

Aus der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Peripherer Nachweis einer CMV-Infektion als prognostischer Faktor bei Patienten  
mit Glioblastom

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Elnaz Tabatabaei  
aus Ahvaz, Iran

Mainz, 2025

Diese Dissertation ist lizenziert unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0).

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 04. September 2025

## Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
TABELLENVERZEICHNIS .....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
ABSTRACT.....	9
1 EINLEITUNG .....	10
1.1 GLIOBLASTOME.....	10
1.1.1 Epidemiologie und aktuelle Therapiestandards .....	10
1.1.2 Einteilung anhand der WHO-Klassifikation 2021 .....	10
1.2 VIRALE INFEKTE UND KARZINOME.....	11
1.3 CYTOMEGALOVIRUS UND GLIOBLASTOM .....	11
1.4 ZIELSETZUNG DER STUDIE .....	12
2 LITERATURRECHERCHE .....	12
2.1 PATHOPHYSIOLOGIE UND THERAPIERESISTENZ DES GLIOBLASTOMS.....	12
2.1.1 Driver-Mutationen.....	12
2.1.2 Stammzellähnliche Gliomzellen .....	13
2.1.3 Die Blut-Hirn- und Blut-Hirn-Tumor-Schranke.....	14
2.1.4 Mikromilieu des Glioblastoms.....	14
2.1.5 MGMT-Promotor-Methylierungsstatus .....	15
2.2 MODULIEREN DER GLIOBLASTOM-PATHOGENITÄT DURCH EINE CMV-INFEKTION .....	16
2.2.1 T-Zell-Dysfunktion in Glioblastomen .....	17
2.3 HERPESVIREN UND KARZINOME.....	18
2.4 UNEINHEITLICHE DATEN BEZÜGLICH DER CMV-PRÄSENZ IN GLIOBLASTOMEN.....	19
2.5 DIE ROLLE DER MOLEKULAREN MIMIKRY IN DER KREBSIMMUNOTHERAPIE: ERKENNTNISSE AUS PRÄKLINISCHEN UND KLINISCHEN STUDIEN.....	20
2.6 THERAPIE DES GLIOBLASTOMS.....	21
2.6.1 Operation.....	22
2.6.2 Adjuvante Therapie .....	22
2.6.3 Alleinige Strahlentherapie .....	25
2.6.4 Adjuvante Therapie bei Tumorrekurrenz.....	26
2.7 CMV-BEZOGENE THERAPIEANSÄTZE .....	27
2.7.1 CMV-Replikationsinhibitoren (Valganciclovir) .....	28
2.7.2 Immuntherapie .....	29
2.7.3 Dendritische Zellen (DC)-basierte Impfstoffe .....	31

3	MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1	STUDIENDESIGN.....	33
3.2	ETHIKSTATEMENT .....	34
3.3	PATIENTENPOPULATION .....	34
3.4	ANTI-CMV-IGG-BESTIMMUNG .....	35
3.5	STATISTISCHE VERFAHREN .....	36
4	DATENANALYSE UND ERGEBNISSE .....	37
4.1	DESKRIPTIVE STATISTIK .....	37
4.2	SURVIVAL-ANALYSEN .....	39
4.2.1	PFS .....	40
4.2.2	OS .....	41
4.3	RCT- UND MGMT-PROMOTOR-METHYLIERUNGSSTATUS.....	42
4.3.1	Survival-Analyse für MGMT-unmethylierte Patienten .....	43
4.4	MULTIVARIABLE COX-REGRESSION-ANALYSE .....	44
4.4.1	Cox-Analyse für das PFS.....	44
4.4.2	Cox-Analyse für das OS.....	46
4.5	TUMORPROGRESS UND SECOND-LINE-THERAPIE.....	48
5	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	49
5.1	CMV-PRÄVALENZ UND DER EINFLUSS AUF DAS PFS UND OS.....	49
5.2	KRITISCHE BETRACHTUNG DES STUDIENDESIGNS .....	51
5.2.1	Bestimmung des Anti-CMV-Serostatus in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung.....	51
5.2.2	Heterogene Patientengruppen .....	52
5.2.3	Fehlen eines zweiten Arms mit antiviraler Medikation zum Vergleich bei seropositiven Patienten.....	52
5.2.4	Keine CMV-Bestimmung in den Tumorgeweben .....	53
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG DER DISKUSSION.....	53
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	54
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	56

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: WEGE DER CMV-BEZOGENEN BEHANDLUNG VON GLIOBLASTOMEN (YANG ET AL., J CLIN MED).....	27
ABBILDUNG 2: PATIENTENSCHREIBUNG .....	35
ABBILDUNG 3: KAPLAN-MEIER-KURVEN FÜR PFS ANHAND DES ANTI-CMV-IGG-SEROSTATUS UND DER -SERUMKONZENTRATION.....	41
ABBILDUNG 4: KAPLAN-MEIER-KURVE FÜR DAS OS IN BEZUG AUF ANTI-CMV-IGG-SEROSTATUS UND -SERUMKONZENTRATION .....	42
ABBILDUNG 5: KAPLAN-MEIER-KURVEN FÜR OS BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ABGESCHLOSSENE RCT ANHAND DES MGMT-METHYLIERUNGSSTATUS .....	43
ABBILDUNG 6: PFS UND OS UNTER MGMT-PROMOTOR-UNMETHYLIERTEN PATIENTEN IN BEZUG AUF DEN ANTI-CMV-IGG-SEROSTATUS UND DIE -SERUMKONZENTRATION .....	44
ABBILDUNG 7: PROGRESS VOR BEENDIGUNG DER ADJUVANTEN THERAPIE UND SECOND-LINE-CHEMOTHERAPIE ANHAND DES SEROSTATUS.....	49

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ECOG-LEISTUNG-STATUS.....	21
TABELLE 2: PATIENTEN-CHARAKTERISTIKA (N = 83).....	38
TABELLE 3 ANTI-CMV-IGG-SERUMKONZENTRATION: SUBGRUPPENREFERENZEN .....	39
TABELLE 4: MULTIVARIABLE COX-REGRESSION-ANALYSE FÜR PFS IN BEZUG AUF IGG-SEROSTATUS (N = 72).....	45
TABELLE 5: MULTIVARIABLE COX-REGRESSION-ANALYSE FÜR PFS IN BEZUG AUF IGG-SERUMKONZENTRATION (N = 71) .....	46
TABELLE 6: MULTIVARIABLE COX-REGRESSION-ANALYSE FÜR DAS OS MIT DEM ANTI-CMV-SEROSTATUS.....	47
TABELLE 7: MULTIVARIABLE COX-REGRESSION-ANALYSE FÜR DAS OS MIT DER ANTI-CMV-SERUMKONZENTRATION .....	48

