

Aus der Abteilung Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Überprüfung eines Serumproteinprofils für die Diagnostik von
Glioblastomen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Nawka

aus

Trebišov, Slowakische Republik

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. F. Stockhammer

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Kramm

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Tumoren	7
1.1.1 Hirnmetastasen	8
1.1.2 Glioblastoma multiforme (WHO °IV)	8
1.1.3 Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL)	9
1.2 Hirnabszesse	10
1.3 Multiple Sklerose.....	11
1.4 Differenzialdiagnose intrazerebraler Raumforderungen	11
1.5 Stand der Forschung.....	15
1.6 Untersuchte Serumproteine.....	17
1.6.1 CXCL10/IP-10	17
1.6.2 BMP-2	18
1.6.3 HSP70.....	19
2 FRAGESTELLUNG	20
3 METHODEN.....	21
3.1 Ethikantrag.....	21
3.2 Studiendesign.....	21
3.3 Fallzahlberechnung.....	21
3.4 Patientenauswahl.....	21
3.4.1 Einschlusskriterien	21

3.4.2	Ausschlusskriterien	22
3.4.3	Abbruchkriterien	22
3.5	Sammeln von Proben	22
3.5.1	Blutabnahmen.....	22
3.5.2	Lagerung der Seren	22
3.6	Bestimmung der Serumkonzentrationen mittels ELISA.....	23
3.6.1	Benutzte Materialien	23
3.6.2	Aufbereitung der Seren	24
3.6.3	Durchführung der ELISAs und Berechnung der Serumkonzentrationen.....	24
3.6.3.1	CXCL10/IP-10	24
3.6.3.2	BMP-2	26
3.6.3.3	HSP70.....	28
3.6.4	Vorgehen bei Messfehlern	30
3.7	Auswertung der Ergebnisse.....	30
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Untersuchte Gruppen	31
4.2	Konzentrationen der Serumproteine.....	32
4.2.1	Gesamtergebnis	32
4.2.2	CXCL10/IP-10	34
4.2.3	BMP-2	35
4.2.4	HSP70.....	35
4.3	Anwendung der Regel.....	36
5	DISKUSSION	38
5.1	Multiforme Glioblastome	38
5.2	Proteinauswahl	38
5.2.1	CXCL10/IP-10	39
5.2.2	BMP-2	40

5.2.3	HSP70.....	41
5.3	Validität der Regel von Elstner et al. (2011).....	42
5.4	Schwächen der Methodik	43
5.5	Aussichten	44
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	46
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	47

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, erworbenes Immundefektsyndrom
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
APRIL	a proliferation-inducing ligand
AS	Aminosäure
BMP-2	bone morphogenetic protein 2
cDNA	complementary DNA, komplementär-DNA
CEA	carcino-embryonic-antigen; karzinoembryonales Antigen
CT	Computertomografie
CXCL10	CXC chemokine ligand 10, Synonym IP-10
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSA	digitale Subtraktionsangiografie
EEG	Elektroenzephalographie
EGFR	epidermal-growth-factor-receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FET	Fluorethyltyrosin
GFAP	glial fibrillary acidic protein, „Saures Gliafaserprotein“
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HSP70	heat shock protein 70, Hitzeschockprotein 70
HspBP1	Hitzeschockprotein-70-bindendes Protein
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IP-10	interferon-gamma inducible protein 10 kDa, Synonym CXCL10
KI	Konfidenzintervall

l-CaD	niedrigmolekulares Caldesmon
LOH	loss of heterozygosity; Verlust der Heterozygotie
Met	Metastase
MGMT	O6-Methylguanin-Methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
Pg	Pikogramm
PSA	prostataspezifisches Antigen
PTEN	phosphatase and tensin homology
PZNSL	primäres ZNS-Lymphom
SAGE	serielle Analyse der Genexpression
SD	Standardabweichung
s. o.	siehe oben
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomografie
TGF-β	transforming growth factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
WHO	World Health Organisation

z.B. zum Beispiel
ZNS zentrales Nervensystem
z.Z. zur Zeit

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurden Raumforderungen untersucht, die in der MRT- und CT-Bildgebung eine Kontrastmittelaufnahme mit zentraler Nekrose zeigten. Diese Konstellation stellt einen sehr häufigen Befund dar, bei dem differenzialdiagnostisch unterschiedliche Ätiologien infrage kommen. Eine definitive Diagnose ist insofern unerlässlich, als die Therapie der einzelnen Erkrankungen sehr unterschiedlich ist.

1.1 Tumoren

Die Gruppe der hirneigenen Tumoren ist groß und heterogen. Nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS werden mehrere Entitäten unterschieden. Neben den häufigsten Hirnmetastasen sind das die neuroepithelialen Tumoren (Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome, Plexuspapillome, Pineozytome und weitere), meningealen Tumoren (Meningeome, Hämangiome, Sarkome), primären ZNS-Lymphome, Keimzelltumoren (Germinome, Chorionkarzinom) und Tumoren der Sellaregion.

Die Häufigkeit der intrakraniellen Tumoren wird mit 1:5000 Einwohner pro Jahr angegeben, wobei ihr Anteil an den durch alle Krebserkrankungen bedingten Todesfällen bei 3% liegen dürfte. Obwohl sie in allen Altersstufen auftreten können, findet man eine Häufung im mittleren Lebensalter bis zum frühen Greisenalter (Schirmer 2005).

Im Unterschied zu den meisten anderen Tumorerkrankungen werden, mit Ausnahme der Metastasen sowie der PZNSL, die Hirntumoren nicht mit der sonst üblichen TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt. Es wird die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems angewandt, die zuerst 1979 veröffentlicht und 2007 zum vierten Mal revidiert wurde. Die Hirntumore werden dabei in vier Grade mit steigender Malignität eingeteilt. Diese Einteilung ist einer der wichtigsten prognostischen Parameter und entscheidend für die Therapiewahl (Louis et al. 2007). Grad I betrifft Läsionen mit niedrigem proliferativem Potenzial und der Möglichkeit einer Heilung durch alleinige Resektion. Grad-II-Tumoren sind generell infiltrativ und rezidivieren häufig, obwohl sie nur niedrige proliferative Aktivität zeigen. Manche Grad-II-Tumoren neigen zum Progress im Sinne einer Transformation in einen höhergradigen Tumor. Dies beobachtet man häufig bei Grad-II-Astrozytomen, die sich im Falle eines Rezidivs als anaplastische Astrozytome oder Glioblastome präsentieren (Mikkelsen et al. 1991). Bei WHO-Grad-III-Tumoren findet man histologische Zeichen der Malignität wie Kernatypien und rasche mitotische Aktivität. WHO-Grad-IV-Tumoren sind hochmaligne, mitotisch aktive, infiltrativ wachsende Neoplasien, häufig mit nekrotischen An-

teilen. Sie sind assoziiert mit einem raschen Wachstum und einem fatalen Ausgang. Zu dieser Gruppe gehören neben den Glioblastomen auch die meisten embryonalen Tumoren (Louis et al. 2007).

1.1.1 Hirnmetastasen

In der CT findet man bei Hirnmetastasen meist runde, kontrastmittelaufnehmende Raumforderungen mit oft sehr ausgeprägtem umgebendem Ödem (El Kamar und Posner 2004). Die MRT ist zwar sensitiver, eine Unterscheidung zu primären Hirntumoren ist jedoch nicht immer möglich.

Hirnmetastasen sind bei steigender Inzidenz die häufigsten Tumoren des Gehirns (Mintz und Cairncross 1998). Sie treten bei 15 – 40% aller Tumorerkrankungen auf und sind somit bis zu zehnmal häufiger als primäre Hirntumoren. Oft ist dies die erste Präsentation und in bis zu 15% der Fälle lässt sich kein Primärtumor finden (Polyzoidis et al. 2005). Die meisten Metastasen haben ihren Ursprung in der Lunge und in der Brust. An dritter Stelle stehen die Melanommetastasen, die häufig als Erstsymptom zur Diagnose führen. Bis zu 50% aller Melanompatienten entwickeln Hirnmetastasen (Amer et al. 1978, Patel JK et al. 1978).

Die Behandlung ist oft palliativ und soll die Lebensqualität verbessern. Kortikosteroide mildern die Symptomatik und Antiepileptika sind hilfreich bei Patienten mit Anfällen. Bei multiplen Metastasen erfolgt meist eine Ganzhirnbestrahlung, wogegen bei jungen Patienten in gutem Allgemeinzustand und einer solitären Metastase eine Operation indiziert ist. Ein radiochirurgischer Eingriff stellt hier eine Alternative dar (Wowra et al. 2009, Wowra et al. 2004). Das mediane Überleben beschränkt sich jedoch auf etwa ein halbes Jahr (Guillamo et al. 2008).

1.1.2 Glioblastoma multiforme (WHO °IV)

Das Glioblastom ist der häufigste und gleichzeitig einer der bösartigsten primären Hirntumoren. Es ist mit 65% der Häufigste in der Gruppe der Gliome, die ihrerseits über 70% aller Hirntumoren ausmachen (Ohgaki und Kleihues 2005). Typisch sind eine zentrale Nekrose, eine hohe Rate an Neovaskularisation und endothelialer Proliferation sowie das Auftreten in der weißen Substanz des Großhirns, wo Glioblastome auch infiltrativ weiterwachsen (Scherer 1940).

Die primäre Behandlungsmethode für Glioblastome besteht in einer möglichst kompletten Resektion des kontrastmittelaufnehmenden Tumors, ohne dass dem Patienten ein neues neurologisches Defizit zugefügt wird (Lacroix et al. 2001, Stummer et al. 2008).

Standard bei der Resektion von Glioblastomen ist die fluoreszenzgestützte Resektion. Dazu muss der Patient 5-ALA (Gliolan ®) oral 2-4 Stunden präoperativ einnehmen (€ 980,-) (Stummer et al. 2006). Ferner hat sich die präoperative FET-PET-Untersuchung zur Bestimmung der Tumorausdehnung etabliert (Stockhammer et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht durch eine möglichst weitgehende Resektion des Tumors unter Schonung der neurologischen Funktion durch eine Wachkraniotomie. Diese Methode wird jedoch häufiger bei niedrig-gradigen Hirntumoren angewandt (Szelenyi et al. 2010).

Eine Resektion im Gesunden ist bei diesen Neoplasien wegen des infiltrativen Wachstums nicht möglich, sodass nach einer alleinigen Operation mit einem Rezidiv/Progress zu rechnen ist. Eine Operation ist dennoch indiziert, wenn der kontrastmittelaufnehmende Tumoranteil komplett entfernt werden kann oder der Patient durch die raumfordernde Wirkung unmittelbar zu sterben droht (Nazzaro und Neuwelt 1990, Stummer et al. 2008). Standardmäßig schließt sich an die Resektion eine Radio- und/oder Chemotherapie an. Bei der Radiotherapie wird der Tumor lokal mit einer Gesamtdosis von 50 - 60 Gy bestrahlt (Heesters et al. 2003). Im Rahmen der Chemotherapie hat sich die Behandlung mit dem oralen alkylierenden Zytostatikum Temozolomid zum Standard entwickelt (Stupp und Roila 2009, Weller 2008).

Das mediane Überleben von Patienten mit einem Glioblastom unter kombinierter Radiochemotherapie liegt bei 14,6 Monaten und nur 16 % leben länger als 3 Jahre (Stupp et al. 2009). Die wichtigsten prognostischen Faktoren sind das Alter und der Karnofsky-Index bei Diagnosestellung (Krex et al. 2007).

1.1.3 Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL)

In den CT-Aufnahmen nehmen die PZNSL homogen Kontrastmittel auf, bei AIDS-Patienten finden sich häufig mehrere Läsionen mit einer zentralen Nekrose wie bei einem Glioblastom (Johnson et al. 1997, Poon et al. 1989). Auch in den MRT-Untersuchungen ist eine Unterscheidung von einem Gliom nicht immer möglich. Dies macht eine Biopsie in der Regel notwendig (Buhring et al. 2001, Haque et al. 2008, Soussain und Hoang-Xuan 2009, Zhang D et al. 2010).

Die primären ZNS-Lymphome machen etwa 4 – 7% aller primären Hirntumoren aus (Shah und DeAngelis 2005) und treten gehäuft bei Patienten mit AIDS auf. Es handelt sich meist um B-Zell-non-Hodgkin-Lymphome. Die charakteristischen Lokalisationen sind das Corpus callosum, die Basalganglien und der periventrikuläre Raum.

Eine operative Resektion ist bei Patienten mit PZNSL nicht indiziert, da sich die Prognose dadurch nicht verbessern lässt und sich kein zusätzlicher Nutzen gegenüber einer alleinigen Biopsie ergibt (Batchelor und Loeffler 2006, Gerstner und Batchelor 2007). Zusätzlich wachsen Lymphome oft infiltrativ und können multifokal auftreten (Bellinzona et al. 2005). Die Behandlung sollte im Rahmen klinischer Studien erfolgen. Bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, wird eine kurative Polychemotherapie durchgeführt. Ein wichtiger Bestandteil ist die hochdosierte Methotrexattherapie. Zeitversetzt folgt die Ganzhirnbestrahlung mit 45 Gy plus Tumorboost (Pels und Schlegel 2006, Schlegel 2009). Insgesamt kann ein medianes Überleben von 40 bis 60 Monaten erreicht werden (Yamanaka und Tanaka 2004). Bei bis zu 50% aller Patienten unter 60 Jahren ist eine Heilung möglich (Juergens et al. 2010).

1.2 Hirnabszesse

In den üblichen CT- und MRT-Aufnahmen zeigen sich Hirnabszesse als ein Rundherd mit hoher ringförmiger Kontrastmittelanreicherung und umgebendem Ödem, was die Unterscheidung zu einem Glioblastom mit zentraler Nekrose schwierig macht.

Hirnabszesse sind abgekapselte entzündliche Rundherde, die in den meisten Fällen durch Bakterien im Großhirn gebildet werden. Prädisponierend sind eine Immunsuppression sowie kongenitale Herzfehler. Bei immunsupprimierten Patienten können auch Parasiten und Pilze wie Toxoplasma oder Candida diese Erkrankung hervorrufen. Durch diese Raumforderung kommt es auch zu einem Druckanstieg und Ödembildung, was, je nach Lage, verschiedene Beschwerden auslöst. Die Inzidenz liegt bei etwa 1/500 000/Jahr (Scharfetter und Sonnabend 1980).

Anhand der Ätiologie kann man drei Arten von Hirnabszessen unterscheiden. Am häufigsten ist die direkte Ausbreitung als Folge einer Sinusitis oder Otitis. Zweitens entstehen Abszesse nach offenen Schädel-Hirn-Traumata oder nach chirurgischen Eingriffen. Letztlich gibt es auch die Möglichkeit der hämatogenen Aussaat von Keimen, meist bei einer Endokarditis oder pulmonaler Infektion (Calfee und Wispelwey 2000). Letztere stellen eine veritable Differenzialdiagnose zu o.g. zerebralen Raumforderungen dar.

Ein richtungsweisender Hinweis der präoperativen Diagnostik ist bei Hirnabszessen besonders wertvoll, da die Behandlungsmethode der Wahl die umgehende Aspiration ist (Moorthy und Rajshekhar 2008). Nicht nur wird dadurch der Abszess entleert und der raumfordernde Effekt verringert, der eventuelle Nachweis des Erregers und deren Resistenzbestimmung ist der entscheidende Schritt zur effektiven und erfolgreichen Therapie. Nicht zuletzt durch die

gerechte kombinierte Antibiotikatherapie über mehrere Wochen bis Monate werden die meisten Patienten heutzutage ohne bleibende neurologische Ausfälle geheilt. Die Letalität beträgt 5 – 10% (Hakan 2008).

1.3 Multiple Sklerose

Die Diagnostik einer Multiplen Sklerose ist nicht einfach und setzt sich aus dem klinischen Bild, der MRT-Bildgebung und der Liquordiagnostik zusammen. Klassischerweise zeigen sich in den T2-gewichteten MRT-Aufnahmen meist multiple hyperintense Läsionen der weißen Substanz, die Kontrastmittel aufnehmen. Jedoch können sich auch Läsionen mit ringförmiger Kontrastmittelaufnahme zeigen, die den o.g. Läsionen differenzialdiagnostisch entgegengesetzt werden können (Bruck et al. 1997). Oft findet sich bei großen Herden ein sogenannter "offener Ring" der Kontrastmittelaufnahme, der bei der Abgrenzung der MS gegenüber Neoplasien und einer Infektion behilflich sein kann (Masdeu et al. 2000). Bei der Elektrophorese des Liquors kann man so genannte oligoklonale Banden finden, die durch das Vorhandensein von IgG entstehen.

