

Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. R.-I. Ernestus

MACC1 – ein prognostischer Blutmarker für das Überleben

von Patienten mit Glioblastoma multiforme?

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nikolas Neuhaus

aus Münster

Würzburg, Oktober 2022

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. rer nat. Carsten Hagemann

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Störk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag des Promotionskolloquiums

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie, meine Eltern, meine Geschwister, meine Frau Sophia und meine Kinder
Jakob und Lotta

Die Daten der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert.

Hagemann C, **Neuhaus N**, Dahlmann M, Kessler AF, Kobelt D, Herrmann P, Eyrich M, Freitag B, Linsenmann T, Monoranu CM, Ernestus RI, Löhr M, Stein U. Circulating MACC1 Transcripts in Glioblastoma Patients Predict Prognosis and Treatment Response. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 13;11(6):825.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hypothese.....	7
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Materialien	8
2.1.1	Geräte.....	8
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	9
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	9
2.1.4	Antikörper.....	11
2.1.5	Kits.....	11
2.1.6	Primer	12
2.1.7	Software.....	12
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Patientenkohorte	12
2.2.2	MACC1 mRNA Transkript-Konzentration	14
2.2.3	IDH1-Mutationsstatus	14
2.2.4	MGMT-Promotormethylierungsstatus	16
2.2.5	Tumorvolumetrie	20
2.2.6	Statistische Methoden.....	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Das Patientenkollektiv.....	21
3.2	Statistische Analysen.....	24
3.2.1	GBM versus Kontrollen.....	24
3.2.2	GBM IDH1 Status versus Kontrollen.....	24
3.2.3	Gesamtcluster	29
3.2.4	Gesamtpatientenkohorte	32
3.2.5	Standardtherapie nach Stupp	34
3.2.5.1	IDH1 Mutationsstatus.....	34
3.2.6	Clusteranalysen.....	34
3.2.6.1	Clusteranalysen der MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen in Kombination mit der TMZ-Chemotherapie	34

3.2.6.2	Clusteranalysen der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration in Kombination mit dem IDH1 Mutationsstatus	35
4	Diskussion.....	41
4.1	Schlussfolgerungen für die Praxis und für weitere Untersuchungen	43
5	Zusammenfassung	44
6	Literatur.....	46

Appendixverzeichnis

- I Abkürzungsverzeichnis
- II Abbildungsverzeichnis
- III Tabellenverzeichnis
- IV Danksagung
- V Lebenslauf
- VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen
- VII Eidesstattliche Erklärung

1 Einleitung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein aggressiver, invasiver und schwer zu behandelnder primärer Hirntumor bei Erwachsenen [1, 2].

Kennzeichnend sind das invasive Wachstum, die rasche Proliferation, sowie die Rezidivneigung. Die Gliomagenese zeigt die typischen Zeichen der Tumorentstehung, auch „hallmarks of cancer“ genannt: Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Resistenz gegen apoptotische Signale, Deregulation von DNA-Reparatur-Genen, Produktion von Faktoren für die Neoangiogenese und obwohl GBM nur äußerst selten metastasieren auch Faktoren, die in die Metastasierung involviert sind [3].

Makroskopisch kennzeichnet das GBM eine zentrale nekrotische Masse, sowie eine periphere Tumorzone [4]. Mikroskopisch zeigen sich pleomorphe mitotisch aktive Zellen, nukleäre Atypien und Nekrosen, sowie eine verstärkte Mikrovaskularisation [4]. GBM treten durchschnittlich im Alter von 62 Jahren auf [5].

Klinisch präsentieren sich Hirntumoren je nach Größe mit fokalen oder zentralen Symptomen [6]. So zeigen sich je nach Tumorlokalisation fokalneurologische Ausfälle, sowie als zentrale Symptome Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen [6], epileptische Anfälle [7] - meist bei schnellem Wachstum - und Verwirrtheit und Wesensänderungen [8].

Die Diagnose des Hirntumors wird durch Kombination von radiologischen und histopathologischen Untersuchungen gestellt [9]. So zeigen sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel typische Merkmale eines Hirntumors: Kontrastmittelaufnehmende irreguläre Masse mit fokalem Ödem und zentraler Nekrose, Mittellinienverschiebung und gegebenenfalls Satellitenläsionen [9]. Jedoch gilt zu beachten, dass aufgrund des radiologischen Bildes verschiedene Differentialdiagnosen wie Hirntuberkulose, Hirnabszesse und opportunistische Infektionen nicht komplett ausgeschlossen werden können [9]. Die anschließende histopathologische Untersuchung eines Hirnbiopsie-Schnittes oder operativen Schnittpräparates gibt klinischen Aufschluss über die Pathologie des Befundes und bestätigt die Diagnose eines GBM [8]. Zudem kann mikroskopisch eine weitere

Unterklassifikation des GBM je nach Vorkommen von Riesenzellen, oligodendritische Komponenten und Gemistozyten erfolgen [4].

In der 2016 von der WHO veröffentlichten Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems wird eine neue Einteilung vorgestellt, in der nicht nur nach pathologischen Kriterien eingeteilt wird; auch molekulargenetische Marker gehen maßgeblich in die Klassifizierung ein [10]. Sie beruht somit auf phänotypischen (histopathologischen) und genotypischen (molekularen) Mustern [10]. Neben den histopathologischen Faktoren haben nun auch molekulare Faktoren wie der Mutationsstatus des Isocitratdehydrogenase-1 (IDH1) -Gens und die 1p/19q-Deletion einen entscheidenden Anteil an der Klassifikation der Gliome. Der IDH1 Mutationstatus wird mittels PCR und Sequenzierung oder Immunhistochemisch durch mutationsspezifische Antikörper nachgewiesen. Die IDH1 und ihr Homologon IDH2 sind Enzyme des Citratzyklus, die α -Ketoglutarat bilden [11]. Mutationen im IDH1-Gen - meist an der Position 132, wobei es zum Austausch von Arginin gegen Histidin kommt (R132H) – führen durch die Carboxylierung von α -Ketoglutarat zu einem erhöhten Umsatz von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), das die Reduktion von Glutathion herabsetzt und so letztendlich zu einer erhöhten Bildung von 2-Hydroxyglutarat führt [12]. Mutiertes IDH1 verliert seine Funktion α -Ketoglutarat im Citratzyklus zu bilden und erhöht stattdessen die Produktion von 2-Hydroxyglutarat [13]. Das erhöhte 2-Hydroxyglutarat ist mit der Tumorgenese sowie mit DNA-Schäden assoziiert [14]. Die IDH1 R132H Mutation bildet einen prognostischen Marker für das Überleben von Glioblastom-Patienten [10].

Der kombinierten Verlust der Allele (loss of heterozygosity, LOH) auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und dem langen Arm von Chromosom 19 (19q), welcher auf eine unbalancierte Translokation ($t(1;19)(q10;p10)$) zurückzuführen ist, wird als 1p/19q-Codeletion in der WHO Klassifikation von 2016 ebenfalls als genetischer Marker aufgeführt [15]. Der kombinierte 1p/19q-Verlust gilt als unabhängiger Marker für die verbesserte Ansprechbarkeit auf Radio- und Chemotherapie, sowie die verlängerte Gesamtüberlebenszeit [16] - dieser Marker gilt jedoch ausschließlich für Astrozytome, Oligoastrozytome und Oligodendrogliome, nicht jedoch für das GBM und fungiert zudem als Unterscheidungsmerkmal dieser Tumorentitäten. (Abbildung 1).

Diese vorliegende Arbeit wurde unter der 2016 WHO Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems erarbeitet und bildet somit die Grundlage der Arbeit bezüglich der Tumorklassifikation [10]. In der aktuellsten WHO-Klassifikation von 2021 werden die Tumortypen Astrozytom, IDH-mutiert und Glioblastom, IDH-wildtyp sowie Oligodendrogliom IDH-wildtyp und 1p/19q Codeletion aufgezählt und zeigt so, dass die genotypische Einteilung maßgebend ist [17].

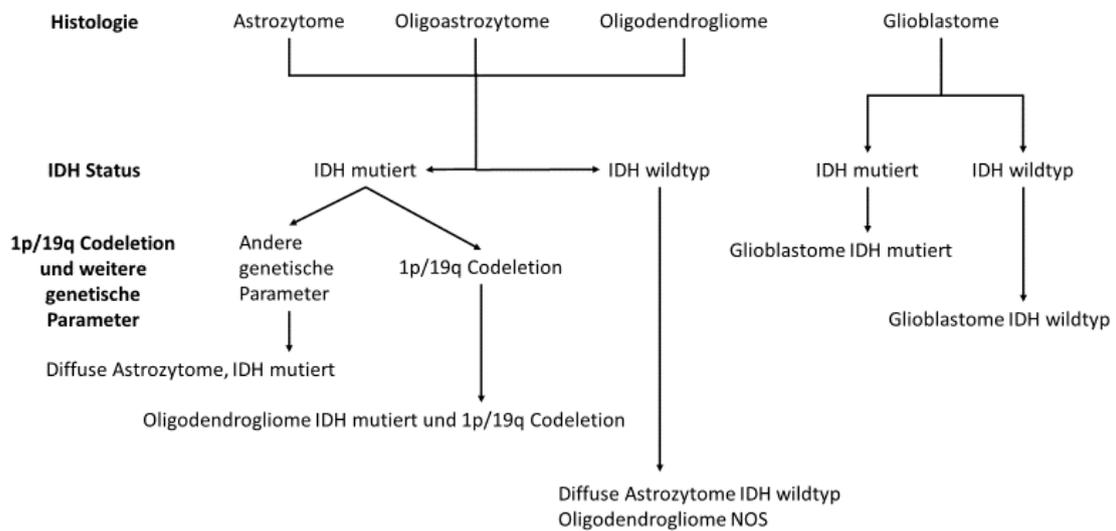


Abbildung 1: Algorithmus zur Klassifikation diffuser Gliome auf Basis der histologischen und genetischen Parameter nach der WHO Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems von 2016. IDH1 = Isocitratdehydrogenase-1, NOS = not otherwise specified. (Eigene Abbildung)

Die aktuellen Therapieansätze für GBM Patienten sind multidisziplinär und umfassen die radikale operative Resektion, die postoperative Bestrahlung der Tumorregion inklusive begleitender und adjuvanter Chemotherapie [1]. Mit dieser intensiven Therapie konnte das mediane Überleben der Patienten auf 14,6 Monate gesteigert werden [2].

In Bezug auf die operative Resektion wird zwischen der stereotaktischen Biopsie, um pathologisches Material zu gewinnen, einer subtotalen Resektion oder der radikalen neurochirurgischen iMRI-assistierten Resektion unterschieden [18]. Die operative

Therapie wird unter Zuhilfenahme intraoperativer Navigationssysteme wie dem intraoperative magnetic resonance imaging (iMRI) durchgeführt [9]. Es muss eine Balance zwischen maximaler operativer Resektion und der postoperativen Lebensqualität bei jedem einzelnen Patienten gefunden werden [18]. Die radikale chirurgische Resektion zeigt dabei ein besseres Gesamtüberleben [19]. In der entnommenen Tumorprobe kann postoperativ die Diagnose verifiziert werden, die anschließende molekulargenetische Zuordnung ermöglicht eine genauere Unterteilung in Bezug auf den IDH1-Status [10].

Die postoperative adjuvante Chemotherapie besteht aus den Alkylanzien Temozolomid (TMZ) eventuell in Kombination mit Lomustin [1, 20] (Abbildung 2).

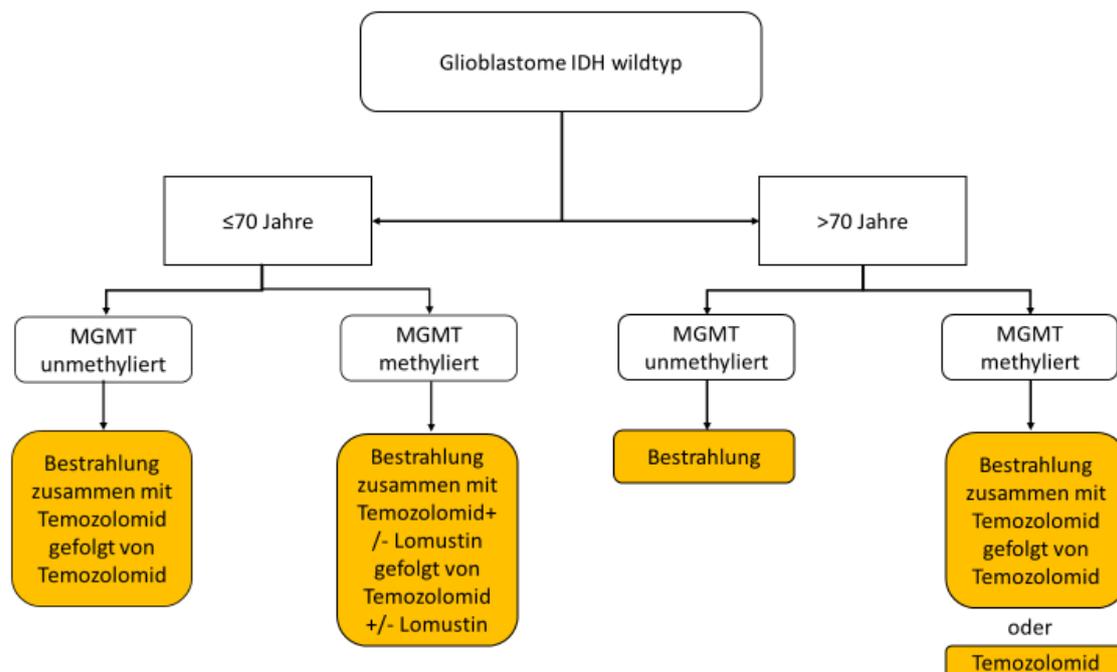


Abbildung 2: Algorithmus der postoperativen Therapieentscheidung bei GBM IDH wildtyp. IDH = Isocitratdehydrogenase-1, MGMT= O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase. (Eigene Abbildung)

Je nach Tumoreinteilung wird ein spezifisches Therapieregime begonnen [20]. Je nach Alter unterscheidet sich das Therapieschema nach dem Methylierungsstatus des Promotors der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) (Abbildung 2). MGMT fungiert als Reparaturenzym in den Tumorzellen. Die Promotormethylierung des MGMT-Gens verhindert die Bildung des Reparaturenzyms, führt so zum verbesserten

Ansprechen von alkylierenden Substanzen und erzielt somit eine erhöhte Apoptoserate der Tumorzellen [21]. Der MGMT-Promotormethylierungsstatus wird mittels methylierungsspezifischer PCR nachgewiesen. Der MGMT-Promotormethylierungsstatus stellt daher einen prognostischen Marker für das postoperative Therapieansprechen dar [22]. So konnten Hegi et al. zeigen, dass die MGMT-Promotormethylierung zu einem medianen Überleben von 21,7 Monaten führte, bei nicht-methyliertem MGMT-Promotor jedoch dieselbe Therapie ein medianes Überleben von nur 12,7 Monaten zeigte [22]. Stupp *et al.* zeigten, dass die postoperative Radiotherapie mit adjuvanter TMZ-Gabe sowie die postoperative TMZ-Chemotherapie Überlebenszeit-verlängernd sind [2]. TMZ wirkt als Alkylanz durch Methylierung von Guanin an der DNA und verhindert so die DNA Replikation [23]. Lomustin ist ein Alkylanz aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe, anerkannt in der Gliom Therapie u.a. bei Oligodendrogliomen [24, 25]. Lomustin in Kombination mit TMZ zeigte in einer Phase-III-Studie einen Überlebensvorteil gegenüber der TMZ-Monotherapie bei GBM mit methyliertem MGMT-Promotormethylierungsstatus [26].