## Abkürzungsverzeichnis

### 5

5-ALA 5-aminolevulinic acid

### 9

95 % CI 95% Konfidenzintervall

95 % UI 95% Unsicherheitsintervall

### A

AK Antikörper

APC antigenpräsentierende Zellen

ATTAC Adoptive T-Cell Therapy Against Cancer

### B

BHS Blut-Hirn-Schranke

BHTS Blut-Hirn-Tumor-Schranke

### C

CAR-T-Zelle Chimäre Antigenrezeptor-T-Zelle

CCNU Lomustin

CML chronisch myeloische Leukämie

cMRT zerebrale Magnetresonanztomographie

CMV Cytomegalievirus

CTL zytotoxische T-Lymphozyten

### D

DC Dendritische Zellen

### E

EBV Epstein-Barr-Virus

ECM Extrazelluläre Matrix

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

ED Erstdiagnose

EGFR epidermal growth factor receptor, epidermal Wachstumsfaktor-Rezeptor

EGFRvIII Epidermal Growth Factor Receptor Variant III

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EORTC European-Organisation-for-Research-and-Treatment-of-Cancer



PpIX	Protoporphyrin IX
PTLD	Posttransplantationslymphomen
<b>R</b>	
RCT	Radiochemotherapie
<b>T</b>	
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
Td	Tetanus/Diphtherie
T-EM	CD8+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TLR2	Toll Like Rezeptor 2
TMB	Tetramethylbenzidine
TMZ	Temozolomid
T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
TTFields	Tumor-treating fields
<b>U</b>	
UCT	universitäres Zentrum für Tumorerkrankungen
<b>V</b>	
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIGAS	Valcyte Treatment of Glioblastom Patients in Sweden
<b>W</b>	
WHO	World Health Organisation
<b>Z</b>	
ZNS	zentrales Nervensystem

## Abstract

Glioblastome sind die häufigste und aggressivste Form primärer Hirntumore mit einer steigenden Inzidenz von ca. 3,2 pro 100.000 Menschen jährlich. Trotz intensiver Forschung bleiben die Therapiemöglichkeiten begrenzt und die Prognose fällt mit einer medianen Gesamtüberlebenszeit von 16 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % schlecht aus. Seit 2005 besteht die Standardtherapie aus totaler Tumoresektion und Radiotherapie mit adjuvanter und konkomitanter Chemotherapie nach dem Stupp-Protokoll. Eine mögliche Verbindung zum Cytomegalievirus (CMV) wird derzeit untersucht. Berichten zufolge fördert CMV durch onkomodulatorische Prozesse wie Angiogenese und mesenchymale Transformation das schnellere Wachstum von Glioblastomen. Darüber hinaus haben Studien mit Anti-CMV-Therapieansätzen vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (OS) gezeigt, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Immunität gegen CMV und der Prognose von Patienten mit Glioblastom hindeutet.

Der Einfluss einer systemischen CMV-Infektion auf die Prognose der Erkrankung wurde noch nicht ausreichend erforscht. Diese Studie untersucht, ob der periphere Nachweis einer CMV-Infektion mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) und dem OS bei Patienten mit Glioblastom in Zusammenhang steht. Insgesamt wurden 83 Patienten auf ihres Anti-CMV-Immunglobulin-G (IgG)-Serostatus, ihre IgG-Serumkonzentration sowie ihres Anti-CMV-Immunglobuline-M (IgM)-Serostatus im peripheren Blut untersucht und mindestens ein Jahr lang nachbeobachtet. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, den peripheren CMV-Infektionsnachweis als möglichen prognostischen Marker für Patienten mit Glioblastom zu evaluieren.

# 1 Einleitung

## 1.1 Glioblastome

### 1.1.1 Epidemiologie und aktuelle Therapiestandards

Glioblastome sind die häufigste und aggressivste Form aller hirneigenen Tumoren. In den Vereinigten Staaten beträgt die durchschnittliche jährliche altersadjustierte Inzidenz von Glioblastomen 3,21 pro 100.000 Einwohner, basierend auf Registerdaten von 2011 bis 2015 (1). Die Inzidenz ist in den letzten Dekaden um etwa 37 % gestiegen. Im Jahr 1992 wurden in Kanada 1.455 Menschen mit einem primären malignen Hirntumor neu diagnostiziert. Diese Zahl stieg bis 2017 auf 2.000 Fälle an (2). Darunter ist das Glioblastom der häufigste bösartige primäre Hirntumor und macht einen Anteil von 45,2 % aller bösartigen primären Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) bzw. 54,1 % aller Gliome aus (3). Trotz intensiver Forschung über die Pathophysiologie des Glioblastoms bleiben die Therapiemöglichkeiten eingeschränkt und die Prognose bleibt schlecht. Die Standardtherapie ist seit 19 Jahren unverändert und besteht aus totaler Tumoresektion sowie Radiotherapie mit adjuvanter und konkomitanter Chemotherapie nach dem Stupp-Protokoll (4). Trotz dieses aggressiven Vorgehens liegt die mediane Gesamtüberlebenszeit bei nur 16 Monaten, und die 5-Jahres-Überlebensrate bleibt unter 10 % (5, 6). Das Therapieansprechen dieser Tumore wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst, u. a. von den molekulargenetischen Eigenschaften wie dem Methylierungsstatus des O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-(MGMT)-Gens. In dieser Hinsicht sind Patienten ohne eine MGMT-Hypermethylierung benachteiligt, da sie auf das Standardchemotherapeutikum, Temozolomid (TMZ), ein alkylierendes Agens, kaum ansprechen. Etwa 50 % der Patienten gehören zu dieser Gruppe. Deshalb ist eine Standardtherapie nicht für alle Patienten geeignet. Momentan wird weltweit nach weiteren Angriffspunkten gesucht, um den Betroffenen ein individuelles Therapieschema anbieten zu können.

### 1.1.2 Einteilung anhand der WHO-Klassifikation 2021

Das Glioblastom stellt die aggressivste und häufigste Form der Hirneigentumore vom astrozytären Typ dar. Laut der neuen bzw. fünften WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore (2021) müssen folgende Kriterien zum Diagnostizieren eines Glioblastoms vorhanden sein: Isozitatdehydrogenase 1 und 2 (IDH) Wildtyp, Veränderungen des Telomerase-Reverse-Transcriptase-(TERT)-Promotors, des epidermal-growth-factor-receptor-(EGFR)-Gens und Chromosomen 7/10 (Änderungen der Kopienzahl in Form einer kombinierten Zunahme von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10). Histologisch sind diese diffus infiltrativen Neoplasmen durch erhöhte

mitotische Aktivität und mikrovaskuläre Proliferation oder Nekrose definiert (7). In der neuen Erscheinung der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore wird der Grad eines Tumors innerhalb eines Subtyps bestimmt. Zum Beispiel kann ein anaplastisches Astrozytom einen Grad von 2, 3 oder 4 aufweisen. Glioblastome hingegen entsprechen immer dem Grad 4 (7).

## 1.2 Virale Infekte und Karzinome

10–15 % aller Krebsarten weltweit sind durch virale Infekte verursacht (8, 9). Herpesviren stellen eine Gruppe der onkogenen Viren dar (10) und werden beim gesunden Menschen nach der Infektion durch die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) stummgeschaltet, sodass sie einen asymptomatischen Verlauf aufweisen, während sie in den Zellen persistieren (11). Die durch Viren verursachte chronische Infektion und Überlastung der CTL kann zu einer Umgebung beitragen, die das Risiko für somatische Mutationen, beispielsweise Mutationen im p53-Gen, erhöht (10). Diese somatischen Mutationen können wiederum zur Entstehung eines Karzinoms beitragen.