Die Multiple Sklerose ist eine demyelinisierende Erkrankung der weißen Substanz des Hirns, des Nervus opticus und des Rückenmarks. Die Inzidenz liegt in Mitteleuropa bei 3-7/100.000, die Prävalenz bei 30-60/100.000 Einwohnern (Poeck und Hacke 2006). Ihre Ätiologie ist bis heute nicht sicher geklärt. Im Rahmen eines lokalen entzündlichen Prozesses werden die Myelinscheiden zerstört und es entstehen sogenannte Plaques im Marklager, die sehr unterschiedliche neurologische Ausfälle verursachen. Meist wird der Sehnerv frühzeitig betroffen, sodass es zu einer Visusstörung und Doppelbildern kommt. Spastische Paraparese und Blasenstörung sind auch häufig vorhanden.

Die Therapie der Multiplen Sklerose wird medikamentös durchgeführt. Zu den eingesetzten Präparaten gehören Kortikoide, Cyclophosphamid, Mitoxantron sowie andere Immunmodulatoren. In lebensbedrohlichen Fällen kommt die Plasmapherese zum Einsatz. Die Prognose kann ganz unterschiedlich sein und reicht von einem oder wenigen Schüben bis zu einem chronischen schnell fortschreitenden Verlauf (Poeck und Hacke 2006).

1.4 Differenzialdiagnose intrazerebraler Raumforderungen

Die Anamnese und eine komplette klinische und neurologische Untersuchung können einen entscheidenden Hinweis auf die Ätiologie der Raumforderung liefern, zur Diagnosestellung allein reichen sie jedoch nicht. Die Symptomatik der Patienten hängt bei supratentoriellen Raumforderungen von der Lokalisation im Großhirn und der Wachstumsgeschwindigkeit ab.

Es können durch die raumfordernde Wirkung, ein perifokales Ödem sowie eine Infiltration Störungen der Motorik, Sensibilität, des Seh- und Sprachvermögens, Störungen der kognitiven Fähigkeiten und der Vigilanz, eine Persönlichkeitsveränderung sowie epileptische Anfälle auftreten. Bei einer Verlegung der Liquorpassage, vor allem bei infratentoriellen Raumforderungen, sind Kopfschmerzen, Übelkeit mit Erbrechen und eine Stauungspapille bis zur Vigilanzminderung typisch. Infektzeichen, Immunsuppression sowie vorangegangene Infektionen (v.a. im HNO-Bereich, Endokarditis und Lungeninfektionen) machen einen Hirnabszess wahrscheinlicher, deren Abwesenheit schließt diesen jedoch nicht aus. Das Vorliegen eines bekannten Tumorleidens spricht für einen metastatischen Ursprung der Raumforderung, Zweittumore sind aber keine Seltenheit.

Bei der Diagnostik ist die moderne Bildgebung unverzichtbar. Das Hauptaugenmerk liegt dabei neben der Computertomografie (CT) als Notfalldiagnostik in der Magnetresonanztomografie (MRT). Zur erweiterten Bildgebung stehen die digitale Subtraktionsangiografie (DSA), die Positronen-Emissions-Tomografie (PET), die Single-Photon-Emissions-Computertomografie (SPECT) sowie die MR-Spektroskopie zur Verfügung.

In der CT-Untersuchung zeigt sich das Glioblastom (ähnlich wie eine Metastase, Abszess oder ein Lymphom bei immunsupprimierten Patienten) als eine hypodense Raumforderung mit einer starken randständigen Kontrastmittelaufnahme, verursacht durch die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. In den Nativaufnahmen zeigt sich zunächst eine inhomogene Gewebedichte mit einem fingerförmigen Marklagerödem. Typisch ist ein unruhiges Gewebemuster mit einer Massenverschiebung. Nicht selten finden sich auch Einblutungen.

Ähnlich verhält sich das Glioblastom in der MRT. Bei den T1-gewichteten MRT-Aufnahmen mit Kontrastmittel erscheint es hypointens und mit einer ringförmigen Kontrastaufnahme. Das schwache Signal im Zentrum der Läsion entspricht einer Nekrose. Die T2-gewichteten Aufnahmen zeigen hohe Intensitätsveränderungen, die weit über die Größe des Tumors hinausgehen, verursacht durch das umgebende Ödem des Hirngewebes (Jansen et al. 2008). T2*-gewichtete Bilder verbessern den Nachweis von Melanometastasen und können zusammen mit T1-gewichteten Sequenzen bei der Abgrenzung zu anderen Tumoren hilfreich sein (Gaviani et al. 2006). Durch die dynamische CT-Perfusion lassen sich Lymphome von Glioblastomen unterscheiden, da sie keine Erhöhung des zerebralen Blutvolumens zeigen, welches für Glioblastome aber typisch ist. Metastasen wurden in dieser Studie nicht untersucht (Schramm et al. 2010). Man sieht, dass durch diese diagnostischen Methoden allein keine definitive Diagnosestellung möglich ist (siehe auch Abbildung 1.1). Für niedrig-gradige

Astrozytome konnte eine 50%ige falsch positive Vorhersage des histologischen Grades mittels CT- und MRT-Untersuchungen gezeigt werden. Bei neu aufgetretenen zerebralen Raumforderungen ist daher eine histologische Diagnose Goldstandard (Kondziolka et al. 1993).

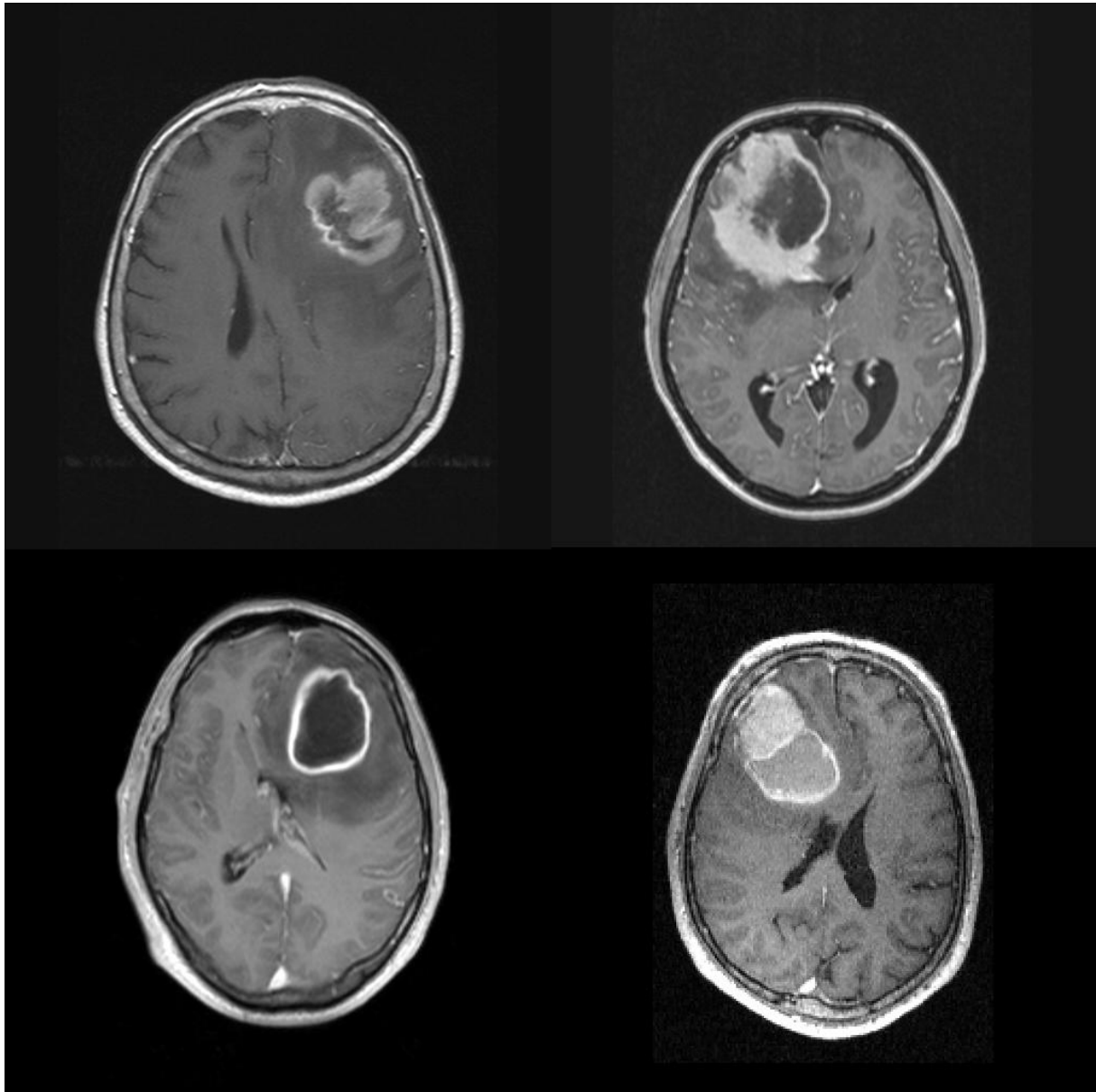


Abb. 1.1: Initiale kontrastmittelgestützte MRT-Bilder unterschiedlicher Entitäten: links oben: B-Zell-Lymphom; rechts oben: B-Zell-Lymphom; links unten: Abszess; rechts unten: Melanommetastasen

Dank der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) können chemische Stoffe wie N-Acetylaspartat, Cholin oder Kreatin quantitativ dargestellt werden. Mit dieser Methode konnte in einer Studie mit einer 84,2%igen Trefferquote zwischen neoplastischen (Astrozytome WHO° II-IV) und nicht-neoplastischen (Hirnfarkte, entzündliche und demyelinisierende

Prozesse) Hirnläsionen unterschieden werden. Ein Vergleich zwischen Glioblastomen und Hirnmetastasen wurde nicht durchgeführt (Hourani et al. 2008).

Glioblastome und Hirnabszesse kann man mit der MRS mit einer Sicherheit von ca. 90% unterscheiden (Lai et al. 2008). Mithilfe diffusionsgewichteter MR-Sequenzen kann mit einer Sensitivität von 78% und einer Spezifität von 96% ein abgekapselter Hirnabszess diagnostiziert werden (Fertikh et al. 2007). Ein wichtiges diagnostisches Mittel, auch wenn nicht obligatorisch vorhanden, ist die Erhöhung der Infektparameter wie Fieber sowie das C-reaktive Protein, die Leukozytenzahl und die Blutsenkungsgeschwindigkeit, die jedoch bei 10 - 20% der Patienten mit abgekapselten Hirnabszessen normal sein können (Nau und Behnke-Mursch 1999).

Eine weitere wichtige diagnostische Modalität bei der Glioblastom-Diagnostik ist die Positronen-Emissions-Tomografie (PET). Bei der Fluorodeoxyglukose-PET (F-18-FDG-PET), der Fluoroethyltyrosin-PET (F-18-FET-PET) oder der Jod-123-Alpha-Methyl-Tyrosin-SPECT (¹²³IMT-SPECT) zeigt das Glioblastom normalerweise so genannte „heiße“ Herde als Zeichen einer hohen metabolischen Aktivität und des vermehrten Transports von Aminosäuren. Das Ausmaß dieser Veränderungen ist ebenfalls hilfreich bei der präoperativen Planung zur Bestimmung der Tumorausdehnung. Eine MR-PET soll in der Zukunft die Darstellung noch deutlich verbessern (Klasner et al. 2010). Eine Unterscheidung zwischen Tumoren und nicht-neoplastischen Veränderungen ist jedoch aufgrund der mangelnden Spezifität der PET nicht möglich (Floeth et al. 2006).

In unklaren Fällen oder bei Inoperabilität schließt sich der bildgebenden Diagnostik eine diagnostische Biopsie an. Diese ist ein invasiver Eingriff, der stereotaktisch, navigationsgestützt oder im Rahmen einer Probeexzision über eine Kraniotomie erfolgen kann. Es handelt sich um einen operativen Eingriff, der als solcher auch entsprechende Gefahren birgt. In 0,9 bis 10% der stereotaktischen Biopsien kommt es zu einer symptomatischen Einblutung (10 - 68% für asymptomatische Blutungen), die Mortalitätsrate liegt bei ca. 0 - 1,7% (Bernstein und Parrent 1994, Kreth et al. 2001). Bei den navigierten rahmenlosen Biopsien treten bei 4 bis 8% aller Patienten neue neurologische Defizite auf (Ali et al. 2009). Bei einer Biopsie über eine Kraniotomie erhöht sich das Risiko einer tiefen Wundinfektion auf 4,3%, das Risiko einer Osteomyelitis des Knochendeckels beträgt ca. 1% (Balch 1967, Tenney et al. 1985).

Zwar können die Effektivität und Wichtigkeit bei der Diagnosestellung und Therapieplanung dieser speziellen bilddiagnostischen Untersuchungen nicht bestritten werden, aber sie sind z.Z. noch sehr teuer und nicht flächendeckend verfügbar. Eine kostengünstige und praktikable

Serumdiagnostik (im Anschluss an eine MRT) könnte die Kosten weiterer Untersuchungen ersparen.

1.5 Stand der Forschung

Ein wichtiges Ziel in der Onkologie ist die Etablierung nicht- oder minimal-invasiver Methoden für die Frühdiagnostik. Das Blut scheint dabei sehr hilfreich zu sein, da es wenig invasiv gewonnen werden, seine Komponenten dynamisch sind und die gelösten Proteine und Peptide optimale Biomarker darstellen (Somasundaram et al. 2009).

Keines der im Patientenserum nachweisbaren Proteine zeigte bis jetzt ausreichende diagnostische oder prognostische Eigenschaften als Tumormarker. Erwähnenswert sind hier z.B. die Chemokine und Chemokinrezeptoren CXCL12 bzw. CXCR4, das YKL-40-Protein, die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) sowie das Haptoglobin α_2 . Bisherige Studien zeigten bereits erste Erfolge, größere retro- sowie prospektive Studien im Vergleich zu anderen Hirnprozessen sind jedoch notwendig, um die Wertigkeit dieser Proteine zu überprüfen. Für den Einsatz im klinischen Alltag sind sie zurzeit sicherlich noch nicht geeignet (Hormigo et al. 2006, Iwadate et al. 2008, Johansen et al. 2006, Kumar et al. 2010, Savarin-Vuaillet und Ransohoff 2007).

Elstner, Stockhammer und Kollegen führten Untersuchungen zur Identifikation von diagnostischen Serumproteinprofilen bei Glioblastompatienten durch (Elstner et al. 2011). Als Grundlage wurden die in letzter Zeit durch die Profilierung der Gen- und Proteinexpression im Tumorgewebe gewonnenen Erkenntnisse genutzt (Furuta et al. 2004, Iwadate et al. 2004, Liang et al. 2005). Das Ziel war es, mit deren Hilfe nach neuen serumbasierten diagnostischen Profilen für die Diagnostik und Verlaufskontrollen bei Patienten mit einem Glioblastom zu suchen. Die Sensitivität des Profils ist dabei wichtiger als die Spezifität, denn auch wenn ein Test hochspezifisch ist, aber viele Erkrankte nicht erkennt, ist er im klinischen Alltag unbrauchbar.

Die potenziell überexprimierten Gene in Astrozytom-Zellen wurden mittels der Expressionsprofile in der Database der seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) identifiziert. Dabei wurde das Gene Expression Displayer Tool benutzt (Kavsan et al. 2005). Es wurden 328 mRNA-Moleküle gefunden, die in den Glioblastomen hoch über- oder unterexprimiert im Vergleich zum gesunden Hirngewebe waren. Davon wurden 36 als potenziell Astrozytom-sezernierte Proteine identifiziert. Weitere 32 Proteine wurden aus den bereits publizierten Genexpressionsdaten der Gliome identifiziert. Aus dem Pool der 68 Kandidatenproteine wurden anhand der Verfügbarkeit von entsprechenden Nachweisverfahren 14 ausgewählt. Zu den

Proteinen gehörten HSP70, BMP-2, RBP4, IGFBP3, TSP1, CXCL10, CX3CL1, MDK, TNF- β , SCF, IL-1 α , PF4, Serotonin und FABP7.

Es wurden 23 Patienten mit diagnostizierter Glioblastom-Erkrankung und 9 gesunde Probanden untersucht. Die Konzentrationen der ausgewählten Proteine wurden in dem Serum des präoperativ entnommenen peripheren Vollblutes der Patienten mittels kommerziell erhältlichen ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse wurden dann mithilfe der Methoden des Data Mining sowie Bootstrapping berechnet.

