

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**Expression der mitotischen Regulatorproteine Pds5A, Pds5B, Mad2A und
Mad2B in astrozytären Tumoren
im Kontext der chromosomalen Instabilität,
Tumorprogression und Patientenprognose**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Susanne Fett
aus Wetter (Hessen)**

Würzburg, Juli 2019

Referent: Prof. Dr. med. Giles Hamilton Vince
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Glioblastoma multiforme.....	1
1.1.1 Gliazellen und Gliome	1
1.1.2 WHO-Klassifikation 2016	1
1.1.3 Diagnostik.....	4
1.1.4 Epidemiologie, Lokalisation und Klinik	5
1.1.5 Therapie	6
1.1.6 Genetische Veränderungen in Gliomen	7
1.2 Der Zellzyklus	9
1.2.1 Die Interphase.....	10
1.2.2 Die Mitosephase.....	12
1.2.2.1 Zellzykluskontrollpunkte.....	13
1.2.2.2 Der mitotische Spindelkontrollpunkt.....	15
1.2.2.3 Abschluss der M-phase und des Zellzyklus	18
1.3 Die Rolle der Cohesinregulatorproteine Pds5A und Pds5B in der Karzinogenese.....	19
1.3.1 Pds5A.....	19
1.3.2 Pds5B.....	20
1.4 Die Rolle der mitotischen Spindelkontrollpunktproteine Mad2A und Mad2B in der Karzinogenese.....	22
1.4.1 Mad2A.....	23
1.4.2 Mad2B.....	25
1.5 Zentrale Themen und Ziel der Arbeit	26

2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Verbrauchsmaterial	29
2.1.3	PC-Programme	29
2.1.4	Chemikalien.....	29
2.1.5	Kit.....	30
2.1.6	Primärantikörper.....	30
2.1.7	Lösungen	30
2.1.8	Untersuchungsmaterial	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Anfertigung histologischer Schnitte	31
2.2.2	Immunhistochemie	32
2.2.2.1	Hintergrund	32
2.2.2.2	Durchführung	33
2.2.2.2.1	Ermittlung der Antikörper-Verdünnung.....	35
2.2.3	Ermittlung von Expressionswerten	38
2.2.4	Statistik.....	41
2.2.4.1	Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	41
2.2.4.2	Kaplan-Meier-Überlebenskurven	42
2.2.4.3	Korrelation.....	43
3	Ergebnisse	46
3.1	Ki67	46
3.2	Pds5A.....	50
3.3	Pds5B	53

3.4	Mad2A	56
3.5	Mad2B	59
3.6	Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten nach ihrer Expression von Ki67, Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B	63
3.7	Korrelationen	66
4	Diskussion	72
4.1	Pds5A	72
4.2	Pds5B	75
4.3	Mad2A	78
4.4	Mad2B	83
4.5	Fazit.....	87
5	Zusammenfassung.....	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Abkürzungsverzeichnis	116

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vergrößerung und Aufbau von Cohesin aus den verschiedenen Untereinheiten und angelagertem Pds5	11
Abb. 2:	Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte	14
Abb. 3:	Der mitotische Spindelkontrollpunkt	16
Abb. 4:	Die Immunhistochemie	32
Abb. 5:	Ki67-IHC, Gesamt-Tumorgewebe	47
Abb. 6:	Ki67-IHC, Proliferationszentren	48
Abb. 7:	Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der Ki67-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren	49
Abb. 8:	Pds5A-IHC, Proliferationszentren	51
Abb. 9:	Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der stark Pds5A-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren ...	52
Abb. 10:	Pds5B-IHC, Proliferationszentren	54
Abb. 11:	Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der Pds5B-Gesamtexpression in den Proliferationszentren	55
Abb. 12:	Mad2A-IHC, Proliferationszentren	57
Abb. 13:	Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der stark Mad2A-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren	58
Abb. 14:	Mad2B-IHC, Proliferationszentren	61
Abb. 15:	Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der zytoplasmatischen Mad2B-Expression in den Proliferationszentren	62
Abb. 16:	Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten nach ihrer Gesamtexpression in den Proliferationszentren	65
Abb. 17:	Statistisch signifikante Korrelationen	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	WHO-Klassifikation und Grad-Einteilung der astrozytären Tumoren und deren Subtypen sowie allgemeine Charakteristika von Hirntumoren	3
Tab. 2:	Genetische Veränderungen in Gliomen.....	8
Tab. 3:	Primärantikörper mit Verdünnung, Inkubationszeiten und verwendeter Positivkontrolle.....	36
Tab. 4:	Auswertung der einzelnen Antigenexpression in den Gesichtsfeldern mit Hilfe von Image J	40
Tab. 5:	Vergleich der Expressionswerte eines Antigens zwischen den einzelnen Tumorstadien und der angewandte parameterfreie Test.....	41
Tab. 6:	Korrelationsgruppen in Bezug auf die Expression der Antigene.....	43
Tab. 7:	Auflistung der einzeln durchgeführten Korrelationen in jeder Gruppe (Tab. 6) in Bezug auf die Unterform der Tumoren	44
Tab. 8:	Rangkorrelationskoeffizient r_s und Höhe der Korrelation	45
Tab. 9:	Medianes Überleben von GBM-Patienten in Monaten bei hoher bzw. niedriger Expression.....	63

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastoma multiforme

1.1.1 Gliazellen und Gliome

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der am häufigsten bei Erwachsenen diagnostizierte primäre Hirntumor. Er weist eine hohe Malignität auf und ist trotz der heutigen Therapiemaßnahmen durch ein medianes Patientenüberleben von nur 14,6 Monaten gekennzeichnet (Stupp et al., 2005).

Das GBM wird zu den astrozytären Tumoren gezählt, die aus neuroepithelialen Gewebe entstehen (Mattle et al., 2013). Aus dem Neuroepithel wird während der Embryogenese die Neuroglia des Zentralnervensystems (ZNS) gebildet. Drei der vier Gliazelltypen gehen aus diesem Gewebe hervor: die Oligodendrozyten, die Ependymzellen und die Astrozyten, die die größte Gruppe unter ihnen darstellen. Die Mikroglia stammt vom Mesoderm ab, zählt aber auch zur Neuroglia des ZNS (Sadler et al., 2008, Trepel, 2012). Aufgaben der Gliazellen am Beispiel der Astrozyten sind u.a. Ernährungs- und Stützfunktion, Beteiligung an der Blut-Hirnschranke sowie Narbenbildung nach Gewebeschäden (Welsch et al., 2010, Trepel, 2012).

Tumoren, die aus diesem neuronalen Stützgewebe hervorgehen, bezeichnet man allgemein als Gliome. Mit 60% stellen die Astrozytome, deren Ursprung wahrscheinlich die Astrozyten sind, die größte Gliomgruppe dar (Schlegel et al., 2003). Sie werden nach den Kriterien der World Health Organization (WHO) für ZNS-Tumoren von 2016 in die Subgruppen „*Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours*“ und „*other astrocytic tumours*“ klassifiziert und in WHO-Grade eingeteilt (Tabelle (Tab. 1) (Louis et al., 2016).

1.1.2 WHO-Klassifikation 2016

Grundlage der aktuellen Klassifizierung bleiben - wie in der vorhergehenden von 2007 auch - die histologischen Merkmale, die eine Subtyp- und Gradeinteilung

ermöglichen. Dafür wird im Rahmen einer stereotaktischen Biopsie oder Operation Gewebematerial aus verdächtigem Gewebe entnommen und zyto- bzw. histologisch aufbereitet und untersucht.

Mit steigendem WHO-Grad der Astrozytome erhöht sich der Zellreichtum und Mitoseindex, während die Zelldifferenzierung abnimmt und Gefäßproliferate sowie Tumorgewebsnekrosen auftauchen. Diffuse Astrozytome ^oII sind mäßig zellreich und gut differenziert. Bei anaplastischen Astrozytomen ^oIII zeigt sich in Abgrenzung zu ^oII-Tumoren eine erhöhte Mitoserate und Zelldichte, sowie eine verstärkte nukleäre und zelluläre Polymorphie. Kleine mikrovaskuläre Proliferate können vorhanden sein. GBM zeigen - wie der Name „multiforme“ andeutet - eine markante zelluläre und nukleäre Pleomorphie, eine noch höhere Zelldichte und eine gesteigerte Zahl an oft atypischen Mitosen. Außerdem treten girlandenförmige oder glomeruloide Gefäßproliferationen, Nekrosen und zystische Tumorzerfallshöhlen auf (Leopardfellstruktur der Gewebeschnitte) (Tab. 1) (Schlegel et al., 2003, Louis et al., 2007, Müller, 2010, Louis et al., 2016).

Zusätzlich zu diesen mikroskopischen Beurteilungen können Spezialfärbungen, z.B. von Proteinen (z.B. Gliafaserprotein), epithelialen (z.B. Zytokeratinen) oder lymphozytären Markern (z.B. *cluster of differentiation* (CD) 20), zur besseren Einteilung genutzt werden (Weller et al., 2014).

Die zuvor gültige WHO-Klassifikation von 2007 wird in der aktuellen Klassifizierung u.a. in der Subgruppe der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumore um molekulare bzw. genotypische Parameter ergänzt. Dadurch soll die diagnostische Zuverlässigkeit erhöht, die Behandlung von Patienten spezifiziert und deren Prognose verbessert werden. Wesentlich ist dabei die Bestimmung des Isocitrat-Dehydrogenase 1/2 (IDH1/2)-Status (Wildtyp oder Mutante). Das GBM als ein ^oIV-Gliom entsteht als primäres oder

Tab. 1: WHO-Klassifikation und Grad-Einteilung der astrozytären Tumoren und deren Subtypen sowie allgemeine Charakteristika von Hirntumoren
 modifiziert nach (Kleihues, 2007, Louis et al., 2007, Mattle et al., 2013, Louis et al., 2016)

Diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren	Andere astrozytäre Tumoren	WHO-Grad und Synonym	Allgemeine und histologische Charakteristika
	<ul style="list-style-type: none"> - Pilozytisches Astrozytom - Subependymales Riesenzellastrozytom 	<p>I</p> <p>Niedriggradiges Gliom</p>	<ul style="list-style-type: none"> - benigne - Wachstum: langsam - Differenzierung: gut
<ul style="list-style-type: none"> - Diffuses Astrozytom (Variante: gemistozytisch) - Oligodendrogliom/ -astrozytom 	<ul style="list-style-type: none"> - Pleomorphes Xanthoastrozytom 	<p>II</p> <p>Gliom der Grad-II-Gruppe, Niedriggradiges Astrozytom, = <i>low-grade astrocytoma</i> (LGA °II)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Wachstum: langsam, infiltrativ - Differenzierung: gut - Rezidiv oder Transformation in höheren Grad möglich
<ul style="list-style-type: none"> - Anaplastisches Astrozytom - Anaplastisches Oligodendrogliom/ -astrozytom 	<ul style="list-style-type: none"> - Anaplastisches, pleomorphes Xanthoastrozytom 	<p>III</p> <p>Höhergradiges Gliom, Anaplastisches Gliom</p>	<ul style="list-style-type: none"> - maligne - Wachstum: schnell - Differenzierung: zunehmende Kernatypien und mitotische Aktivität - Rezidiv möglich
<ul style="list-style-type: none"> - GBM (Varianten: Riesenzell-glioblastom, Gliosarkom, Epitheloides GBM) - Diffuses Mittelliniengliom 		<p>IV</p> <p>GBM</p>	<ul style="list-style-type: none"> - maligne - Wachstum: rasch, aggressiv - Differenzierung: zelluläre und nukleäre Pleomorphie, gesteigerte und atypische Mitosen - Neovaskulogenese und Nekrosen

de novo GBM zu 90% spontan und zeigt in der Regel einen IDH-Wildtyp-Status (Schlegel, 2003). Es kann sich aber auch als sekundäres GBM aus einem niedergradigen Astrozytom $^{\circ}II$ oder $^{\circ}III$ über mehrere Jahre hinweg mit einer bereits in diesen Vorstufen häufig zu detektierenden IDH1/2-Mutation entwickeln (Ohgaki et al., 2013, Louis et al., 2016). Der Methylierungsstatus des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens wird für 60-70jährige Patienten empfohlen, da er prädiktiv für das Therapieansprechen ist (Weller et al., 2014). Zur Diagnosestellung von Oligodendrogliomen und anaplastischen Oligodendrogliomen wird zusätzlich zur IDH-Mutation eine chromosomale 1p/19q-Kodeletion und in v.a. bei Kindern vorkommenden, diffusen Mittelliniengliomen das Vorhandensein einer K27M-Mutation im Histongen H3 untersucht.

In nicht eindeutigen Fällen sind die genotypischen vor den phänotypischen Merkmalen für die Klassifizierung ausschlaggebend. Wenn nicht getestet wurde oder ein nicht eindeutiges Ergebnis vorliegt, kommt die Zusatzbezeichnung „*not otherwise specified*“ (NOS) hinzu. Auch in Fällen ohne genotypischen Marker, wie z.B. den Oligoastrozytomen bzw. anaplastischen Oligoastrozytomen, die oligodendrogliale und astrozytäre histologische Merkmale zeigen, wird NOS hinzugefügt (Louis et al., 2016).

Weitere genotypischen Veränderungen, die zusätzlich auftreten können, aber nicht für die Klassifikation entscheidend sind, werden in Kapitel 1.1.6 aufgeführt.

1.1.3 Diagnostik

Bei Verdacht auf einen Hirntumor findet zunächst eine gründliche Anamneseerhebung und klinische Untersuchung statt. Dabei ist speziell die Ermittlung des neurologischen Status notwendig. Wesentlich für die Diagnostik ist die Magnetresonanztomografie (MRT) mit und ohne Kontrastmittel, die u.U. um weitere Verfahren wie die Computertomografie (CT), Angiografie oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ergänzt wird. Zusätzlich kann eine Lumbalpunktion, z.B. zur Abgrenzung eines entzündlichen Prozesses, oder eine

Elektroenzephalografie (EEG) herangezogen werden. Es folgt eine stereotaktische Biopsie oder eine operative Resektion (Weller et al., 2014).

1.1.4 Epidemiologie, Lokalisation und Klinik

Unter allen Hirntumoren haben GBM einen Anteil von 15%, Astrozytome sind mit 25% vertreten (Müller, 2010). Männer sind etwas häufiger von Gliomen betroffen. Das Verhältnis Männer/Frauen liegt bei diffusen Astrozytomen bei 1,17 und bei GBM bei ca. 1,3 (Ohgaki et al., 2013).

Gliome jeder Gradierung können bereits bei Kindern auftreten, besonders häufig findet sich hier das pilozytische Astrozytom. Im Alter zwischen 30-45 Jahren findet man diffuse bzw. anaplastische Astrozytome, sowie um das 45. Lebensjahr auch sekundäre GBM. Primäre GBM entwickeln sich dagegen erst in höherem Alter. Im Median sind die Patienten bei der Diagnosestellung 62 Jahre alt (Schlegel et al., 2003, Ohgaki et al., 2013, Louis et al., 2016).

Lokalisiert sind Astrozytome v.a. im Marklager des Frontalhirns, aber auch im Temporallappen. Seltener liegen sie im Parietal- oder Okzipitallappen. Das GBM findet sich im Marklager der Großhirnhemisphären (frontal, parietal), in den Stammganglien oder im Hirnstamm. Von einem Schmetterlingsgliom spricht man, wenn es in beide Hemisphären vom Corpus callosum ausgehend hineinwächst (Müller, 2010). Es wird diskutiert, ob ein diffus verteiltes Gliom aus mehreren Subtypen bestehen könnte (Louis et al., 2016).

Je nach Lokalisation im Gehirn sind die Symptome von GBM vielfältig und unspezifisch. Auch ein kleiner Tumor kann bereits große Auswirkungen auf den Patienten haben. Zu den möglichen Symptomen zählen fokal-neurologische Ausfälle, epileptische Anfälle, kognitive und psychische Auffälligkeiten bis hin zu Vigilanzstörungen. Hinzu kommen Zeichen erhöhten Hirndrucks wie Erbrechen, Schwindel und/ oder Kopfschmerzen. In Bezug auf die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten wird deutlich, dass die Symptome von Astrozytomen sich über Jahre entwickeln können und sich bei frühzeitiger Diagnose weniger schwer auf den Patienten auswirken, wohingegen das GBM

innerhalb von wenigen Wochen/ Monaten zu einem fulminanten Beschwerdebild führen kann (Müller, 2010, Mattle et al., 2013).

1.1.5 Therapie

Nach radiologischer und bioptischer Sicherung wäre eine vollständige Resektion der einzige kurative Ansatz. Begrenzt wird die Durchführung dieser Therapiemaßnahme jedoch durch enge Lagebeziehungen zu wichtigen neuronalen Strukturen, die man durch eine radikale Operation zerstören würde (Müller, 2010). Dadurch könnte die Lebensqualität verringert oder sogar das Leben des Patienten gefährdet werden. Eine Abwägung des Resektionsausmaßes muss also stets unter Betrachtung der individuellen Patientensituation erfolgen. Je mehr von einem GBM reseziert wird, desto besser wird die Prognose (Stummer et al., 2006, Stummer et al., 2008, Stummer et al., 2012). Um dabei sicherer Tumor von gesundem Hirngewebe trennen und resezieren zu können, nutzt man intraoperativ die Fluoreszenz der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), welche sich intrazellulär in Tumorgewebe anreichert (Stummer et al., 2006).

Ein diffus-wachsendes LGA °II bei Patienten unter 40 Jahren mit einem Durchmesser unter 5 cm, welches sich asymptomatisch verhält, kann jedoch vorerst mittels regelmäßiger Kontrollen beobachtet werden. Scharf-abgrenzbare, symptomatische oder progrediente niedriggradige Gliome hingegen werden reseziert oder bestrahlt. LGA °III- und GBM-Patienten werden standardmäßig operiert gefolgt von einer Radiatio, wobei bei °III-Tumoren alternativ und bei °IV-Tumoren obligat eine adjuvante Chemotherapie gegeben wird. Zur Anwendung kommt hier heutzutage v.a. das alkylierende Zytostatikum Temozolomid (TMZ). GBM-Patienten profitieren von seinem gleichzeitigen Einsatz während der Bestrahlung. Nach einer vier- bis sechswöchigen Pause startet die Erhaltungstherapie mit TMZ für sechs Zyklen. Das mediane Überleben verlängert sich hierdurch von 12 (alleinige Bestrahlung) auf 14,6 Monate (Radiatio und TMZ) (Stupp et al., 2005). In der EF-14 Studie, einer randomisierten, klinischen Phase III Studie, die Patienten mit GBM nach operativer Resektion und Radiochemotherapie einschloss, konnte durch den

Einsatz von alternierenden elektromagnetischen Feldern (*tumor-treating fields*, TTFields) beim fortgeführten, gleichzeitigen Einsatz von TMZ ein signifikant verbessertes, medianes Überleben von 20,9 Monaten ermittelt werden (Stupp et al., 2017).

Als weitere Chemotherapeutika wurden v.a. früher auch Nitrosoharnstoffe angewendet, z.B. adjuvant durch die intraoperative Einlage von 1,3-Bis(Chloro-Ethyl)-1-Nitroso-Urea-Wafern (BCNU-Wafern bzw. Carmustin) in das Tumorbett (Müller, 2010) oder das PCV-Schema mit dem Alkylanz Procarbacin, dem Nitrosoharnstoff Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (CCNU) und dem Vinca-Alkaloid Vincristin. Elektromagnetische Nano-, Immun- und Suizidtherapien, der Einsatz von Antikörpern gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder Kombinationen von CCNU und TMZ sind in der klinischen Erprobung (Stupp et al., 2015, Herrlinger et al., 2019). In Rezidiv- bzw. Progressionsfällen aller Gliome wird je nach Patientensituation eine Reoperation, Radiatio oder Chemotherapie in Erwägung gezogen (Weller et al., 2014).

1.1.6 Genetische Veränderungen in Gliomen

Neben den in der WHO-Klassifikation von 2016 genannten genotypischen Veränderungen finden sich in Gliomen zahlreiche weitere Mutationen im Genom sowie sehr häufig numerische und strukturelle Aberrationen im Chromosomensatz (Aneuploidie) (Tab. 2). Mit höherem WHO-Grad scheint die Anzahl dieser genetischen Veränderungen zuzunehmen (Shapiro, 2002, Arslantas et al., 2007). Des Weiteren konnten auch Zusammenhänge zwischen Aneuploidien und dem Überleben festgestellt werden (Kunwar et al., 2001, Shapiro, 2002, Wessels et al., 2002).

Die genetischen Veränderungen könnten ursächlich durch einen fehlgesteuerten Zellzyklus, z.B. durch deregulierte Zellzyklusproteine entstanden sein. Andererseits wäre umgekehrt auch denkbar, dass diese selbst Einfluss auf den Zellzyklus und die Expression seiner Regulatorproteine nehmen könnten.

Tab. 2: Genetische Veränderungen in Gliomen
 modifiziert nach (Schröck et al., 1996, Shapiro, 2002, Reifenberger et al., 2004, Ohgaki et al., 2013, Appin et al., 2014, Louis et al., 2016)

Astrozytäre Entität	Genetische Veränderungen
<p>LGA °II</p>	<p><u>häufiger:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Gewinn: 7 (evtl. mit Gonosomverlust) 7q - Mutation: IDH1/2 <p><u>seltener:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Amplifikation: 8q - Deletion: 10, Gonosom 10q, 22q 17p - LOH: 3 6q, 13q 10p - strukturelle Veränderung: 1p, 9p - Mutation: 17p TP53 (ca.59% d.F.) <p><u>in Oligodendrogliomen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Kodeletionen in 75% d.F.: 1p und 19q
<p>LGA °III</p>	<p><u>häufiger:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Polysomie: 7 - Deletion: 10 - Mutation: IDH1/2 <p><u>seltener:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Gewinn: 19, 20, 1q, 11q, Xq 7p,11p - Deletion: 22, Gonosom, 4q, 10q, 11q, 13q, Xq, 22q 1p, 9p, 11p, 12p, - strukturelle Veränderungen (Brüche): 6q, 7q, 15q, 19q 1p, 3p,5p, 9p,17p - Amplifikation: 7q, 12q - Translokation: 1p - LOH: 13q, 19q 1p, 3p, 9p, 11p, - Mutation: TP53 (ca. 53% d.F.) - Überexpression: PDGF

Astrozytäre Entität	Genetische Veränderungen
<p>GBM</p>	<p><u>in primären GBM:</u> - Deletion: 10q (ca.70% d.F.) 10p (ca. 50% d.F.)</p> <p><u>in sekundären GBM:</u> - Deletion: 10q (>60% d.F.), 19q (ca. 50% d.F.)</p> <p><u>in primären und sekundären GBM:</u> - Gewinn: 7, 19, 20, 7q, 8q, 20q 1p,7p - Deletion: 10, 13, 14, 22, Gonosom 4q, 6q, 10q, 13q 9p, 10p CDKN2A</p> <p>- Mutation: IDH1/2 (in primären GBM ca.< 5%, in sekundären ca. 80% d.F.) TP53 (in primären GBM ca.27%, in sekundären ca. 81% d.F.) PTEN</p> <p>- Amplifikation: 12q PDGF mit LOH von 17p und Gen des EGFR</p>

Nummer = ganzes Chromosom oder Chromosomenarm betreffend,

q = langer Chromosomenarm, p = kurzer Chromosomenarm

d.F. = der Fälle

LOH = *loss of heterozygosity*

TP53 = Tumorsuppressor p53

PDGF = *platelet derived growth factor*

CDKN2A = *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (Synonym: p16^{INK4a})

PTEN = *phosphatase and tensin homolog*

EGFR = *epidermal growth factor receptor*

1.2 Der Zellzyklus

Eukaryotische, proliferierende Zellen durchlaufen den Zellzyklus, um ihr Erbgut symmetrisch auf die Tochterzellen weiterzugeben. Den Abschluss des Zellzyklus bildet die Mitose. Während des Zellzyklus werden verschiedene Phasen durchlaufen. Die Zelle wechselt dabei zwischen einer langandauernden Interphase und einer kurzen Mitosephase. Beide Phasen werden wiederum in

verschiedene Abschnitte eingeteilt. So gliedert sich die Interphase in die G₁-, S- und G₂-Phase. Dabei steht die Abkürzung „G“ bei G₁, G₂ (und G₀) für Englisch „gap“, was Abstand oder Lücke bedeutet. „S“ steht für die Synthesephase. Die Mitosephase gliedert sich in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und die Telophase (Lüllmann-Rauch, 2006, Alberts et al., 2011).

1.2.1 Die Interphase

Regen Wachstumsfaktoren die Zelle zur Teilung an, tritt diese aus ihrem Ruhezustand G₀, der Tage bis hin zu Jahren andauern kann, in die G₁-Phase, den Beginn der Interphase, über. In diesem auch als postmitotische oder Präsynthesephase bezeichneten Abschnitt beginnt die Zelle mit ihrem Wachstum. Sie bildet wichtige Zellorganellen und vergrößert ihr Zytoplasma. Auch werden Desoxyribonukleosid-Triphosphate, *messenger ribonucleic acid* (mRNA) für Replikationsenzyme und andere Proteine, die für eine erfolgreiche Teilung wichtig sind, gebildet (Alberts et al., 2011).

In der darauffolgenden S-Phase wird die *deoxyribonucleic acid* (DNA) repliziert. Die duplizierten Chromosomenpaare sind miteinander verflochten und werden fest durch einen speziellen Proteinkomplex zusammengehalten, dem Cohesin (Lüllmann-Rauch, 2006, Alberts et al., 2011). Der zentrale Cohesinkomplex besteht aus drei Teilen: *structural maintenance of chromosomes 1* und 3 (SMC1, SMC3) sowie *sister chromatid cohesion 1* (SCC1), die zusammen eine ringartige Struktur ausbilden. Eine vierte Untereinheit *stromal antigen 1/2* (SA1/2, STAG1/2) bindet direkt an SCC1 (Abbildung (Abb. 1). An bestimmten Regionen der Chromatiden, aber über deren gesamte Länge, wird Cohesin schon am Ende der Telophase bzw. am Übergang zur G₁-Phase, angelagert (Alberts et al., 2011, Peters et al., 2012, Watrin et al., 2016). Verflechtung und Cohesin sorgen zusammen für die Schwesterchromatidkohäsion.

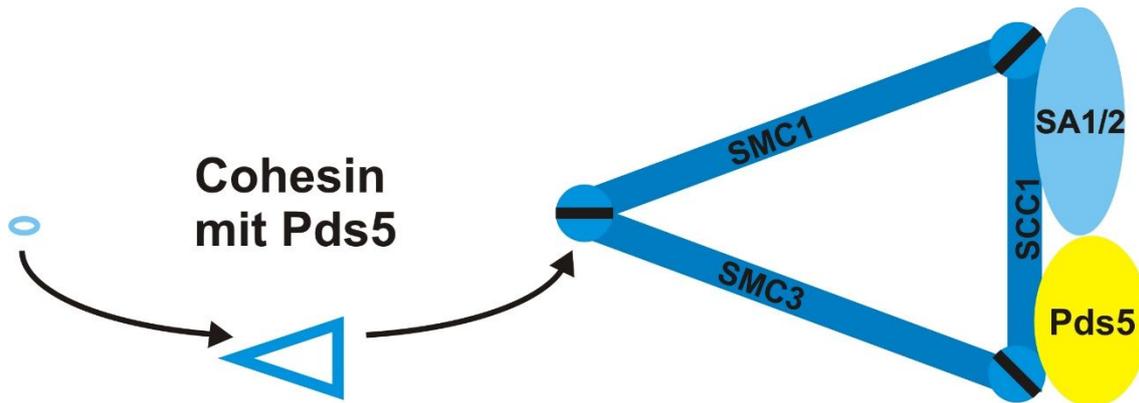


Abb. 1: Vergrößerung und Aufbau von Cohesin aus den verschiedenen Untereinheiten und angelagertem Pds5
modifiziert nach (Peters et al., 2012)

Die Stärke der Kohäsion während des Zellzyklus, aber auch das Cohesin selbst, werden durch Cohesin-regulierende Proteine beeinflusst. Eine Sonderstellung nimmt dabei das Protein *precocious dissociation of sisters 5* (Pds5) ein, welches als positiver und negativer Regulator an der Aufrechterhaltung, Bildung und Lösung von Cohesin und der Schwesterchromatidkohäsion beteiligt ist (Losada et al., 2005, Peters et al., 2012, Rankin, 2015, Ouyang et al., 2017)

In Wirbeltieren existieren zwei Orthologe: Pds5A (auch *sister chromatid cohesion protein 112* (SCC112), PIG54) und Pds5B (auch *androgen-induced proliferation inhibitor* (APRIN), AS3, CG008), die sich zu 65% in ihrer Aminosäurestruktur ähneln (NCBI Gene, 20.01.2016, HGNC, 27.04.2016) (Hagemann et al., 2011, Brough et al., 2012). Ihre genauen funktionellen Unterschiede sind noch nicht abschließend untersucht und der gegenseitige funktionelle Ersatz wird diskutiert (Zhang et al., 2009, Rankin, 2015). Es wird angenommen, dass Pds5A und B unterschiedlich am Chromatin verteilt sind und dadurch verschieden auf die Kohäsion einwirken (Losada et al., 2005, Carretero et al., 2013).

Am besten untersucht sind die Funktionen in der Schwesterchromatidkohäsion von Pds5 in Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Pds5 wird eine Art Gerüstfunktion für andere Proteine zugesprochen. Es bindet über seine *HEAT repeats* an SCC1, sobald sich der Cohesin-Proteinkomplex am Chromatin aufgebaut hat, ohne jedoch eine Untereinheit davon zu sein (Hartman et al., 2000, Panizza et al., 2000, Sumara

et al., 2000, Stead et al., 2003, Peters et al., 2012, Rankin, 2015, Muir et al., 2016).

Das Protein *establishment of cohesion 1* (ECO1 in der Hefezelle; *establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1* (ESCO1) im Menschen) benötigt Pds5 für die Azetylierung von SMC3 und den Erhalt der Kohäsion, welche zusätzlich durch das Protein Sororin unterstützt wird (Peters et al., 2012, Minamino et al., 2015). Pds5 bewahrt anscheinend die Schwesterchromatidkohäsion durch Verhinderung des Abbaus von Cohesin und liegt bis zum Beginn der Anaphase an diesem gebunden vor (Panizza et al., 2000, Tanaka et al., 2001b, D'Ambrosio et al., 2014).

Mit dem Fortschreiten der Interphase wird in der S-Phase aus dem Zentrosom mit seinem Zentriolenpaar ein Diplosom, welches für die Ausbildung der Mitosespindel verantwortlich ist (Alberts et al., 2011).

Die prämitotische oder Postsynthesephase (G_2 -Phase) zeichnet sich durch das Lösen von Zellkontakten zu Nachbarzellen und die Bereitstellung von Proteinen für die Mitose aus, die u.a. zur Destabilisierung der Kernmembran führen (Poeggel et al., 2009, Alberts et al., 2011).

1.2.2 Die Mitosephase

Den Beginn der Mitosephase, die auch als M-Phase oder nur Mitose bezeichnet wird, bildet die Prophase. In dieser kondensieren die duplizierten Chromosomen und werden sichtbar. Die Verflechtung wird aufgehoben und die Cohesinkomplexe werden über zwei verschiedene Signalwege aufgelöst: In der Prophase/ Prometaphase werden zunächst die Cohesinkomplexe, die sich an den Chromosomenarmen befinden, entfernt. Der Cohesinring wird geöffnet, indem das *wings apart like protein* (Wapl) mit Pds5 interagiert und die Trennung von SCC1 von SMC3 bzw. vom Cohesinkomplex vermittelt. Dadurch kommt es zu einer Aufhebung der Schwesterchromatidkohäsion an den Chromosomenarmen, während die Cohesinkomplexe an der Zentromerregion

zunächst noch intakt bleiben (Hartman et al., 2000, Panizza et al., 2000, Waizenegger et al., 2000, Gandhi et al., 2006, Guacci, 2007, Shintomi et al., 2009, Sutani et al., 2009, Peters et al., 2012, Chan et al., 2013, Tedeschi et al., 2013, Rankin, 2015, Ouyang et al., 2017).

Den humanen Formen Pds5A und B wird ebenso die Kontrolle der Cohesin-Verteilung am Chromatin und die Interaktion mit Wapl zugesprochen, um Cohesin vom Chromatin zu lösen (Kueng et al., 2006, Wutz et al., 2017).

Beim Fortschreiten des Zellzyklus trennt sich nun das Diplosom: jedes Zentrosom für sich bildet einen Spindelpol aus und Spindelfasern werden durch Mikrotubulipolymerisation ausgebildet (Spindel-Mikrotubuli). Während der Prometaphase zerfällt die Kernhülle, die Spindel-Mikrotubuli können sich danach mit ihren (+)-Enden an die Kinetochore der Chromosomen anheften und werden nun als Kinetochor-Mikrotubuli bezeichnet.

Die Metaphase zeichnet sich durch Anordnung der Chromosomen mithilfe der Kinetochor-Mikrotubuli an der Metaphaseplatte in der Äquatorialebene der Zelle aus.

Im Meta-Anaphase-Übergang werden nun die übrig gebliebenen Cohesinkomplexe an der Zentromerregion entfernt (Alberts et al., 2011). Grundlage für diesen Mechanismus ist ein Zellzykluskontrollpunkt.

1.2.2.1 Zellzykluskontrollpunkte

Während des Zellzyklus gibt es drei Kontrollpunkte, die der Überprüfung der erfolgten Schritte und der Vorbereitung der nachfolgenden Phase dienen (Abb. 2) (Lüllmann-Rauch, 2006, Alberts et al., 2011).

Die zwischen der S- und M-Phase liegenden G₁- und G₂-Phasen sind für zwei der Kontrollpunkte wesentlich. Der G₁-Kontrollpunkt, der auch als Start- oder Restriktionspunkt bezeichnet wird, liegt am Ende der G₁-Phase. Hier entscheidet sich der Eintritt der Zelle in den Zellzyklus durch Überprüfung der Umweltbedingungen. Liegen günstige Bedingungen vor, so initiiert die Zelle den

Zellzyklus, der danach auch komplett durchlaufen werden muss (Alberts et al., 2011).

