell entwickeln können.

5.3.3. Geschlechtsspezifische *PRG2*-Expression des weiblichen Organismus

Heutzutage ist allgemein bekannt, dass eine geschlechtsspezifische Verteilung zu Ungunsten des männlichen Geschlechts beim Glioblastom vorliegt [9,12]. Es wird die Auffassung vertreten, dass Gene im Gehirn von Mäusen geschlechtsspezifische Expressionsmuster aufzeigen können [174]. Dies führt zu der Fragestellung, inwieweit das biologische Geschlecht spezifische *PRG*-Expressionsmuster im Glioblastom hervorruft. Um dies zu beantworten, erfolgte die Genexpressionsanalyse stratifiziert nach dem biologischen Geschlecht. Mithilfe dieser Arbeit gelang es erstmals, eine geschlechtsspezifische Expression von *PRG2* (Abb. 13) beim Glioblastom festzustellen. An dieser Stelle sollte besonders betont werden, dass *PRG2* bei beiden biologischen Geschlechtern am geringsten von allen fünf *PRGs* vorliegt. Die Ergebnisse unterstreichen eine nicht-statistisch relevante Reduktion von *PRG2* im weiblichen im Vergleich zum männlichen Glioblastom (Abb. 13, E und F), die möglicherweise bei höheren *n*-Zahlen signifikant sein könnte. Außerdem zeigt die Gegenüberstellung des Tumor- und Kontrollgewebes eine signifikante Reduktion von *PRG2* im erkrankten Gewebe (Abb. 13, A und B), die nicht beim männlichen Geschlecht beobachtet werden kann (Abb. 13, C und D). Die Frage nach der geschlechtsspezifischen Expression von *PRG2* ist von besonderem Interesse, um möglicherweise hormonelle Anhaltspunkte für die Ausbildung, das Wachstum oder sogar Therapieansätze des Glioblastoms zu identifizieren. Da Proteine des Zytoskeletts, die zur Plastizität des Gehirns beitragen, durch Sexualhormone reguliert werden [175], können

unter Umständen Hormone mit den *PRGs* interagieren. Diese Proteine modulieren neuronale Strukturen und die Funktionen der Astrozyten [175]. Zusätzlich weisen Forschungsergebnisse auf sexspezifisches Glioblastomwachstum mit bevorzugtem Wachstum im männlichen Tiermodell hin [176-178]. Auch die Tatsache, dass Sexualhormone in Gliazellen synthetisiert werden [175], unterstützt die These, dass die Sexualhormone Einfluss auf das Glioblastom nehmen können. Inwieweit Sexualhormone die *PRGs* regulieren und über strukturellen Modifikationen das Glioblastomwachstum fördern, ist bisher unklar. Um die Frage beantworten zu können, ob *PRG2* an dieser Stelle eine relevante Rolle spielt, bedarf es weiterer Untersuchungen.

5.3.4. Therapieresistenz des Glioblastoms – Wechselwirkungen zwischen dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters und dem Sphingolipid-metabolismus

MGMT repariert DNA-Schäden, die durch Anlagerung einer Alkylgruppe bei der O⁶-Position von Guanin hervorgerufen werden [15,17]. Durch Methylierung des Promotors der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) kommt es zu einer stark reduzierten Expression von MGMT und erhöhtem Ansprechen gegenüber alkylierenden Chemotherapien wie Temozolomid [15,17]. Temozolomid zählt zu der Standardtherapie für die Glioblastom-Behandlung [14]. Aufgrund der Methylierung ihres MGMT-Promotors besitzen ungefähr 45 % der Patienten den Vorteil eines besseren Ansprechens auf Temozolomid [15,19,48]. Eine Temozolomid-Behandlung kann sich positiv auf das Überleben auswirken [19,113]. Entgegen der allgemeinen Annahme konnten die hier dargestellten Ergebnisse (Abb. 16) den positiven prognostischen Faktor des methylierten MGMT-Promotors [113] nicht nachweisen. Es ergab sich kein signifikanter Vorteil der Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 16) nach der Tumorresektion. Die fehlende Information des Resektionsausmaßes und der adjuvanten Behandlung können maßgeblich die Auswertung dieser Datensätze beeinflussen. Die fehlende Kenntnis über subtotale oder totale Tumorresektion und weitere adjuvante Therapien der Patienten schränkt die Beurteilbarkeit der erfassten Überlebenszeiten der Patienten maßgeblich ein [19,24].

Daraus lässt sich ableiten, dass ein Überlebensvorteil durch einen methylierten MGMT-Promoter in Zusammenschau mit der medizinischen Behandlung des Patienten beurteilt wer-

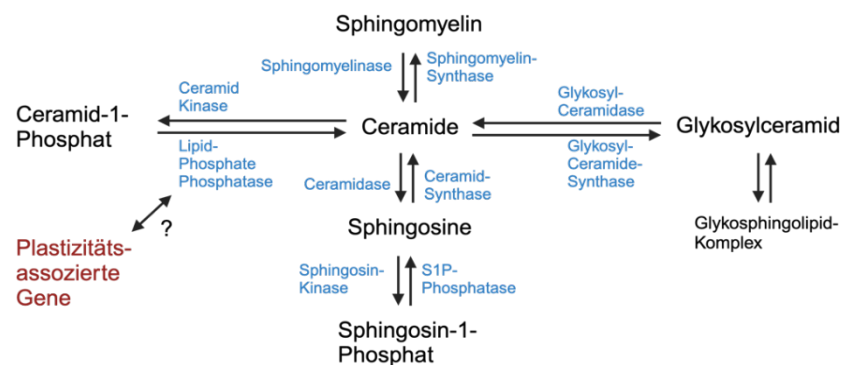


Abbildung 25: Sphingolipidmetabolismus von Ceramid.

In Anlehnung an Tea *et al.* [48,119], Darstellung des Sphingolipidmetabolismus von Ceramid im Hinblick auf die Ceramid-Akkumulation bei Glioblastomzellen. Aktuelle Therapiemaßnahmen der Glioblastombehandlung beeinflussen den Metabolismus von Ceramid. Mitunter kann die Strahlentherapie die Sphingomyelinase aktivieren, die Sphingomyelin zu Ceramid umsetzt [48]. Ceramid entfaltet durch seine Akkumulation eine apoptotische Wirkung [48]. Diese zytotoxische Wirkung macht sich Temozolomid zunutze [48,179], indem es mithilfe der Sphingomyelinase Sphingomyelin zu Ceramid hydrolysiert [180]. Derzeit ist unklar, ob Signalprozesse zwischen den LPPs und PRGs eine Veränderung im Ceramid-Metabolismus hervorrufen. Abbildung kreiert mit BioRender.com.

den sollte. Zu diesem Zweck sollten folgende Studien diese beiden Aspekte miteinander assoziieren, wie es bereits in vorangehenden Studien der Fall war [19,113].

Eine längerfristige Therapie mit Temozolomid kann zu einer Resistenz und einem Tumorrezidiv führen [181]. Temozolomid-resistente Glioblastomzellen weisen einen verstärkten Lipidmetabolismus mit einer erhöhten Cholesterolsynthese auf [182,183]. Dennoch resultiert vermehrt intrazelluläres Cholesterol in Glioblastomzellen in einem erhöhten Zelltod durch Temozolomid [181]. Es wird vermutet, dass Veränderungen des Fettsäurestoffwechsels rekurrente Glioblastomzellen für Temozolomid sensibilisieren [183]. Andererseits führt die Anreicherung von Lipiden zur Lipotoxizität [184]. Um sich vor dieser Lipotoxizität zu schützen, entwickeln Glioblastome verschiedene Mechanismen, indem sie z. B. Lipide in Lipidtröpfchen anreichern [184]. Therapeutische Ansätze sollen zukünftig diese Schutzmechanismen umgehen [184]. Für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien und zur Umgehung der Medikamentenresistenzen wird daher zunehmend der Lipidmetabolismus, insbesondere Phospholipidmetabolismus, des Glioblastoms als therapeutisches Ziel untersucht [49,181]. Für das Tumorwachstum und der damit zunehmenden Membranausdehnung benötigt das Glioblastom hohe Mengen an Lipiden, deren Synthese mit einer erhöhten Phospholipid-Synthese einhergeht [184]. Sphingolipide bilden eine Untergruppe der Phospholipide und sind im Gehirn, vorzugsweise in Membranen, hochgradig angereichert [48]. Bei verschiedenen Tumorarten wurden Sphingolipide mit einer Medikamentenresistenz in Verbindung gebracht [185]. Bemerkenswerterweise greift die aktuelle Glioblastomtherapie in den Sphingolipidmetabolismus ein und beeinflusst dort die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid (Abb. 25) [48]. Temozolomid macht sich die zytotoxische Wirkung des akkumulierenden Ceramids in Glioblastomzellen zunutze [48,179,180]. Im Umkehrschluss kann ein Mangel an Ceramid mit einem fortschreitenden malignen Prozess und reduziertem Überleben bei Gliomen in Verbindung gebracht werden [48,186]. Gleichzeitig kann ein Ungleichgewicht der Sphingolipide für Medikamentenresistenzen der Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid verantwortlich sein [48]. Diese Chemotherapieresistenz geht mit der Minimierung des akkumulierten Ceramids durch die Glykosyl-Ceramid-Synthase und weiteren Ceramid-Abbauprozessen einher (Abb. 25) [48,179]. Durch die Inhibierung der Glykosyl-Ceramid-Synthase kann ein erhöhtes Ansprechen auf Temozolomid in resistenten Glioblastomzellen erzielt werden [179]. In Anbetracht dieser Studienlage gilt zu bedenken, dass LPPs die Ceramid-Spiegel erhöhen [48]. PRGs gelten als Subklasse der LPP-Familie [31]. Trotz intensiver Forschung gibt es bisher keine Studien, die eine Verknüpfung zwischen den PRGs, dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters und dem Ansprechen auf Temozolomid untersucht haben. Aus diesem Grund sollten zukünftige Studien direkte und indirekte Wechselwirkungen zwischen den PRGs und Ceramid beurteilen. Es ist denkbar, dass therapeutische Modifikationen dieser Signalprozesse die Zytotoxizität und Medikamentenresistenz der Glioblastomzellen verändern könnten. Zwar geben die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse (Abb. 14, Abb. 15) keine Information bezüglich des Therapieansprechens, dennoch lässt sich für Glioblastompatienten mit methyliertem MGMT-Promoter eine Neigung für eine erhöhte *PRG2*- und eine reduzierte *PRG1*-Expression nachweisen (Abb. 14). Humane *in vitro*-Analysen der HROG-Zelllinien stützen diese Ergebnisse und weisen signifikante Unterschiede nach (Abb. 15).

Das Auftreten der Medikamentenresistenzen der Glioblastomzelle wird von morphologischen Veränderungen begleitet [182]. Chemotherapieresistente Glioblastomzellen weisen ein runderes Aussehen mit vermehrten Zytoplasma-Anteilen auf [182]. Hauptsächlich PRG3 und PRG5 besitzen die Fähigkeit, neuronale Strukturen morphologisch zu modifizieren [31,55,59]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen auf nicht signifikant reduzierte PRG3- und PRG5-Level beim Glioblastom mit unmethylierten MGMT-Promoter *in vivo* hin (Abb. 14). Dies führt zu der Frage, ob morphologische Veränderungen durch die reduzierte PRG3- und PRG5-Expression mit Medikamentenresistenzen einhergehen und mit einem unmethylierten MGMT-Promoter assoziiert werden können. Die zuvor beschriebene Reduktion von PRG3 und PRG5 beim Glioblastom mit einem unmethylierten MGMT-Promoter konnte *in vitro* nicht bestätigt werden (Abb. 15). Dennoch wiesen HROG-Zellen ohne detektierbare PRG3- und PRG5-Level strukturelle Veränderungen auf (Abb. 19 D bis F), die der Morphologie der beschriebenen resistenten Glioblastomzellen [182] ähneln. Da die HROG15-Zelllinie einen methylierten MGMT-Promoter besitzt, gilt es in Zukunft zu untersuchen, ob strukturelle Veränderungen durch einen PRG3- und PRG5-Mangel eine Medikamentenresistenz unabhängig von dem Methylierungsstatus des MGMT-Promoters hervorrufen können.

5.3.5. Koexpressionsmuster in Abhängigkeit von der PRG3- und PRG5-Expression im Glioblastom

Die Untersuchung der HROG-Zelllinien verdeutlicht eine besondere Konstellation der PRG-Expressionsmuster. Wiederholt konnten Phänomene beobachtet werden, bei denen PRG3 und PRG5 unterhalb des Detektionslevels lagen (Abb. 17, Abb. 18). Extensive Schwankungen von PRG3 im Glioblastom wurden bereits in vorangehenden Studien diskutiert [112]. Da die fehlende Detektion der beiden PRGs nicht bei allen HROG-Zelllinien beobachtet werden konnte, kann von einer Funktionsfähigkeit der TaqMan® Gene Expression Assays für PRG3 und PRG5 ausgegangen werden. Wie lässt sich jedoch die fehlende Messbarkeit der Gene erklären? Eine fehlende Detektion kann z. B. bei Genen mit einer geringen Expression auftreten [167], wie es unter Umständen bei PRG3 und PRG5 der Fall sein kann. Somit kann von einer Deregulation dieser beiden PRGs ausgegangen werden. Vor diesem Hintergrund gilt es zu evaluieren, inwieweit die Deregulation dieser beiden PRGs die Expression der anderen PRGs verändert. Derzeit gibt es nur eine geringe wissenschaftliche Datenlage bezüglich der Koexpression der PRGs. Eine kombinierte Expression resultiert in der zeitgleich erhöhten Proteinkonzentration einzelner PRGs, indem sie gemeinsam eine erhöhte Proteinstabilität erzeugen [115]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse stützen die These, dass eine gleichzeitige PRG-Koexpression ebenso mit einer Hochregulation der mRNA eines einzelnen PRGs verbunden ist. Explizit verstärkt die gleichzeitige PRG3- und PRG5-Koexpression die Expression von PRG3, PRG5 und nicht signifikant von PRG1 (Abb. 17). Trotz der eingeschränkten Interpretationsmöglichkeit durch die geringen n-Zahlen zeigt PRG4 ein relativ stabiles Expressionsmuster, das durch die Koexpression von PRG3 und PRG5 nicht maßgeblich beeinflusst wird (Abb. 17 G und H). Diese Daten unterstützen die Beobachtungen im Tiermodell, dass die *Prg4*-Expression durch Koexpression von *Prg3* und *Prg5* nicht erhöht werden konnte [59].

Da der zelluläre Phänotyp durch die Koexpression von *Prg3* und *Prg5* modifiziert werden kann [59,115], galt es zusätzlich morphologische Effekte an Glioblastomzellen durch diese Koexpression darzustellen. Vorangehend wurde bei der Koexpression beider *PrGs* vermehrt die Ausbildung von Membranprotrusionen beobachtet [115]. Unter Berücksichtigung struktureller Veränderungen des Phänotyps durch spezielle *Prg*-Expressionslevel [30,95] wurde anhand mikroskopischer Aufnahmen die Morphologie der HROG06- und HROG15-Zelllinien dargestellt (Abb. 19). Als Intention für die Darstellung der beiden Zelllinien wurde die Besonderheit genutzt, dass bei HROG15 im Gegensatz zu HROG06 keine *PRG3*- oder *PRG5*-Expression messbar war. Die *Prg3*-Expression wird mit der Ausbildung feiner, länglicher Membranprotrusionen in Verbindung gebracht [63,73,96,97]. Eine breite Spanne von *Prg3*-Expressionsleveln resultierte sogar in der Ausbildung länglicher und fusiformer F98-Gliomzellen [112]. *PRG5* beeinflusst vielmehr die Ausbildung, Anzahl und Struktur von Dornfortsätzen [68,71]. Es konnten morphologische Veränderungen in dieser Arbeit im Zusammenhang mit den beiden *PRGs* beobachtet werden. Die mikroskopische Bildgebung zeigt bei der HROG06-Zelllinie deutlich, dass das Vorliegen von *PRG3* und *PRG5* die Ausbildung kleinerer und schmäler Zellkörper hervorruft (Abb. 19 A bis C). Im Gegensatz dazu führte ein Mangel von *PRG3* und *PRG5* bei der HROG15-Zelllinie zu der Ausbildung großer, breiter und länglicher Zellkörper (Abb. 19 D bis F). Diese mikroskopische Bildgebung lässt keine Rückschlüsse auf die Zunahme von Membranprotrusionen bei der Koexpression beider *PRGs* zu. Limitierend für die Interpretation dieser Ergebnisse können lokale Einflussfaktoren auf das Zellwachstum und die *PRG*-Expression sein. Während FCS die Zellproliferation und Migration humaner Tumorzellen stimuliert und die Überlebensfähigkeit der Zellen erhöht [187,188], kann die Konfluenz humaner Glioblastomzellen die Rezeptor-Expression und die Lokalisierung der Rezeptoren in Lipidtröpfchen beeinflussen [189]. Ungleichgewichte in diesen Lipidtröpfchen spielen bei dem Überleben von Tumorzellen und ihrer Invasion eine Rolle [190,191]. S1P tritt bevorzugt in den Lipidtröpfchen auf [191]. In der Theorie könnten *PRGs* durch die Fähigkeit, bioaktive Lipide wie S1P zu regulieren [55,57], eine Assoziation zu den Lipidtröpfchen und somit der Konfluenz der Glioblastomzellen hergestellt werden. Dies wirft die Frage auf, ob eine vorstellbare Interaktion zu einer Regulation der *PRGs* führt. Um phänotypische Veränderungen und Modifikationen der Genexpression durch spezifische Zellkulturbedingungen [192] auszuschließen, wurde der Einfluss der Konfluenz und des für die Kultivierung verwendeten Nährmediums auf die mRNA-Expression der *PRGs* einzelner HROG-Zelllinien untersucht (Abb. 18). Unter Verwendung unterschiedlich konfigurierter Nährmedien und der Konfluenz konnten keine deutlichen Wechselwirkungen mit der *PRG*-Expression festgestellt werden, wenngleich die niedrige Anzahl der Zelllinien keine statistische Analyse erlaubt.

5.3.6. *PRG3*- und *PRG5*-Deregulation beim Rezidiv-Glioblastom

ZNS-Erkrankungen, z. B. Parkinson, führen zu einer Modifikation der *Prg*-Expressionslevel [56]. Wie bereits vorangehend dargestellt werden konnte, kommt es bei der Ausbildung hirneigener Tumore ebenfalls zu einer *PRG*-Regulation (Abb. 11). In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte validiert werden, ob die Rezidive dieser Glioblastome deutlich stärker veränderte *PRG*-Expressionen *in vitro* aufweisen (Abb. 20). Die Resultate des HROG-Modells

weisen darauf hin, dass *PRG3* und *PRG5* im Gliom bei Rezidiv-Tumoren reguliert sein können (Abb. 20). Bereits die direkte Gegenüberstellung von humanem Glioblastom- und Kontrollgewebe weist auf eine signifikante *PRG3*- sowie *PRG5*-Reduktion (letzteres nur bei Referenzgen *TBP*) im Glioblastom *in vivo* hin (Abb. 11). Diese Ergebnisse untermauern vorangehende Studienergebnisse, bei denen deregulierte *PRG3*-Expressionslevel im humanen Glioblastom nachgewiesen wurden [112]. Zusätzlich können Belege für sehr geringe bis fehlende *Prg5*-Level in Astrozyten und eine zunehmende *PRG5*-Reduktion mit steigendem WHO-Grad von Gliomen [59,68,71,72] die reduzierte *PRG5*-Expression im Glioblastom und Rezidiv-Glioblastom begründen (Abb. 11 B, Abb. 20). Rezidive nach einem Glioblastom treten ungefähr sieben Monate nach der Erstdiagnose auf [7] und führen zu einem medianen Gesamtüberleben von bis zu elf Monaten [9]. Bisher fehlen jegliche Empfehlungen für eine Standardtherapie des Rezidiv-Tumors [9]. Mit zunehmender Entwicklung zu individuellen Behandlungsmethoden könnten molekulargenetische Aspekte ebenfalls beim Rezidiv-Glioblastom relevant werden. Durch abgeänderte Genexpression können Glioblastome möglicherweise therapeutische Maßnahmen umgehen und es kann zu einem Wiederauftreten des Tumors kommen. Wie bereits zuvor beschrieben, können morphologische Änderungen mit einer Medikamentenresistenz assoziiert werden [182]. Die Frage bleibt unbeantwortet, inwieweit strukturelle Veränderungen durch *PRG3* und *PRG5* (siehe „Koexpressionsmuster in Abhängigkeit von der *PRG3*- und *PRG5*-Expression im Glioblastom“) bei Glioblastomzellen hervorgerufen werden und somit das Wiederauftreten des Tumors fördern. Ein Fallbericht unterstützt die Hypothese, da eine Reduktion von *PRG3* mit dem erneutem Auftreten (Rezidiv) eines Nebennierenkarzinoms assoziiert wird [33]. In der Zusammenschau der Forschungsergebnisse kann ein negativer Effekt bei reduziertem *PRG3* erwartet werden. Evidenz dafür liefern Studienergebnisse, die die *PRG3*-Deregulation mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer schlechteren Überlebenschance vergesellschafteten [112]. Es ist jedoch zweifelhaft, ob die Deregulation von *PRG5* in gleicher Weise das Patientenüberleben beeinflusst. Für *PRG5* konnten bisher keine solche Zusammenhänge festgestellt werden [72].

5.4. Fischer-F98-Gliom-Modell

5.4.1. Validierung der kontralateralen Hemisphäre als Kontrollgruppe

Für die Erforschung von Tumorerkrankungen werden Tiermodelle immer weiter optimiert, um die humanen Tumorverhältnisse realitätsgetreu abzubilden. Zur Analyse des Glioblastoms findet das Fischer-F98-Gliom-Modell häufig Anwendung [142,193]. Es wird speziell für die Beurteilung molekularer Veränderungen bevorzugt [141,142]. Ähnlichkeit zu dem humanen Glioblastom erzielt das Fischer-F98-Gliom-Modell durch sein infiltratives Tumorwachstum, die geringe bis fehlende Immunogenität und die erhöhte Expression spezieller molekularer Marker [141,142]. Vorteilhaft ist nicht nur die hohe Ähnlichkeit zu dem humanen Glioblastom [141,142], sondern die Möglichkeit, Tumorzellen am lebenden Organismus durch stereotaktische Implantation in Ratten *in vivo* zu beurteilen [194]. Die Implantation der Tumorzellen per Stereotaxie ermöglicht ein konstantes und reproduzierbares Prozedere, um ein vergleichbares Tumorwachstum zwischen den Tieren zu gewährleisten [195]. Von Vorteil ist zusätzlich das extrem stabile Verhalten der F98-Zelllinien in der Kultur und das Fehlen morphologischer Veränderungen nach zahlreichen Zellpassagen [195]. Um die

molekulargenetischen Besonderheiten des Fischer-F98-Gliom-Modells besser statistisch veranschaulichen zu können, bedarf es der Verwendung von Kontrollgruppen. Die Definition der Kontrollgruppe wird zumeist durch den Untersucher festgelegt. Für diese Arbeit wurde die kontralaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells als Kontrollgruppe verwendet. Verifiziert wurden die Proben der kontralateralen Hemisphäre durch den direkten Vergleich mit Sham-Tieren (Abb. 22). Trotz einer geringen Anzahl an Sham-Tieren wird deutlich, dass beide Gewebetypen ähnliche *Prg*-Expressionsmuster aufweisen. Dies bestätigt die Annahme, dass die kontralaterale Hemisphäre als Kontrolle im Fischer-F98-Gliom-Modell verwendet werden kann. Ein infiltratives Wachstum der implantierten F98-Zelllinie [141,142] in die kontralaterale Hemisphäre wurde zum Zeitpunkt der Euthanasie der Ratte am Tag zehn noch nicht erwartet. Diese These wird durch bildmorphologische Nachweise gestützt, bei denen in frühen Stadien nach der Implantation der F98-Gliomzelllinie ein eher diskretes Tumorwachstum ohne Befall der kontralateralen Hemisphäre beobachtet wurde [196,197]. In Zusammenschau der Ergebnisse (Abb. 22) wurde für die Analysen des Fischer-F98-Gliom-Modells die kontralaterale Hemisphäre der Tiere mit implantierter F98-Zelllinie als Kontrollgruppe etabliert, da davon ausgegangen werden kann, dass die Implantation der F98-Gliomzelllinie keine maßgeblichen Auswirkungen auf die *Prg*-Expression der kontralateralen Hemisphäre hat.

5.4.2. Ist das Fischer-F98-Gliom-Modell trotz Wechselwirkungen mit internen und externen Stimuli ein optimales präklinisches Modell, um die *Prg*-Expression im Gliom veranschaulichen zu können?

Die erstmalige Erfassung aller fünf *Prgs* im Fischer-F98-Gliom-Modell und einer Kontrollgruppe ermöglicht die Beurteilung, inwiefern dieses präklinische Modell die Genexpression des Menschen widerspiegeln kann und somit für die translationale Forschung verwendet werden sollte. Die im vorangehenden Teil dieser Arbeit vorgestellten Daten (Abb. 23) weisen auf deutliche Expressionsunterschiede zwischen dem Kontrollgewebe des Fischer-F98-Gliom-Modells und der F98-Gliomzelllinie hin. Bei nahezu allen *Prgs* kommt es zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression in der F98-Gliomzelllinie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wesentlich für die Betrachtung des Fischer-F98-Gliom-Modells war es, deutliche Unterschiede der *Prgs* zwischen dem Tumorgewebe (ipsilaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells) und der Kontrollgruppe (kontralaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells) aufzuzeigen. In einer Vielzahl der Fälle ergab sich bei dem malignen Gewebe der ipsilateralen Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells eine Suppression der *Prg*-Expression gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 23). Mit den zuvor genannten Ergebnissen erhärtet sich daher die Annahme, dass die malignen Prozesse der Gliomzellen (F98-Gliomzellen und ipsilaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells) vermehrt zu einer Herunterregulation der *Prgs* führen (Abb. 23). Modifikationen dieser Art können im Sinne kanzerogener Mutationen der F98-Gliomzelllinie interpretiert werden. Diese Befunde werden durch frühere Forschungsarbeiten gestützt, bei denen speziell bei F98-Gliomzellen geringere mRNA-Expressionslevel als in Nagetier-Astrozyten detektiert wurden [112]. Gleichwohl werfen die Untersuchungen die Frage auf, welche Faktoren ursächlich signifikante Differenzen zwischen derselben Tumorzelle *in vivo* und *in vitro* begründen. Wechselbeziehungen der Tumorzellen mit externen und internen Stimuli könnten die Frage beantworten. Bei *in vivo*-

Prozessen finden Mechanismen der neuronalen Plastizität statt, damit der Organismus sich an neue Bedingungen anpassen kann [84,85]. Neuronale Plastizität kann durch neurologische Krankheitsbilder verändert werden [90,92,198] und spielt eventuell bei hirneigenen Tumoren eine maßgebliche Rolle. PRGs gelten als zentrale Regulatoren der neuronalen Plastizität [31,55,59]. Daraus folgernd können die Wechselwirkungen der PRGs mit der neuronalen Plastizität vielleicht ein Grund für veränderte *Prg*-Level der F98-Zelllinien im lebenden Organismus darstellen. Ein Nachteil besteht bisher darin, dass die Mechanismen der neuronalen Plastizität vor allem *in vitro* untersucht wurden und der aktuelle Fokus vermehrt auf Analysen *in vivo* liegt [198,199]. Experimentell werden teils signifikante Diskrepanzen der neuronalen Plastizität in Abhängigkeit von dem ausgewählten Umfeld sichtbar [199]. Ursächlich dafür können extrazelluläre Ionenzusammensetzungen sein [199]. Speziell *in vivo* modifizieren physiologische Ionenzusammensetzungen Prozesse der synaptischen Plastizität [199]. Da PRGs die neuronale Plastizität mitgestalten, können sie möglicherweise in ihrer Expression oder auch in ihrer Funktionalität durch Ionenzusammensetzungen beeinflusst werden. Außerdem können fehlende physiologische Reize, z. B. parakrine Signaltransduktion, mechanische Prozesse oder die Zelldissoziation nach der Implantation, zu der Diskordanz der Genexpression *in vitro* im Vergleich zu Modellen *in vivo* beitragen [200]. In Anbetracht dessen kann ein Unterschied der *Prg*-Genexpression *in vivo* und *in vitro* durch zahlreiche Faktoren ausgelöst werden. Diese These würde die im Gegensatz dazu seltener aufgetretenen signifikanten Differenzen zwischen beiden *in vivo*-Geweben (ipsilaterale und kontralaterale Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells) stützen (Abb. 23) – bei denen ähnliche Umgebungsbedingungen zu erwarten sind. Zusätzlich gibt es Einflussfaktoren, die die *Prgs in vivo* (ipsilaterale versus kontralaterale Hemisphäre) modifizieren können, ohne durch maligne Prozesse erklärt zu werden. Von Bedeutung dafür können zusätzliche modulierende neurologische Krankheitsbilder sein. Dabei spielen besonders epileptische Krampfanfälle eine relevante Rolle. Im Rattenmodell ruft die F98-Gliomzelllinie Gliom-assoziierte Krampfanfälle hervor und zeigt somit ein epilepsieartiges Erscheinungsbild [120,201], bei dem nachweislich die Expressionsmuster für *Prg1*, *Prg3* und *Prg5* verändert vorliegen [31,33,61,73,107]. Ungeachtet der Regulation innerhalb des präklinischen Fischer-F98-Gliom-Modells können epileptische Krampfanfälle ebenfalls Analysen humaner *PRG*-Expressionsmuster beeinflussen. Mit 50-60 % zählen epileptische Krampfanfälle zu den häufigen primären Symptomen von Glioblastompatienten [103,201]. Während das Tumorwachstum Anfälle fördert, können Anfälle Tumorwachstum bedingen [103,201]. Vermutungen legen nahe, dass antiepileptische Therapien das Gliom-Wachstum beeinflussen [103]. Als Dreh- und Angelpunkt für diese Interaktionen wird der Neurotransmitter Glutamat gesehen [201]. Interessanterweise sind die Glutamatspiegel beim Gliom selten reguliert [103]. Glutamatspiegel können durch den Lysophospholipidmetabolismus beeinflusst werden. LPA und seine Rezeptoren sind dabei von entscheidender Bedeutung [35]. Die Fähigkeit von Gliomzellen, Glutamat zu produzieren und postsynaptische Glutamatrezeptoren auszubilden [98], kann auf eine Verbindung zu den *Prgs* hinweisen. Durch seine Lage an postsynaptischen Strukturen glutamaterger Synapsen beeinflusst PRG1 die Erregbarkeit mithilfe des bioaktiven Lipids LPA [33,35,58,61]. Mangel an oder Mutationen von PRG1 können zu einer Übererregbarkeit mit folgender Ausbildung epileptischer Krampfanfälle führen [35,61,202]. Die bisherigen Forschungsergebnisse

unterstützen die Theorie, dass das epilepsieartige Erscheinungsbild der F98-Gliomzelle [120,201] sowie epileptische Krampfanfälle bei Gliompatienten *PRG-/Prg*-Expressionsmuster regulieren können. Da nicht alle Patienten epileptische Krampfanfälle erleiden, gilt zu überlegen, ob für die Analyse der *Prg*-mRNA-Expression günstigere präklinische Tiermodelle zur Verfügung stehen oder epileptische Krampfanfälle aufgezeichnet werden können. Neben den genannten krankheitsbedingten Einflussfaktoren bewirken mechanische Verletzungen Modifikationen der *Prg*-Level. Einflüsse auf die *Prg*-Expression sind bereits nach Hirnschädigungen oder nach Verletzung peripherer Nerven beschrieben worden [30,31,33,69,81]. Die mechanische Implantation der F98-Gliomzelllinie in die Fischer-Ratte kann ein lokales Trauma hervorrufen [195]. In Anlehnung an diese Forschungsergebnisse können die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse durch lokale Verletzungen in der ipsilateralen Hemisphäre zusätzlich beeinflusst worden sein.