Eine zusätzliche Therapiemöglichkeit ist die Applikation von Tumor Treating Fields (TTFields), bei denen es sich um mittelfrequente (100-300kHz) elektrische Wechselfelder handelt, die mittels einer auf den rasierten Kopf geklebten Elektroden niedrig-intensive übertragen werden [27]. Dieses elektrische Feld stört die Ausbildung der mitotischen Spindel während der Zellteilung und inhibiert dadurch die Zellproliferation [27]. Zudem haben sie keinen Effekt auf sich nicht-teilende Zellen [27]. Stupp *et al.* konnten zeigen, dass TTFields in Kombination mit TMZ gegenüber der alleinigen TMZ-Erhaltungstherapie die Gesamtüberlebenszeit von GBM-Patienten verlängern [28].

Im Jahr 2009 entdeckten U. Stein *et al.* den unabhängigen prognostischen Blutmarker MACC1 bei Kolonkarzinompatienten [29]. Dieser konnte in Kolonkarzinom-Schnitten mit erhöhter Expression nachgewiesen werden [29].

MACC1 fördert die Proliferation, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen und somit die Tumorgenese des Kolonkarzinoms [30]. Es aktiviert diese Zellfunktionen, indem es das Gen für c-MET - den Rezeptor des Hepatocyte-growth-factor (HGF) - dereguliert [31]. HGF bindet an die Tyrosinkinase c-MET und fungiert so als Mediator

für Zellwachstum, Zellmotilität und Zellinvasion [32]. Durch die Deregulation des HGF/c-MET- Signalweges führt MACC1 zur Tumorgenese und Metastasierung [33]. In Hirntumoren konnte der HGF/c-MET-Signalweg ebenso nachgewiesen werden. Hier wird zudem auch die Tumorangiogenese durch den gestörten Signalweg gefördert [34] (Abbildung 3).

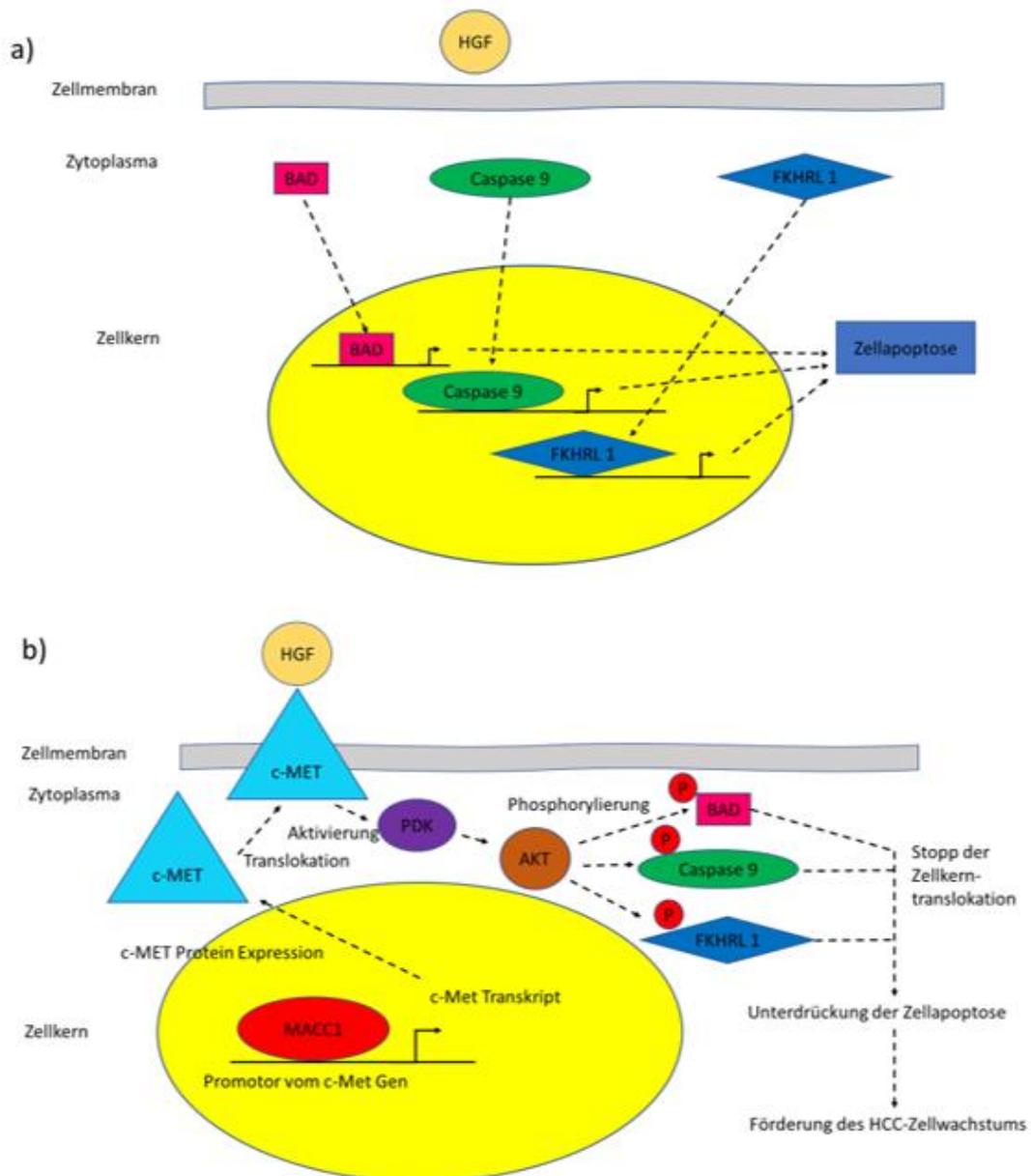


Abbildung 3: Darstellung der molekularen Mechanismen der MACC1 induzierten Zellapoptose in hepatischen cholangischen Karzinom Zellen (HCC): a) Bei niedriger MACC1 Expression gelangen BAD, Caspase 9 und FKHL 1 vom Zytoplasma in den Zellkern, regulieren die Transkription ihrer Zielgene und Induzieren so die Zellapoptose. b) Bei hoher MACC1 Expression steigert MACC1 durch Aktivierung der

Gentranskription von c-Met dessen Expression. HGF bindet an seinen c-MET Rezeptor und aktiviert so den HGF/c-MET Signalweg. Dieser wiederum fördert die Phosphorylierung von BAD, Caspase 9 und FKHL 1 über PI3K und AKT, p-BAD, p-Caspase 9 und p-FKHL 1 können nicht mehr in den Zellkern transportiert werden und so dort nicht ihren pro-Apoptischen Effekt auslösen. Die Zellapoptose wird so bei HCC-Zellen inhibiert. c-Met=Tyrosinkinase-Rezeptor von HGF, HGF = Hematopoetic growth factor (Eigene Abbildung).

MACC1 ist nicht nur beim kolorektalen Karzinom [35], sondern auch bei anderen Tumoren wie dem Lungen-Adenokarzinom [36], dem peritoneal disseminierten Magen-Karzinom [37] und dem hepatozellulären Karzinom [38] nachweisbar. Hagemann *et al.* zeigten mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen, dass MACC1 in GBM Tumorschnitten erhöht exprimiert war, in der Zellkultur führte die MACC1 Überexpression zur Steigerung der Zellproliferation und -invasion [39].

U. Stein *et al.* konnten MACC1 auch im Blutplasma von Kolonkarzinom-Patienten nachweisen [40]. Es stellt einen unabhängigen prognostischen Marker für Diagnose, Prognose und therapeutisches Monitoring bei Kolonkarzinom-Patienten dar [31, 40] und hat einen prädiktiven und prognostischen Wert in Bezug auf die Metastasierung und das progressionsfreie Überleben (PFS) der Patienten [40].

1.1 Hypothese

Da es aktuell keinen bekannten präoperativ nachweisbaren prognostischen Blutmarker für GBM gibt [41], stellt sich die Frage, ob MACC1 einen solchen darstellen könnte. Hier wird daher in einer GBM-Patientenkohorte die Konzentration von MACC1 mRNA im Blutplasma analysiert und ihre Eignung als prognostischer Marker für das PFS und Gesamtüberleben eruiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Accurpette	VWR International
Dampfkochtopf	BEKA
Eismaschine ZBE 70-35	ZIEGRA Eismaschinen
Elektronische Waage ABT 120-SDNM	Kern & Sohn
Kühl- und Gefrierschränke (4°C und -20°C)	Liebherr International
Kühl- und Gefrierschrank -80°C	FRYKA Kühltechnik
Kühlcontainer Chronos 10000397	Messner Industriegase
LightCycler 480 System	Roche Diagnostics
Magnetrührer MR3,001K	Heidolph
MAGNETOM Trio	Siemens
Mikroskop DMI 3000B	Leica Microsystems
Mikrotom SM 2000R	Leica Microsystems
div. Pipetten	Eppendorf
Qubit 3.0.Flurometer	Invitrogen
Thermomixer Typ C	Eppendorf
Step One plus	ThermoFisher
Sterilbank Herasafe type HS12	Heraeus
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage ENTRIS 45202-15	Sartorius
Wasserbad HI1210	Leica Microsystems
Zentrifuge Mega Star 3.0R, VWR Micro Star 17R	VWR International

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser (50 ml, 100 ml, 1 l, 5 l)	Hartenstein
Deckgläser (20 x 16 x 0,4 mm)	Hartenstein
Messzylinder (Glas 250 ml, 1 l)	Hartenstein
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific
96-Well-Plate	Ambion
Deep 96-Well-Plate	Ambion

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
(182) Anti-IDH1 R132H / DIA.H09 Mouse Kat.- Nr.: DIA-HO9-Verdünnungspuffer	Optistain
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇)	Carl Roth
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	DAKO Envision
Digestionspuffer	Ambion
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	Universitätsklinikum Würzburg
Ethanol (EtOH) (C ₂ H ₅ OH)	Carl Roth
MACC1 Anti-Human No: HPA020081- Verdünnungspuffer	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Th. Geyer
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Salzsäure (HCl, 25%)	Merck
Saure Hämalaun-Lösung nach Meyer	Carl Roth
Tris-Buffered-Saline (TBS)	Zytomed
Ultrareines Wasser (steril)	Biochrom

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth
Waschpuffer-Konzentrat 1	Ambion
Waschpuffer-Konzentrat 2/3	Ambion
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Carl Roth
Ziegenserum No: 50062Z	Invitrogen

Herstellung der Lösungen:

Citratpuffer:

Für die Herstellung des Citratpuffers (2 l 20 mM) wurde in 2 l destilliertes Wasser 8,4 g Citronensäure Monohydrat und 4,2 g NaOH Plätzchen gelöst und anschließend mit NaOH ein pH-Wert von 6 titriert.

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung:

Für die Herstellung der DAB-Lösung wurde in 1000 µl DAB-Substratpuffer 20 µl DAB + Chromogen gelöst.

Tris-Buffered-Saline (TBS)-Stammlösung:

Für die Herstellung der TBS-Puffer Stammlösung (10 x Puffer) wurden in 2 l destilliertem Wasser 121,1 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 169,4 g Natriumchlorid und 100 ml Salzsäure 25 % gelöst.

Für den TBS-Puffer wurden 200 ml der TBS-Stammlösung in 1800 ml destilliertem Wasser und mit TBS-Puffer ein pH-Wert von 7,6 titriert.

Peroxidase-Block

Für den Peroxidaseblock wurde in 250 ml destilliertem Wasser 6ml Wasserstoffperoxid (30%) versetzt.

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
(182) Anti-IDH1 R132H / DIA.H09 Mouse Kat.-Nr.: DIA-H09	Optistain
HRP-markiertes-Peroxidase-Polymer: Mouse	DAKO Envision
MACC1 Anti-Human No: HPA020081	Sigma

2.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cells to CpG Kit	Life Technologies
Cells-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit (100ng/µl)	Life Technologies
DNA Master HybProbe kit	Roche Diagnostics
Färbekit: Dako Envision System HRP (DAB) No: K4010	Agilent
High Pure Viral RNA kit	Roche Diagnostics
HRM Master Mix MeltDoctor™	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen™ Qubit™ Assay	Thermo Fisher Scientific
Kit 2100 Bioanalyzer	Agilent
LightCycler DNA Master Hybridization Probes kit	Roche Diagnostics
Recover all Kit	Ambion
short tandem repeat (STR) Genotypisierung	DSMZ
xylohaltiges Histo-Kit	Eukitt

2.1.6 Primer

Tabelle 6: Primer

Bezeichnung	Hersteller
MACC1 Amplikon: 136 bp:	BioTeZ und TIB
Vorwärts-Primer: 5'-TTCTTTTGATTCTCCGGTGA-3'	MolBiol
Rückwärts-Primer: 5'-ACTCTGATGGGCATGTGCTG-3	
FITC-Probe Primer: GCAGACTTCCTCAAGAAATTCTGGAAGATCTA-3	
LCRed640-Probe Primer: 5'-AGTGTTTCAGAACTTCTGGACATTTTAGACGA-3'	
MGMT-HRM-Primer:	Thermo Fisher
#705 mit der Sequenz (vorwärts): 5'-GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT-3	Scientific
#706 mit der Sequenz (rückwärts): 5'-CCTACAAAACCACTCGAACTACCA-3	

2.1.7 Software

Tabelle 7: Software

Bezeichnung	Hersteller
DISP_Image	HALCON
SPSS Statistics Version 23	IBM

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenkohorte

Von 45 Hirntumorpatienten wurden in dem Zeitraum von April 2012 bis März 2014 präoperative Blutproben entnommen, sowie intraoperative Tumorgewebeprobe gewonnen. Das Plasma wurde separiert und auf MACC1 mRNA Transkripte untersucht.

