

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Christian Mawrin)

in Zusammenarbeit mit der
Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie
des Städtischen Klinikum Magdeburg gGmbH
(Direktor: ChA Dr. med. Werner EK Braunsdorf)

**Tumorregionen-abhängige Expression der
Aminosäure-Sensoren MAP4K3, RagC und VPS34 in
Glioblastomen**

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

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Michael Lalk
aus Forst (Lausitz)
Magdeburg 2018

I Bibliographische Beschreibung:

Lalk, Michael:

Tumorregionen-abhängige Expression der Aminosäure-Sensoren MAP4K3, RagC und VPS34 in Glioblastomen - 2017. - 86 Bl., 10 Abb., 8 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat

Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, ob sich beim Glioblastom die Expression der Aminosäuresensoren *MAP4K3*, *RagC* und *VPS34* zwischen Tumorzentrum und Tumorrandzone unterscheidet und ob die Expressionslevel in diesen Regionen in einem Tumor miteinander korrelieren. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen der Expression dieser Aminosäuresensoren in den Tumorproben und der Überlebenszeit der Patienten untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die mRNAs von MAP4K3 und VPS34 quantitativ gleichverteilt im Tumorzentrum und der Randzone exprimiert waren mit minimaler und nicht signifikanter Mittelwertsdifferenz der Regionen. Im Gegensatz dazu zeigte RagC-mRNA im Tumorzentrum zwar eine mittlere Expression von nur 61% gegenüber der Randzone, jedoch ohne statistische Signifikanz dieser Differenz bei den verfügbaren 37 Tumoren.

MAP4K3 hatte einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Glioblastompatienten, wobei eine hohe Expression sowohl im Tumorzentrum als auch in der Tumorrandzone mit einem längeren Gesamtüberleben einherging ($p < 0,05$). RagC zeigte für die Randzone ebenfalls ein signifikant ($p < 0,05$) längeres Überleben für hohe Expressionswerte, während VPS34 in Tumorzentrum und -randzone keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hatte. Diese Daten zeigen, dass die Expression von bestimmten Aminosäuresensoren beim Glioblastom eine Heterogenität innerhalb des Tumors aufweist, und dass eine hohe Expression einiger Aminosäuresensoren

möglicherweise mit einer positiven Prognose für das Überleben der Patienten einhergeht. Obwohl die verfügbaren Behandlungsdaten zunächst keinen störenden Effekt der variablen Behandlungsintensität auf den prognostischen Wert der Aminosäuresensoren vermuten ließen, bedarf dieser Aspekt einer Überprüfung an einem größeren und homogeneren Kollektiv.

Schlüsselwörter

Glioblastom; mTORC1; RagC; MAP4K3; VPS34

II Inhaltsverzeichnis

I Bibliographische Beschreibung:	2
II Inhaltsverzeichnis	4
III Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einführung	9
1.1 Glioblastom	9
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	9
1.1.2 Symptome und Diagnostik	10
1.1.3 Neuropathologische Diagnostik	11
1.1.4 Therapie	12
1.2 mTOR als Schaltzentrale wichtiger intrazellulärer Prozesse	17
1.2.1 Regulation des Zellwachstums durch mTORC1	17
1.2.2 Organisation des Zytoskeletts durch mTORC2	18
1.2.3 Aktivierung von mTORC1 durch MAP4K3	19
1.2.4 Aktivierung von mTORC1 durch die RAG-GTPase	20
1.2.5 VPS34 als Aminosäuresensor und wichtiger Regulator der Autophagozytose	21
1.3 Motivation der Arbeit durch Vorversuche der Arbeitsgruppe	21
2 Zielstellung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Klinische Versorgung und operatives Vorgehen	24
2.1.1 Patientenkollektiv	24
2.1.2 Operation	24
2.1.3 Probenseparation	25
2.1.4 Postoperative Versorgung	26
2.1.5 Erhebung der Überlebenszeit	27
2.1.6 Alter bei Diagnose	27
2.1.7 Tumorlokalisation	27
2.1.8 Methylierungsstatus	28
2.1.9 Gliadel®-Einlage	28
2.2.1 Extraktion von RNA	30
2.2.2 Herstellung von cDNA aus RNA mittels reverser Transkriptase	30
2.2.3 Real-Time-PCR (quantitative PCR)	31
2.2.4 Immunhistochemie (Tissue Microarray, TMA)	32
2.2.5 Extraktion von Proteinen aus Gewebeproben	34
2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.2.7 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)	36
2.2.8 Western-Blot	36
2.2.9 Proteinnachweis	37
2.2.10 Puffer und Lösungen	39
2.2.11 Feinchemikalien	40
2.2.12 Spezifische cDNA-Primer	41
2.2.13 Verwendete Antikörper	41
2.3 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Überlebenszeit der Patienten	43
3.1.2 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MGMT-Status	43

3.2.1 MAP4K3	48
3.2.2 RagC	50
3.2.3 VPS34	52
<i>Abb. 8: Dargestellt werden repräsentative Bilder der Immunhistochemie für MAP4K3 im Tumorzentrum (A) und in der Tumorrandzone (B) sowie für RagC im Tumorzentrum (C) und der Tumorrandzone (D).</i>	54
3.2.4 Korrelation von der Δ Ct-Werte MAP4K3, RagC und VPS34 untereinander an gleicher Lokalisation	55
3.2.5 Weitere statistisch signifikante Korrelationen	55
4. Diskussion	58
4.1 Biometrische Daten und MGMT-Status bezogen auf Vergleichskollektive	58
4.2 Kritische Betrachtung zu MAP4K3	60
4.3 Kritische Betrachtung für RagC	64
4.4 Kritische Betrachtung für VPS34	66
4.5 Behandlungsintensität als Störvariable für die Überlebenseffekte der Aminosäuresensor-Expression	67
4.6 Der Einsatz von Gliadel® bei Glioblastomen in der Primärtherapie	70
4.7 Ausblick	71
5. Zusammenfassung	73
IV Quellenverzeichnis	74
V Danksagung	82
VI Ehrenerklärung	84
VII Darstellung des Bildungsweges	85

III Abkürzungsverzeichnis

ΔC_t	Cycle threshold normiert gegen $\beta 2$ -Mikroglobulin
λ	Wellenlänge (Lambda)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
3-D	dreidimensional
4E-BP1	4E-bindendes Protein 1
5-ALA	5-Aminolävulinsäure (5-Aminolaevulinacid)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	
A	Österreich
a	Jahr
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Anz.	Anzahl
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aminosäuretransporter
BE	
BE	Belgien
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	
ca.	circa
CA	
CA	Kalifornien
cCT	
cCT	cerebrale Computertomographie
cdNA	
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
cMRT	
cMRT	cerebrale Magnetresonanztomographie
C_t	
C _t	cycle threshold
CT	
CT	Computertomographie
D	
D	Deutschland
Deptor	
Deptor	DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DNA	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ECL-Film	
ECL-Film	enhanced Chemilumineszenz-Film
EDTA	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF4B	
eIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
EMA	
EMA	European Medicine Agency
Fa.	
Fa.	Firma
FDA	
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika

g	Gramm
gGmbH	gemeinnützige Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradishperoxidase)
IDH 1 und 2	Isocitrat-Dehydrogenase 1 und 2
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Mol/molarem
m	männlich
mA	Miliampere
MA	Massachusetts
MAC	Macintosh
MAP4K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase Kinase 3
mg	Milligramm
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolarem
MO	Missouri
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MTLA	medizinisch technische Laborassistentin
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mSIN1	mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC 1	mammalian Target of Rapamycin-Komplex 1
mTORC 2	mammalian Target of Rapamycin-Komplex 2
Na ₂ EDTA	Natrium-2-Ethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
NaF	Natrium-Fluorid
NL	Niederlande
nm	Nanometer

p	Signifikanzwert
PA	Pennsylvania
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PET	Positronenemissionstomographie
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität)
PIKK	phosphatidylinositol kinase-related kinase
PRAS 40	40 kDa prolin-rich Akt substrate
PRR5	Proline-rich protein 5
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	Tumorrandzone
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
RagC	Ras-related GTP-binding protein C
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rt	reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
S6K1	S6 Kinase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
S.E.M.	Standardfehler
T1	Tumorzentrum
T2	Tumorrandzone
T _{annealing}	Annealing-Temperatur
TBS	Tris gepufferte Lösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERTp	Promoter der Telomerase reverse transcriptase
TMA	Tissue-Microarray
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Einheiten (units)
UK	Vereinigtes Königreich (United Kingdom)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
VPS 34	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (vacuolar protein sorting)
v/v	volume per volume
w	weiblich
WA	Washington
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
w/v	weight per volume
Z	Tumorzentrum
z. B.	zum Beispiel

1. Einführung

1.1 Glioblastom

Beim Glioblastom handelt es sich um einen infiltrativ wachsenden hirneigenen Tumor astrozytärer Abstammung. Die Einteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems erfolgt aktuell nach der überarbeiteten WHO-Klassifikation von 2016, welche die alte Fassung aus dem Jahr 2007 ablöste [1, 2]. Nach der WHO-Klassifikation handelt es sich beim Glioblastom um einen Grad-IV-Tumor. Den Namen erhielt der Tumor durch die Beschreibungen von Bailey und Cushing. Diese nahmen an, dass es sich um einen Tumor ausgehend von den astrozytären Vorläuferzellen (Glioblasten) handelt [3]. Zudem beschrieben sie das heterogene histologisch-mikroskopische Bild mit pathologischen Gefäßen, Einblutungen und Nekrosen neben vitalen Tumorzellen als „multiform“ [3].

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Rate der Neuerkrankungen liegt in Europa je nach Quelle zwischen 3,6 und 4,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [4, 5]. Männer sind im Vergleich zu Frauen häufiger betroffen (Verhältnis m:w = 1,5) [4]. In den meisten Fällen handelt es sich um primäre Glioblastome (etwa 91%). Ein kleinerer Teil der Tumoren wird als malignisiertes niedriggradiges Astrozytom (etwa 9%) klassifiziert [6, 7].

Die Mehrheit der Glioblastome tritt sporadisch auf. In seltenen Fällen (1%) können sie jedoch auch im Rahmen genetischer Erkrankungen wie z. B. dem Li-Fraumeni-Syndrom, Neurofibromatose Typ I, tuberöser Sklerose oder dem Turcot-Syndrom auftreten [8].

Die Angaben zur medianen Überlebenszeit nach der Diagnosestellung eines Glioblastomes variieren zwischen 4,8 und 6,1 Monaten [4, 5]. Die Überlebenszeit ist unter anderem in hohem Maße vom Alter der Patienten bei Diagnosestellung abhängig. Für die Altersgruppe der 20-44-Jährigen beträgt sie 16,2 Monate, für die 45-69-Jährigen 7,9 Monate und für die über 69-Jährigen noch 3,2 Monate [4].

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Risikofaktoren, die bei der Entstehung des Glioblastomes eine Rolle spielen könnten, diskutiert. Studien zeigen, dass radioaktive Strahlung als gesichert angenommen werden kann [9, 10]. Für andere Umweltfaktoren wie Rauchen [11] oder elektromagnetische Felder [12] konnte kein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Glioblastomen nachgewiesen werden.

Typischerweise metastasieren Glioblastome nicht außerhalb des Gehirns. In einzelnen Fällen konnten jedoch auch Metastasen im zentralen Nervensystem [13] oder noch seltener auch in Organen außerhalb des Nervensystems nachgewiesen werden [14].

1.1.2 Symptome und Diagnostik

Glioblastome können eine Vielzahl neurologischer Ausfälle verursachen. In den meisten Fällen werden Glioblastome jedoch durch epileptische Anfälle oder Verwirrheitszustände symptomatisch [15]. Jüngere Patienten fallen dabei häufiger durch epileptische Anfälle auf, wohingegen ältere Menschen vorwiegend mit Verwirrheitszuständen symptomatisch werden [15]. Weitere Erstsymptome können Persönlichkeitsveränderungen, Lähmungserscheinungen oder Taubheitsgefühle sein. Die neurologische Symptomatik wird hierbei sowohl durch die Raumforderung des Tumors selbst als auch den Funktionsverlust des umgebenden Hirngewebes durch das begleitende perifokale Hirnödeme hervorgerufen.

In der Notfall-Diagnostik erfolgt häufig als Erstes eine native cCT-Untersuchung. Hierbei fallen typischerweise hypodense Areale auf, welche dem Tumor und seinem perifokalen Ödem entsprechen. Als Goldstandard in der präoperativen Diagnostik gilt jedoch die kontrastmittelunterstützte cMRT [16].

Mit der Weiterentwicklung der MRT-Technologie ergab sich in den vergangenen Jahren auch die Möglichkeit der präziseren Darstellung von Tumoren. Einige Forschungsgruppen setzten sich auch mit der Entwicklung von Diagnostikstandards auseinander, welche im günstigsten Fall zur nichtinvasiven Diagnosestellung führen sollten. Im Fokus standen hierbei die Perfusions-MRT, die MRT-Spektroskopie und die PET-MRT [17, 18].

Bei der Kombination aus Perfusions-MRT und MRT-Spektroskopie [19] oder der Perfusions-MRT [20] allein konnten eine gute Differenzierung zwischen solitären Metastasen auf der einen und malignen Gliomen auf der anderen Seite nachgewiesen werden. Hingegen zeigten andere Studien, dass die Differenzierung maligner Gliome gegenüber Abszessen oder Lymphomen eher weniger erfolgreich war [21].

Bisher konnte noch für keine präoperative Diagnostik eine sichere Differenzierung für Glioblastome gegenüber anderen raumfordernden intrakraniellen Prozessen nachgewiesen werden [17].

1.1.3 Neuropathologische Diagnostik

1.1.3.1 Histologie

Als Goldstandard für die Diagnosesicherung gilt nach wie vor die histologische Sicherung des Glioblastomes nach operativer Probenentnahme [22, 23].

Das Präparat enthält sehr dicht gestaffelte Zellen glialen Ursprungs, welche sich durch die typischen fibrillären Gliafortsätze auszeichnen. Es finden sich meist deutlich vermehrt Mitosen. Der Randbereich zeigt reaktiv verändertes Hirnparenchym, welches diffus durch Glioblastomzellen infiltriert wird. Nach der WHO-Klassifikation ist für die Diagnose eines Glioblastomes das Vorliegen von Nekrosen und/oder Gefäßproliferaten erforderlich [1, 2].

1.1.3.2 Molekularpathologie

Weiterhin ist für die Prognose relevant, ob es sich bei dem vorliegenden Tumor um ein primäres Glioblastom oder sekundäres, also aus einem niedriggradigeren Gliom entstandenes Glioblastom handelt [24]. Einen wichtigen Hinweis auf das Vorliegen eines sekundären Glioblastomes bietet der Nachweis der Mutation von *IDH1* oder *IDH2*, zwei Isoformen des Enzyms Isocitrat-Dehydrogenase, welche eine wichtige Rolle im Citratcyclus der Zelle spielen [7]. Mittels eines Antikörpers kann sicher die häufigste Mutation (88%), eine Punktmutation mit Austausch von Arginin durch Histidin, des *IDH1*-Gens (R132H) diagnostiziert werden [25].

Hinweise auf das Vorliegen eines primären Glioblastomes sind vor allem die Amplifikation des EGF-Rezeptors (epithelial growth factor-Rezeptor; EGFR) und Deletionen im Gen *CKN2A*, welches für den Tumor Suppressor p16 kodiert [1, 2, 26].

Ein weiterer wichtiger prognostischer Hinweis ist der Methylierungsstatus des Promotors der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Der Methylierungsstatus wird mit verschiedenen DNA-Analyseverfahren bestimmt. Im Normalfall geschieht dies mittels methylierungsspezifischer PCR [27].

Die häufigste Mutation bei primären Glioblastomen ist die des Promoters der Telomerase reverse Transkriptase (TERTp), welche sich in 55-85% der IDH-Wildtyp-Glioblastome findet [28-30]. Es bestehen Abhängigkeiten der prognostischen Bedeutung von TERTp, IDH-1 und MGMT [29, 30].

Eine Mutation von *TP53* lässt sich in rund 30% der primären Glioblastome und etwa 60% der sekundären Glioblastome detektieren [26]. Mutationen des *PTEN*-Gens,

welches mit seinem Protein PTEN ebenfalls an der Apoptose, dem kontrollierten Zelltod beteiligt ist, werden in 24% der Glioblastome beschrieben [26].

Tabelle 1: Merkmale primärer und sekundärer Glioblastome. Zur einfacheren Darstellung wurden nur die Daten verwendet, welche das mutierte IDH-1 als Klassifizierung für primäre und sekundäre Glioblastome verwenden.

	Primäres Glioblastom	Sekundäres Glioblastom	Quellen
	91,2%	8,8%	[6]
Symptombdauer bei Diagnose	3,9 Monate	15,2 Monate	[6]
Verhältnis männlich/weiblich	1,2-1,46/1	1-1,12/1	[6, 31-33]
Medianes Überleben OP+Radiatio	9,9 Monate	24 Monate	
OP+Radiochemotherapie	15 Monate	31 Monate	[6, 31-34]
Mutation von <i>IDH1</i>	0%	100%	per Definitionem
Mutation von <i>TP53</i>	19-27%	76-81%	[6, 26, 31, 33-35]
Gesteigerte Expression von EGFR	35-39%	0-6,5%	[6, 26, 31, 33, 35]
Mutation von <i>CDKN2A</i>	30-45%	7-22%	[6, 31, 33]
Mutation von PTEN	24-26%	0-8%	[6, 31, 33]
Verlust von 19q	4%	32%	[6, 36]
Verlust von 10q	67%	73%	[6, 33]

adaptiert nach Ohgaki et al [7]

1.1.4 Therapie

1.1.4.1 präoperative Therapie

Bei der präoperativen Therapie steht die Konditionierung des Patienten für eine Operation im Vordergrund. So sollte ein ausgedehntes Hirnödem präoperativ mit Kortikosteroiden oder osmotisch wirksamen Medikamenten wie Mannitol behandelt werden. Durch diese Maßnahmen können vor allem bereits aufgetretene neurologische Defizite deutlich abgemildert werden.

Sollte der Patient bereits präoperativ mit epileptischen Anfällen symptomatisch geworden sein empfiehlt sich eine prä- und perioperative antiepileptische Therapie. Eine prophylaktische Gabe von Antiepileptika ist jedoch nicht indiziert [37].

1.1.4.2 Operation

Präoperativ werden eine Kontrastmittel-MRT oder eine Kontrastmittel-CT des Kopfes für die Operationsplanung durchgeführt. Zum klinischen Standard gehört die Operation mit Hilfe der intraoperativen Neuronavigation nach Referenzierung mit einem der beiden Verfahren.

Es stehen verschiedene Operationsverfahren zur Verfügung: zum einen die Biopsie sowie die offene Probeentnahme im Rahmen der mikrochirurgischen Tumorsektion. Für die Feststellung einer Diagnose ist die mikrochirurgische Operation der Biopsie nicht überlegen [38].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass für das Glioblastom das Ausmaß der Resektion des soliden Tumoranteils ein wichtiger prognostischer Faktor bezüglich progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberlebenszeit ist [39-43].

Das Ziel der Operation ist daher, gestützt durch verschiedene Verfahren, eine maximale Resektion bei möglichst geringen postoperativen neurologischen Defiziten zu erreichen. Das Problem einer möglichst vollständigen Resektion der Tumore besteht im Wachstumsverhalten des Glioblastomes. Anders als zum Beispiel die meisten Metastasen wachsen Gliome infiltrativ. Das bedeutet, dass der Tumor makroskopisch als auch mikroskopisch sich zum gesunden Hirngewebe nicht klar abgrenzen lässt.

Bekannt ist, dass das Tumorstadium in der Mehrheit der Rezidivsituationen entsprechend dem infiltrativen Charakter des Tumors von der Tumorrandszone am Übergang zum gesunden Hirngewebe ausgeht [44].

Für die Operation von malignen Gliomen werden daher Verfahren benötigt, die eine möglichst genaue Darstellung der Tumorausdehnung ermöglichen aber auch die eloquenten Strukturen des Gehirns aufzeigen, um postoperativ möglichst wenig neurologische Defizite zu erhalten.

Mittels der intraoperativen Neuronavigation werden präoperative Aufnahmen des Kopfes in ein 3D-Bild umgewandelt. Während der Operation ist so ein zielgerichtetes Aufsuchen des Tumors unter Schonung der eloquenten Hirnareale möglich. Die größte Herausforderung bei der Arbeit mit der Neuronavigation besteht im sogenannten „brainshift“. Der Begriff beschreibt die intraoperative Verschiebung von Hirnbereichen durch Hirnschwellung oder Resektion des Tumors. Während der Operation ist das Gehirn also Veränderungen unterworfen, welche von der Neuronavigation nicht automatisch kompensiert werden können. Mit der Dauer der Operation und den damit

einhergehenden Veränderungen am Gehirn selbst werden daher weitere Verfahren benötigt um eine möglichst vollständige Resektion unter Vermeidung neurologischer Defizite zu ermöglichen [45, 46].

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung der Tumorgrenzen bei malignen Gliomen ist der Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Hierbei handelt es sich um eine Aminosäure, welche im Häm-Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Häm ist ein Molekül, welches den Sauerstofftransport durch die Erythrozyten im Körper und in den Körperzellen ermöglicht. Charakteristisch für 5-ALA ist, dass es sich in Glioblastomzellen verstärkt anreichert [47]. In den Tumorzellen kommt es dadurch zu einer verstärkten Bildung von Protoporphyrin IX aus 5-ALA [48]. Zusätzlich dazu wird die Akkumulation des Protoporphyrin IX gefördert, bedingt durch eine verringerte Weiterverarbeitung im Rahmen der Häm-Synthese und durch den Mangel an dem Enzym Ferrochelatase in Glioblastomzellen [49].

Während der Operation können daher durch den Einsatz von Licht einer definierten Wellenlänge ($\lambda=400-410\text{nm}$) die malignen Gliomzellen sichtbar gemacht werden. Die Gliomzellen imponieren dabei stark violett bis intensiv rot im Zentrum und gehen in eine zarte rosa Fluoreszenz im Randbereich über. Normales Hirngewebe zeigt im Kontrast dazu kaum eine Fluoreszenz. Mit dieser Methode ist demzufolge eine großzügige Resektion des Tumors möglich [50, 51]. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzbasierten Methode konnten selbst Bereiche, welche im MRT oder im PET-Scan noch nicht als tumorinfiltriert identifizierbar waren mit Hilfe der Fluoreszenz intraoperativ als tumorbefallen detektiert werden [51, 52].

Den Patienten wurde dafür 2-4 Stunden vor der Operation 5-ALA (Handelsname: Gliolan®) in entsprechender Menge (20-30 mg/kg KG) verabreicht.

Die Anwendung von 5-ALA allein ist insofern riskant, als dass durch die Resektion mit Hilfe der Fluoreszenz allein auch infiltrierte eloquente Hirnbereiche reseziert werden können. Verhindern lässt sich dies nur durch die gleichzeitige Anwendung anderer Verfahren wie zum Beispiel der Neuronavigation.

Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung der Schädigung eloquenter Areale ist die sogenannte Wach-Operation. Hierbei wird die Kraniotomie unter lokaler Betäubung und Sedierung des Patienten durchgeführt. Während der Tumorsektion wird dann die Sedierung pausiert und der Patient wird aufgefordert in Abhängigkeit der Tumorlokalisierung Sprachübungen, Fingerbewegungen, Beinbewegungen oder Rechenaufgaben durchzuführen. Ebenso Anwendung findet auch die intraoperative

elektrische Stimulation einzelner Hirnareale zur Austestung eloquenter Bezirke. Dieses Verfahren gilt in Verbindung mit dem Fluoreszenz-Verfahren als sehr sicher mit gutem Resektionsausmaß bei geringen neurologischen Defiziten [53].

Die intraoperative Darstellung des Situs mit Ultraschall ermöglicht über spezielle Module die Anpassung der Neuronavigation an die durch den brainshift entstandenen Veränderungen [54].