Zusammenfassend können *Prg*-Expressionsmuster nicht nur durch externe und interne Faktoren modifiziert und somit in direkten Zusammenhang mit der neuronalen Plastizität gebracht werden, sondern zusätzlich mit neurologischen Krankheitsbildern und mechanischen Veränderungen in Wechselwirkung stehen. Tiermodelle wie das Fischer-F98-Gliom Modell sind relevant, um erstmalig präklinische Daten zu erfassen und zukünftig erfolgreiche Therapien zu identifizieren [195]. Dennoch ist das Fischer-F98-Gliom-Modell mutmaßlich nur begrenzt auf den Menschen übertragbar und kann uns lediglich Hinweise auf den Erfolg von Therapieansätzen beim Menschen geben [141,142].

5.5. Ausblick

Zum ersten Mal werden die Expressionsmuster aller fünf *PRGs/Prgs* im humanen Glioblastom und präklinischen Modellen (HROG-Zelllinien und Fischer-F98-Gliom-Modell) erfasst. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen dabei auf spezifische Expressionsmuster in den biologischen Proben hin. Dabei wird deutlich, dass zahlreiche Faktoren, von neurologischen Symptomen über das Umfeld der untersuchten biologischen Proben bis zur experimentellen Bearbeitung und Datenanalyse, beeinflussende oder auch limitierende Faktoren für die Bestimmung der fünf *PRGs/Prgs* darstellen. Zum einen bedarf es weiterer Forschung zur Optimierung der Modelle, die Erfassung aller Einflussfaktoren und Validierung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse anhand größerer Gruppengrößen, um eine höhere statistische Aussagekraft zu erzielen. Zum anderen kann die Ergänzung histopathologischer Untersuchungen helfen, die neuronale Plastizität des Glioblastoms zu erforschen und molekulargenetische Ansatzpunkte für zukünftige Behandlungsmethoden zu entdecken. Ein Knockdown von *Prg3* und *Prg5* ähnlich der physiologisch fehlenden Detektion im HROG-Modell gibt vielleicht zusätzliche Hinweise auf morphologische Veränderungen der Tumorzellen in Hinblick auf das invasive Tumorwachstum.

Der Mangel an lebensverlängernden Therapiemaßnahmen beim Glioblastom liegt bereits im Mittelpunkt aktueller Forschungsprojekte. Da die Verfügbarkeit humaner Materialien eine außerordentliche Herausforderung ist, bedarf es für die Entwicklung neuer medikamentöser Ansätze einer Optimierung der präklinischen Modelle. Für die Identifizierung neuer Therapiestrategien ist es von Bedeutung, spezifische Unterschiede im Menschen festzustellen und diese anhand von präklinischen Modellen nachzubilden. Dabei sollten

geschlechtsspezifische Unterschiede wie die *Prg2*-Expression im weiblichen Organismus und die *Prg3*- und *Prg5*-Expression bei Rezidiv-Glioblastomen eingehender im Tiermodell untersucht werden. Für die erste Fragestellung könnten Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells hormonell behandelt werden. Für die zweite Fragestellung gilt es Modelle für Rezidiv-Glioblastome zu entwickeln. Durch die starke Ähnlichkeit zum humanen Modell könnte das Fischer-F98-Gliom-Modell Verwendung finden. Dabei sollte das Auftreten eines Rezidiv-Glioms nach Resektion des ersten Tumors in der Ratte mittels Magnetresonanztomographie bestimmt und anschließend die Genexpression quantifiziert werden. Ferner kann auf bereits etablierte Rezidiv-Modelle zurückgegriffen werden [203,204]. Außerdem gilt es, die mit dem Phospholipidmetabolismus assoziierten Medikamentenresistenzen eingehender zu beurteilen. Angesichts der reduzierten *PRG1*-Level bei dem Vorliegen eines methyliertem MGMT-Promoters könnte die Etablierung von *Prg1*-Knockout-Modellen interessant sein. Für die Erfassung der Überlebenswahrscheinlichkeit ist es in Zukunft unabdingbar, die bereits durchgeführten Therapiemaßnahmen der Patienten zu kennen und in die statistische Analyse mit einzubeziehen. Vergleichbare Untersuchungen für niedrigere WHO-Grade hirneigener Tumore könnten ebenfalls neue Therapieoptionen eröffnen. Zusammenfassend gilt es, einzelne Faktoren dieser Grundlagenforschung weiter aufzuarbeiten und präklinische Modelle des Glioblastoms zu optimieren.

6. Appendix

6.1. Patientencharakteristika

Charakteristik	Wert			
Kohorte	Kontrollgruppe der humanen Gewebeproben (n = 17)	Glioblastompatienten der humanen Gewebeproben (n = 16)	Glioblastompatienten der HROG-Zelllinien (n = 14)	p-Wert
Rezidiv (%) [#]	/	/	5 (35,71)	Fisher's exact Test 0,0140, *
Durchschnittsalter $\pm$ SD	54,29 $\pm$ 20,56	65,06 $\pm$ 14,23	64,21 $\pm$ 10,19	Kruskal-Wallis-Test und Post-hoc Test nach Dunn's 0,1482, ns
Weiblich (%)	9 (52,94)	6 (60)	6 (42,86)	Chi-Quadrat 0,6630, ns
methylierter MGMT-Promoter [#] (%)	/	5 (31,25 ^G ; 35,71 ^H) ^A	6 (42,86)	Fisher's exact Test 0,6988 ^D , ns
IDH-Wildtyp [#] (%)	/	14 (87,5 ^G ; 93,33 ^H) ^B	5 (35,71 ^G ; 83,33 ^H) ^C	Fisher's exact Test 0,5000 ^D , ns
Altersgruppen	n-Zahl entsprechend der Altersgruppierung (%)			p-Wert
< 31 Jahre	2 (11,76)	0 (0)	0 (0)	Chi-Quadrat 0,1583, ns
31-65 Jahre	10 (58,82)	6 (37,5)	7 (50)	Chi-Quadrat 0,4703, ns
$\geq$ 66 Jahre	5 (29,41)	10 (62,5)	7 (50)	Chi-Quadrat 0,1568, ns
Tumorlokalisation	n-Zahl entsprechend der Tumorlokalisationen ^{2#J} (%)			p-Wert
Frontal, Frontolateral	unbekannt	4 (25)	3 (21,43)	Fisher's exact Test >0,9999 ^D , ns
Zentral		2 (12,5)	0 (0)	Fisher's exact Test 0,4851 ^D , ns
Temporal		4 (25)	4 (28,57)	Fisher's exact Test >0,9999 ^D , ns
Parietal		1 (6,25)	2 (14,29)	Fisher's exact Test 0,5682 ^D , ns
Okzipital		2 (12,5)	1 (7,14)	Fisher's exact Test >0,9999 ^D , ns
Parietookzipital		1 (6,25)	3 (21,43)	Fisher's exact Test 0,3155 ^D , ns
Temporoparietal		0 (0)	1 (7,14)	Fisher's exact Test 0,4667 ^D , ns
Intraventrikulär		1 (6,25)	0 (0)	Fisher's exact Test >0,9999 ^D , ns
Zerebral		1 (6,25)	0 (0)	Fisher's exact Test >0,9999 ^D , ns

Tabelle 20: Darstellung der humanen Patientencharakteristika *in vivo*, *post mortem* und *in vitro*.

Es konnten nur signifikante Unterschiede zwischen dem Anteil der Rezidiv-Tumore der drei Gruppen innerhalb der Patientencharakteristika festgestellt werden. Es lagen keine weiteren signifikanten Unterschiede vor.

² Entsprechend den Angaben des bereitstellenden Instituts.

[#] Information verarbeitet, sofern diese durch das bereitstellende Institut zur Verfügung gestellt wurde.

¹ Davon 1 Glioblastom-Rezidiv, bei dem initial ein diffuses Astrozytom WHO-Grad II vorlag.

^A Status bei 3 Tumoren unbekannt.

^B Status bei 2 Tumoren unbekannt.

^C Status bei 8 Tumoren unbekannt.

^D Die Berechnung erfolgte anhand der bekannten Tumorlokalisation. Bei fehlender Information der Lokalisation wurden die Patienten nicht in die Berechnung eingeschlossen.

^G Prozentsatz der Patienten der gesamten Kohorte.

^H Prozentsatz der Patienten der gesamten Kohorte, bei denen die untersuchten Informationen bekannt sind. Anhand dieser Gruppe erfolgte die statistische Signifikanz-Berechnung.

^J In 17 Fällen war bei den Glioblastom-Proben der humanen Gewebeproben die Lokalisation des Tumors bekannt. Die Berechnung erfolgte anhand der bekannten Tumorlokalisation. Bei fehlender Information der Lokalisation wurden die Patienten nicht in die Berechnung eingeschlossen.

6.2. Individuelle Patienteninformationen der humanen Tumorproben

Proben-ID	Geschlecht	Alter bei Diagnose [Jahre]	Tumor	Rezidiv im Verlauf?	Histologische Diagnose (WHO-Grad entsprechend WHO 2016)	Seite	Lokalisation	IDH-Status	MGMT-Promoter-Status methyliert?	Neurologische Symptome, sofern bekannt
100	M	82	ED		GBM (IV)	R	Temporal	negativ	Nicht analysiert	Milde faziale Parese
101	M	75	ED		GBM (IV)	L	Okzipital	negativ	nein	
102	M	51	ED		GBM (IV)	R	Zentralregion	negativ	nein	
103	M	72	ED		GBM (IV)	L	Parietal	negativ	nein	
106	M	50	ED		GBM (IV)	L	Intraventrikulär	negativ	ja	
108	W	78	ED		GBM (IV)	R	Frontal	negativ	ja	
109	W	55	ED		GBM (IV)	L	Parietookzipital	negativ	nein	
110	M	51	ED		GBM (IV)	L	Zerebral	negativ	ja	
113	W	47	Primärtumor: Februar 2015	Ja: Juli 2015	GBM (IV)	R	Frontal	mutiert	ja	Wochenlang Cephalgien & Nausea
114	M	76	ED		GBM (IV)	L	Temporal	negativ	nein	
115	W	78	ED		GBM (IV)	L	Frontolateral	negativ	ja	
116	W	80	ED		GBM (IV)	R	Okzipital	negativ	nein	
117	M	70	Primärtumor: März 2013	Ja: August 2014	GBM (IV)	L	Temporal	negativ	nein	
118	W	73	ED		GBM (IV)	R	Frontal	negativ	nein	
120	M	66			GBM (IV)	L	Temporal	negativ	nein	
124	M	37	Primärtumor: März 2007	Ja: Oktober 2007	GBM (IV)	L	Zentralregion			

Tabelle 21: Individuelle Patienteninformationen der humanen Tumorproben.

Informationen zu den einzelnen Patienten der humanen Gewebeproben mit Tumorerkrankungen entsprechen den Angaben des Instituts für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin. Die Gewebeproben wurden freundlicherweise durch das Institut für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Sofern nicht anders beschrieben wurden Proben eines erstmals nachgewiesenen Glioblastoms analysiert. ED = Erstdiagnose. Glioblastom (GBM).

6.3. Individuelle Patienteninformationen der humanen Kontrollproben

Proben-ID	Geschlecht	Alter [Jahre]	Entnahmezeit [Stunden] <i>post mortem</i>	unmittelbare Todesursache	Zur Verfügung stellende Institution
300	M	71	unklar	Urosepsis, keine Reanimation erfolgt	I.f.A.
301	W	88	6	Hyperkapnische, respiratorische Insuffizienz Typ II nach Bronchopneumonie und Bronchiolitis, keine Reanimation erfolgt	I.f.A.

Proben-ID	Geschlecht	Alter [Jahre]	Entnahmezeit [Stunden] <i>post mortem</i>	unmittelbare Todesursache	Zur Verfügung stellende Institution
G13/16	W	77	130	Enterokolitis	I.f.R.
G17/16	W	72	76	Herzbeutelamponade	I.f.R.
G21/16	M	64	64	Myokardinfarkt	I.f.R.
G26/16	M	47	49	Erstechen	I.f.R.
G27/16	W	47	49	Erstechen	I.f.R.
G28/16	M	39	76	Herzversagen	I.f.R.
G31/16	M	65	43	Myokardinfarkt	I.f.R.
K55/16	M	75	109	Blutaspiration	I.f.R.
G56/16	M	46	115	Myokardinfarkt	I.f.R.
G61/16	W	41	28	Intoxikation mit Doxepin	I.f.R.
G95/16	W	55	97	Aortenruptur	I.f.R.
200	W	63	unklar	unklar	I.f.P.
201	W	16	unklar	unklar	I.f.P.
202	W	14	unklar	unklar	I.f.P.
203	M	43	unklar	unklar	I.f.P.

Tabelle 22: Individuelle Patientendaten der humanen Gewebeproben der Kontrollgruppe.

Die Gewebeproben wurden freundlicherweise durch das Institut für Rechtsmedizin und das Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock sowie Institut für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. I.f.R. = Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Rostock; I.f.A. = Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock; I.f.P. = Institut für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin.

6.4. Patienteninformationen der HROG-Zelllinien und Einteilung entsprechend ihrer *PRG3*- und *PRG5*-Expressionsmuster

Proben-ID	Ge-schlecht	Alter [Jah-re]	Histologische Diagnose mit WHO-Grad nach Klassifikation von 2016	Seite	Lokali-sation	Über-lebens-zeit [Monate]	IDH-Sta-tus	MGMT-Promoter-Status; cDNA-Expres-sion	PTEN	EGFR [x-Fach]	Mutationen	Eta-blierte Zelllinie vor-handen	Verdop-plungs-zeit [Stun-den]	Pas-sage
HROG02	M	68	GBM (IV)	R	Parieto-okzipital	† 7	Wild-typ	M; <0,001	3,68	3	TP53 ^{R248Q} , 4q12(PDGFR) amplified, K-Ras ^{wt} , B-RAF ^{wt} , PTEN ⁻	Ja	38 ± 2,7	P30
HROG04	W	53	Rezidiv-GBM (IV)	R	Frontal	† 13	Nicht be-kannt	U; 1,02	12,7	36	PTEN ^{W274L} , 9p212.3(CDKN2A) deleted	Ja	86 ± 18,7	P14

Appendix

Proben-ID	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologische Diagnose mit WHO-Grad nach Klassifikation von 2016	Seite	Lokalisation	Überlebenszeit [Monate]	IDH-Status	MGMT-Promoter-Status; cDNA-Expression	PTEN	EGFR [x-Fach]	Mutationen	Etablierte Zelllinie vorhanden	Verdopplungszeit [Stunden]	Passage
HROG05	W	60	Rezidiertes GBM (IV)	L	Temporal	† 3	Wild-typ	M; <0,001	1,01	82	TP53 ^{wt} , K-Ras G12D, B-RAF ^{wt} , 4q12(PDGFR A) amplified, PTEN P169S/del 212-229	Ja	48 ± 9,4	P11
										1				
HROG06 ⁴	M	53	GBM (IV)	L	Frontal	† 8	Wild-typ	U; 0,07	2,31	82	TP53 ^{R273H, R306*} , 4q12(PDGFR A) amplified, K-Ras ^{wt} , B-RAF ^{wt} , PTEN ^(*1 at 126)	Ja	59 ± 14,0	P10 – unverdünnte Probe
										1				P29 – Verdünnungsreihe
HROG07	M	55	Rezidiertes GBM (IV)	R	Temporo-parietal	† 6	Nicht bekannt	U; 0,34	14,9	12	TP53 ^{wt} , PTEN ^{wt} , 9q21.3 (CDKN2A) deleted	Ja	89 ± 17,2	P9
										1				
HROG10	M	74	GBM (IV)	R	Temporal	† 7	Nicht bekannt	U; 0,27	3,73	2	TP53 ^{wt} , PTEN ^{wt} , 4q12 (PDGFR A) amplified	Ja	62 ± 11,0	P9
										1				
HROG13	W	77	GBM (IV)	R	Temporal	† 8	Nicht bekannt	M; <0,001	2,88	1	TP53 ^{wt} , PTEN ^{wt} , chr.7 amplified; chr. 10 lost ; 9p21.3 (CDKN2A) deleted	Ja	74 ± 2,7	P10
										1				
HROG15	M	56	GBM (IV)	R	Parietal	23	Nicht bekannt	M; <0,001	3,7	1	TP53 ^{WR273C} , PTEN ^{S170N} , 17q11.2(NF) deleted	Ja	52 ± 15,0	P12 – unverdünnte Probe

Proben-ID	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologische Diagnose mit WHO-Grad nach Klassifikation von 2016	Seite	Lokalisation	Überlebenszeit [Monate]	IDH-Status	MGMT-Promoter-Status; cDNA-Expression	PTEN	EGFR [x-Fach]	Mutationen	Etablierte Zelllinie vorhanden	Verdopplungszeit [Stunden]	Passage
														P25 – Verdünnungsreihe
HROG17	M	70	Rezidiertes GBM (IV)	L	Pariet-okzipital	† 3	Wildtyp	M; <0,001	0,55	4 1	TP53 ^{wt} , K-Ras ^{wt} , B-RAF ^{wt} , PTEN ^{R130*}	Ja	43 ± 9,2	P20
HROG24	W	73	GBM (IV)	L	Okzipital	† 10	Nicht bekannt	U; <0,001	2,21	43 1	TP53; R273C; PTEN exon 3 del / spliced, MGMT CN=1	Ja	70 ± 16,3	P5
HROG36	W	80	GBM (IV)	R	Parietal	† 5	Wildtyp	U; <0,001	3,72	1 1	TP53 ^{wt} , K-Ras ^{wt} , B-RAF ^{wt} , PTEN ^{I55} , MGMT CN=0	Ja	35 ± 4	P5
HROG38	W	49	GBM (IV)	R	Pariet-okzipital	19	Nicht bekannt	U; 0,23	0,02	1 1	PTEN I224M / R234W	Ja	63 ± 3,9	P6
HROG41	M	71	GBM	L	Frontal	† 2	IDH1 R132H	M; nicht bewertet	nicht bewertet	1 1		Ja		P3
HROG59	M	60	Rezidiertes GBM (IV)	R	Temporal	† 8	Nicht bekannt	U; 0,73	8,55	16 1		Ja		P8

Tabelle 23: Listung der individuellen Patientendaten der HROG-Zelllinien.

Patientendaten der HROG-Zelllinien wurden freundlicherweise durch die Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt [116-118,205-217]. Die Patienteninformationen umfassen: Das Geschlecht (M = Männlich, W = Weiblich), das Alter zum Resektionszeitpunkt in Jahren, den histologischen Grad sowie die WHO-Klassifizierung, die Tumorklassifizierung, die Tumorklassifizierung (L = Links, R = Rechts), die Überlebenszeit nach der Resektion in Monaten († = Tod des Patienten, **Fett** = Patient lebte am Stichtag den 25. Januar 2013), IDH-Status, MGMT-Status (M = methyliert, U = unmethyliert; CN = copy number 1, wenn eine Genkopie verloren ist und 0, wenn beide Genkopien verloren sind) sowie die relative cDNA-Expression des MGMT-Gens im Vergleich zu dem Referenzgen *TBP*, relative cDNA-Expression von *PTEN*-Genen im Vergleich zu dem Referenzgen *TBP*, die genomische Amplifikationsrate von EGFR im Vergleich zu dem normalen diploid status (1 = 2n), weitere Mutationen (wt = Wildtyp, wenn keine Mutationen detektiert wurden; Mutationen werden durch die Position angegeben, wobei die wt-Aminosäure vorne und die aus der Mutation resultierende Aminosäure hinten oder * im Falle eines Stopp-Codons steht; del = Deletion der Aminosäure; spliced = Alternativ verbunden; +1 = Einfügen einer Basis, die zu einer Rahmenverschiebung führt), Etablierung der Zelllinie, Verdopplungszeit und Passage der jeweiligen Zelllinie zum Zeitpunkt der Analyse.

Gruppeneinteilung	<i>PRG3</i> und <i>PRG5</i> exprimiert	<i>PRG3</i> und <i>PRG5</i> nicht detektierbar	<i>PRG3</i> exprimiert, <i>PRG5</i> nicht detektierbar	<i>PRG5</i> exprimiert, <i>PRG3</i> nicht detektierbar
Proben-ID	HROG04	HROG15	HROG07	HROG02
	HROG06	HROG41		HROG05
	HROG10	HROG59		HROG24
	HROG13			
	HROG17			
	HROG36			
	HROG38			

Tabelle 24: Gruppierung der HROG-Zelllinien im Bezug zur Detektion der relativen *PRG3*- und *PRG5*-Expression.

6.5. Informationen zu den F98-Zelllinien und den Geweben des Fischer-F98-Gliom-Modells

F98-Zelllinie		Ratte				Gewebetyp vorliegend für Analysen		
ID der F98-Zelllinie	Entnahmedatum der Zellen	Tier-ID der Ratte	Geburt der Ratte	Datum der stereotaktischen Implantation der Zellen in die Ratte	Datum der Euthanasie der Ratte und Gewebeentnahme	Zellkultur vorliegend	Tumorgewebe ipsilateral vorliegend	Gewebe kontralateral der Implantation vorliegend
ZK F98-Probe*	unklar	-	-	-	-	X	-	-
-	-	unbehandelte Wistar-Ratte **	06.03.17	-	16.03.17	-	-	-
ZK 631-2	21.02.17	631-2	21.12.16	21.02.17	08.03.17	X	X	X
ZK 631-5	27.02.17	631-5	21.12.16	27.02.17	13.03.17	X	X	X
ZK 632-1	20.03.17	632-1	18.01.17	20.03.17	03.04.17	X	X	X
ZK 632-1	20.03.17	632-2	18.01.17	20.03.17	05.04.17	Entspricht ZK 632-1	X	-
ZK 632-6	28.03.17	632-6	18.01.17	28.03.17	12.04.17	X	X	X
ZK 639-1	18.05.17	639-1	15.03.17	18.05.17	01.06.17	X	X	X
ZK 639-1	18.05.17	639-2	15.03.17	18.05.17	01.06.17	Entspricht ZK 639-1	X	X
F98-02	06.06.17	-	-	-	-	X	-	-
F98-03	21.06.17	-	-	-	-	X	-	-
-	24.04.17	638-12	15.02.17	24.04.17	08.05.17	-	X (Sham)	X (Sham)
-	24.04.17	638-11	15.02.17	24.04.17	09.05.17	-	X (Sham)	X (Sham)

Tabelle 25: Informationen zu dem Fischer-F98-Gliom-Modell.

Die Materialien und zusätzlichen Informationen wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, freundlicherweise durch das Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Es werden die Identifikationen der Zelllinien und Tiere genannt. Kennzeichnung relevanter Daten, wie der Entnahmezeitpunkt der Zelllinie und das Datum der stereotaktischen Implantation der Zelllinie in die entsprechende männlichen Fischer-Ratte. Darstellung der Zeitpunkte der Geburt und Euthanasie der Ratte. „X“ markiert das Material, dass von der jeweiligen Untersuchungsgruppe vorliegt.

* Die Probe der F98-Zelllinie mit der ID ZK F98-Probe wurde ohne Nennung weiterer Informationen zur Validierung der experimentellen Methoden zur Verfügung gestellt.

** Hierbei handelt es sich um eine weibliche, unbehandelte Wistar-Ratte, die zur Erprobung der einzelnen experimentellen Protokolle verwendet wurde. Die Informationen und das

Hirngewebe der linken Hemisphäre wurde freundlicherweise durch das Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt.

6.6. Etablierung des humanen *ACTB*-Primers

Der zuvor am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock etablierte Maus-*Actb*-Primer dienten als Vergleichsvorlage für die Generierung eines humanen *ACTB*-Primers mithilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) [144]. Etabliert wurde der verwendete humane *ACTB*-Primer mithilfe der von der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene

Datenbank veröffentlichten mRNA-Zielsequenz der Maus- und der humanen mRNA des *Actb*/*ACTB*-Gens sowie mit dem Abgleich beider Sequenzen („Alignments“) mit dem ApE – A plasmid editor Version 2.0.47 (Abb. 26). Im Abgleich erfolgte die Markierung der den Maus-*Actb*-Primer entsprechenden Nukleotidsequenzen. Diese Sequenzen dienten, mit anschließender Modifikation, als Vorlage für die Generierung des humanen *ACTB*-Primers (Abb. 26) (human beta Aktin 3'-Primer mit 5'-3'-Sequenz

„ACCACGGCCAGCGGGAAATCGTGCGTGA“

(29), empfohlene Annealing-Temperatur von 73,7 °C und human beta Aktin 5'-Primer mit 5'-3'-Sequenz

„TGCGGTGGACGATGGAGGGGCCGGA“ (27), empfohlene Annealing-Temperatur von 74,1 °C).

Aufgrund anschließend negativer experimenteller Testergebnisse (Abb. 27) und Rücksprache mit der Eurofins Genomics GmbH (Deutschland) konnte festgestellt werden, dass die optimale Annealing-Temperatur der humanen *ACTCB*-Primer zu hoch war. Die neu generierten Primer wurden hinlänglich

ihrer Sequenzlänge und Sequenzauswahl mit einer Modifikation des GC-Gehalts angepasst [133]. Ein hoher GC-Gehalt resultiert, durch die zusätzliche Stabilität der DNA-Doppelhelix, in einer erschwerten Strangtrennung [126]. Für die effiziente Amplifikation GC-reicher Sequenzen werden, neben erhöhten Denaturierungstemperaturen in den ersten PCR-Zyklen, höhere Annealing-Temperaturen benötigt [126]. Insbesondere zu hohe Denaturierungstemperaturen über einen längeren Zeitraum beeinflussen die Halbwertszeit der DNA-Polymerase negativ und reduzieren somit die Effizienz der Reaktion und Signalintensität [126]. Anschließend Überprüfungen der neuen Zielsequenz mit der NCBI Gene Datenbank

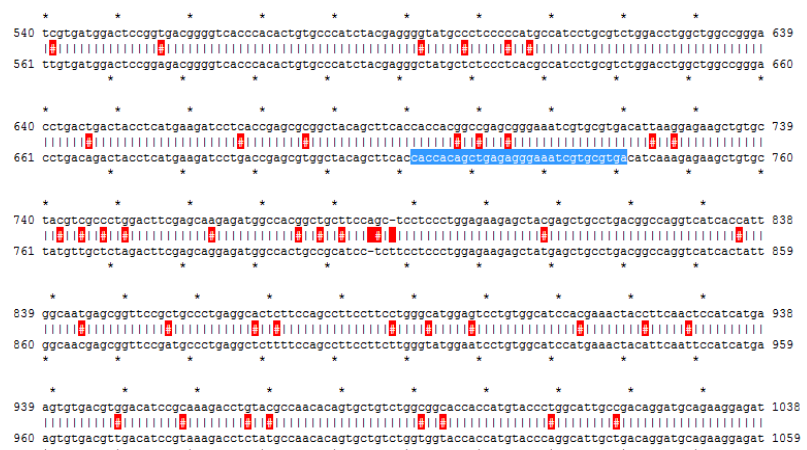


Abbildung 26: Nukleotidsequenzen der humanen und der Maus-mRNA des *ACTB*/*Actb*-Gens.

Vergleich der Nukleotidsequenzen der humanen (obere Nukleotidsequenz) und der Maus- (untere Nukleotidsequenz) mRNA des *ACTB*/*Actb*-Gens mit ApE – A plasmid editor Version 2.0.47 und Darstellung dreier Missmatch-Nukleotide sowie blaue Hinterlegung des Maus-*Actb*-Vorwärts-Primers.

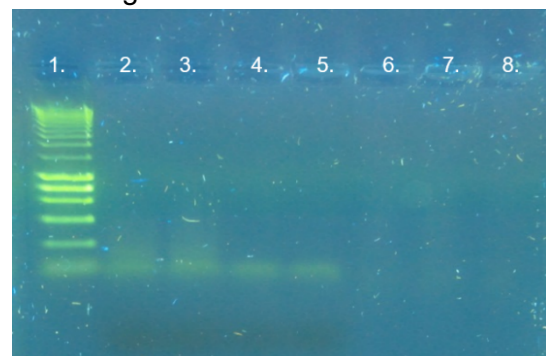


Abbildung 27: Gelelektrophorese unter Anwendung des nicht erfolgreichen humanen *ACTB*-Primers.

Fotografischer Nachweis der Gelelektrophorese des primär konfigurierten, un erfolgreichen humanen *ACTB*-Primers. 1. HyperLadderTM 1Kb, 2. Positive humane Gewebeprobe, 3. Negative humane Kontrollprobe, 4. gDNA der Maus, 5. Nuklease-freies Wasser.

fürten zur Entwicklung eines neuen humanen *ACTB*-Primers (human beta Aktin 3'-Primer mit 5'-3'-Sequenz „CCGAGCGGGAAATCGTGCGTGA“ (22), empfohlene Annealing-Temperatur von 65,8 °C und human beta Aktin 5'-Primer mit 5'-3'-Sequenz „GGGCCGGACTCGTCATACTCCT“ (22), empfohlene Annealing-Temperatur von 65,8 °C). Nach erfolgreicher experimenteller Testung wurde dieser für die weiteren Amplifikationen des *ACTB*-Gens bei humanen PCR-Produkten verwendet.