Die Tumorgewebeproben wurden für die Immunhistochemischen Färbungen (IHC) zur Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus und des MGMT-Promotormethylierungsstatus mittels Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Teilnehmer willigten entsprechend der Vorgabe der Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Nr. 135/09) ein und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Der Kontrollgruppe, bestehend aus 15 Probanden ohne bekannte Tumorerkrankung, wurde ebenfalls 5ml Blutplasma entnommen.

Folgende molekulare und klinische Daten wurde für die GBM-Patienten erhoben:

- MACC1 mRNA Transkriptspiegel im Plasma
- der IDH1-Mutationsstatus [IDH1 R132H positiv/IDH1 R132H negativ]
- der MGMT-Promotormethylierungsstatus [methyliert/nicht-methyliert]
- Tumorgrad nach WHO-Klassifikation 2016
- das Alter bei Blutprobenentnahme [Jahren]
- OP-Datum
- Todeszeitpunkt
- Zeitpunkt des Rezidiv Auftretens (Progression free survival = PFS)
- das Geschlecht der Patienten [männlich/weiblich]
- Eastern Cooperative Oncology Group Score (ECOG-Status) [0-5]
- Tumolvolumen [cm³]
- postoperative Therapie mit TMZ [ja/nein]
- postoperative Radiatio

Nach der Datenerhebung wurden die Patienten anhand der medianen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen in eine Teilgruppe mit niedriger und eine Teilgruppe mit hoher MACC1 mRNA Transkript-Konzentration eingeteilt. Ziel war es, zwei homogene Gruppen zu erhalten, die sich lediglich aufgrund der unterschiedlichen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen (niedrig versus hoch) und in ihrem PFS bzw.

Gesamtüberleben unterscheiden. Diese Gruppen wurden nun miteinander verglichen. Außerdem wurden die oben genannten molekularen und klinischen Faktoren miteinander korreliert und Clusteranalysen durchgeführt, um eine mögliche prognostische Relevanz von MACC1 zu erfassen.

2.2.2 MACC1 mRNA Transkript-Konzentration

Die präoperativ gewonnenen Blutproben der Patienten wurden im Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin in Berlin nach dem von Stein *et al.* entwickelten Protokoll analysiert [40].

Das Blutplasma wurde durch Zentrifugation mit 1300 xg für 10 min bei 10°C gewonnen. Danach wurde nochmals zur Entfernung von restlichen Zellbestandteilen bei 4 °C für 15 min mit 2500 xg zentrifugiert. Das Plasma wurde bei -80 °C eingefroren.

Die RNA-Isolation aus dem Blutplasma erfolgte mit Hilfe des *High Pure Viral RNA kit*, die anschließende Messung der RNA-Konzentration mit dem *Kit 2100 Bioanalyzer*. Anschließend wurde die quantitative *real-time RT-PCR* durchgeführt.

Die PCR erfolgte nach dem folgenden Schema: 30 sek bei 95°C, dann 45 x (95°C für 10 sek, 62°C für 10 sek, 72°C für 10 sek), die Schmelzkurve von 40°C bis auf 95°C wurde anschließend mittels des *LightCycler 480 Systems* bestimmt.

Die Kalibrator cDNA wurde für die jeweiligen Messdurchgänge aus der SW620 Zelllinie hergestellt. Die Authentifizierung der Zelllinie erfolgte durch *short tandem repeat (STR) Genotypisierung* und zeigte den gleichen Genotyp wie die ATCC und CCL-227-Zelllinien. Die MACC1 mRNA Transkripte des Plasmas wurden als prozentualer Anteil an der mRNA Expression einer kalibrierten mRNA-Probe, die als 100% gesetzt wurde, berechnet.

2.2.3 IDH1-Mutationsstatus

Die Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus erfolgte mittels Immunhistochemie im Tumorbologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg.

Intraoperativ gewonnene Tumorgewebeproben der Patienten wurden auf die IDH1-R132H-Mutation untersucht. Nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung wurde das Gewebe in Blöcke geschnitten und bei -80°C gelagert. Es erfolgten die immunhistochemischen MACC1-Färbungen auf diesen Hirntumorschnitten. Dazu wurde das Färbekit verwendet. Als Positivkontrolle diente ein diffuses Astrozytom und als Negativkontrolle ein primäres GBM. Für die Färbung wurden die Blöcke aus der Kühlung entnommen, bei 0°C vorgewärmt und dann bei -20°C für 10 min vorgekühlt. Anschließend wurden mit dem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt und in circa 15°C kaltes Wasser gelegt. Durch das Überführen der Schnitte in 42°C warmes Wasser wurden sie gestreckt und danach auf die „Superfrost Plus Objektträger“ aufgezogen. Über 12 h erfolgte das vertikale Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur. Danach waren sie gebrauchsfertig für die immunhistochemische Färbung. Zuerst wurden die Objektträger in einer absteigenden Xylol/Alkohol-Reihe entparaffiniert (Xylol (1) 10 min, Xylol (2) 10 min, 100 % EtOH (1) 30 sek, 100 % EtOH (2) 5 min, 96 % EtOH (1) 30 sek, 96 % EtOH (2) 5 min, 70 % EtOH (1) 30 sek., 70 % EtOH (2) 5 min). Anschließend erfolgt mittels des Heat Induced Epitop Retrieval (HIER) bei 120° in Citratpuffer die Epitop-Freisetzung. Danach erfolgt das Waschen mit Aqua dest., anschließend der Peroxidase-Block (0,7% Wasserstoffperoxid), um die humane Peroxidase zu blockieren. Nach Inkubation des Blocks und 2-maligem Waschen mit Aqua dest. und dem TBS Puffer folgte der Proteinblock mit 150 µl 10 %igem Ziegen Serum pro Schnitt. Anschließend wurde der immunhistochemische Primärantikörper (182)Anti-IDH1 R132H / DIA.H09 Mouse auf die Schnitte appliziert, jeweils 75 µl pro Schnitt in der Verdünnung von 1:20 mit Verdünnungspuffer. Nach 24 h Inkubation bei 4°C wurde der Primärantikörper mit dem TBS-Puffer ab gespült und der HRP-Polymer Mouse Sekundärantikörper appliziert und für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach 2-fachen Abspülen mit dem TBS-Puffer wurden die Schnitte mit 150 µl DAB+Chromogen entwickelt und anschließend mit Hämaulaun gegengefärbt. Daraufhin erfolgte unter fließendem Leitungswasser das Bläuen, sowie in der aufsteigenden Xylol- und Alkoholreihe (jeweils 2 min in 70 % EtOH (1), 70 % EtOH (2), 96 % EtOH (1), 96 % EtOH (2), 100 % EtOH (1), 100 %, EtOH (2), Xylol (1), Xylol (2)) das Entwässern. Abschließend wurden die Schnitte mit dem xylolhaltigen Histokit eingedeckt. Die Auswertung der Färbung erfolgt an dem Mikroskop Leica DMI 3000B, sowie mit Unterstützung des Neuropathologischen

Instituts unter der Leitung von PD Dr. C. Monoranu. Je nach zytoplasmatischer Anfärbung wurden die Immunreaktion der IDH1 R 132H-Färbung als positiv oder negativ bewertet.

2.2.4 MGMT-Promotormethylierungsstatus

Der MGMT-Promotormethylierungsstatus der Hirntumorproben der Patienten wurde nach dem MGMT Bestimmungsprotokoll von Esteller *et al.* im Tumorbiologischem Labor Würzburg bestimmt [42].

Der MGMT Methylierungsstatus wurde nach Isolation und anschließender Umschreibung in genomischer DNA (gDNA) aus dem Kryogewebematerial mittels *High Resolution Melting quantitative Polymerase Chain Reaction* (HRM-qPCR) bestimmt.

Die gDNA-Isolation erfolgte durch das *Recover all Kit*. Zur Materialgewinnung wurde von jedem Patienten 35 mg an Kryomaterial, das bei -80°C gelagert worden war, vom Paraffingewebe 80 µm am Mikrotom geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Es wurde anschließend 1 ml Xylol hinzugefügt, dieses Gemisch gevortext und zentrifugiert und anschließend 3 min bei 50°C erhitzt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, danach wurde das Xylol ohne Beschädigung des Pellets entfernt. Es erfolgten 2 Behandlungen mit EtOH. Es wurde jeweils 1 ml 100% EtOH hinzugefügt und gevortext, danach 2 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde das EtOH ohne Beschädigung des Pellets entfernt. Diese Schritte wurden einmal wiederholt, danach wurde nochmals vorsichtig zentrifugiert und letzte EtOH-Reste wurden entfernt. Die Pellets wurden nun bei 40-45°C für 20 min vakuumzentrifugiert.

Nachfolgend erfolgte die Protease-Aufarbeitung. Hierfür wurde zuerst ein Verdauungspuffer des Kits je nach Menge der anfangs verwendeten Materialgröße/-menge und danach jeweils 4 µl Protease hinzugefügt. Diese Mixtur wurde vorsichtig gemischt, sodass das Pellet in der Lösung schwamm. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 50°C über 16 h. Danach wurde die Nukleinsäure-Isolation vorbereitet, indem je nach vorheriger Verdauungs-Puffermenge, die Isolationsmischung und 100 % EtOH im Verhältnis von 1 : 2,3 gemischt und in die Reaktionsgefäße hinzugefügt wurden.

Bis zu 700 µl des Gemisches wurden auf den Filter einer Filterkartusche des Kits gegeben, anschließend wurde bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diese Schritte wurden bis zum Verbrauch des gesamten Probengemisches wiederholt. Es erfolgte das zweimalige Waschen. Beim 1. Waschen wurden 700 µl von Waschpuffer 1, dem vorher 42 ml 100% EtOH hinzugefügt worden waren, auf die Filterkartusche gegeben und bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Reaktionsgefäß anschließend beim 2. Waschgang mit 500 µl von Waschpuffer 2/3, dem vorher 48 ml 100%EtOH hinzugefügt worden war, gefüllt und bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und der Filter in das gleichen Reaktionsgefäß eingesetzt. Daraufhin erfolgte ein finales Zentrifugieren für 30 sek, um die letzte verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.

Es erfolgte die finale Nukleinsäurereinigung, indem 10 µl RNase A mit 50 µl Nuklease freiem Wasser gemischt und diese 60 µl des RNase-Mixes auf die Filterkartusche gegeben wurde. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte dreimaliges Waschen. Zuerst wurde für den 1. Waschgang 700 µl von Waschpuffer 1 auf die Filterkartusche gegeben, circa 30-60 sek bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach erfolgte der 2. Waschgang, indem 500 µl von Waschpuffer 2/3 auf die Filterkartusche gegeben wurden und diese bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde verworfen. Beim 3. Waschgang wurden 500 µl von Waschpuffer 2/3 auf die Filterkartusche gegeben, diese bei 10000 xg für 30 sek zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und abschließend nochmals bei 10 000 xg für 60 sek zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Die Eluation der Pellets erfolgte, indem zuerst die Filterkartusche auf frische Reaktionsgefäße gestellt, danach 60 µl der auf 95°C vorgeheizten Elutionslösung des Kits mittig auf den Filter gegeben, der Deckel geschlossen und die Probe 60 sek bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurde die Probe 60 sek bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Elutionslösung durch den Filter fließen zu lassen. Das sich so bildende Eluat enthielt die gDNA.

Zur Messung der gDNA-Konzentration nach der Extraktion wurde das *Invitrogen*TM *Qubit*TM *Assay* verwendet. Dafür wurden 1 µl der gDNA mit dem Dilutionspuffer

gemischt und anschließend im Qubit™ 3.0 Fluorometer bei Raumtemperatur für 2 min gemessen. Diese gDNA-Proben aller Patienten wurden bei -20°C gelagert.

Nach der Isolation erfolgte die Desaminierung des unmethylierten Cytosins der gDNA in Uracil durch das *Cells to CpG Kit*. Zu Beginn erfolgte die in dem Kit enthaltene Pufferansetzung. Der Binding Puffer wurde mit 50 ml Isopropyl-alkohol ($\geq 99,5\%$), jeder Waschpuffer mit 120 ml EtOH ($\geq 99,5\%$) und jeder *Desulfonation Reagents* mit 45 ml EtOH ($\geq 99,5\%$) gemischt. Danach wurde das *Conversion Reagent* angesetzt, indem 260 μl *Denaturation Reagent* und 8 ml H₂O zum *Conversion Reagent* Pulver gegeben wurden. Anschließend wurden 500 μl Conversion Puffer zum *Conversion Reagent* hinzugegeben und im 60°C warmen Wasserbad für 10 min erwärmt, bis das komplette Pulver aufgelöst war. Während dieser Inkubation wurde 2- bis 3-mal gevortext.

Es folgte die Denaturierung der gDNA im PCR-Reaktionsgefäß. Dafür wurden 5 μl *Denaturation Reagent* zu 45 μl gereinigter gDNA pipettiert und gemischt. Danach wurde bei 50°C für 10 min inkubiert. Hiernach erfolgte die Konvertierung von Cytosin zu Uracil, indem 100 μl des angesetzten *Conversion Reagent* zur denaturierten Probe im PCR-Reaktionsgefäß gegeben und diese gemischt wurde. Je nach Menge der eingesetzten gereinigten gDNA erfolgte nun die PCR nach dem folgenden Zyklus:

Bei 50 pg bis 100 ng: 65°C für 30 min, 95°C für 30 sek, 65°C für 30 min, 95°C für 30 sek, 65°C für 30 min und 4°C für bis zu 4 h; bei >100 ng bis 2 μg : 65°C für 30 min, 95°C für 90 sek, 65°C für 30 min, 95°C für 90 sek, 65°C für 30 min und 4°C für bis zu 4 h; bei >2 μg : 95°C für 3 min, 65°C für 60 min, 95°C für 3 min, 65°C für 30 min und 4°C für bis zu 4 h.

