

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

Biomarker in primären Glioblastomen und
Gliomen: prognostische Relevanz von
AGTRAP, ALKBH3 und Diversin

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 Nikolas Walter

aus Berlin

Magdeburg 2024

Meinem Vater gewidmet, der im Alter von 54 Jahren an einem Glioblastom verstarb.
(Der Name meines Vaters ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten)

Bibliographische Beschreibung:

Walter, Nikolas:

Biomarker in primären Glioblastomen und Gliomen: prognostische Relevanz von AGTRAP, ALKBH3 und Diversin. - 2024. - 48 Bl., 14 Abb., 22 Tab.

Kurzreferat

Ziel der Studie war es, neue Proteine als prognostische Biomarker in primären Glioblastomen und Gliomen zu identifizieren. Dafür wurden die Proteine AGTRAP, ALKBH3 und Diversin immunhistochemisch in WHO II-III Gliomgewebe und Glioblastomgewebe angefärbt und analysiert. Das Gewebe stammt von einer Kohorte von 233 Patient*innen, die am Universitätsklinikum Magdeburg operiert wurden. Die Proteine AGTRAP und ALKBH3 stellten sich dabei als mögliche prognostisch relevante Biomarker heraus. Mittels Literaturrecherche konnten Hypothesen über die Wirkweisen der drei Proteine in diesen Tumorarten aufgestellt werden, die als Basis für weiterführende Studien dienen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 GLIOME.....	1
1.2 DAS GLIOBLASTOM.....	1
1.2.1 EPIDEMIOLOGIE.....	2
1.2.2 ÄTIOLOGIE UND TUMORGENESE.....	2
1.2.3 DIAGNOSTIK.....	2
1.2.4 KLINISCH-PROGNOSTISCHE FAKTOREN (ALTER, KARNOFSKY INDEX, TUMORRESEKTION, THERAPIE, MGMT-STATUS).....	4
1.3 BIOMARKER BEI GLIOBLASTOMEN.....	5
1.3.1 AGTRAP.....	5
1.3.2 ALKBH3.....	6
2. MATERIAL UND METHODIK.....	9
2.1 STUDIENAUFBAU	9
2.2 MATERIALIEN MIT HERSTELLER	11
TAB. 5. ANTIKÖRPER.....	12
2.3 HERSTELLUNG DER TMA S.....	13
2.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.....	13
2.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE	15
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	17
3. ERGEBNISSE	19
3.1 AGTRAP: EXPRESSION IN GESUNDEM VERSUS TUMORGEWEBE.....	19
3.2 AGTRAP: UNIVARIATANALYSE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN.....	20
3.3 AGTRAP: UNIVARIATANALYSE DES REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN	21
3.4 AGTRAP: BIVARIATE KORRELATIONSANALYSE MIT TUMORPARAMETERN BEI GLIOMPATIENT*INNEN	22
3.5 AGTRAP: MULTIVARIATANALYSE DES GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOBLASTOMPATIENT*INNEN.....	23
3.6 ALKBH3: EXPRESSION IN GESUNDEM VERSUS TUMORGEWEBE	24
3.7 ALKBH3: UNIVARIATANALYSE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN.....	25
3.8 ALKBH3: UNIVARIATANALYSE DES REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN	26
3.9 ALKBH3: BIVARIATE KORRELATIONSANALYSE MIT TUMORPARAMETERN BEI GLIOMPATIENT*INNEN	27
3.10 ALKBH3: MULTIVARIATANALYSE DES GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOBLASTOMPATIENT*INNEN.....	28
3.11 DIVERSIN: EXPRESSION IN GESUNDEM VERSUS TUMORGEWEBE	29
3.12 DIVERSIN: UNIVARIATANALYSE DES GESAMTÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN.....	30
3.13 DIVERSIN: UNIVARIATANALYSE DES REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOMPATIENT*INNEN	31
3.14 DIVERSIN: BIVARIATE KORRELATIONSANALYSE MIT TUMORPARAMETERN BEI GLIOMPATIENT*INNEN	32
3.15 AGTRAP/ALKBH3: UNIVARIATANALYSE DES GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOBLASTOMPATIENT*INNEN	33

3.16 AGTRAP/ALKBH3: MULTIVARIATANALYSE DES GESAMT- UND REZIDIV-FREIEN ÜBERLEBENS BEI GLIOBLASTOMPATIENT*INNEN.....	35
4. DISKUSSION.....	36
4.1 MATERIAL UND METHODIK.....	36
4.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND DATENERHEBUNG.....	36
4.1.2 TMA UND IMMUNHISTOCHEMIE.....	37
4.2 AGTRAP.....	38
4.3 ALKBH3.....	41
4.4 DIVERSIN.....	43
4.5 AGTRAP/ALKBH3.....	46
4.6 FAZIT UND AUSBLICK.....	47
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	48

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
1meA	1 methyliertes Adenin
3meC	3 methyliertes Cytosin
AGTRAP	Angiotensin II Receptor-Associated Protein
ALKBH3	AlkB Homolog 3
ASSC	Activating Signal Co-integrator Complex
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
BRAF	Proto-Oncogene B-Raf
CBTRUS	The Central Brain Tumor Registry of the US
CGM	CompuGroup Medical SE & Co. KGaA
COL1A1/COL1A2	Kollagen 1A1/1A2
DAB	3,3'-Diaminodbenzidine
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dvl	Dishevelled
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
F(ab)2-Teil	Fragment Antigen Binding
F(c)-Teil	Fragment Crystalline
GBM	Glioblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MET	MET Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD ⁺ bzw. NADH ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid

NCD	Noncommunicable Diseases
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer
PBX3	Pre-B Cell Leukemia Homeobox 3
PCA-1	Prostate Cancer Antigen-1
PCP	Planar Cell Polarity
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RONS	Reactive Oxide and Nitrogen Species
SCCC	Plattenepithelkarzinome der Zervix
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBS	Tris-Buffered Saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TMA	Tissue Microarray
TMZ	Temozolomid
TTF	Tumor-Treating-Fields
USF1	Upstream Stimulatory Factor 1
WHO	World Health Organization
WNT	Zusammensetzung aus Wg für Wingless und Int-1

1. Einleitung

1.1 Gliome

Gliome sind eine heterogene Gruppe von hirneigenen Tumoren. Die Klassifikation der Gliome erfolgt anhand der WHO Klassifikation für Tumore des Zentralen Nervensystems und wird fortlaufend angepasst. Die Gliome können nach Art der Gliazellen (Astrozytom, Oligodendrogliom, Ependymom, Mischgliome) und ihrer Malignität (WHO Grad I-IV bzw. 1-4) eingeteilt werden. In der neuesten Version der WHO Klassifikation wurde die romanische Bezifferung durch die arabische ersetzt (1). Die vorliegende Arbeit nutzt noch die alte, romanische Bezifferung. Während WHO Grad I Gliome insbesondere bei Kindern vorkommen und kurativ behandelt werden können, sind WHO Grad II-IV Gliome durch diffuses Wachstum charakterisiert und können nach heutigem Stand nur palliativ behandelt werden. Allgemein erfolgt nach einer Bildgebung eine Operation und histo- sowie molekularpathologische Untersuchung des Gewebes, dem sich je nach Befund eine Strahlen- und/oder Chemotherapie anschließt (2–4). In der vorliegenden Studie wurden lediglich Gewebe von Gliomen WHO Grad II-IV untersucht mit Schwerpunkt auf primären Glioblastomen, die den Großteil der untersuchten Gewebe ausmachen. Das Glioblastom wird im Folgenden ausführlicher beschrieben. Aufgrund des Zeitpunktes der Datenerhebung wird als Einteilung der in der Studie eingeschlossenen Gewebe die WHO Klassifikation von 2016 benutzt.

1.2 Das Glioblastom

Das Glioblastom ist der häufigste maligne Tumor im zentralen Nervensystem. Es erkranken primär Menschen im älteren Erwachsenenalter (1,5). Das Glioblastom wird aufgrund seiner infausten Prognose als Gliom WHO Grad IV klassifiziert und die Diagnose wird anhand der Histologie und Molekularpathologie des Tumorgewebes gestellt (1,6). Die Symptomatik, körperliche Untersuchung sowie MRT Bildgebung liefern wichtige Hinweise für die Diagnose, aber auch Therapiemöglichkeiten und Outcome (6). In der Therapie ist eine größtmögliche Resektion mit anschließender Radiochemotherapie nach dem Stupp Protokoll Standard (6,7).

1.2.1 Epidemiologie

Das Glioblastom ist mit einem Anteil von 48,3 % der häufigste maligne Tumor des Zentralen Nervensystems. Die Erkrankung tritt üblicherweise im Alter von 60 bis 70 Jahren auf und betrifft am häufigsten die männliche, weiße Bevölkerung (5). Überwiegend tritt das Glioblastom supratentoriell im Gehirn auf, selten im Kleinhirn, Hirnstamm oder Rückenmark. Dort kann es alle Hirnlappen betreffen, am häufigsten den Frontallappen (8). Auch eine bihemispherielle Manifestation ist möglich (8,9).

1.2.2 Ätiologie und Tumorgenese

Wie viele andere Krebsarten auch scheint das Glioblastom eher sporadisch aufzutreten. Lediglich die Exposition mit ionisierender Strahlung und seltene genetischen Erkrankungen (Neurofibromatose Typ I, Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom) gehen mit einem erhöhten Gliom bzw. Glioblastom Risiko einher (10,11). Der Ursprung und die Genese von Glioblastomen ist nicht gänzlich geklärt. Als Ursprungszellen werden sogenannte Glioblastom-Stammzellen angenommen, die sich aus mutierten neuralen Stammzellen entwickeln (12,13). Glioblastome können sekundär aus niedriggradigeren WHO II oder III Gliomen bzw. Astrozytomen oder primär ohne Vorstufen entstehen (14,15). Primäre Glioblastome weisen eine schlechtere Prognose und ein anderes molekularpathologisches Profil auf als sekundäre Glioblastome (15). In dieser Studie wurden nur primäre Glioblastome untersucht.

1.2.3 Diagnostik

Zur Diagnostik eines Gehirntumors ist die MRT Untersuchung Goldstandard (3). Das Glioblastom zeigt sich im MRT Bild meist als solitäre, randständig Kontrastmittel aufnehmende und von einem perifokalen Ödem umgebene Masse mit zentralen Nekrosen (25). Die Bildgebung kann den Verdacht zwar erhärten, das Glioblastom kann jedoch lediglich anhand der histomolekularen Untersuchung des Tumorgewebes diagnostiziert werden (1,6). Die Gewebeentnahme kann dabei durch eine offene Operation oder Biopsie erfolgen (6). Die Biopsie wird allgemein bei zu hohem Operationsrisiko, insbesondere bei hohem Alter, reduziertem Allgemeinzustand oder

Lage des Tumors in funktionell relevanten Hirngebieten eingesetzt. Die Entscheidung zwischen Biopsie oder Operation ist letztlich immer individuell zu treffen (6,16).

Wie bereits oben erwähnt, hängt die Einordnung eines Gliomgewebes als Glioblastom von der Histologie und Molekulargenetik des Tumors ab (1,17). Gliomgewebe zeigt typische Merkmale wie Hyperzellularität, nukleäre Atypien und Mitosen (18). Glioblastomgewebe weist zusätzlich Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferate auf. In Kombination mit einem IDH Wildtyp ist dies für die Diagnose Glioblastom ausreichend (6). Jedoch zeigten ein Auftreten von EGFR Amplifikation, Veränderungen des siebten und zehnten Chromosoms (+7/-10) oder TERT Promotermutationen in Gliomen einen ähnlich schlechten klinischen Verlauf wie IDH Wildtyp Glioblastome (19). In der neuen Klassifikation werden Gliome mit einem dieser molekulargenetischen Merkmale daher ebenfalls als Glioblastom eingeordnet, auch wenn in der Histologie Nekrosen oder mikrovaskuläre Proliferate fehlen (1). Die zuvor als IDH mutiertes Glioblastom bezeichnete Gruppe wird neuerdings als IDH mutiertes Astrozytom WHO Grad 4 bezeichnet, da diese sich unter anderem klinisch und molekularpathologisch vom IDH Wildtyp Glioblastom unterscheiden (1,20). Für die Diagnose des Glioblastoms muss also IDH als Wildtyp vorliegen. Die vorliegende Studie nutzt jedoch Daten, die noch die alte Klassifikation nutzten, in der IDH mutierte Glioblastome noch als Glioblastome eingeordnet wurden (17). Daher sind die IDH mutierten Glioblastome in dieser Studie miteinbezogen worden, wobei deren Anteil mit 5,6 % sehr gering ist.

Im Folgenden werden die bereits oben erwähnten und für die Diagnostik wichtigen molekularen Veränderungen des Glioblastoms dargestellt.

Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu Alpha Ketoglutarat, wobei NAD bzw. NADH zu NADP bzw. NADPH reduziert wird, die u.a. wichtig für die Eliminierung freier Sauerstoff Radikale sind (IDH1 ist im Zytoplasma und Peroxisomen lokalisiert, IDH2 ist in Mitochondrien lokalisiert) (21). IDH Mutationen kommen bei Gliomen jeden Grades vor und sind prognostisch günstig (5). Wie oben beschrieben gilt eine IDH Mutation nach neuestem Stand als Ausschlusskriterium in der Glioblastom Diagnostik (1).

Der Epidermal Growth Factor Receptor ist ein Wachstumsfaktor Rezeptor mit Tyrosin Kinase Aktivität, der in antiapoptotischen und proliferativen Signalwegen beteiligt ist (22). Einige primäre Glioblastome zeigen Amplifikationen des EGFR Gens (23).

Die Telomerase Reverse Transkriptase ist ein Subkomplex des Ribonucleoproteins Telomerase. Diese weist eine erhöhte Aktivität in einem Großteil der Gliome auf (24). Die erhöhte Aktivität ist bei Glioblastomen vor allem auf Mutationen im TERT Promoter zurückzuführen (25). Die Telomerase führt über Verlängerung der Chromosomenenden (Telomere) zur Immortalisierung der Krebszelle und spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese (26).

Typisch für Glioblastome sind außerdem Verluste bzw. eine Monosomie des zehnten Chromosoms und Zugewinne bzw. eine Trisomie des siebten Chromosoms (19). Sie enthalten Gene, die in der Glioblastomentstehung eine wichtige Rolle spielen. Zum Beispiel findet sich auf Chromosom 10 das Gen für den Tumorsuppressor PTEN und auf Chromosom 7 die Onkogene EGFR, BRAF und MET (21).

1.2.4 Klinisch-Prognostische Faktoren (Alter, Karnofsky Index, Tumorresektion, Therapie, MGMT-Status)

Im Folgenden werden die wichtigsten prognostischen Faktoren der Glioblastombehandlung erläutert, die auch in dieser Studie zur Evaluierung der prognostischen Aussagekraft der betrachteten Biomarker hinzugezogen wurden. Der IDH Mutationsstatus wurde bereits oben in Kapitel 1.2.3. erklärt.

Erkrankungsalter: Erhöhtes Alter geht bekanntlich mit verminderter Resilienz und erhöhter Morbidität einher und stellt einen negativen prognostischen Faktor dar (27).

Karnofsky Index: Nach Abschluss der klinischen Untersuchung sollte der Karnofsky Performance Index (KPI) festgestellt werden (6). Dieser schätzt die durch die Symptomatik der Erkrankung verursachte Einschränkung des Alltags und Beanspruchung von Hilfe ein. Er wurde erstmals 1948 durch Karnofsky et al. beschrieben (28). Obwohl er durch die Ärzt*innen subjektiv eingeschätzt wird, stellt der KPI einen unabhängigen prognostischen Wert für das Outcome der Glioblastompatient*innen dar (29).

Tumorresektion: Bei der offenen Operation wirkt sich das Ausmaß der Tumorresektion prognostisch günstig auf das Gesamt- und Rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben aus (30,31). Das Resektionsausmaß ist dabei abhängig von der Lokalisation und Tumorgöße (32). Aufgrund der infiltrierenden Art des Tumors ist eine kurative Totalresektion nach aktuellem Stand nicht möglich (33). Daher wird eine größtmögliche Tumorresektion bei geringstmöglicher Entnahme intakten

Gehirnmaterials angestrebt (6,34). Zur Einschätzung des Resektionsausmaßes erfolgt eine möglichst frühzeitige postoperative MRT Kontrolle (35).

Therapie: Nach Entnahme des Tumorgewebes und histomolekularpathologischen Nachweises eines Glioblastoms ist eine kombinierte Radiochemotherapie nach Stupp Protokoll Standard und ist einer alleinigen Radiotherapie überlegen (36). Dabei wird der Tumor mit einer Gesamtdosis von 60 Gy verteilt über 6 Wochen mit 2 Gy pro Tag an fünf Tagen pro Woche von extern bestrahlt. Begleitend wird täglich 75 mg Temozolomid (TMZ) pro Quadratmeter Körperoberfläche oral eingenommen. Der kombinierten Radiochemotherapie folgt eine Erhaltungsdosis von 150-200 mg TMZ pro Quadratmeter Körperoberfläche an 5 Tagen eines 28 Tage Zyklus. Dies wird bis zu sechsmal wiederholt (6,36). Bei älteren Patient*innen mit reduziertem Allgemeinzustand zeigte sich eine hypofraktionierte Bestrahlung als gute Alternative (37).

MGMT-Status: TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, das DNA methyliert und zu DNA Strangbrüchen führt. Diese sind zytotoxisch und wirken vor allem in schnell proliferierenden Zellverbänden, wie zum Beispiel in Glioblastomen (38). Die Wirksamkeit von TMZ in der Glioblastomzelle ist wesentlich von der MGMT Promotormethylierung abhängig, die dazu führt, dass das DNA reparierende Enzym O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) verringert exprimiert wird (38,39). Die MGMT Promotormethylierung stellt so einen therapeutisch und prognostisch günstigen Faktor in der Glioblastom Behandlung dar und wird obligatorisch in der Gewebediagnostik mitbestimmt (6,40,41).

1.3 Biomarker bei Glioblastomen

Trotz intensiver Therapie ist ein Progress bzw. Rezidiv des Tumors sehr wahrscheinlich (42). Mit einer 5 Jahres Überlebensrate von lediglich 6,8 Prozent, ist das Glioblastom der tödlichste Hirntumor (5). Die Identifikation neuer prognostisch relevanter Biomarker kann dabei helfen, die Entstehung und Progression des Glioblastoms besser zu verstehen und es gezielter zu behandeln.

1.3.1 AGTRAP

Das Angiotensin II Type I Receptor associated Protein ist ein Transmembranprotein, das in der Zellmembran und in Membranen von intrazellulären Transportvesikeln

vorkommt. Es interagiert spezifisch mit dem C-terminalen Ende des Angiotensin II Typ I Rezeptor (43). AT1R ist ein G Protein gekoppelter Rezeptor und stellt einen von zwei Rezeptortypen dar, über die der Ligand Angiotensin II als Teil des RAAS wesentlich an der kardiovaskulären Regulation des Körpers beteiligt ist. Angiotensin II führt unter anderem über Vasokonstriktion und vermehrter Aldosteron Sekretion zu einer Blutdruckerhöhung (44). In physiologischem Zustand unterstützen Angiotensin II und AT1R zwar Herz Kreislauf System und Elektrolythaushalt, eine Überstimulation des Rezeptors führt jedoch unter anderem zu Bluthochdruck und kardialem Remodeling (45,46). Über die Internalisierung des Rezeptors und gezielter Dämpfung bestimmter durch AT1R ausgelösten Signalkaskaden scheint AGTRAP einer Überaktivierung des Rezeptors entgegenzuwirken, ohne jedoch dessen physiologische Wirkung zu beeinflussen (45). AGTRAP kommt insbesondere in Nieren-, Herz-, Pankreas- und Schilddrüsengewebe vor (47). Jedoch zeigen sich auch erhöhte mRNA Werte in Leukozyten, vor allem Monozyten und Granulozyten. Dabei korreliert die Menge an AGTRAP mRNA in Leukozyten positiv mit der inflammatorischen Aktivität bei chronischen, nicht übertragbaren Erkrankungen (NCDs) (48).