6.7. Etablierung des *Actb*-Primers für das Fischer-F98-Gliom-Modell

Durch Zuhilfenahme der NCBI Gene Datenbank konnte die mRNA-Zielsequenz des *Actb*-Gens der Spezies Ratte ermittelt und mittels Nutzung des CLC Sequence Viewer 7.8.1 die Sequenz der *Actb*-Primer dargestellt werden. Anschließend erfolgte die experimentelle Überprüfung anhand derer festgestellt werden konnte, dass die Maus-*Actb*-Primer auch bei der Spezies der Ratte verwendet werden können (Abb. 28 und Abb. 29).

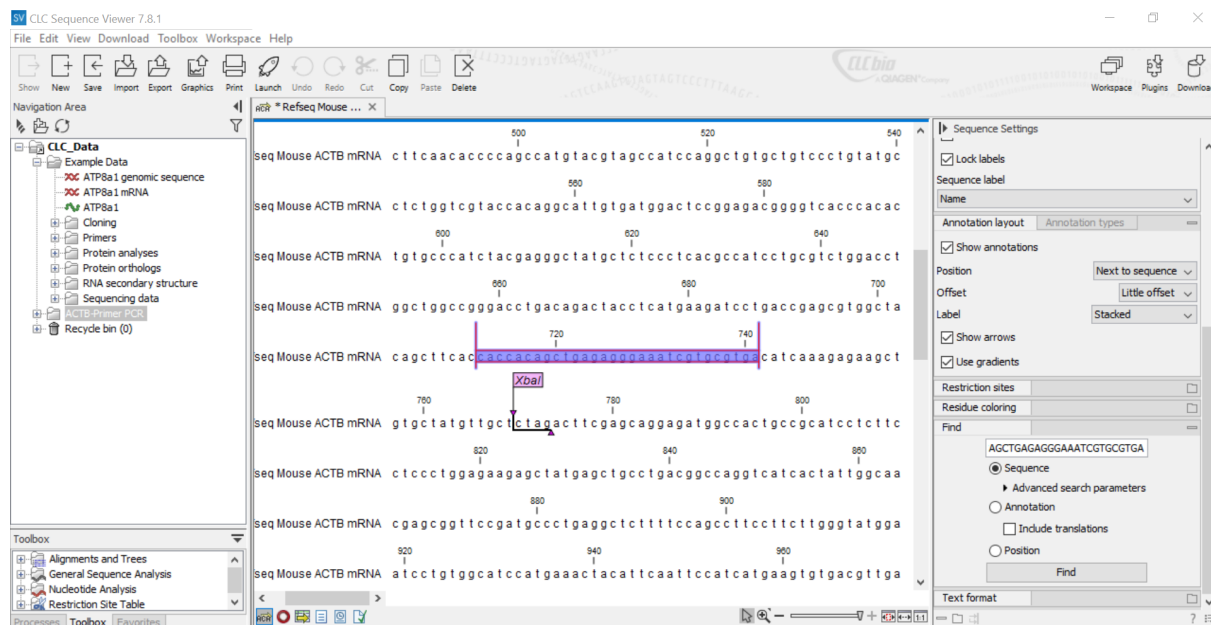


Abbildung 28: Darstellung des Maus-*Actb*-forward-Primers auf der Maus-mRNA-*Actb*-Referenzsequenz auf Chromosom 5.

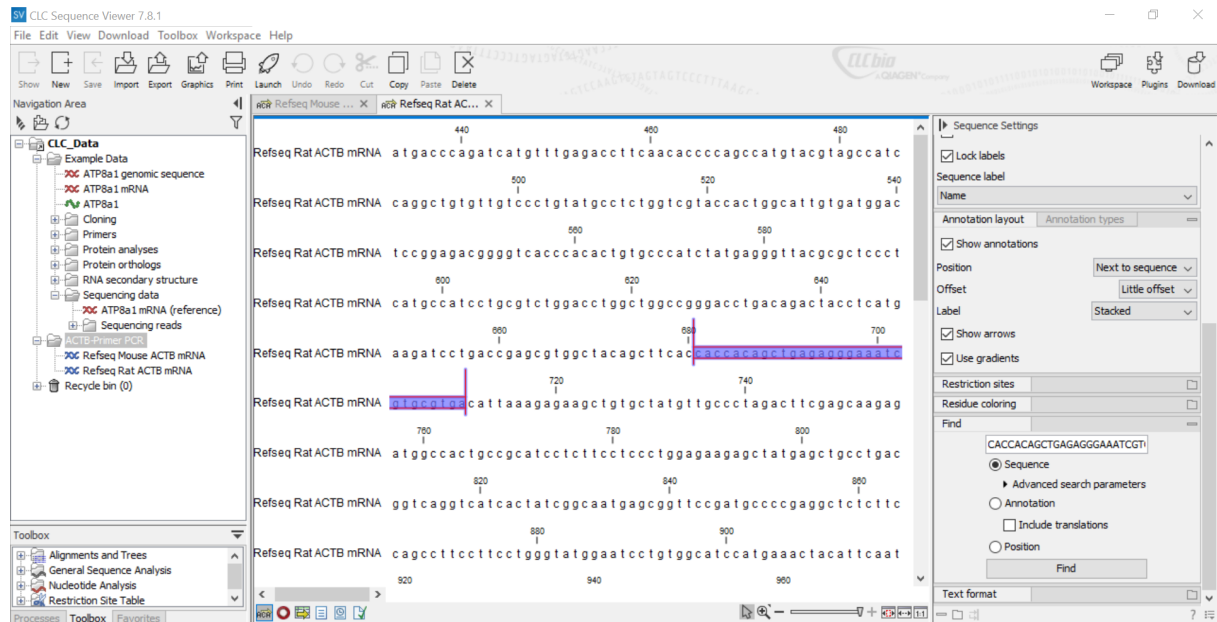


Abbildung 29: Darstellung des Maus-*Actb*-forward-Primers auf der Ratten-mRNA-*Actb*-Referenzsequenz auf Chromosom 7.

6.8. Etablierung des neuen *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays für die qRT-PCR

Während initiale Untersuchungen der *Prg3*-Expression an einer unbehandelten Wistar-Ratte mithilfe des ersten *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assays (Assay-ID Rn01640214_m1) erfolgreich waren, wird anhand der Abb. 33 deutlich, dass dieser bei dem Fischer-F98-Gliom-Modell nicht zur Detektion der *Prg3*-Expression geeignet ist. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt fehlenden Genom-Darstellungen der Wistar- und Fischer-Ratte, wurde ein neuer *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assay (Assay-ID Rn01640210_m1) etabliert. Dieser TaqMan® Gene Expression Assay wurde anhand des vorliegenden TaqMan® Gene Expression Assays für *Prg3* bei Vorliegen einer ähnlichen Amplifikationslänge und anderen Exon-Grenze ausgewählt (TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640210_m1 Exon-Grenze 1-2 mit einer Amplifikationslänge von 77 Basenpaaren, TaqMan® Gene Expression Assay *Prg3* Rn01640214_m1 Exon-Grenze 5- 6 mit einer Amplifikationslänge von 72 Basenpaaren [146,147]).

6.9. Ergänzende statistische Analysen mit grafischer Darstellung

6.9.1. Signifikante Veränderungen der *PRG*-Expressionsmuster bei Glioblastom- und Kontrollpatienten aller Altersgruppen

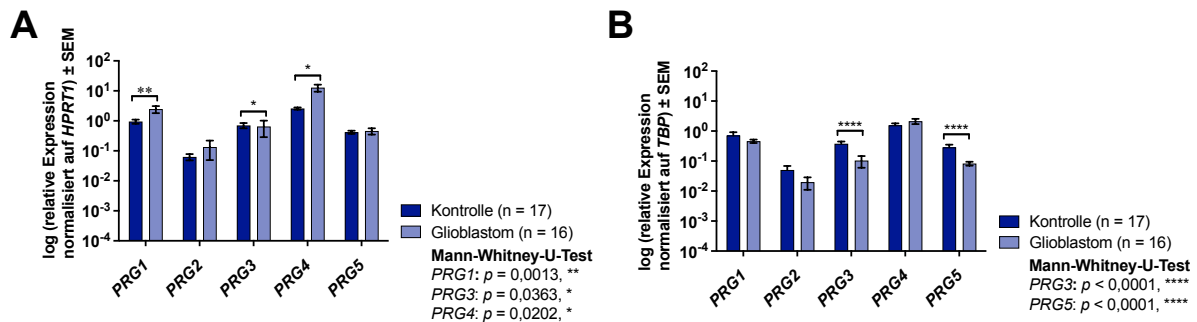


Abbildung 30: Relative *PRG*-mRNA-Expression der Glioblastom- und Kontrollkohorte aller Altersgruppen. Relative mRNA-Expression der *PRGs* im humanen Glioblastom *in vivo* im Vergleich zu nicht-malignem Hirngewebe (Kontrollgruppe) *post mortem*. **(A und B)** Die Kontrollgruppe beinhaltet zwei Patientinnen < 18 Jahren (Proben-ID 201 und 202). Die mRNA-Expressionslevel im nicht-malignen Hirngewebe und bei dem Glioblastompatienten wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* **(A)** und *TBP* **(B)** normalisiert.

6.9.2. Fehlende signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen jungen und alten Glioblastompatienten

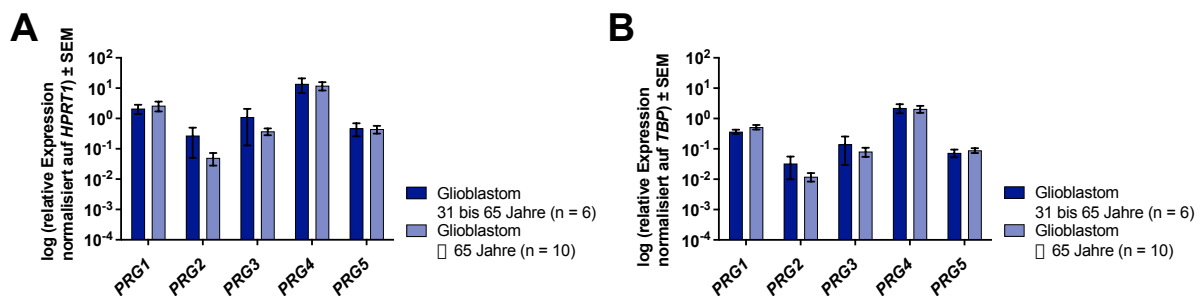
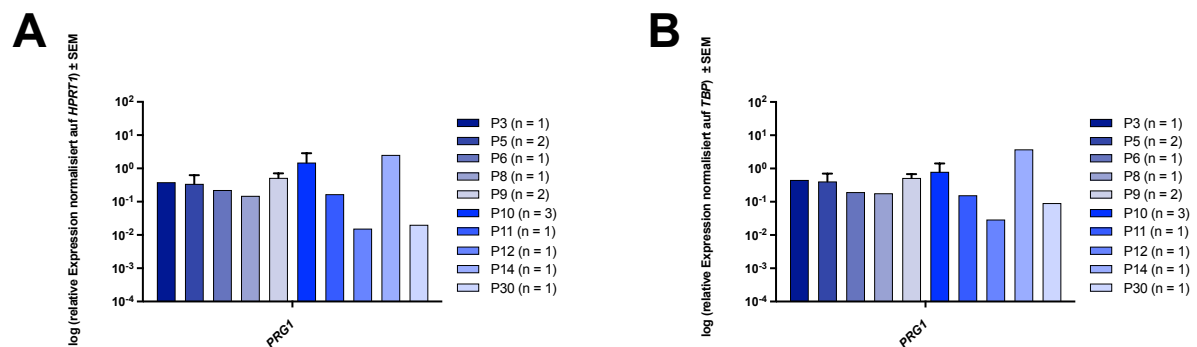


Abbildung 31: Nicht signifikante Unterschiede der *PRG*-Expression bei jungen und alten Glioblastompatienten.

Relative mRNA-Expression der *PRGs* im humanen Glioblastom *in vivo* entsprechend der jeweiligen Altersgruppe. **(A und B)** Vergleich der Glioblastom-Kohorten im Alter von 31 bis 65 Jahren und ≥ 66 Jahren. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* **(A)** und *TBP* **(B)** normalisiert.

6.9.3. Fehlende *PRG*-Regulation bei zunehmender Passage der HROG-Zelllinien



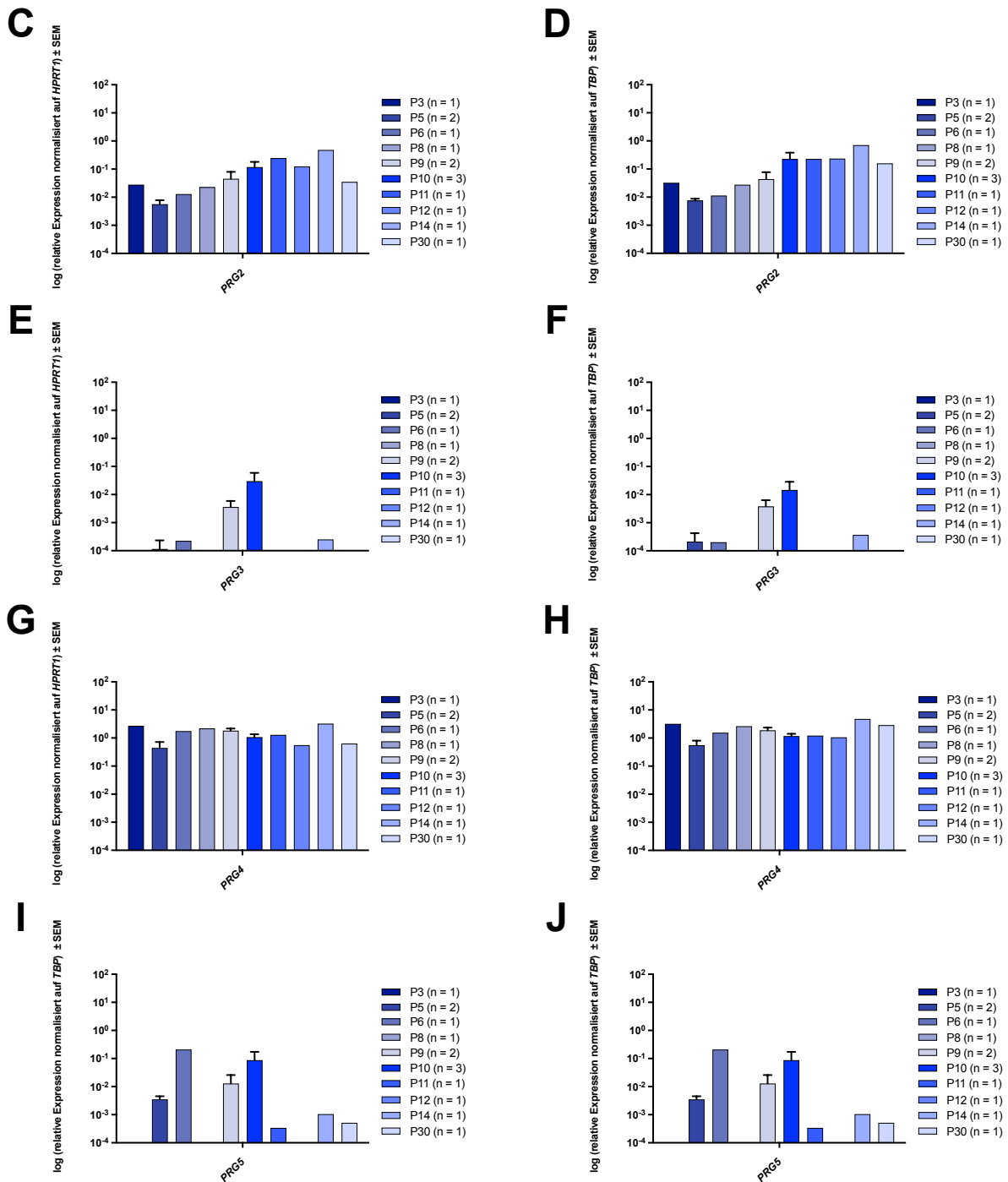
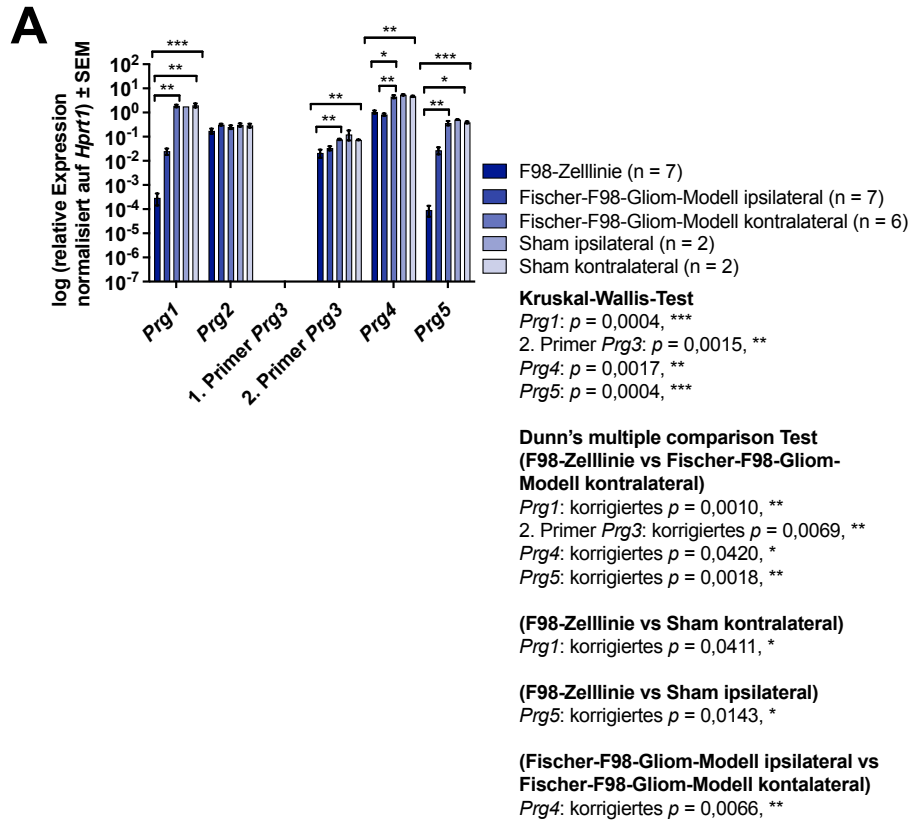


Abbildung 32: Relative PRG-mRNA-Expression dargestellt entsprechend der Passage der HROG-Zelllinien. Mit zunehmender Passage können sich der Phäno- und Genotyp der Zelllinie verändern [143]. Die Grafik veranschaulicht die relative PRG-mRNA-Expression der HROG-Zelllinien in Abhängigkeit von ihrer Passage. Aufgrund der geringen n-Zahl pro Gruppe ist eine statistische Auswertung dieser Daten nicht möglich. Limitierend sind außerdem die unterschiedlichen Abstände zwischen den Passage-Zeitpunkten. Während zu früheren Passagen mehr Gruppen dargestellt werden können, liegt später ein größerer Abstand bis Passage 30 vor. Bei steigender Passage präsentiert PRG1 (Referenzgen HPRT1) eine nicht signifikante Reduktion der Expression mit Ausreißern in den Passagen 9,10 und 14. Die Expression bei Passage 3 reduziert sich auf circa 20,35 % des Ausgangswertes. Bei der Normalisierung auf TBP kann eine diskrete Reduktion mit leichten Schwankungen über die Anzahl der Passagen festgestellt werden. Die PRG2-Expression zeigt einen tendenziellen Anstieg im Verlauf der Passagen, um schlussendlich niedrigere mRNA-Level aufzuweisen. Infolge der fehlenden Kenntnis der PRG2-mRNA-Expression zwischen Passagen 15 und 29 ist ein Absinken der Expression zur Passage 30 nicht besonders aussagekräftig. Deutlich wird bei PRG4 eine relativ stabile Expression unabhängig von der Passage. PRG3 und PRG5 weisen ähnliche Expressionsverläufe auf. Während PRG3 in der Hälfte der Passagen nicht exprimiert wird, zeigt es in den anderen Passagen mRNA-Expressionen von 10^{-4} er bis zu 10^{-2} er logarithmischen Potenzen. Eine PRG5-Expression ist in drei Passagen nicht detektierbar. Während der anderen Passagen variieren die Expressionswerte von PRG5 zwischen 10^{-4} er bis zu 10^{-1} er logarithmischen Potenzen. In Anbetracht der Ergebnisse

sollten folgende Studien zur Fehlerreduktion der mRNA-Analyse der PRGs die Auswahl von Zelllinien mit niedriger Passage präferieren oder einheitliche Passage-Zeitpunkte auswählen. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *HPRT1* (A, C, E, G, I) und *TBP* (B, D, F, H, J) normalisiert.

6.9.4. Darstellung aller analysierten Gruppen zur Beurteilung des Fischer-F98-Gliom-Modells



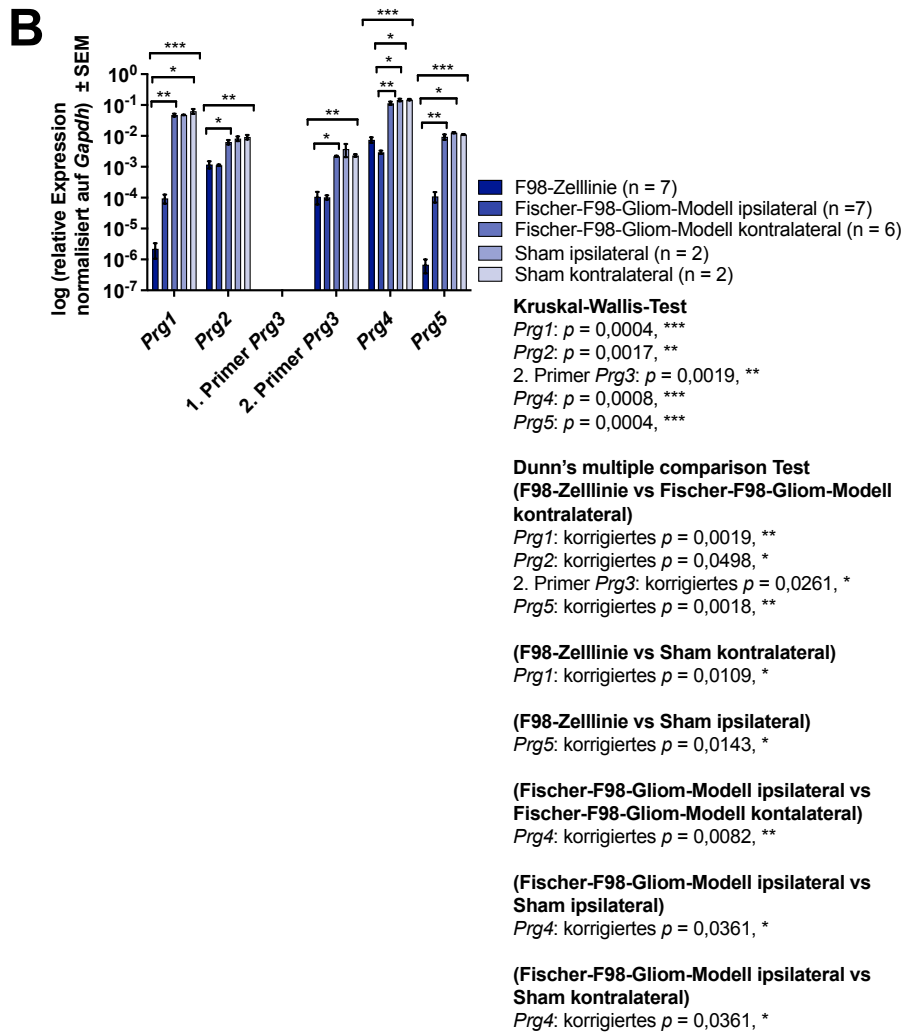


Abbildung 33: Relative *Prg*-mRNA-Expression des Fischer-F98-Gliom-Modells.

Grafische Darstellung der mRNA-Expression der *Prgs* der F98-Gliomzelllinie, der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells und der Sham-Tiere. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebearten. Deutlich wird, dass bei dem ersten *Prg3* TaqMan® Gene Expression Assay keine *Prg3*-Detektion nachgewiesen wurde. Die statistische Auswertung aller Daten ist nur begrenzt beurteilbar, da die geringe n-Zahl der Sham-Tiere die Analyse erschwert. Wie bereits in Abb. 22 dargestellt, zeigt sich ein ähnliches *Prg*-Expressionsmuster zwischen den Sham-Tieren und der kontralateralen Hemisphäre des Fischer-F98-Gliom-Modells. Einzelne Hinweise für nicht signifikante Differenzen werden dafür zwischen den Sham-Tieren und den kanzerogenen Proben erkennbar. Wie in Abb. 23 dargestellt zeigen Proben *ex vivo* eine meist reduzierte relative mRNA-Expression als *in vivo* auf. Diese Diskrepanzen wurden vor allem bei der Betrachtung der Kontrollgruppe im Vergleich zur F98-Gliomzelllinie deutlich. Unter Berücksichtigung der begrenzten statistischen Auswertungsmöglichkeiten lässt sich annehmen, dass *in vivo* erhöhte mRNA-Expressionen im Vergleich zu *in vitro* detektiert werden können und kanzerogen verändertes Material im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Tendenz zur Herunterregulation der *Prg*-Expression hervorruft. Siehe auch „Evaluierung der Kontrollgruppe für das Fischer-F98-Gliom-Modell“ und „Expression der *Prgs* im Fischer-F98-Gliom-Modell“. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert und jeweils auf *Hprt1* (A) und *Gapdh* (B) normalisiert. Anwendung des Kruskal-Wallis mit Post-hoc Test nach Dunn's für die Ermittlung der signifikanten Differenzen.

6.10. Verwendete Proben-Identifikation der Diagramme

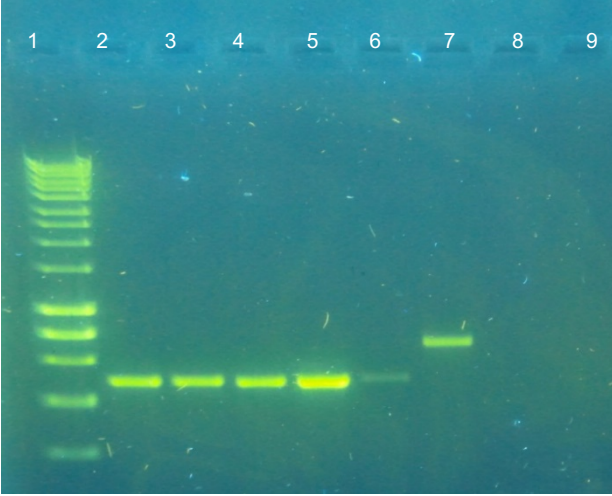
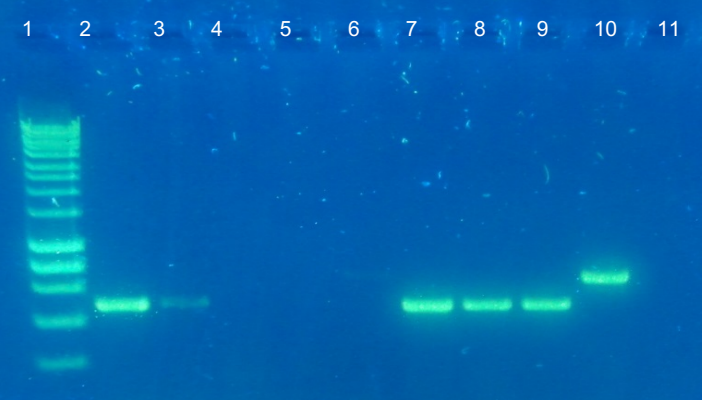
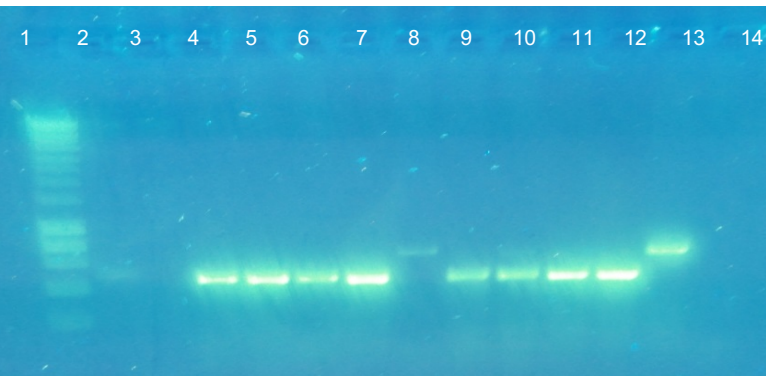
Abbildung	Proben-ID
11 A und B	Proben-ID der Kontrollen: 300, 301, G13/16, G17/16, G21/16, G26/16, G27/16, G28/16, G31/16, G56/16, G61/16, G95/16, K55/16, 200, 203; Proben-ID der Glioblastome: 100, 101, 102, 103, 106, 108, 109, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 124.
12 A und B	Proben-ID der Kontrollen: G21/16, G26/16, G27/16, G28/16, G31/16, G56/16, G61/16, G95/16, 200, 203; Proben-ID der Glioblastome: 102, 106, 109, 110, 113, 124.
12 C und D	Proben-ID der Kontrollen: 300, 301, G13/16, G17/16, K55/16; Proben-ID der Glioblastome: 100, 101, 103, 108, 114, 115, 116, 117, 118, 120.
12 E und F	Proben-ID der Glioblastompatienten zwischen 31-65 Jahren: 102, 106, 109, 110, 113, 124.