Ebenso ermöglicht die Anwendung eines intraoperativen MRTs die Korrektur der Neuronavigation [55]. Zusätzlich dazu erhöht der Einsatz des intraoperativen MRTs das Ausmaß der Resektion des im MRT nachweisbaren Tumors [43].

Kritisch zu bemerken bleibt, dass auch Bereiche mit Tumordinfiltration teilweise kein MRT-Kontrastmittel aufnehmen und daher auch nicht mittels intraoperativer MRT detektiert werden können [52].

Postoperativ sollte eine MRT des Kopfes mit Kontrastmittel innerhalb der ersten 48 Stunden durchgeführt werden um das Ausmaß der Resektion möglichst sicher beurteilen zu können [56].

1.1.4.3 Anwendung von intraoperativer Chemotherapie mit Gliadel®

Bereits während der Operation besteht die Möglichkeit einer lokalen Chemotherapie. Eine Zulassung für die Behandlung des Glioblastomes besitzt aktuell nur das Präparat Gliadel® der Firma ProStrakan. Hierbei handelt es sich um mit Carmustin beladene Polymer-Plättchen. Carmustin ist ein Vertreter der Nitrosoharnstoffe und entfaltet seine Wirkung durch Alkylierung von DNA und RNA. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die mediane Überlebenszeit durch die Anwendung von Carmustin gesteigert werden konnten [57-59]. Die Angaben über die Verlängerung der Lebenszeit variieren je nach Autor. In einer Metaanalyse von 62 Publikationen wurde ein medianes Überleben von 16.4 +/- 21.6 Monaten mit Gliadel® und 13.1 +/- 29.9 Monaten ohne Gliadel® angegeben [59].

1.1.4.4 Bestrahlung

Die Radiotherapie mit der Bestrahlung des Glioblastomes gilt auch aktuell noch als wichtige, weil lebensverlängernde Therapie in der Behandlung [4, 60, 61]. Als Standarddosis wurden 60Gy mit Einzeldosen von 1,5-2Gy etabliert [62]. Empfohlen wird auch die Bestrahlung eines Randbereiches um den Tumorrund/Rand der Resektion von 2cm in Abhängigkeit von den umliegenden Strukturen [62]. Gerade bei älteren Patienten kann aufgrund der zu erwartenden schlechteren Prognose und nicht zu erwartender Spätfolgen auch eine intensiviertere Radiatio mit 35-40Gy in Einzeldosen von 2,5-3Gy erwogen werden [61, 63]. Auch gerade bei älteren Patienten zeigt die Bestrahlung des Tumors eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit bei geringer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes und der Lebensqualität [64].

1.1.4.5 Adjuvante Chemotherapie und kombinierte Radiochemotherapie

Bis zum Jahr 2005 galt die Operation des Glioblastomes mit nachfolgender alleiniger Bestrahlung des Gehirns als Standardtherapie. Stupp *et al* konnten 2002 erstmals die Wirksamkeit von Temozolomid, einer alkylierenden Substanz, bei der Behandlung von Glioblastomen nachweisen [65]. Die Wirksamkeit der kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomid (Temodal®) und Bestrahlung des Gehirns konnte nachfolgend in mehreren Studien bestätigt werden [61, 66, 67].

Die mittlere Überlebenszeit durch die Anwendung der kombinierten Radiochemotherapie ohne vorherige Operation konnte von 8,1 auf 9,7 Monate gesteigert werden und das Überleben der Patienten, die vorher operiert wurden verlängerte sich im Mittel von 12 auf 14,2 Monate [67].

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Überlebenszeit positiv mit dem Alter der Patienten korreliert [66, 67]. Weitere Untersuchungen konnten nachweisen, dass eine Mono-Therapie bei Patienten die älter als 65 Jahre waren ein besseres medianes Überleben erbrachte im Vergleich zur kombinierten Radiochemotherapie [60]. MGMT-positive Patienten scheinen dabei besser auf Temozolomid anzusprechen als MGMT-negative Patienten [60]. Bei MGMT-negativen Patienten wird daher eine alleinige Bestrahlung empfohlen wohingegen MGMT-positive Patienten eine Chemotherapie mit Temodal® als Mono-Therapie erhalten sollten [60].

In den EANO-Richtlinien von 2017 findet sich aus diesem Grund die Empfehlung, Patienten mit einem Alter bis zu 70 Jahren, welche sich in gutem neurologischen

Zustand befinden, mit einer kombinierten Radio-Chemotherapie zu behandeln [68]. Für Patienten, welche älter als 70 Jahre sind wird hingegen eine Mono-Therapie mit hypofraktionierter Bestrahlung bei unbekanntem oder nicht methyliertem MGMT-Promoter und alleiniger Temozolomid-Therapie bei methyliertem MGMT-Promoter empfohlen [68].

Das Medikament Bevacizumab (Avastin®) wurde 2009 von der FDA zugelassen für die Behandlung des Glioblastomes beim Progress unter laufender Chemotherapie mit Temozolomid. Eine groß angelegte multizentrische doppelblinde Studie konnte ein verbessertes progressionsfreies Überleben in der Primärtherapie des Glioblastoms nachweisen [69]. Dabei wurde keine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei vermehrten Nebenwirkungen im Vergleich zum Placebo festgestellt [69]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde 2014 seitens der EMA die Zulassung von Bevacizumab für die Therapie des Glioblastomes abgelehnt.

1.2 mTOR als Schaltzentrale wichtiger intrazellulärer Prozesse

Anabole und katabole Prozesse eines Gewebes oder einzelner Zellen befinden sich in einem gut kontrollierten Gleichgewicht. Der mTOR-Proteinkomplex (mammalian Target of Rapamycin) ist an verschiedenen anabolen und katabolen Prozessen in der Zelle beteiligt [70, 71]. mTOR wird funktionell der Gruppe der PIKKs (phosphatidylinositol kinase-related kinase) zugeordnet aufgrund seiner Seronin-/Threonin-Kinase-Domäne am Carboxyl-Ende und ist 280 kDa groß [71]. Es bildet 2 unterschiedliche Proteinkomplexe, mTORC1 und mTORC2, welche sich strukturell voneinander unterscheiden und in der Zelle verschiedene Funktionen erfüllen [72, 73].

1.2.1 Regulation des Zellwachstums durch mTORC1

mTORC1 (mTOR-Komplex 1) setzt sich zusammen aus den Proteinen mTOR, mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), PRAS 40 (40 kDa prolin-rich Akt substrate) und Deptor (DEP-domain-containing mTOR interacting protein) [71, 74, 75].

Der Proteinkomplex wird durch mehrere Kaskaden aktiviert und deaktiviert. Die wichtigsten Faktoren welche von mTOR1 detektiert werden sind Konzentration an Aminosäuren, Energiegehalt der Zelle, Wachstumsfaktoren, Sauerstoffgehalt und oxidativer Stress [76]. Entsprechende Konstellationen der detektierten Stoffe

resultieren in einer Aktivierung von mTORC1, welche wiederum eine Steigerung der Proteinbiosynthese nach sich zieht.

Dies realisiert mTORC1 durch Phosphorylierung von 4E-BP1 (4E-bindendes Protein 1) und S6K1 (S6 Kinase 1). S6K1 ist in seiner phosphorylierten Form ein wesentlicher Koordinator der Translation durch Aktivierung von eIF4B (eukaryoter Translation initiirender Faktor 4B) und des 6s ribosomalen Proteins [77]. Außerdem bildet S6K1 eine positive feed-back-Schleife mit mTORC1 und erhöht damit dessen Aktivität durch Phosphorylierung [78].

Die Phosphorylierung des Proteins 4E-BP1 setzt eine Kaskade in Gang, bei der vom 5'-Ende der RNA her die Translation ab dem AUG-Codon gestartet wird [79]. Aufgrund dessen werden eine Helikase und die 40s-Untereinheit der Ribosomen rekrutiert, die dann entsprechend die Translation der mRNA einleiten [80].

1.2.2 Organisation des Zytoskeletts durch mTORC2

mTORC2 (mTOR-Komplex 2) setzt sich zusammen aus mTOR, mSIN1 (mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1), Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), PRR5 (Proline-rich protein 5), Deptor (DEP-domain-containing mTOR interacting protein) und mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) [76]. Insgesamt ist über die Funktion von mTORC2 wenig bekannt. Als gesichert gilt, dass mTORC2 eine wesentliche Rolle in der Organisation des Zytoskeletts durch die Aktivierung verschiedener Faktoren spielt [81]. Weitere Funktionen erfüllt mTORC2 im Rahmen des Zellmetabolismus und der Autophagozytose [82, 83].

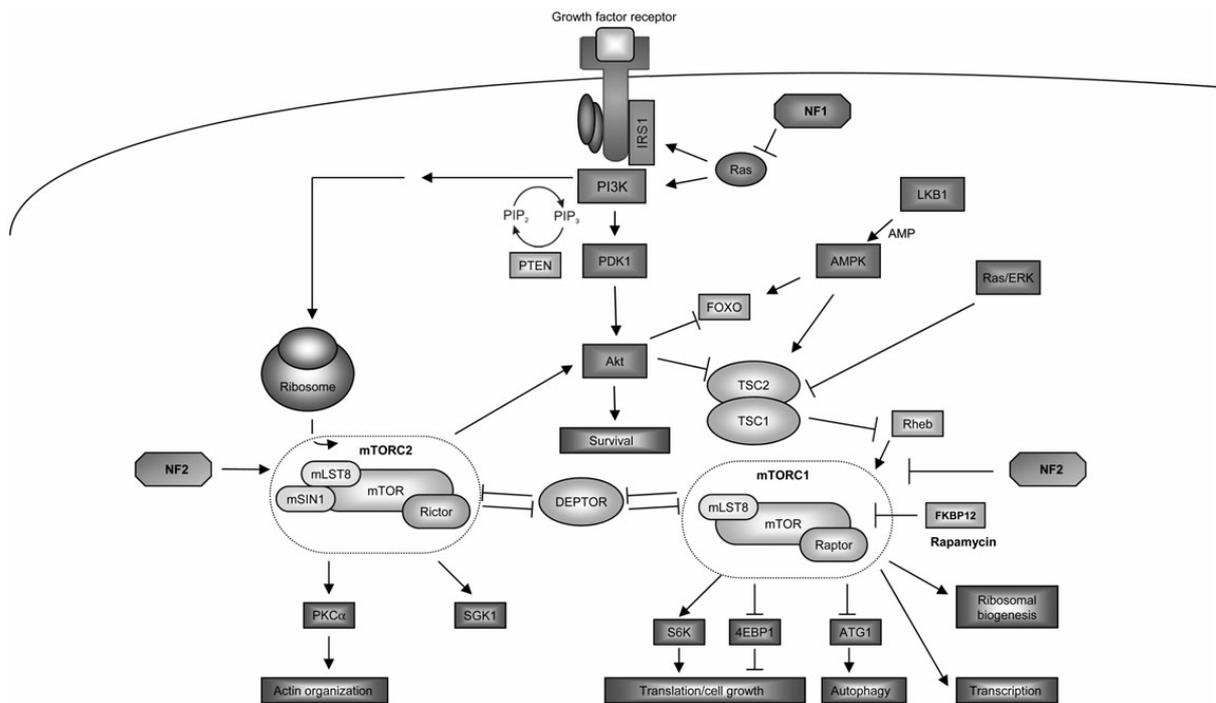


Abb. 1: Regulierung des intrazellulären mTOR-Signalweges [84]

1.2.3 Aktivierung von mTORC1 durch MAP4K3

Die Kinase MAP4K3 gehört zur Gruppe der Mitogen-activated protein kinase Kinasen (MAP4K). Kaskaden Mitogen-aktivierter Proteinkinasen spielen in Tumorzellen generell eine große Rolle bei der Übertragung von Signalen, welche Proliferation und Zelltod regulieren. Veränderungen dieser Signalwege durch Mutation oder veränderte Expression einzelner Komponenten können das Tumorwachstum daher beeinflussen. Für die erhöhte Expression von MAP4K3 in Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wurde z.B. eine Assoziation mit erhöhtem Rezidiv-Risiko bzw. kürzeren Rezidiv-freien Überlebenszeiten beschrieben [85]. In funktioneller Hinsicht wurde vor allem für die homologe Kinase bei der Taufliege *Drosophila* eine Rolle bei der Regulation des Tumor-suppressiven, anti-proliferativen und pro-apoptischen Hippo-Signalwegs gezeigt [86, 87]. Eine andere Arbeit konnte den fördernden Einfluss des Enzyms auf die Caspase-abhängige Apoptose bei *Drosophila* nachweisen [88]. Diese Resultate lassen eher an Tumor-hemmende Eigenschaften dieses Enzyms denken. Zu den vielfältigen Rollen dieser Kinase, die in Tumorzellen relevant sind, gehört jedoch auch die Regulation des Kinasekomplexes mTORC1, der ganz wesentlich die Restriktion des Größenwachstums einer Tumorzelle in Abhängigkeit von den physiologischen

Bedingungen in der Zelle wie Angebot an Aminosäuren, ATP und Sauerstoff steuert. Dies bewirkt mTORC1 vor allem über die Steuerung der Proteinbiosynthese. Ein wesentlicher Faktor ist die ausreichende Verfügbarkeit von Aminosäuren in der Zelle, um eine effektive Proteinsynthese zu realisieren. MAP4K3 konnte in mehreren Studien als wichtiger Sensor für die Konzentration von Aminosäuren in der Zelle nachgewiesen werden [89, 90]. Wird eine ausreichend hohe Konzentrationen an Aminosäuren in der Zelle detektiert, aktiviert MAP4K3 mTORC1 und bewirkt eine positive Regulation der Proteinbiosynthese [89-92]. Neben der Fähigkeit mTORC1 direkt zu aktivieren reguliert MAP4K3 auch die Aktivität der mTORC1-Effektoren 4E-BP1 und S6K1 durch direkte Phosphorylierung [90]. Somit beeinflusst die aktivierte Form der MAP4K3 an mindestens 2 Punkten die Proteinbiosynthese der Zelle positiv, was wiederum eher an eine Tumor-fördernde Rolle dieser Kinase in ihrer Eigenschaft als Aminosäure-Sensor des mTORC1-Signalweges denken lässt.

1.2.4 Aktivierung von mTORC1 durch die RAG-GTPase

Die Rag GTPase besteht aus den beiden Komplexen RagA/RagB und RagC/RagD. Rag ist die Abkürzung für Ras-related GTP-binding protein. Die nicht aktivierte Form des Komplexes wird in der Zelle durch erhöhte Aminosäurelevel in den aktivierten Zustand überführt [93]. Das aktivierte Heterodimer RagA/B-RagC/D interagiert dann mit der Raptor-Domäne von mTORC1 und verbindet mTORC1 mit intrazellulären Lysosomen, was wiederum zur Aktivierung von mTORC1 führt [94]. Die Funktion des Rag-Komplexes als Aminosäuresensor kann durch Sestrin inhibiert werden [94]. Obwohl der Aktivierungsweg über den Rag-Komplex eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von mTORC1 spielt, scheint er nicht allein für eine Anheftung an die Lysosomen verantwortlich zu sein [95, 96]. Während somit der in Teilen bekannte Mechanismus der GTPase-vermittelten Aktivierung von mTORC1 durch Aminosäuren eine das Tumorwachstum fördernde Rolle von Rag-Heterodimeren nahelegt, gab es in jüngster Zeit auch direkte Hinweise für eine Rolle des Monomers RagC bei der Entstehung von Tumoren. Beim folliculären Lymphom fanden sich häufig Mutationen im Gen für RagC, welche gleichzeitig die Raptor-Bindung erhöhten und zu einer Resistenz der mTORC1-Aktivierung gegenüber Aminosäuremangel führten [97]. Dies unterstrich zum einen, dass das Monomer RagC notwendig ist für die Aminosäure-Detektion und zum anderen, dass die Zerstörung dieser regulatorischen Rolle von RagC, d.h. die Eliminierung der Aminosäure-Abhängigkeit, Tumorbildung verstärken kann.

1.2.5 VPS34 als Aminosäuresensor und wichtiger Regulator der Autophagozytose

Das Protein VPS34 (vacuolar protein sorting 34) ist ein Mitglied der Enzymgruppe der Phosphoinositol-3-kinasen. Es ist, wie auch MAP4K3 und RagC, in die Detektion der Aminosäurekonzentration innerhalb der Zelle und Aktivierung von mTORC1 involviert [76]. Dabei agiert VPS34 in 2 Richtungen: Liegen genug Aminosäuren in der Zelle vor um Proteinbiosynthese zu betreiben so wird mTORC1 aktiviert [98]. Beim Fehlen von Aminosäuren wirkt VPS34 jedoch andererseits auch als ein wichtiger Initiator der Autophagie [98-100]. Dies bedeutet also, dass VPS34 in Tumorzellen multiple Funktionen erfüllen kann: zum einen eine das Zellwachstum fördernde Funktion durch die von Aminosäurespiegeln abhängige Aktivierung von mTORC1 (erhöhte Proteinbiosynthese) zum anderen aber auch eine Hemmung der Autophagie. In seiner gut untersuchten Eigenschaft als Autophagie-Regulator induziert das Protein bei Aminosäuremangel via mTORC1-Hemmung die Initialphase der Autophagie. Gleichzeitig ermöglicht es die spätere Phase der Bildung der Phagophore unabhängig von mTORC1 [101]. Eine Übersicht der Transmission von Aminosäure-Signalen zu mTORC1 durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen drei zentralen Proteine und einige mehr findet sich auch in der Arbeit von Duan und Kollegen [91].

1.3 Motivation der Arbeit durch Vorversuche der Arbeitsgruppe

Ein wesentliches Forschungsinteresse des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Promotionsarbeit galt der Nutzbarkeit von mTORC1 als therapeutische Zielstruktur, allerdings beim Mausmodell des Meningeoms [102]. Auf Zellkulturebene waren dabei auch die physiologischen Restriktionen der mTORC1-Kinaseaktivität durch Aminosäuremangel, ATP- und Sauerstoffmangel untersucht worden. Bei Meningeomzellen, aber auch bei mitgeführten Karzinom- und Gliomzellen fand sich dabei eine reversible Reduktion dieser Kinaseaktivität, messbar als reduzierte Phosphorylierung von p70S6K im Western Blot, durch Entzug der für mTORC1 relevanten Aminosäure Leucin (unpublizierte Daten). Aufgrund der nicht einfachen Umsetzbarkeit physiologischer Manipulationen dieser Art in das Mausmodell erfolgten hierzu keine weiterführenden Analysen am Meningeom. Jedoch waren die oben erwähnten drei Proteine als relevante Überträger der Aminosäure-Signale auf mTORC1 bereits bekannt. Da weiterhin beim Glioblastom Unterschiede in der

Nährstoffversorgung zwischen zentralen und peripheren Tumorarealen zu einer differentiellen Aktivierung dieser Proteine führen könnten, motivierte diese Ausgangslage die Untersuchung der Expression dieser Aminosäuresensoren in Glioblastomen und ihrer eventuellen Assoziation mit klinischen Parametern.

2 Zielstellung der Arbeit

Das Glioblastom zeichnet sich durch ein besonders invasives Wachstum aus. Hierbei wird das umgebende Hirngewebe durch Tumorzellen infiltriert. Im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg zeigten vorhergehende *in vitro*-Versuche eine deutliche Variabilität der Expression der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34 bei Glioblastom-Zellkulturen sowie eine Leucin-Abhängigkeit der mTORC1-Aktivierung. Bei den genannten Proteinen handelt es sich, unabhängig von ihrer vielfältigen anderweitigen Bedeutung, um upstream-Regulatoren des mTORC1-Signalweges. *In vivo* bestand der Verdacht, dass Unterschiede in der Expression von Aminosäuresensoren bestehen könnten, da es bei der Anwendung der essentiellen Aminosäure 5-Aminolävulinsäure zu einer vermehrten Anreicherung im Tumorzentrum und einer weniger starken Anreicherung in der Tumorrandzone kommt.

- Besteht ein Zusammenhang zwischen den relativen Expressionsleveln der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34 im Tumorzentrum und in der Tumorrandzone?
- Hat die Expression von MAP4K3, RagC und VPS34 im Tumorzentrum bzw. in der Tumorrandzone einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten?
- Korreliert die Expression von MAP4K3, RagC und VPS34 untereinander innerhalb des Tumorzentrums bzw. der Tumorrandzone?

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Versorgung und operatives Vorgehen

2.1.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Untersuchung von Proben, welche in der Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie im Klinikum Magdeburg gGmbH von Mai 2011 bis März 2014 routinemäßig im Rahmen einer Operation nach entsprechender Indikationsstellung entnommen wurden. Es wurden 74 Proben analysiert, welche von Tumorresektionen bei 37 Patienten stammen. Das Kriterium für den Einschluss des Patientenmaterials in die Untersuchung war die Diagnose eines Glioblastomes in der Referenzhistologie des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg. Intraoperative Proben wurden bei allen Patienten entnommen, bei denen die histologische Schnellschnittuntersuchung den Verdacht auf das Vorliegen eines malignen glialen Tumors ergab oder bei denen keine Schnellschnittdiagnostik zur Verfügung stand, jedoch in der radiologischen Diagnostik bildmorphologisch ein Glioblastom zu vermuten war. Bei den Proben der 37 untersuchten Patienten konnte später im Paraffinschnitt die Diagnose eines Glioblastomes gesichert werden. Es handelt sich bei den untersuchten Tumoren ausschließlich um supratentoriell gelegene Tumoren. Die Resektion der Tumoren diente therapeutischen und diagnostischen Zwecken. Das Probenmaterial, welches untersucht wurde, wäre in jedem Fall reseziert worden. Durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität erfolgte eine positive Bewertung zu dieser retrospektiven Studie.

2.1.2 Operation

Standardmäßig wurden die Operationen unter Anwendung der Neuronavigation (VectorVision®, Fa. Brainlab®, Erlangen, D) durchgeführt. Die dafür notwendigen Fiducials wurden am Tag vor der Operation oder am Morgen des Operationstages aufgebracht. Für die Referenzierung wurde anschließend ein Navigations-MRT mit Kontrastmittel durchgeführt. Zusätzlich erhielten 33 Patienten 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Trinklösung mit der Prämedikation. Die Trinklösung wurde in einer Konzentration von 20-30 mg/kg KG verabreicht. 4 Patienten erhielten das Medikament nicht. Die Patienten wurden während der Operation in eine Mayfield-Klemme

eingespannt. Diese dient mit 3 Dornen, welche in der Kalotte verankert werden, zum einen der Fixierung des Kopfes während der Operation und zum anderen der präzisen intraoperativen Referenzierung mittels oben erwähnter Neuronavigation. Nachfolgend wurde die Kalotte mittels Kraniotomie (Midas-Rex Legend®, Medtronic®, Minneapolis, Mi, USA) eröffnet. Unter Verwendung der Neuronavigation wurde der am wenigsten invasive Zugangsweg gewählt und bis zum Tumor präpariert. Intraoperativ konnten die mit 5-ALA zur Fluoreszenz befähigten Tumorzellen mittels violetterem Licht ($\lambda=400-410\text{nm}$) unter dem Operationsmikroskop (Pentaro®, Zeiss-Meditec AG®, Jena, D) sichtbar gemacht werden. Maligne Gliome stellten sich dabei im Zentrum stark violett dar. Die Farbgebung schwächte sich zum Tumorrand hin ab, bis sie in ein zartes rosa Leuchten überging. Die überwiegende Zeit wurde jedoch unter konventionellem Xenon-Licht operiert. Makroskopisch ließen sich die Tumoren vom umliegenden Gewebe unterscheiden durch eine typischerweise vorhandene graue Färbung mit teilweise thrombosierten pathologischen Gefäßen und nekrotischen Arealen. Unter Schonung von eloquenten Arealen wurden die Tumoren möglichst vollständig entfernt. Im Rahmen der Operation wurde bei der Mehrzahl der Patientinnen und Patienten eine intraoperative Chemotherapie mittels Carmustin-Wafern (Gliadel®, Fa. Archimedes®, Reading, UK) durchgeführt. Die Proben wurden vor Implantation von Gliadel® entnommen und abgegeben, so dass diese keinerlei Kontakt mit dem Chemotherapeutikum hatten.

