

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

## **Prognostische Relevanz von NEDD8 und RRM1 in Gliomen**

### **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 Carl Ludwig Raven Siebert

aus Starnberg

Magdeburg 2024

## Kurzreferat

Gliome sind die häufigsten malignen hirneigenen Tumoren des erwachsenen Menschen. Trotz intensiver Forschung ist die Prognose von Gliomen und insbesondere des Glioblastoms weiterhin schlecht.

In dieser Arbeit wurden die beiden Biomarker NEDD8 und RRM1 in Gliomgewebe untersucht. Dazu wurden fixierte Gewebeproben von 263 Gliompatient\*innen genutzt. Die Proben wurden in Form von TMAs aufbereitet, immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Es wurde auf eine Assoziation bezüglich des Gesamtüberleben und des rezidivfreien Überlebens getestet. Zusätzlich wurde eine Korrelationsanalyse mit den Tumorparametern Tumolvolumen, Ödemvolumen und Ki67-Positivität angefertigt. Im letzten Schritt erfolgte eine Untersuchung der Marker auf ihre unabhängige prognostische Relevanz hin.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von NEDD8 in seiner zytoplasmatischen Ausprägung mit einem signifikant geringeren Gesamt- und rezidivfreien Überleben bei Glioblastomen assoziiert ist. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich ein 1,42-fach erhöhtes Sterberisiko bei einer hohen NEDD8-Expression. Außerdem konnte NEDD8 als unabhängiger Prognosefaktor für das Glioblastom identifiziert werden.

Eine erhöhte Expression von RRM1 bei WHO-Grad 4 Tumoren konnte mit einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert werden. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Ausprägung von RRM1 und dem Proliferationsindex Ki67 bei Glioblastomen. In der multivariaten Analyse von RRM1 zeigte sich ein 1,76-fach erhöhtes Sterberisiko bei hoher Expression von RRM1. RRM1 konnte als unabhängiger prognostische Marker für das Glioblastom identifiziert werden.

Die Analyse der Markerkombination (NEDD8+RRM1) ergab in der Auswertung bei hoher Expression beider Marker ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben. Die multivariate Analyse zeigte bei hoher Ausprägung der Marker ein 2,05-fach erhöhtes Sterberisiko und konnte als unabhängiger prognostischer Parameter eingeordnet werden.

### Schlüsselwörter

Gliom, Glioblastom, NEDD8, RRM1, Biomarker

## Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG .....</u>	<u>6</u>
1.1 GLIOME .....	6
1.2 DER BIOMARKER NEDD8.....	10
1.3 DER BIOMARKER RRM1.....	11
<u>2. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>14</u>
2.1 STUDIENAUFBAU.....	14
2.2 HE-ÜBERSICHTSFÄRBUNG.....	19
2.3 HERSTELLUNG DER TMAS.....	19
2.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.....	20
2.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE.....	23
2.6 ERHEBUNG DES MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS.....	25
2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	26
<u>3. ERGEBNISSE.....</u>	<u>28</u>
3.1 NEDD8: KORRELATION MIT DEM WHO-GRAD.....	28
3.2 NEDD8: ASSOZIATION MIT DEM GESAMTÜBERLEBEN.....	29
3.3 NEDD8: ASSOZIATION MIT DEM REZIDIVFREIEN ÜBERLEBEN.....	31
3.4 NEDD8: KORRELATION MIT WEITEREN TUMORPARAMETERN.....	33
3.5 NEDD8: GESAMTÜBERLEBEN UND REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN – MULTIVARIATANALYSE.....	35
3.6 RRM1: KORRELATION MIT DEM WHO-GRAD.....	36
3.7 RRM1: ASSOZIATION MIT DEM GESAMTÜBERLEBEN.....	36
3.8 RRM1: ASSOZIATION MIT DEM REZIDIVFREIEN ÜBERLEBEN.....	37
3.9 RRM1: UNTERSCHIED DER EXPRESSION ZWISCHEN GESUNDEM GEWEBE UND TUMORGEWEBE.....	38
3.10 RRM1: ASSOZIATION MIT DEM GESAMTÜBERLEBEN NACH ERNEUTEM CUT-OFF.....	39
3.11 RRM1: ASSOZIATION MIT REZIDIVFREIEN ÜBERLEBEN NACH ERNEUTEM CUT-OFF.....	40
3.12 RRM1: KORRELATION MIT WEITEREN TUMORPARAMETERN.....	41
3.13 RRM1: GESAMTÜBERLEBEN UND REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN - MULTIVARIATANALYSE.....	42
3.14 NEDD8c/RRM1: ASSOZIATION MIT GESAMTÜBERLEBEN UND REZIDIVFREIEN ÜBERLEBEN.....	43
3.15 NEDD8c/RRM1: GESAMTÜBERLEBEN UND REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN – MULTIVARIATANALYSE.....	44
<u>4. DISKUSSION.....</u>	<u>46</u>
4.1 BIOMETRISCHE DATEN IN BEZUG AUF VERGLEICHSKOLLEKTIVE.....	46
4.2 DISKUSSION DER METHODEN.....	47
4.2.1 PATIENTENKOLLEKTIV.....	47
4.2.2 TISSUE MICROARRAYS (TMAS).....	48
4.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE.....	48
4.3 DER BIOMARKER NEDD8.....	49
4.4 DER BIOMARKER RRM1.....	56
4.5 DIE KOMBINATION DER BIOMARKER NEDD8/RRM1.....	60
4.6 AUSBLICK.....	61
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>62</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>64</u>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Charakteristika des Patientenkollektivs .....	15
Tabelle 2: Laborausstattung .....	16
Tabelle 3: Chemikalien .....	17
Tabelle 4: Materialien .....	18
Tabelle 5: Antikörper und Primer .....	19
Tabelle 6: Korrelationsanalyse von NEDD8c und NEDD8n .....	34
Tabelle 7: Cox-Regressionsanalyse zu NEDD8c .....	35
Tabelle 8: Korrelationsanalyse von RRM1 .....	42
Tabelle 9: Cox-Regressionsanalyse zu RRM1 .....	43
Tabelle 10: Cox-Regressionsanalysen zu NEDD8c/RRM1 .....	45

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Färbeverhalten von NEDD8c, NEDD8n und RRM1 in den Gewebsschnitten .....	24
Abbildung 2: NEDD8c und NEDD8n-Expression in Korrelation mit dem WHO-Grad 2, WHO-Grad 3 und WHO-Grad 4 .....	28
Abbildung 3: NEDD8c und NEDD8n: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad. ....	30
Abbildung 4: NEDD8c und NEDD8n: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad.....	32
Abbildung 5: RRM1-Expression in Korrelation mit dem WHO-Grad 2, WHO-Grad 3 und WHO-Grad 4. ....	36
Abbildung 6: RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad. ....	37
Abbildung 7: RRM1: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad. ....	38
Abbildung 8: RRM1: Unterschied der Expression in gesundem und in Tumorgewebe. ....	39
Abbildung 9: RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad. ....	40
Abbildung 10: RRM1: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad. ....	41
Abbildung 11: Kombination von NEDD8c und RRM1: univariate Analyse in Glioblastompatient*innen .....	44
Abbildung 12: NEDD8: Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege.....	55
Abbildung 13: RRM1: Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege.....	59

## **Abkürzungsverzeichnis**

Akt .....	Proteinkinase B
AML .....	akute myeloische Leukämie
ATF4 .....	Activating Transcription Factor 4
ATP .....	Adenosintriphosphat
A-Zentrum .....	Aktivitäts-Zentrum
BRCA1 .....	Breast Cancer 1
CDKs .....	Cyclin-Dependent-Kinases
CRLs .....	Cullin-Ring-Ligasen
CT .....	Computertomografie
Cul1 .....	Cullin 1
Cul2 .....	Cullin 2
Cul3 .....	Cullin 3
CUL4 .....	Cullin 4
dATP .....	Desoxyadenosintriphosphat
DNA .....	Desoxyribonukleinacid
dNTPs .....	Desoxynukleosidtriphosphaten
EGFR .....	Epidermal Growth Factor Receptor
ERBB2 .....	Transducer of ERBB2
FAK .....	Focal Adhesion Kinase
FASN .....	Fatty Acid Synthase
FOXO1 .....	Forkhead-Box-O-1-Transkriptionsfaktor
GFAP .....	Glial Fibrillary Acidic Protein
HE .....	Hämatoxylin-Eosin
HIF1 $\alpha$ .....	Hypoxia Inducible Factor 1
HR .....	Hazard Ratio

ICD-10 ..... International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10  
 IDH ..... Isocitratdehydrogenase  
 IGF1 ..... Insulin-like Growth Factor 1  
 KEAP1 ..... Kelch-like ECH-Associated Protein 1  
 lncRNA HOTAIR ..... Exosome-mediated transfer of long non coding RNA  
 LOH ..... Loss Of Heterozygosity  
 MAPK ..... Mitogen-Activated-Protein Kinase  
 MDM2 ..... Mouse Double Minute 2 Homolog  
 MGMT ..... O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase  
 mRNA ..... messenger ribonucleic acid  
 MRT ..... Magnetresonanztomografie  
 mTOR ..... mammalian Target Of Rapamycin  
 NAE ..... NEDD8 activating Enzym  
 NEDD8c ..... NEDD8 cytoplasmic  
 NEDD8n ..... NEDD8 nucleär  
 NF $\kappa$ B ..... Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells  
 NF1 ..... Neurofibromatose 1  
 NFIA ..... Nuclear Factor I A  
 NOXA ..... Phorbol-12-Mystate-13-Acetate-Induced Protein 1  
 PCR ..... Polymerase chain reaction  
 PDGFRA ..... Platelet-Derived Growth Factor Receptor A  
 PD-L1 ..... Programmed Death-Ligand 1  
 PI3K ..... Phosphoinositid-3-Kinase  
 pRB ..... Retinoblastomprotein  
 PTEN ..... Phosphatase and Tensin Homolog  
 RAF ..... Rapidly Accelerated Fibrosacoma  
 RAS ..... Rat Sarcoma  
 RASSF1A ..... Ras Associating Domain-Containing Protein 1  
 REDD1 ..... Regulated in Development and DNA Damage Response 1  
 RhoA ..... Ras Homolog Family Member A  
 RITA ..... p53 Activating and Inducin Tumor Apoptosis  
 RNR ..... Ribonukleotidreduktase  
 ROS ..... Reactive Oxygen Species  
 RRM1 ..... Ribonucleoside-diphosphate Reductase Large Subunit 1  
 RRM2 ..... Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2  
 SNPs ..... Single-Nucleotide-Polymorphisms  
 S-Zentrum ..... Spezifisches-Zentrum  
 TERT ..... Telomerase Reverse Transcriptase  
 TMAs ..... Tissue-Microarrays  
 TRIM21 ..... Tripartite Motif Containing 21  
 UBE2M ..... Ubiquitin Conjugating Enzym E2 M  
 VEGF ..... Vascular Endotehial Growth Factor  
 VHL ..... Von-Hippel-Lindau Protein  
 WHO ..... World Health Organisation

# 1. Einleitung

## 1.1 Gliome

Gliome sind die häufigsten malignen hirneigenen Tumoren des erwachsenen Menschen. Ausgehend von den unterschiedlichen Zellarten des Gehirns lassen sich Gliome in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome und Glioblastome unterteilen. Das Grading der Gliome erfolgt anhand der WHO-Klassifikation. Niedriggradige Tumoren entsprechen den WHO-Graden 1 und 2, während hochgradige Tumoren den WHO-Graden 3 und 4 zugeordnet werden (1).

Gliome treten abhängig von ihrem histologischen Subtyp in unterschiedlichen Altersklassen auf. Außerdem sind Männer häufiger von Gliomen betroffen als Frauen. Unter den Gliomen ist der am häufigsten auftretende und aggressivste Tumor das Glioblastom (2). Per Definition entspricht das Glioblastom dem WHO-Grad 4 (3). Es entwickelt sich de-novo und hat ein medianes Erkrankungsalter von 59-62 Jahren. Die Entstehung des Glioblastoms ist nicht endgültig geklärt. Man geht davon aus, dass gewisse genetische Veränderungen gepaart mit Schlüsselmutationen zur Entstehung von Glioblastomstammzellen aus neuralen Stammzellen beitragen (4).

Das Glioblastom hat trotz radikaler Resektion mit folgender Radio- und Chemotherapie mit 15 Monaten nach Erstdiagnose eine schlechte Überlebensprognose (5).

Gliome entwickeln sich zum großen Teil sporadisch. Bei einigen seltenen genetischen Erkrankungen wie dem Lynch-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom oder der Tuberösen Sklerose konnte eine Häufung der Entstehung von Gliomen nachgewiesen werden. Außerdem konnten bei hochgradigen Gliomen bestimmte SNPs entdeckt werden, die mit ihrer Entstehung in Verbindung gebracht werden konnten (6–8).

Andere Studien kamen zu dem Schluss, dass das Risiko für Gliome bei atopischen Erkrankungen, Allergien und einer längerfristigen Einnahme von anti-inflammatorischen Medikamenten geringer ist (6, 9, 10). Gesundheitsgefährdende Faktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum oder Drogenkonsum konnten nicht mit der Entstehung von hochgradigen Gliomen korreliert werden (11).

Gliome treten hauptsächlich supratentoriell in den großen vier Hirnlappen auf. Infratentorielle und spinale Lokalisationen sind seltener zu finden (2).

Die Symptomatik hängt vorwiegend von der Lokalisation des Tumors ab. Zu den häufigen Symptomen gehören Kopfschmerzen, Ataxie, Schwindel, Sehstörungen und Synkopen (12). Besonders zu erwähnen sind Krampfanfälle, die ein häufig auftretendes Symptom darstellen und bei Patient\*innen ohne Epilepsie in der Vorgeschichte als Anlass zur Abklärung eines Hirntumors genommen werden sollten (13).

Die diagnostische Methode der Wahl ist die MRT in verschiedenen Phasen mit Kontrastmittel. Gliome stellen sich in T1-Wichtung als hypointens und in T2-Wichtung als hyperintens dar. Ein genaues Grading anhand der Bildgebung ist mittels konventionellem MRT nicht möglich (14).

Neben der Bildgebung ist die Histopathologie für die definitive Diagnose unabdingbar. Im Allgemeinen zeigen Gliome typische Merkmale maligner Tumoren, wie atypische Zellen und erhöhte mitotische Aktivität. Höhergradige Gliome und insbesondere Glioblastome zeigen glomeruläre Blutgefäße und Nekrosezonen (3). Innerhalb der Nekrosezonen kann man zusätzlich zwischen den Zonen insuffizienter Blutversorgung und den fokalen Zonen, umrandet von Pseudopallisaden, unterscheiden.

Zusätzlich zu den morphologischen Kriterien werden immunhistochemische und molekulare Marker untersucht, um die Tumorentität zu spezifizieren und mögliche prognostisch relevante Faktoren zu identifizieren. Zu diesen Markern zählen die IDH1/2 Mutation, die zur Unterscheidung von Glioblastom bei Wildtyp oder Astrozytom bei Mutation dienen. Weiterhin wird die 1p/19q-Kodeletion bestimmt, um Oligodendrogliome von Astrozytomen abzugrenzen (15).

Außerdem dienen EGFR-Amplifikation, die TERT-Promotormutation und die +7/-10 zytogenetische Veränderung als Identifikationsmarker von Glioblastomen. Die Rezeptortyrosinkinase EGFR war auch Bestandteil von Untersuchungen mit dem Ziel ihre prognostische Relevanz in Glioblastomen zu zeigen. EGFR trägt in Glioblastomen zur Zellteilung, Invasivität und Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie bei (16, 17). Die genaue prognostische Relevanz der EGFR-Amplifikation ist noch nicht

abschließend geklärt, da verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind (5).

Die Analyse der TERT-Promotormutation ist ein weiterer Teil der molekularen Diagnostik der Gliome. Sie tritt insbesondere bei Glioblastomen auf. In der aktuellen WHO-Klassifikation wird der Nachweis von TERT, einem von drei genetischen Parametern zur Diagnose des Glioblastoms, beschrieben. TERT ist Bestandteil der Telomerase und dadurch im Prozess der natürlichen Zellalterung involviert. Die prognostische Relevanz der TERT-Promotormutation ist noch nicht abschließend gesichert (8, 18).

Die Ausprägung der MGMT-Promotormethylierung, ist primär ein prognostischer Marker, da eine Auswirkung auf die Wirksamkeit der Therapie besteht (15). Die MGMT-Promotormethylierung hat relevanten Einfluss auf das Ansprechen der Patient\*innen auf das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid. Bei Patient\*innen mit methylierter MGMT-Promotorregion ist die Wirkung des Chemotherapeutikums besser, als bei Patient\*innen ohne Methylierung dieser Region (19). MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das Alkylgruppen von DNA-Basen entfernt und dadurch mit der Funktion alkylierender Chemotherapeutika interferiert (20).

Ein weiterer Marker ist GFAP, ein von Astrozyten exprimiertes Protein (21). Eine verringerte Expression von GFAP in Glioblastomzellen weist auf undifferenzierte Tumorzellen hin, konnte jedoch nicht mit der Progression und Entwicklung des Tumors in Zusammenhang gebracht werden (22).

Zusätzlich häufig bestimmt wird das LOH. LOH-10q ist einer der häufigsten genetischen Veränderungen innerhalb des Glioblastoms (23). Auf diesem Chromosom ist der Tumorsuppressor PTEN kodiert, der in 15-40% der Glioblastome mutiert ist (24). Die prognostische Aussagekraft von PTEN ist noch nicht abschließend geklärt, da die Studienlage dazu noch widersprüchlich ist (5). Es gibt noch zahlreiche weitere genetische und molekulare Aberrationen, die in Gliomen identifiziert wurden. Verhaak et al. konnten in ihrer Arbeit anhand von EGFR, NF1 und PDGFRA/IDH1 unterschiedliche Subtypen des Glioblastoms beschreiben, die mit dem klinischen Outcome korrelieren (25).



Die Therapie maligner Gliome besteht aus der Radikalresektion des Tumors, gefolgt von einer simultanen Radio- und Chemotherapie mit anschließender adjuvanter Chemotherapie (26).

Eine vollständige Resektion ist einerseits wegen der einhergehenden Infiltration bestimmter essentieller anatomischer Strukturen nicht möglich. Andererseits ist durch die Invasivität des Tumors eine Totalresektion nicht möglich, da vereinzelte Tumorzellen zwischen gesunden Zellen erhalten bleiben (2).

Die Radiotherapie wird in Form einer Teletherapie der Resektionshöhle und des im Umkreis von 2 cm davon entfernten Gewebes durchgeführt (27). Die Standarddosis ist 60 Gy, die in 2 Gy Fraktionen über 6 Wochen verabreicht wird (28).

Der Einsatz von Chemotherapie gehört insbesondere bei Glioblastomen seit 2005 zum Standardprozedere der Behandlung. Durch die Studie von Stupp et al. konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Temozolomid mit einem besseren Patient\*innen-Outcome verbunden ist (29). Durch diese Erkenntnisse wurde das Stupp-Schema, bestehend aus Radio- und Chemotherapie zum Standardprotokoll der Glioblastombehandlung (26). Während der 6-wöchigen simultanen Radio- und Chemotherapie erhalten Patient\*innen 75 mg/m<sup>2</sup>/Tag Temozolomid. Bei der folgenden adjuvanten Chemotherapie erhalten Patient\*innen 150 mg/m<sup>2</sup>/Tag Temozolomid alle 28 Tage für mindestens 6 Zyklen (29).

Trotz der großen Anzahl an bisher identifizierten Biomarkern in Gliomen und besonders in Glioblastomen hat sich die Prognose der Patient\*innen nur unwesentlich verändert. Daher sind weitere Anstrengungen von Nöten, um die genauen molekularen Abläufe besser zu verstehen und effektivere Behandlungsmöglichkeiten zu finden.

## 1.2 Der Biomarker NEDD8

NEDD8 ist Teil der Gruppe der Ubiquitin-like-Proteine. Diese Gruppe zeichnet sich dadurch aus, dass die einzelnen Proteine die gleiche Faltung wie Ubiquitin haben und in der gleichen Weise an Substrate gebunden werden (30). Die Aminosäureabfolge von NEDD8 ist zu 60% identisch und zu 80% homolog zu Ubiquitin (31). NEDD8 wird mittels verschiedener Enzyme modifiziert, um letztendlich an die verschiedenen Substrate gebunden werden zu können (32).

### NEDD8 Substrate

Die am besten untersuchten Substrate von NEDD8 sind Culline. Culline sind Proteine, die als molekulares Gerüst für Cullin-Ring-Ligasen (CRLs) dienen und durch NEDD8 reguliert werden. Neben den CRLs unterliegen auch Tumorsuppressoren und Onkoproteine der Regulation von NEDD8 (32).

Den Cul1 basierten CRLs dienen unter anderem Zellzyklus Inhibitoren, wie p130, CDKs wie p27, p57 und p21 und Tumorsuppressoren wie ERBB2, FOXO1 und RASSF1A als Substrate. Diese Cul1-CRLs sorgen für den Abbau dieser Proteine und konnten vermehrt in Lymphomen, Brustkrebs und anderen Krebsarten nachgewiesen werden (33–36). Des Weiteren wurden Cul1 basierte CRLs mit dem vermehrten Abbau von NF $\kappa$ B-Inhibitoren und dem proapoptotischen BH3-only Protein in Verbindung gebracht (33, 37).

Die Cul2 basierte CRL bildet einen Komplex mit dem VHL, der zur Homöostase von HIF1 $\alpha$  beiträgt (38). VHL selbst ist auch Substrat von NEDD8 und fördert in dieser Form die tumorsuppressive Eigenschaft von VHL (39).