Bereits in den 70er-Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen einer CMV-Infektion und der Malignität eines Tumors vermutet, erstmals beim Prostata-CA (12). Im Jahr 2002 wurden zum ersten Mal CMV-Proteine in den histopathologischen Präparaten von glialen Tumoren entdeckt (13) und in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die CMV-Genprodukte die Pathogenität des Glioblastoms fördern (14-16). Die Entdeckung dieser Zusammenhänge konnte den Weg zur Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen und dadurch die Prognose dieser Krebsarten verbessern.

## 1.3 Cytomegalovirus und Glioblastom

In Europa wird die CMV-Seroprävalenz in der Allgemeinbevölkerung auf 66 % (95 % UI: 56–74) geschätzt (17). Wie bei allen Herpesviren besteht eine Latenzzeit zwischen Infektion und Krankheitsausbruch und die Viren persistieren lebenslang im Körper. Die CMV-Infektion verläuft meist asymptomatisch, bei immunsupprimierten Menschen (v. a. bei Neugeborenen und AIDS-Patienten) kommt es jedoch häufig zu schweren klinisch symptomatischen Verläufen. Die Glioblastomzellen weisen eine hohe Expression von CTLA-4- und PD-1-Antigenen auf, die zur Herunterregulierung der CTL und der Immunantwort führen (18). Dies könnte ebenso zu einer manifesten CMV-Infektion, vermehrter Translation viraler Proteine und den damit verbundenen onkomodulatorischen Effekten des CMV beitragen.

Beim Glioblastom führt die CMV-Infektion zu onkomodulatorischen Vorgängen wie gesteigerter Angiogenese und mesenchymaler Transformation, durch die das Wachstum des Glioblastoms beschleunigt werden können (19, 20). CMV-Proteine wurden außerdem in Gliom-stammzellähnlichen Zellen (GSC) vermehrt detektiert (15) und fördern deren Migration.

Die klinische Relevanz der GSC liegt in ihrer Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie und ihrem klonogenen und tumorerzeugenden Potenzial (21, 22). Darüber hinaus haben Studien mit Anti-CMV-Therapieansätzen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich des OS bei Patienten mit Glioblastom im Vergleich zu Kontrollgruppen, die Standardtherapien erhielten, gezeigt (23-30).

Allerdings ist die systemische CMV-Infektion und deren Einfluss auf die Prognose der Erkrankung ein noch nicht ausreichend erforschtes Gebiet. Lediglich in einer Studie wurde von einer schlechteren Prognose und verkürztem OS bei Anti-CMV-IgG-seropositiven Patienten berichtet (19).

## 1.4 Zielsetzung der Studie

Die systemische CMV-Infektion und deren Einfluss auf die Prognose der Erkrankung stellen den Fokus der vorliegenden Beobachtungsstudie dar. Die Hauptfragestellung lautet, ob der periphere Nachweis einer CMV-Infektion in Zusammenhang mit dem PFS und dem OS steht. In diesem Rahmen wurden 83 Patienten mit Glioblastom auf Anti-CMV-IgG und -IgM im peripheren Blut untersucht und für mindestens ein Jahr weiterbeobachtet. Weiterhin wurden die IgG-positiven Patienten anhand deren IgG-Serumkonzentration in weitere Kleingruppen unterteilt, um den Einfluss der IgG-Serumkonzentration auf das Outcome beurteilen zu können. Für den primären Endpunkt wurde das PFS festgelegt und für den sekundären Endpunkt das OS.

Die Anti-CMV-IgG-Serumkonzentration der Patienten mit Glioblastom könnte einen prognostischen Faktor darstellen und soll deshalb näher untersucht werden. Diese Studie soll dazu beitragen, die Datenlage bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem peripheren CMV-Infektionsnachweis und der Prognose von Patienten mit Glioblastom zu erweitern. Aus den gewonnenen Erkenntnissen könnte ein potenzieller Therapieansatzpunkt für künftige klinische Studien abgeleitet werden.

## 2 Literaturrecherche

### 2.1 Pathophysiologie und Therapieresistenz des Glioblastoms

#### 2.1.1 Driver-Mutationen

Wie das Glioblastom entsteht bzw. was die Risikofaktoren für die Entstehung solcher Tumore sind, ist noch nicht bekannt. Die bisherigen Studien über die Pathomechanismen des Glioblastoms haben jedoch gezeigt, dass genetische und epigenetische Faktoren zur Therapieresistenz des Glioblastoms beitragen, sodass trotz des üblichen aggressiven Vorgehens das mediane OS unter bestmöglicher Radiochemotherapie (RCT) bei lediglich 16

Monaten bleibt (5). Die Glioblastom-Driver-Mutationen sind in 45 Genen nachgewiesen worden (31, 32). Besonders wichtig sind Mutationen in TP53-, ATRX-, TERT-, NF1-, PTEN- und EGFR-Genen. Diese führen zu einer erhöhten Vaskularisierung des Tumors (33), Suppression der Immunzellfunktion (34), Unterdrückung der Mikrogliazellen und Makrophagen im Gehirn (33) und Infiltration gesunder Astrozytome (35). Das Problem dieser Driver-Mutationen im Glioblastom besteht darin, dass sie i) nicht in jedem Tumor gleichermaßen präsent sind und ii) ihre hohe Variabilität dem Tumor ermöglicht, alternative Überlebenswege zu entwickeln. Deshalb war die Entdeckung des genomischen Mappings beim Glioblastom therapeutisch nicht revolutionär, wie es beispielsweise bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) der Fall war.

### 2.1.2 Stammzellähnliche Gliomzellen

Glioblastomzellen weisen unterschiedliche Typen auf. Ein relevanter Zelltyp stellen die stammzellähnlichen Gliomzellen (Glioma Stem-like Cells, GSC) dar, die molekular durch ihre CD133-Positivität erkennbar sind (36, 37). In einer Studie von Soroceanu et al. wurde gezeigt, dass CMV-Immediate-Early-(IE)-Proteine die stammzellähnlichen Eigenschaften von Glioblastomzellen fördern (15). Sie haben beobachtet, dass CMV-IEs bevorzugt in GSC exprimiert werden, wo sie mit anderen Glioblastom-Stammzellmarkern wie CD133, Nestin und Sox2 „kolokalisieren“. Dies war im Vergleich mit CMV-negativen GSCs mit einer stärkeren Selbstregenerierung und Proliferation der Zellen verbunden, die mittels einer RNAi-Behandlung teilweise rückgängig gemacht werden konnte (15).

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass CMV einen Tropismus für Makrophagen/Mikroglia und CD133+ GSC innerhalb von Glioblastomen aufweist (38). Die GSC produzieren CMV-induziertes IL-10, das menschliche Monozyten – die Vorläuferzellen der Makrophagen/Mikroglia des ZNS (TAM) – dazu veranlasst, einen M2-immunsuppressiven Phänotyp anzunehmen. Diese Aktivierungsform von Makrophagen spielt eine Rolle bei der Unterdrückung von Immunantworten sowie der Förderung von Gewebereparatur und Tumorwachstum.

CMV induziert die Expression von IL-10, welches die Expression des viralen IE1 in Monozyten fördert, einem Modulator der viralen Replikation und Transkription. Durch CMV infizierte Monozyten produzierten angiogenes VEGF und immunsuppressives TGF- $\beta$ , zeigten eine vermehrte intrazelluläre Expression von p-STAT3 und förderten die Migration von GSC (38). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CMV als Treiber der Gliomagenese wirkt, indem es tumorsupportive Eigenschaften in Monozyten induziert.