2.1.3 Probenseparation

Im Rahmen der Operation wurde versucht, den Tumor möglichst vollständig zu entfernen. Es wurden Teile des entnommenen Materials nach 2 Lokalisationen aufgeteilt. Lokalisation 1 war dabei das Tumorzentrum (Z) und Lokalisation 2 die Randzone des Tumors (R). Die Zuordnung der Proben zu einer der beiden Lokalisationen wurde kombiniert, je nach Verfügbarkeit, makroskopisch, durch die Fluoreszenz-Reaktion und mittels Neuronavigation verifiziert (Abb. 2). Entsprechend der Ausrichtung der Untersuchung konnte jedem der 37 Patienten 1 Präparat aus dem Tumorzentrum und 1 Präparat aus der Tumorrundzone zugeordnet werden. Insgesamt konnten somit für die Studie 74 Präparate ausgewertet werden. Unmittelbar nach der Entnahme der Probe wurden die Proben durch MTLAs der Pathologie im Zentral-OP abgeholt und im Labor der Pathologie des Klinikum Magdeburg gGmbH aufgearbeitet. Es erfolgte das zügige Einfrieren der Proben bei -20°C . Es wurden von den Proben sowohl die nativen Präparate verwahrt als auch Paraffinschnitte angefertigt.

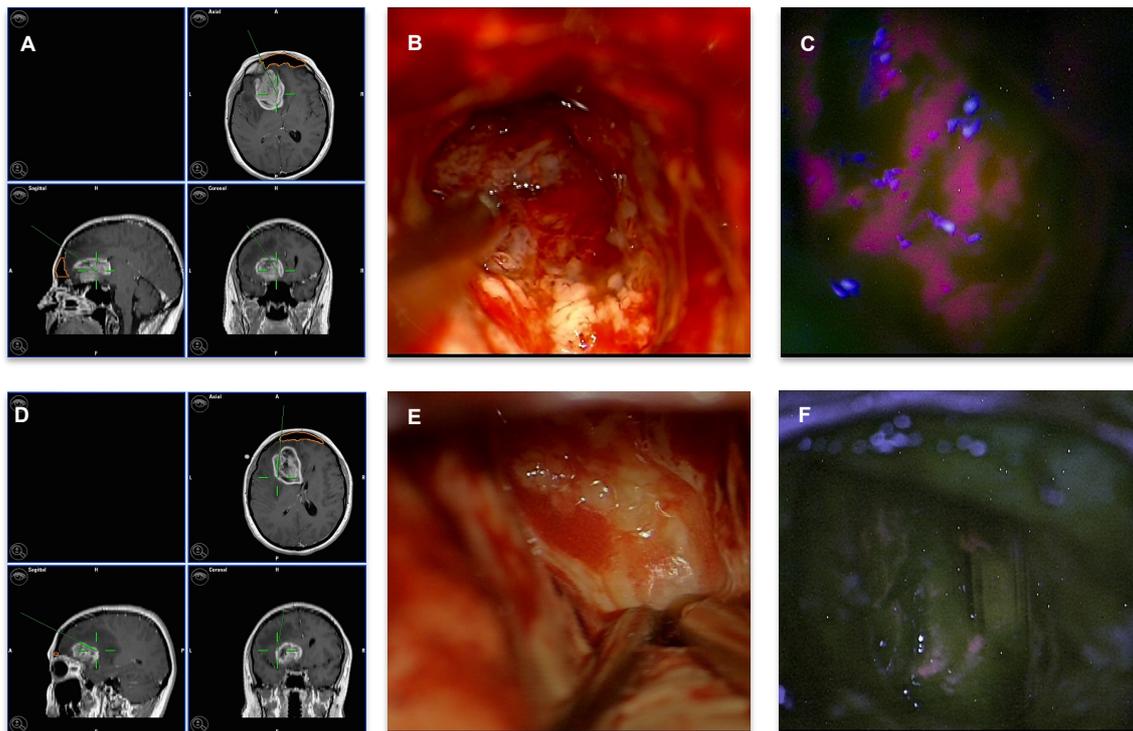


Abb. 2: Darstellung der Entnahmeorte für die Untersuchung. Das Tumorzentrum besteht makroskopisch aus einer grauen Tumormasse mit ausgeprägten Nekrosen (**B**). Durch die Anwendung von Gliolan[®] leuchtet das Tumorzentrum unter UV-Licht stark violett (**C**). Hingegen zeigt sich in der Infiltrationszone nahezu normales Hirngewebe (**E**). Unter fluoreszierendem Licht werden daher auch nur wenige Tumorzellen aktiviert, was zu einer leichten rosa Färbung führt (**F**). Verifiziert wurden Tumorzentrum (**A**) und Tumorrandzone (**D**) durch die Anwendung der Neuronavigation.

2.1.4 Postoperative Versorgung

Postoperativ wurden die Patienten auf die Intensivstation verlegt. Zur Kontrolle des Resektionsausmaßes wurde bei den Patienten standardisiert innerhalb von 48 Stunden nach der Operation eine cMRT durchgeführt. Bei Kontraindikationen gegen eine cMRT-Untersuchung wurde eine Kontrastmittel-cCT durchgeführt. Ein Patient konnte aufgrund postoperativer Kreislaufinstabilität nicht innerhalb von 48 Stunden die Untersuchung durchlaufen. Nach der Übernahme auf die Normalstation erfolgte in Abhängigkeit von den neurologischen Defiziten eine Mobilisation unter physiotherapeutischer Anleitung. Alle Patienten wurden anfänglich im interdisziplinären Tumorboard und später dann im spezialisierten neuroonkologischen Tumorboard vorgestellt. Hier wurde dann individuell über das weitere Prozedere

entschieden. Im Anschluss an die stationäre Behandlung wurde, in Abhängigkeit vom Beschluss des Tumorboards und dem Wunsch des Patienten, in den meisten Fällen eine Radio-Chemotherapie durchgeführt. Patienten, welche durch die Reduzierung des Allgemeinzustandes nicht in der Lage waren eine kombinierte Radio-Chemotherapie anzutreten, wurden ebenfalls entsprechend des Beschlusses des neuroonkologischen Tumorboards und im Einklang mit dem Patientenwunsch in die neurologische Rehabilitation oder die Kurzzeitpflege verlegt. Die Nachkontrolle der Patienten erfolgte ambulant über niedergelassene Kollegen.

2.1.5 Erhebung der Überlebenszeit

Um die Überlebenszeit nach der Operation ermitteln zu können wurden über verschiedene Verfahren die Überlebenszeitdaten bestimmt. Zunächst wurden Daten der onkologischen Schwerpunktpraxis Magdeburg (Hasselbachplatz 2, 39104 Magdeburg) ausgewertet und eine Zuarbeit von Prof. Dr. med. J. Bahnsen, Chefarzt der Strahlentherapie des Johanniter Krankenhauses Stendal (Wendstraße 31, 39576 Hansestadt Stendal) genutzt. Fehlende Daten wurden über Hausarztpraxen und Angehörige ermittelt. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten nachverfolgt werden.

2.1.6 Alter bei Diagnose

Von den in die Untersuchung eingeschlossenen 37 Patienten waren 20 Männer (54,1%) und 17 Frauen (45,9%). Der jüngste Patient war 43 Jahre und der älteste Patient 86 Jahre alt. Beim Alter lag der arithmetische Mittelwert bei 62,1 Jahren und der Median bei 60 Jahren (Abb. 3).

2.1.7 Tumorlokalisation

Bei den Patienten waren 22 Tumoren in der rechten Großhirnhemisphäre (59,5%) und 14 Tumoren in der linken Großhirnhälfte (37,8%) lokalisiert. Bei 1 Patient (2,7%) bestand ein bereits in der MRT-Bildgebung sichtbar über den Balken gewachsenes, sogenanntes Schmetterlingsgliom.

Die Verteilung der Tumoren in unserer vergleichenden Untersuchung auf die verschiedenen Hirnlappen ist in Tabelle 2 dargestellt. Glioblastome respektieren in ihrem Wachstum Hirnlappengrenzen nicht. Tumoren, welche in mehreren Hirnlappen

vorhanden waren, wurden zur Ermöglichung einer statistischen Auswertung dem Hirnlappen mit dem größten Tumoranteil zugerechnet.

2.1.8 Methylierungsstatus

Bei der Bestimmung des Methylierungsstatus der Tumoren war der MGMT-Promoter bei 17 Proben (45,9%) methyliert, bei 15 Proben (40,5%) unmethyliert und bei 5 Proben (13,5%) nicht sicher bestimmbar.

2.1.9 Gliadel®-Einlage

Intraoperativ wurde bei 30 Patienten eine lokale Chemotherapie mit Carmustin-Wafern (Gliadel®, Fa. ProStrakan®, Galashiels, UK) durchgeführt. Bei 7 Patienten wurde diese Therapie nicht angewandt. (Abb. 3)

Tab. 2: Auflistung der Patienten nach hemisphärischer Lokalisation des Tumors. Bei überlappenden Tumoren wurde der Hirnloben mit der größten Tumorlast gewertet.

Lokalisation	Häufigkeit	
	(n)	Prozent (%)
Frontal	8	21,6
Temporal	18	48,6
Parietal	7	18,9
Okzipital	4	10,8
Total	37	100,0

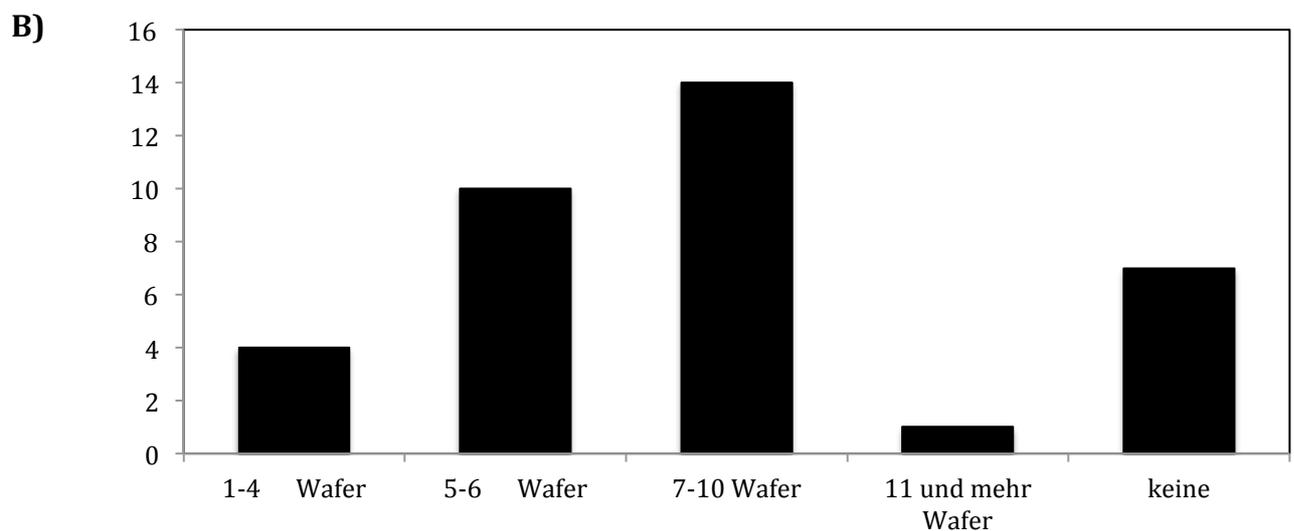
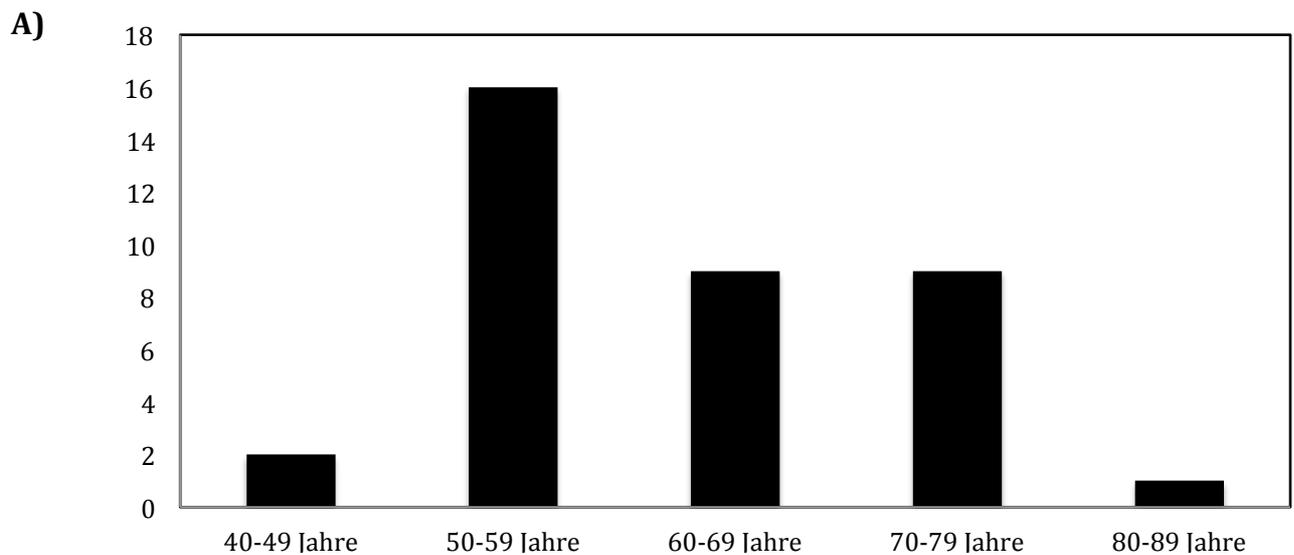


Abb. 3: Darstellung des Alters der Patienten bei Operation des Glioblastoms (A) und Anzahl der bei der Operation implantierten Gliadel®-Wafer (B)

2.2 Molekularbiologische und histologische Untersuchungen

2.2.1 Extraktion von RNA

Die Proben (ca. 10mm³) wurden mit Keramik-Kügelchen (precellys[®] Keramik-Kügelchen, Durchmesser=1,4 mm, Peqlab[®], Erlangen, D) und 1 ml Trizol[®] (Life Technologies[®], Waltham, PA, USA) in 2 ml Röhrchen gegeben. Die Homogenisierung erfolgte dann im Gewebe-Homogenisator Precellys24[®] (Peqlab[®], Erlangen, D) in 2 Durchgängen über je 20 s bei 5000 rpm. Danach wurden 0,2 ml Chloroform (Roth[®], Karlsruhe, D) zugegeben und die Mischung von Hand 15 s lang geschüttelt. Nachfolgend ist das Lysat bei 4°C mit 10.000 rpm 15 min lang zentrifugiert worden. Dabei bildeten sich 3 Phasen: der klare Überstand, welcher die RNA enthielt, die Interphase und die untere, vornehmlich Proteine beinhaltende Phase. Vom Überstand wurden dann 600µl abpipettiert und in ein weiteres Gefäß gegeben. Dem Überstand wurden 500µl Isopropanol (Roth[®], Karlsruhe, D) zugegeben. Die Lösung ruhte für 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde anschließend bei 10.000 rpm und einer Temperatur von 20°C 10 min lang zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde dem entstandenen RNA-Pellet 1 ml RNase-freies 70-prozentiges Ethanol (Fischar[®], Saarbrücken-Scheidt, D) zugegeben. Es wurde dann erneut bei 20°C und 10.000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden des Reagenzgefäßes befindliche RNA-Pellet sichtbar. Das Reagenzgefäß wurde mittels Vakuum-Konzentrator getrocknet. Danach wurden die Pellets im Heizblock (Roth[®], Karlsruhe, D) bei 55-60°C mit RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration wurden von der Lösung 1 µl abpipettiert und 69 µl H₂O zugegeben. Anschließend erfolgte die Konzentrationsberechnung mittels eines Photometers (BioPhotometer[®], Eppendorf[®], Hamburg, D). Danach wurden die Proben mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Herstellung von cDNA aus RNA mittels reverser Transkriptase

Im nächsten Schritt wurde aus der gewonnenen RNA sogenannte cDNA mittels reverser Transkriptase (200 u/µl, Bioline[®], Taunton, MA, USA) hergestellt. Zu 2 µg RNA wurden 8 µl Random-Primer (25 µg/µl Hexanukleotide, Fa. biomers.net[®], Ulm, D) gegeben und anschließend mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Die reverse Transkriptase (rt) kann lediglich aus einzelsträngiger RNA komplementäre DNA-Stränge synthetisieren. Hierfür war daher zunächst die Auftrennung vorhandener

Sekundärstrukturen notwendig. Die RNA-Lösung wurde dafür 10 Minuten lang bei 70°C erhitzt und nachfolgend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Der RNA-Lösung wurden dann 8 µl 5-fach Puffer, 0,8 µl dNTPs (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA), 0,25 µl reverse Transkriptase und 10,95 µl RNase-freies Wasser zugegeben. Die Probe wurde anschließend 55 min bei 40°C und weitere 15 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Die entstandene DNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 Real-Time-PCR (quantitative PCR)

Für den PCR-Ansatz wurden 1 µl der Proben-cDNA mit jeweils 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer (s. Tabelle 3), 8,26 µl 2 x SensiMix® SYBR-HiRox (Quiagen, Venlo, NL) und 5,3 µl HPLC-Wasser versetzt. Die verwendeten Forward- und Reverse-Primer waren spezifisch ausgewählt für die zu untersuchenden Gene und sind im Abschnitt 2.2.12 aufgeführt. Die Ansätze wurden dann in eine 96-well-Mikrotiterplatte in einer Doppelbestimmung pipettiert. Die Amplifizierung erfolgte dann im ABI Prism 7000 SDS® (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) und durch die dazugehörige Software Version 1.1. Das gewählte Programm erhitzte die Proben für 2 min. auf 50°C und für 15 min auf 95°C. Es wurden 40 Zyklen über 30 s bei 95°C, 30 s bei der jeweiligen spezifischen Bindungstemperatur der Primer (Tabelle 3) und 1 min bei 72°C vom Cycler ausgeführt.

Der Unterschied der *Real-Time*-PCR oder auch quantitativen PCR im Vergleich zur konventionellen PCR ist, dass bei dieser Methode eine gleichzeitige Bestimmung der Menge an amplifizierter DNA ermöglicht wird. Der Lösung wird hierfür SYBR®-Green zugesetzt. Dieser Farbstoff ist in der Lage an doppelsträngige DNA zu binden. Er absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda=494$ nm und emittiert Licht einer Wellenlänge von $\lambda=521$ nm. So konnte nach jedem Zyklus der DNA-Amplifizierung eine Quantifizierung der DNA mittels Fluoreszenz durchgeführt werden. SYBR®-Green bindet auch an RNA und einzelsträngige DNA. Diese Bindung ergibt jedoch eine wesentlich schwächere Fluoreszenz als die Bindung an doppelsträngige DNA. Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Reinheit des PCR-Produktes zu überprüfen. Das Ziel der *Real-Time*-PCR ist die Amplifikation bestimmter Abschnitte der cDNA welche spezifisch sind für die zu untersuchenden mRNA-Moleküle. Hierbei liefert die PCR ein quantitatives Ergebnis für die Expression der entsprechenden mRNA in den einzelnen Proben. Die Berechnungen erfolgten mit dem Wert ΔC_t . Dieser ergibt sich aus der Anzahl der Zyklen für das Zielgen ($C_t(x)$) von welchem zur Normalisierung im

vorliegenden Fall die Anzahl der Zyklen für β_2 -Mikroglobulin (C_t (β_2 -Mikroglobulin)) subtrahiert wurde. β_2 -Mikroglobulin wird eine von physiologischen Bedingungen in der Tumorzelle weitgehend unabhängige Expression unterstellt (sog. Haushaltsgen).

$$\Delta C_t = C_t(x) - C_t(\beta_2\text{-Mikroglobulin})$$

C_t bezeichnet in dieser Formel den cycle threshold, also die Zyklusanzahl bei der ein vorher definierter Fluoreszenzwert erreicht wurde, welcher für alle Proben gleich ist.

$C_t(x)$ bezeichnet den cycle threshold für die mRNA des zu untersuchenden Gens. C_t (β_2 -Mikroglobulin) bezeichnet den cycle threshold des gut charakterisierten Gens von β_2 -Mikroglobulin (housekeeping gene). Das sogenannte „housekeeping gene“ wird benötigt für die Quantifizierung, da es dem zu untersuchenden Gen als Vergleichswert gegenübergestellt wird. Ohne diese interne Normierung würden Ungenauigkeiten der ursprünglichen RNA-Messung und die variable Effizienz der cDNA-Synthese die Expressionsstudie beeinflussen. Als „housekeeping gene“ werden typischerweise Genomabschnitte verwendet, welche für Proteine codieren, die in dem betreffenden Gewebetyp, hier Gliomgewebe, im Wesentlichen unabhängig sind von physiologischer Regulation durch äußere Faktoren, wie Nährstoffversorgung und Wachstumsfaktoren. Alle C_t -Werte wurden durch die Verwendung des ABI Prism 7000 SDS®-Cycler und der dazugehörigen Software bestimmt.

Ein hoher ΔC_t -Wert entspricht in dieser Berechnung einer niedrigen Expression des Zielgens, da entsprechend viele Zyklen benötigt wurden um die Photoreaktion auszulösen. Umgekehrt entsprechen niedrige ΔC_t -Werte einer hohen Expression des Zielgens.

2.2.4 Immunhistochemie (Tissue Microarray, TMA)

Die Tumorproben des Tumorzentrums und der Tumorrandzone wurden in der Pathologie des Klinikums Magdeburg jeweils getrennt voneinander in Paraffin eingebettet. Es wurden aus den im OP gekennzeichneten Proben für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone jeweils ein Paraffinblock und ein Kryopräparat konserviert. Es handelt sich daher bei den Tumorproben jeweils um sehr eng benachbarte Gewebstücke aus dem Tumorzentrum bzw. der Tumorrandzone. Die Paraffinblöcke wurden dann zu diagnostischen Zwecken in die Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg versandt. Hier wurden aus den Paraffinblöcken

Feinschnitte angefertigt, welche mit der Methode der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt wurden. Dabei handelt es sich um eine Standardfärbung der histologischen Untersuchung, in der Zellkerne violett und Zytoplasma leuchtend rosa dargestellt werden. In den HE-Schnitten wurden dann charakteristische Bereiche des Glioblastomes im Zentrum und in der Randzone markiert. Insgesamt konnte so das Probenmaterial von 12 Patienten mit Tumorzentrum und Tumorrundzone, also insgesamt 24 Proben, ausgewertet werden.