Die Neddylierung von Cul3 zur verstärkten Aktivierung der Cul3 basierten CRLs (32). Pitard et al. konnten bei der Zellteilung die Cul3 basierten CRLs in Verbindung mit der BTB Untereinheit Mel-26 bringen und eine essentielle Funktion zum Aufbau der Mitosespindel feststellen (40). Sumara et al. konnten feststellen, dass die KLH9-KLH13 basierte Cul3-CRL zur Komplettierung der Zytokinese beiträgt (41). Weitere Signalwege, in denen Cul3 eine Rolle spielt, konnten Ou et al. anhand der regulatorische Funktion von Cul3 im onkogenen Hedgehog-Signalweg feststellen (42).

Zusätzlich sind Cul3 basierte CRLs in der Regulation der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Niture et al. stellten fest, dass die BTB-Untereinheit KEAP1 mit Cul3 einen Komplex bildet, der zum Abbau von protektive Maßnahmen gegenüber ROS führt (43).

Die auf Cul4 basierten CRLs sind ebenfalls in der Regulation des Zellzyklus involviert und auch ihre Aktivität wird durch Neddylierung gesteigert (32). Jackson et al. konnten feststellen, dass die CRL-DDB1-Cul4<sup>CDT2</sup> den Abbau von p21 und dem Replikationsfaktor CDT1 fördert (44). Daneben sind Cul4-basierte CRLs in der Regulation von Nukleotid-Exzisions-Reparaturmechanismen der DNA involviert (45). Eine Untereinheit von Cul4 befindet sich auf dem chromosomalen Abschnitt 13q34. Melchor et al. konnten feststellen, dass dieser DNA-Abschnitt in Brustkrebszellen häufig amplifiziert ist (46).

Auch das Tumorsupressorprotein p53 unterliegt einer Regulation durch NEDD8. MDM2, eine RING Finger E3 Ligase, inhibiert die transkriptionelle Aktivität von p53 durch Neddylierung (47). MDM2 selbst unterliegt ebenfalls einer Regulation durch NEDD8. Bei Neddylierung erhöht sich die Stabilität des MDM2-Proteinkomplexes. MDM2 ist unter anderem bei Sarkomen amplifiziert. Deneddylierung von MDM2 resultiert in Instabilität des Komplexes und in einer gesteigerten p53 Aktivierung (48, 49).

### 1.3 Der Biomarker RRM1

RRM1 ist die  $\alpha$ -Untereinheit der Ribonukleotidreduktase (RNR). Die RNR ist essentiell für die Replikation und Reparatur der DNA (50). Neben der  $\alpha$ -Untereinheit gibt es noch die  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheit beinhaltet mit dem zweiwertigen Eisenion und dem Tyrosylradikal, zwei für die Funktion der RNR, essentielle Bestandteile (51).

#### Regulation der Aktivität der RNR

Die Regulation der Aktivität der RNR funktioniert unter anderem über die allosterischen Zentren der RRM1-Untereinheit (52). Die Substratspezifität ist abhängig von den Bindungspartnern an das allosterische S-Zentrum. Die Kontrolle der Aktivität ist von der Bindung von dATP an das A-Zentrum abhängig. Bei erhöhtem dATP/ATP-Verhältnis wird die Aktivität der RNR gehemmt (53).

Ein weiterer Mechanismus ist die Kontrolle der Proteinlevel innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen. Die Genexpression von RRM1 und RRM2 ist innerhalb des Zell-Zyklus reguliert. Die Level der mRNA sind in der S-Phase am Höchsten, während sie in der G1/0-Phase vernachlässigbar gering sind (54). Das Proteinlevel von RRM1 hingegen bleibt über den gesamten Zellzyklus annähernd konstant, was durch die relativ lange Halbwertszeit von RRM1 erklärbar ist (55). Die RRM2-Proteinkonzentration hängt jedoch, anders als bei RRM1, von der mRNA-Konzentration ab und wird zusätzlich durch Abbau von RRM2 in der G2-Phase gesteuert (55, 56).

### RNR und DNA-Reparatur

Elledge et al. konnten RRM1 und RRM2 als durch DNA-Schädigung vermehrt exprimierte Gene identifizieren (57). Im Falle einer Schädigung durch UV-Licht steigt beispielsweise das Expressionslevel der Gene in Mäusen an (58). Burkhalter et al. konnten feststellen, dass die RNR-Aktivität die Art des Reparaturmechanismus beeinflusst. Bei erhöhter Aktivität ermöglicht die Produktion von dNTPs den Mechanismus der homologen Rekombinationsreparatur, während bei geringer Aktivität der Mechanismus der nicht homologen Strangbruchreparatur gefördert wird (59).

### RRM1 und die Tumorphysiologie

Die ambivalenten Funktionen der RNR können einerseits zur Tumorentstehung durch Förderung der Mutagenese beitragen. Andererseits ist die Beteiligung an DNA-Reparaturmechanismen eine präventive Wirkung des Enzyms bezüglich maligner Prozesse (60). Fan et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine erhöhte RRM1-Expression eine tumorsuppressive Wirkung in Form einer verminderten Transformation und Unterdrückung der Metastasierung zur Folge hat (61).

Neben den tumorsuppressiven Wirkungen von RRM1 konnte auch gezeigt werden, dass die von RRM1 induzierten DNA-Reparaturmechanismen zur Entstehung von Chemoresistenzen beitragen können. Nakahira et al. konnten eine erhöhte RRM1-Expression in Pankreaskarzinomen mit einem verminderten Ansprechen auf

Gemcitabin beobachten (62). Auch in Lungenkarzinomen konnte eine erhöhte RRM1-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie assoziiert werden (63).

Aufgrund der Relevanz der beschriebenen Biomarker NEDD8 und RRM1 in Krebs untersuchten wir deren Expressionsmuster in Gliomen. Wir konnten in der Studie zeigen, dass eine erhöhte Expression beider Marker mit einer schlechteren Prognose der Patient\*innen assoziiert ist. Dies dient als Ansatzpunkt weiterer Nachforschungen um die immer noch hohe Mortalität von Gliompatient\*innen zu verbessern.

Diese Arbeit und die Experimente wurden vor der aktualisierten WHO-Klassifikation von 2021 angefertigt. Dementsprechend wurden innerhalb des Experiments auch IDH-positive Tumoren als Glioblastome gewertet und in den Abbildungen wurden die WHO-Grade mit römischen Ziffern beschriftet. Die Einleitung wurde an die Klassifikation von 2021 angepasst.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studienaufbau

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Analyse von paraffin-eingebettetem Tumormaterial, das von Patient\*innen mit Astrozytomen und Glioblastomen 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. Zusätzlich zum Tumormaterial wurde bei einigen Patient\*innen auch gesundes Gewebe identifiziert und miteinbezogen (n=62). Die Erhebung der Daten wurde mittels ICD-10 Klassifizierung in der klinikinternen Datenbank CGM MEDICO durchgeführt. Nicht vorhandene Informationen wurden mit Hilfe der behandelnden Hausärzt\*innen/Kliniken und dem Krebsregister Sachsen-Anhalt ergänzt.

Die Einteilung des untersuchten Kollektivs erfolgte anhand der WHO-Klassifikation hirneigener Tumoren aus dem Jahr 2016. Das Patientenkollektiv umfasst lediglich Patient\*innen mit Primären. Das mediane Erkrankungsalter der Patient\*innen betrug für WHO-Grad 2 Tumoren 43 Jahre, für WHO-Grad 3 Tumoren 49 Jahre und für WHO-Grad 4 Tumoren 64 Jahre.

Die Daten der Patient\*innen wurden gemäß den vorher festgelegten krankheitsrelevanten Aspekten gesammelt und vergleichend dargestellt (Tab. 1). Neben verschiedenen klinischen Parametern wurde das Ausmaß der Tumorresektion, der Karnofsky-Index, der MGMT-Methylierungsstatus und der IDH1-Mutationsstatus in die Auswertung miteinbezogen.

Die Expression der untersuchten Biomarker wurde durch immunhistochemische Färbungen ermittelt. Die Ergebnisse wurden im Anschluss bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Krankheitsverlauf und der Expression des Biomarkers analysiert.

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

**Tabelle 1: Charakteristika des Patientenkollektivs**

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

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

## 2.2 Materialien

**Tabelle 2: Laborausstattung**

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



**Tabelle 3: Chemikalien**

2-Propanol, Rotipuran $\geq 99,8\%$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid 40%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Acrylamid Piperazine diacrylamid (PDA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Amoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Antibody Diluent OP Qanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Aqua	B Braun, Melsungen, Deutschland
Citratpuffer (PT Module Buffer 1)	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
DAB Quanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Eosin Gellösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin Y	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethanol 99%	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Reserach, Freiburg, Deutschland
Formalin 4,0% (35-37%)	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Formicacid 98-100%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin $>99,5\%$ Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hot Star Taq Plus Mastermix 2x	QIAGEN, Hilden, Deutschland
HRP Polymer Quanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mountex	Medite Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nucleo Spin Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

Papanicolaus Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Primary Antibody Amplifier Quanto	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Rnase-Free-Water	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Roticlear für Histologie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure 65%	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Salzsäure rauchend 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat Lösung 99% reinst	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Surgipath Paraplast	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Themed	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Biorad, Hercules, CA, USA
Tris Pufferan mind 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultravision Protein Block	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Ultravision Hydrogen Peroxide Block	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Xylol 98,5%	TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

**Tabelle 4: Materialien**

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

**Tabelle 5: Antikörper und Primer**

MGMT-methyliert rückwärts 5'-CAC CGT CCC GAA AAA AAA CTC CG-3'	Biomers, Ulm, Deutschland
MGMT-methyliert vorwärts 5'-GTT TTT AGA ACG TTT TGC GTT TCG AC-3'	Biomers, Ulm, Deutschland
MGMT-unmethyliert rückwärts 5'-CTA CCA CCA TCC CAA AAA AAA ACT CCA-3'	Biomers, Ulm, Deutschland
MGMT-unmethyliert vorwärts 5'-TGT GTT TTT AGA ATG TTT TGT GTT TTG AT-3'	Biomers, Ulm, Deutschland
NEDD8 (19E3) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
RRM1 (D12F12) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Universal Methylated Human DNA Standard (5yg/20yl)	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

## 2.2 HE-Übersichtsfärbung

Zu Beginn wurden aus den Paraffinblöcken 2µm starke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Daraufhin wurde mittels eines Färbeautomaten die Übersichtsfärbung erstellt. Anhand der Übersichtsfärbungen wurden die Proben, zur Herstellung der Tissue-Microarrays (TMAs), aus den Paraffinblöcken gestanzt.

## 2.3 Herstellung der TMAs

Die TMAs wurden mithilfe des Arraymold kit E erstellt. Geeignete Spenderblöcke zeichneten sich durch eine große Tumormenge und kleine Nekroseareale aus. Mittels der HE-Übersichtsfärbung konnten den Anforderungen entsprechende Probeareale bestimmt werden. Zuletzt wurden die Proben ausgestanzt, in die Empfängerblöcke eingefügt und in 2µm starke Bereiche geschnitten. Durch diese Methode lassen sich große Mengen an Gewebeproben parallel bearbeiten.

## 2.4 Immunhistochemische Färbung

Die Färbung der Marker erfolgte mittels Immunhistochemie. Bei dieser Methode wird die Interaktion zweier Antikörper mit den jeweiligen spezifischen Epitopen genutzt. Dies ist gekoppelt mit einer Farbumschlagsreaktion.

Als primäre Antikörper wurden NEDD8 und RRM1 genutzt, die aus Kaninchenserum gewonnen wurden. Der F(ab)<sub>2</sub>-Teil der primären Antikörper bindet spezifisch an die Zielantigene innerhalb der Proben. Durch Hinzugabe des sekundären Antikörpers, der mit seinem Epitop den unspezifischen Fc-Teil des primären Antikörpers bindet, entsteht der Antigen-Antikörper-Komplex. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Peroxidase entsteht durch eine Enzymreaktion ein Farbsignal, das zur Auswertung dient.

Zu Beginn wurde das Gewebe entparaffiniert. Dafür wurden die Gewebeproben zweimal für zehn Minuten in das Lösungsmittel Roticlear gelegt. Daraufhin erfolgte die Benetzung der Proben in einer absteigenden Alkoholreihe beginnend mit zweimal Isopropanol 100% und einmal Isopropanol 70%, für jeweils fünf Minuten. Zuletzt wurden die Schnitte in zwei aufeinander folgenden fünf minütigen Schritten in destilliertem Wasser hydriert.

Durch die ursprüngliche Aufbereitung des Gewebes änderten die Proteine ihre Konformation. Um die Ausgangskonformation wiederzuerlangen, wurden die Proben in das saure Milieu eines Citratpuffers Heat-induced Epitope Retrieval gegeben. In dessen Milieu von pH 6,0 wurden die Proben für 90 Sekunden zum Sieden gebracht, um daraufhin sechsmalig mit intermittierenden Pausen erhitzt zu werden. Im Anschluss wurden die Proben bei ca. 20°C abgekühlt. Folgend wurde der Citratpuffer langsam durch destilliertes Wasser ersetzt und die Proben für zehn Minuten in TBS-Tween-Puffer (Tris-buffered Saline + Tween 20) gewaschen.

Als nächstes folgte ein Peroxidblock, um die Reaktionen endogener Peroxidasen zu unterbinden. Dafür wurden die Schnitte für zehn Minuten mit 200 µl Peroxidblock benetzt. Im Folgenden wurden die Proben dreimalig für fünf Minuten in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurde im Anschluss ein fünfminütiger Proteinblock nach gleichem Muster vollzogen. Die im

Proteinblock enthaltenen Proteine binden unspezifische Epitope in den Proben ab. Eine zu lange Kontaktzeit sollte vermieden werden, da ansonsten auch spezifische Bindungen betroffen sein würden und fehlerhafte Ergebnisse entstehen könnten. Darauf erfolgte eine erneute Waschung in TBS-Tween-Puffer.

Als Nächstes wurde der primäre Antikörper aufgetragen. Dieser wurde in einem bestimmten Mischverhältnis mit Antibody Diluent Quanto verdünnt, so dass folgende Endkonzentrationen verwendet wurden:

NEDD8: 0,114 µg/ml

RRM1: 0,248 µg/ml

Es wurden 200 µl der verdünnten Antikörperlösung auf die Objektträger pipettiert und diese über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der Inkubation folgend wurden die Proben erneut mit TBS-Tween-Puffer gewaschen. Um die Bindungskapazität der primären Antikörper zu optimieren, wurden die Objektträger für zehn Minuten mit Primary Antibody Amplifier benetzt. Nach weiteren Waschschritten wurde der sekundäre Antikörper mit gekoppelter Horseradish Peroxidase aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit TBS-Tween-Puffer wurde das Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Substrat Kit) auf die Proben pipettiert. Die enzymatische Spaltung des Substratchromogens durch die Horseradish Peroxidase erzeugte eine mikroskopische und makroskopische bräunliche Farbreaktion.

Die Dauer der Inkubation war antikörperspezifisch und wurde im Rahmen einer Testfärbung im Vorhinein bestimmt. Nach der jeweiligen Zeit wurden die Objektträger in destilliertes Wasser überführt und dreimal für fünf Minuten gereinigt.

Um die Zellkerne zu visualisieren wurde eine Hämatoxylin-Färbung bei ca. 20°C durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger mit lauwarmem Wasser abgespült. Es folgte eine Rehydrierung der Schnitte mit Isopropanol 70% (ca. zwei Minuten) und zweimal Isopropanol 100% (ca. fünf Minuten jeweils). Im letzten Schritt

wurden die Proben mit Hilfe des Eindeckmediums Mountex und den Deckgläsern fixiert. Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte getrocknet, bevor sie eingescannt und digitalisiert wurden.

## 2.5 Immunhistochemische Analyse

Durch die Digitalisierung der Objektträger war eine Auswertung des Färbeverhaltens mit dem Programm Aperio ImageScope möglich. Die Schnitte konnten durch spezifische Einstellung von Brightness (B, Helligkeit) und Contrast (C, Kontrast) optimal dargestellt werden. Anhand der Färbereigenschaften wurde entweder der H-Score, für zytoplasmatische Färbungen, oder der Five-Tier-Score, für nukleäre Färbungen, verwendet. Die Ermittlung der Werte erfolgte von zwei Personen, die unabhängig voneinander beurteilten. Der endgültige Wert ergab sich aus dem Mittelwert beider vorher eruierten Ergebnisse.

Die Auswertung des zytoplasmatischen Expressionsmusters bei dem Marker, NEDD8c erfolgte anhand des H-Scores. Dieser Score beinhaltet neben Intensität der Färbung 1 = weak (geringe Färbung), 2 = medium (mittelgradige Färbung) und 3 = strong (starke Färbung) (Abb. 1A), auch den Anteil positiv gefärbter Zellen (0-100%) innerhalb eines Spots. Der endgültige Score wurde anhand der folgenden Formel, in der sich die beiden Faktoren widerspiegeln, bestimmt:

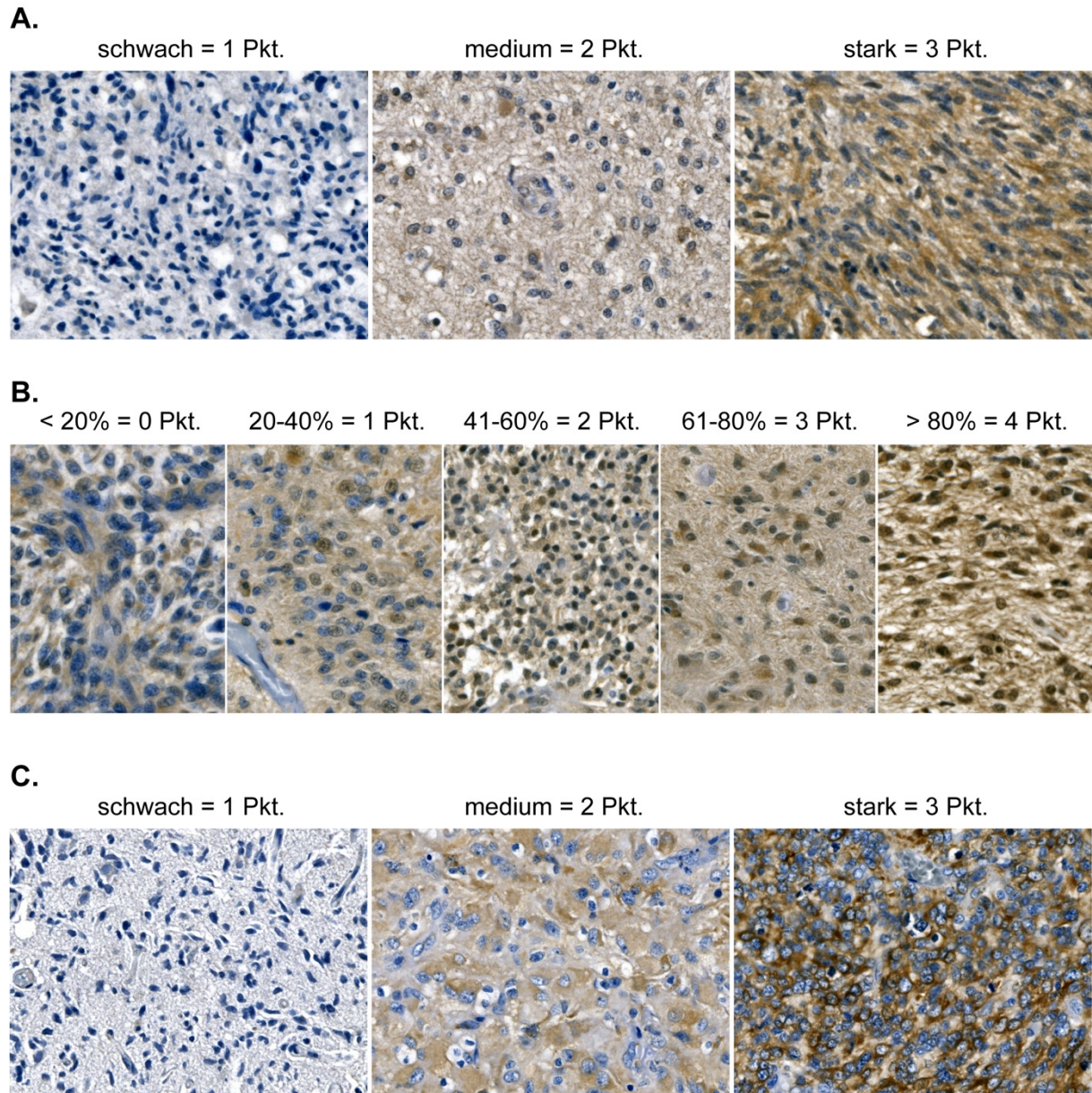
$$\text{H-Score} = [1x (\% \text{Zellen } 1+) + 2x (\% \text{Zellen } 2+) + 3x (\% \text{Zellen } 3+)].$$

Die summative Verrechnung der unterschiedlich gefärbten Areale ermöglichte dabei zusätzlich die Integration von Gewebeprobe, die einen nicht zu vernachlässigenden Grad an Heterogenität in der Färbung zeigen. Der Score umfasst gemäß der Formel Werte zwischen 100 und 300.

Die Auswertung der nukleären Expression NEDD8n erfolgte anhand des 5-Tier-Scores (Abb. 1B). Für diesen Score wurde in 20x-Vergrößerung jede Probe in 4 Quadranten unterteilt, die wiederum unter Beurteilung eines einzelnen Spots hinsichtlich der Intensität bewertet wurden. Aufgrund eines zuvor definierten Scores, von null bis vier war eine einheitliche Auswertung möglich. Ein Anteil kleiner 20% positiv gefärbter Kerne entsprach dem Scoring-Wert „0“. Färbungen mit einem Anteil von 20-40% positiver Kerne wurden mit „1“ bewertet. Bei 40-60% positiv gefärbter Kerne wurde der Wert „2“ und bei 60-80% der Wert „3“ vergeben. Bei mehr als 80% positiver Kerne erhielt der ausgewählte Spot den Wert „4“.

Die Auswertung von RRM1, welche auch ein zytoplasmisches Expressionsmuster hat, erfolgte ebenfalls mittels H-Score (Abb. 1C).