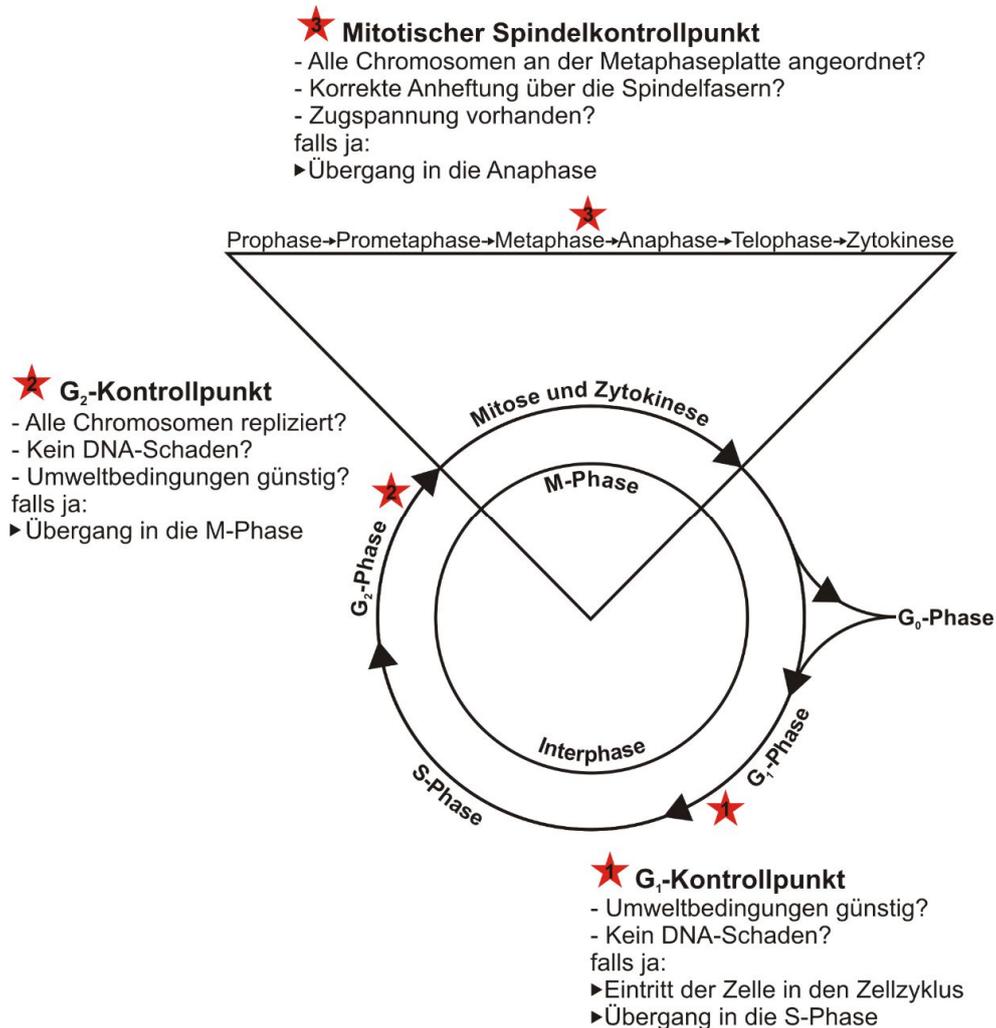


Abb. 2: Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte
 modifiziert nach (Lüllmann-Rauch, 2006, Alberts et al., 2011)

Am Ende der G₂ und vor Beginn der M-Phase liegt der G₂-Kontrollpunkt. An dieser Stelle wird kontrolliert, ob die DNA in der S-Phase fehlerfrei repliziert wurde und ob weiterhin günstige Umweltbedingungen vorliegen. Nur dann erfolgt der Eintritt in die M-phase (Alberts et al., 2011).

Der dritte Kontrollpunkt liegt am Übergang der Metaphase zur Anaphase und wird als mitotischer Spindelkontrollpunkt bezeichnet. Er ist für die vollständige Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion wesentlich (Alberts et al., 2011).

1.2.2.2 Der mitotische Spindelkontrollpunkt

Der mitotische Spindelkontrollpunkt, der auch als Metaphasekontrollpunkt (Metaphase-Anaphase Kontrollpunkt) oder *spindle assembly checkpoint* (SAC) bezeichnet wird, überprüft die korrekte Anheftung der Kinetochor-Mikrotubuli an die Zentromeren bzw. die Kinetochorregion der Schwesterchromatiden in der Metaphaseplatte.

Bei einer fehlerhaften Anlagerung der Spindel-Mikrotubuli, z.B. monotelisch (nur ein Chromatid ist gebunden, Abb. 3, rechte Spalte a, b) kommt es zur Aktivierung des Kontrollpunktes. Eine Schlüsselkomponente ist dabei das Protein *mitotic arrest deficient 2A* (Mad2A). Es wird auch als Mad2, *mitotic arrest deficient 2-Like 1* (Mad2L1) oder *Homo sapiens MAD* (HSMAD) bezeichnet (NCBI Gene, 30.06.2016). Ungebundene Kinetochore bewirken über eine Signalkaskade eine Phosphorylierung der Aminosäure Serin an Position 195 am Carboxy-Terminus von Mad2A (Kim et al., 2010). Es kommt zu einem Konformationswandel, der Mad2A aktiviert (Kim et al., 2010). Aktiviertes Mad2A bindet an *cell division cycle 20* (Cdc20) und inhibiert dessen Funktion. Danach binden die Proteine *budding uninhibited by benzimidazol* (Bub) 3 und *Bub1 related* (BubR1), die die Wirkung von Mad2A zusätzlich verstärken. Alle drei zusammen bilden den *mitotic checkpoint complex* (MCC). Cdc20 kann nun nicht mehr eine Ubiquitinligase namens *anaphase-promoting-complex/Cyclosom* (APC/C, APC) aktivieren, die für das Fortschreiten der Metaphase in die Anaphase verantwortlich ist. Der Zellzyklusarrest tritt ein (Abb. 3, rechte Spalte, a-f) (Hwang et al., 1998, Luo et al., 2000, Sudakin et al., 2001, Chung et al., 2002, Luo et al., 2002, Wassmann et al., 2003, Bharadwaj et al., 2004, Luo et al., 2004, De Antoni et al., 2005, Nasmyth, 2005, Musacchio et al., 2007, Kim et al., 2010, Alberts et al., 2011).

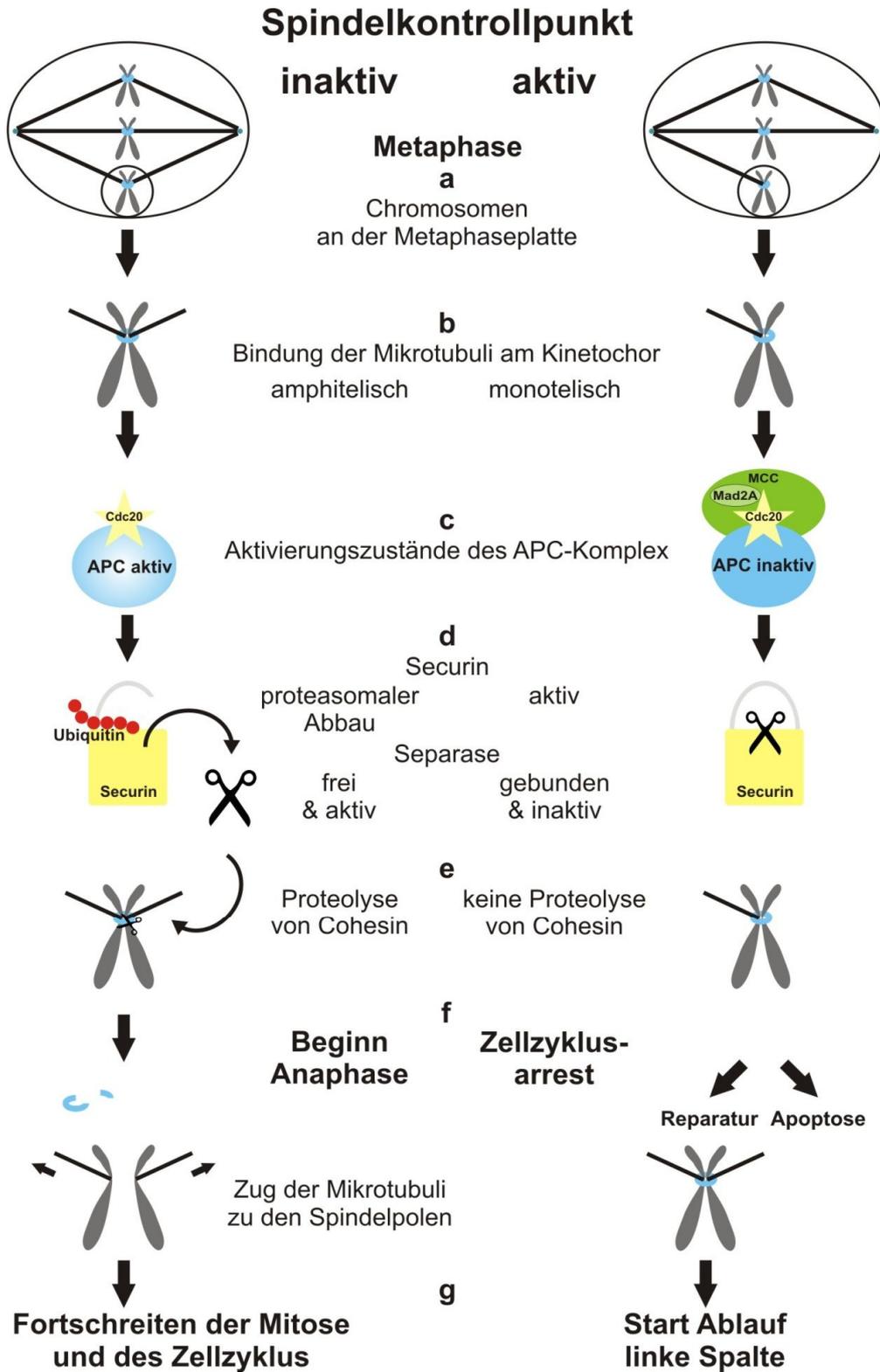


Abb. 3: Der mitotische Spindelkontrollpunkt modifiziert nach (Bharadwaj et al., 2004)

Von Mad2A existiert ein Homolog, dessen Aminosäurestruktur diesem zu 54% ähnelt und welches als Mad2B bezeichnet wird (Murakumo et al., 2000). Es ist auch als *mitotic arrest deficient 2-Like 2* (Mad2L2), PolZ2 oder hRev7 bekannt (NCBI Gene, 01.07.2016). Mad2B verändert wie Mad2A bei Bindung von Partnerproteinen am C-Terminus seine Konformation und kann ebenso den Zellzyklus durch Hemmung von APC/C regulieren, indem es an dessen Aktivatoren Cdc20 sowie Cadherin 1 (CDH1) direkt bindet (Chen et al., 2001, Hara et al., 2017). CDH1 wird dabei jedoch in höherem Maße gehemmt als Cdc20. Als Folge wird der Abbau von Cyclin B und Cdc20, die beide für den Mitoseausgang wichtig sind, sowie weiterer typischer APC/C Substrate verhindert. Dadurch, dass Mad2B sowohl an Cdc20 als auch CDH1 binden kann, die für das Fortschreiten bzw. für den Ausgang der Mitose wichtig sind, hat es wahrscheinlich eine Art Überwachungsfunktion inne, ob und wann alle Chromosomen korrekt an den Kinetochoren angeheftet sind und könnte so die Zytokinese regulieren (Chen et al., 2001). Des Weiteren ist Mad2B in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen als Bestandteil des Shieldin-Proteinkomplex in das *Non-homologous end-joining* (NHEJ) eingebunden und scheint auch in der homologen Rekombination (HR) eine Rolle zu spielen (Cheung et al., 2006, Boersma et al., 2015, Gupta et al., 2018).

Die Zelle hat nach Eintritt des Zellzyklusarrests zwei Möglichkeiten: entweder sie leitet die Apoptose ein und verhindert dadurch das Fortschreiten der Mitose mit einer Fehlseggregation der Chromatiden, oder sie sorgt durch eine amphitelische Anbindung der Spindelfasern (beide Chromatiden sind jeweils gebunden, Abb. 3, linke Spalte, a, b) für eine Reparatur, die die Aufhebung des Arrests ermöglicht.

Sind alle Kinetochore mit Spindelfasern verbunden, wird die Phosphorylierungseinheit von Mad2A entfernt und es findet keine weitere Aktivierung mehr statt (Sotillo et al., 2007). An noch aktiviertes Mad2A bindet p31^{comet} hochaffin und führt zu einer Dissoziation von Cdc20. Der Kontrollpunkt ist inaktiviert und der Zellzyklus kann voranschreiten (Habu et al., 2002, Xia et al., 2004, Yang et al., 2007, Hagan et al., 2011, Choi et al., 2015): Cdc20 wird

nun nicht länger inhibiert, aktiviert dadurch APC/C, welches in Folge seiner Funktion als Ubiquitinligase nachkommt. Securin wird ubiquitiniert und im 26S Proteasom abgebaut. Dies bewirkt die Freisetzung einer zuvor durch Securin inhibierten Protease, der Separase. Die aktivierte Separase spaltet von den an der Zentromerregion verbliebenen Cohesin-Proteinkomplexen die SCC1 Untereinheit ab. Dadurch geht die Kohäsion der Schwesterchromatiden verloren und der Zellzyklus kann beendet werden (Abb. 3, linke Spalte, a-g) (Waizenegger et al., 2000, Bharadwaj et al., 2004, Musacchio et al., 2007, Alberts et al., 2011, Peters et al., 2012).

1.2.2.3 Abschluss der M-phase und des Zellzyklus

Durch die Auflösung der Kohäsion ist die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase möglich. Sie werden durch die sich verkürzenden, depolymerisierenden Kinetochor-Mikrotubuli gleichmäßig verteilt zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen. Zusätzlich wandern auch die Spindelpole auseinander und unterstützen so zusätzlich die Trennung der Schwesterchromatiden (Alberts et al., 2011).

Nachdem die Chromatiden sich vollständig an dem jeweiligen Spindelpol eingefunden haben, wird durch Zerfall der Kinetochor-Mikrotubuli und die Dekondensierung der Chromatiden die Telophase eingeleitet. Die Kernhülle kann sich erneut ausbilden und eine Einschnürung der Zellmembran als Vorbereitung zur vollständigen Teilung der Zelle ist zu beobachten, welche das Ende der Mitose darstellt (Alberts et al., 2011).

Den Abschluss der M-Phase bildet die vollständige Zytokinese, in der sich die Zelle durch kontraktile Aktinfilamente und Myosin II durchschnürt. Jede neu entstandene Tochterzelle beinhaltet nun einen Kern mit komplettem Chromosomensatz (Alberts et al., 2011).

Nach diesem Abschluss der Zellteilung kann die Zelle nun wieder in die G₁-Phase übertreten und erneut einen Zellzyklus durchlaufen, oder sie geht in die G₀-Phase über, in der sie entweder differenziert oder in einen proliferatorischen

Ruhezustand eintritt. Ruhende Zellen können durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren später wieder in den Zellzyklus übergehen (Alberts et al., 2011).

1.3 Die Rolle der Cohesinregulatorproteine Pds5A und Pds5B in der Karzinogenese

1.3.1 Pds5A

Neben seiner Rolle bei der Cohesinregulation ist Pds5A essentiell für eine normale Entwicklung und scheint an dem Wachstum der Zelle sowie seiner Proliferation beteiligt zu sein (Kumar et al., 2004, Zhang et al., 2007, Zheng et al., 2008, Zhang et al., 2009). Mutationen bzw. Knockdown (KD) von Pds5A führten zu chromosomaler Fehlverteilung, Aneuploidie und DNA-Reparaturdefekten, sowie Fehlern in der embryonalen Entwicklung (Zhang et al., 2009). Pds5A könnte zu Tumorentstehung/-progress beitragen, evtl. selbst ein Onkogen sein bzw. onkogene Eigenschaften innehaben (Zheng et al., 2008, Hagemann et al., 2011). Es interagiert mit TP63, einem Homolog von TP53, (Little, 2002, Orzol, 2015) und besitzt Bindedomänen für zwei häufig mutierte Onkogene, Ras und Rho (Little et al., 2002, Kumar et al., 2004, Orzol et al., 2015). Zusammenhänge zwischen Pds5A-Expression und programmiertem Zelltod werden bei dessen transienter bzw. stabiler Expression beschrieben (Kumar et al., 2004). In Pds5A-*small interfering RNA* (siRNA)-Versuchen mit den GBM Zelllinien U251 bzw. GaMG zeigten sich allerdings keinerlei Auswirkungen auf den mitotischen Spindelkontrollpunkt, die Proliferation oder das Überleben der Zellen (Hagemann et al., 2011). Je nach Gewebe scheint die Pds5A-Expression daher unterschiedliche Auswirkungen auf Zellen zu haben. In diesen KD-Versuchen wiesen weniger Zellen sowohl eine Trennung der Schwesterchromatiden an den jeweiligen Chromosomenarmen als auch an der Zentromerregion auf. Die Rolle von Pds5A bei der Schwesterchromatidkohäsion und die Interaktion mit dem Cohesinkomplex könnte eine Erklärung für die zu beobachtende Aneuploidie bei Gliomen sein.

Die Gensequenz von Pds5A ist auf dem Chromosom 4p14 lokalisiert (Kumar et al., 2004) (NCBI Gene, 20.01.2016). Im Zusammenhang mit verschiedenen Tumoren, z.B. Bronchial- oder Mammakarzinomen sowie hämatoonkologischen Erkrankungen wurden Aberrationen von 4p bzw. an 4p14 gefunden (Schouten et al., 1990, Wu et al., 1995, Arribas et al., 1999, Feng et al., 2002, Knosel et al., 2002, Sun et al., 2005, Put et al., 2012, Zhou et al., 2013a, Ravishankar Ram et al., 2015, Stoepker et al., 2015, Natrajan et al., 2016, Van Roosbroeck et al., 2016). In einem *Case Report* über einen Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) wurde von Pds5A als einem neuen Translokationspartner des Gens *mixed lineage leukemia* (MLL) berichtet (Put et al., 2012).

Beim Adulten wurde Pds5A in Gewebematerial in Relation zu embryonalen Gewebe gleichmäßig niedrig nukleär exprimiert (Zhang et al., 2007). In Tumorgewebe ist es dagegen in Bezug zu Normalgeweben variabel exprimiert: Eine alleinige Expression fand sich in Tumoren von Ösophagus und Leber im Vergleich zu nicht pathologisch-verändertem Gewebe, dagegen eine niedrigere in Brust- und Nierentumorgewebe. In Rektum und dem entsprechenden Tumor konnte Pds5A hingegen nicht detektiert werden. Eine Überexpression von Pds5A zeigte sich in Karzinomen des Magens, Kolons, Uterus und der Lunge (Kumar et al., 2004, Zheng et al., 2008). Gliazellen von Normalhirngewebe sind nach dem *Human Protein Atlas* schwach bis moderat angefärbt (Proteinatlas, 16.08.2016^a). Eine Überexpression (Hagemann et al., 2011) bzw. eine Steigerung der Pds5A-positiven Gesamtzellzahl und Intensität (Proteinatlas, 16.08.2016^b) in Gliomen sind beschrieben. Mittels dem *Gliom-microarray-data-set* GSE7696, dem *GBM dataset* des *Cancer Genome Atlas* und multivariaten Überlebensanalysen wurde unter 1785 Genen Pds5A als eins von 13 Prognosegenen in Gliomen ermittelt (Yang et al., 2019).

1.3.2 Pds5B

Wie Pds5A hat auch Pds5B zusätzliche Aufgaben in der Zelle inne, z.B. während der Meiose, in der Stammzellendifferenzierung oder bei der Steuerung des androgen-induzierten Proliferationsarrestes in Prostatagewebe (Geck et al., 1999, Geck et al., 2000, Maffini et al., 2002, Losada et al., 2005, Denes et al.,

2010, Fukuda et al., 2010). Außerdem wird Pds5B als Mediator homologer Rekombination gewertet und beeinflusst die Korrekturfunktion bei fehlerhafter Anlagerung der Spindelfasern, indem es für die Aurora B-Akkumulation an den Zentromeren verantwortlich ist (Carretero et al., 2013, Krenn et al., 2015, Couturier et al., 2016).

KD-Versuche von Pds5B führten in verschiedenen Zelllinien zu einem Verlust der Biorientierung an der Metaphaseplatte, Veränderungen in der Schwesterchromatidtrennung (Losada et al., 2005), chromosomaler Fehlverteilung, Aneuploidie (Carretero et al., 2013) und morphologischen Ähnlichkeiten zu Krebsinitiationszellen bzw. -stammzellen (Denes et al., 2010). Pds5B könnte ein möglicher Tumorsuppressor sein (Denes et al., 2010, Ma et al., 2019). Seine Lage im Genom in der Nähe von den Tumorsuppressoren *breast cancer 2* (BRCA2) und Retinoblastom-1 (Rb-1) sowie die Interaktion mit BRCA2 unterstützen diese Theorie (Geck et al., 1999, Brough et al., 2012, Couturier et al., 2016).

Es ist wie Pds5A wichtig für die embryonale Entwicklung und Mutationen können zu Cohesinopathien bzw. Cornelia de Lange (CdL)-Geburtsdefekten beitragen (Zhang et al., 2007, Zhang et al., 2009, Mannini et al., 2010). Pds5B scheint mit Gehirnatrophie, mit milder kognitiver Beeinträchtigung und Alzheimerdemenz assoziiert zu sein (Furney et al., 2011, Lee et al., 2017).

Pds5B wird wie Pds5A während der Embryogenese ubiquitär, im Gewebe Erwachsener hingegen variabel mit besonders hohen Expressionsanteilen in Hirn und Hoden exprimiert. Pds5B scheint v.a. am Nukleolus lokalisiert zu sein (Zhang et al., 2007).

Es wird am Genlokus 13q13.1 kodiert (NCBI Gene, 05.06.2019). Deletionen bzw. LOH finden sich von 13q in Gliomen (Tab. 2). Außerdem ist der häufige Verlust bzw. LOH von D13S171, welches im Genlokus von Pds5B liegt, in verschiedenen, weiteren Karzinomen (Geck et al., 2000) wie den invasiv lobulären und duktalem Mamma- (Beckmann et al., 1996), nicht-kleinzelligen Lungen- (*non-small cell lung cancer* (NSCLC)) (Gorgoulis et al., 2000) und Prostatakarzinomen (Edwards et al., 1998) bekannt.

LOH-Veränderungen von Pds5B bzw. die zusätzliche oder alternative Herunterregulation findet man bei einer Vielzahl weiterer Karzinome, wie z.B. Schilddrüsen-, Ösophagus-, Zervix-, Kopf- und Halskarzinomen (*head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC)) und auch in Prostatakrebszellen (Harada et al., 2001, Reis et al., 2005, Seo et al., 2005, He et al., 2008, Maffini et al., 2008, Zhang et al., 2008). Eine biallelische Inaktivierung wurde von Pds5B in der Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1 (Kunnev et al., 2009) und *frameshift*-Mutationen wurden in gastrischen bzw. kolorektalen Adenokarzinomen (Kim et al., 2013, Solomon et al., 2014), in Lymphknotenmetastasen von einem Mammakarzinom (Blighe et al., 2014) und in zwei Fällen von familiärem myelodysplastischen Syndrom (MDS)/ AML (Churpek et al., 2015) nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu wurde Pds5B in squamösen Zellkarzinomen des Oropharynx (*oral squamous cell carcinoma* (OSCC)) als hoch-exprimiert beschrieben: in allen Proben nachweisbar mit meist 25-50%, teilweise sogar über 50% positivem Zellanteil (Franca et al., 2017). Eine moderate bis hohe Expression wird im Proteinatlas für unterschiedliche Gewebeproben von Tumoren angegeben, u.a. gastrointestinale und gynäkologische Karzinome (Proteinatlas, 05.06.2019). In Gliazellen menschlichem Normal- als auch Gliomgewebes sind sogar bei meist starker Intensität mehr als $\frac{3}{4}$ der Zellkerne positiv für Pds5B (Proteinatlas, 16.08.2016^c, 16.08.2016^d).

1.4 Die Rolle der mitotischen Spindelkontrollpunktproteine Mad2A und Mad2B in der Karzinogenese

Defekte im Spindelkontrollpunkt können zu genetischer Instabilität in Form von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen beitragen (Rimkus et al., 2007). Der Spindelkontrollpunkt ist in seiner Funktion selten in menschlichen Tumoren geschwächt oder dysfunktional (Perez de Castro et al., 2007, Schwartzman et al., 2010). Häufiger findet man eine Überaktivierung verbunden mit der Hemmung von Tumorsuppressoren, die zu chromosomaler Instabilität (CIN) führt (Schwartzman et al., 2010, Sotillo et al., 2010). Diese Überaktivierung des Spindelkontrollpunktes führt zu einer verlängerten Mitose, einer

unnatürlichen Stabilisierung von Cyclin B1 und Securin, einem gehäuften Auftreten von merotelischen Bindungen der Kinetochor-Mikrotubuli (von beiden Spindelpolen strahlen zwei Kinetochor-Mikrotubuli an einer Chromatide ein) sowie Chromosomenverlust (Schvartzman et al., 2010, Sotillo et al., 2010).

1.4.1 Mad2A

Mad2A ist zusätzlich zu seiner Rolle am Spindelkontrollpunkt an der Kinetochor-Mikrotubuli-Stabilisierung beteiligt (Kabeche et al., 2012).

Es scheint je nach Expressionsausmaß unterschiedliche Auswirkungen auf Zellen zu haben (Sotillo et al., 2007). In bisher veröffentlichten Studien wird in Folge eines haploinsuffizienten Mad2A, aber auch bei einer Überexpression die Ausbildung von CIN, Aneuploidien und das Auftreten von Tumoren beschrieben (Michel et al., 2001, Sotillo et al., 2007, Faisal et al., 2017). Eine Mad2A-Überexpression überaktiviert wahrscheinlich den Spindelkontrollpunkt mit einer verlängerten Mitose (Hernando et al., 2004, Sotillo et al., 2007). Bei einer solchen wurde sogar eine Progression zu einem maligneren Subtyp beobachtet (Schvartzman et al., 2011, Li et al., 2017, Shi et al., 2018). Sehr hohe Expressionslevel konnten Zelltod bewirken (Sotillo et al., 2007), der aber auch bei Verlust beider Mad2A Allele eintrat (Michel et al., 2004).

Mad2A wird von 4q27 kodiert (NCBI Gene, 30.06.2016). Bei höhergradigen Gliomen sind Deletionen des langen Arms von Chromosom 4 bekannt (Tab. 2). In einigen Karzinomen, z.B. von Mamma (Percy et al., 2000), Blase (Hernando et al., 2001) und Magen (Kim et al., 2005), fand man Mutationen von Mad2A. Die GBM-Zelllinien U87 und U373 zeigten einen Basenaustausch, der jedoch als benigner Polymorphismus eingestuft wurde (Percy et al., 2000). In Gliazellen von Normalhirn wurde Mad2A nicht und nur sehr gering in Gliomgewebeproben detektiert (Proteinatlas, 16.08.2016^e, 16.08.2016^f). In einer weiteren Expressionsuntersuchung zeigte sich im densitometrischen Vergleich nach einer *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), dass von Normalhirn zu °II und °IV-Gliomen, die Variabilität der Expression bei gleichbleibendem Median zunahm (Tannous et al., 2013). In Analysen über das REMBRANDT Datenportal des *National Cancer Institute* konnte eine erhöhte

Mad2A-Expression in Gliomen im Vergleich zu Normalgewebe ermittelt werden (Wu et al., 2018a).

In Zelllinien nasopharyngealer Karzinome hingegen wurde neben einer reduzierten Mad2A-Expression der Verlust des mitotischen Checkpunktes dargestellt (Wang et al., 2000). *Thyroid hormone receptor-interacting protein 13* (TRIP13), welches in multiplen Myelomen hochreguliert und verbunden mit einer schlechteren Prognose nachgewiesen wurde, scheint am proteasomalen Abbau von Mad2A und der Schwächung des SAC beteiligt zu sein (Zhou et al., 2013b, Tao et al., 2017). In Real-time-PCR-Methoden war Mad2A bei Patienten mit einem hypoplastischen MDS erniedrigt und verbunden mit chromosomalen Alterationen sowie erhöhter Mortalität (Borges et al., 2018). In tubo-ovariellen Karzinomen ist eine erniedrigte Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Furlong et al., 2012, Byrne et al., 2017).

Das Spindelkontrollpunktprotein ist jedoch in den meisten Tumoren tatsächlich häufig überexprimiert. Eine Mad2A-Überexpression wurde auf Proteinebene für Lymphome (Schvartzman et al., 2010), Retinoblastome (Hernando et al., 2004), das MDS (Genga et al., 2015), Karzinome des Mundes (Rizzardì et al., 2014), des Magens (Wang et al., 2009, Wang et al., 2018), des Kolons bzw. Rektums (Li et al., 2003), der Leber (Schvartzman et al., 2010, Li et al., 2017), der Lunge (Schvartzman et al., 2010) und der Blase (Choi et al., 2013) sowie für Sarkome des Weichgewebes (Hisaka et al., 2008) und des Knochens (Yu et al., 2010, Yu et al., 2012) beschrieben. Auf Genebene wurde ebenso eine Hochregulation in verschiedenen Tumoren nachgewiesen (Qiu et al., 2015, Zhou et al., 2015, Shi et al., 2016, Ding et al., 2017, Peng et al., 2017, Hu et al., 2018, Shi et al., 2018) und Mad2A wurde als hub-Gen für hepatozelluläre (Karzinome (HCC)) (Jin et al., 2015, Yan et al., 2017, Fan et al., 2018, Wen et al., 2018, Chen et al., 2019), Prostata- (Xiang et al., 2019), Nasopharynx- (Chen et al., 2017, Ge et al., 2019), invasiv-duktales Mamma- (Li et al., 2018a), anaplastische Schilddrüsen- (Hu et al., 2018) sowie kleinzellige Lungenkarzinome (*small cell lung cancer* (SCLC)) (Ni et al., 2018) identifiziert. Die Zöliakie, die mit der seltenen Spätkomplikation eines T-Zell-Lymphoms einhergehen kann, zeigte in Gewebematerial eine Hochregulation von Mad2A (Buoli Comani et al., 2015, Nijeboer et al., 2015).

Mad2A wird außerdem als Differenzierungskriterium zwischen SCLC und NSCLC sowie als Biomarker für Gestationsdiabetes (Wu et al., 2018b, Zhao et al., 2019) diskutiert.

1.4.2 Mad2B

Mad2B interagiert mit Mad2A (Murakumo et al., 2000) und scheint an beiden Reparaturwegen von DNA-Doppelstrangbrüchen durch NHEJ und HR beteiligt zu sein (Cheung et al., 2006, Boersma et al., 2015). Die Mad2B-Expression ist von Körpergewicht und Glukosewerten abhängig (Meng et al., 2014, Mongan et al., 2016). Hyperglykämie führt zu einem Anstieg der Mad2B-Expression, diese bewirkt neuronale Apoptose und könnte in der Entwicklung der diabetischen Enzephalopathie eine Rolle spielen. Neuronen sind demgegenüber durch die Hemmung von Mad2B, aber auch durch die Förderung seiner Ubiquitinierung durch Metforminhydrochlorid vor dem Glucose-induzierten, programmierten Zelltod geschützt (Meng et al., 2014, Meng et al., 2017). Mad2B wird als eins der *disease causing genes* in der Fanconi-Anämie und als ein hub-Gen bei der akuten Aortendissektion betrachtet (Mamrak et al., 2017, Wang et al., 2017). Es wird außerdem als Biomarker einer *human immunodeficiency virus* (HIV)1-Latenz diskutiert und wurde in HIV-assoziierten diffusen B-Zell-Lymphomen im Keimzentrum erhöht nachgewiesen (Lee et al., 2018, Maguire et al., 2019).

Mad2B scheint auch je nach Expressionsausmaß wie Mad2A unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle zu haben. Homozygoter und heterozygoter KD von Mad2B bewirkte verzögertes Wachstum und eine erhöhte Rate an Zelltod von Hühner-B-Lymphozyten (Zelllinie DT40), beeinflusste den SAC jedoch nicht (Okada et al., 2005). Eine Überexpression von Mad2B führte auch nicht zu einem Zellzyklusarrest (Murakumo et al., 2000). Jedoch fand man in Kombination mit einer Mad2B-Überexpression in Gewebe kolorektaler bzw. ovarieller Karzinome veränderte Mitosefiguren mit Anaphasebrücken, die ein Hinweis für CIN sein können, außerdem eine Korrelation zu einem höheren Tumorstadium und einer schlechteren Prognose (Rimkus et al., 2007, Niimi et al., 2014). Neuere Daten hingegen zeigen, dass eine höhere Expression von Mad2B in kolorektalen

Karzinomen und entsprechenden Maus-Xenograft-Versuchen mit einer kleineren Tumormasse, verringerter Metastasierungshäufigkeit, besserer Prognose und niedrigerem klinischen Stadium korreliert (Li et al., 2018b).

Interessant ist der Aspekt, dass die Region auf 1p36.22, die für Mad2B kodiert (NCBI Gene, 01.07.2016), häufig von LOH in einigen Krebsformen, z.B. nasopharyngealen Tumoren (Lo et al., 2000), Keimzelltumoren (Summersgill et al., 1998, Bussey et al., 2001), Brust- und Kolonkarzinomen (Ragnarsson et al., 1999), betroffen ist. Von Gliomen sind Deletionen, Brüche und Translokationen, die den Chromosomenabschnitt 1p betreffen, bekannt (Tab. 2). Untersuchungen bezüglich der Mad2B-Expression in Tumoren verglichen mit physiologischem Normalgewebe zeigten eine geringere Expression in Neuroblastomen (Janoueix-Lerosey et al., 2004), chromophoben Nierenzellkarzinomen (Pinto et al., 2007) und oralen, squamösen Tumoren (Diniz et al., 2015). Eine Überexpression im Vergleich zu Normalgeweben konnte hingegen in Brusttumoren (Yuan et al., 2006), Ösophagus- (Gu et al., 2019), Magen- (Chen et al., 2018), Kolon- (Friederichs et al., 2005, Rimkus et al., 2007, Li et al., 2018b), Endometrium- (Zhao et al., 2014) und in Ovariakarzinomen (Niimi et al., 2014) ermittelt werden. Auch in Gliomen wurde eine Überexpression von Mad2B beobachtet (Zhao et al., 2011). Eine weitere Quelle gibt jedoch an, dass es in Gliomen wie auch in Normalhirn bei schwacher Intensität nur teilweise von den Gliazellen exprimiert wird (Proteinatlas, 16.08.2016^g, 16.08.2016^h).

1.5 Zentrale Themen und Ziel der Arbeit

GBM haben eine hohe Malignität und mit einem medianen Überleben von nur 14,6 Monaten eine äußerst ungünstige Prognose (Stupp et al., 2005). Eine Verbesserung dieser Prognose sowie der Patientensituation und letztendlich eine Heilung bleiben vorrangige Ziele der Wissenschaft. Eine Voraussetzung für neue Therapiemaßnahmen ist die bessere Kenntnis der molekularbiologischen Grundlagen dieser Erkrankung. Mit der neuen WHO-Klassifikation von 2016 wird ein deutliches Zeichen für die Bedeutung der Molekularbiologie gesetzt.

Charakteristika von Tumorzellen, die auch für Gliome kennzeichnend sind, sind die CIN und Aneuploidie, die nicht nur als Folge von, sondern auch als Grund für die Entstehung von Tumoren betrachtet werden könnten (Tab. 2) (Rimkus et al., 2007, Schwartzman et al., 2010). Für die Entstehung, die Malignisierung und die Rezidivneigung von Gliomen könnte eine Störung der Schwesterchromatidkohäsion und des mitotischen Kontrollpunktes ursächlich sein. Ein möglicher Ansatzpunkt für neue Therapien wären daher die regulatorischen Untereinheiten von Cohesin, z.B. Pds5A und Pds5B, bzw. Proteine des mitotischen Spindelkontrollpunktes, wie z.B. Mad2A und Mad2B, die jeweils an der korrekten Chromosomenverteilung beteiligt sind.

