

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Prognostische Relevanz von PGRMC1, TRIM33  
und PRAS40 in Gliomen und Glioblastomen

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Frederik Till Alexander Schäfer

aus Hamburg

Magdeburg 2024

### Bibliographische Beschreibung:

Schäfer, Frederik Till Alexander:

Prognostische Relevanz von PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 in Gliomen. - 2024. - 26 Abb.,

1 Tab., 5 Anl.

### Kurzreferat

Ziel der Studie war es, einen Zusammenhang zwischen den Markern PGRMC1, TRIM33 sowie PRAS40 und dem Gesamtüberleben von Patient\*innen mit Gliomen darzustellen. Hierfür wurden Gewebeproben von 11 Astrozytomen WHO Grad 2, 19 von Astrozytomen WHO Grad 3 sowie 233 Glioblastomen gesammelt und anschließend markerspezifisch immunhistochemisch gefärbt, ausgewertet und in Bezug auf Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben analysiert. Zudem folgte eine Korrelationsanalyse mit anderen Tumorparametern und eine Lebenszeitanalyse.

In dieser Studie zeigten wir, dass Glioblastompatient\*innen mit einer hoher PGRMC1 Expression ein signifikant schlechteres Gesamt- sowie Rezidiv-freies Überleben aufwiesen, als Patient\*innen mit niedriger Expression. Zudem resultierte aus der Lebenszeitanalyse ein signifikant höheres Risiko zu sterben, sofern eine hohe PGRMC1 Expression vorlag.

Die Analyse von TRIM33 zeigte ähnliche Ergebnisse, auch hier war eine hohe Expression bei Glioblastompatient\*innen mit einem kürzeren Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben assoziiert, als mit niedriger TRIM33 Expression. Ferner lag eine signifikante Korrelation von TRIM33 Expression in Glioblastomen und dem Proliferationsmarker Ki67 vor.

Der Marker PRAS40 dagegen lieferte keine signifikanten Assoziationen bzw. Korrelationen mit dem Überleben oder anderen Tumorparametern.

Diese in unserer Studie erzielten Ergebnisse können als Basis für weitere molekulare Untersuchungen in Bezug zu den genutzten Markern dienen.

### **Schlüsselwörter**

Gliome und Glioblastome  
Prognostische Biomarker  
PGRMC1  
TRIM33  
PRAS40

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>.....</b>
<b><u>1. EINLEITUNG.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1. GLIOME.....	1
1.2. DAS GLIOBLASTOM .....	1
1.3. PATHOGENESE BEIM GLIOBLASTOM.....	2
1.5. THERAPIE .....	4
1.6. PGRMC1 .....	5
1.7. TRIM33 .....	6
1.8. PRAS40.....	7
1.9. ZIELSETZUNG DER STUDIE.....	8
<b><u>2. MATERIAL UND METHODEN .....</u></b>	<b><u>9</u></b>
2.1. STUDIENAUFBAU .....	9
2.2. MATERIALIEN.....	11
2.4. HERSTELLUNG DER TISSUE MICROARRAYS (TMAs) .....	13
2.7. ERHEBUNG DES MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS .....	19
2.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	20
<b><u>3. ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>22</u></b>
3.1. PGRMC1: KORRELATION MIT DEM WHO GRAD .....	22
3.2. PGRMC1: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN .....	22
3.3. PGRMC1: KORRELATION MIT WEITEREN TUMORPARAMETERN .....	24
3.4. PGRMC1: GESAMT- UND REZIDIV-FREIES ÜBERLEBEN – MULTIVARIATANALYSE BEI WHO GRAD 4 .....	25
3.5. TRIM33: KORRELATION MIT DEM WHO GRAD.....	27
3.6. TRIM33: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN .....	27
3.7. TRIM33: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN NACH ERNEUTEM CUT-OFF .....	29
3.8. TRIM33: KORRELATION MIT WEITEREN TUMORPARAMETERN.....	32
3.9. TRIM33: GESAMT- UND REZIDIV-FREIES ÜBERLEBEN – MULTIVARIATANALYSE IN WHO GRAD 4 .....	33
3.10. PRAS40: KORRELATION MIT DEM WHO-GRAD .....	35
3.11. PRAS40: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN.....	35
3.12. PRAS40: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN NACH ERNEUTEM CUT-OFF .....	37
3.13. PRAS40: KORRELATION MIT WEITEREN TUMORPARAMETERN .....	40
3.14. PGRMC1/TRIM33: ASSOZIATION MIT DEM GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBEN ...	41
<b><u>4. DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>44</u></b>
4.1. BIOMETRISCHE DATEN IN BEZUG ZU VERGLEICHSKOLLEKTIVEN.....	44

<b>4.2. PGRMC1 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. TRIM33 .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4. PRAS40.....</b>	<b>54</b>
<b>4.5. PGRMC1/TRIM33.....</b>	<b>56</b>
<b>4.6. DISKUSSION DER METHODEN UND LIMITATIONEN .....</b>	<b>58</b>
4.6.1. PATIENTENKOLLEKTIV.....	58
4.6.2. TISSUE MICROARRAY.....	58
4.6.3. IMMUNHISTOCHEMIE.....	59
<b>4.7. AUSBLICK.....</b>	<b>59</b>
<b><u>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>62</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Akt	Serin/Threonin-Kinase
ALC1	Amplified in Liver Cancer
BET	Bromo- und extraterminale Domäne
CD66b	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8
COXII	Cyclooxygenase II
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrome P450
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAB	Diaminobenzidin
DAP1	Death Associated Protein 1
DNA	Desoxyribonucleotidacid
EGFR	Epidermal Growth Factor
F(ab)2	Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
Fc	Antikörperfragment mit rezeptorbindender Domäne
GBM	Glioblastom
GS-626510	Bromodomain Containing Protein 4 Inhibitor
Gy	Gray
H	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HIER	Heat Induced Epitope Release
HR	Hazard Ratio
HRP	Horse-Reddish-Peroxidase
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten
IDH	Isocitratdehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
iNOS	Isoform NO-Synthase
ITGB1	Integrin beta-1
JAK	Januskinase
JQ1	Selektiver BET Inhibitor
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall

Ki67	Proliferationsmarker
LOH	Loss Of Heterozygosity
MAP1LC3-II	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPR	Membrane-Associated Progesterone Receptor
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC	Mammalian Target of Rapamycin Complex
MYC	Menschliches Gen
OP	Operation
P4	Progesteron
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDA	Acrylamid Piperazine Diacrylamid
PGRMC1	Progesterone Receptor Component 1
pH	Potentia hydrogenii
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PRAS40	Prolin Rich Substrate of Akt
RAS	Rat Sarcoma
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SMAD2/3/4	Proteine des TGFbeta Signalwegs
Snail	Snail Family Transcriptional Repressor 1
STAT	Signal Transducers and Activatoos of Transcription
TBS	Tert-Butyl-Dimethyl-Silylether-Schutzgruppe
TGF	Transforming Growth Factor
Themed	Tetramethylethylethylendiamin
TMA	Tissue Microarray
TP53	TP53-Tumorsupressorgen
TRIM33	Transcription Intermediate Factor 33
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN	Polysorbat 20
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1. Gliome

In Deutschland wurden laut des Robert-Koch-Institut im Jahr 2016 7.430 bösartige Tumore des ZNS diagnostiziert (1). Mit einem Anteil von 1,5 % aller erfassten Krebserkrankungen hat das ZNS eine relativ geringe Inzidenz. Diese betrug bei den Frauen 5,9 pro 100.000 Menschen, bei den Männern 7,6 pro 100.000 Menschen (1). In den USA ergibt sich mit einer Inzidenz von 7,08 pro 100.000 Einwohner ein ähnliches Bild (2). Diese Inzidenzraten sind seit über 20 Jahren relativ stabil. Den Großteil der Neubildungen ist histologisch den Gliomen zuzuordnen. Gliome zählen zu den hirneigenen Tumoren, eine neoplastische Erkrankung, die sich *de novo* im Gehirn entwickeln und meistens glialer Genese sind. Hierunter fallen Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome sowie deren Mischformen.

Die Weltgesundheitsorganisation WHO klassifiziert Hirntumore in vier Malignitätsgrade (Grad 1-4), zu deren Ermittlung histopathologische und molekulare Merkmale herangezogen werden. In dieser Studie wurden Astrozytome der WHO Grade 2-3 und Glioblastome des WHO Grades 4 untersucht, wobei die Großzahl der Proben den Glioblastomen zuzuordnen war und diese daher den Schwerpunkt der Betrachtung ergeben. Die Einteilung der in unserer Studie eingeschlossenen Astrozytome erfolgte nach Kriterien der WHO Klassifikation von 2016.

### 1.2. Das Glioblastom

Das Glioblastom ist ein infiltrativ diffus wachsender Tumor, der vorwiegend aus Astrozyten hervorgeht und charakteristisch pleomorphe Zellen, mikrovaskuläre Proliferation und Nekroseareale aufweist (3). Die starke Entdifferenzierung und das schnelle Wachstum machen das Glioblastom zu einem der tödlichsten Tumorarten. Mit einer Inzidenz zwischen 3-4 pro 100.000 Einwohner ist es zudem die häufigste aller bösartigen Neubildungen im Gehirn (2-5). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 62 Jahren (2-5). Dennoch treten Glioblastome in allen Altersgruppen auf, wobei aber mehr als 80% bei über 50-Jährigen und lediglich 6,9 % bei unter 39-Jährigen erfasst wurden (5).

Ferner gibt es geschlechterspezifische Unterschiede bei denen Männer im Verhältnis 1,26-1,66:1 ein höheres Erkrankungsrisiko aufweisen als Frauen (2,4–6). Durch das invasive Tumorwachstum gestaltet sich die operative Totalresektion als schwierig bzw. unmöglich, sodass kein kuratives Vorgehen möglich und die Wahrscheinlichkeit der Rezidivbildung hoch ist (7).

Glioblastome, IDH-Wildtyp zählen in der aktuellen WHO Klassifikation von 2021 neben dem Oligodendrogliom, 1p/19q kodeltetiert und dem Astrozytom, IDH-Mutation zur neu definierten Gruppe der diffusen Gliome des Erwachsenenalters (8). Vor dieser Neugruppierung der Gliome wurde das Glioblastom in Primär oder Sekundär eingeteilt. Primäre entwickelten sich *de novo* aus gesundem glialen Gewebe, während sich Sekundäre aus einer niedergradigen astrozytären Vorstufe herausbildeten. Histologisch waren die beiden nicht voneinander zu unterscheiden. Molekularbiologische Merkmale, wie die TP53 Mutation, welche häufiger im sekundären Glioblastom zu finden ist (65 % vs. 30 %) (5,9) und das meist höhere Erkrankungsalter bei *de novo* Glioblastomen, erlaubten eine Differenzierung (10).

### 1.3. Pathogenese beim Glioblastom

Die genauen pathogenen Mechanismen für die Entstehung von Glioblastomen ist bisher nicht bekannt, jedoch konnten charakteristische genetische Anomalien, Amplifikationen und Chromosomenmutationen identifiziert werden, die zur aktuellen Klassifikation genutzt werden (8). Genetisch gekennzeichnet ist das Glioblastom durch eine Mutation der Telomerase (TERT), welche bei 84% der Glioblastome zu finden ist (11). Zusätzlich imponiert eine Amplifikation vom EGFR (12). Weitere relevante pathogene Mechanismen sind der Verlust von Chromosom 10 und Gewinn von Chromosom 7 (+7/-10) (13), Mutationen oder Deletionen von PTEN (phosphatase and tensin homolog) (14).

Die Mutation des IDH1 Gen ist charakteristisch für astrozytäre und oligodendriale Tumore und besitzt einen hohen Stellenwert in der Klassifizierung hirneigener Tumore. So wurde in der Klassifikation der WHO von 2016 das Glioblastom in IDH-Wildtyp und IDH-Mutation unterschieden (3). In der aktualisierten WHO Klassifikation von 2021 erfolgte eine neue Einteilung sodass Tumore mit IDH-Mutation nun zu den Astrozytomen Grad 4 gezählt werden (8).



Das Glioblastom (IDH-Wildtyp) zeigt ein höheres Erkrankungsalter sowie eine schlechtere Prognose als das IDH-mutierte Astrozytom Grad 4 (15). Des Weiteren konnten in-vivo-Versuche zeigen, dass eine Mutation von IDH1 R132H zu reduzierten Wachstumsraten und erhöhter Apoptose von Tumorzellen führt. Zudem ist die Invasion und Migration in umliegendes Gewebe behindert (16).

Primären Glioblastome nach Definition der WHO Klassifikation von 2016, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellen, sind selten mutiert (< 5 %) (6). Die Erhebung des IDH1 Mutationsstatus diente zur Sicherstellung, dass die Patient\*innen, die in das Kollektiv aufgenommen wurden, an einem primären Glioblastom erkrankt waren. Mit einem Verhältnis von 186 nicht-Mutierten zu 13 Mutierten ist dies empirisch gesichert (6).

### 1.4. Prognose

Das Glioblastom hat trotz operativer und neuroonkologischer Fortschritte eine gleichbleibend sehr schlechte Prognose (2). Die mittlere Gesamtüberlebenszeit schwankt stark, je nach Erhebung zwischen 3 bis 21,7 Monaten (2,4,5,17–19). Zwei Jahr nach Diagnose leben noch zwischen 3,3 und 33 % der Patient\*innen (20,21), nach 5 Jahren nur noch 3,4 bis 5 % (4,17,21). Mittlerweile wurden viele Faktoren auf die Prognose von Glioblastomen untersucht, doch nur wenige stellten sich als relevant heraus. Etablierte Parameter für eine bessere Prognose sind das weibliche Geschlecht, ein junges Erkrankungsalter, ein hoher Karnofsky-Index und eine hohe Punktzahl im Mini-Mental-Status-Test, welcher die kognitive Leistungsfähigkeit überprüft (18,22–25). Zudem profitieren Patient\*innen von der Methylierung des MGMT-Gens, der Mutation des IDH1- oder IDH2-Gens und einer onkologisch relevanten Resektion (26–28). Zudem hat die Therapie einen bedeutenden Einfluss auf die Prognose (s. Kapitel 1.5.).

Die MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das Alkylgruppen des DNA-Bausteins Guanin entfernt. Mit diesem Funktionsmechanismus wirkt die MGMT so dem Wirkungsprinzip des alkylierenden Chemotherapeutikums Temozolomid entgegen (29). Ist das MGMT-Gen methyliert bleibt die Expression aus. Die Methylierung des MGMT-Promotors zählt heutzutage aus prognostischer Sicht zu den wichtigsten

Markern und wird standardmäßig nach operativen Eingriffen bestimmt. MGMT-methylierte Glioblastome haben, unabhängig der Therapie, eine signifikant niedrigere Hazard Ratio von 0,45 und in Verbindung mit einer Temozolomid-Therapie eine verlängerte Lebenserwartung (30).

Neben den genannten klinischen und molekularen Parametern zeigen auch histopathologische Eigenschaften einen Einfluss auf die Prognose. Das Vorliegen von Riesenzellen, fokaler oligodendroglialer Differenzierung und das Fehlen anaplastischer Elemente sprechen für ein längeres Überleben (31). Zudem wurden bei Langzeitüberlebenden eine TP53 Überexpression beobachtet und einen 19q Chromosomenverlust als charakteristisch angesehen (32,33).

### 1.5. Therapie

Die Glioblastomtherapie ist stark abhängig vom Allgemeinzustand der Patient\*innen und beinhaltet im Wesentlichen eine operative Intervention und eine postoperative kombinierte Strahlen-/Chemotherapie. Klinischer Standard bei einem chirurgischen Eingriff ist ein prä-operatives MRT des Schädels mit Kontrastmittel und eine darauf basierende MRT-gestützte OP-Planung, die das Resektionsergebnis signifikant verbessert (34). Zudem hat sich in diesem Zusammenhang die fluoreszenzgestützte intraoperative Gabe von 5-Aminolävulinsäure bewährt (35). Bei der Operation sollte ein maximales Maß an Tumorresektion angestrebt werden, da so ein längeres Überleben der Patient\*innen erreicht wird (22,36). Da es sich bei Glioblastomen allerdings um nicht kurativ operable Tumore handelt, sollte in Hinblick auf neue mögliche neurologische Defizite auf absolute Radikalität verzichtet werden (37).

Im Anschluss oder bei konventioneller Behandlung ist eine lokale Strahlentherapie indiziert. Hier ist eine konformale Therapie mit 54-60 Gy Standard, De- oder Eskalationen sind dennoch möglich (38). Bei einer Hyperfraktionierung ist die Strahlentoleranz des Hirngewebes zu beachten, bei der die Inzidenz von Nekrosen von 5 % bei 72 Gy Gesamtdosis auf 10 % bei 90 Gy Gesamtdosis ansteigt (39). Zudem stellte sich heraus, dass eine Ganzhirnbestrahlung im Gegensatz zur Lokalen keinerlei Vorteile bietet (37).

Der bislang größte Durchbruch in der Therapie erfolgte mit der Gabe von Temozolomid, welche die mediane Überlebenszeit von Patient\*innen mit alleiniger Strahlentherapie von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate verlängerte und die 2-Jahres-Überlebensrate von 10 auf 26 Prozent steigerte (40). Dabei handelt es sich um ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches Blut-Hirnschrankengängig ist (41). In besonderer Form profitieren Patient\*innen mit einem methylierten MGMT-Promotor, die 2-Jahres-Überlebensrate lag hier bei sogar 46 Prozent (26).

Nichtsdestotrotz bleibt es eine palliative Therapie, die das Leben nur marginal verlängert, sodass verschiedene neue Therapieformen in Erprobung sind. Ansatzpunkte sind immunologische Verfahren wie die vielversprechende Tumorimpfung, bei der Immunzellen des Patienten extrahiert, ex vivo tumorspezifisch vermehrt und anschließend reinfundiert werden (42). Ferner wird die Möglichkeit der onkolytischen Virustherapie, bei der Zika-Viren zur Tumorzellbekämpfung genutzt werden, erprobt (43).

## 1.6. PGRMC1

Die Progesteronrezeptormembran Komponente 1, kurz PGRMC1, ist Mitglied der „Membrane-Associated Progesterone Receptor“ (MAPR) Familie (44) und wird von dem gleichnamigen Gen auf dem X-Chromosom codiert (45). Lokalisiert ist das Protein meist an der Membran des ER (46) und in verschiedenen stoffwechselaktiven Zellen, wie in der Leber oder Nebennierenrinde zu finden (47,48). Charakteristisch für das Protein ist die Häm-bindende Region, die sich mit der des Zytochrom-b<sub>5</sub> ähnelt (49). Die genaue Funktion des Proteins ist nicht abschließend geklärt, dennoch sind diverse Funktionen bekannt. Meyer *et al.* identifizierten 1996 die Progesteronbindung von PGRMC1 (47), deren Funktion aber weiterhin ungeklärt ist. Eine große Rolle spielt die Häm-bindende Region, über die mittels Häms ein PGRMC1-Dimer entsteht. Dieser bei Eukaryoten einmalige Vorgang wurde als „Heme-Stacking Dimer“ beschrieben (50). Das Dimer interagiert, anders als das einzelne Protein, mit dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), der in verschiedenen Tumoren für die Tumorgenese mitverantwortlich ist (51). Reguliert wird die Dimerisation von der Verfügbarkeit von Häm sowie dem Vorhandensein von Kohlenstoffmonoxid, welches die Bildung verhindert (52).

Darüber hinaus nimmt PGRMC1, durch Bindung und Regulation von Zytochrome P450, Einfluss auf den zellulären Medikamentenmetabolismus (53) und die Cholesterolsynthese (54). Diese Interaktion kann zur Chemoresistenz von Tumorzellen führen, wie Kabe *et al.* am Beispiel von Doxorubicin belegen (50). Weitere krebisrelevante Funktionen sind die Unterdrückung der p53 Expression und der Supprimierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Weg, wodurch die Zelle teilungsaktiv bleibt (55). Ferner agiert PGRMC1 anti-apoptotisch in uterinen Granulationszellen (56) sowie zellprotektiv und wachstumsfördernd bei Brustkrebs (57).

Aktuelle Studien zeigen aber auch, dass hohe PGRMC1 Expression in Kopf-Hals-Karzinomen zu einer effektiven Elimination der Tumorzellen durch Ferroptoseinduktoren führte (58).

Die Rolle von PGRMC1 in Glioblastomen ist weitgehend unbekannt und Ziel dieser Studie ist daher der Zusammenhang von Expression und Gesamtüberleben der eingeschlossenen Glioblastompatient\*innen.

## 1.7. TRIM33

Der intermediäre Transkriptionsfaktor 1 gamma (TRIM33 oder TIF1 $\gamma$ ) gehört zur Familie der E3 Ubiquitinligasen mit einer Ring-Box-Coiled-Coil Region (59). Das Protein hat eine Größe von 123 kDa und wird vom TRIM33-Gen auf Chromosom 1 codiert (60). Die am N-Terminus gelegene Ring-Box-Coiled-Coil Einheit fungiert als Ligase und ubiquitiniert physiologisch SMAD4, welches Bestandteil des TGF $\beta$ -Signalwegs ist und  $\beta$ -Catenin, das zum Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg gehört (61,62). Am C-Terminus liegt ein PHD-Finger sowie eine Bromodomäne, über die TRIM33 mit den Histonen 3 und 4 bindet (63). Zwischen den beiden Endregionen ist ein Middle Linker zu finden, der mit SMAD2 und SMAD3 interagiert, die ebenfalls Teil des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs sind (64).

Unter physiologischen Bedingungen funktioniert TRIM33 insbesondere als Transkriptionsfaktor und steuert die Genexpression hämatopoetischen und reguliert die Hämatopoese sowie das Zellwachstum über Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs (65,66). Darüber hinaus kann TRIM33, durch Interaktion mit ALC1 (Amplified In Liver Cancer), eine PARP-abhängige DNA-Reparatur anregen (67).

Der TGF $\beta$ -Signalweg spielt eine fundamentale Rolle bei der Tumorentstehung und der Tumorprogression verschiedener Krebsarten, eingeschlossen von Glioblastomen (68). Gleiches gilt für den Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalweg (69), dessen Relevanz bei Glioblastomen im Besonderen durch die Interaktion mit IDH deutlich wird (70).

Die Rolle von TRIM33 in Tumoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird das Protein als Tumorpromotor als auch als Tumorsuppressor beschrieben.

## 1.8. PRAS40

Das prolinreiche Akt Substrat mit einer Größe von 40 kDa (PRAS40) wird vom AKT1S1 Gene (Akt1 Substrate 1) codiert und ist auf dem Chromosom 19q13.33 lokalisiert. 15 Prozent des Proteins werden von Prolin gebildet wobei die Funktion der zwei prolinreichen Anteile am N-Terminus noch ungeklärt sind (71). Entdeckt wurde das Protein 2003 in einer Reihe von Versuchen mit insulinbehandelten Zellen von Kovacina *et al.* (72). Lokalisiert ist PRAS40 im Zellkern und kann über seine Exportsequenz ins Zytoplasma transportiert werden (73). Je nach Lokalisation hat PRAS40 verschiedene Funktionen. Die Hauptfunktion liegt im Zytoplasma in Form der Regulation des mTOR Signalwegs. Dabei greift PRAS40 zweierlei in die Kaskade ein, einmal als Substrat für mTORC1, wodurch das Protein phosphoryliert wird und damit als Downstream-Regulator von mTORC1 wirkt (74). Andererseits fungiert phosphoryliertes PRAS40 als Upstream-Regulator, indem es über den Insulinrezeptor Akt phosphoryliert und damit eine Aktivierung des Akt/mTOR Signalweg bewirkt (75). Im Glioblastom ist der Signalweg mit verschiedenen zellulären Prozessen assoziiert, unter anderem mit Tumorfördernden wie Proliferation, Migration und längerem Zellüberleben (76).