Es ist bekannt, dass entzündliche Prozesse eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung und -progression spielen (49). AT1R induziert verschiedene proinflammatorische und tumorfördernde Proteine (50). AT1R zeigt des Weiteren hohe Expressionen in verschiedenen Tumortypen auf, auch in höhergradigen Astrozytomen (51–53). Als eng mit AT1R verknüpft und den Rezeptor regulierendes Protein zeigt AGTRAP ebenfalls erhöhte Expressionen in bestimmten Tumoren wie dem Hepatozellulären Karzinom auf und ist dort mit einer schlechteren Prognose assoziiert (54). Seine Expression und sein möglicher prognostischer Wert in Glioblastomen wurde noch nicht untersucht und wird in der vorliegenden Arbeit behandelt.

1.3.2 ALKBH3

Alpha-Ketoglutarate Dependent Dioxygenase Homolog 3 (ALKBH3) oder Prostate Cancer Antigen-1 (PCA-1) ist ein DNA und RNA reparierendes Enzym, das die oxidative Demethylierung von N-alkyliertem Cytosin (3meC) und Adenin (1meA) katalysiert. Die Reaktion ist Eisen und Alpha-ketoglutarat abhängig, wobei Formaldehyd vom Substrat abgespalten wird, um Adenin bzw. Cytosin wiederherzustellen. Mit ALKBH1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 stellt ALKBH3 ein in Säugern vorkommendes Homolog zum Reparaturenzym Alkb dar, das in E. coli nachgewiesen

wurde (55). Sein engster Verwandter, ALKBH2, wirkt dabei vor allem an doppelsträngiger DNA, während ALKBH3 vor allem an einzelsträngiger DNA und RNA wirkt (56). Dango et al. zeigten auf, dass ALKBH3 zusammen mit dem Activating Signal Co-integrator complex (ASSC) interagiert, der als Helicase die doppelsträngige DNA entwindet und ALKBH3 so an einzelsträngiger DNA Alkylierungsschäden reparieren kann, wodurch die Lebenszeit und Proliferation der Zellen gefördert wird (57). Die Hauptsubstrate von ALKBH3, 3meC und 1meA, besitzen eine ausgeprägte zytotoxische Komponente (58). Solche oder ähnliche Alkylierungsschäden des Erbgutes entstehen als Teil des Zellmetabolismus endogen, aber können auch durch bestimmte Substanzen von exogen induziert werden (59). Das oben beschriebene TMZ stellt eine solche Substanz dar und ist fester Bestandteil in der Glioblastombehandlung (7). Eine Inaktivierung des Gens des Reparaturenzyms MGMT durch Promotormethylierung führt zu einer erhöhten Sensibilität des Tumors gegenüber TMZ und dessen induzierten Alkylierungsschäden und so zu einem längeren Gesamtüberleben der Patient*innen (60). Für den engsten Verwandten von ALKBH3, ALKBH2, konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden, dass es in Glioblastomen im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert ist und im Übrigen die Resistenz gegenüber TMZ erhöht (61). ALKBH3 könnte als Reparaturenzym möglicherweise ebenfalls in ähnlicher Weise die Tumorthherapie und Tumorprogression beeinflussen.

Die bisherige Literatur stellt unterschiedliche, von der Art des Tumors abhängige Ergebnisse der ALKBH3 Expressionen fest. Während bestimmte Tumorarten erhöhte ALKBH3 Protein bzw. mRNA Expressionen im Vergleich zu gesundem Gewebe aufweisen, zeigen andere eine verminderte Expression (62–65). Dies zeigt sich auch bei der Untersuchung der Assoziation der ALKBH3 Expression in verschiedenen Tumoren mit dem Gesamtüberleben der Patient*innen (63,65).

In der vorliegenden Arbeit soll nun die Proteinexpression von ALKBH3 in Glioblastomen untersucht werden und ein möglicher prognostischer Wert aufgezeigt werden.

1.3.3 Diversin

Diversin ist ein regulatorisches Protein im WNT Signalweg (66). Der WNT Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege der Zelle und spielt insbesondere in der

Embryogenese und Organentwicklung eine Rolle (67). Der WNT Signalweg teilt sich in verschiedene Unterwege auf, den klassischen WNT/Beta-Catenin Weg sowie Beta-Catenin unabhängige Kaskaden, u.a. den WNT/PCP und den WNT/Kalzium Signalweg (67). Der WNT/Beta-Catenin Signalweg führt über das Protein Dishevelled (Dvl) zur Deaktivierung des Beta-Catenin Abbaukomplexes (68). Beta-Catenin fällt dadurch vermehrt an und wirkt im Zellkern unter Zusammenwirken mit T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) als Transkriptionsfaktor (67). Diversin ist ein Protein mit acht N-terminalen Ankyrin Wiederholungen, das den WNT Signalweg auf zwei Wegen beeinflusst. Zum einen unterstützt das Protein den Beta-Catenin Abbaukomplex, indem es die Phosphorylierung von Beta-Catenin durch die Casein Kinase I Epsilon fördert, wodurch eine zweite Phosphorylierung durch die Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) ermöglicht wird. Das phosphorylierte Beta-Catenin wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (66). Dadurch nimmt Diversin Einfluss auf Entwicklungsvorgängen in Organismen, wie die „body axis formation“ in Zebrafischen (66). Zum anderen wirkt Diversin fördernd auf den WNT/PCP Weg, indem es in Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AF9 JNK-abhängige Genexpressionen aktiviert (69). Dies beeinflusst unter anderem die Gastrulation bzw. Embryogenese von Zebrafischen (66,70).

Als ein wichtiger Signalweg in Zell- und Organentwicklung ist der WNT Signalweg auch in der Tumorentwicklung und -progression beteiligt. Insbesondere in Kolorektalen Karzinomen zeigte sich, dass ein Verlust des Adenomatous-polyposis-coli Proteins, ein weiterer Teil des Beta-Catenin Abbaukomplexes, zu einer Akkumulation von Beta-Catenin führt und wesentlich zu Zellproliferation und Tumorgenese beiträgt (71). Pulvirenti et al. zeigten die Bedeutung des WNT Signalwegs für die proliferativen Eigenschaften in Gliomen auf. Beispielsweise zeigte das Protein Dishevelled 2, Teil des WNT Signalwegs, eine Überexpression in Gliomen. Des Weiteren führte eine Blockierung von Dishevelled 2 bzw. Beta-Catenin in Gliomzellen zu verminderter Proliferation (72)

Diversin könnte als ein WNT Signalweg beeinflussendes Protein ebenfalls einen Einfluss auf die Progression von Tumoren bzw. Glioblastomen haben. Die Ergebnisse von Yu X. et al. weisen bereits auf solch eine Rolle von Diversin in Brustkrebs hin (73). In der vorliegenden Arbeit wird daher die Expression von Diversin und sein möglicher prognostischer Wert in Glioblastomen betrachtet.

2. Material und Methodik

2.1 Studienaufbau

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine in Tumorgewebe angefärbt, welches von Patient*innen mit supratentoriell diffus infiltrierenden Hirntumoren (Gliome) stammt. Ihr Farb- bzw. Expressionsverhalten wurde anschließend mit retrospektiv gewonnenen, krankheitsrelevanten Merkmalen der Patient*innen verglichen und auf eine mögliche Assoziation hin analysiert.

Dafür wurden mittels der CGM Medico Datenbank des Universitätsklinikums Magdeburg 263 geeignete Patient*innen ermittelt, die zwischen 2005 und 2018 am Universitätsklinikum operiert wurden. Die Kohorte enthält lediglich Primären, die histopathologisch diagnostiziert und nach ICD klassifiziert wurden. Neben 233 Glioblastomen (WHO IV) wurden zur Gegenüberstellung n=62 Proben mit gesundem Gehirngewebe und n=11 bzw. n=19 niedriggradige WHO II bzw. WHO III Gliome in die Studie miteinbezogen. Das gesunde Gehirngewebe war den Tumoren anliegendes Gewebe, das während der Operation mitentnommen wurde und mikroskopisch als nicht-tumorös identifiziert werden konnte. Das mediane Erkrankungsalter der Patient*innen betrug für WHO II 43 Jahre, für WHO III 49 Jahre und für WHO IV 64 Jahre.

Krankheitsrelevante Merkmale der Patient*innen wie Todeszeitpunkt, Rezidive, die erhaltene Therapie, Resektionsstatus, Karnofsky-Index, MGMT-Methylierung sowie IDH Mutationsstatus wurden ebenfalls mithilfe der CGM Medico Datenbank gesammelt und ausschnittsweise vergleichend in Tabelle 1 dargestellt. Zusätzlich wurden zur Auffindung fehlender Daten die behandelnden Hausärzte, Kliniken und/oder das Krebsregister Sachsen-Anhalt hinzugezogen. Außerdem musste der MGMT Methylierungsstatus einzelner Tumore im Labor nachbestimmt werden, da dieser im ursprünglichen Pathologiebefund nicht erwähnt wurde.

Die Proteine AGTRAP, ALKBH3 und Diversin wurden in den Proben mittels immunhistochemischer Färbung dargestellt. Anschließend wurde analysiert, ob ihr Expressionsverhalten mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sein könnte.

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

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

CTX = Chemotherapie RTX = Radiotherapie RCTX = Radiochemotherapie n.d. = not determinable
Tab. 1. Charakteristika des Patientenkollektivs

2.2 Materialien mit Hersteller

Anmerkung zum Urheberrecht: Erwähnte Markennamen unterliegen dem Urheberrecht der jeweiligen Unternehmen. Diese sind jedoch nicht Herausgeber der vorliegenden Studie noch dafür presserechtlich verantwortlich. Eingetragene Markennamen wurden nach bestem Wissen einmalig als solche gekennzeichnet.

Laborausstattung	
Aperio Versa 8	Leica Biosystems Nussloch GmbH®
Lichtmikroskop Primo Star	Carl Zeiss AG ®
Fluoreszenzmikroskop BZ-X810	Keyence Deutschland®
Vortex-Genie 2®	Thermo Fisher Scientific®
Mikrowelle NN-V423M	Panasonic®
Pipetten	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG®
Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific
Digitaler Pipettierhelfer S1	Thermo Fisher Scientific
Minizentrifuge SU 1550	Sunlab Instruments®
HistoCore MULTICUT	Leica Biosystems Nussloch GmbH
HistoCore Arcadia Einbettssystem	Leica Biosystems Nussloch GmbH

Tab. 2. Laborausstattung

Material	
Menzel-Gläser Superfrost Plus®	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser 24x50mm	Carl Roth®
Double-Edge Blades PTFE Coated Stainless Steel	Personna®
FEATHER® Microtome Blades S35	pfm medical GmbH®
Arraymold kit E	Arraymold®

Tab. 3. Material

Chemikalien	
Destilliertes Wasser	B. Braun®
2-Propanol, ROTIPURAN® >=99,8 %	Carl Roth
ROTICLEAR® für Histologie	Carl Roth
Tris PUFFERAN >= 99,8%	Carl Roth
Tween® 20	Carl Roth
Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer	Carl Roth
Eosin G-Lösung 1% wässrig	Carl Roth
Mountex Eindeckmedium	Medite Medical®
Ethanol vergällt >=99,8%	Carl Roth
Antibody Diluent OP Quanto	Thermo Fisher Scientific
Citratpuffer (PT Module™ Buffer 1)	Thermo Fisher Scientific
Epredia™ DAB Quanto	Thermo Fisher Scientific
UltraVison™ Hydrogen Peroxide Block	Thermo Fisher Scientific
UltraVision™ Protein-Block	Thermo Fisher Scientific
Primary Antibody Amplifier Quanto	Thermo Fisher Scientific
HRP Polymer Quanto	Thermo Fisher Scientific

Tab. 4. Chemikalien

Antikörper	
AGTRAP Polyclonal Antibody , Rabbit IgG	Proteintech®
ALKBH3 Polyclonal Antibody, Rabbit IgG	Proteintech
ANKRD6 (Diversin) Polyclonal Antibody, Rabbit IgG	Proteintech

Tab. 5. Antikörper

Software	
Adobe Photoshop®	Adobe Inc. ®
Adobe Illustrator®	Adobe Inc.

CGM Medico®	CompuGroup Medical SE & Co. KGaA®
Image J	https://imagej.net/ij/download.html
PACS Chillweb	Nexus / Chilli GmbH ®
SPSS	SPSS Inc. ®

Tab. 6. Software

2.3 Herstellung der TMAs

Die immunhistochemische Analyse der Gewebe erfolgte anhand von Tissue Microarrays. Zur Herstellung mussten zunächst repräsentative Areale auf den Paraffinblöcken der entnommenen Gewebe ermittelt werden, die sich durch viel Tumorgewebe und wenig nekrotisches Gewebe auszeichnen. Dafür wurden 2 µm dicke Schnitte der Spenderblöcke erstellt, die anschließend mit Hämatoxylin-Eosin in dem Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Magdeburg angefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt wurden.

Die geeigneten Areale der Spenderblöcke wurden anschließend ausgestanzt und in einen TMA Empfängerblock überführt. Die Empfängerblöcke wurden mithilfe des Arraymold kit E erstellt. Im Anschluss wurden die Blöcke mit einer Dicke von 2 µm geschnitten.

2.4 Immunhistochemische Färbung

Nach Herstellung der Tissue Microarrays wurden diese immunhistochemisch angefärbt. Dabei besetzt ein primärer Antikörper das Zielantigen bzw. die zu untersuchenden Proteine AGTRAP, ALKBH3 und Diversin mit seinem spezifischen F(ab)2-Teil. Die hier verwendeten Antikörper wurden aus Kaninchenserum gewonnen. Ein sekundärer Antikörper bindet wiederum den unspezifischen F(c)-Teil des primären Antikörpers. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Peroxidase und anschließender Zugabe eines geeigneten Substrats entsteht ein Farbsignal, dessen Stärke mit der Anzahl des gebundenen Proteins im Gewebe korreliert.

Zunächst mussten die Antigene/Epitope auf den Tissue Microarrays zugänglich für die Antikörper gemacht werden. Dafür mussten sie zu Beginn entparaffiniert werden. Die Slides wurden zweimal für je zehn Minuten in das Lösungsmittel RotiClear gelegt. Dem folgte eine Inkubation der Proben in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit

zweimal Isopropanol 100% und einmal Isopropanol 70% für jeweils fünf Minuten. Schließlich folgte eine Rehydrierung in destilliertem Wasser für zweimal je fünf Minuten.

Bei der Fixierung durch Formaldehyd und Paraffinierung des entnommenen Gewebes zur Konservierung entstehen Cross-Links sowie Konformationsänderungen zwischen Proteinen. Damit die Antikörper die Antigene erkennen und binden können, müssen diese Cross-Links entfernt bzw. die Proteine demaskiert werden. Dies erfolgte mittels der Heat Induced Epitope Retrieval Methode (HIER). Die Slides wurden in einen mit Citrat Puffer pH 6 gefüllten Behälter gelegt und in der Mikrowelle bei 1000 Watt für ca. 90 Sekunden und dann sechs mal zehn Sekunden mit intermittierenden einminütigen Pausen erwärmt. Dem schloss sich eine Abkühlung auf Zimmertemperatur an. Das Puffergemisch wurde dann langsam durch destilliertes Wasser ersetzt.

Wie oben beschrieben erfolgt die Färbung der Antigen-Antikörper Komplexe mittels einer Peroxidase. Physiologisch sind im Gewebe jedoch zelleigene Peroxidasen vorhanden, die das Ergebnis daher verfälschen würden. Es musste somit ein Peroxid-Block eingesetzt werden, um diese Peroxidasen zu blockieren. Zusätzlich entstehen bei dem Einsatz von Antikörpern oft unspezifische Wechselwirkungen. Diese werden durch den Einsatz von TBS-Tween Puffer Lösung (Tris-buffered saline with Tween20, 1:20 Verdünnung), einem Tensid, vermindert. Nach einer zehnminütigen Waschung mit TBS-Tween wurden die Schnitte für 10 Minuten 200 µl Peroxid-Block ausgesetzt. Anschließend folgte eine dreimalige Waschung mit TBS-Tween für je fünf Minuten. Dann erfolgte eine Inkubation mit UltraVision™ Protein-Block zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper. Der Proteinblock enthält Proteine, welche unspezifische Epitope in den Proben binden und der primäre Antikörper so nur die spezifischen Epitope bindet. Nach einer kurzen Waschung mit TBS-Tween erfolgte die Gabe des primären Antikörpers auf die TMAs.

Mittels vorher erfolgten immunhistochemischen Testfärbungen und Beurteilung im Mikroskop konnten die richtigen Verdünnungen der primären Antikörper ermittelt werden, die zu einer guten Anfärbung der jeweiligen Proteine im Tumorgewebe führten. Für AGTRAP betrug die Endkonzentration 193 ng/ml, für ALKBH3 293 ng/ml und für Diversin 333 ng/ml. Die Verdünnung der primären Antikörper erfolgte mittels Antibody Diluent Quanto.

Die Inkubation der Slides mit je 200 µl Antikörper-Verdünnungen erfolgte bei 4 Grad Celsius für 24 Stunden. Nach dreimaliger TBS-Tween Waschung wurden die Proben

für zehn Minuten einem Primary Antibody Amplifier ausgesetzt, der zu einer Verstärkung der Antigen-Antikörper Bindung führt. Nach weiterer, dreimaliger Waschung mit TBS Tween folgte die Einwirkung der Slides mit dem sekundären, mit einer Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase; HRP) gekoppelten, Antikörper. Dieser bindet mit seinen F(ab)2-Teilen die F(c)-Teile der primären Antikörper. Dies erfolgte unter Lichtschutz für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Waschung mit TBS Tween erfolgte die Zugabe des Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Circa 30µl Chromogen wurden dafür mit einem Milliliter DAB Substrat gemischt und davon je 200 µl auf die Slides aufgetragen. Bei der Spaltung des Substratchromogens durch die Peroxidase im Gewebe entsteht eine bräunliche Farbreaktion. Hier gab es keine vorgegebene Zeit, die Proben wurden bei ausreichender Braunfärbung dreimal für je fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zur besseren Darstellung der Zellen erfolgte anschließend eine Zellkernfärbung mit Hämatoxylin. Dafür wurden die Slides 3 Minuten in Hämatoxylin inkubiert und anschließend mit lauwarmen Wasser abgespült bis das Gewebe auf den Slides eine bläulich-graue Färbung annahm. Dem schloss sich eine Hydrierung durch Einwirkung der Slides in mit 100 % Isopropanol befüllten Behältern an, zuerst mit einer kurzen und dann jeweils fünfminütigen Einwirkungszeit. Zum Schluss wurden die Slides mit dem Eindeckmedium Mountex und Deckgläsern fixiert, um sie unter dem Mikroskop beurteilen zu können.

2.5 Immunhistochemische Analyse

Die Digitalisierung der gefärbten Tissue Microarrays erfolgte durch den Slide Scanner Aperio Versa 8. Die Auswertung der digitalisierten TMAs erfolgte mit dem Programm Aperio ImageScope. Es war eine Beurteilung der Proben bis in 20-facher Vergrößerung möglich. Zur bestmöglichen Ansicht konnten Brightness (Helligkeit, B) und Contrast (Kontrast, C) im Programm angepasst werden.

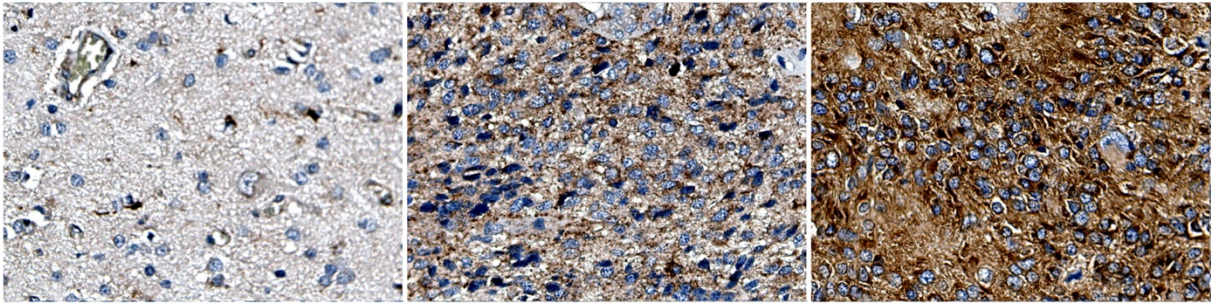
Mittels vorher erfolgter Internetrecherche sowie erstellter Übersichtsfärbungen der Proteine wurde für alle eine überwiegend zytoplasmatische Färbung festgestellt. Für die Auswertung von zytoplasmatischen Färbungen wurde der H-Score verwendet.