Pds5A und Mad2A, das jeweilige Homo- bzw. Orthologon Pds5B und Mad2B, sowie der Proliferationsmarker Ki67, wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund ihrer wesentlichen Funktion während der Mitose immunhistochemisch in einem Panel von Gliomgewebeproben untersucht. Das Expressionsverhalten dieser Proteine in verschiedenen Gliomentitäten bzw. WHO-Graden wurde miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Belinea PC Windows Professional Windows ME	Belinea, Wittmund
Drahtbügel aus rostfreiem Edelstahl	A. Hartenstein, Würzburg
Färbekammer	Werkstatt des Universitätsklinikums Würzburg
Färberahmen aus Glas	A. Hartenstein, Würzburg
Glaskästen mit Deckel	A. Hartenstein, Würzburg
Glastrichter	A. Hartenstein, Würzburg
Kamera Olympus Camedia C-5060 wide zoom 5.1Megapixel, 4xwideZoom lens ED	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank Liebherr öko super (-20°C)	Liebherr, Bulle, CH
Kühlschrank Liebherr profiline	Liebherr, Bulle, CH
Mikroskop Olympus BX41	Olympus, Hamburg
Mikrowelle Grill R-3G17	Sharp Electronics, Wien, A
Färbetrog (Kunststoff, durchsichtig) mit Färbegestell für Tissue Tek® Objektträger Färbesystem	Science Services, München
Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Schlittenmikrotom	Produkte für Medizintechnik, Köln
Trichtergestell	Bürkle, Bad Bellingen

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser (24×50 mm)	A. Hartenstein, Würzburg Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 - 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Papierfilter Grade 595, ½ gefaltet (240 mm Ø)	Schleicher und Schuell BioScience, Dassel
Mini PAP-Pen	Zytomed Systems, Berlin
Objektträger Super Frost®Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
PCR Soft Tubes (0,2 ml)	Biozym Scientific, Hess.-Oldenburg Biozym Biotech Trading, Wien, A
Pipettenspitzen, ungestopft	Sarstedt, Nürnbergrecht
Transferpipetten	VWR International, Darmstadt

2.1.3 PC-Programme

GraphPad Prism 4	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
MacBiophotonics Image J	W. Rasband (Entwickler), National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Olympus DP-Soft 5.0	Olympus, Hamburg

2.1.4 Chemikalien

Aqua destillata	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
Einschlußmittel Vitro-Clud	R. Langenbrinck, Emmendingen
Eindeckmittel DT 500	DiaTec, Hallstadt
Ethanol, absolut (vergällt und unvergällt)	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethanol, absolut, 70%	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe
Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) Citrate Buffer pH 6,0 (10×)	ZYTOMED Systems, Berlin

Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Peroxide Block	ZYTOMED Systems, Berlin
Xylol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

2.1.5 Kit

ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum, HRP008DAB	ZYTOMED Systems, Berlin
---	-------------------------

2.1.6 Primärantikörper

Anti-Mad2L1 antibody (ab87274)	abcam, Cambridge, UK
Anti-Mad2L2 antibody (ab115622)	abcam, Cambridge, UK
Anti-PDS5B antibody (ab84918)	abcam, Cambridge, UK
Anti-SCC 112 antibody (ab122352)	abcam, Cambridge, UK
Rabbit Monoclonal Antibody to Human Ki-67 (RMPD 004)	ZYTOMED Systems, Berlin

2.1.7 Lösungen

Citratpuffer (1× , pH 6,0)

Die Herstellung des 1× Puffers erfolgte durch Zugabe von 100 ml 10× HIER Citrate Puffer zu 900 ml Aqua destillata. Die Mischung war bei 4°C im Kühlschrank 1 Monat lang haltbar.

DAB-Färbelösung

Bei jedem Färbvorgang wurde eine Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung immer frisch angesetzt: 4 Tropfen DAB-Konzentrat pro Flasche Substratpuffer, beide im Zytochem-Plus HRP Kit enthalten.

96% Ethanol

Für 1 l 96% Ethanol wurden 960 ml Ethanol mit 40 ml Aqua destillata aufgefüllt.

50% Ethanol

Für 1 l 50% Ethanol wurden 500 ml Ethanol und 500 ml Aqua destillata gemischt.

2.1.8 Untersuchungsmaterial

Ein aus der Abteilung Neuropathologie im Institut für Pathologie der Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Patientenpanel setzte sich aus zehn primären GBM, sieben ruhenden Astrozytomen WHO °II, fünf Astrozytomen WHO °II mit ihrem Rezidiv derselben Gradierung, sowie ein weiteres Rezidiv (ohne Vorliegen der Gewebeprobe des vorhergehenden Astrozytoms) und abschließend aus sechs malignisierenden Astrozytomen WHO °II und ihren jeweiligen sekundären GBM zusammen. Diese 40 Gewebeproben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Für die korrekte Durchführung einer immunhistochemischen Färbung (IHC) ist bei jedem Durchgang eine Positivkontrolle mitzuführen. Die hier verwendeten Positivkontrollen waren bereits in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträgern fertig aufgezogen. Dabei diente für die Ki67-IHC Tonsillengewebe (aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, Universitätsklinikum Würzburg), für die Pds5A-IHC Kolonkarzinomgewebe (aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg), für die Mad2B-IHC Gewebe des Cerebellums (aus der Abteilung für Neuropathologie der Universität Würzburg) und für die IHC von Pds5B und Mad2A Mammakarzinomgewebe (aus der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg) als Kontrolle.

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Von jedem Paraffinblock wurden 3 µm Schnitte mithilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt und manuell auf Objektträger gezogen, um diese für die IHC verwenden zu können.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Hintergrund

Die IHC dient der „Visualisierung von Gewebe- und Zellantigenen“ mithilfe von Antikörpern. Sie ist „eine komplexe Methode, in der histologische sowie immunologische Detektionsmethoden kombiniert werden.“ (ZYTOMED Systems, 2007^a, 2007^b).

Das Prinzip beruht auf der Detektion eines Antigenepitops durch einen Primärantikörper (Abb. 4). Mithilfe eines Detektionssystems kann diese Bindung sichtbar gemacht werden. Dazu wird der Primärantikörper durch einen zweiten Antikörper, den Sekundärantikörper, erkannt, der auch als Brückenantikörper oder Link bezeichnet wird.

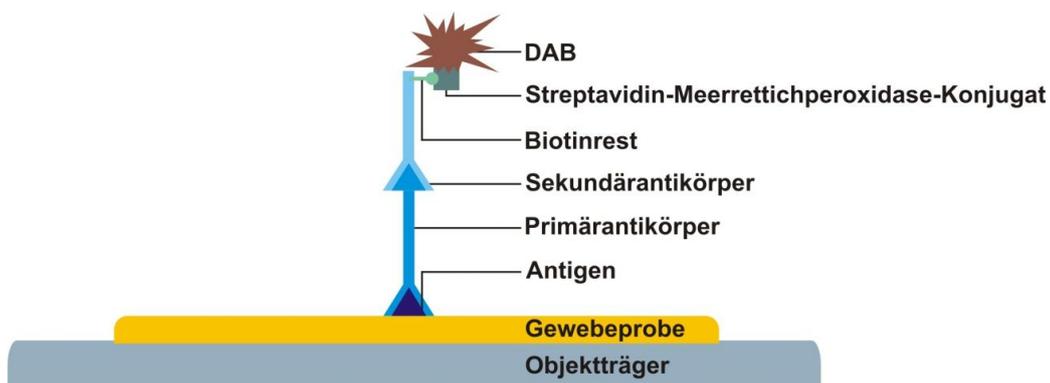


Abb. 4: Die Immunhistochemie
modifiziert nach (Leinco Technologies, 2016)

Nachgewiesen werden die Antikörper dann nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip: Der polyvalente biotinylierte Sekundärantikörper bindet Moleküle eines Streptavidin-Konjugates. Außer Streptavidin enthält das Konjugat die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), welche ein hinzugefügtes chromogenes Substrat, hier DAB, umsetzt und einen Farbniederschlag am Ort des Zielantigens bewirkt (ZYTOMED Systems, 2007^a).

Um kontrollieren zu können, dass die IHC funktioniert hat, ist anzuraten, bei jedem Färbedurchgang neben der Positiv- auch eine Negativkontrolle mitzuführen. Eine Färbung der Positivkontrolle sollte eintreten, da bekannt ist,

dass das Epitop hier vorhanden ist. Sie überprüft damit die korrekte Durchführung der Methode (ZYTOMED Systems, 2007^a).

Eine Farbgebung in der Negativkontrolle deutet auf eine fehlerhafte Verarbeitung oder auf eine unspezifische Färbung hin, die auch unabhängig von und evtl. sogar ohne die Durchführung der IHC auftritt (ZYTOMED Systems, 2007^a). Sie soll dadurch eine Fehlinterpretation durch Auswertung einer falsch positiven Antikörperbindung an dieser Stelle vermeiden.

2.2.2.2 Durchführung

Von jedem Paraffinblock wurden jeweils zwei Objektträger für die Durchführung der IHC sowie eine vom jeweiligen Hersteller des Antikörpers empfohlene Positivkontrolle bereitgelegt.

Vor Verwendung des ZytoChem-Plus HRP Kits wurden alle Reagenzien, die zur Aufbewahrung im Kühlschrank lagerten, mit Ausnahme der Antikörper und des DAB-Fläschchens, auf Raumtemperatur gebracht.

Drei Liter PBS sowie 300 ml des Citratpuffers wurden bereitgestellt. Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydratisiert. Dies erfolgte mithilfe von Xylol und Ethanol bei Raumtemperatur: Zuerst wurden die Schnitte in einen gläsernen Färberahmen hineingesetzt, dann jeweils zweimal 15 min in Xylolbäder getaucht, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe: zweimal 2 min im 100%, zweimal 2 min im 96%, zweimal 2 min im 70% und einmal 2 min im 50% Ethanolbad. Anschließend wurden die Schnitte wenige Sekunden in Aqua destillata und abschließend in den Waschpuffer PBS zum Äquilibrieren getaucht.

Der nächste Schritt stellte die Überführung der Objektträger in ein Färbegestell eines mit Citratpuffer gefüllten Färbetrogs aus Kunststoff dar.

Die Epitope des zu detektierenden Antigens sind oft durch die Konservierung des Gewebes mithilfe Formaldehyds quervernetzt bzw. „maskiert“ (ZYTOMED Systems, 2007^b). Damit der Primärantikörper binden kann, muss diese Quervernetzung durch siedenden Citratpuffer aufgehoben werden, eine sogenannte „thermische Antigen Demaskierung“ erfolgt (ZYTOMED Systems, 2007^b).

Der Citratpuffer wurde mit den Paraffinschnitten in der Mikrowelle 2 min auf Stufe 5 bei 750 Watt aufgekocht, und siedete dann für 15 min auf Stufe 3 bei 375 Watt weiter.

Bei Bedarf, d.h. wenn der Spiegel des Citratpuffers in der Küvette zu stark durch den Siedevorgang abgesunken war, wurde Citratpuffer nachgefüllt, damit die Schnitte immer vollständig durch Flüssigkeit bedeckt waren. Erst wenn die Flüssigkeit erneut leicht siedete, lief die verbliebene Zeit der 15 min weiter. Im Anschluss wurde der Färbetrog samt Inhalt bei Raumtemperatur ohne Deckel 25 min abgekühlt.

Alle nun folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Reagenzien wurde in einer Färbekammer, die mit Aqua destillata besprühten Tüchern ausgelegt war, um ein feuchtes Milieu zu schaffen, durchgeführt.

Vor Auftragen der Reagenzien musste stets von den Objektträgern vorsichtig das darauf stehende PBS abgeklopft werden, um eine entsprechende Kontaktfläche zur Gewebeprobe zu ermöglichen und Verdünnungseffekte der Reagenzien zu vermeiden. Gleichzeitig galt es ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern und eine vollständige Benetzung mit dem entsprechenden Reagenz zu gewährleisten.

Die Schnitte wurden mitsamt des Färbegestells kurz in PBS getaucht. Einzeln wurde ein Objektträger nach dem anderen herausgenommen, der Gewebeschnitt mit dem PAP-Pen eingekreist und in die Färbekammer gelegt. Für 10 min wurden nun die Schnitte mit dem Peroxid-Block inkubiert. Der Peroxid-Block, eine 3%ige H₂O₂-Lösung, wird dafür eingesetzt, um die endogene Peroxidase zu hemmen (ZYTOMED Systems, 2007^c). Die exogen zugeführte Peroxidase im Enzymkonjugat setzt am Ende der IHC das Chromogen um. Sollte die gewebeeigene Peroxidase nicht gehemmt werden, kann dies zu unerwünschten Hintergrundfärbungen und dadurch zu Fehlinterpretationen führen (ZYTOMED Systems, 2007^c).

Im Anschluss an den Block wurden die Schnitte in einem weiteren Tauchbecken mit PBS für 2 min auf dem Plattformschüttler bei Stufe 2 bis 3 von dem Reagenz freigewaschen.

Es folgte ein Abschütteln des PBS und ein erneutes Auflegen der Schnitte in die Färbekammer. Dort wurden sie für 5 min mit *Blocking solution* (Reagenz 1) inkubiert. Diese blockiert unspezifischen Bindungsstellen, mit denen der Primär- oder auch Sekundärantikörper reagieren könnte (ZYTOMED Systems, 2007^a).

Ein weiterer Waschschrift für 2 min in einem Tauchbecken mit PBS wurde auf dem Plattformschüttler durchgeführt. Der Primärantikörper konnte nun aufgetragen werden.

Fünf verschiedene Primärantikörper der Klasse Immunglobulin G (IgG) wurden jeweils für das gesamte Patientenpanel verwendet. Sie waren gegen Ki67, Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B gerichtet.

Ki67 war ein „*ready-to-use*“-Antikörper. Bei den vier anderen musste die Verdünnung ermittelt werden, mit der das augenscheinlich beste Färbeergergebnis erzielt wurde, bevor die eigentliche IHC des Patientenpanels durchgeführt werden konnte.

2.2.2.2.1 Ermittlung der Antikörper-Verdünnung

Abcam gibt für jeden Antikörper Empfehlungen für eine zu verwendende Positivkontrolle (Tab. 3) und Verdünnung im beiliegenden Datenblatt an: für Pds5A eine Verdünnungsspanne von 1:500 bis 1:1000, für Pds5B 1:100 bis 1:500, für Mad2A 1:100 bis 1:500 und für Mad2B eine 1:100 Verdünnung.

Zur Austestung wurde sich an diesen Herstellerangaben orientiert, indem jeweils eine Gewebeprobe, die abcam als Positivkontrolle befürwortete, in der niedrigst- und eine in der höchst-angegebenen Verdünnung immunhistochemisch behandelt wurde. Zusätzlich wurde ein aus dem Patientenpanel stammendes Tumorgewebe mit einer der Verdünnungen der IHC behandelt. Das unter dem Mikroskop zu beobachtende Färbeergergebnis konnte mit dem Bildmaterial einer

IHC im beiliegenden Datenblatt von abcam verglichen werden. Es wurde darauf geachtet, dass v.a. die Positivkontrolle ein möglichst gleichwertiges Färbeergebnis wie das Bildmaterial aufwies. Dabei sollten Zellstrukturen und Kerne spezifisch angefärbt sein, ohne dass das Präparat durch Hintergrundfärbung überfärbt wirkte, gleichzeitig musste aber auch eine mögliche Antigenlokalisierung deutlich zu erkennen sein.

Durch den Vergleich des Färbeergebnisses der hohen gegenüber der niedrigeren Verdünnung und weiteres Austesten durch Eingrenzen des Verdünnungsbereichs näherte man sich in der von abcam angegebenen Spanne einer für Pds5B und Mad2A geeigneten Verdünnung an (Tab. 3). Für Pds5A und Mad2B konnte sich nicht an die Empfehlungen von abcam gehalten werden, da Pds5A ein zu schwaches Färbesignal zeigte, Mad2B hingegen ein zu starkes und unspezifisches. Durch Austestung verschiedener Verdünnungen wurden die in Tab. 3 genannten Verdünnungen für Pds5A und Mad2B als spezifisch für die IHC bewertet und für das gesamte Patientenpanel angewendet.

Tab. 3: Primärantikörper mit Verdünnung, Inkubationszeiten und verwendeter Positivkontrolle

Antikörper gegen Antigen	Ki67	Pds5A	Pds5B	Mad2A	Mad2B
Verdünnung Primärantikörper	gebrauchsfertig	1:100	1:250	1:100	1:300
Inkubationszeit Primärantikörper (min)	30	30	30	30	30
Inkubationszeit DAB (min)	5	5	5	5	5
Inkubationszeit Hämalun (sek)	35	40	40	40	45
Positivkontrolle	Tonsille	Kolonkarzinom	Mammakarzinom	Mammakarzinom	Cerebellum

Neben der Austestung der Verdünnung wurden Variationen des immunhistochemischen Protokolls geprüft: die Inkubationszeiten des Primärantikörpers (30 - 60 min), des DAB's (5 - 15 min) und des Gegenfärbens mit Hämalaun. Die letztlich terminierten Zeiten sind in Tab. 3 für jeden Antikörper einsehbar.

Der Antikörper gegen Ki67 wurde erst kurz vor dem Auftragen aus dem Kühlschrank geholt. Die anderen Antikörper lagerten unverdünnt im -20°C Gefrierschrank in 10 µl Aliquots. Auch hier wurde erst kurz vor dem Auftragen der entsprechende Antikörper aufgetaut und in der festgelegten Konzentration mit PBS verdünnt.

Der jeweilige Primärantikörper wirkte 30 min auf die Positivkontrolle und einen Schnitt der jeweiligen Gewebeprobe ein. Der zweite Objektträger der gleichen Patientenprobe diente als Negativkontrolle und wurde nur mit PBS inkubiert.

Diese sollte keine Färbung außer einer Gegenfärbung mit Hämalaun zeigen.

Mit Ablauf der Zeit wurde von den Objektträgern das benetzende Reagenz abgeklopft und dreimal 2 min mit PBS auf dem Plattformschüttler gewaschen. Insgesamt wurden sechs verschiedene Tauchbecken verwendet, da eine Separierung der Objektträger mit und ohne Primärantikörper nötig war.

In der Färbekammer erfolgte dann für jeweils 15 min zunächst eine Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und im Anschluss mit dem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat, welches am Biotinrest des Brückenantikörpers bindet (ZYTOMED Systems, 2007^a). Dazwischen und im Anschluss wurde ein Waschschrift mit PBS dreimal für 2 min auf dem Schüttler durchgeführt. Eine Trennung der Objektträger war hier nicht notwendig.

Das Chromogen, eine frisch angesetzte DAB-Färbelösung, wurde im Dunkeln auf die Gewebeprobe geträufelt und je nach verwendetem Antikörper für einige Minuten inkubiert (Tab. 3). Während dieser Zeit fand die Umsetzung des DAB-Farbstoffes durch das Enzymkonjugat statt. Sofern der Primär- und an diesen der Sekundärantikörper gebunden hatten, resultierte dies in einer dunkelbraunen Färbung. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Objektträger für wenige Sekunden in Aqua destillata abgestoppt.

Zum Abschluss wurde eine Gegenfärbung mit filtriertem Hämalaun durchgeführt. Dadurch wurde an allen Stellen des Gewebes, an denen kein Primärantikörper gebunden hatte, eine Kontrastierung zu den übrigen mit DAB dargestellten Kontaktflächen hervorgerufen. Die Inkubationszeit differierte bei den fünf unterschiedlichen Antikörpern (Tab. 3).

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Objektträger in ein Tauchbecken mit Leitungswasser und unter fließendem Wasser gebläut. Die Temperatur des Wassers wurde kühl, die Wasserstrahlstärke auf eine mittlere Stufe eingestellt und auf den Rand des Tauchbeckens, niemals direkt auf die Objektträger, ausgerichtet, um ein Ablösen der Gewebeproben zu vermeiden.

Zur anschließenden Dehydrierung der Gewebeproben wurden sie in eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht: einmal 2 min in 50%, je zweimal 2 min in 70%, 96%, 100% Ethanol und abschließend zweimal 10 min in Xylol.

Abschließend wurden die Objektträger mit einem Eindeckmittel und einem Deckgläschen unter der Vermeidung von Luftblasen auf dem Präparat eingedeckt und zum Trocknen gelagert.

2.2.3 Ermittlung von Expressionswerten

Mithilfe des Lichtmikroskops BX41 und der an dieses gekoppelten Kamera „Camedia C5060“, fand mit einer 60× Vergrößerung eine Fotodokumentation der Gewebeproben statt. Der Helligkeitsregler wurde auf Stufe 6 eingestellt.

Der Belinea PC mit dem Programm „Olympus DP-Soft 5.0“ löste die Kamera durch Anklicken von „SQ“ aus, das Foto erschien auf dem Monitor und konnte in seiner Farbhelligkeit mittels „Oper“ nachbearbeitet werden (vorgenommene Oper-Anpassungen: Gamma: 1,227; Helligkeit: -73; Kontrast: 610).

Von den mit dem anti-Ki67-Antikörper gefärbten Objektträgern wurden von jedem Präparat des Patientenpanels zuerst fünf Gesichtsfelder „ungezielt“ erfasst. Sie sollten einen durchschnittlichen Expressionswert in der gesamten Gewebeprobe repräsentieren und wurden als „Ki67-Expression im Gesamt-Tumorgewebe“ bezeichnet.

In einer zweiten Erfassung von fünf Gesichtsfeldern wurden „gezielt“ die Bereiche aufgesucht, die die augenscheinlich stärkste Dichte an Ki67-exprimierenden Zellen aufwiesen. Ein hohes Maß an Ki67-Positivität zeigte hohe proliferative Aktivität an - ein zellteilungsaktives Zentrum des Tumors. Diese Gesichtsfelder sollten die Expression des Antigens in „Proliferationszentren“ des vorliegenden Gewebeschnitts widerspiegeln.

Von den mit den anti-Pds5A-, anti-Pds5B-, anti-Mad2A- und anti-Mad2B-Antikörpern immunhistochemisch behandelten Objektträgern wurden fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Die fotografierten Bereiche sollten sich an den bei Ki67-definierten „Proliferationszentren“ orientieren.

Mithilfe des Computerprogramms „Image J“ fand eine Auszählung der fotodokumentierten Gesichtsfelder statt. Befehlseingabe: „*File*“ „*open*“, dann via „*Plugins*“ zu „*Particle Analysis*“, Unterpunkt: „*Cell Counter*“. In dem dann sich öffnenden „*Counterwindow*“ wurde ausgezählt.

In der Auswertung wurde unterschieden, ob sich ein Zellkern braun gefärbt durch DAB darstellte, und somit als Antigen-präsentierend (positiv) gewertet werden konnte, oder ob eine Blaufärbung gegen eine Antigenexpression sprach (negativ).

Bei näherer Betrachtung konnte in der IHC von Pds5A, Pds5B und Mad2A ein qualitativer Unterschied in der Farbstärke beobachtet werden, so dass neben der Wertung, ob sich ein Zellkern positiv oder negativ zeigte, eine weitere Differenzierung zwischen starker und schwacher Färbung erfolgte. Schwach und stark gefärbte Zellen zusammengenommen, ergaben die Gesamtzellzahl an positiv gefärbten Zellen. Bei einigen Präparaten in der Pds5B-IHC war eine „Mischfärbung“ blau-bräunlich auffällig, die als schwach positiv gewertet wurde.

Mad2B zeigte zwar auch teilweise quantitative Unterschiede in der Farbstärke, so dass auch hier nach der bisher verwendeten Methode in einem ersten

Durchgang Farbtintensitäten der Kerne unterschieden wurden. Es stellte sich bei näherer Betrachtung aber heraus, dass zusätzlich zu der Kernfärbung auch eine Zytoplasmafärbung vorlag. Daher wurden hier - anstelle von Farbstärken - vier Gruppen nach den verschiedenen Lokalisationen von DAB-detektiertem Antigen unterschieden:

1. Zytoplasma-positiv, Kern-negativ
2. Zytoplasma- und Kern-positiv
3. Zytoplasma-negativ/nicht zu erkennen, Kern-positiv
4. Zytoplasma- und Kern-negativ

Durch Addition der ersten drei wurde die Gesamtsumme an antigenpräsentierenden Tumorzellen ermittelt.

Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die Auswertung aller fünf Antigene.

Tab. 4: Auswertung der einzelnen Antigenexpression in den Gesichtsfeldern mit Hilfe von Image J

Antigen	Differenzierung der Tumorzellen
Ki67	Expression: positiv oder negativ
Pds5A	Expression: positiv oder negativ, Expressionsstärke: schwach oder stark
Pds5B	Expression: positiv oder negativ, Expressionsstärke: schwach oder stark
Mad2A	Expression: positiv oder negativ, Expressionsstärke: schwach oder stark
Mad2B	Expression: positiv oder negativ, Lokalisation der Expression: Zellkern, Zytoplasma oder Zellkern und Zytoplasma

Das jeweilige Counterwindow sowie die Übersicht über die Resultate wurden abgespeichert. In einer Exceltabelle wurden die Zahlenwerte der Zellen festgehalten und die Prozentangaben errechnet. Der Begriff „Expressionswert“ wird im Folgenden synonym zur Prozentangabe verwendet.

2.2.4 Statistik

Das PC-Programm „*GraphPad Prism 4*“ wurde für die statistischen Auswertungen genutzt. Aufgrund der geringen Probenanzahl konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Daher wurden parameterfreie Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau α wurde auf 5% (0,05) festgelegt. Ein signifikantes Ergebnis lag also vor, wenn der Signifikanzwert $p < \alpha$ war, d.h. $< 0,05$.

2.2.4.1 Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Zunächst wurden die Expressionswerte eines Antigens zwischen den verschiedenen Tumorentitäten miteinander verglichen. Diese Analyse wurde für jedes der fünf Antigene einzeln durchgeführt. Eine Übersicht der durchgeführten Vergleiche zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Vergleich der Expressionswerte eines Antigens zwischen den einzelnen Tumorstadien und der angewandte parameterfreie Test

Tumorgewebe 1	Tumorgewebe 2	Parameterfreier Test
Alle LGA °II	Alle GBM	Mann-Whitney-U-Test
Primäre GBM	Sekundäre GBM	Mann-Whitney-U-Test
Ruhende LGA °II	Rezidivierende LGA °II	Mann-Whitney-U-Test
Rezidivierende LGA °II	Malignisierende LGA °II	Mann-Whitney-U-Test
Rezidivierende LGA °II	Rezidiv-LGA °II	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
Malignisierende LGA °II	Sekundäre GBM	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Bei ungepaarten Proben, d.h. bei voneinander unabhängigen Tumorgeweben unterschiedlicher Patienten, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Gepaarte Proben wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgewertet.

Gepaart bedeutet, dass zwei Tumorbiopsien desselben Patienten miteinander verglichen wurden, wobei die erste Probe ein LGA °II darstellte und die folgende ein Rezidiv bzw. einen Progress.

2.2.4.2 Kaplan-Meier-Überlebenskurven

Die Auswirkungen der Antigenexpression in Bezug auf das Überleben wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven berechnet.

Die genauen Überlebensdaten zu den einzelnen Patienten lagen jedoch in nur sechs GBM-Fällen vor. Patienten, deren Überleben nicht, jedoch der Termin der letzten Vorstellung in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg bekannt war, wurden daher mit dem bis *dato* bekannten Überleben mit in die Erfassung genommen. Dies betraf acht GBM-Fälle. Zu allen übrigen Patienten, deren Tumorproben im Patientenpanel vorlagen, konnten keine eindeutigen Informationen ermittelt werden, so dass diese nicht in die Kaplan-Meier-Analysen einfließen. Insgesamt wurden somit 14 Patienten für diese Analyse berücksichtigt. Bei allen vorliegenden Daten handelte es sich um primäre und sekundäre GBM.

Für die Gesamtexpression aller fünf Proteine in den Proliferationszentren wurden die Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt, um zu klären, ob es einen Überlebensvorteil, der in Zusammenhang mit dem Grad der Expression der Proteine steht, gibt.

Der Median der prozentualen Proteinexpression wurde als Grenze zur Unterscheidung hoch- und niedrig-exprimierender Patienten gewählt. Diese wurden dann miteinander verglichen.

Von Ki67 wurde neben der Expression in Proliferationszentren auch die Expression im Gesamt-Tumorgewebe und von Pds5A, Pds5B sowie Mad2A die starke Expression analysiert. Für Mad2B wurden vier verschiedene Kaplan-Meier-Überlebenskurven angefertigt: Gesamtexpression (unabhängig vom Kompartiment der positiven Signalgebung), positive Zytoplasmafärbung, positive Kernfärbung sowie gleichzeitig vorliegende positive Kern- und Zytoplasmafärbung.

2.2.4.3 Korrelation

In einem weiteren Schritt wurde mithilfe einer parameterfreien Korrelation, die den Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s ermittelt, überprüft, ob die Expression der fünf Antigene in einem Zusammenhang miteinander stehen könnten.

Durch Bildung von Gruppen wurde definiert, welche Expressionen (gesamt, stark, Lokalisation) miteinander verglichen werden sollten (Tab. 6).

Tab. 6: Korrelationsgruppen in Bezug auf die Expression der Antigene

Gruppe	Expression	Expression
1	Gesamtexpression (alle Antigene)	Gesamtexpression (alle Antigene)
2	Starke Expression (Pds5A, Pds5B, Mad2A)	Starke Expression (Pds5A, Pds5B, Mad2A)
3	Gesamtexpression (alle Antigene)	Starke Expression (Pds5A, Pds5B, Mad2A)
4	Gesamtexpression (alle Antigene)	Mad2B-Expression in den verschiedenen Lokalisationen
5	Starke Expression (Pds5A, Pds5B, Mad2A)	Mad2B-Expression in den verschiedenen Lokalisationen

Da von allen Antigenen mit Ausnahme von Ki67 nur Expressionswerte in Proliferationszentren vorlagen, wurde von Ki67 auch nur die Expression in Proliferationszentren für die Korrelationen verwendet.

In jeder Gruppe wurden hierbei nur die entsprechenden, gleichwertigen Unterformen des Tumors (Tab. 7) zwischen den einzelnen Antigenen korreliert, so dass sich hinter jeder der fünf aufeinander bezogenen Expressionen acht einzelne Korrelationen verbergen.

Jedes Antigen (Antigen X) wurde mit jedem anderen (Antigen Y) verglichen - außer den in Tab. 6 aufgeführten Ausnahmen.

Tab. 7: Auflistung der einzeln durchgeführten Korrelationen in jeder Gruppe (Tab. 6) in Bezug auf die Unterform der Tumoren

Antigen X	Antigen Y
Alle GBM	Alle GBM
Alle LGA °II	Alle LGA °II
Primäre GBM	Primäre GBM
Sekundäre GBM	Sekundäre GBM
Ruhende LGA °II	Ruhende LGA °II
Rezidivierende LGA °II	Rezidivierende LGA °II
Malignisierende LGA °II	Malignisierende LGA °II
Rezidiv-LGA °II	Rezidiv-LGA °II

Gleichgerichtete Zusammenhänge zwischen Proteinen haben in der Spearman-Rangkorrelation ein positives, gegenläufige tragen ein negatives Vorzeichen.

Die Stärke der Spearman-Rangkorrelation bzw. Höhe des Zusammenhangs wurde anhand des absoluten Wertes (unabhängig vom Vorzeichen) des r_s eingeteilt (Tab. 8, Universität Stuttgart, 02.07.2016).

Tab. 8: Rangkorrelationskoeffizient r_s und Höhe der Korrelation
modifiziert nach (Universität Stuttgart, 2016)

Rangkorrelationskoeffizient r_s	Höhe der Korrelation
0 bis 0,2	sehr gering
bis 0,5	gering
bis 0,7	mittel
bis 0,9	hoch
größer als 0,9	sehr hoch

3 Ergebnisse

3.1 Ki67

Mithilfe des Ki67-Antikörpers werden Zellkerne proliferierender Zellen angefärbt.

Expression im Gesamt-Tumorgewebe

Die Ki67-Expression im Gesamt-Tumorgewebe wurde durch die Auswertung von fünf „ungezielt“ erfassten Zählfenstern ermittelt, die den durchschnittlichen Anteil des Proteins in der Gewebeprobe darstellen sollten. In Abb. 5 ist diese positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Es zeigte sich für alle GBM eine Ki67-Expression im Mittel (\bar{x}) von 16,40% und für alle LGA °II von $\bar{x} = 3,29\%$. Der parameterfreie Test zwischen beiden WHO-Graden errechnete einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0013$). Außerdem unterschieden sich rezidivierende LGA °II signifikant durch eine geringere Proliferation von malignisierenden LGA °II ($p = 0,0173$). Alle anderen Vergleiche waren statistisch nicht signifikant verschieden (Daten hier nicht gezeigt).

Expression in den Proliferationszentren

Als Proliferationszentren wurden jene Bereiche mit besonders großer Ki67-Positivität und folglich hoher proliferativer Aktivität definiert. Daher fielen die Expressionswerte hier höher aus als bei der „ungezielten“ Erfassung. In Abb. 6 ist die durchschnittlich positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Bei GBM konnten in $\bar{x} = 28,29\%$ der Zellen Ki67-positive Kerne nachgewiesen werden, bei den LGA °II nur in 9,72% der Zellen. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte auch hier die gesteigerte Ki67-Expression in GBM gegenüber allen LGA °II eine Signifikanz ($p = 0,0012$) (Abb. 7 a). Bei allen anderen Vergleichen gab es keinen deutlichen Unterschied in der Expression des Proliferationsmarkers zwischen den einzelnen Entitäten (Abb. 7 b - f).