### Abb. 1



**Abbildung 1: Färbeverhalten von NEDD8c, NEDD8n und RRM1 in den Gewebsschnitten**

**A** Darstellung der zytoplasmatischen Färbung von NEDD8. Die Färbung zeigt ein braunes Kolorit. Das Scoring-System orientiert sich am H-Score, der je nach Ausprägung der gefärbten Zelle, eine Zuordnung in zu der Kategorie schwach=1 Pkt., medium=2 Pkt. und stark=3 Pkt. ermöglichte. **B** Darstellung der nukleären Färbung von NEDD8. Die Färbung zeigt ein braunes Kolorit. Das Scoring-System orientiert sich am 5-Tier-Score, der die Einteilung der Proben nach dem Anteil gefärbter Kerne ermöglicht. **C** Darstellung der zytoplasmatischen Färbung von RRM1. Färbung und Scoring wie in A. (Vergrößerung 20x; B=0; C=0)



## 2.6 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 Neuropathologie stammen. Da bei einigen der analysierten Proben der Status fehlte, wurde der MGMT-Methylierungsstatus bei 33 Patient\*innen nachbestimmt.

Der Methylierungszustand wurde mit einer methylierungsspezifischen PCR bestimmt, die nach einer Gelelektrophorese, die Zuordnung der Proben als methyliert oder unmethyliert erlaubte.

Zunächst wurden mit Hilfe von HE-Übersichtsfärbungen die Areale der Tumorprobe markiert, welche solide Anteile zeigten. Diese Areale wurden mit einer Rasierklinge herausgeschabt und anschließend entparaffiniert.

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels 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.

Danach wurde die benötigte DNA durch Zentrifugation und Zugabe mehrerer Lysispuffer aus dem Gewebe ausgelöst. Der Mechanismus beruht darauf, dass durch die Puffer verschiedene pH-Milieus geschaffen werden, in denen alle Gewebesteile durch Zentrifugation getrennt werden und die negativ geladene DNA erhalten bleibt. Daraufhin wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt, bevor sie einer Bisulfit-Konvertierung mittels Bisulfite Conversion kit unterzogen wurde. Diese dreistufige Reaktion findet zwischen der Base Cytosin und Natrium-Bisulfit statt. Cytosin wird zu Uracil umgewandelt. Die Intention ist die Vermeidung hinderlicher Ausfällungen.

Anschließend wurde die Durchführung der PCR mit spezifischen Primersets vollzogen. 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 vorangegangenen Arbeitsschrittes.

Nach Beendigung der PCR wurden die DNA-Produkte und Kontrollprodukte (Standard, EDTA-Blut, Leerwert) auf ein vorher angefertigtes Acrylamid-Gel 8% aufgetragen. Anschließend wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Das Acrylamid-Gel wurde durch Mischung von 24ml Acrylamid-PDA (13%), 16ml Tris-Puffer (120mM), 400µl Ammoniumpersulfat (10%) und 40µl Temed Fertiglösung hergestellt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in Silbernitratlösung gefärbt. Hierfür wurde das Gel zunächst in Salpetersäure (2-3%) geschwenkt und danach mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte die Zugabe von Silbernitratlösung, ein weiterer Waschgang, sowie die Zugabe von Formalin und Natriumcarbonat, um die Färbung zu starten. Bei Braunfärbung der Banden wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser, Essigsäure (10%) und Glycerin (5%) beendet. Nach Trocknung der Proben folgte die Auswertung.

Bei der Analyse der fertigen Gele wurde eine Probe als „methyliert“ gewertet, sobald eine Bande methylierter PCR-Primer erkennbar war. Fehlte diese Bande wurde die Probe als „unmethyliert“ gewertet.

## 2.7 Statistische Auswertung

Zur Analyse der Daten des untersuchten Kollektivs wurde die Statistiksoftware SPSS genutzt. Hier wurde zuerst eine Korrelation der Marker mit den einzelnen WHO-Graden untersucht. Daraufhin wurde das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall der Patient\*innen analysiert. Hierfür wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode Überlebenskurven erstellt. Diese univariaten Analysen mit Hilfe des Long-Rank-Tests dienten zur Kontrolle der Signifikanz der Resultate. Das Gesamtüberleben wurde als Zeitraum zwischen der Diagnosestellung und dem Sterbedatum bzw. der letzten Datenerhebung definiert. Das rezidivfreie Intervall wurde anhand des nach

Tumorresektion verstrichenen Zeitraums ohne diagnostisch nachweisbaren Rezidiv-Tumor festgelegt.

Ergänzend wurden Korrelationsanalysen angefertigt, in denen die Marker auf ihren jeweiligen Zusammenhang mit den folgenden Parametern untersucht wurden:

- Tumolvolumen: Das Tumolvolumen wurde anhand der präoperativen MRT-Bilder bestimmt. Hierfür war die T1 gewichtete Aufnahme bei Kontrastmittelgabe das Mittel der Wahl. Nach Ausmessung des Tumors in den drei Raumebenen wurde das Volumen in  $\text{mm}^3$  bestimmt.
- Ödemvolumen: Das Volumen des perifokalen Ödems wurde ebenfalls mittels präoperativen MRT-Aufnahmen errechnet. Hierbei diente die T2-gewichtete Flair-Aufnahme als Vorlage, da in dieser eine Abgrenzung zum Liquor cerebrospinalis und zum Tumor möglich war. Das Volumen wurde auch in allen drei Raumebenen in  $\text{mm}^3$  bestimmt.
- Ki67-Positivität: Der Proliferationsmarker Ki67 ist mit der Tumorzellproliferation assoziiert und wird routinemäßig in der Pathologie bestimmt (64). Die Werte wurden aus den Berichten der Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg entnommen.

Zur Einschätzung der prognostischen Relevanz wurde die Auswertung um multivariate Analysen und der Ermittlung der Hazard Ratio (HR) im Rahmen der Cox-Regression erweitert. Nachfolgende, bereits empirisch als prognostisch relevant ausgemachte Faktoren (5,65), wurden dabei genutzt:

- Karnofsky-Index
- Therapie
- Erkrankungsalter
- Resektionsstatus

Bei allen Untersuchungen wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0.05$  gesetzt.

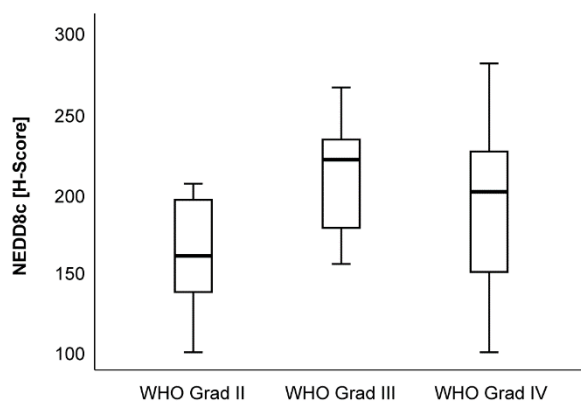
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 NEDD8: Korrelation mit dem WHO-Grad

Im ersten Teil der Studie wurde auf eine Korrelation zwischen NEDD8c oder NEDD8n mit dem WHO-Grad der Tumoren hin untersucht. Dafür wurden die Daten mittels Box-Whisker-Plots dargestellt. Der statistische Test erfolgte durch Spearman's Rho. Die Ergebnisse zeigten eine geringere Expression von NEDD8c in niedriggradigen Gliomen (-WHO-Grad 2: Median=160) im Vergleich zu höhergradigen Gliomen (-WHO-Grad 3: Median=220; -WHO-Grad 4: Median=200) (Abb. 2 A). Eine signifikante Korrelation war jedoch nicht zu erkennen ( $Rho=0,042$ ;  $p=0,529$ ; Spearman).

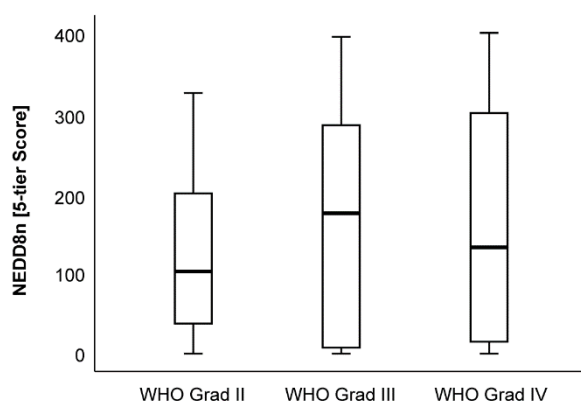
#### Abb. 2

##### A.



WHO Grad	Median	Minimum	Maximum	N
Grad II	160	100	205	7
Grad III	220	155	265	7
Grad IV	200	100	280	214

##### B.



WHO Grad	Median	Minimum	Maximum	N
Grad II	102	0	325	8
Grad III	175	0	395	7
Grad IV	132	0	400	210

**Abbildung 2: NEDD8c und NEDD8n-Expression in Korrelation mit dem WHO-Grad 2, WHO-Grad 3 und WHO-Grad 4**

**A-B.** Der Median stellt sich als schwarze Linie und die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Kästchen mit Fehlerbalken. Die Tabelle zeigt nach WHO-Grad die jeweiligen Mediane, Minima, Maxima und Anzahl der Patient\*innen.

Auch bei NEDD8n war in Gliomen des WHO-Grades 2 (Median=102) verglichen mit Gliomen der WHO-Grade 3 (Median=175) und 4 (Median=132) die Expression von NEDD8n geringer (Abb. 2 B). Hier war allerdings auch keine signifikante Korrelation zwischen NEDD8n und dem WHO-Grad zu erkennen ( $Rho=0,036$ ;  $p=0,589$ ; Spearman).

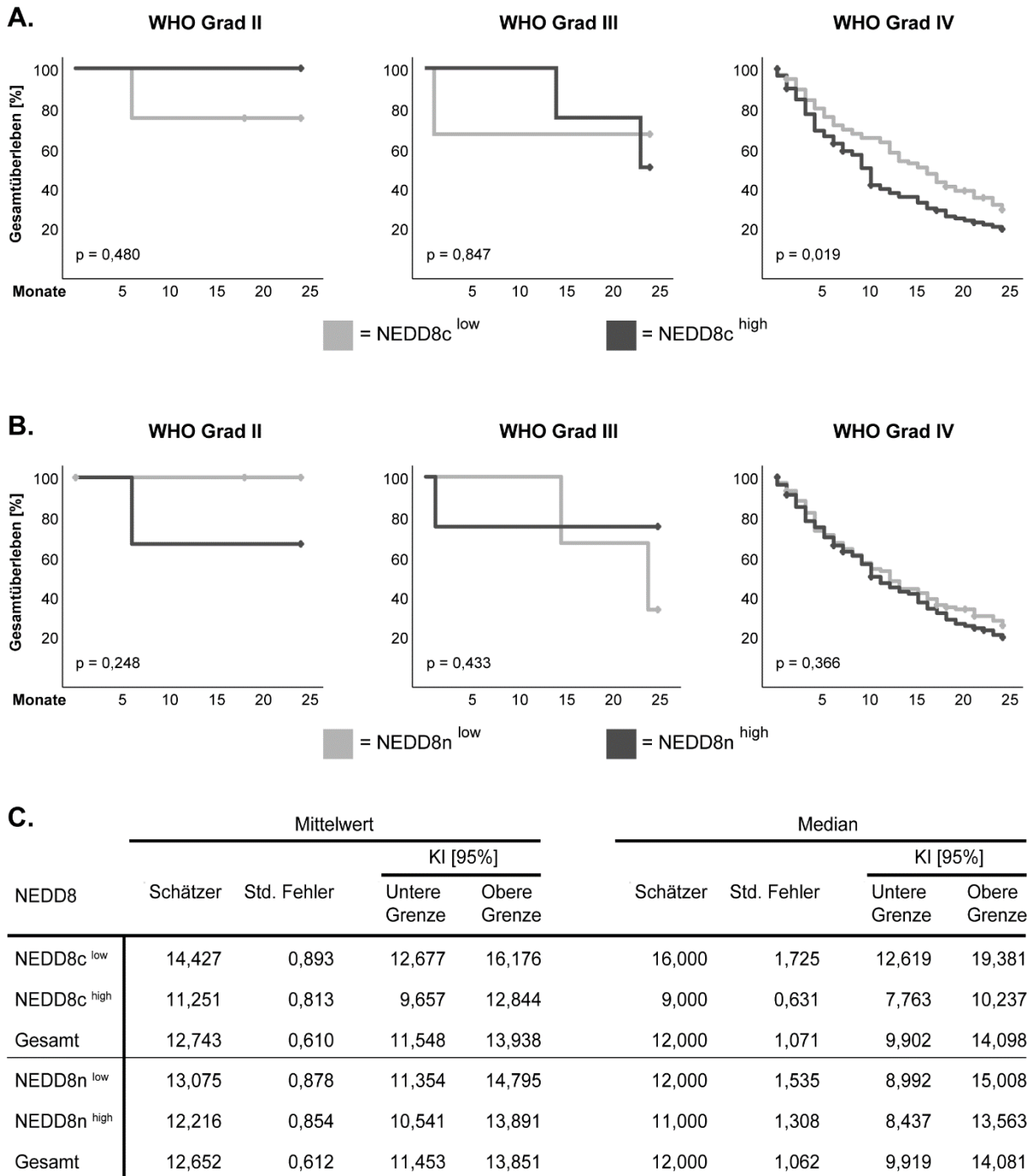
### 3.2 NEDD8: Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Als nächstes wurde untersucht, ob die NEDD8-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patient\*innen assoziiert ist. Dafür wurde die Expression von NEDD8c und NEDD8n in NEDD8c<sup>high</sup>, NEDD8c<sup>low</sup>, bzw. NEDD8n<sup>high</sup> und NEDD8n<sup>low</sup> dichotomisiert, basierend auf der Median-Split-Methode. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Methode dargestellt und die Signifikanz anhand von Log-Rank getestet.

Bezüglich NEDD8c zeigte sich, dass Glioblastom-Patient\*innen mit einer hohen NEDD8c-Expression (NEDD8c<sup>high</sup>) eine signifikant kürzere Überlebenszeit hatten, als Glioblastom Patient\*innen mit niedriger NEDD8c-Expression (NEDD8c<sup>low</sup>) ( $p=0,019$ ; Log-Rank) (Abb. 3 A). Demnach hatten Patient\*innen mit einer erhöhten Expression von NEDD8c eine wesentlich kürzere mediane Überlebenszeit (9 Monate), als Patient\*innen mit einer niedrigen NEDD8c-Expression, welche eine mediane Überlebenszeit von 16 Monaten aufwies (Abb. 3 C). Bei Patient\*innen mit -WHO-Grad 2 ( $p=0,480$ ; Log-Rank) und -WHO-Grad 3 ( $p=0,847$ ; Log-Rank) konnte diese Assoziation nicht beobachtet werden (Abb. 3 A).

Die univariate Analyse für NEDD8n zeigte bei keinem der untersuchten WHO-Grade signifikante Ergebnisse bezüglich einer Assoziation mit dem Gesamtüberleben (-WHO-Grad 2:  $p=0,248$ ; Log-Rank; -WHO-Grad 3:  $p=0,433$ ; Log-Rank; -WHO-Grad 4:  $p=0,366$ ; Log-Rank) (Abb. 3 B).

**Abb. 3**



**Abbildung 3: NEDD8c und NEDD8n: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A-B** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **C** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen NEDD8c<sup>low</sup>, NEDD8c<sup>high</sup>, NEDD8n<sup>low</sup> und NEDD8n<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

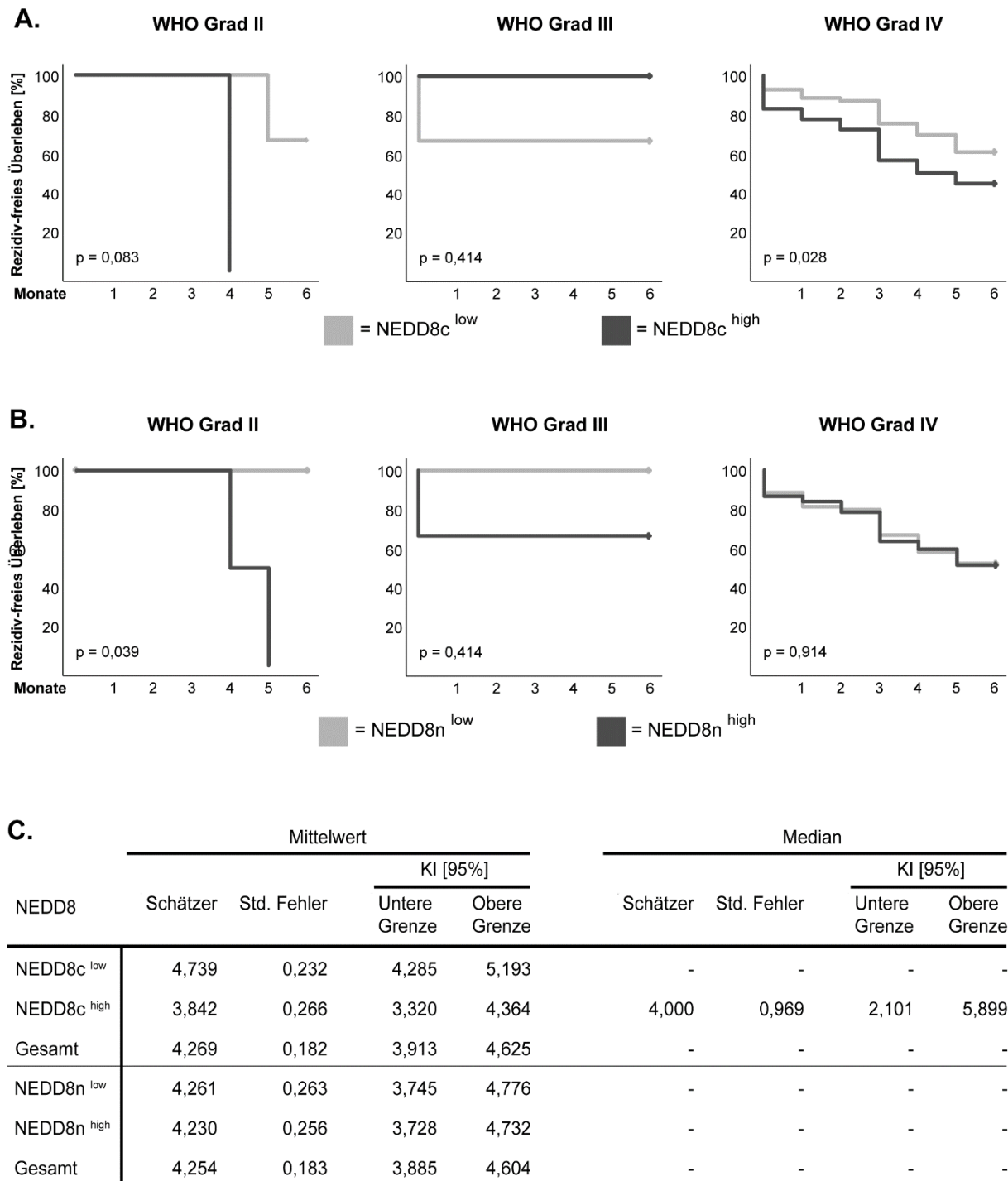
### 3.3 NEDD8: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben

Um die Assoziation zwischen NEDD8-Expression und dem rezidivfreien Überleben zu untersuchen, wurden ebenfalls die Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rank-Test angewendet. Bei WHO-Grad 4 hatten NEDD8c<sup>high</sup> Patient\*innen ein signifikant niedrigeres rezidivfreies Überleben als NEDD8c<sup>low</sup> Patient\*innen ( $p=0,028$ ; Log-Rank) (Abb. 4 A). Bei WHO-Grad 2 und 3 wurde keine signifikante Assoziation zwischen NEDD8c und dem rezidivfreien Überleben der Patient\*innen festgestellt (WHO-Grad 2:  $p=0,083$ ; Log-Rank; WHO-Grad 3:  $p=0,414$ ; Log-Rank) (Abb. 4 A).

Bezüglich NEDD8n konnten bei WHO-Grad 3 und 4 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression des Markers und dem rezidivfreien Überleben beobachtet werden (WHO-Grad 3:  $p=0,414$ ; Log-Rank; -WHO-Grad 4:  $p=0,914$ ; Log-Rank) (Abb. 4 B). Bei -WHO-Grad 2 hatten die NEDD8n<sup>high</sup> Patient\*innen ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als NEDD8n<sup>low</sup> Patient\*innen ( $p=0,039$ ; Log-Rank) (Abb. 4 B). Diese Ergebnisse sollten allerdings unter der Betrachtung der kleinen Kohorte beurteilt werden.

Die mittleren und medianen Überlebenszeiten für -WHO-Grad 4 Patient\*innen sind der Abb. 4 C zu entnehmen. Für manche Stichproben konnten keine Medianwerte berechnet werden, da die geschätzte Überlebenswahrscheinlichkeit keine 50% erreicht hatte.

**Abb. 4**



**Abbildung 4: NEDD8c und NEDD8n: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A-B** Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **C** Mittel- und Medianwerte für das rezidivfreie Überleben der Patient\*innengruppen NEDD8c<sup>low</sup>, NEDD8c<sup>high</sup>, NEDD8n<sup>low</sup> und NEDD8n<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.



### 3.4 NEDD8: Korrelation mit weiteren Tumorparametern

Weiterhin wurde analysiert, ob eine Korrelation zwischen der NEDD8-Expression und neuroradiologischen (Tumorvolumen, Ödemvolumen) oder histopathologischen (Ki67-Positivität) Tumorparametern besteht. Zu diesem Zweck wurde eine bivariate Korrelationsanalyse mittels Spearman's Rho durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten bei keinem der WHO-Grade eine signifikante Korrelation zwischen NEDD8c-Expression und den untersuchten Tumorparametern (Tab. 6 A). Bei NEDD8n hingegen ergab sich eine signifikante positive Korrelation des WHO-Grades 2 mit der Ki67-Positivität ( $Rho=0,713$ ;  $p=0,047$ ; Spearman) und eine negative Korrelation des WHO-Grades 3 mit der Ki67-Positivität ( $Rho=-0,893$ ;  $p=0,016$ ; Spearman) (Tab. 6 B). Diese Korrelationen sollten allerdings unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Anzahl der Patient\*innen bei WHO-Grad 2 ( $n=8$ ) und 3 ( $n=6$ ) sehr gering ist. Bei Glioblastomen (WHO-Grad 4) konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden, und das bei einer deutlich größeren Kohorte ( $n=203$ ).