A.

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.

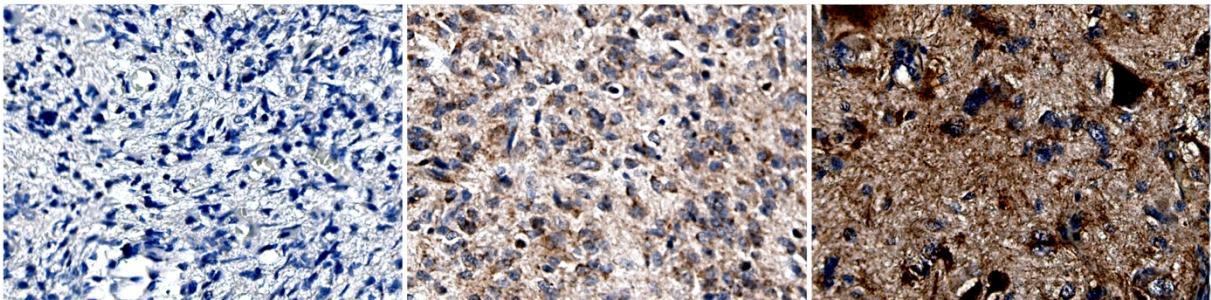


B.

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.



C.

schwach = 1 Pkt.

medium = 2 Pkt.

stark = 3 Pkt.

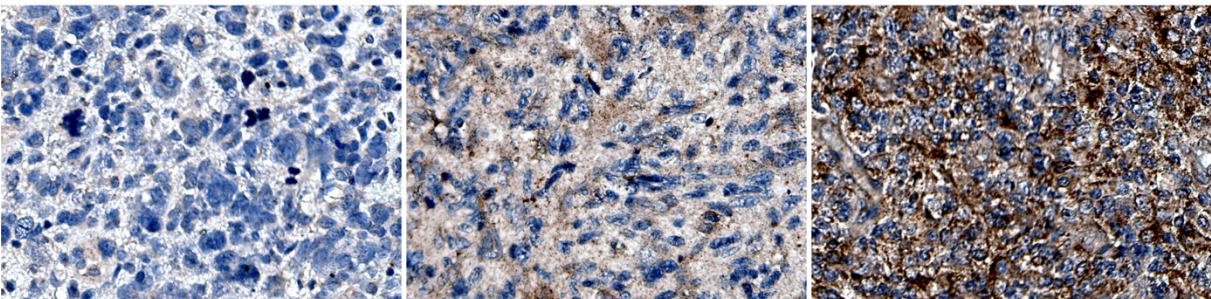


Abbildung 1: Färbeverhalten von AGTRAP, ALKBH3 und Diversin in den Gewebeschnitten (Vergrößerung 20x; B=-20; C=+30) **A** Darstellung der zytoplasmatischen Färbung von AGTRAP. Die Anfärbung des Proteins zeigt ein braunes Kolorit. Als Scoring-System wurde der H-Score verwendet. Je nach Ausprägung Färbung erfolgte eine Zuordnung in die Kategorie schwach=1 Pkt., medium=2 Pkt. und stark=3 Pkt multipliziert mit dem Anteil gefärbter Zellen im Gewebe. **B** Darstellung der zytoplasmatischen Färbung von ALKBH3. Färbung und Scoring erfolgte wie in A. **C** Darstellung der zytoplasmatischen Färbung von Diversin. Färbung und Scoring erfolgte wie in A.

Hierbei wird zum einen die Intensität der Färbung als 1 = weak (geringe Färbung), 2 = medium (mittelgradige Färbung), 3 = strong (starke Färbung) sowie der Anteil angefärbter Zellen im Gewebe (0-100%) beurteilt (Abb. 1). Der H-Score entsteht letztlich mittels der Formel:

$$\text{H-Score} = (1 \times X) + (2 \times Y) + (3 \times Z)$$

X=weak, Y=medium, Z=strong, X + Y + Z = 100% des gesamten Tumorareals

So konnten auch heterogene Expressionen in Geweben gut beurteilt werden. Eine gefärbte Gewebeprobe konnte gemäß der Formel einen H-Score zwischen 100 und 300 erreichen.

Die Färbungen der TMAs wurden durch zwei unabhängig voneinander urteilende Personen ausgewertet und aus deren ermittelten H-Scores jeweils der Mittelwert gebildet.

2.6 Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS. Zunächst wurde geprüft, ob ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen gesundem Hirngewebe und Gewebe aus WHO Grad II, III oder IV Tumoren besteht. Dies erfolgte mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U Tests. Zusätzlich wurden für die Gruppen Gesund, WHO II, III, IV Tumorgewebe jeweils Box-Whisker-Plots erstellt.

Weiterhin wurde das Gesamtüberleben und Rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben der Glioblastompatient*innen analysiert. Das Gesamtüberleben wurde als Zeitraum zwischen Erstdiagnose bzw. Erstoperation und Sterbedatum bzw. Stand der letzten bekannten Datenlage definiert. Das Rezidiv-freie Überleben wurde als der Zeitraum zwischen Erstoperation und Diagnose eines Rezidivs festgelegt. Mittels der Median-Split-Methode wurden anhand der H-Scores der Gewebe zwei Patientengruppen erstellt, die als Kaplan-Meier-Kurven gegenübergestellt wurden. Mittels Log-Rank-Test wurden diese als Univariat Analyse auf einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben bzw. Rezidiv-freien Überleben untersucht.

Zusätzlich wurde mittels der Bivariat Analyse nach Spearman geprüft, ob eine Korrelation des H-Scores der Tumorgewebe der verschiedenen WHO-Grade mit folgenden Parametern besteht:

- a) Tumolvolumen: Anhand präoperativer, T1-gewichteter MRT-Aufnahmen wurde Höhe, Breite und Tiefe des Tumors ermittelt und das Tumolvolumen in Kubikmillimeter berechnet.
- b) Ödemvolumen: Das Ödemvolumen wurde nach gleichem Vorgehen berechnet. Jedoch wurden präoperative T2-gewichtete FLAIR MRT-Aufnahmen verwendet, um das perifokale Tumorödem besser darzustellen und es von Liquor abgrenzen zu können.

- c) Ki-67 Positivität: Der Proliferationsmarker wurde dem Pathologiebefund aus der Medico Datenbank entnommen.

Zur Überprüfung, ob eine prognostische Relevanz der Proteinexpression bezüglich Gesamt- oder Rezidiv-freiem Überleben besteht, wurde im Rahmen einer Multivariat Analyse der Cox-Regression-Test angewandt. Dabei wurden die folgenden, als prognostisch relevant ermittelten und in 1.2.4 genauer erläuterten Faktoren miteinbezogen (27,36,74–78):

- Erkrankungsalter
- Karnofsky Index
- Tumorresektion
- Therapie
- MGMT-Status
- IDH1-Status

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

3. Ergebnisse

3.1 AGTRAP: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe

Zuerst wurde untersucht, ob ein Expressionsunterschied zwischen gesundem (tumorfremem) Gehirngewebe und Tumorgeweben der WHO Grade II, III oder IV Gliomen vorliegt. Um dies zu veranschaulichen, wurde für die ermittelten H-Scores ein Box-Whisker-Plot erstellt (Abb. 2A).

Die höhergradigen Tumore (WHO Grad III und WHO Grad IV) zeigten mit 222,50 bzw. 230,00 einen deutlich höheren Median als das gesunde Gewebe (155,00) (Tab. 7A). Niedriggradige Tumore (WHO Grad II) hatten mit 127,50 einen etwas kleineren Median im Vergleich zu dem gesunden Gewebe (Tab. 7A).

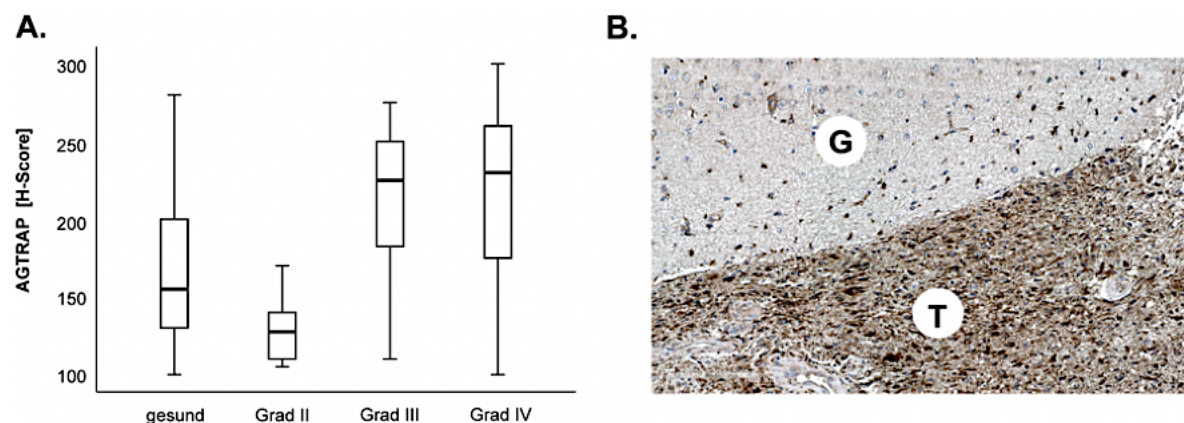


Abb. 2. AGTRAP: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Box-Whisker-Plot der AGTRAP Expression in den Gruppen Gesund, WHO Grad II, III, IV. Die schwarze Linie in den Boxen stellt die Mediane dar, die oberen und unteren Boxbegrenzungen sind die 25. und 75. Perzentilen. **B.** Randbereich eines Glioblastoms nach immunohistochemischer Färbung mit AGTRAP. G=gesund/tumorfrei; T= Tumor.

WHO Grad	Median	Minimum	Maximum	N	Stichproben	Signifikanz (2-seitig)
gesund	155,00	100	280	54	gesund vs. Grad II	0,054
Grad II	127,50	105	170	6	gesund vs. Grad III	0,057
Grad III	222,50	110	275	7	gesund vs. Grad IV	< 0,001
Grad IV	230,00	100	300	210		

Tab. 7. AGTRAP: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Mediane, Minima, Maxima und N= Patientenanzahl der Gruppen. **B.** Test auf Expressionsunterschiede zwischen gesundem Gewebe und den Tumorgeweben mit den ermittelten zweiseitigen Signifikanzen nach Mann-Whitney-U.

Um die Signifikanz dieser Expressionsunterschiede festzustellen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Hierbei wurden jeweils die Tumorgewebe der unterschiedlichen WHO Grade dem gesunden Gewebe gegenübergestellt (Tab. 7B). Die Ergebnisse zeigten, dass die Glioblastome (WHO Grad IV) eine signifikant höhere Expression von AGTRAP aufwiesen als das gesunde Gewebe ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U) (Tab. 7B). Ein repräsentatives Beispiel der AGTRAP Expression in Glioblastom Gewebe versus angrenzendem, gesunden Gewebe ist in Abbildung 2B dargestellt.

3.2 AGTRAP: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen

Es wurde getestet, ob die Expression von AGTRAP in den Tumorgeweben mit dem Gesamtüberleben der Patient*innen zusammenhängt. Dafür wurde die Kohorte mittels der Median-Split Methode in zwei Gruppen eingeteilt: Patient*innen mit hoher AGTRAP Expression (AGTRAP^{high}) und solche mit niedriger AGTRAP Expression (AGTRAP^{low}). Anhand der Kaplan-Meier-Methode wurden für jeden WHO Grad die 24 Monate Überlebenskurven der beiden Patientengruppen dargestellt (Abb. 3). Zur Ermittlung der Signifikanz zwischen den beiden Gruppen wurde anschließend eine Univariatanalyse mittels Log-Rank-Test durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die WHO Grad II Tumore ausschließlich in die AGTRAP^{low} Gruppe eingeordnet wurden, es konnte somit kein Vergleich durchgeführt werden (Abb. 3, linker Panel). Bei Patient*innen mit WHO Grad III Tumoren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,538$; Log-Rank) (Abb. 3, mittlerer Panel). Glioblastom Patient*innen mit hoher AGTRAP Expression im Tumorgewebe hatten eine signifikant kürzere Überlebenszeit als jene mit geringerer Expression ($p < 0,001$; Log-Rank) (Abb. 3, rechter Panel). Die mediane Überlebenszeit der AGTRAP^{high} Glioblastom Patient*innen war mit 7 Monaten deutlich geringer als die der AGTRAP^{low} Patient*innen mit 18 Monaten (Tab. 8).

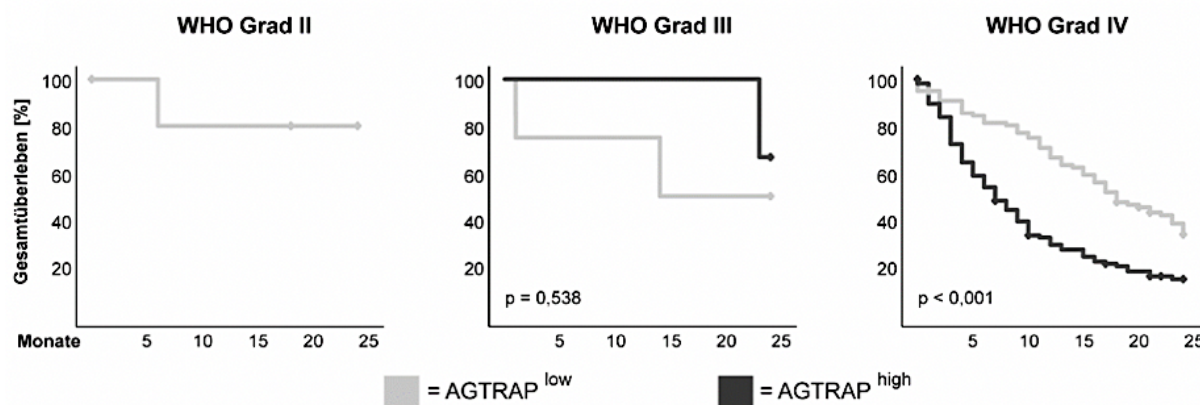


Abb. 3. AGTRAP: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger AGTRAP Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

AGTRAP	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
AGTRAP ^{low}	16,286	0,836	14,674	17,924	18,000	1,991	14,098	21,902
AGTRAP ^{high}	9,728	0,776	8,207	11,250	7,000	1,013	5,015	8,985
Gesamt	12,873	0,615	11,668	14,079	12,000	1,111	9,822	14,178

Tab. 8. AGTRAP: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger AGTRAP Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.3 AGTRAP: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen

Des Weiteren wurden dieselben Gruppen hinsichtlich eines Unterschiedes im Rezidiv-freien Überleben in den ersten sechs Monaten nach Erstdiagnose verglichen. Hierfür wurden ebenfalls die Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rank-Test angewendet.

Bei WHO Grad II Tumoren konnte nur eine geringe Expression von AGTRAP (AGTRAP^{low}) festgestellt werden, ein Vergleich war daher nicht möglich (Abb. 4, linker Panel). Bei Patient*innen mit WHO Grad III Tumoren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,221$; Log-Rank) (Abb. 4, mittlerer Panel). Glioblastom Patient*innen mit hoher AGTRAP Expression im Tumorgewebe hatten eine signifikant kürzere Rezidiv-freie Überlebenszeit als jene mit geringerer AGTRAP Expression ($p = 0,003$; Log-Rank) (Abb. 4, rechter Panel). Die Glioblastom Patient*innen mit AGTRAP^{high} Tumoren erhielten im Mittel nach 3,636

Monaten ein Rezidiv, die Patient*innen mit einer geringeren Expression erst nach 4,789 Monaten (Tab. 9).

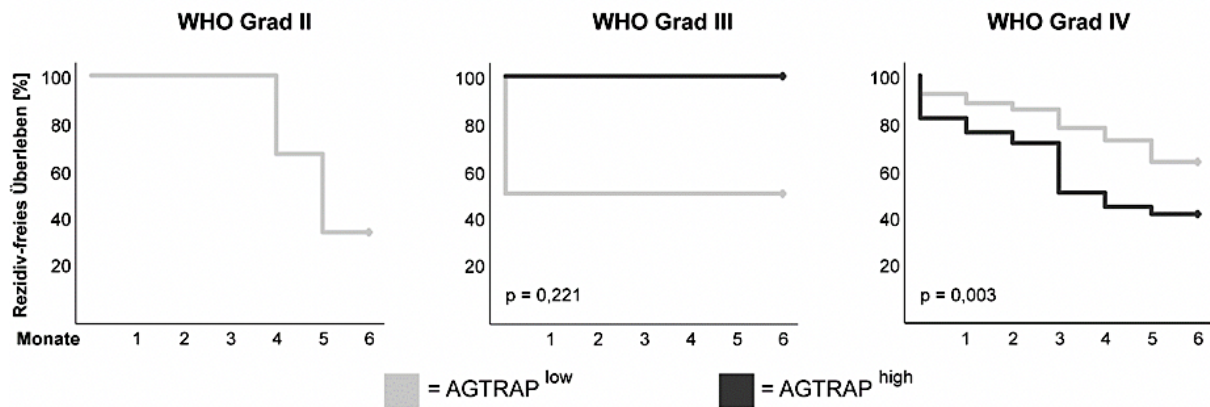


Abb. 4. AGTRAP: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger AGTRAP Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

AGTRAP	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
AGTRAP ^{low}	4,789	0,224	4,351	5,228	-	-	-	-
AGTRAP ^{high}	3,636	0,286	3,077	4,196	4,000	0,452	3,114	4,886
Gesamt	4,254	0,185	3,891	4,616	-	-	-	-

Tab. 9. AGTRAP: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Rezidiv-freie Überleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger AGTRAP Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.4 AGTRAP: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen

Wichtige Parameter, um Gliome hinsichtlich Größe und Wachstum einordnen zu können, sind unter anderem Tumolvolumen, Ödemvolumen sowie der Proliferationsmarker Ki67 (79,80). Wir haben daher untersucht, ob eine Korrelation zwischen den genannten Wachstumsparametern und dem AGTRAP Expressionsgrad im Gewebe vorliegt. Dies wurde mit Hilfe des Spearman Korrelationstests (Spearman's Rho) für WHO Grad II, III und IV Tumore getrennt ermittelt.

Bei WHO Grad II und III Tumoren korrelierte die AGTRAP Expressionsstärke positiv mit allen Parametern, jedoch ohne Signifikanz (Tab. 10). Bei den Glioblastomen lagen es ebenfalls ausschließlich positive Korrelationen vor. Das Tumolvolumen korrelierte

hier außerdem signifikant mit der AGTRAP Expression (Rho = 0,140; p = 0,043; Spearman) (Tab. 10).

Korrelationen AGTRAP (Spearman's Rho)		Tumorzvolumen [cm ³]	Ödemvolumen [cm ³]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,600	0,714	0,338
	Signifikanz (2-seitig)	0,208	0,111	0,512
	N	6	6	6
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	0,054	0,487	0,493
	Signifikanz (2-seitig)	0,908	0,268	0,321
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,140*	0,099	0,034
	Signifikanz (2-seitig)	0,043	0,154	0,632
	N	209	209	203

Tab. 10. AGTRAP: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen. Ermittelte Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's Rho) mit den jeweiligen zweiseitigen Signifikanzen und der Patientenzahl (N) nach WHO Grad. * =signifikant auf p=0,05 Niveau.

3.5 AGTRAP: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen

Unsere Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 und 3.3 zeigten, dass eine hohe AGTRAP Expression signifikant mit einem geringen Gesamtüberleben bzw. Rezidiv-freien Überleben bei Glioblastom Patient*innen assoziiert ist. Nun haben wir getestet, ob die AGTRAP Expression einen unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben oder Rezidiv-freie Überleben bei diesen Patient*innen darstellt. Hierfür wurde eine Multivariatanalyse mittels Cox-Regressionstest durchgeführt. Die AGTRAP^{low} Gruppe wurde als Dummy Variable festgelegt. Bewährte prognostische Faktoren für den Outcome von Glioblastompatient*innen wie Alter, Karnofsky-Index, Resektionsausmaß, Therapie, MGMT Methylierungsstatus und IDH1 Mutationsstatus (7,27,74–78) wurden als Kovariaten miteinbezogen.