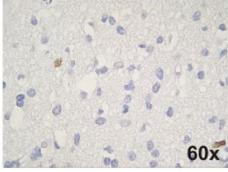
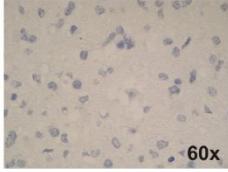
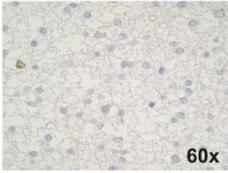
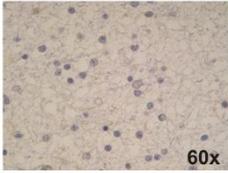
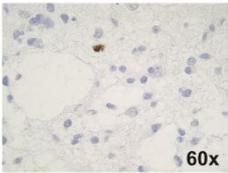
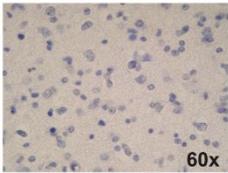
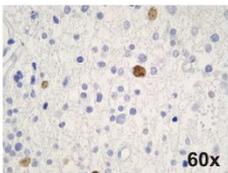
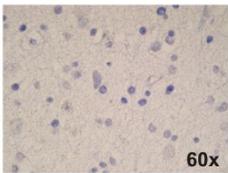
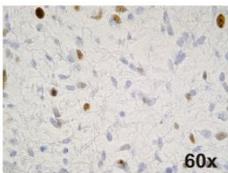
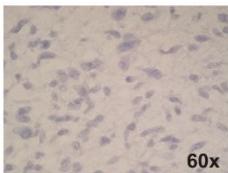
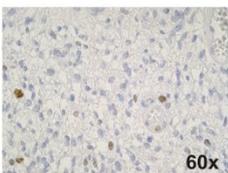
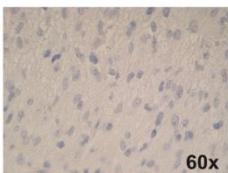
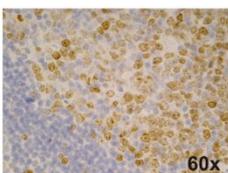
Tumorentität	Ki67-IHC Gesamt-Tumorgewebe	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			5. $\bar{x} = 2,66\%$
Rezidivierende LGA °II			6. $\bar{x} = 1,09\%$
Rezidiv- LGA °II			4. $\bar{x} = 2,93\%$
Malignisierende LGA °II			3. $\bar{x} = 6,21\%$
Sekundäre GBM			1. $\bar{x} = 28,44\%$
Primäre GBM			2. $\bar{x} = 9,19\%$
Positivkontrolle Tonsille			

Abb. 5: Ki67-IHC, Gesamt-Tumorgewebe
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittlich positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

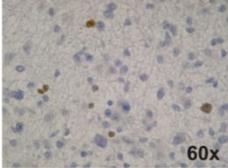
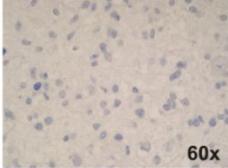
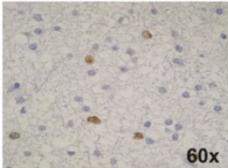
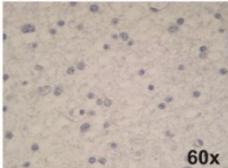
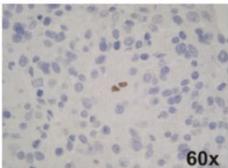
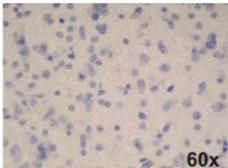
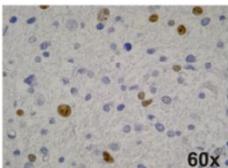
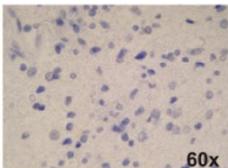
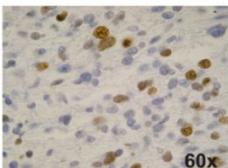
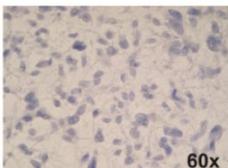
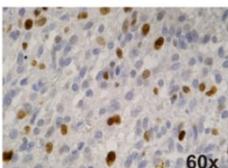
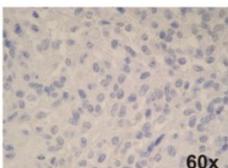
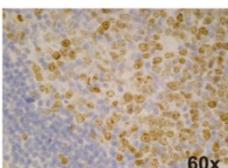
Tumorentität	Ki67-IHC Proliferationszentrum	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			5. $\bar{x} = 9,54\%$
Rezidivierende LGA °II			4. $\bar{x} = 9,87\%$
Rezidiv- LGA °II			6. $\bar{x} = 6,23\%$
Malignisierende LGA °II			3. $\bar{x} = 13,29\%$
Sekundäre GBM			1. $\bar{x} = 42,67\%$
Primäre GBM			2. $\bar{x} = 19,67\%$
Positivkontrolle Tonsille			

Abb. 6: Ki67-IHC, Proliferationszentren
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittlich positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

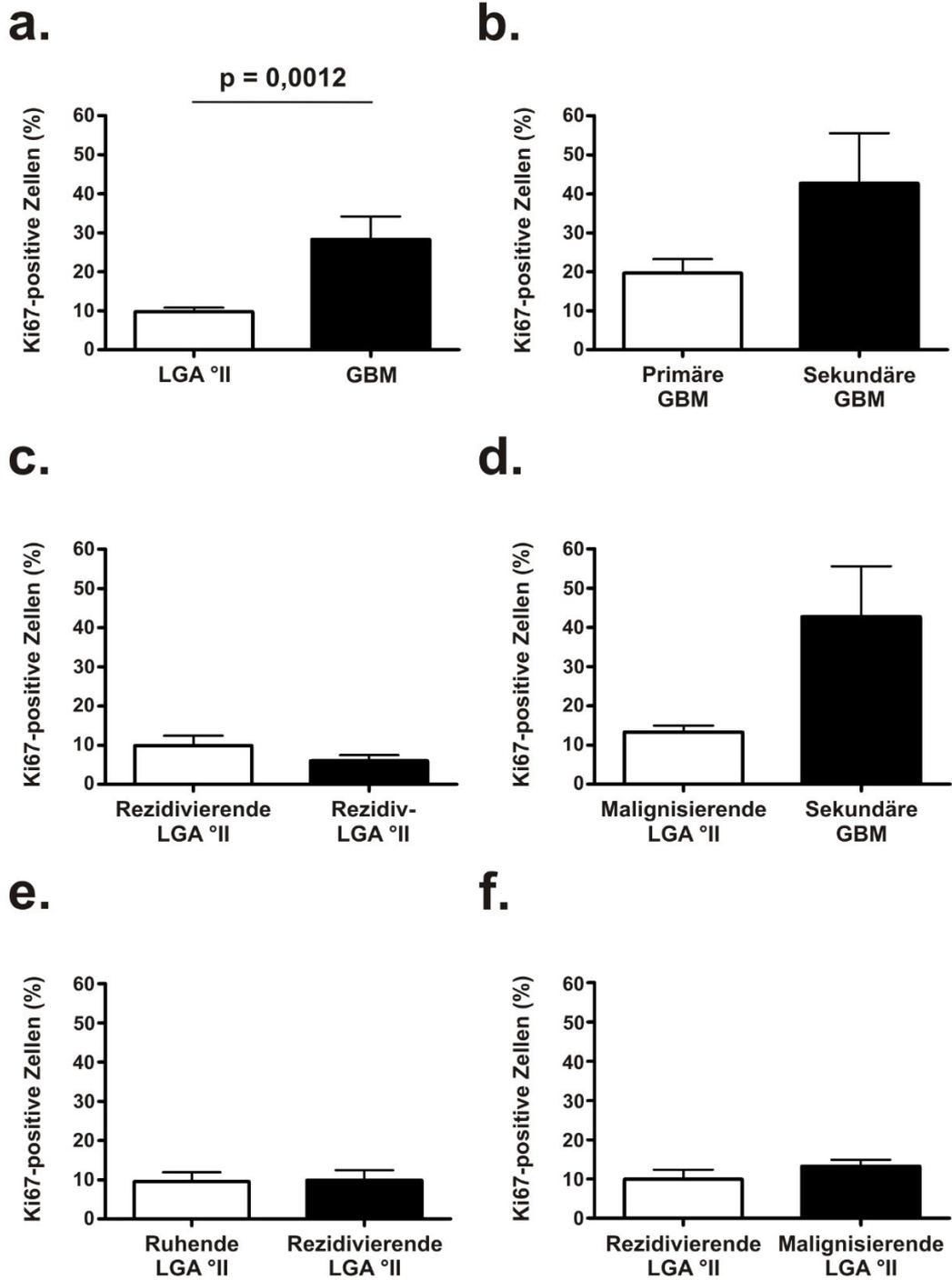


Abb. 7: Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der Ki67-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren

3.2 Pds5A

Die mikroskopische Begutachtung der Pds5A-IHC ergab eine Färbung von nahezu 100% der Tumorzellkerne. Auch die Kerne einiger physiologischer Neurone (Normalhirn) im Cortexbereich, sowie Makroglia (Astrozyten und Oligodendrozyten) waren positiv gefärbt. Mikroglia, Endothelzellen, Lymphozyten und Monozyten waren negativ.

Gesamtexpression in den Proliferationszentren

Je nach Entität und WHO-Grad lag die Anzahl an positiven Zellen bei mindestens $\bar{x} \geq 92\%$. Bis auf einen Vergleich mussten die Nullhypothesen bei der Durchführung der parameterfreien Tests angenommen werden. Nur LGA °II, die rezidierten, zeigten einen signifikant höheren Gehalt an Pds5A gegenüber LGA °II, die weder eine Progress- noch Rezidivneigung aufwiesen ($p = 0,0177$) (Daten hier nicht gezeigt).

Starke Expression in den Proliferationszentren

Der Mittelwert der starken Pds5A-Expression in den Proliferationszentren von allen LGA °II betrug $\bar{x} = 35,80\%$, von allen GBM $\bar{x} = 33,26\%$. In Abb. 8 ist die durchschnittlich stark positiv-gefärbte Zellzahl in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Sekundäre GBM wiesen im Vergleich zu primären einen signifikant höheren Gehalt an Zellen mit einer starken Expression auf ($p = 0,0110$) (Abb. 9 b). Ebenso zeigten LGA °II von Patienten, die im Verlauf ein Rezidiv ausbildeten, einen signifikanten Unterschied zu Patienten, die einmalig ein LGA °II entwickelten ($p = 0,0480$) (Abb. 9 e). Alle anderen Vergleiche waren statistisch nicht signifikant (Abb. 9 a, c, d, f).

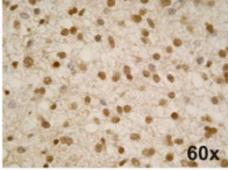
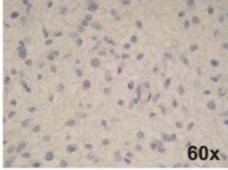
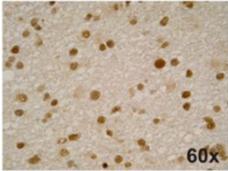
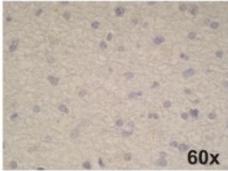
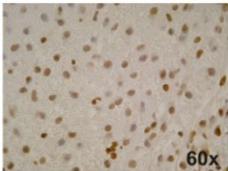
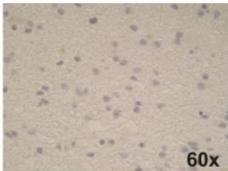
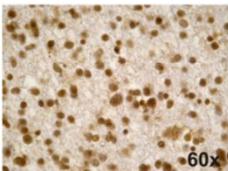
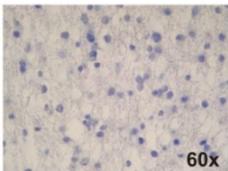
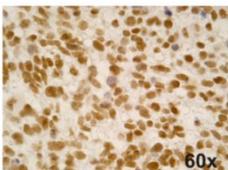
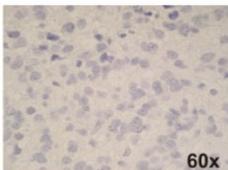
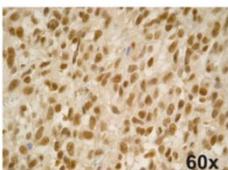
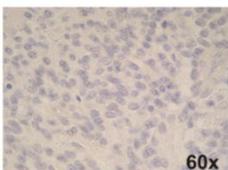
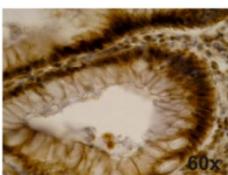
Tumorentität	Pds5A-IHC Proliferationszentrum	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			4. $\bar{x} = 30,27\%$
Rezidivierende LGA °II			1. $\bar{x} = 47,32\%$
Rezidiv- LGA °II			5. $\bar{x} = 28,27\%$
Malignisierende LGA °II			3. $\bar{x} = 40,18\%$
Sekundäre GBM			2. $\bar{x} = 46,30\%$
Primäre GBM			6. $\bar{x} = 25,43\%$
Positivkontrolle Kolonkarzinom			

Abb. 8: Pds5A-IHC, Proliferationszentren
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittlich stark positiv-gefärbte Zellzahl in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

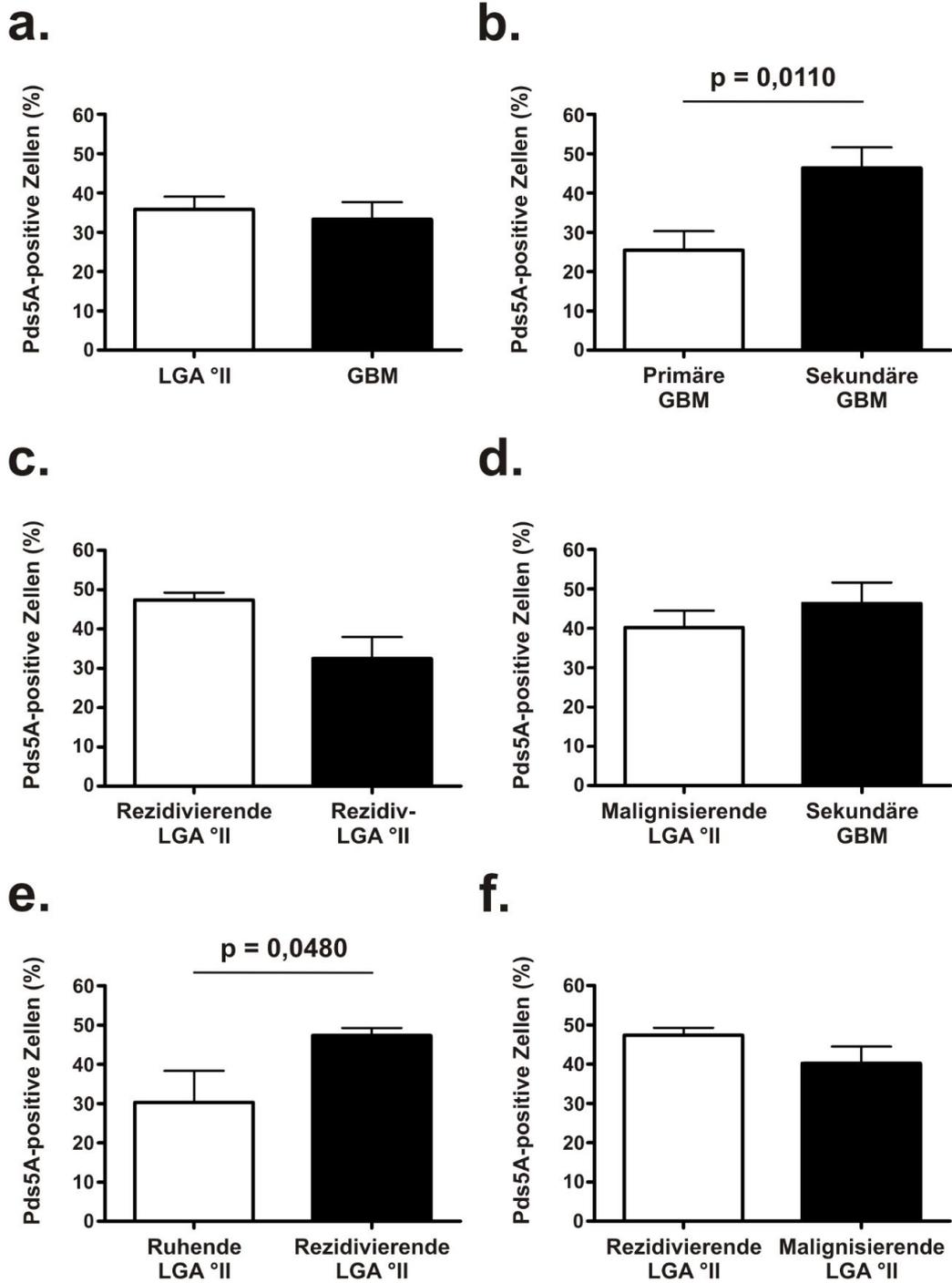


Abb. 9: Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der stark Pds5A-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren

3.3 Pds5B

Ähnlich wie bei Pds5A waren nahezu alle Tumorzellkerne für Pds5B positiv. Ebenso waren Cortexneuronen und Endothelzellen angefärbt.

Gesamtexpression in den Proliferationszentren

Der Mittelwert der Pds5B-Gesamtexpression in den Proliferationszentren aller LGA °II betrug $\bar{x} = 98,11\%$, aller GBM $\bar{x} = 99,11\%$. In Abb. 10 ist die durchschnittlich positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Pds5B-Expression (Abb. 11 a-f).

Starke Expression in den Proliferationszentren

Auch die Vergleiche über die starke Pds5B-Expression zeigten keinen signifikanten Unterschied (Daten hier nicht gezeigt).

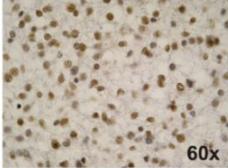
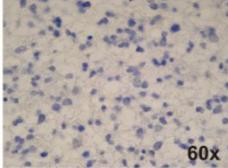
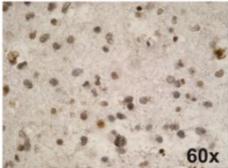
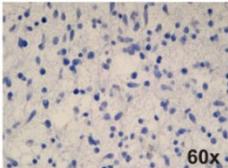
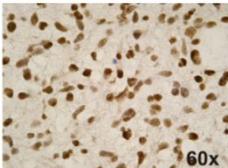
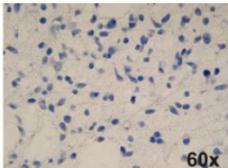
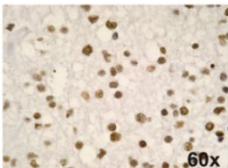
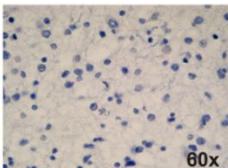
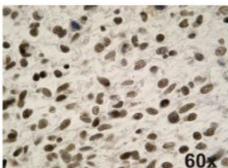
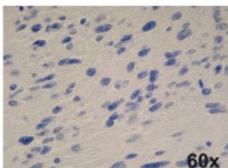
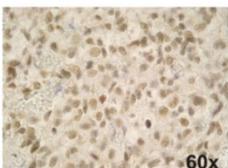
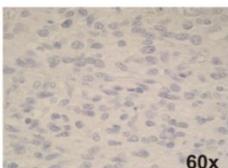
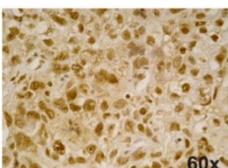
Tumorentität	Pds5B-IHC Proliferationszentrum	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			6. $\bar{x} = 95,65\%$
Rezidivierende LGA °II			3. $\bar{x} = 99,01\%$
Rezidiv- LGA °II			4. $\bar{x} = 98,82\%$
Malignisierende LGA °II			2. $\bar{x} = 99,53\%$
Sekundäre GBM			1. $\bar{x} = 99,63\%$
Primäre GBM			5. $\bar{x} = 98,80\%$
Positivkontrolle Mammakarzinom			

Abb. 10: Pds5B-IHC, Proliferationszentren
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittlich positiv-gefärbte Gesamtzellzahl in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

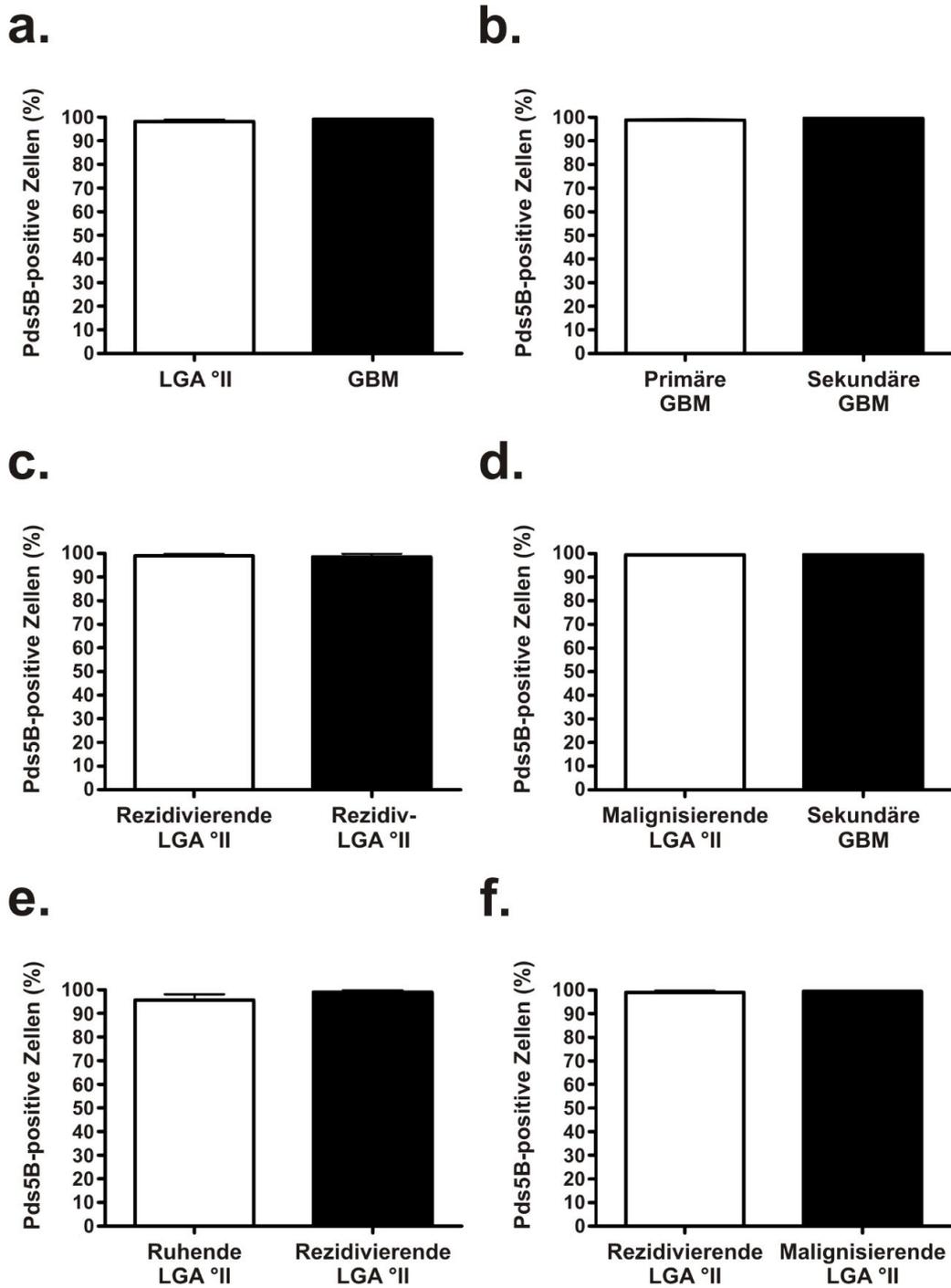


Abb. 11: Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der Pds5B-Gesamtexpression in den Proliferationszentren

3.4 Mad2A

Mad2A fand sich sowohl in den Kernen von Tumorzellen, als auch bei Neuronen in Normalhirnanteilen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Arachnoidalzellen. Endothelzellen zeigten nur teilweise eine als positiv zu wertende Färbung.

Gesamtexpression in den Proliferationszentren

Insgesamt war die Gesamtzellzahl in den Proliferationszentren je nach Entität und WHO-Grad $\bar{x} \geq 94\%$, so dass bei der Durchführung der parameterfreien Tests kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (Daten hier nicht gezeigt).

Starke Expression in den Proliferationszentren

In Abb. 12 ist die durchschnittlich stark positiv-gefärbte Zellzahl in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Alle LGA °II zusammen exprimierten mit einem durchschnittlichen Wert von $\bar{x} = 57,88\%$ deutlich mehr stark Mad2A-gefärbte Kerne als alle GBM ($\bar{x} = 37,31\%$). Im statistischen Vergleich zwischen beiden WHO-Graden konnte die Nullhypothese abgelehnt werden ($p = 0,0004$) (Abb. 13 a). In allen anderen Tumorentitäten war die Mad2A-Expression nicht signifikant unterschiedlich exprimiert (Abb. 13 b-f).

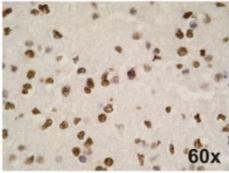
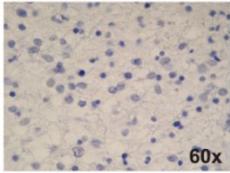
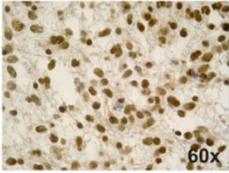
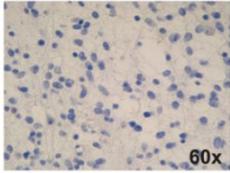
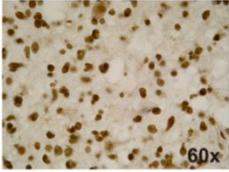
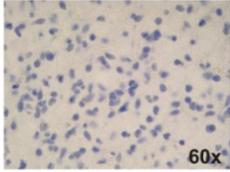
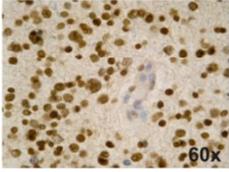
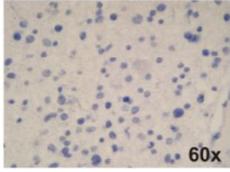
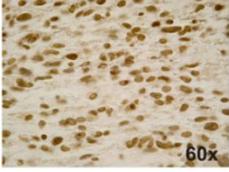
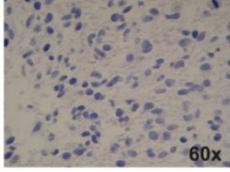
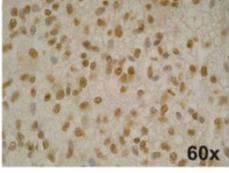
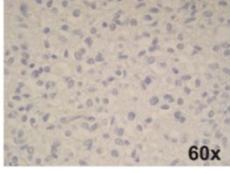
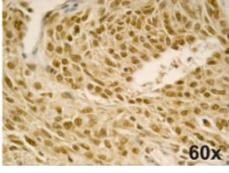
Tumorentität	Mad2A-IHC Proliferationszentrum	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			2. $\bar{x} = 57,78\%$
Rezidivierende LGA °II			1. $\bar{x} = 65,33\%$
Rezidiv- LGA °II			4. $\bar{x} = 52,84\%$
Malignisierende LGA °II			3. $\bar{x} = 56,80\%$
Sekundäre GBM			5. $\bar{x} = 40,40\%$
Primäre GBM			6. $\bar{x} = 35,45\%$
Positivkontrolle Mammakarzinom			

Abb. 12: Mad2A-IHC, Proliferationszentren
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittlich stark positiv-gefärbte Zellzahl in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

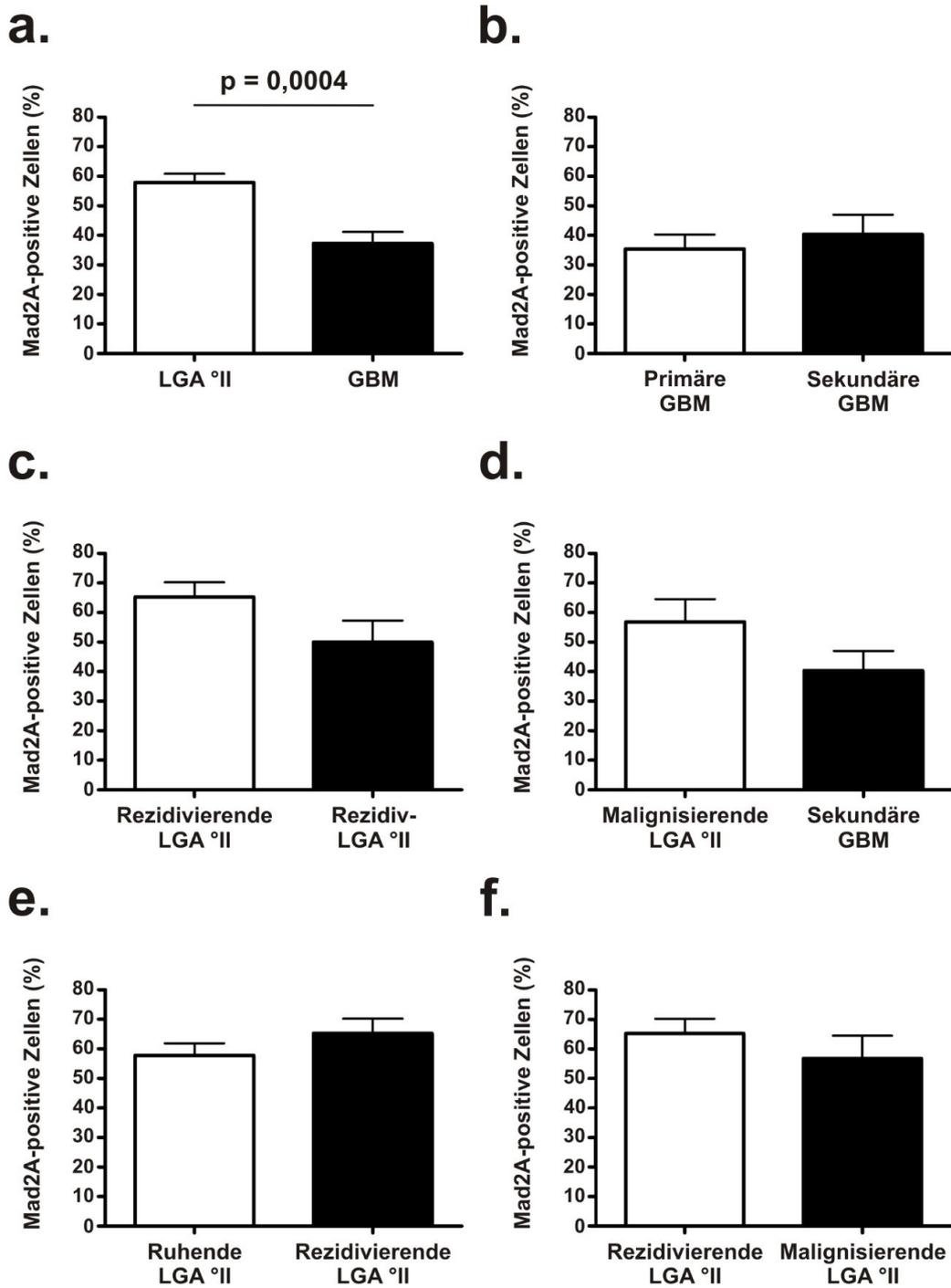


Abb. 13: Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der stark Mad2A-exprimierenden Zellen in den Proliferationszentren

3.5 Mad2B

In der Mad2B-IHC färbten sich Kerne und/ oder Zytoplasmaraume von Tumorzellen an. Außerdem waren auch einige Oligodendrozyten positiv in der Mad2B-Expression, während Astrozyten, Lymphozyten und Endothelzellen negativ blieben. In der Differenzierung nach Antigenlokalisation (Tab. 4) stellte die insgesamt stärkste Gruppe Tumorzellen dar, deren Zytoplasmaraume positiv gefärbt waren, deren Kerne aber negativ blieben.

Gesamtexpression in den Proliferationszentren

Einen Signifikanzwert von $p = 0,0034$ ergab der Vergleich von allen LGA °II zu allen GBM. Die GBM enthielten mehr Mad2B-exprimierende Zellen als alle Astrozytome °II. Alle weiteren Vergleiche zeigten keinen signifikanten Unterschied. Je nach Entität und WHO-Grad lag die positive Gesamtzellzahl zwischen $\bar{x} = 43-78\%$ (Daten hier nicht gezeigt).

Expression in Kern und Zytoplasma in den Proliferationszentren

Die Nullhypothese konnte in allen durchgeführten Vergleichen nicht abgelehnt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Expression im Kern bei negativer Zytoplasmafärbung in den Proliferationszentren

Kein signifikanter Unterschied konnte in den Mann-Whitney-U- bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt).

Expression im Zytoplasma bei negativer Kernfärbung in den Proliferationszentren

In Abb. 14 ist die durchschnittliche Zahl Zytoplasma-positiv-gefärbter Zellen in Prozent je nach Tumorentität und eine daraus abgeleitete Rangordnung aufgeführt. Mit einem Mittelwert von $\bar{x} = 66,25\%$ exprimierten alle GBM mehr Mad2B im Zytoplasma bei negativer Kernfärbung im Vergleich zu allen LGA °II ($\bar{x} = 41,41\%$). Der parameterfreie Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden WHO-Graden ($p = 0,0005$) (Abb. 15 a). Bei allen weiteren Vergleichen musste die Nullhypothese angenommen werden (Abb. 15 b-f).

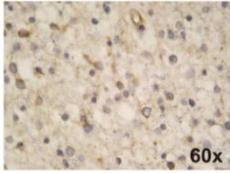
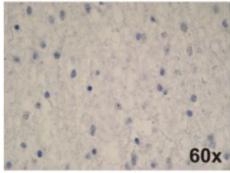
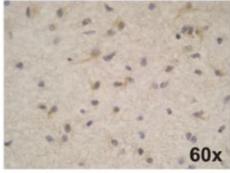
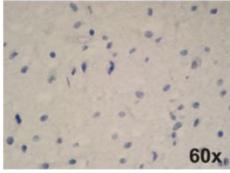
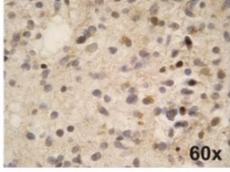
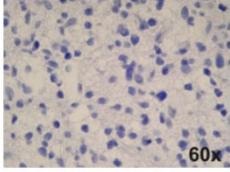
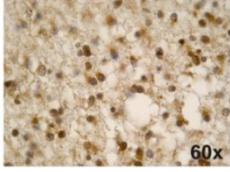
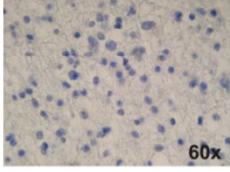
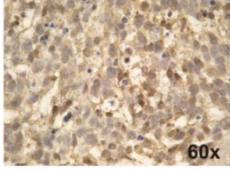
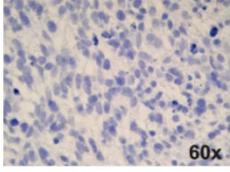
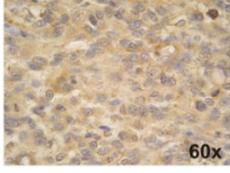
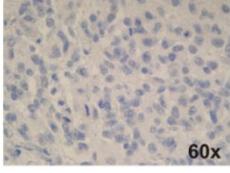
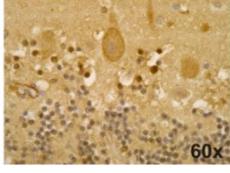
Tumorentität	Mad2B-IHC Proliferationszentrum	Negativkontrolle	Rang nach Mittelwert
Ruhende LGA °II			4. $\bar{x} = 40,64\%$
Rezidivierende LGA °II			6. $\bar{x} = 34,98\%$
Rezidiv- LGA °II			5. $\bar{x} = 36,05\%$
Malignisierende LGA °II			3. $\bar{x} = 53,02\%$
Sekundäre GBM			2. $\bar{x} = 60,89\%$
Primäre GBM			1. $\bar{x} = 71,60\%$
Positivkontrolle Cerebellum			

Abb. 14: Mad2B-IHC, Proliferationszentren
Gezeigt ist ein repräsentatives Bild des Färbeverhaltens aus jeder Tumorentität. Die durchschnittliche Zahl Zytoplasma-positiv-gefärbter Zellen (Kern-negativ-gefärbte Zellen) in Prozent und eine sich daraus ergebende Rangordnung sind angegeben.