Aus diesen 24 Proben wurde ein Tissue Microarray (TMA) angefertigt. Hierbei handelt es sich um einen leeren Paraffinblock (Rezeptor-Block) in den Stenzen eines Gewebes (Donor-Block) eingebracht werden. Dafür wurde der Manual Tissue Arrayer MTA-1® (Alpha Metrix Biotech®, Rödermark, D) verwendet. Von den 24 Proben in Paraffin wurden pro Probe 3 Stenzen aus dem Donor-Block in den Rezeptor-Paraffinblock übertragen, so dass sich am Ende 72 Proben auf dem Rezeptor-Block befanden. Von dem so entstandenen Rezeptor-Block wurden dann mit dem Schlittenmikrotom (Leica®, Solms, D) mehrere Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend entparaffiniert. Hierfür wurden sie zunächst mit Protax-Clear, einem Xylol-Ersatz, versetzt und dreimal 10 min inkubiert. Anschließend wurden den Schnitten Ethanol in absteigender Konzentration zugesetzt. Angefangen mit Ethanol 100%ig zweimalig für jeweils 5 min, danach zweimalig Ethanol 96%ig für jeweils 5 min und anschließend Ethanol 70%ig für 5 min. Die Schnitte wurden im nächsten Schritt mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und mit TBS-Tween20 für 20 min im Dampfgerär erhitzt. Anschließend erfolgte dann das Abkühlen unter Zimmertemperatur für 10 min. Der Schnitt für RagC wurde dann mit EDTA für 15 min im Dampfgerär und der für MAP4K wurde mit Citratpuffer für 10 min im Dampfgerär inkubiert. Für die Detektion wurden die Objektträger im Anschluss für 30 min auf Zimmertemperatur gekühlt. In den nachfolgenden Schritten wurden die Schnitte dann dreimal mit destilliertem Wasser für je 5 min und anschließend für 10 Minuten mit 3%igem Wasserstoffperoxid gewaschen. Darauffolgend wurden die Objektträger für 1 h in Blockierlösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die primären Antikörper für RagC bzw. MAP4K in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween 20 für je 5 min entfernt. Anschließend wurden 1-3 Tropfen SignalStain® auf die Objektträger aufgetragen und diese bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Daran schlossen sich drei Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit TBS-Tween 20 an. Die Proben wurden danach

mi 1 ml SignalStain®-DAB Diluent 30µl SignalStain®-DAB Chromogen Concentrate behandelt. Von dieser Lösung wurden dann jeweils 200µl für 10 Minuten auf beide Objektträger gegeben. Die Lösungen wurden durch das einmalige Eintauchen in destilliertem Wasser entfernt. In den folgenden Schritten wurden die Kerne entsprechend der Hämatoxylin-Färbung angefärbt. Die Objektträger wurden danach für jeweils 5 Minuten zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Dehydrierung wurden die Objektträger zweimalig für 10 s in 95%igem Alkohol und danach erneut zweimalig für 10 s in 100%igem Alkohol inkubiert. Zum Abschluss erfolgte die Inkubation mit Protax-Clear zweimalig für jeweils 10s und die Aufbringung eines Deckglases auf die Proben. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Hierbei hoben sich die Kerne violett und die jeweils markierten Proteine bräunlich ab. Negativkontrollen umfassten Testfärbungen nach Weglassen des primären Antikörpers.

Die zytoplasmatische Färbung von Tumorzentrum und Tumorrandzone der 12 Tumoren wurde semiquantitativ durch den Verfasser analysiert. Dabei wurde eine vierstufige Bewertung vorgenommen. Waren weniger als 10% der Zellen im Präparat angefärbt wurde die 0 vergeben. Waren mehr als 10% aber weniger als 50% der Zellen angefärbt wurde eine 1 vergeben. Bei mehr als 50% und weniger als 80% angefärbten Zellen wurde eine 2 vergeben. Bei mehr als 80% angefärbten Zellen wurde eine 3 vergeben.

2.2.5 Extraktion von Proteinen aus Gewebeproben

Aus den Proben von 4 Patienten wurden jeweils vom Tumorzentrum und von der Tumorrandzone Proteine extrahiert. Die Restriktion auf lediglich 8 Proben resultiert aus der geringen Verfügbarkeit von ausreichendem Material aus Tumorzentrum und Tumorrandzone bei dem gleichen Patienten. Die Tumorproben wurden, außer bei sehr großen Tumoren, klein gehalten, um die Vermischung von Proben aus verschiedenen Zonen und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die 8 Proben wurden bei -80°C gelagert. Die Proteinextraktion erfolgte auf Eis. Für die Extraktion wurde RIPA-Puffer, 10 µl/ml Protease-Inhibitor Cocktail (Serva®, Heidelberg, D), 1 µl/ml 1 M DTT und 10 µl/ml 100 mM Natriummetavanadat verwendet. Der Mix aus verschiedenen Proteaseinhibitoren dient hierbei der Hemmung der natürlich natürlichen Proteasen, welche die Proteine degradieren. DTT wird verwendet als Oxidationsschutz für Sulfhydrylgruppen. Dadurch wird die artifizielle Bildung von Disulfidbrücken

unterbunden und ein komplettes Auffalten der Proteine im SDS-Probenpuffer gewährleistet.

Etwa 10-30 mg der Proben wurden mit RIPA-Puffer versetzt. Anschließend wurde das Gewebe mittels des Stabhomogenisators (T10 basic®, IKA®, Staufen im Breisgau, D) verarbeitet. Das entstandene Homogenisat wurde dann bei 14.000 rpm und 4°C über 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinproben wurden dann bei -40°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus den gewonnenen Überständen erfolgte mit Hilfe der Biuret-Reaktion. Hierbei handelt es sich um eine Nachweisreaktion von Peptidbindungen in einer Proteinlösung durch Kupfer-Ionen (Cu^+). Die Bildung der Cu^+ -Ionen erfolgt durch die Reduktion von 2-wertigen Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) und wird bedingt durch die Proteine im alkalischen Milieu. Für die Biuret-Reaktion wurde der DC Protein Assay Kit® (BioRad®, Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Auf eine Mikrotiter-Platte wurden die Proteinproben aufgebracht. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Lösungen mit definierter aufsteigender Protein-Konzentration (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA in dH_2O) verwendet, welche aus 1%iger BSA-Lösung hergestellt wurden und anhand derer die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden konnte. Zunächst wurde eine Arbeitslösung hergestellt. Hierfür wurden 20 μl des Reagenz S in 1 ml des Reagenz A pipettiert. Sowohl von der Proteinlösung als auch von den Standardreihen wurden zweimal 5 μl je well auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und jeweils 25 μl der Arbeitslösung sowie 200 μl der Reagenzlösung B zugegeben. Die Lösungen gehen mit den Proteinen einen Komplex ein, dessen optische Dichte in der Lösung nach der Inkubation direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 15 Minuten bei 300 rpm auf dem Thermomixer Comfort® (Eppendorf®, Hamburg, D) inkubiert. Es folgte die Messung der optischen Dichte durch den ELISA-Reader (Infinite M200®, Tecan®, Männedorf, CH). Hierfür wurde durch das Gerät zunächst die Absorption bei 750 nm und danach bei 450 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Die Proteinkonzentration sowohl der Standardkurve als auch der Tumorproben wurde mittels der Software Magellan® (Tecan®, Männedorf, CH) bestimmt. Alle Messungen erfolgten anhand einer Doppelbestimmung.

2.2.7 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Proteine in Proteingemischen der Molekülgröße nach aufgetrennt werden. Die Gelelektrophorese erfolgte in Elektrophoreseapparaturen der Firma BioRAD (Mini Trans-Blot® Cell, BioRad®, Hercules, CA, USA). Zunächst wurde zwischen 2 Glasplatten mit 1,5 mm Abstand ein 15%iges kleinporiges Trenngel gegossen und ein 4%iges großporiges Sammelgel darüber geschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben entsprechend ihrer Konzentration mit RIPA-Puffer aufgefüllt um ähnliche Konzentrationen zu erhalten.

Das entstandene Gemisch wurde mit 2-fach Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 100°C aufgeköcht anschließend sofort auf Eis gestellt. Dies gewährleistet eine problemlose Auftrennung. Das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine und das ebenfalls enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken. Der Inkubationsschritt auf Eis verhindert die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen der Proteine. Zudem bewirkt SDS die Bildung negativ geladener SDS-Proteinkomplexe, welche eine gleichmäßige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld gewährleistet. Aufgrund der gleichmäßigen Ladung der Proteine durch SDS ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Trenngel nahezu ausschließlich von der Molekülgröße abhängig. Es wurden je nach geplantem Antikörper Proteinmengen von 40 μ g bis 60 μ g auf das Gel aufgetragen. Als Referenz für bestimmte Molekülgrößen wurde 5 μ l des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas®, Waltham, PA, USA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel, was im Sammelgel einer Spannung von ca. 80 V und im Trenngel von ca. 120 V entspricht. Die Elektrophorese wurde dann durchgeführt bis der im Lämmli-Puffer enthaltene Indikatorfarbstoff (Bromphenolblau) das Trenngel vollständig passiert hatte. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Abschnitt 2.2.10 aufgeführt.

2.2.8 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies geschieht über ein senkrecht zu Gel und Nitrozellulose ausgerichtetes elektrisches Feld. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode vom Trenngel auf die

Nitrozellulosemembran. Durchgeführt wurde der Western-Blot ebenfalls in der Mini Trans-Blot® Cell (BioRad®, Hercules, CA, USA). Hierfür wurde zunächst das Gel zwischen den Glasplatten entfernt und das Sammelgel abgetrennt. In Sandwich-Technik wurden in die Blot-Kassette, deren Anodenseite folgend, zunächst 1 Schwamm, 1 Filter-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel, 1 Filter-Papier, und 1 Schwamm gelegt. Die Kassette wurde verschlossen und in den Blot-Tank überführt. Vor dem Verschließen der Kassette wurde die zwischen den Schichten befindliche Luft vorsichtig mit einer Walze entfernt. Zur Blot-Kassette wurden eine Kühleinheit und 1 Magnetrührer gegeben um die Proteine und die Tank-Blot Vorrichtung vor Überhitzung zu schützen. Der Blot-Tank wurde anschließend mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 200 mA. Nachfolgend wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für 1 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver gelöst in TBS-Tween20 blockiert.

2.2.9 Proteinnachweis

Nach dem im Anschluss an den Western-Blot durchgeführten Blocken der Membranen wurde ein für das jeweilige Zielprotein spezifischer primärer Antikörper zugegeben und die Nitrozellulosemembran bei 4°C über Nacht unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Da für VPS34 kein spezifischer Antikörper verfügbar war, wurde ein Antikörper als Ersatzvariante verwendet, der ganz allgemein PI3K erkennt, nicht spezifisch VPS34. Am Folgetag wurde die Nitrozellulosemembran unter leichtem Schütteln 2x5 min und 2x10 min mit TBS-Tween20-Puffer gewaschen und nachfolgend für 1 h mit einem an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet dabei an den konstanten Teil des primären Antikörpers. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran erneut 2x5 min und anschließend 2x10 min mit TBS-Tween20-Puffer gewaschen. Daran schloss sich die Detektion unter Verwendung von „Immobilon Western Chemiluminescent® HRP Substrate“ (Merck Millipore®, Billerica, MA, USA) nach Herstellerangaben an. Die Detektion des Substratumsatzes erfolgte auf ECL-Film, welcher in einem Automaten für Röntgenfilme Curix 60 (Agfa, Mortsel, BE) entwickelt wurde. Für die Verwendung weiterer primärer Antikörper war es erforderlich, die gebundenen Antikörper zu entfernen und ein sogenanntes Stripping durchzuführen. Hierbei wurden die Membran für 45 min mit dem Strippingbuffer (Restore Strippingbuffer®, Thermo®, Waltham, PA, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend für 2x10 min mit TBS-Tween20-Puffer gewaschen. Vor

dem Aufbringen eines neuen primären Antikörpers wurde die Membran erneut für 1 h bei Raumtemperatur mit 5%igem Magermilchpuffer gelöst in TBS-Tween20-Puffer geblockt.

2.2.10 Puffer und Lösungen

Blockierpuffer:	5 ml	TBS-Tween 20
	250 µl	Ziegenserum
Lauf-Puffer: (pH=8,3)	3 g/l	Tris-Base
	14,4 g/l	Glycin
	1 g/l	SDS
RIPA-Puffer: (pH=7,4)	1,2 g/l	Tris-Base
	8,75 g/l	NaCl
	2,1 g/l	NaF
	20 ml/l 0,5 M (w/v)	0,5 M (w/v) Na ₂ EDTA
	10 ml/l	Triton-X 100
	3,35 ml/l 30 % (w/v)	30% (w/v) SDS
	5 g/l	Deoxycholat
Sammelgel:	1,3 ml	H ₂ O
	0,5 ml	Acrylamid (30%)
	0,6 ml	0,68 M Tris/HCl (pH 6,8)
	0,6 ml	0,5% SDS (w/v)
	3 µl	TEMED
	15µl	APS (10%)
TBS-Tween20: (pH=7,5)	0,9 g/l	Tris-Base
	6,8 g/l	1,88M Tris/HCl (pH 8,8)
	8,8 g/l	NaCl
	1 ml/l	Tween 20
Trenngel:	1 ml	H ₂ O
	5 ml	Acrylamid (30%)
	2 ml	1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)

	2 ml	0,5% SDS (w/v)
	8,3 µl	TEMED
	50 µl	APS (10%)
Transferpuffer:	3 g/l	Tris-Base
(pH=8,3)	11,3 g/l	Glycin
	200 ml/l (v/v)	Methanol

2.2.11 Feinchemikalien

1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA
2-fach Puffer nach Laemmli	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA
Acrylamid (30%)	Roth®, Karlsruhe, D
APS (10%)	Merck®, Darmstadt, D
Citratpuffer	Dako, Hamburg, D
Deoxycholat	Serva®, Heidelberg, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA
Glycin	Roth®, Karlsruhe, D
Magermilchpulver 5%	Roth®, Karlsruhe, D
Methanol	J.T.Baker®, Deventer, NL
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth®, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth®, Karlsruhe, D
Natrium-Fluorid (NaF)	Roth®, Karlsruhe, D
Natriummetavanadat (NaVO ₃)	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA
Protease-Inhibitor Cocktail	Serva®, Heidelberg, D
Natriumlaurylsulfat 0,5% (SDS)	Roth®, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, D
SignalStain® DAB Chromogen-Konzentrat	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA
SignalStain® DAB Diluent	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA
Tris-Base	Roth®, Karlsruhe, D

Tris-HCl	Roth®, Karlsruhe, D
Triton-X 100®	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA
Tween 20	Merck®, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth®, Karlsruhe, D
Xylol-Ersatz (Protax Clear)	Quartett, Berlin, D

2.2.12 Spezifische cDNA-Primer

In Tabelle 3 wurden die spezifischen Primer für die cDNA aufgelistet.

Name	Ziel-Gen	Sequenz	T _{annealing}	Hersteller
hRagC-163-F	Rag C	CATTTCCAATAGCTCCTTTG	55°C	biomers.net®
hRagC-R	Rag C	GCTTTAGAAACAGTAATGTGAAG	55°C	biomers.net®
hMAP4K3-152-F	MAP4K3	CACATTTAGAAGATGATGAAGG	55°C	biomers.net®
hMAP4K3-R	MAP4K3	CTTGATTGTTCTTGATTTTC	55°C	biomers.net®
hVps34-141-F	VPS34	GTCTGGCCTAATGTAGAAGC	55°C	biomers.net®
hVps34-R	VPS34	ATCTACTTTCACCATGTGTCC	55°C	biomers.net®
β2Mg-quant F	β2-Mikro-globulin	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	55°C	biomers.net®
β2Mg-quant R	β2-Mikro-globulin	GATGCTGCTTACATGTCTCG	55°C	biomers.net®

2.2.13 Verwendete Antikörper

In Tabelle 4 wurden die verwendeten Antikörper aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen PI3K	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen MAP4K	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen Rag C	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Maus Aktin	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA	1:2000
Anti-Kaninchen Ig, HRP-gekoppelt	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Maus Ig, HRP-gekoppelt	Cell Signaling®, Danvers, MA, USA	1:1000

2.3 Statistik

Zur Textverarbeitung wurde Word 2011 Office and Student for MAC (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) in der Version 14.2.0 verwendet. Als Tabellenkalkulationsprogramm wurde Excel 2011 Office and Student for MAC (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) in der Version 14.2.0 benutzt. Der Vergleich von unabhängigen Vergleichspaaren bei mehr als 2 Gruppen erfolgte mit dem Post-hoc-Test (Tukeys post-hoc-Test). Die Frage nach der Signifikanz von 2 mit einander zu vergleichenden Werten wurde durch den zweiseitigen T-Test beantwortet. Überdies wurde die Pearson-Korrelation eingesetzt um den linearen Zusammenhang der Werte zu beurteilen. Um die Abhängigkeit der Überlebenszeit von verschiedenen Faktoren zu untersuchen, wurde die Cox-Regression herangezogen. Die Darstellung der Überlebenszeiten erfolgte nach Kaplan-Meier.

Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. habil. Siegfried Kropf vom Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Universität Magdeburg mit dem Programm SPSS® (SPSS Inc.®, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Überlebenszeit der Patienten

Tumorproben des ersten Patienten wurden im Juli 2011 in die Untersuchung eingeschlossen und die letzten Proben wurden im März 2014 gewonnen. Die Erfassung der Überlebenszeitdaten erfolgte bis November 2014. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren 30 Patienten verstorben und noch 7 Patienten am Leben. Die mittlere Überlebenszeit betrug 55 Wochen und die mediane Überlebenszeit lag bei 27 Wochen. Die überlebenden Patienten wurden in die Berechnung mit der bis zum Ende der Studie überlebten Zeit eingeschlossen. In den nachfolgend dargestellten Kaplan-Meyer-Grafiken wurden die überlebenden Patientinnen und Patienten mit senkrechten Strichen entsprechend ihrer Überlebenszeit seit der Operation gekennzeichnet (Abb. 4).

Die Abhängigkeit der Überlebenszeit von verschiedenen Faktoren wurde mit Hilfe einer Cox-Regression berechnet. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Auswertung der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Expression der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34 sowohl im Tumorzentrum als auch in der Tumorrandzone.

3.1.1 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter

Für die 37 Patientinnen und Patienten, deren Tumorproben analysiert wurden, sind die Überlebenszeitdaten ermittelt worden. Dabei wurde die Zeitspanne von der Operation bis zum Tod berechnet. Weiterhin wurden zwei Kohorten gebildet, welche sich am arithmetischen Mittelwert bei 62 Jahren aufteilten. Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt, verzeichneten jüngere Patienten tendenziell ein längeres Überleben im Vergleich zu den Älteren (Abb. 4). Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht ermittelt werden.

3.1.2 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MGMT-Status

Weiterhin wurde der MGMT-Status ebenfalls in 2 Kohorten eingeteilt. Dabei wurden jeweils methylierte und unmethylierte MGMT-Promotoren als Gruppen definiert. Bei 17 Patienten war der MGMT-Promotor methyliert und bei 15 Patienten unmethyliert. Bei 5

Patienten war der Methylierungsstatus nicht sicher zu bestimmen. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den Gruppen (Abb. 4).

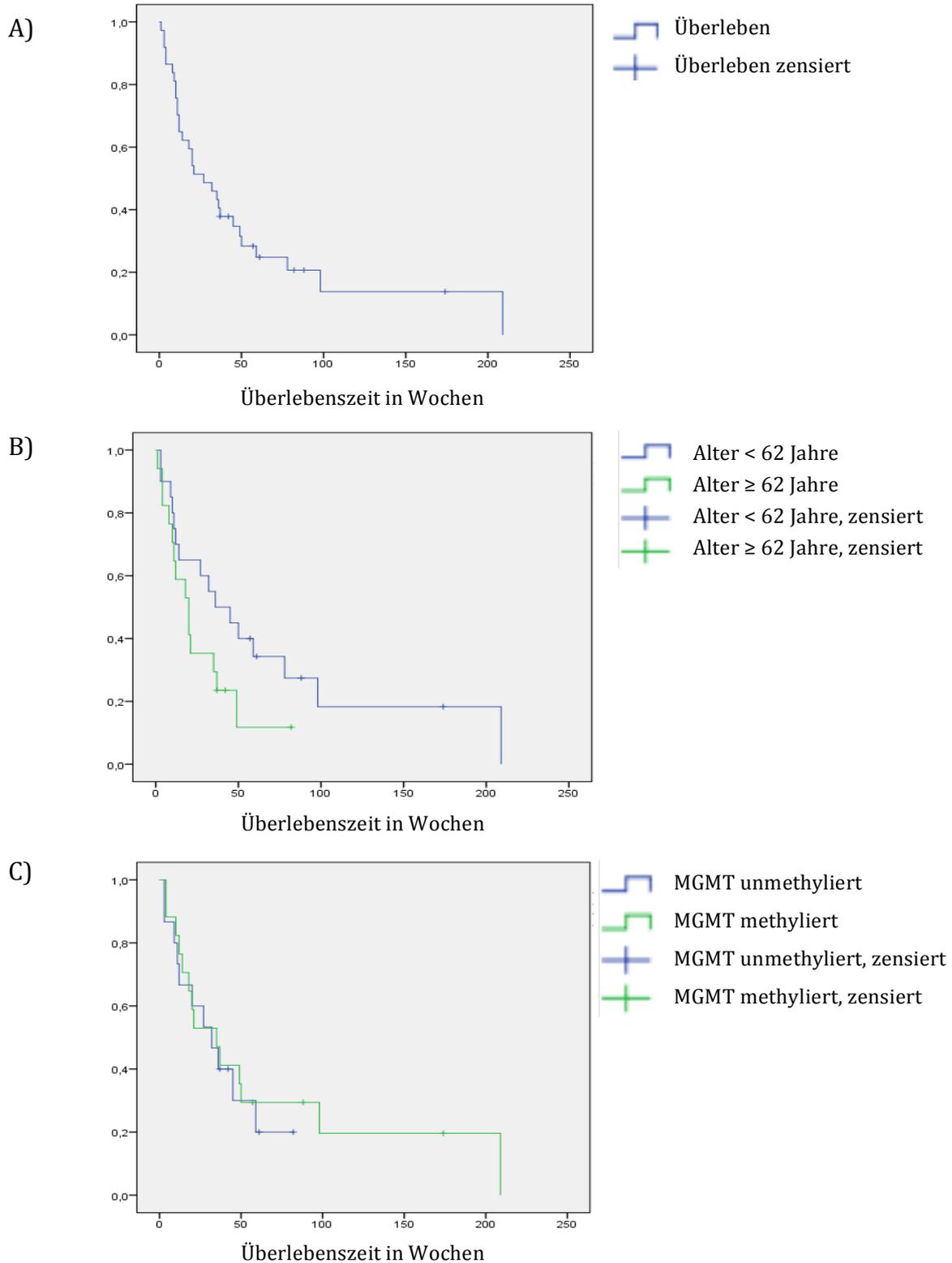


Abb. 4: Gesamtüberleben der untersuchten Patienten (A), das Überleben in Abhängigkeit vom Alter (B) und das Überleben in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus (C) im untersuchten Patientenkollektiv.

3.2 Untersuchung der Verteilung von MAP4K3, RagC und VPS34 in Glioblastomen

Die nach Tumorentnahme separierten Proben wurden durch *in-vivo*-Fluoreszenz, MRT-Navigation und nachrangig auch durch das makroskopische Bild (Abb. 2) einer der beiden Lokalisationen zugeordnet. Anschließend wurde der ΔC_t -Wert und damit indirekt die Genexpression der verschiedenen Aminosäuretransporter im Zentrum und in der Randzone desselben Tumors verglichen. Hohe ΔC_t -Werte gehen dabei mit einer niedrigen Genexpression und niedrige ΔC_t -Werte mit einer hohen Genexpression einher. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht darüber, von welchen der Tumoren gleichzeitig Material für Western Blots zur Verfügung stand und von welchen Tumoren Einbettungen als Tissue-Micro-Array-Probe wie unten beschrieben angefertigt wurden.

Tabelle 5: Dargestellt werden die verschiedenen Modalitäten mit denen das Gewebe von Tumorzentrum und Tumorrandzone ausgewertet wurde. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation wurde in Jahren und die Überlebenszeit in Monaten dargestellt.