**Tabelle 6: Korrelationsanalyse von NEDD8c und NEDD8n**

**A.**

Korrelationen NEDD8c (Spearman's Rho)		Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,429	0,250	0,668
	Signifikanz (2-seitig)	0,337	0,589	0,101
	N	7	7	7
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	-0,500	-0,714	0,213
	Signifikanz (2-seitig)	0,253	0,071	0,686
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,112	< 0,001	0,106
	Signifikanz (2-seitig)	0,102	0,997	0,127
	N	213	213	207

**B.**

Korrelationen NEDD8n (Spearman's Rho)		Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,240	0,024	0,713*
	Signifikanz (2-seitig)	0,568	0,955	0,047
	N	8	8	8
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	0,450	-0,108	-0,893*
	Signifikanz (2-seitig)	0,310	0,818	0,016
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	-0,043	-0,055	0,040
	Signifikanz (2-seitig)	0,541	0,429	0,567
	N	209	209	203

**Tabelle 6: Korrelationsanalyse von NEDD8c und NEDD8n**

**NEDD8c und NEDD8n: Korrelation der Expression mit Tumorvolumen, Ödemvolumen und Ki67-Positivität in Bezug auf den WHO-Grad**

**A-B.** Bivariate Korrelationsanalyse mittels Spearman Rangkorrelationskoeffizient der Marker. Die Tabelle zeigt aufgeschlüsselt nach WHO-Grad die Anzahl der Patient\*innen (N), die zweiseitige Signifikanz und den Korrelationskoeffizienten. \* =signifikant auf p=0,05 Niveau

### 3.5 NEDD8: Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben – Multivariatanalyse

Da in der univariaten Analyse lediglich NEDD8c bei WHO-Grad 4 signifikant war, wurde abschließend nur bei dieser Konstellation eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt. Hierbei sollte der Einfluss verschiedener Parameter, die sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren beim Glioblastom behauptet haben, berücksichtigt werden. In der vorliegenden Studie wurde das Alter, der Karnofsky-Index, das Ausmaß der Resektion sowie die Therapie als bekannte Prognosefaktoren berücksichtigt. Entsprechend Tab. 7 A zeigte sich nach Adjustierung mit den Kovariaten ein signifikant höheres Sterberisiko bei Patient\*innen mit erhöhter NEDD8c-Expression (HR=1,418; KI [95%]=1,017-1,978; p=0,040). Daraus lässt sich schließen, dass NEDD8c ein unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient\*innen ist.

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens zeigte die multivariate Analyse keine prognostisch signifikante Aussagekraft einer erhöhten Expression von NEDD8 in der untersuchten Kohorte (Tab. 7 B).

**Tabelle 7: Cox-Regressionsanalyse zu NEDD8c**

<b>A.</b>				<b>B.</b>			
Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz	Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
NEDD8c	1,418	1,017-1,978	0,040	NEDD8c	1,261	0,753-2,109	0,378
Alter	1,029	1,015-1,043	< 0,001	Alter	1,013	0,994-1,033	0,177
Karnofsky Index	0,991	0,979-1,002	0,102	Karnofsky Index	0,988	0,974-1,003	0,116
Resektion	0,675	0,495-0,921	0,013	Resektion	0,881	0,565-1,372	0,575
Therapie	0,739	0,682-0,800	< 0,001	Therapie	0,700	0,621-0,788	< 0,001

**Tabelle 7: Cox-Regressionsanalyse zu NEDD8c**

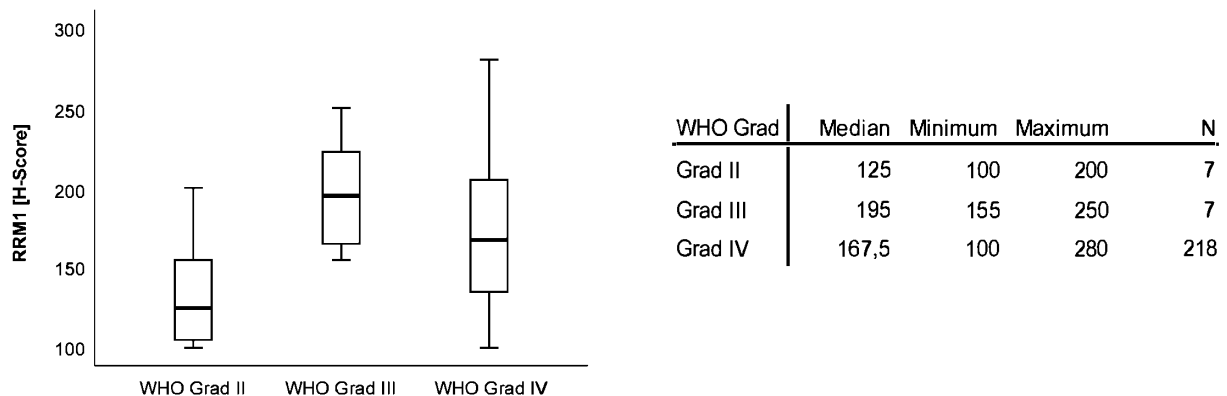
**NEDD8c: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben in Glioblastompatient\*innen**

**A.** Regressionsanalyse des 24 Monate Überlebens für Patient\*innen mit NEDD8c-Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Regressionsanalyse des 6-monatigen rezidivfreien Überlebens wie in A. NEDD8c<sup>low</sup> wurde als Dummy-Variable verwendet. HR=Hazard Ratio; KI [95%]=95% Konfidenzintervall.

### 3.6 RRM1: Korrelation mit dem WHO-Grad

Auch bei dem Marker RRM1 wurde zuerst eine Korrelationsanalyse zwischen der Expression von RRM1 und dem WHO-Grad durchgeführt. Dies erfolgte nach Ermittlung des H-Scores und wurde in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt (Abb. 5). Der statistische Test erfolgte durch Spearman's Rho. Hier ist kein durchgehender Trend erkennbar. Es lässt sich lediglich erkennen, dass die Expression in den Tumoren WHO-Grad 2 (Median=125), im Vergleich zu den Tumoren des WHO-Grades 3 (Median=195) und 4 (Median=167,5) niedriger ist. Eine signifikante Korrelation konnte allerdings nicht beobachtet werden (Rho=0,037; p=0,579; Spearman).

**Abb. 5**



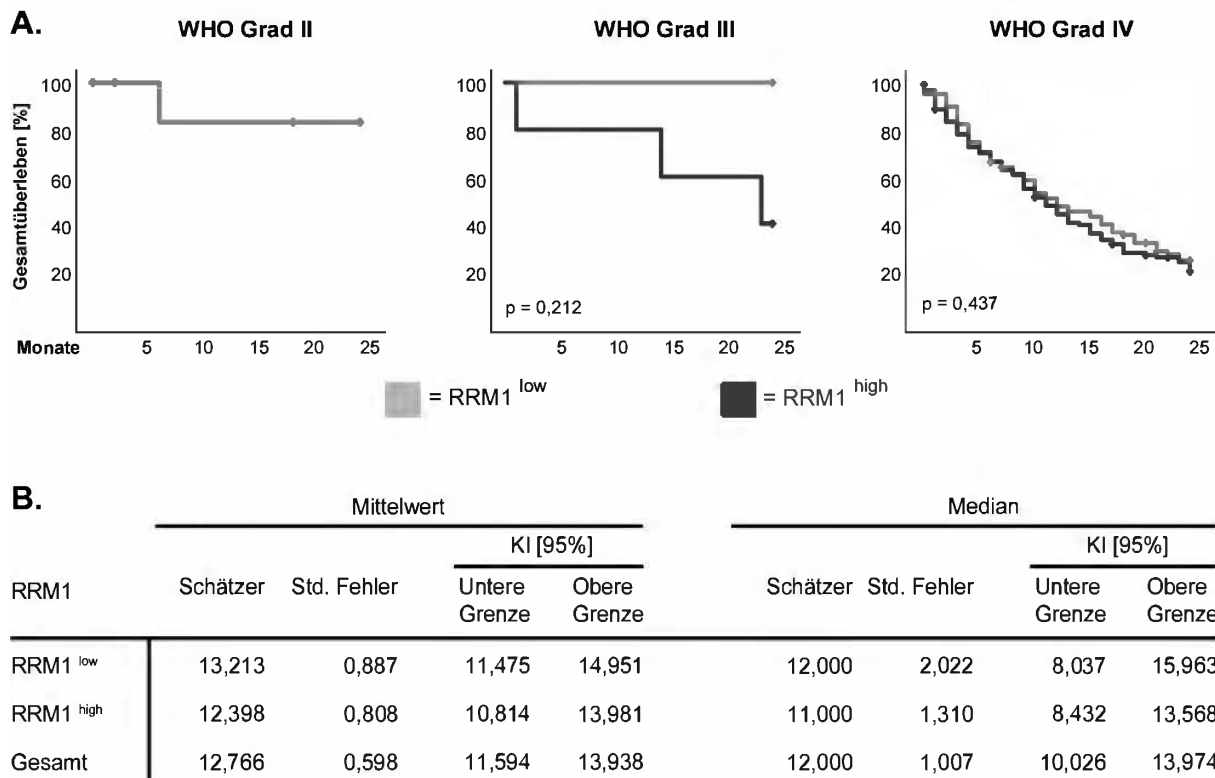
**Abbildung 5: RRM1-Expression in Korrelation mit dem WHO-Grad 2, WHO-Grad 3 und WHO-Grad 4.**

Der Median stellt sich als schwarze Linie und die Perzentile (25. und 75.) als vertikale Kästchen mit Fehlerbalken. Die Tabelle zeigt nach WHO-Grad die jeweiligen Mediane, Minima, Maxima und Anzahl der Proband\*innen.

### 3.7 RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Als nächstes wurde untersucht, ob die RRM1-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patient\*innen assoziiert ist. Hierfür wurde RRM1 in RRM1<sup>high</sup> und RRM1<sup>low</sup> mittels der Median-Split Methode dichotomisiert. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Methode dargestellt und die Signifikanz anhand von Log-Rank getestet. Die Expression von RRM1 zeigte in keinem der untersuchten WHO-Grade eine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben (Abb. 6 A). Die mediane Überlebenszeit war bei RRM1<sup>high</sup> Glioblastompatient\*innen (11 Monate) im Vergleich zu RRM1<sup>low</sup> Glioblastompatient\*innen (12 Monate) lediglich um einen Monat verringert (Abb. 6 C).

**Abb. 6**



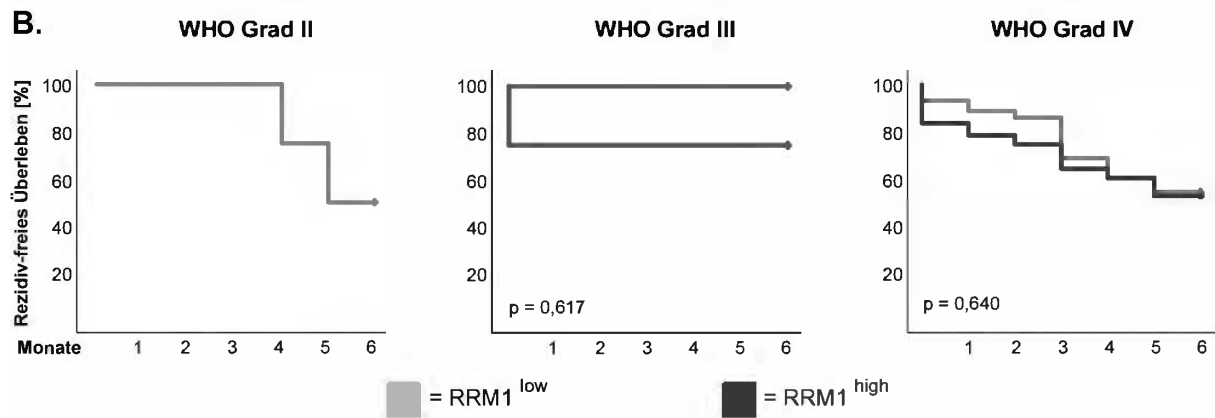
**Abbildung 6: RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **B** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen RRM1<sup>low</sup> und RRM1<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

### 3.8 RRM1: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben

Folgend wurde die Assoziation der RRM-1-Expression mit dem rezidivfreien Überleben mittels Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Test analysiert. Die Resultate zeigten, dass bei keinem WHO-Grad ein signifikanter Zusammenhang besteht (WHO-Grad 2: kein Log-Rank-Test möglich; WHO-Grad 3: p=0,617; Log-Rank; WHO-Grad 4: p=0,640; Log-Rank) (Abb. 7 A). Die mittlere Überlebenszeit für WHO-Grad 4 Patient\*innen ist der Abb. 7 B zu entnehmen.

**Abb. 7**



**B.**

RRM1	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
RRM1 <sup>low</sup>	4,500	0,233	4,044	4,956	-	-	-	-
RRM1 <sup>high</sup>	4,128	0,267	3,605	4,651	-	-	-	-
Gesamt	4,304	0,179	3,953	4,655	-	-	-	-

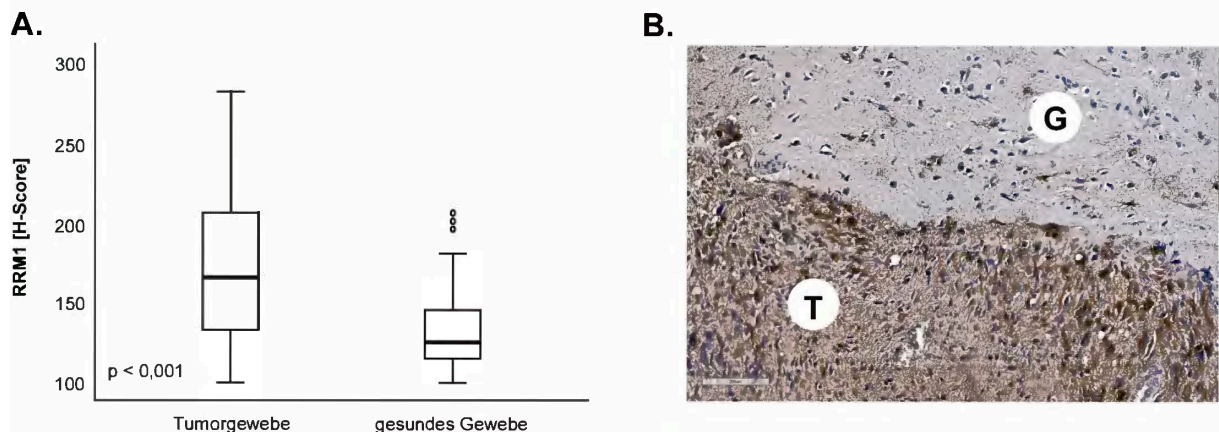
**Abbildung 7: RRM1: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A** Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **B** Mittel- und Medianwerte für das rezidivfreie Überleben der Patientengruppen RRM1<sup>low</sup> und RRM1<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

### 3.9 RRM1: Unterschied der Expression zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe

Aufgrund der nicht-signifikanten Ergebnisse bei RRM1 in den oben gezeigten Analysen (Abb. 6 und 7) folgte als nächstes eine Untersuchung der Expression von RRM1 in gesundem Gewebe und in Tumorgewebe. Der statistische Test erfolgte durch Mann-Whitney und wurde in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Analyse zeigte, dass die Expression von RRM1 in Tumorgewebe signifikant höher war als in gesundem Gewebe ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-U) (Abb. 8 A). In Abb. 8 B ist ein repräsentatives Beispiel von Tumorrangewebe dargestellt, in dem der Unterschied zwischen dem stark gefärbten Tumoranteil und dem schwach gefärbten gesunden Anteil visuell ersichtlich ist.

**Abb. 8**



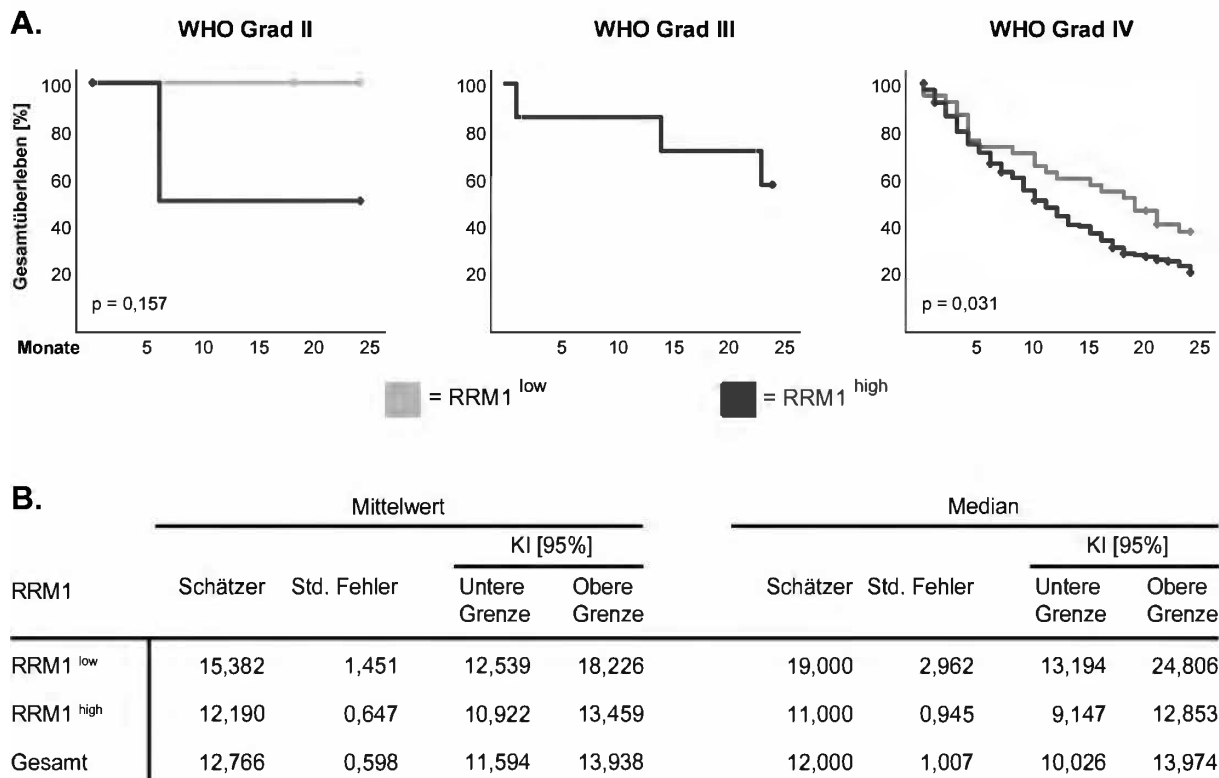
**Abbildung 8: RRM1: Unterschied der Expression in gesundem und in Tumorgewebe.**

**A** Der Median stellt sich als schwarze Linie und die Perzentile (25. Und 75.) als vertikale Kästchen mit Fehlerbalken. Die Ausreißer werden als Punkte über dem Fehlerbalken dargestellt. **B** Randgewebe einer Patient\*innen-Probe nach immunhistochemischer Färbung mit RRM1. T=Tumor, G=Gesund

### 3.10 RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben nach erneutem Cut-off

Als nächstes wurde die Analyse bezüglich des Gesamtüberlebens wiederholt (vgl. Kapitel 3.7), wobei die Dichotomisierung in  $RRM1^{low}$  und  $RRM1^{high}$  anhand des Medians des gesunden Gewebes erfolgte. Nun konnte bei WHO-Grad 4 ein signifikant geringeres Überleben der Patient\*innen bei einer erhöhten RRM1-Expression detektiert werden ( $p=0,031$ ; Log-Rank) (Abb. 9 A). Demzufolge hatten WHO-Grad 4 Patient\*innen mit einer erhöhten RRM1-Expression eine geringere mediane (11 Monate) Überlebenszeit, als Patient\*innen mit einer niedrigeren RRM1-Expression deren mediane Überlebenszeit 19 Monate betrug (Abb. 9 B). Bei WHO-Grad 2 und 3 Patient\*innen waren nach wie vor keine signifikanten Unterschiede zwischen  $RRM1^{low}$  und  $RRM1^{high}$  bezüglich des Gesamtüberlebens zu erkennen (WHO-Grad 2:  $p=0,157$ ; Log-Rank; WHO-Grad 3: kein Log-Rank-Test möglich) (Abb. 9 A).

**Abb. 9**



**Abbildung 9: RRM1: Assoziation mit dem Gesamtüberleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A** Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **B** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen RRM1<sup>low</sup> und RRM1<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

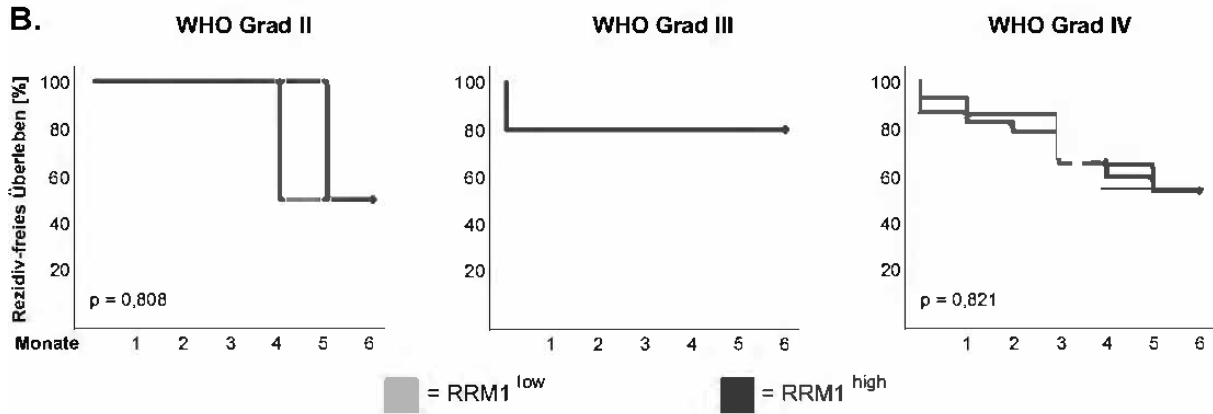
### 3.11 RRM1: Assoziation mit rezidivfreien Überleben nach erneutem Cut-off

Auch die Assoziation zwischen RRM1-Expression und dem rezidivfreien Überleben wurde anhand der gleichen Dichotomisierung wie in Kapitel 3.10 wiederholt.