Zur Entsalzung der DNA wurde 600 μl Bindepuffer in die 2 ml Vertiefung der *deep 96-well Plate* gegeben. Dazu wurden dann 150 μl der konvertierten gDNA-Probe gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nun wurde die Binding Plate auf die *PureLink™96 Receiver Plate* gesetzt und die gemischte Probe auf die entsprechende Säule der *Binding Plate* geladen. Anschließend wurde bei 3100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nun erfolgte die Salzentfernung durch Waschen. Dafür wurde die *Binding Plate* auf die *PureLink™ 96 Receiver Plate* gesetzt und 600 μl des *Desulfonation Reagents* auf die entsprechende Säule der *Binding Plate* gegeben. Die Platte wurde

anschließend mit Klebefolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurde bei 3100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Nachfolgend wurde die Desulfonierung durchgeführt, indem die *Binding Plate* auf die *PureLink™ 96 Receiver Plate* gesetzt wurde, dann 200 µl *Desulfonation Reagent* auf die entsprechende Säule der *Binding Plate* gegeben, die Platte mit Klebefolie bedeckt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert wurde. Danach wurde bei 3100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend erfolgte das Waschen der DNA, indem die *Binding Plate* auf die *PureLink™ 96 Receiver Plate* gesetzt, 400 µl Waschpuffer auf die entsprechende Säule der *Binding Plate* gegeben, das Ganze bei 3100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen wurde. Dieser Waschdurchgang wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschen wurde der restliche Waschpuffer entfernt, indem die *Binding Plate* auf die *PureLink™ 96 Receiver Plate* gesetzt und bei 3100 xg für 20 min zentrifugiert wurde. Der Durchlauf und die *96 well Receiver Plate* wurden anschließend verworfen.

Für die Elution wurde die *Binding Plate* auf eine neue Elutionsplatte gesetzt und 100 µl Hochgereinigtes-Wasser direkt in die Mitte der entsprechenden Säule auf der *Binding Plate* gegeben. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und danach bei 3100 xg für 5 min zentrifugiert – gegebenenfalls wurde ein zweites Mal eluiert.

Es folgte die Durchführung der HRM-qPCR mit dem *Cells-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit*. Zuerst wurden die Standards der HRM-qPCR für den Anteil an methylierter DNA angesetzt. Diese lagen bei 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% Anteilen an methylierter DNA pro 100 ng/µl. Als Primer für die HRM-qPCR dienten die bei -20°C gelagerten MGMT-Primer #705 und MGMT-Primer #706. Die Primer wurden im Verhältnis 1:20 mit H₂O verdünnt (10 µl Primer + 190 µl H₂O). Anschließend wurde die HRM-qPCR angesetzt. Es wurden 10 µl *HRM Master Mix MeltDoctor™*, 1,2 µl MGMT-Primer #705, 1,2 µl MGMT-Primer #706, 2 µl gDNA und 5,6 µl deionisiertes H₂O miteinander gemischt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Die Negativkontrolle wurde ohne gDNA angesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert und anschließend auf eine *96-Well-Plate* pipettiert.

Der HRM-qPCR Lauf erfolgte nach dem folgenden Schema: 45 x (*Holding Stage*: 95°C für 10 min; *Cycling Stage*: 95°C für 15 sek, 60°C für 60 sek; *Melt Curve Stage*: 95°C für

10 sek, 60°C für 60 sek, 95°C für 15 sek, 60°C für 15 sek). Anhand der zuvor gesetzten Standards wurde nun jede gDNA bezüglich ihres methylierten Anteils analysiert.

2.2.5 Tumorvolumetrie

Die Tumorvolumetrie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Neuroradiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mittels DISP_Image in cm³ [43]. Dafür wurde auf dem präoperativen MRT-Bildern händisch die *Regions Of Interest (ROI)* auf jedem *Digital Imaging and Communication (DICOM)*-Bild markiert und die *MPRage(T1)-Phase* mit der Software *DISPImage* analysiert [44].

2.2.6 Statistische Methoden

Die Auswertung der gesammelten Daten erfolgte durch *IBM SPSS Statistics Version 23*. Unterschiede in den MACC1 Blutplasma Transkriptwerten zwischen den beiden Gruppen von tumorfreien Kontrollpersonen (n=15) vs. GBM Patienten (n=45) wurden durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test analysiert. Als signifikanter p-Wert wurde $p < 0,05$ gesetzt. Des Weiteren wurden bei dem gesamten Patientenkollektiv das Überleben nach 24 Monaten und das PFS nach 12 Monaten bestimmt. Anhand des Cutoffs der MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen wurden zwei Gruppen gebildet und diese bezüglich ihres Gesamtüberlebens, dem Überleben nach 24 Monaten und dem PFS in Kaplan-Meier-Kurven in Kombination mit dem log rank Test analysiert. Zudem wurden beide Gruppen bezüglich der Faktoren Geschlecht, Alter, Gesamtüberlebenszeit, PFS, ECOG Status, Therapieverfahren und der molekulargenetischen Faktoren IDH1 Mutationsstatus, MGMT Methylierungsstatus und des Tumorumfanges mittels des nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test analysiert.

Clusteranalysen sind Gruppeneinteilungen der Faktoren/Einzeldaten, mit dem Ziel der Bildung einer oder mehrerer homogener Cluster, die sich gleichzeitig von den/dem anderen Cluster/n maximal unterscheiden. Durch diese Analyseform können Ähnlichkeiten und Unterschiede in den Datensätzen hervorgehoben werden, indem die zu untersuchenden Faktoren unabhängig von ihrer vorherigen Klassifizierung begutachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Unterteilung der wichtigen prognostischen

Faktoren durch Bestimmung der Mittelwerte mittels ANOVA-Test in verschiedene Cluster zur genaueren Analyse und Darstellung der prognostischen Relevanz dieser Faktoren im Zusammenhang mit der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration.

3 Ergebnisse

3.1 Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv von 45 Patienten teilte sich in 11 weibliche Patientinnen (24,4%) und 34 männliche Patienten (75,6%) auf. Der Altersmedian lag bei exakt 65 Jahren (SD 13,2 Jahre). Der ECOG-Status als Skala für die Leistungsfähigkeit der Patienten bei Erstdiagnose, betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 2-3 bei 8 Patienten (17,8%), von 1 bei 21 Patienten (46,7%) und von 0 bei 16 Patienten (35,5%). Im Median lag der ECOG Status bei 1. Das mediane Tumervolumen aller 45 Patienten lag bei 35,95 cm³.

Das Patientenkollektiv bestand aus 39 Patienten mit einem WHO-Grad IV IDH1 wildtyp (wt) Tumor (86,7%) und sechs Patienten mit einem WHO-Grad IV IDH1 R132H Tumor (13,3%). Einen methylierten MGMT Promotormethylierungsstatus wiesen 20 Patienten (50,0%) auf, einen unmethylierten MGMT Promotormethylierungsstatus hatten 20 Patienten (50,0%). Es fehlten die Daten von 5 Patienten. (Tabelle 8).

Als operative Intervention wurde bei 10 Patienten (23,8%) eine stereotaktische Biopsie durchgeführt, 3 Patienten (7,1%) erhielten eine offene Biopsie/subtotale Resektion und 29 Patienten (69,1%) hatten eine komplette Tumorsektion. Von 3 Patienten lagen keine Daten vor. Als postoperative Therapie wurde bei 40 Patienten (88,9%) eine Bestrahlung des Tumorgebiets durchgeführt. Keine Bestrahlung erhielten 5 Patienten (11,1%). Die anerkannte Standardtherapie nach Stupp, also adjuvante Bestrahlung mit ggf. TMZ und adjuvante Chemotherapie mit TMZ, hatten 29 Patienten (64%) erhalten, 16 Patienten (36%) hatten kein Standardtherapieschema nach Stupp bekommen [2]. Im Median wurde die Chemotherapie nach Stupp-Schema für einen Monat durchgeführt.

In Bezug auf die progressionsfreie Zeit fehlten die Daten von 21 Patienten, bzw. hatten einige dieser Patienten bisher kein Rezidiv bekommen. 13 Patienten (54,2%) hatten nach 0 bis 6 Monaten einen Tumorprogress, 11 Patienten (45,8%) später. Das

Gesamtüberleben unterteilte sich in 13 Patienten (28,9%), die 0 bis 6 Monate und 32 Patienten (71,1%) die länger als 6 Monate überlebt haben.

Die MACC1 mRNA Transkript Konzentration lag im Median bei 0,3966% des MACC1-mRNA Kalibrierungsstandards (Tabelle 8).

Tabelle 8: Klinische und molekulare Charakteristika der Patientenkohorte (n=45); SD = Standardabweichung; TMZ = Temozolomid

Patienten n=45	Weiblich: 11 (24,4%)	Männlich: 34 (75,6%)	
Alter	Median: 65 Jahre (SD 13,2 Jahre) (23 - 83 Jahren)		
ECOG	2-3: 8 (17,8%)	1: 21 (46,7%)	0: 16 (35,5%)
Tumorzvolumen	Median: 35,95 cm ³ (1,8 - 97,8 cm ³)		
IDH 1 Status	<i>IDH1 wildtyp</i> : 39 (86,7%)	<i>IDH1 R132H</i> : 6 (13,3%)	
MGMT Promotormethylierungs status Fehlend: 5	Methyliert: 20 (50%)	Unmethyliert: 20 (50%)	
OP Fehlend: 3	Stereotaktische Tumorbiopsie: 10 (23,8%)	Offene Tumorbiopsie /subtotale Resektion: 3 (7,1%)	Komplette Tumorresektion: 29 (69,1%)
Postoperative Therapie	Radiatio: 40 (88,9%)	Keine Radiatio: 5 (11,1%)	
Chemotherapie	mit TMZ: 29 (64%)	ohne TMZ: 16 (36%)	
Dauer der Chemotherapie	Median: 1 Monat		
Progressionsfreies Überleben Fehlend: 22	0-6 Monate: 13 (57%)	> 6 Monate: 10 (43%)	
Gesamtüberleben	< 6 Monate: 13 (28,9%)	> 6 Monate: 32 (71,1%)	

3.2 Statistische Analysen

3.2.1 GBM versus Kontrollen

Für die im Blutplasma zirkulierenden MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen bei GBM Patienten (n=45) zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (n=15) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Die MACC1 mRNA Transkript-Konzentration lag bei den Kontrollen im Median bei 0,0145% des Kalibrators (SD 0,080). Bei den GBM Patienten lag der Median bei 0,3966% des Kalibrators (SD 0,432). Es zeigte sich eine 13,1-fache Erhöhung der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Blutplasma im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$) (Abbildung 4).

3.2.2 GBM IDH1 Status versus Kontrollen

Im Vergleich der MACC1 mRNA-Werte der gesunden Kontrollen mit den Werten der GBM Patienten, die in IDH wildtyp (Median 0,4726% des Kalibrators, SD 0,436) und IDH R132H (Median 0,1489% des Kalibrators, SD 0,087) unterschieden wurden, zeigt sich ein signifikanter Unterschied (IDH1wt: $p < 0,001$; IDH1 R132H $p = 0,018$). Im Vergleich der beiden GBM Populationen stellt sich ebenso ein signifikanter Unterschied von $p = 0,005$ dar (Abbildung 5). Die IDH1 wildtyp Patienten hatten eine 14,6-fach erhöhte MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Blutplasma im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$), die IDH1 R132H mutierten Patienten hatten eine 3,4-fach erhöhte Transkript-Konzentration ($p = 0,0320$).

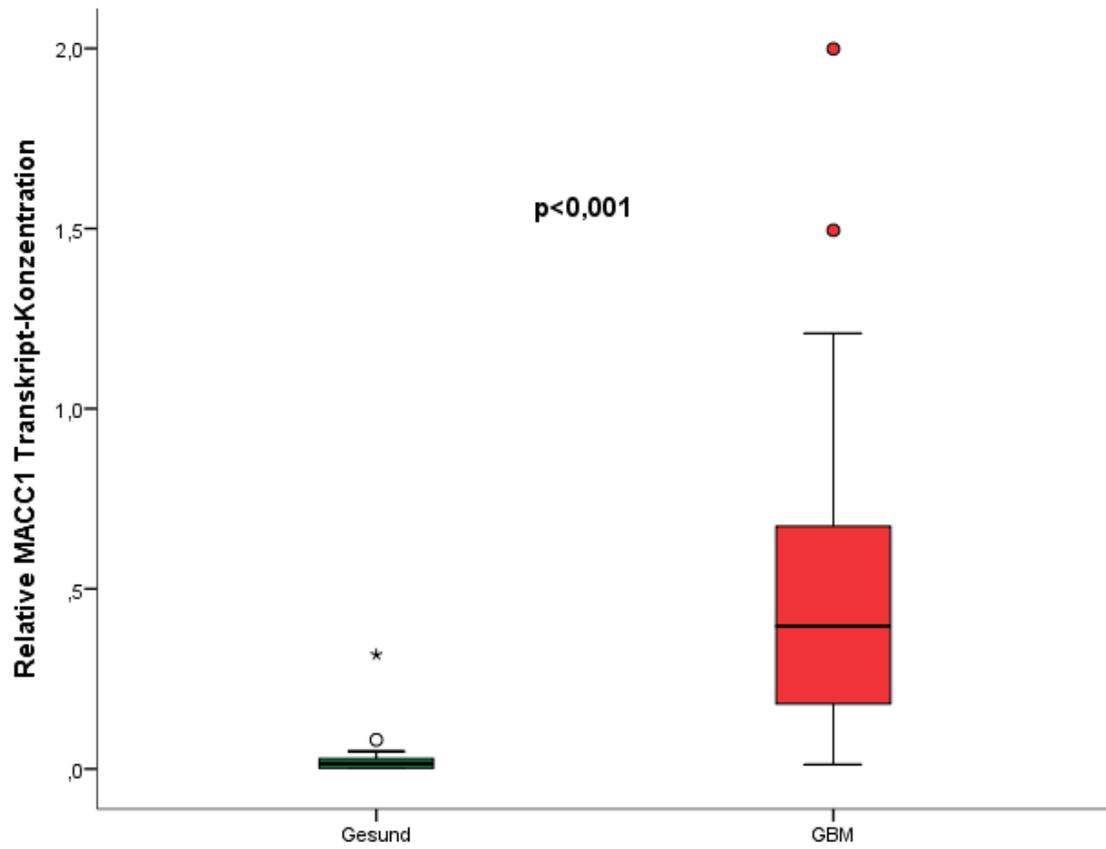


Abbildung 4: Vergleich der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Plasma aller GBM Patienten (n=45) mit gesunden Kontrollen (n=15).