Es wurden erhöhte Serumkonzentrationen bei GBM-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen bei den Proteinen HSP70, RBP4, Serotonin und SCF gefunden. Erniedrigte Werte fand man für CXCL10. Leichte Unterschiede gab es bei BMP-2, TSP2, MDK, PF4 und CX3CL1. Keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab es bei IGFBP3, IL-1 α und TNF- β . Bei FABP7 waren die Ergebnisse mit den benutzten Antikörpern nicht reproduzierbar. Es fand sich keine Korrelation zwischen der Tumorgröße (bestimmt im Rahmen der MRT-Diagnostik) und der Konzentration der untersuchten Proteine. Es wurden Grenzwerte für die maximale Unterscheidung zwischen Kontrollen und GBM-Patienten für 8 Proteine gefunden (BMP-2, HSP70, IGFBP3, TSP1, RBP4, MDK, CX3CL1 und CXCL10). Keines der einzelnen Proteine besaß die Eigenschaft, mit brauchbarer Spezifität und Sensitivität zwischen den Kontrollen und den GBM-Patienten zu unterscheiden.

Die Grenzwerte der Konzentrationen wurden anschließend für die Identifikation der Proteinprofile mittels Assoziationsanalyse benutzt. Das Serumprofil, bestehend aus den Faktoren BMP-2, CXCL10 und HSP70, war mit der GBM-Erkrankung assoziiert (siehe Abbildung 1.2).

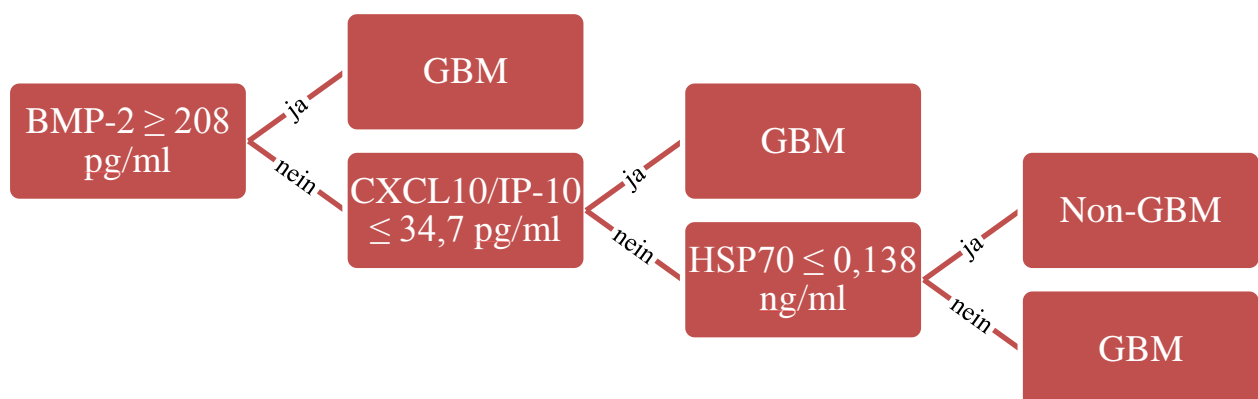


Abb. 1.2: Regel von Elstner et al. (2011) zur Diagnostik von Glioblastomen mit Hilfe der Serummarker

Dieses Profil ordnete 96% der GBM-Patienten und 89% der Kontrollen mittels Bootstrap-Validierung richtig zu (siehe Tabelle 1.1).

Tab. 1.1. Ergebnistabelle der Arbeit mit der Regel von Elstner et al. (2011)

		Diagnose		Gesamt
		Glioblastom	Non-GBM	
Ergebnis Regel	Glioblastom	22	1	23
	Non-GBM	1	8	9
Gesamt		23	9	32

Diese Studie zeigte, dass ein robustes Serumprofil für GBM mittels Data-Mining in einer relativ kleinen Studienkohorte zu identifizieren ist. Die Ergebnisse waren die Basis für die Validierung an einem größeren und klinisch relevanten Untersuchungskollektiv, da die Patienten der Kontrollgruppe andere zerebrale Läsionen aufweisen.

1.6 Untersuchte Serumproteine

1.6.1 CXCL10/IP-10

IP-10 (*interferon-gamma inducible protein 10 kDa*), auch bekannt als CXCL10, wird in einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf IFN- γ und Lipopolysaccharide induziert. Es ist ein pleiotropes Molekül, das auf aktivierte T-Zellen und Monozyten wirkt, besitzt jedoch keine chemotaktische Aktivität für neutrophile Granulozyten (Taub et al. 1993, Taub et al. 1995). IP-10 inhibiert die Formation der Knochenmark-Kolonien und die Angiogenese (Angiolillo et al. 1995, Sarris et al. 1993). Es kann auch die natürlichen Killer-Zellen und die T-Zell-Migration stimulieren und reguliert die T-Zell-Reifung und die Expression von Adhäsionsmolekülen (Neville et al. 1997).

Die IP-10-cDNA kodiert ein 98-Aminosäuren(AS)-Vorläuferprotein mit einem 21-AS-Signalpeptid, das gespalten wird, um ein reifes 77-AS-Protein zu bilden (Luster et al. 1985).

Die IP-10-mRNA wird in aktivierten T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Splenozyten, Keratinozyten, Osteoblasten, Astrozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert (Hua und Lee 2000). Sie wird ebenfalls im Rahmen verschiedener Erkrankun-

gen exprimiert. Dazu gehören z.B. entzündliche Hauterkrankungen, kutane T-Zell-Lymphome sowie die HIV-Infektion. Die IP-10-Expression kann zu der Akkumulation von aktivierten T-Zellen in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit bei HIV-infizierten Personen beitragen (Kolb et al. 1999).

Die IP-10-Expression ist signifikant erhöht in Astrozyten im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Xia et al. 2000). Astrozyten, die IP-10 exprimieren, sind mit senilen Plaques assoziiert. Außerdem werden in Astrozyten unter gleichzeitigem Einfluss von IFN- γ und TNF- α erhöhte Mengen von IP-10-mRNA akkumuliert (Majumder et al. 1998). Eine erhöhte CXCL10-Produktion in Gliomzellen wurde ebenfalls gezeigt (Maru et al. 2008). Der Rezeptor für IP-10, CXCR3, kann an Neuronen und neuronalen Prozessen in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Hirnregionen gefunden werden.

1.6.2 BMP-2

Das *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2, früher bekannt als BMP-2A) ist Mitglied der *transforming growth factor beta* (TGF- β)-Superfamilie (Wozney et al. 1988). BMPs wurden ursprünglich als Proteinregulatoren der Knorpel- und Knochenformation identifiziert. Sie greifen in die Embryogenese und Morphogenese verschiedener Gewebe und Organe ein. Sie können das Wachstum, die Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose unterschiedlicher Zelltypen regulieren, inklusive mesenchymaler, epithelialer, hämatopoetischer und neuronaler Zellen. BMP-2 hat pleiotrope Funktionen wie Organogenese, Knochenformation und -regeneration und Regulation der Formation der sich entwickelnden Extremitätenknospen. Das rekombinante humane BMP-2 besitzt potente ektopische Knochenformationsaktivität (Leong und Brickell 1996, Reddi 1994, Reddi 1998, Riley et al. 1996, Wozney 1989, Wozney 1992).

Jedes BMP wird als ein Vorläuferpeptid synthetisiert, zur reifen Form verarbeitet und anschließend als ein Dimer sekretiert. Es gibt sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit gleicher, wenn nicht sogar gesteigerter, biologischer Aktivität (Mehler et al. 1997, Sampath et al. 1990). BMP-2 ist ein glykosyliertes 396-AS-Polypeptid, zusammengesetzt aus einer 19-AS-Signalsequenz, einer 263-AS-Pro-Region und einem reifen 114-AS-Segment (Wozney et al. 1988).

BMPs sind wichtige Signalmoleküle für Prozesse der embryonalen Entwicklung. Die Differenzierung von Knorpel und Knochen beinhaltet eine Reihe von Vorgängen, die direkt durch BMPs beeinflusst werden. Ein Knockout des BMP-2-Gens bei Mäusen führt zum Tod des Embryos (Reddi 1994). Die enchondrale Knochenformation ist nicht nur für die

Extremitätenformation während der Embryogenese notwendig, sondern auch erforderlich für das longitudinale Knochenwachstum im postnatalen Leben und die Knochenregeneration nach Verletzungen. BMP-2 wird in der Wachstumsplatte exprimiert und reguliert dort die Chondrogenese, indem es die Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten induziert (De et al. 2001, Erickson et al. 1997).

Immunhistochemisch konnten bereits signifikant erhöhte Werte der BMP-2-Expression in Gliomen im Vergleich zum gesunden Hirngewebe nachgewiesen werden. Die Stärke der Expression korreliert sowohl mit dem Malignitätsgrad der Gliome (WHO °I und °II vs. WHO °III und °IV) als auch mit der Prognose und der medianen Überlebenszeit (Liu et al. 2009, Zhang MY et al. 2009).

1.6.3 HSP70

Das HSP70 (Hitzeschockprotein 70) ist ein molekulares Chaperon, dessen Expression dann induziert wird, wenn die Zellen oder der Organismus verschiedenen Formen von Stress exponiert werden. Es verhindert die Proteinaggregation und fördert die Rückfaltung von Proteinen, die durch Umweltbelastungsfaktoren, Pathogene oder im Rahmen von Erkrankungen beschädigt wurden. Die Aktivität von HSP70 ist essenziell für das Zellüberleben und die Erholung unter Stresskonditionen wie auch für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion im Normalzustand (Bukau et al. 2006, Mayer und Bukau 1998, Mayer und Bukau 2005).

HSP70 spielt eine Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen und physiologischen Prozessen wie Hyperthermie, Hypertension, Exposition gegenüber chemisch-toxischen Agenzien, Ischämie, Entzündung, Autoimmunität, Apoptose, Krebs, Organtransplantation, bakterielle und virale Infektionen, Altern, Spermatogenese, Menstruation und physische Aktivität (Chen et al. 1999, Delogu et al. 1997, Dix et al. 1998, Eddy 1999, Feige und van Eden 1996, Gabai et al. 1998, Gray et al. 1999, Heydari et al. 1994, Jaattela 1999, Jacquier-Sarlin et al. 1994, Kilgore et al. 1998, Komatsu et al. 1997, Li et al. 1995, Lovis et al. 1994, Mehta et al. 1997, Nishimura et al. 1997, Perdrizet et al. 1999, Santoro 1994, Witzmann et al. 1996).

Immunhistochemische Analysen konnten zeigen, dass das Hitzeschockprotein-70-bindende Protein (HspBP1) in höhergradigen Gliomen im Vergleich zum normalen Hirngewebe übermäßig exprimiert wird. Es interagiert mit multiplen Proteinen aus der HSP70-Familie und bindet spezifisch an die Oberfläche von Hirntumorzellen (Graner et al. 2009).

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war, ein diagnostisches Hilfsmittel zu finden, das helfen kann, zwischen Glioblastomen und deren Differenzialdiagnosen zu unterscheiden. Elstner, Stockhammer und Kollegen konnten 2011 ein Serumprofil bestehend aus drei im peripheren Blut bestimmbar Proteinen identifizieren, das in einer relativ kleinen Untersuchungsgruppe zwischen Hirngesunden und Patienten mit Glioblastomen unterscheiden konnte. Dieses Profil sollte nun klinisch an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Zusätzlich sollten in der Kontrollgruppe keine Hirngesunden sein, sondern Patienten mit anderen Hirnläsionen, die in der MRT einem Glioblastom ähnlich sehen. Dies ist besonders für den klinischen Alltag relevant. Die konkrete Fragestellung lautete deshalb: Kann man mithilfe eines Serummarkerprofils, bestehend aus CXCL10/IP-10, BMP-2 und HSP70, präoperativ ein Glioblastom mit einer hohen Sensitivität und ausreichenden Spezifität von anderen zerebralen Raumforderungen abgrenzen?

3 Methoden

3.1 Ethikantrag

Am 08.08.2006 wurde bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Charité, Arbeitsausschuss II Virchow-Klinikum, ein Antrag zur Beurteilung des medizinischen Forschungsvorhabens im Fachbereich Humanmedizin gestellt. Der Verantwortliche Leiter des Vorhabens war Dr. med. Florian Stockhammer von der Charité Campus Virchow-Klinikum. Die Studie wurde von der Ethikkommission am 10.10.2006 (EA2/093/06) genehmigt.

3.2 Studiendesign

Es handelt sich um eine geschlossene unizentrische Studie. Die Studie wurde am Campus Virchow-Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Der Beginn der Studie war am 01.05.2006.

3.3 Fallzahlberechnung

Für die Serumregel wird eine Sensitivität, ein Glioblastom zu erkennen, von $\pi = 0,95$ angenommen. Das 95%-Konfidenzintervall soll mit $d = 0,05$ angenommen werden. Es resultiert eine benötigte Fallzahl von

$$N \approx (z_{1-\alpha/2})^2 \pi (1 - \pi) / d^2$$

$$N \approx 1,96^2 (0,95)(1-0,95)/(0,05)^2$$

$$N \approx 73$$

3.4 Patientenauswahl

Die Patienten wurden an der Klinik für Neurochirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert.

3.4.1 Einschlusskriterien

Für die Teilnahme an der Studie mussten alle folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Patientenalter > 18 Jahre
- In der präoperativen MRT-Diagnostik Nachweis einer intrazerebralen Raumforderung, die differenzialdiagnostisch an ein Glioblastom WHO °IV denken lässt (Raumforderung mit Kontrastmittelaufnahme und zentraler Nekrose)
- Postoperative pathologisch-anatomische Untersuchung einer Tumorgewebeprobe

- Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung des Patienten vor der Blutentnahme

3.4.2 Ausschlusskriterien

Bei Vorliegen von mindestens einem der folgenden Kriterien wurden die Patienten aus der Studie ausgeschlossen:

- Diagnose eines Oligodendroglioms oder eines Astrozytoms WHO °I-III
- Vorliegen einer Anämie
- Stillende, Schwangere und Frauen, bei denen eine Schwangerschaft nicht sicher ausgeschlossen werden kann
- Nicht geschäftsfähige Personen und Personen in behördlicher oder gerichtlicher Verwahrung

3.4.3 Abbruchkriterien

Folgende Patienten wären aus der Studie im Verlauf ausgeschlossen worden:

- Patienten, die im Verlauf der Studie ihre Einwilligung zurückgezogen hätten

3.5 Sammeln von Proben

3.5.1 Blutabnahmen

Allen Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllt haben (ausgenommen die postoperativen pathologisch-anatomischen Untersuchungen einer Tumorgewebeprobe) und bei denen eine Operation oder Biopsie der zerebralen Raumforderung durchgeführt werden sollte, wurden zeitnah zu den kontrastmittelgestützten MRT-Aufnahmen 18 ml Blut abgenommen. Die Abnahme erfolgte aus dem peripheren Blut mittels zweier Serumröhrchen ohne Zusatz, auf deren Innenwand Silikapartikel als Gerinnungsaktivator aufgesprüht waren. Das Blut wurde zunächst für 20 min stehen gelassen, um eine komplette Gerinnung zu erreichen. Anschließend wurde das geronnene Blut in den Serumröhrchen in einer Hettich Universal 320 R Tischzentrifuge bei 5000 U/min für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Serumüberstand abgenommen und in zwei sterile 5-ml-Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden mit dem Patientennamen, Geburtsdatum sowie dem Abnahmedatum versehen.

3.5.2 Lagerung der Seren

Alle Kryoröhrchen mit den Patientenseren wurden unmittelbar nach dem Zentrifugieren und Umfüllen aufsteigend nach dem Abnahmedatum in 10x10-Kryo-Boxen aus Karton einsortiert

und in diesen in einem Tiefstkuhlschrank bei -80°C gelagert. Die Zeit zwischen Abnahme und Einfrieren des Serums betrug zwischen etwa 30 Minuten und 8 Stunden. Die Lagerzeit bei -80°C betrug 1 bis 32 Monate.

3.6 Bestimmung der Serumkonzentrationen mittels ELISA

3.6.1 Benutzte Materialien

Tabelle 3.1 zeigt die Geräte und Materialien, die neben der üblichen Laborausstattung in folgenden Abschnitten benutzt wurden.