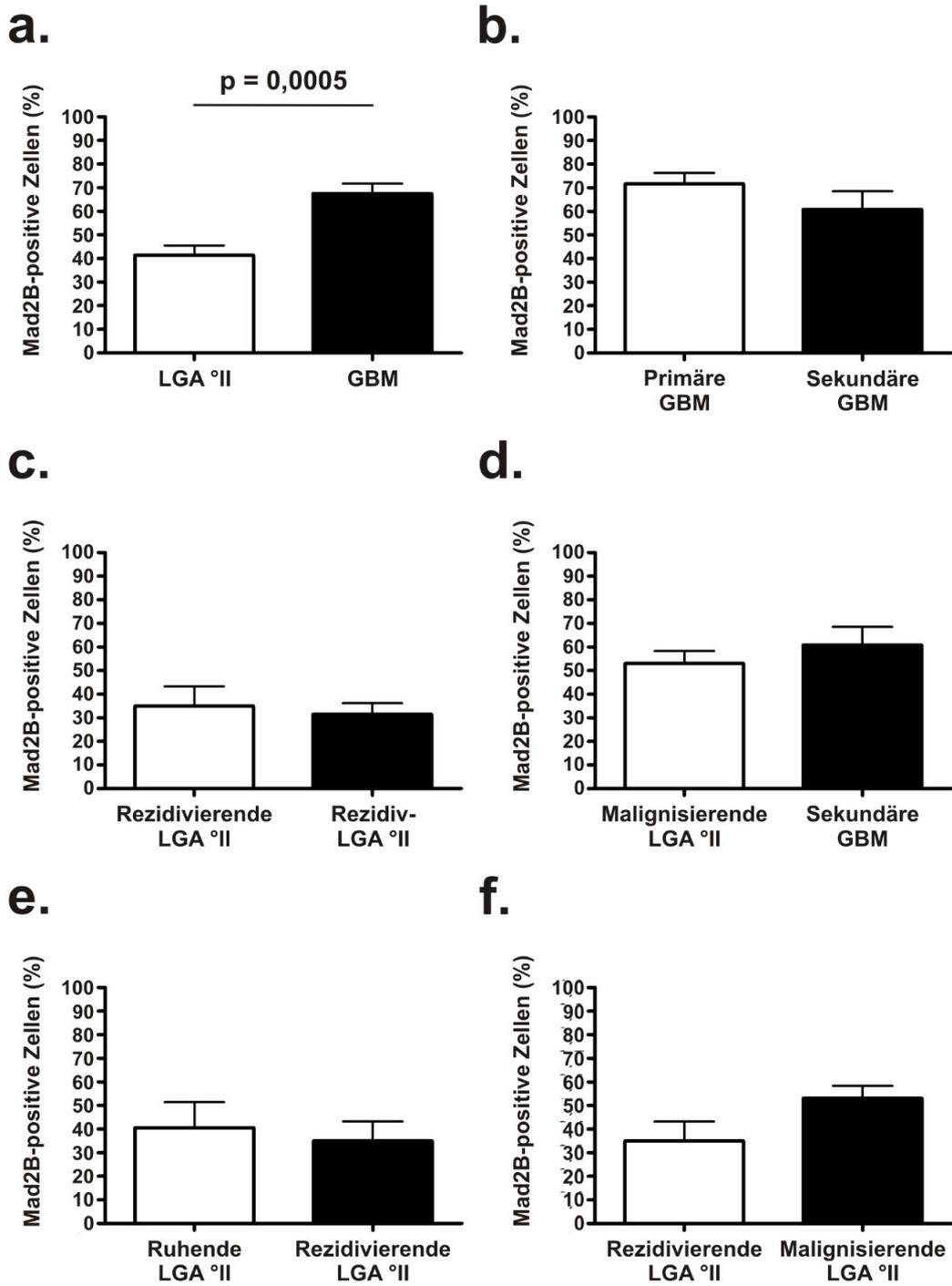


Abb. 15: Graphen der parameterfreien Tests mit der Quantifizierung der zytoplasmatischen Mad2B-Expression in den Proliferationszentren

3.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten nach ihrer Expression von Ki67, Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B

Das Überleben von GBM-Patientengruppen, die sich in ihrer Expressionsstärke von Ki67, Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B unterschieden, wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Analysen untersucht. In den meisten Fällen (Ki67, Pds5A, Pds5B und Mad2B) verliefen die Kurven nahezu deckungsgleich und zeigten auch statistisch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16 a, b, c, d, f). Allerdings ergaben sich im medianen Überleben Unterschiede (Tab. 9).

Tab. 9: Medianes Überleben von GBM-Patienten in Monaten bei hoher bzw. niedriger Expression

Protein bzw. Antigen	Expression	
	Hoch	Niedrig
Ki67-Expression im Gesamt-Tumorgewebe	13	9
Ki67-Expression in den Proliferationszentren	8	13
Pds5A-Gesamtexpression in den Proliferationszentren	9	13
Pds5B-Gesamtexpression in den Proliferationszentren	8	13
Mad2A-Gesamtexpression in den Proliferationszentren	6	16
Mad2B-Gesamtexpression in den Proliferationszentren	13	9
Mad2B-Expression in Kern und Zytoplasma in den Proliferationszentren	8	16

Auffällig war die Kaplan-Meier-Analyse für Mad2A. Hier liefen die Kurven deutlich auseinander. Im Median hatten Patienten mit niedriger Expression einen Überlebensvorteil von 10 Monaten (6 Monate bei hoher Expression gegenüber 16 Monaten bei niedriger Expression) (Abb. 16 e).

Die einzige Kaplan-Meier-Analyse, die ein statistisch signifikantes Ergebnis erbrachte, war jene, die zwischen den Lokalisationen der Mad2B-Expression differenzierte. Patienten mit positiver Kern- und Zytoplasmafärbung hatten bei hoher Expression mit einem medianen Überleben von 8 Monaten eine signifikant ungünstigere Prognose im Vergleich zu 16 Monaten bei niedriger Expression ($p = 0,0122$) (Abb. 16 g).

Die Kaplan-Meier-Analysen der starken Expression von Pds5A, Pds5B, Mad2A und die der zytoplasmatischen bzw. nukleären Mad2B-Expression waren nicht signifikant (Daten hier nicht gezeigt).

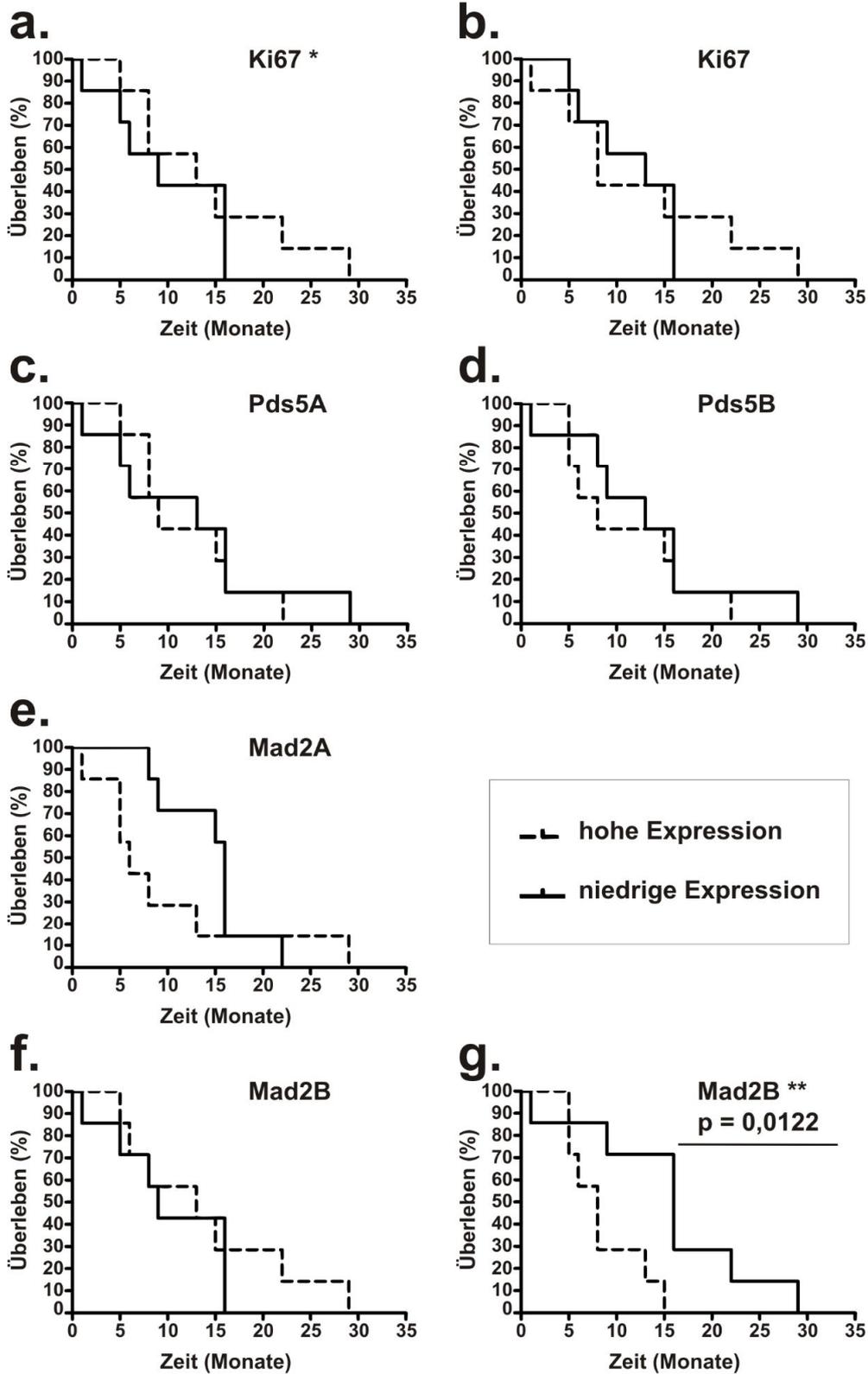


Abb. 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten nach ihrer Gesamtexpression in den Proliferationszentren
 Ausnahmen: * = Ki67-Expression im Gesamt-Tumorgewebe (a),
 ** = Mad2B-Expression in Kern und Zytoplasma in den Proliferationszentren (g)

3.7 Korrelationen

Alle analysierten Proteine sind in die Regulation der Zellteilung involviert. Um festzustellen, ob zwischen den Expressionen, einschließlich Expressionsstärken bzw. -lokalisationen, von Ki67, Mad2A, Mad2B, Pds5A und Pds5B Zusammenhänge bestehen könnten, wurden Spearman-Rangkorrelationsanalysen durchgeführt. Im folgenden Abschnitt sind nur die Analysen erwähnt, bei denen eine signifikante positive oder negative Korrelation ermittelt werden konnte. Alle nicht aufgeführten Korrelationen waren nicht signifikant.

Pds5A - Mad2A

Eine geringe positive Korrelation wurde für die Gesamtexpression der Proteine Pds5A und Mad2A in allen LGA °II errechnet ($p = 0,0336 / r_s = 0,4351$). Des Weiteren gab es mittlere bzw. hohe positive Korrelationen in der starken Expression dieser Proteine in allen ($p = 0,0118 / r_s = 0,6118$) bzw. in primären ($p = 0,0268 / r_s = 0,7091$) GBM (Abb. 17 a - c).

Pds5B - Mad2A

Positive mittlere bzw. hohe Korrelationen ergaben sich zwischen starker Mad2A- und Pds5B-Gesamtexpression für alle ($p = 0,0125 / r_s = 0,6079$) bzw. für primäre ($p = 0,0306 / r_s = 0,6933$) GBM, sowie den LGA °II-Rezidiven ($p = 0,0333 / r_s = 0,8452$). Negativ korrelierte hingegen die starke Mad2A- mit der starken Pds5B-Expression bei allen LGA °II ($p = 0,0370 / r_s = - 0,4278$) mit einem niedrigen und bei den ruhenden LGA °II ($p = 0,0341 / r_s = - 0,8214$) mit einem hohen Korrelationskoeffizienten (Abb. 17 d - h).

Mad2A - Mad2B

Für die ruhenden LGA °II ergaben sich sehr hoch positive Korrelationen sowohl zwischen der Gesamtexpression von Mad2A und Mad2B ($p = 0,0028 / r_s = 0,9636$), als auch zwischen der gesamten Mad2A- und der zytoplasmatischen Mad2B-Expression ($p = 0,0028 / r_s = 0,9636$). Rezidiv-LGA °II wiesen eine hoch-negative Korrelation zwischen starker

Mad2A- und Mad2B-Färbung im Kern auf ($p = 0,0333 / r_s = - 0,8857$) (Abb. 17 i - k).

Pds5A - Pds5B

Die starke Pds5A-Expression korrelierte positiv mit der Pds5B-Gesamtexpression bei allen GBM mit einem mittleren ($p = 0,0086 / r_s = 0,6325$) und bei den primären GBM mit einem hohen ($p = 0,0047 / r_s = 0,8283$) Korrelationskoeffizienten. In der starken Expression beider Proteine zeigten sich positive Zusammenhänge bei allen LGA °II ($p = 0,0303 / r_s = 0,4426$) sowie allen ($p = 0,0108 / r_s = 0,6176$) und den primären GBM ($p = 0,0174 / r_s = 0,7455$) von einem geringen, über ein mittleres bis hin zu einem hohen Korrelationsniveau (Abb. 17 l - p).

Mad2B - Ki67

In primären GBM korrelierte die gesamte Mad2B-Färbung mit der Ki67-Expression positiv ($p = 0,0072 / r_s = 0,8061$). Eine positive Korrelation zeigte auch die Ki67-Expression mit der zytoplasmatischen Mad2B-Färbung in primären GBM ($p = 0,0174 / r_s = 0,7455$). In beiden Fällen mit einem hohen Korrelationskoeffizienten (Abb. 17 q, r).

Pds5B - Mad2B

Die gesamte Pds5B-Expression korrelierte hoch negativ mit der Mad2B-Färbung in Kern und Zytoplasma in Rezidiv-LGA °II ($p = 0,0333 / r_s = - 0,8452$). Ein positiver Zusammenhang zeigte sich zwischen der starken Pds5B-Expression und der Mad2B-Färbung in Kern und Zytoplasma für alle GBM mit einem mittleren ($p = 0,0172 / r_s = 0,5853$) und in den primären GBM mit einem hohen Korrelationskoeffizienten ($p = 0,0172 / r_s = 0,7455$) (Abb. 17 s - u).

Pds5A - Mad2B

Die Mad2B-Kernfärbung korrelierte sehr hoch positiv mit der starken Pds5A-Expression bei den ruhenden LGA °II ($p = 0,0067 / r_s = 0,9063$) (Abb. 17 v).

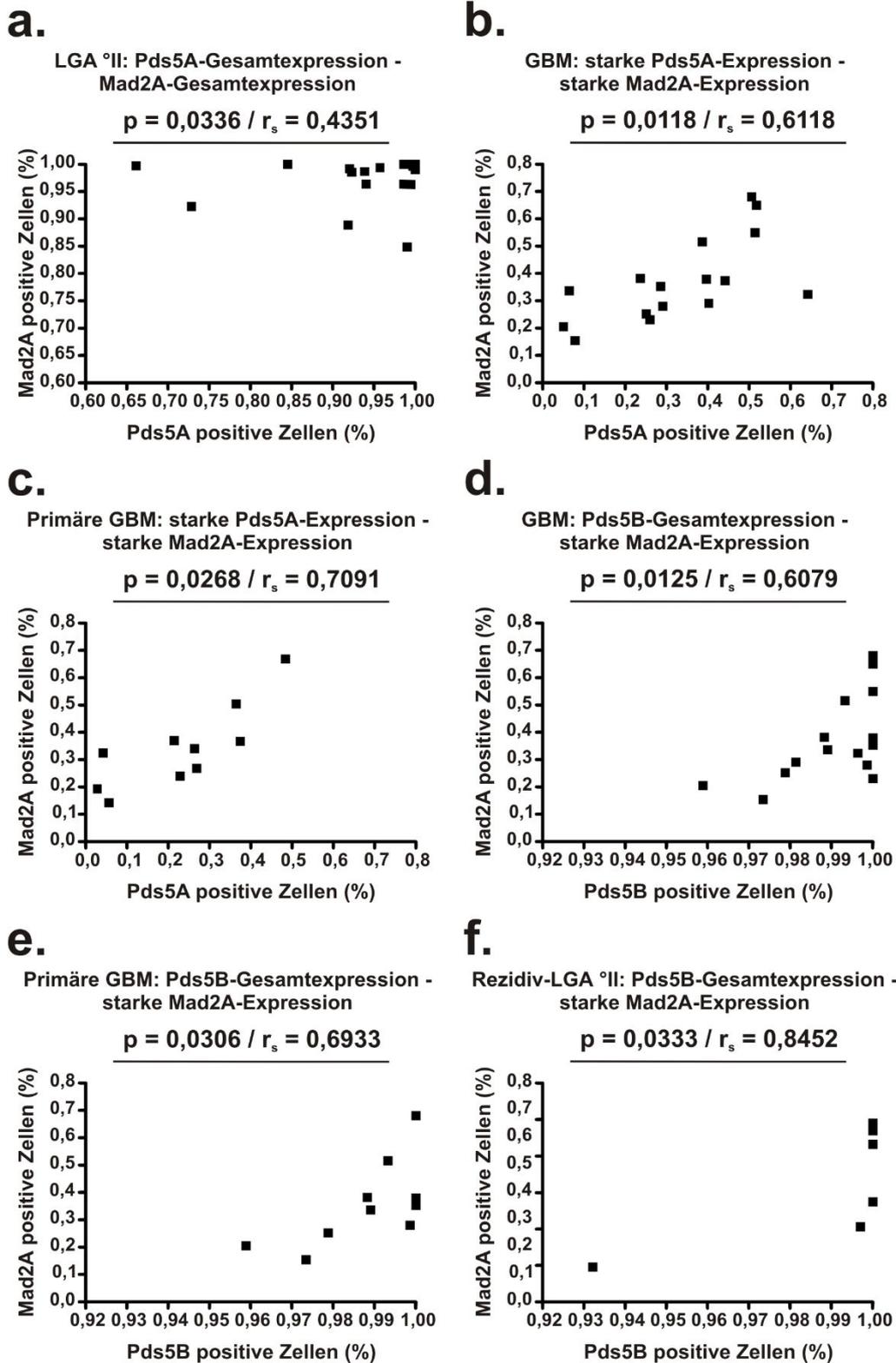
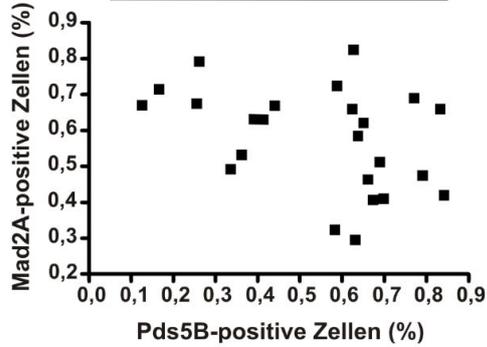


Abb. 17: Statistisch signifikante Korrelationen

g.

LGA °II: starke Pds5B-Expression -
starke Mad2A-Expression

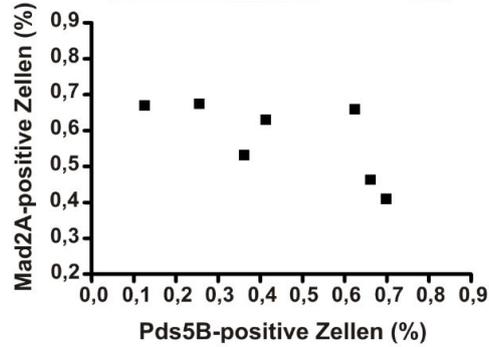
$p = 0,0370 / r_s = - 0,4278$



h.

Ruhende LGA °II: starke Pds5B-Expression -
starke Mad2A-Expression

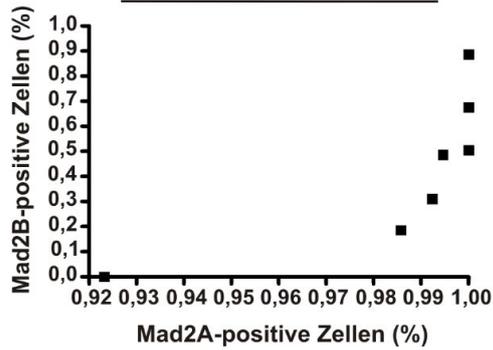
$p = 0,0341 / r_s = - 0,8214$



i.

Ruhende LGA °II: Mad2A-Gesamtexpression -
Mad2B-Gesamtexpression

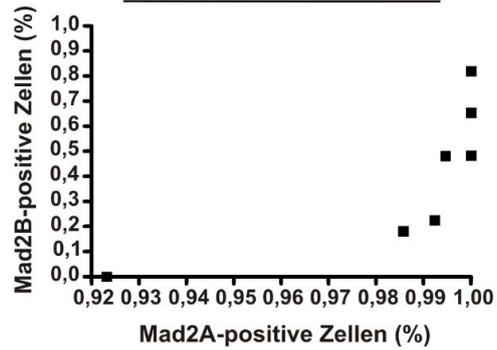
$p = 0,0028 / r_s = 0,9636$



j.

Ruhende LGA °II: Mad2A-Gesamtexpression -
Mad2B-Expression im Zytoplasma

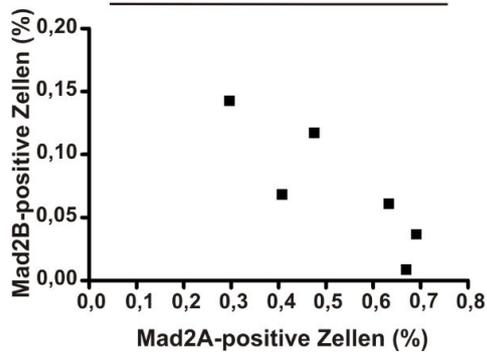
$p = 0,0028 / r_s = 0,9636$



k.

Rezidiv-LGA °II: starke Mad2A-Expression -
Mad2B-Expression im Kern

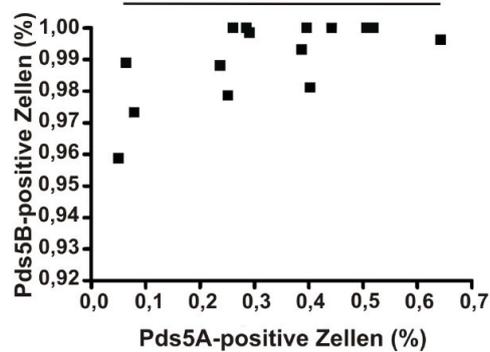
$p = 0,0333 / r_s = - 0,8857$



l.

GBM: starke Pds5A-Expression -
Pds5B-Gesamtexpression

$p = 0,0086 / r_s = 0,6325$

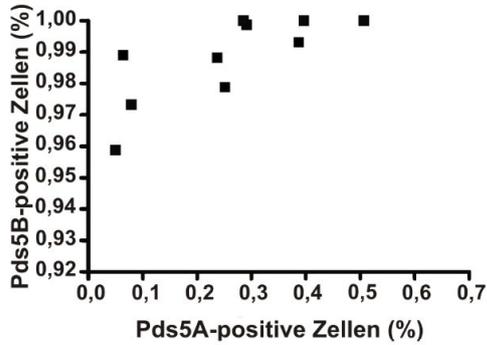


Fortsetzung von Seite 68

m.

Primäre GBM: starke Pds5A-Expression - Pds5B-Gesamtexpression

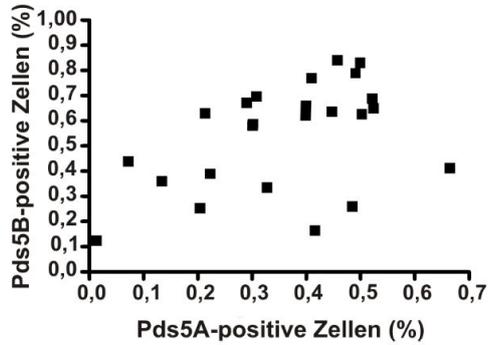
$p = 0,0047 / r_s = 0,8283$



n.

LGA °II: starke Pds5A-Expression - starke Pds5B-Expression

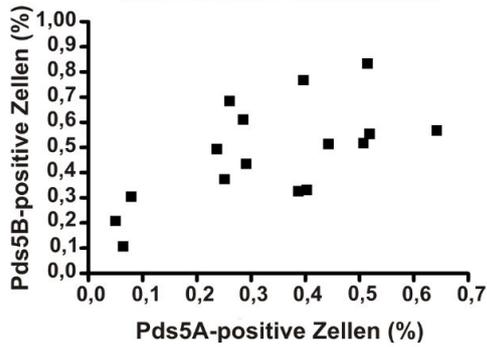
$p = 0,0303 / r_s = 0,4426$



o.

GBM: starke Pds5A-Expression - starke Pds5B-Expression

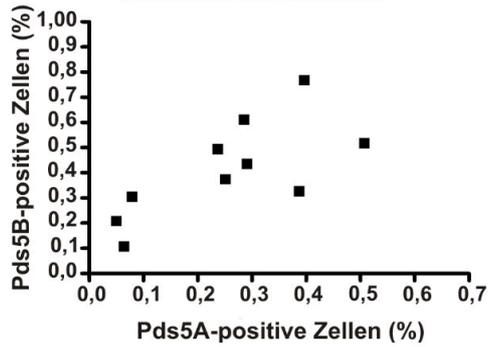
$p = 0,0108 / r_s = 0,6176$



p.

Primäre GBM: starke Pds5A-Expression - starke Pds5B-Expression

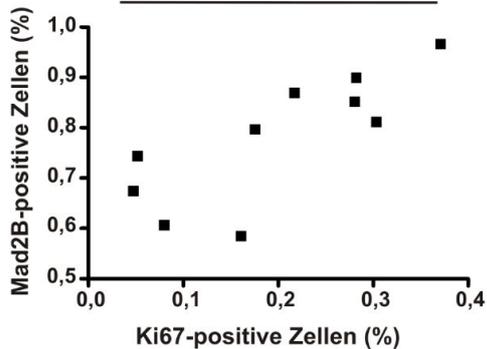
$p = 0,0174 / r_s = 0,7455$



q.

Primäre GBM: Ki67-Expression - Mad2B-Gesamtexpression

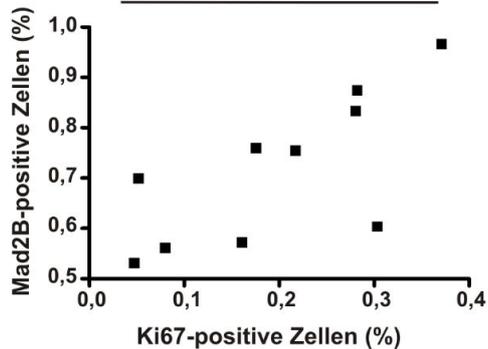
$p = 0,0072 / r_s = 0,8061$



r.

Primäre GBM: Ki67-Expression - Mad2B-Expression im Zytoplasma

$p = 0,0174 / r_s = 0,7455$

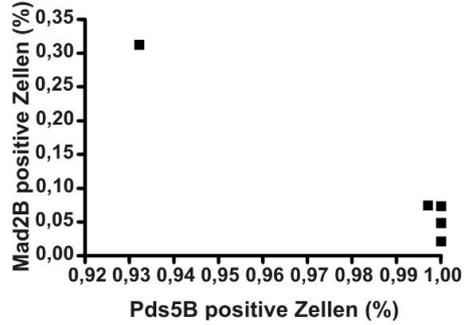


Fortsetzung von Seite 68

s.

Rezidiv-LGA °II: Pds5B-Gesamtexpression -
Mad2B-Expression in Kern und Zytoplasma

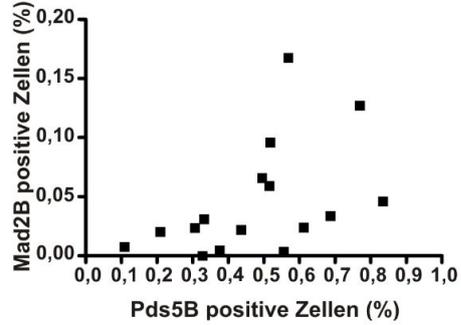
$p = 0,0333 / r_s = -0,8452$



t.

GBM: starke Pds5B-Expression -
Mad2B-Expression in Kern und Zytoplasma

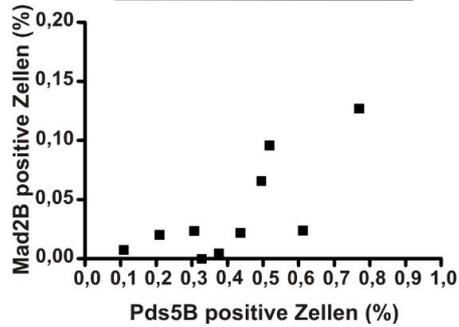
$p = 0,0172 / r_s = 0,5853$



u.

Primäre GBM: starke Pds5B-Expression -
Mad2B-Expression in Kern und Zytoplasma

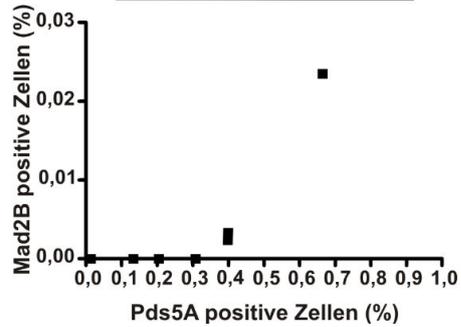
$p = 0,0174 / r_s = 0,7455$



v.

Ruhende LGA °II: starke Pds5A-Expression -
Mad2B-Expression im Kern

$p = 0,0067 / r_s = 0,9063$



Fortsetzung von Seite 68

4 Diskussion

4.1 Pds5A

Pds5A ist ein Zellzyklus-reguliertes Protein, welches von der S- bis zur M-Phase exprimiert wird und Zellzyklusphasen-abhängig unterschiedliche Konzentrationen aufweist (Kumar et al., 2004, Zheng et al., 2008). Ein Anstieg der Pds5A-Expression ist v.a. mit der G₂/M-Phase assoziiert (Kumar et al., 2004, Zheng et al., 2008). Es wird im Organismus ubiquitär, aber je nach Gewebeart auf variablem Niveau exprimiert (Zhang et al., 2009, Hagemann et al., 2011, Capalbo et al., 2012). Mit Hilfe von Northernblotanalysen konnte im Organvergleich gezeigt werden, dass es im Normalhirn von Ratten bzw. Mäusen ein mittleres, im Menschen dagegen ein erniedrigtes Pds5A-Expressionsniveau aufweist (Zhang et al., 2009, Hagemann et al., 2011, Capalbo et al., 2012). Auffällig ist, dass es in C6-GBM Zellen der Ratte auf mRNA-Ebene stark überexprimiert wird, was sich auch für menschliche GBM-Zelllinien (U87, U343, U251, U373 und GaMG-Zellen) auf Proteinebene bestätigen ließ (Hagemann et al., 2011). Eine erhöhte Pds5A-Expression im Vergleich zum Normalgewebe wurde auch für humane Tumoren des Magens, Kolon transversums, der Lunge und des Uterus nachgewiesen. Dabei fand sich eine von der Dignität des Gewebes abhängige, variable mRNA- und Proteinexpression (Kumar et al., 2004, Zheng et al., 2008). In Vorversuchen unseres Labors konnte eine Überexpression von Pds5A sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinlevel für astrozytäre Tumoren nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch eine zunehmende Expressionsstärke von Normalhirngewebe über LGA °II zu GBM (Hagemann et al., 2011). Es wurde diskutiert, dass eine solche Überexpression zur Entwicklung und Progression von Tumoren im Allgemeinen und astrozytären Tumoren im Besonderen beitragen könnte (Zheng et al., 2008, Hagemann et al., 2011). Obwohl in der hier vorliegenden Arbeit die Expression von Pds5A für astrozytäre Tumoren bestätigt werden konnte, konnte ein Anstieg der Pds5A-Expression mit höherem WHO-Grad nicht reproduziert werden. In allen Gewebeproben der verschiedenen Entitäten wurde eine gleichmäßige

Gesamtexpression von Pds5A festgestellt (Daten hier nicht gezeigt). Parameterfreie Statistikttests ergaben keinen Unterschied zwischen LGA °II und GBM. Signifikante Unterschiede zeigten sich aber zwischen ruhenden und rezidivierenden LGA °II ($p = 0,0177$ bzw. $p = 0,0480$) sowie einzig in der zusätzlich untersuchten starken Pds5A-Expression zwischen primären und sekundären GBM ($p = 0,0110$). Dies lässt vermuten, dass Pds5A eine Rolle in der Ausbildung von LGA °II-Rezidiven bzw. von sekundären GBM spielen könnte. Daher könnte Pds5A für eine individualisierte Therapie und Diagnostik von Nutzen sein, z.B. in der postoperativen Überwachung von LGA °II-Patienten. Für die Diagnostik sekundärer GBM wurde der Nachweis spezifischer Mutationen der IDH1/2 etabliert (Ohgaki et al., 2013, Appin et al., 2014, Weller et al., 2014). Weitere molekulare Marker wären hier wünschenswert und Pds5A könnte evtl. eine Rolle spielen. Seiner Funktion während des Zellzyklus entsprechend handelt es sich bei Pds5A um ein nukleär exprimiertes Protein, was auch für nasopharyngeale Karzinome und GBM gezeigt wurde (Kumar et al., 2004, Zheng et al., 2008, Hagemann et al., 2011). In Gliomen WHO °IV beobachtete man außerdem eine Zunahme in der Pds5A-Expressionstärke je näher man dem Tumorzentrum kam (Hagemann et al., 2011). Die hier vorliegende Arbeit bestätigte diese Kernfärbung für Astrozytome und Unterschiede in der Expressionsstärke, die differierende Pds5A-Konzentrationen in den Tumorzellkernen vermuten lassen, noch einmal. Insbesondere wurde sich auf die durch die Expression des Proliferationsmarkers Ki67-definierten Proliferationszentren der Tumoren konzentriert. Hier fanden sich je nach untersuchter Gliom-Entität mindestens 92% der Zellkerne positiv für Pds5A-Proteinexpression. Dabei konzentrierte sich Pds5A zwar auf die Proliferationszentren, korrelierte aber nicht mit der Ki67-Expression. Dies bestätigte Beobachtungen anderer Autoren (Losada et al., 2005, Zhang et al., 2009, Hagemann et al., 2011). Dennoch kann eine Rolle von Pds5A für die Proliferation von Gliomzellen nicht ausgeschlossen werden. Eine Pds5A-Überexpression in der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293T und in drei nasopharyngealen Zelllinien regte die Zellproliferation und das Kolonienwachstum an (Zheng et al., 2008). Eine transiente bzw. stabile

Pds5A-Expression führte in COS-1 bzw. MDA MB 231-Zellen zu einem Anstieg von Zellen in der sub-G₁-Phase (Kumar et al., 2004). Es wird daher auch diskutiert, ob Pds5A eine gewebespezifische Doppelrolle in der Tumorgenese einerseits durch eine proliferative, andererseits durch eine apoptoseinduzierende Wirkung spielen könnte (Zheng et al., 2008). Auf die Prognose der GBM-Patienten scheint die Stärke der Pds5A-Expression keine Auswirkungen zu haben. Auch wenn es im medianen Überleben zwischen niedriger und hoher Pds5A-Expression einen Unterschied von 4 Monaten zu geben schien, verliefen beide Kaplan-Meier-Kurven doch nahezu deckungsgleich, so dass dieser Unterschied wohl auf die geringe Probenzahl zurückgeführt werden kann. Es ist jedoch bekannt, dass eine Pds5A-Überexpression die TP63-Konzentration steigert (Zheng et al., 2008), welches mit einer schlechteren Prognose in HNSCC assoziiert ist (Lo Muzio et al., 2005). Aktuell wird Pds5A eine Rolle in der Pathogenese von GBM zugesprochen und als eins von 13 GBM-Prognosegenen diskutiert (Yang et al., 2019). Die vorliegenden Daten zeigen, dass Pds5A in LGA °II und GBM hoch exprimiert wird, und als Überexpression gedeutet werden könnte, da in Normalhirngewebe zwischen 25-75% der Gliazellen schwach bis moderat angefärbt sind. In Gliomen zeigte sich ein Anstieg der Intensität und bei $\frac{3}{4}$ der Proben (14 von 19 Gewebeproben) waren über 75% der Zellen positiv gefärbt (Proteinatlas, 16.08.2016^a, 16.08.2016^b). In dem hier untersuchten Gliompanel überschritten 38 von 40 Proben, d.h. 95% des untersuchten Materials, die 75%-Grenze an positiven Zellen. Eine solche Überexpression könnte evtl. therapeutisch für Gliompatienten nutzbar werden. Depletion oder Mutation von Pds5⁺, dem Pds5A-Homolog der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, führte zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Ultraviolett-Bestrahlung (UV), Methanoesulfonate, Bleomycin und Thiabendazol im Vergleich zu Pds5⁺-exprimierende Zellen (Wang et al., 2002). Pds5⁺-Eso1-Doppelmutanten (Eso-1 entspricht *cancer/testis antigen 1 (CTAG1)*) zeigten eine erhöhte UV-Sensibilität als die Pds5-Einzelmutanten in *Schizosaccharomyces pombe* (Tanaka et al., 2001a). Durch Pds5-ausgelöste Chromosomenverluste, Kohäsions- und Kondensationsdefekte konnten u.a. über die Kontrolle der Pds5-Expression in verschiedenen Hefe-Spezies verhindert

werden (Tanaka et al., 2001a, Stead et al., 2003, Aguilar et al., 2005, Tong et al., 2014). Es wäre also möglich, dass eine Pds5A-Überexpression zur Therapieresistenz von Gliomen beiträgt. Seine Rolle in der Regulation der Schwesterchromatidkohäsion könnte es zukünftig auch ermöglichen, therapeutisch in die Aneuploidie von Gliomzellen einzugreifen.