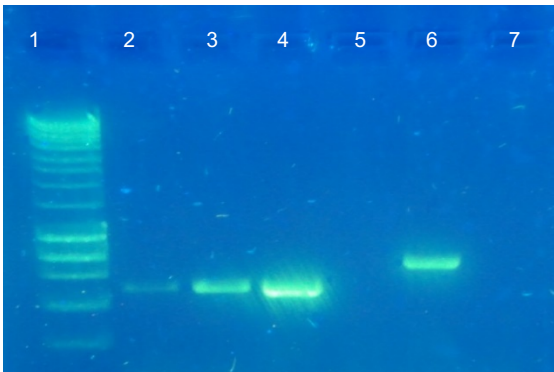
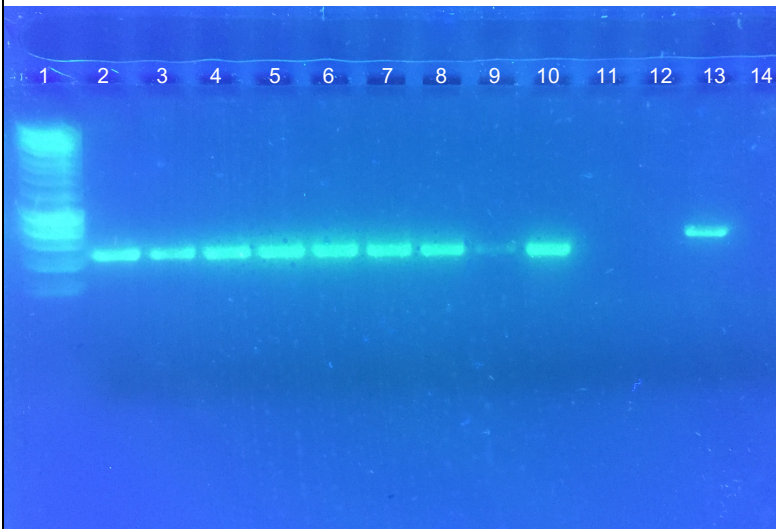
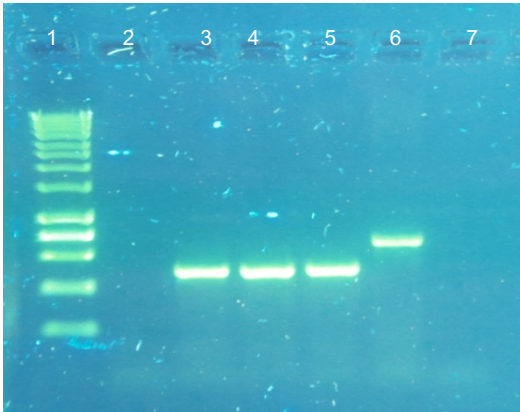
Abbildung	Proben-ID
12 G und H	Proben-ID der Glioblastompatienten ab 66 Jahren: 100, 101, 103, 108, 114, 115, 116, 117, 118, 120.
13 A und B	Proben-ID der weiblichen Kontrollen: 301, G13/16, G17/16, G27/16, G 61/16, G95/16, 200, 201, 202; Proben-ID der Glioblastompatientinnen: 108, 109, 113, 115, 116, 118.
13 C und D	Proben-ID der männlichen Kontrollen: 300, G21/16, G26/16, G28/16, G31/16, G56/16, K55/16, 203; Proben-ID der Glioblastompatienten: 100, 101, 102, 103, 106, 110, 114, 117, 120, 124.
13 E und F	Proben-ID der Glioblastompatientinnen: 108, 109, 113, 115, 116, 118; Proben-ID der Glioblastompatienten: 100, 101, 102, 103, 106, 110, 114, 117, 120, 124.
14 A und B	Proben-ID der Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter: 106, 108, 110, 113, 115; Proben-ID der Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter: 101, 102, 103, 109, 114, 116, 117, 118, 120.
15 A und B	Proben ID's: methylierter MGMT-Promoter: HROG02, HROG05, HROG13, HROG15, HROG17, HROG41; unmethylierter MGMT-Promoter: HROG04, HROG06, HROG07, HROG10, HROG24, HROG36, HROG38, HROG59.
16	Proben ID's: methylierter MGMT-Promoter: HROG02, HROG13, HROG15, HROG41; unmethylierter MGMT-Promoter: HROG06, HROG10, HROG24, HROG36, HROG38.
17	Proben-ID mit <i>Prg3</i> / mit <i>Prg5</i> : HROG04, HROG06, HROG10, HROG13, HROG36, HROG38, HROG17; Proben-ID mit <i>Prg3</i> / ohne <i>Prg5</i> : HROG07; Proben-ID ohne <i>Prg3</i> / ohne <i>Prg5</i> : HROG15, HROG59, HROG41; Proben-ID ohne <i>Prg3</i> / mit <i>Prg5</i> : HROG02, HROG05, HROG24.
20 A und B	Proben-ID Glioblastom: HROG02, HROG06, HROG10, HROG13, HROG15, HROG24, HROG36, HROG38; Proben-ID Rezidiv-Glioblastom: HROG04, HROG05, HROG07, HROG17, HROG59.
21 A und B	Proben-ID der Wildtyp-Ratte: unbehandelte Wistar-Ratte, Proben-ID der F98-Zelllinie: ZK F98-Probe.
22 A und B	Proben-ID des kontralateralen Fischer-F98-Gliom-Modells: 631-2 kontralateral, 631-5 kontralateral, 632-1 kontralateral, 632-6 kontralateral, 639-1 kontralateral, 639-2 kontralateral, Proben-ID der Sham ipsilateral: 638-11 ipsilateral, 638-12 ipsilateral, Proben-ID der Sham kontralateral: 638-11 kontralateral, 638-12 kontralateral.
23 A bis J	Proben-ID des kontralateralen Fischer-F98-Gliom-Modells: 631-2 kontralateral, 631-5 kontralateral, 632-1 kontralateral, 632-6 kontralateral, 639-1 kontralateral, 639-2 kontralateral, Proben-ID des ipsilateralen Fischer-F98-Gliom-Modells: 631-2 ipsilateral, 631-5 ipsilateral, 632-1 ipsilateral, 632-2 ipsilateral, 632-6 ipsilateral, 639-1 ipsilateral, 639-2 ipsilateral, Proben-ID der Zelllinien: ZK 631-2, ZK 631-5, ZK 632-1, ZK 632-6, ZK 639-1, ZK F98-02, ZK F98-03.
30 A und B	Proben-ID der Kontrollen: 300, 301, G13/16, G17/16, G21/16, G26/16, G27/16, G28/16, G31/16, G56/16, G61/16, G95/16, K55/16, 200, 201, 202, 203; Proben-ID der Glioblastome: 100, 101, 102, 103, 106, 108, 109, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 124.
31 A und B	Proben-ID der Glioblastompatienten zwischen 31-65 Jahren: 102, 106, 109, 110, 113, 124; Proben-ID der Glioblastompatienten ab 66 Jahren: 100, 101, 103, 108, 114, 115, 116, 117, 118, 120.
32 A bis J	Proben-ID der Passage (P): P3: HROG41; P5: HROG24, HROG36; P6: HROG38; P8: HROG59; P9: HROG07, HROG10; P10: HROG06, HROG13, HROG17; P11: HROG05; P12: HROG15; P14: HROG04; P30: HROG02.
33 A und B	Proben-ID der F98-Zelllinie: ZK 631-2, ZK 631-5, ZK 632-1, ZK 632-6, ZK 639-1, ZK F98-02, ZK F98-03; Proben-ID des ipsilateralen Fischer-F98-Gliom-Modells: 631-2 ipsilateral, 631-5 ipsilateral, 632-1 ipsilateral, 632-2 ipsilateral, 632-6 ipsilateral, 639-1 ipsilateral, 639-2 ipsilateral; Proben-ID des kontralateralen Fischer-F98-Gliom-Modells: 631-2 kontralateral, 631-5 kontralateral, 632-1 kontralateral, 632-6 kontralateral, 639-1 kontralateral, 639-2 kontralateral, Proben-ID der Sham ipsilateral: 638-11 ipsilateral, 638-12 ipsilateral, Proben-ID der Sham kontralateral: 638-11 kontralateral, 638-12 kontralateral.

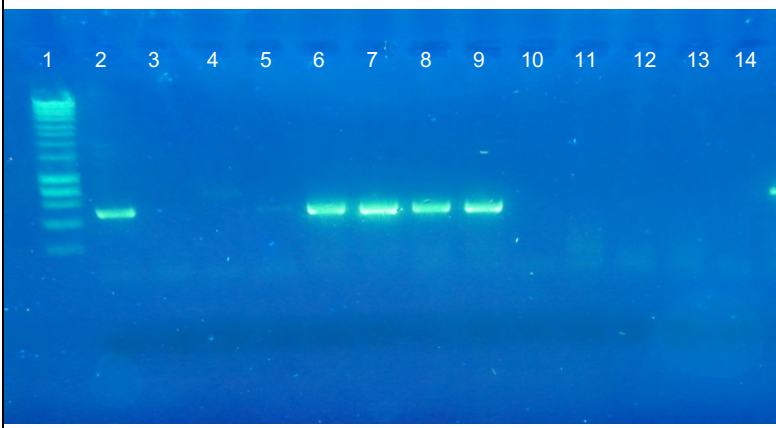
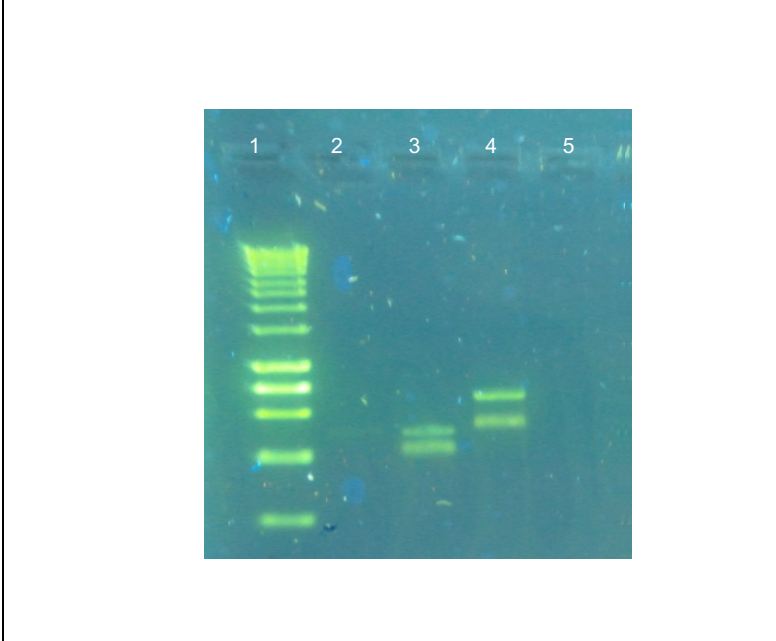
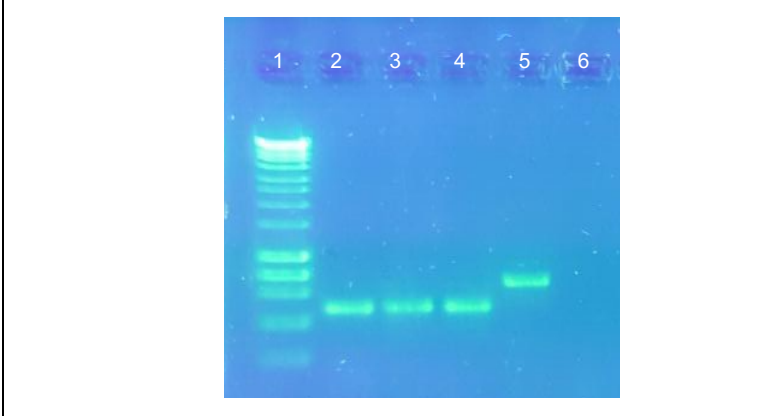
Tabelle 26: Auflistung der verwendeten Proben-ID in den Diagrammen.

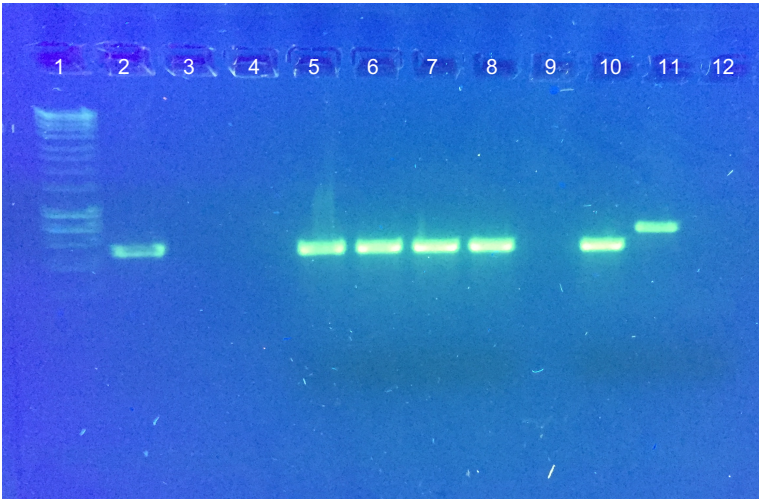
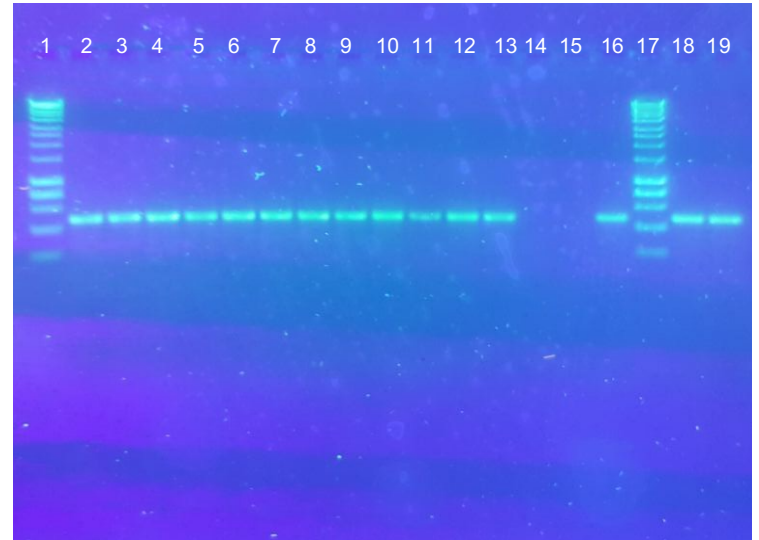
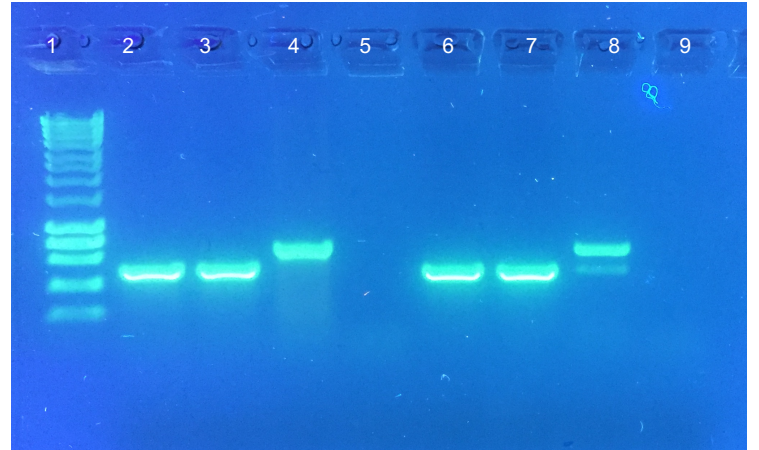
6.11. Fotografische Dokumentation der Gelelektrophorese

Nachfolgend wird die Gelelektrophorese aller verwendeten Proben dieser Arbeit fotografisch dargestellt. Proben, die nicht in dieser Arbeit verwendet wurden, werden entsprechend gekennzeichnet.

Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese	Beschriftung
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2: 301, 3: G13/16, 4: G17/16, 5: 102, 6: 103, 7: humane gDNA, 8: leere Spalte und 9: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. Bei den Spalten 2-6 und 9 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2: 100, 3: 101, 4-9: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 10: humane gDNA und 11: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. Bei den Spalten 2-5 und 11 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 4: 106, 6: 203, 9: G28/16, 10: 300, 11: G26/16, 12: 120, Spalten 2-3, 5 und 7-8: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 13: humane gDNA und 14: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. Bei den Spalten 4, 6, 9, 10, 11, 12 und 14 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese	Beschriftung
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2: 108, 3: 109, 4: 110, 5: nicht in dieser Arbeit verwendete Probe, 6: humane gDNA und 7: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. Bei den Spalten 2-4 und 7 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2: 113, 3: 117, 4: 114, 5: 115, 6: 118, 7: G95/16, 8: G61/16, 9: G56/16, 10: 200, 12: 116, 11: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 13: humane gDNA und 14: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. Bei den Spalten 2-10, 12 und 14 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination. Die Probe 116 zeigte keine entsprechende Bande, eine erneute Überprüfung konnte bei geringen Probenmaterial nicht durchgeführt werden. Nach fehlendem gDNA-Nachweis in der Probe 116, zeigte sich eine Analyse mittels qRT-PCR erfolgreich.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 4: 124, Spalten 2,3 und 5: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 6: humane gDNA und 7: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeprobe in vivo und post mortem. Bei den Spalten 4 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese	Beschriftung
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 6: G21/16, 7: G27/16, 8: G31/16, 9: G26/16, Spalten 2-5 und 11-13: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 14: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i> und 15: humane gDNA. Bei den Spalten 6-9 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 3: K55/16, 2: nicht in dieser Arbeit verwendete Probe, 4: humane gDNA und 5: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. Bei Spalte 3 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination, da die gDNA bei ungefähr 700 bp erwartet wird (siehe Abb. 7). Die cDNA des amplifizierten ACTB-Gens der Probe K55/16 ist tendenziell bei 500 bp sichtbar. Bei den Doppelbanden in den Spalten 3 und 4 handelt es sich am ehesten um ein technisches Artefakt, da dieselbe humane gDNA für alle humanen Gelelektrophoresen verwendet wurde.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 3: 201, 4: 202, 2: nicht in dieser Arbeit verwendete Probe, 5: humane gDNA und 6: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Gewebeproben <i>in vivo</i> und <i>post mortem</i>. Bei den Spalten 3 und 4 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese	Beschriftung
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Zelllinien. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2: HROG06 Konfluenz 90 % + 10 % FCS, 5: HROG06 Konfluenz 50 % + 10 % FCS, 6: HROG06 Konfluenz 50 %, ohne FCS, 7: HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS, 8: HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS, 10: HROG15 Konfluenz 50 %, ohne FCS, Spalten 3, 4 und 9: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 11: humane gDNA und 12: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Zelllinien. Bei den Spalten 2, 5-8 und 10 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Zelllinien. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1, 20: HyperLadder™ 1Kb, 2: HROG02, 3: HROG05, 4: HROG10, 5: HROG13, 6: HROG15, 7: HROG17, 9: HROG24, 10: HROG36, 11: HROG38, 12: HROG07, 13: HROG41, 16: HROG59, Spalte 8 und 18-19: nicht in dieser Arbeit verwendete Proben, 14: humane gDNA und 15: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Zelllinien. Bei den Spalten 2-13 und 16 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination. Lediglich die Darstellung der gDNA war nicht erfolgreich.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der humanen Zelllinien und der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: HyperLadder™ 1Kb, 2. ZK F98-Probe, 2: unbehandelte Wistar-Ratte, 4: gDNA der Ratte, 5: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells, 6: HROG04, 7: HROG06, 8: humane gDNA und 9: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der humanen Zelllinien. Bei den Spalten 3 und 4 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

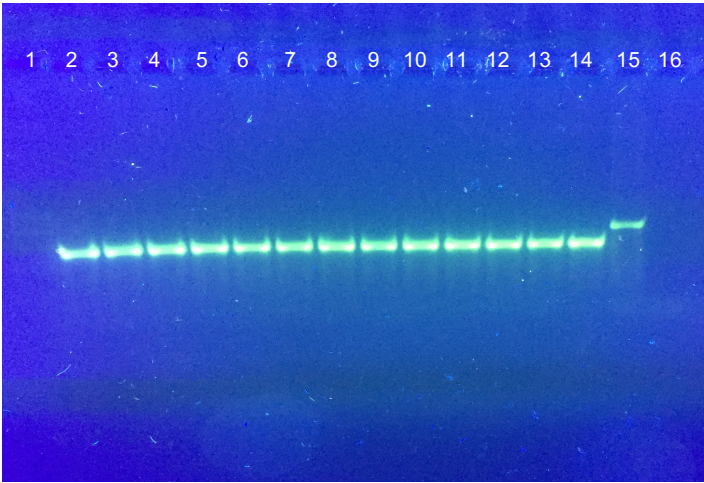
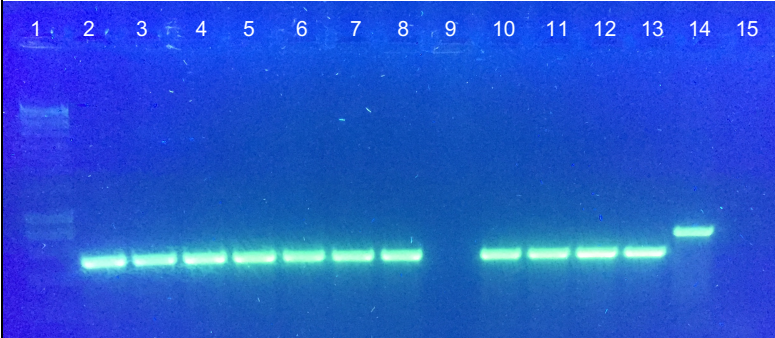
Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese	Beschriftung
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: undeutliche Darstellung des HyperLadder™ 1Kb, 2: 631-2 ipsilateral, 3: 631-kontralateral, 4: ZK 631-2, 5: 631-5 ipsilateral, 6: 631-5 kontralateral, 7: ZK 631-5 kontralateral, 8: 632-1 ipsilateral, 9: 632-1 kontralateral, 10: ZK 632-1, 11: 632-2 ipsilateral, 12: 632-6 ipsilateral, 13: 632-6 kontralateral, 14 ZK 632-6, 15: gDNA der Ratte und 16: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells. Bei den Spalten 2-14 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.
	Fotographische Darstellung der Gelelektrophorese der Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells. In den Spalten werden folgende Proben-IDs dargestellt: 1: undeutliche Darstellung des HyperLadder™ 1Kb, 2: 639-1 ipsilateral, 3: 639-1 kontralateral, 4: ZK 639-1, 5: 639-2 ipsilateral, 6: 639-2 kontralateral, 7: 638-11 ipsilateral, 8: 638-11 kontralateral, 9: nicht in dieser Arbeit verwendete Probe, 10: 638-12 ipsilateral, 11: 638-12 kontralateral, 12: ZK F98-02, 13: ZK F98-03, 14: gDNA der Ratte und 15: Nuklease-freies Wasser des Reaktionsansatzes der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells. Bei den Spalten 2-8 und 10-13 kam es zu keinem Nachweis einer gDNA-Kontamination.

Tabelle 27: Fotografische Darstellung der Gelelektrophorese aller verwendeten Proben.

6.12. Darstellung der verwendeten Rohdaten

6.12.1. Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA in humanen Gewebeproben *in vivo* und *post mortem*

Proben-ID	Gewebe-typ	Spektrometer BioMate 3 *				NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer				Eppendorf BioSpectrometer® basic			
		260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in µg/ml	260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in ng/µl	260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in µg/ml
gDNA Human	Hirngewebe					3,097	1,533	2,02	154,87				
100	Tumor					10,726	5,270	2,04	429,02	1,372	0,7	1,96	548,7
101	Tumor					10,483	5,131	2,04	419,33	1,278	0,649	1,97	511,3
102	Tumor					33,982	16,790	2,02	1359,27				
103	Tumor					15,084	7,364	2,05	603,34	1,842	0,916	2,01	736,9 #
106	Tumor					6,072	2,934	2,07	242,86	0,733	0,368	1,99	293
108	Tumor					7,973	3,884	2,05	318,93	0,958	0,489	1,96	383
109	Tumor					7,782	4,372	1,78	311,28	0,930	0,624	1,49	371,8 #
110	Tumor	0,239	0,167	1,43	478	8,942	4,809	1,86	357,68	1,111	0,677	1,64	444,2
113	Tumor	-	-	-	-	4,458	2,295	1,94	178,31	0,668	0,373	1,79	267,2
114	Tumor	0,056	0,031	1,81	122	-	-	-	-	-	-	-	-
115	Tumor	0,221	0,110	2,0	442	-	-	-	-	-	-	-	-
116	Tumor	-	-	-	-	1,743	0,943	1,87	69,74	0,244	1,488	1,64	97,4
117	Tumor	-	-	-	-	1,999	1,030	1,94	79,95	0,254	0,141	1,8	101,6
118	Tumor	0,136	0,079	1,72	272	-	-	-	-	-	-	-	-
120	Tumor	0,05	0,026	1,92	100	-	-	-	-	-	-	-	-
124	Tumor	-	-	-	-	39,372	20,916	1,88	1573,10	-	-	-	-
300	Kontrolle	-	-	-	-	43,941	21,695	2,03	1757,66	-	-	-	-
301	Kontrolle	-	-	-	-	48,875	23,979	2,04	1955,00	-	-	-	-
G13/16	Kontrolle	-	-	-	-	45,828	22,613	2,03	1833,12	-	-	-	-
G17/16	Kontrolle	-	-	-	-	45,364	22,246	2,04	1814,57	-	-	-	-
G21/16	Kontrolle	-	-	-	-	45,636	22,554	2,02	1825,45	-	-	-	-
G26/16	Kontrolle	-	-	-	-	48,382	23,862	2,03	1935,27	-	-	-	-
G27/16	Kontrolle	-	-	-	-	64,814	31,895	2,03	2592,57	-	-	-	-
G28/16	Kontrolle	-	-	-	-	36,597	18,122	2,02	1463,87	-	-	-	-
G31/16	Kontrolle	-	-	-	-	29,236	14,465	2,02	1169,45	-	-	-	-
K55/16	Kontrolle	-	-	-	-	20,654	10,108	2,04	826,17	-	-	-	-
G56/16	Kontrolle	-	-	-	-	47,652	23,861	2,00	1906,09	-	-	-	-
G61/16	Kontrolle	-	-	-	-	44,538	22,668	1,96	1781,54	-	-	-	-
G95/16	Kontrolle	-	-	-	-	62,110	31,274	1,99	2484,39	-	-	-	-
200	Kontrolle	-	-	-	-	4,403	2,240	1,97	176,13	0,487	0,262	1,86	194,6 #

Proben-ID	Gewebe-typ	Spektrometer BioMate 3 *				NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer				Eppendorf BioSpectrometer® basic			
		260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in µg/ml	260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in ng/µl	260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/A280	Konzentration in µg/ml
201	Kontrolle	-	-	-	-	3,493	1,951	1,79	139,71	0,422	0,274	1,54	168,8
202	Kontrolle	-	-	-	-	3,737	2,041	1,83	149,47	0,426	0,26625	1,60	170,5
203	Kontrolle	-	-	-	-	6,885	3,366	2,05	275,40	0,847	0,437	1,94	338,8

Tabelle 28: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA in humanen Gewebeproben *in vivo* und *post mortem*.

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde zur Nukleinsäure-Quantifizierung die fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Proben anhand der Absorption im UV-Bereich bei 260 und 280 nm [164] mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer und dem Eppendorf BioSpectrometer® basic unter Verwendung der RNA-Suspension durchgeführt. Für die Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient mit dem Zielbereich A260/A280 = 1,8 – 2,0 verwendet [164]. Blau hinterlegte Felder zeigen den Quotienten A260/A280 außerhalb des Zielbereichs 1,8 – 2,0. Ergänzend wurden freundlicherweise von einem Kooperationspartner, dem Institut für Neuropathologie der Charité der Universitätsmedizin Berlin, Messwerte des Spektrometer BioMate 3 mit der Seriennummer 2K4G352002 zur Verfügung gestellt (mit * gekennzeichnete Spalten). Die geringe Menge an Probenmaterial ermöglichte nicht in allen Fällen eine Bestimmung der Daten mit den verschiedenen Geräten. Der jeweils **fett** geschriebene Messwert wurde für die folgenden Methoden verwendet. Die Konzentration der entsprechenden RNA-Suspension wurde für die Bestimmung der RNA-Masse für die anschließende cDNA-Synthese genutzt. Mit # gekennzeichnete Messwerte konnten unter Umständen nicht adäquat dargestellt werden, da z. B. Werte oder Absorption zu hoch waren.

6.12.2. Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der humanen Gewebeproben *in vivo* und *post mortem*

Proben-ID	Gewebe-typ	Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>HPRT1</i>)					Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>TBP</i>)				
		PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5	PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5
100	Tumor	1,49	0,233	0,238	17,4	0,757	0,233	0,0365	0,0373	2,73	0,119
101	Tumor	3,04	0	0,0319	15,9	0,143	1,04	0	0,0109	5,45	0,0491
102	Tumor	0,915	0,0005	0,0764	2,61	0,0748	0,342	0,00019	0,0285	0,978	0,028
103	Tumor	2,98	0,0433	0,503	19,8	1,27	0,374	0,00552	0,0635	2,5	0,161
106	Tumor	5,23	1,38	6	48	1,48	0,484	0,142	0,705	5,62	0,14
108	Tumor	1,42	0	0,319	36,1	0,0535	0,195	0,0022	0,0267	4,25	0,00593
109	Tumor	1,81	0,025	0,302	12,2	0,0125	0,428	0,00594	0,0642	2,6	0,00292
110	Tumor	0,619	0,225	0,238	2,5	0,558	0,128	0,0466	0,0493	0,518	0,116
113	Tumor	1,08	0	0,0041	5,84	0,299	0,287	0	0,00108	1,55	0,0795
114	Tumor	1,04	0,0265	0,114	1,64	0,0595	0,43	0,0112	0,0479	0,688	0,0251
115	Tumor	1,56	0,0435	0,279	1,33	0,296	0,638	0,0178	0,114	0,54	0,121
116	Tumor	11	0,00045	0,797	19,3	0,849	0,921	0,00016	0,0668	1,63	0,0731
117	Tumor	1,77	0,0828	0,647	5,07	0,578	0,435	0,0203	0,159	1,24	0,142
118	Tumor	1,02	0,0103	0,0058	1,79	0,198	0,495	0,00505	0,0028	0,875	0,0964
120	Tumor	1,24	0,0633	0,824	2	0,264	0,419	0,0209	0,279	0,68	0,09
124	Tumor	3,1	0,0148	0,0357	12,5	0,437	0,536	0,00286	0,00615	2,16	0,0754
300	Kontrolle	0,637	0,024	0,366	1,93	0,585	0,435	0,0164	0,251	1,32	0,4
301	Kontrolle	0,713	0,123	0,223	2,64	0,373	0,605	0,105	0,19	2,24	0,317
G13/16	Kontrolle	0,343	0,00459	0,301	3,21	0,337	0,132	0,00132	0,116	1,24	0,13
G17/16	Kontrolle	0,551	0,0343	0,646	2,79	0,268	0,255	0,0156	0,297	1,28	0,123

Proben-ID	Gewebe-typ	Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>HPRT1</i>)					Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>TBP</i>)				
		<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>	<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>
G21/16	Kontrolle	0,569	0,0202	2,2	2,36	0,345	0,202	0,00713	0,782	0,84	0,123
G26/16	Kontrolle	0,855	0,114	0,714	2,45	0,474	0,321	0,0428	0,268	0,919	0,178
G27/16	Kontrolle	1,09	0,0773	1,55	2,6	0,357	0,32	0,0226	0,454	0,763	0,105
G28/16	Kontrolle	1,07	0,0706	0,868	3,79	0,518	0,429	0,0284	0,349	1,52	0,208
G31/16	Kontrolle	0,675	0,0149	0,378	1,37	0,378	0,375	0,0083	0,21	0,76	0,21
K55/16	Kontrolle	0,562	0,016	0,395	4,57	0,301	0,152	0,00437	0,108	1,22	0,0819
G56/16	Kontrolle	0,435	0,0217	0,27	1,92	0,166	0,34	0,0171	0,211	1,5	0,13
G61/16	Kontrolle	0,585	0,0143	1,58	1,96	0,309	0,247	0,00637	0,689	0,826	0,133
G95/16	Kontrolle	0,488	0,0335	0,31	1,63	0,229	0,257	0,0177	0,163	0,862	0,12
200	Kontrolle	1,04	0,023	0,715	1,16	0,208	0,909	0,0198	0,619	1,02	0,182
201	Kontrolle	2,37	0,233	1,04	2,79	0,853	2,86	0,28	1,25	3,37	1,03
202	Kontrolle	2,24	0,113	0,295	3,58	0,84	1,67	0,0844	0,219	2,68	0,626
203	Kontrolle	1,94	0,134	0,171	3,16	0,599	2,58	0,178	0,228	4,22	0,801

Tabelle 29: Rohdaten der qRT-PCR der humanen Tumor- und Kontrollproben.