Tab. 3.1 Benutzte Materialien

Material	Hersteller
15-ml-Falcon™-Röhrchen	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
1,5-ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research® Pro	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette Research®	Eppendorf, Hamburg
Laborzentrifuge 3K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Horizontalschüttler HS 250 basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kreisschüttler MS 2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
ELISA-Mikroplatten-Lesegerät Model 680 Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software Microplate Manager Version 5.2 Build 103	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software GraphPad Prism® Version 5.00	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Vereinigte Staaten

3.6.2 Aufbereitung der Seren

Bevor die Serumkonzentrationen der ausgewählten Proteine gemessen werden konnten, wurden die tiefstgekühlten Patientenserum auf folgende Weise vorbereitet:

Zunächst wurden für jeden Patienten 1 15-ml-Falconröhrchen und 12 leere 1,5-ml-Reaktionsgefäße mit der Patientenummer beschriftet. Danach wurden die jeweils zwei 5-ml-Kryoröhrchen mit dem bei -80°C tiefstgekühlten Patientenserum in einem Wasserbad bei ca. 21°C aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt beider Kryoröhrchen eines Patienten in ein vorbeschriftetes Falconröhrchen umgefüllt. Dieses wurde mit dem Kreisschüttler kurz mit 1500 Umdrehungen pro Minute geschüttelt und unmittelbar darauf auf 0°C Eis gelagert. Jetzt wurde das Patientenserum in die vorbeschrifteten Reaktionsgefäße aliquotiert. Dabei wurden in jedes Reaktionsgefäß 0,5 ml Patientenserum eingefüllt. Je nach Menge des Patientenserums konnten für jeden Patienten fünf bis zwölf Reaktionsgefäße mit jeweils 0,5 ml gefüllt werden. Im Anschluss wurden alle beschrifteten Reaktionsgefäße in 10x10-Kryo-Boxen einsortiert und in einem Tiefstschrank bis zur Durchführung der ELISAs bei -80°C eingefroren.

3.6.3 Durchführung der ELISAs und Berechnung der Serumkonzentrationen

Im Folgenden wird der Ablauf der durchgeführten ELISAs beschrieben. Es wurden bei jeder Messung alle 72 Serumproben zweifach untersucht. Dazu wurden immer jeweils zwei identische ELISA-Kits benutzt.

3.6.3.1 CXCL10/IP-10

Es wurde das Kit Quantikine® Human CXCL10/IP-10 (Katalognummer DIP100) von R&D Systems, Abingdon, Vereinigtes Königreich benutzt.

Dieses Immunoassay-Kit ist ein 4,5-Stunden-Festphasen-ELISA zur Messung des humanen IP-10 in Zellkulturen, Speichel, Serum und Plasma. Es enthält E. coli-exprimiertes rekombinantes humanes IP-10 und es quantifiziert akkurat den rekombinanten Faktor. Dieser Assay setzt die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik ein. Die Mikroplatte ist mit einem monoklonalen IP-10-spezifischen Antikörper vorbeschichtet. Die Standards und die Proben werden in die *Wells* pipettiert und das vorhandene IP-10 wird an den immobilisierten Antikörper gebunden. Nach dem Auswaschen aller ungebundenen Substanzen wird ein enzymgekoppelter polyklonaler IP-10-spezifischer Antikörper in die *Wells* zugefügt. Nach einem Auswaschen aller ungebundenen Antikörper-Enzym-Reagenzien wird eine Substratlösung beigelegt, es entsteht eine Farbreaktion im Verhältnis zu der IP-10-Menge, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Farbreaktion wird gestoppt und die Farbintensität gemessen.

Der Arbeitsablauf bestand aus folgenden Schritten:

1. Die aliquotierten und bei -80°C gelagerten Serumproben werden in den Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut und wenige Sekunden mit bis zu 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.
2. Der IP-10-Standard (5 ng eines rekombinanten humanen IP-10 gepuffert mit Konservierungsmitteln und lyophilisiert) wurde mit 1 ml deionisiertem Wasser rekonstituiert. Diese 5-ng/ml-Lösung wurde kurz gevortext und für 15 min stehen gelassen. Mithilfe des Kalibrator-Verdünnungsmittels RD6Q (Tierserum mit Konservierungsmitteln) wurde anschließend eine Standard-IP-10-Verdünnungsreihe hergestellt (500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,2 pg/ml; 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml).
3. Es wurden 75 µl des Assay-Verdünnungsmittels RD1-56 (gepufferte Proteinbasen mit Konservierungsmitteln) in jedes *Well* pipettiert.
4. Es wurden 75 µl der Standards oder der Proben in die entsprechenden *Wells* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde mit einem Klebestreifen bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Jedes *Well* wurde mittels einer Multikanalpipette vollständig aspiriert und mit 400 µl eines Waschpuffers (gepuffertes *Surfactant* mit Konservierungsmitteln) neu gefüllt. Dieser Prozess wurde insgesamt 4-mal durchgeführt.
6. Es wurden 200 µl eines IP-10-Konjugates (polyklonale Antikörper gegen IP-10 konjugiert an die Meerrettichperoxidase mit Konservierungsmitteln) in jedes *Well* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde wieder mit einem Klebestreifen bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Aspiration und Wäsche wie im Schritt 5.
8. Farbreagenzien A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid) und B (stabilisiertes Chromogen – Tetramethylbenzidin) wurden in gleichen Mengen zur Substratlösung vermischt und vor Licht geschützt.
9. Es wurden 200 µl der Substratlösung in jedes *Well* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert.
10. Es wurden 50 µl einer Stopp-Lösung (Schwefelsäure) in jedes *Well* pipettiert. Die Farbe in den *Wells* änderte sich von Blau in Gelb.

11. Nach der Farbumkehr wurde die optische Dichte der *Wells* mit einem ELISA-Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm (mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm) abgelesen.
12. Die Zweifach-Werte für die Standards und die Proben wurden gemittelt und davon die optische Dichte des Null-Standards abgezogen.
13. Die Werte der Konzentration und der entsprechenden optischen Dichte der Standards wurden in die Software GraphPad Prism® 5 eingegeben und mittels linearer Regression wurde die Eichkurve für jede ELISA-Platte erstellt. Anhand der Kurve wurden die optischen Dichtewerte der Proben in ihre Konzentrationen umgerechnet (ebenfalls mit GraphPad Prism® 5).

3.6.3.2 BMP-2

Es wurde das Kit Quantikine® BMP-2 (Katalognummer DBP200) von R&D Systems, Abingdon, Vereinigtes Königreich benutzt.

Dieses Immunoassay-Kit ist ein 4,5-Stunden-Festphasen-ELISA zur Messung des humanen BMP-2 in Knochenextrakten und Zellkulturen. Es enthält CHO-exprimiertes rekombinantes humanes BMP-2 und es quantifiziert akkurat den rekombinanten Faktor. Dieser Assay setzt die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik ein. Die Mikroplatte ist mit einem monoklonalen BMP-2-spezifischen Antikörper vorbeschichtet. Die Standards und die Proben werden in die *Wells* pipettiert und das vorhandene BMP-2 wird an den immobilisierten Antikörper gebunden. Nach dem Auswaschen aller ungebundenen Substanzen wird ein enzymgekoppelter polyklonaler BMP-2-spezifischer Antikörper in die *Wells* zugefügt. Nach einem Auswaschen aller ungebundenen Antikörper-Enzym-Reagenzien wird eine Substratlösung beigefügt und es entsteht eine Farbreaktion im Verhältnis zu der BMP-2-Menge, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Farbreaktion wird gestoppt und die Farbintensität gemessen.

Der Arbeitsablauf bestand aus folgenden Schritten:

1. Die aliquotierten und bei -80°C gelagerten Serumproben werden in den Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut und wenige Sekunden mit bis zu 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.
2. Der BMP-2-Standard (20 ng eines rekombinanten humanen BMP-2 in gepufferten Proteinbasen mit Konservierungsmitteln und lyophilisiert) wurde mit 1 ml deionisiertem Wasser rekonstituiert. Diese 20 ng/ml Lösung wurde kurz gevortext und 15 min stehen gelassen. Mithilfe des Kalibrator-Verdünnungsmittels RD5P (gepufferte

Proteinbasen mit Konservierungsmitteln) wurde anschließend eine Standard-BMP-2-Verdünnungsreihe hergestellt (4000 pg/ml; 2000 pg/ml; 1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml und 62,5 pg/ml).

3. Es wurden 100 µl des Assay-Verdünnungsmittels RD1-19 (gepufferte Proteinbasen mit Konservierungsmitteln) in jedes *Well* pipettiert.
4. Es wurden 50 µl der Standards oder der Proben in die entsprechenden *Wells* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde mit einem Klebestreifen bedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei ca. 500 U/min inkubiert.
5. Jedes *Well* wurde mittels einer Multikanalpipette vollständig aspiriert und mit 400 µl eines Waschpuffers (gepuffertes *Surfactant* mit Konservierungsmitteln) neu gefüllt. Dieser Prozess wurde insgesamt 4-mal durchgeführt.
6. Es wurden 200 µl eines BMP-2-Konjugates (monoklonale Antikörper gegen BMP-2 konjugiert an die Meerrettichperoxidase mit Konservierungsmitteln) in jedes *Well* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde wieder mit einem Klebestreifen bedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
7. Aspiration und Wäsche wie im Schritt 5.
8. Farbreagenzien A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid) und B (stabilisiertes Chromogen – Tetramethylbenzidin) wurden in gleichen Mengen zur Substratlösung vermischt und vor Licht geschützt.
9. Es wurden 200 µl der Substratlösung in jedes *Well* pipettiert. Die ELISA-Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert.
10. Es wurden 50 µl einer Stopp-Lösung (Schwefelsäure) in jedes *Well* pipettiert. Die Farbe in den *Wells* änderte sich von Blau in Gelb.
11. Nach der Farbumkehr wurde die optische Dichte der *Wells* mit einem ELISA-Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm (mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm) abgelesen.
12. Die Zweifach-Werte für die Standards und die Proben wurden gemittelt und davon die optische Dichte des Null-Standards abgezogen.
13. Die Werte der Konzentration und der entsprechenden optischen Dichte der Standards wurden in die Software GraphPad Prism® 5 eingegeben und mittels linearer Regression wurde die Eichkurve für jede ELISA-Platte erstellt. Anhand der Kurve wurden die

optischen Dichtewerte der Proben in ihre Konzentrationen umgerechnet (ebenfalls mit GraphPad Prism® 5).

3.6.3.3 HSP70

Es wurde das Kit HSP70 High Sensitivity EIA (Katalognummer EKS-715) von Assay Designs, Inc., Ann Arbor, Vereinigte Staaten benutzt.

Dieses Immunoassay-Kit ist ein Komplett-Kit für die quantitative Bestimmung des induzierbaren Hitzeschockproteins 70 (Hsp70) in Serum- und Plasmaproben von Menschen, Mäusen und Ratten. Es detektiert nicht andere Mitglieder der Hsp70-Familie, wie z.B. Hsc70 (Hsp73), Grp78, DnaK (*E. coli*) oder Hsp71 (*M. tuberculosis*). Die Proben (1:2 verdünnt) und die Standards werden in die *Wells* pipettiert, die mit einem monoklonalen Hsp70-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Die Platte wird danach inkubiert und anschließend alle ungebundenen Substanzen ausgewaschen. Eine gelbe Lösung aus polyklonalen Hsp70-spezifischen Antikörpern wird dazugegeben. Diese bindet das Hsp70, das auf der Platte gefangen wurde. Die Platte wird wieder inkubiert und gewaschen. Eine blaue Konjugat-Lösung kommt dazu und bindet die Antikörper. Die Platte wird erneut inkubiert und gewaschen. Danach werden die *Wells* mit einem Substrat gefüllt und dank einer Farbreaktion färbt sich die Lösung blau. Die zugegebene Stopp-Lösung stoppt die Substratreaktion und die entstandene gelbe Färbung wird bei 450 nm ausgelesen. Die Signalintensität ist der Hsp70-Konzentration direkt proportional.

Der Arbeitsablauf bestand aus folgenden Schritten:

1. Die aliquotierten und bei -80°C gelagerten Serumproben werden in den Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut und wenige Sekunden mit bis zu 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.
2. Es wurden 100 µl des Assaypuffers 28 (phosphatgepufferte Salzlösung mit bovinem Serumalbumin und Detergens) in die Null-Standard-*Wells* pipettiert.
3. Die Hsp70-Standard-Lösung (10 µg/ml eines rekombinanten humanen Hsp70) wurde kurz gevortext und mithilfe des Assaypuffers wurde anschließend eine Standard-Hsp70-Verdünnungsreihe hergestellt (12,50 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,13 ng/ml; 1,56 ng/ml; 0,78 ng/ml; 0,39 ng/ml und 0,20 ng/ml).
4. Es wurden jeweils 100 µl der Standardreihe in die entsprechenden *Wells* pipettiert.
5. Es wurden jeweils 50 µl des Assaypuffers und 50 µl der Proben in die *Wells* für die Proben pipettiert.

6. Die ELISA-Platte wurde mit einem Klebestreifen bedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei ca. 500 U/min inkubiert.
7. Jedes *Well* wurde mittels einer Multikanalpipette vollständig aspiriert und mit 400 µl eines Waschpuffers (TRIS-gepufferte Salzlösung mit Detergens) neu gefüllt. Dieser Prozess wurde insgesamt 4-mal durchgeführt.
8. Es wurden 100 µl eines Hsp70-Antikörpers (gelbe Lösung aus polyklonalen Hsp70-spezifischen Kaninchenantikörpern) in jedes *Well* außer dem *Blank-Well* pipettiert.
9. Die ELISA-Platte wurde wieder mit einem Klebestreifen bedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
10. Aspiration und Wäsche wie in Schritt 7.
11. Es wurden 100 µl eines Hsp70-Konjugates (blaue Lösung aus Ziegen-anti-Kaninchen-IgG konjugiert an die Meerrettichperoxidase) in jedes *Well* außer dem *Blank-Well* pipettiert.
12. Die ELISA-Platte wurde erneut mit einem Klebestreifen bedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
13. Aspiration und Wäsche wie in Schritt 7.
14. Es wurden 100 µl eines Substrates (Lösung aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) in jedes *Well* pipettiert.
15. Die ELISA-Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
16. Es wurden 100 µl einer Stopp-Lösung (Salzsäurelösung in Wasser) in jedes *Well* pipettiert.
17. Nach der Farbumkehr wurde die optische Dichte der *Wells* mit einem ELISA-Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm abgelesen. Von allen Werten wurde der Mittelwert des *Blank-Wells* abgezogen.
18. Die Werte der Konzentration und der entsprechenden optischen Dichte der Standards wurden in die Software GraphPad Prism® 5 eingegeben und mittels linearer Regression wurde die Eichkurve für jede ELISA-Platte erstellt. Anhand der Kurve wurden die optischen Dichtewerte der Proben in ihre Konzentrationen umgerechnet (ebenfalls mit GraphPad Prism® 5).

3.6.4 Vorgehen bei Messfehlern

Auf jeder 96-*Wells*-Platte war nach Abzug von 2 *Blank-Wells* und 2x8 *Standard-Wells* (einschließlich der Null-Standards) noch ausreichend Platz für die doppelte Konzentrationsmessung bei 39 Patientenproben. So wurden auf der ersten Platte bei allen 3 Proteinkonzentrationsmessungen 39 Proben untersucht und auf einer zweiten Platte die restlichen 33. Folglich gab es auf der zweiten Platte noch Platz für weitere 6 Doppelmessungen. Diese wurden genutzt, um die Doppelwerte der ersten Platte, die die größte relative Abweichung voneinander zeigten, erneut zu messen. Bei diesen Proben gab es letztendlich 4 Einzelwerte, bei denen entweder ein Ausreißer ausgeschlossen wurde und die restlichen 3 Werte gemittelt wurden oder es wurden (falls kein eindeutiger Ausreißer festzumachen war) alle 4 Werte gemittelt. Dadurch konnte die Mehrzahl der Messfehler korrigiert werden.

Die zuerst gemessenen BMP-2-Konzentrationen wiesen niedrigere Werte auf als die in der Arbeit von Elstner et al. (2011) und lagen somit unter dem Regel-Cut-Off von 208 pg/ml. Um etwaige Fehler bei der Durchführung der ELISAs auszuschließen, wurden die kompletten BMP-2-Bestimmungen wiederholt. Auch die zweite Messung zeigte jedoch ähnliche Ergebnisse, sodass alle vier Einzelwerte von jeder Probe zur Bildung des Mittelwertes benutzt wurden. Einzelne Ausreißer wurden in die Mittelwertbildung nicht eingeschlossen.

3.7 Auswertung der Ergebnisse

Zunächst wurden die Ergebnisse für die jeweiligen Proteine mittels der Software GraphPad Prism® 5 mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-Test für die Gruppen GBM und Non-GBM getestet. Die Ergebnisse wurden ebenfalls graphisch in Form von Whiskerplots nach Tukey dargestellt (die Non-GBM-Gruppe wurde auch in die Einzelgruppen Met, PZNSL, Abszess und MS aufgeteilt).

Die Regel von Elstner et al. (2011) (Abb. 1.2) wurde auf die Ergebnisse der Serumproteinkonzentrationsmessungen jedes Patienten angewandt und das Testergebnis mit der histologisch gesicherten Diagnose verglichen. Eine Vierfeldertafel wurde erstellt und die Regel auf ihre Eigenschaften wie Sensitivität und Spezifität untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchte Gruppen

Um herauszufinden, ob die ausgewählten Serumproteine für die Unterscheidung zwischen Patienten mit Glioblastomen und anderen zerebralen Raumforderungen nützlich sein können, wurden die Konzentrationen dieser bei insgesamt 72 Patienten bestimmt. Patienten mit den Diagnosen Hirnmetastase, primäres ZNS-Lymphom, Hirnabszess sowie Multiple Sklerose stellten die Kontrollgruppe dar. Die Verteilung der Erkrankungen zeigt Tabelle 4.1.