### 2.1.3 Die Blut-Hirn- und Blut-Hirn-Tumor-Schranke

Ein primäres Hindernis bei der medikamentösen Therapie aller Hirneigentumoren stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) dar. Die BHS ist eine dichte Barriere, die aus Perizyten, Astrozytenfortsätzen sowie Tight Junctions und Adhärenz-Kontakten besteht und v. a. Moleküle  $> 500$  Da bzw.  $> 400$  nm sowie hydrophile Moleküle nicht ins Hirngewebe einwandern lässt (39). Darunter fallen auch die klassischen Chemotherapeutika wie Cisplatin und die monoklonalen Antikörper, außer Bevacizumab (40).

Es ist bekannt, dass sich die BHS bei höhergradigen Hirntumoren wie dem Glioblastom durch die Tumorfiltration verändert und an diesen Stellen keine dichte Barriere mehr zwischen Hirngewebe und Blut bildet. Durch diese veränderten Stellen können zirkulierende Zellen und Moleküle aus dem Blut ins Hirngewebe gelangen. Diese durchlässige Barriere wird als Blut-Hirn-Tumor-Schranke (BHTS) bezeichnet (41). Die BHTS ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Anzahl an Perizyten, eine verminderte Dichte von Tight Junctions und Adhärenz-Kontakten, den Verlust von Astrozytenfortsätzen sowie eine erhöhte Durchlässigkeit für zirkulierende Immunzellen (42). Aufgrund dieser erhöhten Durchlässigkeit ist eine orale oder intravenöse Chemotherapie bei Patienten mit Glioblastom anwendbar. Allerdings bleiben durch die noch unveränderten Bereiche der BHS einige Regionen des Gehirns für Chemotherapeutika weiterhin unzugänglich, sodass zytostatische Medikamente wie TMZ das Tumorgewebe nur partiell erreichen können (43). Aus diesem Grund sind im Vergleich zu anderen malignen Tumoren des menschlichen Körpers nur wenige wirksame Medikamente speziell für Hirntumoren wie Glioblastome entwickelt worden.

### 2.1.4 Mikromilieu des Glioblastoms

Im gesunden ZNS stellen die Mikrogliazellen die Hauptimmunzellen des Gehirns dar, die in der frühen embryonalen Phase aus dem Dottersack entstehen und sich selbst im ZNS regenerieren können (44, 45). Diese Zellen sind die intrinsischen Makrophagen des ZNS. Durch die durchlässigen Stellen der BHTS können auch Immunzellen in das Hirngewebe einwandern (46). Durch die Durchlässigkeit der BHTS können Monozyten über das zirkulierende Blut ins ZNS einwandern und sich dort in Makrophagen umwandeln. Diese beiden Zellpopulationen, Mikroglia und Monozyten/Makrophagen aus der Peripherie, bilden die sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM). Bis zu 50 % der Tumormasse bestehen aus TAM (47). Es wurde gezeigt, dass eine CMV-Infektion von TAM deren Polarisierung in den M2-Phänotyp fördert, welcher antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und das Tumorstadium unterstützt. Der M2-Phänotyp ist durch die Sekretion von IL-10 sowie eine verstärkte STAT3-Signalisierung gekennzeichnet, was zu einem schnelleren Tumorfortschritt führt (38).

Das Zusammenspiel zwischen Glioblastomzellen und TAM führt u. a. zu einer Verformung des Gewebes, die wiederum mit dem Tumorwachstum einhergeht. Die sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebeverformung und dem Tumorwachstum. (48). Die Glioblastomzellen besitzen große Mengen der inaktiven Form des MMP2, die sogenannte Pro-MMP2 (47). Um die inaktive MMP2 in die aktive Form umzuwandeln, wird MMP14 benötigt, das aus den Mikrogliazellen des TAM stammt. Durch extrazelluläre Vesikel regen Glioblastomzellen die Mikrogliazellen dazu an, mehr MMP14 zu produzieren. Dieser Prozess erfolgt über den Toll-Like-Rezeptor 2 (TLR2) (49). Die aktive MMP2 verursacht die Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM), einem Netzwerk aus Proteinen und Molekülen, das die Zellen umgibt und ihnen Struktur und Stabilität verleiht. Durch den Abbau der ECM wird die Barriere zwischen Tumor und gesundem Gewebe geschwächt, was die Invasion des gesunden Gewebes durch den Tumor ermöglicht (50).

### 2.1.5 MGMT-Promotor-Methylierungsstatus

Das O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen kodiert das Enzym MGMT, das für die DNA-Reparatur im Falle einer Guanin-Störung bzw. Guanin-Methylierung bei DNA-Transkription zuständig ist. Die Purinbase Guanin ist das Hauptziel des gängigsten Chemotherapeutikums, TMZ, bei Patienten mit Glioblastom. Je nach Methylierungsstatus des Gen-Promotors wird das MGMT-Gen transkribiert und translatiert. Dementsprechend wird das MGMT-Enzym in der Zelle vorhanden sein oder fehlen. Unter Umständen, wie bei Methylierung des Promotors, können die Transkription und Translation nicht stattfinden, der Zelle würde ein DNA-Reparaturmechanismus fehlen und es besteht eine höhere Chemotherapie-Sensibilität.

TMZ bezeichnet ein Alkylierungsmittel, das eine Methylgruppe an Purinbasen der DNA (O<sup>6</sup>-Guanin; N<sup>7</sup>-Guanin und N<sup>3</sup>-Adenin) liefert, was zu einer Veränderung des Moleküls und schließlich zur Apoptose führt (51). Die zytotoxische Base, O<sup>6</sup>-Methylguanin (O<sup>6</sup>-MeG), kann durch MGMT in Tumoren, die dieses Protein exprimieren, entfernt oder in Tumoren mit Fehlpaarungsreparatur-Defizienz (mismatch-repair-deficiency; MMR) toleriert werden. Mit anderen Worten: MGMT überträgt die Methylgruppe von Guanin, repariert dadurch beschädigte DNA und wirkt der zytotoxischen Wirkung von TMZ auf Tumorzellen entgegen. Durch die Entfernung der methylierten Base führt MGMT zu einer Resistenz gegen TMZ (51). Darüber hinaus scheitern selbst Patienten, die zunächst auf TMZ ansprechen, aufgrund erworbener Resistenzen an der Therapie (52).

Der Abbau von MGMT vor der Chemotherapie mit Alkylierungsmitteln verhindert die O<sup>6</sup>-MeG-Reparatur. Daher können die MGMT-Pseudosubstrate O<sup>6</sup>-Benzylguanin und Lomeguatrib (ein synthetischer MGMT-Inhibitor) Tumore für TMZ sensibilisieren (53). Etwa 55 % der

Glioblastom-Patienten sind aufgrund des MGMT-DNA-Reparatursystems resistent gegen TMZ (54).