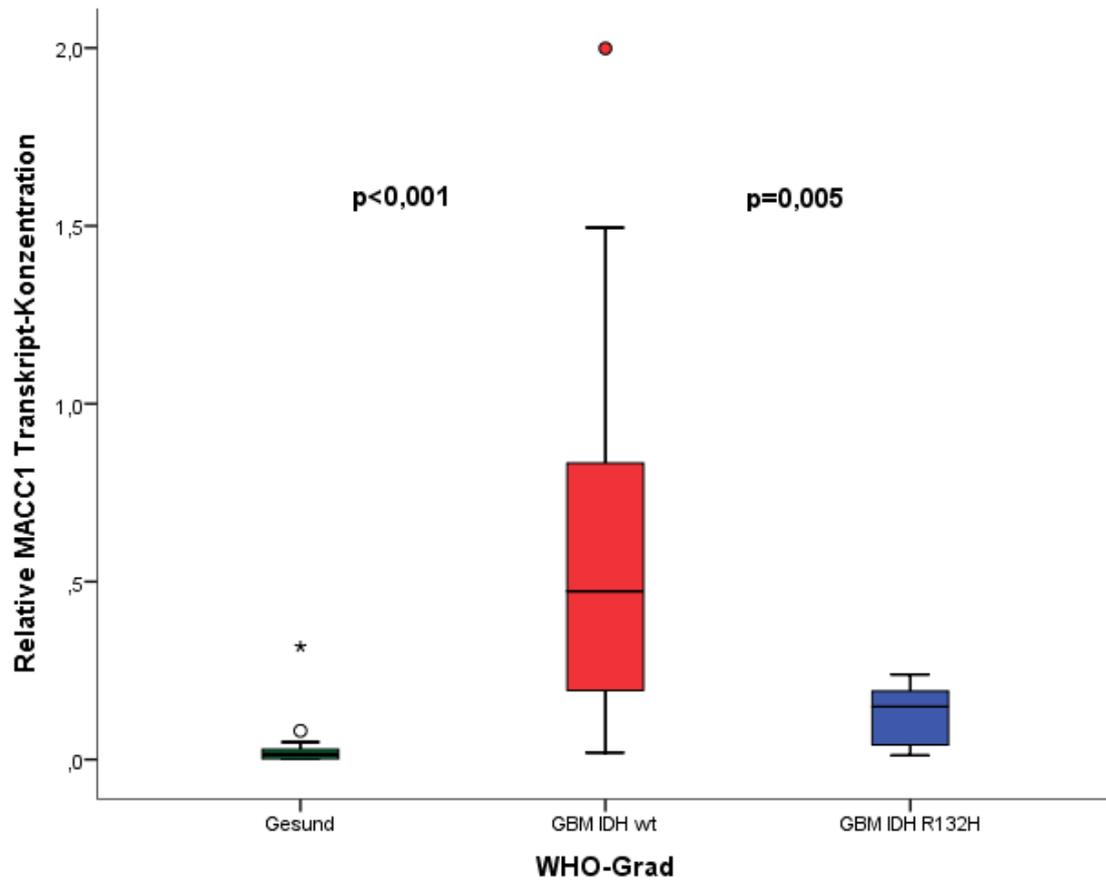


Abbildung 5: Vergleich der GBM Patienten ohne (n=39; IDH1 wildtyp (wt)) und mit IDH1 R132H Mutation (n=6) und gesunden Kontrollen (n=15).

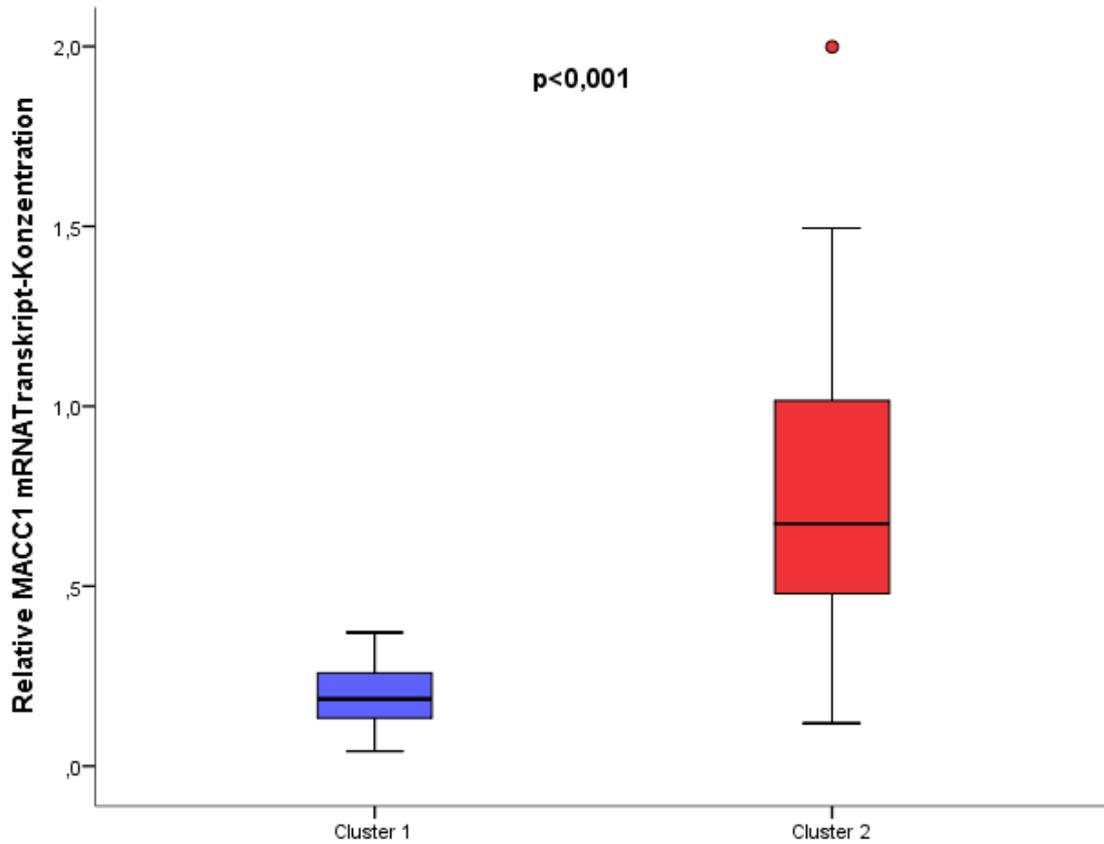


Abbildung 6: MACC1 mRNA Transkript-Konzentration bei GBM Patienten nach Cluster Analyse (Cluster 1: n=16; Cluster 2 n=23, siehe Tabelle 9).

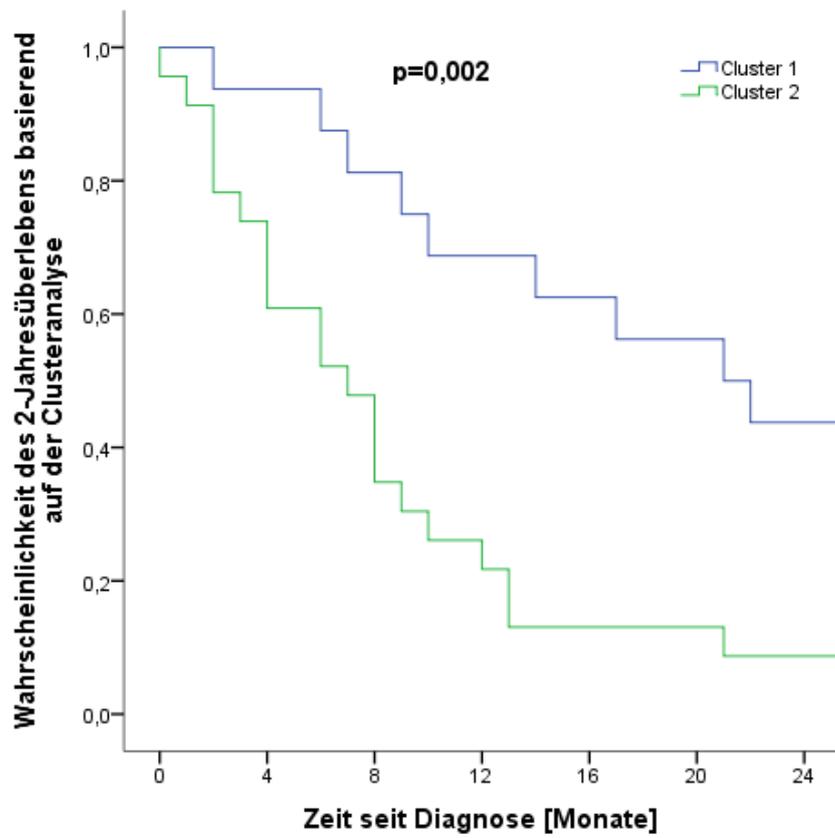


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse des 2-Jahresüberlebens basierend auf der Clusterzugehörigkeit.

3.2.3 Gesamtcluster

Wurden nun die möglichen prognostischen Faktoren Alter, IDH1 Mutationsstatus, Standardtherapie mit TMZ, Tumolvolumen, MACC1 mRNA Gehalt und der für den Therapieerfolg prognostische MGMT Promotormethylierungsstatus einer Clusteranalyse unterzogen, bildeten sich zwei Cluster. Das erste Cluster (n=16) beinhaltete ein niedriges Alter (Mittelwert 55,13 Jahre), eine niedrige MACC1 mRNA Transkript-Konzentration, ein niedriges Tumolvolumen (Mittelwert 33,28 cm³), einen IDH1 Mutationsstatus mit n=12 IDH1 wildtyp Patienten und n=4 Patienten mit IDH1 R132H Mutation, einen ausgeglichenen MGMT Promotormethylierungsstatus (nicht methyliert n=7 und methyliert n=9) und n=15 Patienten, die mit Standardtherapie nach Stupp behandelt wurden, sowie n=1 Patient der nicht nach Standardtherapie behandelt wurde (Tabelle 9). Die Patienten dieses Clusters hatten ein medianes Überleben von 21 Monaten (SD 5,0 Monate). Die 2-Jahres-Überlebensrate lag bei 43,8%.

In dem anderen Cluster (n=23) gruppierten sich hohes Alter (Mittelwert 69,39 Jahre) und hohe MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (n=21) sowie n=2 Patienten mit niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration, hohes Tumolvolumen (Mittelwert 42,62 cm³), IDH1 wildtyp Mutationsstatus (n=23) und ein ausgeglichener MGMT Promotormethylierungsstatus (nicht methyliert n=13 und methyliert n=10), sowie ausgeglichene postoperative Therapie (Standardtherapie nach Stupp n=12 und keine Standardtherapie nach Stupp n=11) (Tabelle 9). Das mediane Überleben lag bei 7 Monaten (SD 1,6 Monate). Hier lag die 2-Jahresüberlebensrate bei 8,7%, mit einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Clustern (p=0,002) (Abbildung 7) Ebenso gab es im Vergleich der MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen der beiden Cluster einen signifikanten Unterschied mit p<0,001 (Abbildung 6).

Tabelle 9: Statistiken der Cluster 1 (n=16) und Cluster 2 (n=23); w = weiblich, m = männlich, SD = Standardabweichung, Standardtherapie = Therapieverfahren nach Stupp mit kokombinanter Chemotherapie mit TMZ und Radiatio, wt = wildtyp

	Patientenanzahl	Mittleres Alter (in Jahren)	Tumorvolumen (in cm ³)
Cluster 1	16 (w = 3; m = 13)	55,23	33,28
Cluster 2	23 (w = 7; m = 16)	69,39	42,63
Gesamt	39 (w = 10; m = 29)	63,54	38,79

	MGMT- Promotormethylierungsstatus		Therapieverfahren	
	Cluster 1	nicht- methyliert	7	Standardtherapie
	methyliert	9	keine Standardtherapie	1
Cluster 2	nicht- methyliert	13	Standardtherapie	12
	methyliert	10	keine Standardtherapie	11
Gesamt	Nicht- methyliert	20	Standardtherapie	27
	methyliert	19	keine Standardtherapie	12

	MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (Median 0,3966% des Kalibrators)		MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (Median)
Cluster 1	niedrig	16	0,1862% des Kalibrators
	hoch	0	
Cluster 2	niedrig	2	0,6723% des Kalibrators
	hoch	21	
Gesamt	niedrig	18	0,3977% des Kalibrators
	hoch	21	

	IDH1 Mutations-Status		Gesamtüberleben (in Monaten)
Cluster 1	IDH1 wt	12	MW 21
	IDH1 R132H	4	SD 5,0
Cluster 2	IDH1 wt	23	MW 7
	IDH1 R132H	0	SD 1,6
Gesamt	IDH1 wt	35	MW 9
	IDH1 R132H	4	SD 13,8

3.2.4 Gesamtpatientenkohorte

Der Median der MACC1 Blutplasma Transkript-Konzentrationen der GBM Patienten lag bei 0,3966% des Kalibrators und wurde als Cut-off Wert zur Unterteilung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen mit 22 bzw. 23 Patienten gewählt. Hierbei zeigte sich in der Kaplan-Meier-Kurve der 2-Jahres-Überlebensraten ein signifikanter Unterschied ($p=0,008$) (Abbildung 8). Bei Patienten mit niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Blut lag die 2-Jahres-Überlebensrate bei 36,4%, bei Patienten mit hoher MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Blutplasma bei 8,7%.

Im Vergleich der beiden gebildeten Gruppen ergaben sich, nach statistischer Analyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests, signifikante Unterschiede in den Kategorien Alter, Gesamtüberleben und dem IDH1 Mutationsstatus (Tabelle 10). Die Gruppe mit der niedrigen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration hatte ein medianes Alter von 58 Jahren, die Gruppe mit hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen von 71 Jahren ($p=0,001$). Ebenso ergab sich ein signifikanter Unterschied beim IDH1 Mutationsstatus ($p=0,006$). Nicht signifikant unterschiedlich waren dagegen der ECOG-Status, das angewandte Therapieverfahren, der MGMT-Promotomethylierungsstatus und das Tumolvolumen zwischen den beiden Gruppen mit hoher und niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (Tabelle 10).

Tabelle 10: Statistischer Vergleich der klinischen und molekularen Charakteristika von GBM Patienten mit niedrigem (< 0,3966% des Kalibrators) und hohem (>0,3966% des Kalibrators) MACC1 mRNA Transkript-Konzentration. ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group Score; m = männlich; Med.= Median; meth. = methyliert; MW= Mittelwert; n.-m. = nicht-methyliert; SD = Standardabweichung; TMZ = Chemotherapie mit Temozolomid; w = weiblich; signifikante Werte sind fett gedruckt.