Tab. 4.1. Verteilung der Erkrankungen unter den Patienten und das Geschlechterverhältnis

Diagnose	GBM	Met	PZNSL	Abszess	MS
Anzahl Patienten (m; w)	35 (22; 13)	19 (8; 11)	10 (4; 6)	6 (4; 2)	2 (0; 2)
Gesamt (m; w)	GBM n=35 (22; 13)		Non-GBM n=37 (16; 21)		

GBM = Glioblastom, Met = Hirnmetastasen, PZNSL = primäre ZNS-Lymphome, MS = Multiple Sklerose, m = männlich, w = weiblich

Abbildung 4.1 zeigt die Altersstruktur der untersuchten Gruppen.

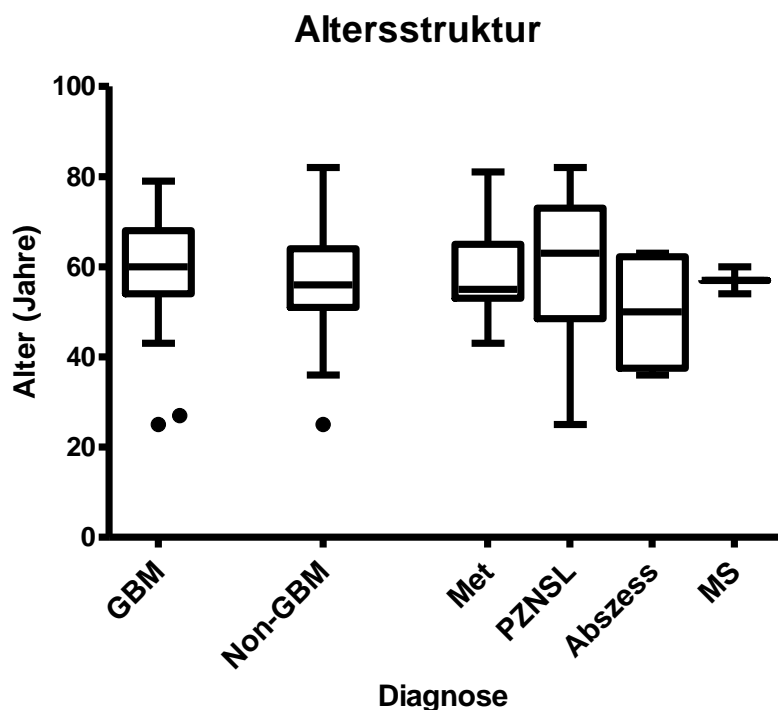


Abb. 4.1: Altersstruktur der Diagnosegruppen; Whiskerplot nach Tukey

4.2 Konzentrationen der Serumproteine

4.2.1 Gesamtergebnis

Die Tabelle 4.2 zeigt zunächst alle Ergebnisse in Übersicht. In der Tabelle 4.3 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Patientenruppen dargestellt.

Tab. 4.2. Serumproteinkonzentrationen aller Patienten

<i>Pat.-Nr.</i>	<i>Diagnose</i>	<i>CXCL10¹</i>	<i>BMP-2¹</i>	<i>Hsp70²</i>	<i>Pat.-Nr.</i>	<i>Diagnose</i>	<i>CXCL10¹</i>	<i>BMP-2¹</i>	<i>Hsp70²</i>
1	Met	37,17	147,86	1,26	37	GBM	47,63	99,26	0
2	Met	24,89	112,60	0	38	Met	11,26	92,53	0
3	Met	17,64	121,36	0	39	GBM	48,89	86,26	0
4	Met	55,30	110,25	0	40	GBM	96,84	116,04	0
5	GBM	166,06	130,91	0	41	GBM	117,49	99,62	0,03
6	GBM	39,54	104,94	0,05	42	GBM	27,43	109,18	0
7	GBM	99,24	107,52	0	43	Met	24,11	91,66	0
8	Met	669,77	128,21	0	44	GBM	30,99	111,68	0
9	GBM	15,64	133,63	0	45	GBM	47,72	97,61	0
10	GBM	453,91	103,08	0	46	PZNSL	31,94	104,77	0
11	PZNSL	110,26	114,49	13,89	47	GBM	16,04	87,65	0
12	GBM	44,31	108,14	0	48	GBM	66,35	116,30	0
13	Abszess	354,93	123,22	0	49	Abszess	15,57	97,68	0
14	Abszess	40,52	97,04	0	50	GBM	60,77	102,79	0
15	GBM	37,45	105,87	0	51	GBM	69,08	95,08	3,76
16	GBM	61,72	112,55	0	52	Abszess	27,31	113,07	3,14
17	PZNSL	97,85	115,78	0	53	Met	169,93	97,55	0
18	Met	26,57	88,81	0	54	Met	21,02	104,01	0
19	Met	148,76	89,31	0	55	Met	63,86	95,00	0
20	Met	34,66	101,24	0,11	56	GBM	34,79	106,65	1,63
21	PZNSL	151,41	113,76	0	57	Abszess	239,70	95,64	0
22	GBM	38,01	83,14	0	58	MS	56,74	96,96	0
23	GBM	37,17	89,18	0	59	Met	21,97	97,59	0
24	PZNSL	32,01	105,35	0	60	GBM	75,13	93,13	0
25	PZNSL	167,73	107,66	0	61	Abszess	36,45	100,06	0
26	PZNSL	48,47	93,29	0	62	GBM	18,41	89,21	0
27	Met	130,63	98,50	0	63	Met	65,52	89,37	0
28	GBM	37,03	122,13	19,15	64	GBM	168,27	101,50	0
29	GBM	47,91	106,83	0	65	PZNSL	67,30	87,89	0
30	GBM	130,63	96,35	0	66	GBM	31,11	88,02	0
31	PZNSL	16,94	93,49	0	67	GBM	49,26	86,30	0
32	MS	43,74	114,99	0	68	PZNSL	33,25	100,84	0
33	GBM	825,84	111,77	0,39	69	GBM	51,87	94,98	0
34	Met	8,57	88,15	0	70	GBM	225,46	92,50	0
35	Met	82,64	86,13	0	71	Met	39,53	93,39	0
36	GBM	52,09	110,11	0	72	GBM	18,41	103,38	0

¹ in pg/ml ² in ng/ml (0<0,03)

Tab. 4.3. Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Patientenruppen

	<i>Mittelwert</i>			<i>Standardabweichung</i>		
	CXCL10 ¹	BMP-2 ¹	Hsp70 ²	CXCL10 ¹	BMP-2 ¹	Hsp70 ²
GBM	93,42	102,95	0,71	138,12	12,22	3,28
Met	87,01	101,76	0,08	148,80	16,09	0,29
PZNSL	75,72	103,73	1,39	53,52	9,74	4,39
Abszess	119,08	104,45	0,52	143,05	11,17	1,28
MS	49,44	105,97	0	10,32	12,75	0

¹ in pg/ml ² in ng/ml (0<0,03)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen der Konzentrationen der jeweiligen Serummarker mittels ELISA dargestellt und ausgewertet.

4.2.2 CXCL10/IP-10

Abbildung 4.2 zeigt die Konzentrationen von CXCL10/IP-10 in den jeweiligen Diagnosegruppen.

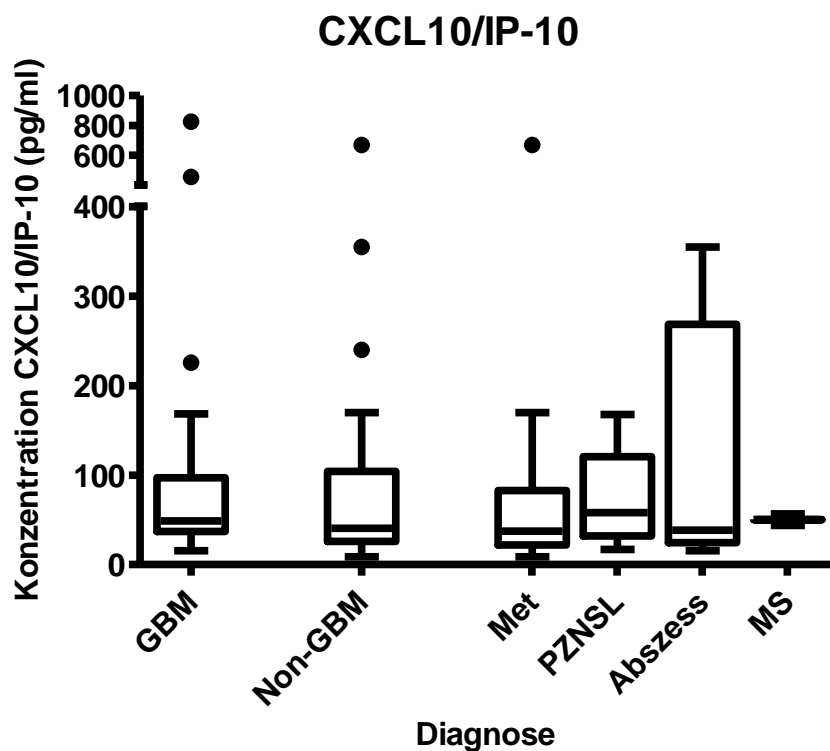


Abb. 4.2: Konzentrationen von CXCL10/IP-10 in den Diagnosegruppen

Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bei den Patienten mit einem Glioblastom und der Kontrollgruppe ($p=0,7660$). Es lässt sich also nicht allein anhand der Konzentration dieses Markers zwischen einem Glioblastom und einer anderen zerebralen Raumforderung unterscheiden.

4.2.3 BMP-2

Abbildung 4.3 zeigt die Konzentrationen von BMP-2 in den jeweiligen Diagnosegruppen.

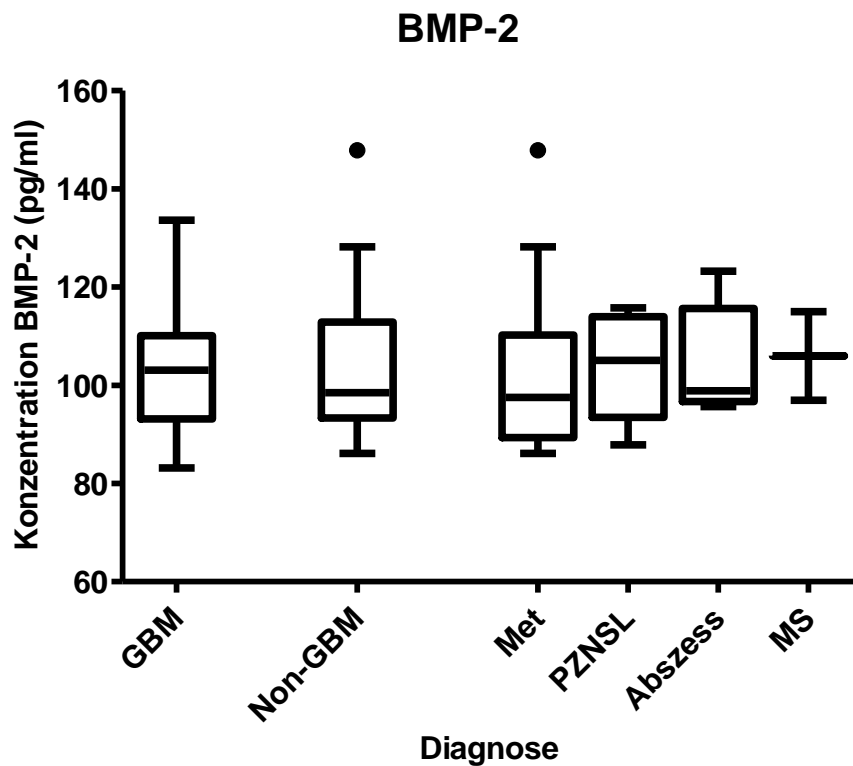


Abb. 4.3: Konzentrationen von BMP-2 in den Diagnosegruppen

Es findet sich auch bei diesem Serummarker kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bei den Patienten mit einem Glioblastom und der Kontrollgruppe ($p=0,9979$).

4.2.4 HSP70

Abbildung 4.4 zeigt die Konzentrationen von HSP70 in den jeweiligen Diagnosegruppen.

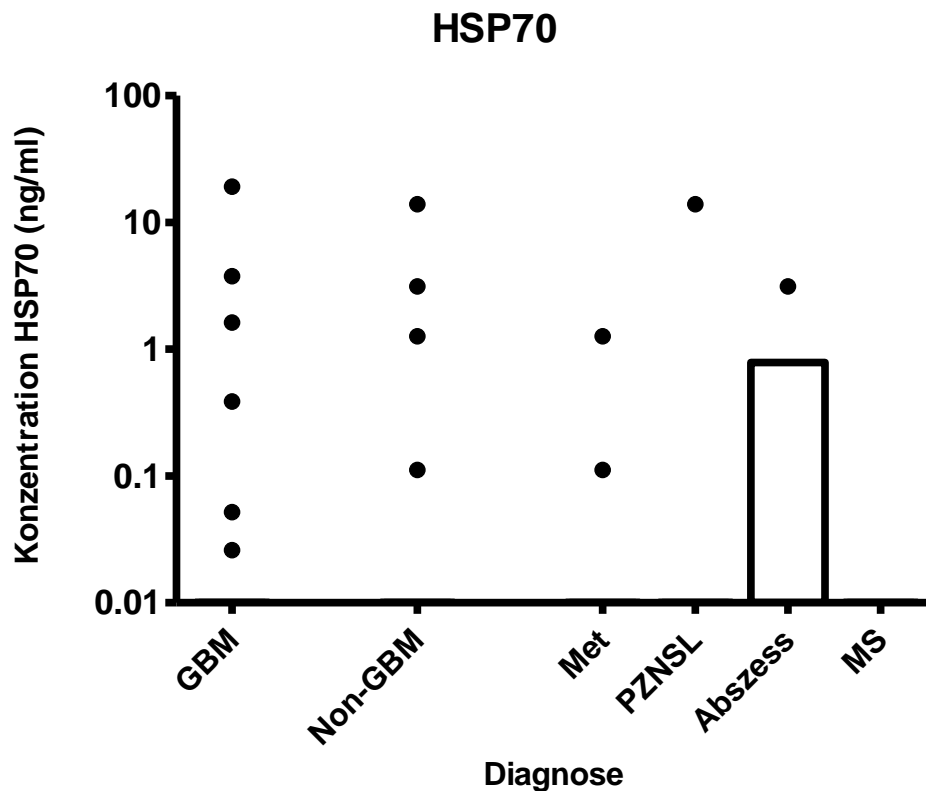


Abb. 4.4: Konzentrationen von HSP70 in den Diagnosegruppen (Y-Achse logarithmisch skaliert)

Es findet sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bei den Patienten mit Glioblastomen und der Kontrollgruppe ($p=0,7459$). Bei der Mehrheit der Patientenseren lag die Konzentration von HSP70 unterhalb des messbaren Bereichs (29 von 35 in der Glioblastom-Gruppe, 17 von 19 in der Hirnmetastase-Gruppe, 9 von 10 in der Primäres-ZNS-Lymphom-Gruppe, 5 von 6 in der Hirnabszess-Gruppe, 2 von 2 in der Multiple-Sklerose-Gruppe).

Keines der drei untersuchten Serumproteine ist also allein in der Lage, ein Glioblastom von den Differenzialdiagnosen abzugrenzen.

Der nächste Schritt ist es, einen Algorithmus einzusetzen (im weiteren Regel genannt), mit dessen Hilfe eine solche Abgrenzung in wenigen Schritten möglich wäre.

4.3 Anwendung der Regel

Die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen wurden in die Regel basierend auf den Daten von Elstner et al. (2011) eingesetzt. Dort erreichte diese Regel bei 23 Glioblastom-Patienten und 9 Kontrollen eine Sensitivität von 96% (22 von 23) und eine Spezifität von 89% (8 von 9). Abbildung 4.5 zeigt noch einmal den Aufbau dieser Regel.