Die Ergebnisse der Nordic-Trial-NCBTSG-Gruppe (55) und NOA-08 (55) haben den MGMT-Methylierungsstatus als prädiktiven Biomarker etabliert, sodass dieser heute routinemäßig bei allen Patienten mit Glioblastom bestimmt wird. Dieser Marker wird bei der Therapieauswahl v. a. bei älteren Patienten als entscheidender Faktor mitberücksichtigt. Obwohl der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus das Ansprechen auf die üblichen alkylierenden Chemotherapeutika wie TMZ vorhersagen kann, wird er nicht als molekularer Marker zur Einteilung der Gliome bewertet (56).

## 2.2 Modulieren der Glioblastom-Pathogenität durch eine CMV-Infektion

CMV wird in der Literatur noch nicht als onkogenes Virus gesehen, da eine Kausalität zwischen einer CMV-Infektion und Malignitätsentstehung nicht beobachtet wurde. Es wird jedoch als ein onkomodulatorischer Faktor bei Malignomen erwähnt. In der Literatur wird u. a. von einer chromosomalen Instabilität nach einer Infektion mit CMV berichtet. Mit CMV infizierte Lymphozyten weisen eine chromosomale Instabilität auf einem Niveau auf, das gleich oder höher ist als bei Lymphozyten, die einer Gammabestrahlung ausgesetzt wurden (57). Außerdem wurde beobachtet, dass CMV die Empfindlichkeit von Lymphozyten gegenüber den Wirkungen von Bestrahlung erhöht, was zu einer größeren Instabilität führt als bei Lymphozyten, die entweder einzeln mit CMV oder Bestrahlung behandelt wurden (57).

In einer Studie mit Mäusen wurde eine Aktivierung von STAT3 in vitro in humanen Glioblastomzellen und Neurosphären durch CMV beobachtet (58). Die STAT3-Aktivierung führt zu einer erhöhten Proliferation von Gliomen und neuralen Stammzellen (GSC) sowie letztendlich zu einer reduzierten Überlebensrate bei CMV+-Mausmodellen (58).

In einem weiteren Tierversuch an Mäusen untersuchten Krenzlin et al. die Effekte einer CMV-Infektion in Glioblastomen. (59). Insgesamt wurden 39 Mäuse in dieses Experiment eingeschlossen. Ungefähr die Hälfte (n = 19) wurde mit CMV infiziert, während der Rest (n = 20) naiv blieb. Nach einer Inkubationszeit von 15 Wochen wurden allen Mäusen stereotaktisch Glioblastomzellen eingepflanzt. Die MRT-Bilder nach der Implantation und im weiteren Verlauf zeigten signifikante Unterschiede im Tumolvolumen zwischen den beiden Gruppen, wobei die CMV-positiven Mäuse größere Tumorumfänge aufwiesen als die CMV-negativen. Darüber hinaus konnte eine erhöhte CD31- und KI67-Expression in den mit MCMV infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Das KI67-Protein wird fast ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert und gilt als prognostischer Marker für viele Krebsarten (60). CD31 ist ein Endothelmarker, der für längere Gefäße und stärkere Gefäßverzweigungen in der CMV-positiven Gruppe spricht. CMV infiziert und akkumuliert sich in den Perizyten (61).

Perizyten sind die kontraktile Zellen entlang der Kapillaren und u. a. für die Angiogenese, den zerebralen Blutfluss und die Gefäßstabilisierung zuständig (61-64). Eine höhere Anzahl an Perizyten geht mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie und somit einer schlechteren Prognose einher (65). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Perizyten schneller zu den mit CMV infizierten Glioblastomzellen im Vergleich zu den naiven Glioblastomzellen wandern (59). Zusätzlich wurde eine erhöhte PDGF-d-Expression in den MCMV-positiven Mäusen beobachtet, die wiederum mit einer erhöhten Angiogenese und Perizyten-Migration ins Tumorgewebe einherging. Nach der PDGF-d-Elimination wurden eine geringere Perizyten-Migration und Angiogenese, ähnlich wie in der MCMV-negativen Kontrollgruppe, beobachtet (59). Dementsprechend kann PDGF-d als ein ‚Vermittler‘, der die CMV-Einflüsse auf die Hypervaskularisierung und das Glioblastom-Wachstum ermöglicht, angenommen werden. Die PDGF-d-Färbung und die Vaskularisierung konnten durch die Gabe einer antiviralen Medikation, Cidofivir, reduziert werden. Zudem wurde bei MCMV-positiven Mäusen, die Cidofovir erhielten, ein längeres OS im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet. Bei MCMV-negativen Mäusen zeigte die Behandlung jedoch keinen signifikanten Effekt auf das OS (59).

### 2.2.1 T-Zell-Dysfunktion in Glioblastomen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind entscheidend für die Abwehr von Virusinfektionen und Karzinomen. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren und differenzieren zu Effektorphänotypen, wenn sie auf Antigene treffen, die auf Klasse-I-HLA-Molekülen von dendritischen Zellen präsentiert werden. CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen wandern zu den Infektionsstellen und töten infizierte oder krebsartige Zellen ab. Nach der Beseitigung der Infektion bleibt ein Pool von pathogenspezifischen CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen bestehen, der bei erneutem Kontakt mit demselben Pathogen schnell reagiert (66).

In einer Studie aus dem Jahr 2017 wurde festgestellt, dass CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl im Tumorgewebe als auch im Blut von IE-1-seropositiven Patienten mit Glioblastom vermehrt vorhanden waren (18). Die Gewebe-IE-1-Positivität korrelierte in dieser Studie mit einer erhöhten CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration ( $P < 0,0001$ ). CD8<sup>+</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T-EM) machten den Großteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe aus, verglichen mit dem peripheren Blut von CMV-positiven Patienten ( $P < 0,0001$ ) sowie CMV-positiven ( $P < 0,001$ ) und -negativen ( $P < 0,001$ ) Spendern. In den Biopsien wiesen die CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-EM-Zellen im Vergleich zu den Populationen im peripheren Blut hohe Expressionsniveaus der Immun-Checkpoint-Proteine CTLA-4 und PD-1 auf ( $P < 0,001$  bzw.  $P < 0,0001$ ) (18). Trotz der scheinbar erhöhten Immunogenität von CMV im Vergleich zu Tumorantigenen waren die T-Zellen bei hohem Expressionsniveau der Immun-Checkpoint-Proteine CTLA-4 und PD-1

gehemmt, und der CMV-Status hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten (HR = 0,85; 95 % CI 0,564–1,290; P = 0,45) (18).

Die Verbesserung der Immunfunktion im Tumormikroumfeld könnte daher das Überleben der Patienten erhöhen. Diese Ergebnisse unterstützen das wachsende Interesse an der Verabreichung von ex vivo expandierten, autologen, antigen-spezifischen T-Zellen oder der Verwendung von Tumorzelllysat-gepulsten dendritischen Zellen in der Immuntherapie gegen Glioblastome.

### 2.3 Herpesviren und Karzinome

Herpesviren werden beim gesunden Menschen nach der Infektion durch die CTL stummgeschaltet, sodass sie einen asymptomatischen Verlauf aufweisen, während sie in den Zellen persistieren (11). Nur bei einer Immunsuppression (z. B. durch AIDS, iatrogene Ursachen etc.) können diese Viren sich replizieren und symptomatisch werden. Die Mechanismen werden anhand des Epstein-Barr-Virus (EBV) erklärt.