## 1.9. Zielsetzung der Studie

Das Glioblastom zeichnet sich durch seine besonders schlechte Prognose für die betroffenen Patient\*innen aus. Dennoch gibt es bis dato sehr wenige Biomarker, die eine prognostische Relevanz aufweisen. Ziel dieser Studie war daher, neue prognostische Biomarker zu identifizieren. Hierfür prüften wir den Zusammenhang der drei Marker Kandidaten PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 sowie deren Kombination auf den Einfluss auf das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben. Basis der Untersuchung war das selbsterstellte Kollektiv aus Patient\*innen, die von 2005 bis 2018 in neurochirurgischer Behandlung am Uniklinikum Magdeburg waren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienaufbau

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Analyse von Paraffin-eingebettetem Tumormaterial, welches von Patient\*innen mit supratentoriell diffus infiltrierenden Hirntumoren stammt. Die Größe der Kohorte umfasst 263 Patient\*innen, die im Zeitraum von 2005 bis 2018 in der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Magdeburg operiert wurden.

Die Datengenerierung erfolgte mittels ICD-Klassifizierung in der klinikinternen Datenbank CGM MEDICO. Weiterführende und fehlende Informationen wurden mit Hilfe der behandelnden Hausärzte/Kliniken und dem Krebsregister Sachsen-Anhalt ergänzt.

Das Patientenkollektiv wurde anhand der WHO-Klassifikation für hirneigene Tumore in drei Hauptgruppen WHO Grad 2, WHO Grad 3 und WHO Grad 4 (Glioblastom) eingeteilt. Die Patientengruppen umfassen ausschließlich Patienten mit Primären. Das mediane Erkrankungsalter der Patient\*innen betrug für WHO Grad 2 43 Jahre, für WHO Grad 3 49 Jahre und für WHO Grad 4 61 Jahre.

Die patientenbezogenen Daten wurden gemäß vorher festgelegten krankheitsrelevanten Aspekten gesammelt und ausschnittsweise vergleichend dargestellt (Tab. 1). Neben der Diagnose und der durchgeführten Therapie wurden zusätzlich verschiedenen klinische Aspekte wie dem Ausmaß der Tumorsektion, der MGMT-Methylierungsstatus, die IDH1-Mutation, der Karnofsky-Index sowie das Sterbedatum erhoben.

Die Biomarkerexpression im Gewebe wurde mittels immunhistochemischer Färbung detektiert und anschließend die Ergebnisse jedes Patienten hinsichtlich einer Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und dem Färbeverhalten analysiert.

Die Durchführung dieser Studie wurde unter Einhaltung aller dafür vorgesehenen Kriterien durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg genehmigt.(NeurOBIOM Nr. 146/19)

	WHO Grad 2		WHO Grad 3		WHO Grad 4	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
<b>Gesamtzahl</b>	11	100	19	100	233	100
<b>Geschlecht</b>						
Weiblich	4	36,4	8	42,1	106	47,5
Männlich	7	63,6	11	57,9	127	52,5
<b>Karnofsky</b>						
0	0	0	1	5,3	3	1,3
10	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	2	0,9
30	0	0	1	5,3	11	4,7
40	0	0	1	5,3	10	4,3
50	1	9,1	2	10,5	34	14,6
60	1	9,1	6	31,5	45	19,3
70	8	72,7	6	31,5	81	34,7
80	0	0	0	0	22	9,4
90	1	9,1	2	10,6	23	9,9
100	0	0	0	0	0	0
n.d.	0	0	0	0	2	0,9
<b>Therapie</b>						
OP	1	9,1	3	15,8	40	17,2
OP+RTX	3	27,3	1	5,3	25	10,7
OP+CTX	0	0	2	10,5	1	0,4
OP+RCTX	6	54,5	11	57,9	161	69,1
n.d.	1	9,1	2	10,5	6	2,6
<b>Resektionsstatus</b>						
Subtotal/Biopsie	5	45,5	11	57,9	134	57,5
Total	5	45,5	6	31,6	87	37,3
n.d.	1	9,1	2	10,5	12	5,2
<b>MGMT- Methylierung</b>						
Methyliert	3	27,3	9	47,4	137	58,8
Unmethyliert	7	63,6	9	47,4	85	36,5
n.d.	1	9,1	1	5,2	11	4,7
<b>IDH1</b>						
negativ	4	36,4	5	26,3	186	79,8
positiv	6	54,5	5	26,3	13	5,6
n.d.	1	9,1	9	47,4	34	14,6

CTX = Chemotherapie RTX = Radiotherapie RCTX = Radiochemotherapie n.d. = not determinable

**Tabelle 1: Charakteristika des Patientenkollektivs**



## 2.2. Materialien

<b>Laboraausstattung</b>	
<b>Aperio Versa 8</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Bio Photometer</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Biometra High Voltage Power Pack PP3000</b>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
<b>Biometra Schüttler BT16</b>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
<b>Biometra TSC Thermo Shaker</b>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
<b>BZ-X810 All-in-One Fluoreszenzmikroskop</b>	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
<b>Centrifuge 5417R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Elektronik Rührer MONO</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Elektrophoresekammer Kühler</b>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
<b>Histo Core Arcadia C</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Histo Core Arcadia H</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Histo Core Multicut</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Leica Autostainer XL</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Mastercycler Gradient</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Mini Vortex</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Multiphor 2</b>	Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
<b>Pipetten</b>	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
<b>Primo Star</b>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
<b>Thermomixer Comfort</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Tischzentrifuge</b>	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

<b>Material</b>	
<b>Arraymold kit E</b>	Arraymold, Riverton, UT, USA
<b>Deckgläser 24x50mm</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>double-edge Blades PTFE coated Stainless Steel</b>	Personna, St. Louis, MO, USA
<b>Menzel-Gläser Superfrost Plus</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland

<b>Chemikalien</b>	
<b>2-Propanol, Rotipuran &gt;=99,8 %</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Acrylamid 40%</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Acrylamid Piperazine diacrylamid (PDA)</b>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Amoniumpersulfat</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Antibody Diluent OP Quanto</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Aqua</b>	B Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Citratpuffer (PT Module Buffer 1)</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>DAB Quanto</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Eosin Y</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Essigsäure 100%</b>	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
<b>Ethanol 99%</b>	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
<b>Ethanol vergällt 99,8%</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>EZ DNA Methylation Kit</b>	Zymo Reserach, Freiburg, Deutschland
<b>Formalin 4,0% (35-37%)</b>	Fischar, Saarbrücken, Deutschland

<b>Formicacid 98-100%</b>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Glycerin &gt;99,5% Rotipuran</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Hot Star Taq Plus Mastermix 2x</b>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<b>HRP Polymer Quanto</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Mountex</b>	Medite Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
<b>Natriumcarbonat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Nucleo Spin Tissue</b>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<b>Papanicolaus Lösung</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Primary Antibody Amplifier Quanto</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Rnase-Free-Water</b>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<b>Roticlear für Histologie</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Salpetersäure 65%</b>	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
<b>Salzsäure rauchend 37 %</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Silbernitrat Lösung 99% reinst</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Surgipath Paraplast</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>Themed</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Tris Base</b>	Biorad, Hercules, CA, USA
<b>Tris Pufferan mind 99,8%</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Tween 20</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ultravision Protein Block</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Ultravision Hydrogen Peroxide Block</b>	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Xylol 98,5%</b>	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

<b>Antikörper und Primer</b>	
<b>MGMT-methyliert rückwärts 5'-CAC CGT CCC GAA AAA AAA CTC CG-3'</b>	Biomers, Ulm, Deutschland
<b>MGMT-methyliert vorwärts 5'-GTT TTT AGA ACG TTT TGC GTT TCG AC-3'</b>	Biomers, Ulm, Deutschland
<b>MGMT-unmethyliert rückwärts 5'-CTA CCA CCA TCC CAA AAA AAA ACT CCA-3'</b>	Biomers, Ulm, Deutschland
<b>MGMT-unmethyliert vorwärts 5'-TGT GTT TTT AGA ATG TTT TGT GTT TTG AT-3'</b>	Biomers, Ulm, Deutschland
<b>PGRMC1 (D6M5M) XP Rabbit mAb</b>	Cell Signalling, Danver, MA, USA
<b>PRAS40 (D23C7) XP Rabbit mAb</b>	Cell Signalling, Danver, MA, USA
<b>TIF1<math>\gamma</math> (TRIMM33) 10yg/100yl</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
<b>Universal Methylated Human DNA Standard (5yg/20yl)</b>	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

<b>Software</b>	
<b>Adobe Illustrator</b>	Adobe Inc., San Jose, CA, USA
<b>Adobe Photoshop</b>	Adobe Inc., San Jose, CA, USA
<b>Apeiro Image Scope</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
<b>CGM Medico</b>	CGM Clinical Europe GmbH
<b>Image J</b>	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/index.html">https://imagej.nih.gov/ij/index.html</a>
<b>PACS Chilliweb</b>	Nexus / Chilli GmbH
<b>SPSS</b>	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

### 2.3. Anfertigung der HE-Übersichtsfärbungen

Zur Anfertigung der Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung wurden die Paraffinblöcke mit einer Stärke von zwei  $\mu\text{m}$  geschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Die anschließende Färbung erfolgte mit einem Färbeautomaten (Leica Autostainer XL). Die Notwendigkeit der Übersichtsfärbung besteht darin, geeignete Gewebeareale für die TMAs zu identifizieren.

### 2.4. Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs)

Für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Gewebeproben erfolgte die Herstellung von Tissue Microarrays. Sie stellen eine effiziente Methode zur Analyse von einer großen Anzahl von Gewebeproben dar, die bei dem großen Patientenkollektiv gegeben ist. Mit Hilfe des Arraymold kit E wurden die TMA Empfängerblöcke gefertigt. Passende Areale auf den Tumorgewebeproben wurden mittels Lichtmikroskopie sowie der HE-Übersichtsfärbung ausgewählt und anschließend gestanzt. Nach der Überführung in den Empfängerblock wurden die fertigen TMAs in zwei  $\mu\text{m}$  starke Bereiche geschnitten und auf einen Objektträger gebracht.

## 2.5. Immunhistochemische Färbung

Die Tissue Microarrays wurden unter Anwendung der direkten Immunhistochemie gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion von primären und sekundären Antikörpern welche ein bestimmtes Antigen binden und daraufhin ein sichtbares Farbsignal aussenden.

Als primäre Antikörper wurden PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 genutzt, welche aus Kaninchenserum gewonnen wurden. Der primäre Antikörper bindet mit seinem F(ab)2-Teil an spezifische Antigene auf der Gewebeprobe und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex. Als sekundärer Antikörper wurde ein kaninchenspezifischer AK genutzt, der an den unspezifischen Fc-Teil des primären Antikörpers bindet. Durch die Kopplung mit Meerrettichperoxidase und anschließender enzymatischer Spaltung entsteht das Farbsignal, welches sich mikro- sowie makroskopisch detektieren lässt. Um die Färbung durchzuführen muss das Gewebe, im ersten Schritt, vom Paraffin befreit werden. Dazu werden die Schnitte jeweils zweimal für zehn Minuten in Roticlear gegeben, das als Lösungsmittel das Paraffin vom Gewebe löst. Danach folgt eine absteigende Alkoholreihe aus zweimal Isopropanol 100% und einmal Isopropanol 70%, in denen die Schnitte jeweils fünf Minuten verweilen. Anschließend wurden die Proben mittels destillierten Wassers zweimalig für je fünf Minuten hydriert.

Durch die Paraffinfixierung des Gewebes befinden sich die enthaltenen Proteine in einer sehr schwer zugänglichen Konformation, sodass zur weiteren Färbung eine Rekonfiguration in die Ursprungsform erfolgen muss. Hierfür diente die Zugabe von saurem Citratpuffer Heat-induced Epitope Retrieval (HIER). Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass ein Milieu von pH 6.0 entstanden ist. Die Proben wurden im Puffer zunächst für 90 Sekunden in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und darauf sechsmalig mit intermittierenden Pausen weiter erhitzt. Dem folgte eine 30-minütige Abkühlung auf Zimmertemperatur. Nach diesem Schritt war die Immunreaktivität der im Gewebe enthaltenen Proteine wiederhergestellt.

Nach Abschluss der Demaskierung wurde der Citratpuffer schrittweise mit destilliertem Wasser entfernt und die Proben daraufhin zehn Minuten in TBS-TWEEN-Puffer (Tris-buffered Saline + Tween 20) (1:20) gewaschen.

Da im Gewebe endogene Peroxidasen vorkommen, folgt eine Blockade mittels 200 µl Peroxidblock, der für zehn Minuten vollständig auf die Proben aufgetragen wurde. Daraufhin erfolgten drei weitere Waschungen im TBS-TWEEN-Puffer für jeweils fünf Minuten. Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper zu verhindern, schloss sich die Behandlung mit 200 µl Ultra Vision Protein Block an, welcher für genau fünf Minuten vollständig auf die Probe aufgetragen wurde. Bei dem Proteinblock handelt es sich um tierisches Serum, deren enthaltene Proteine an unspezifische Epitope im Gewebe binden und diese maskieren. Eine zu lange Kontaktzeit muss vermieden werden, da ansonsten auch spezifische Bindungsstellen blockiert und so falsche Färbeergebnisse erzeugt werden können.

Anschließend erfolgten drei weitere Waschgänge für jeweils fünf Minuten im TBS TWEEN.

Im nächsten Schritt erfolgte die Benetzung der Proben mit dem primären Antikörper. Dieser wurde vorher in bestimmter Konzentration, welche durch Testfärbungen bestimmt wurde, mit Antibody Diluent OP Quanto verdünnt, sodass folgende Endkonzentrationen verwendet wurden:

PGRMC1	0,112 µg/ml
TRIM33	0,100 µg/ml
PRAS40	1,314 µg/ml

Jeweils 200µl der Antikörperlösung wurden auf den Objektträger pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach der nächtlichen Inkubation folgten drei Waschschrte im TBS-TWEEN-Puffer und die Zugabe von 200 µl Primary Antibody Amplifier mit einer Reaktionszeit von zehn Minuten. Letzterer Schritt hat eine optimale Bindungskapazität des primären Antikörpers zur Folge. Weitere drei Waschschrte in TBS TWEEN folgten. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper mit der gekoppelten Horseradish Peroxidase (HRP) hinzugefügt und für 15 Minuten in dunkler Umgebung inkubiert. Die polymeren Bindungseigenschaften der HRP führen zur Interaktion vieler F(ab)<sub>2</sub>-Teile

des sekundären Antikörpers mit einzelnen Fc-Teilen der bereits gebundenen primären Antikörper. So wird eine optimale Bindungsfrequenz erzeugt und dadurch eine maximale Signalreaktion bei relativ kurzer Inkubationszeit. Nach erneuter Waschung mit TBS TWEEN in dunkler Umgebung wurde das Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Substrate/Chromogen mix) auf die Objektträger aufgetragen.

Bei der Anfertigung des Substratchromogen wurde ein Tropfen (etwa 30  $\mu$ l) Chromogen mit einem ml DAB Substrat gemischt und daraufhin 200  $\mu$ l auf die Proben flächig verteilt. Die folgende Inkubationszeit war antikörperspezifisch und wurde im Vorfeld im Rahmen einer Testfärbung ermittelt. Die enzymatische Spaltung des Substratchromogens mit HRP erzeugt die detektierbare Färbung des Gewebes. Zum Abbruch der Reaktion wurden die Objektträger für dreimal fünf Minuten in destilliertes Wasser gestellt.

Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Proben nachfolgend mit Hämatoxylin für drei Minuten gegengefärbt und für fünf Minuten unter laufendem lauwarmen Wasser abgespült. Um das Eindecken der Schnitte vorzubereiten folgte eine Dehydrierung mittels Isopropanol 100%, in dem die Schnitte einmal kurz und zweimal für je fünf Minuten verweilten.

Zuletzt wurden auf die entwässerten Gewebeproben ein Tropfen (ca. 30  $\mu$ l) des Eindeckmediums Mountex gegeben und mit einem Eindeckglas fixiert. Nachdem die Proben getrocknet waren, konnten sie digitalisiert werden und standen zur Analyse bereit.

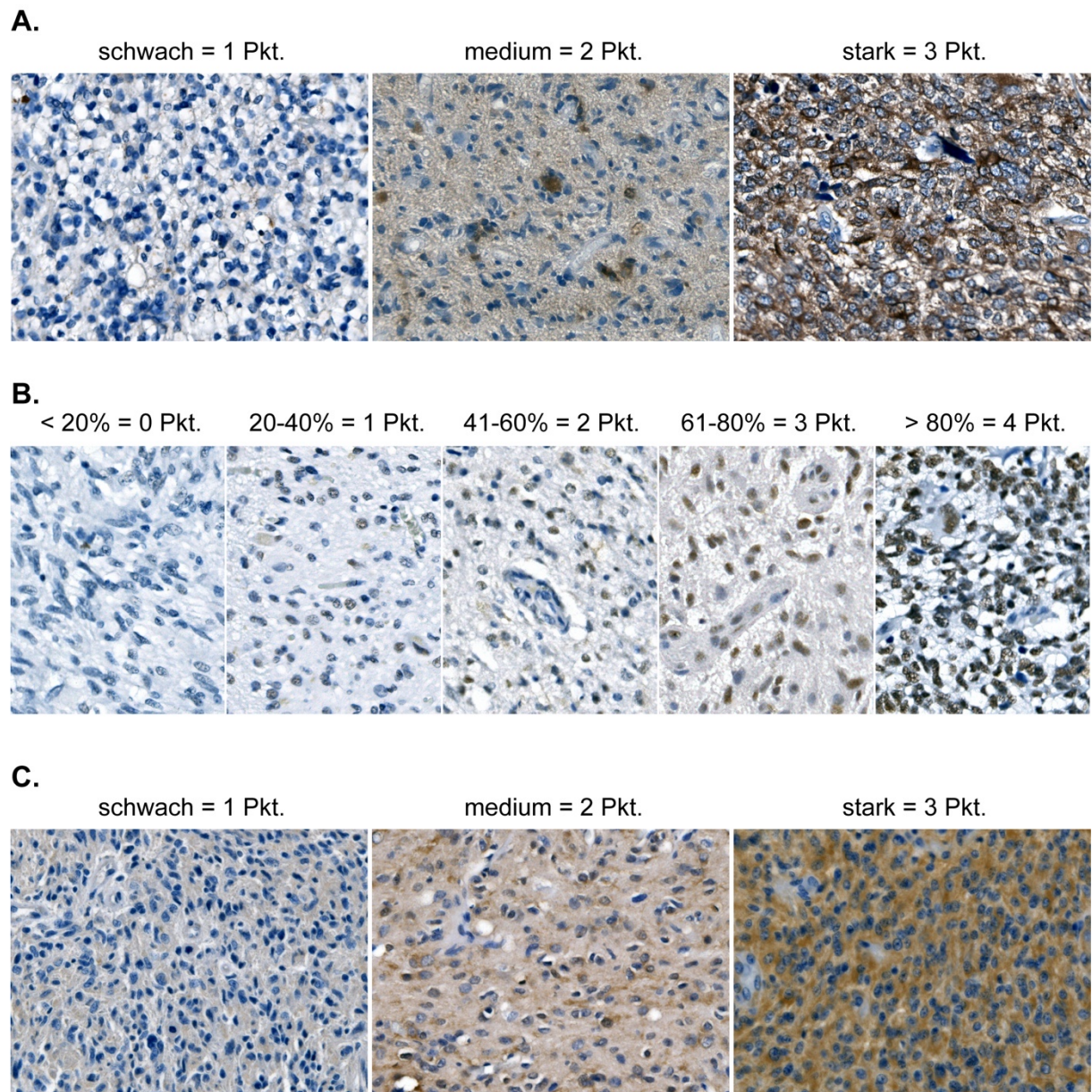
## 2.6. Immunhistochemische Analyse

Die digitalisierten Objektträger wurden mittels des Programm Aperio ImageScope ausgewertet. Zur Einschätzung des Färbeverhaltens konnte über die Einstellung des Kontrasts (C) und der Helligkeit (B) die optimale Belichtung des Schnittes erreicht werden. Die Auswertung erfolgte in 20-facher Vergrößerung. Je nach Lokalisation der Antikörper in der Zelle(Kern/Zytoplasma) erfolgte die Bewertung durch unterschiedliche Scoringverfahren. Die zytoplasmatischen Färbungen von PGRMC1 und wurden mit dem H-Score bewertet, der die Intensität erfasst (1=weak, 2=medium, 3=strong). Hierbei wird der gesamte Tumorauschnitt anhand einer selbst erstellten Vorlage nach der Intensität prozentual analysiert (Abb. 1A). Die drei Intensitätsstufen wurden mittels folgender Gleichung summiert:

$$\text{H-Score} = [ 1x (\% \text{ Zellen } 1) + 2x (\% \text{ Zellen } 2) + 3x (\% \text{ Zellen } 3) ]$$

Vorteil der summierten Bewertung der Gesamtintensität ist die genaue Erfassung von auch heterogen gefärbten Gewebeproben. Nach Anwendung der Formel ergab sich eine Gesamtbewertung mit Werten zwischen 100-300. Die Zellkernfärbung von TRIM33 wurde mit dem 5-Tier-Score eingestuft. Dafür wurden vier Gewebeabschnitte (20-fache Vergrößerung) zufällig ausgewählt und der prozentuale Anteil von positiv gefärbten Zellkernen ermittelt. Die Bewertung erfolgte über ein fünfstufiges System (0 = 0-20 %, 1 = 21-40 %, 2 = 41-60 %, 3 = 61-80 %, 4 = 81-100 %) (Abb. 1B). Der finale Score errechnete sich aus den gemittelten Werten der vier Gewebebereichen mit Werten zwischen null und vier.

Die Bewertung der zytoplasmatischen Färbung von PRAS40 erfolgte nach dem gleichen Vorgehen wie beim Marker Kandidaten PGRMC1 (Abb. 1C).

**Abb. 1**

**Abbildung 1: Das Scoringssystem und Färbeverhalten von PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 (Vergrößerung 20x) A.** PGRMC1. Es zeigt sich eine zytoplasmatische Färbung des Gewebes (braunes Kolorit). Je nach Farbeintensität wurde in die Kategorien schwach, medium oder stark eingeteilt und mittels H-Score bewertet. **B.** TRIM33. Das Protein zeigt ein ausschließlich nukleäres Färbeverhalten, welches in einer Braunfärbung der Zellkerne resultiert. Mittels 5-tier Score wurde der prozentuale Teil der positiven Zellkerne analysiert. **C.** PRAS40. Das Scoringssystem orientiert sich am H-Score, der je nach Farbintensität, das Gewebe in die Kategorien schwach, medium und stark einteilt.



## 2.7. Erhebung des MGMT-Methylierungsstatus

Die Informationen bezüglich des MGMT-Methylierungsstatus der Tumorproben beruhen zum Großteil auf der klinikinternen Datenbank, die aus dem klinischen Regelbetrieb des Instituts der Pathologie stammen. Da bei einigen der analysierten Proben dieser Status fehlte, wurde der MGMT-Methylierungsstatus bei 33 Patienten nachbestimmt.