Patienten- Nr.	Geschlecht	Alter	Überlebenszeit	rt-PCR	Immun- Histochemie	Western Blot
1	weiblich	68	5	Ja	Nein	Nein
2	weiblich	50	11	Ja	Nein	Nein
3	weiblich	66	1	Ja	Nein	Ja
4	männlich	60	4	Ja	Nein	Nein
5	weiblich	57	10	Ja	Nein	Nein
6	männlich	58	4	Ja	Nein	Nein
7	weiblich	57	9	Ja	Nein	Nein
8	männlich	58	1	Ja	Nein	Nein
9	männlich	61	1	Ja	Nein	Nein
10	weiblich	53	47	Ja	Nein	Nein
11	männlich	54	2	Ja	Nein	Ja
12	weiblich	73	10	Ja	Nein	Nein
13	männlich	66	10	Ja	Nein	Nein
14	weiblich	52	22	Ja	Ja	Nein
15	weiblich	82	8	Ja	Ja	Nein
16	männlich	57	2	Ja	Ja	Nein
17	weiblich	79	2	Ja	Nein	Nein
18	männlich	62	4	Ja	Nein	Nein
19	weiblich	74	0	Ja	Nein	Nein
20	männlich	75	5	Ja	Nein	Nein
21	männlich	60	3	Ja	Nein	Nein
22	männlich	71	5	Ja	Nein	Nein
23	männlich	54	0	Ja	Ja	Nein
24	weiblich	51	6	Ja	Ja	Nein
25	weiblich	53	0	Ja	Ja	Nein
26	männlich	43	0	Ja	Ja	Nein
27	männlich	56	3	Ja	Ja	Nein
28	männlich	73	0	Ja	Nein	Nein
29	männlich	58	10	Ja	Ja	Nein
30	männlich	74	2	Ja	Ja	Nein
31	weiblich	66	0	Ja	Nein	Nein
32	weiblich	74	0	Ja	Ja	Nein
33	männlich	57	0	Ja	Nein	Nein
34	weiblich	57	8	Ja	Nein	Nein
35	weiblich	66	4	Ja	Nein	Ja
36	männlich	46	66	Ja	Nein	Ja
37	männlich	79	26	Ja	Ja	Nein

3.2.1 MAP4K3

In der *real-time*-PCR zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der mittleren ΔC_t -Werte zwischen Tumorzentrum ($4,16 \pm 0,29$) und Tumorrand ($4,21 \pm 0,28$), jeweils Mittelwert \pm Standardfehler (S.E.M.). Dies entsprach nach einer Schätzformel für die relative mRNA-Expression ($E_r = 1/2^{\Delta C_t}$) einer Expressionsdifferenz von unter 3,6% (nicht signifikant). Die Lokalisation innerhalb des Tumors hatte somit auf mRNA-Ebene keinen Einfluss auf die Expression dieser Kinase. Trotz erheblicher Streuungen unter den 37 analysierten Tumoren fand sich eine positive Korrelation der Expression von MAP4K3 im Tumorzentrum und der Tumorrandzone. Hohe Expressionswerte im Tumorzentrum korrelierten dabei mit hohen Expressionswerten in der Tumorrandzone (Abb. 5). Die Korrelation war statistisch signifikant ($r=0,57$, $p<0,01$). Die Western Blot-Analyse zeigte als unabhängige Analyse, dass MAP4K in einem Teil der Tumoren auf Proteinebene nachweisbar war (Abb. 5).

Der TMA zeigt eine ubiquitäre Expression von MAP4K in Tumorzentrum und Tumorrandzone (Abb. 8).

Die Behandlungsintensität mit Darstellung der Chemotherapie (TMZ), Radiatio und Carmustin-Wafern wurde in Relation zu den Expressionsleveln des Aminosäuresensors in Tab. 8 (Diskussion) dargestellt.

Werden die Überlebenszeitdaten mit den Daten der *Real-Time*-PCR abgeglichen und in die Betrachtung einbezogen, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der relativen Genexpression von MAP4K3. Niedrige Werte von MAP4K3 (hohe ΔC_t -Werte) korrelieren dabei signifikant ($p<0,05$) mit einer schlechteren Überlebenszeit, wohingegen hohe Expressionen sich prognostisch eher günstig auszuwirken scheinen (Abb. 5). Die Beobachtung ist sowohl für das Tumorzentrum als auch die Tumorrandzone signifikant. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden 3 Expressionsklassen gebildet. Diese entsprechen der oberen, mittleren und unteren Perzentile der ΔC_t -Werte von MAP4K3 im Tumorzentrum und der Tumorrandzone. In Abb. 5 sind die Kaplan-Meier-Kurven (kumulatives Überleben) für die drei so definierten Expressions-Klassen dargestellt.

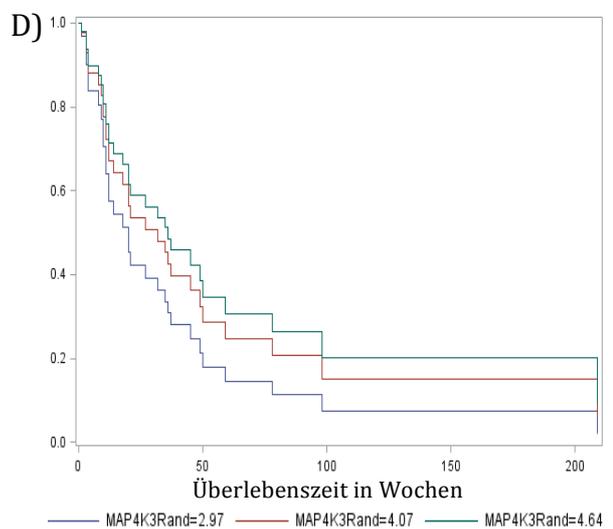
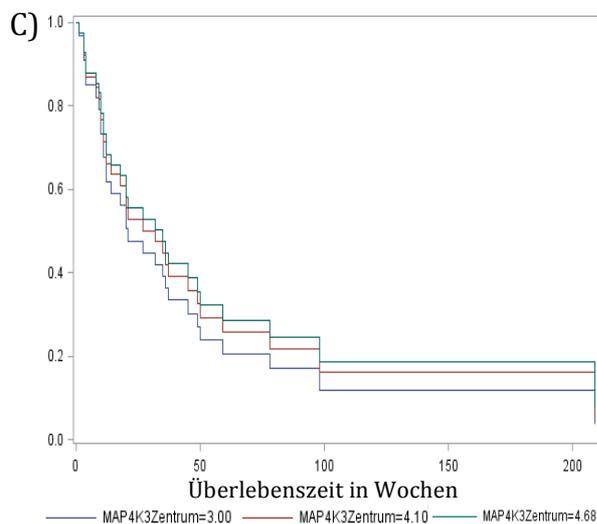
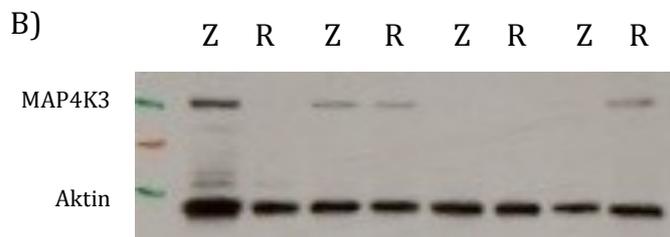
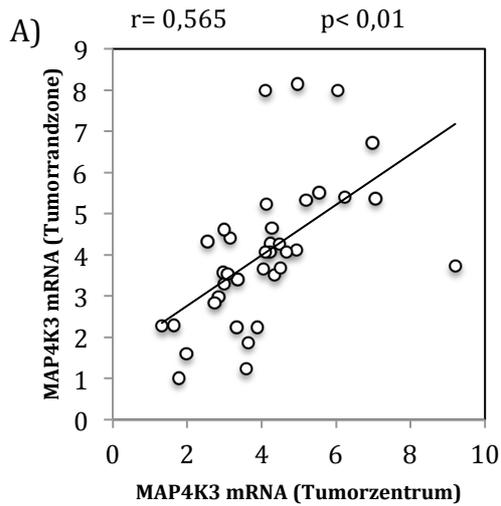


Abb. 5: ΔC_t -Werte von MAP4K3 nach Normierung gegen $\beta 2$ -Mikroglobulin in Tumorrandzone und Tumorzentrum (A). Hohe ΔC_t -Werte entsprechen einer niedrigen Expression von MAP4K3 und niedrige ΔC_t -Werte entsprechen einer hohen Expression von MAP4K3. Die Korrelation von Tumorzentrum und Tumorrandzone ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Darstellung der MAP4K-Proteinexpression mittels Western-Blot (B). Hierbei werden Tumorzentrum (Z) und Tumorrandzone (R) gegenübergestellt. Die Überlebenszeitdaten wurden in Abhängigkeit von der mRNA-Expression (ΔC_t) von MAP4K3 im Tumorzentrum (C) und in der Tumorrandzone (D) analysiert. Gegenübergestellt werden dabei jeweils eine obere, mittlere und untere Perzentile der ΔC_t -Werte für MAP4K3 aller Proben.

3.2.2 RagC

Im Falle der Expression von RagC zeigten sich zwar etwas größere Abhängigkeiten der ΔC_t -Werte von der Lokalisation im Tumor, jedoch erreichten die Differenzen zwischen Tumorzentrum ($7,90 \pm 0,44$) und Tumorrand ($7,19 \pm 0,40$) auch für diese GTPase keine statistische Signifikanz bei den 37 verfügbaren Tumoren. Der größere C_t -Wert im Tumorzentrum entspricht dabei einer geringeren mittleren mRNA-Menge von 61% im Vergleich zum Tumorrand (Differenz nicht signifikant). Auch die Korrelation zwischen Tumorzentrum und der Tumorrandzone ergab knapp keine Signifikanz ($r=0,3$ $p=0,07$) (Abb. 6). Hohe ΔC_t -Werte im Tumorzentrum gingen aber auch hier meist mit höheren ΔC_t -Werten in der Tumorrandzone einher.

Der Western-Blot für RagC zeigt kräftige Banden im Tumorzentrum. Es wurden RagC und Aktin separat in 2 Durchläufen untersucht, da sie die gleiche Proteingröße besitzen und sich bei gleicher Auftragung identisch weit wanderten (Abb. 6). Es zeigt sich das RagC generell exprimiert wird (Abb. 6). Der TMA zeigt für die Randzone eine sehr kräftige Anreicherung in den Tumorzellen und kaum Anreicherung im umliegenden Hirngewebe. Im Tumorzentrum findet sich eine homogene Anreicherung in den Tumorzellen bei nicht angefärbten Tumornekrosen (Abb. 8).

Im Zuge der nachfolgenden Analyse von RagC als potenzieller prognostischer Faktor wurde erneut auch die inkonstante Behandlungsintensität der Patienten den Expressionsleveln gegenübergestellt, um eine potenziell störende Wirkung dieser variablen Behandlung zu diskutieren (Tab. 8, Diskussionsteil).

Die Überlebenszeitdaten wurden mit den ΔC_t -Werten von RagC im Tumorzentrum und in der Tumorrandzone abgeglichen. Dabei zeigte sich, dass höhere ΔC_t -Werte und damit eine niedrige Expression von RagC, eher mit einem schlechteren Überleben einhergehen und niedrigere Werte eher auf ein längeres Überleben hindeuten (Abb. 6). Die Beobachtung ist für die Tumorrandzone statistisch signifikant ($p<0,05$). Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen wurden 3 Expressionsklassen gebildet. Das kumulative Überleben wurde dann entsprechend dieser drei Klassen aufgeschlüsselt (Abb. 6)

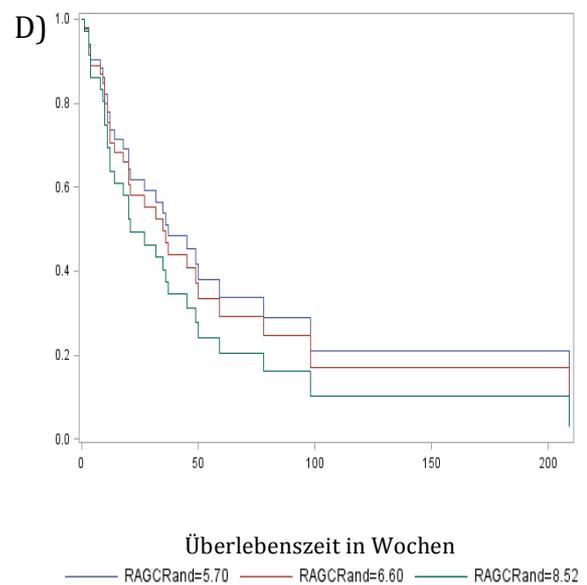
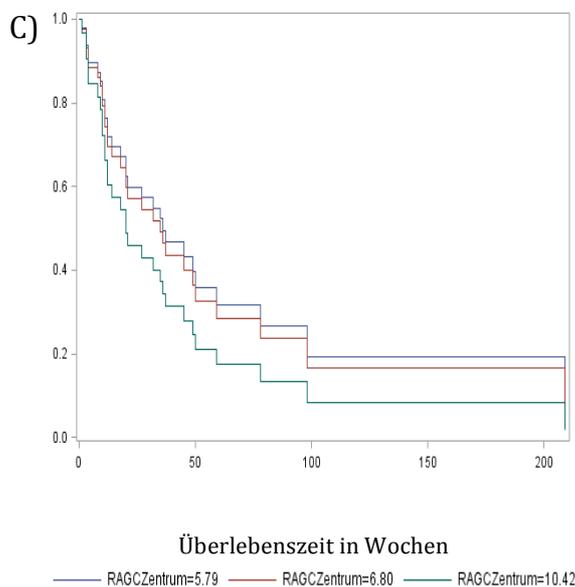
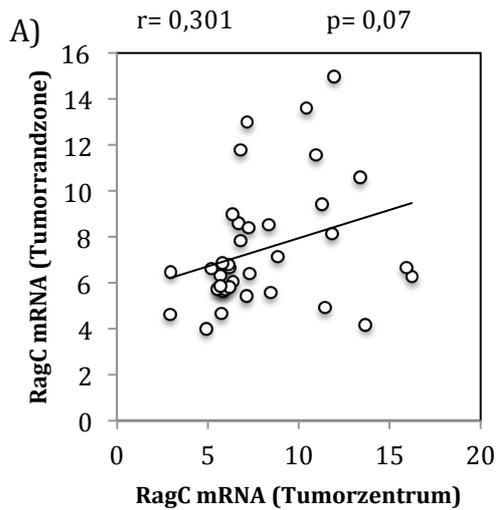


Abb. 6: ΔC_t -Werte der mRNA-Expression von RagC in der Tumorrandzone und Tumorzentrum (A). Die Beziehung von Tumorzentrum und Tumorrandzone ist statistisch nicht signifikant. Darstellung der RagC-Proteinexpression mittels Western-Blot (B). Es werden Tumorzentrum (Z) und Tumorrandzone (R) gegenübergestellt. Die Überlebenszeitdaten wurden in Abhängigkeit von den ΔC_t -Werten von RagC für das Tumorzentrum (C) als auch für die Tumorrandzone (D) analysiert. Gegenübergestellt werden dabei jeweils eine obere, mittlere und untere Perzentile der ΔC_t -Werte von MAP4K3 aller Proben.

3.2.3 VPS34

Nach Auswertung der ΔC_t -Werte der *real-time*-PCR für die Expression von VPS34 im Tumorzentrum und der Tumorrandzone zeigt sich, wie bereits für MAP4K3, eine weitgehende Übereinstimmung der mittleren ΔC_t -Werte zwischen Tumorzentrum ($3,67 \pm 0,16$) und Tumorrand ($3,69 \pm 0,15$), jeweils Mittelwert \pm S.E.M.. Dies entsprach einer Expressionsdifferenz von unter 2,6% (nicht signifikant). Die Lokalisation innerhalb des Tumors hatte somit auf mRNA-Ebene keinen Einfluss auf die Expression dieser Kinase. Trotz erheblicher Streuungen unter den 37 analysierten Tumoren fand sich eine positive Korrelation zwischen beiden Regionen, welche statistisch signifikant ist ($r=0,613$ $p<0,01$). Das Expressionslevel von VPS34 ist dabei im Tumorzentrum ähnlich hoch wie in der Tumorrandzone (Abb. 7).

Der in Abbildung 7 dargestellte Western Blot zeigt ein homogenes Expressionsmuster des Proteins VSP34 sowohl im Tumorzentrum als auch für die Randzone. Da für VPS34 oder die entsprechende Subklasse von PI3K kein spezifischer Antikörper verfügbar war, wurde der generell gegen PI3K gerichtete Antikörper der Firma Cell Signaling (siehe Methoden) verwendet.

Die Überlebenszeitdaten wurden mit den in der *real-time*-PCR bestimmten ΔC_t -Werten von VPS34 für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone analysiert. Es ergab sich kein Hinweis auf einen Überlebensvorteil verschiedener Konzentrationen von VPS34 sowohl für das Tumorzentrum wie auch für die Tumorrandzone (Abb. 7). Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen wurden entsprechend der Expression von VPS34 aller Patienten jeweils für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone 3 Kohorten gebildet. Diese entsprechen der oberen, mittleren und unteren Perzentile der Expression von VPS34 im Tumorzentrum und der Tumorrandzone. Das kumulative Überleben wurde dann entsprechend dieser drei Klassen aufgeschlüsselt (Abb. 7).

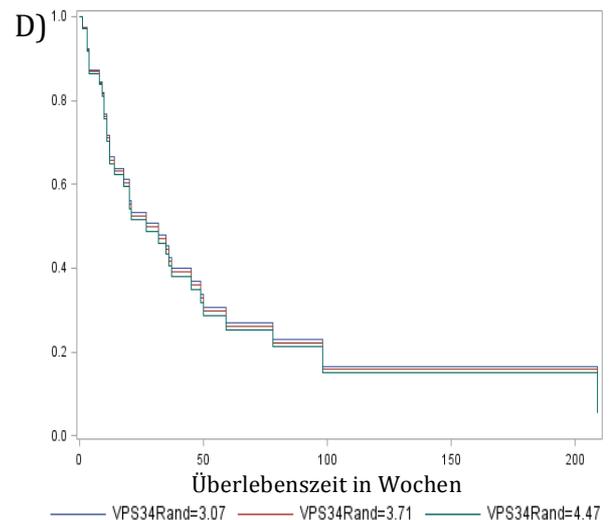
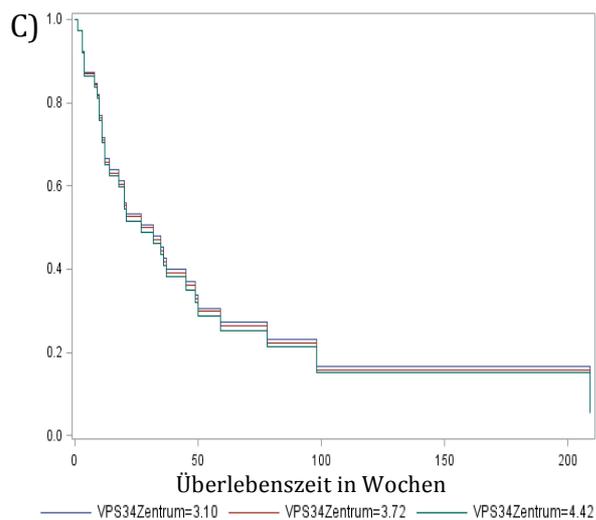
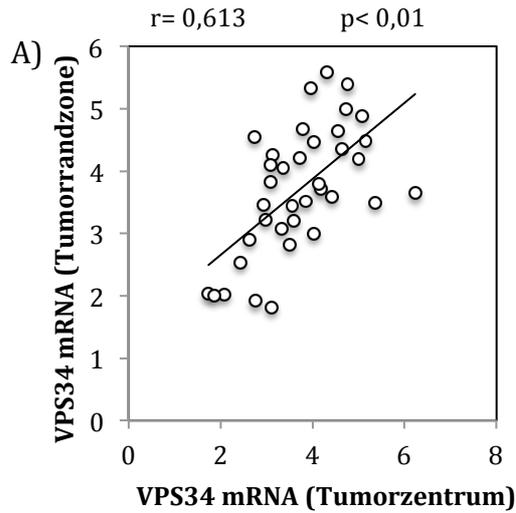


Abb. 7: Expression der mRNA von VPS34 in der Tumorrandzone und Tumorzentrum (A). Die Beobachtung ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Darstellung der VPS34-Proteinexpression mittels Western-Blot mit unspezifischerem Marker für PI3K (B). Hierbei werden Tumorzentrum (Z) und Tumorrandzone (R) gegenübergestellt. Die Überlebenszeitdaten wurden in Abhängigkeit von den ΔCt -Werten der mRNA-Expression von VPS34 im Tumorzentrum (C) und in der Tumorrandzone (D) analysiert. Gegenübergestellt werden dabei jeweils eine obere, mittlere und untere Perzentile der Expression von VPS34 aller Proben.

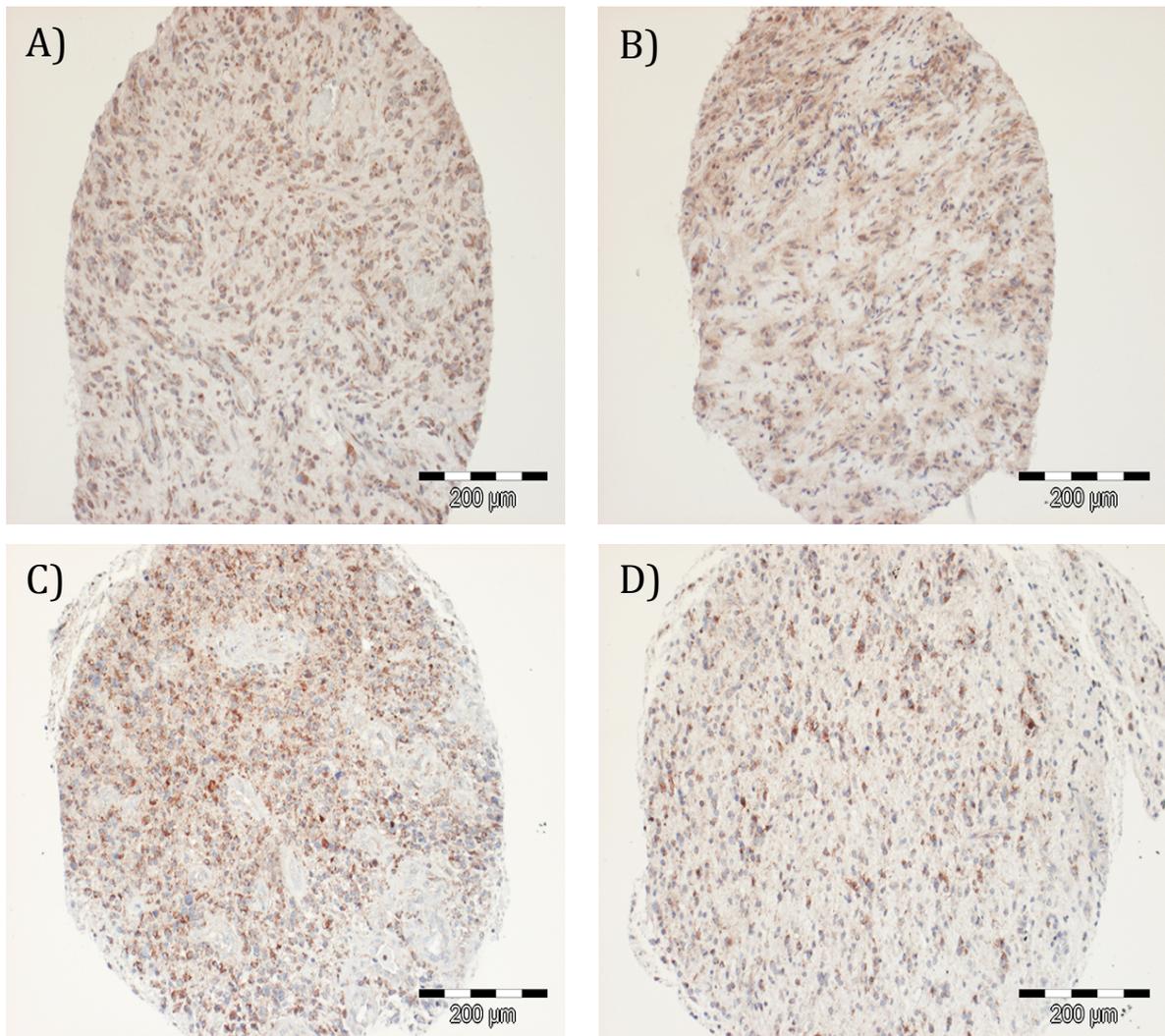


Abb. 8: Dargestellt werden repräsentative Bilder der Immunhistochemie für MAP4K3 im Tumorzentrum (A) und in der Tumorrandzone (B) sowie für RagC im Tumorzentrum (C) und der Tumorrandzone (D).