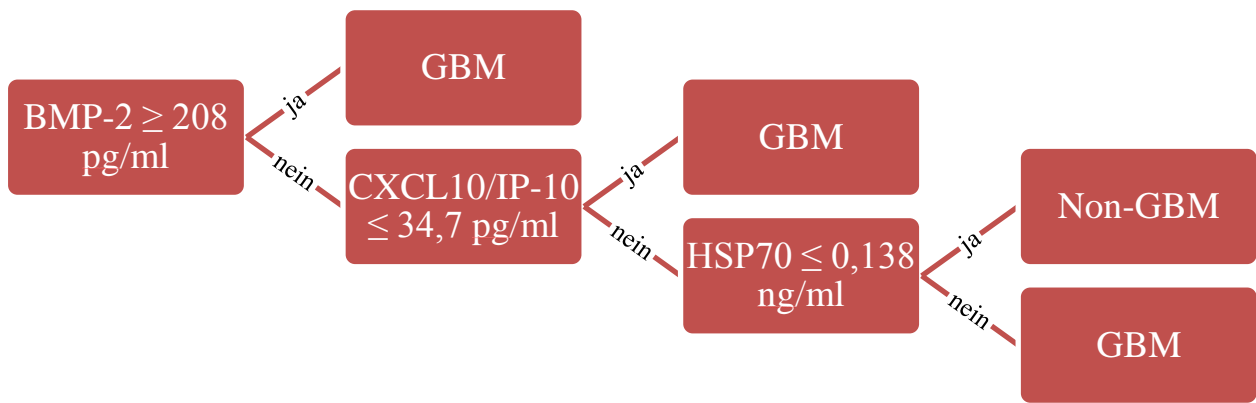


Abb. 4.5: Regel von Elstner et al. (2011) zur Diagnostik von Glioblastomen mit Hilfe der Serummarker (entspricht der Abb. 1.2 auf Seite 16)

Diese Regel wurde auf die erhobenen Daten jedes einzelnen Patienten angewandt und ausgewertet. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 4.4.

Tab. 4.4. Ergebnistabelle mit der Regel von Elstner et al. (2011), angewandt auf die Daten jedes Patienten

		Diagnose		Gesamt
		Glioblastom	Non-GBM	
Ergebnis Regel	Glioblastom	11	17	28
	Non-GBM	24	20	44
Gesamt		35	37	72

Diese Regel erreicht bei unserem Kollektiv an Patienten eine Sensitivität von 31% (95%-KI 17% - 49%), eine Spezifität von 54% (95%-KI 37% - 71%), einen positiven prädikativen Wert von 39% (95%-KI 22% - 59%) und einen negativen prädikativen Wert von 45% (95%-KI 30% - 61%). Diese Werte sind zu niedrig und liegen im Bereich des statistischen Zufalls. Damit eignet sich diese Regel in keiner Hinsicht zur Diagnostik von Glioblastomen.

5 Diskussion

5.1 Multiforme Glioblastome

Wie es bereits der Name Glioblastoma "multiforme" andeutet, vermag sich unter dieser Diagnose keine einheitliche Gruppe von Tumoren verbergen. Ca. 90% machen primäre Glioblastome aus, die sich rasch entwickeln und mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Die selteneren sekundären Glioblastome treten bei jüngeren Patienten auf und entwickeln sich aus niedrig-gradigen Astrozytomen. Diese beiden Entitäten haben Mutationen in unterschiedlichen genetischen Signalwegen. Histologisch können noch kleinzellige, riesenzellige sowie Glioblastome mit oligodendroglialer Komponente unterschieden werden (Kleihues et al. 2007).

Genetisch gesehen findet man bei Glioblastomen mehrere Veränderungen, die mehr oder weniger häufig vorhanden sind. Der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*; LOH) am Chromosom 10 stellt mit ca. 70% die häufigste Veränderung dar. Die EGFR-Amplifikation (*epidermal-growth-factor-receptor*) konnte als Folge einer Mutation bei mehreren Krebserkrankungen (einschließlich des Glioblastoms) nachgewiesen werden. Weitere genetische Alterationen sind die p16-Deletion sowie die Mutationen der Gene TP53 und PTEN (*phosphatase and tensin homology*). Eine besondere Stellung hat die MGMT(O6-Methylguanin-Methyltransferase)-Promoter-Methylierung, die sogar eine prognostische Aussagekraft besitzt. MGMT ist ein Reparaturenzym, das durch Alkylantien ausgelöste DNA-Schäden reparieren kann und dadurch eine Radiochemotherapie weniger erfolgversprechend macht. Die Bildung von MGMT wird durch den MGMT-Gen-Promoter reguliert. Wenn dieser methyliert ist, wird das MGMT-Gen inaktiviert und dadurch weniger MGMT gebildet. Dadurch sprechen diese Patienten auf eine Radiochemotherapie besser an. Alle diese genetischen Veränderungen können Auswirkungen auf die histologischen Eigenschaften und die Proteinexpression haben. So zeigt sich z.B. die YKL-40-Sekretion mit einem positiven LOH-Status assoziiert (Frenel et al. 2009, Ohgaki und Kleihues 2007, Pelloski et al. 2005). Diese Heterogenität der Glioblastome mag die Suche nach einem universellen Serummarker erschweren.

5.2 Proteinauswahl

Bis heute haben sich keine Serumproteine in der klinischen Diagnostik und Verlaufskontrolle durchgesetzt. Einige Proteine wie z.B. das GFAP (saures Gliafaserprotein), das YKL-40, APRIL (*a proliferation-inducing ligand*), Haptoglobin α_2 , Cathepsin D oder das I-CaD (niedrigmolekulares Caldesmon) haben in einigen Untersuchungen ihre Fähigkeit, zwischen Ge-

sunden und Tumorkranken zu unterscheiden, gezeigt (Fukuda et al. 2005, Hormigo et al. 2006, Ilzecka und Ilzecki 2006, Jung et al. 2007, Kumar et al. 2010, Zheng et al. 2005). Dabei wurden jedoch meist relativ niedrige Patientenzahlen untersucht (ca. 10 – 90 Glioblastom-Erkrankte), sodass größere Patientenkollektive im Rahmen prospektiver Studien zur Klärung der Validität dieser Marker notwendig sind. Zudem ist es noch viel schwieriger, das Glioblastom serundiagnostisch von anderen Hirntumoren oder Hirnentzündungen abzugrenzen.

Für keines der drei hier untersuchten Serumproteine konnte in der Arbeit von Elstner et al. (2011) ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Glioblastomen und gesunden Probanden gefunden werden. Erst durch die Anwendung der Regel ist ein potenziell hilfreicher Test entstanden.

5.2.1 CXCL10/IP-10

Erhöhte Serumwerte von CXCL10/IP-10 zeigen sich im Rahmen von unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems. Es wurde zunächst als ein Protein beschrieben, dass als Antwort auf IFN- γ ansteigt und wurde mit Prozessen der Entzündung und Proliferation assoziiert. Es wird von verschiedenen Zellen sezerniert, wie z.B. Endothelzellen, Monozyten, Eosinophilen, NK-Zellen, T-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, usw. (Jinquan et al. 2000, Luster und Ravetch 1987, Taub et al. 1993). Es ist als recht unspezifisch anzusehen und findet sich bei einer Vielzahl an Erkrankungen.

Es wurde gezeigt, dass CXCL10/IP-10 als ein angiostatisches Agens die Neovaskularisation unterdrückt (Strieter et al. 1995). Zu erhöhter lokaler Neovaskularisation kommt es bei allen untersuchten Differenzialdiagnosen (GBM, Metastasen sowie Abszesse) und dies erschwert ebenfalls die diagnostische Wertigkeit dieses Proteins.

Zudem wird CXCL10/IP-10 bei vielen Autoimmunerkrankungen exprimiert, z.B. bei rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematosus, Sjögrensyndrom, systemischer Sklerose, idiopathischer entzündlicher Myopathie, Multipler Sklerose, Autoimmunthyreoiditis, Diabetes mellitus Typ I und Morbus Addison (Fujii et al. 2004, Hanaoka et al. 2003, Narumi et al. 2000, Rotondi et al. 2007, Sorensen et al. 1999).

Was neurologische Erkrankungen anbelangt, wurde die CXCL10/IP-10-Expression in aktivierten Astrozyten gefunden und z.B. mit der Alzheimer-Erkrankung, aber auch mit Astrozytomen in Verbindung gebracht (Maru et al. 2008, Xia et al. 2000). Dabei konnte sogar gezeigt werden, dass die Expressionsrate mit dem Grad der Malignität zusammenhängt.

In dieser Untersuchung fand sich kein Unterschied in den Serumwerten von CXCL10/IP-10 zwischen den verschiedenen differenzialdiagnostischen Gruppen. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass es bei all diesen Erkrankungen zu einer mehr oder minder ausgeprägten Hirnentzündung/Aktivierung der Astrozyten kommt, die nicht spezifisch für ein Glioblastom ist.

5.2.2 BMP-2

Neben seiner Wichtigkeit in der Induktion und Regulation der Knorpel- und Knochenformation sowie der Entwicklung auch anderer Organsysteme spielt das BMP-2 ebenfalls im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen eine Rolle. Dies wurde in den letzten Jahren in mehreren Studien nachgewiesen. Die Wirkung von BMP-2 scheint dabei jedoch nicht einheitlich zu sein.

Erhöhte Gewebeexpression von BMP-2 konnte in verschiedenen Lungenkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen werden (Langenfeld et al. 2005). Die Invasivität von Melanomen und Lungenkarzinomen wird anscheinend durch das BMP-2 erhöht (Langenfeld et al. 2003). Beim Ovarialkarzinom korreliert die BMP-2-Expression mit kürzerer Überlebenszeit (Le Page et al. 2009). Studien haben gezeigt, dass BMP-2 sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte auf das Wachstum von Zelllinien des Lungen- und Brustkarzinoms hat (Ghosh-Choudhury et al. 2000, Pouliot et al. 2003, Tada et al. 1998).

Wachstumsstimulierende Wirkung von BMP-2 konnte weiterhin auch bei dem Pankreaskarzinom und dem Prostatakarzinom in Abwesenheit von Androgenen gezeigt werden (Ide et al. 1997, Kleeff et al. 1999). Demgegenüber inhibiert BMP-2 das Wachstum von Tumorzellen der Schilddrüse, des Magens, des Pankreas, des Myeloms sowie der androgenabhängigen Prostatazellen in Anwesenheit von Androgenen (Clement et al. 2005, Franzen und Heldin 2001, Hsu et al. 2005, Ide et al. 1997, Kleeff et al. 1999, Wen et al. 2004). Beim Magenkarzinom konnte eine Korrelation zwischen dem Tumorgrad sowie der Tumorprogression gezeigt werden (Park et al. 2010).

BMP scheint ebenfalls eine Rolle bei der Angiogenese zu spielen (Langenfeld EM und Langenfeld J 2004, Lyden et al. 1999, Yang et al. 1999).

Auch bei Gliomen unterschiedlicher Malignität konnten immunhistochemisch erhöhte Werte der BMP-2-Expression nachgewiesen werden. Die Stärke der Expression korreliert sowohl mit dem Malignitätsgrad der Gliome (WHO °I und °II vs. WHO °III und °IV) als auch mit der Prognose und der medianen Überlebenszeit (Liu et al. 2009, Zhang MY et al. 2009).

Das BMP-2 ist also ein Marker, der im Glioblastomgewebe erhöht ist, jedoch leider auch bei vielen anderen Raumforderungen überexprimiert wird. Seine Wirkung ist noch nicht ausreichend geklärt, es finden sich sowohl positive als auch negative Einflüsse auf das Tumorstadium.

5.2.3 HSP70

Die Hitzeschockproteine (HSP) sind Stressproteine, die in allen Zellen jedes Organismus vorhanden sind (Lindquist 1986). Sie spielen eine entscheidende Rolle in Prozessen wie Proteinfaltung, -zusammenbau, -transport, Zellzykluskontrolle, Apoptoseinhibition usw.

Das HSP70 wird als Antwort der Zellen auf verschiedene Stressoren vermehrt produziert. Wie der Name schon sagt, kommt es bei einer nicht-letalen Temperaturerhöhung zur HSP70-Produktion, die zu einer Thermotoleranz führt (Li et al. 1995). Auch körperliche Tätigkeit und Hypoxie induzieren die HSP70-Produktion (Madden et al. 2008).

HSP70 inhibiert mehrere Apoptosewege, wie die durch die c-jun-Kinase oder die Kaspase vermittelten (Daugaard et al. 2007, Gabai et al. 1997, Gabai et al. 1998). Da der programmierte Zelltod inhibiert wird, ist die Konzentration von HSP70 bei einem weiten Spektrum an Krebserkrankungen erhöht (Calderwood et al. 2006, Ciocca und Calderwood 2005). Dazu gehören vor allem Karzinome (Mamma-, Endometrium-, Lungen-, Prostata-, Kolorektalkarzinome und andere) und Gliome (Ciocca et al. 1993, Jaattela 1999, Nanbu et al. 1998, Sherman und Multhoff 2007). Eine hohe Expression kann eine fortgeschrittene Erkrankung und schlechte Prognose andeuten (Jolly und Morimoto 2000, Kocsis et al. 2010). Außerdem spielt das HSP70 eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. bei autoimmuner Arthritis, Diabetes mellitus Typ I, Atherosklerose, Multipler Sklerose und anderen (Raska und Weigl 2005).

Es wurde nahe gelegt, dass das HSP70 die Zellen bei einer Tumorstadium vor hypoxischem Stress schützt (Patel B et al. 1995). Des Weiteren wurde angedeutet, dass es im Rahmen von Hirninfarkten zu einer Überexpression von HSP70 kommt und dadurch der ischämische Schaden reduziert wird und Neurone sowie Gliazellen geschützt werden (Giffard et al. 2004, Hoehn et al. 2001, Rajdev et al. 2000). Ähnliche Wirkung wird dem HSP70 auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben. Dazu gehört der Morbus Alzheimer, der Morbus Parkinson und die amyotrophe Lateralsklerose (Brown 2007, Forman et al. 2004, Selkoe 2004).

Man sieht, dass das HSP70 ein hochspezifisches Stressprotein ist, das bei vielen physiologischen Prozessen sowie im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen, besonders auch bei neuronalen, vermehrt exprimiert wird und somit nicht für die Unterscheidung zwischen Glioblastomen und anderen Raumforderungen des Gehirns geeignet ist.

5.3 Validität der Regel von Elstner et al. (2011)

Die Arbeit von Elstner et al. (2011) und die daraus entstandene Regel zur Diagnostik von Glioblastomen bildeten die Grundlage dieser Arbeit. Es sollte die Kraft dieser Regel an einem größeren Patientenkollektiv und auch im Vergleich zu klinisch relevanten Differenzialdiagnosen überprüft werden.

In der Arbeit wurden 23 Patienten mit diagnostizierter Glioblastom-Erkrankung und 9 gesunde Probanden als Vergleichsgruppe untersucht. Diese geringe Fallzahl kann zu vermehrtem Auftreten von falsch positiven sowie falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Vergleichsgruppe von Elstner et al. (2011) bestand aus 9 Hirngesunden. Wie man von den untersuchten Proteinen jedoch weiß, sind ihre Werte vor allem im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen, Stresssituationen oder entzündlichen Prozessen erhöht. (s. o.) Die klinisch relevanten Differenzialdiagnosen von Glioblastomen sind andere Tumorerkrankungen, Metastasen sowie Abszesse. Für BMP-2 sowie Hsp70 konnte bereits in mehreren Studien ein Zusammenhang mit verschiedenen Tumorerkrankungen sowie dem Tumorstadium nachgewiesen werden. Dies macht eine Unterscheidung zwischen zwei Tumorarten schwierig, könnte jedoch zur Einschätzung der Progression bzw. der Prognose eingesetzt werden.

Auffällig ist, dass in der Arbeit signifikant niedrigere Serumkonzentrationswerte von CXCL10/IP-10 bei Glioblastomerkrankten im Vergleich zu Hirngesunden gefunden wurden (34,2 pg/ml vs 105,4 pg/ml). Damit war CXCL10/IP-10 auch eins der wichtigsten Unterscheidungskriterien. Dabei wirkt CXCL10/IP-10 angiostatisch und immunhistochemisch konnten bereits erhöhte Expressionsraten bei Astrozytomen nachgewiesen werden (Maru et al. 2008). Diese erniedrigten Werte konnten nicht reproduziert werden. Unsere Mittelwerte lagen bei 93,42 pg/ml bei Glioblastomerkrankten und 87,19 pg/ml bei den Differenzialdiagnosen. Die Glioblastom-Patienten von Elstner et al. (2011) wurden multizentrisch rekrutiert (Boston in Massachusetts, Vereinigte Staaten sowie 3 Standorte in Berlin). Durch den Transport, die Zwischenlagerung oder eine defekte Kühlkette können die Proteine zerfallen sein. Die Kontroll-Proben wurden dagegen nur an einer Klinik entnommen und mussten nicht transportiert

werden, jedoch kam es trotzdem vereinzelt zu Verzögerungen, bis die Seren eingefroren wurden (bis zu 8 Stunden). Unsere Arbeit war unizentrisch.