4.2 Pds5B

Pds5B ist ein Ortholog von Pds5A. Ihre funktionellen Unterschiede sind noch nicht abschließend untersucht (Rankin, 2015), es wird aber diskutiert, dass Pds5B Pds5A funktionell ersetzen kann (Zhang et al., 2009). Daher wäre eigentlich eine negative Korrelation der Pds5B-Expression im Vergleich zur Pds5A-Expression zu erwarten gewesen. Stattdessen ergaben sich positive Korrelationen beider Proteine in allen LGA °II sowie in allen bzw. primären GBM, welche durch ihre redundante Funktion der Cohesin-Kontrolle und Interaktion mit Wapl bedingt (Kueng et al., 2006, Wutz et al., 2017) oder ein Hinweis auf einen noch unbekanntem, wechselseitigen Zusammenhang sein könnte.

Die Pds5B-Expression ist zellzyklusspezifisch reguliert, wobei aber eine Überexpression auch Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nehmen kann (Geck et al., 1999, Zhou et al., 2013a). Eine Pds5B-Überexpression induzierte eine Proliferationshemmung von embryonalen Karzinomzellen bzw. ist in Prostatakarzinomzellen miteinander assoziiert (Geck et al., 2000, Denes et al., 2010). Bei astrozytären Tumoren ergab sich allerdings - wie bei einer IHC von OSCC-Proben (Franca et al., 2017) - keinerlei Korrelation mit der Ki67-Expression, so dass ein solcher Zusammenhang hier nicht gegeben zu sein scheint. Pds5B wird gewebespezifisch unterschiedlich exprimiert, wobei das Gehirngewebe im murinen Organvergleich eine Mittelstellung im Expressionslevel einnimmt (Zhang et al., 2007). In menschlichen Gliazellen zeigte Pds5B eine hohe Expression mit einem Anteil größer als 75% an stark positiv-gefärbten Zellen (Proteinatlas, 16.08.2016^o). Sein Gen ist auf Chromosom 13q lokalisiert (NCBI Gene, 05.06.2019). In LGA °II findet sich häufig ein Verlust bzw. LOH von 13q und für GBM wurde der Verlust des

ganzen Chromosom 13 beschrieben (Shapiro, 2002). Für eine Vielzahl weiterer Karzinome ist eine LOH und die Herunterregulation der Pds5B-Expression bekannt (Harada et al., 2001, Reis et al., 2005, Solomon et al., 2014) und für die Tumorgenese von Karzinomen des Verdauungstraktes wurde bereits ein Zusammenhang mit *frameshift*-Mutationen und LOH beschrieben (He et al., 2008, Zhang et al., 2008, Kim et al., 2013, Solomon et al., 2014). Diese Genveränderungen von Pds5B in Ösophaguskarzinomen zeigten einen positiven Zusammenhang mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen sowie einem höheren pathologischen bzw. WHO-Grad (Harada et al., 2001, Huang et al., 2002, Zhang et al., 2008). Bei Mammakarzinomen korrelierte ein niedriges Pds5B-Level mit einem höheren histologischen Grad positiv (Brough et al., 2012). Es wurde daher vermutet, dass Pds5B ein Tumorsuppressor sein könnte (Denes et al., 2010, Ma et al., 2019). In der Tat hemmte eine Pds5B-Überexpression in P19 embryonalen Karzinomzellen die Differenzierung sowie Proliferation und führte zu einem Anstieg der Apoptoserate. Ein KD bewirkte eine Phänotypänderung der Zellen mit morphologischen Ähnlichkeiten zu Krebsstammzellen, während die normale Expression eine Differenzierung der Zellen induzierte (Denes et al., 2010). In Pankreaskarzinomzellen ist das Onkogen *MicroRNA-223* (miR-223) am Tumorprogress beteiligt und in der Lage Pds5B herunterzuregulieren. Eine Pds5B-Überexpression hingegen bewirkte eine verzögerte Zellmobilität, -wachstum sowie eine Tumorregression (Ma et al., 2019). Aus diesen Gründen wurde in den Zellen astrozytärer Tumoren eigentlich eine niedrige Pds5B-Expression erwartet. Überraschenderweise war das Gegenteil der Fall. Hier wurde nun Pds5B in mindestens 95% der Kerne je nach untersuchter Gliomentität exprimiert. Eine solche hohe nukleäre Pds5B-Expression wurde meines Wissens für humanes Tumorgewebe bisher nicht in der Forschungsliteratur beschrieben. Lediglich in einer IHC von 62 OSCC konnte eine mehr als 50%ige Expression in 11 Proben dargestellt werden, in den Übrigen nur ein 25-50% positiver Pds5B-Zellanteil (Franca et al., 2017). In epithelialen Prostatazellen von Ratten fand sich eine nukleäre Expression von über 90% (Maffini et al., 2002) und in Zusammenhang mit Pathologien wurde eine weitere Hochregulation in septalen Geweben von Patienten mit einem

Ventrikelseptumdefekt beobachtet (Zhang et al., 2006). Allerdings findet sich im Proteinatlas eine moderate bis erhöhte Expression bei einer Vielzahl von Karzinomen und die Angabe bei Gliomen, dass von 22 untersuchten Gewebeproben alle mehr als 75% positive Tumorzellen enthielten und 12 davon eine intensive Pds5B-IHC aufwiesen (Proteinatlas, 16.08.2016^d, 05.06.2019). Eine Expression im Nukleolus - wie von Zhang, et al. beschrieben (Zhang et al., 2007) - konnte hier bei den Astrozytomen jedoch nicht detektiert werden.

Es gab keinen Unterschied zwischen den verschiedenen untersuchten Entitäten in der Gesamt- als auch starken Expression, so dass Pds5B keinen Einfluss auf WHO-Grad, Rezidivausbildung und Malignisierung in Gliomen zu haben scheint. Dazu passt auch, dass sich das Überleben von Patienten mit schwächerer nicht signifikant von jenen mit stärkerer Pds5B-Expression in Kaplan-Meier-Analysen unterschied, auch wenn das mediane Überleben der niedrig-exprimierenden Patienten 5 Monate länger war als jenes der Hochexprimierer. Dies könnte auf die geringe Probenzahl zurückzuführen sein. Allerdings wurde für Patienten mit Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen, die mit einer adjuvanten Anthrazyklin-basierten Chemotherapie behandelt worden waren, bei niedriger Pds5B-Expression sowohl ein längeres brustkrebsspezifisches als auch metastasenfreies Überleben ermittelt (Brough et al., 2012). In hochgradig serösen Ovarialkarzinomen war die Pds5B-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Couturier et al., 2016). Ein möglicher Effekt kann somit auch für GBM-Patienten nicht ausgeschlossen werden, zumal GBM eine höhere Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) aufweisen, wenn gleichzeitig SA2 mutiert ist. Beim gleichzeitigen Einsatz von TMZ oder Camptothecin zeigten sich synergistische Effekte (Bailey et al., 2014, Solomon et al., 2014). Die Gen-Stilllegung von Pds5B führte in HeLa-Zellen bzw. 293T embryonalen Nierenzellen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber PARP-Inhibitoren, Mitomycin C, ionisierender Bestrahlung und die Tumorgroße implantierter HeLa-Zellen in Xenograft-Zebrafisch-Versuchen verringerte sich (Brough et al., 2012, Couturier et al., 2016). Die Pds5B-Expression in GBM-Zellen könnte daher zur Therapieresistenz beitragen und das Antibiotikum Tetrazyklin bzw. Casodex, ein

Androgenrezeptorantagonist, die Pds5B herunterregulieren können (Geck et al., 2000, Murthy et al., 2005), könnten das Therapieansprechen der GBM erhöhen.

4.3 Mad2A

Mad2A ist eine Schlüsselkomponente des SAC, der die korrekte Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen während der M-Phase sicherstellt, und auch an der Kinetochor-Mikrotubuli-Stabilisierung in Säugerzellen beteiligt ist (Alberts et al., 2011, Kabeche et al., 2012). Dadurch wird CIN und Aneuploidie von Zellen vorgebeugt. Über eine Mad2A-Überexpression wurde bei verschiedenen Tumoren berichtet (Alizadeh et al., 2000, Rizzardi et al., 2014, Genga et al., 2015, Li et al., 2017, Wang et al., 2018) und es wird diskutiert, dass sie einen Einfluss auf Malignome haben könnte (Sotillo et al., 2007, Sotillo et al., 2010). So korrelierte eine höhere Mad2A-Expression mit einem höheren Tumorgrad in kolorektalen, hepatozellulären, Lungenadeno-, Ovarial-, Zervix- und squamösen Karzinomen des Mundbereiches (Choi et al., 2013, Park et al., 2013, Kim et al., 2014, Rizzardi et al., 2014, Shi et al., 2016, Li et al., 2017, Shi et al., 2018), aber nicht in pleuralen Mesotheliomen (Suraokar et al., 2014). Im transgenen Tiermodell konnte durch Mad2A-Überexpression das Auftreten von HCC, Lungenadenomen, Fibrosarkomen und Lymphomen beobachtet werden (Sotillo et al., 2007). Eine direkte Rolle für Mad2A bzw. seine Überexpression in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum wurde bislang nicht angenommen (Sotillo et al., 2007, Sotillo et al., 2010), in neueren Studien wird Mad2A jedoch immer häufiger in Zusammenhang mit der Onkogenese gesetzt (Peng et al., 2017, Fukuhisa et al., 2019).

Obwohl sich die mittlere Gesamtexpression von Mad2A zwischen Normalhirn, LGA °II und GBM nicht unterschied, gab es eine deutlich zunehmende Variabilität der Mad2A-mRNA-Expression im Tumor (Tannous et al., 2013). Ein signifikanter Anstieg der Expression von Gliomen gegenüber Normalhirn wurde in einer Proteinanalyse des *REMBRANDT* Datenportal des *National Cancer Institute* ermittelt (Wu et al., 2018a). Das Protein wird nach dem Proteinatlas nicht von Normalhirn-Gliazellen exprimiert, konnte aber in einigen Gliomen - mit einem

Anteil positiver Zellen unter 25% - membranös-zytoplasmatisch mittels IHC nachgewiesen werden (Proteinatlas, 16.08.2016^e, 16.08.2016^f). In den Proliferationszentren des Gliompanels wurde dagegen eine hohe nukleäre Gesamtexpression in mindestens $\bar{x} = 94\%$ der Tumorzellkerne je nach Entität und WHO-Grad detektiert. Eine Korrelation zwischen dem Proliferationsmarker Ki67 und Mad2A konnte jedoch nicht gefunden werden, so dass die Mad2A-Expression in Gliomen in keinem Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferation zu stehen scheint. Dies ist in Übereinstimmung mit Studien an *mouse embryonic fibroblasts* (MEF)-Zellen und Thymusgewebe (Hernando et al., 2004, Schwartzman et al., 2011). Mögliche Effekte einer Mad2A-Überexpression auf die Proliferation werden jedoch unterschiedlich diskutiert (Sotillo et al., 2007, Bargiela-Iparraguirre et al., 2014), zumal sich für squamöse Karzinome des Mundbereichs durchaus eine positive Korrelation mit Ki67 ergab (Rizzardi et al., 2014). Die Herunterregulation von Mad2A konnte in der hepatozellulären Karzinomzelllinie HCCLM3 Proliferation, Migration und Invasion unterdrücken (Li et al., 2017). In einer Funktionsblockade von Mad2A mittels *small hairpin RNA* (shRNA) in den Gliomzelllinien U87 und U251 wurde ebenso eine herabgesetzte Proliferation und klonales Wachstum beobachtet (Wu et al., 2018a).

Zwischen den analysierten Tumorentitäten gab es keinen statistischen Unterschied in den Mann-Whitney-U und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests, mit Ausnahme einer signifikant, verringerten starken Expression in GBM im Vergleich zu LGA °II, was aber nicht bedeutet, dass Mad2A einen Einfluss auf die Progression astrozytärer Tumoren hat, wie es auf Proteinebene für gastrische und auf Genebene u.a. für kleinzellige Lungen- oder kolorektale Karzinome vermutet wird (Bargiela-Iparraguirre et al., 2014, Yan et al., 2016, Ni et al., 2018). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Mad2A-Expression zwischen LGA °II und den daraus entstandenen sekundären GBM. Die beobachtete Herunterregulation bei GBM könnte auf einem Verlust von Chromosom 4q beruhen, der hier häufig auftritt und auf dem das Gen von Mad2A lokalisiert ist (Shapiro, 2002) (NCBI Gene, 30.06.2016). Patientinnen mit Ovarialkarzinomen unterschiedlichen histologischem Subtyps, die niedrige Mad2A-Konzentrationen

exprimierten, wiesen ein kürzeres rezidiv- und progressionsfreies Überleben auf als jene mit hoher Mad2A-Expression (Furlong et al., 2012, Park et al., 2013, McGrogan et al., 2014, Byrne et al., 2017). Ein verbessertes krankheitsspezifisches Überleben von der Diagnosestellung bis zum Tod wurde andererseits für hochgradig seröse tubo-ovarielle Karzinome bei einer niedrigen Expression ermittelt (Byrne et al., 2018). In den meisten anderen bislang untersuchten Tumoren war allerdings eine Mad2A-Überexpression mit einer ungünstigen Prognose und einer Neigung zur Metastasierung assoziiert (Tanaka et al., 2001b, van 't Veer et al., 2002, Li et al., 2003, Hernando et al., 2004, Yu et al., 2010, Schwartzman et al., 2011, Choi et al., 2013, Suraokar et al., 2014, Genga et al., 2015, Li et al., 2017). So stellte es sich auch für die hier analysierten GBM heraus. Die Kurven der Kaplan-Meier-Analysen liefen deutlich auseinander und Patienten mit niedriger Mad2A-Expression wiesen einen medianen Überlebensvorteil von 10 Monaten auf. Möglicherweise könnte Mad2A daher als Biomarker oder Bestandteil eines Scoring-Systems für die Prognose werden, wie es auch für NSCLC vorgeschlagen wurde (Gentles et al., 2015, Shi et al., 2016). Die Mad2A-Expression wird durch die E2F-Transkriptionsfaktoren kontrolliert (Hernando et al., 2004), die wiederum unter der Kontrolle von Tumorsuppressoren wie TP53 und Rb stehen (Schwartzman et al., 2011). In Gliomen sind diese Tumorsuppressoren häufig mutiert, wodurch es zu einer Überexpression von Mad2A kommen kann (Shapiro, 2002, Hernando et al., 2004, McLendon et al., 2008, Schwartzman et al., 2011, Ohgaki et al., 2013). Außerdem ist bekannt, dass ein Anstieg der Mad2A-Expression durch Homozygotie der Allele (Schwartzman et al., 2011), aber auch durch *high mobility group A1* (HMGA1)-Proteine, die nach Überexpression am Tumorprogress beteiligt sein können, bedingt sein kann (Pierantoni et al., 2015). Solche Veränderungen könnten auch die Expressionsstärkenunterschiede im Panel beeinflusst haben.

Interessant ist, dass die Mad2A-Expression über die Phosphatase 2A (PP2A) mit Pds5A verbunden zu sein scheint. So konnte eine PP2A-Expressionssteigerung durch einen Pds5A-KD hervorgerufen werden (Capalbo et al., 2012), wohingegen eine Inhibition oder ein KD von PP2A eine Verringerung der

Mad2A-Expression bewirkten (Bian et al., 2014). Während sich bei *Schizosaccharomyces pombe* keine Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen Mad2 und Pds5⁺ ergaben (Wang et al., 2002), führte in *Saccharomyces cerevisiae* das Fehlen von Pds5-1 zu einem 11-fachen Anstieg der Mad2-Expression (Ren et al., 2008). Diese Daten wurden für Säugerzellen durch die direkte Interaktion von Mad2A mit Pds5A in einem *Hefe-Two-Hybrid*-Test (unpublizierte Vorarbeiten) und auch durch die positiven Korrelationsanalysen der Expressionsdaten des hier untersuchten Patientenpanels gestützt. Auch mit Pds5B ergaben sich positive Korrelationen. Mad2A und Pds5B spielen beide eine Rolle in der Mikrotubuli-Anbindung (Kabeche et al., 2012, Carretero et al., 2013, Krenn et al., 2015), so dass die Korrelationen hier einen funktionellen Zusammenhang andeuten könnten.

Es ist bekannt, dass eine Mad2A-Überexpression einerseits zu einem überaktiven Spindelkontrollpunkt führen kann, bei dem es trotz normaler Mitosespindel zu einem Arrest am Metaphase-Anaphase-Übergang durch einen blockierten APC/C kommt (He et al., 1997, Hernando et al., 2004). Im Verlauf führt dies trotz fortbestehender Schwesterchromatidkohäsion zu einem Mitoseausgang, welcher mit Chromosomenbrüchen, Anaphasebrücken, Fehlsegregationen, Deletionen, Amplifikationen und Aneuploidie einhergehen kann (Hernando et al., 2004, Sotillo et al., 2007). Andererseits kommt es zu einem Ausfall der Kinase Aurora B und ihrer Funktion, die dann eine fehlerhafte Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftung nicht mehr reparieren kann, was ebenfalls eine Fehlsegregation bewirkt. Die Folge sind CIN und Aneuploidie (Hernando et al., 2004, Sotillo et al., 2007, Alberts et al., 2011, Kabeche et al., 2012). Diese Mechanismen könnten eine Erklärung für die auch bei der Entstehung von Gliomen auftretende CIN und Aneuploidie sein. Des Weiteren scheint Mad2A zusammen mit anderen Onkogenen die Aggressivität von Tumoren und deren Neigung zur Rezidivbildung zu steigern. In transgenen Mausmodellen führte eine Überexpression von Mad2A in Verbindung mit dem Onkogen *Myc* zu einer Beschleunigung der Lymphombildung bzw. der Ausbildung eines aggressiven Tumors, und zusammen mit dem Onkogen *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (KRAS) kam es zu einer verstärkten

Rezidivbildung von Lungentumoren (Sotillo et al., 2007, Sotillo et al., 2010). Aber auch bei Doppelmутanten mit Deletion von Mad2A und dem für TP53 kodierenden Gen *transformation related protein 53* (Trp53) konnte in Zell- und Mausmodellen akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe (T-ALL) sowie HCC mit schnellerem Progress, erhöhter Letalität und rapidem Wachstum beobachtet werden (Foiyer et al., 2017). Erste therapeutische Ansätze finden sich bereits in der Forschung. In Mad2A^{+/-} Mäusen führte eine Normalisierung der Mad2A-Expression durch eine TP53-Mutante zu einer signifikant reduzierten Zahl an aneuploiden Tumorzellen (Schvartzman et al., 2011). Gegen Mad2A gerichtete siRNA's in EGFR-Chitosan Nanopartikeln ließen Lungenadenokarzinomzellen absterben (Nascimento et al., 2014) und konnten zusammen mit enthaltenem Cisplatin die Resistenz von NSCLC überwinden, das Tumorstadium hemmen sowie in dosisreduzierter Anwendung von Cisplatin Nebenwirkungen reduzieren (Nascimento et al., 2017). Das Unterbinden der Interaktion von Mad2A mit *HLA-F-adjacent transcript 10* (FAT10), das in Tumoren überexprimiert wird, verringerte den Tumorprogress (Theng et al., 2014). Eine Inhibierung der PP2A durch Cantharidin verhinderte eine Dephosphorylierung von Mad2A, wodurch HeLa- und OS-17-Zellen einer Osteosarkom-Zelllinie apoptotisch wurden (Peters et al., 2012, Bian et al., 2014) und Withaferin A, welches in der ayurvedischen Medizin angewendet und antikanzerogene Effekte zu haben scheint, führte Mad2A dem proteasomalen Abbau zu, wodurch die kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 und SW480 in die Apoptose gingen (Das et al., 2014). Allerdings ist zu beachten, dass die Herunterregulation der Mad2A-Expression durch eine alternativ-gespaltene Isoform von Mad2A, Mad2β, in gastrischen Karzinomen bzw. der Zelllinie MKN45 das Ansprechen auf Paclitaxel reduzierte (Bargiela-Iparraguirre et al., 2014) und zu einer Multidrug-Resistenz beitragen könnte (Nelson et al., 1999, Yin et al., 2004, Yin et al., 2006). Auch der Verlust des Mad2A-Proteins mündete in einer erhöhten Resistenz gegenüber Paclitaxel in epithelialen Ovarialkarzinomen (Furlong et al., 2012), demgegenüber steigerte eine geringe Expression von Mad2A die Chemosensitivität (Byrne et al., 2018). In Zelllinien nasopharyngealer Karzinome als auch testikulärer Keimzelltumore war eine erniedrigte

Mad2A-Expression mit einer zellulären Resistenz gegenüber Cisplatin verbunden, demgegenüber eine erhöhte Sensitivität bei ektopter Mad2A-Überexpression stand (Cheung et al., 2005, Fung et al., 2006). In U87 und U251-Gliomzelllinien beobachtete man durch Depletion von Mad2A einerseits eine Migrations- und Invasionshemmung, andererseits jedoch auch eine verminderte Sensitivität gegenüber Mitosehemmstoffen wie Paclitaxel und Vinblastin (Wu et al., 2018a). Ob diese Mechanismen auch bei Gliomen bzw. Gliompatienten wirken, das müssen zukünftige Forschungen zeigen. Eine Normalisierung der Mad2A-Expression könnte aber durchaus auch bei Gliomen von therapeutischer Relevanz sein.

4.4 Mad2B

Auch Mad2B ist wie sein Homolog Mad2A in die Regulation der Mitosephase involviert, spielt allerdings eher eine Rolle bei dem Mitoseausgang und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels NHEJ und HR (Chen et al., 2001, Cheung et al., 2006, Boersma et al., 2015, Gupta et al., 2018). Eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine ist bekannt (Murakumo et al., 2000). Daher war es auch nicht überraschend im vorliegenden Panel Expressionskorrelationen aufzufinden. Auch zeigten sich Korrelationen zu den Cohesinregulatoren Pds5A und Pds5B, was auf eine gemeinsame Funktion hindeuten könnte.

In einigen Tumoren ist Mad2B im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert (Friederichs et al., 2005, Yuan et al., 2006, Rimkus et al., 2007, Zhao et al., 2011, Niimi et al., 2014, Zhao et al., 2014, Diniz et al., 2015, Chen et al., 2018, Li et al., 2018b, Gu et al., 2019). In Gliazellen von Normalhirngewebe und in Gliomen wird Mad2B allerdings schwach und nur mit einem Anteil zwischen 25-75% exprimiert (Proteinatlas, 16.08.2016^g, 16.08.2016^h). Zhao et al. konnte in ca. 40% der mittels RT-PCR und IHC-analysierten Gliomproben eine Mad2B-Überexpression zeigen (Zhao et al., 2011). Diese Daten wurden in der hier vorgestellten Analyse bestätigt. 97,5% der Proben (39 von 40) waren positiv für Mad2A, wobei 14 Proben mehr als 75% positiv-gefärbte Zellen aufwiesen. Dabei hatten die GBM im Vergleich zu den LGA °II eine signifikant stärkere Gesamtexpression.

Diese erhöhte Expression könnte durch einen Zugewinn von Chromosom 1p zustande kommen, auf dem das Mad2B-Gen lokalisiert ist, und welches eine Veränderung darstellt, die bei GBM sehr häufig auftritt (Shapiro, 2002) (NCBI Gene, 01.07.2016).

Eine mit dem Tumorgrad ansteigende Mad2B-Expression wurde zwar für Kolon-, Endometrium- und klarzellige Ovarialkarzinome beschrieben und wirkte sich bei diesen Tumoren negativ auf die Prognose aus (Rimkus et al., 2007, Niimi et al., 2014, Zhao et al., 2014), ein derartiger Einfluss auf das Überleben wurde aber bislang für Gliome nicht gezeigt (Zhao et al., 2011). Auch in dem hier untersuchten Panel wirkte sich die generelle Mad2B-Expression nicht signifikant auf das Überleben von GBM-Patienten aus. Allerdings waren Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des Proteins auffällig. Eine nukleäre Mad2B-Expression wurde bereits für Gliome, ösophageale Karzinome und auch nasopharyngeale Zellen beschrieben (Cheung et al., 2006, Zhao et al., 2011, Gu et al., 2019). Diese konnte hier für einen geringen prozentualen Anteil der Zellen bestätigt werden. Die weitaus größere Gruppe stellten aber Tumorzellen mit ausschließlicher Zytoplasmafärbung dar, was zuvor nicht beobachtet bzw. von der Forschungsliteratur beschrieben wurde (Zhao et al., 2011). Der Proteinatlas gibt jedoch an, dass das Zytoplasma die Hauptlokalisierung von Mad2B und auch eine membranös-zytoplasmatische Expression in Gliomen nachweisbar sei (Proteinatlas, 16.08.2016^g, 16.08.2016^h). Auffällig war nun, dass jene Patienten mit einer hohen Mad2B-Expression in Zellkernen und Zytoplasma eine im Median um 8 Monate signifikant verkürzte Überlebenszeit aufwiesen. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von Mad2B für die Malignität des Tumors hin, auch wenn keine Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen analysierten Subgruppen festgestellt werden konnten.

Verschiedene Proteine regulieren den Kern- und Zytoplasmatransport von Mad2B. Zum einem ist die GTPase *Ras-related nuclear protein* (RAN) daran beteiligt, zum anderen interagiert Mad2B mit dem N-terminalen Ende des *papillary renal cell carcinoma* (PRCC) Proteins, wodurch der Übertritt von Mad2B aus dem Zytoplasma in den Zellkern bewirkt wird. Unterbleibt dieser Transport durch eine Mutation, kommt es zu Defekten im SAC, was zur Tumorgenese

beiträgt (Weterman et al., 2001, Medendorp et al., 2009). Mad2B wird daher eine regulierende Schlüsselrolle bei der Reparatur von DNA-Schäden in Krebszellen zugesprochen, die über eine Inaktivierung therapeutisch nutzbar gemacht werden könnte (Cheung et al., 2006, Niimi et al., 2014). Die Depletion von Mad2B in HCT116-Kolonkarzinomzellen steigerte die UV-Empfindlichkeit der Zellen (Bhat et al., 2017). Eine Mad2B-Überexpression bewirkte hingegen in den Zelllinien Eca-109 und TE-1 ösophagealer, squamöser Karzinome eine Resistenz der Zellen gegenüber Bestrahlung und schien den oxidativen Stress nach Radiatio zu reduzieren (Gu et al., 2019). Eine Suppression der Mad2B-Expression in nasopharyngealen Karzinomzellen bzw. eine Mad2B(-/-)-Mutante in Hühner-B-Lymphozyten erhöhte z.B. deren Sensitivität für DNA-schädigende Agenzien, wie Alkylanzien (Melphalan, Chlorethamin, Methyl-Methansulfonate), Platinderivaten (Cisplatin), Mitomycin C oder auch Gammabestrahlung (Okada et al., 2005, Cheung et al., 2006). Außerdem reduzierte sich in Versuchen mit ovariellen, ösophagealen und nasopharyngealen Karzinomzelllinien die Kolonienbildung, die Proliferations- bzw. Mutationsrate, und DNA-geschädigte sowie apoptische Zellen stiegen in ihrer Anzahl an. Das Tumolvolumen verkleinerte sich in den entsprechenden Xenograft-Nacktmausmodellen (Cheung et al., 2006, Niimi et al., 2014, Gu et al., 2019). Die Bedeutung von Mad2B für die Proliferation von astrozytären Tumoren wird auch durch die positiven Korrelationen zu dem Proliferationsmarker Ki67 unterstrichen. Auch für GBM-Zellen könnten diese Befunde von Relevanz sein, da ein Mad2B-KD in U251-GBM-Zellen eine Sensibilisierung gegenüber Radiatio und eine Steigerung der Apoptoserate hervorruft (Zhao et al., 2011). Allerdings gilt zu beachten, dass in neueren Studien Mad2B den Abbau von *nuclear receptor coactivator 3* (NCOA3) induziert, welcher in verschiedenen Karzinomen erhöht mit Tumorentstehung, einer schlechteren Prognose und Metastasierung verbunden ist. Mad2B wird daher als Tumorsuppressor in kolorektalen Karzinomen betrachtet und eine Überexpression scheint die Prognose zu verbessern (Li et al., 2018b). Es wurde auch beobachtet, dass in *breast cancer 1* (BRCA1)-defizienten Zellen eine zusätzliche Depletion des Shieldin-Bestandteils Mad2B zu einer Resistenz gegenüber PARP-Inhibitoren

beitrug (Gupta et al., 2018, Leland et al., 2018). Mad2B und die Regulation seiner Expression könnte somit ein weiteres vielversprechendes therapeutisches Ziel auch für Gliome sein.

4.5 Fazit

Die vorliegenden Daten des Patientenpanels zeigen eine hohe Expression der mitotischen Regulatorproteine Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B in verschiedenen Entitäten astrozytärer Tumoren.

Astrozytäre Tumoren sind durch CIN und Aneuploidien gekennzeichnet. Der Einfluss oben genannter Proteine auf die korrekte Verteilung der Chromosomen während der Mitose ist ausreichend belegt. Hinweise auf Fehlsegregationen durch die Überexpression der untersuchten Proteine finden sich in der Literatur. Studienergebnisse liefern außerdem Hinweise, dass die Beeinflussung der Expression dieser mitotischen Regulatorproteine neue Optionen in der Therapie von Karzinompatienten ermöglichen könnte. Dies wird durch die hier vorgestellten Daten weiter unterstützt, so dass die Proteine Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B mögliche neue Angriffspunkte in der Behandlung von astrozytären Tumoren darstellen, die es weiterzuverfolgen gilt.

5 Zusammenfassung

Die zunehmende Bedeutung der Molekularbiologie zeigt sich in der neuen WHO-Klassifikation von 2016 für ZNS-Tumoren und insbesondere astrozytäre Tumoren. Dabei gehört das Glioblastoma multiforme (GBM) mit einer äußerst ungünstigen Prognose zu den hoch-malignen Astrozytomen (WHO °IV) und ist durch eine ausgeprägte chromosomale Instabilität (CIN) gekennzeichnet. Der mitotische Spindelkontrollpunkt (SAC) und die zeitlich korrekte Auflösung der Schwesterchromatidkohäsion sorgen normalerweise für den fehlerfreien Ablauf der Mitose. Um der Ursache der CIN nachzugehen, wurden die Regulatorproteine des SAC Mad2A und Mad2B sowie der Schwesterchromatidkohäsion Pds5A und Pds5B in einem Patientenpanel immunhistochemisch untersucht. Alle vier Proteine wiesen eine hohe Expression in Proliferationszentren auf, die durch Ki67-Expression definiert wurden. Zusätzlich wurden Unterschiede in der Expressionsstärke bzw. der subzellulären Lokalisation detektiert. Pds5A könnte für die Ausbildung von Rezidiven niedriggradiger Astrozytome (*low-grade astrozytoma*, LGA) °II bzw. von sekundären GBM wichtig sein. Sein Ortholog war in allen Tumorentitäten gleichmäßig hoch exprimiert. Eine starke Mad2A-Expression war in allen GBM im Vergleich zu allen LGA °II signifikant vermindert und könnte durch den in GBM häufig vorkommenden Verlust von Chromosomenarm 4q bedingt sein, der das Mad2A-Gen enthält. Für sein Homolog Mad2B konnte ein signifikanter Anstieg in der Gesamt- bzw. Zytoplasmaexpression mit steigendem WHO-Grad ermittelt werden. Eine niedrige Gesamtexpression von Mad2A bzw. von Mad2B in Kern- und Zytoplasma könnte mit einem Überlebensvorteil für GBM-Patienten verbunden sein. Je nach Entität, Expressionsstärke und Expressionslokalisation gab es Korrelationen zwischen der Expression von Ki67, Pds5A, Pds5B, Mad2A und Mad2B.

Die Expressionswerte dieser mitotischen Regulatorproteine könnten einerseits der Grund für, andererseits aber auch eine Konsequenz von CIN sein und eine Anpassung der Tumorzellen zur Ausbalancierung der Vor- und Nachteile genetischer Veränderungen darstellen, die ihr Überleben sichert (Rimkus et al., 2007).