Tab. 6: Semiquantitative Verteilung von MAP4K in Tumorzentrum und Tumorrandzone nach Auswertung von 12 Glioblastomen (TMA). Einteilung der Tumore in eine von vier Kategorien durch einen Beobachter.

	Tumorzentrum	Tumorrandzone
0	1	1
+	5	4
++	4	4
+++	2	3

Tab. 7: Semiquantitative Verteilung von Rag C zwischen Tumorzentrum und Tumorrandzone nach Auswertung von 12 TMA. Einteilung der Tumore in eine von vier Kategorien durch einen Beobachter.

	Tumorzentrum	Tumorrandzone
0	0	0
+	2	4
++	4	3
+++	6	5

3.2.4 Korrelation von der ΔC_t -Werte MAP4K3, RagC und VPS34 untereinander an gleicher Lokalisation

Neben der Betrachtung der Korrelation zwischen Tumorzentrum und der Tumorrandzone für jeweils einen Aminosäuresensor wurden MAP4K3, RagC und VPS34 auch hinsichtlich ihrer Expression untereinander an gleicher Lokalisation miteinander verglichen. Für das Tumorzentrum zeigte sich eine positive Korrelation der ΔC_t -Werte von MAP4K3 und VPS34 im Tumorzentrum ($r=0,578$; $p<0,01$). Die anderen Expressionen der Aminosäuretransporter untereinander im Tumorzentrum verhielten sich wie folgt: RagC und MAP4K3 ($r=-0,305$; $p=0,067$) sowie RagC und VPS34 ($r=-0,079$; $p=0,641$).

In der Tumorrandzone zeigte sich eine positive Korrelationen für die ΔC_t -Werte der Expression von MAP4K3 und VPS34 ($r=0,398$; $p<0,05$). Für den Vergleich der Expressionen von RagC und VPS34 ($r=0,289$; $p=0,083$) sowie MAP4K3 und RagC ($r=-0,103$; $p=0,543$) in der Tumorrandzone ergab sich keine Korrelation. Die ΔC_t -Werte der einzelnen Aminosäuresensoren sind für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone in Abb. 9 graphisch dargestellt.

3.2.5 Weitere statistisch signifikante Korrelationen

Alle anderen möglichen Paarungen der ΔC_t -Werte von MAP4K3, RagC und VPS34 wurden ebenfalls hinsichtlich möglicher Korrelationen untersucht. Statistische Signifikanz konnte für die Korrelationen von MAP4K3 (Tumorrandzone) und VPS34 (Tumorzentrum) ($r=0,462$; $p<0,01$), VPS34 (Tumorrandzone) und MAP4K3 (Tumorzentrum) ($r=0,345$; $p<0,05$) sowie MAP4K3 (Tumorrandzone) und RagC (Tumorzentrum) ($r=-0,39$; $p<0,05$) nachgewiesen werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse wurden in Abb. 10 dargestellt.

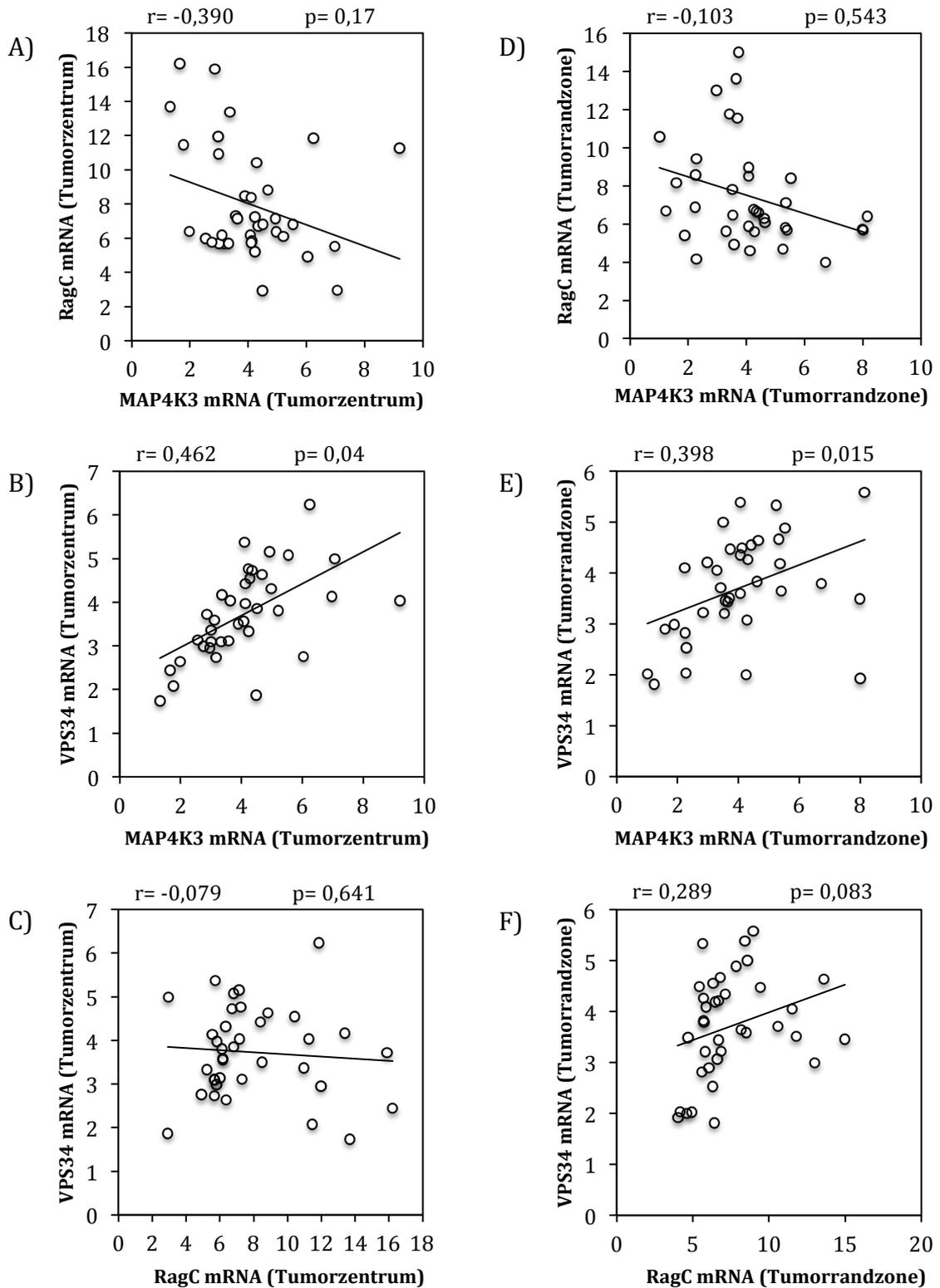


Abb. 9: Δ Ct-Werte der mRNA-Expression von MAP4K3, RagC und VPS34 jeweils für das Tumorzentrum (A-C) und die Tumorrandzone (D-F). Statistische Signifikanz bestand für 8B: VPS34 mit MAP4K3 (jeweils Tumorzentrum) ($p < 0,01$) sowie 8E: VPS34 mit MAP4K3 (jeweils Tumorrandzone) ($p < 0,05$).

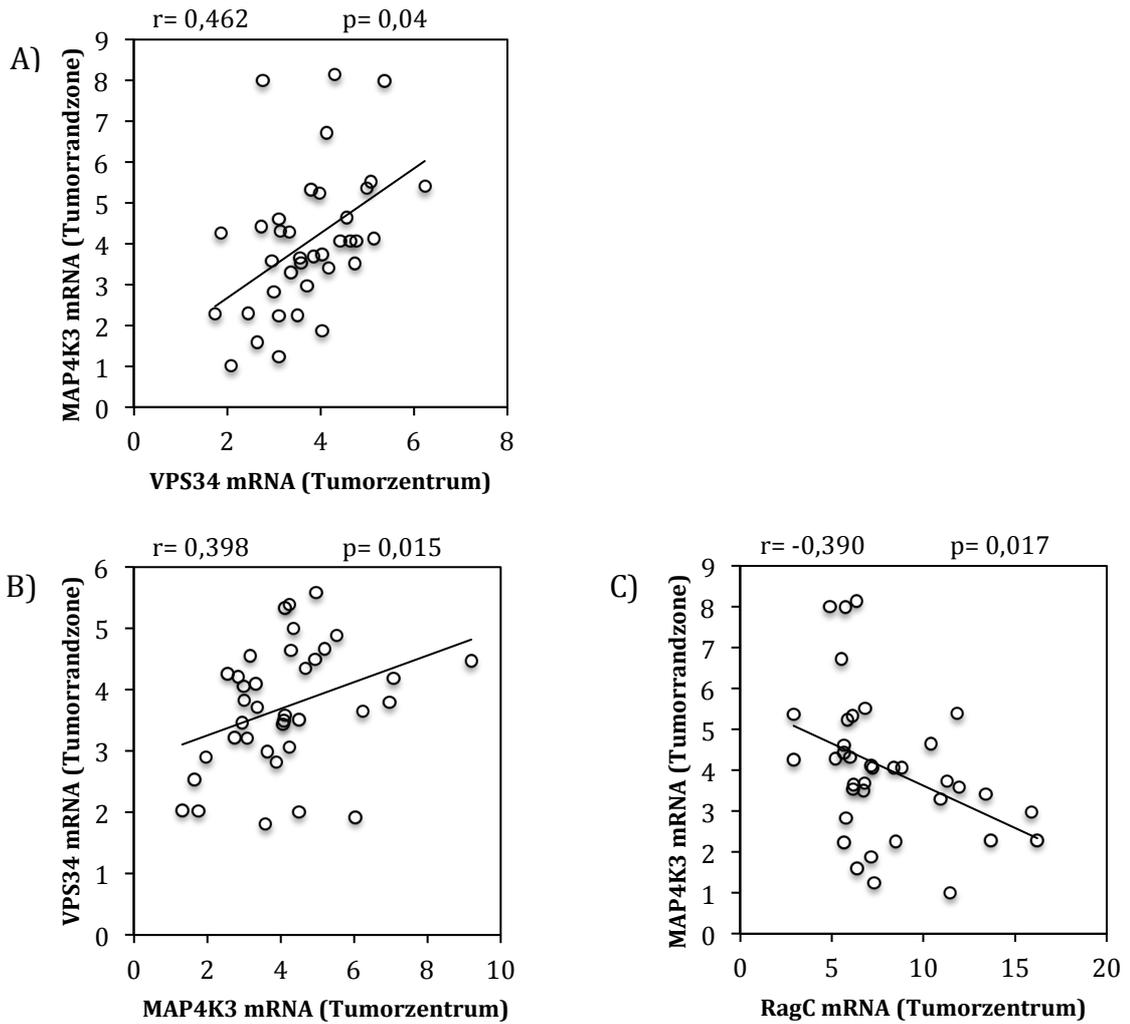


Abb. 10: Statistisch signifikante Korrelationen der ΔC_t -Werte der mRNA-Expression von VPS34 im Tumorzentrum und MAP4K3 in der Tumorrandzone (A). Die Beobachtung ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die positive Korrelation zwischen den ΔC_t -Werten der mRNA-Expression für MAP4K3 im Tumorzentrum und VPS34 in der Tumorrandzone (B) sowie die negative Korrelation der ΔC_t -Werte der mRNA-Expression für RagC im Tumorzentrum und MAP4K3 in der Tumorrandzone (C). Beide Korrelationen sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Intention der Untersuchung des Probenmaterials war die Differenzierung und Charakterisierung der Zellen im Tumorzentrum und der Tumorrandzone von Glioblastomen im Hinblick auf die Expression der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34.

Das Wachstum der Glioblastome geht dabei nicht vom gesamten Tumor, sondern im Wesentlichen von der Randzone an der Grenze zum gesunden Hirngewebe aus. Aufgrund dessen ist das Ausmaß der Resektion des Hirntumors, insbesondere auch der Tumorrandzone entscheidend für das postoperative Überleben der Patienten [42, 43].

Neben der reinen vergleichenden Statistik der Aminosäuresensoren zwischen Tumorrandzone und Tumorzentrum wurden in der Untersuchung auch biometrische Daten wie das Alter, das Geschlecht und die Überlebenszeit der Patienten nach der Operation in die Analyse mit einbezogen.

Die Wahl der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34 als zu untersuchende Parameter ergab sich aus Ihrer Bedeutung als Upstream-Regulatoren des mTORC1-Signalweges [76, 89-92, 94-96]. In mehreren Studien konnte bereits der Einfluss von mTORC1 oder dessen Upstream-Regulatoren auf maligne Hirntumoren nachgewiesen werden [84, 103, 104]. Die Aminosäuresensoren beeinflussen durch das Erkennen der Aminosäurekonzentration in der Zelle die mTORC1-Aktivität und damit auch das Wachstumsverhalten der Zellen. Für Glioblastomzellen *in vivo* lag zu Beginn der Studie keine systematische Untersuchung dieser Aminosäuresensoren vor.

4.1 Biometrische Daten und MGMT-Status bezogen auf Vergleichskollektive

Mit den 37 untersuchten Patienten ist nur ein kleines Kollektiv untersucht worden. Daher stellt sich die Frage nach der Repräsentativität der untersuchten Proben. Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einem Median von 60 Jahren und einem mittleren Alter von 62,1 Jahren etwas unter dem Wert den das amerikanische Krebsregisters (Median 64 Jahre) ausweist. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen dieser Studie bestätigt werden bei der das Verhältnis Männer zu Frauen 1,2:1 betrug. Datenerhebungen aus England beschreiben ein Verhältnis von 1,5:1 [4].

Insgesamt scheinen also die Patienten in der vorliegenden Untersuchung im Wesentlichen repräsentativ für das Gesamtkollektiv der Glioblastom-Patienten zu sein.

Sowohl das Alter bei Diagnosestellung als auch die Geschlechtsverteilung stimmen weitestgehend mit den Angaben der Vergleichskollektive überein.

Die ermittelten Überlebenszeitdaten liegen in dem von uns beobachteten Patientenkollektiv bei einer medianen Überlebenszeit von 27 Wochen. Nimmt man für einen Monat 30 Tage an, so würde das einem medianen Überleben von 6,3 Monaten entsprechen. Verglichen mit den Arbeiten von Brodbelt *et al* und Ohgaki *et al*, welche das mediane Überleben mit 4,8 bis 6,1 Monaten angeben, würde dabei die Überlebenszeit leicht über den beschriebenen Werten liegen [4, 5]. Die mediane Überlebenszeit ist dabei im Wesentlichen vom Alter der Patienten bei Diagnosestellung abhängig wobei ein jüngeres Alter mit besserem Überleben korreliert [4]. Die Tatsache, dass das Überleben der untersuchten Patienten leicht von den in der Literatur beschriebenen Werten abweicht, kann unter Umständen schon durch die Tatsache erklärt werden, dass das Patientenkollektiv im Vergleich zu den in der Literatur veröffentlichten Daten ein niedrigeres medianes Alter zum Zeitpunkt der Erkrankung aufweist.

Die Lokalisation der Tumoren spielt für die Prognose eine entscheidende Bedeutung, da in eloquenten Zentren eine möglichst vollständige Resektion nicht möglich ist ohne die neurologische Funktion zu beeinträchtigen. Sowohl das Erhalten der neurologischen Funktion als auch die möglichst großzügige Resektion des Tumors sind jedoch 2 wesentliche prädiktive Faktoren für die Überlebenszeit nach der Operation [41-43, 105]. Die Verteilung der Tumoren auf die Hemisphäre und auf die einzelnen Hirnlappen ist zwar untersucht worden, jedoch liegen hierzu keine vergleichbaren Daten von anderen Arbeitsgruppen vor. Aufgrund dessen ist hier eine Aussage über die Repräsentativität des Patientenkollektivs bezüglich dieses Gesichtspunktes nicht möglich.

Das Vorliegen einer Hypermethylierung des MGMT-Promoters hat einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten, wobei ein methylierter MGMT-Promoter mit einem verbesserten Gesamtüberleben einhergeht [106]. Die Bestimmung des Methylierungsstatus gestaltete sich in manchen Fällen schwierig, so dass dieser nicht bei allen Patienten sicher festgelegt werden konnte. In der vorliegenden Studie waren 13,5% (5 von 37) nicht sicher zuordenbar. In Studien der Arbeitsgruppe von Zawlik *et al* konnten 8% des Patientenkollektivs keine eindeutigen Methylierungszustände zugeordnet werden [107]. In dem von uns beobachteten Patientenkollektiv lag der MGMT-Promoter bei 17 Patienten (45,9%) methyliert und bei 15 Patienten (40,5%) unmethyliert vor. Die Studie von Zawlik *et al* zeigt ähnliche Daten [107]. Die

Abhängigkeit der Überlebenszeit vom Methylierungsstatus des MGMT-Promoters konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Rapp *et al*, die einen deutlichen Überlebensvorteil von Patienten mit methyliertem Promoter zeigen konnten [106]. Das Abweichen der vorliegenden Ergebnisse kann verschiedene Ursachen haben. Das beobachtete Patientenkollektiv ist klein, so dass sich nur begrenzt allgemeingültige Aussagen ableiten lassen. Des Weiteren könnten hier die Anwendung intraoperativen Gliadels oder die postoperative Radio-Chemotherapie eine Rolle spielen. Eine endgültige Klärung der Frage ist jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.

Grundsätzlich waren die MGMT-Analysen mit einem etablierten diagnostischen Primersystem durchgeführt worden und stets unter Mitführung enzymatisch methylierter humaner DNA als Positivkontrolle und Blut-DNA als Negativkontrolle. Hierbei kam es stets auch zu dem erwarteten Resultat.

Die erste großangelegte Studie zu MGMT hatte einen generellen, auch Behandlungs-unabhängigen prognostischen Benefit der Promotermethylierung ergeben [108]. Vielleicht kann jedoch angemerkt werden, dass eine Meta-Analyse des Behandlungserfolgs älterer Patienten mit Glioblastom (≥ 65 Jahre) aus 13 Primärstudien ergab, dass der Methylierungsstatus des Promoters hier zwar eine klar prädiktive Bedeutung für das Überleben unter Temozolomid(TMZ)-Therapie hatte (TMZ oder TMZ + Bestrahlung), jedoch nicht behandlungsunabhängig eine prognostische Rolle einnahm [109]. Bei Therapien ohne TMZ war die Methylierung bedeutungslos. Die Heterogenität der Behandlungen in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 37 Tumoren mag also für den fehlenden MGMT-Effekt mit verantwortlich sein, so z. B. die nicht im Einzelnen bekannte Intensität einer TMZ-Behandlung.

4.2 Kritische Betrachtung zu MAP4K3

MAP4K3 spielt bei der Steuerung des Zellzyklus eine wesentliche Rolle, da es als Aminosäuresensor eines der aktivierenden Proteine im mTORC-1 Signalweg darstellt [89-92]. In Abhängigkeit vom Aminosäurepool wird durch Phosphorylierung ihrer regulatorischen Domäne am Serin-170 die Kinase MAP4K3 aktiviert, was die Lysosomen-abhängige Aktivierung von mTORC1 fördert [91, 110, 111]. Aminosäureentzug führt zur schnellen Dephosphorylierung und Deaktivierung von MAP4K3, während Aminosäure-Stimulation das Gegenteil bewirkt [90, 110]. Es konnte

nachgewiesen werden, dass MAP4K3 in der Kette der Signalüberträger für die Aminosäure-Stimulation der Proteinbiosynthese und anderer mTORC1-abhängiger Prozesse oberhalb von mTORC1 agiert, weil die Aktivierung von MAP4K3 zeitlich vor der Phosphorylierung von p70S6K, einem klassischen mTORC1-Substrat, auftritt und nicht durch den mTORC1-Inhibitor Rapamycin gehemmt werden kann [112]. Obwohl der Einfluss von MAP4K3 auf mTORC1 durch Störungen der Funktion von RagC aufgehoben werden kann und der Mitogen-aktivierten Kinase daher vielleicht keine dominierende Rolle zukommt, ist ihre Beteiligung an der metabolischen Regulation von mTORC1 damit hinreichend gesichert [112]. Wegen der in der Einleitung dargestellten ambivalenten Rolle von MAP4K3 in Tumoren, inklusive der Entdeckung von MAP4K3-Fusionsgenen in hochgradigen pädiatrischen Gliomen, stellte sich daher die Frage nach dem Stellenwert der MAP4K3-Expression im Glioblastom des Erwachsenenalters in Abhängigkeit von der Lokalisation. [113].

Dafür wurden Proben aus dem Tumorzentrum und der Tumorrandzone analysiert. Die Zuordnung der Proben aus dem resezierten Tumormaterial zum Tumorzentrum oder der Tumorrandzone wurde anhand der Anfärbung mittels 5-ALA und der Neuronavigation getroffen (s. Abschnitt 2.1.3). Wie auch für die übrigen untersuchten Aminosäure-Sensoren erfolgte daher die an allen Tumoren durchgeführte Quantifizierung der mRNA-Level aus cDNA, die nach makroskopischen Kriterien aus Tumorzentrum bzw. Tumorrand gewonnen worden war. Eine Überprüfung anhand von Gefrierschnitten erfolgte nicht und war wegen des Operationsortes außerhalb des Universitätsklinikums Magdeburg auch nicht möglich. Allerdings gewährleistete die Verwendung der 5-ALA-Fluoreszenz die bestmögliche Gewähr für eine Probenentnahme aus der Infiltrationszone. Methodenkritisch ist dennoch anzumerken, dass es sich bei der Lokalisation ‚Tumorrand‘ für die cDNA-Gewinnung nicht um eine histologisch gesicherte Infiltrationszone handelt.

Es zeigte sich, dass nach der Normalisierung der Expression von MAP4K3 gegen die Expression von β_2 -Mikroglobulin für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone beinahe identische Expression gefunden wurde (Mittelwertsdifferenz < 3,6%, nicht signifikant). Eine systematische Abhängigkeit von der Lokalisation existierte also nicht. Es konnte eine positive Korrelation zwischen den Lokalisationen ermittelt werden. Diese Beobachtung ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Es ist davon auszugehen, dass in der Infiltrationszone des Glioblastomes die Glioblastomzellen neben Zellen des nicht pathologischen Hirngewebes vorliegen. Dies wird durch die Ergebnisse des TMA

gestützt. Da dennoch die mittleren mRNA-Level beider Lokalisationen nicht signifikant verschieden waren, gibt es wahrscheinlich weder zwischen Glioblastomzellen des Tumorzentrums und der aktiven Wachstumszone, noch zwischen Tumorgewebe und nicht-neoplastischen Zellelementen eine differentielle Regulation der mRNA-Expression. Eine genauere Aufschlüsselung nach den Zellelementen der Infiltrationszone wäre ggf. durch eine aufwendige Real-Time-PCR nach Mikrodissektion möglich [114]. Die TMAs zeigten im Tumorzentrum deutlich Tumorzellen mit großen Zellkernen neben überwiegend nekrotischem Gewebe bei starker Vaskularisierung. In der Randzone konnte normales Hirngewebe identifiziert werden, welches von Tumorzellen durchsetzt war. Die Anreicherung für MAP4K3 und RagC fand sich in der Tumorrandzone in den Tumorzellen. Das infiltrierte Hirngewebe zeigte keine wesentliche Anfärbung.

Im Western Blot konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass eine Expression von MAP4K3 im Tumorzentrum und der Tumorrandzone stattfindet. Aufgrund der geringen Menge untersuchter Proben lassen sich weiterführende Rückschlüsse nicht ziehen.