Wenn EBV zuerst eine naive B-Zelle infiziert, setzt es das Wachstumsprogramm oder Latenz-III-Muster ein, das EBV-Proteine mit ausreichendem onkogenem Potenzial exprimiert, um in vitro eine Unsterblichkeit und in vivo B-Zell-Wachstum und -Differenzierung auszulösen. Dabei werden die Gene EBNA1, EBNA6 sowie LMP1, LMP2A und LMP2B exprimiert. Dieses Expressionsmuster zwingt die infizierten Zellen, sich zu proliferierenden B-Zellen zu entwickeln, was die Replikation der EBV-Episome ermöglicht. Latenz III fällt jedoch immunogen aus und Zellen, die dieses Muster zeigen, werden von CTL eliminiert (67). Die daraus resultierende Immunantwort durch CTL fördert in infizierten Zellen den Wechsel zum Latenz-II- und dann Latenz-I-Muster, das weder immunogen noch onkogen ist, da nur EBNA1 und EBER exprimiert werden (10). Während EBV nicht direkt genetische Veränderungen im Wirt (somatische Mutationen) verursacht, können die durch EBV verursachte chronische Infektion und Zellproliferation zu einer Umgebung beitragen, die das Risiko für solche Mutationen, wie die Überexpression von BCL-6, Mutationen im p53-Gen oder Mutationen in den RAS-Genen, erhöht.

Bei immunsupprimierten Patienten und AIDS-Patienten können Latenz-III-Zellen gedeihen und zu Posttransplantationslymphomen (PTLD) oder AIDS-assoziierten Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) führen, wobei somatische Mutationen des Wirts zur Lymphomgenese beitragen (10). In Malaria-Regionen begünstigt die durch *P. falciparum* induzierte B-Zell-Proliferation das Auftreten von 8:14-Translokationen, die wiederum zur Burkitt-Lymphomgenese führen können (68). Die Glioblastomzellen weisen eine hohe Expression von CTLA-4- und PD-1-Antigenen auf, die zur Herunterregulierung der CTL und der Immunantwort führen (18). Die Immunsuppression könnte zur Entstehung neuer somatischer

Mutationen durch die CMV-Infektion bei Patienten mit Glioblastom beitragen, ähnlich wie bei der Lymphomgenese in EBV-assoziierten NHL.

## 2.4 Uneinheitliche Daten bezüglich der CMV-Präsenz in Glioblastomen

Ein Zusammenhang zwischen einer CMV-Infektion und der Malignität eines Tumors wurde bereits in den 70er-Jahren vermutet, erstmals beim Prostata-CA (12). Im Jahr 2002 haben Cobbs et al. zum ersten Mal CMV-Proteine in histopathologischen Präparaten von glialen Tumoren entdeckt (15). Diese waren nur in den Glioblastomzellen ersichtlich und im gesunden Hirngewebe nicht vorhanden, was den Verdacht weckte, dass ein Zusammenhang zwischen diesem Virus und Glioblastomen bestehen könnte.

In den nächsten Jahren folgten kontroverse Publikationen, die keine CMV-DNA weder im Tumorgewebe noch im peripheren Blut entdecken konnten (69-71), aber auch Arbeiten, die von einer CMV-Präsenz im Glioblastom-Tumorgewebe, aber keinem Nachweis weder in den nekrotisierten Anteilen des Tumors noch außerhalb der Tumorgrenzen berichteten (13, 72, 73). Im Jahr 2008 haben Scheurer et al. ähnliche Daten publiziert und schlugen vor, dass die Anzahl an CMV-infizierten-Zellen mit den höheren Graden des Glioms zunimmt ( $P = 0.006$  – Vergleich zw. Glioblastom vs. Low-Grade-Glioma (LGG) und anaplastischen Astrozytomen) (57). In derselben Publikation haben Scheurer et al. die kontroverse Datenlage auf die uneinheitlichen Vorbereitungsmethoden zurückgeführt. Sie behaupteten, dass die Gewebeproben eine Dicke von  $6\mu\text{m}$  haben müssen, um die optimale Färbung erzielen zu können. Dieses Kriterium wurde zuvor von Mitchell et al. erfüllt und sie konnten damit ebenso positive Daten erzielen (72). Dieser Faktor wurde in den Publikationen von Lau et al. und Sabatier et al., die keine CMV-Zellen in den Proben nachweisen konnten, in der Methodik nicht erwähnt (70, 71). Poltermann et al., ebenso mit negativen Resultaten bei der Suche nach CMV-Zellen im Tumorgewebe, haben Probeschnitte mit einer Dicke von  $8\mu\text{m}$  verwendet (69), die eigentlich nur für oberflächliche Färbungen geeignet sind.

Zusätzlich muss eine höhere Antikörperkonzentration zur Erkennung der niedrigeren CMV-Konzentrationen gewährleistet werden (74). Lau et al. und Poltermann et al. haben eine IE1-Antikörperverdünnung von 1:200 und Sabatier et al. von 1:100 benutzt (69-71). Diese Verdünnungsraten sind eher geeignet für die Entdeckung aktiver CMV-Infektionen und nicht für die niedrigkonzentrierten HCM-Viren im Gehirn. Scheurer et al. haben mit einer IE1-AK-Verdünnung von 1:40 eine CMV-Infektion in 100 % der Glioblastom-Tumorproben ( $n = 21$ ) und in 82 % der LGG ( $n = 14$ ) nachweisen können (57).

Die Entparaffinierung der Proben muss ebenso gewisse Kriterien erfüllen, damit die viralen Antigene erhalten bleiben und entdeckt werden können. Unter anderem darf die Erhitzungsphase der Proben in der Mirowelle nicht zu lange dauern, da dies die virale Epitope

denaturieren kann. Lau et al. und Poltermann et al. haben die Proben jeweils 10 und 20 Minuten in der Mikrowelle erhitzt (69, 70), was als zu lange zu bewerten ist (57). Für eine bessere Entparaffinierung schlagen Scheurer et al. eine Kombination aus Erhitzung in der Mikrowelle (zur Entfernung des groben Paraffinanteils) und Xylole vor (57).

Eine weitere Kritik an den negativen Resultaten von Sabatier et al. betrifft deren Nutzung des sogenannten Mikroarray (71). Mikroarray umfasst eine Methode zur Gen-Erkennung im Labor. Nur ein punktueller Anteil an Gewebe reicht für Tausende von Untersuchungen aus. Da das Glioblastom aber inhomogen ausgebildet ist, stellt Mikroarray nicht die repräsentativste Methode dar, um nach CMV-Genen im Glioblastom zu suchen. Heute herrscht Konsens darüber, dass CMV in den meisten, wenn nicht allen Glioblastom-Tumoren vorhanden ist, wahrscheinlich den malignen Phänotyp des Tumors moduliert und daher als onkomodulatorisches Mittel angesehen wird (73).

## 2.5 Die Rolle der molekularen Mimikry in der Krebsimmuntherapie: Erkenntnisse aus präklinischen und klinischen Studien

Als beste prognostische Marker für ein erfolgreiches Ergebnis einer Immuntherapie gelten eine hohe Tumormutationslast und T-Zell-Infiltration, basierend auf der Überlegung, dass ein Tumor mit einer hohen Anzahl an Mutationen eine höhere Chance aufweist, durch T-Zellen-Infiltration erkannt und eliminiert zu werden (75). Dennoch zeigen Studien, dass die qualitativen Eigenschaften von Tumorneoantigenen möglicherweise relevanter sind als die Quantität. Es wird angenommen, dass Tumorantigene eher immunogen sind, wenn sie Antigenen ähneln, die mit Infektionskrankheiten in Zusammenhang stehen, da sie mit größerer Wahrscheinlichkeit von einer T-Zelle erkannt werden (75-77).