Der Methylierungszustand erfolgte mit einer methylierungsspezifischen Polymerasekettenreaktion (PCR) die nach einer Gelelektrophorese die Zuordnung der Proben als methyliert oder unmethyliert erlaubte. Zunächst wurden mit Hilfe der bereits angefertigten HE-Übersichtsfärbungen folgende Areale der Tumorprobe markiert, welche solide Tumoranteile zeigten. Diese Areale wurden mit einer Rasierklinge herausgekratzt und anschließend in mehreren Schritten entparaffiniert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research). Zu Beginn wurden die entparaffinierten Proben mit einer Proteinase sowie einem Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Die in dem Gewebe befindliche DNA wurde anschließend durch Zentrifugation und Zugabe mehrerer Pufferlösungen aus dem nun lysierten Gewebe herausgetrennt. Der Mechanismus beruht drauf, dass durch die Puffer verschiedene pH-Milieus geschaffen werden, durch die alle Gewebeteile abzentrifugiert werden können und die negativ geladene DNA erhalten bleibt. Die DNA-Konzentration wurde darauf photometrisch bestimmt, bevor sie, nun adäquat isoliert, einer Bisulfit-Konvertierung mittels bisulfite conversion kit unterzogen wurde. Diese dreistufige Reaktion findet zwischen Cytosin und Natrium-Bisulfit statt und konvertiert Cytosin zu Uracil. Ziel dessen ist die Eliminierung von sonst anfallenden hinderlichen Ausfällungen.

Anschließend erfolgte die Durchführung der PCR mit spezifischen Primersets.

Es wurden folgende Primer verwendet:

MGMT-methyliert vorwärts 5'-GTT TTT AGA ACG TTT TGC GTT TCG AC-3'

MGMT-methyliert rückwärts 5'-CAC CGT CCC GAA AAA AAA CTC CG-3'

MGMT-unmethyliert vorwärts 5'-TGT GTT TTT AGA ATG TTT TGT GTT TTG AT-3'

MGMT-unmethyliert rückwärts 5'-CTA CCA CCA TCC CAA AAA AAA ACT CCA-3'

Der Einbezug von Proben ohne DNA-Gehalt gewährleistete die Kontrolle des Arbeitsschrittes. Nach Beendigung der PCR wurden die DNA-Produkte sowie Kontrollprodukte (Standard, EDTA-Blut, Leerwert) auf ein Acrylamid-Gel 8 % aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Das Acrylamid-Gel wurde durch Mischung von 24 ml Acrylamid-PDA (13 %), 16 ml Tris Puffer (120 mM), 400 µl Ammoniumpersulfat (10 %) und 40 µl Themed Fertiglösung hergestellt.

Während der Elektrophorese bildete sich ein blauer Streifen, als dieser das Ende des Gels erreicht hatte wurde die Elektrophorese beendet und anschließend mit Silbernitratlösung gefärbt. Hierfür wurde das Gel zunächst in Salpersäure 2-3 % geschwenkt, bis der blaue Streifen ins Gelbe umgeschlagen ist und daraufhin drei Mal mit Aqua dest. gewaschen. Das weitere Vorgehen war die Zugabe von Silbernitratlösung für 20 Minuten, erneutes Waschen und Zugabe von Natriumcarbonat sowie Formalin, um die Färbung zu starten. Bei Braunfärbung der Banden wurde die Reaktion mit Aqua dest., Essigsäure 10 % und Glycerin 5 % gestoppt und schließlich zum Trocknen aufgehängt. Bei der Analyse der fertigen Gele wurde eine Probe als „methyliert“ gewertet, sobald eine Bande methylierter PCR-Primer erkennbar war. Fehlte diese Bande war die Probe als „unmethyliert“ zu werten.

### 2.8. Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mittels dem Statistikprogramm SPSS. Dabei wurde nach einer Korrelation zwischen WHO Grad und der einzelnen Biomarkern gesucht, um eine eventuell vorhandene Einflussnahme der Marker PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 nachzuweisen. Darüber hinaus wurde in Bezug der Marker das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall analysiert. Dabei wurde das Gesamtüberleben als Zeitraum zwischen Erstoperation und Sterbedatum bzw. der letzten bekannten Datenlage definiert. Das progressionsfreie Intervall beinhaltete das Überleben ohne diagnostizierten Rezidivtumor. Als Mittel der Wahl wurde hier mit der Kaplan-Meier-Methode eine Überlebenskurve errechnet und zur Kontrolle der Signifikanz einem Log-Rank-Test unterzogen.

Beim weiteren Vorgehen wurden zusätzlich folgende Parameter auf den Zusammenhang mit den Biomarkern untersucht:

- Tumolvolumen: Das Tumolvolumen wurde mit Hilfe der präoperativen MRT-Aufnahmen bestimmt. Hierfür wurde die T1 gewichtete Aufnahme nach Kontrastmittelgabe genutzt, da hier der Tumor am besten zur Darstellung kommt.
- Ödemvolumen: Das Ödemvolumen wurde nach gleichem Vorgehen wie bei dem des Tumors ermittelt. Einziger Unterschied war die Nutzung der T2 gewichteten Flair Aufnahme, da hier eine gute Abgrenzung zwischen Tumor, Ödem und Liquor cerebrospinalis möglich war.
- Ki67: Proliferationsmarker zur Darstellung von sich schnell teilenden Zellpopulationen, welcher standartmäßig in der Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg bestimmt wird.

Zur Einschätzung der prognostischen Relevanz wurde die Auswertung um multivariate Analysen sowie der Ermittlung der Hazard Ratio (HR) im Rahmen der Cox-Regression erweitert. Einfluss nahmen hier folgende, bereits als prognostisch relevant ermittelte, Faktoren:

- Erkrankungsalter
- Karnofsky-Index
- Tumorresektion
- Therapie

Bei allen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. PGRMC1: Korrelation mit dem WHO Grad

Zu Anfang untersuchten wir eine mögliche Korrelation zwischen der PGRMC1 Expression und den WHO Graden der Tumore. Hierfür wurden die ermittelten H-Scores der Gewebeproben in einem Box-Whisker-Plot veranschaulicht und eine statistische Analyse mit Spearman's Rho durchgeführt. Wir beobachteten eine höhere Expression von PGRMC1 in hochgradigen Tumoren (WHO Grad 3: Median = 195; WHO Grad 4: Median = 180) als in Niedriggradigen (WHO Grad 2: Median = 135) (Abb. 2). Dennoch erreichte diese Korrelation nicht das Signifikanzniveau (Rho = 0,123,  $p = 0,064$ , Spearman).

**Abb. 2**



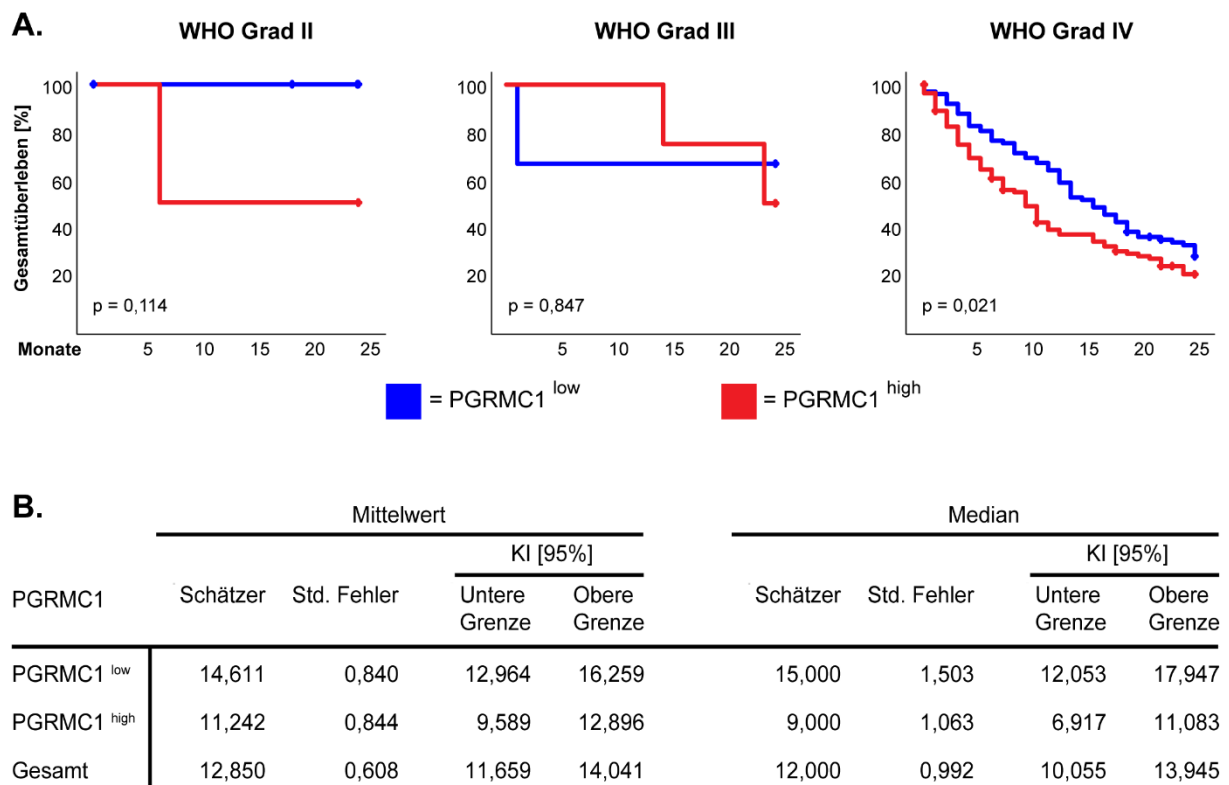
**Abbildung 2. PRGMC1 Expression in Korrelation mit den WHO Graden 2, 3 und 4.** Die Mediane werden als schwarze Linien dargestellt, die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fehlerbalken. Die Tabelle führt nach WHO Grad die Mediane, Minima, Maxima und Anzahl der Probanden auf.

#### 3.2. PGRMC1: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben

Als nächstes analysierten wir die Assoziation zwischen den Expressionsleveln von PGRMC1 und dem Gesamtüberleben der Patient\*innen mit WHO Grad 2, 3 und 4 Tumoren. Zunächst wurde die Expression mittels der Median-Split-Methode in

PGRMC1<sup>low</sup> und PGRMC1<sup>high</sup> dichotomisiert. Die Überlebensdaten sind in einer Kaplan-Meier Überlebenskurve dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Die Ergebnisse zeigten, dass Glioblastom Patient\*innen (WHO Grad 4) mit einer hohen PGRMC1 Expression (PGRMC1<sup>high</sup>) ein signifikant schlechteres Überleben haben, als PGRMC1<sup>low</sup> Patient\*innen ( $p = 0,021$ , Log-Rank) (Abb. 3A). Das mittlere und mediane Überleben bei WHO-Grad 4 ist in Abbildung 3B gezeigt. Bei den WHO Grad 2 und WHO Grad 3 Patient\*innen wurde keine signifikante Assoziation zwischen dem Gesamtüberleben und PGRMC1 Expression festgestellt (Abb. 3A).

**Abb. 3**

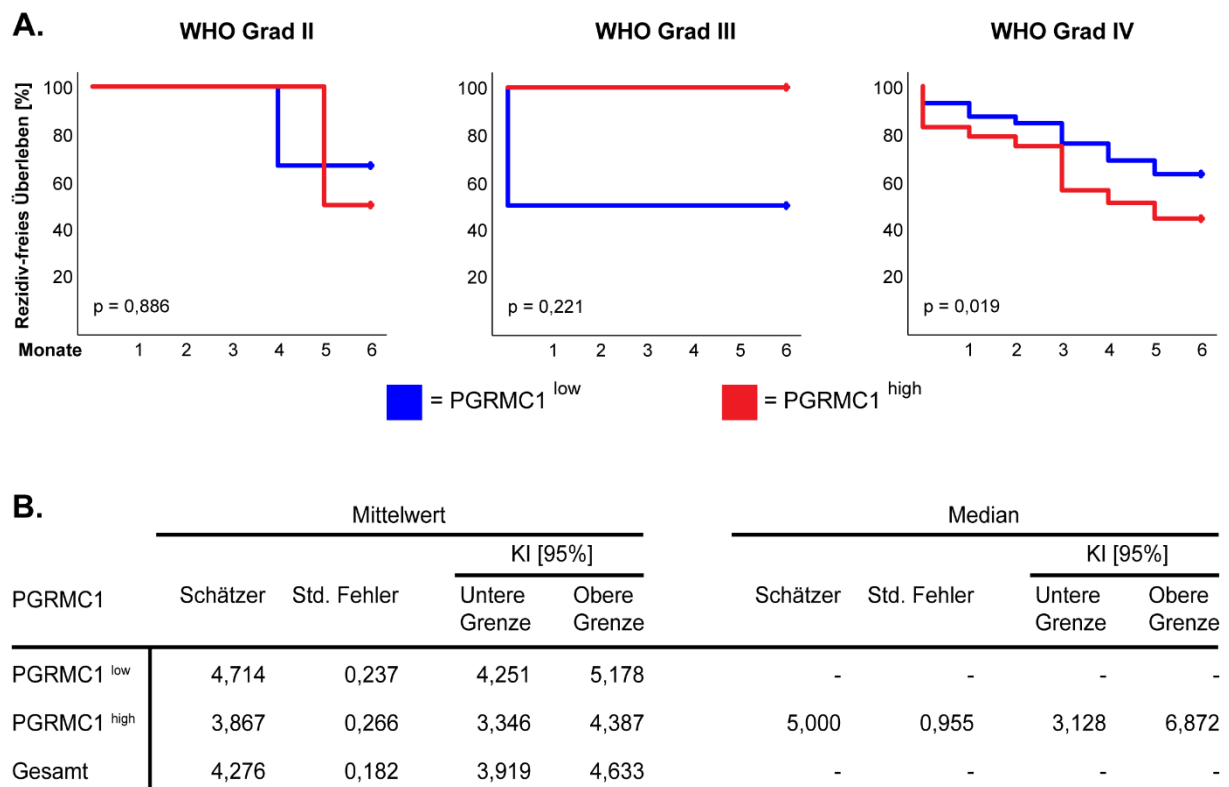


**Abbildung 3. PGRMC1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad. A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PGRMC1 Expression. Zur Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PGRMC1 Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95 %] = 95 % Konfidenzintervalle.

Weiterführend folgte nach gleichem Vorgehen die Auswertung des Rezidiv-freien Überlebens über sechs Monate. Auch hier zeigten nur Patient\*innen mit WHO Grad 4 signifikante Ergebnisse. Eine hohe PGRMC1 Expression war mit einem schlechteren Rezidiv-freien Überleben assoziiert als jene mit niedriger Expression ( $p = 0,019$ , Log-

Rank) (Abb. 4A). In Abbildung 4B sind die Mittelwerte und Mediane des Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 zu finden. Für manche Stichproben konnten keine Medianwerte berechnet werden, da die geschätzte Überlebenswahrscheinlichkeit keine 50 % erreicht hatte. Bei den WHO Grad 2 und WHO Grad 3 Patient\*innen wurde keine signifikante Assoziation zwischen dem Rezidiv-freien Überleben und PGRMC1 Expression festgestellt (Abb. 4A).

## Abb. 4



**Abbildung 4. PGRMC1: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad.** **A.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überleben nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PGRMC1 Expression. Analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PGRMC1 Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95 %] = 95 % Konfidenzintervalle.

### 3.3. PGRMC1: Korrelation mit weiteren Tumorparametern

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die PGRMC1 Expression mit anderen tumorrelevanten Parametern korreliert. Dafür wurden das Tumolvolumen, das Ödemvolumen und die Ki67 Positivität [ $> 10\%$ ] einer Korrelationsanalyse nach

Spearman unterzogen (Abb. 5). Diese offenbarten keinerlei signifikanten Zusammenhänge.

**Abb. 5**

Korrelationen PGRMC1 (Spearman's Rho)		Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	-0,084	0,072	-0,274
	Signifikanz (2-seitig)	0,844	0,866	0,511
	N	8	8	8
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	-0,571	-0,107	0,334
	Signifikanz (2-seitig)	0,180	0,819	0,518
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,086	0,074	0,021
	Signifikanz (2-seitig)	0,211	0,284	0,770
	N	211	211	205

**Abbildung 5. PGRMC1: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad.** Bivariate Analyse mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizient des Markers mit den Parametern Tumorvolumen, Ödemvolumen und Ki67 Positivität. Die Tabelle zeigt WHO gradspezifisch den Korrelationskoeffizienten, die Signifikanz und die Patientenzahl.

### 3.4. PGRMC1: Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben – Multivariatanalyse bei WHO Grad 4

Zur weiteren Analyse der Überlebensdaten nutzten wir das proportionale Hazard Modell als Regressionsverfahren. Hierfür wurde die multivariate Cox-Regression mit verschiedenen, sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren bei Glioblastomen erwiesenen, Faktoren adjustiert. Berücksichtigt wurden das Alter, der Karnofsky-Index, das Resektionsausmaß und die Therapie. Da die univariate Analyse lediglich für Tumore des WHO Grads 4 signifikante Ergebnisse hervorbrachte (Abb. 3-4), wurden die WHO Grade 2 und 3 hier nicht weiter analysiert.

Die Analyse zeigte nach Adjustierung, dass Glioblastompatient\*innen mit einer hohen PGRMC1 Expression (PGRMC1<sup>high</sup>) ein signifikant höheres Sterberisiko im Vergleich zu PGRMC1<sup>low</sup> Patient\*innen haben (HR = 1,505; KI [95 %] = 1,085-2,088; p = 0,014)

(Abb. 6A). Bei der Analyse des Rezidiv-freien Überlebens stellte sich keine signifikante prognostische Relevanz für PGRMC1<sup>high</sup> heraus (Abb. 6B). Somit kann PGRMC1 als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient\*innen angesehen werden.

## Abb. 6

### A.

Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
PGRMC1 <sup>low</sup>	1	-	-
PGRMC1 <sup>high</sup>	1,505	1,085-2,088	0,014
Alter	1,028	1,014-1,042	< 0,001
Karnofsky Index	0,991	0,979-1,002	0,105
Resektion	0,677	0,501-0,916	0,011
Therapie	0,731	0,675-0,792	< 0,001

### B.

Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
PGRMC1 <sup>low</sup>	1	-	-
PGRMC1 <sup>high</sup>	1,419	0,844-2,385	0,187
Alter	1,014	0,994-1,033	0,173
Karnofsky Index	0,988	0,973-1,003	0,109
Resektion	0,846	0,546-1,309	0,452
Therapie	0,705	0,626-0,792	< 0,001

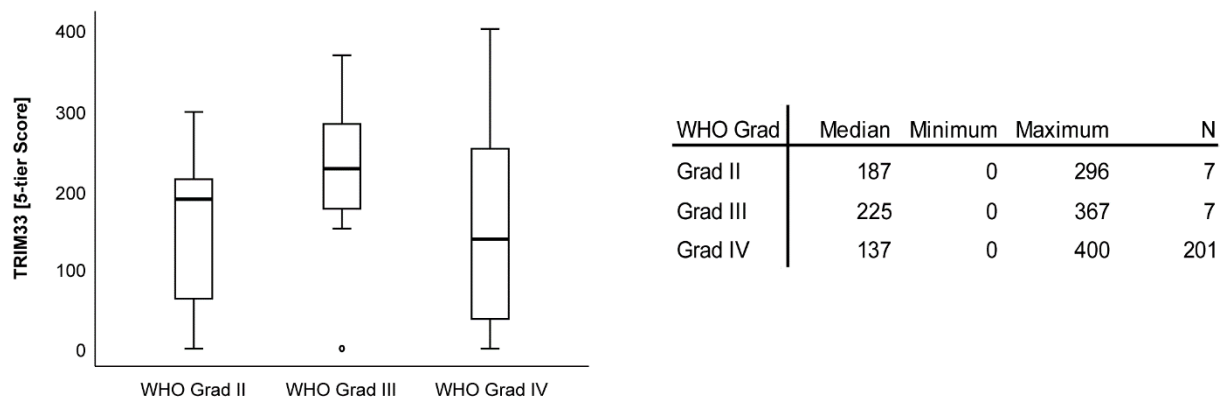
**Abbildung 6. PGRMC1: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient\*innen.** **A.** Regressionsanalyse des 24 Monate Überlebens von Patient\*innen mit hoher PGRMC1 Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Regressionsanalyse des sechs monatigen Rezidiv-freien Überlebens wie in A. PGRMC1<sup>low</sup> wurde als Dummy-Variable verwendet. HR= Hazard Ratio; KI [95 %] = 95 % Konfidenzintervall.



### 3.5. TRIM33: Korrelation mit dem WHO Grad

Bei unserem zweiten Marker TRIM33 starteten wir ebenfalls mit der Untersuchung zu einer möglichen Korrelation zwischen der Expression und den WHO Graden der Tumore. Die 5-tier Scores der Tumorproben wurden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt, die statistische Analyse mittels Spearman's Rho durchgeführt. Die Mediane zeigten keinen Trend (WHO-Grad 2: Median = 187; WHO-Grad 3: Median = 225; WHO-Grad 4: Median = 137) und die Korrelation erreichte nicht das Signifikanzniveau (Rho = -0,067,  $p = 0,325$ , Spearman) (Abb. 7).

**Abb. 7**

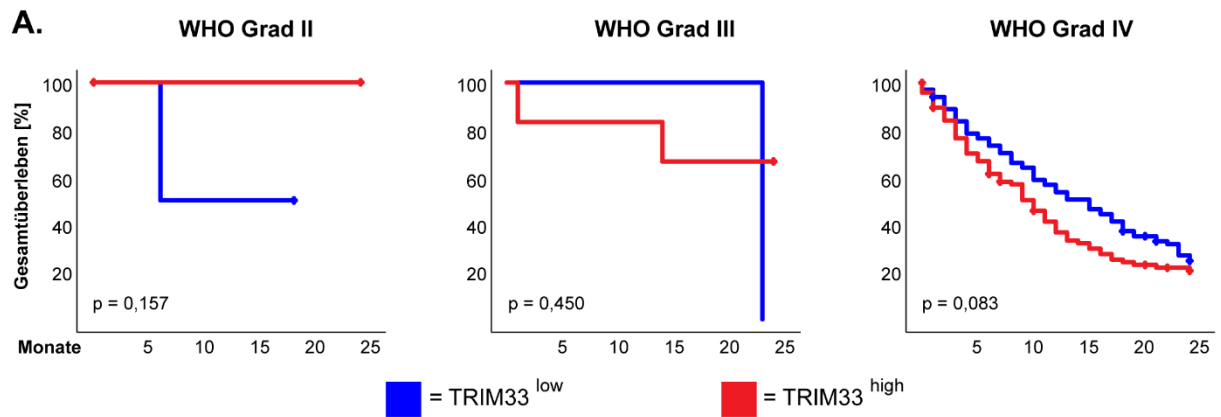


**Abbildung 7. TRIM33 Expression in Korrelation mit den WHO Graden 2, 3 und 4.** Die Mediane werden als schwarze Linien dargestellt, die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fehlerbalken. Die Tabelle führt nach WHO Grad die Mediane, Minima, Maxima und Anzahlen der Probanden auf.

### 3.6. TRIM33: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben

Um die Assoziation zwischen den Expressionsleveln von TRIM33 und dem Gesamtüberleben der Patient\*innen mit WHO Grad 2, 3 und 4 zu untersuchen wurden die 5-tier Scores mit der Median-Split-Methode in TRIM33<sup>high</sup> und TRIM33<sup>low</sup> dichotomisiert. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Abbildung 8A veranschaulicht, dass bei keinem der drei WHO Grade ein signifikanter Unterschied zwischen TRIM33<sup>high</sup> und TRIM33<sup>low</sup> Patient\*innen besteht. Das mediane und mittlere Überleben von WHO Grad 4 ist in Abbildung 8B gezeigt.