Das Risiko, in den nächsten 24 Monaten zu versterben, lag bei hoher AGTRAP Expression um 1,455-mal höher als bei niedriger AGTRAP Expression. Mit p = 0,051 ist dieser Unterschied im Gesamtüberleben annähernd signifikant (KI [95%] = 0,998-2,123; Cox-Regression) (Tab. 11A). Das Risiko eines Rezidivs war bei hoher AGTRAP

Expression ebenfalls erhöht, jedoch ohne Signifikanz (HR = 1,562; KI [95%] = 0,903-2,704; p = 0,111; Cox-Regression) (Tab. 11B).

A.				B.			
Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert	Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert
AGTRAP ^{low}	1	-	-	AGTRAP ^{low}	1	-	-
AGTRAP ^{high}	1,455	0,998-2,123	0,051	AGTRAP ^{high}	1,562	0,903-2,704	0,111
Alter	1,023	1,008-1,038	0,002	Alter	1,015	0,995-1,035	0,140
Karnofsky Index	0,988	0,977-0,999	0,038	Karnofsky Index	0,987	0,972-1,003	0,105
Resektion	0,682	0,499-0,931	0,016	Resektion	0,858	0,551-1,336	0,498
Therapie	0,764	0,703-0,831	<0,001	Therapie	0,711	0,629-0,804	<0,001
MGMT	0,947	0,684-1,312	0,744	MGMT	1,353	0,842-2,175	0,212
IDH1	0,839	0,636-1,105	0,212	IDH1	1,149	0,818-1,615	0,422

Tab. 11. AGTRAP: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen. Cox-Regressionsanalyse des (A) 24 Monate Gesamtüberlebens und (B) 6 Monate Rezidiv-freien Überlebens der AGTRAP^{high} Glioblastom Patientengruppe. Die AGTRAP^{low} Patientengruppe wurde als Dummy Variable festgelegt und Alter, Karnofsky-Index, Resektion, Therapie, MGMT Methylierung und IDH1 Mutation als Kovariaten. HR = Hazard-Ratio; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.6 ALKBH3: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe

Bei der Betrachtung von ALKBH3 wurde ebenfalls zunächst die Expression im gesunden Gewebe mit WHO Grad II, III und IV Tumorgewebe verglichen. Die H-Scores wurden in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt (Abb. 5A).

Mit einem Median von 226,00 hatte das gesunde Gewebe einen größeren H-Score als alle drei Tumorarten, deren Medianwerte sich nur gering unterschieden (WHO Grad II: 202,00; Grad III: 195,50; Grad IV: 200,00) (Tab. 12A).

Daraufhin wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft, ob dieser Expressionsunterschied von ALKBH3 zwischen dem gesunden Gewebe und den Tumorgeweben signifikant ist. (Tab. 12B). Im Vergleich zu WHO Grad II (p = 0,016; Mann-Whitney-U-Test) bzw. Grad IV Tumoren (p < 0,001; Mann-Whitney-U-Test) war die Expression von ALKBH3 im gesunden Gewebe signifikant erhöht. Ein repräsentatives Beispiel der unterschiedlichen Färbung von gesundem Gewebe und Glioblastom Gewebe ist in Abbildung 5B dargestellt.

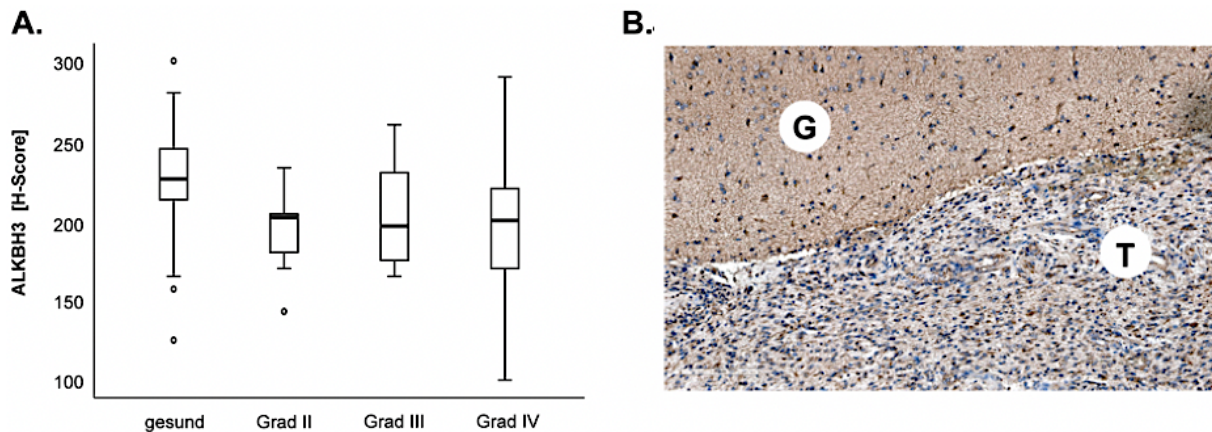


Abb. 5. ALKBH3: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Box-Whisker-Plot der Expression von ALKBH3 in den Gruppen Gesund, WHO Grad II, III, IV. Die schwarze Linie in den Boxen stellt die Mediane dar, die oberen und unteren Boxbegrenzungen sind die 25. und 75. Perzentilen, die kleinen Kreise außerhalb der Whisker stellen Ausreißer dar. **B.** Randbereich eines Glioblastoms nach immunhistochemischer Färbung mit ALKBH3. G=gesund/tumorfrei; T= Tumor.

WHO Grad	Median	Minimum	Maximum	N	Stichproben	Signifikanz (2-seitig)
gesund	226,00	125	300	54	gesund vs. Grad II	0,016
Grad II	202,00	143	233	7	gesund vs. Grad III	0,200
Grad III	196,50	165	260	6	gesund vs. Grad IV	< 0,001
Grad IV	200,00	100	290	190		

Tab. 12. ALKBH3: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Mediane, Minima, Maxima und N= Patientenanzahl der Gruppen. **B.** Test auf Expressionsunterschiede zwischen gesundem Gewebe und den Tumorgeweben mit den ermittelten zweiseitigen Signifikanzen nach Mann-Whitney-U.

3.7 ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen

Im Folgenden wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der ALKBH3 Expression und dem Gesamtüberleben der Patient*innen gibt. Wie bei AGTRAP wurden die Patient*innen nach der Median-Split Methode in eine Gruppe mit hoher Proteinexpression (ALKBH3^{high}) und eine Gruppe mit niedriger Proteinexpression (ALKBH3^{low}) eingeteilt. Für jeden WHO Grad wurden anschließend die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der beiden Patientengruppen über 24 Monate nach Erstdiagnose erstellt (Abb. 6). Um zu überprüfen, ob sich die beiden Patientengruppen signifikant im Überleben unterscheiden, wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt.

Bei den WHO Grad II und III Patient*innen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben ($p = 0,480$ bzw. $p = 0,107$; Log-Rank-Test) (Abb. 6, linker bzw. mittlerer

Panel). Glioblastom Patient*innen mit einer hohen ALKBH3 Expression im Gewebe lebten jedoch signifikant länger als jene mit niedriger ALKBH3 Expression ($p < 0,001$; Log-Rank-Test) (Abb. 6, rechter Panel). Die mediane Überlebenszeit der ALKBH3^{high} Gruppe betrug 16 Monate, die der ALKBH3^{low} Gruppe nur 9 Monate (Tab. 13).

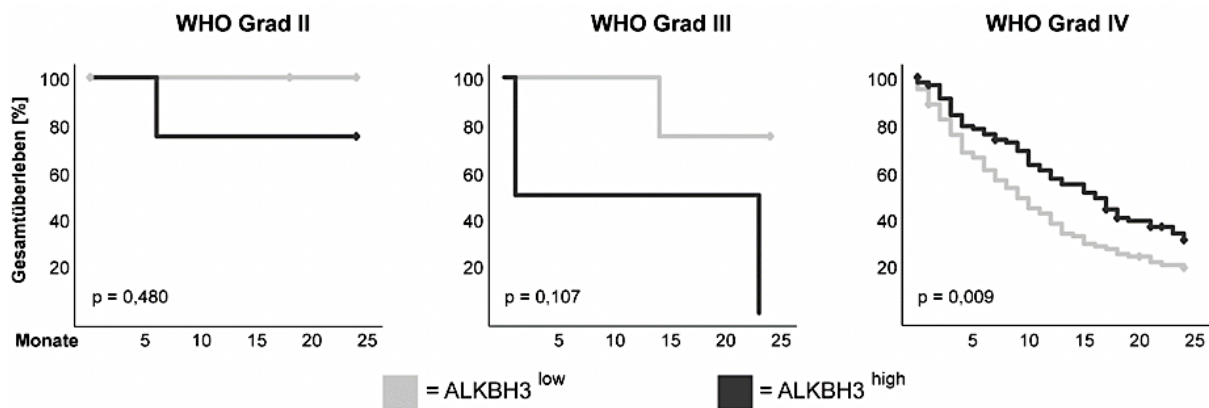


Abb. 6. ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger ALKBH3 Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt

ALKBH3	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
ALKBH3 ^{low}	11,010	0,873	9,298	12,722	9,000	1,310	6,433	11,567
ALKBH3 ^{high}	14,726	0,924	12,916	16,537	16,000	2,081	11,921	20,079
Gesamt	12,794	0,647	11,526	14,063	12,000	1,018	10,005	13,995

Tab. 13. ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger ALKBH3 Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.8 ALKBH3: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen

Bei denselben Patientengruppen wurde nun untersucht, ob sie sich hinsichtlich der Rezidiv-freien Überlebenszeit innerhalb der ersten 6 Monate nach Erstdiagnose unterschieden. Es wurden für jeden WHO Grad die Kaplan-Meier Überlebenskurven erstellt, der Test auf signifikanten Unterschied erfolgte wie oben durch Log-Rank-Analyse.

Weder bei WHO Grad II ($p = 0,445$; Log-Rank-Test) noch bei WHO Grad III ($p = 0,317$; Log-Rank-Test) oder Grad IV Tumorpatient*innen ($p = 0,163$; Log-Rank-Test) konnte eine Signifikanz festgestellt werden (Abb. 7; Tab. 14).

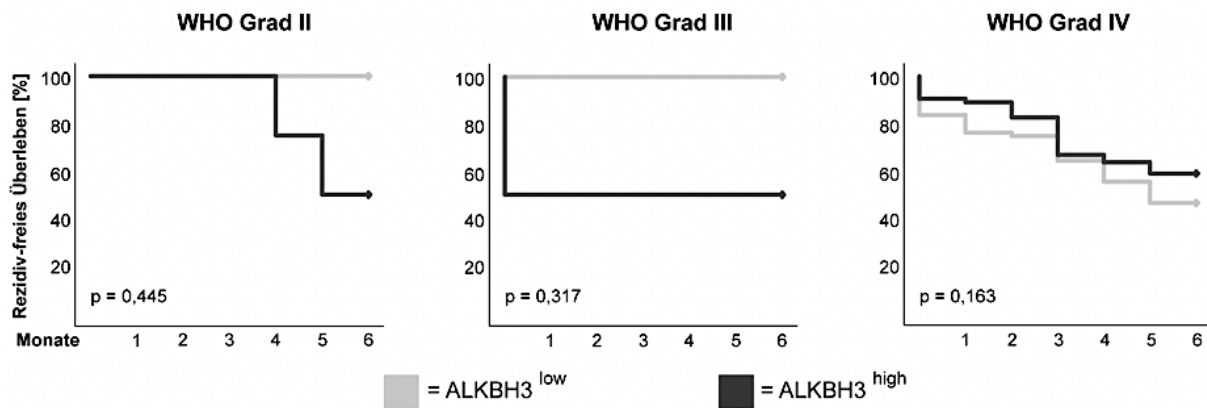


Abb. 7. ALKBH3: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger ALKBH3 Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

ALKBH3	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
ALKBH3 ^{low}	4,000	0,248	3,443	4,557	5,000	-	-	-
ALKBH3 ^{high}	4,508	0,259	4,001	5,015	-	-	-	-
Gesamt	4,246	0,194	3,866	4,626	-	-	-	-

Tab. 14. ALKBH3: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Rezidiv-freie Überleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger ALKBH3 Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.9 ALKBH3: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen

Wie bei AGTRAP wurde außerdem analysiert, ob eine Korrelation zwischen der ALKBH3 Expression und den Wachstumsparametern Tumorzellen, Ödemvolumen und Ki67-Positivität besteht. Auch hier wurde der Spearman Korrelationstest (Spearman's Rho) angewandt und die Ergebnisse tabellarisch nach WHO Grad getrennt dargestellt.

WHO Grad II und III Tumore zeigten positive Korrelationen ohne statistische Signifikanz (Tab. 15, obere und mittlere Zeile). Die Glioblastome zeigten bei allen Parametern eine inverse Korrelation mit der ALKBH3 Expression auf, jedoch ebenfalls nicht signifikant (Tab. 15, untere Zeile).

Korrelationen ALKBH3 (Spearman's Rho)		Tumorzvolumen [cm ³]	Ödemvolumen [cm ³]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,571	0,679	0,408
	Signifikanz (2-seitig)	0,180	0,094	0,363
	N	7	7	7
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	0,371	0,771	0,447
	Signifikanz (2-seitig)	0,468	0,072	0,450
	N	6	6	5
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	-0,068	-0,092	-0,048
	Signifikanz (2-seitig)	0,351	0,209	0,521
	N	189	189	183

Tab. 15. ALKBH3: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen. Ermittelte Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's Rho) mit den jeweiligen zweiseitigen Signifikanzen und der Patientenanzahl (N) sind nach WHO Grad.

3.10 ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen

Zur Ermittlung einer unabhängigen, prognostischen Relevanz des Biomarkers für Glioblastom Patient*innen erfolgte auch bei ALKBH3 eine Adjustierung mit den prognostischen Einflussparametern mittels Cox-Regression. Im Gegensatz zu AGTRAP spricht, wie in Abbildung 6 aufgezeigt, eine erniedrigte ALKBH3 Expression für einen schlechteren Outcome der Glioblastom Patient*innen. Daher wurde hier zur besseren Darstellung als Dummy Variable die Patientengruppe mit hoher Proteinexpression (ALKBH3^{high}) festgelegt.

Es wurde festgestellt, dass eine niedrige ALKBH3 Expression mit einem signifikant erhöhten Sterberisiko einhergeht (HR = 1,484; KI [95%] = 1,032-2,134; p = 0,033; Cox-Regression) (Tab. 16A). ALKBH3 könnte somit einen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben in der Glioblastom Diagnostik darstellen. Bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens konnte keine Signifikanz von ALKBH3 festgestellt werden (HR = 1,036; KI [95%] = 0,590-1,820; p = 0,901; Cox-Regression) (Tab. 16B).

A.

Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert
ALKBH3 ^{high}	1	-	-
ALKBH3 ^{low}	1,484	1,032-2,134	0,033
Alter	1,023	1,007-1,039	0,004
Karnofsky Index	0,989	0,976-1,003	0,125
Resektion	0,701	0,499-0,985	0,040
Therapie	0,737	0,676-0,804	< 0,001
MGMT	0,862	0,608-1,221	0,404
IDH1	0,810	0,603-1,087	0,160

B.

Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert
ALKBH3 ^{high}	1	-	-
ALKBH3 ^{low}	1,036	0,590-1,820	0,901
Alter	1,012	0,992-1,033	0,248
Karnofsky Index	0,990	0,974-1,006	0,223
Resektion	0,869	0,529-1,428	0,580
Therapie	0,694	0,615-0,783	< 0,001
MGMT	1,292	0,777-2,146	0,323
IDH1	1,124	0,795-1,589	0,509

Tab. 16. ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen. Cox-Regressionsanalyse des **(A)** 24 Monate Gesamtüberlebens und **(B)** 6 Monate Rezidiv-freien Überlebens der ALKBH3^{low} Glioblastom Patientengruppe. Die ALKBH3^{high} Patientengruppe wurde als Dummy Variable festgelegt und Alter, Karnofsky-Index, Resektion, Therapie, MGMT Methylierung und IDH1 Mutation als Kovariaten. HR = Hazard-Ratio; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.11 Diversin: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe

Zu Beginn wurden die Expressionsunterschiede von Diversin zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe untersucht. Das Tumorgewebe wurde nach WHO Grad aufgeteilt und die jeweiligen H-Scores in einem Box-Whisker-Plot dargestellt (Abb. 8A). Die höhergradigen Gliome zeigten mit 183,00 und 190,00 einen höheren Median als das niedriggradige bzw. gesunde Gewebe (157,00 und 152,00) (Tab. 17A). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte auf, dass Grad IV Tumore eine signifikant höhere Expression von Diversin aufwiesen als gesundes Gewebe ($p = 0,005$; Mann-Whitney-U-Test) (Tab. 17B). In Abbildung 8B ist dieser Unterschied bildlich dargestellt.

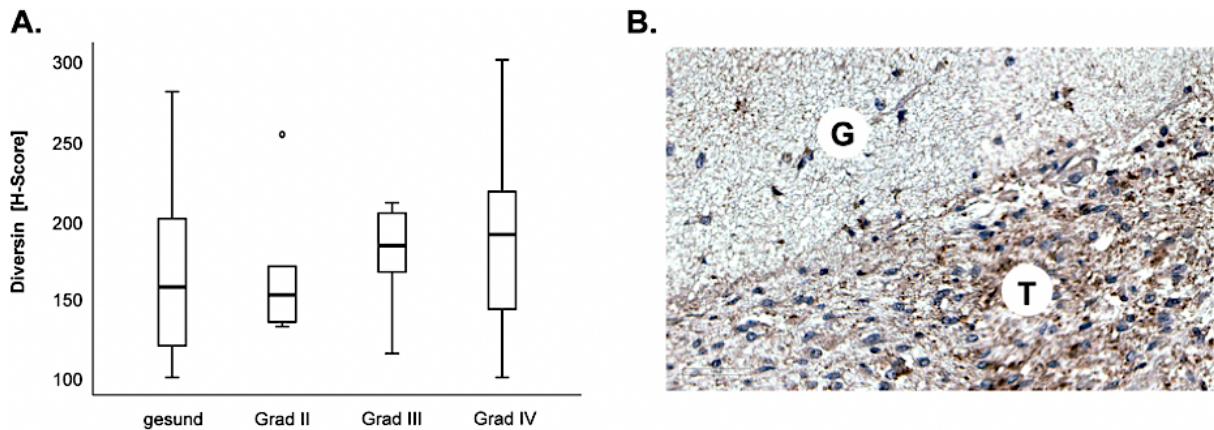


Abb. 8. Diversin: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Box-Whisker-Plot der Diversin Expression in den Gruppen Gesund, WHO Grad II, III, IV. Die schwarze Linie in den Boxen stellt die Mediane dar, die oberen und unteren Boxbegrenzungen sind die 25. und 75. Perzentilen, die kleinen Kreise außerhalb der Whisker stellen Ausreißer dar. **B** Randbereich eines Glioblastoms nach immunhistochemischer Färbung mit Diversin. G=gesund/tumorfrei; T= Tumor.

WHO Grad	Median	Minimum	Maximum	N	Stichproben	Signifikanz (2-seitig)
gesund	157,00	100	280	55	gesund vs. Grad II	0,923
Grad II	152,00	132	253	6	gesund vs. Grad III	0,339
Grad III	183,00	115	210	7	gesund vs. Grad IV	0,005
Grad IV	190,00	100	300	197		

Tab. 17. Diversin: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe. **A.** Mediane, Minima, Maxima und N= Patientenanzahl der Gruppen. **B.** Test auf Expressionsunterschiede zwischen gesundem Gewebe und den Tumorgeweben mit den ermittelten zweiseitigen Signifikanzen nach Mann-Whitney-U.

3.12 Diversin: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen

Die Überprüfung eines statistisch signifikanten Zusammenhangs zwischen der Diversin Expression und des 24 Monate Gesamtüberlebens erfolgte auch hier mittels Kaplan-Meier-Methode und anschließendem Log-Rank-Test. Durch die Median Split Methode wurden die Patient*innen in solche mit hoher Diversin Expression und solche mit niedriger Diversin Expression eingeteilt und deren Überlebenskurven erstellt.