Bei den blau hinterlegten Feldern wurde für den Mittelwert der relativen Expression der Wert "0" ausgewählt (siehe „Limitationen der Datenanalyse für die Auswertung der qPCR-Ergebnisse“). Die gelb hinterlegten Felder weisen Mittelwerte für die relative Expression auf, bei denen die ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen $> 0,5$ Zyklen lag. Eine genaue Erläuterung dafür findet sich in „Tabelle 30“.

6.12.3. Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen *PRG*-Expression mit Darstellung der einzelnen C_T -Werte humaner Proben *in vivo* und *post mortem*

Patient-en-ID	Gewebe-typ	<i>PRG</i>	Referenz-gen	C_T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
				1. Messung						
				1. C_T -Wert	2. C_T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C_T -Wert Referenz-gen	2. C_T -Wert Referenz-gen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
101	Tumor	<i>PRG2</i>	<i>HPRT1</i>	37,79141*	38,464554*	0,673144	30,256214	30,030123	0,226091	0,00414
101	Tumor	<i>PRG2</i>	<i>TBP</i>	37,79141*	38,464554*	0,673144	28,642685	28,554565	0,08812	0,0014
108	Tumor	<i>PRG2</i>	<i>HPRT1</i>	36,677914*	36,71301*	0,035096	29,985172	Unbestimmt	n.z.	n.z.
109	Tumor	<i>PRG5</i>	<i>HPRT1</i>	34,954742	36,0462*	1,091458	28,907679	29,05922	0,151541	0,0115
109	Tumor	<i>PRG5</i>	<i>TBP</i>	34,954742	36,0462*	1,091458	26,688286	26,818632	0,130346	0,00246
113	Tumor	<i>PRG2</i>	<i>HPRT1</i>	35,917088*	34,745804	1,171284	27,75993	27,829994	0,070064	0,00589
113	Tumor	<i>PRG2</i>	<i>TBP</i>	35,917088*	34,745804	1,171284	25,929596	25,84667	0,082926	0,00154
G56/16	Kontrolle	<i>PRG2</i>	<i>HPRT1</i>	36,03872*	36,744133*	0,705413	32,23333	27,32432	4,90901	0,0365
G56/16	Kontrolle	<i>PRG2</i>	<i>TBP</i>	36,03872*	36,744133*	0,705413	30,046156	30,431454	0,385298	0,0141

Patienten-ID	Gewebe- typ	PRG	Referenz- gen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
				2. Messung						
				1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenz- gen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
101	Tumor	PRG2	HPRT1	Unbestimmt	41,141983*	n.z.	31,732445	30,394756	1,337689	n.z.
101	Tumor	PRG2	TBP	Unbestimmt	41,141983*	n.z.	27,905119	27,596344	0,308775	n.z.
108	Tumor	PRG2	HPRT1	35,904488*	35,662918	0,24157	29,539484	30,339453	0,799969	0,0186
109	Tumor	PRG5	HPRT1	35,34234*	37,302258*	1,959918	Unbestimmt	29,12557	n.z.	n.z.
109	Tumor	PRG5	TBP	35,34234*	37,302258*	1,959918	30,582188	30,497717	0,084471	0,00193
113	Tumor	PRG2	HPRT1	40,70664*	41,10028*	0,39364	28,519249	28,442163	0,077086	0,000185
113	Tumor	PRG2	TBP	40,70664*	41,10028*	0,39364	26,497387	26,533964	0,036577	0,000047
G56/16	Kontrolle	PRG2	HPRT1	36,43542*	38,452827*	2,017401	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	n.z.
G56/16	Kontrolle	PRG2	TBP	36,43542*	38,452827*	2,017401	30,582188	30,497717	0,084471	0,0107

Patienten-ID	Gewebe- typ	PRG	Referenz- gen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
				3. Messung						
				1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenz- gen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
101	Tumor	PRG2	HPRT1	37,769054*	35,5873*	2,181754	29,42311	29,654984	0,231874	0,00972
101	Tumor	PRG2	TBP	37,769054*	35,5873*	2,181754	27,800371	27,626877	0,173494	0,00251
108	Tumor	PRG2	HPRT1	38,83397*	37,13161*	1,70236	29,691427	30,09809	0,406663	0,0047
109	Tumor	PRG5	HPRT1	34,92409	35,49179*	0,5677	28,943321	28,717697	0,225624	0,0125
109	Tumor	PRG5	TBP	34,92409	35,49179*	0,5677	26,761541	26,754225	0,007316	0,00292
G56/16	Kontrolle	PRG2	HPRT1	34,36833	33,81364	0,55469	28,481094	28,576452	0,095358	0,0217
G56/16	Kontrolle	PRG2	TBP	34,36833	33,81364	0,55469	28,05835	28,27995	0,2216	0,0171

Patienten-ID	Gewebe- typ	PRG	Referenz- gen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
				4. Messung						
				1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenz- gen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
101	Tumor	PRG2	HPRT1	37,543312*	39,871696*	2,328384	29,55895	29,5509	0,00805	0,00237
101	Tumor	PRG2	TBP	37,543312*	39,871696*	2,328384	27,909336	27,743826	0,16551	0,000741

Patienten-ID	Gewebe-typ	PRG	Referenz-gen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
				5. Messung						
				1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenz-gen	2. C _T -Wert Referenz-gen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
101	Tumor	PRG2	HPRT1	37,801186*	37,180527*	0,620659	29,834957	29,503834	0,331123	0,00444
101	Tumor	PRG2	TBP	37,801186*	37,180527*	0,620659	28,230331	27,873627	0,356704	0,00145

Tabelle 30: C_T-Werte und kalkulierte Mittelwerte der relativen Expression der PRGs humaner Gewebeprobe.

Darstellung multipler Messungen zur Bestimmung der Mittelwerte der relativen PRG-Expression. Auflistung der einzelnen C_T-Werte der Proben-ID's sowie der entsprechenden Referenzgene für die Normalisierung. Darstellung der ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen. * = C_T-Wert der untersuchten Patienten > 35 Zyklen; C_T -Werte > 40 Zyklen wird *Kursiv* gekennzeichnet; **FETT** sofern ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen > 0,5. ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen (nachfolgend als ΔC_T bezeichnet). n.z. = nicht zutreffend.

Blau hinterlegte Felder zeigen ausgewählte Mittelwerte der relativen Genexpression einzelner Proben-ID's an:

- **Proben-ID 109:** Alle Messungen weisen eine erhöhte ΔC_T auf. Mindestens ein C_T-Wert der Duplikatbestimmung > 35 Zyklen. Es erfolgte die Auswahl der Messergebnisse der 3. Messung, da hier die geringste ΔC_T bei zeitgleich niedrigsten C_T-Werten vorlag. Lediglich ein C_T-Wert der Duplikatbestimmung war > 35 Zyklen.
- **Proben-ID G56/16:** ΔC_T > 0,5 Zyklen bei allen Messungen. Die Ergebnisse der 3. Messung wurden ausgewählt, da die C_T-Werte < 35 Zyklen und ΔC_T die geringste Differenz aufweist.

Für die folgenden Proben-ID's gilt, dass der Wert "0" für den Mittelwert der relativen Genexpression ausgewählt wurde:

- **Proben-ID 101:** ΔC_T bei allen 5 Messungen > 0,5 Zyklen. C_T-Wert der Duplikate immer > 35 Zyklen.
- **Proben-ID 108:** Es konnte primär aufgrund erhöhter bzw. nicht detektierbarer C_T-Werte keine Normalisierung auf *HPRT1* berechnet werden. Währenddessen lagen bereits C_T-Werte über 35 Zyklen bei der entsprechenden Proben-ID vor. Bei der 3. Messung bestätigten sich die erhöhten C_T-Werte und es konnte ein ΔC_T > 0,5 ermittelt werden.
- **Proben-ID 113:** ΔC_T der ersten Messung deutlich > 0,5 Zyklen, mit einem C_T-Wert der Duplikatbestimmung > 35 Zyklen. C_T-Werte der zweiten Messung sind > 40 Zyklen.

6.12.4. Durchschnittliche relative PRG-Expression entsprechend den Abbildungen der humanen Proben *in vivo* und *post mortem*

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf HPRT1)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb. 11, A und B	Kontrolle (ohne 201 und 202)	Glioblastom	0,7702 ± 0,1026	2,457 ± 0,6410	0,04836 ± 0,01133	0,1343 ± 0,08508	0,7125 ± 0,1557	0,6509 ± 0,3629	2,503 ± 0,2371	12,75 ± 3,364	0,3631 ± 0,03375	0,4581 ± 0,1098
Abb.12, A und B	Kontrolle (31 bis 65 Jahre)	Glioblastom (31 bis 65 Jahre)	0,8747 ± 0,1417	2,126 ± 0,7191	0,05235 ± 0,01393	0,2742 ± 0,2240	0,8756 ± 0,2157	1,109 ± 0,9793	2,24 ± 0,2563	13,94 ± 7,048	0,3583 ± 0,04424	0,4769 ± 0,2178
Abb.12, C und D	Kontrolle (≥ 66 Jahre)	Glioblastom (≥ 66 Jahre)	0,5612 ± 0,06185	2,656 ± 0,9548	0,04038 ± 0,02122	0,05032 ± 0,02221	0,3862 ± 0,07137	0,3759 ± 0,09565	3,028 ± 0,4372	12,03 ± 3,671	0,3728 ± 0,05588	0,4468 ± 0,1277
Abb.12, E und F	Glioblastom (31 bis 65 Jahre)	-	2,126 ± 0,7191	-	0,2742 ± 0,2240	-	1,109 ± 0,9793	-	13,94 ± 7,048	-	0,4769 ± 0,2178	-
Abb. 12, G und H	Glioblastom (≥ 66 Jahre)	-	2,656 ± 0,9548	-	0,05032 ± 0,02221	-	0,3759 ± 0,09565	-	12,03 ± 3,671	-	0,4468 ± 0,1277	-

Appendix

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf HPRT1)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb.13, A und B	Weibliche Kohorte	Glioblastom-patientinnen	1,047 $\pm$ 0,2515	2,982 $\pm$ 1,608	0,07289 $\pm$ 0,02455	0,01321 $\pm$ 0,007250	0,74 $\pm$ 0,1789	0,2845 $\pm$ 0,1184	2,484 $\pm$ 0,2558	12,76 $\pm$ 5,437	0,4193 $\pm$ 0,08282	0,2847 $\pm$ 0,1230
Abb.13, C und D	Männliche Kohorte	Glioblastom-patienten	0,8429 $\pm$ 0,1715	2,142 $\pm$ 0,4519	0,05193 $\pm$ 0,01706	0,2069 $\pm$ 0,1331	0,6703 $\pm$ 0,2332	0,8708 $\pm$ 0,5764	2,694 $\pm$ 0,3790	12,74 $\pm$ 4,509	0,4208 $\pm$ 0,05309	0,5621 $\pm$ 0,1546
Abb.13, E und F	Glioblastom-patientinnen	Glioblastom-patienten	2,982 $\pm$ 1,608	2,142 $\pm$ 0,4519	0,01321 $\pm$ 0,007250	0,2069 $\pm$ 0,1331	0,2845 $\pm$ 0,1184	0,8708 $\pm$ 0,5764	12,76 $\pm$ 5,437	12,74 $\pm$ 4,509	0,2847 $\pm$ 0,1230	0,5621 $\pm$ 0,1546
Abb. 14, A und B	methylierter MGMT-Promoter	unmethylierter MGMT-Promoter	1,982 $\pm$ 0,8281	2,757 $\pm$ 1,065	0,3297 $\pm$ 0,2658	0,02802 $\pm$ 0,009935	1,368 $\pm$ 1,159	0,3668 $\pm$ 0,1109	18,75 $\pm$ 9,723	8,923 $\pm$ 2,614	0,5373 $\pm$ 0,2488	0,3832 $\pm$ 0,1436
Abb. 30, A und B	Kontrolle (inklusive 201 und 202)	Glioblastom	0,9508 $\pm$ 0,1531	2,457 $\pm$ 0,6410	0,06302 $\pm$ 0,01504	0,1343 $\pm$ 0,08508	0,7072 $\pm$ 0,1405	0,6509 $\pm$ 0,3629	2,583 $\pm$ 0,2181	12,75 $\pm$ 3,364	0,42 $\pm$ 0,04895	0,4581 $\pm$ 0,1098
Abb. 31, A und B	Glioblastom-patienten (31 bis 65 Jahre)	Glioblastom-patienten ($\geq$ 66 Jahre)	2,126 $\pm$ 0,7191	2,656 $\pm$ 0,9548	0,2742 $\pm$ 0,2240	0,05032 $\pm$ 0,02221	1,109 $\pm$ 0,9793	0,3759 $\pm$ 0,09565	13,94 $\pm$ 7,048	12,03 $\pm$ 3,671	0,4769 $\pm$ 0,2178	0,4468 $\pm$ 0,1277

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf TBP)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb. 11, C und D	Kontrolle (ohne 201 und 202)	Glioblastom	0,5039 $\pm$ 0,1566	0,4616 $\pm$ 0,06040	0,03273 $\pm$ 0,01224	0,01983 $\pm$ 0,008845	0,329 $\pm$ 0,05456	0,1039 $\pm$ 0,04382	1,369 $\pm$ 0,2275	2,126 $\pm$ 0,4184	0,2161 $\pm$ 0,04718	0,08278 $\pm$ 0,01240
Abb.12, A und B	Kontrolle (31 bis 65 Jahre)	Glioblastom (31 bis 65 Jahre)	0,598 $\pm$ 0,2290	0,3675 $\pm$ 0,06058	0,03482 $\pm$ 0,01628	0,03293 $\pm$ 0,02300	0,3973 $\pm$ 0,07132	0,1424 $\pm$ 0,1130	1,323 $\pm$ 0,3340	2,238 $\pm$ 0,7437	0,219 $\pm$ 0,06577	0,07364 $\pm$ 0,02107
Abb.12, C und D	Kontrolle ($\geq$ 66 Jahre)	Glioblastom ($\geq$ 66 Jahre)	0,3158 $\pm$ 0,09004	0,518 $\pm$ 0,08696	0,02854 $\pm$ 0,01935	0,01196 $\pm$ 0,003731	0,1924 $\pm$ 0,03697	0,08079 $\pm$ 0,02664	1,46 $\pm$ 0,1958	2,058 $\pm$ 0,5301	0,2104 $\pm$ 0,06242	0,08826 $\pm$ 0,01592
Abb. 12, E und F	Glioblastom (31 bis 65 Jahre)	-	0,3675 $\pm$ 0,06058	-	0,03293 $\pm$ 0,02300	-	0,1424 $\pm$ 0,1130	-	2,238 $\pm$ 0,7437	-	0,07364 $\pm$ 0,02107	-
Abb. 12, G und H	Glioblastom ($\geq$ 66 Jahre)	-	0,5180 $\pm$ 0,08696	-	0,01196 $\pm$ 0,003731	-	0,08079 $\pm$ 0,02664	-	2,058 $\pm$ 0,5301	-	0,08826 $\pm$ 0,01592	-
Abb.13, A und B	Weibliche Kohorte	Glioblastom-patientinnen	0,8061 $\pm$ 0,3033	0,494 $\pm$ 0,1064	0,06142 $\pm$ 0,02984	0,005192 $\pm$ 0,002713	0,4441 $\pm$ 0,1215	0,04593 $\pm$ 0,01793	1,587 $\pm$ 0,3145	1,908 $\pm$ 0,5510	0,3073 $\pm$ 0,1062	0,06314 $\pm$ 0,01977

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf TBP)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb.13, C und D	Männliche Kohorte	Glioblastom-patienten	0,6043 $\pm$ 0,2845	0,4421 $\pm$ 0,07644	0,03781 $\pm$ 0,02052	0,02861 $\pm$ 0,01354	0,3009 $\pm$ 0,07273	0,1387 $\pm$ 0,06823	1,537 $\pm$ 0,3968	2,256 $\pm$ 0,6004	0,2665 $\pm$ 0,08359	0,09456 $\pm$ 0,01545
Abb.13, E und F	Glioblastom-patientinnen	Glioblastom-patienten	0,494 $\pm$ 0,1064	0,4421 $\pm$ 0,07644	0,005192 $\pm$ 0,002713	0,02861 $\pm$ 0,01354	0,04593 $\pm$ 0,01793	0,1387 $\pm$ 0,06823	1,908 $\pm$ 0,5510	2,256 $\pm$ 0,6004	0,06314 $\pm$ 0,01977	0,09456 $\pm$ 0,01545
Abb. 14, A und B	methylierter MGMT-Promoter	unmethylierter MGMT-Promoter	0,3464 $\pm$ 0,09437	0,5427 $\pm$ 0,08451	0,04172 $\pm$ 0,02641	0,007695 $\pm$ 0,002720	0,1792 $\pm$ 0,1328	0,08029 $\pm$ 0,02910	2,496 $\pm$ 1,036	1,849 $\pm$ 0,5109	0,09249 $\pm$ 0,02375	0,07418 $\pm$ 0,01792
Abb. 30, A und B	Kontrolle (inklusive 201 und 202)	Glioblastom	0,7111 $\pm$ 0,2041	0,4616 $\pm$ 0,06040	0,05031 $\pm$ 0,01819	0,01983 $\pm$ 0,008845	0,3767 $\pm$ 0,07293	0,1039 $\pm$ 0,04382	1,564 $\pm$ 0,2422	2,126 $\pm$ 0,4184	0,2881 $\pm$ 0,06669	0,08278 $\pm$ 0,01240
Abb. 31, A und B	Glioblastom-patienten (31 bis 65 Jahre)	Glioblastom-patienten ($\geq$ 66 Jahre)	0,3675 $\pm$ 0,06058	0,518 $\pm$ 0,08696	0,03293 $\pm$ 0,02300	0,01196 $\pm$ 0,003731	0,1424 $\pm$ 0,1130	0,08079 $\pm$ 0,02664	2,238 $\pm$ 0,7437	2,058 $\pm$ 0,5301	0,07364 $\pm$ 0,02107	0,08826 $\pm$ 0,01592

Tabelle 31: Durchschnittlichen relative PRG-Expression $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts der Abbildung der humanen Gewebeproben.

Darstellung der durchschnittlichen relativen PRG-Expression $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM, Standard Error of the Mean) in Bezug zu dem verwendeten Referenzgen für die einzelnen Patientengruppen der jeweiligen grafischen Darstellung der humanen *in vivo* und *post mortem* Proben.

6.12.5. Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der humanen Zelllinien

Proben-ID	Gewebetyp	RNA-Masse in μ g	NanoDrop® ND-1000 Spectro-photometer				Eppendorf BioSpectrometer® basic	
			260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/ A280	Konzentration in ng/ μ l	A260/A280	Konzentration in μ g/ml
HROG02	Tumor	-	21,305	10,169	2,1	852,2	-	-
HROG04 *	Tumor-Rezidiv	2	-	-	-	-	-	-
HROG05 *	Tumor-Rezidiv	2	-	-	-	-	-	-
HROG06 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG07 *	Tumor-Rezidiv	1	-	-	-	-	-	-
HROG10 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG13 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG15 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG17 *	Tumor-Rezidiv	2	-	-	-	-	-	-
HROG24 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-

Proben-ID	Gewebetyp	RNA-Masse in µg	NanoDrop® ND-1000 Spectro-photometer				Eppendorf BioSpectrometer® basic	
			260 nm (A260)	280 nm (A280)	A260/ A280	Konzentration in ng/µl	A260/A280	Konzentration in µg/ml
HROG36 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG38 *	Tumor	2	-	-	-	-	-	-
HROG41 *	Tumor	1	-	-	-	-	-	-
HROG59 *	Tumor-Rezidiv	2	-	-	-	-	-	-
HROG06 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	Tumor	-	-	-	-	-	2,03	1068,6
HROG06 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	Tumor	-	-	-	-	-	2,01	730,5
HROG06 Konfluenz 50 %, ohne FCS	Tumor	-	-	-	-	-	1,87	538,6
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	Tumor	-	-	-	-	-	1,91	679,2
HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	Tumor	-	-	-	-	-	1,73	478,8
HROG15 Konfluenz 50 %, ohne FCS	Tumor	-	-	-	-	-	1,91	506,3

Tabelle 32: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der humanen Zelllinien.

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde zur Nukleinsäure-Quantifizierung die fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Proben anhand der Absorption im UV-Bereich bei 260 und 280 nm [164] mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer und dem Eppendorf BioSpectrometer® basic unter Verwendung der RNA-Suspension durchgeführt. Für die Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient mit dem Zielbereich A260/A280 = 1,8 – 2,0 verwendet [164]. Blau hinterlegte Felder zeigen den Quotienten A260/A280 außerhalb des Zielbereichs 1,8 – 2,0. Die freundlicherweise durch einen Kooperationspartner, den Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock, zur Verfügung gestellten Zelllinien mit der Markierung * erhielten keine ergänzende Messung zur fotometrischen Bestimmung der Nukleinsäure-Quantifizierung, da für die folgende cDNA-Synthese benötigte Informationen der RNA-Masse bereitgestellt wurden. Die geringe Menge an Probenmaterial ermöglichte nicht in allen Fällen eine Bestimmung der Daten mit beiden Geräten. Die Konzentration der entsprechenden RNA-Suspension wurde für die Bestimmung der RNA-Masse für die anschließende cDNA-Synthese genutzt.

6.12.6. Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der humanen Zelllinien

Proben-ID	Gewebetyp	Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>HPRT1</i>)					Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>TBP</i>)				
		<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>	<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>
HROG02	Tumor	0,0204	0,0353	0	0,638	0,000114	0,092	0,159	0	2,89	0,000516
HROG04	Tumor-Rezidiv	2,55	0,48	0,000252	3,24	0,000711	3,77	0,71	0,00037	4,8	0,00105

Proben-ID	Gewebetyp	Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>HPRT1</i>)					Mittelwerte der relativen Expression (Referenzgen <i>TBP</i>)				
		<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>	<i>PRG1</i>	<i>PRG2</i>	<i>PRG3</i>	<i>PRG4</i>	<i>PRG5</i>
HROG05	Tumor-Rezidiv	0,168	0,246	0	1,3	0,000368	0,157	0,23	0	1,22	0,000341
HROG06	Tumor	4,24	0,00704	0,089	1,47	0,54	2,04	0,00338	0,0429	0,712	0,259
HROG07	Tumor-Rezidiv	0,336	0,0102	0,00589	2,18	0	0,365	0,0111	0,00638	2,36	0
HROG10	Tumor	0,712	0,0802	0,00134	1,47	0,0269	0,683	0,077	0,00129	1,41	0,0258
HROG13	Tumor	0,212	0,124	0,000548	1,21	0,00367	0,265	0,155	0,000683	1,52	0,00459
HROG15	Tumor	0,0155	0,125	0	0,556	0	0,0293	0,236	0	1,06	0
HROG17	Tumor-Rezidiv	0,0369	0,223	0,000184	0,556	0,000307	0,0869	0,524	0,000429	1,3	0,000717
HROG24	Tumor	0,626	0,0078	0	0,72	0,00404	0,702	0,00875	0	0,807	0,00453
HROG36	Tumor	0,0642	0,00354	0,000232	0,172	0,00139	0,117	0,00646	0,000424	0,313	0,00255
HROG38	Tumor	0,224	0,013	0,000225	1,77	0,239	0,197	0,0114	0,000203	1,56	0,21
HROG41	Tumor	0,385	0,0279	0	2,72	0	0,452	0,0327	0	3,2	0
HROG59	Tumor-Rezidiv	0,15	0,023	0	2,21	0	0,181	0,0276	0	2,66	0
HROG06 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	Tumor	8,68	0,00032	0,00434	2,28	0,895	3,1	0,00011	0,00155	0,815	0,32
HROG06 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	Tumor	8,74	0	0,0113	2,55	1,02	3,38	0	0,00438	0,989	0,394
HROG06 Konfluenz 50 %, ohne FCS	Tumor	7,65	0	0,00461	2,85	1,33	2,74	0	0,00165	1,02	0,475
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	Tumor	0,007	0,409	0	1,75	0	0,0061	0,354	0	1,52	0
HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	Tumor	0,0057	0,0835	0	1,42	0	0,0063	0,0921	0	1,57	0
HROG15 Konfluenz 50 %, ohne FCS	Tumor	0,0122	0,17	0	3,04	0	0,0071	0,0996	0	1,78	0

Tabelle 33: Darstellung der Mittelwerte der relativen PRG-Expression der HROG-Zelllinien.

Bei den blau hinterlegten Feldern wurde für den Mittelwert der relativen Expression der Wert "0" ausgewählt. Die gelb hinterlegten Felder weisen Mittelwerte für die relative Expression auf, bei denen die ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen > 0,5 Zyklen ist. Eine genaue Erläuterung dafür findet sich in „Tabelle 34“.

6.12.7. Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen PRG-Expression mit Darstellung der einzelnen C_T-Werte humaner Zelllinien

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
HROG02	PRG3	HPRT1	36,01222*	36,894695*	0,882475	21,692965	21,512495	0,18047	0,0000362
HROG02	PRG3	TBP	36,01222*	36,894695*	0,882475	23,787382	23,766672	0,02071	0,00016
HROG04	PRG3	HPRT1	35,67536*	35,06966*	0,6057	23,361578	23,401073	0,039495	0,000252
HROG04	PRG3	TBP	35,67536*	35,06966*	0,6057	23,95851	23,9285	0,03001	0,00037
HROG05	PRG3	HPRT1	43,1719060*	37,0994000*	6,072506	23,386175	23,51681	0,130635	0,0000413
HROG05	PRG3	TBP	43,1719060*	37,0994000*	6,072506	23,495058	23,209137	0,285921	0,0000335

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			2. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
HROG02	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	22,95195	23,015373	0,063423	n.z.
HROG02	PRG3	TBP	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,95901	24,926739	0,032271	n.z.
HROG04	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	27,53247	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	n.z.
HROG04	PRG3	TBP	Unbestimmt	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	28,380783	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	n.z.
HROG05	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	24,916862	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	n.z.
HROG05	PRG3	TBP	Unbestimmt	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	24,567064	Nicht genügend Material für Doppelbestimmung	n.z.	n.z.

Appendix

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
HROG07	PRG5	HPRT1	Unbestimmt	38,947586	n.z.	24,762114	24,560432	0,201682	n.z.
HROG07	PRG5	TBP	Unbestimmt	38,947586	n.z.	24,772623	24,79562	0,022997	n.z.
HROG15	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	23,018305	23,151894	0,133589	n.z.
HROG15	PRG3	TBP	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,046112	23,965216	0,080896	n.z.
HROG15	PRG5	HPRT1	38,398052*	40,725586*	2,327534	23,018305	23,151894	0,133589	0,0000143
HROG15	PRG5	TBP	38,398052*	40,725586*	2,327534	24,046112	23,965216	0,080896	0,0000284
HROG17	PRG5	HPRT1	35,22717*	34,646427	0,580743	23,260601	23,22492	0,035681	0,000307
HROG17	PRG5	TBP	35,22717*	34,646427	0,580743	24,542616	24,404016	0,1386	0,000717

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
HROG24	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	39,0900800*	n.z.	23,013086	22,981203	0,031883	n.z.
HROG24	PRG3	TBP	Unbestimmt	39,0900800*	n.z.	23,156395	23,172514	0,016119	n.z.
HROG41	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	37,9792200*	n.z.	24,421633	24,443867	0,022234	n.z.
HROG41	PRG3	TBP	Unbestimmt	37,9792200*	n.z.	24,670572	24,659378	0,011194	n.z.
HROG41	PRG5	HPRT1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,421633	24,443867	0,022234	n.z.
HROG41	PRG5	TBP	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,670572	24,659378	0,011194	n.z.
HROG59	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	25,251501	25,242641	0,00886	n.z.
HROG59	PRG3	TBP	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	25,53854	25,492794	0,045746	n.z.
HROG59	PRG5	HPRT1	42,5606580*	41,0882300*	1,472428	25,251501	25,242641	0,00886	0,0000116
HROG59	PRG5	TBP	42,5606580*	41,0882300*	1,472428	25,53854	25,492794	0,045746	0,0000139

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
HROG06 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	PRG2	HPRT1	38,802666*	37,844315*	0,958351	25,89141	26,135992	0,244582	0,000214
HROG06 Konfluenz	PRG2	TBP	38,802666*	37,844315*	0,958351	24,656883	24,640507	0,016376	0,0000806

Appendix

Patienten-ID	PRG	Referenzen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
50 % + 10 % FCS									
HROG06 Konfluenz 50 %	PRG2	HPRT1	38,6750530*	39,9924740*	1,317421	26,82588	26,869165	0,043285	0,000192
HROG06 Konfluenz 50 %	PRG2	TBP	38,6750530*	39,9924740*	1,317421	25,379385	25,346039	0,033346	0,0000692
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	PRG3	HPRT1	40,7778900*	Unbestimmt	n.z.	25,525803	25,429033	0,09677	n.z.
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	PRG3	TBP	40,7778900*	Unbestimmt	n.z.	25,289724	25,254128	0,035596	n.z.
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	PRG5	HPRT1	39,819004*	37,8324700*	1,986534	25,525803	25,429033	0,09677	0,000117
HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS	PRG5	TBP	39,819004*	37,8324700*	1,986534	25,289724	25,254128	0,035596	0,000103
HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	40,7163540*	n.z.	25,421082	25,418888	0,002194	n.z.
HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	PRG3	TBP	Unbestimmt	40,7163540*	n.z.	25,587437	25,537142	0,050295	n.z.
HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS	PRG5	HPRT1	43,0695570*	41,6101040*	1,459453	25,421082	25,418888	0,002194	0,00000912
HROG15 Konfluenz	PRG5	TBP	43,0695570*	41,6101040*	1,459453	25,587437	25,537142	0,050295	0,00000998

Patienten-ID	PRG	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
50 % + 10 % FCS									
HROG15 Konfluenz 50 %	PRG3	HPRT1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	27,080849	27,113077	0,032228	n.z.
HROG15 Konfluenz 50 %	PRG3	TBP	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	26,360537	26,284443	0,076094	n.z.
HROG15 Konfluenz 50 %	PRG5	HPRT1	40,7541660*	39,9761050*	0,778061	27,080849	27,113077	0,032228	0,000105
HROG15 Konfluenz 50 %	PRG5	TBP	40,7541660*	39,9761050*	0,778061	26,360537	26,284443	0,076094	0,000061

Tabelle 34: Auflistung der C_T-Messwerte der HROG-Zelllinien.