Abb. 8



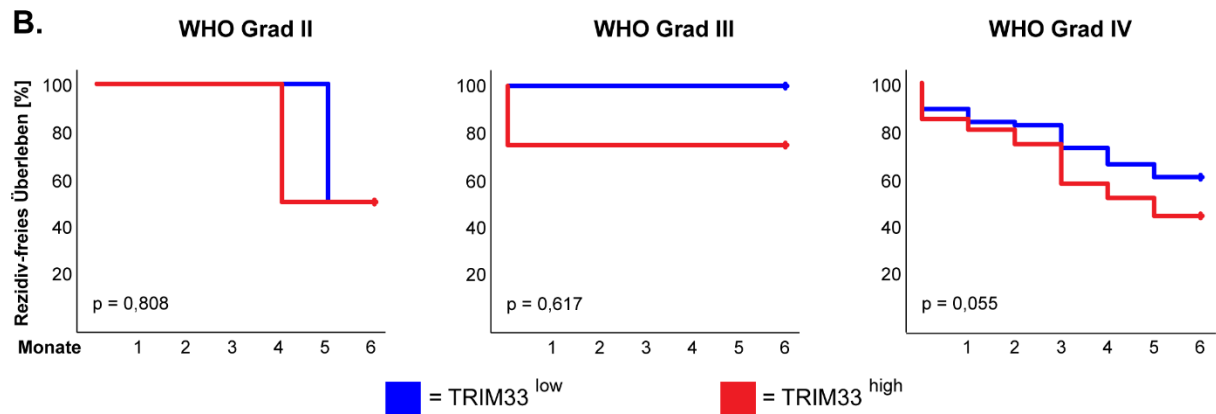
**B.**

TRIM33	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
TRIM33 <sup>low</sup>	13,947	0,868	12,246	15,648	15,000	2,042	10,997	19,003
TRIM33 <sup>high</sup>	11,167	0,871	9,461	12,874	10,000	0,991	8,058	11,942
Gesamt	12,620	0,621	11,385	13,819	11,000	0,964	9,111	12,889

**Abbildung 8 TRIM33: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad.** **A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger TRIM33 Expression. Zur statistischen Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur TRIM33 Expression.

Beim Rezidiv-freien sechs Monatsüberleben erreichte der Marker ebenfalls bei allen WHO Graden nicht das Signifikanzniveau (Abb. 9A). Die Mittelwerte und Mediane im Bezug zum Überleben mit WHO Grad 4 sind in Abbildung 9B dargestellt.

Abb. 9



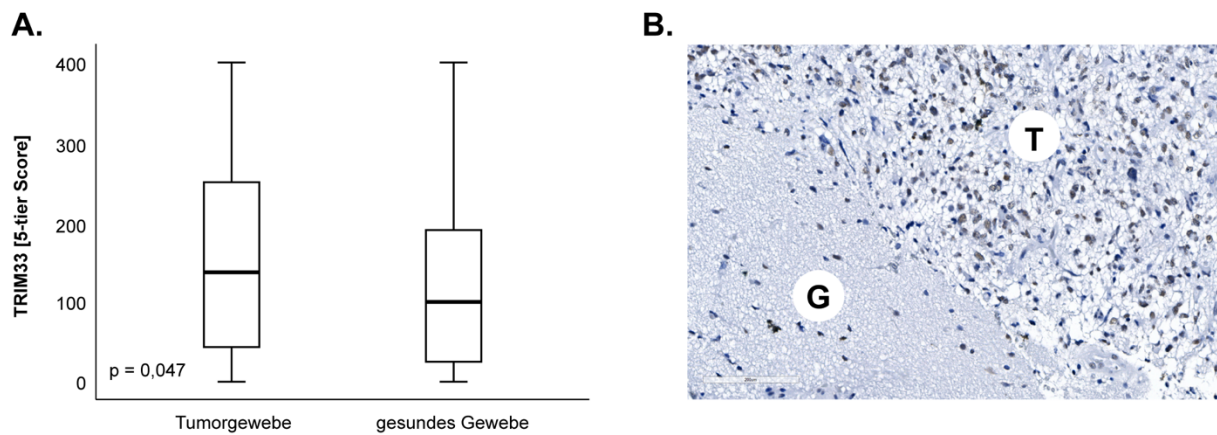
**B.**

	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
TRIM33			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
TRIM33 <sup>low</sup>	4,534	0,250	4,043	5,025	-	-	-	-
TRIM33 <sup>high</sup>	3,924	0,277	3,381	4,467	5,000	0,896	3,244	6,756
Gesamt	4,245	0,188	3,876	4,613	-	-	-	-

**Abbildung 9 TRIM33: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad A.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überleben nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger TRIM33 Expression. Statistisch analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur TRIM33 Expression.

### 3.7. TRIM33: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben nach erneutem Cut-off

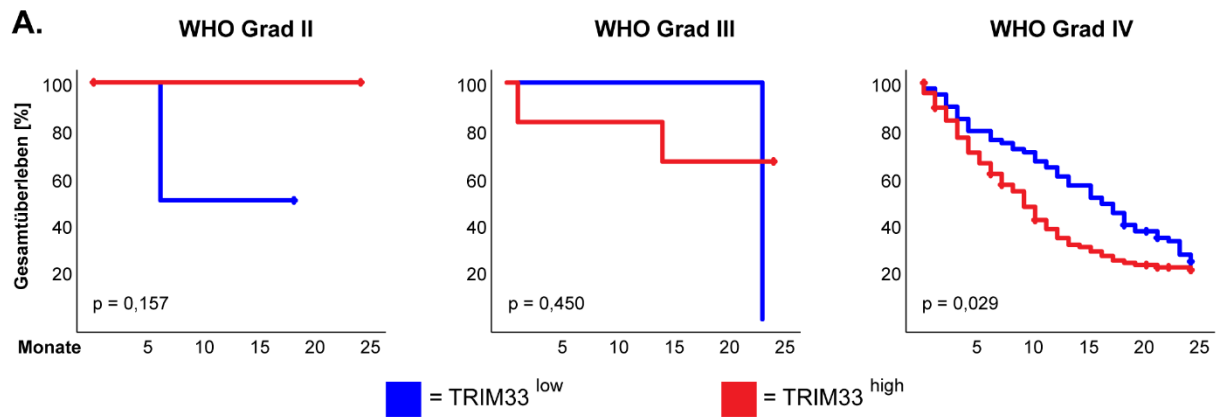
Da die Analyse der Expression auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben mittels der Median-Split-Methode keinerlei Ergebnisse lieferte, verglichen wir noch einmal das Expressionsmuster von Tumorgewebe mit dem von gesundem Hirngewebe. Die 5-tier Scores von TRIM33 sind in einem Box-Whisker-Plot dargestellt und mit dem Mann-Whitney-U Test statistisch untersucht. Es ergab sich, dass das gesunde Gewebe signifikant niedrigere TRIM33 Expression aufweist als das Tumorgewebe ( $p = 0,047$ ; Mann-Whitney-U) (Abb. 10A). Die unterschiedliche Expression von TRIM33 zwischen Tumor- und gesundem Gewebe wird in einem repräsentativen Randausschnitt gezeigt (Abb. 10B).

**Abb. 10**

**Abbildung 10 TRIM33: Vergleich von Tumor- und gesundem Gewebe A.** Box-Whisker-Plot der beiden Gewebearten. Die Mediane werden als schwarze Linien dargestellt, die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fehlerbalken. Die Signifikanz befindet sich unten rechts. **B.** Bildliche Darstellung einer Randzone von Tumor (T) und gesundem Hirngewebe (G).

Auf Grund dieses Ergebnis wiederholten wir die Analyse des Gesamt- und Rezidivfreien Überlebens. Hierfür wurde TRIM33 Expression auf Basis des Medians der gesunden Gewebeproben neu dichotomisiert. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Die Ergebnisse zeigten, dass Glioblastompatient\*innen mit einer hohen TRIM33 Expression ( $\text{TRIM33}^{\text{high}}$ ) ein signifikant schlechteres Überleben haben, als  $\text{TRIM33}^{\text{low}}$  Patient\*innen ( $p = 0,029$ , Log-Rank) (Abb. 11A). Das mediane Gesamtüberleben betrug bei Patient\*innen mit niedriger TRIM33 Expression ( $\text{TRIM33}^{\text{low}}$ ) 16 Monate und bei  $\text{TRIM33}^{\text{high}}$  Patient\*innen nur 9 Monate (Abb. 11B). Bei den WHO Grad 2 und 3 Patient\*innen wurde keine signifikante Assoziation zwischen dem Gesamtüberleben und PGRMC1 Expression festgestellt (Abb. 11A).

Abb. 11



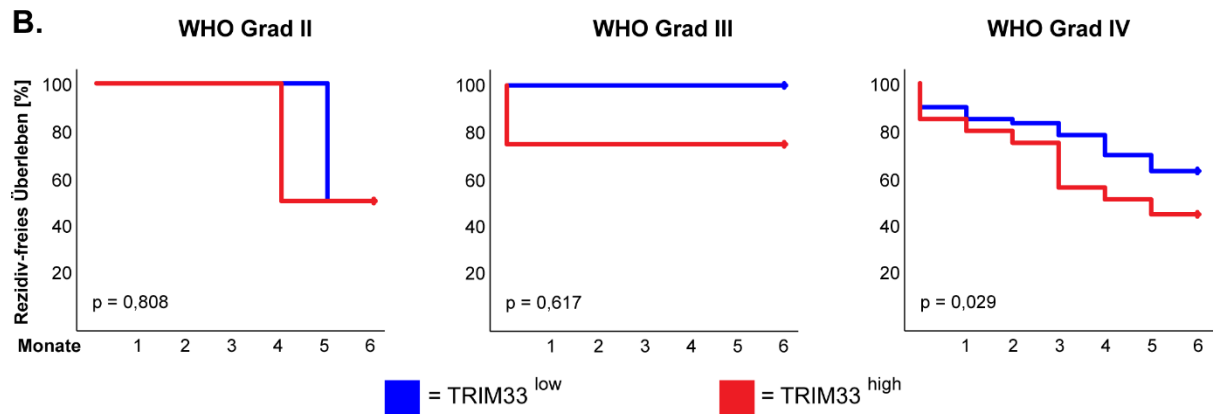
**B.**

TRIM33	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
TRIM33 <sup>low</sup>	14,778	0,945	12,926	16,630	16,000	1,959	12,161	19,839
TRIM33 <sup>high</sup>	10,994	0,795	9,386	12,501	9,000	0,959	7,121	10,879
Gesamt	12,541	0,621	11,323	13,759	11,000	0,961	9,116	12,884

**Abbildung 11 TRIM33: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad.** **A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger TRIM33 Expression. Zur statistischen Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur TRIM33 Expression.

Nach gleicher Methodik wie beim Gesamtüberleben erfolgte die Analyse zum Rezidiv-freien Überleben. Die WHO Grade 2 und 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen hoher und niedriger Expression von TRIM33 (Abb. 12A). Die Glioblastompatient\*innen (WHO Grad 4) zeigten dagegen einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,029$ , Log-Rank), sodass eine hohe TRIM33 Expression mit einem kürzeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert war (Abb. 12A). Das mittlere Rezidiv-freie Überleben verkürzte sich bei steigender Expression von 4,7 auf 3,9 Monate (Abb. 12B).

Abb. 12



**B.**

TRIM33	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
TRIM33 <sup>low</sup>	4,678	0,271	4,148	5,208	-	-	-	-
TRIM33 <sup>high</sup>	3,899	0,254	3,401	4,397	5,000	0,981	3,077	6,923
Gesamt	4,232	0,189	3,862	4,602	-	-	-	-

**Abbildung 12 TRIM33: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad A.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überleben nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger TRIM33 Expression. Statistisch analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur TRIM33 Expression

### 3.8. TRIM33: Korrelation mit weiteren Tumorparametern

Zusätzlich zum Überleben sollten Korrelationen mit anderen erhobenen Tumorparametern untersucht werden (vgl. Kapitel 3.3). Die bivariate Korrelationsanalyse (Spearman's Rho) des Markers zeigte zwei signifikante Zusammenhänge. Die Gewebeproben des WHO Grad 3 korrelierten negativ und signifikant mit dem Ödemvolumen ( $Rho = -0,821$ ,  $p = 0,023$ , Spearman). Durch die geringe Anzahl an Patient\*innen des WHO Grades 3 muss allerdings die Validität dieser Korrelation zukünftig in einer größeren Patientenkohorte bestätigt werden. In WHO Grad 4 Tumoren, bei denen ein großes Patientenkollektiv vorlag, ergab sich eine hochsignifikante positive Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki67 ( $Rho = 0,197$ ,  $p = 0,006$ , Spearman) (Abb. 13).

**Abb. 13**

Korrelationen TRIM33 (Spearman's Rho)		Tumorzvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,091	-0,109	0,748
	Signifikanz (2-seitig)	0,846	0,816	0,053
	N	7	7	7
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	-0,714	-0,821*	-0,091
	Signifikanz (2-seitig)	0,071	0,023	0,864
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,055	0,026	0,197**
	Signifikanz (2-seitig)	0,436	0,711	0,006
	N	200	200	194

**Abbildung 13. TRIM33: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad.** Bivariate Analyse mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizient des Markers mit den Parametern Tumorzvolumen, Ödemvolumen und Ki67 Positivität. Die Tabelle zeigt WHO-gradspezifisch den Korrelationskoeffizienten, die Signifikanz und die Patientenzahl.

\*Signifikant auf  $p = 0,05$  Niveau; \*\*Signifikant auf  $p = 0,01$  Niveau

### 3.9. TRIM33: Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben – Multivariatanalyse in WHO Grad 4

Zur weiteren Analyse der Überlebensdaten nutzten wir das proportionale Hazard Modell als Regressionsverfahren. Hierfür wurde die multivariate Cox-Regression mit verschiedenen, sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren bei Glioblastomen erwiesenen, Faktoren adjustiert. Berücksichtigt wurden das Alter, der Karnofsky-Index, das Resektionsausmaß und die Therapie. Da die univariate Analyse lediglich für Tumore des WHO Grads 4 signifikante Ergebnisse hervorbrachte (Abb. 3-4), wurden die WHO Grade 2 und 3 hier nicht weiter analysiert.

Die Analyse zeigte nach Adjustierung, dass Glioblastompatient\*innen mit einer hohen TRIM33 Expression (TRIM33<sup>high</sup>) zwar ein erhöhtes Sterberisiko haben; die Regressionsanalyse erreicht hier allerdings nicht das Signifikanzniveau (HR = 1,348; KI [95 %] = 0,954-1,904;  $p = 0,091$ ) (Abb. 14A). Gleiches gilt beim 6 Monats Rezidiv-freien Überleben (HR = 1,439; KI [95 %] = 0,831-2,491;  $p = 0,194$ ) (Abb. 14B). Damit

ist TRIM33 weder fürs Gesamt- noch für das Rezidiv-freie Überleben ein unabhängiger prognostischer Marker bei Glioblastomen.

### Abb. 14

<b>A.</b>				<b>B.</b>			
Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz	Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
TRIM33 <sup>low</sup>	1	-	-	TRIM33 <sup>low</sup>	1	-	-
TRIM33 <sup>high</sup>	1,348	0,954-1,904	0,091	TRIM33 <sup>high</sup>	1,439	0,831-2,491	0,194
Alter	1,024	1,010-1,038	0,001	Alter	1,012	0,992-1,032	0,237
Karnofsky Index	0,991	0,980-1,003	0,149	Karnofsky Index	0,990	0,975-1,005	0,182
Resektion	0,664	0,483-0,912	0,012	Resektion	0,769	0,487-1,214	0,259
Therapie	0,735	0,677-0,798	< 0,001	Therapie	0,707	0,629-0,795	< 0,001

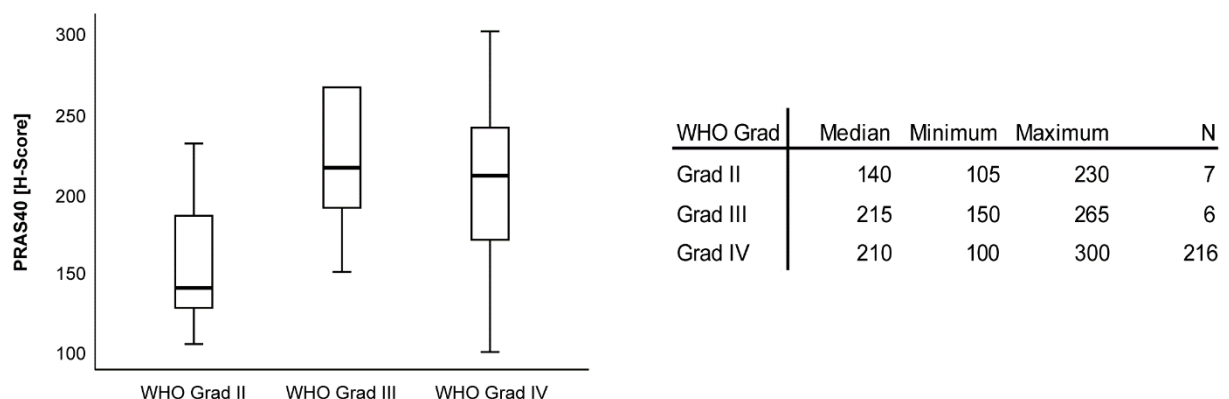
**Abbildung 14 TRIM33: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient\*innen.** **A.** Regressionsanalyse des 24 Monate Überlebens von Patient\*innen mit hoher TRIM33 Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Regressionsanalyse des sechs monatigen Rezidiv-freien Überlebens wie in A. TRIM33<sup>low</sup> wurde als Dummy-Variable verwendet. HR = Hazard Ratio; KI [95 %] = 95 % Konfidenzintervall.



### 3.10. PRAS40: Korrelation mit dem WHO-Grad

Der letzte untersuchte Marker PRAS40 wurde in einer Korrelationsanalyse mit Astrozytomen (WHO Grad 2 und 3) und Glioblastomen (WHO Grad 4) untersucht. Genutzt wurden dabei die ermittelten H-Scores sowie die Malignitätseinteilung der WHO. Die Scores wurden in einem Box-Whisker-Plot anschaulich dargestellt und mit Spearman's Rho statistisch analysiert. Aus letzterem resultierte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression und Malignitätsgrad ( $Rho = 0,085$ ,  $p = 0,199$ , Spearman) (Abb. 15). Dennoch ist erkennbar, dass in den höhergradigen Gewebeproben höhere H-Scores erzielt wurden (WHO Grad 3: Median = 215; WHO Grad 4: Median = 210), als in Niedergradigen (WHO Grad 2: Median = 140).

**Abb. 15**



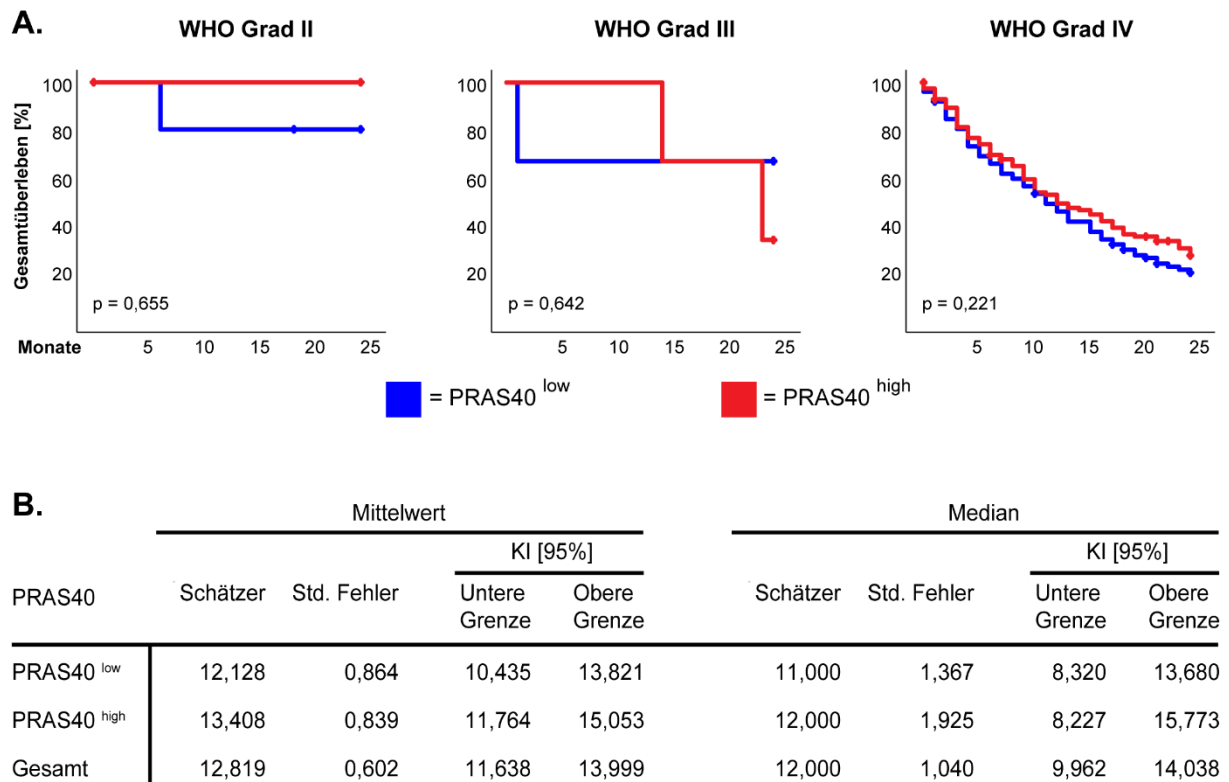
**Abbildung 15. PRAS40 Expression in Korrelation mit den WHO-Graden 2, 3 und 4.** Die Mediane werden als schwarze Linien dargestellt, die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fehlerbalken. Die Tabelle führt nach WHO Grad die Mediane, Minima, Maxima und Anzahlen der Probanden auf.

### 3.11. PRAS40: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben

Zur Bewertung der Assoziation zwischen den Expressionsleveln von PRAS40 und dem Gesamtüberleben der Patient\*innen mit WHO Grad 2, 3 und 4 wurden die ermittelten H-Scores ebenfalls über die Median-Split-Methode in PRAS40<sup>high</sup> und PRAS40<sup>low</sup> dichotomisiert. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Es zeigte sich

bei keinem der drei WHO Grade ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PRAS40 Expression und dem Gesamtüberleben der Patient\*innen (WHO Grad 2:  $p = 0,655$ ; WHO Grad 3:  $p = 0,642$ ; WHO Grad 4:  $p = 0,211$ , Log-Rank) (Abb. 16A). Die Mittelwerte und Mediane im Bezug zum Überleben mit WHO Grad 4 sind in Abbildung 16B dargestellt.