Ein zusätzliches Problem bei der Suche nach Serumproteinmarkern ist die kommerzielle Verfügbarkeit von geeigneten ELISA-Kits. Dadurch konnten lediglich 14 von insgesamt 86 Kandidatenproteinen untersucht werden. Dies ist zurzeit eine große Limitation, die sich jedoch zukünftig beheben ließe.

Zusammenfassend muss also gesagt werden, dass die Regel von Elstner et al. (2011) nicht für die Diagnostik von intrazerebralen Raumforderungen im klinischen Alltag geeignet ist.

5.4 Schwächen der Methodik

Wie bereits beschrieben, gibt es nicht für alle Serumproteine ein entsprechendes kommerziell erhältliches Nachweisverfahren. In dieser Arbeit wurden die gleichen ELISA-Kits wie in der Arbeit von Elstner et al. (2011) benutzt. Diese sind jedoch nicht spezifisch auf die Bestimmung im menschlichen Serum abgestimmt, sondern dienen auch zur Konzentrationsbestimmung z.B. in Zellkulturmedien, Speichel, Plasma oder im Serum von Mäusen und Ratten. Das kann dazu führen, dass unsere Messwerte nicht im optimalen Messbereich liegen und dadurch die Qualität und Präzision der Messungen beeinträchtigt wird.

Das BMP-2-ELISA-Kit ist für die Bestimmung in Knochengewebeextrakten und in Zellkulturmedien konzipiert. Der Hersteller gibt an, dass auch menschliches Serum auf das Vorhandensein von BMP-2 evaluiert wurde, wobei alle Proben unter dem niedrigsten Standard (62,5 pg/ml) lagen. Der Messbereich liegt bei diesem Kit zwischen 62,5 pg/ml und 4000 pg/ml. Die meisten in dieser Arbeit gemessenen Patientenserumkonzentrationen lagen zwischen 90 und 120 pg/ml, d.h. zwischen dem niedrigsten und dem zweitniedrigsten Standard. Dies ist im Vergleich mit den Werten der Arbeit von Elstner et al. (2011) deutlich niedriger (Serumkonzentration bei Glioblastomen 209 pg/ml, bei Hirngesunden 176 pg/ml). Da die Konzentrationen nicht im optimalen Bereich zu liegen kommen, führen bereits kleine Unterschiede in der optischen Dichte der ELISA-*Wells* zu größeren Konzentrationsänderungen und Verschiebungen im Gesamtfeld aller Proben. Dadurch war das BMP-2-Kit für Störeinflüsse sehr empfindlich, was die Suche nach einem möglichen Grenzwert deutlich erschwerte.

Bei dem HSP70-Kit lag der Messbereich zwischen 0,20 ng/ml und 12,5 ng/ml. Obwohl wir die Serumproben statt der vom Hersteller empfohlenen 4-fach-Dilution nur 2-fach verdünnt haben, lagen die meisten Messwerte unter der Nachweisgrenze. Lediglich bei 10 Proben konnte eine HSP70-Konzentration gemessen werden, was nur 14% aller Proben entspricht.

Die gemessenen Konzentrationen erlaubten keine Unterscheidung zwischen Glioblastomen und den Differenzialdiagnosen.

Park et al. haben 2008 in ihren Arbeiten BMP-2-Konzentrationen im Serum bei gesunden Probanden von im Schnitt 87,95 pg/ml gemessen. Bei Patienten mit einem metastasierten Magenkarzinom lagen die Werte im Schnitt bei 179,61 pg/ml (Park et al. 2008). In einer zweiten Arbeit haben Park et al. bei Magenkarzinompatienten mit Lymphknotenmetastasen ein Serum-BMP-2 von 382,7 pg/ml und ohne Lymphknotenmetastasen von 211,69 pg/ml messen können (Park et al. 2010). Die Werte der gesunden Proben von Park et al. entsprechen eher den Werten aus unserer Arbeit als den etwas höheren Werten von Elstner et al. (2011), die ihrerseits eher denen der Gruppe der Magenkarzinompatienten entsprechen.

Was die Serumkonzentrationen von HSP70 bei gesunden Probanden in der Normalbevölkerung (meist männlich) bzw. bei präoperativen Patienten angeht, sind die Daten in der wissenschaftlichen Literatur nicht ganz einheitlich. Hier eine Übersicht: 1131 (0 - 13380) ng/ml (Pockley et al. 1998), 0 ng/ml (Dybdahl et al. 2002), <5 ng/ml (Kimura et al. 2004), 0,31 (0,21 - 0,42) ng/ml (Dybdahl et al. 2005), 1,76 (1,05 - 2,94) ng/ml (Dhingra et al. 2006), <1 ng/ml (Suzuki et al. 2006), 0,3 ng/ml (Molvarec et al. 2007), 0,15 ng/ml (Elstner et al. 2011). Man sieht, dass die meisten Angaben eine Konzentration von im Schnitt <1 ng/ml zeigen. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Es wurden keine erhöhten Werte weder bei Patienten mit Glioblastomen noch in den Kontrollgruppen gemessen. Die biologische Halbwertszeit von HSP70 soll ca. 18 Stunden betragen (Gerner et al. 2002). Dies könnte einen gewissen Einfluss auf die gemessenen Werte haben, wenn man bedenkt, dass die Seren bis zu 8 Stunden Zimmertemperatur ausgesetzt waren. Anschließend wurden sie bei -80 °C gelagert. Es wird davon ausgegangen, dass das Protein bei -80 °C einige Monate stabil bleibt.

5.5 Aussichten

Es gibt derzeit keine validen Proteine im peripheren Blut, die ausreichend spezifisch sind, um das Glioblastom von anderen zerebralen Läsionen zu unterscheiden. Dafür mag es mehrere Gründe geben wie z.B. die histologische sowie genetische Vielseitigkeit der Erkrankung und damit der unterschiedliche Metabolismus oder die Blut-Hirn-Schranke. Dennoch sollte die Möglichkeit einer Serum-Diagnostik bei unklaren Hirnprozessen weiter verfolgt werden. Wie man an mehreren anderen Tumorerkrankungen sieht, kann ein solcher Marker die rechtzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung maßgeblich beeinflussen. Erwähnt seien hier z.B. das karzinoembryonale Antigen (CEA) (Kolon-, Pankreas- und Adenokarzinom der Lunge), das CA 125 (Ovarialkarzinom), das CA 19-9 (Pankreas-, Magen- und Kolonkarzinom), das

Alpha-1-Fetoprotein (AFP) (hepatozelluläres Karzinom) oder das prostataspezifische Antigen (PSA). Aufgrund der Heterogenität von Glioblastomen scheint eine Kombination aus mehreren Serummarkern klinisch erfolgversprechender. Mehrere Marker (z.B. APRIL, GFAP, AKL-40, Haptoglobin α_2 , s.o.) zeigten bereits erste Erfolge und konnten zwischen niedrig- und höhergradigen Astrozytomen bzw. zwischen Tumorkranken und Hirngesunden unterscheiden. Weitere Studien sind jedoch notwendig. Bis dahin bleibt die Diagnosestellung eines Glioblastoms dem Ergebnis einer histologischen Untersuchung vorbehalten.

6 Zusammenfassung

Die Diagnostik eines Glioblastoms (GBM) stützt sich z.Z. neben klinischer Symptomatik auf bildgebende Diagnostik sowie die histologische Untersuchung. In letzter Zeit werden zunehmend Serumproteine beschrieben und untersucht, die mit einer GBM-Erkrankung assoziiert sind. Elstner, Stockhammer und Kollegen haben 2011 ein Serumproteinprofil identifiziert, das aus CXCL10/IP-10, BMP-2 und HSP70 besteht und in einem Kollektiv von 23 GBM-Erkrankten und 9 Gesunden eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 96% besaß. Dieses Profil wurde nun in einer unizentrischen klinischen Studie an 35 GBM-Erkrankten und 37 Patienten mit differenzialdiagnostisch relevanten Erkrankungen (v. a. Hirnmetastasen und primären ZNS-Lymphomen) überprüft. Dabei wurden die präoperativ abgenommenen Blutproben mittels des ELISA-Nachweisverfahrens untersucht und die jeweiligen Konzentrationen in die von Elstner et al. (2011) entwickelte Regel eingesetzt. In diesem Kollektiv konnte das Profil nicht zwischen einem GBM und seinen Differenzialdiagnosen unterscheiden (Sensitivität 31%, Spezifität 54%). Es ist nicht als Hilfsmittel zur Diagnostik von Glioblastomen geeignet.

Schlagwörter:

Glioblastom, Serumproteinprofil, CXCL10/IP-10, BMP-2, HSP70

Keywords:

glioblastoma, serum protein profile, CXCL10/IP-10, BMP-2, HSP70

7 Literaturverzeichnis

1. Ali Z, Prabhakar H, Bithal PK, Dash HH (2009): A review of perioperative complications during frameless stereotactic surgery: our institutional experience. *J Anesth* 23, 358-362
2. Amer MH, Al-Sarraf M, Baker LH, Vaitkevicius VK (1978): Malignant melanoma and central nervous system metastases: incidence, diagnosis, treatment and survival. *Cancer* 42, 660-668
3. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G (1995): Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182, 155-162
4. Balch RE (1967): Wound infections complicating neurosurgical procedures. *J Neurosurg* 26, 41-45
5. Batchelor T, Loeffler JS (2006): Primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 24, 1281-1288
6. Bellinzona M, Roser F, Ostertag H, Gaab RM, Saini M (2005): Surgical removal of primary central nervous system lymphomas (PCNSL) presenting as space occupying lesions: a series of 33 cases. *Eur J Surg Oncol* 31, 100-105
7. Bernstein M, Parrent AG (1994): Complications of CT-guided stereotactic biopsy of intra-axial brain lesions. *J Neurosurg* 81, 165-168
8. Brown IR (2007): Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 147-158
9. Bruck W, Bitsch A, Kolenda H, Bruck Y, Stiefel M, Lassmann H (1997): Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann Neurol* 42, 783-793
10. Buhning U, Herrlinger U, Krings T, Thiex R, Weller M, Kuker W (2001): MRI features of primary central nervous system lymphomas at presentation. *Neurology* 57, 393-396
11. Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006): Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451
12. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR (2006): Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31, 164-172
13. Calfee DP, Wispelwey B (2000): Brain abscess. *Semin Neurol* 20, 353-360
14. Chen HC, Guh JY, Tsai JH, Lai YH (1999): Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. *Kidney Int* 56, 1270-1273
15. Ciocca DR, Calderwood SK (2005): Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86-103

16. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL (1993): Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85, 570-574
17. Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A (2005): Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 27, 401-407
18. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581, 3702-3710
19. De LF, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V, Baron J (2001): Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 142, 430-436
20. Delogu G, Lo Bosco L, Marandola M, Famularo G, Lenti L, Ippoliti F, Signore L (1997): Heat shock protein (HSP70) expression in septic patients. *J Crit Care* 12, 188-192
21. Dhingra R, Larson MG, Benjamin EJ, Lipinska I, Gona P, Corey D, Keaney JF, Jr., Vasan RS (2006): Cross-sectional correlates of serum heat shock protein 70 in the community. *Am J Hypertens* 19, 227-231
22. Dix DJ, Garges JB, Hong RL (1998): Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. *Mol Reprod Dev* 51, 373-380
23. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A (2002): Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105, 685-690
24. Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A (2005): Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart* 91, 299-304
25. Eddy EM (1999): Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 4, 23-30
26. El Kamar FG, Posner JB (2004): Brain metastases. *Semin Neurol* 24, 347-362
27. Elstner A, Stockhammer F, Nguyen-Dobinsky TN, Nguyen QL, Pilgermann I, Gill A, Guhr A, Zhang T, von EK, Picht T (2011): Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients. *J Neurooncol* 102, 71-80
28. Erickson DM, Harris SE, Dean DD, Harris MA, Wozney JM, Boyan BD, Schwartz Z (1997): Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop Res* 15, 371-380

29. Feige U, van Eden W (1996): Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *EXS* 77, 359-373
30. Fertikh D, Krejza J, Cunqueiro A, Danish S, Alokaili R, Melhem ER (2007): Discrimination of capsular stage brain abscesses from necrotic or cystic neoplasms using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 106, 76-81
31. Floeth FW, Pauleit D, Sabel M, Reifenberger G, Stoffels G, Stummer W, Rommel F, Hamacher K, Langen KJ (2006): 18F-FET PET differentiation of ring-enhancing brain lesions. *J Nucl Med* 47, 776-782
32. Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004): Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10, 1055-1063
33. Franzen A, Heldin NE (2001): BMP-7-induced cell cycle arrest of anaplastic thyroid carcinoma cells via p21(CIP1) and p27(KIP1). *Biochem Biophys Res Commun* 285, 773-781
34. Frenel JS, Botti M, Loussouarn D, Campone M (2009): Prognostic and predictive factors for gliomas in adults. *Bull Cancer* 96, 357-367
35. Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2004): Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 35, 43-51
36. Fukuda ME, Iwadate Y, Machida T, Hiwasa T, Nimura Y, Nagai Y, Takiguchi M, Tanzawa H, Yamaura A, Seki N (2005): Cathepsin D is a potential serum marker for poor prognosis in glioma patients. *Cancer Res* 65, 5190-5194
37. Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO, Huang S, Lei J, Huang TN, Lee YS, Bhowmick DA, Lubensky IA, Oldfield EH (2004): Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 6806-6814
38. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY (1997): Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272, 18033-18037
39. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY (1998): Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 438, 1-4
40. Gaviani P, Mullins ME, Braga TA, Hedley-Whyte ET, Halpern EF, Schaefer PS, Henson JW (2006): Improved detection of metastatic melanoma by T2*-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 605-608
41. Gerner C, Vejda S, Gelbmann D, Bayer E, Gotzmann J, Schulte-Hermann R, Mikulits W (2002): Concomitant determination of absolute values of cellular protein amounts, synthesis rates, and turnover rates by quantitative proteome profiling. *Mol Cell Proteomics* 1, 528-537
42. Gerstner E, Batchelor T (2007): Primary CNS lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 7, 689-700

43. Ghosh-Choudhury N, Woodruff K, Qi W, Celeste A, Abboud SL, Ghosh CG (2000): Bone morphogenetic protein-2 blocks MDA MB 231 human breast cancer cell proliferation by inhibiting cyclin-dependent kinase-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 705-711
44. Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, Sapolsky R, Steinberg G, Hu B, Yenari MA (2004): Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol* 207, 3213-3220
45. Graner MW, Raynes DA, Bigner DD, Guerriero V (2009): Heat shock protein 70-binding protein 1 is highly expressed in high-grade gliomas, interacts with multiple heat shock protein 70 family members, and specifically binds brain tumor cell surfaces. *Cancer Sci* 100, 1870-1879
46. Gray CC, Amrani M, Yacoub MH (1999): Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Int J Biochem Cell Biol* 31, 559-573
47. Guillamo JS, Emery E, Busson A, Lechapt-Zalcman E, Constans JM, Defer GL (2008): Current management of brain metastases. *Rev Neurol (Paris)* 164, 560-568
48. Hakan T (2008): Management of bacterial brain abscesses. *Neurosurg Focus* 24, E4
49. Hanaoka R, Kasama T, Muramatsu M, Yajima N, Shiozawa F, Miwa Y, Negishi M, Ide H, Miyaoka H, Uchida H (2003): A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5, R74-R81
50. Haque S, Law M, Abrey LE, Young RJ (2008): Imaging of lymphoma of the central nervous system, spine, and orbit. *Radiol Clin North Am* 46, 339-61, ix
51. Heesters M, Molenaar W, Go GK (2003): Radiotherapy in supratentorial gliomas. A study of 821 cases. *Strahlenther Onkol* 179, 606-614
52. Heydari AR, Takahashi R, Gutschmann A, You S, Richardson A (1994): Hsp70 and aging. *Experientia* 50, 1092-1098
53. Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK, Yenari MA (2001): Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 1303-1309
54. Hormigo A, Gu B, Karimi S, Riedel E, Panageas KS, Edgar MA, Tanwar MK, Rao JS, Fleisher M, DeAngelis LM (2006): YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 12, 5698-5704
55. Hourani R, Brant LJ, Rizk T, Weingart JD, Barker PB, Horska A (2008): Can proton MR spectroscopic and perfusion imaging differentiate between neoplastic and nonneoplastic brain lesions in adults? *AJNR Am J Neuroradiol* 29, 366-372
56. Hsu MY, Rovinsky S, Penmatcha S, Herlyn M, Muirhead D (2005): Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer Metastasis Rev* 24, 251-263