Darstellung multipler Messungen zur Bestimmung der Mittelwerte der relativen PRG-Expression. Auflistung der einzelnen C_T-Werte der Proben-ID's sowie der entsprechenden Referenzgene für die Normalisierung. * = C_T-Wert der untersuchten Patienten > 35 Zyklen; C_T-Wert > 40 Zyklen werden *Kursiv* gekennzeichnet; **FETT** sofern ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen > 0,5. ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen (nachfolgend als ΔC_T bezeichnet).

Blau hinterlegte Felder zeigen ausgewählte Mittelwerte der relativen Genexpression einzelner Proben-ID's an:

- **Proben-ID HROG04/PRG3:** Die erste Messung weist eine erhöhte ΔC_T > 0,5 Zyklen auf. Beide C_T-Werte der Duplikatbestimmung > 35 Zyklen. Bei der zweiten Messung liegt nicht ausreichend Material für eine Doppelbestimmung vor. Die C_T-Werte der Proben-ID sind nicht ermittelbar. Es erfolgte die Auswahl der Messergebnisse der 1. Messung, da die C_T-Werte von HROG04 nur diskret über 35 Zyklen erhöht sind und die ΔC_T nur minimal erhöht ist.
- **Proben-ID HROG17/PRG5:** Die erste Messung weist eine erhöhte ΔC_T > 0,5 Zyklen auf. Ein C_T-Wert der Duplikatbestimmung > 35 Zyklen. Es liegt nicht genügend Material für eine erneute Messung vor. Es erfolgte die Auswahl der Messergebnisse der 1. Messung, da die C_T-Werte von HROG17 nur diskret über 35 Zyklen erhöht ist und die ΔC_T nur minimal erhöht ist.

Für die folgenden Proben-ID's gilt, dass der Wert "0" für den Mittelwert der relativen Genexpression ausgewählt wurde:

- **Proben-ID HROG2/PRG3:** ΔC_T deutlich > 0,5 Zyklen und C_T-Wert der Duplikate > 35 Zyklen bei der ersten Bestimmung. Bei der zweiten Messung lagen die Messwerte außerhalb des detektierbaren Bereichs. Es liegt nicht genügend Material für eine erneute Messung vor.
- **Proben-ID HROG05/ PRG3:** Bei der ersten Messung ΔC_T deutlich > 0,5 Zyklen und C_T-Werte der Duplikate > 35 Zyklen, teils > 40 Zyklen. Bei der zweiten Messung konnte aufgrund der geringen Materialmengen keine Doppelbestimmung durchgeführt werden. Der Einzelwert lag außerhalb des detektierbaren Bereichs.

Für die folgenden Proben-ID's gilt, dass der Wert "0" für den Mittelwert der relativen Genexpression ausgewählt wurde. Es lag nicht ausreichend Material für mehrfache Messungen vor und es wurde daher nur eine einzelne Messung durchgeführt:

- **Proben-ID HROG07/PRG5:** Der C_T-Wert der Duplikatbestimmung > 35 Zyklen oder im nicht detektierbaren Bereich. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
- **Proben-ID HROG15/PRG3:** Da die C_T-Werte der Duplikatbestimmung außerhalb des detektierbaren Bereichs lagen, konnte kein ΔC_T -Wert ermittelt werden.
- **Proben-ID HROG15/PRG5:** ΔC_T deutlich > 0,5 Zyklen. C_T-Werte der Duplikate immer > 35 Zyklen oder sogar > 40 Zyklen.
- **Proben-ID HROG24/PRG3:** Es konnte aufgrund erhöhter bzw. nicht detektierbarer C_T-Werte weder eine ΔC_T noch eine Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG41/PRG3:** Es konnte aufgrund erhöhter bzw. nicht detektierbarer C_T-Werte weder eine ΔC_T noch eine Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.

- **Proben-ID HROG41/PRG5:** Die C_T -Werte waren außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG59/PRG3:** Die C_T -Werte waren außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG59/PRG5:** ΔC_T lag deutlich $> 0,5$ Zyklen, bei C_T -Werten der Duplikatbestimmung > 40 Zyklen.
- **Proben-ID HROG06 Konfluenz 50 % + 10 % FCS/PRG2:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate immer > 35 Zyklen.
- **Proben-ID HROG06 Konfluenz 50 %/PRG2:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Wert der Duplikate immer > 35 Zyklen.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS/PRG3:** Es konnte aufgrund erhöhter bzw. nicht detektierbarer C_T -Werte weder eine ΔC_T noch eine Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 90 % + 10 % FCS/PRG5:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Wert der Duplikate immer > 35 Zyklen.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS/PRG3:** Es konnte aufgrund erhöhter bzw. nicht detektierbarer C_T -Werte weder eine ΔC_T noch eine Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 50 % + 10 % FCS/PRG5:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Wert der Duplikate immer > 40 Zyklen.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 50 %/PRG3:** Die C_T -Werte lagen nicht im detektierbaren Bereich. Daher konnte weder eine ΔC_T noch eine Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID HROG15 Konfluenz 50 %/PRG5:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Wert der Duplikate immer > 35 Zyklen, teils > 40 Zyklen.

6.12.8. Durchschnittliche relative PRG-Expression der einzelnen Gruppen der Abbildungen der humanen Zelllinien

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf HPRT1)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb. 15, A und B	methylierter MGMT-Promoter	un-methylierter MGMT-Promoter	0,1396 $\pm$ 0,05956	1,113 $\pm$ 0,5289	0,1302 $\pm$ 0,03722	0,0781 $\pm$ 0,05809	0,000122 $\pm$ 0,00009034	0,01212 $\pm$ 0,01101	1,163 $\pm$ 0,3395	1,654 $\pm$ 0,3341	0,0007432 $\pm$ 0,0005887	0,08166 $\pm$ 0,05606
Abb. 20, A und B	Glioblastom	Rezidiv-Glioblastom	0,7643 $\pm$ 0,5054	0,6482 $\pm$ 0,4778	0,04949 $\pm$ 0,01860	0,1964 $\pm$ 0,08612	0,01142 $\pm$ 0,01108	0,001265 $\pm$ 0,001157	1,001 $\pm$ 0,1969	1,897 $\pm$ 0,4548	0,1019 $\pm$ 0,06898	0,0002772 $\pm$ 0,0001325

Abbildung	Gruppe 1	Gruppe 2	Durchschnittliche relative PRG-Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf TBP)									
			PRG1		PRG2		PRG3		PRG4		PRG5	
			Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2
Abb. 15, A und B	methylierter MGMT-Promoter	un-methylierter MGMT-Promoter	0,1804 $\pm$ 0,06347	1,007 $\pm$ 0,06347	0,2228 $\pm$ 0,06727	0,107 $\pm$ 0,08657	0,0001853 $\pm$ 0,0001217	0,006446 $\pm$ 0,005262	1,865 $\pm$ 0,3801	1,828 $\pm$ 0,5113	0,001027 $\pm$ 0,0007219	0,06287 $\pm$ 0,03786
Abb. 20, A und B	Glio-blastom	Rezidiv-Glioblastom	0,5157 $\pm$ 0,2363	0,912 $\pm$ 0,7160	0,08212 $\pm$ 0,03197	0,3005 $\pm$ 0,1380	0,005688 $\pm$ 0,005318	0,001436 $\pm$ 0,001239	1,284 $\pm$ 0,2763	2,468 $\pm$ 0,2763	0,06337 $\pm$ 0,03774	0,0004216 $\pm$ 0,0002054

Appendix

Abb. 17 A bis J		Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf HPRT1)					Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf TBP)				
Gruppe		PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5	PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5
Gruppe 1	HROG: mit PRG3, mit PRG5	1,148 ± 0,6144	0,133 ± 0,06517	0,01311 ± 0,01265	1,413 ± 0,3712	0,116 ± 0,07796	1,023 ± 0,5267	0,2125 ± 0,1083	0,006614 ± 0,006049	1,659 ± 0,5519	0,07196 ± 0,04243
Gruppe 2	HROG: mit PRG3, ohne PRG5	0,336	0,0102	0,00589	2,18	0	0,365	0,0111	0,00638	2,36	0
Gruppe 3	HROG: ohne PRG3, ohne PRG5	0,1835 ± 0,1080	0,05863 ± 0,03321	0	1,829 ± 0,6531	0	0,2208 ± 0,1236	0,09877 ± 0,06863	0	2,307 ± 0,6425	0
Gruppe 4	HROG: ohne PRG3, mit PRG5	0,2715 ± 0,1823	0,09637 ± 0,07524	0	0,886 ± 0,2083	0,001507 ± 0,001268	0,317 ± 0,1934	0,1326 ± 0,06522	0	1,639 ± 0,6368	0,001796 ± 0,001368

Abb. 18, A bis D		Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf HPRT1)					Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf TBP)				
Gruppe		PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5	PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5
Gruppe 1	HROG06 90 %	Da die n-Zahl jeweils 1 ist, entspricht die durchschnittliche relative PRG-Expression dem Mittelwert der relativen Expression der jeweiligen Proben-ID. Hierdurch ergibt sich ein SEM-Wert von Null.									
Gruppe 2	HROG06 50 % mit FCS										
Gruppe 3	HROG06 50 % ohne FCS										
Gruppe 4	HROG15 90 %										
Gruppe 5	HROG15 50 % mit FCS										
Gruppe 6	HROG15 50 % ohne FCS										

Abb. 32, A bis J		Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf HPRT1)					Durchschnittliche relative PRG-Expression ± SEM (Normalisierung auf TBP)				
Gruppe		PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5	PRG1	PRG2	PRG3	PRG4	PRG5
Gruppe 1	P3	0,385	0,0279	0	2,72	0	0,452	0,0327	0	3,2	0
Gruppe 2	P5	0,3451 ± 0,2809	0,00567 ± 0,002130	0,000116 ± 0,0001160	0,446 ± 0,2740	0,002715 ± 0,001325	0,4095 ± 0,2925	0,007605 ± 0,001145	0,000212 ± 0,0002120	0,56 ± 0,2470	0,00354 ± 0,0009900
Gruppe 3	P6	0,224	0,013	0,000225	1,77	0,239	0,197	0,0114	0,000203	1,56	0,21
Gruppe 4	P8	0,15	0,023	0	2,21	0	0,181	0,0276	0	2,66	0
Gruppe 5	P9	0,524 ± 0,1880	0,0452 ± 0,03500	0,003615 ± 0,002275	1,825 ± 0,3550	0,01345 ± 0,01345	0,524 ± 0,1590	0,04405 ± 0,03295	0,003835 ± 0,002545	1,885 ± 0,4750	0,0129 ± 0,01290
Gruppe 6	P10	1,496 ± 1,373	0,118 ± 0,06241	0,02991 ± 0,02954	1,079 ± 0,2719	0,1813 ± 0,1793	0,7973 ± 0,6235	0,2275 ± 0,1546	0,01467 ± 0,01411	1,177 ± 0,2412	0,0881 ± 0,08546
Gruppe 7	P11	0,168	0,246	0	1,3	0,000368	0,157	0,23	0	1,22	0,000341
Gruppe 8	P12	0,0155	0,125	0	0,556	0	0,0293	0,236	0	1,06	0
Gruppe 9	P14	2,55	0,48	0,000252	3,24	0,000711	3,77	0,71	0,00037	4,8	0,00105
Gruppe 10	P30	0,0204	0,0353	0	0,638	0,000114	0,092	0,159	0	2,89	0,000516

Tabelle 35: Durchschnittliche relative mRNA-Expression der HROG-Zelllinien der einzelnen Abbildungen.

Darstellung der durchschnittlichen relativen PRG-Expression $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM, Standard Error of the Mean) in Bezug zu dem Referenzgen für die einzelnen HROG-Patientengruppen der jeweiligen grafischen Darstellung.

6.12.9. Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der F98-Gliomzellen und Gewebe der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells

Proben-ID	Gewebetyp	Eppendorf BioSpectrometer® basic	
		A260/A280	Konzentration in µg/ml
gDNA Ratte	Hirngewebe	2,08	88,54
ZK F98-Probe	Zellkultur	-	837,9
unbehandelte Wistar-Ratte	Wildtyp-Hirngewebe	-	1055,4
ZK 631-2	Zellkultur	2,08	1088,2
631-2 ipsilateral	Tumor	2,07	712,7
631-2 kontralateral	Hirngewebe	2,11	511,7
ZK 631-5	Zellkultur	2,09	869,1
631-5 ipsilateral	Tumor	2,11	1077
631-5 kontralateral	Hirngewebe	2,09	731,3
ZK 632-1	Zellkultur	2,09	1189,7
632-1 ipsilateral	Tumor	2,09	1158,8
632-1 kontralateral	Hirngewebe	1,99	880,8
632-2 ipsilateral	Tumor	2,07	1125,2
ZK 632-6	Zellkultur	2,06	1143,1
632-6 ipsilateral	Tumor	2,1	1168
632-6 kontralateral	Hirngewebe	2,01	674,4
ZK 639-1	Zellkultur	1,98	1151,4
639-1 ipsilateral	Tumor	2,02	1190
639-1 kontralateral	Hirngewebe	2,0	835,9
639-2 ipsilateral	Tumor	1,94	958,3
639-2 kontralateral	Hirngewebe	1,92	929,4
ZK F98-02	Zellkultur	2,0	1145,7
ZK F98-03	Zellkultur	2,02	1027,2
638-12 ipsilateral	Sham-Hirngewebe	1,92	537,3
638-12 kontralateral	Sham-Hirngewebe	1,98	669,4
638-11 ipsilateral	Sham-Hirngewebe	1,99	922,6
638-11 kontralateral	Sham-Hirngewebe	2,0	1116,5

Tabelle 36: Fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration zur Nukleinsäure-Quantifizierung der RNA der F98-Gliomzellen und des Gewebes der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells.

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde zur Nukleinsäure-Quantifizierung die fotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Proben anhand der Absorption im UV-Bereich bei 260 und 280 nm [164] mit dem Eppendorf BioSpectrometer® basic unter Verwendung der RNA-Suspension durchgeführt. Für die Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient mit dem Zielbereich A260/A280 = 1,8 – 2,0 verwendet [164]. Blau hinterlegte Felder zeigen den Quotienten A260/A280 außerhalb des Zielbereichs 1,8 – 2,0. Für

die ZKF98-Probe und die unbehandelte Wistar-Ratte wurde der Quotient A260/A280 nicht bestimmt. Die Konzentration der entsprechenden RNA-Suspension wurde für die Bestimmung der RNA-Masse für die anschließende cDNA-Synthese verwendet.

6.12.10. Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse der F98-Gliomzellen und des Gewebes der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells

Proben-ID	Gewebetyp	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf <i>Hprt1</i>)						Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf <i>Gapdh</i>)					
		<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Prg3</i> 2. Primer	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>	<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Prg3</i> 2. Primer	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>
unbehandelte Wistar-Ratte	Wildtyp-Hirngewebe	3,46	1,05	1,16	0,73	9,83	0,912	0,101	0,0306	0,0338	0,0202	0,285	0,0265
ZK F98-Probe	Zellkultur	0,00823	0,137	0,0023	0,0012	1,28	0,00589	0,000033	0,000571	9,46E-06	6,08E-06	0,00533	0,0000243
ZK 631-2	Zellkultur	0	0,196	0	0,0304	1,3	0	0	0,000751	0	0,000123	0,00495	0
631-2 ipsilateral	Tumor	0,0103	0,451	0	0,0361	1,12	0,00479	0,0000275	0,0012	0	0,000111	0,00299	0,0000128
631-2 kontralateral	Hirngewebe	2,01	0,193	0	0,0627	5,1	0,248	0,0423	0,00409	0	0,00199	0,108	0,00523
ZK 631-5	Zellkultur	0,00077	0,178	0	0,05	1,01	0,0002	6,21E-06	0,00142	0	0,000319	0,00807	1,55E-06
631-5 ipsilateral	Tumor	0,0468	0,372	0	0,0337	1,08	0,0191	0,000142	0,00114	0	0,000113	0,00329	0,0000586
631-5 kontralateral	Hirngewebe	2,71	0,236	0	0,0897	6,33	0,272	0,0644	0,00564	0	0,00237	0,153	0,00648
ZK 632-1	Zellkultur	0	0,223	0	0,0401	0,854	0	0	0,00173	0	0,000223	0,00663	0
632-1 ipsilateral	Tumor	0,00656	0,232	0	0,0368	0,499	0,0148	0,0000253	0,000892	0	0,000121	0,00192	0,0000569
632-1 kontralateral	Hirngewebe	1,47	0,162	0	0,0741	2,38	0,233	0,047	0,00517	0	0,00247	0,0759	0,00747
632-2 ipsilateral	Tumor	0,00504	0,288	0	0,0546	0,536	0,00977	0,0000185	0,00106	0	0,000141	0,00196	0,0000358
ZK 632-6	Zellkultur	0	0,0399	0	0,0285	0,385	0	0	0,000164	0	8,83E-05	0,00158	0
632-6 ipsilateral	Tumor	0,0202	0,288	0	0,0532	0,669	0,0262	0,00007	0,000998	0	0,00015	0,00231	0,000091
632-6 kontralateral	Hirngewebe	1,2	0,156	0	0,0878	2,71	0,256	0,0329	0,00429	0	0,002	0,0746	0,00704
ZK 639-1	Zellkultur	0,00033	0,147	0	0	0,811	0,0002	2,29E-06	0,00104	0	0	0,00586	1,38E-06

Proben-ID	Gewe-betyp	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf <i>Hprt1</i>)						Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf <i>Gapdh</i>)					
		<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Prg3</i> 2. Primer	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>	<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Prg3</i> 2. Primer	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>
639-1 ipsilateral	Tumor	0,0519	0,302	0	0,0129	0,972	0,0469	0,000232	0,00136	0	4,05E-05	0,00436	0,00021
639-1 kontra-lateral	Hirn-gewebe	2,32	0,326	0	0,0866	5,81	0,68	0,0594	0,00835	0	0,00223	0,149	0,0174
639-2 ipsilateral	Tumor	0,0351	0,287	0	0,0101	0,907	0,0703	0,000154	0,00126	0	4,28E-05	0,00399	0,000309
639-2 kontra-lateral	Hirn-gewebe	1,63	0,436	0	0,065	5,41	0,521	0,039	0,0104	0	0,00218	0,129	0,0124
ZK F98-02	Zellkultur	0,00093	0,371	0	0	1,54	0,00026	6,64E-06	0,00266	0	0	0,011	1,81E-06
ZK F98-03	Zellkultur	2,6E-05	0,0622	0	0	1,49	0	2,47E-07	0,000601	0	0	0,0144	0
638-12 ipsilateral	Sham-Hirn-gewebe	1,79	0,26	0	0,0703	5,05	0,524	0,0468	0,00679	0	0,00205	0,132	0,0122
638-12 kontra-lateral	Sham-Hirn-gewebe	1,63	0,239	0	0,0717	4,43	0,356	0,052	0,00764	0	0,00212	0,142	0,0115
638-11 ipsi-lateral	Sham-Hirn-gewebe	1,81	0,358	0	0,18	5,77	0,493	0,0492	0,00971	0	0,00546	0,159	0,0134
638-11 kontra-lateral	Sham-Hirn-gewebe	2,38	0,346	0	0,0764	5,04	0,43	0,0745	0,0108	0	0,00255	0,158	0,0108

Tabelle 37: Daten der relativen *Prg*-Expression der entsprechenden Proben-ID im Fischer-F98-Gliom-Modell.

Bei den blau hinterlegten Feldern wurde für den Mittelwert der relativen Expression der Wert "0" ausgewählt. Die gelb hinterlegten Felder weisen Mittelwerte für die relative Expression auf, bei denen die ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen $> 0,5$ Zyklen ist. Eine genaue Erläuterung dafür findet sich in „Tabelle 38“.

6.12.11. Erläuterung der Auswahl spezieller Mittelwerte der relativen *Prg*-Expression mit Darstellung der einzelnen C_T -Werte der F98-Gliomzellen und der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells

Patienten-ID	<i>Prg</i>	Referenzgen	C_T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C_T -Wert	2. C_T -Wert	ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C_T -Wert Referenzgen	2. C_T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK F98-Probe	<i>Prg1</i>	<i>Hprt1</i>	29,535961	28,865622	0,670339	22,250046	22,228436	0,02161	0,00823

Appendix

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK F98-Probe	Prg1	Gapdh	29,535961	28,865622	0,670339	14,491805	14,123295	0,36851	0,000033
ZK 631-2	Prg1	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	21,445814	21,544943	0,099129	n.z.
ZK 631-2	Prg1	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	13,571803	13,3431835	0,2286195	n.z.
ZK 631-2	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	21,445814	21,544943	0,099129	n.z.
ZK 631-2	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	13,571803	13,3431835	0,2286195	n.z.
631-2 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	39,209686*	44,2968000*	5,087114	20,366894	20,643055	0,276161	0,0000011
631-2 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	39,209686*	44,2968000*	5,087114	15,001501	14,895186	0,106315	2,65E-08
ZK 631-5	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,347519	24,488945	0,141426	n.z.
ZK 631-5	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	17,4633	17,437891	0,025409	n.z.
631-5 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	21,694883	21,936207	0,241324	n.z.
631-5 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	13,465137	13,458489	0,006648	n.z.
631-5 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	20,500483	20,381138	0,119345	n.z.
631-5 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	14,875174	15,223258	0,348084	n.z.
ZK 632-1	Prg1	Hprt1	43,774605*	38,226303*	5,548302	23,7196	23,761421	0,041821	0,0000226
ZK 632-1	Prg1	Gapdh	43,774605*	38,226303*	5,548302	16,776175	16,687996	0,088179	0,000000168
ZK 632-1	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	23,7196	23,761421	0,041821	n.z.
ZK 632-1	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	16,776175	16,687996	0,088179	n.z.
ZK 632-1	Prg5	Hprt1	38,402744*	39,117565*	0,714821	23,7196	23,761421	0,041821	0,0000309
ZK 632-1	Prg5	Gapdh	38,402744*	39,117565*	0,714821	16,776175	16,687996	0,088179	0,000000243
632-1 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,041199	23,92448	0,116719	n.z.
632-1 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,949879	15,975587	0,025708	n.z.

Appendix

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
632-1 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	22,695913	22,534225	0,161688	n.z.
632-1 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	17,638582	17,662926	0,024344	n.z.
632-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,06161	24,106546	0,044936	n.z.
632-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,995654	15,990054	0,0056	n.z.
ZK 632-6	Prg1	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	23,198643	23,1114	0,087243	n.z.
ZK 632-6	Prg1	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,239374	15,210314	0,02906	n.z.
ZK 632-6	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	23,198643	23,1114	0,087243	n.z.
ZK 632-6	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,239374	15,210314	0,02906	n.z.
ZK 632-6	Prg5	Hprt1	39,307354*	38,086613*	1,220741	23,198643	23,1114	0,087243	0,0000226
ZK 632-6	Prg5	Gapdh	39,307354*	38,086613*	1,220741	15,239374	15,210314	0,02906	9,34E-08
632-6 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,163807	24,059525	0,104282	n.z.
632-6 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,92574	15,951436	0,025969	n.z.
632-6 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	40,4523300*	43,8206560*	3,36832	22,683292	22,703537	0,020245	0,00000246
632-6 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	40,4523300*	43,8206560*	3,36832	17,536966	17,484308	0,052658	6,91E-08
ZK 639-1	Prg3 2. Primer	Hprt1	39,2008300*	40,3281300*	1,1273	25,987913	25,906757	0,081156	0,0000754
ZK 639-1	Prg3 2. Primer	Gapdh	39,2008300*	40,3281300*	1,1273	18,999027	18,592537	0,40649	0,000000558
639-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,092701	24,102348	0,009647	n.z.
639-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	16,230392	16,306705	0,076313	n.z.
639-2 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	43,4600070*	Unbestimmt	n.z.	23,569304	23,629	0,059696	n.z.
639-2 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	43,4600070*	Unbestimmt	n.z.	18,208279	18,212791	0,004512	n.z.
ZK F98-02	Prg3	Hprt1	42,50034*	Unbestimmt	n.z.	23,181257	23,273933	0,092676	n.z.

Appendix

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
	1. Primer								
ZK F98-02	Prg3 1. Primer	Gapdh	42,50034*	Unbestimmt	n.z.	16,203682	15,9880085	0,2156735	n.z.
ZK F98-02	Prg3 2. Primer	Hprt1	43,8030170*	42,5934640*	1,209553	27,033	27,153088	0,12088	0,0000157
ZK F98-02	Prg3 2. Primer	Gapdh	43,8030170*	42,5934640*	1,209553	19,821068	19,983953	0,162885	0,000000108
ZK F98-03	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	23,242723	23,448452	0,205729	n.z.
ZK F98-03	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	16,71277	16,595726	0,117044	n.z.
ZK F98-03	Prg3 2. Primer	Hprt1	44,1415750*	Unbestimmt	n.z.	26,02341	26,10372	0,08031	n.z.
ZK F98-03	Prg3 2. Primer	Gapdh	44,1415750*	Unbestimmt	n.z.	19,530315	19,551743	0,021428	n.z.
638-12 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	22,39941	22,181568	0,217842	n.z.
638-12 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	17,077337	16,994877	0,08246	n.z.
638-12 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	21,82369	21,826283	0,002593	n.z.
638-12 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	16,94778	16,756088	0,191692	n.z.
638-11 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	41,9323540*	44,2851220*	2,352768	23,46771	23,200438	0,267272	0,00000161
638-11 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	41,9323540*	44,2851220*	2,352768	18,102467	18,170658	0,068191	4,04E-08
638-11 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	42,737286*	n.z.	22,144602	22,168516	0,023914	n.z.
638-11 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	42,737286*	n.z.	17,192207	17,128677	0,06353	n.z.

Appendix

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			1. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK 631-2	Prg5	Hprt1	Unbestimmt	36,7048450*	n.z.	21,445814	21,544943	0,099129	n.z.
ZK 631-2	Prg5	Gapdh	Unbestimmt	36,7048450*	n.z.	13,571803	13,3431835	0,2286195	n.z.
631-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	37,097343*	n.z.	21,813982	21,96907	0,155088	n.z.
631-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	37,097343*	n.z.	13,292839	13,391516	0,098677	n.z.
ZK 639-1	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	22,81266	23,9485	1,13584	n.z.
ZK 639-1	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	15,944441	15,948194	0,003753	n.z.
639-1 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	24,254961	24,453787	0,198826	n.z.
639-1 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	16,548155	16,565443	0,017288	n.z.
639-1 kontralateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	22,728691	23,461082	0,732391	n.z.
639-1 kontralateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	17,141275	16,773191	0,368084	n.z.
ZK F98-02	Prg5	Hprt1	35,342697*	35,005795*	0,336902	23,181257	23,273933	0,092676	0,000256
ZK F98-02	Prg5	Gapdh	35,342697*	35,005795*	0,336902	16,203682	15,9880085	0,2156735	0,00000181
ZK F98-03	Prg5	Hprt1	38,381344*	35,5865330*	2,794811	23,242723	23,448452	0,205729	0,000125
ZK F98-03	Prg5	Gapdh	38,381344*	35,5865330*	2,794811	16,71277	16,595726	0,117044	0,00000111

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			2. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	Referenzgen ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK 631-2	Prg5	Hprt1	40,02426*	38,7821850*	1,242075	23,434526	23,453775	0,019249	0,0000172
ZK 631-2	Prg5	Gapdh	40,02426*	38,7821850*	1,242075	15,912907	15,794247	0,11866	8,77E-08
631-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	41,577496*	n.z.	24,122545	24,229385	0,10684	n.z.
631-2 ipsilateral	Prg3 1. Primer	Gapdh	Unbestimmt	41,577496*	n.z.	15,793321	15,863664	0,070343	n.z.
ZK 639-1	Prg3 1. Primer	Hprt1	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	25,987913	25,906757	0,081156	n.z.

Appendix

ZK 639-1	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Gapdh</i>	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	18,999027	18,592537	0,40649	n.z.
639-1 ipsilateral	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Hprt1</i>	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	26,811008	26,904667	0,093659	n.z.
639-1 ipsilateral	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Gapdh</i>	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	19,007763	18,963394	0,044369	n.z.
639-1 kontralateral	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Hprt1</i>	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	25,009586	25,182648	0,173062	n.z.
639-1 kontralateral	<i>Prg3</i> 1. Primer	<i>Gapdh</i>	Unbestimmt	Unbestimmt	n.z.	19,860521	19,762127	0,098394	n.z.
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Hprt1</i>	38,013004*	40,646923*	2,633919	27,033	27,153088	0,12088	0,000291
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Gapdh</i>	38,013004*	40,646923*	2,633919	19,821068	19,983953	0,162885	0,00000197
ZK F98-03	<i>Prg5</i>	<i>Hprt1</i>	Unbestimmt	36,6778800*	n.z.	26,02341	26,10372	0,08031	n.z.
ZK F98-03	<i>Prg5</i>	<i>Gapdh</i>	Unbestimmt	36,6778800*	n.z.	19,530315	19,551743	0,021428	n.z.