Bei der Überlebenszeit zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil bei höherem Expressionslevel (niedriger ΔC_t -Wert) von MAP4K3 sowohl für das Tumorzentrum als auch für die Tumorrandzone. Niedrigere Werte von MAP4K3 korrelierten hingegen mit einem schlechteren Überleben. Aufgrund der inhomogenen Behandlungsintensitäten der analysierten Patienten, muss diese Aussage jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Dieser Aspekt wird für alle diesbezüglich relevanten Aminosäuresensoren gemeinsam unten diskutiert (siehe Abschnitt 4.5).

Ausgangspunkt des Interesses für Aminosäuresensoren war, in der Arbeitsgruppe der Neuropathologie des Universitätsklinikums Magdeburg, die Beschäftigung mit mTORC1. Die meisten und alle publizierten Arbeiten dazu hatten sich allerdings mit Meningeomen befasst. So war mTORC1 selbst als denkbares Target einer Meningeomtherapie am orthotopen Mausmodell beschrieben worden [102]. Immer waren dabei *in vitro* auch die physiologischen Restriktionen der mTORC1-Aktivierung durch Aminosäuremangel (z.B. Leucin-Entzug), durch ATP-Mangel (Galaktose als schlechter verwertbarer Zucker, mitochondriale Atmungshemmer) und durch Sauerstoffmangel (Hypoxieschrank) mit analysiert worden, ohne dass sich daraus weiterführende Projektansätze ergeben hatten. Unpublizierte *in vitro*-Daten der Arbeitsgruppe an Meningeom aber z.T. auch an Karzinom- und Gliomzellen aus dieser Zeit hatten jedoch gezeigt, dass eine Verarmung der Zellen an der mTORC1-relevanten Aminosäure Leucin zu einem im Western Blot

(p70S6K-Phosphorylierung) nachweisbaren Verlust an Kinaseaktivität von mTORC1 führt, der sich durch Rekonstitution von Leucin im Medium wieder aufheben ließ. Vom Standpunkt einer das Tumorzellwachstum fördernden mTORC1-Aktivierung durch MAP4K3 ausgehend hatten wir vermutet, dass vermehrte Expression von MAP4K3 im Tumor mit einem schlechteren Überleben einhergeht als Zeichen der höheren mTORC-Aktivität der teilungsaktiven Bereiche des Glioblastomes. Eine solche Hypothese hätte auch zu der beschriebenen Eigenschaft von MAP4K3 als negativer prognostischer Marker beim NSCLC gepasst [85]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch das Gegenteil. Die besonders aggressiven Tumore scheinen eine niedrigere Expression von MAP4K3 mit schlechterem Überleben zu haben. Dieses zur Hypothese konträre Ergebnis kann möglicherweise jedoch durch die eingangs erwähnten vielfältigen anderen Funktionen von MAP4K3 außerhalb seiner Rolle als Aminosäuresensor erklärbar sein. Diese Funktionen könnten teilweise eher in Richtung einer Tumorzellwachstum bremsenden Funktion interpretiert werden, wie z.B. seine pro-apoptotische Funktion [88].

Eine weitere Erklärung hierfür könnte sein, dass in aggressiveren Tumorzellen mit entsprechend hoher Proteinbiosynthese, mTORC1 bereits ohne Stimulation via MAP4K3 eine hohe Aktivität erreicht und daher ein negativer Feedback-Mechanismus aktiviert wird, der den Aminosäure-Sensor MAP4K3 herunterreguliert und damit eine weitere mTORC1-Aktivierung bremst. Obwohl gerade die Hemmung der Aktivitäten von mTORC1 und mTORC2 als therapeutischer Angriff auf das Glioblastom diskutiert wurde und zumindest im Tiermodell auch vielversprechend war [115], ist es nicht klar, ob die den Tumorprozess vorantreibenden Zellen innerhalb des Glioblastomes wirklich eine hohe Aktivität von mTOR-Komplexen aufweisen. Zu unseren Resultaten passend zeigte die Arbeitsgruppe von Han *et al*, dass insbesondere Glioblastom-Stammzellen eine sehr niedrige Aktivität von mTORC1 besitzen [116]. Es könnte daher sein, dass gerade die besonders aggressiv wachsenden Tumore sehr geringe Expressionen der Komponenten des mTORC-Signalweges aufweisen.

Eine weitere Erklärung ist möglicherweise, dass im Tumor bei erhöhter Proliferation kaum noch Aminosäuren als Substrat zur Verfügung stehen und MAP4K3 deshalb herunterreguliert wird.

Überlegenswert erscheint es MAP4K3 als Prognosemarker an größeren Kollektiven zu analysieren, da die Expression an Entnahmestellen im Tumorzentrum und der Tumorrandzone annähernd gleich ist. So könnte man Proben jeglicher Lokalisation im

Tumor nach Normalisierung gegen β_2 -Mikroglobulin der gleichen Probe analysieren. Hierfür wären jedoch größer angelegte Studien erforderlich um die Ergebnisse an größeren Kollektiven zu verifizieren und wenn dies erfolgreich wäre einen Cut-off-Wert zu etablieren um eine positive oder negative Prognose abschätzen zu können. Für den Einsatz als Prognosemarker wäre dann auch tiefgefrorenes, natives Probenmaterial für die Gewinnung von RNA erforderlich. Dies ist jedoch nicht flächendeckend realisierbar. Eine pharmakologische Therapie zur Hemmung von MAP4K3 erscheint nicht sinnvoll. Bei einer niedrigen Expression von MAP4K3 besteht eine schlechtere Prognose, was eine selektive Hemmung wenig sinnvoll erscheinen lässt. Zusätzlich sind die meisten Kinsaseinhibitoren gegen mehrere Kinasen gerichtet, was systemisch angewendet, zu schweren Nebenwirkungen führen würde. Vor allem aber bedarf es zunächst Gruppen von Patienten mit homogenerer Behandlung, um MAP4K3 als potentiellen prognostischen Faktor zu verifizieren (siehe Abschnitt 4.5).

4.3 Kritische Betrachtung für RagC

RagC erfüllt, ähnlich wie MAP4K3, die Funktion eines Aminosäuresensors und Upstream-Regulators des Zellzyklus über den mTORC1 [94-96].

Es reguliert primär über seine GTP- bzw. GDP-Beladung die mTORC1-Aktivierung. Rag-GTPasen sind Heterodimere aus A/B- bzw. C/D- Untereinheiten, wobei Rag A/B^{GTP} und RagC/D^{GDP} die aktiven Formen sind, welche an mTORC1 binden und dessen Signaltransduktion durch Hinleitung von mTORC1 zur Lysosomenoberfläche aktivieren, während umgekehrt Rag A/B^{GDP} und RagC/D^{GTP} diese Signaltransduktion auch in Gegenwart hinreichender Aminosäurepools inhibieren [117]. Die Details dieses Mechanismus finden sich u.a. in der Übersichtsarbeit von Duan und Kollegen [91]. Die erst kürzlich publizierte Beobachtung von RagC- Mutationen in Tumoren, welche die Bindung an Raptor - d.h. an mTORC1- erhöhen und die Aktivierung von mTORC1 unabhängig vom Aminosäurepool machten, untermauerten weiter die Rolle der Aminosäure-Perzeption durch kleine Rag-GTPasen und speziell die Rolle von RagC bei Tumorprozessen [97].

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete niedrigere mittlere Expression von RagC im Tumorzentrum (61%) unterschied sich zwar nicht signifikant ($p = 0,2$) von der zu 100% gesetzten im Tumorrand, doch mag dies ggf. eine Folge des begrenzten Probenumfangs sein. Bedenkt man, dass die Mittelwerte für MAP4K3 und VPS34 jeweils für die beiden

Lokalisationen beinahe identisch waren, so könnte die erhebliche Differenz bei RagC doch darauf hindeuten, dass hier tatsächlich in den Glioblastomzellen der aktiven Wachstumszone (Infiltrationszone) RagC stärker exprimiert wird. Speziell bei diesem Aminosäuresensor würde sich vielleicht die Aufstockung der Probenzahl in einer größeren Kohorte lohnen und ggf. auch eine aufwendigere Dissektion der Infiltrationszone in ihre zellulären Elemente gemäß Histologie. Immerhin zeigte sich auch im TMA eine geringe Anfärbung von gesunden Nervenzellen gegenüber einer kräftigen Anfärbung in den Tumorzellen der Tumorrandzone, was für eine stärkere Expression von RagC in den Tumorzellen der Randzone spricht.

Gleichzeitig wären auch orthotope Xenograft-Experimente an der Maus mit RagC-manipulierten Gliomzellen denkbar (Überexpression, Knockdown), um die Auswirkung auf das Tumorwachstum experimentell auszuloten.

Auf der anderen Seite steht die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gefundene positive Überlebens-Assoziation von RagC im Tumorrand (Abb. 6) einer Assoziation hoher RagC-Expression mit der aktiven Fraktion von Tumorzellen entgegen, sofern diese Überlebens-Assoziation tatsächlich besteht und nicht durch die heterogene Behandlung des Patientenkollektivs ein Scheineffekt generiert wurde (siehe Abschnitt 4.5). Der nur mit wenigen Proben mögliche Western Blot (Abb. 6) schien tendenziell eher auf eine geringere Expression des RagC-Proteins in der Randzone hinzudeuten. Allerdings ist hier die verfügbare Probenzahl für eine klare Aussage nicht relevant.

Bei niedriger Expression von RagC in der Tumorrandzone (hohe ΔC_t -Werte) zeigt sich ein schlechteres Überleben der Patienten gegenüber Patienten mit hoher Expression von RagC.

Mittels Western Blot konnte in einem unabhängigen Verfahren die Expression von Rag C gezeigt werden.

Der TMA zeigt im Tumorzentrum eine homogene Anfärbung der Tumorzellen neben dem Vorliegen von Nekrosen und pathologischen Gefäßen. In der Infiltrationszone zeigen die Tumorzellen der gleichen Patienten eine ähnlich starke Anfärbung wie im Tumorzentrum und durchflechten das nicht pathologische Hirngewebe welches selbst nicht anreichert.

Sollten weiterführende *in-vivo*-Studien zu RagC angestrengt werden empfiehlt es sich den Entnahmeort der Probe eindeutig zu definieren, da sich Unterschiede in der Bedeutung für die Überlebenszeit zwischen dem Tumorzentrum und der Tumorrandzone ergeben. Eine Verwendung als Prognosemarker ist nach den

vorliegenden Ergebnissen nicht empfehlenswert. Eine Prognoseabschätzung würde sich als technisch schwierig gestalten ohne den genauen Entnahmeort der untersuchten Probe zu kennen.

Therapeutisch erscheint eine Hemmung von RagC wenig vielversprechend, da niedrigere Expressionslevel mit einem schlechteren Überleben einhergehen. Da dem gesteigerten Zellwachstum andere Faktoren zugrunde zu liegen scheinen ist eine selektive Hemmung von RagC nicht sehr aussichtsreich.

4.4 Kritische Betrachtung für VPS34

VPS34 ist ebenfalls essentiell in die Aminosäure-Stimulation von mTORC1 involviert, weil ohne diese Phosphatidylinositol-3-Kinase eine Erhöhung der Kinaseaktivität des mTOR-Komplexes durch Aminosäuren nicht mehr möglich ist, wie dies an der Phosphorylierung des klassischen mTORC1-Substrates p70S6K ablesbar ist. Umgekehrt steigert die erzwungene Überexpression von VPS34 in Gegenwart eines hinreichenden Aminosäurepools die Phosphorylierung des genannten mTORC1-Substrates [118]. Ein komplexer, Ca^{2+} -vermittelter Mechanismus für die positive Regulation von mTORC1 durch Aminosäuren via VPS34 wurde von Gulati und Kollegen vorgeschlagen [119].

Mit Hilfe der *real-time*-PCR wurde ebenfalls die Expression von VPS34 im Tumorzentrum und in der Tumorrandzone ermittelt. Wie schon für MAP4K3 waren auch hier die Mittelwerte der mRNA-Level in beiden Regionen nahezu identisch (Differenz < 2,6%, nicht signifikant). Es war also auch hier nicht davon auszugehen, dass Tumorzellen in der aktiven Wachstumszone abweichende Level dieses Aminosäuresensors aufweisen, wengleich auch hier der Vorbehalt einer eventuellen späteren Untersuchung einzelner Zellelemente der Infiltrationszone nach Maßgabe der Histologie bestehen bleibt. Im Vergleich von Tumorzentrum und Tumorrandzone hinsichtlich der Expression von VPS34 zeigt sich eine positive Korrelation welche statistisch signifikant ist ($p < 0,01$).

Analysen auf Proteinebene im Western Blot zeigten ein ähnliches Expressionslevel von VPS34 für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone als Bestätigung der mRNA-Befunde. Der verfügbare Antikörper ist allerdings nicht spezifisch für VPS34 sondern allgemein gegen PI3K gerichtet, was die Interpretation erschwert. Denn auch andere PI3Ks sind oberhalb von mTORC1 und unabhängig von Aminosäuren in die Aktivierung des mTOR-Komplexes involviert, z.B. bei der Weiterleitung pro-mitotischer Signale von

Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. dem EGF-(epidermal growth factor) Rezeptor. Diese Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen via PI3K, Akt und mTORC1 ist eine wesentliche Funktion von PI3Ks in Tumoren, auch in Gliolastomen [120]. Insofern ist die Aussagekraft des Western Blots nicht spezifisch.

Ein TMA konnte für VPS34 nicht angefertigt werden, da derzeit, keine kommerziellen Antikörper verfügbar sind, welche spezifisch gegen VPS34 gerichtet sind.

Für die Überlebenszeit zeigt VPS34 sowohl für das Tumorzentrum als auch für die Tumorrandzone ähnliche Resultate für hohe und niedrige Expressionslevel. Ein Überlebensvorteil konnte für verschiedene Expressionen von VPS34 nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VPS34 gegenüber MAP4K3 und RagC der am wenigsten geeignete Prognose-Marker ist, da sich keine Überlebensvorteile für verschiedene Expressionslevel zeigten.

Holand *et al* konnten in Zellkulturen eine Verlangsamung des Tumorwachstums von Glioblastomen unter Hemmung von PI3K mittels si-RNA nachweisen [104]. Aufgrund der hier vorgelegten Daten der rt-PCR scheint jedoch speziell die Expression von VPS34 keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben.

4.5 Behandlungsintensität als Störvariable für die Überlebenseffekte der Aminosäuresensor-Expression

Weitaus die meisten Patienten erhielten Radiatio, Temodal und Gliadel-Wafer (siehe Tabelle 5). Genauer war jedoch lediglich für Gliadel bekannt (Anzahl Wafer), nicht aber für die Standardtherapien Radiatio und Temodal. Bei jeder durchgeführten Operation wurde eine möglichst ausgedehnte Resektion angestrebt. Das genaue Ausmaß der Operation (Teilresektion, subtotale oder makroskopisch totale Resektion) war jedoch nicht bekannt. Hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung der Behandlungsmodalitäten war das untersuchte Kollektiv also recht homogen, relevante quantitative Parameter waren jedoch weitgehend unbekannt (Ausmaß der Resektion, Anzahl der Temodal-Zyklen, Details der Radiatio). Eine exakte Statistik zum Ausschluss der Behandlungsintensität als Störfaktor bei der Bewertung der Rolle von Aminosäuresensoren für das Überleben, war so nicht möglich. Dementsprechend sind die in den Kaplan-Meier-Kurven der Abbildungen 5, 6 und 7 diskutierten signifikanten Abhängigkeiten der Überlebenszeiten von einzelnen Aminosäuresensoren mit höchster Vorsicht zu betrachten. Trotz der Unmöglichkeit einer exakten Statistik zu diesem

Punkt, sollte zumindest qualitativ die Behandlungsintensität als Störvariable im Folgenden betrachtet werden.

Als mutmaßlich relevante Überlebensfaktoren waren die Expression von MAP4K3 in Tumorzentrum und Tumorrandzone sowie die Expression von RagC in der Tumorrandzone in Erscheinung getreten. Für diese drei Parameter waren übereinstimmend jeweils hohe ΔC_t -Werte, also eine niedrige Expression, mit schlechterem Überleben assoziiert gewesen. Dies war statistisch analysiert worden anhand der Aufteilung der ΔC_t -Werte in drei Perzentile, d.h. die höchsten Perzentile waren jeweils mit dem schlechtesten Überleben assoziiert (Abb. 5 und 6).

Die Tabelle 8 gibt nun an, welche Behandlungsintensität Patienten zuteilwurde, die jeweils in die obere (3), mittlere (2) oder untere (1) Perzentile fielen. Die Behandlungsintensität wurde dabei aufgeteilt in Temodaltherapie (% der Patienten mit Temodal), Radiatio (% der Patienten mit Radiatio) und die Anzahl der erhaltenen Gliadel-Wafer.

Für MAP4K3 im Tumorzentrum zeigte sich dabei, dass der Prozentsatz Temodal-behandelter bzw. bestrahlter Patienten sowie die mittlere Anzahl der erhaltenen Gliadel-Wafer von der Gruppe der höchsten Perzentile über die mittlere zur niedrigsten Perzentile abnahmen. Dabei waren die Differenzen generell gering und die Unterschiede in der Anzahl der Gliadel-Wafer, als einziger quantitativer Parameter, auch zwischen den Gruppen nicht signifikant. Die moderaten Differenzen der Behandlungsintensität innerhalb dieser drei Gruppen hatten also eine Ausrichtung, die exakt der Reihung der MAP4K3-Expression nach dem Überlebensvorteil entgegenlief. Die Gruppe mit der für das Überleben ungünstigsten MAP4K3-Perzentile hatte eine geringfügig intensivere Behandlung erfahren. Hieraus ergaben sich also keine Hinweise auf eine Störwirkung der variablen Behandlung auf den behaupteten prognostischen Effekt von MAP4K3.

Die gleiche Argumentation gilt mit Einschränkungen auch für die beiden anderen Parameter, d.h. MAP4K3 und RagC in der Tumorrandzone. Hier gab es zwar keine der prognostischen Tendenz der Aminosäuresensoren entgegenlaufende Verteilung der Behandlungsintensitäten, aber umgekehrt auch keine gleichgerichtete Verteilung. Erneut waren die Differenzen insgesamt gering und für den einzigen quantitativen Parameter, die Anzahl der Gliadel-Wafer, zwischen den drei Perzentil-Gruppen auch in keinem Fall statistisch signifikant.

Es ergibt sich also als Resümee, dass die verfügbaren Behandlungsdaten zumindest keinen Hinweis darauf liefern, dass die behaupteten Überlebenseffekte der Aminosäure-

Sensoren nur Scheineffekte sind, die sich durch die variable Behandlung der Patienten erklären ließen. Selbstverständlich muss betont werden, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit der prognostische Wert der mRNA-Level nicht hinreichend nachgewiesen werden konnte. Für eine vertiefte Analyse bedürfte es eines größeren und möglichst homogen behandelten Patientenkollektivs bei gleichzeitiger statistischer Betrachtung aller relevanten Co-Variablen.

Tab. 8: Darstellung der Perzentilen für die ΔCt -Werte von MAP4K3 Tumorzentrum, MAP4K3 in der Tumorrandzone und RagC in der Tumorrandzone. Den Perzentilen wurde dann die angewandte Therapie mit Temozolomid, Radiatio und intraoperativer Anwendung von Carmustin-Wafern zugeordnet. Dargestellt wurden die Werte für die in der rt-PCR ein signifikanter Einfluss auf die Überlebenszeit nachgewiesen werden konnte. Die Perzentile 3 entspricht dabei den hohen ΔCt -Werten, Perzentile 2 den mittleren ΔCt -Werten und Perzentile 1 den niedrigen ΔCt -Werten.

MAP4K3 Tumorzentrum

ΔCt -Wert	% Temodal	% Radiatio	Anz. Gliadel-Wafer
Perzentile 3	92	100	6,08
Perzentile 2	85	85	5,31
Perzentile 1	83	75	4,50

MAP4K3 Tumorrandzone

ΔCt -Wert	% Temodal	% Radiatio	Anz. Gliadel-Wafer
Perzentile 3	85	92	4,54
Perzentile 2	92	92	6,69
Perzentile 1	85	73	4,55

RagC Tumorrandzone

ΔCt -Wert	% Temodal	% Radiatio	Anz. Gliadel-Wafer
Perzentile 3	85	92	5,08
Perzentile 2	82	73	5,73
Perzentile 1	92	92	5,15

4.6 Der Einsatz von Gliadel® bei Glioblastomen in der Primärtherapie

Die postoperative Chemotherapie hat nur eingeschränkten Zugriff auf den Resttumor, da die Blut-Hirn-Schranke limitierend für die intrathekale Konzentration des Chemotherapeutikums ist [121].

Aufgrund dessen wurde ein Therapieansatz geschaffen bei dem eine Chemotherapie direkt vor Ort ansetzt. Hierfür werden Gliadel®-Wafer verwendet. Es handelt sich dabei um mit Carmustin beladene Polymer-Plättchen, welche auf die Resektionsränder aufgelegt und dort verklebt werden.

In dem von uns behandelten Patientenkollektiv wurden bei 29 von 37 Patienten Gliadel®-Wafer eingesetzt. Bei 8 Patienten wurde dies aufgrund von Kontraindikationen gegen Gliadel wie zum Beispiel die breite Eröffnung des Ventrikelsystems nicht durchgeführt. Je nach Größe der Resektionshöhle wurden unterschiedlich viele Wafer

eingebraucht. Zur statistischen Auswertung wurden folgende Gruppen definiert: Keine Waferanwendung (8 Patienten), 1-4 implantierte Wafer (4 Patienten), 5-6 Wafern (10 Patienten) und 7-11 Wafern (15 Patienten). Hierbei handelt es sich um die einzigen sicheren adjuvanten Behandlungsdaten, da die weitere Behandlung außerhalb der Klinik stattfand und im Einzelnen nicht mehr vollständig nachvollziehbar war. Es zeigte sich ein besseres Überleben der Patienten mit 1-6 implantierten Wafern im Vergleich zu keinem oder mehr als 7 Wafern.

Das gute Überleben der Patienten mit Implantation von 1-6 Wafern beruht unter anderem auf der häufig noch geringen Größe des Tumors und entsprechend besserem Outcome [122]. Hier wirkt Gliadel® lebenszeitverlängernd wie auch in groß angelegten Studien nachgewiesen werden konnte [57].

Ein signifikanter Überlebensvorteil war jedoch nicht nachweisbar, was im Wesentlichen an der geringen Anzahl an Patienten mit mehreren sehr kleinen Kohorten lag. Für eine statistische Auswertung wäre ein größeres und homogeneres Patientenkollektiv erforderlich.

4.7 Ausblick

Die Erforschung der Glioblastome und ihrer Genese bietet noch sehr viel Potenzial, da zum jetzigen Zeitpunkt nur begrenzte Daten über die Tumorbioogie zur Verfügung stehen und gerade auch die bisherigen Therapieerfolge lediglich im Rahmen mehrerer Monate nicht aber Jahre oder gar einer vollständigen Heilung liegen.

Es gelang der Nachweis einer heterogenen Verteilung für die verschiedenen Aminosäuresensoren zwischen den Tumoren und z.T. auch innerhalb eines Tumors zwischen Tumorrandzone und dem Tumorzentrum. Systematische Mittelwertsdifferenzen zwischen den Lokalisationen über alle 37 untersuchten Glioblastome wurden jedoch für MAP4K3 und VPS34 ausgeschlossen und erreichten bei der untersuchten Fallzahl auch für RagC keine statistische Signifikanz. Wegen der Heterogenität innerhalb eines Tumors ist es für zukünftige Untersuchungen wichtig, *in vivo* genau zu definieren, an welcher Stelle die Proben entnommen werden, um vergleichbare Daten zu erzeugen. Eine enge und zuverlässige Zusammenarbeit zwischen dem Kliniker, der die Proben entnimmt und dem Kollegen, der die Proben im Labor verarbeitet ist dafür unerlässlich.

Eine pharmakologische Hemmung verspricht aufgrund des schlechten Überlebens bei niedriger Expression von MAP4K3 und RagC nur wenig Aussicht auf eine Verlängerung des Überlebens. VPS34 scheint aufgrund der erzielten Ergebnisse als Zielprotein ebenfalls eher wenig geeignet, da kein Effekt unterschiedlicher Expressionslevel auf das Gesamtüberleben gezeigt werden konnte.