Chiaro et al. berichteten in einer Publikation von einer Serie erfolgreicher Tierversuchen zur Bestätigung der Theorie, dass Tumore Peptide aufweisen könnten, die einen hohen Grad an Homologie mit viralen Peptiden aufweisen und es dadurch kreuzreaktiven T-Zellen ermöglichen könnten, Tumorzellen durch molekulare Mimikry zu erkennen und abzutöten (78). Sie haben gezeigt, dass bei Mäusen eine bestehende Immunität gegen bestimmte virale Epitope die Wirksamkeit der Krebsimmuntherapie durch molekulare Mimikry in verschiedenen Situationen steigerte. Um zu verstehen, ob dieser Mechanismus teilweise das Ansprechen auf eine Immuntherapie beim Menschen erklären könnte, analysierten sie eine Kohorte von Melanom-Patienten. Die periphere Anti-CMV-IgG-Konzentration der Patienten wurde in Abständen von 1 und 3 Monaten nach der Therapie gemessen. Es zeigte sich eine Responder- und eine Non-Responder-Gruppe, wobei die Responder-Gruppe höhere Anti-CMV-IgG-Konzentrationen aufwies ( $R_{1mo}$  12.8 g/L vs.  $NR_{1mo}$ : 9.4 g/L,  $P = 0.02$ ,  $R_{3mo}$  12.7 g/L vs.  $NR_{3mo}$ : 9.9 g/L). In dieser Patientenkohorte zeigte sich, dass hohe Konzentrationen an

CMV-spezifischen Antikörpern mit einem verlängerten PFS verbunden waren, und es wurde festgestellt, dass periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) sowohl mit Melanomen als auch CMV-homologen Peptiden kreuzreagieren konnten. Schließlich zeigte die T-Zell-Rezeptorsequenzierung die Expansion derselben CD8+-T-Zellklone, wenn PBMC mit Tumor- oder homologen Viruspeptiden expandiert wurden (78).

## 2.6 Therapie des Glioblastoms

Trotz jahrzehntelanger Forschung über die Pathophysiologie des Glioblastoms bleiben die Therapiemöglichkeiten beschränkt und die Prognose schlecht. Im Jahr 2005 etablierte sich das Stupp-Protokoll als Standardtherapieschema. Dieses besteht aus totaler Tumoresektion, Radiotherapie mit adjuvanter und konkomitanter Chemotherapie mit TMZ (4). Weitere Studien wurden insbesondere für Patienten mit unmethyliertem MGMT-Gen entwickelt. Aufgrund der Vielzahl dieser Studien werden nicht alle im Detail erwähnt. Welche Therapie einem Patienten angeboten wird, hängt von vielen Faktoren ab, u. a. dem Eastern-Cooperative-Oncology-Group (ECOG)-Status des Patienten, dem Alter und dem MGMT-Methylierungsstatus.

*Tabelle 1: ECOG-Leistung-Status*

Grad	ECOG-Leistung-Status (79)
0	Ganz aktiv, kann alle Leistungen wie vor der Erkrankung uneingeschränkt weiterführen
1	Eingeschränkt in körperlich anstrengenden Aktivitäten, aber gehfähig und in der Lage, leichte oder sitzende Arbeiten auszuführen, z. B. leichte Arbeit im Haus, Büroarbeit
2	Gehfähig und in der Lage, sich selbst zu versorgen, jedoch nicht in der Lage, irgendwelche Arbeitstätigkeiten auszuführen; etwa mehr als 50 % der Wachstunden mobil
3	Nur begrenzt zur Selbstfürsorge fähig; mehr als 50 % der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden sein
4	Völlig abhängig; Nicht zur Selbstfürsorge fähig; immer an Bett oder Stuhl gebunden

### 2.6.1 Operation

In randomisierten Studien wurde gezeigt, dass mit der fluoreszenzgesteuerten Chirurgie (FGS) im Vergleich zur konventionellen Resektion eine umfassendere Resektion hochgradiger Gliome erreicht werden kann, was zu längerem PFS und OS führt (80). Die Standardmethode zur FGS mit der besten Datenlage ist das 5-aminolevulinic acid (5-ALA), das präoperativ oral appliziert wird.

Orales 5-ALA wird in den Mitochondrien von Gliomzellen metabolisiert, um Protoporphyrin IX (PpIX) zu produzieren, das unter tiefblauem Licht fluoresziert. Diese Anreicherung von fluoreszierendem PpIX in den Tumorzellen ermöglicht die Abgrenzung vom umliegenden Gewebe und erleichtert die Resektion. Es wurde festgestellt, dass die schwache intraoperative Fluoreszenz über das Volumen des präoperativen kontrastmittelaufnehmenden Tumors hinausgeht. Dies deutet darauf hin, dass 5-ALA die Darstellung von MRT-non-Enhancing-Tumorgewebe ermöglicht (81). Es wird angenommen, dass die Akkumulation von 5-ALA-vermitteltem PpIX teilweise vom Grad der Störung der BHS abhängt, aber auch von einer Reihe anderer Faktoren, wie einem erhöhten Zellstoffwechsel und verändertem Tumormikromilieu. Im Jahr 2017 genehmigte die US-amerikanische Food-and-Drug-Administration 5-ALA (Gleolan, NX Development Corp.) als Hilfsmittel für die intraoperative Darstellung hochgradiger Gliome (WHO-Grad III oder IV in der präoperativen Bildgebung). Derzeit beträgt die akzeptierte Dosis von 5-ALA 20 mg/kg Körpergewicht und wird 3 Stunden vor einer geplanten chirurgischen Tumorsektion oral verabreicht (82).

### 2.6.2 Adjuvante Therapie

Welche weiteren Maßnahmen nach der operativen Entfernung des Tumors erfolgen sollen, lässt sich durch Faktoren wie MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (83), Alter des Patienten, AZ bzw. ECOG des Patienten sowie Verträglichkeit und Wirksamkeit einer gewählten Therapie entscheiden.

#### 2.6.2.1 STUPP-Schema

Im Jahr 2005 veröffentlichten Stupp et al. im New England Journal of Medicine eine Studie, bei der Patienten mit Glioblastom nach der Resektion randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt wurden. In der Kontrollgruppe erhielten die Patienten eine alleinige Radiotherapie und die zweite Gruppe erhielt zusätzlich für 6 Wochen eine konkomitante TMZ-Therapie, gefolgt von 6 Zyklen TMZ a5/28. Die HR für den Tod bei Patienten, die mit Strahlentherapie plus TMZ behandelt wurden, im Vergleich zu denen, die nur Strahlentherapie erhielten, betrug 0,63 (95% CI: 0,52–0,75;  $P < 0,001$ ) (54). Aufgrund dieser Daten hat sich das Stupp-Protokoll als Standardtherapie des Glioblastoms etabliert.