	MACC1 mRNA niedrig			MACC1 mRNA hoch			t-Test/log rank		
Geschlecht	w: 4		m: 18	w: 7		m: 16	p=0,350		
Alter (Jahre)	MW: 56,73	Med: 58,00	SD: 14,1	MW: 68,96	Med: 71,00	SD: 9,0	p=0,001		
ECOG Status	MW: 0,77	Med: 1,00	SD: 0,8	MW: 0,95	Med: 1,00	SD: 0,8	p=0,456		
Tumorvolumen (cm ³)	MW: 33,49	Med: 32,60	SD: 24,2	MW: 45,71	Med: 44,55	SD: 28,1	p=0,135		
MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (%)	MW: 0,177	Med: 0,175	SD: 0,1	MW: 0,811	Med: 0,674	SD: 0,4	p<0,001		
IDH1 Mutations-Status	wildtyp: 16		R132H: 6	wildtyp: 23		R132H: 0	p=0,006		
MGMT Promotor-methylierungsstatus	n.-m.: 9	meth.: 10	fehlt: 3	n.-m.: 11	meth.: 10	fehlt: 2	p=0,759		
Therapieverfahren	Kein TMZ: 5		TMZ: 17	Kein TMZ 11		TMZ: 12	p=0,082		
Progressionsfreies Überleben (Monate)	MW: 10,25	SD: 1,9	Med: 9,00	SD: 3,5	MW: 8,73	SD: 3,1	Med: 5,00	SD: 1,0	p=0,382
Gesamtüberleben (Monate)	MW: 29,68	SD: 5,8	Med: 14,00	SD: 7,0	MW: 9,39	SD: 2,2	Med: 7,0	SD: 1,9	p=0,008

3.2.5 Standardtherapie nach Stupp

Das Standardtherapieregime bei GBM Patienten ist die Therapie nach Stupp, die aus der operativen Resektion und anschließender kombinierter Strahlen- und Chemotherapie mit TMZ und adjuvanter TMZ-Chemotherapie besteht [2]. Nach Unterteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit oder ohne Standardtherapie zeigte sich die Überlebensraten nach 24 Monaten bei Standardtherapie Patienten bei 34,5%, Patienten, die keine Standardtherapie erhielten, überlebten die zwei Jahre nicht (Abbildung 9; $p < 0,001$).

3.2.5.1 IDH1 Mutationsstatus

In der vorliegenden Untersuchung hatten 6 Patienten die IDH1 R132H Mutation und 39 Patienten den IDH wildtyp. Mit Hilfe einer Kaplan-Meier Analyse wurde die 2-Jahres-Überlebensrate dieser Gruppe bestimmt. Von den Patienten mit IDH1 wildtyp überlebten 15,4%, von jenen mit IDH1 R132H Mutation 66,7% diesen Zeitraum ($p = 0,024$) (Abbildung 10).

3.2.6 Clusteranalysen

3.2.6.1 Clusteranalysen der MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen in Kombination mit der TMZ-Chemotherapie

Die Clusteranalyse der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration mit der Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] (siehe Kapitel 1 Einleitung) bildete 4 Cluster. Jeweils die niedrigen und die hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration clusterten mit der Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] und ohne die Standardtherapie. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Clustern ($p < 0,001$). Niedrige MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen clusterten zusammen mit der Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] ($n = 17$) und die entsprechenden Patienten hatten ein medianes Überleben von 22 Monaten (SD 13,1 Monaten). Ihre 2-Jahres-Überlebensrate lag bei 47,1%. Die Cluster mit hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen und mit der Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] setzen sich aus Patienten mit einem medianen Überleben von 8 Monaten (SD 1,7 Monate) und einer 2 Jahresüberlebensrate von 16,7%

zusammen. Patienten mit niedrigen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen, die keine Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] (n=11) erhalten hatten, wiesen ein medianes Überleben von 6 Monaten (SD 5,5 Monaten) auf und Patienten mit hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen ohne Standardtherapie nach Stupp überlebten im Median 4 Monate (SD 2,8 Monaten). Keiner der Patienten ohne Standardtherapie nach Stupp *et al.* [2] überlebten 2 Jahre, unabhängig von der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (Abbildung 11).

3.2.6.2 Clusteranalysen der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration in Kombination mit dem IDH1 Mutationsstatus

Im Zusammenhang der MACC1 mRNA Transkriptkonzentration und dem IDH1 Mutationsstatus wurden 3 Cluster durch Kaplan-Meier-Analyse verglichen. Es zeigte sich im medianen Überleben der Patienten signifikante Unterschiede ($p=0,012$). Patienten mit niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration und IDH1 wildtyp (n=16) überlebten im Median 9 Monate (SD 4,7 Monate) und Patienten mit hoher MACC1 mRNA Transkript-Konzentration und IDH1 wildtyp (n=23) 7 Monate (SD 1,9 Monate). Das längste mediane Überleben hatten Patienten mit niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration und IDH1 R132H Mutation (n=6) mit 25 Monaten (SD 1,1 Monate) (Abbildung 12). Auffällig war, dass die Kombination einer hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration mit der IDH1 R132H Mutation nicht auftrat. Die 2-Jahres-Überlebensraten der Patienten lagen bei IDH1 R132H Mutation und niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration bei 66,7%, bei IDH1 wildtyp und niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration bei 25,0% und bei IDH1 wildtyp und hoher MACC1 mRNA Transkript-Konzentration bei 8,7% (Abbildung 12).

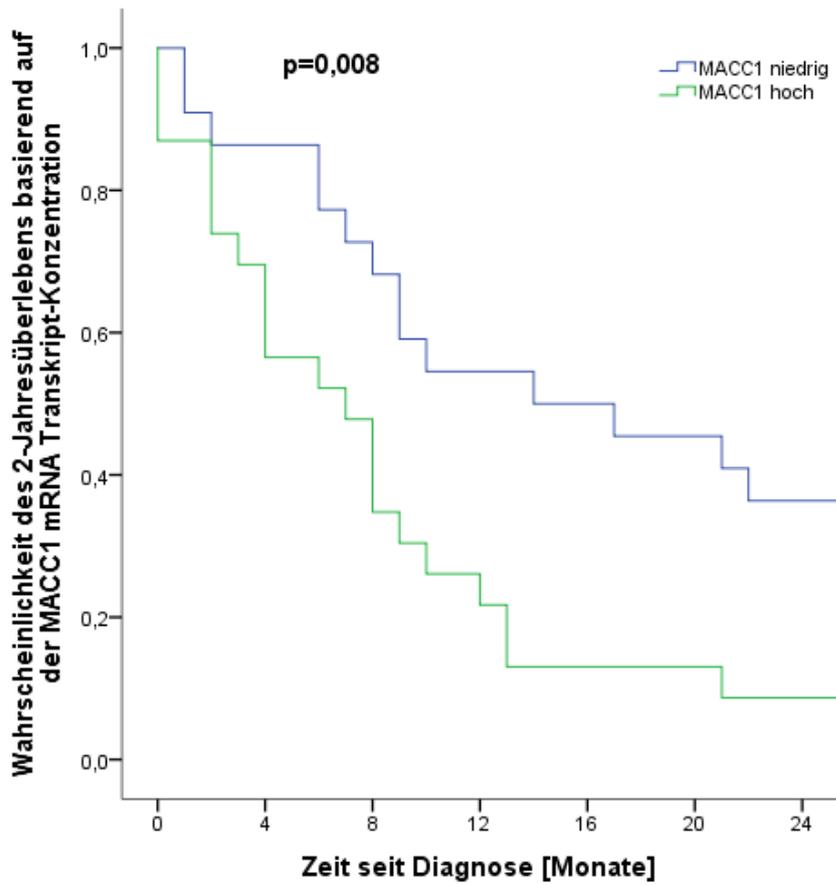


Abbildung 8: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten, Cut-off MACC1-Median 0,3966% des Kalibrators, MACC1 niedrig n=22, MACC1 hoch n=23.

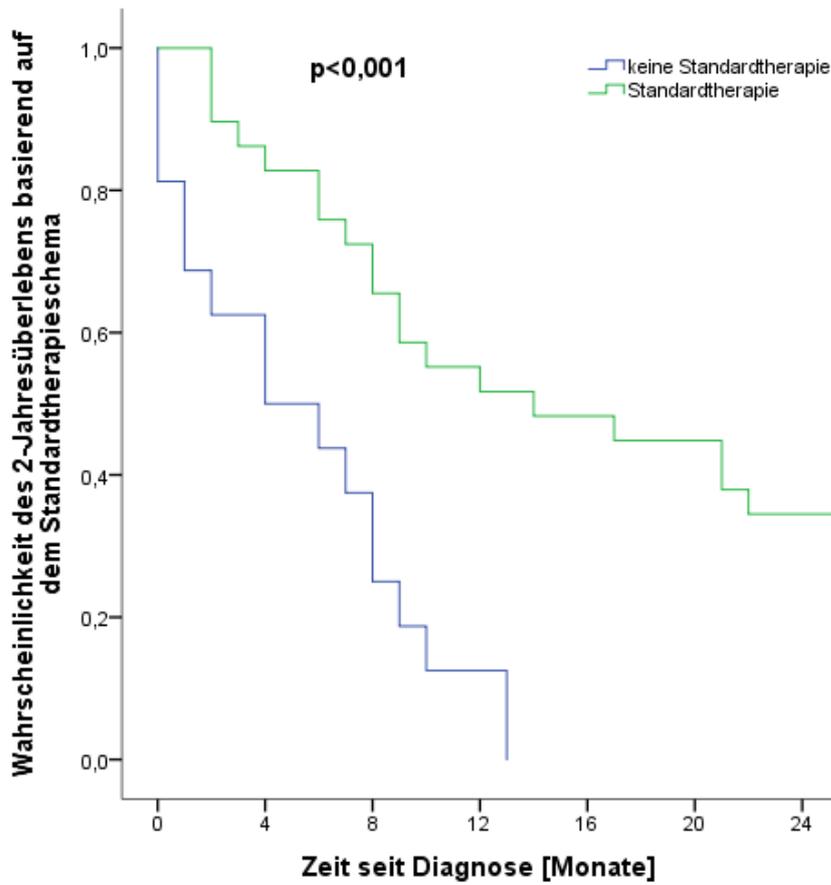


Abbildung 9: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate von GBM Patienten unter Standardtherapie (Operation und Radiochemotherapie nach Stupp) im Vergleich zu GBM Patienten ohne Standardtherapie (Standardtherapie n=29, keine Standardtherapie n=16).

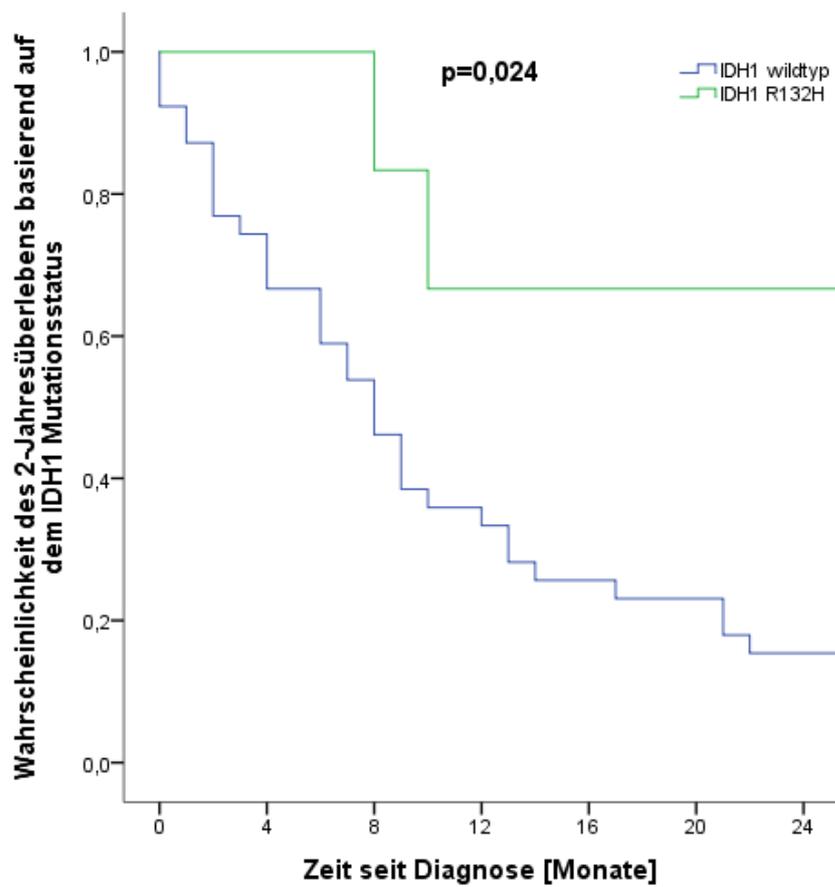


Abbildung 10: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten basierend auf dem IDH1 Mutationsstatus (IDH1 R132H n=6, IDH1 wildtyp n=39)

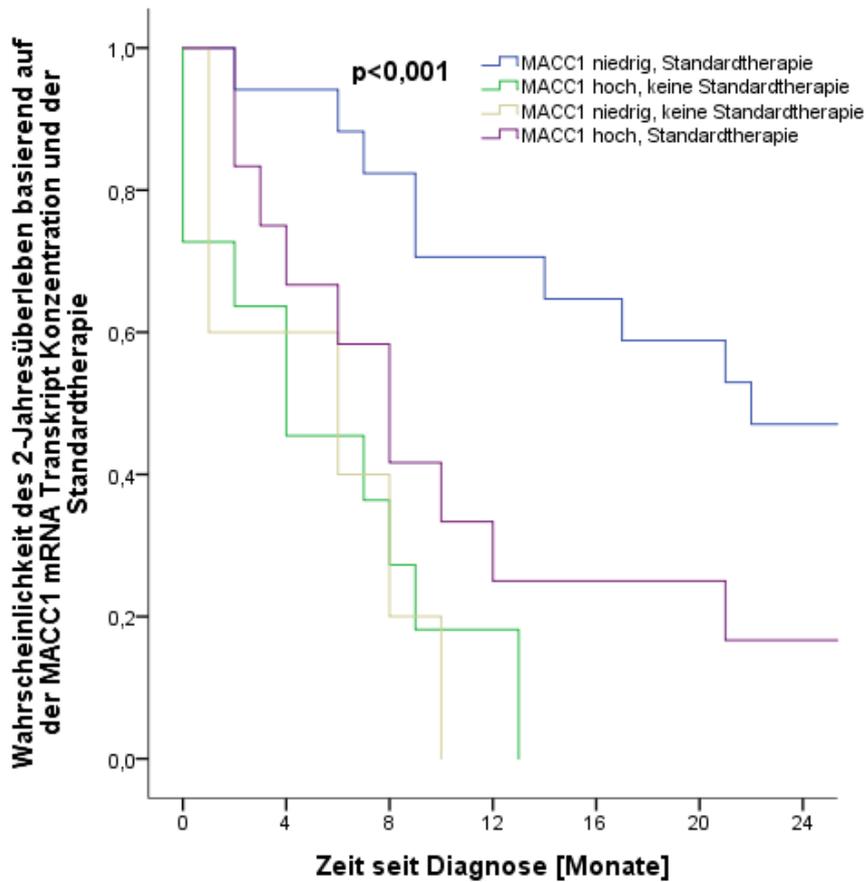


Abbildung 11: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate von GBM Patienten unterteilt nach MACC1 mRNA Transkriptgehalt und Therapieverfahren (1: n=17; MACC1 niedrig und Standardtherapie; 2: n=11; MACC1 hoch und keine Standardtherapie; 3: n=5; MACC1 niedrig und keine Standardtherapie; 4: n=12; MACC1 hoch und Standardtherapie)