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			3. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	HKG ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Hprt1</i>	35,61079*	36,3547330*	0,743943	24,026321	24,122475	0,096154	0,000267
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Gapdh</i>	35,61079*	36,3547330*	0,743943	17,091988	17,129108	0,03712	0,00000215
ZK F98-03	<i>Prg5</i>	<i>Hprt1</i>	38,3858000*	39,0487500*	0,66295	23,113375	23,22558	0,112205	0,0000213
ZK F98-03	<i>Prg5</i>	<i>Gapdh</i>	38,3858000*	39,0487500*	0,66295	16,604565	16,688261	0,083696	0,000000232

Patienten-ID	Prg	Referenzgen	C _T -Werte der Doppelbestimmung [Zyklen]						
			4. Messung						
			1. C _T -Wert	2. C _T -Wert	ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	1. C _T -Wert Referenzgen	2. C _T -Wert Referenzgen	HKG ΔC _T – Differenz der Doppelbestimmungen	Mittelwerte der relativen Expression (Normalisierung auf Referenzgen)
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Hprt1</i>	38,878376*	38,0015500*	0,876826	25,90181	25,856586	0,045224	0,000172
ZK F98-02	<i>Prg5</i>	<i>Gapdh</i>	38,878376*	38,0015500*	0,876826	18,452768	18,41031	0,042458	0,000000988

Tabelle 38: Ermittelte C_T-Werte im Fischer-F98-Gliom-Modell.

Darstellung multipler Messungen zur Bestimmung der Mittelwerte der relativen *Prg*-Expression. Auflistung der einzelnen C_T-Werte der Proben-ID's sowie der entsprechenden Referenzgene für die Normalisierung. * = C_T-Wert der untersuchten Proben > 35 Zyklen; C_T -Werte > 40 Zyklen wird *Kursiv* gekennzeichnet; **FETT** sofern ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen > 0,5. ΔC_T – Differenz der Doppelbestimmungen (nachfolgend als ΔC_T bezeichnet).

Blau hinterlegte Felder zeigen ausgewählte Mittelwerte der relativen Genexpression einzelner Proben-ID's an:

- **Proben-ID ZK F98-Probe/Prg1:** Die erste Messung weist eine erhöhte ΔC_T > 0,5 Zyklen auf. Beide C_T-Werte der Duplikatbestimmung sind geringer als 35 Zyklen. Bei der zweiten Messung liegt nicht ausreichend Material für eine Doppelbestimmung vor. Die ΔC_T-Werte der Proben-ID sind nicht ermittelbar. Es erfolgte die Auswahl der Messergebnisse der 1. Messung, da die C_T-Werte nur eine diskret erhöhte ΔC_T aufzeigen.

- **Probe ZK F98-02/Prg5:** Bei der ersten Messung wurden C_T -Werte > 35 Zyklen gemessen. Diese Messung wurde ausgewählt, da $\Delta C_T < 0,5$ Zyklen vorlag und bei den zwei weiteren Messungen die $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen bei gleichzeitig deutlich erhöhten C_T -Werten lagen.
- Für die folgenden Proben-ID's gilt, dass der Wert "0" für den Mittelwert der relativen Genexpression ausgewählt wurde. Es lag nicht ausreichend Material für mehrfache Bestimmungen vor:
- **Proben-ID ZK 631-2/Prg1:** Der C_T -Wert der Duplikatbestimmung ist nicht im detektierbaren Bereich. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID ZK 631-2/Prg3. 1.Primer:** Der C_T -Wert der Duplikatbestimmung ist nicht im detektierbaren Bereich. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID ZK 631-2/Prg5:** Der eine C_T -Wert der Duplikatbestimmung ist nicht im detektierbaren Bereich, der andere C_T -Wert ist > 35 Zyklen. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID 631-2 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Jeweils ein C_T -Wert der beiden Duplikatbestimmungen ist nicht im detektierbaren Bereich, der andere C_T -Wert ist > 35 oder sogar > 40 Zyklen. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID 631-2 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** ΔC_T deutlich $> 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate immer > 35 Zyklen oder sogar > 40 Zyklen.
 - **Proben-ID 631-5 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Der C_T -Wert der Duplikatbestimmung ist nicht im detektierbaren Bereich. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID 631-5 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Der C_T -Wert der Duplikatbestimmung ist nicht im detektierbaren Bereich. Eine ΔC_T konnte somit nicht ermittelt werden.
 - **Proben-ID ZK 632-1/Prg1:** ΔC_T deutlich $> 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate immer > 35 Zyklen oder sogar > 40 Zyklen.
 - **Proben-ID ZK 632-1/Prg3:** 1.Primer: Die C_T -Werte waren außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID ZK 632-1/Prg5:** ΔC_T deutlich $> 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate immer > 35 Zyklen.
 - **Proben-ID 632-1 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 632-1 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 632-2 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID ZK 632-6/Prg1:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID ZK 632-6/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID ZK 632-6/Prg5:** ΔC_T deutlich $> 0,5$ Zyklen. C_T -Wert der Duplikate immer > 35 Zyklen.
 - **Proben-ID 632-6 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 632-6 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate immer > 40 Zyklen.
 - **Proben-ID ZK 639-1/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches bei zwei Messungen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID ZK 639-1/Prg3. 2.Primer:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T -Werte der Duplikate waren > 35 Zyklen, teils > 40 Zyklen.
 - **Proben-ID 639-1 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches bei zwei Messungen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 639-1 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches bei zwei Messungen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 639-2 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
 - **Proben-ID 639-2 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T -Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches oder > 40 Zyklen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.

- **Proben-ID ZK F98-02/Prg3. 1.Primer:** Die C_T-Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches oder > 40 Zyklen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID ZK F98-02/Prg3. 2.Primer:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T-Werte der Duplikate immer > 40 Zyklen.
- **Proben-ID ZK F98-03/Prg3. 1.Primer:** Die C_T-Werte waren außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID ZK F98-03/Prg3. 2.Primer:** Die C_T-Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches oder > 40 Zyklen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID ZK F98-03/Prg5:** Bei der ersten und dritten Bestimmung waren die $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen, C_T-Werte der Duplikate > 35 Zyklen. Die C_T-Werte waren bei der zweiten Messung außerhalb des detektierbaren Bereiches oder > 35 Zyklen, somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID 638-12 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T-Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID 638-12 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T-Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.
- **Proben-ID 638-11 ipsilateral/Prg3. 1.Primer:** $\Delta C_T > 0,5$ Zyklen. C_T-Werte der Duplikate immer > 40 Zyklen.
- **Proben-ID 638-11 kontralateral/Prg3. 1.Primer:** Die C_T-Werte lagen außerhalb des detektierbaren Bereiches oder > 40 Zyklen. Somit konnte keine ΔC_T oder Normalisierung auf die Referenzgene berechnet werden.

6.12.12. Durchschnittliche relative *Prg*-Expression der einzelnen Gruppen der Abbildungen der F98-Gliomzellen und der Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells

Abb. 22, A bis B		Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Hprt1</i>)					Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Gapdh</i>)				
Gruppe		<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>	<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>
Gruppe 1	Fischer-F98-Gliom-Modell kontralateral	1,89 $\pm$ 0,2303	0,2515 $\pm$ 0,04486	0,07765 $\pm$ 0,004914	4,623 $\pm$ 0,6797	0,3683 $\pm$ 0,07641	0,0475 $\pm$ 0,004966	0,006323 $\pm$ 0,001027	0,002207 $\pm$ 0,00007894	0,1149 $\pm$ 0,01415	0,009337 $\pm$ 0,001899
Gruppe 2	Sham ipsilateral	1,8 $\pm$ 0,01000	0,309 $\pm$ 0,04900	0,1252 $\pm$ 0,05485	5,41 $\pm$ 0,3600	0,5085 $\pm$ 0,01550	0,048 $\pm$ 0,001200	0,00825 $\pm$ 0,001460	0,003755 $\pm$ 0,001705	0,1455 $\pm$ 0,01350	0,0128 $\pm$ 0,0006000
Gruppe 3	Sham kontralateral	2,005 $\pm$ 0,3750	0,2925 $\pm$ 0,05350	0,07405 $\pm$ 0,002350	4,735 $\pm$ 0,3050	0,393 $\pm$ 0,03700	0,06325 $\pm$ 0,01125	0,00922 $\pm$ 0,001580	0,002335 $\pm$ 0,0002150	0,15 $\pm$ 0,008000	0,01115 $\pm$ 0,0003500

Abb. 23, A bis J		Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Hprt1</i>)					Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Gapdh</i>)				
Gruppe		<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>	<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>
Gruppe 1	Fischer-F98-Gliom-Modell kontralateral	1,89 $\pm$ 0,2303	0,2515 $\pm$ 0,04486	0,07765 $\pm$ 0,004914	4,623 $\pm$ 0,6797	0,3683 $\pm$ 0,07641	0,0475 $\pm$ 0,004966	0,006323 $\pm$ 0,001027	0,002207 $\pm$ 0,00007894	0,1149 $\pm$ 0,01415	0,009337 $\pm$ 0,001899
Gruppe 2	Fischer-F98-Gliom-Modell ipsilateral	0,02513 $\pm$ 0,007365	0,3171 $\pm$ 0,02717	0,03391 $\pm$ 0,006586	0,8261 $\pm$ 0,09692	0,02741 $\pm$ 0,008826	0,00009561 $\pm$ 0,00003099	0,00113 $\pm$ 0,00006051	0,0001028 $\pm$ 0,00001667	0,002974 $\pm$ 0,0003662	0,0001106 $\pm$ 0,00004093
Gruppe 3	F98-Zelllinie	0,0002938 $\pm$ 0,0001519	0,1739 $\pm$ 0,04167	0,02129 $\pm$ 0,007977	1,056 $\pm$ 0,1570	0,00009286 $\pm$ 0,0000444	0,000002198 $\pm$ 0,000001135	0,001195 $\pm$ 0,0003132	0,0001076 $\pm$ 0,00004714	0,007499 $\pm$ 0,001582	0,0000006771 $\pm$ 0,0000003227

Abb. 33, A bis B		Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Hprt1</i>)					Durchschnittliche relative <i>Prg</i> -Expression $\pm$ SEM (Normalisierung auf <i>Gapdh</i>)				
Gruppe		<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>	<i>Prg1</i>	<i>Prg2</i>	<i>Prg3</i>	<i>Prg4</i>	<i>Prg5</i>
Gruppe 1	F98-Zelllinie	0,0002938 $\pm$ 0,0001519	0,1739 $\pm$ 0,04167	0,02129 $\pm$ 0,007977	1,056 $\pm$ 0,1570	0,00009286 $\pm$ 0,0000444	0,000002198 $\pm$ 0,000001135	0,001195 $\pm$ 0,0003132	0,0001076 $\pm$ 0,00004714	0,007499 $\pm$ 0,001582	0,0000006771 $\pm$ 0,0000003227
Gruppe 2	Fischer-F98-Gliom-Modell ipsilateral	0,02513 $\pm$ 0,007365	0,3171 $\pm$ 0,02717	0,03391 $\pm$ 0,006586	0,8261 $\pm$ 0,09692	0,02741 $\pm$ 0,008826	0,00009561 $\pm$ 0,00003099	0,00113 $\pm$ 0,00006051	0,0001028 $\pm$ 0,00001667	0,002974 $\pm$ 0,0003662	0,0001106 $\pm$ 0,00004093
Gruppe 3	Fischer-F98-Gliom-Modell kontralateral	1,89 $\pm$ 0,2303	0,2515 $\pm$ 0,04486	0,07765 $\pm$ 0,004914	4,623 $\pm$ 0,6797	0,3683 $\pm$ 0,07641	0,0475 $\pm$ 0,004966	0,006323 $\pm$ 0,001027	0,002207 $\pm$ 0,00007894	0,1149 $\pm$ 0,01415	0,009337 $\pm$ 0,001899
Gruppe 4	Sham ipsilateral	1,8 $\pm$ 0,01000	0,309 $\pm$ 0,04900	0,1252 $\pm$ 0,05485	5,41 $\pm$ 0,3600	0,5085 $\pm$ 0,01550	0,048 $\pm$ 0,001200	0,00825 $\pm$ 0,001460	0,003755 $\pm$ 0,001705	0,1455 $\pm$ 0,01350	0,0128 $\pm$ 0,0006000
Gruppe 5	Sham kontralateral	2,005 $\pm$ 0,3750	0,2925 $\pm$ 0,05350	0,07405 $\pm$ 0,002350	4,735 $\pm$ 0,3050	0,393 $\pm$ 0,03700	0,06325 $\pm$ 0,01125	0,00922 $\pm$ 0,001580	0,002335 $\pm$ 0,0002150	0,15 $\pm$ 0,008000	0,01115 $\pm$ 0,0003500

Tabelle 39: Durchschnittliche relative *Prg*-Expression der einzelnen Abbildungen des Fischer-F98-Gliom-Modells.

Darstellung der durchschnittlichen relativen *Prg*-Expression $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM, Standard Error of the Mean) in Bezug zu dem Referenzgene für die einzelnen Gruppen der jeweiligen grafischen Darstellung der Datensätze der F98-Gliomzellen und Ratten des Fischer-F98-Gliom-Modells.

VI. Abkürzungsverzeichnis

A

A Absorption
Abbildung Abb.
ACTB beta Aktin
Aqua dest. destilliertes Wasser,
..... Aqua destillata
ATX Autotaxin, Lysophospholipase D

B

BLAST Basic Local Alignment Search Tool
bp Basenpaar
bzw. beziehungsweise

C

c Konzentration
C Celsius
C1P Ceramid-1-Phosphat,
..... Ceramide 1-phosphate
CDKN2B
..... Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2B
cDNA komplementäre DNA,
..... complementary DNA
CT Computertomographie
C_T Schwellenwert-Zyklus, Threshold Cycle

D

DAG Diacylglycerol
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure
DWI Diffusion weighted imaging

E

E Effizienz
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure,
..... Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
et al. *et aliter*

F

FAM 6-Carboxyfluorescein
FCS Fetales Kälberserum, Fetal calf serum
FLAIR Fluid attenuated inversion recovery

G

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-
Dehydrogenase
GBM Glioblastom, Glioblastom
G-CIMP gliomspezifischer CpG-Insel-
Methylator-Phänotyp
gDNA genomischen DNA

H

h Stunden
HPRT1 Hypoxanthin-Guanin-
Phosphoribosyl-Transferase 1

I

IDH Isocitratdehydrogenase

K

KPS Karnofsky performance status

L

LPA Lysophosphatidat, Lysophosphatide
LPC Lysophosphatidylcholin,
..... Lysophosphatidylcholine
LPP, LPPs Lipid-Phosphat-Phosphatase(n),
..... Lipid phosphate phosphatase(s)

M

MAG Monoacylglycerol
MAPK Mitogen-activated Protein Kinase
MGB Minor Groove Binder
MGMT O⁶-methylguanin-DNA-
Methyltransferase
min Minuten
MIQUE Minimum Information for
Publication of Quantitative Real-Time PCR
Experiment
ml Milliliter
mRNA messenger Ribonukleinsäure
MRT Magnetresonanztomographie

N

n.z. nicht zutreffend
NCBI National Center for Biotechnology
Information

NFQnicht fluoreszierende Quencher
 Farbstoff, Nonfluorescent Quencher
 nm Nanometer
 NOSNot otherwise specified
 ns nicht signifikant

P

PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
 PCR Polymerase-Kettenreaktion
 PETPositron-Emissions-Tomographie
 PI3KPhosphatidylinositol-3-Kinase
 PRG, PRGs.....Plasticity-related gene(s), Lipid
 phosphatase related protein (LRP/ LPPR)
 PRG, PRGs/Prg, Prgs.....
plasticity-related gene(s)
 PRG1 LPPR4
 PRG2 LPPR3
 PRG3 LPPR1
 PRG4 LPPR2
 PRG5 LPPR5
 Proben-ID..... Proben-Identifikation
 PTENPhosphatase and Tensin Homolog

Q

Quencher Löscher

R

RNA Ribonukleinsäure
 rpm Umdrehungen pro Minute
 RT-PCR quantitative Real-Time Polymerase
 Chain Reaction, quantitative Echtzeit-
 Polymerase-Kettenreaktion

S

sSekunden
 S1PSphingosin 1-Phosphat, Sphingosine 1-
 phosphate
 SDStandard Abweichung,
 Standard Deviation
 SEM Standardfehler des Mittelwerts,
 Standard Error of the Mean

T

TBP TATA-Box Bindeprotein
 TERT..... Telomerase reverse transcriptase
 TMS Transkranielle Magnetstimulation
 TRIS..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

u.a.unter anderem

V

V Volt
 VEGFVascular endothelial growth factor
 vs versus, im Gegensatz zu

W

WHOWeltgesundheitsorganisation,
 World Health Organization

Z

z. B.zum Beispiel
 ZNS..... zentrales Nervensystem

VII. Literaturverzeichnis

- 1 Press, O. U. *Gene/Protein Nomenclature Guidelines and Requirements*, <https://academic.oup.com/molehr/pages/Gene_And_Protein_Nomenclature> (Accessed on 2025/03/04).
- 2 Bruford, E. A. *et al.* Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Nature Genetics* **52**, 754-758, doi:10.1038/s41588-020-0669-3 (2020).
- 3 Sundberg, J. P. & Schofield, P. N. Commentary: mouse genetic nomenclature. Standardization of strain, gene, and protein symbols. *Veterinary Pathology* **47**, 1100-1104, doi:10.1177/0300985810374837 (2010).
- 4 Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology* **23**, 1231-1251, doi:10.1093/neuonc/noab106 (2021).
- 5 Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* **131**, 803–820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1 (2016).

- 6 Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology* **2**, 494-503; quiz 491 p following 516, doi:10.1038/ncpneuro0289 (2006).
- 7 Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics* **152**, 63–82, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005 (2015).
- 8 Miranda, A., Blanco-Prieto, M., Sousa, J., Pais, A. & Vitorino, C. Breaching barriers in glioblastoma. Part I: Molecular pathways and novel treatment approaches. *International journal of pharmaceuticals* **531**, 372-388, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.07.056 (2017).
- 9 Wen, P. Y. *et al.* Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology* **22**, 1073-1113, doi:10.1093/neuonc/noaa106 (2020).
- 10 Ng, W. *et al.* Complexities of lysophospholipid signalling in glioblastoma. *Journal of Clinical Neuroscience* **21**, 893-898, doi:10.1016/j.jocn.2014.02.013 (2014).
- 11 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
- 12 Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology* **17** iv1-iv62, doi:10.1093/neuonc/nov189 (2015).
- 13 Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology* **4**, 278–299, doi:10.1093/neuonc/4.4.278 (2002).
- 14 McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S. A. & Plaha, P. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ* **374**, n1560, doi:10.1136/bmj.n1560 (2021).
- 15 Jovcevska, I. Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosnian Journal of Basic Medical Science* **19**, 116-124, doi:10.17305/bjbms.2018.3717 (2019).
- 16 Thomas, L., Di Stefano, A. L. & Ducray, F. Predictive biomarkers in adult gliomas: the present and the future. *Current Opinion in Oncology* **25**, 689-694, doi:10.1097/CCO.0000000000000002 (2013).
- 17 Wick, W. *et al.* MGMT testing-the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology* **10**, 372-385, doi:10.1038/nrneurol.2014.100 (2014).
- 18 Weller, M. *et al.* MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clinical Cancer Research* **21**, 2057-2064, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2737 (2015).
- 19 Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **352**, 997-1003, doi:10.1056/NEJMoa043331 (2005).
- 20 Iacob, G. & Dinca, E. B. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life* **2**, 386-393 (2009).
- 21 Madhusoodanan, S., Ting, M. B., Farah, T. & Ugur, U. Psychiatric aspects of brain tumors: A review. *World Journal of Psychiatry* **5**, 273-285, doi:10.5498/wjp.v5.i3.273 (2015).
- 22 Albert, F. K., Forsting, M., Sartor, K., Adam, H.-P. & Kunze, S. Early Postoperative Magnetic Resonance Imaging after Resection of Malignant Glioma: Objective Evaluation of Residual Tumor and Its Influence on Regrowth and Prognosis. *Neurosurgery* **34**, 45-61 (1994).
- 23 Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* **7**, 392-401, doi:10.1016/s1470-2045(06)70665-9 (2006).

- 24 Stummer, W. *et al.* Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* **62**, 564-576, doi:10.1227/01.neu.0000317304.31579.17 (2008).
- 25 Rogers, C. M., Jones, P. S. & Weinberg, J. S. Intraoperative MRI for Brain Tumors. *Journal of Neuro-Oncology* **151**, 479-490, doi:10.1007/s11060-020-03667-6 (2021).
- 26 Ille, S. *et al.* Non-Invasive Mapping for Effective Preoperative Guidance to Approach Highly Language-Eloquent Gliomas-A Large Scale Comparative Cohort Study Using a New Classification for Language Eloquence. *Cancers* **13**, 207, doi:10.3390/cancers13020207 (2021).
- 27 Asimakidou, E., Abut, P. A., Raabe, A. & Seidel, K. Motor Evoked Potential Warning Criteria in Supratentorial Surgery: A Scoping Review. *Cancers (Basel)* **13**, doi:10.3390/cancers13112803 (2021).
- 28 Raabe, A., Meyer, B., Schaller, K., Vajkoczy, P. & Winkler, P. A. *The Craniotomy Atlas*. 1 edn, (Thieme Medical Publishers, 2019).
- 29 Gately, L., McLachlan, S. A., Philip, J., Ruben, J. & Dowling, A. Long-term survivors of glioblastoma: a closer look. *Journal of Neuro-Oncology* **136**, 155-162, doi:10.1007/s11060-017-2635-1 (2018).
- 30 Brindley, D. N. & Bräuer, A. U. in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* Ch. Chapter 12, 289-310 (Springer, Boston, MA, 2009).
- 31 Bräuer, A. U. & Nitsch, R. Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 595-600, doi:10.1016/j.bbalip.2008.04.004 (2008).
- 32 Tang, X. & Brindley, D. N. Lipid Phosphate Phosphatases and Cancer. *Biomolecules* **10**, 1263, doi:10.3390/biom10091263 (2020).
- 33 Strauss, U. & Bräuer, A. U. Current views on regulation and function of plasticity-related genes (PRGs/LPPRs) in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1831**, 133-138, doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.010 (2013).
- 34 Gross, I. & Bräuer, A. U. Modulation of lysophosphatidic acid (LPA) receptor activity: the key to successful neural regeneration? *Neural Regeneration Research* **15**, 53-54, doi:10.4103/1673-5374.264452 (2020).
- 35 Roza, C., Campos-Sandoval, J. A., Gómez-García, M. C., Peñalver, A. & Márquez, J. Lysophosphatidic Acid and Glutamatergic Transmission. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **12**, 138, doi:10.3389/fnmol.2019.00138 (2019).
- 36 Ng, W. & Morokoff, A. *Lysophospholipid Signalling and the Tumour Microenvironment*. Vol. 1270 123-144 (Springer, Cham, 2021).
- 37 Ren, H. *et al.* Lipid phosphate phosphatase (LPP3) and vascular development. *Biochimica et Biophysica Acta* **1831**, 126-132, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.012 (2013).
- 38 Tabuchi, S. The autotaxin-lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor cascade: proposal of a novel potential therapeutic target for treating glioblastoma multiforme. *Lipids in Health and Disease* **14**, 56, doi:10.1186/s12944-015-0059-5 (2015).
- 39 Yung, Y. C., Stoddard, N. C. & Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research* **55**, 1192-1214, doi:10.1194/jlr.R046458 (2014).
- 40 Chatterjee, I., Humtsoe, J. O., Kohler, E. E., Sorio, C. & Wary, K. K. Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via β -catenin and Cyclin-D1 signaling. *Molecular Cancer* **10**, doi:10.1186/1476-4598-10-51 (2011).
- 41 Byrne, K. F., Pal, A., Curtin, J. F., Stephens, J. C. & Kinsella, G. K. G-protein-coupled receptors as therapeutic targets for glioblastoma. *Drug Discovery Today* **26**, 2858-2870, doi:10.1016/j.drudis.2021.07.008 (2021).
- 42 Tang, X., Benesch, M. G. K. & Brindley, D. N. Role of the autotaxin-lysophosphatidate axis in the development of resistance to cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1865**, 158716, doi:10.1016/j.bbalip.2020.158716 (2020).

- 43 Mahajan-Thakur, S., Bien-Moller, S., Marx, S., Schroeder, H. & Rauch, B. H. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling in glioblastoma multiforme-A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18112448 (2017).
- 44 Brindley, D. N. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* **92**, 900-912, doi:10.1002/jcb.20126 (2004).
- 45 Manning Jr, T. J., Parker, J. C. & Sontheimer, H. Role of lysophosphatidic acid and rho in glioma cell motility. *Cell motility and the cytoskeleton* **45**, 185-199, doi:10.1002/(SICI)1097-0169(200003)45:3<185::AID-CM2>3.0.CO;2-G (2000).
- 46 Valdés-Rives, S. A. *et al.* LPA1 Receptor Promotes Progesterone Receptor Phosphorylation through PKC α in Human Glioblastoma Cells. *Cells* **10**, doi:10.3390/cells10040807 (2021).
- 47 Valdés-Rives, S. A., de la Fuente-Granada, M., Velasco-Velázquez, M. A., González-Flores, O. & González-Arenas, A. LPA1 receptor activation induces PKC α nuclear translocation in glioblastoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **110**, 91-102, doi:10.1016/j.biocel.2019.03.003 (2019).
- 48 Tea, M. N., Poonnoose, S. I. & Pitson, S. M. Targeting the Sphingolipid System as a Therapeutic Direction for Glioblastoma. *Cancers* **12**, 111, doi:10.3390/cancers12010111 (2020).
- 49 Companioni, O., Mir, C., Garcia-Mayea, Y. & E., L. M. Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* **11**, 745092, doi:10.3389/fonc.2021.745092 (2021).
- 50 Tanic, N., Brkic, G., Dimitrijevic, B., Dedovic-Tanic, N., Gefen, N., Benharroch, D., Gopas, J. Identification of Differentially Expressed mRNA Transcripts in Drug-resistant Versus Parental Human Melanoma Cell Lines. *Anticancer Research* **26**, 2137-2142 (2006).
- 51 Alderton, F. *et al.* G-protein-coupled receptor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway is attenuated by lipid phosphate phosphatases 1, 1a, and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 13452-13460, doi:10.1074/jbc.M006582200 (2001).
- 52 Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M. A., Latham, D. E. & Loeffler, J. S. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Mediates Resistance to Sequential Administration of Radiation and Chemotherapy in Primary Human Glioblastoma Cells in a RAS-dependent Manner. *Cancer Research* **62**, 4307-4315 (2002).
- 53 McArdle, L. *et al.* Microarray analysis of phosphatase gene expression in human melanoma. *British Journal of Dermatology* **152**, 925-930, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06454.x (2005).
- 54 Zhang, X., Li, M., Yin, N. & Zhang, J. The Expression Regulation and Biological Function of Autotaxin. *Cells* **10**, 939, doi:10.3390/cells10040939 (2021).
- 55 Brandt, N., Köper, F., Hausmann, J. & Bräuer, A. U. Spotlight on plasticity-related genes: Current insights in health and disease. *Pharmacology & Therapeutics* **260**, 108687, doi:10.1016/j.pharmthera.2024.108687 (2024).
- 56 Wallen, Z. D. *et al.* Plasticity-related gene 3 (LPPR1) and age at diagnosis of Parkinson disease. *Neurology Genetics* **4**, e271, doi:10.1212/NXG.0000000000000271 (2018).
- 57 Fuchs, J. *et al.* Plasma membrane phospholipid phosphatase-related proteins as pleiotropic regulators of neuron growth and excitability. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **15**, 984655, doi:10.3389/fnmol.2022.984655 (2022).
- 58 Geist, B., Vorwerk, B., Coiro, P., Ninnemann, O. & Nitsch, R. PRG-1 transcriptional regulation independent from Nex1/Math2-mediated activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 651-661, doi:10.1007/s00018-011-0774-7 (2012).
- 59 Gross, I. *et al.* Systematic expression analysis of plasticity-related genes in mouse brain development brings PRG4 into play. *Developmental Dynamics* **251**, 714-728, doi:10.1002/dvdy.428 (2021).

- 60 Brindley, D. N. & Waggoner, D. W. Mammalian Lipid Phosphate Phosphohydrolases. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 24281–24284, doi:10.1074/jbc.273.38.24281 (1998).
- 61 Trimbuch, T. *et al.* Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* **138**, 1222–1235, doi:10.1016/j.cell.2009.06.050 (2009).
- 62 Brandt, N. *et al.* PRG3 and PRG5 C-Termini: Important Players in Early Neuronal Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, doi:10.3390/ijms232113007 (2022).
- 63 Broggini, T. *et al.* Plasticity Related Gene 3 (PRG3) overcomes myelin-associated growth inhibition and promotes functional recovery after spinal cord injury. *Aging (Albany NY)* **8**, 2463–2487, doi:10.18632/aging.101066 (2016).
- 64 Broggini, T., Nitsch, R. & Savaskan, N. E. Plasticity-related Gene 5 (PRG5) Induces Filopodia and Neurite Growth and Impedes Lysophosphatidic Acid- and Nogo-A-mediated Axonal Retraction. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 521–537, doi:10.1091/mbc.e09-06-0506 (2010).
- 65 Brosig, A. *et al.* The Axonal Membrane Protein PRG2 Inhibits PTEN and Directs Growth to Branches. *Cell Reports* **29**, 2028–2040 e2028, doi:10.1016/j.celrep.2019.10.039 (2019).
- 66 Fuchs, J., Eickholt, B. J. & Leondaritis, G. Harnessing PTEN's Growth Potential in Neuronal Development and Disease. *Neuroscience Insights* **15**, 2633105520959056, doi:10.1177/2633105520959056 (2020).
- 67 Velmans, T. *et al.* Plasticity-related gene 3 promotes neurite shaft protrusion. *BMC Neuroscience* **14**, doi:10.1186/1471-2202-14-36 (2013).
- 68 Gross, I. *et al.* Plasticity-Related Gene 5 Is Expressed in a Late Phase of Neurodifferentiation After Neuronal Cell-Fate Determination. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **16**, 797588, doi:10.3389/fncel.2022.797588 (2022).
- 69 Bräuer, A. U. *et al.* A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nature Neuroscience* **6**, 572–578, doi:10.1038/nn1052 (2003).
- 70 Tokumitsu, H. *et al.* Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. *The Biochemical Journal* **431**, 81–91, doi:10.1042/BJ20100637 (2010).
- 71 Coiro, P., Stoenica, L., Strauss, U. & Bräuer, A. U. Plasticity-related gene 5 promotes spine formation in murine hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 24956–24970, doi:10.1074/jbc.M114.597880 (2014).
- 72 Stange, L. *et al.* LPPR5 Expression in Glioma Affects Growth, Vascular Architecture, and Sunitinib Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 3108, doi:10.3390/ijms23063108 (2022).
- 73 Savaskan, N. E., Bräuer, A. U. & Nitsch, R. Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *European Journal of Neuroscience* **19**, 212–220, doi:10.1046/j.1460-9568.2003.03078.x (2004).
- 74 Schwob, J. E. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record* **269**, 33–49, doi:10.1002/ar.10047 (2002).
- 75 Hu, B. *et al.* Research Progress of Olfactory Nerve Regeneration Mechanism and Olfactory Training. *Ther Clin Risk Manag* **18**, 185–195, doi:10.2147/TCRM.S354695 (2022).
- 76 Cheung, M. C., Jang, W., Schwob, J. E. & Wachowiak, M. Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Frontiers in Neural Circuits* **7**, doi:10.3389/fncir.2013.00207 (2014).
- 77 Neves, G., Cooke, S. F. & Bliss, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience* **9**, 65–75, doi:10.1038/nrn2303 (2008).