Kein WHO Grad zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen auf (WHO Grad II: $p = 0,617$; WHO Grad III: $p = 0,538$; WHO Grad IV: $p = 0,687$; Log-Rank) (Abb. 9). Die mediane Überlebenszeit bei der Diversin^{high} Glioblastom Patientengruppe war geringfügig länger (13 Monate) als bei der Diversin^{low} Glioblastom Patientengruppe (11 Monate) (Tab. 18).

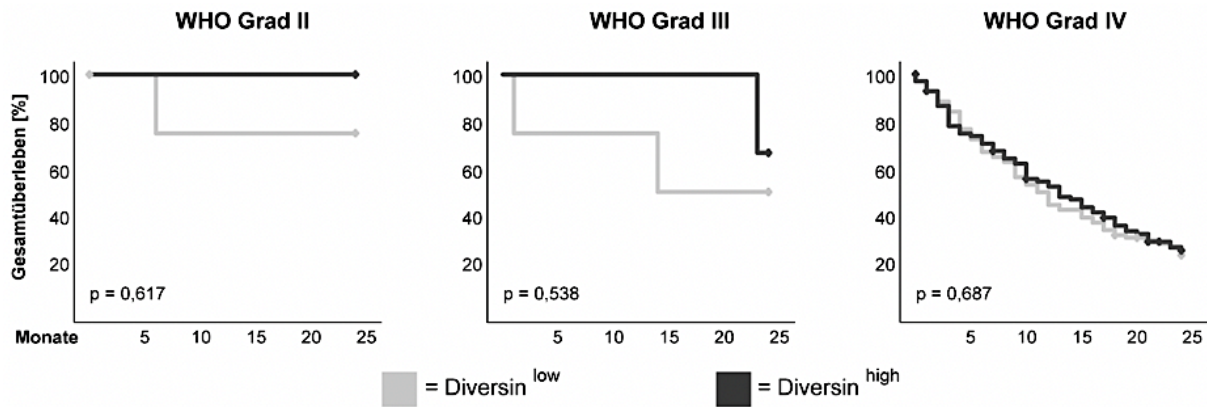


Abb. 9. Diversin: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger Diversin Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

Diversin	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Diversin ^{low}	12,744	0,885	11,009	14,478	11,000	1,313	8,427	13,573
Diversin ^{high}	13,266	0,897	11,507	15,024	13,000	2,134	8,818	17,182
Gesamt	13,003	0,628	11,772	14,234	12,000	1,037	9,968	14,032

Tab. 18. Diversin: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger Diversin Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.13 Diversin: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen

Die statistische Methodik von Abschnitt 3.12 wurde ebenfalls angewandt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Diversin Expression und dem Rezidiv-freien Überleben aufzuzeigen.

Hier zeigte sich ebenfalls bei keinem der WHO Grade eine statistische Signifikanz (WHO Grad II: $p = 0,225$; WHO Grad III: $p = 0,221$; WHO Grad IV: $p = 0,857$; Log-Rank) (Abb. 10). Da kein Zusammenhang zwischen der Diversin Expression und dem Gesamtüberleben oder Rezidiv-freien Überleben festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 9, 10), erfolgte bei Diversin keine zusätzliche Multivariatanalyse.

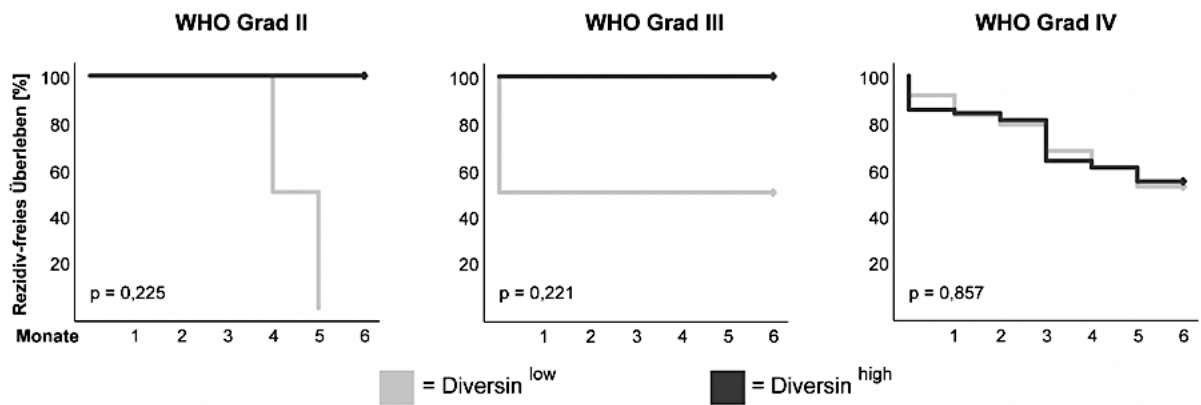


Abb. 10. Diversin: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Kaplan-Meier 6 Monate Überlebenskurven von Patient*innen mit hoher und niedriger Diversin Expression für WHO Grad II, III, IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

Diversin	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Diversin ^{low}	4,338	0,250	3,847	4,829	-	-	-	-
Diversin ^{high}	4,279	0,269	3,751	4,808	-	-	-	-
Gesamt	4,309	0,184	3,949	4,669	-	-	-	-

Tab. 19. Diversin: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Rezidiv-freie Überleben der Glioblastompatient*innen mit hoher bzw. niedriger Diversin Expression. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.14 Diversin: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen

Um eine mögliche Korrelation der Diversin Expression mit den Wachstumsparametern Tumorgröße, Ödemvolumen oder Ki67 Positivität festzustellen, wurde der bivariate Spearman-Korrelationstest (Spearman's Rho) angewandt.

Die Parameter zeigten bei keinem WHO Grad eine signifikante Korrelation mit der Diversin Expression (Tab. 20).

Korrelationen Diversin (Spearman's Rho)		Tumorvolumen [cm ³]	Ödemvolumen [cm ³]	Ki67 Positivität [>10%]
WHO Grad II	Korrelationskoeffizient	0,143	0,143	-0,393
	Signifikanz (2-seitig)	0,787	0,787	0,441
	N	6	6	6
WHO Grad III	Korrelationskoeffizient	0,250	0,571	0,273
	Signifikanz (2-seitig)	0,589	0,180	0,600
	N	7	7	6
WHO Grad IV	Korrelationskoeffizient	0,076	0,057	-0,057
	Signifikanz (2-seitig)	0,290	0,427	0,434
	N	196	196	190

Tab. 20. Diversin: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen. Ermittelte Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's Rho) mit den jeweiligen zweiseitigen Signifikanzen und der Patientenanzahl (N) sind nach WHO Grad.

3.15 AGTRAP/ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen

Unsere bisherigen Daten zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Outcome der Glioblastompatient*innen und der Expression von AGTRAP und ALKBH3 auf. Im Folgenden untersuchten wir daher, inwiefern eine Kombination der beiden Marker mit dem Gesamtüberleben und Rezidiv-freien Überleben dieser Patient*innen assoziiert ist. Hierfür wurden zwei Patientengruppen untersucht, die, abgeleitet von den obigen Ergebnissen, den besten bzw. schlechtesten Outcome aufzeigen sollten: Patient*innen mit niedriger AGTRAP und hoher ALKBH3 Expression (AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high}) und Patient*innen mit hoher AGTRAP und niedriger ALKBH3 Expression (AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low}). Für diese Gruppen wurden 24 Monate Überlebenskurven und 6 Monate Überlebenskurven nach Kaplan-Meier erstellt. Mittels Log-Rank-Analyse wurden die beiden Patientengruppen auf signifikanten Unterschied hin untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low} Patient*innen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p < 0,001$; Log-Rank) (Abb. 11A), sowie ein kürzeres Rezidiv-freies Überleben ($p = 0,004$; Log-Rank) (Abb. 11B) hatten als AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high} Patient*innen. Die AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high} Patient*innen lebten im Median um 18 Monate länger (Tab. 21A). Auch die Rezidiv-freie Zeit der AGTRAP^{low}/

ALKBH3^{high} Patient*innen war im Mittel mit 4,690 länger als die der AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low} Patient*innen mit 2,923 (Tab. 21B)

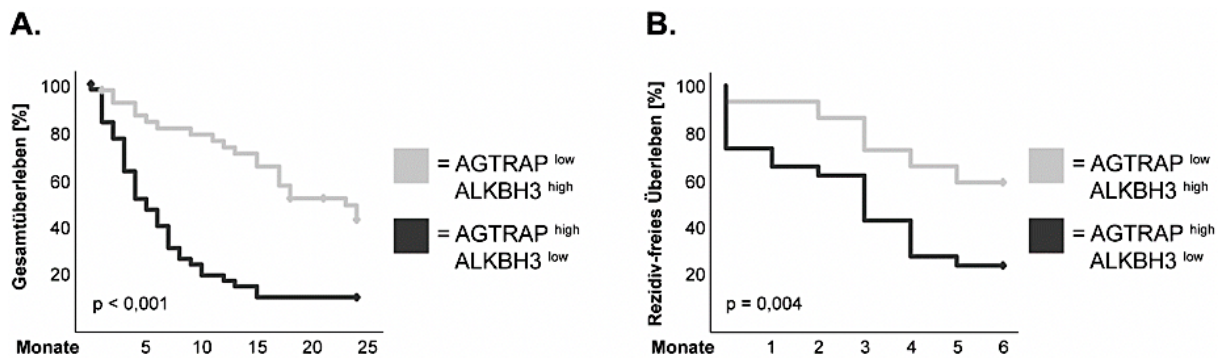


Abb. 11. AGTRAP/ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen. A/B. Kaplan-Meier 24 Monate Überlebenskurven bzw. 6 Monate Rezidiv-freie Überlebenskurven von AGTRAP^{low}/ALKBH3^{high} und AGTRAP^{high}/ALKBH3^{low} Patientengruppen für WHO Grad IV. Der Log-Rank-Test wurde für die statistische Analyse genutzt und die p-Werte sind jeweils in der linken unteren Ecke der Diagramme dargestellt.

A.	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
AGTRAP ^{low} /ALKBH3 ^{high}	17,391	1,352	14,669	19,968	23,000	3,996	15,167	30,833
AGTRAP ^{high} /ALKBH3 ^{low}	7,031	1,003	5,065	8,997	5,000	0,980	3,079	6,921
Gesamt	11,800	1,004	9,831	13,768	9,000	2,059	4,965	13,035

B.	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]		Schätzer	Std. Fehler	KI [95%]	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
AGTRAP ^{low} /ALKBH3 ^{high}	4,690	0,345	4,013	5,366	-	-	-	-
AGTRAP ^{high} /ALKBH3 ^{low}	2,923	0,445	2,051	3,795	3,000	0,504	2,012	3,988
Gesamt	3,855	0,303	3,262	4,447	5,000	0,823	2,387	5,613

Tab. 21. AGTRAP/ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen. A/B. Mittelwerte, Mediane und deren Streuungsmaße für das Gesamtüberleben bzw. das Rezidiv-freie Überleben der Glioblastompatient*innen mit AGTRAP^{low}/ALKBH3^{high} und AGTRAP^{high}/ALKBH3^{low}. Std. Fehler = Standardfehler; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall.

3.16 AGTRAP/ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen

Zuletzt wurde geprüft, ob nach Adjustierung mit den prognostischen Einflussfaktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Form der Therapie, MGMT Methylierungsstatus und IDH1 Mutation) die Expressionskombination der Marker eine signifikant prognostische Relevanz bezüglich Gesamtüberleben oder Rezidiv-freien Überleben besitzt.

Die Multivariatanalyse mittels Cox-Regression zeigte, dass AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low} Patient*innen ein signifikant höheres Sterberisiko aufwiesen (HR = 2,403; KI [95%] = 1,200-4,811; p = 0,013; Cox-Regression) im Vergleich zu AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high} Patient*innen (Tab. 22A). Hinsichtlich des Rezidiv-freien Überlebens zeigte sich kein unabhängiger prognostischer Wert der Biomarkerkombination (HR = 2,021; KI [95%] = 0,808-5,057; p = 0,133; Cox-Regression) (Tab. 22B).

A.				B.			
Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert	Cox Regression	HR	KI [95%]	p-Wert
AGTRAP ^{low} /ALKBH3 ^{high}	1	-	-	AGTRAP ^{low} /ALKBH3 ^{high}	1	-	-
AGTRAP ^{high} /ALKBH3 ^{low}	2,403	1,200-4,811	0,013	AGTRAP ^{high} /ALKBH3 ^{low}	2,021	0,808-5,057	0,133
Alter	1,020	0,996-1,045	0,102	Alter	1,009	0,976-1,044	0,578
Karnofsky Index	0,981	0,959-1,002	0,079	Karnofsky Index	0,990	0,963-1,017	0,470
Resektion	0,664	0,391-1,125	0,128	Resektion	1,264	0,685-2,333	0,453
Therapie	0,813	0,706-0,936	0,004	Therapie	0,809	0,670-0,977	0,027
MGMT	0,953	0,518-1,752	0,876	MGMT	1,203	0,525-2,754	0,662
IDH1	0,519	0,273-0,984	0,044	IDH1	0,728	0,350-1,515	0,396

Tab. 22. AGTRAP/ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen. Cox-Regressionsanalyse des (A) 24 Monate Gesamtüberlebens und (B) 6 Monate Rezidiv-freien Überlebens der AGTRAP^{high}/ALKBH3^{low} Glioblastom Patientengruppe. Die AGTRAP^{low}/ALKBH3^{high} Patientengruppe wurde als Dummy Variable festgelegt und Alter, Karnofsky-Index, Resektion, Therapie, MGMT Methylierung und IDH1 Mutation als Kovariaten. HR = Hazard-Ratio; KI [95%] = 95% Konfidenzintervall

4. Diskussion

4.1 Material und Methodik

4.1.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Zur Ermittlung von aussagekräftigen und übertragbaren Ergebnissen ist ein für die Krankheit repräsentatives Patientenkollektiv essentiell. Da der Fokus der vorliegenden Studie auf Patient*innen mit primärem Glioblastom liegt, sind diese mit rund 89 Prozent (N=233) am häufigsten in der Kohorte vertreten. Zum Vergleich der Expressionsgrade der drei betrachteten Proteine in Gliomgewebe unterschiedlichen WHO Grades, wurde eine kleine Anzahl an WHO II (N=11) bzw. WHO III Gliom (N=19) Patient*innen ebenfalls miteinbezogen. Die Aussagekraft der Expressionen in den WHO II und III Gliomen ist daher nur gering. Die vorliegende Glioblastomkohorte zeigt ein medianes Erkrankungsalter von 64 Jahren und einen männlichen Anteil von rund 53 Prozent. Dies ist vergleichbar mit dem CBTRUS Report von 2016, der ein medianes Erkrankungsalter von 65 Jahren mit einem männlichen Anteil von rund 58 Prozent ermittelte (5). Das mediane Gesamtüberleben der hier untersuchten Kohorte liegt bei 12 Monaten. Eine Überlebensanalyse von Brown et al. zeigte beispielsweise ein medianes Überleben von rund 9 Monaten, eine Studie von Helseth et al. ein medianes Überleben von rund 10 Monaten (27,81) . Weitere ermittelte Daten wie Therapie, Resektionsstatus, MGMT- Methylierung und IDH1 Mutation decken sich weitgehend mit einer Kohorte von Glioblastompatient*innen, die zwischen 2005 und 2013 am Universitätsklinikum Regensburg operiert wurden (82). Insgesamt lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Studie eine für Glioblastome repräsentative Kohorte untersucht wurde.

Vor allem durch den retrospektiven Charakter der Studie ergaben sich verschiedene Herausforderungen bei der Datenerhebung, die bei der Interpretation dieser Arbeit beachtet werden sollten. Die neueste Klassifikation der WHO ordnet IDH mutierte Glioblastome als IDH mutierte Astrozytome WHO Grad IV ein (1). Die Datenerhebung sowie Durchführung der vorliegenden Studie erfolgte jedoch vor dieser neuen Einteilung. Der Anteil IDH mutierter Glioblastome fällt mit 5,6 Prozent jedoch relativ gering aus. Sie werden in dieser Arbeit daher weiterhin als Glioblastome eingeordnet. Zur Beurteilung des Resektionsstatus wird postoperativ ein MRT mit Kontrastmittel durchgeführt. Benignes Kontrastmittelenhancement im MRT als Folge der Operation

nimmt mit der postoperativen Zeit zu und kann nicht sicher von Resttumor abgegrenzt werden (83). Daher wurde zur Ermittlung des Resektionsstatus mittels MRT ein Standardzeitfenster von 72 Stunden festgelegt. Durch eine verspätete oder nicht erfolgte postoperative MRT Beurteilung konnte somit keine Aussage zu dem Resektionsstatus einiger Tumore (5,2 Prozent der Kohorte) getroffen werden. Durch fehlende Berichte der weiterbehandelnden Hausärzte bzw. Kliniken konnte teilweise keine Ermittlung des Vitalstatus bestimmter Patient*innen erfolgen. Als Konsequenz wurden diese in der statistischen Analyse zensiert.

4.1.2 TMA und Immunhistochemie

Bei der TMA Methode werden den Tumorgewebe der Patient*innen mikro- bis millimetergroße Gewebezylinder entnommen und diese neben Tumorproben anderer Patient*innen in einem Paraffinblock eingebettet und anschließend mittels Mikrotom geschnitten (84). Dadurch zeigen sich verschiedene Vor- und Nachteile. Beim Schneiden neuer TMAs vom Paraffinblock können die einzelnen Proben verletzt werden oder sich ihre Gewebezusammensetzung ändern. Bestimmte Tumorproben konnten teilweise nicht in die Endauswertung dieser Studie aufgenommen werden, da diese zu viel Nekrose und Einblutung bzw. zu wenig auswertbaren Tumoranteil enthielten. Außerdem stellen TMAs nur einen Bruchteil des gesamten entnommenen Tumorgewebes dar. TMAs können so, besonders in inhomogenem Gewebe, nicht immer das Gewebe und die Proteinexpression im Gesamttumor widerspiegeln (85). Nichtsdestotrotz wiesen verschiedene Studien die Reliabilität der TMA Methode nach. Dabei erwiesen sich die TMA Proben insbesondere dann als repräsentativ, wenn zwei bis drei Proben pro Tumor entnommen und untersucht wurden (86–88). Dies war auch in der vorliegenden Studie zumindest für einen Teil der Tumore gegeben. Die TMA Methode ist sehr gewebesparend und kann so gut für Forschungszwecke eingesetzt werden. Es können des Weiteren mehrere Tumore verschiedener Patient*innen gleichzeitig und mit identischer Vorgehensweise bei geringem Materialaufwand analysiert werden. Daher sind TMAs zeit- und kostengünstig (84). Durch ihre vorherige Fixierung und Paraffineinbettung sind die Gewebeproben außerdem haltbar und können gut für retrospektive Analysen verwendet werden (89). Die Relevanz und Rolle der hier untersuchten Proteine ist in Glioblastomen weitgehend unbekannt. Mit möglichst geringem Materialaufwand sollten möglichst viele Tumore untersucht und

verwertbare Ergebnisse ermittelt werden. Somit ist das Tissue Microarrays Verfahren für die vorliegende Studie gut geeignet.

Die immunhistochemische Färbung ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von Expressionsmustern in Geweben. Wichtig für die Durchführung ist ein einheitliches, im entsprechenden Labor etabliertes und reproduzierbares Vorgehen (90). Durch die Verwendung von bereits an Paraffingewebe getesteten Antikörpern konnten mögliche Fehlfärbungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Um eine möglichst objektive Beurteilung der Tumoranfärbungen bzw. Proteinexpressionen zu erreichen, erfolgte die Auswertung durch zwei unabhängige Begutachter, die bei zu großen Diskrepanzen durch eine dritte Person ergänzt wurden. Die Tumorgewebe wurden anonymisiert, wodurch keine Rückschlüsse auf den Outcome der zugehörigen Patient*innen getroffen werden konnten.