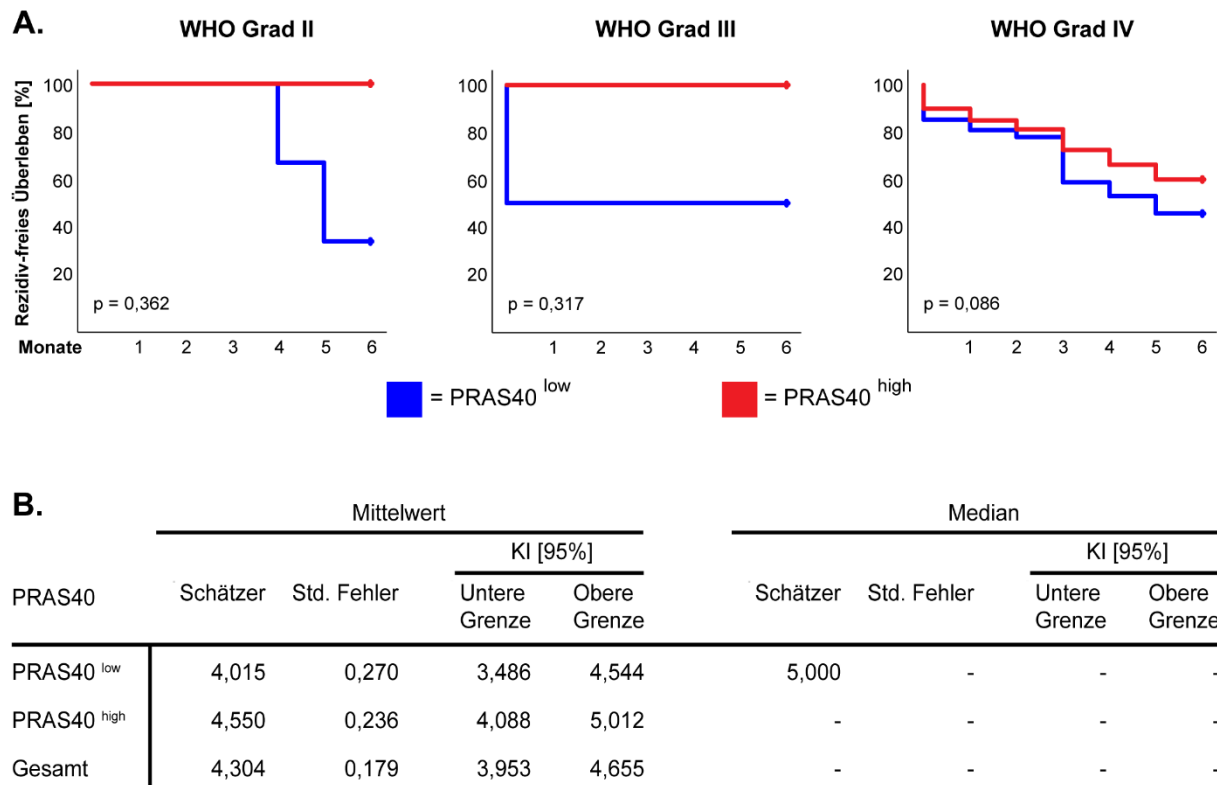
**Abb. 16**



**Abbildung 16. PRAS40: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad.** **A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PRAS40 Expression. Zur statistische Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PRAS40 Expression.

Beim Rezidiv-freien sechs Monatsüberleben erreicht der Marker ebenfalls bei allen WHO-Graden nicht das Signifikanzniveau (WHO Grad 2:  $p = 0,362$ ; WHO Grad 3:  $p = 0,317$ ; WHO Grad 4:  $p = 0,086$ ) (Abb. 17A). Die Mittelwerte und Mediane im Bezug zum Überleben mit WHO Grad 4 sind in Abbildung 17B dargestellt.

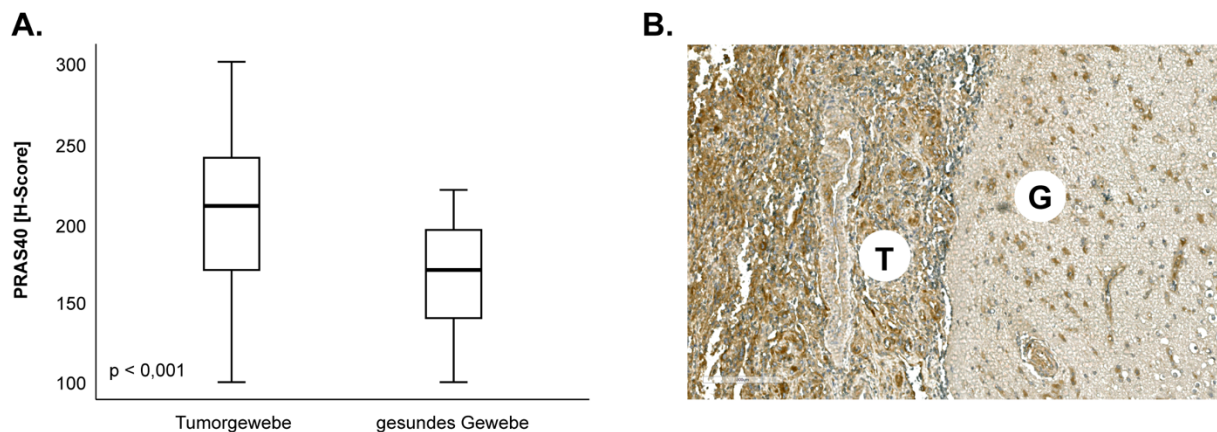
Abb. 17



**Abbildung 17. PRAS40: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad A.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überleben nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PRAS40 Expression. Statistisch analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PRAS40 Expression.

### 3.12. PRAS40: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben nach erneutem Cut-off

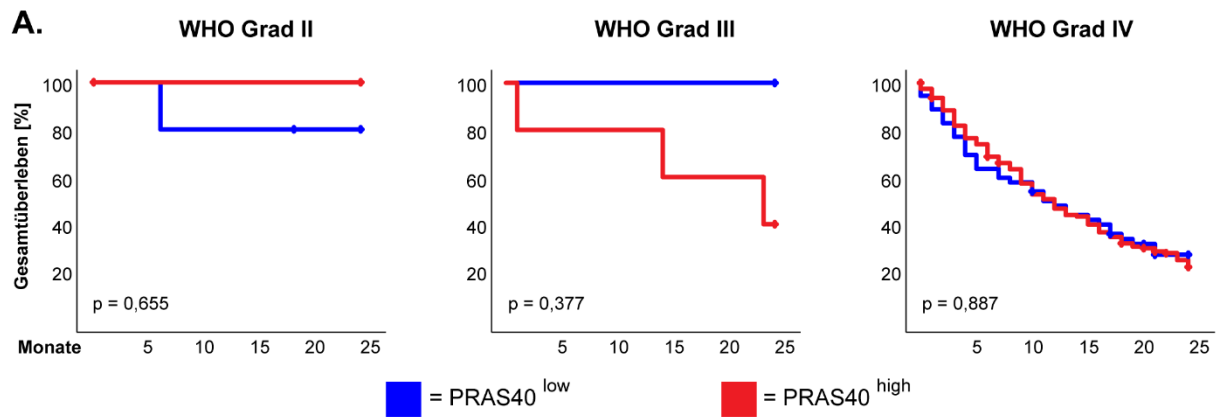
Da die Analyse der Expression auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben mittels der Median-Split-Methode, keinerlei Ergebnisse lieferte, verglichen wir noch einmal, wie schon bei TRIM33, die PRAS40 Expression von Tumorgewebe mit dem von gesundem Hirngewebe. Die H-Scores von PRAS40 wurden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt und mit dem Mann-Whitney-U Test statistisch untersucht. Es ergab sich, dass das gesunde Gewebe eine hochsignifikant niedrigere PRAS40 Expression aufweist als das Tumorgewebe ( $p = < 0,001$ ; Mann-Whitney-U) (Abb. 18A). Die unterschiedliche Expression von PRAS40 zwischen Tumor- und gesundem Gewebe wird in einem repräsentativen Randausschnitt gezeigt (Abb. 18B).

**Abb. 18**

**Abbildung 18 PRAS40: Vergleich von Tumor- und gesundem Gewebe** **A.** Box-Whisker-Plot der beiden Gewebearten. Die Mediane werden als schwarze Linien dargestellt, die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Boxen mit Fehlerbalken. Die Signifikanz befindet sich unten rechts. **B.** Bildliche Darstellung einer Randzone von Tumor (T) und gesundem Hirngewebe (G).

Auf Grund dieses Ergebnis wiederholten wir die Analyse des Gesamt- und Rezidivfreien Überlebens. Hierfür wurde PRAS40 Expression auf Basis des Medians der gesunden Gewebeproben neu dichotomisiert. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede in allen drei WHO-Graden (WHO Grad 2:  $p = 0,655$ ; WHO Grad 3:  $p = 0,377$ ; WHO Grad 4:  $p = 0,887$ , Log-Rank) (Abb. 19A). Im Vergleich zu den Ergebnissen des Median-Split näherten sich die Überlebenszeiten der Patient\*innen sogar noch einmal an (vgl. Abb. 16A/19A). Die Mittelwerte und Mediane im Bezug zum Überleben ist in Abbildung 19B dargestellt.

Abb. 19



**B.**

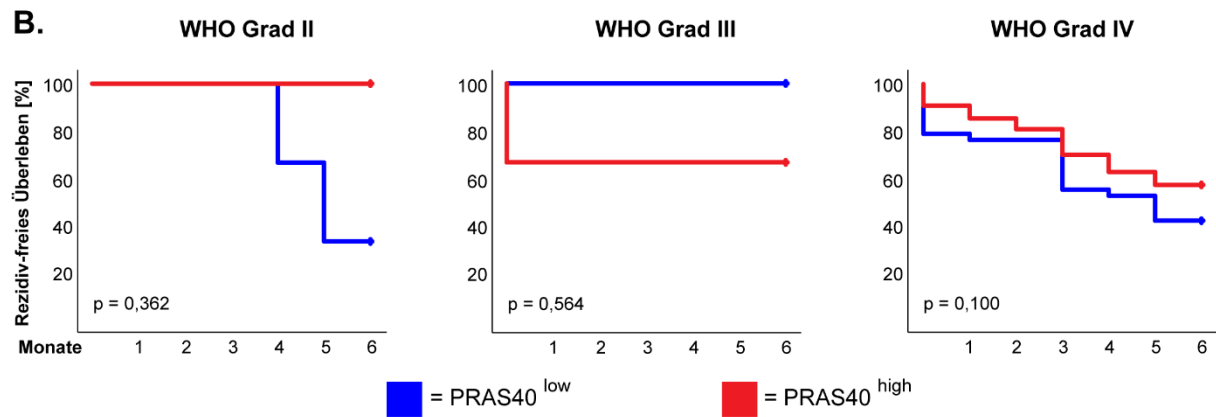
PRAS40	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
PRAS40 <sup>low</sup>	12,532	1,274	10,088	14,976	12,000	2,509	7,082	16,918
PRAS40 <sup>high</sup>	12,913	0,687	11,567	14,258	12,000	1,215	9,618	14,382
Gesamt	12,819	0,602	11,638	13,999	12,000	1,040	9,962	14,038

**Abbildung 19. PRAS40: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad. A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PRAS40 Expression. Zur statistischen Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PRAS40 Expression.

Nach gleicher Methodik wie beim Gesamtüberleben erfolgte die Analyse zum Rezidivfreien Überleben. Wieder erreicht der Marker bei allen WHO Graden nicht das Signifikanzniveau (Abb. 20A). Die Mittelwerte und Mediane im Bezug zum Überleben ist in Abbildung 20B dargestellt.

Da die univariate Analyse keine signifikanten Ergebnisse lieferte, wurde auf eine multivariate Analyse des Markers verzichtet.

Abb. 20



**B.**

PRAS40	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
PRAS40 <sup>low</sup>	3,816	0,383	3,065	4,566	5,000	-	-	-
PRAS40 <sup>high</sup>	4,473	0,199	4,083	4,863	-	-	-	-
Gesamt	4,304	0,179	3,953	4,655	-	-	-	-

**Abbildung 20. PRAS40: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad A.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überleben nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PRAS40 Expression. Analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten **B.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PRAS40 Expression.

### 3.13. PRAS40: Korrelation mit weiteren Tumorparametern

Zusätzlich zum Überleben sollten Korrelationen mit anderen erhobenen Tumorparametern untersucht werden (vgl. Kapitel 3.3.). Die bivariate Korrelationsanalyse (Spearman's Rho) des Markers zeigte einen signifikanten Zusammenhang. Die Gewebeproben des WHO Grad 3 korrelierten negativ und signifikant mit dem Proliferationsmarker Ki67 (Rho = -0,968, p = 0,007, Spearman) (Abb. 21). Durch die geringe Anzahl an Patient\*innen des WHO Grades 3 muss allerdings die Validität dieser Korrelation zukünftig in einer größeren Patientenkohorte bestätigt werden.

**Abb. 21**

Korrelationen PRAS40 (Spearman's Rho)		Tumorzvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,474	0,474	<0,001
	Signifikanz (2-seitig)	0,282	0,282	1,000
	N	7	7	7
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	-0,488	-0,098	0,968**
	Signifikanz (2-seitig)	0,326	0,854	0,007
	N	6	6	5
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	-0,054	0,057	0,122
	Signifikanz (2-seitig)	0,427	0,408	0,078
	N	215	215	209

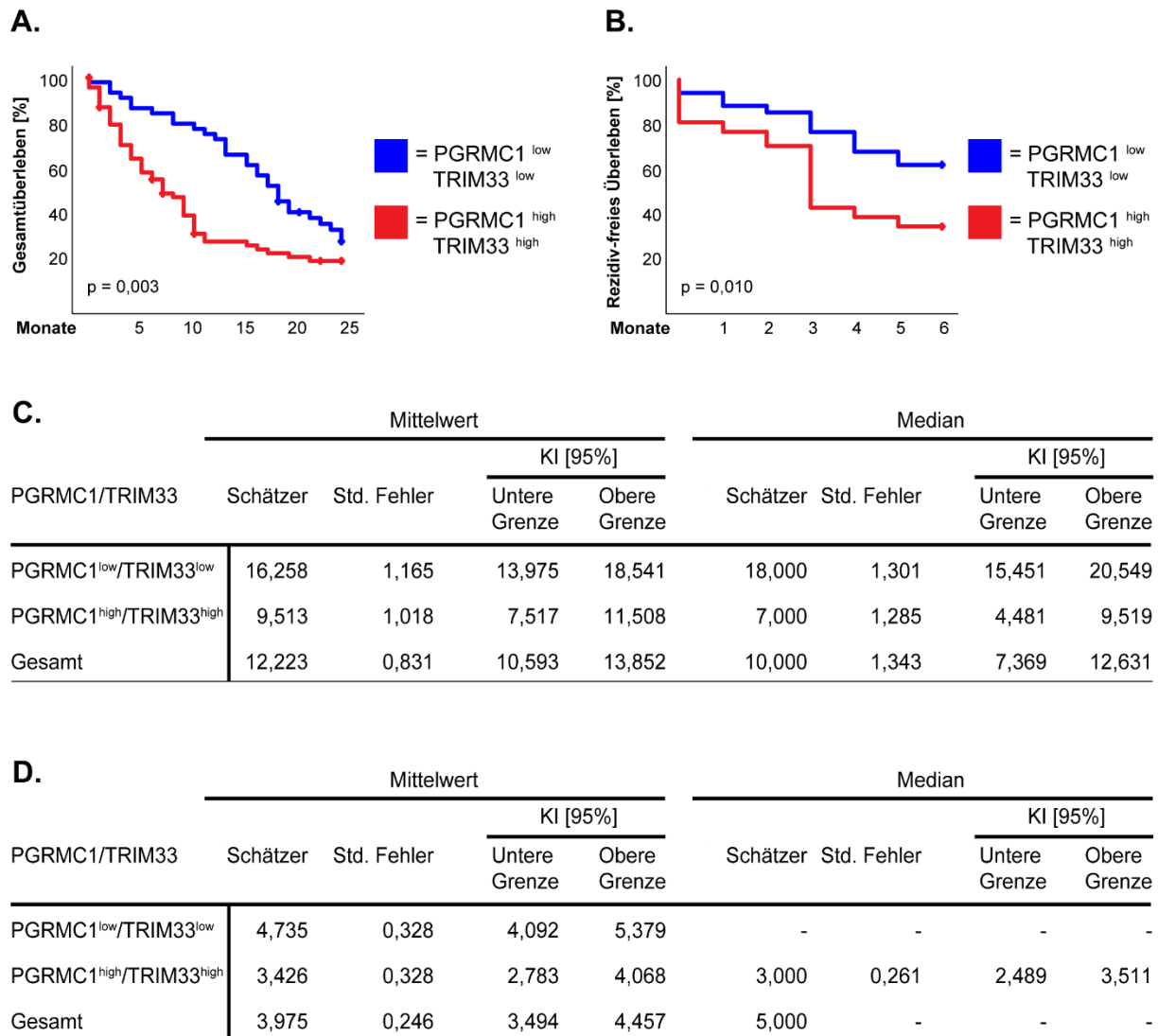
**Abbildung 21. PRAS40: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad.** Bivariate Analyse mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizient des Markers mit den Parametern Tumorzvolumen, Ödemvolumen und Ki67 Positivität. Die Tabelle zeigt WHO gradspezifisch den Korrelationskoeffizienten, die Signifikanz und die Patientenzahl.

\*\*Signifikant auf  $p=0,01$  Niveau

### 3.14. PGRMC1/TRIM33: Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben

In dieser Studie identifizierten wir eine hohe Expression von PGRMC1 oder von TRIM33 als ungünstige prognostische Faktoren für Glioblastompatient\*innen. Auf Basis dieser Resultate wird nun die Kombination der beiden Marker in Bezug auf das Gesamt- und das Rezidiv-freie Überleben untersucht. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier dargestellt und die statistische Testung folgte mit dem Log-Rank-Test. Die Ergebnisse zeigten, dass „double-high“ Patient\*innen (PGRMC1<sup>high</sup>/TRIM33<sup>high</sup>) ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ( $p = 0,003$ , Log-Rank) (Abb. 22A), sowie ein kürzeres Rezidiv-freies Überleben ( $p = 0,01$ , Log-Rank) (Abb. 22B) haben, als „double-low“ Patient\*innen (PGRMC1<sup>low</sup>/TRIM33<sup>low</sup>). Die PGRMC1<sup>low</sup>/TRIM33<sup>low</sup> Patient\*innen lebten im Median um 11 Monate länger und einen Monat länger Rezidiv-frei (Abb. 22C-D).

Abb. 22



**Abbildung 22. Kombination von PGRMC1 und TRIM33: Univariat- und Multivariatanalyse in Glioblastompatient\*innen.** **A.** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PGRMC1 und TRIM33 Expression. Zur statistischen Analyse wurde der Log-Rank Test genutzt, die p-Werte befinden sich links unten. **B.** Kaplan-Meier sechs Monate Rezidiv-freies Überlebenskurven nach WHO Grad und hoher bzw. niedriger PGRMC1 und TRIM33 Expression. Statistisch analysiert wurde mittels Log-Rank Test, die p-Werte befinden sich links unten. **C.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Gesamtüberlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PGRMC1/TRIM33 Expression. **D.** Tabellarische Auflistung des mittleren und medianen Rezidiv-freien Überlebens bei WHO Grad 4 in Bezug zur PGRMC1/TRIM33 Expression.



Im Anschluss erfolgte eine Überlebenszeitanalyse, die das Sterberisiko der Patient\*innen modellieren sollte. Diese wurde mittels multivariater Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Diese zeigte nach Adjustierung des Alters, des Karnofsky-Index, des Ausmaßes der Resektion und der Therapie, dass eine gleichzeitig erhöhte PGRMC1- und TRIM33-Expression (PGRMC1<sup>high</sup>/TRIM33<sup>high</sup>) mit einem signifikant höheren Sterberisiko einhergeht (HR = 1,892, KI [95 %] = 1,178-3,038, p = 0,008) (Abb. 23A). Außerdem ist das Sterberisiko und die Signifikanz im Vergleich zu den einzelnen Marken erhöht (vgl. Abb. 6A und 14A). Bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens hatte diese Marker-Kombination keine signifikante prognostische Aussagekraft (Abb. 23B).

### Abb. 23

#### A.

Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
PGRMC1/TRIM33 <sup>l</sup>	1	-	-
PGRMC1 <sup>h</sup> /TRIM33 <sup>h</sup>	1,892	1,178-3,038	0,008
Alter	1,022	1,002-1,043	0,029
Karnofsky Index	0,997	0,982-1,013	0,710
Resektion	0,627	0,416-0,946	0,026
Therapie	0,740	0,662-0,828	< 0,001

#### B.

Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
PGRMC1/TRIM33 <sup>l</sup>	1	-	-
PGRMC1 <sup>h</sup> /TRIM33 <sup>h</sup>	1,750	0,841-3,645	0,135
Alter	1,026	0,997-1,055	0,076
Karnofsky Index	0,995	0,975-1,015	0,634
Resektion	0,876	0,515-1,490	0,626
Therapie	0,745	0,643-0,864	< 0,001

**Abbildung 23 Kombination von PGRMC1 und TRIM33: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient\*innen.** **A.** Multivariate Cox-Regression Analyse des 24 Monate Überlebens von Patient\*innen mit hoher PGRMC1 und TRIM33 Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Multivariate Cox-Regression Analyse des sechs monatigen Rezidiv-freien Überleben wie in B. PGRMC1<sup>low</sup>/TRIM33<sup>low</sup> wurde als Dummy-Variable verwendet. HR = Hazard Ratio; KI [95 %] = 95 % Konfidenzintervall.

## 4. Diskussion

### 4.1. Biometrische Daten in Bezug zu Vergleichskollektiven

Das erhobene Kollektiv ist mit 263 Patient\*innen, davon 233 mit Glioblastom, umfangreich. Dennoch stellt sich die Frage der Repräsentativität der untersuchten Proben. Im Folgenden wird, in Hinsicht auf die Bedeutung für die Studie, nur auf Glioblastompatient\*innen verwiesen. Das mediane Alter der Patient\*innen bei Diagnosestellung lag bei 64 Jahren und damit nur zwei Jahre über dem medianen Erkrankungsalter der WHO-Definition (6). Ferner sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Das war auch im untersuchten Kollektiv zu beobachten, hier betrug das Verhältnis von Männern zu Frauen 1,2:1. Eine Datenerhebung aus der Schweiz beschreibt ein Verhältnis von 1,26:1 (5). Im Hinblick auf das Alter und die Geschlechterverteilung ist das Kollektiv also repräsentativ für Glioblastompatient\*innen. Die mediane Überlebenszeit lag bei unserem Kollektiv bei 12 Monaten und damit vergleichbar zu aktuellen Erhebungen, die ein medianes Überleben von 12-14 Monaten ermittelten, wobei die 14 Monate nur bei optimaler Therapie erreicht wurden (77,78). Da in unserem Patientenkollektiv 70% der Patient\*innen eine kombinierte Radiochemotherapie erhalten haben ist das mediane Überlebensalter plausibel.

Ein weiter prognostisch sehr relevanter Marker ist der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors, wobei eine methylierte Promotorregion bei Therapie mit TMZ eine deutlich bessere Prognose aufweist (79). Daher folgt hier auch der Vergleich zu anderen Studien um die Repräsentativität unseres Kollektivs zu bestätigen. Mit einer Methylierungsrate von 59 % ist sie deutlich höher als in Vergleichskollektiven, die Methylierungsraten von 33 bis 45 Prozent aufwiesen (20,30,80). Diese Diskrepanz ist mit der am Institut für Pathologie am Uniklinikum Magdeburg verwendeten Methodik zur Methylierungsbestimmung zu erklären. Bei der von uns durchgeführten Nachbestimmung der nicht ermittelten Status fiel auf, dass bereits sehr kleine PCR-Banden als positive Promotormethylierung gewertet wurden und es sich bei dem verwendeten Kit um eines der effizientesten seiner Art handelt (81).

## 4.2. PGRMC1

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Bedeutung von PGRMC1 für das Gesamtüberleben bei Patient\*innen mit Glioblastomen demonstriert. Wir zeigten, dass eine hohe PGRMC1 Expression einen unabhängigen signifikanten Marker für ein kürzeres Gesamtüberleben darstellt. Somit kann PGRMC1 als prognostischer Biomarker für Glioblastompatient\*innen angesehen werden.