- 78 Lourenço, J., Koukoulis, F. & Bacci, A. Synaptic inhibition in the neocortex: Orchestration and computation through canonical circuits and variations on the theme. *Cortex* **132**, 258-280, doi:10.1016/j.cortex.2020.08.015 (2020).
- 79 Feldman, D. E. Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annual Review of Neuroscience* **32**, 33-55, doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135516 (2009).
- 80 Peeva, G. P. *et al.* Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. *European Journal of Neuroscience* **24**, 2152-2162, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05091.x (2006).
- 81 Savaskan, N. E. & Nitsch, R. Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus. *Reviews in the Neurosciences* **12**, 195-215, doi:10.1515/revneuro.2001.12.3.195 (2001).
- 82 Kreutzer, J. S., DeLuca, J. & Caplan, B. *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. 1 edn, (Springer New York, NY, 2011).
- 83 Unichenko, P. *et al.* Plasticity-Related Gene 1 Affects Mouse Barrel Cortex Function via Strengthening of Glutamatergic Thalamocortical Transmission. *Cerebral Cortex* **26**, 3260-3272, doi:10.1093/cercor/bhw066 (2016).
- 84 von Bernhardt, R., Bernhardt, L. E. & Eugénin, J. What Is Neural Plasticity? *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1015**, 1-15, doi:10.1007/978-3-319-62817-2_1 (2017).
- 85 Lv, K. *et al.* Neuroplasticity of Glioma Patients: Brain Structure and Topological Network. *Frontiers in Neurology* **13**, 871613, doi:10.3389/fneur.2022.871613 (2022).
- 86 Citri, A. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 18-41, doi:10.1038/sj.npp.1301559 (2008).
- 87 Ho, V. M., Lee, J.-A. & Martin, K. C. The cell biology of synaptic plasticity. *Science* **334**, 623-628, doi:10.1126/science.1209236 (2011).
- 88 Engert, F. & Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**, 66-70, doi:10.1038/19978 (1999).
- 89 Gipson, C. D. & Olive, M. F. Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior? *Genes Brain Behav* **16**, 101-117, doi:10.1111/gbb.12324 (2017).
- 90 Sekino, Y., Kojima, N. & Shirao, T. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International* **51**, 92-104, doi:10.1016/j.neuint.2007.04.029 (2007).
- 91 Bourne, J. N. & Harris, K. M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience* **31**, 47-67, doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646 (2008).
- 92 Chidambaram, S. B. *et al.* Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* **92**, 161-193, doi:10.1016/j.pnpbp.2019.01.005 (2019).
- 93 Hering, H. & Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 880-888, doi:10.1038/35104061 (2001).
- 94 Cargnelutti, E., Ius, T., Skrap, M. & Tomasino, B. What do we know about pre- and postoperative plasticity in patients with glioma? A review of neuroimaging and intraoperative mapping studies. *Neuroimage: Clinical* **28**, 102435, doi:10.1016/j.nicl.2020.102435 (2020).
- 95 Hashimoto, T. *et al.* Plasticity-related gene 1 is important for survival of neurons derived from rat neural stem cells. *Journal of Neuroscience Research* **91**, 1402-1407, doi:10.1002/jnr.23269 (2013).
- 96 Sigal, Y. J., Quintero, O. A., Cheney, R. E. & Morris, A. J. Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *Journal of Cell Science* **120**, 340-352, doi:10.1242/jcs.03335 (2007).
- 97 Fink, K. L., Lopez-Giraldez, F., Kim, I. J., Strittmatter, S. M. & Cafferty, W. B. J. Identification of Intrinsic Axon Growth Modulators for Intact CNS Neurons after Injury. *Cell Reports* **18**, 2687-2701, doi:10.1016/j.celrep.2017.02.058 (2017).

- 98 Melgarejo da Rosa, M. Communication of Glioma cells with neuronal plasticity: What is the underlying mechanism? *Neurochemistry International* **141**, 104879, doi:10.1016/j.neuint.2020.104879 (2020).
- 99 Taylor, K. R. & Monje, M. Neuron-oligodendroglial interactions in health and malignant disease. *Nature Reviews Neuroscience* **24**, 733-746, doi:10.1038/s41583-023-00744-3 (2023).
- 100 Lawal, O., Ulloa Severino, F. P. & Eroglu, C. The role of astrocyte structural plasticity in regulating neural circuit function and behavior. *Glia* **70**, 1467-1483, doi:10.1002/glia.24191 (2022).
- 101 Lauko, A., Lo, A., Ahluwalia, M. S. & Lathia, J. D. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Seminars in Cancer Biology* **82**, 162-175, doi:10.1016/j.semcancer.2021.02.014 (2022).
- 102 Venkataramani, V. *et al.* Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature* **573**, 532-538, doi:10.1038/s41586-019-1564-x (2019).
- 103 Huberfeld, G. & Vecht, C. J. Seizures and gliomas -- towards a single therapeutic approach. *Nature Reviews Neurology* **12**, 204-216, doi:10.1038/nrneurol.2016.26 (2016).
- 104 Wang, X., Liang, J. & Sun, H. The Network of Tumor Microtubes: An Improperly Reactivated Neural Cell Network With Stemness Feature for Resistance and Recurrence in Gliomas. *Frontiers in Oncology* **12**, 921975, doi:10.3389/fonc.2022.921975 (2022).
- 105 Ni, H., Jiang, Y. W., Tao, L. Y., Jin, M. F. & Wu, X. R. ZnT-1, ZnT-3, CaMK II, PRG-1 expressions in hippocampus following neonatal seizure-induced cognitive deficit in rats. *Toxicology Letters* **184**, 145-1450, doi:10.1016/j.toxlet.2008.11.003 (2009).
- 106 Ni, H. *et al.* Dynamic pattern of gene expression of ZnT-1, ZnT-3 and PRG-1 in rat brain following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures. *Toxicology Letters* **194**, 86-93, doi:10.1016/j.toxlet.2010.02.008 (2010).
- 107 Wang, D. *et al.* PRG5 Knockout Precipitates Late-Onset Hypersusceptibility to Pilocarpine-Induced Juvenile Seizures by Exacerbating Hippocampal Zinc Signaling-Mediated Mitochondrial Damage. *Frontiers in Neuroscience* **15**, 715555, doi:10.3389/fnins.2021.715555 (2021).
- 108 Liu, X. *et al.* PRG-1 relieves pain and depressive-like behaviors in rats of bone cancer pain by regulation of dendritic spine in hippocampus. *International Journal of Biological Sciences* **17**, 4005-4020, doi:10.7150/ijbs.59032 (2021).
- 109 van Coevorden-Hameete, M. H. *et al.* Plasticity-related gene 5: A novel surface autoantigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation* **2**, e156, doi:10.1212/NXI.0000000000000156 (2015).
- 110 Neftel, C. *et al.* An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* **178**, 835-849 e821, doi:10.1016/j.cell.2019.06.024 (2019).
- 111 Matas-Rico, E. *et al.* Glycerophosphodiesterase GDE2 Promotes Neuroblastoma Differentiation through Glypican Release and Is a Marker of Clinical Outcome. *Cancer Cell* **30**, 548-562, doi:10.1016/j.ccell.2016.08.016 (2016).
- 112 Fan, Z. *et al.* PRG3 induces Ras-dependent oncogenic cooperation in gliomas. *Oncotarget* **7**, 26692–26708, doi:10.18632/oncotarget.8592 (2016).
- 113 Mirimanoff, R. O. *et al.* Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 2563-2569, doi:10.1200/JCO.2005.04.5963 (2006).
- 114 Cioffi, G. *et al.* Sex differences in glioblastoma response to treatment: Impact of MGMT methylation. *Neuro-Oncology Advances* **6**, vdae031, doi:10.1093/noajnl/vdae031 (2024).
- 115 Yu, P. *et al.* Cooperative interactions of LPPR family members in membrane localization and alteration of cellular morphology. *Journal of Cell Science* **128**, 3210-3222, doi:10.1242/jcs.169789 (2015).

- 116 Mullins, C. S. *et al.* A Comprehensive Approach to Patient-individual Glioblastoma Multiforme Model Establishment. *Journal of Cancer Science & Therapy* **6**, 177-187, doi:10.4172/1948-5956.1000237 (2014).
- 117 Mullins, C. S. *et al.* Establishment and characterization of primary glioblastoma cell lines from fresh and frozen material: A detailed comparison. *PloS One* **8**, e71070, doi:10.1371/journal.pone.0071070 (2013).
- 118 Mullins, C. S. *Patient-individual models of gliomas: establishment, characterization and applications* doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) thesis, Universität Rostock, (2013).
- 119 Biosystems, A. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 1-70 (2008).
- 120 Lange, F. *et al.* Perampanel Add-on to Standard Radiochemotherapy in vivo Promotes Neuroprotection in a Rodent F98 Glioma Model. *Frontiers in Neuroscience* **14**, 598266, doi:10.3389/fnins.2020.598266 (2020).
- 121 Arnemann, J. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 3 edn, (Springer Berlin, Heidelberg, 2019).
- 122 Wilfinger, W. W., Mackey, K. & Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474-476, 478-481, doi:10.2144/97223st01 (1997).
- 123 BIOLINE Reagents Ltd, G. *HyperLadder™ 1kb - Product Manual*, <<https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2672/>> (Accessed on 2024/05/18).
- 124 Corporation, L. T. Amplification efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays. (2012).
- 125 Wiedemann, C., Schulz, H. L. & Weber, B. H. F. Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* **1/2004**, 99-102 (2004).
- 126 Schild, T. A. Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. 1-118. <https://www.uniklinik-freiburg.de/fileadmin/mediapool/07_kliniken/med_innere1/downloads/core_facility/pdf/s/sdsman.pdf>.
- 127 Applied Biosystems, T. F. S. *Real-time PCR: understanding Ct*, <<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> ; <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>> (Accessed on 2023/06/26).
- 128 Gläser, A. *et al.* Identification of Brain-Specific Treatment Effects in NPC1 Disease by Focusing on Cellular and Molecular Changes of Sphingosine-1-Phosphate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 4502, doi:10.3390/ijms21124502 (2020).
- 129 Applied Biosystems, T. F. S. *TaqMan Gene Expression Assay solutions. Proven performance for fast, reliable results.*, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html?gclid=EALalQobChMIqazooPWZhgMVmgQGAB1chwOkEAAAYASAAEgLXqvD_BwE&ef_id=EALalQobChMIqazooPWZhgMVmgQGAB1chwOkEAAAYASAAEgLXqvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!606132911450!e!!g!!taqman%20gene%20expression%20assays!17574808757!139287689698&cid=gsd_pcr_sbu_r03_co_cp1491_pjt9621_gsd00000_0se_gaw_rs_pur_&gad_source=1 ; <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/taqman-gex-brochure.pdf> > (Accessed on 2024/05/19).
- 130 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 131 Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* **3**, 1101-1108, doi:10.1038/nprot.2008.73 (2008).

- 132 Walker, N. J. A Technique Whose Time Has Come. *Science* **296**, 557-559, doi:10.1126/science.296.5567.55 (2002).
- 133 Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* **1**, 1559-1582, doi:10.1038/nprot.2006.236 (2006).
- 134 de Ronde, M. W. J. *et al.* Practical data handling pipeline improves performance of qPCR-based circulating miRNA measurements. *RNA* **23**, 811-821, doi:10.1261/rna.059063.116 (2017).
- 135 Harrison, R. A. & de Groot, J. F. Treatment of Glioblastoma in the Elderly. *Drugs & Aging* **35**, 707–718, doi:10.1007/s40266-018-0568-9 (2018).
- 136 Giambra, M. *et al.* The peritumoral brain zone in glioblastoma: where we are and where we are going. *Journal of Neuroscience Research* **101**, 199-216, doi:10.1002/jnr.25134 (2023).
- 137 Lemée, J. M., Clavreul, A. & Menei, P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncology* **17**, 1322-1332, doi:10.1093/neuonc/nov119 (2015).
- 138 Beck, A. P. & Meyerholz, D. K. Evolving challenges to model human diseases for translational research. *Cell and Tissue Research* **380**, 305-311, doi:10.1007/s00441-019-03134-3 (2020).
- 139 Brent, R. L. Utilization of Animal Studies to Determine the Effects and Human Risks of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals, and Physical Agents). *Pediatrics* **113**, 984–995 (2004).
- 140 Thomann, K.-D. Die Contergan-Katastrophe: Die trügerische Sicherheit der „harten“ Daten. *Deutsches Ärzteblatt* **104**, A 2778–2782 (2007).
- 141 Barth, R. F. & Kaur, B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* **94**, 299-312, doi:10.1007/s11060-009-9875-7 (2009).
- 142 Sahu, U., Barth, R. F., Otani, Y., McCormack, R. & Kaur, B. Rat and Mouse Brain Tumor Models for Experimental Neuro-Oncology Research. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **81**, 312-329, doi:10.1093/jnen/nlac021 (2022).
- 143 (ECACC), T. E. C. o. A. C. C. *Passage numbers explained*, <<https://www.culturecollections.org.uk/technical/cell-line-passage-numbers-explained.aspx> ; https://www.culturecollections.org.uk/media/114565/m219_passage-numbers-explained.pdf> (Accessed on 2023/04/12).
- 144 Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611-622, doi:10.1373/clinchem.2008.112797 (2009).
- 145 Liu, W. & Saint, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294**, 327-353, doi:10.1016/S0006-291X(02)00478-3 (2002).
- 146 Inc., -. T. F. S. *TaqMan® Gene Expression Assay Rn01640210_m1*, <https://www.thermofisher.com/taqman-gene-expression/product/Rn01640210_m1?CID=&ICID=&subtype=> (Accessed on 2025/01/27).
- 147 Inc., -. T. F. S. *TaqMan® Gene Expression Assay Rn01640214_m1*, <https://www.thermofisher.com/taqman-gene-expression/product/Rn01640214_m1?CID=&ICID=&subtype=> (Accessed on 2025/01/27).
- 148 Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66, doi:10.1016/s0304-3940(02)01423-4 (2003).
- 149 Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, RESEARCH0034, doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034 (2002).

- 150 Radonić, A. *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 856–862, doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177 (2004).
- 151 Schmid, H. *et al.* Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International* **64**, 356–360, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00074.x (2003).
- 152 Thul, P. J. *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, eaal3321, doi:10.1126/science.aal3321 (2017).
- 153 Atlas, T. H. P. *HPRT1* protein expression summary, <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165704-HPRT1>> (Accessed on 2022/12/28).
- 154 Valente, V. *et al.* Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology* **10**, 17, doi:10.1186/1471-2199-10-17 (2009).
- 155 Aithal, M. G. S. & Rajeswari, N. Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Research and Treatment* **3**, 24–29, doi:10.14791/btrt.2015.3.1.24 (2015).
- 156 Atlas, T. H. P. *TBP* protein expression summary, <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112592-TBP>> (Accessed on 2022/12/28).
- 157 Atlas, T. H. P. *GAPDH* protein expression summary, <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111640-GAPDH>> (Accessed on 2022/12/28).
- 158 Kreth, S. *et al.* Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro-Oncology* **12**, 570–579, doi:10.1093/neuonc/nop072 (2010).
- 159 de Kok, J. B. *et al.* Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Labaratory Investigation* **85**, 154–159, doi:10.1038/labinvest.3700208 (2005).
- 160 Svingen, T., Letting, H., Hadrup, N., Hass, U. & Vinggaard, A. M. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ* **3**, e855, doi:10.7717/peerj.855 (2015).
- 161 Gresner, S. M. *et al.* Selection of reference genes for gene expression studies in astrocytomas. *Analytical Biochemistry* **408**, 163–165, doi:10.1016/j.ab.2010.09.010 (2011).
- 162 Julian, G. S., de Oliveira, R. W., Perry, J. C., Tufik, S. & Chagas, J. R. Validation of housekeeping genes in the brains of rats submitted to chronic intermittent hypoxia, a sleep apnea model. *PLoS One* **9**, e109902, doi:10.1371/journal.pone.0109902 (2014).
- 163 Reuss, A. M., Groos, D., Ghoochani, A., Buchfelder, M. & Savaskan, N. MCT4 Promotes Tumor Malignancy in F98 Glioma Cells. *Journal of Oncology* **2021**, 6655529, doi:10.1155/2021/6655529 (2021).
- 164 Silver, N. *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Molecular Biology* **9**, 64, doi:10.1186/1471-2199-9-64 (2008).
- 165 Hamalainen, H. K. *et al.* Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* **299**, 63–70, doi:10.1006/abio.2001.5369 (2001).
- 166 Tricarico, C. *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry* **309**, 293–3000, doi:10.1016/s0003-2697(02)00311-1 (2002).
- 167 McCall, M. N., McMurray, H. R., Land, H. & Almudevar, A. On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics* **30**, 2310–2316, doi:10.1093/bioinformatics/btu239 (2014).

- 168 Peterson, S. J. & Foley, S. Clinician's Guide to Understanding Effect Size, Alpha Level, Power, and Sample Size. *Nutrition in Clinical Practice* **36**, 598-605, doi:10.1002/ncp.10674 (2021).
- 169 Weber, E. J. & Hoo, Z. H. Why sample size estimates? *Emerg Med J* **35**, 755-756, doi:10.1136/emered-2018-207763 (2018).
- 170 Wang, Z. *et al.* Lipid metabolism as a target for cancer drug resistance: progress and prospects. *Front Pharmacol* **14**, 1274335, doi:10.3389/fphar.2023.1274335 (2023).
- 171 Venkatraman, G. *et al.* Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment. *The FASEB Journal* **29**, 772-785, doi:10.1096/fj.14-262659 (2015).
- 172 Samadi, N., Gaetano, C., Goping, I. S. & Brindley, D. N. Autotaxin protects MCF-7 breast cancer and MDA-MB-435 melanoma cells against Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* **28**, 1028-1039, doi:10.1038/onc.2008.442 (2009).
- 173 Perry, J. R. *et al.* Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **376**, 1027-1037, doi:10.1056/NEJMoa1611977 (2017).
- 174 Pellegrini, M., Pallottini, V., Marin, R. & Marino, M. Role of the sex hormone estrogen in the prevention of lipid disorder. *Current Medicinal Chemistry* **21**, 2734-2742, doi:10.2174/0929867321666140303123602 (2014).
- 175 Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Piña-Medina, A. G. & Camacho-Arroyo, I. Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins Involved in Brain Plasticity. *Frontiers in Psychiatry* **6**, 165, doi:10.3389/fpsy.2015.00165 (2015).
- 176 Hönikl, L. S. *et al.* High expression of estrogen receptor alpha and aromatase in glial tumor cells is associated with gender-independent survival benefits in glioblastoma patients. *Journal of Neuro-Oncology* **147**, 567-575, doi:10.1007/s11060-020-03467-y (2020).
- 177 Verzat, C., Delisle, M. B., Courriere, P. & Hollande, E. Influence of host sex on the growth of a human glioblastoma line in athymic mice. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **16**, 141-151, doi:10.1111/j.1365-2990.1990.tb00943.x (1990).
- 178 Plunkett, R. J., Lis, A., Barone, T. A., Fronckowiak, M. D. & Greenberg, S. J. Hormonal effects on GBM in the nude rat model. *Journal of Neurosurgery* **90**, 1072-1077, doi:10.3171/jns.1999.90.6.1072 (1999).
- 179 Giussani, P. *et al.* Glucosylceramide synthase protects glioblastoma cells against autophagic and apoptotic death induced by temozolomide and Paclitaxel. *Cancer Investigation* **30**, 27-37, doi:10.3109/07357907.2011.629379 (2012).
- 180 Hawkins, C. C., Ali, T., Ramanadham, S. & Hjelmeland, A. B. Sphingolipid Metabolism in Glioblastoma and Metastatic Brain Tumors: A Review of Sphingomyelinases and Sphingosine-1-Phosphate. *Biomolecules* **10**, 1357, doi:10.3390/biom10101357 (2020).
- 181 Yamamoto, Y. *et al.* Involvement of Intracellular Cholesterol in Temozolomide-Induced Glioblastoma Cell Death. *Neurologia medico-chirurgica* **58**, 296-302, doi:10.2176/nmc.ra.2018-0040 (2018).
- 182 Choo, M. *et al.* Involvement of cell shape and lipid metabolism in glioblastoma resistance to temozolomide. *Acta Pharmacologica Sinica* **44**, 670-679, doi:10.1038/s41401-022-00984-6 (2022).
- 183 Parik, S. *et al.* GBM tumors are heterogeneous in their fatty acid metabolism and modulating fatty acid metabolism sensitizes cancer cells derived from recurring GBM tumors to temozolomide. *Frontiers in Oncology* **12**, 988872, doi:10.3389/fonc.2022.988872 (2022).
- 184 Kou, Y., Geng, F. & Guo, D. Lipid Metabolism in Glioblastoma: From De Novo Synthesis to Storage. *Biomedicines* **10**, 1943, doi:10.3390/biomedicines10081943 (2022).
- 185 Bataller, M. *et al.* The Role of Sphingolipids Metabolism in Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Oncology* **11**, 807636, doi:10.3389/fonc.2021.807636 (2021).

- 186 Riboni, L. *et al.* Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. *Glia* **39**, 105-113, doi:10.1002/glia.10087 (2002).
- 187 Heger, J. I. *et al.* Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. *Exp Cell Res* **365**, 57-65, doi:10.1016/j.yexcr.2018.02.017 (2018).
- 188 Zhang, R., Zhang, H., Chen, B. & Luan, T. Fetal bovine serum attenuating perfluorooctanoic acid-inducing toxicity to multiple human cell lines via albumin binding. *Journal of Hazardous Materials* **389**, 122109, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122109 (2020).
- 189 Szöör, A., Ujlaky-Nagy, L., Tóth, G., Szöllösi, J. & Vereb, G. Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms. *Cell Signal* **28**, 81-93, doi:10.1016/j.cellsig.2015.11.012 (2016).
- 190 Mollinedo, F. & Gajate, C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *Journal of Lipid Research* **61**, 611-635, doi:10.1194/jlr.TR119000439 (2020).
- 191 D'Aprile, C., Prioni, S., Mauri, L., Prinetti, A. & Grassi, S. Lipid rafts as platforms for sphingosine 1-phosphate metabolism and signalling. *Cellular Signalling* **80**, 109929, doi:10.1016/j.cellsig.2021.109929 (2021).
- 192 Arigony, A. L. *et al.* The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *BioMed Research International* **2013**, 597282, doi:10.1155/2013/597282 (2013).
- 193 Zoteva, V. *et al.* An improved F98 glioblastoma rat model to evaluate novel treatment strategies incorporating the standard of care. *PLoS One* **19**, e0296360, doi:10.1371/journal.pone.0296360 (2024).
- 194 Robertson, F. L., Marqués-Torrejón, M. A., Morrison, G. M. & Pollard, S. M. Experimental models and tools to tackle glioblastoma. *Disease Models & Mechanisms* **12**, dmm040386, doi:10.1242/dmm.040386 (2019).
- 195 Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A. M., Larouche, A. & Fortin, D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *The Canadian Journal of Neurological Science* **34**, 296-306, doi:10.1017/s0317167100006715 (2007).
- 196 Fortin, D. Drug Delivery Technology to the CNS in the Treatment of Brain Tumors: The Sherbrooke Experience. *Pharmaceutics* **11**, 248, doi:10.3390/pharmaceutics11050248 (2019).
- 197 Blanchard, J., Mathieu, M., Patenaude, Y. & Fortin, D. MR-Pathological Comparison in F98- Fischer Glioma Model Using a Human Gantry. *The Canadian Journal of Neurological Science* **33**, 86-91, doi:10.1017/s0317167100004753 (2006).
- 198 Cheyne, J. E. & Montgomery, J. M. The cellular and molecular basis of in vivo synaptic plasticity in rodents. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **318**, C1264-C1283, doi:10.1152/ajpcell.00416.2019 (2020).
- 199 Gonzalez, K. C., Losonczy, A. & Negrean, A. Dendritic Excitability and Synaptic Plasticity In Vitro and In Vivo. *Neuroscience* **489**, 165-175, doi:10.1016/j.neuroscience.2021.12.039 (2022).
- 200 Kitsis, R. & Leinwand, L. A. Discordance between gene regulation in vitro and in vivo. *Gene Expression* **2**, 313-318 (1992).
- 201 Lange, F., Hörnschemeyer, J. & Kirschstein, T. Glutamatergic Mechanisms in Glioblastoma and Tumor-Associated Epilepsy. *Cells* **10**, 1226, doi:10.3390/cells10051226 (2021).
- 202 Knierim, E. *et al.* Mutations in plasticity-related-gene-1 (PRG-1) protein contribute to hippocampal seizure susceptibility and modify epileptic phenotype. *Cerebral Cortex* **33**, 7454-7467, doi:10.1093/cercor/bhad051 (2023).

- 203 Das, A. *et al.* MODL-19. Development of a recurrent Glioblastoma murine model following surgical resection- Investigatin the tumor-immune microenvironment to evaluate novel perioperative therapies. *Neuro-Oncology* **25** (2023).
- 204 Liu, F. *et al.* Rapid tumor recurrence in a novel murine GBM surgical model is associated with Akt/PD-L1/vimentin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **569**, 1-9, doi:10.1016/j.bbrc.2021.06.072 (2021).
- 205 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG07* 1-2 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 206 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG10* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 207 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG06* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 208 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG13* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 209 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG05* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 210 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG02* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 211 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG17* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 212 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG15* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 213 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG36* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 214 Linnebacher, M. in *CLS Product Information: HROG04* 1-3 (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 215 Service, C. C. L. in *HROG24 Product sheet - cell line* (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 216 Service, C. C. L. in *HROG38 Product sheet - cell line* (CLS Cell Lines Service GmbH).
- 217 Service, C. C. L. in *HROG59 Product sheet - cell line* (CLS Cell Lines Service GmbH).

VIII. Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe, abgesehen von den Hilfestellungen, auf die in der Danksagung hingewiesen wird, verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle verwendeten Quellen und Werke, die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Saskia Wernsdorf-Scheel

Rostock, 31.03.2025

X. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Prof. Dr. rer. medic. Anja U. Bräuer für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Anatomie im Bereich der Gliomforschung durchführen zu dürfen sowie für die exzellente wissenschaftliche Betreuung als auch die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Die jederzeit kurzfristige Erreichbarkeit, die gemeinschaftliche Herangehensweise bei neuen Fragestellungen und die langfristige Unterstützung haben diese Arbeit zu einer einzigartigen, lehrreichen Erfahrung für mich gemacht. Ich möchte herzlich Prof. Dr. med. Andreas Wree für die Möglichkeiten danken, die er mir mit der Durchführung meiner Dissertation am Institut für Anatomie angeboten hat. Außerdem bin ich ihm und den Körperspendern außerordentlich dankbar für die Zurverfügungstellung humaner Hirngewebeproben. Mein weiterer besonderer Dank gilt Anne Gläser für ihre einzigartige Einführung in die experimentelle Forschung und die Vermittlung des wissenschaftlichen Arbeitens. Ich danke an dieser Stelle auch Dr. rer. nat. Dirk Koczan und Ildiko Toth für ihre Einweisung und Expertise im Bereich der qRT-PCR und die Möglichkeit der Gerätenutzung vor Ort. Dem technischen Angestellten Robin Piecha danke ich für seine fachliche Betreuung und technische Hilfsbereitschaft. Herausragend danken möchte ich PD Dr. med. Arend Koch und seinen Kollegen, deren unangefochtenes Interesse an Forschung die Vision dieser Arbeit durch die Bereitstellung seltener Tumorproben, ins Leben gerufen hat. Besonders danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Andreas Büttner und seinem Team, die eine wissenschaftliche Gegenüberstellung von Kontrollgruppen durch Zurverfügungstellung von humanen Gewebeproben ermöglicht haben. Ferner möchte ich Prof. Dr. med. Timo Kirschstein, Dr. rer. nat. Falko Lange und ihrem Team für ihre herausragende Kooperation, die Bereitstellung der Gewebeproben mit Einblicken in die tierexperimentelle Forschung und die Hilfe bei Fragen zur Statistik danken. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar und ihrem Team für die Bereitstellung einer Tiergewebe-Probe. Besonders danken möchte ich PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher und seinen Kollegen für die außerordentliche Kooperation und Zurverfügungstellung ihrer humanen Zelllinien und die langfristige Unterstützung bei dieser Arbeit. In Gedenken an Dr. rer. nat. Christina Susanne Linnebacher gilt insbesondere ihr dieser Dank, für ihren Enthusiasmus und die Visualisierung der Forschung mit Zellkulturen. Vielen Dank an Dr. rer. nat. Carsten Holzmann, Prof. Dr. med. Ulf Strauß und Dr. rer. nat. Stefan Roth für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen. Für ihre besondere Expertise bei Gliomen und die wissenschaftlichen Diskussionen danke ich Dr. med. Lisa Hönikl. Mein weiterer Dank für ihre wissenschaftliche Unterstützung gilt Dr. rer. nat. Barbara Lohmüller und Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Witt. Außerordentlich danken möchte ich meiner Familie für ihre tatkräftige Unterstützung, insbesondere meinen Eltern und meinem Mann für ihren Zuspruch und ihre Geduld im Verlauf dieser Arbeit.