4.2 AGTRAP

Die vorliegende Studie beschreibt das AGTRAP Protein erstmalig als möglichen Biomarker in Glioblastomen. Die Rolle von AGTRAP in der Tumorprogression ist weitgehend unerforscht. Tatsächlich ergab eine Eingabe von "AGTRAP and cancer" in der Pubmed-Suchmaschine nur 11 mögliche relevante Studien. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass AGTRAP eine signifikant erhöhte Expression in Glioblastom Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe aufweist. Auch in anderen Krebsarten ist eine erhöhte Expression von AGTRAP in Tumoren nachgewiesen: Liu et al. wies eine erhöhte Expression von AGTRAP in Hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zu benachbartem bzw. tumorfreiem Gewebe nach (54). Zeng et al. konnte zeigen, dass die AGTRAP Expression in Plattenepithelkarzinomen der Zunge ebenfalls höher ist als in tumorfreiem Gewebe (91). Wang et al. analysierten Genexpressionen aus der TCGA Datenbank und stellten eine Überexpression von AGTRAP in 51 verschiedenen Tumorarten im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe fest, unter anderem in HCC Tumoren als auch in Glioblastomen (92).

Des Weiteren zeigten zwei unabhängige Studien, dass erhöhte AGTRAP mRNA- bzw. Genexpression mit einer schlechten Prognose für HCC Patient*innen einhergeht (54,92). Mittels „Weighted Gene Coexpression Analysis“ wurde ermittelt, dass bei Plattenepithelkarzinomen der Zunge eine erhöhte AGTRAP Genexpression ebenfalls einen prognostisch ungünstigen Faktor bzgl. des Gesamtüberlebens darstellt (91).

Auch in Brustkrebs konnte AGTRAP als prognostischer Faktor nachgewiesen werden, der mit einem niedrigerem Gesamtüberleben assoziiert ist (93). Unsere Studie zeigt zum ersten Mal, dass eine erhöhte AGTRAP Expression mit einem verringerten Gesamtüberleben sowie Rezidiv-freien Überleben der Glioblastom Patient*innen assoziiert ist. Zusätzlich konnten wir eine signifikante Korrelation der AGTRAP Expression mit dem Tumolvolumen von Glioblastomen feststellen. In der Multivariatanalyse stellt AGTRAP mit $p = 0,051$ zwar nur einen annähernd prognostischen Wert für das Gesamtüberleben der Glioblastompatient*innen dar, jedoch sprechen die Studienlage sowie die Ergebnisse dieser Arbeit sehr dafür, dass mit einer größeren Glioblastom Kohorte statistische Signifikanz erreicht werden würde.

AGTRAP steht in enger Verbindung zum Angiotensin II Typ I Rezeptor, der unter anderem zellproliferativ wirkt und in Glioblastomen ebenfalls mit einem schlechten Outcome für die Patient*innen assoziiert ist (43,45,53). Jedoch wirkt AGTRAP eher hemmend auf die Wirkung des Rezeptors, unter anderem über dessen Internalisierung (43,45). Somit ist eigentlich ein tumorprotektiver Effekt von AGTRAP zu erwarten, der jedoch durch unsere Ergebnisse und die Studienlage widerlegt wird. Die Literatur liefert dafür verschiedene Erklärungsansätze. Lopez-Illasaca M. et al. weist darauf hin, dass AGTRAP auch an von AT1R unabhängigen zellulären Mechanismen beteiligt ist (43). Mittels Protein-Protein Interaction Analysis konnten Liu et al. eine Verbindung von AGTRAP zum MAPK Signalweg in HCC feststellen (54). Überaktivierungen des MAPK Signalweges sind bei der Entstehung und Progression einiger Tumore beteiligt, so auch beim Glioblastom (94,95). Wang et al. konnten in Brustkrebsgewebe eine Interaktion von AGTRAP mit den Transkriptionsfaktoren USF1 und PBX3 sowie dem Akt/mTOR Signalweg nachweisen, die gemeinsam als Signalachse unter anderem über Unterstützung der aeroben Glykolyse tumorprogressiv wirken (93). Diese Signalachse könnte auch in Glioblastomen wirken, da die beteiligten Moleküle auch in Glioblastom Gewebe verstärkt exprimiert sind und mit erhöhter Malignität assoziiert sind (96–98). In Plattenepithelkarzinomen der Zervix wurde eine Verbindung von AGTRAP mit dem Tumor-suppressor Protein p-16 aufgezeigt. Nach Mendaza et al. könne AGTRAP mit p16 komplexieren und es so im Zytoplasma halten, wodurch es seine tumorprotektive Wirkung im Zellkern nicht erfüllen kann. Die Patient*innen mit weniger nukleärem p16 wiesen einen schlechteren Outcome auf (99). Außerdem ging in Brustkrebs eine erhöhte zytoplasmatische Akkumulation von p16 mit höherer Malignität der Tumoren einher (100). Die

tumorsuppressive Wirkung von p16 ist auch in Glioblastomen wichtig, ein Verlust von p16 führt zu einem schlechteren Outcome für die Patient*innen (101).

Das Nichtansprechen immunmodulatorischer Therapiemöglichkeiten und die nach wie vor schlechte Prognose beim Glioblastom liegt unter anderem an dessen starker Immunsuppression (102). Hong et al. zeigten in einer Pan Cancer Analyse verschiedener Krebsarten eine Verbindung von AGTRAP mit diversen immunregulativen Mechanismen in Glioblastomen auf (103). Insbesondere wiesen sie eine positive Korrelation der AGTRAP Genexpression mit den in Glioblastomen immunsuppressiv und tumorprogressiv wirkenden M2 Makrophagen nach (103,104). Auch bei WHO II und III Gliomen korreliert die Genexpression von AGTRAP positiv mit dem Anteil an M2 Makrophagen im Tumorgewebe (105). In Hepatozellulären Karzinomen korrelierte die AGTRAP Expression außerdem mit der T-cell exhaustion, einer durch den Tumor verursachten Funktionsabnahme von Tumor bekämpfenden T-Zellen (54,106). In Plattenepithelkarzinomen der Zunge konnte eine negative Korrelation mit der AGTRAP Genexpression und der Invasion CD8 positiver T-Zellen aufgezeigt werden (91). Auch in Glioblastomen ist T-cell exhaustion äußerst ausgeprägt und eine Invasion CD8 positiver T-Zellen mit einem besseren Outcome assoziiert (107,108). Der beschriebene Einfluss von AGTRAP auf diese Mechanismen könnten somit auch seine tumorprogressive Rolle in Glioblastomen erklären.

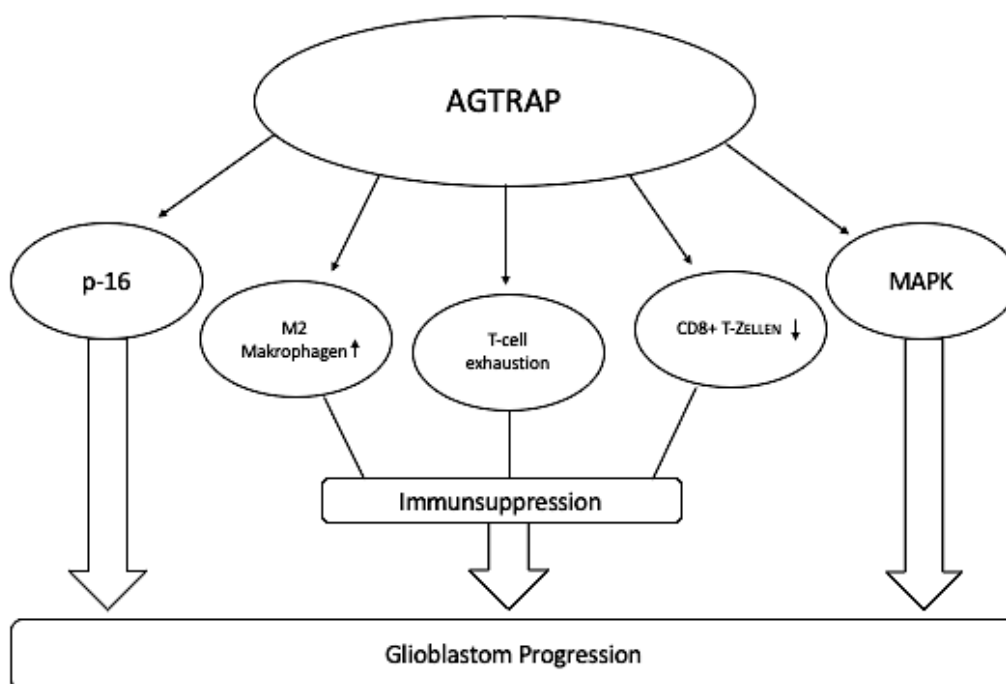


Abb. 12. AGTRAP: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen

4.3 ALKBH3

Die vorliegende Studie zeigt erstmals ALKBH3 als möglichen prognostisch günstigen Biomarker für Glioblastome auf. In alle Gliomen beobachteten wir eine niedrigere Expression des ALKBH3 Proteins als in anliegendem, gesunden Hirngewebe. Dieser Expressionsunterschied erreichte sowohl in WHO Grad II als auch Grad IV Gliomen statistische Signifikanz.

Die weitere Studienlage zeigt ein uneinheitliches Bild des Einflusses von ALKBH3 auf Tumore auf und scheint abhängig von der betrachteten Tumorart zu sein. Unter anderem Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Nackenregion, Prostatakarzinome und Pankreaskarzinome zeigen eine erhöhte ALKBH3 Protein bzw. mRNA Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu anliegendem Gewebe (62,63,109). Hingegen konnte in Brustkrebsgewebe sowie Adenokarzinomen der Lunge eine geringere Protein- bzw. mRNA Expression von ALKBH3 im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden (64,65).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Betrachtung des Einflusses von ALKBH3 auf den Outcome von Tumorpatient*innen. Während hohe ALKBH3 Expressionen in beispielsweise Pankreaskarzinomen sowie Nierenzellkarzinomen ein schlechteres Outcome für die Patient*innen darstellen, konnten in Brustkrebs, Hodgkin Lymphomen und Adenokarzinomen der Lunge eine gegenteilige Wirkung aufgezeigt werden (63,110). Eine Inaktivierung des ALKBH3 Gens mittels CpG Methylierung (und anschließend verminderter Expression) stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor bzgl. des Gesamtüberlebens von Brustkrebs- und Hodgkin Lymphom Patient*innen dar (64,111). Zusätzlich konnte in Adenokarzinomen der Lunge gezeigt werden, dass eine erhöhte ALKBH3 Expression mit einem besserer Outcome assoziiert ist (65).

Die vorliegende Studie identifizierte mittels Multivariat Analyse ALKBH3 ebenfalls als prognostisch günstigen Faktor bzgl. des Gesamtüberlebens bei Glioblastompatient*innen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Feng et al. bei der Untersuchung der mRNA Expression von ALKBH3 in Glioblastomen anhand der GEPIA2 Database eine Überexpression im Vergleich zu tumorfreiem Hirngewebe feststellen. Außerdem konnten sie eine Assoziation einer mRNA Überexpression von ALKBH3 in Glioblastomproben mit einem schlechteren Gesamtüberleben feststellen (112). Diese Ergebnisse scheinen auf dem ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnisse dieser

Studie zu stehen. Dafür lassen sich jedoch verschiedene Ursachen aufführen. Zum einen ist die mRNA Expression nicht immer mit der letztlichen Proteinexpression gleichzusetzen. In der Studie von Feng et al. wurden ebenfalls Proteinexpressionen in Glioblastomen untersucht und ALKBH3 zeigte sich dabei als schwach exprimiert, wie in unserer Studie ebenfalls aufgezeigt wurde (112). Dieser Unterschied könnte an der ausgeprägten Ubiquitinierung und anschließendem Abbau von ALKBH3 Proteinen liegen, wie es Zhao et al. in Prostata-, Brust und Lungenkarzinomen aufzeigen konnten, die dazu führten dass die mRNA und Proteinexpression von ALKBH3 nicht miteinander korrelieren (113). Zum anderen sagten Feng et al. selbst, dass die verwendeten Daten aus öffentlichen Registern stammen und nicht experimentell bestätigt wurden sowie eine gewisse Inkonsistenz aufweisen (112).

Die Rolle von ALKBH3 als DNA reparierendes sowie RNA regulierendes Enzym in der Zelle könnte die, in Glioblastomen gezeigte, tumorsuppressive Wirkung erklären. Stefansson et al. zeigten, dass vermehrte genetische Inaktivierung von ALKBH3 in Brustkrebs mit einer erhöhten Anzahl an methyliertem Cytosin (3meC) im Brustkrebsgewebe einhergeht (64). You et al. konnten das zweifach methylierte Adenin 1,6meA in tRNA als weitere RNA Modifikation identifizieren, die möglicherweise krebsfördernd wirkt und durch ALKBH3 demethyliert wird. Sie konnten einen erhöhten Gehalt an 1,6meA in Brustkrebsgewebe nachweisen (114). Über Demethylierung von exogen als auch endogen verursachten Basenveränderungen in DNA als auch RNA trägt ALKBH3 zur genetischen Integrität der Zelle bei (64,115). In früheren Studien konnte das mutagene Potential von 3meC in E.coli nachgewiesen werden (116,117). Eine in Folge von verminderter ALKBH3 Expression erhöhte Mutationslast könnte so die Entstehung als auch Progression von Glioblastomen fördern.

Des Weiteren konnten Calvo et al. zeigen, dass eine reduzierte Aktivität von ALKBH3 mit einer erhöhten Anfälligkeit für, mit Entzündung assoziiertem, Dickdarmkrebs einhergeht. Über RONS, die von aktivierten Entzündungszellen freigegeben werden, kommt es zu vermehrten DNA Läsionen in den Dickdarmzellen (118). Da die Entstehung von Glioblastomen auch mit Entzündungen in Verbindung steht, könnte ein Defizit von ALKBH3 hier somit ähnlich zur Krebsentstehung beitragen (119).

Esteve-Puig et al. zeigten außerdem eine Assoziation von genetischer Inaktivierung von ALKBH3 und einer Überexpression der Kollagene von Typ 1a2 und 1a1 (COL1A2, COL1A1) in Hodgkin Lymphomen auf. In der mRNA von diesen Kollagenen wurde eine

erhöhte Anzahl an 1meA nachgewiesen, welche durch ALKBH3 demethyliert werden (111). Erhöhte 1meA Werte könnten die Expression dieser Proteine beeinflussen und so eine direkte kausale Verbindung von ALKBH3 und der Kollagen Typ 1 Expression erklären. Als Teil des Extrazellulärmatrix sind Kollagene wichtig für die invasive Eigenschaft von Glioblastomen. Überexpressionen von Kollagen I sind bei Glioblastom mit einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert und besonders in dem aggressiven mesenchymalen Subtyp präsent (120). ALKBH3 könnte in Glioblastomen also über verminderte Kollagen Expression einen günstigeren Verlauf fördern.

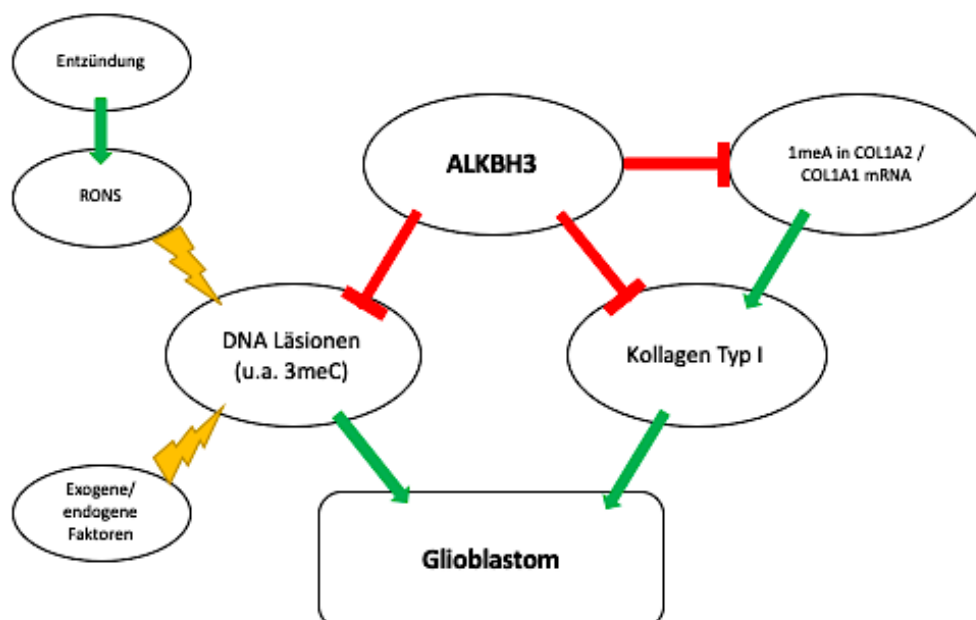


Abb. 13. ALKBH3: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen. Grün: Fördernder Einfluss; Rot: Hemmender Einfluss; Gelb: Mutationsfördernder Einfluss

4.4 Diversin

In Tumoren wie NSCLC oder Kolonkarzinomen konnte eine negative Assoziation einer Diversin Überexpression mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden (121,122). In einer Expressionsanalyse von Diversin in verschiedenen Krebsarten zeigten Bai et al. weiterführend eine, je nach Tumorart, unterschiedliche Assoziation der Diversin Expression mit dem Outcome der Patient*innen auf: In Kolorektalen Karzinomen und Hautkrebs ist eine hohe Diversin Expression mit kürzerem Gesamtüberleben

assoziiert, in Gehirntumoren, Brustkrebs und Lungenkrebs ist eine hohe Expression mit längerem Gesamtüberleben assoziiert (122). Auch Zhao et al. konnten eine Assoziation von Diversin Expression und niedrigem Gesamtüberleben in Adenokarzinomen des Kolons aufzeigen (123). In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation des Diversin Expressionsgrades mit dem Gesamt- oder Rezidivfreien Überleben von Gliompatient*innen festgestellt werden.

Jedoch zeigen unsere Ergebnisse eine erhöhte Expression von Diversin in den höhergradigen Gliomen (WHO III und IV) im Vergleich zu niedriggradigen WHO II Gliomen bzw. gesundem Gehirngewebe und weisen daher auf eine mögliche Rolle des Diversin Proteins in der Gliomprogression hin. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wang et al., die bereits eine Korrelation zwischen der Diversin Expression und Tumorgrad bei Gliomen feststellen konnten (124). In Brustkrebs, NSCLC sowie kolorektalen Karzinomen konnte ebenfalls eine Diversin Überexpression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Des Weiteren korrelierte eine Diversin Überexpression bei allen drei Tumorarten signifikant mit dem TNM Status der beiden Tumorarten (73,121,125).

Obwohl die Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind, liefert insbesondere die Studie von Wang et al. Hinweise, die auf einen tumorprogressiven Einfluss von Diversin in Gliomen hindeuten: Knockdown von Diversin mittels siRNA führte in den behandelten Glioblastom Zelllinien zu vermindertem Wachstum sowie Invasivität. Außerdem zeigten diese Zellen einen verminderten Gehalt an MMP9 und aktivierter JNK (phospho-JNK) (124). Beide Proteine zeigen invasive und proliferative Eigenschaften und scheinen mit Diversin in Verbindung zu stehen. Als Teil des nicht kanonischen WNT Signalweges führt Diversin zu einer erhöhten Aktivität von JNK abhängigen Genexpressionen (69). Sowohl bei NSCLC als auch Brustkrebs weisen Studien daraufhin, dass Diversin über eine vermehrte Aktivierung des JNK Signalwegs fördernd auf Tumorinvasion und -proliferation wirkt (73,121). Des Weiteren zeigt sich für phospho-JNK in Gliomen ein ähnliches Expressionsmuster, wie es in der vorliegenden Studie für Diversin ermittelt wurde: In WHO III und IV Gliomen ist es stärker exprimiert als in niedriggradigen WHO II Gliomen (126). In mit Diversin transfizierten NSCLC Zellen kommt es außerdem zu einer JNK abhängigen Expression von MMP9 (121). MMP9 ist in höhergradigen Gliomen stärker exprimiert als in niedriggradigen und eine Überexpression führte in Glioblastom Zelllinien zu

erhöhter Proliferation (127). MMP9 fördert über die Degradation von Extrazellulärer Matrix außerdem die Invasivität von Tumoren (128). Diversin könnte also über JNK und MMP9 zu den proliferativen und invasiven Eigenschaften der höhergradigen WHO III und IV Gliomen beitragen, was die Diversin Überexpression in diesen Geweben erklären würde.