Damit könnten diese Regulatorproteine als neue Angriffspunkte einer noch spezifischeren Therapie in der Behandlung von astrozytären Tumoren und für die Prognose von Patienten Bedeutung erlangen.

6 Literaturverzeichnis

Aguilar, C., Davidson, C., Dix, M., Stead, K., Zheng, K., Hartman, T., Guacci, V. (2005). "Topoisomerase II suppresses the temperature sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* pds5 mutants, but not the defect in sister chromatid cohesion." *Cell Cycle* 4(9): 1294-1304.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2011). "Molekularbiologie der Zelle ". 5. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, S. 1191-1260.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., Staudt, L. M. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* 403(6769): 503-511.

Appin, C. L., Brat, D. J. (2014). "Molecular genetics of gliomas." *Cancer J* 20(1): 66-72.

Arribas, R., Ribas, M., Risques, R. A., Masramon, L., Tortola, S., Marcuello, E., Aiza, G., Miro, R., Capella, G., Peinado, M. A. (1999). "Prospective assessment of allelic losses at 4p14-16 in colorectal cancer: two mutational patterns and a locus associated with poorer survival." *Clin Cancer Res* 5(11): 3454-3459.

Arslantas, A., Artan, S., Oner, U., Muslumanoğlu, M. H., Ozdemir, M., Durmaz, R., Arslantas, D., Vural, M., Cosan, E., Atasoy, M. A. (2007). "Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas." *Pathol Oncol Res* 13(1): 39-46.

Bailey, M. L., O'Neil, N. J., van Pel, D. M., Solomon, D. A., Waldman, T., Hieter, P. (2014). "Glioblastoma cells containing mutations in the cohesin component STAG2 are sensitive to PARP inhibition." *Mol Cancer Ther* 13(3): 724-732.

Bargiela-Iparraguirre, J., Prado-Marchal, L., Pajuelo-Lozano, N., Jimenez, B., Perona, R., Sanchez-Perez, I. (2014). "Mad2 and BubR1 modulates tumorigenesis and paclitaxel response in MKN45 gastric cancer cells." *Cell Cycle* 13(22): 3590-3601.

Beckmann, M. W., Picard, F., An, H. X., van Roeyen, C. R., Dominik, S. I., Mosny, D. S., Schnurch, H. G., Bender, H. G., Niederacher, D. (1996). "Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer." *Br J Cancer* 73(10): 1220-1226.

Bharadwaj, R., Yu, H. (2004). "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer." *Oncogene* 23(11): 2016-2027.

- Bhat, A., Qin, Z., Wang, G., Chen, W., Xiao, W. (2017). "Rev7, the regulatory subunit of Polzeta, undergoes UV-induced and Cul4-dependent degradation." *Febs j* 284(12): 1790-1803.
- Bian, Y., Kitagawa, R., Bansal, P. K., Fujii, Y., Stepanov, A., Kitagawa, K. (2014). "Synthetic genetic array screen identifies PP2A as a therapeutic target in Mad2-overexpressing tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(4): 1628-1633.
- Blighe, K., Kenny, L., Patel, N., Guttery, D. S., Page, K., Gronau, J. H., Golshani, C., Stebbing, J., Coombes, R. C., Shaw, J. A. (2014). "Whole genome sequence analysis suggests intratumoral heterogeneity in dissemination of breast cancer to lymph nodes." *PLoS One* 9(12): e115346.
- Boersma, V., Moatti, N., Segura-Bayona, S., Peuscher, M. H., van der Torre, J., Wevers, B. A., Orthwein, A., Durocher, D., Jacobs, J. J. L. (2015). "MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection." *Nature* 521(7553): 537-540.
- Borges, D. P., Dos Santos, A. W. A., Paier, C. R. K., Ribeiro, H. L. J., Costa, M. B., Farias, I. R., de Oliveira, R. T. G., Franca, I., Cavalcante, G. M., Magalhaes, S. M. M., Pinheiro, R. F. (2018). "Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome." *Leuk Res* 64: 61-70.
- Brough, R., Bajrami, I., Vatcheva, R., Natrajan, R., Reis-Filho, J. S., Lord, C. J., Ashworth, A. (2012). "APRIN is a cell cycle specific BRCA2-interacting protein required for genome integrity and a predictor of outcome after chemotherapy in breast cancer." *Embo j* 31(5): 1160-1176.
- Buoli Comani, G., Panceri, R., Dinelli, M., Biondi, A., Mancuso, C., Meneveri, R., Barisani, D. (2015). "miRNA-regulated gene expression differs in celiac disease patients according to the age of presentation." *Genes Nutr* 10(5): 482.
- Bussey, K. J., Lawce, H. J., Himoe, E., Shu, X. O., Suijkerbuijk, R. F., Olson, S. B., Magenis, R. E. (2001). "Chromosomes 1 and 12 abnormalities in pediatric germ cell tumors by interphase fluorescence in situ hybridization." *Cancer Genet Cytogenet* 125(2): 112-118.
- Byrne, T., Coleman, H. G., Cooper, J. A., McCluggage, W. G., McCann, A., Furlong, F. (2017). "The association between MAD2 and prognosis in cancer: a systematic review and meta-analyses." *Oncotarget* 8(60): 102223-102234.
- Byrne, T., Nelson, L., Beirne, J. P., Sharpe, D., Quinn, J. E., McCluggage, W. G., Robson, T., Furlong, F. (2018). "BRCA1 and MAD2 Are Coexpressed and Are Prognostic Indicators in Tubo-ovarian High-Grade Serous Carcinoma." *Int J Gynecol Cancer* 28(3): 472-478.

- Capalbo, G., Muller-Kuller, T., Ottmann, O. G., Hoelzer, D., Scheuring, U. J. (2012). "HIV-1 infection suppresses expression of host cell cycle-associated gene PDS5A." *Intervirology* 55(4): 263-275.
- Carretero, M., Ruiz-Torres, M., Rodriguez-Corsino, M., Barthelemy, I., Losada, A. (2013). "Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres." *EMBO J* 32(22): 2938-2949.
- Chan, K. L., Gligoris, T., Upcher, W., Kato, Y., Shirahige, K., Nasmyth, K., Beckouet, F. (2013). "Pds5 promotes and protects cohesin acetylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(32): 13020-13025.
- Chen, F., Shen, C., Wang, X., Wang, H., Liu, Y., Yu, C., Lv, J., He, J., Wen, Z. (2017). "Identification of genes and pathways in nasopharyngeal carcinoma by bioinformatics analysis." *Oncotarget* 8(38): 63738-63749.
- Chen, J., Fang, G. (2001). "MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex." *Genes Dev* 15(14): 1765-1770.
- Chen, W., Cui, Y., Wang, J., Yuan, Y., Sun, X., Zhang, L., Shen, S., Cheng, J. (2018). "Effects of downregulated expression of microRNA-187 in gastric cancer." *Exp Ther Med* 16(2): 1061-1070.
- Chen, Z., Chen, J., Huang, X., Wu, Y., Huang, K., Xu, W., Xie, L., Zhang, X., Liu, H. (2019). "Identification of Potential Key Genes for Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma by Bioinformatics Analysis." *J Comput Biol*.
- Cheung, H. W., Chun, A. C., Wang, Q., Deng, W., Hu, L., Guan, X. Y., Nicholls, J. M., Ling, M. T., Chuan Wong, Y., Tsao, S. W., Jin, D. Y., Wang, X. (2006). "Inactivation of human MAD2B in nasopharyngeal carcinoma cells leads to chemosensitization to DNA-damaging agents." *Cancer Res* 66(8): 4357-4367.
- Cheung, H. W., Jin, D. Y., Ling, M. T., Wong, Y. C., Wang, Q., Tsao, S. W., Wang, X. (2005). "Mitotic arrest deficient 2 expression induces chemosensitization to a DNA-damaging agent, cisplatin, in nasopharyngeal carcinoma cells." *Cancer Res* 65(4): 1450-1458.
- Choi, E., Yu, H. (2015). "Phosphorylation propels p31(comet) for mitotic exit." *Cell Cycle* 14(13): 1997-1998.
- Choi, J. W., Kim, Y., Lee, J. H., Kim, Y. S. (2013). "High expression of spindle assembly checkpoint proteins CDC20 and MAD2 is associated with poor prognosis in urothelial bladder cancer." *Virchows Arch* 463(5): 681-687.
- Chung, E., Chen, R. H. (2002). "Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2." *Mol Biol Cell* 13(5): 1501-1511.

- Churpek, J. E., Pyrtel, K., Kanchi, K. L., Shao, J., Koboldt, D., Miller, C. A., Shen, D., Fulton, R., O'Laughlin, M., Fronick, C., Pusic, I., Uy, G. L., Braunstein, E. M., Levis, M., Ross, J., Elliott, K., Heath, S., Jiang, A., Westervelt, P., DiPersio, J. F., Link, D. C., Walter, M. J., Welch, J., Wilson, R., Ley, T. J., Godley, L. A., Graubert, T. A. (2015). "Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia." *Blood* 126(22): 2484-2490.
- Couturier, A. M., Fleury, H., Patenaude, A. M., Bentley, V. L., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Niraj, J., Pauty, J., Berman, J. N., Dellaire, G., Di Noia, J. M., Mes-Masson, A. M., Masson, J. Y. (2016). "Roles for APRIN (PDS5B) in homologous recombination and in ovarian cancer prediction." *Nucleic Acids Res* 44(22): 10879-10897.
- D'Ambrosio, L. M., Lavoie, B. D. (2014). "Pds5 prevents the PolySUMO-dependent separation of sister chromatids." *Curr Biol* 24(4): 361-371.
- Das, T., Roy, K. S., Chakrabarti, T., Mukhopadhyay, S., Roychoudhury, S. (2014). "Withaferin A modulates the Spindle assembly checkpoint by degradation of Mad2-Cdc20 complex in colorectal cancer cell lines." *Biochem Pharmacol* 91(1): 31-39.
- De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D., Musacchio, A. (2005). "The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint." *Curr Biol* 15(3): 214-225.
- Denes, V., Pilichowska, M., Makarovskiy, A., Carpinito, G., Geck, P. (2010). "Loss of a cohesin-linked suppressor APRIN (Pds5b) disrupts stem cell programs in embryonal carcinoma: an emerging cohesin role in tumor suppression." *Oncogene* 29(23): 3446-3452.
- Ding, Z. H., Qi, J., Shang, A. Q., Zhang, Y. J., Wei, J., Hu, L. Q., Wang, W. W., Yang, M. (2017). "Docking of CDK1 with antibiotic drugs revealed novel therapeutic value in breast ductal cancer in situ." *Oncotarget* 8(37): 61998-62010.
- Diniz, M. G., Silva Jde, F., de Souza, F. T., Pereira, N. B., Gomes, C. C., Gomez, R. S. (2015). "Association between cell cycle gene transcription and tumor size in oral squamous cell carcinoma." *Tumour Biol* 36(12): 9717-9722.
- Edwards, S. M., Dunsmuir, W. D., Gillett, C. E., Lakhani, S. R., Corbishley, C., Young, M., Kirby, R. S., Dearnaley, D. P., Dowe, A., Ardern-Jones, A., Kelly, J., Spurr, N., Barnes, D. M., Eeles, R. A. (1998). "Immunohistochemical expression of BRCA2 protein and allelic loss at the BRCA2 locus in prostate cancer. CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators." *Int J Cancer* 78(1): 1-7.

Faisal, I., Kauppi, L. (2017). "Reduced MAD2 levels dampen the apoptotic response to non-exchange sex chromosomes and lead to sperm aneuploidy." *Development* 144(11): 1988-1996.

Fan, G., Tu, Y., Chen, C., Sun, H., Wan, C., Cai, X. (2018). "DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma." *Cancer Cell Int* 18: 140.

Feng, B. J., Huang, W., Shugart, Y. Y., Lee, M. K., Zhang, F., Xia, J. C., Wang, H. Y., Huang, T. B., Jian, S. W., Huang, P., Feng, Q. S., Huang, L. X., Yu, X. J., Li, D., Chen, L. Z., Jia, W. H., Fang, Y., Huang, H. M., Zhu, J. L., Liu, X. M., Zhao, Y., Liu, W. Q., Deng, M. Q., Hu, W. H., Wu, S. X., Mo, H. Y., Hong, M. F., King, M. C., Chen, Z., Zeng, Y. X. (2002). "Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4." *Nat Genet* 31(4): 395-399.

Foijer, F., Albacker, L. A., Bakker, B., Spierings, D. C., Yue, Y., Xie, S. Z., Davis, S., Lutum-Jehle, A., Takemoto, D., Hare, B., Furey, B., Bronson, R. T., Lansdorp, P. M., Bradley, A., Sorger, P. K. (2017). "Deletion of the MAD2L1 spindle assembly checkpoint gene is tolerated in mouse models of acute T-cell lymphoma and hepatocellular carcinoma." *Elife* 6.

Franca, J. A., Diniz, M. G., Bernardes, V. F., Costa-Silva, R. C., Souza, R. P., Gomez, R. S., Gomes, C. C. (2017). "Cohesin subunits, STAG1 and STAG2, and cohesin regulatory factor, PDS5b, in oral squamous cells carcinomas." *J Oral Pathol Med* 46(3): 188-193.

Friederichs, J., Rosenberg, R., Mages, J., Janssen, K. P., Maeckl, C., Nekarda, H., Holzmann, B., Siewert, J. R. (2005). "Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression." *Int J Colorectal Dis* 20(5): 391-402.

Fukuda, T., Hoog, C. (2010). "The Mouse Cohesin-Associated Protein PDS5B Is Expressed in Testicular Cells and Is Associated with the Meiotic Chromosome Axes." *Genes (Basel)* 1(3): 484-494.

Fukuhisa, H., Seki, N., Idichi, T., Kurahara, H., Yamada, Y., Toda, H., Kita, Y., Kawasaki, Y., Tanoue, K., Mataka, Y., Maemura, K., Natsugoe, S. (2019). "Gene regulation by antitumor miR-130b-5p in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical significance of oncogenic EPS8." *J Hum Genet*.

Fung, M. K., Cheung, H. W., Ling, M. T., Cheung, A. L., Wong, Y. C., Wang, X. (2006). "Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells." *Br J Cancer* 95(4): 475-484.

Furlong, F., Fitzpatrick, P., O'Toole, S., Phelan, S., McGrogan, B., Maguire, A., O'Grady, A., Gallagher, M., Prencipe, M., McGoldrick, A., McGettigan, P., Brennan, D., Sheils, O., Martin, C., E, W. K., O'Leary, J., McCann, A. (2012). "Low MAD2 expression levels associate with reduced progression-free survival

in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer." *J Pathol* 226(5): 746-755.

Furney, S. J., Simmons, A., Breen, G., Pedroso, I., Lunnon, K., Proitsi, P., Hodges, A., Powell, J., Wahlund, L. O., Kloszewska, I., Mecocci, P., Soininen, H., Tsolaki, M., Vellas, B., Spenger, C., Lathrop, M., Shen, L., Kim, S., Saykin, A. J., Weiner, M. W., Lovestone, S. (2011). "Genome-wide association with MRI atrophy measures as a quantitative trait locus for Alzheimer's disease." *Mol Psychiatry* 16(11): 1130-1138.

Gandhi, R., Gillespie, P. J., Hirano, T. (2006). "Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase." *Curr Biol* 16(24): 2406-2417.

Ge, Y., He, Z., Xiang, Y., Wang, D., Yang, Y., Qiu, J., Zhou, Y. (2019). "The identification of key genes in nasopharyngeal carcinoma by bioinformatics analysis of high-throughput data." *Mol Biol Rep*.

Geck, P., Maffini, M. V., Szelei, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M. (2000). "Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: the role of AS3 as its mediator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10185-10190.

Geck, P., Szelei, J., Jimenez, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M. (1999). "Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostate cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus." *J Steroid Biochem Mol Biol* 68(1-2): 41-50.

Genga, K. R., Filho, F. D., Ferreira, F. V., de Sousa, J. C., Studart, F. S., Magalhaes, S. M., Heredia, F. F., Pinheiro, R. F. (2015). "Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome." *J Clin Pathol* 68(5): 381-387.

Gentles, A. J., Bratman, S. V., Lee, L. J., Harris, J. P., Feng, W., Nair, R. V., Shultz, D. B., Nair, V. S., Hoang, C. D., West, R. B., Plevritis, S. K., Alizadeh, A. A., Diehn, M. (2015). "Integrating Tumor and Stromal Gene Expression Signatures With Clinical Indices for Survival Stratification of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer." *J Natl Cancer Inst* 107(10).

Gorgoulis, V. G., Kotsinas, A., Zacharatos, P., Mariatos, G., Liloglou, T., Tsoli, E., Kokotas, S., Fassoulas, C., Field, J. K., Kittas, C. (2000). "Association of allelic imbalance at locus D13S171 (BRCA2) and p53 alterations with tumor kinetics and chromosomal instability (aneuploidy) in nonsmall cell lung carcinoma." *Cancer* 89(9): 1933-1945.

Gu, C., Luo, J., Lu, X., Tang, Y., Ma, Y., Yun, Y., Cao, J., Cao, J., Huang, Z., Zhou, X., Zhang, S. (2019). "REV7 confers radioresistance of esophagus squamous cell carcinoma by recruiting PRDX2." *Cancer Sci* 110(3): 962-972.

Guacci, V. (2007). "Sister chromatid cohesion: the cohesin cleavage model does not ring true." *Genes Cells* 12(6): 693-708.

Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., Lukas, J., Choudhary, C. (2018). "DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity." *Cell* 173(4): 972-988.e923.

Habu, T., Kim, S. H., Weinstein, J., Matsumoto, T. (2002). "Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis." *EMBO J* 21(23): 6419-6428.

Hagan, R. S., Manak, M. S., Buch, H. K., Meier, M. G., Meraldi, P., Shah, J. V., Sorger, P. K. (2011). "p31(comet) acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment." *Mol Biol Cell* 22(22): 4236-4246.

Hagemann, C., Weigelin, B., Schommer, S., Schulze, M., Al-Jomah, N., Anacker, J., Gerngras, S., Kuhnel, S., Kessler, A. F., Polat, B., Ernestus, R. I., Patel, R., Vince, G. H. (2011). "The cohesin-interacting protein, precocious dissociation of sisters 5A/sister chromatid cohesion protein 112, is up-regulated in human astrocytic tumors." *Int J Mol Med* 27(1): 39-51.

Hara, K., Taharazako, S., Ikeda, M., Fujita, H., Mikami, Y., Kikuchi, S., Hishiki, A., Yokoyama, H., Ishikawa, Y., Kanno, S. I., Tanaka, K., Hashimoto, H. (2017). "Dynamic feature of mitotic arrest deficient 2-like protein 2 (MAD2L2) and structural basis for its interaction with chromosome alignment-maintaining phosphoprotein (CAMP)." *J Biol Chem* 292(43): 17658-17667.

Harada, H., Uchida, N., Shimada, Y., Kumimoto, H., Shinoda, M., Imamura, M., Ishizaki, K. (2001). "Polymorphism and allelic loss at the AS3 locus on 13q12-13 in esophageal squamous cell carcinoma." *Int J Oncol* 18(5): 1003-1007.

Hartman, T., Stead, K., Koshland, D., Guacci, V. (2000). "Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 151(3): 613-626.

He, S., Guo, G. M., Liu, F. X., Huang, X. P., Xu, X., Cai, Y., Han, Y. L., Zhan, Q. M., Wu, M., Dong, J. T., Wang, G. Q., Wang, M. R. (2008). "Molecular analysis in combination with iodine staining may contribute to the risk prediction of esophageal squamous cell carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(3): 307-315.

He, X., Patterson, T. E., Sazer, S. (1997). "The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15): 7965-7970.

- Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S. W., Cordon-Cardo, C. (2004). "Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control." *Nature* 430(7001): 797-802.
- Hernando, E., Orlow, I., Liberal, V., Nohales, G., Benezra, R., Cordon-Cardo, C. (2001). "Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer." *Int J Cancer* 95(4): 223-227.
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R. D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bahr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., Suchorska, B., Brehmer, S., Weyerbrock, A., Renovanz, M., Bullinger, L., Galldiks, N., Vajkoczy, P., Misch, M., Vatter, H., Stuplich, M., Schafer, N., Kebir, S., Weller, J., Schaub, C., Stummer, W., Tonn, J. C., Simon, M., Keil, V. C., Nelles, M., Urbach, H., Coenen, M., Wick, W., Weller, M., Fimmers, R., Schmid, M., Hattingen, E., Pietsch, T., Coch, C., Glas, M. (2019). "Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial." *Lancet* 393(10172): 678-688.
- Hisaoka, M., Matsuyama, A., Hashimoto, H. (2008). "Aberrant MAD2 expression in soft-tissue sarcoma." *Pathol Int* 58(6): 329-333.
- Hu, S., Liao, Y., Chen, L. (2018). "Identification of Key Pathways and Genes in Anaplastic Thyroid Carcinoma via Integrated Bioinformatics Analysis." *Med Sci Monit* 24: 6438-6448.
- Huang, X. P., Wei, F., Liu, X. Y., Xu, X., Hu, H., Chen, B. S., Xia, S. H., Han, Y. S., Han, Y. L., Cai, Y., Wu, M., Wang, M. R. (2002). "Allelic loss on 13q in esophageal squamous cell carcinomas from northern China." *Cancer Lett* 185(1): 87-94.
- Hwang, L. H., Lau, L. F., Smith, D. L., Mistrot, C. A., Hardwick, K. G., Hwang, E. S., Amon, A., Murray, A. W. (1998). "Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint." *Science* 279(5353): 1041-1044.
- Janoueix-Lerosey, I., Novikov, E., Monteiro, M., Gruel, N., Schleiermacher, G., Loriod, B., Nguyen, C., Delattre, O. (2004). "Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma." *Oncogene* 23(35): 5912-5922.
- Jin, B., Wang, W., Du, G., Huang, G. Z., Han, L. T., Tang, Z. Y., Fan, D. G., Li, J., Zhang, S. Z. (2015). "Identifying hub genes and dysregulated pathways in hepatocellular carcinoma." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19(4): 592-601.

- Kabeche, L., Compton, D. A. (2012). "Checkpoint-independent stabilization of kinetochore-microtubule attachments by Mad2 in human cells." *Curr Biol* 22(7): 638-644.
- Kim, H. S., Park, K. H., Kim, S. A., Wen, J., Park, S. W., Park, B., Gham, C. W., Hyung, W. J., Noh, S. H., Kim, H. K., Song, S. Y. (2005). "Frequent mutations of human Mad2, but not Bub1, in gastric cancers cause defective mitotic spindle checkpoint." *Mutat Res* 578(1-2): 187-201.
- Kim, M. S., An, C. H., Yoo, N. J., Lee, S. H. (2013). "Frameshift mutations of chromosome cohesion-related genes SGOL1 and PDS5B in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability." *Hum Pathol* 44(10): 2234-2240.
- Kim, S., Sun, H., Ball, H. L., Wassmann, K., Luo, X., Yu, H. (2010). "Phosphorylation of the spindle checkpoint protein Mad2 regulates its conformational transition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(46): 19772-19777.
- Kim, Y., Choi, J. W., Lee, J. H., Kim, Y. S. (2014). "MAD2 and CDC20 are upregulated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix." *Int J Gynecol Pathol* 33(5): 517-523.
- Kleihues, P. (2007). "Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome-Astrozytome und Oligodendrogliome." *Onkologie*: S. 5-9.
- Knosel, T., Petersen, S., Schwabe, H., Schluns, K., Stein, U., Schlag, P. M., Dietel, M., Petersen, I. (2002). "Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases." *Virchows Arch* 440(2): 187-194.
- Krenn, V., Musacchio, A. (2015). "The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling." *Front Oncol* 5: 225.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K., Peters, J. M. (2006). "Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin." *Cell* 127(5): 955-967.
- Kumar, D., Sakabe, I., Patel, S., Zhang, Y., Ahmad, I., Gehan, E. A., Whiteside, T. L., Kasid, U. (2004). "SCC-112, a novel cell cycle-regulated molecule, exhibits reduced expression in human renal carcinomas." *Gene* 328: 187-196.
- Kunnev, D., Ivanov, I., Ionov, Y. (2009). "Par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans) and androgen-induced prostate proliferative shutoff associated protein genes are mutationally inactivated in prostate cancer cells." *BMC Cancer* 9: 318.

- Kunwar, S., Mohapatra, G., Bollen, A., Lamborn, K. R., Prados, M., Feuerstein, B. G. (2001). "Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival." *Cancer Res* 61(20): 7683-7688.
- Lee, E., Giovanello, K. S., Saykin, A. J., Xie, F., Kong, D., Wang, Y., Yang, L., Ibrahim, J. G., Doraiswamy, P. M., Zhu, H. (2017). "Single-nucleotide polymorphisms are associated with cognitive decline at Alzheimer's disease conversion within mild cognitive impairment patients." *Alzheimers Dement (Amst)* 8: 86-95.
- Lee, S. Y., Choi, B. S., Yoon, C. H., Kang, C., Kim, K., Kim, K. C. (2018). "Selection of biomarkers for HIV-1 latency by integrated analysis." *Genomics*.
- Leland, B. A., Chen, A. C., Zhao, A. Y., Wharton, R. C., King, M. C. (2018). "Rev7 and 53BP1/Crb2 prevent RecQ helicase-dependent hyper-resection of DNA double-strand breaks." *Elife* 7.
- Li, C., Luo, L., Wei, S., Wang, X. (2018a). "Identification of the potential crucial genes in invasive ductal carcinoma using bioinformatics analysis." *Oncotarget* 9(6): 6800-6813.
- Li, G. Q., Li, H., Zhang, H. F. (2003). "Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance." *World J Gastroenterol* 9(9): 1972-1975.
- Li, Y., Bai, W., Zhang, J. (2017). "MiR-200c-5p suppresses proliferation and metastasis of human hepatocellular carcinoma (HCC) via suppressing MAD2L1." *Biomed Pharmacother* 92: 1038-1044.
- Li, Y., Li, L., Chen, M., Yu, X., Gu, Z., Qiu, H., Qin, G., Long, Q., Fu, X., Liu, T., Li, W., Huang, W., Shi, D., Kang, T., Luo, M., Wu, X., Deng, W. (2018b). "MAD2L2 inhibits colorectal cancer growth by promoting NCOA3 ubiquitination and degradation." *Mol Oncol* 12(3): 391-405.
- Little, N. A., Jochemsen, A. G. (2002). "p63." *Int J Biochem Cell Biol* 34(1): 6-9.
- Lo, K. W., Teo, P. M., Hui, A. B., To, K. F., Tsang, Y. S., Chan, S. Y., Mak, K. F., Lee, J. C., Huang, D. P. (2000). "High resolution allelotype of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* 60(13): 3348-3353.
- Lo Muzio, L., Santarelli, A., Caltabiano, R., Rubini, C., Pieramici, T., Trevisiol, L., Carinci, F., Leonardi, R., De Lillo, A., Lanzafame, S., Bufo, P., Piattelli, A. (2005). "p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma." *Hum Pathol* 36(2): 187-194.
- Losada, A., Yokochi, T., Hirano, T. (2005). "Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts." *J Cell Sci* 118(Pt 10): 2133-2141.

- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." *Acta Neuropathol* 131(6): 803-820.
- Louis, D. N., WHO (2007). "WHO classification of tumours of the central nervous system". 4th edition, Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon, S. 25-52.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). "Taschenlehrbuch Histologie". 2., komplett überarb. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 74-86.
- Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M. W., Wagner, G. (2000). "Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20." *Nat Struct Biol* 7(3): 224-229.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., Yu, H. (2002). "The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20." *Mol Cell* 9(1): 59-71.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., Yu, H. (2004). "The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states." *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 338-345.
- Ma, J., Cao, T., Cui, Y., Zhang, F., Shi, Y., Xia, J., Wang, Z. P. (2019). "miR-223 Regulates Cell Proliferation and Invasion via Targeting PDS5B in Pancreatic Cancer Cells." *Mol Ther Nucleic Acids* 14: 583-592.
- Maffini, M., Denes, V., Sonnenschein, C., Soto, A., Geck, P. (2008). "APRIN is a unique Pds5 paralog with features of a chromatin regulator in hormonal differentiation." *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(1-2): 32-43.
- Maffini, M. V., Geck, P., Powell, C. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M. (2002). "Mechanism of androgen action on cell proliferation: AS3 protein as a mediator of proliferative arrest in the rat prostate." *Endocrinology* 143(7): 2708-2714.
- Maguire, A., Chen, X., Wisner, L., Malasi, S., Ramsower, C., Kendrick, S., Barrett, M. T., Glinsmann-Gibson, B., McGrath, M., Rimsza, L. M. (2019). "Enhanced DNA repair and genomic stability identify a novel HIV related Diffuse Large B-cell Lymphoma signature." *Int J Cancer*.
- Mamrak, N. E., Shimamura, A., Howlett, N. G. (2017). "Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia." *Blood Rev* 31(3): 93-99.
- Mannini, L., Menga, S., Musio, A. (2010). "The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer." *Hum Mutat* 31(6): 623-630.

- Mattle, H., Mumenthaler, M. (2013). "Neurologie". 13., vollst. überarb. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 12ff., 50 ff.
- McGrogan, B., Phelan, S., Fitzpatrick, P., Maguire, A., Prencipe, M., Brennan, D., Doyle, E., O'Grady, A., Kay, E., Furlong, F., McCann, A. (2014). "Spindle assembly checkpoint protein expression correlates with cellular proliferation and shorter time to recurrence in ovarian cancer." *Hum Pathol* 45(7): 1509-1519.
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* 455(7216): 1061-1068.
- Medendorp, K., van Groningen, J. J., Vreede, L., Hetterschijt, L., van den Hurk, W. H., de Bruijn, D. R., Brugmans, L., van Kessel, A. G. (2009). "The mitotic arrest deficient protein MAD2B interacts with the small GTPase RAN throughout the cell cycle." *PLoS One* 4(9): e7020.
- Meng, X., Chu, G., Ye, C., Tang, H., Qiu, P., Hu, Y., Li, M., Zhang, C. (2017). "Involvement of AMPK in regulating the degradation of MAD2B under high glucose in neuronal cells." *J Cell Mol Med* 21(6): 1150-1158.
- Meng, X., Wang, X., Tian, X., Yang, Z., Li, M., Zhang, C. (2014). "Protection of neurons from high glucose-induced injury by deletion of MAD2B." *J Cell Mol Med*.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V. V., Benezra, R. (2004). "Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13): 4459-4464.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V., Benezra, R. (2001). "MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells." *Nature* 409(6818): 355-359.
- Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., Shirahige, K. (2015). "Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2." *Curr Biol* 25(13): 1694-1706.
- Mongan, A. M., Lynam-Lennon, N., Casey, R., Maher, S., Pidgeon, G., Reynolds, J. V., O'Sullivan, J. (2016). "Visceral obesity stimulates anaphase bridge formation and spindle assembly checkpoint dysregulation in radioresistant oesophageal adenocarcinoma." *Clin Transl Oncol* 18(6): 632-640.
- Muir, K. W., Kschonsak, M., Li, Y., Metz, J., Haering, C. H., Panne, D. (2016). "Structure of the Pds5-Scc1 Complex and Implications for Cohesin Function." *Cell Rep* 14(9): 2116-2126.

Müller, M. (2010). "Chirurgie - für Studium und Praxis : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen ; 2010/2011 ". 10. Auflage, Med. Verl.- und Informationsdienste, Breisach am Rhein, S. 462 f.

Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C. M., Fishel, R. (2000). "A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2." *J Biol Chem* 275(6): 4391-4397.

Murthy, S., Agoulnik, I. U., Weigel, N. L. (2005). "Androgen receptor signaling and vitamin D receptor action in prostate cancer cells." *Prostate* 64(4): 362-372.

Musacchio, A., Salmon, E. D. (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 379-393.

Nascimento, A. V., Singh, A., Bousbaa, H., Ferreira, D., Sarmento, B., Amiji, M. M. (2014). "Mad2 checkpoint gene silencing using epidermal growth factor receptor-targeted chitosan nanoparticles in non-small cell lung cancer model." *Mol Pharm* 11(10): 3515-3527.

Nascimento, A. V., Singh, A., Bousbaa, H., Ferreira, D., Sarmento, B., Amiji, M. M. (2017). "Overcoming cisplatin resistance in non-small cell lung cancer with Mad2 silencing siRNA delivered systemically using EGFR-targeted chitosan nanoparticles." *Acta Biomater* 47: 71-80.

Nasmyth, K. (2005). "How do so few control so many?" *Cell* 120(6): 739-746.

Natrajan, R., Sailem, H., Mardakheh, F. K., Arias Garcia, M., Tape, C. J., Dowsett, M., Bakal, C., Yuan, Y. (2016). "Microenvironmental Heterogeneity Parallels Breast Cancer Progression: A Histology-Genomic Integration Analysis." *PLoS Med* 13(2): e1001961.

Nelson, K. K., Schlondorff, J., Blobel, C. P. (1999). "Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta." *Biochem J* 343 Pt 3: 673-680.

Ni, Z., Wang, X., Zhang, T., Li, L., Li, J. (2018). "Comprehensive analysis of differential expression profiles reveals potential biomarkers associated with the cell cycle and regulated by p53 in human small cell lung cancer." *Exp Ther Med* 15(4): 3273-3282.

Niimi, K., Murakumo, Y., Watanabe, N., Kato, T., Mii, S., Enomoto, A., Asai, M., Asai, N., Yamamoto, E., Kajiyama, H., Shibata, K., Kikkawa, F., Takahashi, M.

(2014). "Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells." *Cancer Sci*.

Nijeboer, P., Malamut, G., Mulder, C. J., Cerf-Bensussan, N., Sibon, D., Bouma, G., Cellier, C., Hermine, O., Visser, O. (2015). "Enteropathy-associated T-cell lymphoma: improving treatment strategies." *Dig Dis* 33(2): 231-235.

Ohgaki, H., Kleihues, P. (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." *Clin Cancer Res* 19(4): 764-772.

Okada, T., Sonoda, E., Yoshimura, M., Kawano, Y., Saya, H., Kohzaki, M., Takeda, S. (2005). "Multiple roles of vertebrate REV genes in DNA repair and recombination." *Mol Cell Biol* 25(14): 6103-6111.

Orzol, P., Holcakova, J., Nekulova, M., Nenutil, R., Vojtesek, B., Coates, P. J. (2015). "The diverse oncogenic and tumour suppressor roles of p63 and p73 in cancer: a review by cancer site." *Histol Histopathol* 30(5): 503-521.

Ouyang, Z., Yu, H. (2017). "Releasing the cohesin ring: A rigid scaffold model for opening the DNA exit gate by Pds5 and Wapl." *Bioessays* 39(4).

Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F., Nasmyth, K. (2000). "Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion." *Curr Biol* 10(24): 1557-1564.

Park, P. E., Jeong, J. Y., Kim, S. Z., Park, J. Y. (2013). "MAD2 Expression in Ovarian Carcinoma: Different Expression Patterns and Levels among Various Types of Ovarian Carcinoma and Its Prognostic Significance in High-Grade Serous Carcinoma." *Korean J Pathol* 47(5): 418-425.