57. Hua LL, Lee SC (2000): Distinct patterns of stimulus-inducible chemokine mRNA accumulation in human fetal astrocytes and microglia. *Glia* 30, 74-81
58. Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K, Osada Y, Sugimura T, Terada M (1997): Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res* 57, 5022-5027
59. Ilzecka J, Ilzecki M (2006): APRIL is increased in serum of patients with brain glioblastoma multiforme. *Eur Cytokine Netw* 17, 276-280
60. Iwadate Y, Sakaida T, Hiwasa T, Nagai Y, Ishikura H, Takiguchi M, Yamaura A (2004): Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer Res* 64, 2496-2501
61. Iwadate Y, Hayama M, Adachi A, Matsutani T, Nagai Y, Hiwasa T, Saeki N (2008): High serum level of plasminogen activator inhibitor-1 predicts histological grade of intracerebral gliomas. *Anticancer Res* 28, 415-418
62. Jaattela M (1999): Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248, 30-43
63. Jacquier-Sarlin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT, Richard MJ, Polla BS (1994): Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia* 50, 1031-1038
64. Jansen O, Forsting M, Sartor K: Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen; in: *Neuroradiologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008, 90-91
65. Jinqun T, Jing C, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Quan S, Hansen JB, Dissing S, Malling HJ, Skov PS (2000): CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J Immunol* 165, 1548-1556
66. Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA (2006): Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 194-202
67. Johnson BA, Fram EK, Johnson PC, Jacobowitz R (1997): The variable MR appearance of primary lymphoma of the central nervous system: comparison with histopathologic features. *AJNR Am J Neuroradiol* 18, 563-572
68. Jolly C, Morimoto RI (2000): Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92, 1564-1572
69. Juergens A, Pels H, Rogowski S, Fliessbach K, Glasmacher A, Engert A, Reiser M, Diehl V, Vogt-Schaden M, Egerer G (2010): Long-term survival with favorable cognitive outcome after chemotherapy in primary central nervous system lymphoma. *Ann Neurol* 67, 182-189
70. Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007): Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 3336-3341

71. Kavsan V, Shostak K, Dmitrenko V, Zozulya Y, Rozumenko V, Demotes-Mainard J (2005): Characterization of genes with increased expression in human glioblastomas. *Tsitol Genet* 39, 37-49
72. Kilgore JL, Musch TI, Ross CR (1998): Physical activity, muscle, and the HSP70 response. *Can J Appl Physiol* 23, 245-260
73. Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimamura F, Kato A, Nukui Y (2004): Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection. *Am J Surg* 187, 777-784
74. Klasner BD, Krause BJ, Beer AJ, Drzezga A (2010): PET imaging of gliomas using novel tracers: a sleeping beauty waiting to be kissed. *Expert Rev Anticancer Ther* 10, 609-613
75. Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M (1999): Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology* 116, 1202-1216
76. Kleihues P, Burger PC, Aldape KD: Glioblastoma; in: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Band 1; hrsg. v. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK; World Health Organisation, Lyon 2007, 33-49
77. Kocsis J, Madaras B, Toth EK, Fust G, Prohaszka Z (2010): Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress Chaperones* 15, 143-151
78. Kolb SA, Sporer B, Lahrtz F, Koedel U, Pfister HW, Fontana A (1999): Identification of a T cell chemotactic factor in the cerebrospinal fluid of HIV-1-infected individuals as interferon-gamma inducible protein 10. *J Neuroimmunol* 93, 172-181
79. Komatsu T, Konishi I, Fukumoto M, Nanbu K, Koshiyama M, Mandai M, Mori T (1997): Messenger ribonucleic acid expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in human endometrium and myometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1385-1389
80. Kondziolka D, Lunsford LD, Martinez AJ (1993): Unreliability of contemporary neurodiagnostic imaging in evaluating suspected adult supratentorial (low-grade) astrocytoma. *J Neurosurg* 79, 533-536
81. Kreth FW, Muacevic A, Medele R, Bise K, Meyer T, Reulen HJ (2001): The risk of haemorrhage after image guided stereotactic biopsy of intra-axial brain tumours--a prospective study. *Acta Neurochir (Wien)* 143, 539-545
82. Krex D, Klink B, Hartmann C, von DA, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G (2007): Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 2596-2606
83. Kumar DM, Thota B, Shinde SV, Prasanna KV, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K (2010): Proteomic identification of

- haptoglobin alpha2 as a glioblastoma serum biomarker: implications in cancer cell migration and tumor growth. *J Proteome Res* 9, 5557-5567
84. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E (2001): A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95, 190-198
 85. Lai PH, Weng HH, Chen CY, Hsu SS, Ding S, Ko CW, Fu JH, Liang HL, Chen KH (2008): In vivo differentiation of aerobic brain abscesses and necrotic glioblastomas multiforme using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 29, 1511-1518
 86. Langenfeld EM, Langenfeld J (2004): Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2, 141-149
 87. Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J (2003): The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24, 1445-1454
 88. Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J (2005): Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 80, 1028-1032
 89. Le Page C, Puiffe ML, Meunier L, Zietarska M, de LM, Tonin PN, Provencher D, Mes-Masson AM (2009): BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. *J Ovarian Res* 2, 4
 90. Leong LM, Brickell PM (1996): Bone morphogenic protein-4. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 1293-1296
 91. Li GC, Mivechi NF, Weitzel G (1995): Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 11, 459-488
 92. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO (2005): Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5814-5819
 93. Lindquist S (1986): The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191
 94. Liu C, Tian G, Tu Y, Fu J, Lan C, Wu N (2009): Expression pattern and clinical prognostic relevance of bone morphogenetic protein-2 in human gliomas. *Jpn J Clin Oncol* 39, 625-631
 95. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109
 96. Lovis C, Mach F, Donati YR, Bonventre JV, Polla BS (1994): Heat shock proteins and the kidney. *Ren Fail* 16, 179-192

97. Luster AD, Ravetch JV (1987): Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166, 1084-1097
98. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV (1985): Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315, 672-676
99. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K (1999): Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-677
100. Madden LA, Sandstrom ME, Lovell RJ, McNaughton L (2008): Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids* 34, 511-516
101. Majumder S, Zhou LZ, Chaturvedi P, Babcock G, Aras S, Ransohoff RM (1998): Regulation of human IP-10 gene expression in astrocytoma cells by inflammatory cytokines. *J Neurosci Res* 54, 169-180
102. Maru SV, Holloway KA, Flynn G, Lancashire CL, Loughlin AJ, Male DK, Romero IA (2008): Chemokine production and chemokine receptor expression by human glioma cells: role of CXCL10 in tumour cell proliferation. *J Neuroimmunol* 199, 35-45
103. Masdeu JC, Quinto C, Olivera C, Tenner M, Leslie D, Visintainer P (2000): Open-ring imaging sign: highly specific for atypical brain demyelination. *Neurology* 54, 1427-1433
104. Mayer MP, Bukau B (1998): Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol Chem* 379, 261-268
105. Mayer MP, Bukau B (2005): Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684
106. Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA (1997): Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 20, 309-317
107. Mehta NK, Carroll M, Sykes DE, Tan Z, Bergsland J, Canty J, Jr., Bhayana JN, Hoover EL, Salerno TA (1997): Heat shock protein 70 expression in native and heterotopically transplanted rat hearts. *J Surg Res* 70, 151-155
108. Mikkelsen T, Cairncross JG, Cavenee WK (1991): Genetics of the malignant progression of astrocytoma. *J Cell Biochem* 46, 3-8
109. Mintz AP, Cairncross JG (1998): Treatment of a single brain metastasis: the role of radiation following surgical resection. *JAMA* 280, 1527-1529
110. Molvarec A, Prohaszka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Fust G, Karadi I, Rigo J, Jr. (2007): Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol* 73, 172-179

111. Moorthy RK, Rajshekhar V (2008): Management of brain abscess: an overview. *Neurosurg Focus* 24, E3
112. Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T (1998): Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev* 22, 549-555
113. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K (2000): Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 12, 1561-1565
114. Nau R, Behnke-Mursch J (1999): Diagnosis and treatment of brain abscesses. *Ther Umsch* 56, 659-663
115. Nazzaro JM, Neuwelt EA (1990): The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high-grade astrocytomas in adults. *J Neurosurg* 73, 331-344
116. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O (1997): The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): A novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 207-219
117. Nishimura H, Emoto M, Kimura K, Yoshikai Y (1997): Hsp70 protects macrophages infected with *Salmonella choleraesuis* against TNF-alpha-induced cell death. *Cell Stress Chaperones* 2, 50-59
118. Ohgaki H, Kleihues P (2005): Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108
119. Ohgaki H, Kleihues P (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453
120. Park Y, Kim JW, Kim DS, Kim EB, Park SJ, Park JY, Choi WS, Song JG, Seo HY, Oh SC (2008): The Bone Morphogenesis Protein-2 (BMP-2) is Associated with Progression to Metastatic Disease in Gastric Cancer. *Cancer Res Treat* 40, 127-132
121. Park Y, Kang MH, Seo HY, Park JM, Choi CW, Kim YH, Kim IS, Kim JS, Oh SC (2010): Bone morphogenetic protein-2 levels are elevated in the patients with gastric cancer and correlate with disease progression. *Med Oncol* 27, 1192-1199
122. Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S, Mackness M, McLeod D (1995): Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 36, 907-912
123. Patel JK, Didolkar MS, Pickren JW, Moore RH (1978): Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases. *Am J Surg* 135, 807-810
124. Pelloski CE, Mahajan A, Maor M, Chang EL, Woo S, Gilbert M, Colman H, Yang H, Ledoux A, Blair H (2005): YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 11, 3326-3334

125. Pels H, Schlegel U (2006): Primary central nervous system lymphoma. *Curr Treat Options Neurol* 8, 346-357
126. Perdrizet GA, Shapiro DS, Rewinski MJ (1999): Surgical stress and the heat shock response: in vivo models of stress conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 874, 320-325
127. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM (1998): Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 27, 367-377
128. Poeck K, Hacke W: Multiple Sklerose; in: *Neurologie*, Springer, Heidelberg 2006, 489-508
129. Polyzoidis KS, Miliaras G, Pavlidis N (2005): Brain metastasis of unknown primary: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Cancer Treat Rev* 31, 247-255
130. Poon T, Matoso I, Tchertkoff V, Weitzner I, Jr., Gade M (1989): CT features of primary cerebral lymphoma in AIDS and non-AIDS patients. *J Comput Assist Tomogr* 13, 6-9
131. Pouliot F, Blais A, Labrie C (2003): Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* 63, 277-281
132. Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, Mestril R, Dillmann W, Weinstein PR, Sharp FR (2000): Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol* 47, 782-791
133. Raska M, Weigl E (2005): Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149, 243-249
134. Reddi AH (1994): Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4, 737-744
135. Reddi AH (1998): Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16, 247-252
136. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR (1996): Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* , 39-46
137. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P (2007): Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev* 28, 492-520
138. Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C, Ridge RJ, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1990): Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 265, 13198-13205
139. Santoro MG (1994): Heat shock proteins and virus replication: hsp70s as mediators of the antiviral effects of prostaglandins. *Experientia* 50, 1039-1047
140. Sarris AH, Broxmeyer HE, Wirthmueller U, Karasavvas N, Cooper S, Lu L, Krueger J, Ravetch JV (1993): Human interferon-inducible protein 10: expression and purification

- of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 178, 1127-1132
141. Savarin-Vuaillet C, Ransohoff RM (2007): Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics* 4, 590-601
 142. Scharfetter F, Sonnabend W (1980): The cerebral abscess. *MMW Munch Med Wochenschr* 122, 50-54
 143. Scherer HJ (1940): A critical review: The pathology of cerebral gliomas. *J Neurol Psychiatry* 3, 147-177
 144. Schirmer M: Intrakranielle Tumoren; in: *Neurochirurgie*, Urban & Fischer Verlag, München 2005, 202-241
 145. Schlegel U (2009): Primary CNS lymphoma. *Ther Adv Neurol Disord* 2, 93-104
 146. Schramm P, Xyda A, Klotz E, Tronnier V, Knauth M, Hartmann M (2010): Dynamic CT perfusion imaging of intra-axial brain tumours: differentiation of high-grade gliomas from primary CNS lymphomas. *Eur Radiol* 20, 2482-2490
 147. Selkoe DJ (2004): Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6, 1054-1061
 148. Shah GD, DeAngelis LM (2005): Treatment of primary central nervous system lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 19, 611-27, v
 149. Sherman M, Multhoff G (2007): Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 192-201
 150. Somasundaram K, Nijaguna MB, Kumar DM (2009): Serum proteomics of glioma: methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 9, 695-707
 151. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM (1999): Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103, 807-815
 152. Soussain C, Hoang-Xuan K (2009): Primary central nervous system lymphoma: an update. *Curr Opin Oncol* 21, 550-558
 153. Stockhammer F, Misch M, Horn P, Koch A, Fonyuy N, Plotkin M (2009): Association of F18-fluoro-ethyl-tyrosin uptake and 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 151, 1377-1383
 154. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van DJ, Walz A, Marriott D (1995): The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270, 27348-27357
 155. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006): Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7, 392-401

156. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oettel F, Turowski B, Woiciechowsky C (2008): Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62, 564-576
157. Stupp R, Roila F (2009): Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 126-128
158. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459-466
159. Suzuki K, Peake J, Nosaka K, Okutsu M, Abbiss CR, Surriano R, Bishop D, Quod MJ, Lee H, Martin DT (2006): Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman Triathlon race. *Eur J Appl Physiol* 98, 525-534
160. Szelenyi A, Bello L, Duffau H, Fava E, Feigl GC, Galanda M, Neuloh G, Signorelli F, Sala F (2010): Intraoperative electrical stimulation in awake craniotomy: methodological aspects of current practice. *Neurosurg Focus* 28, E7
161. Tada A, Nishihara T, Kato H (1998): Bone morphogenetic protein 2 suppresses the transformed phenotype and restores actin microfilaments of human lung carcinoma A549 cells. *Oncol Rep* 5, 1137-1140
162. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ (1993): Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177, 1809-1814
163. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR (1995): Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 155, 3877-3888
164. Tenney JH, Vlahov D, Salzman M, Ducker TB (1985): Wide variation in risk of wound infection following clean neurosurgery. Implications for perioperative antibiotic prophylaxis. *J Neurosurg* 62, 243-247
165. Weller M (2008): Chemotherapy for brain tumors in adult patients. *Nervenarzt* 79, 231-241
166. Wen XZ, Miyake S, Akiyama Y, Yuasa Y (2004): BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 100-106
167. Witzmann FA, Fultz CD, Lipscomb JC (1996): Toxicant-induced alterations in two-dimensional electrophoretic patterns of hepatic and renal stress proteins. *Electrophoresis* 17, 198-202
168. Wowra B, Muacevic A, Jess-Hempfen A, Tonn JC (2004): Safety and efficacy of outpatient gamma knife radiosurgery for multiple cerebral metastases. *Expert Rev Neurotherapeutics* 4, 673-679

169. Wowra B, Muacevic A, Tonn JC (2009): Quality of radiosurgery for single brain metastases with respect to treatment technology: a matched-pair analysis. *J Neurooncol* 94, 69-77
170. Wozney JM (1989): Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1, 267-280
171. Wozney JM (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32, 160-167
172. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
173. Xia MQ, Bacskai BJ, Knowles RB, Qin SX, Hyman BT (2000): Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 108, 227-235
174. Yamanaka R, Tanaka R (2004): Advances for the treatment of primary central nervous system lymphoma (review). *Oncol Rep* 12, 563-568
175. Yang X, Castilla LH, Xu X, Li C, Gotay J, Weinstein M, Liu PP, Deng CX (1999): Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development* 126, 1571-1580
176. Zhang D, Hu LB, Henning TD, Ravarani EM, Zou LG, Feng XY, Wang WX, Wen L (2010): MRI findings of primary CNS lymphoma in 26 immunocompetent patients. *Korean J Radiol* 11, 269-277
177. Zhang MY, Wu J, Gong X, Chen RK, Fang JS (2009): Clinical significance of BMP-2 protein and mRNA expression in human glioma. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 25, 637-639
178. Zheng PP, Hop WC, Sillevs Smitt PA, van den Bent MJ, Avezaat CJ, Luider TM, Kros JM (2005): Low-molecular weight caldesmon as a potential serum marker for glioma. *Clin Cancer Res* 11, 4388-4392

Lebenslauf

Mein Name ist Peter Nawka. Ich wohne in der Buschkrugallee 134, 12359 Berlin. Geboren wurde ich am 26. Januar 1985 in Trebišov in der Slowakischen Republik. Ich besuchte die VI. Grundschule in Michalovce und ein slowakisch-englisches bilinguales Gymnasium in Košice (beides in der Slowakischen Republik). Meine Schulzeit schloss ich 2003 auf dem Gymnasium P. Horova in Michalovce mit der Abiturnote 1,0 ab.

Von 2003 bis 2009 studierte ich Humanmedizin im Reformstudiengang an der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Ab Mai 2006 arbeitete ich an meiner Promotionsarbeit in der Klinik für Neurochirurgie der Charité. Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im Oktober 2009 mit der Note 2,0.

Seit Januar 2010 bin ich als Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie im Vivantes Klinikum Neukölln in Berlin tätig.