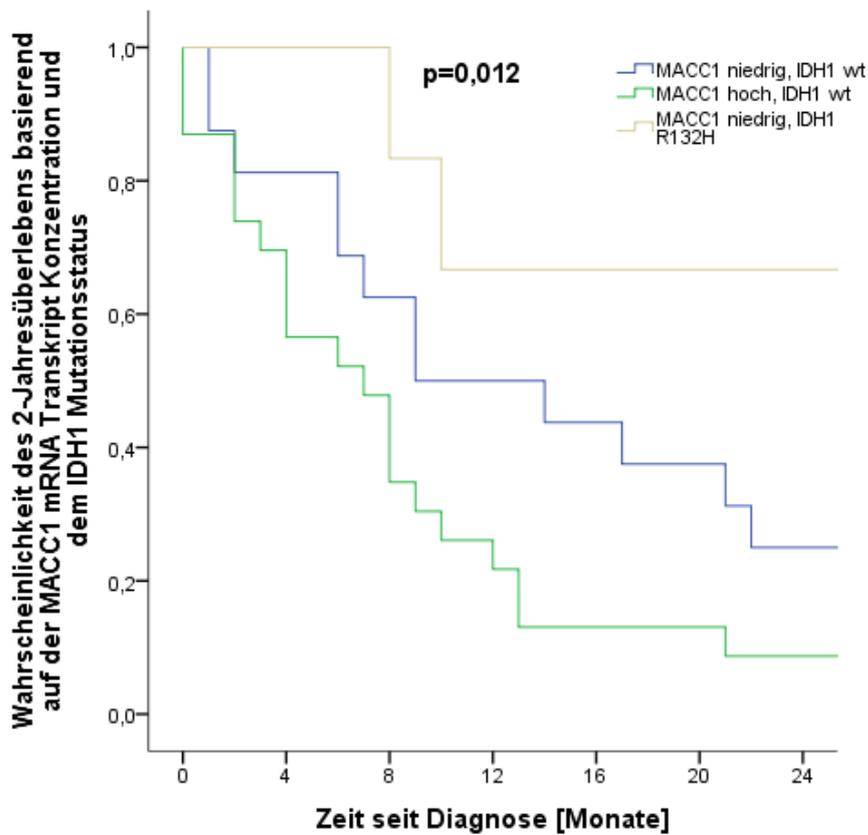


Abbildung 12: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten in Relation zum IDH1 Mutationsstatus und der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (1: n=16; MACC1 niedrig und IDH1 wildtyp; 2: n=23; MACC1 hoch und IDH1 wildtyp; 3: n=6 MACC1 niedrig und IDH1 R132H).

4 Diskussion

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass MACC1 mRNA Transkripte im Blutplasma nicht nur für Kolonkarzinome von prognostischer Relevanz sind, sondern auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC), bei bestimmten Bronchialkarzinomen und anderen Tumoren als prognostischer Blutplasmamarker herangezogen werden können [35–38]. In dieser Arbeit wurde nun erstmals untersucht, inwiefern der Nachweis von MACC1 mRNA Transkripten im Blutplasma prognostische Relevanz für das Überleben von GBM Patienten haben könnte. In der aktuellen WHO Hirntumorklassifikation von 2016 ist erstmals mit dem IDH1 Mutationsstatus ein molekulargenetischer Marker aufgenommen worden, der auch für die Diagnostik von Relevanz ist [8]. Molekulargenetische Faktoren sind nicht nur für die Diagnostik, sondern auch für die Prognose und damit für das therapeutische Vorgehen bei Tumoren relevant. Mit dem MGMT Promotormethylierungsstatus steht zudem ein prognostischer Marker für das Ansprechen auf die Therapie mit dem Alkylans TMZ zur Verfügung [22]. MGMT ist somit ein therapieentscheidender Faktor.

Der MGMT Methylierungsstatus wie auch der IDH1 Mutationsstatus können bisher nur über das aus dem Tumor mittels Biopsie oder operativer Tumorresektion gewonnenen Material bestimmt werden. Hier liegt der große und entscheidende Unterschied zu MACC1. MACC1 mRNA Transkripte können bereits präoperativ aus dem Blutplasma bestimmt werden und benötigen keine aufwendigen operativen Eingriffe.

In der vorliegenden Untersuchung konnte dies nun erstmals für GBM nachgewiesen werden. Die Untersuchung zeigt, dass eine niedrige MACC1 mRNA Transkript-Konzentration mit einem längeren und eine hohe MACC1 mRNA Transkript-Konzentration mit einem kürzeren Gesamtüberleben korrelieren.

Im Vergleich der Gruppen mit hohen und niedrigen MACC1 Blutplasmawerten zeigte sich, dass IDH1 R132H nur in der Gruppe mit der niedrigen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration auftrat, aber nicht bei Patienten mit erhöhter MACC1 mRNA Transkript-Konzentration zu finden war. Auch bestätigte sich in unserer Untersuchung, dass Patienten mit IDH1 mutiertem GBM ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufwiesen. Dass Patienten mit IDH1 R132H mutierten Tumoren ein längeres Überleben

haben als Patienten mit IDH1 wildtyp Tumoren, konnte auch in einer Untersuchung von 445 Tumoren des Zentralnervensystems festgestellt werden [45].

In einer Studie mit 274 chinesischen GBM-Patienten, die die Standardtherapie, also operative Resektion mit anschließender Radiochemotherapie mit TMZ erhielten, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit IDH1 R132H Mutation und MGMT Promotormethylierung, mit einem medianen Überleben von 35,8 Monaten, die beste Prognose hatten [46]. Diese Aussage bestätigt sich in dieser Untersuchung, wobei festzuhalten ist, dass in der hier gezeigten Studie der MGMT Promotormethylierungsstatus keinerlei Einfluss auf das Überleben der beiden gebildeten Gruppen hatte, da der MGMT Promotormethylierungsstatus in beiden Gruppen ausgeglichen vorlag und somit keinen Bias verursachte.

Wurden anhand der medianen MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen zwei Gruppen gebildet, ergaben sich signifikante Unterschiede beim Alter und dem IDH1 Mutationsstatus. Das hohe Alter und der IDH1 wildtyp Status wurde auch in einer Untersuchung von 565 GBM-Patienten als Parameter für schlechte Prognose festgestellt [47]. In dieser Studie wurden zudem ein niedriger Karnofsky-Index/ ECOG-Status sowie die Multifokalität des Tumors als prognostisch ungünstige Faktoren benannt. Dies konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen, da der ECOG-Status in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufwies.

Zirkulierende Blutmarker sind von enormer Wichtigkeit für die Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze, sowie auch entscheidend für die möglichst frühzeitige Prognose bei verschiedenen Tumorentitäten, insbesondere auch beim GBM [41]. Diese Daten zeigen, dass mit der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration ein präoperativer Blutmarker zur Verfügung steht, der in Clusteranalysen zusammen mit weiteren günstigen prognostischen Faktoren eine Prognose bezüglich des Überlebens zulässt. Somit ist es möglich, für jeden Patienten vor Therapiestart eine individuelle Überlebensprognose zu evaluieren. Daneben ist auch der IDH1 Mutationsstatus ein wichtigster Faktor, der eine prognostische Relevanz für das Überleben hat und zudem Teil der WHO Klassifikation ist [8]. Wir konnten zeigen, dass in dieser Kohorte niedrige MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen mit der IDH1 R132H Mutation assoziiert waren, hohe MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen jedoch nicht mit der IDH1

Mutation assoziiert waren. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen der niedrigen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration, sowie der IDH1 R132H Mutation besteht, bedarf weiterer Forschung.

MACC1 ist aus therapeutischer Sicht ein interessantes Protein, das durch Inhibition das Tumorwachstum eingrenzen könnte, da MACC1 an vielen verschiedenen Stellen Einfluss auf das Tumorwachstum hat [48, 49].

Erste Therapieansätze gehen dabei auf verschiedene MACC1 regulierende mRNAs ein, wie zum Beispiel die Regulator mRNA miR-338-3p [50, 51]. Diese mRNA reguliert auch die MACC1 mRNA Expression in GBM Zellen [52]. Eine weitere mögliche Therapieoption stellt die Bildung von Antikörpern, die sich gegen MACC1 richten, dar. So führten MACC1 Antikörper (Chanti-MACC1) in Nicht-Kleinzelligen-Lungenkrebs-Zelllinien zu einer verminderten MACC1 Expression und verhinderten über Blockierung des HGF/c-MET Signalwegs die Tumorzellproliferation, die Tumorzellmigration und Tumordinvasion [53]. Als weitere die MACC1-Expression inhibierende Faktoren gelten Medikamente der Gruppe der Statine, ursprünglich zur Reduzierung des Cholesterinspiegels eingesetzt [54], die bereits in Tierversuchen einen vielversprechenden Erfolg bei MACC1 assoziierten soliden Tumoren zeigten [55]. Lovastatin beeinträchtigt die MACC1 Promotoraktivität, sodass die verminderte MACC1 Expression zu einer verringerten Metastasierung führt [55]. Auch bei 339 dänischen GBM Patienten zeigte der Einsatz von Statinen vor der Diagnose einen möglichen Benefit in Bezug auf das Gesamtüberleben [56].

4.1 Schlussfolgerungen für die Praxis und für weitere Untersuchungen

Die Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen bei GBM zeigen die Relevanz von molekulargenetischen Faktoren bei Tumoren. Insbesondere für die personalisierte Medizin sind solche Faktoren wichtig für die Definition des Therapieansprechens und der Überlebensraten der Patienten. Die vorliegende Untersuchung bestätigt, dass die MACC1 mRNA Transkript-Konzentration ein weiterer vor allem unkompliziert zu gewinnender, da aus dem Blutplasma extrahierbarer, Tumormarker für das GBM sein könnte, der eine prognostische Aussage für die Patienten zulässt. So kann es im klinischen Alltag möglich werden, Patienten eine genauere präoperative Prognose zu geben und so eine

Entscheidung über den weiteren Therapieablauf in Bezug auf operative Resektion und anschließende Chemotherapie oder palliative Therapie zu treffen. Gerade im Bereich der GBM Therapie zeigen sich aktuell verschiedene Erweiterungen u.a. mit Statinen. Zudem bietet MACC1 auch einen therapeutischen Ansatzpunkt.

Weitere Forschungen sollten vor allem molekulargenetische Untersuchungen von Langzeitüberlebenden für die Erkennung weiterer Marker in den Blick nehmen [57].

5 Zusammenfassung

Das GBM ist der aggressivste primäre Hirntumor bei Erwachsenen ohne bekannten Tumormarker. Wir haben im Blutplasma zirkulierende mRNA Transkripte von MACC1, einem prognostischen Biomarker für solide Tumoren, auf ihre Korrelation mit dem klinischem Outcome und der Therapieantwort bei GBM-Patienten getestet. MACC1 mRNA Transkripte waren signifikant erhöht bei GBM-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine niedrige MACC1 mRNA Transkript-Konzentration clusterte mit anderen prognostisch wertvollen Faktoren, wie z.B. dem IDH1 Mutationsstatus: Patienten mit der IDH1 R132H Mutation in Kombination mit einer niedrigen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration wiesen das längste Gesamtüberleben von über 2 Jahren auf, IDH1 wildtyp und eine hohe MACC1 mRNA Transkript-Konzentration führten zum schlechtesten Outcome (medianes Gesamtüberleben 8,1 Monate). Patienten mit IDH1 wildtyp und einer niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration waren intermediär (medianes Gesamtüberleben 9,1 Monate). Kein Patient hatte eine IDH1 R132H Mutation und eine hohe MACC1 mRNA Transkript-Konzentration. Patienten mit niedriger MACC1 mRNA Transkript-Konzentration, die die Standardtherapie nach Stupp erhielten, überlebten länger (medianes Gesamtüberleben 22,6 Monate) als Patienten mit einer hohen MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (medianes Gesamtüberleben 8,1 Monate). Patienten, die keine Standardtherapie erhielten, zeigten das schlechteste Outcome, unabhängig von der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (niedrig: 6,8 Monate, hoch: 4,4 Monate). Durch das Hinzufügen der MACC1 mRNA Transkript-Konzentrationen zur präoperativen Diagnostik könnte somit die Prognose und das Outcome von GBM Patienten genauer evaluiert werden und so eine genauere Einteilung in Therapie- und Risikogruppen erfolgen.