Hier ergaben sich allerdings keine neuen signifikanten Zusammenhänge zwischen einer erhöhten RRM1-Expression und dem rezidivfreien Überleben (WHO-Grad 2: p=0,808; Log-Rank; WHO-Grad 3: kein Log-Rank Test möglich; WHO-Grad 4: p=0,821; Log-Rank) (Abb. 10 A). Die mittlere Überlebenszeit für WHO-Grad 4 Patient\*innen ist der Abb. 10 B zu entnehmen.



**Abb. 10**



**B.**

RRM1	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
RRM1 <sup>low</sup>	4,536	0,373	3,805	5,266	-	-	-	-
RRM1 <sup>high</sup>	4,250	0,203	3,852	4,648	-	-	-	-
Gesamt	4,304	0,179	3,953	4,655	-	-	-	-

**Abbildung 10: RRM1: Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben in Bezug auf den WHO-Grad.**

**A** Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurve nach WHO-Grad und hoher beziehungsweise niedriger Expression der Marker. Der Log-Rank Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **B** Mittel- und Medianwerte für das rezidivfreie Überleben der Patientengruppen RRM1<sup>low</sup> und RRM1<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

### 3.12 RRM1: Korrelation mit weiteren Tumorparametern

Weiterhin wurde analysiert, ob eine Korrelation zwischen der RRM1-Expression und den Tumorparametern Tumorzellen, Ödemvolumen und Ki67-Positivität besteht. Bei den WHO-Graden 2 und 3 konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der RRM1-Expression und den oben genannten Parametern festgestellt werden (Tab. 8). Bei WHO-Grad 4 hingegen konnte eine hochsignifikante positive Korrelation der RRM1-Expression mit der Ki67-Positivität festgestellt werden (Rho=0,245; p<0,001; Spearman) (Tab.8). Dies weist daraufhin, dass eine erhöhte RRM1-Expression mit einer erhöhten Zellproliferation korreliert.

**Tabelle 8: Korrelationsanalyse von RRM1**

Korrelationen RRM1 (Spearman's Rho)		Tumorvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ödemvolumen [cm <sup>3</sup> ]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,491	0,382	0,408
	Signifikanz (2-seitig)	0,263	0,398	0,363
	N	7	7	7
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	-0,107	< 0,001	-0,030
	Signifikanz (2-seitig)	0,819	1,000	0,954
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,057	0,117	0,245**
	Signifikanz (2-seitig)	0,407	0,085	< 0,001
	N	217	217	211

**Tabelle 8: Korrelationsanalyse von RRM1**

**RRM1: Korrelation mit Tumorvolumen, Ödemvolumen und Ki67-Positivität in Bezug auf den WHO-Grad**

Bivariate Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rangkorrelationskoeffizient der Marker. Die Tabelle zeigt aufgeschlüsselt nach WHO-Grad die Anzahl der Patient\*innen (N), die zweiseitige Signifikanz und den Korrelationskoeffizienten. \*\* =signifikant auf p<0,001 Niveau

**3.13 RRM1: Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben - Multivariatanalyse**

Da in der univariaten Analyse lediglich RRM1 bei WHO-Grad 4 signifikant war wurde abschließend nur bei dieser Konstellation eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt. Auch hier wurden die bereits oben genannten prognostischen Parameter mitberücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Adjustierung mit den Kovariaten ein signifikant höheres Sterberisiko bei erhöhter RRM1-Expression vorliegt (HR=1,761; KI [95%]=1,121-2,766; p=0,014) (Abb. Tab 9 A). Daraus lässt sich schließen, dass RRM1 als ein unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient\*innen fungieren kann. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte eine erhöhte RRM1-Expression keine Signifikanz aufweisen (HR=0,980; KI [95%]=0,531-1,809; p=0,949) (Tab. 9 B). Demnach ist eine prognostische Aussagekraft von RRM1 bezüglich des rezidivfreien Überlebens in Glioblastompatient\*innen nicht gegeben.

**Tabelle 9: Cox-Regressionsanalyse zu RRM1**

<b>A.</b>				<b>B.</b>			
Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz	Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
RRM1	1,761	1,121-2,766	0,014	RRM1	0,980	0,531-1,809	0,949
Alter	1,028	1,014-1,042	< 0,001	Alter	1,014	0,994-1,033	0,164
Karnofsky Index	0,991	0,980-1,002	0,126	Karnofsky Index	0,989	0,975-1,004	0,147
Resektion	0,633	0,467-0,859	0,003	Resektion	0,859	0,554-1,332	0,496
Therapie	0,731	0,675-0,791	< 0,001	Therapie	0,686	0,611-0,770	< 0,001

**Tabelle 9: Cox-Regressionsanalyse zu RRM1**

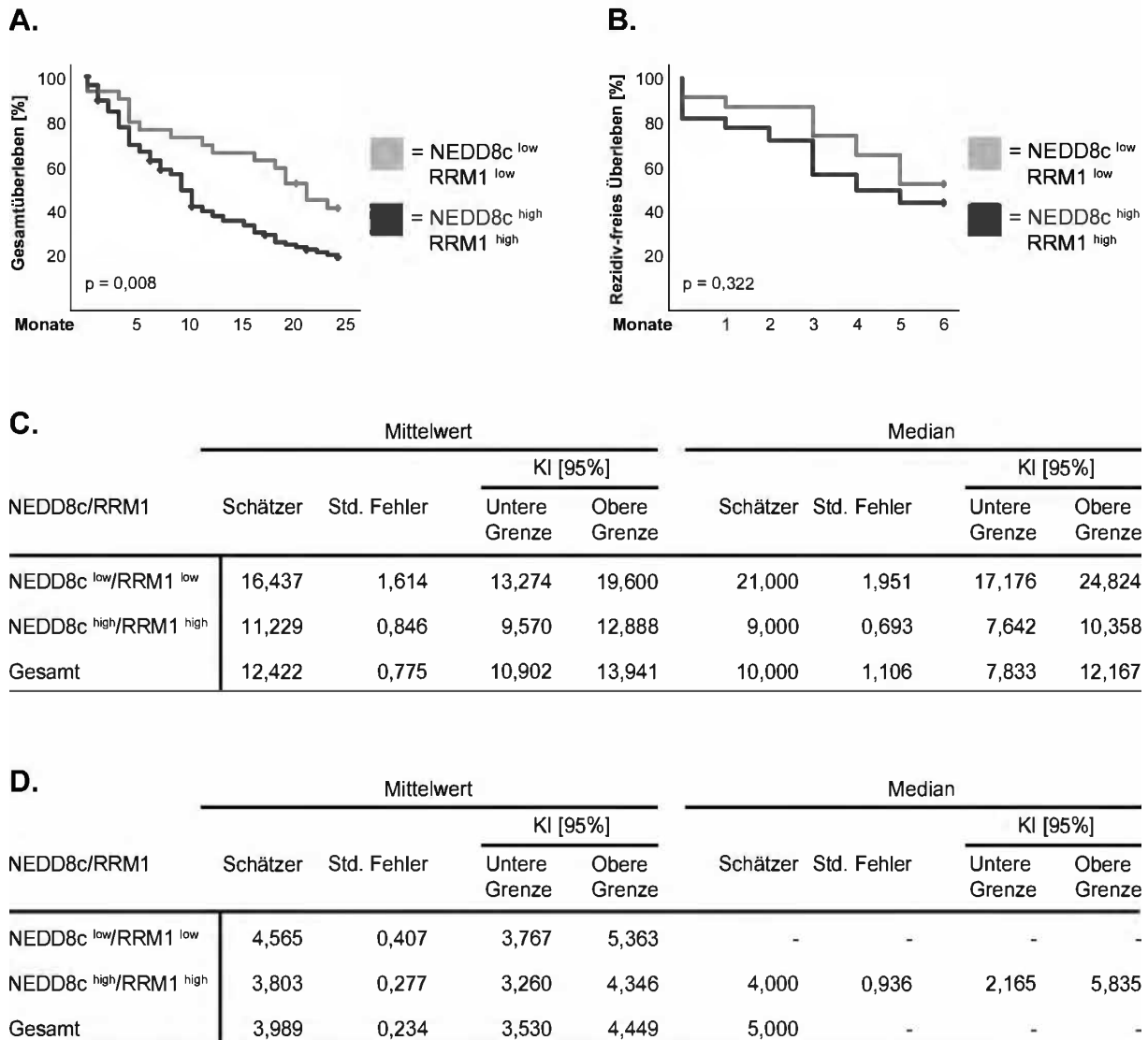
**RRM1: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben in Glioblastompatient\*innen**

**A.** Regressionsanalyse des 24 Monate Überlebens für Patient\*innen mit RRM1-Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Regressionsanalyse des 6-monatigen rezidivfreien Überlebens wie in A. HR=Hazard Ratio; KI [95%]=95% Konfidenzintervall.

**3.14 NEDD8c/RRM1: Assoziation mit Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben**

In dieser Studie identifizierten wir eine hohe Expression von NEDD8c oder von RRM1 als ungünstige prognostische Faktoren für Glioblastompatient\*innen (WHO-Grad 4). Basierend auf diesen Resultaten wird nun die Kombination der beiden Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass „double-high“ Patient\*innen (NEDD8c<sup>high</sup>/RRM1<sup>high</sup>) ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (p=0,008; Log-Rank) als „double-low“ Patient\*innen (NEDD8c<sup>low</sup>/RRM1<sup>low</sup>) haben (Abb. 11 A). Beim Vergleich der medianen Überlebenszeiten haben „double low“ (Median=21,000) eine mehr als doppelt so lange Überlebenszeit wie „double high“ Patient\*innen (Median=9,000) (Abb.11 C). Bezüglich des rezidivfreien Überlebens waren keine signifikanten Unterschiede zwischen „double low“ und „double high“ Patient\*innen zu erkennen (p=0,322; Log-Rank) (Abb. 11 B). Die mittleren und medianen Werte für das rezidivfreie Überleben der Glioblastompatient\*innen sind der Abb. 11 D zu entnehmen.

**Abb. 11**



**Abbildung 11: Kombination von NEDD8c und RRM1: univariate Analyse in Glioblastompatient\*innen**

**A.** Kaplan-Meier-24-Monate-Überlebenskurve nach hoher beziehungsweise niedriger Expression von NEDD8c und RRM1. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte befinden sich in der linken unteren Ecke. **B** Kaplan-Meier-6-Monate-Überlebenskurve wie in A. **C-D** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben der Patientengruppen NEDD8c<sup>low</sup>/RRM1<sup>low</sup> und NEDD8c<sup>high</sup>/RRM1<sup>high</sup>. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervalle.

### 3.15 NEDD8c/RRM1: Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben – Multivariatanalyse

Im Anschluss erfolgten multivariate Cox-Regressions-Analysen der Markerkombination NEDD8c/RRM1 in Glioblastompatient\*innen (WHO-Grad 4). Diese zeigten nach Adjustierung des Alters, des Karnofsky-Index, des Ausmaßes der

Resektion und der Therapie, dass eine gleichzeitig erhöhte NEDD8- und RRM1-Expression (NEDD8<sup>high</sup>/RRM1<sup>high</sup>) mit einem signifikant höheren Sterberisiko (HR=2,049; KI [95%]=1,195-3,512; p=0,009) einhergeht (Tab. 10 A). Außerdem ist das Sterberisiko und die Signifikanz im Vergleich zu den einzelnen Marken erhöht (vgl. Tab. 7 A und 9 A). Bezüglich des rezidivfreien Überlebens hatte diese Marker-Kombination allerdings keine signifikante prognostische Aussagekraft (Tab. 10 B).

**Tabelle 10: Cox-Regressionsanalysen zu NEDD8c/RRM1**

<b>A.</b>				<b>B.</b>			
Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz	Cox Regression	HR	KI [95%]	Signifikanz
NEDD8c/RRM1	2,049	1,195-3,512	0,009	NEDD8c/RRM1	1,174	0,590-2,339	0,648
Alter	1,022	1,005-1,040	0,013	Alter	1,012	0,989-1,035	0,313
Karnofsky Index	0,999	0,985-1,013	0,867	Karnofsky Index	0,986	0,969-1,003	0,118
Resektion	0,708	0,484-1,036	0,075	Resektion	0,956	0,569-1,606	0,866
Therapie	0,691	0,617-0,774	< 0,001	Therapie	0,744	0,647-0,856	< 0,001

**Tabelle 10: Cox-Regressionsanalysen zu NEDD8c/RRM1**

**NEDD8c/RRM1- Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben in Glioblastompatient\*innen**

**A.** Regressionsanalyse des 24-Monate-Überlebens für Patient\*innen mit NEDD8c/RRM1-Expression adjustiert mit Alter, Karnofsky-Index, Resektion und Therapie. **B.** Regressionsanalyse des 6-monatigen rezidivfreien Überlebens wie in A. HR=Hazard Ratio; KI [95%]=95% Konfidenzintervall.

## 4. Diskussion

### 4.1 Biometrische Daten in Bezug auf Vergleichskollektive

Das hier analysierte Kollektiv umfasst 263 Patient\*innen, davon 233 mit einem Glioblastom. Trotz der recht hohen Anzahl an Patient\*innen stellt sich die Frage, ob das Kollektiv repräsentativ ist. Die folgenden Daten berücksichtigen lediglich Patient\*innen mit Glioblastom.

Das mediane Alter der untersuchten Patient\*innen betrug 64 Jahre bei Diagnosestellung. Dies liegt demnach zwei Jahr über dem der WHO-Klassifikation von 2016. Außerdem sind Männer mit einer Quote von 1,2:1 häufiger betroffen als Frauen. Dies ähnelt ebenfalls den Daten der WHO-Klassifikation von 2016, die bei Zusammennahme beider Glioblastomarten, eine ähnliche Quote zwischen Männern und Frauen ausgibt. Demnach kann man das untersuchte Kollektiv bezüglich des Alters und der Geschlechterverteilung als repräsentativ werten. Die mediane Überlebenszeit unserer Studie lag bei 12 Monaten. Laut der WHO-Klassifikation von 2016 liegt die mediane Überlebenszeit, abhängig von der erhaltenen Therapie, bei 9,9 bis 15 Monaten (3). Demnach ist auch hier von repräsentativen Daten auszugehen.

Ein weiterer relevanter Prognosefaktor ist der Methylierungsstatus der MGMT-Promotorregion. Eine methylierte Promotorregion spricht besser auf das Chemotherapeutikum Temozolomid an (66). Aufgrund der Relevanz des MGMT-Methylierungsstatus wurde die hier erhobenen Daten ebenfalls auf Repräsentativität gegenüber dieses Prognosemarkers überprüft. Das hier analysierte Kollektiv weist eine Methylierungsrate von 59% auf und ist so um einiges höher, als ein Vergleichskollektiv mit 45% Methylierungsrate, das von Hegi et al. untersucht wurde (19). Dieser Unterschied könnte in der Verwendung verschiedener Methylierungskits liegen. Nach Holmes et al. ist das EZ-DNA-Methylation-Kit (Zymo Research) mit 99,9% Konversionsrate, eines der effektivsten und sensitivsten Kits (67). Der hohe Grad an Sensibilität des verwendeten Kits könnte eine mögliche Erklärung unserer vergleichsweise hohen Methylierungsrate sein (siehe. Tab. 1).

## 4.2 Diskussion der Methoden

### 4.2.1 Patientenkollektiv

Zur Untersuchung des Gewebes wurden in Paraffin eingebettete Proben aus der Neuropathologie genutzt. Bei diesen Proben zeigten sich die ersten Limitationen der Methodik, da manche Gewebeproben sehr große Nekrosezonen, Einblutungen und wenig vitales Tumorgewebe enthielten. Proben, bei denen kein Tumorgewebe mehr identifiziert werden konnte, wurden von der Studie ausgeschlossen. Außerdem ergaben sich Probleme bei der Erhebung der vollständigen klinischen Daten der Patient\*innen. Durch fehlende Berichte der Hausärzt\*innen und Kliniken sowie Wohnortwechsel der Patient\*innen war eine Erhebung der Follow-Up Daten teilweise nicht möglich. In Konsequenz daraus wurden diese Patient\*innen in der Studie zensiert.

Zur Vervollständigung der Daten wurde bei einigen Patient\*innen der MGMT-Methylierungsstatus nachbestimmt. Bei dieser Nachbestimmung wurden Promotorregionen, die schwach methyliert waren, als unmethyliert gewertet, da ein genauer Cut-off-Wert vom Hersteller nicht angegeben wurde. Dies zeigt, dass die Sensitivität der Materialien, bezogen auf den Methylierungsgrad der Promotorregion, eine mögliche Limitation darstellt. Weiterhin ergaben sich Probleme bei der Bestimmung des Resektionsstatus. Bei einigen Patient\*innen lag postoperativ nur eine CT oder MRT-Aufnahme vor, die außerhalb des 72-Stunden-Fensters lag. Dieses 72-Stunden-Fenster ist der momentane Standard bei postoperativer Bewertung des Resektionsausmaßes bei Gliomen. Es wird genutzt, um Resttumor von Granulationsgewebe zu unterscheiden (68). Neuere Studien empfehlen, dass das postoperative MRT zeitnah gemacht wird, damit eine möglichst genaue Beurteilung des Resektionsstatus gewährleistet werden kann (69). Dementsprechend konnte der Resektionsstatus bei Patient\*innen außerhalb dieses Fensters nicht genau erhoben werden, da Resttumor von Granulationsgewebe nicht zu unterscheiden war.

#### 4.2.2 Tissue Microarrays (TMAs)

Die Kohorte in dieser Studie umfasst mehr als 250 Patient\*innen-Proben zur Untersuchung. Für eine suffiziente und kostengünstige Analyse einer hohen Anzahl an Patient\*innen eignet sich die Methode der TMAs sehr gut, da hier auf einem Objektträger eine große Anzahl an Proben Platz finden (70). Nachdem bei dieser Methodik bereits in anderen Studien eine hohe Repräsentativität der einzelnen Spots im Vergleich zum Spendergewebe nachgewiesen wurde, eignete sie sich für unsere Zwecke optimal (72, 73). Zusätzlich ist diese Methode sehr gut geeignet, um die Proben immunhistochemischen Färbemethoden zu unterziehen und die Gewebeproben zu anonymisieren (71). Problematisch bei dieser Methode ist das Ausstanzen von kleinen Abschnitten aus einem großen Gewebeblock. Dabei kann es durch Auswahl eines falschen Abschnitts oder verminderter Verfügbarkeit des Tumorgewebes zu einer fehlerhaften Erstellung der genutzten Gewebeproben kommen. Um diesem potentiellen Fehler bei der Gewebsauswahl vorzubeugen haben wir nach Möglichkeit mehrere Proben des gleichen Tumors verwendet. In einer Vielzahl von Studien konnte veranschaulicht werden, dass die Proben der TMAs bei soliden Tumoren konkordant gegenüber der traditionellen Methode mit einzelnen Objektträgern sind (72,73). Trotz der genannten Limitationen ist diese Methodik ein gutes Verfahren um valide Ergebnisse zu erzielen.

#### 4.2.3 Immunhistochemie

Das Verfahren der Immunhistochemie ist eine etablierte Methode zur Analyse von Expressionsmustern in Gewebeproben. Grenzen dieser Methode zeigen sich in der möglichen unspezifischen Hintergrundfärbung der Proben. Die Färbung des Hintergrunds durch hydrophobe Interaktionen von Proteinen, ionischen sowie elektrostatischen Interaktionen und vielen weiteren können die Auswertung der Proben erschweren (74). Zum Ausschluss eventueller unspezifischer Färbungen wurden in dieser Studie ausschließlich Antikörper genutzt, die bereits an in Paraffin eingebetteten Geweben getestet und validiert wurden. Zur Auswertung wurden zwei unabhängige in der Medizin tätige Personen zurate gezogen um einen hohen Grad an Objektivität zu gewährleisten. Bei großen Unterschieden in der Beurteilung wurde eine dritte unabhängige Person zur endgültigen Bewertung hinzugezogen.



### 4.3 Der Biomarker NEDD8

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine hohe NEDD8-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen (NEDD8c) signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben und rezidivfreien Intervall bei Patient\*innen mit einem primären Glioblastom einhergeht (siehe Abb. 3 A und 4 A). Bei der Cox-Regressionsanalyse wurde die Unabhängigkeit von NEDD8c als prognostischer Marker gezeigt und eine mit ihm einhergehende erhöhte Sterberate identifiziert (siehe Abb. 6 A). Weiterhin konnten wir eine Lokalisation von NEDD8 im Zellkern nachweisen. Jedoch konnten bei der nukleären Lokalisation keine signifikanten Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens gezeigt werden (siehe Abb. 3 B und 4 B).