Das Protein PGRMC1 interagiert in diversen zellulären Prozessen wie dem Energiemetabolismus, der Fettregulation, Häm- und Cyp-Biologie, Genregulation und der Mitose (82). Bei diversen Tumorentitäten, darunter Kolon- (50), Brust- (83), Bronchial- (84) und Ovarialkarzinomen (85), wurde im Vergleich zu gesundem Gewebe über eine Überexpression von PGRMC1 berichtet.

Mir *et al.* untersuchten anhand von 30 Gewebeproben von Lungentumoren die PGRMC1 Expression und beobachteten, dass eine höhere Expression mit einer schlechteren Prognose für die Patient\*innen assoziiert war (86). Die genauen molekularen Zusammenhänge blieben unklar.

Des Weiteren zeigte eine Arbeit unserer Arbeitsgruppe, dass der Knockout von PGRMC1 eine signifikante Reduzierung der metabolischen Aktivität, des Zellwachstums und der Zellinvasion von GBM-Zellen zur Folge hatte (87).

Darüber, wie PGRMC1 durch zelluläre Signalwege Einfluss auf die Tumorgenese hat, wird diskutiert und verschiedene Ansätze sind in der Literatur beschrieben.

Das Recycling zelleigener Organellen oder intrazellulärer Proteine (Autophagie) wird bei der Entstehung von Krebs kontrovers diskutiert und kann kontextbezogen die Rolle als Tumorsuppressor oder -promotor annehmen (88). Beim Glioblastom beschrieben Gammoh *et al.* anhand von Mausmodellen, dass die Inhibition der Autophagie zu einer starken Suppression des Tumorstwachstums führte. Ferner wurde mit molekularen Analysen festgestellt, dass autophagieinhibierte Gliazellen keine Wachstumssignale verarbeiteten und sich eine Zellseneszenz einstellte (89). Aus diesen Ergebnissen kann die Autophagie als ein Einflussfaktor auf die Glioblastomgenese angesehen

werden und so ebenfalls Einfluss auf die Prognose haben. PGRMC1 bindet an MAP1LC3-II, ein zentrales Protein im Signalweg der Autophagie und etablierter Marker des Autophagosoms (90) und führt damit zu erhöhter Autophagieaktivität der Zelle (91). Besteht dieser Zusammenhang ebenfalls in Glioblastomzellen, so kann dieser stärkeres Tumorwachstum initiieren und unsere erzielten Ergebnisse stützen. Dieser Signalweg wurde ebenfalls von He et al. anhand glioblastomtragender Mäuse im Rahmen von Radiosensibilisierung durch „ultrasound-triggered microbubble destruction“ untersucht. Hierbei wurde eine Reduktion der intrazellulären PGRMC1 Expression sowie dessen Bindung mit MAP1LC3-II initiiert und folgend eine erhöhte Radiosensibilität der Glioblastomzellen in vivo und in vitro nachgewiesen (92).

Der nächste relevante zelluläre Prozess ist die Einflussnahme von PGRMC1 auf verschiedene Signalkaskaden im Weg der Rezeptorthyrosinkinase, welcher bei über 90 Prozent der Glioblastome Mutationen aufweist (3). Dabei am prominentesten ist die Amplifikation des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), welche 41 bis 57 Prozent der Glioblastome aufweisen (93,94). Die EGFR Signalwege können je nach Lokalisation des Rezeptors in der Zelle separiert werden. Plasmamembrangebundene EGFR mediiert diverse Signalwege wie RAS/MAPK, JAK/STAT, PKB/AKT oder PKC und reguliert so das Tumorwachstum, das Zellüberleben oder die Angiogenese (93). Ahmed *et al.* berichteten in einer molekularen Studie über die Verknüpfung von PGRMC1 und dem EGFR. So stabilisierte PGRMC1 den Rezeptor an der Zelloberfläche und der Knockdown von PGRMC1 oder des EGFR führte zu einem verminderten Tumorwachstum (95). Darüberhinaus beschreiben Kabe *et al.* anhand von Zelllinien, dass PGRMC1 als direkter Ligand vom EGFR fungiert, diesen aktiviert und Downstreamsignale weiterleitet (50). Dass die Aktivierung zu einer schlechteren Prognose führt, wurde am Beispiel von PKC beschrieben. Mawren et al. untersuchten an 26 Patient\*innen die Relevanz der PKC Expressionen im Bezug zum Überleben und stellten fest, dass eine hohe PKC Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (96).

Zusätzlich zu den beschriebenen Signalwegen nach Phosphorylierung des EGFR kann dieser selbst auch translozieren und an zellulären Organellen wie den Mitochondrien oder dem Zellkern Signale vermitteln (93). Boerner *et al.* untersuchten an Brustkrebszelllinien die Funktion vom EGFR am Mitochondrium und beschrieben

dessen Translokation zur Mitochondrienmembran sowie die Interaktion mit COXII mit Hilfe von Co-Immunopräzipitations Assays. Durch diese Interaktion schützte es die Brustkrebszellen vor einer Adriamycin-induzierten Apoptose und wurde deshalb als onkogen angenommen (97). Auch am Zellkern wurde der EGFR als tumorfördernd beschrieben, indem er die Transkription von wachstumsfördernden oder anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie MYC oder iNOS initiiert (98).

Die Funktion von PGRMC1 als Aktivator vom EGFR und der oben beschriebenen zellulären Prozesse, die durch diese Signalkaskade ausgelöst werden, stützt es unsere Ergebnisse von der schlechteren Prognose beim Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben.

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine Assoziation von PGRMC1 mit Integrin beta-1 (ITGB1) und TCF 1/7. Die Menge dieser beiden Proteine war nach einem Knockout von PGRMC1 in GBM Zellen deutlich reduziert. Auch in unseren GBM Proben zeigte sich eine Korrelation der Expression von PGRMC1 und ITGB1 (87). Der ITGB1 Signalweg steht in diversen Tumorzellen im Zusammenhang mit der Tumorgenese sowie der -progression (99). Bei Glioblastompatient\*innen zeigte sich zudem ein Zusammenhang von hoher ITGB1 Expression und einem schlechteren Gesamtüberleben, sowie eine Synergie von ITGB1 und EGF/EGFR bei der Invasion der Tumorzellen (100). Diese Ergebnisse zeigen die Relevanz der PGRMC1 und ITGB1 Signalachse in GBM's und stützen zudem die Ergebnisse unserer Studie.

Die Korrelation von hoher PGRMC1 und EGRF Expression wurde ebenfalls in hepatozellulären Karzinomen beobachtet und mit einer geringeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert (101). Im Rahmen dieser Studie von Sang et al. zeigte sich zudem ein Einfluss von PGRMC1 auf die Immunantwort. Der Knock Out von PGRMC1 führte zu einer vermehrten Nekrose der Tumorzellen sowie einer Supprimierung der EGFR gesteuerten pro-inflammatorischen IL-6 Produktion und NF- $\kappa$ B Aktivität (101). Diese Regulation des Immunsystems durch PGRMC1 ist ebenfalls in Glioblastomzellen denkbar und somit ein Ansatz im Bereich der Immuntherapie für Glioblastome.

Abb. 24

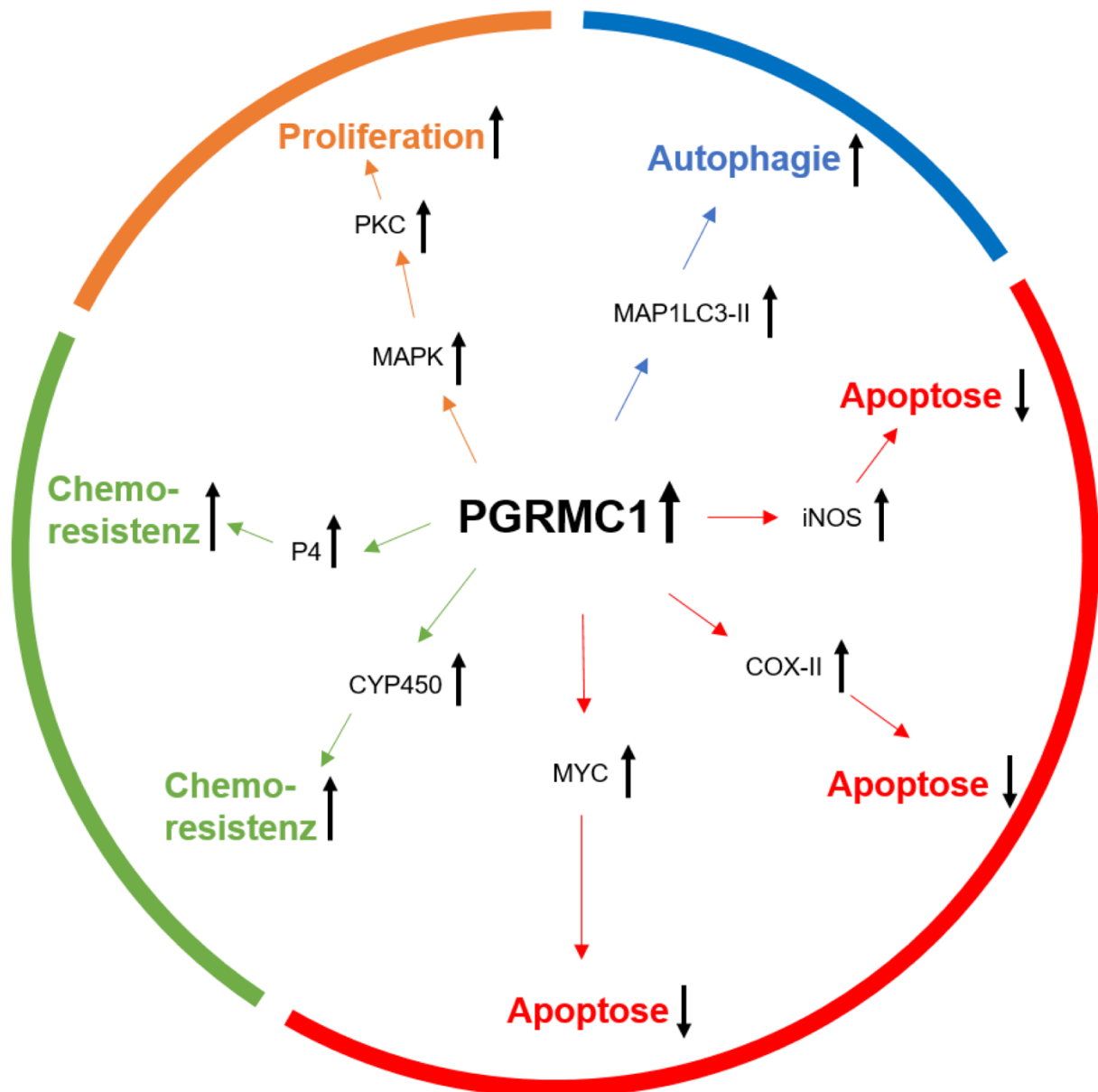


Abbildung 24 PGRMC1: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen

Im Kontext der neutrophilen Chemotaxis in Glioblastomen identifizierten Zha *et al.* eine positive Feedbackschleife von Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs), welche den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivierten und über eine Erhöhung der Interleukin-8 (CXCL8)-Ausschüttung zu einem neutrophilen Recruitment in GBM-Zellen führte (102). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe zeigten die zwei untersuchten GBM-Zelllinien ebenfalls eine Ausschüttung hoher Mengen Interleukin-8 (CXCL8). Diese Ausschüttung wurde durch den Knock Down von PGRMC1 signifikant reduziert.

Ferner zeigte sich eine signifikant positive Korrelation von der PGRMC1-Expression und der Expression des neutrophilen Oberflächenmarker CD66b in GBM-Gewebeproben (87). CD66b fungiert als Marker für die neutrophilen Granulozyten. Diese positive Korrelation unterstützt einen Zusammenhang von PGRMC1-Expression und der pro-inflammatorischen Recrutierung von Neutrophilen ins Gewebe.

Verschiedene Studien zeigten, dass diese pro-inflammatorische Mikroumgebung zu einer gesteigerten Progression von GBM-Zellen führt (102,103). Diese pro-inflammatorische Funktion von PGRMC1 und die daraufhin gesteigerte Tumorprogression kann ein möglicher Erklärungsansatz für das schlechtere Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben unserer untersuchten Patient\*innen sein.

Neben dem möglichen Einfluss von PGRMC1 auf die Tumorgenese und die Inflammation kann nach dem aktuellen Stand der Literatur eine weitere Funktionsweise des Proteins betrachtet werden. Dabei handelt es sich um die Ausbildung einer Chemotherapieresistenz gegen Doxorubicin bei Uterussarkomzellen, in denen PGRMC1 hoch exprimiert war (104). Basis dieser Studie waren die Erkenntnisse von Hand *et al.*. Unter Verwendung von Hefepilzzellen beschrieben sie, dass das DAP1 Gen (Death Associated Protein 1) für das Zellüberleben nach DNA Schäden durch Methylmethansulfonat benötigt wird (105). DAP1 gehört wie PGRMC1 zur Familie der MAPRs (Membrane-Associated Progesterone Receptor) und wird als homolog angesehen. Weitere Studien spezifizierten diesen Mechanismus und beschreiben die Involvierung von PGRMC1 in die durch P4 mediierte Anti-Apoptose bei Behandlung mit cis-Platin in Ovarialtumoren (106). Das Chemotherapeutikum der Wahl bei Glioblastomen ist Temozolomid, ebenfalls ein methylierendes Medikament, welches allerdings vorwiegend anti-autophagisch wirkt (107). Durch den gleichen Mechanismus der DNA-Schädigung ist ein positiver Einfluss von PGRMC1 auf das Zellüberleben bei Temozolomid Therapie denkbar. Die so verminderte Potenz von Temozolomid kann dazu beigetragen haben, dass Patient\*innen mit einer höheren PGRMC1 Expression ein kürzeres Überleben hatten.

Darüberhinaus lieferten Kabe *et al.* Ergebnisse über die Aktivierung von CYP450 via Bindung mit PGRMC1 und der daraus resultierenden Degradation von Doxorubicin

(50). Auch dieser Mechanismus ist bei Temozolomid denkbar, wenn ein CYP-induzierter Abbau des Therapeutikums oder seiner aktiven Abbauprodukte vorliegt. Auch hier bedarf es weiterer Nachforschungen. Klar ist aber, dass ein schnellerer Abbau ebenfalls zu einer verminderten Potenz führen würde und so zu einer schlechteren Prognose.

In Abbildung 24 sind nocheinmal alle relevanten zellulären Mechanismen von PGRMC1 graphisch dargestellt.

PGRMC1 zeigt vielseitige Einflüsse auf zelluläre tumorfördernde Mechanismen, welche unsere Ergebnisse stützen. Dies liefert die Basis für weitere molekulare Analysen in folgenden Studien. Eine tumorsupprimierende Wirkung von PGRMC1 ist nach aktuellem Stand der Forschung nicht bekannt.

### 4.3. TRIM33

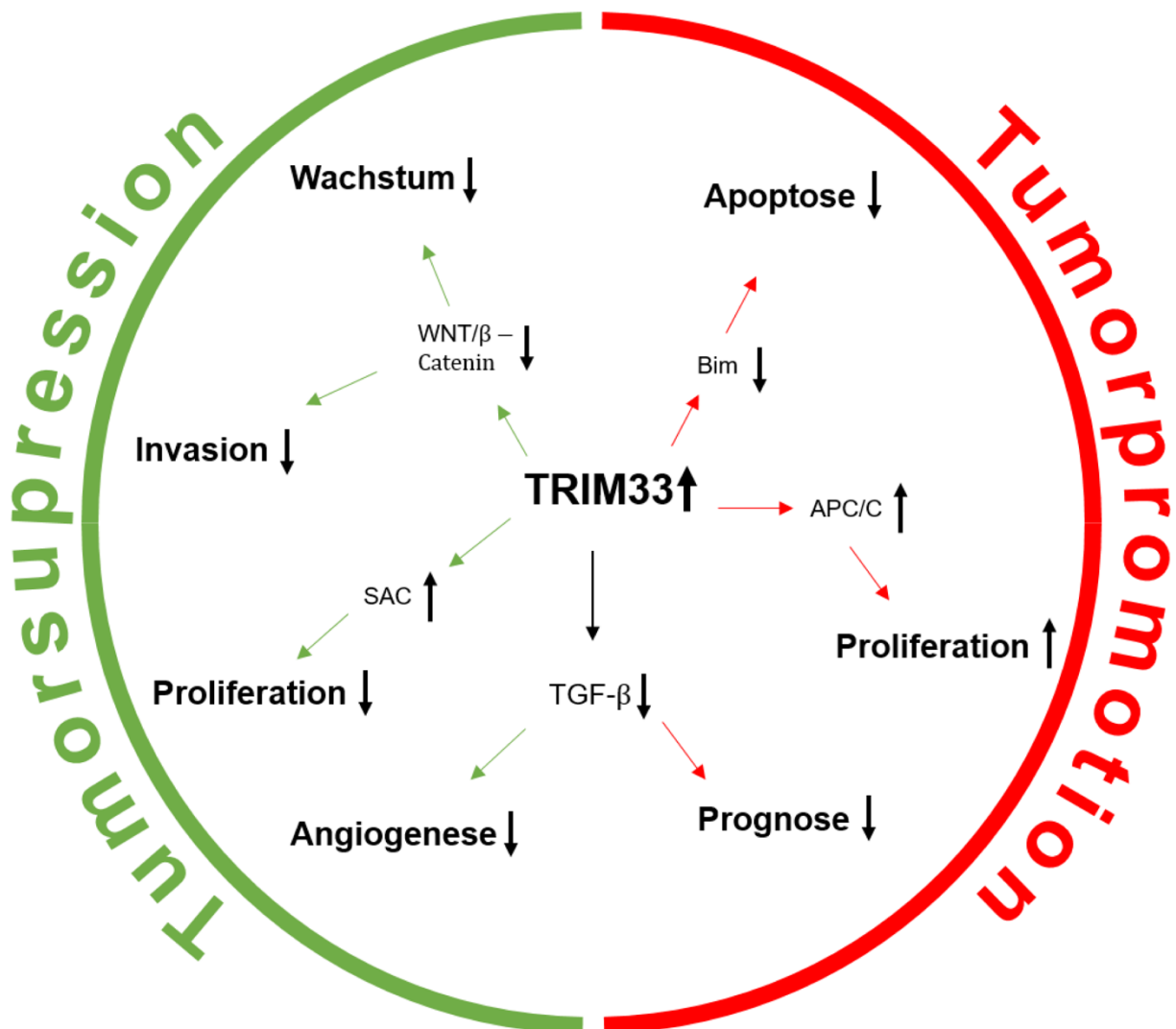
Der Transkriptionsfaktor TRIM33 zeigte, im Vergleich zum gesunden TRIM33 high Gewebe, eine erhöhte Expression im Tumorgewebe. Des Weiteren hatten Glioblastompatient\*innen mit erhöhter TRIM33 Expression ein signifikant kürzeres Gesamt- sowie Rezidiv-freies Überleben als Patient\*innen mit niedriger Expression. Im Zuge der Cox-Regression hatten TRIM33 high Patient\*innen ein erhöhtes Sterberisiko, das Signifikanzniveau wurde allerdings nicht erreicht. Anhand dieser Ergebnisse ist TRIM33 zwar nicht als prognostisch unabhängiger Marker im Glioblastom anzusehen, könnte aber einer Rolle in der Entstehung und Progression dieser Tumorentität spielen.

TRIM33 hat Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse, wie die Transkription (66), die Zelldifferenzierung (108) und die Mitose (109). In Relation zu Tumoren wurden zwei Signalkaskaden beschrieben, in denen TRIM33 entscheidend mitwirkt und dadurch als Tumorpromoter oder als Tumorsuppressor fungieren kann (110). Die Tumorsuppression erfolgt über die Inhibierung der WNT/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade, welche durch vermehrte Transkription von Genen wie c-myc, Cyclin D1 und Snail, zu Tumorwachstum und Invasion/Metastasierung führt (111). In Bezug zu diesem Signalweg liegt bereits eine an Glioblastomen durchgeführte Studie vor. Jianfei *et al.* berichteten über den inhibitorischen Effekt von TRIM33 durch Destabilisierung von  $\beta$ -



Catenin und der darauffolgenden Ubiquitinierung in Glioblastomzellen (62). Sie beschrieben TRIM33 als Tumorsuppressor und damit würde es zu einer besseren Prognose führen. Dieses Ergebnis steht damit gegensätzlich zu dem in unserer Studie erzielten Ergebnis, dass eine hohe TRIM33 Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Nun stellt sich die Frage wie dies erklärt werden kann. Ein Ansatzpunkt zur Erklärung dieser Diskrepanz ist die Multifunktionalität von TRIM33. Jianfei *et al.* testeten über transfizierte GBM-Zelllinien nur den Einfluss von TRIM33 auf  $\beta$ -Catenin und ließen andere Funktionswege außer Acht. Dabei ist ein Zusammenspiel mehrerer Signalwege und deren gegenseitige Beeinflussung wahrscheinlich.

**Abb. 25**



**Abbildung 25 TRIM33: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen**

Studien von anderen Tumorentitäten zeigten mit der TGF- $\beta$ /SMAD Signalkaskade einen weiteren von TRIM33 beeinflussten Signalweg. Die TGF- $\beta$ /SMAD Signalkaskade kann in Glioblastomen hoch aktiv sein und führt so zum Beispiel zu vermehrter Angiogenese und schlechterer Prognose (112,113). Loay *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass eine hohe TRIM33 Expression und zusätzlicher Verlust von SMAD4 mit einer schlechteren Prognose bei operablen Mamma-Karzinomen assoziiert ist (114). Sie nutzten dafür ebenfalls eine immunhistochemische Färbung sowie mit 248 Proband\*innen ein ähnlich großes Patientenkollektiv. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Jain *et al.*, bei denen eine hohe TRIM33 Expression mit gleichzeitigem SMAD4 Verlust in Kolorektalkarzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (115). Der Zusammenhang von hoher TRIM33 Expression und dem Verlust von SMAD4 stellte den Bezug zur TGF- $\beta$ /SMAD Signalkaskade her und deckt sich mit der Literatur. TRIM33 kann durch Ubiquitinierung von SMAD4 als Regulator des TGF- $\beta$ /SMAD Signalwegs fungieren (61).

Neben Studien mit hoher TRIM33 Expression finden sich ebenfalls Studien in denen das Tumorgewebe, im Vergleich zum Gesunden, eine niedrige Expression aufweist. Ding *et al.* untersuchten hepatozelluläre Karzinome (HCC) und stellten ein gegenläufiges Ergebnis dar. Hier war eine niedrigere TRIM33 Expression und kein SMAD4 Verlust mit einem schlechteren Überleben vergesellschaftet (116). Gleiches wurde im Nierenzellkarzinom (RCC) beobachtet (117). Warum diese gegenläufigen Ergebnisse erzielt wurden, ist noch nicht geklärt. Der allgemeine Stand der Forschung sieht TRIM33, durch seine Rolle als Inhibitor des TGF- $\beta$ /SMAD Signalweg, als Tumorsuppressor an (110). Doch auch hier wurden anderslautende Ergebnisse veröffentlicht. So wurde beschrieben, dass in Mammakarzinomen sowohl ein aktivierter, als auch ein kompletter Verlust des TGF- $\beta$ /SMAD Signalwegs tumorfördernd agierten (118).