Interessant ist vor allen Dingen MAP4K3 als prognostischer Faktor, da hier sowohl für das Tumorzentrum als auch für die Tumorrandzone ein Einfluss der Expression des Proteins auf die Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden konnte. Dieser Zusammenhang ließ sich für Rag C nicht so klar nachweisen, da lediglich die Expression in der Tumorrandzone einen signifikanten Einfluss auf das Überleben zu haben scheint. In prospektiven Studien wäre es auch interessant zu untersuchen, ob im Falle eines Rezidiv-Tumors sich die relative Konzentration von MAP4K3 oder RagC über die Zeit ändert. Im Falle eines Rezidivs könnte die Änderung des Expressionsmusters auf eine zunehmende Aggressivität des Tumors hindeuten und entsprechend auch wieder prognostisch relevant sein.

5. Zusammenfassung

Beim Glioblastom handelt es sich um einen bösartigen Tumor aus hirneigenen Vorläuferzellen. Bislang haben alle Therapiekonzepte beim Menschen nur eine sehr geringe Verlängerung der Überlebenszeit und eingeschränkte Verbesserung des progressionsfreien Überlebens bewirken können.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zu untersuchen, inwiefern sich die Expression der Aminosäuresensoren MAP4K3, RagC und VPS34 in der Tumorrandzone und im Tumorzentrum voneinander unterscheiden. Weiterhin wurde auch die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Konzentration der Aminosäuresensoren jeweils für das Tumorzentrum und die Tumorrandzone untersucht.

Zur Untersuchung wurden Proben von operativ entfernten Glioblastomen verwendet. Diese waren nach der Resektion des Tumors entsprechend ihrer Lokalisation in Tumorrandzone und Tumorzentrum separiert worden.

Die mRNA für MAP4K3 und VPS34 ist im Zentrum und in der Randzone quantitativ nahezu gleichverteilt. Die Mittelwerte waren für beide Regionen jeweils fast identisch (Differenzen $<3,6\%$ bzw. $<2,6\%$). Dagegen liegt die mRNA für RagC in der Tumorrandzone möglicherweise höher konzentriert vor als im Tumorzentrum (Faktor 1,6), wengleich auch diese Differenz beim jetzigen Probenumfang keine Signifikanz erreichte. Da in der Tumorrandzone neben den Tumorzellen auch gesundes Gewebe vorliegt, mag die mRNA-Konzentration in den Tumorzellen der Randzone vergleichsweise unterschätzt worden sein. Dies könnte nur durch künftige Separierung der Zellelemente der Randzone via Mikrodissektion näher untersucht werden.

Bei der Korrelation der Überlebenszeiten mit der Expression der Aminosäuresensoren konnte statistisch signifikant ($p<0,05$) gezeigt werden, dass eine niedrige Expression von MAP4K3 im Zentrum und in der Randzone mit einem schlechteren Überleben einhergehen. Für RagC zeigt sich ebenfalls ein signifikant schlechteres Überleben bei niedriger Expression in der Tumorrandzone ($p<0,05$). Die Unabhängigkeit dieser Einschätzung von potentiell störenden Co-Variablen, insbesondere variabler Behandlungsintensität, müsste jedoch späteren Studien mit größeren und homogeneren Patientenkollektiven vorbehalten bleiben. Die Expression von VPS34 in Tumorzentrum und der Tumorrandzone scheint keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben zu haben.

IV Quellenverzeichnis

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
3. Bailey P, Cushing H. Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1925;11(1):82-4.
4. Brodbelt A, Greenberg D, Winters T, Williams M, Vernon S, Collins VP. Glioblastoma in England: 2007-2011. *Eur J Cancer.* 2015;51(4):533-42.
5. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(6):479-89.
6. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(19):6002-7.
7. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(4):764-72.
8. Almairac F, Frenay M, Paquis P. [Genetic diseases and glioblastomas]. *Neurochirurgie.* 2010;56(6):455-8.
9. Ron E, Modan B, Boice JD, Jr., Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med.* 1988;319(16):1033-9.
10. Karlsson P, Holmberg E, Lundberg LM, Nordborg C, Wallgren A. Intracranial tumors after radium treatment for skin hemangioma during infancy--a cohort and case-control study. *Radiat Res.* 1997;148(2):161-7.
11. Vida S, Richardson L, Cardis E, Krewski D, McBride M, Parent ME, et al. Brain tumours and cigarette smoking: analysis of the INTERPHONE Canada case-control study. *Environ Health.* 2014;13:55.
12. Sorahan T. Magnetic fields and brain tumour risks in UK electricity supply workers. *Occup Med (Lond).* 2014;64(3):157-65.
13. Pietschmann S, von Bueren AO, Kerber MJ, Baumert BG, Kortmann RD, Muller K. An individual patient data meta-analysis on characteristics, treatments and outcomes of glioblastoma/ gliosarcoma patients with metastases outside of the central nervous system. *PLoS One.* 2015;10(4):e0121592.
14. Awan M, Liu S, Sahgal A, Das S, Chao ST, Chang EL, et al. Extra-CNS metastasis from glioblastoma: a rare clinical entity. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;15(5):545-52.
15. Posti JP, Bori M, Kauko T, Sankinen M, Nordberg J, Rahi M, et al. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol Scand.* 2015;131(2):88-93.
16. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Deutsches Arzteblatt international.* 2010;107(45):799-807; quiz 8.
17. Mabray MC, Barajas RF, Jr., Cha S. Modern brain tumor imaging. *Brain Tumor Res Treat.* 2015;3(1):8-23.

18. Keunen O, Taxt T, Gruner R, Lund-Johansen M, Tonn JC, Pavlin T, et al. Multimodal imaging of gliomas in the context of evolving cellular and molecular therapies. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;76:98-115.
19. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24(10):1989-98.
20. Cha S, Lupo JM, Chen MH, Lamborn KR, McDermott MW, Berger MS, et al. Differentiation of glioblastoma multiforme and single brain metastasis by peak height and percentage of signal intensity recovery derived from dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(6):1078-84.
21. Stadnik TW, Chaskis C, Michotte A, Shabana WM, van Rompaey K, Luypaert R, et al. Diffusion-weighted MR imaging of intracerebral masses: comparison with conventional MR imaging and histologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22(5):969-76.
22. Weller M. Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma. *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13210.
23. Kobayashi H, Hirata K, Yamaguchi S, Terasaka S, Shiga T, Houkin K. Usefulness of FMISO-PET for glioma analysis. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(11):773-8.
24. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010;120(6):707-18.
25. Loussouarn D, Le Loupp AG, Frenel JS, Leclair F, Von Deimling A, Aumont M, et al. Comparison of immunohistochemistry, DNA sequencing and allele-specific PCR for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *International journal of oncology*. 2012;40(6):2058-62.
26. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892-9.
27. Reifenberger G, Malzkorn B, Acker T, Bettstetter M, Buslei R, von Deimling A, et al. RESULTS OF THE INTERNATIONAL INTERLABORATORY COMPARISON OF MGMT PROMOTER METHYLATION ANALYSIS INVOLVING TWENTY-THREE ACADEMIC CENTERS IN GERMANY, AUSTRIA AND THE NETHERLANDS. *Neuro-Oncology*. 2014;16(suppl 3):iii49-iii50.
28. Lee Y, Koh J, Kim SI, Won JK, Park CK, Choi SH, et al. The frequency and prognostic effect of TERT promoter mutation in diffuse gliomas. *Acta neuropathologica communications*. 2017;5(1):62.
29. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):931-7.
30. Nguyen HN, Lie A, Li T, Chowdhury R, Liu F, Ozer B, et al. Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro Oncol*. 2017;19(3):394-404.
31. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):765-73.

32. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2010;119(4):487-94.
33. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597-602.
34. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):341-7.
35. Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, et al. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* 2003;63(20):6613-25.
36. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(6):539-43.
37. Tremont-Lukats IW, Ratilal BO, Armstrong T, Gilbert MR. Antiepileptic drugs for preventing seizures in people with brain tumors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(2):CD004424.
38. Shooman D, Belli A, Grundy PL. Image-guided frameless stereotactic biopsy without intraoperative neuropathological examination. *J Neurosurg.* 2010;113(2):170-8.
39. Vidiri A, Carapella CM, Pace A, Mirri A, Fabi A, Carosi M, et al. Early post-operative MRI: correlation with progression-free survival and overall survival time in malignant gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006;25(2):177-82.
40. Sanai N, Berger MS. Recent surgical management of gliomas. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:12-25.
41. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
42. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery.* 2008;62(3):564-76; discussion -76.
43. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsky C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol.* 2011;13(12):1339-48.
44. Petrecca K, Guiot MC, Panet-Raymond V, Souhami L. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2013;111(1):19-23.
45. Pinsker MO, Nabavi A, Mehdorn HM. Neuronavigation and resection of lesions located in eloquent brain areas under local anesthesia and neuropsychological-neurophysiological monitoring. *Minim Invasive Neurosurg.* 2007;50(5):281-4.
46. Wirtz CR, Albert FK, Schwaderer M, Heuer C, Staubert A, Tronnier VM, et al. The benefit of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery. *Neurol Res.* 2000;22(4):354-60.
47. Stepp H, Beck T, Pongratz T, Meinel T, Kreth FW, Tonn J, et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer.* 2007;26(2):157-64.

48. Kondo M, Hirota N, Takaoka T, Kajiwara M. Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell lines of rat. *Cell Biol Toxicol.* 1993;9(1):95-105.
49. Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer.* 2011;104(5):798-807.
50. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):392-401.
51. Roessler K, Becherer A, Donat M, Cejna M, Zachenhofer I. Intraoperative tissue fluorescence using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is more sensitive than contrast MRI or amino acid positron emission tomography ((¹⁸F)-FET PET) in glioblastoma surgery. *Neurol Res.* 2012;34(3):314-7.
52. Eljamel S, Petersen M, Valentine R, Buist R, Goodman C, Moseley H, et al. Comparison of intraoperative fluorescence and MRI image guided neuronavigation in malignant brain tumours, a prospective controlled study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(4):356-61.
53. Feigl GC, Ritz R, Moraes M, Klein J, Ramina K, Gharabaghi A, et al. Resection of malignant brain tumors in eloquent cortical areas: a new multimodal approach combining 5-aminolevulinic acid and intraoperative monitoring. *J Neurosurg.* 2010;113(2):352-7.
54. Fan X, Roberts DW, Ji S, Hartov A, Paulsen KD. Intraoperative fiducial-less patient registration using volumetric 3D ultrasound: a prospective series of 32 neurosurgical cases. *J Neurosurg.* 2015:1-11.
55. Kuhnt D, Ganslandt O, Schlaffer SM, Buchfelder M, Nimsky C. Quantification of glioma removal by intraoperative high-field magnetic resonance imaging: an update. *Neurosurgery.* 2011;69(4):852-62; discussion 62-3.
56. Vogelbaum MA. Does extent of resection of a glioblastoma matter? *Clin Neurosurg.* 2012;59:79-81.
57. McGirt MJ, Than KD, Weingart JD, Chaichana KL, Attenello FJ, Olivi A, et al. Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2009;110(3):583-8.
58. Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148(3):269-75; discussion 75.
59. Chowdhary SA, Ryken T, Newton HB. Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis. *J Neurooncol.* 2015;122(2):367-82.
60. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):707-15.
61. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-26.
62. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 2002;64(3):259-73.

63. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1583-8.
64. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1527-35.
65. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1375-82.
66. Combs SE, Gutwein S, Schulz-Ertner D, van Kampen M, Thilmann C, Edler L, et al. Temozolomide combined with irradiation as postoperative treatment of primary glioblastoma multiforme. Phase I/II study. *Strahlenther Onkol.* 2005;181(6):372-7.
67. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol.* 2012;107(2):359-64.
68. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e315-e29.
69. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709-22.
70. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004;18(16):1926-45.
71. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-84.
72. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122-8.
73. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell.* 2002;10(3):457-68.
74. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell.* 2003;11(4):895-904.
75. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 2002;110(2):163-75.
76. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.
77. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):307-18.
78. Holz MK, Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26089-93.
79. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000;103(2):253-62.
80. Lee T, Pelletier J. Eukaryotic initiation factor 4F: a vulnerability of tumor cells. *Future Med Chem.* 2012;4(1):19-31.
81. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 2004;14(14):1296-302.

82. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.
83. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124-31.
84. Pachow D, Wick W, Gutmann DH, Mawrin C. The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms. *Neuro Oncol*. 2015;17(2):189-99.
85. Hsu CP, Chuang HC, Lee MC, Tsou HH, Lee LW, Li JP, et al. GLK/MAP4K3 overexpression associates with recurrence risk for non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(27):41748-57.
86. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nature communications*. 2015;6:8357.
87. Li S, Cho YS, Yue T, Ip YT, Jiang J. Overlapping functions of the MAP4K family kinases Hppy and Msn in Hippo signaling. *Cell discovery*. 2015;1:15038.
88. Lam D, Shah S, de Castro IP, Loh SH, Martins LM. *Drosophila* happyhour modulates JNK-dependent apoptosis. *Cell death & disease*. 2010;1:e66.
89. Schriever SC, Deutsch MJ, Adamski J, Roscher AA, Ensenauer R. Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism. *J Nutr Biochem*. 2013;24(5):824-31.
90. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J*. 2007;403(1):13-20.
91. Duan Y, Li F, Tan K, Liu H, Li Y, Liu Y, et al. Key mediators of intracellular amino acids signaling to mTORC1 activation. *Amino Acids*. 2015;47(5):857-67.
92. Resnik-Docampo M, de Celis JF. MAP4K3 is a component of the TORC1 signalling complex that modulates cell growth and viability in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2011;6(1):e14528.
93. Efeyan A, Zoncu R, Sabatini DM. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol Med*. 2012;18(9):524-33.
94. Chantranupong L, Wolfson RL, Orozco JM, Saxton RA, Scaria SM, Bar-Peled L, et al. The Sestrins interact with GATOR2 to negatively regulate the amino-acid-sensing pathway upstream of mTORC1. *Cell Rep*. 2014;9(1):1-8.
95. Oshiro N, Rapley J, Avruch J. Amino acids activate mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 without changing Rag GTPase guanyl nucleotide charging. *J Biol Chem*. 2014;289(5):2658-74.
96. Kim J, Kim E. Rag GTPase in amino acid signaling. *Amino Acids*. 2016.
97. Okosun J, Wolfson RL, Wang J, Araf S, Wilkins L, Castellano BM, et al. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. *Nature genetics*. 2016;48(2):183-8.
98. Ktistakis NT, Manifava M, Schoenfelder P, Rotondo S. How phosphoinositide 3-phosphate controls growth downstream of amino acids and autophagy downstream of amino acid withdrawal. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(1):37-43.
99. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*. 2009;186(6):773-82.
100. Yu X, Long YC, Shen HM. Differential Regulatory Functions of Three Classes of Phosphatidylinositol and Phosphoinositide 3-Kinases in Autophagy. *Autophagy*. 2015;0.
101. Zhi X, Feng W, Rong Y, Liu R. Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017.
102. Pachow D, Andrae N, Kliese N, Angenstein F, Stork O, Wilisch-Neumann A, et al. mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(5):1180-9.
103. Harter PN, Jennewein L, Baumgarten P, Ilna E, Burger MC, Thiebold AL, et al. Immunohistochemical Assessment of Phosphorylated mTORC1-Pathway Proteins in Human Brain Tumors. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127123.
 104. Holand K, Boller D, Hagel C, Dolski S, Treszl A, Pardo OE, et al. Targeting class IA PI3K isoforms selectively impairs cell growth, survival, and migration in glioblastoma. *PLoS One*. 2014;9(4):e94132.
 105. McGirt MJ, Mukherjee D, Chaichana KL, Than KD, Weingart JD, Quinones-Hinojosa A. Association of surgically acquired motor and language deficits on overall survival after resection of glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*. 2009;65(3):463-9; discussion 9-70.
 106. Rapp M, Goeppert M, Felsberg J, Steiger HJ, Sabel M. The impact of sequential vs. combined radiochemotherapy with temozolomide, resection and MGMT promoter hypermethylation on survival of patients with primary glioblastoma--a single centre retrospective study. *British journal of neurosurgery*. 2013;27(4):430-5.
 107. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology*. 2009;32(1):21-9.
 108. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
 109. Yin AA, Zhang LH, Cheng JX, Dong Y, Liu BL, Han N, et al. The predictive but not prognostic value of MGMT promoter methylation status in elderly glioblastoma patients: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(1):e85102.
 110. Yan L, Mieulet V, Burgess D, Findlay GM, Sully K, Procter J, et al. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. *Molecular cell*. 2010;37(5):633-42.
 111. Suzuki T, Inoki K. Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2011;43(9):671-9.
 112. Kim J, Guan KL. Amino acid signaling in TOR activation. *Annual review of biochemistry*. 2011;80:1001-32.
 113. Carvalho D, Mackay A, Bjerke L, Grundy RG, Lopes C, Reis RM, et al. The prognostic role of intragenic copy number breakpoints and identification of novel fusion genes in paediatric high grade glioma. *Acta neuropathologica communications*. 2014;2:23.
 114. Hodne K, Weltzien FA. Single-Cell Isolation and Gene Analysis: Pitfalls and Possibilities. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):26832-49.
 115. Luchman HA, Stechishin OD, Nguyen SA, Lun XQ, Cairncross JG, Weiss S. Dual mTORC1/2 blockade inhibits glioblastoma brain tumor initiating cells in vitro and in vivo and synergizes with temozolomide to increase orthotopic xenograft survival. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5756-67.
 116. Han YP, Enomoto A, Shiraki Y, Wang SQ, Wang X, Toyokuni S, et al. Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. *Neuro Oncol*. 2017;19(5):636-47.
 117. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 2010;141(2):290-303.
 118. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-

- kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(40):14238-43.
119. Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, et al. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. Cell metabolism. 2008;7(5):456-65.
120. Fan QW, Weiss WA. Inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling in glioblastoma by mTORC1/2 inhibitors. Methods in molecular biology. 2012;821:349-59.
121. Neuwelt EA, Barnett PA, Bigner DD, Frenkel EP. Effects of adrenal cortical steroids and osmotic blood-brain barrier opening on methotrexate delivery to gliomas in the rodent: the factor of the blood-brain barrier. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(14):4420-3.
122. Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, Weingart JD, Bennett R, Brem H, et al. Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. Clinical article. J Neurosurg. 2011;114(3):587-94.

V Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit Professor Dr. med. habil. Christian Mawrin sowie Herrn ChA Dr. med. Werner EK Braunsdorf für die Vergabe des Promotionsthemas. Ohne die durch sie gegebene Möglichkeit der Gewinnung der Proben sowie deren Verarbeitung wäre diese Arbeit unmöglich durchführbar gewesen. Zudem haben mich beide auch während der Arbeit am Thema durch ihr fachliches Wissen und persönliches Engagement stets voran gebracht. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. habil. Elmar Kirches danken. Durch die offenen und fachlich tiefgründigen Diskussionen konnte er mein Verständnis für die Ergebnisse und deren Interpretation stets erweitern.

Weiterhin möchte ich der Manfred-Lautenschläger-Stiftung (Heidelberg) danken, mit deren Unterstützung dieses Projekt realisiert werden konnte.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuropathologie. Hier sollen stellvertretend Frau Dr. rer. nat. Doreen Pachow, Frau Ines Schellhase, Frau Dr. rer. nat. Annette Wilisch-Neumann und Frau Sandra Hartmann genannt sein. Sie alle haben mit Ihrer unerschütterlichen Geduld und Strapazierfähigkeit dazu beigetragen, dass sich die Welt der Molekularbiologie mir ein kleines Stück öffnen musste.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Kropf vom Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bedanken. Nur mit seiner Hilfe war es überhaupt erst möglich die gewonnen Ergebnisse statistisch aufzuarbeiten, eine Arbeit die ich ohne ihn sicher nicht hätte ausführen können.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Prof. Dr. med. habil. Jens Bahnsen, Dr. med. Hendrik Kröning und den zahlreichen Hausärzten, welche bei der Evaluierung der biometrischen Daten der Patienten von welchen die untersuchten Proben stammen geholfen haben.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir zu jeder Zeit das Gefühl gab, dass die Aufgabe lösbar ist und mir die nötige Ruhe vermittelte um das Ziel, die Fertigstellung dieser Arbeit, zu erreichen.

Am Ende aber gewiss nicht an letzter Stelle möchte ich meiner Freundin Viktoria danken die mich immer wieder motiviert hat mich an den Schreibtisch zu setzen und

kontinuierlich am Fortgang der Dissertation zu arbeiten. Du hast mich inspiriert, angestachelt und Verständnis gezeigt wann immer ich es brauchte. Vielen Dank!

VI Ehrenerklärung

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

Tumorregionen-abhängige Expression der Aminosäure-Sensoren MAP4K3, RagC und VPS34 in Glioblastomen

im Institut für Neuropathologie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. habil. C. Mawrin, Prof. Dr. rer. nat. E. Kirches und Frau Dr. rer. nat. D. Pachow

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.

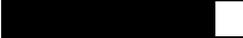
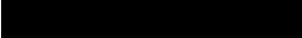
Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Hannover, den 21.02.2018

Unterschrift

VII Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Angaben

Name: Michael Lalk
Geburtsdatum: 14.02.1984
Geburtsort: Forst (Lausitz)
Anschrift: 
Telefonnummer: 
Email: 
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1990 - 06/1996 Grund- und Gesamtschule Grano
09/1996 - 06/2003 Pestalozzi-Gymnasium Guben
06/2003 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,8)

Zivildienst

07/2003 - 05/2004 Zivildienstleistender im Operationsbereich des Naemi-Wilke-Stifts Guben

Hochschulausbildung

10/2004 - 10/2010 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3,0)
10/2006 - 02/2007 Wahlpflichtfach Neurochirurgie (Note: 1)
08/2009 - 07/2010 Praktisches Jahr:
Unfallchirurgie und Gefäßchirurgie im Kreisklinikum Aschersleben-Staßfurt
Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie im Klinikum Magdeburg gGmbH
Klinik für Kardiologie am Universitätsklinikum Magdeburg GbR
Klinik für Innere Medizin im Concord Hospital, Lehrkrankenhaus der University of Sydney
10/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0; Gesamtnote: 2,33)
11/2010 Approbation als Arzt

Famulaturen

02/2007 - 03/2007 Orthopädische Abteilung des Naemi-Wilke-Stifts Guben
02/2008 - 03/2008 Allgemeinmedizinische Praxis Hüfner/Schemainda Guben

08/2008 - 09/2008 Orthopädische Abteilung des Naemi-Wilke-Stifts Guben
09/2008 - 10/2008 Viszeralchirurgische Station des Naemi-Wilke-Stifts Guben
Beruflicher Werdegang

01.01.2011 – 30.09.2016 Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Neurochirurgie und
Wirbelsäulenchirurgie des Klinikums Magdeburg gGmbH;
Chefarzt Dr. med. Werner EK Braunsdorf
15.10.2016 – heute Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Neurochirurgie der
Medizinischen Hochschule Hannover
Direktor Prof. Dr. med. Joachim K. Krauss

Weiterbildungen und Zusatzqualifikationen

27.09. – 28.09.2013 Teilnahme am Workshop Full-endoscopic Operations of the
Lumbar, Thoracic and Cervical Spine, St. Anna Hospital,
Herne (Germany)

Vortrag

11.09.2015 8. Düsseldorfer Gliadel® Anwender Symposium in der
neurochirurgischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Thema: „Aminosäuresensoren und Wachstumsverhalten von
Glioblastomen“

08.10.2015 19. Chirurgische Forschungstage am Universitätsklinikum
Würzburg
Posterpräsentation zum Thema: „Die Rolle von MAP4K3, Rag
C und VPS 34 als Aminosäuredektoren beim Wachstum der
Glioblastome“

Hannover, den 21.02.2018

Michael Lalk