NEDD8 ist Teil der ubiquitinähnlichen Proteine, welche wie Ubiquitin an diverse Substrate konjugiert werden. Diese Substrate sind unter anderem Culline, Tumorsuppressoren und Onkoproteine (32). Eine Überexpression von NEDD8 wurde bereits in Lungenkarzinomen, intrahepatischen Cholangiokarzinomen und Kolonkarzinomen nachgewiesen (75–77). Die durch eine erhöhte NEDD8 Expression dysregulierten folgenden molekularen Pfade könnten vielfältigen Einfluss auf die malignen Eigenschaften des Glioblastoms haben:

#### Zellwachstum und Proliferation

Die in unserer Studie nachgewiesene erhöhte NEDD8-Expression kann eine erhöhte Aktivität der Cul1-basierten CRLs zur Folge haben. Cul1-basierte CRLs bauen Zellzyklusinhibitoren wie p130 und CDK-Inhibitoren wie p27, p57 und p21 vermehrt ab (33). Alza et al. konnten in einer Studie feststellen, dass eine Inhibition der FAK über p27 eine Seneszenz der Tumorzellen herbeiführt (78). Dies deutet daraufhin, dass aus einem vermehrten Abbau von p27 eine Tumorprogression resultiert. Zusätzlich zeigten Boriello et al., dass p57 in vielen Tumoren vermindert exprimiert wird, was sich ebenfalls durch einen Verlust der Zellzyklus-Regulation positiv auf die Tumorentstehung auswirken kann (79). Auch Tumorsuppressoren wie BRCA1, TOB1, FOXO1 und RASSF1a wurden als Substrate der Cul1-basierten CRLs identifiziert (34). Sie werden bei einer erhöhten Aktivität der Cul1 vermehrt abgebaut. Zhu et al. konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass die Micro RNA miR-28-5p durch eine Hemmung

von FOXO1 zum Zellwachstum von Glioblastomzellen beiträgt (80). Dem gleichen Muster nach könnte NEDD8 durch einen vermehrten Abbau von FOXO1 zur Tumorprogression beitragen. Zusätzlich zeigte Zhao et al., dass eine Hemmung des tumorprogressionsfördernden NEDD8-Konjugationsenzym UBE2M die Proliferation der Tumorzellen in intrahepatischen Cholangiokarzinomen hemmt (81).

Tian et al. konnten in ihrer Studie bei Blasenkarzinomen ebenfalls zeigen, dass eine erhöhte NEDD8-Expression mit einem schlechterem Gesamtüberleben und einer erhöhten Tumorprogression assoziiert ist (82). Levav-Cohen et al. demonstrierten, dass die Hemmung von pRB oder die Aktivierung von E2F/DP1 bei der Tumorgenese eine Rolle spielen können. Diese Hemmung kommt durch Neddylierung von MDM2 zustande. Der Prozess der Neddylierung trägt zur Stabilisierung und dadurch zur Funktion des Proteins bei. pRB ist ein Checkpoint-Inhibitor, der normalerweise E2F/DP1 bindet und so das Voranschreiten des Zellzyklus verhindert (83). Uchida et al. stellten fest, dass MDM2 pRB abbaut und so eine Fortführung des Zellzyklus fördert (84). Außerdem interagiert MDM2 auch direkt mit E2F/DP1, indem es dieses bindet und dadurch seine transkriptionelle Aktivität steigert (85). Die Stabilisierung durch NEDD8 würde demzufolge diese onkogenen Wege fördern und zur Proliferation des Tumors beitragen. Dies deckt sich wiederum mit unseren Ergebnissen und demonstriert den Einfluss von NEDD8 auf die Proliferation und die Progression von Tumoren. Momand et al. zeigten, dass Gliome zu der Gruppe an Tumoren gehören, in der eine vergleichsweise hohe Frequenz an MDM2-Amplifikationen vorherrscht (86).

Außerdem zeigten Xie et al., dass eine Neddylierung von PTEN zu dessen Kernimport führt und dort zur Steigerung der Proliferation und des Metabolismus der Zelle beiträgt. Diese Wirkung wird einerseits der Dislokation von PTEN in den Zellkern und der daraus folgenden verminderten Regulation des protoonkogenen PI3K/Akt-Signalwegs zugeschrieben (87). Andererseits fördert PTEN im Nukleus die Dephosphorylierung von FASN, was einen Abbau dieses Enzyms durch die TRIM21 assoziierte Ubiquitinligase hemmt (87,88). Erhöhte Aktivität von FASN trägt durch vermehrte de-novo-Synthese von Fettsäuren zur Tumorentstehung bei (89). In Gewebeproben von Mammakarzinomen korrelierte neddyliertes PTEN mit Tumorprogression und einer schlechten Prognose (87).

Neben PTEN hat NEDD8 eine Wirkung auf den PI3K/Akt Signalweg über das Protein REDD1. Gu et al. konnten in ihrer Studie feststellen, dass eine Hemmung von NEDD8 zu einer vermehrten Expression von REDD1 führt und dadurch der protoonkogene PI3K/Akt Signalweg gehemmt wird (90). Im Umkehrschluss würde eine erhöhte Aktivität von NEDD8 zur verminderten Expression von REDD1 führen und dadurch zur Tumorprogression beitragen.

Eine weitere Signalachse, in die NEDD8 involviert ist, ist die MDM2-p53 Achse. Xirodimas et al. zeigten, dass MDM2 die Konjugation von NEDD8 an p53 fördert und damit die Aktivität von p53 inhibiert (47). Eine Inhibition des Tumorsuppressors p53 führt zur Einschränkung seiner vielfältigen zytoprotektiven Mechanismen (91). Eine verringerte Aktivität von p53 durch Neddylierung führt zu stärkerer Proliferation und Langlebigkeit der Tumorzellen. Die Relevanz von p53 in der Tumorsuppression in Glioblastomen zeigten Forte et al. in einer Studie, in der Glioblastomzellen mit dem p53-Reaktivator RITA transfiziert wurden und ein deutlich höherer Anteil an p53 induzierter Apoptose der Tumorzellen zu erkennen war (92). Abida et al. konnten in ihrer Studie einen ähnlichen Mechanismus zeigen, der mit einer Neddylierung einer Cul1 assoziierten CRL zusammenhängt, die die Neddylierung von p53 fördert und auch hier für eine verringerte Aktivität des Tumorsuppressors sorgt (93). Diese Erkenntnisse in Bezug auf die anfangs erwähnte Steigerung der Cul1 assoziierten CRLs decken sich mit den Ergebnissen unserer Studie und resultieren in einer schlechteren Prognose bei hoher NEDD8-Expression.

### Migration/Invasion

In Magenkarzinomen konnten Lan et al. feststellen, dass eine Inhibierung der Neddylierung der Cul1-basierten CRLs zu einer verminderten Migration der Tumorzellen führt (94). Dehan et al. konnten einen erhöhten Abbau von NF- $\kappa$ B Inhibitoren durch eine Cul1-basierte CRL zeigen (95). Dies könnte im Umkehrschluss eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B durch eine erhöhte Aktivität von NEDD8 zur Folge haben. NF- $\kappa$ B wurde bei kolorektalen Karzinomen als essentieller Bestandteil der Migration der Tumorzellen beobachtet (96).

Neben NF- $\kappa$ B hat auch p53 einen Einfluss auf die Invasion der Tumorzellen. Kim et al. zeigten in ihrer Studie, dass p53 im Zusammenspiel mit p21 die Zellinvasion hemmt.

Dieser Mechanismus läuft über die Aktivierung von BAX ab, die zur Unterdrückung der Invasion und Induktion der Apoptose führt (97). Ein erhöhter Abbau von p53 und p21 durch eine gesteigerte NEDD8-Aktivität würde demzufolge zu einer verstärkten Invasion und einer verringerten Apoptoserate der Zellen führen.

### Angiogenese

Shi et al. konnten neben der migrations- und proliferationsfördernden Wirkung von NEDD8 eine proangiogene Funktion in soliden Tumoren nachweisen (98). Yao et al. konnten diesen fördernden Effekt bezüglich der Angiogenese ebenfalls feststellen. Sie zeigten, dass eine Inhibierung von NEDD8 in einer Akkumulation von RhoA resultiert, einem Protein, das den Prozess der Angiogenese beeinträchtigt (99).

Auch Liu et al. konnten feststellen, dass eine Inhibition von NEDD8 zu einer Verringerung der angiogenen Aktivität führt. In der Studie konnten die Autoren zeigen, dass in Endothelzellen eine Inhibition von NEDD8 zu einer gesteigerten Aktivität des proapoptotischen ATF4/NOXA Signalwegs führt (100). Eine erhöhte NEDD8-Aktivität hingegen würde das Gegenteil bewirken und demnach zur Angiogenese beitragen.

Eine weitere proangiogene Wirkung von NEDD8 liegt in der Kompromittierung des p53 Signalwegs. Chen et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass p53 die Transkription der miR-1249 fördert. Diese Micro-RNA hemmt über Interaktion mit VEGF die Angiogenese der Tumorzellen (101). Ein vermehrter NEDD8-induzierter Abbau von p53 könnte demnach zu einer proangiogenen Wirkung führen.

### Chemoresistenz

In einer Studie an Glioblastomzelllinien konnten Xiao et al. feststellen, dass eine durch NFIA geförderte erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B besteht. Diese konnte in Zusammenhang mit einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem gängigen Chemotherapeutikum Temozolomid gebracht werden (102).

Bei Cul4 führt eine Neddylierung der CRL ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivität. Diese kann in einem verminderten Ansprechen der Tumorzellen auf das Chemotherapeutikum Temozolomid resultieren. Jackson et al. zeigten, dass die Cul4 basierte CRL-DDB1-Cul4<sup>CDT2</sup> für den Abbau des CdK-Inhibitors p21 zuständig ist

(103). Dieser CdK-Inhibitor ist ein wichtiger Angriffspunkt von Temozolomid. In Glioblastomen induziert Temozolomid durch p21-Aktivierung eine Seneszenz der Tumorzellen (104). Eine geringeren p21-Aktivierung durch erhöhte Expression von NEDD8 könnte sich vorteilhaft für die Tumorzellen auswirken, da die durch p21 angeregten Alterungsprozesse ausblieben.

Einen weiteren Einflussfaktor bezüglich der Chemoresistenz bei Glioblastomzellen ist in MDM2 zu finden. MDM2 ist als Ringfinger-E3-Ligase direkt am Abbau von p53 durch Ubiquitinierung beteiligt (47). Die Neddylierung von MDM2 trägt zu dessen Stabilität bei. Die durch Chemotherapeutika induzierten DNA Schäden führen zur Instabilität von MDM2 und dadurch zu einem verringerten Abbau von p53. Dadurch kommt es vermehrt zur p53 assoziierten Apoptose der Tumorzellen (48). Daraus könnte man schließen, dass bei einer erhöhten NEDD8-Expression, die Sensitivität der Tumorzellen bezüglich Chemotherapeutika erniedrigt ist, da MDM2 stabilisiert wird und den tumorsuppressiven p53-Signalweg blockiert.

Die erhöhte Aktivität von NEDD8 könnte durch die dargestellten Mechanismen zur Resistenz gegenüber Temozolomid beitragen und somit zur schlechten Prognose von Patient\*innen beitragen.

### Genetische Instabilität

Die Cul3 abhängigen CRL-Komplexe unterliegen ebenfalls der Modifikation durch NEDD8. Ein beschriebenes Substrat der Cul3/KLH9/KLH13 ist Aurora B. Aurora B wurde von Sumara et al. als beteiligter Faktor für die korrekte Komplettierung der Zytokinese identifiziert und wird durch Cul3/KLH9/KLH13 von den mitotischen Chromosomen entfernt (41). Durch die direkte Beteiligung dieses Proteins an der Mitose und der darauf fußenden regulatorischen Funktion innerhalb des Zellzyklus liegt der Schluss nahe, dass bei Fehlregulation dieses Signalweges eine korrekte Zellteilung nicht gewährleistet werden kann. Eine dysregulierte Mitose kann zu chromosomaler Instabilität führen, die sich vorteilhaft auf die Tumorentstehung auswirken kann (105). Eine mögliche Dysregulation der Mitose durch die Überexpression von NEDD8 könnte demnach mutagen und tumorfördernd wirken.

Cul3 ist auch an der Regulierung von oxidativem Stress beteiligt. Cul3 bindet KEAP1 und führt so im Folgenden zur Deaktivierung von ARE. ARE leitet Prozesse in die Wege, die vor oxidativem Stress schützen (32). Oxidativer Stress kann Mutationen innerhalb der DNA auslösen, die zur Entstehung von Karzinomen beitragen (106).

Die Fülle an Prozessen, die NEDD8 beeinflusst, zeugt von der Wichtigkeit dieses Proteins für die Funktion der Zelle. Auch Hua et al. konnten in einer Studie eine Überexpression von NEDD8 in Glioblastomzellen feststellen und beschreiben das Protein als möglichen Ansatzpunkt für die Therapie (107). Zusätzlich wird diese These durch eine Arbeit von Zhou et al. gestützt. Die Autoren zeigten, dass eine Hemmung von NEDD8 mittels MLN4924 eine Hochregulierung des Immunocheckpoint-Inhibitors PD-L1 in Glioblastomzellen zur Folge hat und dadurch ein verbessertes Ansprechen auf PD-L1 Inhibitoren zu erkennen ist (108). Dies sind hoffnungsvolle Ansätze für eine Entwicklung individualisierter Therapieansätze. Zweifelsohne werden weitere Forschungsanstrengungen das Gesamtbild und die molekularen Feinheiten von NEDD8 weiter untersuchen und dadurch ein genaueres Verständnis der Tumorbilogie ermöglichen sowie neue Therapieansätze offenbaren. Eine Etablierung von NEDD8 als prognostischen Marker bei Glioblastompatient\*innen sollte im klinischen Alltag in Betracht gezogen werden.

#### NEDD8-Inhibitor MLN4924

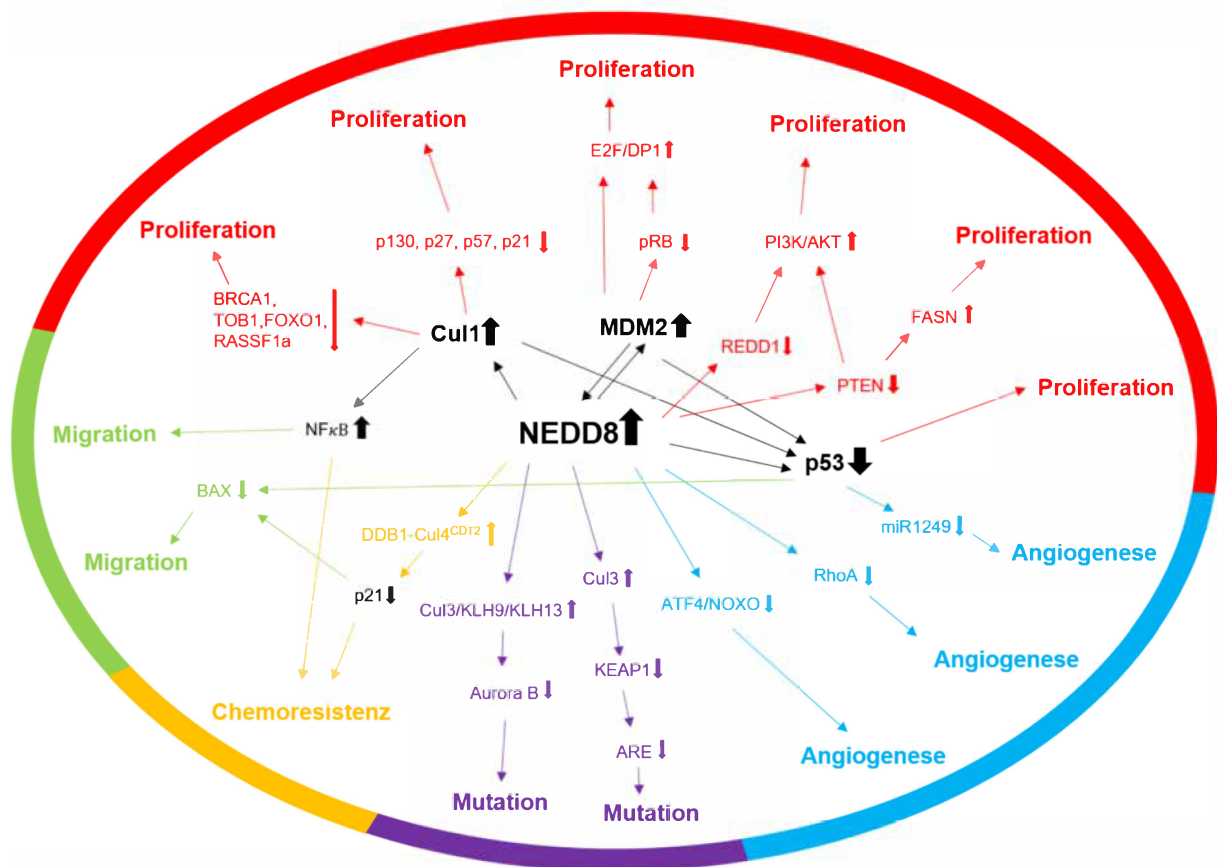
MLN4924 ist ein selektiver Inhibitor der generellen NEDD8-Konjugation durch die Hemmung des NAE. NEDD8 und MLN4924 binden jeweils an ihren Teil des Enzyms und bilden nach der Reaktion ein stabiles Produkt. Dieses Produkt verbleibt im Enzym und verhindert weitere katalytische Funktionen von NAE (109). Die Hemmung führte in Zellreihen von kolorektalen Karzinomzellen zu Defekten in der S-Phase, DNA-Schäden und Apoptose (110). Swords et al. testeten MLN4924 auch an Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML). Es zeigte sich eine Hemmung der tumorfördernden Eigenschaften der AML-Zellen (111).

NEDD8 hat viele Substrate wie Tumorsuppressoren und Onkoproteine, die in bei malignen Prozessen eine Rolle spielen können. In Anbetracht dessen hat MLN4924 vielversprechende Aussichten als potentieller Ausgangspunkt für Therapeutika von

Tumorpatient\*innen. Andererseits sollte ein Einsatz eines generellen NEDD8-Inhibitors sorgfältig erwogen werden, da die Wirkung von NEDD8 sehr vielfältig ist und auch diverse physiologische Mechanismen beeinflusst.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege von NEDD8 ist in Abb. 12 dargestellt.

**Abb. 12**



**Abbildung 12: NEDD8: Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege.**

#### 4.4 Der Biomarker RRM1

Die große Untereinheit der RNR, RRM1 hat sowohl tumorsuppressive, als auch onkogene Eigenschaften. In unserer Analyse zeigten wir ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben von Glioblastompatient\*innen bei hoher Expression von RRM1 (siehe Abb. 11 A). Mittels der Cox-Regressions Analyse wurde ein erhöhtes Sterberisiko ermittelt und RRM1 als möglicher unabhängiger prognostischer Marker bei Glioblastompatient\*innen identifiziert (siehe Abb. 14 A). Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass die RRM1-Expression in Tumorgewebe signifikant höher ist, als in gesundem Gewebe (siehe Abb. 10 B). Dies deutet auf eine tumorfördernde Funktion von RRM1 in Glioblastomzellen hin.

RRM1 wird eine maßgebliche Rolle in der Regulierung der dNTPs zuteil (50,112). Ein Verlust der richtigen Balance der dNTPs kann zu Beeinträchtigung der DNA-Reparaturmechanismen und zu Mutationen führen (60). Aye et al. stellten in einer Metanalyse fest, dass RRM1 in Sarkomen, Tumoren des zentralen Nervensystems und Lungenkrebs zu den am meisten exprimierten Genen gehört (60). Nachfolgend werden die Mechanismen, in die RRM1 eingebunden ist, diskutiert und mit unseren Ergebnissen verglichen.

Jiang et al. konnte in einer Studie an Glioblastomzellen zeigen, dass eine Inhibition von RRM1 durch die MicroRNA-1468-5p zu einem vermindertem Zellwachstum und verminderter Proliferation führt (113). Dies zeigt im Umkehrschluss, dass RRM1 eine wichtige Funktion im Fortschreiten des Zellzyklus bei Tumorzellen hat. Auch Fang et al. konnten bei RRM1 eine proliferative Wirkung in Schilddrüsenkarzinomen nachweisen (114). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass RRM1 über eine Aktivierung des onkogenen RAS/RAF/MAPK Signalweges zur Zellproliferation und Invasion der malignen Zellen bei Magenkarzinomen beiträgt. Weiterhin wurde eine Assoziation von RRM1 mit einem schlechteren Gesamtüberleben, einer erhöhten Sterberate und eine positive Korrelation von RRM1 mit dem Proliferationsmarker, Ki67, beschrieben (115). Diese Assoziation und Korrelation konnten wir in unserer Studie ebenfalls feststellen (siehe Abb. 11 A und 14 A). Der in unserer Arbeit demonstrierte erhebliche Unterschied der Expression von RRM1 in gesundem und krankem Gewebe



(siehe Abb.10 B) gepaart mit der erhöhten Ki67-Positivität deutet auf die Funktion von RRM1 als Tumorpromotor in Glioblastomen hin.

Ein weiterer Mechanismus, der die Expression und Aktivität der RNR steigern kann hängt mit dem mTOR-Kinase-Komplex zusammen. He et al. zeigten in ihren Analysen, dass mTOR sowohl die Transkription, als auch die Translation der beiden Untereinheiten RRM1 und RRM2 positiv reguliert (116). mTOR ist Bestandteil des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs, welcher bereits im Glioblastom beschrieben ist und an diversen malignen Prozessen, wie Proliferation, Tumorzellwachstum und Infiltration beteiligt ist (117–119). Chakravarti et al. zeigten in ihrer Studie, dass im Glioblastom dieser Signalweg in erhöhtem Ausmaß aktiv ist (120). Durch eine vermehrte Aktivierung des geschilderten Signalwegs und der damit verbundenen erhöhten RRM1-Expression kann von einer in der Tumorgenese beteiligten Funktion dieses Proteins auszugehen sein.