Bai et al. konnten eine prognostische und immunregulative Rolle von Diversin in Kolonkarzinomen aufzeigen. Dabei untersuchten sie die Diversin Expression auch in anderen Tumorarten und wiesen auch eine Korrelation dieser mit infiltrierenden Immunzellen wie Lymphozyten und Makrophagen in Glioblastomen nach (122). Zhao et al. konnten ebenfalls Korrelationen der Diversin Expression und infiltrierenden Immunzellen in Adenokarzinomen des Kolons aufzeigen (123). In Dickdarmkrebs konnten Bai et al. zusätzlich eine Korrelation der Diversin Expression mit der Infiltration von tumorprogressiven M2 Makrophagen feststellen (122). Diese sind ebenfalls in höhergradigen Gliomen vermehrt präsent und führen zu einer immunsuppressiven Umgebung des Tumors, die die Tumorbekämpfung erschwert (104). Diversin könnte somit auch über die Beeinflussung immunologischer Prozesse zur Gliomprogression beitragen.

Luan et al. wiesen in Zellen von Kolorektalen Karzinomen nach, dass eine Überregulation von Diversin mit verminderter Aktivität von den Zyklusinhibitoren p21 und p27 einhergeht. Dies führt zu einer Entthemmung Cyclin-abhängiger Kinasen, die den Zellzyklus aktivieren und so die Zellproliferation unterstützen (125). Für beide Inhibitoren konnte eine tumorsuppressive Wirkung auch in Glioblastomen nachgewiesen werden (129,130). Die Diversin Überexpression in höhergradigen Gliomen könnte somit auch durch Hemmung von p21 und p27 zur Progression beitragen.

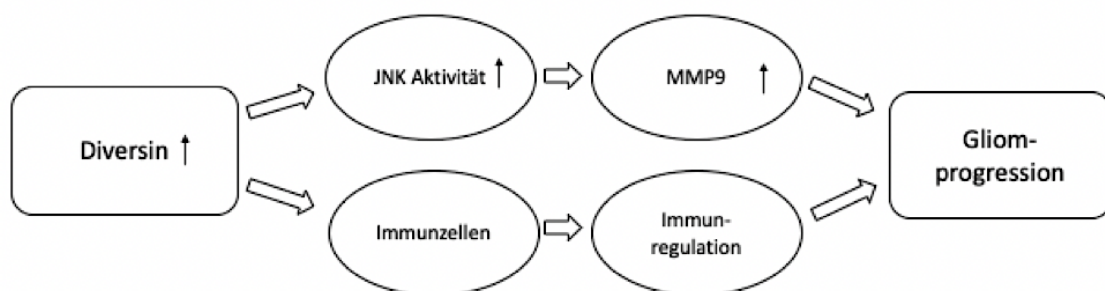


Abb. 14. Diversin: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen

4.5 AGTRAP/ALKBH3

Die Studienlage zeigt, dass Kombinationen von Biomarkern in Tumoren häufig eine größere prognostisch beziehungsweise therapeutisch relevante Aussagekraft besitzen als die Betrachtung eines einzelnen Markers. Mammakarzinome können anhand einer Kombination aus Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, und HER2-Status sowie des Ki-67-Proliferationsindex in Subtypen eingeteilt werden, die sich in ihrer prognostischer und therapeutischer Konsequenz unterscheiden (131). In Glioblastomen stellte sich außerdem heraus, dass die Markerkombination aus MGMT Methylierungsstatus und IDH1 Mutationsstatus eine bessere prognostische Aussagekraft für das Gesamtüberleben besitzt als die einzelnen Marker allein (132). Weller et al. zeigten in einer immunhistochemischen Analyse auf, dass die prognostische Aussagekraft der Kombination von FoxP3, einem Marker für regulatorische T-Zellen, mit den Tumormarkern AHNAK bzw. CORTACTIN in Larynx- bzw. Oro-hypopharynx Plattenepithelkarzinomen der Aussagekraft des Markers FoxP3 allein überlegen ist (133). Kim et al. wiesen außerdem nach, dass das Hinzuziehen von mehreren Biomarkern die prognostische Aussagekraft bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle verbessert (134).

In der vorliegenden Studie konnten zwei Proteine identifiziert werden, deren Expressionen einen prognostischen Wert bzgl. des Gesamtüberlebens von Glioblastompatient*innen aufweisen. Bei der Analyse der Kombination der Biomarker wurden die zwei Patientengruppen gegenübergestellt, die das ungünstigste Expressionsprofil (AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low}) bzw. das günstigste Expressionsprofil (AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high}) dieser Proteine aufweisen. Die AGTRAP^{high} / ALKBH3^{low} Gruppe zeigt eine deutlich kürzere mediane Gesamt- und Rezidiv-freie Überlebenszeit als die AGTRAP^{low} / ALKBH3^{high} Gruppe. Das Sterberisiko ist 2,4-fach erhöht. Ein solcher Unterschied zwischen den Patientengruppen konnte bei der Analyse der einzelnen Biomarkerexpressionen nicht erreicht werden. Dort zeigte sich bei Patient*innen mit hoher AGTRAP bzw. niedriger ALKBH3 Expression ein jeweils etwa 1,5-fach erhöhtes Sterberisiko. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass auch hier die Kombination der Biomarker im Vergleich zu den einzelnen Biomarkern in ihrer prognostischen Aussagekraft überlegen ist.

Diese Ergebnisse lassen des Weiteren vermuten, dass eine hohe AGTRAP Expression in Kombination mit einer geringen ALKBH3 Expression einen stark

tumorprogressiven Einfluss in primären Glioblastomen hat. Jedoch ist nicht klar, ob diese Wirkung additiv oder synergistisch ist. Eine mögliche Beziehung zwischen AGTRAP und ALKBH3 konnte bisher in keiner Studie nachgewiesen werden. Die Ursachen für die tumorprogressive Rolle von AGTRAP in Glioblastomen scheinen eher Interaktionen mit den MAPK und Akt/mTOR Signalwegen, dem Tumorsuppressor p-16 oder eine immunsuppressive Wirkung zu sein (siehe 4.2). Die tumorsuppressive Rolle von ALKBH3 in Glioblastomen könnte dagegen eher an der DNA und mRNA modulierenden Wirkung liegen, die zu einer Verminderung der Mutationslast oder der verminderten Expression bestimmter tumorprogressiver Proteine führen (siehe 4.3). Somit scheinen eine erhöhte AGTRAP und erniedrigte ALKBH3 Expression die Glioblastom Progression eher unabhängig voneinander bzw. additiv zu begünstigen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine auch miteinander interagieren bzw. synergistisch wirken. Dies lässt sich aufgrund der vorliegenden Arbeit und der Studienlage nicht abschließend sagen und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.6 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnten mit AGTRAP und ALKBH3 zwei der drei untersuchten Proteine als mögliche prognostisch relevante Biomarker im primären Glioblastom identifiziert werden. Für Diversin konnte keine prognostische Relevanz festgestellt werden, jedoch weisen die hier ermittelten Ergebnisse und die Studienlage dennoch auf eine mögliche Rolle von Diversin in der Gliomprogression hin. Für AGTRAP und ALKBH3 ließen sich anhand verschiedener Studien vielversprechende Hypothesen aufstellen, wie sie die Progression des Glioblastoms beeinflussen könnten. Die hier ermittelten Ergebnisse und diskutierten Wirkungsweisen der Proteine sollten in zukünftigen Studien validiert und genauer aufgeklärt werden, um einen möglichen diagnostischen oder auch therapeutischen Nutzen in der Gliom- und vor allem Glioblastombehandlung zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Proteine AGTRAP, ALKBH3 und Diversin in primären Glioblastomen sowie WHO II und III Gliomen untersucht und auf eine mögliche prognostische Relevanz hin geprüft. Als Kohorte dienten 263 Patient*innen, die zwischen 2005 und 2018 am Universitätsklinikum Magdeburg operiert wurden. Aus den entnommenen Geweben wurden Tissue Microarrays erstellt und die Proteine mittels Immunhistochemie angefärbt. Anschließend wurde die Färbung der Proben anhand des H-Scores durch mindestens zwei unabhängige Begutachter beurteilt. Unter Anwendung des Mann-Whitney-U Tests, Log-Rank Tests, Spearman Korrelationstests und Cox-Regressionstests wurden Assoziationen zwischen den drei Marker Kandidaten und verschiedenen klinischen Parameter ermittelt.

AGTRAP wies zum einen höhere Expressionen in Gliomgeweben als in gesundem Gewebe auf. Zum anderen war eine erhöhte Expression von AGTRAP in Glioblastomgewebe mit einem verringerten Gesamt- sowie Rezidiv-freien Überleben assoziiert. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen dem AGTRAP Expressionsgrad und dem Tumolvolumen aufgezeigt werden. Mit 0,051 zeigte sich AGTRAP in der Multivariatanalyse als annähernd signifikanter prognostischer Faktor bezüglich des Gesamtüberlebens von Glioblastompatient*innen. Für ALKBH3 konnte eine verringerte Expression in Gliomgeweben als in gesundem Gewebe festgestellt werden. Zusätzlich war eine erhöhte ALKBH3 Expression in Glioblastomgewebe mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert und stellte dabei einen unabhängigen prognostischen Faktor dar. Für Diversin zeigten unsere Ergebnisse eine erhöhte Proteinexpression in den höhergradigen Gliomen (WHO III und IV) im Vergleich zu niedriggradigen WHO II Gliomen bzw. gesundem Gehirngewebe. Eine Kombinationsanalyse der AGTRAP und ALKBH3 Expressionen erwies sich prognostisch aussagekräftiger als die Einzelmarkeranalysen. Die Patientengruppe mit einer hohen AGTRAP Expression und einer verminderten ALKBH3 Expression zeigten ein 2,4-fach erhöhtes Sterberisiko im Vergleich zu der Patientengruppe mit einer geringen AGTRAP Expression und hohen ALKBH3 Expression.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten mit AGTRAP und ALKBH3 sowie ihrer Kombination potenzielle Biomarker für primäre Glioblastome identifiziert werden, die in zukünftigen Studien bezüglich ihrer Wirkweise und potenziellen diagnostischen und therapeutischen Wertigkeit untersucht werden können.

Literaturverzeichnis

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology* (2021) 23:1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
2. Forst DA, Nahed BV, Loeffler JS, Batchelor TT. Low-Grade Gliomas. *The Oncologist* (2014) 19:403–413. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0345
3. Lim YJ. Medical Treatment of Pediatric Low-Grade Glioma. *Brain Tumor Res Treat* (2022) 10:221. doi: 10.14791/btrt.2022.0039
4. Weller M, Van Den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, Bendszus M, Balana C, Chinot O, Dirven L, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* (2021) 18:170–186. doi: 10.1038/s41571-020-00447-z
5. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology* (2016) 18:v1–v75. doi: 10.1093/neuonc/now207
6. Wick W., Bendszus M., Goldbrunner R., Grosu A., Hattingen E., Hau P., Herrlinger U., et al., Gliome, S2k-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 30.12.2023) https://register.awmf.org/assets/guidelines/030-099l_S2k_Gliome_2021-07.pdf
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352:987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
8. Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, Auvinen A. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology* (2007) 9:319–325. doi: 10.1215/15228517-2007-016
9. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Lemos AM, Gokaslan A, Cabrera-Aldana EE, Ashary A, Olivi A, Quinones-Hinojosa A. The butterfly effect on glioblastoma: is volumetric extent of resection more effective than biopsy for these tumors? *J Neurooncol* (2014) 120:625–634. doi: 10.1007/s11060-014-1597-9
10. Hanif F, Muzaffar K, Perveen kahkashan, Malhi S, Simjee S. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *APJCP* (2017) 18: doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3
11. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro-Oncology* (2010) 12:104–113. doi: 10.1093/neuonc/nop011
12. Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh

Z, O' Malley C, Naumann H, Alvarez-Buylla A, Brandner S. Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J* (2010) 29:222–235. doi: 10.1038/emboj.2009.327

13. Loras A, Gonzalez-Bonet L, Gutierrez-Arroyo J, Martinez-Cadenas C, Marques-Torrejon M. Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. *Life* (2023) 13:905. doi: 10.3390/life13040905

14. Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* (2013) 19:764–772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002

15. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Research* (2004) 64:6892–6899. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337

16. Hart MG, Grant GR, Solyom EF, Grant R. Biopsy versus resection for high-grade glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2019) 2019: doi: 10.1002/14651858.CD002034.pub2

17. 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) 131:803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1

18. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch* (2017) 471:257–269. doi: 10.1007/s00428-017-2181-4

19. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Reifenberger G, Stupp R, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol* (2018) 136:805–810. doi: 10.1007/s00401-018-1913-0

20. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, Holland EC, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters B, Komori T, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol* (2020) 139:603–608. doi: 10.1007/s00401-020-02127-9

21. Stoyanov GSt, Dzhenkov DL. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia Medica* (2018) 60:48–66. doi: 10.1515/folmed-2017-0069

22. Sibilila M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* (2007) 75:770–787. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x

23. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* (2007) 170:1445–1453. doi:

10.2353/ajpath.2007.070011

24. Sano T, Asai A, Mishima K, Fujimaki T, Kirino T. Telomerase activity in 144 brain tumours. *Br J Cancer* (1998) 77:1633–1637. doi: 10.1038/bjc.1998.267
25. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* (2013) 126:267–276. doi: 10.1007/s00401-013-1141-6
26. Masutomi K, Hahn WC. Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Letters* (2003) 194:163–172. doi: 10.1016/S0304-3835(02)00703-6
27. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, Langberg CW, Lote K, Rønning P, Scheie D, Vik A, Meling TR. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme: Survival, prognostic factors, and repeat surgery in GBM patients. *Acta Neurologica Scandinavica* (2010) 122:159–167. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01350.x
28. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer* (1948) 1:634–656. doi: 10.1002/1097-0142(194811)1:4<634::AID-CNCR2820010410>3.0.CO;2-L
29. Wang J, Hu G, Quan X. Analysis of the factors affecting the prognosis of glioma patients. *Open Medicine* (2019) 14:331–335. doi: 10.1515/med-2019-0031
30. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya R, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* (2016) 2:1460. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1373
31. Sanai N, Polley M-Y, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. *JNS* (2011) 115:3–8. doi: 10.3171/2011.2.JNS10998
32. Tunthanathip T, Madteng S. Factors associated with the extent of resection of glioblastoma. *Precis Cancer Med* (2020) 3:12–12. doi: 10.21037/pcm.2020.01.01
33. Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, Weil S, Horstmann H, Wiestler B, Syed M, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* (2015) 528:93–98. doi: 10.1038/nature16071
34. Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Sandhu N, Knox SJ. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front Oncol* (2021) 10:574012. doi: 10.3389/fonc.2020.574012
35. Bette S, Gempt J, Huber T, Boeckh-Behrens T, Ringel F, Meyer B, Zimmer C, Kirschke JS. Patterns and Time Dependence of Unspecific Enhancement in Postoperative Magnetic Resonance Imaging After Glioblastoma Resection. *World*

Neurosurgery (2016) 90:440–447. doi: 10.1016/j.wneu.2016.03.031

36. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352:987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330

37. Okada M, Miyake K, Tamiya T. Glioblastoma Treatment in the Elderly. *Neurol Med Chir(Tokyo)* (2017) 57:667–676. doi: 10.2176/nmc.ra.2017-0009

38. Zhang J, F.G. Stevens M, D. Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *CMP* (2012) 5:102–114. doi: 10.2174/1874467211205010102

39. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352:997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331

40. Szyłberg M, Sokal P, Śledzińska P, Bebyn M, Krajewski S, Szyłberg Ł, Szyłberg A, Szyłberg T, Krystkiewicz K, Birski M, et al. *MGMT* Promoter Methylation as a Prognostic Factor in Primary Glioblastoma: A Single-Institution Observational Study. *Biomedicines* (2022) 10:2030. doi: 10.3390/biomedicines10082030

41. Kim YS, Kim SH, Cho J, Kim JW, Chang JH, Kim DS, Lee KS, Suh C-O. *MGMT* Gene Promoter Methylation as a Potent Prognostic Factor in Glioblastoma Treated With Temozolomide-Based Chemoradiotherapy: A Single-Institution Study. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* (2012) 84:661–667. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.12.086

42. Campos B, Olsen LR, Urup T, Poulsen HS. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene* (2016) 35:5819–5825. doi: 10.1038/onc.2016.85

43. Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The Angiotensin II Type I Receptor-associated Protein, ATRAP, Is a Transmembrane Protein and a Modulator of Angiotensin II Signaling. *MBoC* (2003) 14:5038–5050. doi: 10.1091/mbc.e03-06-0383

44. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* (2008) 264:224–236. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x

45. Wakui H. The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein in hypertension and kidney diseases: Oshima Award Address 2019. *Clin Exp Nephrol* (2020) 24:289–294. doi: 10.1007/s10157-020-01861-4

46. Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today* (2011) 16:22–34. doi: 10.1016/j.drudis.2010.11.016

47. Wang W, Huang Y, Zhou Z, Tang R, Zhao W, Zeng L, Xu M, Cheng C, Gu S, Ying K, et al. Identification and characterization of AGTRAP, a human homolog of

murine Angiotensin II Receptor-Associated Protein (Agtrap). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2002) 34:93–102. doi: 10.1016/S1357-2725(01)00094-2

48. Haruhara K, Wakui H, Azushima K, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, et al. Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. *Atherosclerosis* (2018) 269:236–244. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.013
49. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* (2019) 51:27–41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025
50. Smith GR, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *Journal of Inflammation* (2004) 1:3. doi: 10.1186/1476-9255-1-3
51. Huang W, Yu L-F, Zhong J, Qiao M-M, Jiang F-X, Du F, Tian X-L, Wu Y-L. Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Human Gastric Cancer and Induces MMP2 and MMP9 Expression in MKN-28 Cells. *Dig Dis Sci* (2008) 53:163–168. doi: 10.1007/s10620-007-9838-9
52. Ren H. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep* (2012) doi: 10.3892/or.2012.1720
53. Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernández-Pedro N, Morales-Espinosa D, Cerón-Lizarraga TL, González-De la Rosa CH, Rembao D, Segura-Pacheco B, Sotelo J. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer* (2008) 99:160–166. doi: 10.1038/sj.bjc.6604431
54. Liu S, Zhao W, Li X, Zhang L, Gao Y, Peng Q, Du C, Jiang N. AGTRAP Is a Prognostic Biomarker Correlated With Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* (2021) 11:713017. doi: 10.3389/fonc.2021.713017
55. Duncan T, Trewick SC, Koivisto P, Bates PA, Lindahl T, Sedgwick B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:16660–16665. doi: 10.1073/pnas.262589799
56. Aas PA, Otterlei M, Falnes PØ, Vågbø CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjørås M, Slupphaug G, Seeberg E, et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* (2003) 421:859–863. doi: 10.1038/nature01363
57. Dango S, Mosammamaparast N, Sowa ME, Xiong L-J, Wu F, Park K, Rubin M, Gygi S, Harper JW, Shi Y. DNA Unwinding by ASCC3 Helicase Is Coupled to ALKBH3-Dependent DNA Alkylation Repair and Cancer Cell Proliferation. *Molecular Cell* (2011) 44:373–384. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.039
58. Shrivastav N, Li D, Essigmann JM. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* (2010) 31:59–70. doi: 10.1093/carcin/bgp262