6 Literatur

1. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffiatti R, Wick W (2014) EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *The Lancet Oncology* 15(9):e395-e403. doi:10.1016/S1470-2045(14)70011-7
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 82(10):656–670. doi:10.1007/s00109-004-0564-x
5. Wirsching H-G, Galanis E, Weller M (2016) Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* 134:381–397. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2
6. Forsyth PA, Posner JB (1993) Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology* 43(9):1678–1683. doi:10.1212/wnl.43.9.1678
7. Perkins A, Liu G (2016) Primary brain tumors in adults: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 93(3):211–217
8. Grant R (2004) Overview: brain tumour diagnosis and management/Royal College of Physicians guidelines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 Suppl 2:ii18-23. doi:10.1136/jnnp.2004.040360

9. Jacobs AH, Kracht LW, Gossmann A, Ruger MA, Thomas AV, Thiel A, Herholz K (2005) Imaging in neurooncology. *NeuroRx* 2(2):333–347. doi:10.1602/neurorx.2.2.333
10. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131(6):803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
11. Zou P, Xu H, Chen P, Yan Q, Zhao L, Zhao P, Gu A (2013) IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. *PLoS One* 8(7):e68782. doi:10.1371/journal.pone.0068782
12. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre J-Y (2009) Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 27(25):4150–4154. doi:10.1200/JCO.2009.21.9832
13. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462(7274):739–744. doi:10.1038/nature08617
14. Horbinski C (2013) What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol* 125(5):621–636. doi:10.1007/s00401-013-1106-9
15. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 18(3):636–645. doi:10.1200/JCO.2000.18.3.636
16. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, Schlegel U, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G (2004) Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q

- status with survival. *Brain Pathol* 14(2):121–130. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00044.x
17. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffiatti R, Deimling A von, Ellison DW (2021) The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 23(8):1231–1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
 18. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2):190–198. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190
 19. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsky C (2011) Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol* 13(12):1339–1348. doi:10.1093/neuonc/nor133
 20. Hofer S, Bullinger L, Dierlamm, Judith, Grosu, Anca-Ligia, Hau P, Hense J, Hoffmann, Johannes, Proescholdt, Martin, Pflugshaupt T, Preusser, Matthias, Pukrop, Tobias, Rushing EJ, Wörmann B (2021) Gliome im Erwachsenenalter. Leitlinie. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html>
 21. Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4(4):296–307. doi:10.1038/nrc1319
 22. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331

23. Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E (2001) Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *The Lancet Oncology* 2(9):552–560. doi:10.1016/S1470-2045(01)00489-2
24. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, Bernsen HJJA, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WNM, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K (2013) Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 31(3):344–350. doi:10.1200/JCO.2012.43.2229.
25. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB, Strike TA (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303(23):1323–1329. doi:10.1056/NEJM198012043032303
26. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F et al (2019) Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 393(10172):678–688. doi:10.1016/S0140-6736(18)31791-4
27. Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Hoff DD von (2018) Tumor-treating fields: a fourth modality in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 24(2):266–275. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1117
28. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, Zhu J-J, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim C-Y, Paek S-H, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z (2017) Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a

- randomized clinical trial. *JAMA* 318(23):2306–2316.
doi:10.1001/jama.2017.18718
29. Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I, Birchmeier W, Schlag PM (2009) MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med* 15(1):59–67. doi:10.1038/nm.1889
 30. Arlt F, Stein U (2009) Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol* 41(12):2356–2359. doi:10.1016/j.biocel.2009.08.001
 31. Stein U, Dahlmann M, Walther W (2010) MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med (Berl)* 88(1):11–18. doi:10.1007/s00109-009-0537-1
 32. Organ SL, Tsao M-S (2011) An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol* 3(1 Suppl):S7-S19. doi:10.1177/1758834011422556
 33. Stein U, Smith J, Walther W, Arlt F (2009) MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes. *Cell Cycle* 8(15):2467–2469. doi:10.4161/cc.8.15.9018
 34. Abounader R, Laterra J (2005) Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7(4):436–451. doi:10.1215/S1152851705000050
 35. Shirahata A, Shinmura K, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Hibi K (2010) MACC1 as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 30(7):2689–2692
 36. Chundong G, Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Iwanami T, Nakagawa M, Oyama T, Tanaka F (2011) Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* 31(4):1141–1145
 37. Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Hibi K (2010) MACC 1 as a

- marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma. *Anticancer Res* 30(9):3441–3444
38. Qiu J, Huang P, Liu Q, Hong J, Li B, Lu C, Wang L, Wang J, Yuan Y (2011) Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 9:166. doi:10.1186/1479-5876-9-166
39. Hagemann C, Fuchs S, Monoranu CM, Herrmann P, Smith J, Hohmann T, Grabiec U, Kessler AF, Dehghani F, Löhr M, Ernestus R-I, Vince GH, Stein U (2013) Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro Oncol* 15(12):1696–1709. doi:10.1093/neuonc/not136
40. Stein U, Burock S, Herrmann P, Wendler I, Niederstrasser M, Wernecke K-D, Schlag PM (2012) Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis. *PLoS One* 7(11):e49249. doi:10.1371/journal.pone.0049249
41. Zachariah MA, Oliveira-Costa JP, Carter BS, Stott SL, Nahed BV (2018) Blood-based biomarkers for the diagnosis and monitoring of gliomas. *Neuro Oncol* 20(9):1155–1161. doi:10.1093/neuonc/noy074
42. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343(19):1350–1354. doi:10.1056/NEJM200011093431901
43. Plummer DL (1992) DispImage: Un mezzo di analisi e presentazione per iconografia medica. *Rivista di Neuroradiologia* 5(4):489–495. doi:10.1177/197140099200500413
44. Chow DS, Qi J, Guo X, Miloushev VZ, Iwamoto FM, Bruce JN, Lassman AB, Schwartz LH, Lignelli A, Zhao B, Filippi CG (2014) Semiautomated volumetric measurement on postcontrast MR imaging for analysis of recurrent and residual disease in glioblastoma multiforme. *AJNR Am J Neuroradiol* 35(3):498–503. doi:10.3174/ajnr.A3724

45. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360(8):765–773. doi:10.1056/NEJMoa0808710
46. Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, Qiu X, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Yan W, Li J, You Y, Chen CC, Jiang T (2015) IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 6(38):40896–40906. doi:10.18632/oncotarget.5683
47. Ahmadipour Y, Jabbarli R, Gembruch O, Pierscianek D, Darkwah Oppong M, Dammann P, Wrede K, Özkan N, Müller O, Sure U, El Hindy N (2019) Impact of multifocality and molecular markers on survival of glioblastoma. *World Neurosurg* 122:e461-e466. doi:10.1016/j.wneu.2018.10.075
48. Stein U (2013) MACC1 - a novel target for solid cancers. *Expert Opin Ther Targets* 17(9):1039–1052. doi:10.1517/14728222.2013.815727
49. Radhakrishnan H, Walther W, Zincke F, Kobelt D, Imbastari F, Erdem M, Kortüm B, Dahlmann M, Stein U (2018) MACC1-the first decade of a key metastasis molecule from gene discovery to clinical translation. *Cancer Metastasis Rev* 37(4):805–820. doi:10.1007/s10555-018-9771-8
50. Li P, Chen X, Su L, Li C, Zhi Q, Yu B, Sheng H, Wang J, Feng R, Cai Q, Li J, Yu Y, Yan M, Liu B, Zhu Z (2013) Epigenetic silencing of miR-338-3p contributes to tumorigenicity in gastric cancer by targeting SSX2IP. *PLoS One* 8(6):e66782. doi:10.1371/journal.pone.0066782
51. Ilm K, Fuchs S, Mudduluru G, Stein U (2016) MACC1 is post-transcriptionally regulated by miR-218 in colorectal cancer. *Oncotarget* 7(33):53443–53458. doi:10.18632/oncotarget.10803
52. Shang C, Hong Y, Guo Y, Xue Y (2016) Mir-338-3p inhibits malignant biological behaviors of glioma cells by targeting MACC1 gene. *Med Sci Monit* 22:710–716. doi:10.12659/msm.897055

53. Shi W, Song J, Wang W, Zhang Y, Zheng S (2017) MACC-1 antibody target therapy suppresses growth and migration of non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep* 16(5):7329–7336. doi:10.3892/mmr.2017.7517
54. Endo A (2004) The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl* 5(3):125–130. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.033
55. Juneja M, Kobelt D, Walther W, Voss C, Smith J, Specker E, Neuenschwander M, Gohlke B-O, Dahlmann M, Radetzki S, Preissner R, Kries JP von, Schlag PM, Stein U (2017) Statin and rottlerin small-molecule inhibitors restrict colon cancer progression and metastasis via MACC1. *PLoS Biol* 15(6):e2000784. doi:10.1371/journal.pbio.2000784
56. Gaist D, Hallas J, Friis S, Hansen S, Sørensen HT (2014) Statin use and survival following glioblastoma multiforme. *Cancer Epidemiol* 38(6):722–727. doi:10.1016/j.canep.2014.09.010
57. Jovčevska I (2019) Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosn J Basic Med Sci* 19(2):116–124. doi:10.17305/bjbms.2018.3717

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse
cDNA	complementary DNA (komplementär DNA)
c-MET	Rezeptortyrosinkinase von HGF
DAB	3,3'-Diaminobuttersäure
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group-Skala
GBM	Glioblastoma multiforme
gDNA	genomische DNA
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatopoetic growth factor
HIER	Heat Induced Epitop Retrieval
HRM-qPCR	High Resolution Melting quantitative PCR
IHC	immunhistochemische Färbungen
IDH1	Isozitat-Dehydrogenase 1
IDH2	Isozitat-Dehydrogenase 2
IDHwt	IDH Wildtyp
iMRI	intelligent Magnet-Resonanz-Tomographie
LOH	loss of heterozygosity (kombinierter Verlust der Allele)
m	männlich

MACC1	Metastasis associated in Colon Cancer 1
Med.	Median
meth.	methyliert
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n.-m	nicht methyliert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOS	not otherwise specified
OP	Operation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFS	Progression Free Survival
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Regionen von Interesse (regions of interest)
RT-PCR	real time - PCR
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
sek	Sekunden
STR	short tandem repeat
TBS	Tris-buffered-saline
TMZ	Temozolomid
TTFields	Tumor Treating Fields

w

weiblich

WHO

World Health Organization

wt

wildtyp

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Algorithmus zur Klassifikation diffuser Gliome auf Basis der histologischen und genetischen Parameter nach der WHO Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems von 2016. IDH1 = Isocitratdehydrogenase-1, NOS = not otherwise spezifiziert. (Eigene Abbildung) 3
- Abbildung 2: Algorithmus der postoperativen Therapieentscheidung bei GBM IDH wildtyp. IDH = Isocitratdehydrogenase-1, MGMT= O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase. (Eigene Abbildung) 4
- Abbildung 3: Darstellung der molekularen Mechanismen der MACC1 induzierten Zellapoptose in hepatischen cholangischen Karzinom Zellen (HCC): a) Bei niedriger MACC1 Expression gelangen BAD, Caspase 9 und FKHRL 1 vom Zytoplasma in den Zellkern, regulieren die Transkription ihrer Zielgene und induzieren so die Zellapoptose. b) Bei hoher MACC1 Expression steigert MACC1 durch Aktivierung der Gentranskription von c-Met dessen Expression. HGF bindet an seinen c-MET Rezeptor und aktiviert so den HGF/c-MET Signalweg. Dieser wiederum fördert die Phosphorylierung von BAD, Caspase 9 und FKHRL 1 über PI3K und AKT, p-BAD, p-Caspase 9 und p-FKHRL 1 können nicht mehr in den Zellkern transportiert werden und so dort nicht ihren pro-Apoptotischen Effekt auslösen. Die Zellapoptose wird so bei HCC-Zellen inhibiert. c-Met=Tyrosinkinase-Rezeptor von HGF, HGF = Hematopoetic growth factor. (Eigene Abbildung). 6
- Abbildung 4: Vergleich der MACC1 mRNA Transkript-Konzentration im Plasma aller GBM Patienten (n=45) mit gesunden Kontrollen (n=15). 25
- Abbildung 5: Vergleich der GBM Patienten ohne (n=39; IDH1 wildtyp (wt)) und mit IDH1 R132H Mutation (n=6) und gesunden Kontrollen (n=15). 26
- Abbildung 6: MACC1 mRNA Transkript-Konzentration bei GBM Patienten nach Cluster Analyse (Cluster 1: n=16; Cluster 2 n=23, siehe Tabelle 9). 27
- Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse des 2-Jahresüberlebens basierend auf der Clusterzugehörigkeit. 28

Abbildung 8: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten, Cut-off MACC1-Median 0,3966% des Kalibrators, MACC1 niedrig n=22, MACC1 hoch n=23. 36

Abbildung 9: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate von GBM Patienten unter Standardtherapie (Operation und Radiochemotherapie nach Stupp) im Vergleich zu GBM Patienten ohne Standardtherapie (Standardtherapie n=29, keine Standardtherapie n=16). 37

Abbildung 10: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten basierend auf dem IDH1 Mutationsstatus (IDH1 R132H n=6, IDH1 wildtyp n=39) 38

Abbildung 11: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate von GBM Patienten unterteilt nach MACC1 mRNA Transkriptgehalt und Therapieverfahren (1: n=17; MACC1 niedrig und Standardtherapie; 2: n=11; MACC1 hoch und keine Standardtherapie; 3: n=5; MACC1 niedrig und keine Standardtherapie; 4: n=12; MACC1 hoch und Standardtherapie) 39

Abbildung 12: Kaplan-Maier-Analysen der 2-Jahresüberlebensrate der GBM Patienten in Relation zum IDH1 Mutationsstatus und dem MACC1 mRNA Transkript-Konzentration (1: n=16; MACC1 niedrig und IDH1 wildtyp; 2: n=23; MACC1 hoch und IDH1 wildtyp; 3: n=6 MACC1 niedrig und IDH1 R132H). 40

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	8
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	9
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen	9
Tabelle 4: Antikörper	11
Tabelle 5: Kits	11
Tabelle 6: Primer	12
Tabelle 7: Software	12
Tabelle 8: Klinische und molekulare Charakteristika der Patientenkohorte (n=45); SD = Standardabweichung; TMZ = Temozolomid	23
Tabelle 9: Statistiken der Cluster 1 (n=16) und Cluster 2 (n=23); w = weiblich, m = männlich, SD = Standardabweichung, Standardtherapie = Therapieverfahren nach Stupp mit kokombinanter Chemotherapie mit TMZ und Radiatio, wt = wildtyp	30
Tabelle 10: Statistischer Vergleich der klinischen und molekularen Charakteristika von GBM Patienten mit niedrigem (< 0,3966% des Kalibrators) und hohem (>0,3966% des Kalibrators) MACC1 mRNA Transkript-Konzentration. ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group Score; m = männlich; Med.= Median; meth. = methyliert; MW= Mittelwert; n.-m. = nicht-methyliert; SD = Standardabweichung; TMZ = Chemotherapie mit Temozolomid; w = weiblich; signifikante Werte sind fett gedruckt.	33

IV Danksagung

Danke an das gesamte Team der Tumorbiologie der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik an der Universität Würzburg für Hilfe, Unterstützung und die vielen wertvollen Tipps.

Danke an meine Familie für die Unterstützung, Motivation und Hilfe in allen Lebenslagen.

Der Lebenslauf ist in der digitalen Version dieser Dissertation nicht enthalten.

V Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Hagemann C, Neuhaus N, Dahlmann M, Kessler AF, Kobelt D, Herrmann P, Eyrich M, Freitag B, Linsenmann T, Monoranu CM, Ernestus RI, Löhr M, Stein U.

Circulating MACC1 Transcripts in Glioblastoma Patients Predict Prognosis and Treatment Response. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 13;11(6):825.

VI EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation MACC1 – ein prognostischer Blutmarker für das Überleben von Patienten mit Glioblastoma multiforma? eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 01. Oktober 2022

Unterschrift