Des Weiteren konnten Yuan et al. in ihrer Studie feststellen, dass RRM1 eine Rolle in der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Temozolomid zuteilwird. Sie beschrieben, dass lncRNA-HOTAIR in temozolomidresistenten Glioblastomzellen signifikant erhöht war. Diese Resistenz wird von lncRNA-HOTAIR durch die miR-519a-3p/RRM1-Achse induziert und reguliert. Bei Reduktion der lncRNA konnte eine verminderte Chemoresistenz der Glioblastomzellen in-vivo nachgewiesen werden (121). Die verminderte Antwort auf Temozolomid unterstreicht unsere Ergebnisse bezüglich des verminderten Gesamtüberlebens bei erhöhter RRM1-Expression (siehe Abb. 11 A), da ein Großteil der Glioblastompatient\*innen mit Temozolomid behandelt werden. Ein vermindertes Ansprechen auf Temozolomid würde zu einer vermehrten Tumorprogression und einem geringeren Überleben führen.

Außerdem ist die RNR und dadurch auch die Untereinheit RRM1 in Tumorzellen essentiell, da sie für den Nachschub von dNTPs sorgen. Shao et al. beschreiben eine erhöhte RNR-Aktivität in diversen Krebsarten (122). Eine mögliche Erklärung für eine gesteigerte RNR-Aktivität liefern Jørgensen et al., die in Brustkrebszellen genetische Aberrationen innerhalb der Untereinheiten von der RNR festgestellt haben. Die genetischen Veränderungen im RRM1-Gen waren mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (123).

## RRM1-Inhibitoren

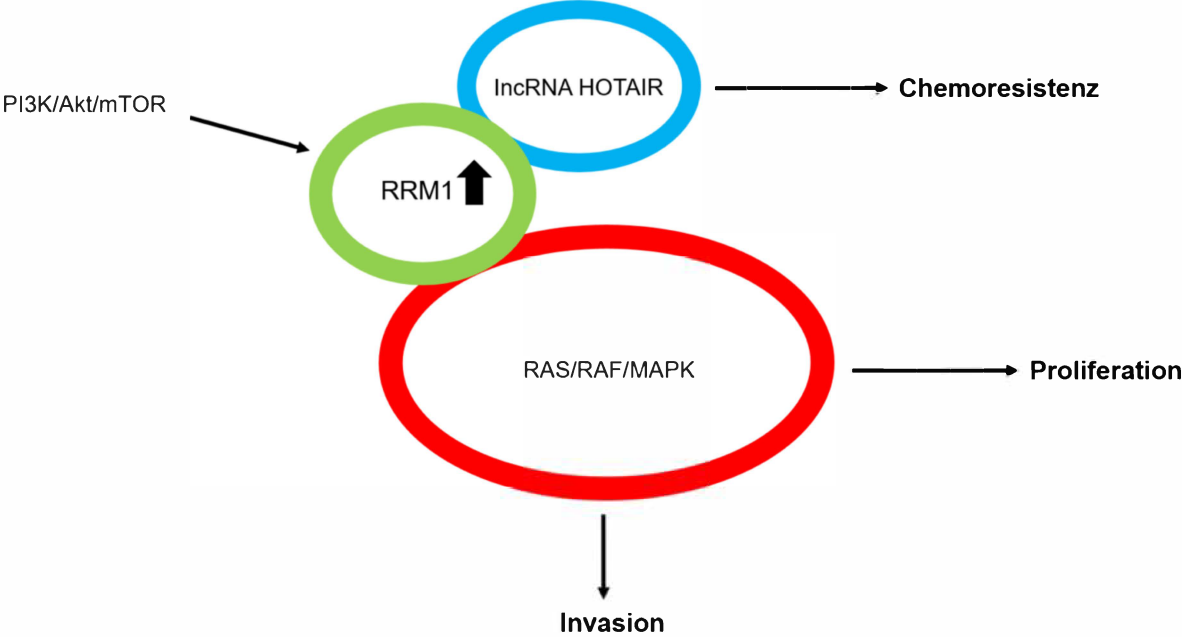
Gemcitabin ist ein spezifischer Inhibitor von RRM1 und wird bereits bei Pankreas-, Ovarial-, Brust-, Blasen- und Lungenkarzinomen eingesetzt (60). Gemcitabin wirkt nach Umwandlung in seine aktive Form als Suizid-Inhibitor von RRM1 und wird bereits in der Therapie von Pankreaskarzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen eingesetzt (124). Ein weiterer Inhibitor von RRM1 ist Clofarabine, das durch reversible Bindung die Funktion der RNR beeinträchtigt. Clofarabine findet bereits Verwendung in der Behandlung von kindlicher akuter Leukämie (125). Ariey-Bonnet konnten in ihrer Studie, einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten RRM1-Expression und ungünstigem Outcome bei Patienten mit Glioblastom multiforme zeigen und betonen damit die mögliche Bedeutung von RRM1 als Ziel für die Kombinationstherapie bei dieser spezifischen Krebsart. Dies legt nahe, dass die gezielte Hemmung von RRM1 in Verbindung mit anderen Medikamenten eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse bei GBM-Patienten darstellen könnte. (126).

Unsere Ergebnisse und die hier im Vorhinein angeführten Erkenntnisse lassen Raum für neue Ansätze in der Diagnostik und Therapie des Glioblastoms. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Gemcitabine, ein spezifischer RRM1-Inhibitor, gegenüber Gliomzellen pro-apoptotisch wirken und potenziell zu einer Sensibilisierung gegenüber der Radiotherapie beitragen könnte (127, 128).

Durch weitere molekulare Untersuchungen und einem besseren Verständnis der Rolle von RRM1 in Glioblastomzellen bietet sich somit ein mögliches Ziel für eine individualisierte expressionsabhängige Therapie dieser Tumorentität. Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden, RRM1 als prognostischen Marker für Glioblastome im klinischen Alltag zu etablieren.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege von RRM1 ist in Abb. 13 dargestellt.

**Abb. 13**



**Abbildung 13: RRM1: Zusammenfassung der wichtigsten Signalwege.**

## 4.5 Die Kombination der Biomarker NEDD8/RRM1

Durch die erfolgsversprechenden Einzelanalysen von NEDD8c und RRM1 erfolgte zum Ende noch die Untersuchung der beiden Marker zusammen. Die Kombination der beiden untersuchten Marker NEDD8c und RRM1 zeigte in der vorliegenden Studie bei hoher Expression eine Assoziation mit einem niedrigeren Gesamtüberleben (siehe Abb.15 A). Mit dem rezidivfreien Überleben konnte keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 15 B). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde bei der Kombination von „double high“ Patient\*innen ein höheres Sterberisiko, als bei NEDD8 und RRM1 singulär ermittelt und RRM1/NEDD8 konnte als potentielle unabhängige prognostische Markerkombination ausgemacht werden (siehe Abb. 16 A). Diese Ergebnisse deuten auf einen synergistischen Effekt beider Marker hin.

Die jeweilige Beteiligung der beiden Proteine an malignen Prozessen bei Glioblastompatient\*innen wurden bereits in den vorherigen Abschnitten diskutiert. Im Folgenden wird auf mögliche Signalwege eingegangen, in denen beide Marker durch erhöhte Expression dazu beitragen könnten, eine gesteigerte Malignität und so unsere Ergebnisse untermauern.

Ein möglicher Effekt der beiden Marker spiegelt sich im PTEN-Signalweg wider. Wie bereits oben beschrieben, führt eine Neddylierung von PTEN zu dessen Kernimport und einer onkogenen Wirkung über Stabilisierung von Akt sowie die fehlende Regulation des PI3K/Akt Signalweges und der Aktivierung des FASN (88, 89, 91, 129). Dieser Mechanismus könnte demnach in Verbindung mit der von Gautam et al. beschriebenen Überexpression von PTEN, induziert durch RRM1, zu einer verstärkten onkogenen Wirkung führen, da sowohl die tumorsuppressiven Eigenschaften von PTEN nicht zur Geltung kämen, als auch eine zusätzliche tumorfördernde Wirkung durch FASN eine potentielle Folge wäre (130).

Ein weiterer Signalweg in dem beide Marker interagieren, ist der p53-Signalweg. NEDD8 hemmt p53 direkt über Neddylierung, wie auch über Stabilisierung der MDM2-Ringfinger-E3-Ligase, die einen Abbau von p53 durch Ubiquitinylierung fördert (47). Der Tumorsuppressor p53 reguliert negativ den IGF1/AKT/mTOR-Signalweg und somit auch das Proliferationsverhalten der Zelle (131). Teil des mTOR-Signalweges ist auch

die Transkription und Translation von RRM1 (116). Bei einer vermehrten Expression von NEDD8 folgt dementsprechend ein vermehrter Abbau von p53. Dieser vermehrte Abbau ist aufgrund der tumorsuppressiven Wirkung von p53 schon tumorfördernd, doch in Kombination mit der daraus folgenden Überexpression von RRM1 und der damit verbundenen Chemoresistenz und vermehrten Proliferation könnte sich das maligne Potential noch verstärken.

Zudem haben beide Marker voneinander unabhängige und vielfältige Funktionen, die sowohl zur Tumorgenese, als auch zur Tumorprogression beitragen können. Eine gleichzeitige Aktivierung dieser Funktionen könnten ebenfalls zu einer schlechteren Prognose und einem höheren Sterberisiko führen.

#### 4.6 Ausblick

In dieser Studie wurde die Relevanz der Marker NEDD8 und RRM1 bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft untersucht. Nach ausführlicher Diskussion der Funktion dieser Marker zeigte sich, dass sie vielfältige Einflüsse auf die Entstehung und Progression des Glioblastoms haben können. Durch fortführende Forschungsarbeiten hinsichtlich der Signalkaskaden innerhalb des Glioblastoms könnten sich so Ansätze zur Therapie ergeben. Des Weiteren sollten weitere Studien angestrebt werden, die diese Ergebnisse validieren, um diese beiden Marker als feste Bestandteile im klinischen Alltag bei Glioblastompatient\*innen zu integrieren. Durch die Nutzung dieser Marker könnten genauere Prognosen getroffen und spezifische individuelle Therapien eingeleitet werden.

## 5. Zusammenfassung

Gliome sind die häufigsten maligne hirneigene Tumoren des erwachsenen Menschen. Trotz intensiver Therapie und Forschung ist die Prognose schlecht.

In dieser Studie wurden die Biomarker NEDD8 und RRM1 in Gliomgewebe untersucht. Dafür genutzt wurden Gewebeproben von 263 Gliompatient\*innen, die im Zeitraum von 2005 bis 2018 im Universitätsklinikum Magdeburg behandelt wurden. Die Proben wurden in Form von TMAs aufbereitet. Diese TMAs wurden daraufhin mit Antikörpern gegen NEDD8 und RRM1 immunhistochemisch gefärbt und von zwei unabhängigen Gutachter\*innen beurteilt. NEDD8 hatte zwei subzelluläre Lokalisationen, nukleär (NEDD8n) und zytoplasmatisch (NEDD8c), und wurde demnach unterschiedlich gescort. Die Ergebnisse wurden mithilfe des Statistik-Programms SPSS ausgewertet.

Die Auswertung ergab eine signifikante Assoziation einer erhöhten Expression von NEDD8c mit dem Gesamtüberleben ( $p=0,019$ ), und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,028$ ) bei Glioblastompatient\*innen. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens zeigte sich bei NEDD8c<sup>high</sup>-Patient\*innen ein 1,42-fach erhöhtes Sterberisiko und eine signifikante unabhängiger von den Prognosefaktor ( $p=0,040$ ). NEDD8n konnte weder mit dem Gesamtüberleben, noch mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert werden.

Die Analyse des Markers RRM1 zeigte bei hoher Expression primär keine Assoziation mit Gesamt- und rezidivfreien Überleben. Aufgrund eines ausgeprägten Unterschieds der RRM1-Expression in gesundem Gewebe und in Tumorgewebe wurde ein neuer Cut-Off-Wert festgelegt. Die erneute Analyse von RRM1 mit angepasstem Cut-Off Wert zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter RRM1-Expression und verringertem Gesamtüberleben ( $p=0,031$ ). Bei der Korrelationsanalyse zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten RRM1-Expression und der Ki67-Positivität in Glioblastompatient\*innen ( $p<0,001$ ). In der multivariaten Regressionsanalyse zeigte RRM1 ein 1,76-fach erhöhtes Sterberisiko bezüglich des Gesamtüberlebens und eine signifikante Unabhängigkeit als Prognosefaktoren ( $p=0,014$ ).

Die Kombination beider Marker zeigte für „double high“ Patient\*innen eine signifikante Assoziation mit einem verringertem Gesamtüberleben ( $p=0,008$ ). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte ein 2,05-fach erhöhtes Sterberisiko für „double high“ Patient\*innen und konnte auch als unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden ( $p=0,009$ ).

In dieser Studie konnten NEDD8, RRM1 sowie deren Kombination als unabhängige prognostische Marker identifiziert werden. Diese Ergebnisse können als Grundlage weiterer Forschung der molekularen Mechanismen bei Gliompatient\*innen dienen.

## Literaturverzeichnis

1. Wang LM, Englander ZK, Miller ML, Bruce JN. Malignant Glioma. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1405:1-30. doi: 10.1007/978-3-031-23705-8\_1. PMID: 37452933.
2. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 2016 Oct 1;20(5 Suppl):S2-8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8. PMID: 27668386; PMCID: PMC5123811.
3. 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*. 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9. PMID: 27157931.
4. Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P, Iliev B, Enchev Y, Tonchev AB. Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. *Med Oncol*. 2018 Jan 31;35(3):27. doi: 10.1007/s12032-018-1083-x. PMID: 29387965.
5. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Oct;23(10):1985-96. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25053711; PMCID: PMC4185005.
6. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2002 Oct;4(4):278-99. doi: 10.1093/neuonc/4.4.278. PMID: 12356358; PMCID: PMC1920665.
7. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, Ballman KV, Berger M, Buckner JC, Chang S, Giannini C, Halder C, Kollmeyer TM, Kosel ML, LaChance DH, McCoy L, O'Neill BP, Patoka J, Pico AR, Prados M, Quesenberry C, Rice T, Rynearson AL, Smirnov I, Tihan T, Wiemels J, Yang P, Wiencke JK. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):905-8. doi: 10.1038/ng.408. Epub 2009 Jul 5. PMID: 19578366; PMCID: PMC2923561.
8. Davis ME. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs*. 2018 Dec;34(5):420-429. doi: 10.1016/j.soncn.2018.10.001. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30392758.
9. Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, Inskip PD. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer*. 2002 May 10;99(2):252-9. doi: 10.1002/ijc.10320. PMID: 11979441.
10. Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J Cancer*. 2011 Nov 1;129(9):2290-6. doi: 10.1002/ijc.25883. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21190193; PMCID: PMC3125483.
11. Hochberg F, Toniolo P, Cole P, Salcman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol*. 1990 Feb;8(1):55-60. doi: 10.1007/BF00182087. Erratum in: *J Neurooncol* 1990 Aug;9(1):90. PMID: 2319291.
12. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(5):307-12. doi: 10.5114/wo.2014.40559. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25477751; PMCID: PMC4248049.
13. Sanli AM, Turkoglu E, Dolgun H, Sekerci Z. Unusual manifestations of primary Glioblastoma Multiforme: A report of three cases. *Surg Neurol Int*. 2010 Dec 22;1:87. doi: 10.4103/2152-7806.74146. PMID: 21206896; PMCID: PMC3011111.
14. Pope WB, Brandal G. Conventional and advanced magnetic resonance imaging in patients with high-grade glioma. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2018 Sep;62(3):239-253. doi: 10.23736/S1824-4785.18.03086-8. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29696946; PMCID: PMC6123261.



15. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, Bendszus M, Balana C, Chinot O, Dirven L, French P, Hegi ME, Jakola AS, Platten M, Roth P, Rudà R, Short S, Smits M, Taphoorn MJB, von Deimling A, Westphal M, Soffiotti R, Reifenberger G, Wick W. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Mar;18(3):170-186. doi: 10.1038/s41571-020-00447-z. Epub 2020 Dec 8. Erratum in: *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 May;19(5):357-358. PMID: 33293629; PMCID: PMC7904519.
16. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4307-15. PMID: 12154034.
17. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia*. 2010 Sep;12(9):675-84. doi: 10.1593/neo.10688. PMID: 20824044; PMCID: PMC2933688.
18. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffiotti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106. PMID: 34185076; PMCID: PMC8328013.
19. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331. PMID: 15758010.
20. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, Matsukura S, Kudo S, Kitajima Y, Harada H, Furukawa K, Matsuzaki H, Emi M, Nakabeppu Y, Miyazaki K, Sekiguchi M, Mukai T. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*. 2003 Dec 4;22(55):8835-44. doi: 10.1038/sj.onc.1207183. PMID: 14647440.
21. Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H, Ikenaka K. GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev Neurosci*. 1997;19(1):49-57. doi: 10.1159/000111185. PMID: 9078433.
22. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*. 2003 May 29;22(22):3407-11. doi: 10.1038/sj.onc.1206372. PMID: 12776191.
23. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1445-53. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011. PMID: 17456751; PMCID: PMC1854940.
24. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6892-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337. PMID: 15466178.
25. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. PMID: 20129251; PMCID: PMC2818769.
26. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist*. 2006 Feb;11(2):165-80. doi: 10.1634/theoncologist.11-2-165. PMID: 16476837.

27. Aguilar LK, Arvizu M, Aguilar-Cordova E, Chiocca EA. The spectrum of vaccine therapies for patients with glioblastoma multiforme. *Curr Treat Options Oncol.* 2012 Dec;13(4):437-50. doi: 10.1007/s11864-012-0208-2. PMID: 22903697; PMCID: PMC3499675.
28. Leibel SA, Sheline GE. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg.* 1987 Jan;66(1):1-22. doi: 10.3171/jns.1987.66.1.0001. PMID: 3023563.
29. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.
30. Cappadocia L, Lima CD. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev.* 2018 Feb 14;118(3):889-918. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00737. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28234446; PMCID: PMC5815371.
31. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Yeh ET. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem.* 1997 Nov 7;272(45):28557-62. doi: 10.1074/jbc.272.45.28557. PMID: 9353319.
32. Watson IR, Irwin MS, Ohh M. NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell.* 2011 Feb 15;19(2):168-76. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.002. PMID: 21316600.
33. Guardavaccaro D, Pagano M. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene.* 2004 Mar 15;23(11):2037-49. doi: 10.1038/sj.onc.1207413. PMID: 15021891.
34. Hiramatsu Y, Kitagawa K, Suzuki T, Uchida C, Hattori T, Kikuchi H, Oda T, Hatakeyama S, Nakayama KI, Yamamoto T, Konno H, Kitagawa M. Degradation of Tob1 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitination. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8477-83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1603. PMID: 16951159.
35. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1649-54. doi: 10.1073/pnas.0406789102. Epub 2005 Jan 24. PMID: 15668399; PMCID: PMC545492.
36. Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J.* 2008 Jul 9;27(13):1863-74. doi: 10.1038/emboj.2008.115. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566590; PMCID: PMC2486425.
37. Dehan E, Bassermann F, Guardavaccaro D, Vasiliver-Shamis G, Cohen M, Lowes KN, Dustin M, Huang DC, Taunton J, Pagano M. betaTrCP- and Rsk1/2-mediated degradation of BimEL inhibits apoptosis. *Mol Cell.* 2009 Jan 16;33(1):109-16. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.020. PMID: 19150432; PMCID: PMC2655121.
38. Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, Chen Y, Chau V, Read MA, Kaelin WG Jr. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep.* 2002 Feb;3(2):177-82. doi: 10.1093/embo-reports/kvf028. Epub 2002 Jan 29. PMID: 11818338; PMCID: PMC1083969.
39. Russell RC, Ohh M. NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep.* 2008 May;9(5):486-91. doi: 10.1038/embor.2008.19. Epub 2008 Mar 7. PMID: 18323857; PMCID: PMC2373363.
40. Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature.* 2003 Sep 18;425(6955):311-6. doi: 10.1038/nature01959. Epub 2003 Sep 3. PMID: 13679921.

41. Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, Peter M. A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):887-900. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.019. PMID: 17543862.
42. Ou CY, Lin YF, Chen YJ, Chien CT. Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in *Drosophila* eye development. *Genes Dev*. 2002 Sep 15;16(18):2403-14. doi: 10.1101/gad.1011402. PMID: 12231629; PMCID: PMC187440.
43. Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Apr 1;244(1):37-42. doi: 10.1016/j.taap.2009.06.009. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19538984; PMCID: PMC2837794.
44. Jackson S, Xiong Y. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci*. 2009 Nov;34(11):562-70. doi: 10.1016/j.tibs.2009.07.002. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19818632; PMCID: PMC2783741.
45. Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell*. 2005 May 6;121(3):387-400. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.035. PMID: 15882621.
46. Melchor L, Saucedo-Cuevas LP, Muñoz-Repeto I, Rodríguez-Pinilla SM, Honrado E, Campoverde A, Palacios J, Nathanson KL, García MJ, Benítez J. Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res*. 2009;11(6):R86. doi: 10.1186/bcr2456. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19995430; PMCID: PMC2815550.
47. Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):83-97. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.016. PMID: 15242646.
48. Watson IR, Li BK, Roche O, Blanch A, Ohh M, Irwin MS. Chemotherapy induces NEDP1-mediated destabilization of MDM2. *Oncogene*. 2010 Jan 14;29(2):297-304. doi: 10.1038/onc.2009.314. Epub 2009 Sep 28. PMID: 19784069.
49. Oliner JD, Saiki AY, Caenepeel S. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Jun 1;6(6):a026336. doi: 10.1101/cshperspect.a026336. PMID: 27194168; PMCID: PMC4888815.
50. Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, Pontarin G, Ferraro P, Frangini M, Reichard P, Bianchi V. Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res*. 2010 Nov 28;703(1):2-10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.06.002. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20561600.
51. Uhlin U, Eklund H. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature*. 1994 Aug 18;370(6490):533-9. doi: 10.1038/370533a0. PMID: 8052308.
52. Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:681-706. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443. PMID: 16756507.
53. Fairman JW, Wijerathna SR, Ahmad MF, Xu H, Nakano R, Jha S, Prendergast J, Welin RM, Flodin S, Roos A, Nordlund P, Li Z, Walz T, Dealwis CG. Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Mar;18(3):316-22. doi: 10.1038/nsmb.2007. Epub 2011 Feb 20. PMID: 21336276; PMCID: PMC3101628.
54. Chabes AL, Björklund S, Thelander L. S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10796-807. doi: 10.1074/jbc.M312482200. Epub 2003 Dec 19. PMID: 14688249.