59. Klapacz J, Pottenger LH, Engelward BP, Heinen CD, Johnson GE, Clewell RA, Carmichael PL, Adeleye Y, Andersen ME. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2016) 767:77–91. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.11.001
60. Hegi ME, Diserens A-C, Godard S, Dietrich P-Y, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R. Clinical Trial Substantiates the Predictive Value of **O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase** Promoter Methylation in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide. *Clinical Cancer Research* (2004) 10:1871–1874. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0384
61. Johannessen T-CA, Prestegarden L, Grudic A, Hegi ME, Tysnes BB, Bjerkvig R. The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells. *Neuro-Oncology* (2013) 15:269–278. doi: 10.1093/neuonc/nos301
62. Konishi N, Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Mitsui E, Yoshikawa R, Yamamoto H, Tsujikawa K. High Expression of a New Marker PCA-1 in Human Prostate Carcinoma. *Clin Cancer Res* (2005) 11:5090–5097. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0195
63. Yamato I, Sho M, Shimada K, Hotta K, Ueda Y, Yasuda S, Shigi N, Konishi N, Tsujikawa K, Nakajima Y. PCA-1/ALKBH3 Contributes to Pancreatic Cancer by Supporting Apoptotic Resistance and Angiogenesis. *Cancer Res* (2012) 72:4829–4839. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0328
64. Stefansson OA, Hermanowicz S, van der Horst J, Hilmarsdottir H, Staszczak Z, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Gudjonsson T, Sigurdsson S. CpG promoter methylation of the ALKBH3 alkylation repair gene in breast cancer. *BMC Cancer* (2017) 17:469. doi: 10.1186/s12885-017-3453-8
65. Wu G, Yan Y, Cai Y, Peng B, Li J, Huang J, Xu Z, Zhou J. ALKBH1-8 and FTO: Potential Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers in Lung Adenocarcinoma Pathogenesis. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:633927. doi: 10.3389/fcell.2021.633927
66. Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer H-J, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W. The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev* (2002) 16:2073–2084. doi: 10.1101/gad.230402
67. Wnt signaling pathway in development and cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology* (2018) doi: 10.26402/jpp.2018.2.07
68. van Kappel EC, Maurice MM. Molecular regulation and pharmacological targeting of the β -catenin destruction complex: Regulation of the β -catenin destruction complex. *British Journal of Pharmacology* (2017) 174:4575–4588. doi: 10.1111/bph.13922

69. Haribaskar R, Pütz M, Schupp B, Skouloudaki K, Bietenbeck A, Walz G, Schäfer T. The planar cell polarity (PCP) protein Diversin translocates to the nucleus to interact with the transcription factor AF9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2009) 387:212–217. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.012
70. Moeller H, Jenny A, Schaeffer H-J, Schwarz-Romond T, Mlodzik M, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103:15900–15905. doi: 10.1073/pnas.0603808103
71. Polakis P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2012) 4:a008052–a008052. doi: 10.1101/cshperspect.a008052
72. Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms LA, Huse JT, Tabar V, Hall A. Dishevelled 2 Signaling Promotes Self-Renewal and Tumorigenicity in Human Gliomas. *Cancer Research* (2011) 71:7280–7290. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1531
73. Yu X, Wang M, Dong Q, Jin F. Diversin Is Overexpressed in Breast Cancer and Accelerates Cell Proliferation and Invasion. *PLoS ONE* (2014) 9:e98591. doi: 10.1371/journal.pone.0098591
74. Abedi AA, Grunnet K, Christensen IJ, Michaelsen SR, Muhic A, Møller S, Hasselbalch B, Poulsen HS, Urup T. A Prognostic Model for Glioblastoma Patients Treated With Standard Therapy Based on a Prospective Cohort of Consecutive Non-Selected Patients From a Single Institution. *Front Oncol* (2021) 11:597587. doi: 10.3389/fonc.2021.597587
75. Nava F, Tramacere I, Fittipaldo A, Bruzzone MG, DiMeco F, Fariselli L, Finocchiaro G, Pollo B, Salmaggi A, Silvani A, et al. Survival effect of first- and second-line treatments for patients with primary glioblastoma: a cohort study from a prospective registry, 1997-2010. *Neuro-Oncology* (2014) 16:719–727. doi: 10.1093/neuonc/not316
76. Gittleman H, Lim D, Kattan MW, Chakravarti A, Gilbert MR, Lassman AB, Lo SS, Machtay M, Sloan AE, Sulman EP, et al. An independently validated nomogram for individualized estimation of survival among patients with newly diagnosed glioblastoma: NRG Oncology RTOG 0525 and 0825. *NEUONC* (2016)now208. doi: 10.1093/neuonc/now208
77. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* (2008) 26:4189–4199. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5964
78. Cheng H-B, Yue W, Xie C, Zhang R-Y, Hu S-S, Wang Z. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumor Biol* (2013) 34:3555–3559. doi: 10.1007/s13277-013-0934-5
79. Wu C-X, Lin G-S, Lin Z-X, Zhang J-D, Liu S-Y, Zhou C-F. Peritumoral edema shown by MRI predicts poor clinical outcome in glioblastoma. *World J Surg Onc*

(2015) 13:97. doi: 10.1186/s12957-015-0496-7

80. Ahmadipour Y, Jabbarli R, Gembruch O, Pierscianek D, Darkwah Oppong M, Dammann P, Wrede K, Özkan N, Müller O, Sure U, et al. Impact of Multifocality and Molecular Markers on Survival of Glioblastoma. *World Neurosurgery* (2019) 122:e461–e466. doi: 10.1016/j.wneu.2018.10.075

81. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, Fersht N, Mulholland P. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers* (2022) 14:3161. doi: 10.3390/cancers14133161

82. Haj A, Doenitz C, Schebesch K-M, Ehrensberger D, Hau P, Putnik K, Riemenschneider M, Wendl C, Gerken M, Pukrop T, et al. Extent of Resection in Newly Diagnosed Glioblastoma: Impact of a Specialized Neuro-Oncology Care Center. *Brain Sciences* (2017) 8:5. doi: 10.3390/brainsci8010005

83. Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams H-P, Kunze S. Early Postoperative Magnetic Resonance Imaging after Resection of Malignant Glioma: Objective Evaluation of Residual Tumor and Its Influence on Regrowth and Prognosis. *Neurosurgery* (1994) 34:45–61. doi: 10.1097/00006123-199401000-00008

84. Jawhar NMT. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi Medicine* (2009) 29:123–127. doi: 10.4103/0256-4947.51806

85. Chiesa-Vottero AG, Rybicki LA, Prayson RA. Comparison of Proliferation Indices in Glioblastoma Multiforme by Whole Tissue Section vs Tissue Microarray. *Am J Clin Pathol* (2003) 120:902–908. doi: 10.1309/8UAUKFK3NBDMVTNU

86. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Validation of Tissue Microarrays for Immunohistochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *The American Journal of Pathology* (2001) 158:1245–1251. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64075-8

87. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma. *Lab Invest* (2000) 80:1943–1949. doi: 10.1038/labinvest.3780204

88. Alkushi A. Validation of tissue microarray biomarker expression of breast carcinomas in Saudi women. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* (2009) 2:394–398. doi: 10.1016/S1658-3876(09)50007-6

89. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* (2001) 7:24–31.

90. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. “An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry.” In: Yong WH, editor. *Biobanking. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York (2019). p. 289–298 doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_25

91. Zeng H, Li H, Zhao Y, Chen L, Ma X. Transcripto-based network analysis reveals a model of gene activation in tongue squamous cell carcinomas. *Head & Neck* (2019) 41:4098–4110. doi: 10.1002/hed.25952
92. Wang L, Zhang W, Yang T, He L, Liao Y, Lu J. Construction and Comprehensive Analysis of a Stratification System Based on AGTRAP in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Disease Markers* (2021) 2021:1–18. doi: 10.1155/2021/6144476
93. Wang D, Jin X, Lei M, Jiang Y, Liu Y, Yu F, Guo Y, Han B, Yang Y, Sun W, et al. USF1-ATRAP-PBX3 Axis Promote Breast Cancer Glycolysis and Malignant Phenotype by Activating AKT/mTOR Signaling. *Int J Biol Sci* (2022) 18:2452–2471. doi: 10.7150/ijbs.69134
94. Krishna KV, Dubey SK, Singhvi G, Gupta G, Kesharwani P. MAPK pathway: Potential role in glioblastoma multiforme. *Interdisciplinary Neurosurgery* (2021) 23:100901. doi: 10.1016/j.inat.2020.100901
95. Braicu, Buse, Busuioc, Drula, Gulei, Raduly, Rusu, Irimie, Atanasov, Slaby, et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* (2019) 11:1618. doi: 10.3390/cancers11101618
96. Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* (2016) 7:33440–33450. doi: 10.18632/oncotarget.7961
97. Zhou Y, Meng X, He W, Li X, Zhao R, Dong C, Yuan D, Yang J, Zhang R, Shi G, et al. *USF1 / CD90* signaling in maintaining glioblastoma stem cells and tumor-associated macrophages adhesion. *Neuro-Oncology* (2022) 24:1482–1493. doi: 10.1093/neuonc/noac063
98. Xu X, Bao Z, Liu Y, Jiang K, Zhi T, Wang D, Fan L, Liu N, Ji J. PBX3/MEK/ERK1/2/LIN28/let-7b positive feedback loop enhances mesenchymal phenotype to promote glioblastoma migration and invasion. *J Exp Clin Cancer Res* (2018) 37:158. doi: 10.1186/s13046-018-0841-0
99. Mendaza S, Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, Zudaire T, Guarch R, Guerrero-Setas D, Vidal A, Santos-Salas J, Matias-Guiu X, Ausín K, et al. Absence of Nuclear p16 Is a Diagnostic and Independent Prognostic Biomarker in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *IJMS* (2020) 21:2125. doi: 10.3390/ijms21062125
100. Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, Sinn H. Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation. *Br J Cancer* (1998) 78:1661–1668. doi: 10.1038/bjc.1998.739
101. Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Nakamura H, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery* (2002) 96:815–822. doi: 10.3171/jns.2002.96.5.0815

102. Himes BT, Geiger PA, Ayasoufi K, Bhargav AG, Brown DA, Parney IF. Immunosuppression in Glioblastoma: Current Understanding and Therapeutic Implications. *Front Oncol* (2021) 11:770561. doi: 10.3389/fonc.2021.770561
103. Hong K, Zhang Y, Yao L, Zhang J, Sheng X, Song L, Guo Y, Guo Y. Pan-cancer analysis of the angiotensin II receptor-associated protein as a prognostic and immunological gene predicting immunotherapy responses in pan-cancer. *Front Cell Dev Biol* (2022) 10:913684. doi: 10.3389/fcell.2022.913684
104. Vidyarthi A, Agnihotri T, Khan N, Singh S, Tewari MK, Radotra BD, Chatterjee D, Agrewala JN. Predominance of M2 macrophages in gliomas leads to the suppression of local and systemic immunity. *Cancer Immunol Immunother* (2019) 68:1995–2004. doi: 10.1007/s00262-019-02423-8
105. Xiong Z, Xiong Y, Liu H, Li C, Li X. Identification of purity and prognosis-related gene signature by network analysis and survival analysis in brain lower grade glioma. *J Cell Mol Med* (2020) 24:11607–11612. doi: 10.1111/jcmm.15805
106. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* (2019) 37:457–495. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055318
107. Woroniecka K, Chongsathidkiet P, Rhodin K, Kemeny H, Dechant C, Farber SH, Elsamadicy AA, Cui X, Koyama S, Jackson C, et al. T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* (2018) 24:4175–4186. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1846
108. Yang I, Tihan T, Han SJ, Wrensch MR, Wiencke J, Sughrue ME, Parsa AT. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *Journal of Clinical Neuroscience* (2010) 17:1381–1385. doi: 10.1016/j.jocn.2010.03.031
109. Pilżys T, Marcinkowski M, Kukwa W, Garbicz D, Dylewska M, Ferenc K, Mieczkowski A, Kukwa A, Migacz E, Wołosz D, et al. ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy. *Sci Rep* (2019) 9:13249. doi: 10.1038/s41598-019-49550-x
110. Hotta K, Sho M, Fujimoto K, Shimada K, Yamato I, Anai S, Harada H, Tsujikawa K, Konishi N, Shinohara N, et al. Clinical significance and therapeutic potential of prostate cancer antigen-1/ALKBH3 in human renal cell carcinoma. *Oncology Reports* (2015) 34:648–654. doi: 10.3892/or.2015.4017
111. Esteve-Puig R, Climent F, Piñeyro D, Domingo-Domènech E, Davalos V, Encuentra M, Rea A, Espejo-Herrera N, Soler M, Lopez M, et al. Epigenetic loss of m1A RNA demethylase ALKBH3 in Hodgkin lymphoma targets collagen, conferring poor clinical outcome. *Blood* (2021) 137:994–999. doi: 10.1182/blood.2020005823
112. Feng S, Xu Z, Peng J, Zhang M. The AlkB Family: Potential Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Front Oncol* (2022) 12:847821. doi: 10.3389/fonc.2022.847821

113. Zhao Y, Majid MC, Soll JM, Brickner JR, Dango S, Mosammaparast N. Noncanonical regulation of alkylation damage resistance by the OTUD 4 deubiquitinase. *The EMBO Journal* (2015) 34:1687–1703. doi: 10.15252/embj.201490497
114. You X-J, Zhang S, Chen J-J, Tang F, He J, Wang J, Qi C-B, Feng Y-Q, Yuan B-F. Formation and removal of 1, N 6-dimethyladenosine in mammalian transfer RNA. *Nucleic Acids Research* (2022) 50:9858–9872. doi: 10.1093/nar/gkac770
115. Sedgwick B, Bates P, Paik J, Jacobs S, Lindahl T. Repair of alkylated DNA: Recent advances. *DNA Repair* (2007) 6:429–442. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.005
116. Nieminuszczy J, Mielecki D, Sikora A, Wrzesiński M, Chojnacka A, Krwawicz J, Janion C, Grzesiuk E. Mutagenic potency of MMS-induced 1meA/3meC lesions in *E. coli*. *Environ Mol Mutagen* (2009) 50:791–799. doi: 10.1002/em.20497
117. Delaney JC, Essigmann JM. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanine, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2004) 101:14051–14056. doi: 10.1073/pnas.0403489101
118. Calvo JA, Meira LB, Lee C-YI, Moroski-Erkul CA, Abolhassani N, Taghizadeh K, Eichinger LW, Muthupalani S, Nordstrand LM, Klungland A, et al. DNA repair is indispensable for survival after acute inflammation. *J Clin Invest* (2012) 122:2680–2689. doi: 10.1172/JCI63338
119. Kruse C, Liao L, Prins R, Antonios J, Ha E, Kasahara N, Soto H, Yang I. Chronic inflammation drives glioma growth: cellular and molecular factors responsible for an immunosuppressive microenvironment. *Neuroimmunol Neuroinflammation* (2014) 1:66. doi: 10.4103/2347-8659.139717
120. Pencheva N, de Gooijer MC, Vis DJ, Wessels LFA, Würdinger T, van Tellingen O, Bernards R. Identification of a Druggable Pathway Controlling Glioblastoma Invasiveness. *Cell Reports* (2017) 20:48–60. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.036
121. Luan L, Zhao Y, Xu Z, Jiang G, Zhang X, Fan C, Liu D, Zhao H, Xu K, Wang M, et al. Diversin increases the proliferation and invasion ability of non-small-cell lung cancer cells via JNK pathway. *Cancer Letters* (2014) 344:232–238. doi: 10.1016/j.canlet.2013.10.033
122. Bai R, Wu D, Shi Z, Hu W, Li J, Chen Y, Ge W, Yuan Y, Zheng S, Department of Medical Oncology, Key Laboratory of Cancer Prevention and Intervention, Ministry of Education, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China, et al. Pan-cancer analyses demonstrate that ANKRD6 is associated with a poor prognosis and correlates with M2 macrophage infiltration in colon cancer. *Chinese Journal of Cancer Research* (2021) 33:93–102. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2021.01.10
123. Zhao H, Liu G, Li Y, Yang N, Zhao J. [High expression of ANKRD6 is an indicator for poor prognosis of colon adenocarcinoma]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue*

Bao (2023) 43:1715–1724. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2023.10.09

124. Wang M, Yu X, Dong Q, Wang Y. Diversin is overexpressed in human gliomas and its depletion inhibits proliferation and invasion. *Tumor Biol* (2014) 35:7905–7909. doi: 10.1007/s13277-014-2028-4

125. Luan L, Li N, Zhang K, Wang X, Pan H. Diversin upregulates the proliferative ability of colorectal cancer by inducing cell cycle proteins. *Experimental and Molecular Pathology* (2023) 129:104850. doi: 10.1016/j.yexmp.2023.104850

126. Li JY, Wang H, May S, Song X, Fueyo J, Fuller GN, Wang H. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase correlates with histologic grade and EGFR expression in diffuse gliomas. *J Neurooncol* (2008) 88:11–17. doi: 10.1007/s11060-008-9529-1

127. Xue Q, Cao L, Chen X-Y, Zhao J, Gao L, Li S-Z, Fei Z. High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncology Letters* (2017) 13:1325–1330. doi: 10.3892/ol.2017.5567

128. Vihinen P, Ala-aho R, Kahari V-M. Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets in Cancer. *CCDT* (2005) 5:203–220. doi: 10.2174/1568009053765799

129. Mansour MA, Rahman M, Ayad AA, Warrington AE, Burns TC. P21 Overexpression Promotes Cell Death and Induces Senescence in Human Glioblastoma. *Cancers* (2023) 15:1279. doi: 10.3390/cancers15041279

130. Schiappacassi M, Lovat F, Canzonieri V, Belletti B, Berton S, Di Stefano D, Vecchione A, Colombatti A, Baldassarre G. p27Kip1 expression inhibits glioblastoma growth, invasion, and tumor-induced neoangiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics* (2008) 7:1164–1175. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2154

131. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* (2009) 101:736–750. doi: 10.1093/jnci/djp082

132. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, Zanon C, Jeuken JWM, Boots-Sprenger SHE, Wesseling P, Hulsebos TJM, Troost D, van Tilborg AA, et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro-Oncology* (2014) 16:1263–1273. doi: 10.1093/neuonc/nou005

133. Weller P, Bankfalvi A, Gu X, Dominas N, Lehnerdt GF, Zeidler R, Lang S, Brandau S, Dumitru CA. The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer. *European Journal of Cancer* (2014) 50:1291–1300. doi: 10.1016/j.ejca.2014.02.016

134. Kim K, Li S, Cha J, Zhang X, Cha I. Significance of molecular markers in survival prediction of oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* (2012) 34:929–936. doi: 10.1002/hed.21856

Danksagungen

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

Biomarker in Primären Glioblastomen und Gliomen: Prognostische Relevanz von AGTRAP, ALKBH3 und Diversin

in der Klinik der Klinik für Neurochirurgie

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Erol Sandalcioglu und Frau Dr. Claudia Dumitru

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

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

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

Magdeburg, den

Nikolas Walter

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Färbeverhalten von AGTRAP, ALKBH3 und Diversin in den Gewebeschnitten	Seite 16
Abbildung 2	AGTRAP: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 19
Abbildung 3	AGTRAP: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 21
Abbildung 4	AGTRAP: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 22
Abbildung 5	ALKBH3: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 25
Abbildung 6	ALKBH3:Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 26
Abbildung 7	ALKBH3: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 27
Abbildung 8	Diversin: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 30
Abbildung 9	Diversin: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 31
Abbildung 10	Diversin: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 32
Abbildung 11	AGTRAP/ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen	Seite 34
Abbildung 12	AGTRAP: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen	Seite 40
Abbildung 13	ALKBH3: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen	Seite 43
Abbildung 14	Diversin: Zusammenfassung der möglichen Wirkungsweisen	Seite 45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakteristika des Patientenkollektivs	Seite 10
Tabelle 2	Laboraausstattung	Seite 11
Tabelle 3	Material	Seite 11
Tabelle 4	Chemikalien	Seite 12
Tabelle 5	Antikörper	Seite 12
Tabelle 6	Software	Seite 12
Tabelle 7	AGTRAP: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 19
Tabelle 8	AGTRAP: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 21
Tabelle 9	AGTRAP: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 22
Tabelle 10	AGTRAP: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen	Seite 23
Tabelle 11	AGTRAP: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen	Seite 24
Tabelle 12	ALKBH3: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 25
Tabelle 13	ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 26
Tabelle 14	Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 27
Tabelle 15	ALKBH3: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen	Seite 28
Tabelle 16	ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen	Seite 29
Tabelle 17	Diversin: Expression in Gesundem versus Tumorgewebe	Seite 30
Tabelle 18	Diversin: Univariatanalyse des Gesamtüberlebens bei Gliompatient*innen	Seite 31
Tabelle 19	Diversin: Univariatanalyse des Rezidiv-freien Überlebens bei Gliompatient*innen	Seite 32
Tabelle 20	Diversin: Bivariate Korrelationsanalyse mit Tumorparametern bei Gliompatient*innen	Seite 33
Tabelle 21	AGTRAP/ALKBH3: Univariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen	Seite 34
Tabelle 22	AGTRAP/ALKBH3: Multivariatanalyse des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens bei Glioblastompatient*innen	Seite 35