Zusätzlich beobachteten Ligr *et al.* in Pankreaskarzinomzellen, dass der Knockdown von TRIM33 zu einer verringerten Tumordinvasion führte (119). Zudem war das Zellwachstum sowie bei Überexpression als auch beim Knockdown vermindert. Neben der Inhibierung der Invasion zeigten Wang *et al.* einen Einfluss von TRIM33 auf die Apoptose von Tumorzellen. In B-Zell Leukämiezellen beobachteten sie die inhibierende Interaktion von TRIM33 mit der Bim Aktivierung und einer so

verminderten Apoptosefähigkeit der B-Zellen (120). Beide Mechanismen, sowie Inhibierung der Invasion als auch die Reduktion Apoptosefähigkeit sprechen für eine schlechtere Prognose.

Es ist offensichtlich, dass auf Grund der ungeklärten Funktion von TRIM33 keine Aussage über die genaue Rolle dieses Proteins in verschiedenen Tumorentitäten getroffen werden kann. Dennoch bieten unsere Ergebnisse und das Wissen, bei welchen zellulären Signalwegen TRIM33 eine Einflussgröße ist, eine Grundlage, um weiterführende molekulare Studien an Glioblastomzellen voranzutreiben.

Des Weiteren bestand eine hochsignifikante Korrelation zwischen der TRIM33 Expression und dem Proliferationsmarker Ki67, was auf einen Zusammenhang von TRIM33 und der Tumorprogression hindeuten kann. Auch dieses Ergebnis wurde bislang in Glioblastomen nicht gezeigt, eine ähnliche Beobachtung wurde aber im Kolorektalkarzinom gemacht, wo eine hohe TRIM33 Expression mit einer abnormen Proliferationsrate assoziiert war (115). Sedgwick *et al.* untersuchten an HeLa-Zelllinien die Interaktion von TRIM33 mit mitoserelevanten Proteinen (109). Sie beschrieben TRIM33 als Bindungspartner für den Anaphase-Promotions-Komplex/Zyklosom (APC/C), der die Transition von der Metaphase in die Anaphase initiiert. TRIM33 wirkt somit proliferativ. Zudem wurde beschrieben, dass ein TRIM33 Knockdown zu einer Aktivierung des spindle assembly checkpoints (SAC) führte. Dieser Checkpoint verzögert die Zellteilung, bis eine korrekte Anordnung der Chromosomen sichergestellt worden ist (121). In dieser Hinsicht ist TRIM33 durch die Inaktivierung von SAC ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und kann so die Proliferation von entarteten Zellen vorantreiben. Diese Erkenntnisse stützen unser Ergebnis der Korrelation von TRIM33 und dem Proliferationsmarker Ki67. Da es sich bei unserer Studie aber nur um eine immunhistochemische Analyse von eingebettetem Gewebe handelt, müssen zur Bestätigung molekulare Versuchsreihen an Glioblastomzellen folgen.

Sollte sich herausstellen, dass TRIM33 in Glioblastomen als Tumorpromoter fungiert, kann dessen Inhibition als neuer therapeutischer Ansatz dienen. Shi *et al.* berichteten, dass TRIM33 Expressionsverlust in Zellen zu einer Resistenz von BET Inhibitoren JQ1 und GS-626510 in Kolorektalkarzinomen führen (122). Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Inhibitoren genau auf TRIM33 abzielen. BET

Inhibitoren binden an Bromodomänen, von denen TRIM33 auch welche besitzt. Ist so ein gezielter Knockdown möglich, könnte die mögliche schädliche Wirkung von TRIM33 aufgehoben werden.

In Abbildung 25 sind alle relevanten zellulären Prozesse von TRIM33 graphisch dargestellt.

#### 4.4. PRAS40

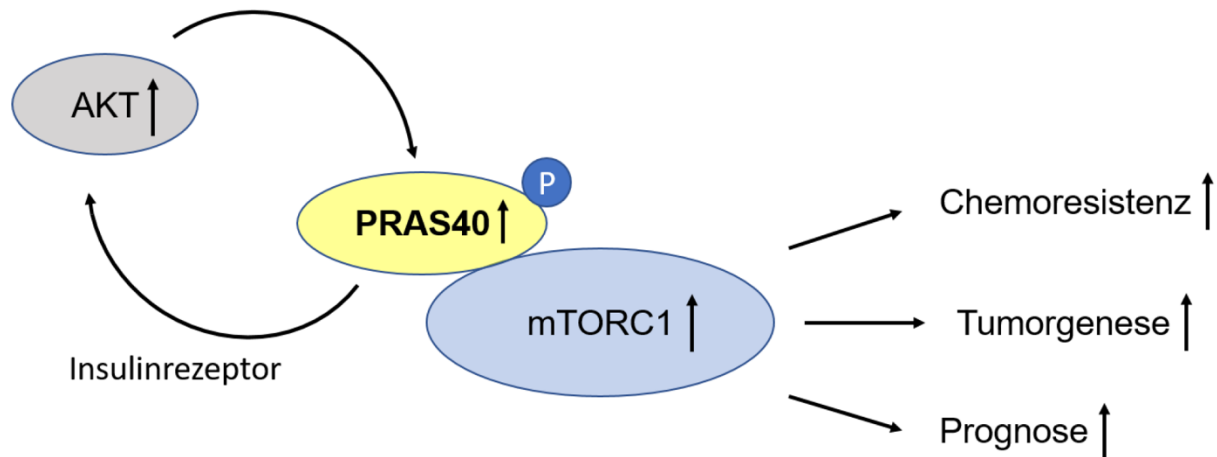
PRAS40 zeigte in unserer Studie eine signifikant höhere Expression in Tumorgewebe als im gesunden Gewebe. Ein signifikanter Unterschied zwischen hoher bzw. niedriger Expression in Bezug zum Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben wurde allerdings nicht beobachtet. Vorherige Studien von PRAS40 in Bezug auf das Überleben oder dessen Funktion bei der Entstehung von Glioblastomen lagen nicht vor.

PRAS40 ist in der Zellbiologie als Bestandteil des mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) bekannt und als Substrat von Akt *in vivo* und *in vitro* bestätigt (72). So spielt es eine wichtige Rolle in metabolischen Dysfunktionen und in verschiedenen Tumoren (71). Eine, wie in unserer Studie, erhöhte Expression von PRAS40 in Tumorgewebe im Vergleich zum Gesunden wurde bereits in diversen Studien beschrieben. Dabei zeigten Mamakarzinome, Leber-, Lungen-, Prostata-, und Kolonkarzinome, sowie Melanome höhere Level von PRAS40 als korrespondierendes gesundes Gewebe (123–125). PRAS40 hat Einfluss auf verschiedene Signalwege, deren Deregulierung im Glioblastom beschrieben wurden und im Folgenden erläutert werden.

Madhunapantula *et al.* beobachteten bei der Tumorprogression von Melanomzelllinien erhöhte Level von phosphoryliertem PRAS40 und eine zeitgleich erhöhte Akt Aktivität. Diese Aktivitätssteigerung führte zu einer deregulierten Zellapoptose und erhöhten so die Lebensfähigkeit der Krebszellen. Diese gleichzeitige Erhöhung von PRAS40 und der Akt Aktivität wurde durch Untersuchung von 30 Melanompatient\*innen mittels Western Blot bestätigt (126). Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls in Prostatakarzinomen (127) und in Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) (128) beobachtet. PRAS40 wird durch aktivierte Akt phosphoryliert und so zum aktiven

phospho-PRAS40, welches den mTOR-Komplex 1 aktiviert (71). In Glioblastomen führt eine Aktivierung vom PI3K/Akt/mTOR Signalweg zur Tumorgenese und zur Chemotherapieresistenz (129).

**Abb. 26**



**Abbildung 26 PRAS40: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen**

Zusätzlich relevant für das Glioblastom ist die Rolle von PRAS40 im Insulinrezeptor/Akt Signalweg. Verschiedene Studien zeigen, dass metabolische Störungen wie Diabetes mellitus II, einen Risikofaktor für Glioblastompatient\*innen darstellen und mit einem schlechteren Gesamt- sowie Rezidiv-freien Überleben assoziiert sind (130,131). Gong *et al.* untersuchten die Interaktion von Insulin sowie seinen Rezeptoren und dem Verhalten von Glioblastomzellen. Sie zeigten, dass schon bei physiologischen Leveln von Insulin ein vermehrtes Tumorwachstum und ein längeres Zellüberleben auftrat, welches durch die Aktivierung des Akt-Signalwegs hervorgerufen wurde (132). Bei diesem Signalweg hat PRAS40 eine besondere Bedeutung da es hier neben der Funktion als Downstream-Regulator von Akt auch eine als Upstream-Regulator innehat. Lv *et al.* untersuchten diesen Signalweg in der Familie der Ewing Sarkome (ESFTs) und beschrieben eine durch phospho-PRAS40 erhöhte Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und damit verbundene erhöhte Aktivität von Akt und mTOR (75).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist das erhöhte Expressionslevel von PRAS40 im Glioblastomgewebe im Vergleich zum gesunden Hirngewebe plausibel. Zudem sollten

die durch die aktivierte Akt/mTOR Signalkaskade ausgelösten Prozesse, die oben bereits beschrieben wurden, eine Auswirkung auf die Prognose eines Glioblastoms haben. So sollte die Prognose der Glioblastompatient\*innen mit hoher PRAS40 Expression schlechter sein, als bei Patient\*innen mit niedrigen PRAS40 Leveln. Ein Ansatz zur Erklärung warum unsere Überlebensanalyse ergebnislos blieb, ist die Wahl des Targets. Wie bereits aus den vorherigen Ausführungen hervorgeht, ist nicht PRAS40, sondern das aktivierte phospho-PRAS40 relevant für den mTOR-Komplex 1. Daher sollte eine weitere Untersuchung unserer Gewebeproben mit einem phospho-PRAS40 Antikörper erfolgen und auf eine Assoziation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben überprüft werden. Die in unserem Patientenkollektiv beobachteten Überexpression von PRAS40 passt zu dieser Annahme, da bei einer großen Menge von PRAS40 viel von diesem Protein phosphoryliert werden kann.

#### 4.5. PGRMC1/TRIM33

Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse der separaten Analysen von PGRMC1 und TRIM33, untersuchten wir nun die Kombination der beiden Marker. Hierbei zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied beim Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben. Glioblastompatient\*innen bei denen beide Marker hoch exprimiert waren, hatten ein schlechteres Überleben als jene, die beide Marker gering exprimiert hatten. Da wir diese Erkenntnis bereits bei den Einzelanalysen gewonnen hatten, war die Lebenszeitanalyse von besonderem Interesse. Hier zeigte sich, dass das Sterberisiko signifikant um 1,9 erhöht war und damit noch einmal deutlich höher als bei PGRMC1 (HR = 1,5) oder TRIM33 (HR = 1,35) alleine. Somit liegt die Annahme nahe, dass sich die beiden Marker synergistisch schlecht auf die Prognose der Patient\*innen auswirken.

Die jeweiligen Mechanismen, an denen die beiden Marker an der Tumorgenese und der Tumorprogression bei Glioblastompatient\*innen beteiligt sind, wurden bereits in der Diskussion erläutert. Dabei ist zu beobachten, dass beide Proteine in unterschiedlichen Signalwegen eine entscheidende Rolle spielen. Diese Tatsache unterstützt die These des synergistischen Effektes insofern, dass beide unabhängig voneinander zur Tumorgenese und -progression beitragen. PGRMC1 agiert dabei insbesondere über die Hochregulierung des Signalwegs der Rezeptorthyrosinkinase

EGFR und deren nachgeschalteten Signalkaskade (93). So wird in der Zelle das Tumorwachstum, das Zellüberleben und die Angiogenese gefördert. Bei den durch TRIM33 regulierten Signalwegen ist der Einfluss auf den Tumor weniger eindeutig und der Mechanismus dahinter unklar (110). Dennoch scheint die Inhibition des ansonsten tumorfördernden TGF- $\beta$ /SMAD Weg zu einer Progression zu führen (114). In dieser Hinsicht tragen beide Marker über unterschiedliche Signalwege zu einer schlechten Prognose bei und erklären das schlechtere Überleben, wenn PGRMC1 sowie TRIM33 hochexprimiert sind.

Neben den Signalwegen sind weitere mögliche Funktionen beschrieben, die nebeneinander eine schlechtere Prognose vermuten lassen. PGRMC1 bindet mit CYP450 und aktiviert dieses (50) und könnte so zum Abbau vom gängigen Chemotherapeutikum Temozolomid beitragen. Das Ausbleiben der DNA-Schädigung verhindert die Zellseneszenz und die Zelle bleibt teilungsaktiv. Von dieser Tatsache kann wiederum die mitoseregulierende Funktion von TRIM33 profitieren. TRIM33 bindet mit dem Anaphase-Promotions-Komplex/Zyklosom (APC/C), welcher die Transition von der Metaphase in die Anaphase initiiert (109). Es lässt sich folgern, dass es durch dieses Zusammenspiel der Marker zu einer höheren Zellproliferation kommt und damit zu einer schlechteren Prognose.

Auf Grund dieser Erkenntnisse ist die Annahme der Synergie von PGRMC1 und TRIM33 und der damit verbundenen schlechteren Prognose sowie dem erhöhten Sterberisiko nachvollziehbar und muss in weiterführenden molekularen Studien weiterverfolgt werden.

## 4.6. Diskussion der Methoden und Limitationen

### 4.6.1. Patientenkollektiv

Bereits bei der Suche nach passenden Patient\*innen wurden Limitationen der Methodik deutlich. Probleme bereiteten die archivierten Gewebeproben, die teilweise sehr wenig vitalen Tumorzellen, große Nekrosezonen oder Einblutungen enthielten. Proben in denen kein vitaler Tumor zu finden war, wurden von der Studie ausgeschlossen. Durch unvollständig vorliegender Patientenakten war zudem die Datenerhebung erheblich erschwert. Klinik-, Hausarzt- oder Wohnortswechsel der Patient\*innen machten die Erhebung der Lebensdaten teilweise unmöglich, sodass diese aus der Studie gestrichen werden mussten.

Prognostische Marker, insbesondere der MGMT-Methylierungsstatus, wurden zur Vollständigkeit nachbestimmt. Probleme bereitete die genaue Bestimmung des prognostisch relevanten Resektionsausmaßes. Bei einigen Patient\*innen lag postoperativ lediglich ein CT oder eine MRT-Aufnahme außerhalb des 72H-Fensters vor. Das Resektionsmaß zu bestimmen gestaltete sich als schwierig da Resttumor von neu entstandenem Granulationsgewebe nicht zu unterscheiden ist (133).

### 4.6.2. Tissue Microarray

Zur Analyse einer großen Anzahl von Gewebeproben bietet die Methode des Tissue Microarray eine schnelle und besonders günstige Variante, da sehr viele Proben auf einem Objektträger Platz finden können (134). Daher war das TMA in dieser Studie, bei einer Patientenkohorte von mehr als 250 Personen, Mittel der Wahl. Des Weiteren eignet sie sich sehr gut für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung (135). Limitiert wird diese Methode durch den nur kleinen Gewebeanteil, welcher aus einer größeren Probe herausgestanzt wurde. So können bereits bei der Auswahl des zu stanzenden Ausschnitts falsche Gewebeanteile ausgewählt werden, sowie heterogene Proteinverteilungen im Gewebe nicht ausreichend erfasst werden (136). Dennoch wurde in einer Vielzahl von Studien belegt, dass Ergebnisse von Gesamtgewebeschnitten und TMAs zumeist konkordant sind (137). Zudem wirkten wir dem in unsere Studie entgegen, indem wir, wenn möglich, mehrere Abschnitte aus demselben Tumor analysierten. Ein weiteres Problem, welches im Laufe der Versuchsdurchführung auftrat, war der Verlust einzelner Proben vom Objektträger,



sodass einige Proben nicht gefärbt und ausgewertet werden konnten. Dennoch ist die Methodik ein probates Mittel, um valide Ergebnisse zu erzielen.

#### 4.6.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein etabliertes Verfahren in der Analyse von Gewebeproben. Mögliche Fehlerquellen sind bei der Wahl der richtigen Antikörper und der Durchführung des IHC Protokolls zu sehen (138). Um etwaige Fehlfärbungen zu verhindern wurden ausschließlich, bereits an Paraffingewebe getesteten und validierten Antikörper verwendet, die kommerziell erhältlich waren. Die Auswertung der Färbung erfolgte durch zwei unabhängige Personen, sodass eine objektive Einschätzung sichergestellt war. Zudem wurde bei einer großen Diskrepanz der ermittelten Scores eine dritte Person eingebunden.

#### 4.7. Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei Biomarkerkandidaten (PGRMC1 und TRIM33), deren Expression eine signifikante prognostische Relevanz auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben von Glioblastompatient\*innen haben. Zudem zeigten die Marker für die Tumorgenese oder die Resistenz gegen Chemotherapeutika potentiell bedeutende Funktionen. Sollten sich diese in Hinblick auf Glioblastomzellen bestätigen, eröffnen sich völlig neue therapeutische Ansätze. Molekulare Marker bieten die Möglichkeit, neben der histologischen Einordnung, eine patientenspezifische Charakterisierung und damit eine auf den Patienten zugeschnittene Therapie. Zurzeit fehlt eine solche Individualisierung und alle Patient\*innen, ungeachtet des MGMT-Methylierungsstatus, bekommen die gleiche Standardtherapie nach Stupp-Schema, auch wenn diese Therapieform nicht immer erfolgsversprechend ist. Daher braucht es neue Ansätze, zu denen diese Studie einen Teil beitragen soll.

## 5. Zusammenfassung

Gliome und Glioblastome sind eine Gruppe der tödlichsten Tumorerkrankungen und das Glioblastom der häufigste maligne hirneigene Tumor. Trotz aggressiver Therapieansätze versterben mehr als 95% der Patient\*innen innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose. Zur besseren Abschätzung der Prognose bedarf es an passenden Biomarkern, die klinisch etabliert werden können. Es gibt vergleichsweise wenige Studien, in denen solche Biomarker identifiziert wurden. Bei PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 handelt es sich um eben solche Marker, die bereits in anderen Tumorarten eine prognostische Relevanz aufwiesen. In dieser Studie untersuchten wir den prognostischen Einfluss der genannten Marker auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben und führten eine Überlebenszeitanalyse durch. Hierfür untersuchten wir 263 Gewebeproben von Patient\*innen mit Gliomen und Glioblastomen, die von 2005 bis 2018 in der neurochirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Magdeburg behandelt wurden. Wir sammelten patienten- und tumorspezifische Daten und führten immunhistochemische Färbungen auf Tissue Microarrays durch. Die Markerexpression wurde anschließend von bis zu drei unabhängigen Gutachtern bewertet und die Ergebnisse mit dem Statistikprogramm SPSS analysiert. Zur Anwendung kamen hier der Kaplan-Meier-Schätzer, der Log-Rank-Test, Spearman's Rho, Mann-Whitney-U und das proportionale Hazard Modell. Daraus resultierte eine signifikante Assoziation von einer hohen PGRMC1 Expression in Glioblastomproben mit einem schlechteren Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben. In der Cox-Regressionsanalyse zeigte sich ein erhöhtes Sterberisiko und eine signifikante Unabhängigkeit anderer Prognosefaktoren. TRIM33 zeigte ebenfalls bei hoher Expression in Glioblastomproben eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben und zudem eine positive Korrelation zum Proliferationsmarker Ki67. In der Cox-Regressionsanalyse zeigte TRIM33 ein erhöhtes Sterberisiko, die Unabhängigkeit zu anderen Prognosefaktoren erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Die Markerkombination von PGRMC1 und TRIM33 war bei hoher Expression beider Proteine in Glioblastomproben hochsignifikant mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Zudem überstieg das Sterberisiko das der jeweiligen Marker alleine. Bei PRAS40 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen niedriger Expression im Gesunden und hoher Expression im Tumor festgestellt.

Diese Studie identifizierte PGRMC1 und TRIM33 als auch ihre Kombination als prognostisch relevante Marker für das Gesamt- sowie das Rezidiv-freie Überleben von Glioblastompatient\*innen und kann als Basis für weiterführende molekulare Studien zu diesen Proteinen im Glioblastom dienen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut R, Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert Koch-Institut (2019). doi: 10.25646/5977.2
2. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016 | Neuro-Oncology | Oxford Academic. [https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/21/Supplement\\_5/v1/5610892](https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/21/Supplement_5/v1/5610892) [Accessed October 26, 2020]
3. Weltgesundheitsorganisation. *WHO classification of tumours of the central nervous system*. Revised 4th edition. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer (2016). 408 p.
4. Brodbelt A, Greenberg D, Winters T, Williams M, Vernon S, Collins VP. Glioblastoma in England: 2007-2011. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* (2015) 51: doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.014
5. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* (2005) 64: doi: 10.1093/jnen/64.6.479
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* (2016) 131:803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
7. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* (2014) 5: doi: 10.4103/2152-7806.132138
8. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* (2021) 23:1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
9. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch N, Maiorka P, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* (2004) 64: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
10. Ohgaki H, Kleinhues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2013) 19: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
11. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, et al. *TERT* promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci* (2013) 110:6021–6026. doi: 10.1073/pnas.1303607110
12. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89:4309–4313. doi: 10.1073/pnas.89.10.4309
13. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* (2012) 26:756–784. doi: 10.1101/gad.187922.112
14. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nouseh H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* (2013) 155:462–477. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034
15. Parsons D, Jones S, Zhang X, Lin J, Leary R, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I, Gallia G, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (2008) 321: doi: 10.1126/science.1164382

16. Cui D, Ren J, Shi J, Feng L, Wang K, Zeng T, Jin Y, Gao L. R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by downregulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Int J Biochem Cell Biol* (2016) 73: doi: 10.1016/j.biocel.2016.02.007
17. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* (2014) 23:1985. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
18. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain J Neurol* (2007) 130:2596–2606. doi: 10.1093/brain/awm204
19. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arzteblatt Int* (2010) 107: doi: 10.3238/arztebl.2010.0799
20. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology* (2009) 32: doi: 10.1159/000170088
21. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem* (2017) 24: doi: 10.2174/0929867324666170516123206
22. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* (2001) 95:190–198. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190
23. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* (2003) 99:467–473. doi: 10.3171/jns.2003.99.3.0467
24. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-Oncol* (2004) 6:227–235. doi: 10.1215/S1152851703000620
25. Scott JG, Bauchet L, Fraum TJ, Nayak L, Cooper AR, Chao ST, Suh JH, Vogelbaum MA, Peereboom DM, Zouaoui S, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. *Cancer* (2012) 118:5595–5600. doi: 10.1002/cncr.27570
26. Me H, Ac D, T G, Mf H, N de T, M W, Jm K, Ja H, W M, L M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352: doi: 10.1056/NEJMoa043331
27. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2009) 27:4150–4154. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832
28. Kubben PL, ter Meulen KJ, Schijns OEMG, ter Laak-Poort MP, van Overbeeke JJ, van Santbrink H. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *Lancet Oncol* (2011) 12:1062–1070. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70130-9
29. Friedman H, McLendon R, Kerby T, Dugan M, Bigner S, Henry A, Ashley D, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (1998) 16: doi: 10.1200/JCO.1998.16.12.3851
30. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, et al. MGMT gene silencing and benefit from

- temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352:997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331
31. Naydenov E, Tzekov C, Minkin K, Nachev S, Romansky K, Bussarsky V. Long-term survival with primary glioblastoma multiforme: a clinical study in bulgarian patients. *Case Rep Oncol* (2011) 4: doi: 10.1159/000323432
  32. Burton E, Lamborn K, Forsyth P, Scott J, O’Campo J, Uyehara-Lock J, Prados M, Berger M, Passe S, Uhm J, et al. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2002) 8:
  33. Burton E, Lamborn K, Feuerstein B, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins R, Aldape K. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* (2002) 62:
  34. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* (2011) 12: doi: 10.1016/S1470-2045(11)70196-6
  35. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O, Zanella F, Reulen H. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* (2006) 7: doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9
  36. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsy C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro-Oncol* (2011) 13: doi: 10.1093/neuonc/nor133
  37. Diener H-C, Ackermann H, Deutsche Gesellschaft für Neurologie eds. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. 5., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (2012). 1190 p.
  38. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* (2002) 64: doi: 10.1016/s0167-8140(02)00078-6
  39. Lawrence Y, Li X, el Naqa I, Hahn C, Marks L, Merchant T, Dicker A. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2010) 76: doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.02.091
  40. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger K, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352: doi: 10.1056/NEJMoa043330
  41. Strobel H, Baisch T, Fitzel R, Schilberg K, Siegelin M, Karpel-Massler G, Debatin K, Westhoff M. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines* (2019) 7: doi: 10.3390/biomedicines7030069
  42. Cuoco J, Benko M, Busch C, Rogers C, Prickett J, Marvin E. Vaccine-Based Immunotherapeutics for the Treatment of Glioblastoma: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *World Neurosurg* (2018) 120: doi: 10.1016/j.wneu.2018.08.202
  43. Zhu Z, Gorman M, McKenzie L, Chai J, Hubert C, Prager B, Fernandez E, Richner J, Zhang R, Shan C, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med* (2017) 214: doi: 10.1084/jem.20171093
  44. Ryu CS, Klein K, Zanger UM. Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions – Focus on Interactions with Cytochromes P450. *Front Pharmacol* (2017) 8: doi: 10.3389/fphar.2017.00159
  45. PGRMC1 protein expression summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000101856-PGRMC1> [Accessed November 10, 2020]
  46. Nölte I, Jeckel D, Wieland F, Sohn K. Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1543:

doi: 10.1016/s0167-4838(00)00188-6

47. Meyer C, Schmid R, Scriba P, Wehling M. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* (1996) 239: doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0726u.x
48. Raza F, Takemori H, Tojo H, Okamoto M, Vinson G. Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor. *Eur J Biochem* (2001) 268: doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02096.x
49. Mifsud W, Bateman A. Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol* (2002) 3: doi: 10.1186/gb-2002-3-12-research0068
50. Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, et al. Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun* (2016) 7:11030. doi: 10.1038/ncomms11030
51. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* (2018) 12: doi: 10.1002/1878-0261.12155
52. Kabe Y, Handa H, Suematsu M. Function and structural regulation of the carbon monoxide (CO)-responsive membrane protein PGRMC1. *J Clin Biochem Nutr* (2018) 63:12–17. doi: 10.3164/jcbtn.17-132
53. Szczesna-Skorupa E, Kemper B. Progesterone receptor membrane component 1 inhibits the activity of drug-metabolizing cytochromes P450 and binds to cytochrome P450 reductase. *Mol Pharmacol* (2011) 79: doi: 10.1124/mol.110.068478
54. Hughes A, Powell D, Bard M, Eckstein J, Barbuch R, Link A, Espenshade P. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab* (2007) 5: doi: 10.1016/j.cmet.2006.12.009
55. Kim J, Kim S, Choi H, Kim M, Lee H, Jang Y, Ryu C. Progesterone Receptor Membrane Component 1 suppresses the p53 and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways to promote human pluripotent stem cell self-renewal. *Sci Rep* (2018) 8: doi: 10.1038/s41598-018-21322-z
56. Peluso J. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front Neurosci* (2013) 7: doi: 10.3389/fnins.2013.00099
57. Clark N, Friel A, Pru C, Zhang L, Shioda T, Rueda B, Peluso J, Pru J. Progesterone receptor membrane component 1 promotes survival of human breast cancer cells and the growth of xenograft tumors. *Cancer Biol Ther* (2016) 17: doi: 10.1080/15384047.2016.1139240
58. You JH, Lee J, Roh J-L. PGRMC1-dependent lipophagy promotes ferroptosis in paclitaxel-tolerant persister cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* (2021) 40:350. doi: 10.1186/s13046-021-02168-2
59. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* (2011) 11: doi: 10.1038/nrc3139
60. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken M, Mattei M, Ganser A, Chambon P, Losson R, et al. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* (1999) 18: doi: 10.1038/sj.onc.1202655
61. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* (2009) 136:123–135. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.051
62. Xue J, Chen Y, Wu Y, Wang Z, Zhou A, Zhang S, Lin K, Aldape K, Majumder S, Lu Z, et al. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear  $\beta$ -catenin degradation. *Nat Commun* (2015) 6: doi: 10.1038/ncomms7156
63. Agricola E, Randall R, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill C. Recruitment of TIF1 $\gamma$  to

- chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell* (2011) 43: doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.020
64. Heldin C, Moustakas A. A new twist in Smad signaling. *Dev Cell* (2006) 10: doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.006
65. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* (2005) 121: doi: 10.1016/j.cell.2005.01.033
66. Bai X, Kim J, Yang Z, Juryneć M, Akie T, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A, et al. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* (2010) 142: doi: 10.1016/j.cell.2010.05.028
67. Kulkarni A, Oza J, Yao M, Sohail H, Ginjala V, Tomas-Loba A, Horejsi Z, Tan AR, Boulton SJ, Ganesan S. Tripartite Motif-containing 33 (TRIM33) protein functions in the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer 1 (ALC1) protein. *J Biol Chem* (2013) 288:32357–32369. doi: 10.1074/jbc.M113.459164
68. Birch J, Coull B, Spender L, Watt C, Willison A, Syed N, Chalmers A, Hossain-Ibrahim M, Inman G. Multifaceted transforming growth factor-beta (TGFβ) signalling in glioblastoma. *Cell Signal* (2020) 72: doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109638
69. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev* (2018) 62: doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002
70. Tompa M, Nagy A, Komoly S, Kalman B. Wnt pathway markers in molecular subgroups of glioblastoma. *Brain Res* (2019) 1718: doi: 10.1016/j.brainres.2019.05.008
71. Lv D, Guo L, Zhang T, Huang L. PRAS40 signaling in tumor. *Oncotarget* (2017) 8:69076–69085. doi: 10.18632/oncotarget.17299
72. Ks K, Gy P, Ss B, Aw G, E S, Mj B, Ra R. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem* (2003) 278: doi: 10.1074/jbc.M210837200
73. Wiza C, Nascimento E, Linssen M, Carlotti F, Herzfeld de Wiza D, van der Zon G, Maassen J, Diamant M, Guigas B, Ouwend D. Proline-rich Akt substrate of 40-kDa contains a nuclear export signal. *Cell Signal* (2013) 25: doi: 10.1016/j.cellsig.2013.05.022
74. Fonseca BD, Smith EM, Lee VH-Y, MacKintosh C, Proud CG. PRAS40 Is a Target for Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 and Is Required for Signaling Downstream of This Complex. *J Biol Chem* (2007) 282:24514–24524. doi: 10.1074/jbc.M704406200
75. Lv D, Liu J, Guo L, Wu D, Matsumoto K, Huang L. PRAS40 deregulates apoptosis in Ewing sarcoma family tumors by enhancing the insulin receptor/Akt and mTOR signaling pathways. *Am J Cancer Res* (2016) 6:
76. Riehle RD, Cornea S, Degterev A. “Role of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate in Cell Signaling.” In: Capelluto DGS, editor. *Lipid-mediated Protein Signaling*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands (2013). p. 105–139 doi: 10.1007/978-94-007-6331-9\_7
77. Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* (2018) 19:2613–2617. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.9.2613
78. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* (2016) 18:1062–1071. doi: 10.1007/s12094-016-1497-x
79. Rapp M, Goeppert M, Felsberg J, Steiger H, Sabel M. The impact of sequential vs. combined radiochemotherapy with temozolomide, resection and MGMT promoter hypermethylation on survival of patients with primary glioblastoma--a single centre retrospective study. *Br J Neurosurg* (2013) 27: doi: 10.3109/02688697.2013.767317
80. Schaff LR, Yan D, Thyparambil S, Tian Y, Cecchi F, Rosenblum M, Reiner AS,



- Panageas KS, Hembrough T, Lin AL. Characterization of MGMT and EGFR protein expression in glioblastoma and association with survival. *J Neurooncol* (2020) 146:163. doi: 10.1007/s11060-019-03358-x
81. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe L-A, Uhl B, Kristiansen G, et al. Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine. *PLoS ONE* (2014) 9: doi: 10.1371/journal.pone.0093933
82. Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, Toyokuni S, Kovacevic Z, Richardson DR. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866:339–349. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.07.004
83. Crudden G, Loesel R, Craven R. Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* (2005) 26: doi: 10.1159/000086485
84. Difilippantonio S, Chen Y, Pietas A, Schlüns K, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Padilla-Nash HM, Ried T, Petersen I. Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* (2003) 39:1936–1947. doi: 10.1016/s0959-8049(03)00419-2
85. Peluso J, Liu X, Saunders M, Claffey K, Phoenix K. Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J Clin Endocrinol Metab* (2008) 93: doi: 10.1210/jc.2007-2771
86. Mir S, Ahmed I, Arnold S, Craven R. Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients. *Int J Cancer* (2012) 131: doi: 10.1002/ijc.26432
87. Dumitru CA, Schröder H, Schäfer FTA, Aust JF, Kreße N, Siebert CLR, Stein K-P, Haghikia A, Wilkens L, Mawrin C, et al. Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) Modulates Tumour Progression, the Immune Microenvironment and the Response to Therapy in Glioblastoma. *Cells* (2023) 12:2498. doi: 10.3390/cells12202498
88. Amaravadi R, Kimmelman A, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* (2016) 30: doi: 10.1101/gad.287524.116
89. Gammoh N, Fraser J, Puente C, Syred H, Kang H, Ozawa T, Lam D, Acosta J, Finch A, Holland E, et al. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy* (2016) 12: doi: 10.1080/15548627.2016.1190053
90. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016) 12:1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
91. Mir S, Schwarze S, Jin L, Zhang J, Friend W, Miriyala S, St Clair D, Craven R. Progesterone receptor membrane component 1/Sigma-2 receptor associates with MAP1LC3B and promotes autophagy. *Autophagy* (2013) 9: doi: 10.4161/auto.25889
92. He Y, Dong X-H, Zhu Q, Xu Y-L, Chen M-L, Liu Z. Ultrasound-triggered microbubble destruction enhances the radiosensitivity of glioblastoma by inhibiting PGRMC1-mediated autophagy in vitro and in vivo. *Mil Med Res* (2022) 9:9. doi: 10.1186/s40779-022-00369-0
93. An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan Q, Weiss W. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* (2018) 37: doi: 10.1038/s41388-017-0045-7
94. Smith J, Tachibana I, Passe S, Huntley B, Borell T, Iturria N, O’Fallon J, Schaefer P, Scheithauer B, James C, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* (2001) 93: doi: 10.1093/jnci/93.16.1246
95. Ahmed I, Rohe H, Twist K, Craven R. Pgrmc1 (progesterone receptor membrane

- component 1) associates with epidermal growth factor receptor and regulates erlotinib sensitivity. *J Biol Chem* (2010) 285: doi: 10.1074/jbc.M110.134585
96. Mawrin C, Diете S, Treuheit T, Kropf S, Vorwerk C, Boltze C, Kirches E, Firsching R, Dietzmann K. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* (2003) 23:
97. Boerner JL, Demory ML, Silva C, Parsons SJ. Phosphorylation of Y845 on the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Binding to the Mitochondrial Protein Cytochrome c Oxidase Subunit II. *Mol Cell Biol* (2004) 24:7059. doi: 10.1128/MCB.24.16.7059-7071.2004
98. Wang S, Hung M. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2009) 15: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2813
99. Blandin A-F, Renner G, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M.  $\beta$ 1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front Pharmacol* (2015) 6: doi: 10.3389/fphar.2015.00279
100. Zhou P, Erfani S, Liu Z, Jia C, Chen Y, Xu B, Deng X, Alfaro JE, Chen L, Napier D, et al. CD151- $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin complexes are prognostic markers of glioblastoma and cooperate with EGFR to drive tumor cell motility and invasion. *Oncotarget* (2015) 6:29675–29693. doi: 10.18632/oncotarget.4896
101. Lee SR, Lee JG, Heo JH, Jo SL, Ryu J, Kim G, Yon J-M, Lee MS, Lee G-S, An B-S, et al. Loss of PGRMC1 Delays the Progression of Hepatocellular Carcinoma via Suppression of Pro-Inflammatory Immune Responses. *Cancers* (2021) 13:2438. doi: 10.3390/cancers13102438
102. Zha C, Meng X, Li L, Mi S, Qian D, Li Z, Wu P, Hu S, Zhao S, Cai J, et al. Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1/RAGE/IL-8 axis. *Cancer Biol Med* (2020) 17:154–168. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0353
103. Liang J, Piao Y, Holmes L, Fuller GN, Henry V, Tiao N, De Groot JF. Neutrophils Promote the Malignant Glioma Phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res* (2014) 20:187–198. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1279
104. Lin S, May E, Chang J, Hu R, Wang L, Chan H. PGRMC1 contributes to doxorubicin-induced chemoresistance in MES-SA uterine sarcoma. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2015) 72: doi: 10.1007/s00018-014-1831-9
105. Hand RA, Jia N, Bard M, Craven RJ. *Saccharomyces cerevisiae* Dap1p, a novel DNA damage response protein related to the mammalian membrane-associated progesterone receptor. *Eukaryot Cell* (2003) 2:306–317. doi: 10.1128/ec.2.2.306-317.2003
106. Peluso JJ, Gawkowska A, Liu X, Shioda T, Pru JK. Progesterone receptor membrane component-1 regulates the development and Cisplatin sensitivity of human ovarian tumors in athymic nude mice. *Endocrinology* (2009) 150:4846–4854. doi: 10.1210/en.2009-0730
107. Würstle S, Schneider F, Ringel F, Gempt J, Lämmer F, Delbridge C, Wu W, Schlegel J. Temozolomide induces autophagy in primary and established glioblastoma cells in an EGFR independent manner. *Oncol Lett* (2017) 14:322–328. doi: 10.3892/ol.2017.6107
108. Guo J, Qin W, Xing Q, Gao M, Wei F, Song Z, Chen L, Lin Y, Gao X, Lin Z. TRIM33 is essential for osteoblast proliferation and differentiation via BMP pathway. *J Cell Physiol* (2017) 232: doi: 10.1002/jcp.25769
109. Sedgwick G, Townsend K, Martin A, Shimwell N, Grand R, Stewart G, Nilsson J, Turnell A. Transcriptional intermediary factor 1 $\gamma$  binds to the anaphase-promoting complex/cyclosome and promotes mitosis. *Oncogene* (2013) 32: doi: 10.1038/onc.2012.501
110. Yu C, Ding Z, Liang H, Zhang B, Chen X. The Roles of TIF1 $\gamma$  in Cancer. *Front Oncol* (2019) 9:979. doi: 10.3389/fonc.2019.00979
111. Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in

- human cancers. *Expert Opin Ther Targets* (2011) 15: doi: 10.1517/14728222.2011.577418
112. Rodón L, González-Juncà A, Inda M del M, Sala-Hojman A, Martínez-Sáez E, Seoane J. Active CREB1 promotes a malignant TGFβ2 autocrine loop in glioblastoma. *Cancer Discov* (2014) 4:1230–1241. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0275
113. Dieterich LC, Mellberg S, Langenkamp E, Zhang L, Zieba A, Salomäki H, Teichert M, Huang H, Edqvist P-H, Kraus T, et al. Transcriptional profiling of human glioblastoma vessels indicates a key role of VEGF-A and TGFβ2 in vascular abnormalization. *J Pathol* (2012) 228:378–390. doi: 10.1002/path.4072
114. Kassem L, Deygas M, Fattet L, Lopez J, Goulvent T, Lavergne E, Chabaud S, Carrabin N, Chopin N, Bachelot T, et al. TIF1γ interferes with TGFβ1/SMAD4 signaling to promote poor outcome in operable breast cancer patients. *BMC Cancer* (2015) 15: doi: 10.1186/s12885-015-1471-y
115. Jain S, Singhal S, Francis F, Hajdu C, Wang J-H, Suriawinata A, Wang Y-Q, Zhang M, Weinshel EH, Francois F, et al. Association of overexpression of TIF1γ with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol WJG* (2011) 17:3994. doi: 10.3748/wjg.v17.i35.3994
116. Ding Z, Jin G, Wang W, Chen W, Wu Y, Ai X, Chen L, Zhang W, Liang H, Laurence A, et al. Reduced expression of transcriptional intermediary factor 1 gamma promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (2014) 60:1620–1636. doi: 10.1002/hep.27273
117. Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, Hase H, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T, et al. miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGFβ/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Mol Cancer Res MCR* (2015) 13:565–574. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0300
118. Bierie B, Moses HL. Gain or loss of TGFβ signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. *Cell Cycle Georget Tex* (2009) 8:3319–3327. doi: 10.4161/cc.8.20.9727
119. Ligr M, Wu X, Daniels G, Zhang D, Wang H, Hajdu C, Wang J, Pan R, Pei Z, Zhang L, et al. Imbalanced expression of Tif1γ inhibits pancreatic ductal epithelial cell growth. *Am J Cancer Res* (2014) 4:
120. Wang E, Kawaoka S, Roe J-S, Shi J, Hohmann AF, Xu Y, Bhagwat AS, Suzuki Y, Kinney JB, Vakoc CR. The transcriptional cofactor TRIM33 prevents apoptosis in B lymphoblastic leukemia by deactivating a single enhancer. *eLife* (2015) 4:e06377. doi: 10.7554/eLife.06377
121. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr Biol* (2012) 22:R966–R980. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.006
122. Shi X, Mihaylova VT, Kuruvilla L, Chen F, Viviano S, Baldassarre M, Sperandio D, Martinez R, Yue P, Bates JG, et al. Loss of TRIM33 causes resistance to BET bromodomain inhibitors through MYC- and TGF-β-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113:E4558-4566. doi: 10.1073/pnas.1608319113
123. Huang B, Porter G. Expression of proline-rich Akt-substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin* (2005) 26:1253–1258. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00184.x
124. Qi Z, Zhang T, Song L, Fu H, Luo H, Wu J, Zhao S, Zhang T, Guo L, Jin L, et al. PRAS40 hyperexpression promotes hepatocarcinogenesis. *EBioMedicine* (2020) 51: doi: 10.1016/j.ebiom.2019.102604
125. Proline-rich AKT substrate of 40-kDa (PRAS40) in the pathophysiology of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 463:161–166. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.041
126. Madhunapantula S, Sharma A, Robertson G. PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer Res* (2007) 67: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4234
127. Shipitsin M, Small C, Giladi E, Siddiqui S, Choudhury S, Hussain S, Huang Y, Chang

- H, Rimm D, Berman D, et al. Automated quantitative multiplex immunofluorescence in situ imaging identifies phospho-S6 and phospho-PRAS40 as predictive protein biomarkers for prostate cancer lethality. *Proteome Sci* (2014) 12: doi: 10.1186/1477-5956-12-40
128. Vincent E, Elder D, Thomas E, Phillips L, Morgan C, Pawade J, Sohail M, May M, Hetzel M, Tavaré J. Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* (2011) 104: doi: 10.1038/bjc.2011.132
129. Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* (2016) 7:33440–33450. doi: 10.18632/oncotarget.7961
130. Mayer A, Vaupel P, Struss H, Giese A, Stockinger M, Schmidberger H. Strong adverse prognostic impact of hyperglycemic episodes during adjuvant chemoradiotherapy of glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft A1* (2014) 190: doi: 10.1007/s00066-014-0696-z
131. Chambless L, Parker S, Hassam-Malani L, McGirt M, Thompson R. Type 2 diabetes mellitus and obesity are independent risk factors for poor outcome in patients with high-grade glioma. *J Neurooncol* (2012) 106: doi: 10.1007/s11060-011-0676-4
132. Gong Y, Ma Y, Sinyuk S, Loganathan S, Thompson R, Sarkaria J, Chen W, Lathia J, Mobley B, Clark S, et al. Insulin-mediated signaling promotes proliferation and survival of glioblastoma through Akt activation. *Neuro-Oncol* (2016) 18: doi: 10.1093/neuonc/nov096
133. Lescher S, Schniewindt S, Jurcoane A, Senft C, Hattingen E. Time window for postoperative reactive enhancement after resection of brain tumors: less than 72 hours. *Neurosurg Focus* (2014) 37: doi: 10.3171/2014.9.FOCUS14479
134. Dias EP, Picciani BLS, Santos V de CB dos, Cunha KS. A simple technique to construct tissue microarrays. *J Clin Pathol* (2018) 71:890–894. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205076
135. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *BioTechniques* (2004) 36:98–105. doi: 10.2144/04361RV01
136. R C, M F, E H, J B, Es d'Amore, Lv C, G M, M B, M P, V G, et al. HER2 status in gastroesophageal cancer: a tissue microarray study of 1040 cases. *Hum Pathol* (2015) 46: doi: 10.1016/j.humpath.2015.02.007
137. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* (2003) 3:421–430. doi: 10.1586/14737159.3.4.421
138. Ward JM, Rehg JE. Rodent Immunohistochemistry: Pitfalls and Troubleshooting. *Vet Pathol* (2014) 51:88–101. doi: 10.1177/0300985813503571

## **Danksagung**

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Prognostische Relevanz von PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 in Gliomen und Glioblastomen**

in der Klinik der Klinik für Neurochirurgie

mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Claudia Dumitru

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Das Scoringssystem und Färbeverhalten von PGRMC1, TRIM33 und PRAS40 (Vergrößerung 20x)	Seite 18
Abbildung 2	PRGMC1 Expression in Korrelation mit den WHO-Graden 2, 3 und 4	Seite 22
Abbildung 3	PGRMC1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 23
Abbildung 4	PGRMC1: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 24
Abbildung 5	PGRMC1: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad	Seite 25
Abbildung 6	PGRMC1: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient*innen	Seite 26
Abbildung 7	TRIM33 Expression in Korrelation mit den WHO Graden 2, 3 und 4	Seite 27
Abbildung 8	TRIM33: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 28
Abbildung 9	TRIM33: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad	Seite 29
Abbildung 10	TRIM33: Vergleich von Tumor- und gesundem Gewebe	Seite 30
Abbildung 11	TRIM33: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 31
Abbildung 12	TRIM33: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 32
Abbildung 13	TRIM33: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad	Seite 33
Abbildung 14	TRIM33: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient*innen	Seite 34
Abbildung 15	PRAS40 Expression in Korrelation mit den WHO Graden 2, 3 und 4	Seite 35

Abbildung 16	PRAS40: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad. A	Seite 36
Abbildung 17	PRAS40: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 37
Abbildung 18	PRAS40: Vergleich von Tumor- und gesundem Gewebe	Seite 38
Abbildung 19	PRAS40: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 39
Abbildung 20	PRAS40: Assoziation mit dem Rezidiv-freien Überleben in Bezug auf den WHO Grad	Seite 40
Abbildung 21	PRAS40: Korrelation mit weiteren Tumorparameter nach WHO Grad	Seite 41
Abbildung 22	Kombination von PGRMC1 und TRIM33: Univariat- und Multivariatanalyse in Glioblastompatient*innen	Seite 42
Abbildung 23	Kombination von PGRMC1 und TRIM33: Multivariate Cox-Regression für das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben in Glioblastompatient*innen	Seite 43
Abbildung 24	PGRMC1: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen	Seite 47
Abbildung 25	TRIM33: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen	Seite 50
Abbildung 26	PRAS40: Zusammenfassung relevanter zellulärer Mechanismen	Seite 53

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Charakteristika des Patientenkollektivs	Seite 10
-----------	---	----------