55. Engström Y, Eriksson S, Jildevik I, Skog S, Thelander L, Tribukait B. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem*. 1985 Aug 5;260(16):9114-6. PMID: 3894352.
56. D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Pagano M. Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1023-34. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.043. PMID: 22632967; PMCID: PMC3616325.
57. Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB, Navas TA. DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*. 1993 May;15(5):333-9. doi: 10.1002/bies.950150507. PMID: 8343143.
58. Filatov D, Björklund S, Johansson E, Thelander L. Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):23698-704. doi: 10.1074/jbc.271.39.23698. PMID: 8798592.
59. Burkhalter MD, Roberts SA, Havener JM, Ramsden DA. Activity of ribonucleotide reductase helps determine how cells repair DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Nov 2;8(11):1258-63. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.07.009. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19713159; PMCID: PMC2763971.
60. Aye Y, Li M, Long MJ, Weiss RS. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene*. 2015 Apr 16;34(16):2011-21. doi: 10.1038/onc.2014.155. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909171.
61. Fan H, Huang A, Villegas C, Wright JA. The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):13181-6. doi: 10.1073/pnas.94.24.13181. PMID: 9371820; PMCID: PMC24283.
62. Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S, Yamasaki M, Marubashi S, Takemasa I, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007 Mar 15;120(6):1355-63. doi: 10.1002/ijc.22390. PMID: 17131328.
63. Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, Caton JR, Demarco LC, O'Rourke MA, Shaw Wright G, Boehm KA, Asmar L, Bromund J, Peng G, Monberg MJ, Bepler G. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5808-15. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9766. Epub 2009 Nov 2. PMID: 19884554; PMCID: PMC2793001.
64. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015 Mar;11(3):1566-72. doi: 10.3892/mmr.2014.2914. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25384676.
65. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Aug;18(8):1061-83. doi: 10.1517/13543780903052764. PMID: 19555299.
66. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459-66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19269895.
67. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe LA, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D. 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 Apr 3;9(4):e93933. doi: 10.1371/journal.pone.0093933. PMID: 24699908; PMCID: PMC3974851.

68. Sato N, Bronen RA, Sze G, Kawamura Y, Coughlin W, Putman CM, Spencer DD. Postoperative changes in the brain: MR imaging findings in patients without neoplasms. *Radiology*. 1997 Sep;204(3):839-46. doi: 10.1148/radiology.204.3.9280269. PMID: 9280269.
69. Bukhari SS, Shamim MS, Mubarak F. Timing of postoperative magnetic resonance imaging (MRI) following glioma resection: Shattering the 72 hour window. *J Pak Med Assoc*. 2019 Aug;69(8):1224-1225. PMID: 31431787.
70. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7. doi: 10.1038/nm0798-844. PMID: 9662379.
71. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*. 2001 Sep;195(1):72-9. doi: 10.1002/path.893. PMID: 11568893.
72. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000 Dec;80(12):1943-9. doi: 10.1038/labinvest.3780204. PMID: 11140706.
73. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Bröcker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol*. 2003 Feb;162(2):469-77. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63841-2. PMID: 12547705; PMCID: PMC1851154.
74. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005 Jul;42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405. PMID: 16006601.
75. Li L, Wang M, Yu G, Chen P, Li H, Wei D, Zhu J, Xie L, Jia H, Shi J, Li C, Yao W, Wang Y, Gao Q, Jeong LS, Lee HW, Yu J, Hu F, Mei J, Wang P, Chu Y, Qi H, Yang M, Dong Z, Sun Y, Hoffman RM, Jia L. Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 May 22;106(6):dju083. doi: 10.1093/jnci/dju083. PMID: 24853380.
76. Gao Q, Yu GY, Shi JY, Li LH, Zhang WJ, Wang ZC, Yang LX, Duan M, Zhao H, Wang XY, Zhou J, Qiu SJ, Jeong LS, Jia LJ, Fan J. Neddylation pathway is up-regulated in human intrahepatic cholangiocarcinoma and serves as a potential therapeutic target. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7820-32. doi: 10.18632/oncotarget.2309. PMID: 25229838; PMCID: PMC4202163.
77. Xie P, Zhang M, He S, Lu K, Chen Y, Xing G, Lu Y, Liu P, Li Y, Wang S, Chai N, Wu J, Deng H, Wang HR, Cao Y, Zhao F, Cui Y, Wang J, He F, Zhang L. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis. *Nat Commun*. 2014 May 13;5:3733. doi: 10.1038/ncomms4733. PMID: 24821572.
78. Alza L, Nàger M, Visa A, Cantí C, Herreros J. FAK Inhibition Induces Glioblastoma Cell Senescence-Like State through p62 and p27. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 27;12(5):1086. doi: 10.3390/cancers12051086. PMID: 32349327; PMCID: PMC7281094.
79. Borriello A, Caldarelli I, Bencivenga D, Criscuolo M, Cucciolla V, Tramontano A, Oliva A, Perrotta S, Della Ragione F. p57(Kip2) and cancer: time for a critical appraisal. *Mol Cancer Res*. 2011 Oct;9(10):1269-84. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0220. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21816904.
80. Zhu G, Wang Z, Mijiti M, Du G, Li Y, Dangmurenjiafu G. MiR-28-5p promotes human glioblastoma cell growth through inactivation of FOXO1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 Aug 1;12(8):2972-2980. PMID: 31934134; PMCID: PMC6949703.
81. Z Zhao B, Gao C, Shi D, Mao J, Zhao J, Guo L, Guo J, Jiao Z. Knockdown of Nedd8-conjugating enzyme UBE2M suppresses the proliferation and induces the apoptosis of intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2019 Dec;42(6):2670-2679. doi: 10.3892/or.2019.7327. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31545502.

82. Tian DW, Wu ZL, Jiang LM, Gao J, Wu CL, Hu HL. Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8 promotes tumor progression and predicts poor prognosis of patients with bladder cancer. *Cancer Sci.* 2019 Jan;110(1):458-467. doi: 10.1111/cas.13865. Epub 2018 Dec 10. PMID: 30407690; PMCID: PMC6317957.
83. Levav-Cohen Y, Haupt S, Haupt Y. Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors.* 2005 Sep;23(3):183-92. doi: 10.1080/08977190500196218. PMID: 16243710.
84. Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda T, Sugimura H, Kamijo T, Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 2005 Jan 12;24(1):160-9. doi: 10.1038/sj.emboj.7600486. Epub 2004 Dec 2. PMID: 15577944; PMCID: PMC544902.
85. Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sørensen TS, La Thangue NB, Kouzarides T. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature.* 1995 Jun 22;375(6533):691-4. doi: 10.1038/375691a0. PMID: 7791903.
86. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998 Aug 1;26(15):3453-9. doi: 10.1093/nar/26.15.3453. PMID: 9671804; PMCID: PMC147746.
87. Xie P, Peng Z, Chen Y, Li H, Du M, Tan Y, Zhang X, Lu Z, Cui CP, Liu CH, He F, Zhang L. Neddylation of PTEN regulates its nuclear import and promotes tumor development. *Cell Res.* 2021 Mar;31(3):291-311. doi: 10.1038/s41422-020-00443-z. Epub 2020 Dec 9. Erratum in: *Cell Res.* 2021 Jan 29;: PMID: 33299139; PMCID: PMC8027835.
88. Lin HP, Cheng ZL, He RY, Song L, Tian MX, Zhou LS, Groh BS, Liu WR, Ji MB, Ding C, Shi YH, Guan KL, Ye D, Xiong Y. Destabilization of Fatty Acid Synthase by Acetylation Inhibits De Novo Lipogenesis and Tumor Cell Growth. *Cancer Res.* 2016 Dec 1;76(23):6924-6936. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1597. Epub 2016 Oct 10. PMID: 27758890; PMCID: PMC5135623.
89. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):763-77. doi: 10.1038/nrc2222. PMID: 17882277.
90. Gu Y, Kaufman JL, Bernal L, Torre C, Matulis SM, Harvey RD, Chen J, Sun SY, Boise LH, Lonial S. MLN4924, an NAE inhibitor, suppresses AKT and mTOR signaling via upregulation of REDD1 in human myeloma cells. *Blood.* 2014 May 22;123(21):3269-76. doi: 10.1182/blood-2013-08-521914. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24713927; PMCID: PMC4046434.
91. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 2005 Apr 18;24(17):2899-908. doi: 10.1038/sj.onc.1208615. PMID: 15838523.
92. Forte IM, Indovina P, Iannuzzi CA, Cirillo D, Di Marzo D, Barone D, Capone F, Pentimalli F, Giordano A. Targeted therapy based on p53 reactivation reduces both glioblastoma cell growth and resistance to temozolomide. *Int J Oncol.* 2019 Jun;54(6):2189-2199. doi: 10.3892/ijo.2019.4788. Epub 2019 Apr 16. PMID: 31081046.
93. Abida WM, Nikolaev A, Zhao W, Zhang W, Gu W. FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2007 Jan 19;282(3):1797-804. doi: 10.1074/jbc.M609001200. Epub 2006 Nov 9. PMID: 17098746; PMCID: PMC3690493.
94. Lan H, Tang Z, Jin H, Sun Y. Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses growth and migration of human gastric cancer cells. *Sci Rep.* 2016 Apr 11;6:24218. doi: 10.1038/srep24218. PMID: 27063292; PMCID: PMC4827092.
95. Dehan E, Bassermann F, Guardavaccaro D, Vasiliver-Shamis G, Cohen M, Lowes KN, Dustin M, Huang DC, Taunton J, Pagano M. betaTrCP- and Rsk1/2-mediated degradation of BimEL inhibits apoptosis. *Mol Cell.* 2009 Jan 16;33(1):109-16. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.020. PMID: 19150432; PMCID: PMC2655121.
96. Jana A, Krett NL, Guzman G, Khalid A, Ozden O, Staudacher JJ, Bauer J, Baik SH, Carroll T, Yazici C, Jung B. NFkB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of

PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):37377-37393. doi: 10.18632/oncotarget.16343. PMID: 28418896; PMCID: PMC5514916.

97. Kim EM, Jung CH, Kim J, Hwang SG, Park JK, Um HD. The p53/p21 Complex Regulates Cancer Cell Invasion and Apoptosis by Targeting Bcl-2 Family Proteins. *Cancer Res*. 2017 Jun 1;77(11):3092-3100. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2098. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28377455.

98. Shi CS, Kuo KL, Lin WC, Chen MS, Liu SH, Liao SM, Hsu CH, Chang YW, Chang HC, Huang KH. Neddylation inhibitor, MLN4924 suppresses angiogenesis in huvecs and solid cancers: *in vitro* and *in vivo* study. *Am J Cancer Res*. 2020 Mar 1;10(3):953-964. PMID: 32266102; PMCID: PMC7136913.

99. Yao WT, Wu JF, Yu GY, Wang R, Wang K, Li LH, Chen P, Jiang YN, Cheng H, Lee HW, Yu J, Qi H, Yu XJ, Wang P, Chu YW, Yang M, Hua ZC, Ying HQ, Hoffman RM, Jeong LS, Jia LJ. Suppression of tumor angiogenesis by targeting the protein neddylation pathway. *Cell Death Dis*. 2014 Feb 13;5(2):e1059. doi: 10.1038/cddis.2014.21. PMID: 24525735; PMCID: PMC3944239.

100. Liu X, Jiang Y, Wu J, Zhang W, Liang Y, Jia L, Yu J, Jeong LS, Li L. NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924 (Pevonedistat) induces NOXA-dependent apoptosis through up-regulation of ATF-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jun 17;488(1):1-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.122. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28450112.

101. Chen X, Zeng K, Xu M, Liu X, Hu X, Xu T, He B, Pan Y, Sun H, Wang S. P53-induced miR-1249 inhibits tumor growth, metastasis, and angiogenesis by targeting VEGFA and HMGA2. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 12;10(2):131. doi: 10.1038/s41419-018-1188-3. PMID: 30755600; PMCID: PMC6372610.

102. Yu X, Wang M, Zuo J, Wahafu A, Mao P, Li R, Wu W, Xie W, Wang J. Nuclear factor I A promotes temozolomide resistance in glioblastoma via activation of nuclear factor κB pathway. *Life Sci*. 2019 Nov 1;236:116917. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116917. Epub 2019 Oct 12. PMID: 31614149.

103. Jackson S, Xiong Y. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci*. 2009 Nov;34(11):562-70. doi: 10.1016/j.tibs.2009.07.002. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19818632; PMCID: PMC2783741.

104. Aasland D, Götzinger L, Hauck L, Berte N, Meyer J, Effenberger M, Schneider S, Reuber EE, Roos WP, Tomicic MT, Kaina B, Christmann M. Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR-CHK1, p21, and NF-κB. *Cancer Res*. 2019 Jan 1;79(1):99-113. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1733. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30361254.

105. Rohrberg J, Van de Mark D, Amouzgar M, Lee JV, Taileb M, Corella A, Kilinc S, Williams J, Jokisch ML, Camarda R, Balakrishnan S, Shankar R, Zhou A, Chang AN, Chen B, Rugo HS, Dumont S, Goga A. MYC Dysregulates Mitosis, Revealing Cancer Vulnerabilities. *Cell Rep*. 2020 Mar 10;30(10):3368-3382.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.041. PMID: 32160543; PMCID: PMC7085414.

106. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 1;49(11):1603-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20840865; PMCID: PMC2990475.

107. Hua W, Li C, Yang Z, Li L, Jiang Y, Yu G, Zhu W, Liu Z, Duan S, Chu Y, Yang M, Zhang Y, Mao Y, Jia L. Suppression of glioblastoma by targeting the overactivated protein neddylation pathway. *Neuro Oncol*. 2015 Oct;17(10):1333-43. doi: 10.1093/neuonc/nov066. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25904638; PMCID: PMC4578582.

108. Zhou S, Zhao X, Yang Z, Yang R, Chen C, Zhao K, Wang W, Ma Y, Zhang Q, Wang X. Neddylation inhibition upregulates PD-L1 expression and enhances the efficacy of immune checkpoint blockade in glioblastoma. *Int J Cancer*. 2019 Aug 1;145(3):763-774. doi: 10.1002/ijc.32379. Epub 2019 May 14. PMID: 31044422.

109. Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, Milhollen MA, Yang X, Burkhardt AL, Ma J, Loke HK, Lingaraj T, Wu D, Hamman KB, Spelman JJ, Cullis CA,

- Langston SP, Vyskocil S, Sells TB, Mallender WD, Visiers I, Li P, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Dick LR. Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell*. 2010 Jan 15;37(1):102-11. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.024. PMID: 20129059.
110. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, Cullis CA, Doucette A, Garnsey JJ, Gaulin JL, Gershman RE, Lublinsky AR, McDonald A, Mizutani H, Narayanan U, Olhava EJ, Peluso S, Rezaei M, Sintchak MD, Talreja T, Thomas MP, Traore T, Vyskocil S, Weatherhead GS, Yu J, Zhang J, Dick LR, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Langston SP. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):732-6. doi: 10.1038/nature07884. PMID: 19360080.
111. Swords RT, Kelly KR, Smith PG, Garnsey JJ, Mahalingam D, Medina E, Oberheu K, Padmanabhan S, O'Dwyer M, Nawrocki ST, Giles FJ, Carew JS. Inhibition of NEDD8-activating enzyme: a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3796-800. doi: 10.1182/blood-2009-11-254862. Epub 2010 Mar 4. PMID: 20203261.
112. Mathews CK. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J*. 2006 Jul;20(9):1300-14. doi: 10.1096/fj.06-5730rev. PMID: 16816105.
113. Jiang K, Zhi T, Xu W, Xu X, Wu W, Yu T, Nie E, Zhou X, Bao Z, Jin X, Zhang J, Wang Y, Liu N. MicroRNA-1468-5p inhibits glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting RRM1. *Am J Cancer Res*. 2017 Apr 1;7(4):784-800. PMID: 28469953; PMCID: PMC5411788.
114. Fang Z, Song R, Gong C, Zhang X, Ren G, Li J, Chen Y, Qiu L, Mei L, Zhang R, Xiang X, Chen X, Shao J. Ribonucleotide reductase large subunit M1 plays a different role in the invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma and undifferentiated thyroid carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Mar;37(3):3515-26. doi: 10.1007/s13277-015-4175-7. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453115.
115. Wang Q, Liu X, Zhou J, Huang Y, Zhang S, Shen J, Loera S, Yuan X, Chen W, Jin M, Shibata S, Liu Y, Chu P, Wang L, Yen Y. Ribonucleotide reductase large subunit M1 predicts poor survival due to modulation of proliferative and invasive ability of gastric cancer. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e70191. doi: 10.1371/journal.pone.0070191. PMID: 23922955; PMCID: PMC3726373.
116. He Z, Hu X, Liu W, Dorrance A, Garzon R, Houghton PJ, Shen C. P53 suppresses ribonucleotide reductase via inhibiting mTORC1. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):41422-41431. doi: 10.18632/oncotarget.17440. PMID: 28507282; PMCID: PMC5522210.
117. 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 May 31;7(22):33440-50. doi: 10.18632/oncotarget.7961. PMID: 26967052; PMCID: PMC5078108.
118. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):424-30. doi: 10.1038/nature04869. PMID: 16724053.
119. Ryskalin L, Biagioni F, Lenzi P, Frati A, Fornai F. mTOR Modulates Intercellular Signals for Enlargement and Infiltration in Glioblastoma Multiforme. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 2;12(9):2486. doi: 10.3390/cancers12092486. PMID: 32887296; PMCID: PMC7564864.
120. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1926-33. doi: 10.1200/JCO.2004.07.193. PMID: 15143086.
121. Yuan Z, Yang Z, Li W, Wu A, Su Z, Jiang B. Exosome-Mediated Transfer of Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Temozolomide Resistance by miR-519a-3p/RRM1 Axis in Glioblastoma. *Cancer Biother Radiopharm*. 2020 Jul 24. doi: 10.1089/cbr.2019.3499. Epub ahead of print. PMID: 32721218.
122. Shao J, Liu X, Zhu L, Yen Y. Targeting ribonucleotide reductase for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Dec;17(12):1423-37. doi: 10.1517/14728222.2013.840293. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24083455.



123. Jørgensen CL, Ejlersen B, Bjerre KD, Balslev E, Nielsen DL, Nielsen KV. Gene aberrations of RRM1 and RRM2B and outcome of advanced breast cancer after treatment with docetaxel with or without gemcitabine. *BMC Cancer*. 2013 Nov 12;13:541. doi: 10.1186/1471-2407-13-541. PMID: 24215511; PMCID: PMC3840598.
124. Wang J, Lohman GJ, Stubbe J. Enhanced subunit interactions with gemcitabine-5'-diphosphate inhibit ribonucleotide reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 4;104(36):14324-9. doi: 10.1073/pnas.0706803104. Epub 2007 Aug 28. PMID: 17726094; PMCID: PMC1964847.
125. Aye Y, Stubbe J. Clofarabine 5'-di and -triphosphates inhibit human ribonucleotide reductase by altering the quaternary structure of its large subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 14;108(24):9815-20. doi: 10.1073/pnas.1013274108. Epub 2011 May 31. PMID: 21628579; PMCID: PMC3116410.
126. Ariey-Bonnet J, Berges R, Montero MP, Mouysset B, Piris P, Muller K, Pinna G, Failes TW, Arndt GM, Morando P, Baeza-Kallee N, Colin C, Chinot O, Braguer D, Morelli X, André N, Carré M, Tabouret E, Figarella-Branger D, Le Grand M, Pasquier E. Combination drug screen targeting glioblastoma core vulnerabilities reveals pharmacological synergisms. *EBioMedicine*. 2023 Sep;95:104752. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104752. Epub 2023 Aug 10. PMID: 37572644; PMCID: PMC10433015.
127. Sigmond J, Honeywell RJ, Postma TJ, Dirven CM, de Lange SM, van der Born K, Laan AC, Baayen JC, Van Groeningen CJ, Bergman AM, Giaccone G, Peters GJ. Gemcitabine uptake in glioblastoma multiforme: potential as a radiosensitizer. *Ann Oncol*. 2009 Jan;20(1):182-7. doi: 10.1093/annonc/mdn543. Epub 2008 Aug 12. PMID: 18701427.
128. Dumitru CA, Weller M, Gulbins E. Ceramide metabolism determines glioma cell resistance to chemotherapy. *J Cell Physiol*. 2009 Dec;221(3):688-95. doi: 10.1002/jcp.21907. PMID: 19711353.
129. Barbier-Torres L, Delgado TC, García-Rodríguez JL, Zubiete-Franco I, Fernández-Ramos D, Buqué X, Cano A, Gutiérrez-de Juan V, Fernández-Domínguez I, Lopitz-Otsoa F, Fernández-Tussy P, Boix L, Bruix J, Villa E, Castro A, Lu SC, Aspichueta P, Xirodimas D, Varela-Rey M, Mato JM, Beraza N, Martínez-Chantar ML. Stabilization of LKB1 and Akt by neddylation regulates energy metabolism in liver cancer. *Oncotarget*. 2015 Feb 10;6(4):2509-23. doi: 10.18632/oncotarget.3191. PMID: 25650664; PMCID: PMC4385867.
130. Gautam A, Li ZR, Bepler G. RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene*. 2003 Apr 10;22(14):2135-42. doi: 10.1038/sj.onc.1206232. PMID: 12687015.
131. Feng Z, Levine AJ. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol*. 2010 Jul;20(7):427-34. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.004. PMID: 20399660; PMCID: PMC2921989.

## **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 NEDD8 und RRM1 in Gliomen

im der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. I. E. Sandalcioglu

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.