Peng, C., Yang, Q., Wei, B., Yuan, B., Liu, Y., Li, Y., Gu, D., Yin, G., Wang, B., Xu, D., Zhang, X., Kong, D. (2017). "Investigation of crucial genes and microRNAs in conventional osteosarcoma using gene expression profiling analysis." *Mol Med Rep* 16(5): 7617-7624.

Percy, M. J., Myrie, K. A., Neeley, C. K., Azim, J. N., Ethier, S. P., Petty, E. M. (2000). "Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells." *Genes Chromosomes Cancer* 29(4): 356-362.

Perez de Castro, I., de Carcer, G., Malumbres, M. (2007). "A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy." *Carcinogenesis* 28(5): 899-912.

Peters, J. M., Nishiyama, T. (2012). "Sister chromatid cohesion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11).

Pierantoni, G. M., Conte, A., Rinaldo, C., Tornincasa, M., Gerlini, R., Federico, A., Valente, D., Medico, E., Fusco, A. (2015). "Deregulation of HMGA1

expression induces chromosome instability through regulation of spindle assembly checkpoint genes." *Oncotarget* 6(19): 17342-17353.

Pinto, M., Soares, M. J., Cerveira, N., Henrique, R., Ribeiro, F. R., Oliveira, J., Jeronimo, C., Teixeira, M. R. (2007). "Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes." *Virchows Arch* 450(4): 379-385.

Poeggel, G., Boeck, G., Bommas-Ebert, U., Brandenburger, T., Hill, T., Huppelsberg, J., Königshoff, M., Teubner, P., Ulfing, N., Voß, R., Walter, K., Zabel, H. (2009). "Prrüfungswissen Physikum". 1. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 20-23.

Put, N., Van Roosbroeck, K., Vande Broek, I., Michaux, L., Vandenberghe, P. (2012). "PDS5A, a novel translocation partner of MLL in acute myeloid leukemia." *Leuk Res* 36(4): e87-89.

Qiu, T., Wang, H., Wang, Y., Zhang, Y., Hui, Q., Tao, K. (2015). "Identification of genes associated with melanoma metastasis." *Kaohsiung J Med Sci* 31(11): 553-561.

Ragnarsson, G., Eiriksdottir, G., Johannsdottir, J. T., Jonasson, J. G., Egilsson, V., Ingvarsson, S. (1999). "Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival." *Br J Cancer* 79(9-10): 1468-1474.

Rankin, S. (2015). "Complex elaboration: making sense of meiotic cohesin dynamics." *FEBS J* 282(13): 2426-2443.

Ravishankar Ram, M., Goh, K. L., Leow, A. H., Poh, B. H., Loke, M. F., Harrison, R., Shankar, E. M., Vadivelu, J. (2015). "Polymorphisms at Locus 4p14 of Toll-Like Receptors TLR-1 and TLR-10 Confer Susceptibility to Gastric Carcinoma in *Helicobacter pylori* Infection." *PLoS One* 10(11): e0141865.

Reifenberger, G., Collins, V. P. (2004). "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas." *J Mol Med (Berl)* 82(10): 656-670.

Reis, E. M., Ojopi, E. P., Alberto, F. L., Rahal, P., Tsukumo, F., Mancini, U. M., Guimaraes, G. S., Thompson, G. M., Camacho, C., Miracca, E., Carvalho, A. L., Machado, A. A., Paquola, A. C., Cerutti, J. M., da Silva, A. M., Pereira, G. G., Valentini, S. R., Nagai, M. A., Kowalski, L. P., Verjovski-Almeida, S., Tajara, E. H., Dias-Neto, E., Bengtson, M. H., Canevari, R. A., Carazzolle, M. F., Colin, C., Costa, F. F., Costa, M. C., Estecio, M. R., Esteves, L. I., Federico, M. H., Guimaraes, P. E., Hackel, C., Kimura, E. T., Leoni, S. G., Maciel, R. M., Maistro, S., Mangone, F. R., Massirer, K. B., Matsuo, S. E., Nobrega, F. G., Nobrega, M. P., Nunes, D. N., Nunes, F., Pandolfi, J. R., Pardini, M. I., Pasini, F. S., Peres, T., Rainho, C. A., dos Reis, P. P., Rodrigus-Lisoni, F. C., Rogatto, S. R., dos Santos, A., dos Santos, P. C., Sogayar, M. C., Zanelli, C. F. (2005). "Large-scale

transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer." *Cancer Res* 65(5): 1693-1699.

Ren, Q., Yang, H., Gao, B., Zhang, Z. (2008). "Global transcriptional analysis of yeast cell death induced by mutation of sister chromatid cohesin." *Comp Funct Genomics*: 634283.

Rimkus, C., Friederichs, J., Rosenberg, R., Holzmann, B., Siewert, J. R., Janssen, K. P. (2007). "Expression of the mitotic checkpoint gene MAD2L2 has prognostic significance in colon cancer." *Int J Cancer* 120(1): 207-211.

Rizzardi, C., Torelli, L., Schneider, M., Giudici, F., Zandona, L., Biasotto, M., Di Lenarda, R., Melato, M. (2014). "MAD2 expression in oral squamous cell carcinoma and its relationship to tumor grade and proliferation." *Anticancer Res* 34(12): 7021-7027.

Sadler, T., Langmann, J. (2008). "Medizinische Embryologie: die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen". 11., aktualisierte und erw. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 389-391.

Schlegel, U., Westphal, M., Weller, M. (2003). "Neuroonkologie". 2., erw. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 12-23.

Schouten, H. C., Sanger, W. G., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O. (1990). "Chromosomal abnormalities in patients with non-cutaneous T-cell non-Hodgkin's lymphoma. The Nebraska Lymphoma Study Group." *Eur J Cancer* 26(5): 618-622.

Schröck, E., Blume, C., Meffert, M. C., du Manoir, S., Bersch, W., Kiessling, M., Lozanowa, T., Thiel, G., Witkowski, R., Ried, T., Cremer, T. (1996). "Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization." *Genes Chromosomes Cancer* 15(4): 199-205.

Schwartzman, J. M., Duijf, P. H., Sotillo, R., Coker, C., Benezra, R. (2011). "Mad2 is a critical mediator of the chromosome instability observed upon Rb and p53 pathway inhibition." *Cancer Cell* 19(6): 701-714.

Schwartzman, J. M., Sotillo, R., Benezra, R. (2010). "Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease." *Nat Rev Cancer* 10(2): 102-115.

Seo, M. J., Bae, S. M., Kim, Y. W., Kim, Y. W., Hur, S. Y., Ro, D. Y., Lee, J. M., Namkoong, S. E., Kim, C. K., Ahn, W. S. (2005). "New approaches to pathogenic gene function discovery with human squamous cell cervical carcinoma by gene ontology." *Gynecol Oncol* 96(3): 621-629.

Shapiro, J. R. (2002). "Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors." *Am J Med Genet* 115(3): 194-201.

Shi, G., Wang, Y., Zhang, C., Zhao, Z., Sun, X., Zhang, S., Fan, J., Zhou, C., Zhang, J., Zhang, H., Liu, J. (2018). "Identification of genes involved in the four stages of colorectal cancer: Gene expression profiling." *Mol Cell Probes* 37: 39-47.

Shi, Y. X., Zhu, T., Zou, T., Zhuo, W., Chen, Y. X., Huang, M. S., Zheng, W., Wang, C. J., Li, X., Mao, X. Y., Zhang, W., Zhou, H. H., Yin, J. Y., Liu, Z. Q. (2016). "Prognostic and predictive values of CDK1 and MAD2L1 in lung adenocarcinoma." *Oncotarget* 7(51): 85235-85243.

Shintomi, K., Hirano, T. (2009). "Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1." *Genes Dev* 23(18): 2224-2236.

Solomon, D. A., Kim, J. S., Waldman, T. (2014). "Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance." *BMB Rep* 47(6): 299-310.

Sotillo, R., Hernando, E., Diaz-Rodriguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Benezra, R. (2007). "Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice." *Cancer Cell* 11(1): 9-23.

Sotillo, R., Schwartzman, J. M., Socci, N. D., Benezra, R. (2010). "Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal." *Nature* 464(7287): 436-440.

Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P., Guacci, V. (2003). "Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion." *J Cell Biol* 163(4): 729-741.

Stoepker, C., Ameziane, N., van der Lelij, P., Kooi, I. E., Oostra, A. B., Roomans, M. A., van Mil, S. E., Brink, A., Dietrich, R., Balk, J. A., Ylstra, B., Joenje, H., Feller, S. M., Brakenhoff, R. H. (2015). "Defects in the Fanconi Anemia Pathway and Chromatid Cohesion in Head and Neck Cancer." *Cancer Res* 75(17): 3543-3553.

Stummer, W., Meinel, T., Ewelt, C., Martus, P., Jakobs, O., Felsberg, J., Reifenberger, G. (2012). "Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery." *J Neurooncol* 108(1): 89-97.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H. J. (2006). "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial." *Lancet Oncol* 7(5): 392-401.

Stummer, W., Reulen, H. J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J. C., Rohde, V., Opperl, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T. (2008). "Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias." *Neurosurgery* 62(3): 564-576; discussion 564-576.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987-996.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C. Y., Paek, S. H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M. E., Ram, Z. (2017). "Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial." *Jama* 318(23): 2306-2316.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A. A., Kesari, S., Steinberg, D. M., Toms, S. A., Taylor, L. P., Lieberman, F., Silvani, A., Fink, K. L., Barnett, G. H., Zhu, J. J., Henson, J. W., Engelhard, H. H., Chen, T. C., Tran, D. D., Sroubek, J., Tran, N. D., Hottinger, A. F., Landolfi, J., Desai, R., Caroli, M., Kew, Y., Honnorat, J., Idbaih, A., Kirson, E. D., Weinberg, U., Palti, Y., Hegi, M. E., Ram, Z. (2015). "Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial." *Jama* 314(23): 2535-2543.

Sudakin, V., Chan, G. K., Yen, T. J. (2001). "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2." *J Cell Biol* 154(5): 925-936.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H., Peters, J. M. (2000). "Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase." *J Cell Biol* 151(4): 749-762.

Summersgill, B., Goker, H., Weber-Hall, S., Huddart, R., Horwich, A., Shipley, J. (1998). "Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change." *Br J Cancer* 77(2): 305-313.

Sun, J., Wiklund, F., Zheng, S. L., Chang, B., Balter, K., Li, L., Johansson, J. E., Li, G., Adami, H. O., Liu, W., Tolin, A., Turner, A. R., Meyers, D. A., Isaacs, W. B., Xu, J., Gronberg, H. (2005). "Sequence variants in Toll-like receptor gene

cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk." *J Natl Cancer Inst* 97(7): 525-532.

Suraokar, M. B., Nunez, M. I., Diao, L., Chow, C. W., Kim, D., Behrens, C., Lin, H., Lee, S., Raso, G., Moran, C., Rice, D., Mehran, R., Lee, J. J., Pass, H. I., Wang, J., Momin, A. A., James, B. P., Corvalan, A., Coombes, K., Tsao, A., Wistuba, II (2014). "Expression profiling stratifies mesothelioma tumors and signifies deregulation of spindle checkpoint pathway and microtubule network with therapeutic implications." *Ann Oncol* 25(6): 1184-1192.

Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T., Shirahige, K. (2009). "Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction." *Curr Biol* 19(6): 492-497.

Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M., Okayama, H. (2001a). "Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism." *Embo j* 20(20): 5779-5790.

Tanaka, K., Nishioka, J., Kato, K., Nakamura, A., Mouri, T., Miki, C., Kusunoki, M., Nobori, T. (2001b). "Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers." *Jpn J Cancer Res* 92(9): 952-958.

Tannous, B. A., Kerami, M., Van der Stoop, P. M., Kwiatkowski, N., Wang, J., Zhou, W., Kessler, A. F., Lewandrowski, G., Hiddingh, L., Sol, N., Lagerweij, T., Wedekind, L., Niers, J. M., Barazas, M., Nilsson, R. J., Geerts, D., De Witt Hamer, P. C., Hagemann, C., Vandertop, W. P., Van Tellingen, O., Noske, D. P., Gray, N. S., Wurdinger, T. (2013). "Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimetabolic drugs." *J Natl Cancer Inst* 105(17): 1322-1331.

Tao, Y., Yang, G., Yang, H., Song, D., Hu, L., Xie, B., Wang, H., Gao, L., Gao, M., Xu, H., Xu, Z., Wu, X., Zhang, Y., Zhu, W., Zhan, F., Shi, J. (2017). "TRIP13 impairs mitotic checkpoint surveillance and is associated with poor prognosis in multiple myeloma." *Oncotarget* 8(16): 26718-26731.

Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I. F., Tang, W., Cisneros, D. A., Bhaskara, V., Nishiyama, T., Vaziri, A., Wutz, A., Ellenberg, J., Peters, J. M. (2013). "Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation." *Nature* 501(7468): 564-568.

Theng, S. S., Wang, W., Mah, W. C., Chan, C., Zhuo, J., Gao, Y., Qin, H., Lim, L., Chong, S. S., Song, J., Lee, C. G. (2014). "Disruption of FAT10-MAD2 binding inhibits tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(49): E5282-5291.

Tong, K., Skibbens, R. V. (2014). "Cohesin without cohesion: a novel role for Pds5 in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS One* 9(6): e100470.

- Trepel, M. (2012). "Neuroanatomie: Struktur und Funktion". 5. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, S. 6-8, 14
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., Friend, S. H. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." *Nature* 415(6871): 530-536.
- Van Roosbroeck, K., Ferreiro, J. F., Tousseyn, T., van der Krogt, J. A., Michaux, L., Pienkowska-Grela, B., Theate, I., De Paepe, P., Dierickx, D., Doyen, C., Put, N., Cools, J., Vandenberghe, P., Wlodarska, I. (2016). "Genomic alterations of the JAK2 and PDL loci occur in a broad spectrum of lymphoid malignancies." *Genes Chromosomes Cancer*.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., Peters, J. M. (2000). "Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase." *Cell* 103(3): 399-410.
- Wang, L., Yin, F., Du, Y., Du, W., Chen, B., Zhang, Y., Wu, K., Ding, J., Liu, J., Fan, D. (2009). "MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: A probable prognostic factor for gastric cancer." *Am J Clin Pathol* 131(6): 793-801.
- Wang, S. W., Read, R. L., Norbury, C. J. (2002). "Fission yeast Pds5 is required for accurate chromosome segregation and for survival after DNA damage or metaphase arrest." *J Cell Sci* 115(Pt 3): 587-598.
- Wang, T., He, X., Liu, X., Liu, Y., Zhang, W., Huang, Q., Liu, W., Xiong, L., Tan, R., Wang, H., Zeng, H. (2017). "Weighted Gene Co-expression Network Analysis Identifies FKBP11 as a Key Regulator in Acute Aortic Dissection through a NF- κ B Dependent Pathway." *Front Physiol* 8: 1010.
- Wang, X., Jin, D. Y., Wong, Y. C., Cheung, A. L., Chun, A. C., Lo, A. K., Liu, Y., Tsao, S. W. (2000). "Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells." *Carcinogenesis* 21(12): 2293-2297.
- Wang, Z., Dang, C., Yan, R., Zhang, H., Yuan, D., Li, K. (2018). "[Screening of cell cycle-related genes regulated by KIAA0101 in gastric cancer]." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 38(10): 1151-1158.
- Wassmann, K., Liberal, V., Benezra, R. (2003). "Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C." *EMBO J* 22(4): 797-806.
- Watrin, E., Kaiser, F. J., Wendt, K. S. (2016). "Gene regulation and chromatin organization: relevance of cohesin mutations to human disease." *Curr Opin Genet Dev* 37: 59-66.

Weller, M., Diener, H. C. (2014). "Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie". 5., vollst. überarbeitete Auflage, 2012, Thieme, Stuttgart, S. 922 ff. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06.pdf, vollständig überarbeitet Version von 01.März 2014 online.

Welsch, U., Deller, T., Sobotta, J. (2010). "Lehrbuch Histologie". 3. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, S. 150-154.

Wen, D. Y., Lin, P., Pang, Y. Y., Chen, G., He, Y., Dang, Y. W., Yang, H. (2018). "Expression of the Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 665 (LINC00665) Gene and the Cell Cycle in Hepatocellular Carcinoma Using The Cancer Genome Atlas, the Gene Expression Omnibus, and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Med Sci Monit* 24: 2786-2808.

Wessels, P. H., Twijnstra, A., Kessels, A. G., Krijne-Kubat, B., Theunissen, P. H., Ummelen, M. I., Ramaekers, F. C., Hopman, A. H. (2002). "Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2." *Genes Chromosomes Cancer* 33(3): 279-284.

Weterman, M. A., van Groningen, J. J., Tertoolen, L., van Kessel, A. G. (2001). "Impairment of MAD2B-PRCC interaction in mitotic checkpoint defective t(X;1)-positive renal cell carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13808-13813.

Wu, D., Wang, L., Yang, Y., Huang, J., Hu, Y., Shu, Y., Zhang, J., Zheng, J. (2018a). "MAD2-p31(comet) axis deficiency reduces cell proliferation, migration and sensitivity of microtubule-interfering agents in glioma." *Biochem Biophys Res Commun* 498(1): 157-163.

Wu, X., Hsu, T. C., Annegers, J. F., Amos, C. I., Fueger, J. J., Spitz, M. R. (1995). "A case-control study of nonrandom distribution of bleomycin-induced chromatid breaks in lymphocytes of lung cancer cases." *Cancer Res* 55(3): 557-561.

Wu, Y., Tan, L., Chen, J., Li, H., Ying, H., Jiang, Y., Wu, Q., Yu, G., Tian, Y., Yu, J., Zeng, T., Yan, L., Liu, C. (2018b). "MAD2 Combined with Mitotic Spindle Apparatus (MSA) and Anticentromere Antibody (ACA) for Diagnosis of Small Cell Lung Cancer (SCLC)." *Med Sci Monit* 24: 7541-7547.

Wutz, G., Varnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D. A., Stocsits, R. R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M. J., Walther, N., Koch, B., Kueblbeck, M., Ellenberg, J., Zuber, J., Fraser, P., Peters, J. M. (2017). "Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins." *Embo j* 36(24): 3573-3599.

Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., Yu, H. (2004). "Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint." *EMBO J* 23(15): 3133-3143.

- Xiang, Y., Zhang, L., Huang, Y., Ling, J., Zhuo, W. (2019). "Microarray-based data mining reveals key genes and potential therapeutic drugs for Cadmium-induced prostate cell malignant transformation." *Environ Toxicol Pharmacol* 68: 141-147.
- Yan, H., Li, Z., Shen, Q., Wang, Q., Tian, J., Jiang, Q., Gao, L. (2017). "Aberrant expression of cell cycle and material metabolism related genes contributes to hepatocellular carcinoma occurrence." *Pathol Res Pract* 213(4): 316-321.
- Yan, M., Song, M., Bai, R., Cheng, S., Yan, W. (2016). "Identification of potential therapeutic targets for colorectal cancer by bioinformatics analysis." *Oncol Lett* 12(6): 5092-5098.
- Yang, H., Jin, L., Sun, X. (2019). "A thirteengene set efficiently predicts the prognosis of glioblastoma." *Mol Med Rep* 19(3): 1613-1621.
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., Luo, X. (2007). "p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry." *Cell* 131(4): 744-755.
- Yin, F., Du, Y., Hu, W., Qiao, T., Ding, J., Wu, K., Liu, Z., Fan, D. (2006). "Mad2beta, an alternative variant of Mad2 reducing mitotic arrest and apoptosis induced by adriamycin in gastric cancer cells." *Life Sci* 78(12): 1277-1286.
- Yin, F., Hu, W. H., Qiao, T. D., Fan, D. M. (2004). "[Multidrug resistant effect of alternative splicing form of MAD2 gene-MAD2beta on human gastric cancer cell]." *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 26(4): 201-204.
- Yu, L., Guo, W. C., Zhao, S. H., Tang, J., Chen, J. L. (2010). "Mitotic arrest defective protein 2 expression abnormality and its clinicopathologic significance in human osteosarcoma." *APMIS* 118(3): 222-229.
- Yu, L., Liu, S., Guo, W., Zhang, B., Liang, Y., Feng, Q. (2012). "Upregulation of Mad2 facilitates in vivo and in vitro osteosarcoma progression." *Oncol Rep* 28(6): 2170-2176.
- Yuan, B., Xu, Y., Woo, J. H., Wang, Y., Bae, Y. K., Yoon, D. S., Wersto, R. P., Tully, E., Wilsbach, K., Gabrielson, E. (2006). "Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability." *Clin Cancer Res* 12(2): 405-410.
- Zhang, B., Chang, J., Fu, M., Huang, J., Kashyap, R., Salavaggione, E., Jain, S., Kulkarni, S., Deardorff, M. A., Uzielli, M. L., Dorsett, D., Beebe, D. C., Jay, P. Y., Heuckeroth, R. O., Krantz, I., Milbrandt, J. (2009). "Dosage effects of cohesin regulatory factor PDS5 on mammalian development: implications for cohesinopathies." *PLoS One* 4(5): e5232.

- Zhang, B., Jain, S., Song, H., Fu, M., Heuckeroth, R. O., Erlich, J. M., Jay, P. Y., Milbrandt, J. (2007). "Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome." *Development* 134(17): 3191-3201.
- Zhang, H., Zhou, L., Yang, R., Sheng, Y., Sun, W., Kong, X., Cao, K. (2006). "Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization." *Biochem Biophys Res Commun* 342(1): 135-144.
- Zhang, Y., Huang, X., Qi, J., Yan, C., Xu, X., Han, Y., Wang, M. (2008). "Correlation of genomic and expression alterations of AS3 with esophageal squamous cell carcinoma." *J Genet Genomics* 35(5): 267-271.
- Zhao, J., Liu, S., Wang, H., Zhang, X., Kang, T., Li, Z., Deng, H., Yue, W., Cao, S. (2011). "Mitotic arrest deficient protein MAD2B is overexpressed in human glioma, with depletion enhancing sensitivity to ionizing radiation." *J Clin Neurosci* 18(6): 827-833.
- Zhao, Q., Bian, A. P., Zhang, Y., Qin, L., Shi, H. R., Su, K. (2014). "Expression of budding uninhibited by benzimidazoles-1 and mitotic arrest deficient-2 in endometrial carcinoma and its significance." *Eur J Gynaecol Oncol* 35(1): 44-47.
- Zhao, X., Li, W. (2019). "Gene coexpression network analysis identified potential biomarkers in gestational diabetes mellitus progression." *Mol Genet Genomic Med* 7(1): e00515.
- Zheng, M. Z., Zheng, L. M., Zeng, Y. X. (2008). "SCC-112 gene is involved in tumor progression and promotes the cell proliferation in G2/M phase." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(4): 453-462.
- Zhou, H. T., Shi, Z. Z., Zhou, Z. X., Jiang, Y. Y., Hao, J. J., Zhang, T. T., Shi, F., Xu, X., Wang, M. R., Zhang, Y. (2013a). "Genomic changes in rectal adenocarcinoma associated with liver metastasis." *Cancer Biomark* 13(4): 281-288.
- Zhou, W., Yang, Y., Xia, J., Wang, H., Salama, M. E., Xiong, W., Xu, H., Shetty, S., Chen, T., Zeng, Z., Shi, L., Zangari, M., Miles, R., Bearss, D., Tricot, G., Zhan, F. (2013b). "NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers." *Cancer Cell* 23(1): 48-62.
- Zhou, W., Yin, M., Cui, H., Wang, N., Zhao, L. L., Yuan, L. Z., Yang, X. P., Ding, X. M., Men, F. Z., Ma, X., Na, J. R. (2015). "Identification of potential therapeutic target genes and mechanisms in non-small-cell lung carcinoma in non-smoking women based on bioinformatics analysis." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19(18): 3375-3384.

Datenblätter

ZYTOMED Systems (2007^a). „Datenblatt ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum.“

ZYTOMED Systems (2007^b). „Datenblatt HIER Citrate Buffer pH 6,0 (10×).“

ZYTOMED Systems (2007^c). „Datenblatt Peroxide Block.“

Internetseiten

HGNC

HGNC (27.04.2016). „Pds5B

http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:20418

NCBI Gene

NCBI Gene (20.01.2016). „NCBI Gene, Pds5A

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23244>“

NCBI Gene (05.06.2019). „NCBI Gene, Pds5B

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23047>“

NCBI Gene (30.06.2016). „NCBI Gene, Mad2A

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4085>“

NCBI Gene (01.07.2016). „NCBI Gene, Mad2B

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10459>“

The Human Protein Atlas (Proteinatlas)

Proteinatlas (16.08.2016^a). „Pds5A, Gehirngewebe physiologisch

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000121892-PDS5A/tissue/cerebral+cortex>“

Proteinatlas (16.08.2016^b). „Pds5A, Gliomgewebe

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000121892-PDS5A/cancer/tissue/glioma>“

Proteinatlas (16.08.2016^c). „Pds5B, Gehirngewebe physiologisch

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000083642-PDS5B/tissue/cerebral+cortex>“

Proteinatlas (16.08.2016^d). „Pds5B, Gliomgewebe

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000083642-PDS5B/cancer/tissue/glioma>“

Proteinatlas (05.06.2019). „Pds5B, unterschiedliches Gewebe pathologisch

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000083642-PDS5B/pathology>“

Proteinatlas (16.08.2016^e). „Mad2A, Gehirngewebe physiologisch

[http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164109-](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164109-MAD2L1/tissue/cerebral+cortex)

[MAD2L1/tissue/cerebral+cortex](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164109-MAD2L1/tissue/cerebral+cortex)“

Proteinatlas (16.08.2016^f). „Mad2A, Gliomgewebe

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164109-MAD2L1/cancer/tissue/glioma>“

Proteinatlas (16.08.2016^g). „Mad2B, Gehirngewebe physiologisch

[http://www.proteinatlas.org/ENSG00000116670-](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000116670-MAD2L2/tissue/cerebral+cortex)

[MAD2L2/tissue/cerebral+cortex](http://www.proteinatlas.org/ENSG00000116670-MAD2L2/tissue/cerebral+cortex)“

Proteinatlas (16.08.2016^h). „Mad2B, Gliomgewebe

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000116670-MAD2L2/cancer/tissue/glioma>“

Immunhistochemie

Leinco Technologies (27.11.2016)

„[http://www.leinco.com/includes/templates/LeincoCustom/images/immunohistoc
hemistry.gif](http://www.leinco.com/includes/templates/LeincoCustom/images/immunohistoc
hemistry.gif)“

Rangkorrelationskoeffizient r_s und Höhe der Korrelation

Universität Stuttgart (02.07.2016)

„[http://www.uni-
stuttgart.de/soz/avps/mitarbeiter/Jakob/WWW/SPSS/Korrelation.html](http://www.uni-
stuttgart.de/soz/avps/mitarbeiter/Jakob/WWW/SPSS/Korrelation.html)“

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
APC/C	anaphase-promoting complex/Cyclosom
APRIN	androgen-induced proliferation inhibitor, Synonym: Pds5B
BCNU-Wafern	1,3-Bis(Chloro-Ethyl)-1-Nitroso-Urea-Wafern Synonym: Carmustin
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
Bub3	budding uninhibited by benzimidazol 3
BubR1	Bub1 related
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CD20	cluster of differentiation
Cdc20	cell division cycle 20
CDH1	Cadherin 1
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A Synonym: p16 ^{INK4a}
CdL	Cornelia de Lange(-Syndrom)
CIN	Chromosomale Instabilität
CT	Computertomografie
CTAG1	cancer/testis antigen 1 Synonym: Eso-1
DAB	Diaminobenzidin
d.F.	der Fälle
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure

ECO1	establishment of cohesion 1 in der Hefezelle
EEG	Elektroenzephalografie
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1, entspricht ECO1 im Menschen
Eso-1	Synonym: cancer/testis antigen 1 (CTAG1)
et al.	et alii (und andere)
evtl.	eventuell
FAT10	HLA-F-adjacent transcript 10
G_(0/1/2)-Phase	Gap _(0/1/2) -Phase
GBM	Glioblastoma multiforme
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HIER	heat induced epitope retrieval (des Citratpuffer)
HIV	human immunodeficiency virus
HMGA1	high mobility group A1
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HR	homologe Rekombination
HRP	horse radish peroxidase
HSMAD	Homo sapiens MAD, Synonym: Mad2A, Mad2L1
IDH1/2	Isocitrat-Dehydrogenase ½
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie/ immunhistochemische Färbungen
KD	Knockdown
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
I	Liter

LGA	low-grade astrozytoma (Niedriggradiges Astrozytom, WHO °II)
LOH	loss of heterozygosity
Mad2A	mitotic arrest deficient 2A, Synonym: Mad2L1, HSMAD
Mad2B	mitotic arrest deficient 2B, Synonym: Mad2L2, PolZ2, hRev7
Mad2L1	mitotic arrest deficient 2-Like 1, Synonym: Mad2A, HSMAD
Mad2L2	mitotic arrest deficient 2-Like 2, Synonym: Mad2B
MCC	mitotic checkpoint complex
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEF	mouse embryonic fibroblasts
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
miR-223	MicroRNA-223
ml	Milliliter
MLL	mixed lineage leukemia
mm	Millimeter
M-Phase	Mitosephase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3
NHEJ	non-homologous end-joining
NSCLC	non-small cell lung cancer
NOS	not otherwise specified

OSCC	oral squamous cell carcinoma squamöse Zellkarzinome des Oropharynx
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p	p-Wert, Signifikanzwert
p16 ^{INK4a}	cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCV-Schema	Procarbacin, Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea, Vincristin
PDGF	platelet derived growth factor
Pds5	precocious dissociation of sisters 5
Pds5 ⁺	Pds5 in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Pds5A	precocious dissociation of sisters 5 A, Synonym: SCC112, PIG54
Pds5B	Pds5 cohesin associated factor B, Synonym: APRIN, AS3, CG008
Pds5p	Pds5 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PP2A	Phosphatase 2A
PRCC	papillary renal cell carcinoma
PTEN	phosphatase and tensin homolog
q	langer Arm eines Chromosoms
RAN	Ras-related nuclear protein
Rb(-1)	Tumorsuppressor Retinoblastom(-1)
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
r _s	Korrelationskoeffizient der Spearman-Rangkorrelationsanalysen
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SA1/2	stromal antigen 1/2, Synonym: STAG1/2
SAC	spindle assembly checkpoint
SCC1	sister chromatid cohesion 1
SCC112	sister chromatid cohesion Protein 112, Synonym: Pds5A
SCLC	small cell lung cancer
sek	Sekunden
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMC1(3)	structural maintenance of chromosomes 1(3)
S-Phase	Synthesephase
STAG1(2)	stromal antigen 1(2), Synonym:SA1(2)
Tab.	Tabelle
T-ALL	akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
TMZ	Temozolomid
TP53 (63)	Tumorsuppressor p53 (p63)
TRIP13	Thyroid hormone receptor-interacting protein 13
Trp53	transformation related protein 53
TTFields	tumor-treating fields, alternierende elektromagnetische Felder
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett-Bestrahlung
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wapl	wings apart like protein
WHO	World Health Organization

z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
%	Prozent
×	Multiplikationszeichen bzw. Synonym für „-fache“
\bar{x}	im Mittel

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich zuallererst Herrn Prof. Dr. med. G. H. Vince aussprechen, der mir als ehemaliger Leiter des Tumorbologischen Labors der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg dieses interessante und spannende Projekt als Dissertationsthema übertragen hat. Ich bedanke mich herzlichst für sein in mich gesetztes Vertrauen, die freundlichen Worte und die Unterstützung, die er mir jederzeit während diesem Projekt zukommen ließ.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Hagemann gilt mein weiterer außerordentlicher Dank für die hervorragende Betreuung, die er mir entgegenbrachte und die vom Beginn bis zum Abschluss dieser Arbeit maßgeblich für deren Gelingen war. Bei praktischen, aber auch theoretischen Fragen war er stets ansprechbar und konnte mit hoher fachlicher Expertise weiterhelfen. Nach Beendigung der Labortätigkeiten stand er mir jederzeit beratend und hilfsbereit zur Seite.

Besonderer Dank gilt der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie und Frau Dr. med. A. F. Keßler, die für dieses Projekt von der Stiftung für Neurochirurgische Forschung einen Forschungspreis gewann, welcher einen wesentlichen finanziellen Beitrag zur praktischen Umsetzung des Themas darstellte. Daneben danke ich Frau Dr. A. F. Keßler auch für ihr Engagement und ihre Begeisterungsfähigkeit für die neurochirurgische Forschung und Medizin, an der sie mich während meiner Zeit in der Tumorbologie aber auch als Famula der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg teilhaben ließ.

Weiterhin danke ich außerordentlich Frau Siglinde Kühnel. Ohne sie wäre diese Arbeit in der praktischen Ausführung nicht möglich gewesen. Sie war diejenige, die mich die Methodik der IHC lehrte. Dadurch legte sie den Grundstein für diese Arbeit. Ihre hohe Kompetenz als technische Assistentin war somit essentiell für mich für die Bearbeitung dieses Themas.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. M. Monoranu aus der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, gilt zusätzlich mein besonderer Dank. Durch ihr Engagement die IHC in der Austestungsphase der besten AK-Verdünnung mit einzuschätzen und die angefärbten Strukturen mitzubeurteilen, konnten erst die vorliegenden Erkenntnisse gewonnen werden.

Ebenso danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Löhr, der während den regelmäßig-stattfindenden Besprechungen immer zur Weiterentwicklung dieser Arbeit durch Ideen und Anregungen beitrug.

Biologie-Laborantin Frau Stefanie Gerngras ist auch hervorzuheben, die mir weitere Methoden der tumorbiologischen Forschung zeigte und damit zusätzliche Einblicke in die wissenschaftliche Arbeitsweise gewährte.

Außerdem gilt mein Dank allen Instituten, die mir die präparierten Gewebematerialien zur Verfügung gestellt haben. Vor allem ist hier die Abteilung für Neuropathologie im Institut für Pathologie der Universität Würzburg hervorzuheben. Des Weiteren sind das Institut für Pathologie der Universität Würzburg, die Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen sowie die Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg zu nennen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich von Herzen. Ohne ihre uneingeschränkte und vielfache Unterstützung, den ständigen Rückhalt und das große Verständnis wäre das Studium der Humanmedizin und dadurch auch diese Dissertation nicht möglich gewesen. Meiner Schwester und meinem Freund danke ich ebenso herzlich für die positive Begleitung.

Meinen Freunden, die in sämtlichen Phasen des Studiums und der Doktorarbeit an meiner Seite waren und mich unterstützten, bin ich ebenfalls sehr verbunden.

Vor allem aber gilt mein außerordentlicher Dank jenen Patienten, die sich dazu bereiterklärt haben, das Gewebe ihres Tumors der Forschung zur Verfügung zu stellen. Daneben haben sie und alle Patienten mit dieser schweren Erkrankung meinen tiefen Respekt vor der damit verbundenen Herausforderung, die das Leben an sie stellt. Ich hoffe sehr, dass diese Arbeit in ihrem Sinne zum besseren Verständnis astrozytärer Tumoren beitragen und langfristig bei der Entwicklung neuer Therapien sowie zur Verbesserung der Prognose mithelfen wird.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der elektronischen Version dieser Arbeit enthalten.