### 2.6.2.1 CeTeG-Studie

Für Patienten mit einer MGMT-Promotor-Hypermethylierung besteht die Möglichkeit, an der CeTeG-Studie teilzunehmen. In dieser Studie erhalten die Patienten zusätzlich zum TMZ das Alkylierungsmittel CCNU (84). CCNU ist ein Alkylierungsmittel vom Nitrosoharnstoff-Typ. Es wird in vivo hydrolysiert, wodurch reaktive Metaboliten entstehen, die eine Alkylierung und Quervernetzung der DNA und RNA verursachen (an der O6-Position von Guanin-enthaltenden Basen). Hierdurch wird die Zytotoxizität induziert (85). CCNU kann wie TMZ die BHS überqueren (85). In dieser offenen, randomisierten Phase-3-Studie wurden 141 Patienten im Alter von 18 bis 70 Jahren mit neu diagnostiziertem Glioblastom und methyliertem MGMT-Promotor sowie einem Karnofsky-Performance-Score von 70 % oder höher in 17 deutschen Universitätskliniken eingeschlossen. Die Patienten wurden zufällig (1:1) einer von zwei Behandlungsgruppen zugeordnet: Entweder erhielten sie die Standardbehandlung mit TMZ (75 mg/m<sup>2</sup> pro Tag während der Radiotherapie [59-60 Gy], gefolgt von sechs Zyklen TMZ mit 150-200 mg/m<sup>2</sup> pro Tag an den ersten 5 Tagen eines 4-Wochen-Zyklus) oder bis zu sechs Zyklen CCNU (100 mg/m<sup>2</sup> am Tag 1) plus TMZ (100-200 mg/m<sup>2</sup> pro Tag an den Tagen 2-6 eines 6-Wochen-Zyklus) zusätzlich zur Radiotherapie (59-60 Gy). Aufgrund der unterschiedlichen Behandlungspläne waren weder die Patienten noch die Ärzte verblindet. Der primäre Endpunkt war das Gesamtüberleben in der modifizierten Intention-to-Treat-Population, die alle randomisierten Patienten umfasste, die mit der zugewiesenen Chemotherapie begonnen hatten. 129 Patienten (63 in der TMZ-Gruppe und 66 in der CCNU-TMZ-Gruppe) bildeten die modifizierte Intention-to-Treat-Population. Das mediane Gesamtüberleben verbesserte sich von 31,4 Monaten (95% CI 27,7-47,1) bei TMZ auf 48,1 Monate (32,6 Monate bis nicht beurteilbar) bei CCNU-TMZ (HR 0,60, 95% CI 0,35-1,03; p = 0,0492). Nebenwirkungen vom Grad 3 oder höher traten bei 32 (51%) von 63 Patienten in der TMZ-Gruppe und bei 39 (59%) von 66 Patienten in der CCNU-TMZ-Gruppe auf (84).

### 2.6.2.2 N2M2-Studie

NCT-Neuro-Master-Match (N2M2)-Trial bezeichnet eine Phase-I/IIa-Studie für IDH-Wildtyp-Patienten ohne MGMT-Promotor-Hypermethylierungsnachweis. Patienten ohne MGMT-Promotor-Hypermethylierung (ca. 1/2 aller Glioblastom-Patienten) stellen keine passenden Kandidaten für eine TMZ-Therapie dar, da das Temodal ein alkylierender Agent ist und dessen Wirkung durch das vorhandene MGMT-Enzym aufgehoben wird. Bei diesen Patienten wird versucht, anhand der molekularen Untersuchungsergebnisse eine gezielte Therapie durchzuführen. In Deutschland wurde die N2M2-Studie hauptsächlich für Patienten

ohne MGMT-Promotor-Methylierung entwickelt. Patienten, bei denen die definierten Biomarker nachzuweisen sind, werden einer der fünf Subgruppen der Match-Gruppe zugeordnet. Die Stratifizierung erfolgt anhand der folgenden Therapeutika und deren Ansatzpunkte: Alectinib, Idasanutlin, Palbociclib, Vismodegib und Temsirolimus (86). Patienten ohne passende/definierte molekulare Merkmale (sog. Non-Match) werden randomisiert einer der Subgruppen ohne starke Biomarker zugeordnet und erhalten Atezolizumab, Asinercept (APG101) oder Standard-TMZ (86).

### 2.6.2.3 EORTC-26062

Die European-Organisation-for-Research-and-Treatment-of-Cancer (EORTC)-26062-Studie wurde als Primärtherapie für ältere Patienten oder Patienten mit eingeschränktem klinischem Funktionsstatus mit Glioblastom entwickelt. Die Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass eine hypofraktionierte RCT mit TMZ und bis zu zwölf Erhaltungszyklen TMZ einer alleinigen Radiotherapie bei Senioren überlegen ist (87).

### 2.6.2.4 Tumor Treating Fields (TTF)

Tumor-treating fields (TTFields) ist eine antimetabolische Behandlungsmethode, die durch die Anwendung niederfrequenter Wechselstromfelder die Zellteilung und die Organellenbildung in Glioblastomzellen stört (88).

In einer randomisierten, offenen Studie von Stupp et al. wurden 695 Patienten mit Glioblastom eingeschlossen, deren Tumor entweder reseziert oder biopsiert wurde und die eine RCT abgeschlossen hatten. Die Patienten wurden in 83 Zentren zwischen Juli 2009 und 2014 rekrutiert und bis Dezember 2016 nachbeobachtet. Die Patienten wurden im Verhältnis 2:1 randomisiert und erhielten entweder TTFields in Kombination mit einer Erhaltungstherapie mit TMZ (n = 466) oder nur TMZ (n = 229). Die TTFields, bestehend aus niederfrequenten (200 kHz) Wechselstromfeldern, wurden mindestens 18 Stunden täglich über vier auf der Kopfhaut angebrachte Transducer-Arrays mithilfe eines tragbaren Geräts verabreicht. Beide Gruppen erhielten TMZ (150-200 mg/m<sup>2</sup>) an 5 Tagen in einem 28-Tage-Zyklus (6-12 Zyklen). Das mediane PFS ab Randomisierung betrug 6,7 Monate in der TTFields-TMZ-Gruppe und 4,0 Monate in der TMZ-allein-Gruppe (HR 0,63; 95% CI 0,52-0,76; p < 0,001). Das mediane OS lag bei 20,9 Monaten in der TTFields-TMZ-Gruppe im Vergleich zu 16,0 Monaten in der TMZ-allein-Gruppe (HR 0,63; 95% CI 0,53-0,76; p < 0,001). Systemische Nebenwirkungen traten bei 48% der Patienten in der TTFields-TMZ-Gruppe und bei 44% der Patienten in der TMZ-allein-Gruppe auf. Leichte bis mittelschwere Hauttoxizität unter den Transducer-Arrays wurde bei 52% der Patienten in der TTFields-TMZ-Gruppe beobachtet, während in der TMZ-allein-Gruppe keine Patienten davon betroffen waren (88).

### 2.6.2.5 Bevacizumab

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch auf den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) abzielt. VEGF spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese), die für das Tumorwachstum entscheidend sind. In einer randomisierten Studie wurden 437 Patienten mit Glioblastom und Tumorprogression nach einer Chemoradiotherapie im Verhältnis 2:1 entweder Lomustin plus Bevacizumab (Kombinationstherapie, 288 Patienten) oder Lomustin allein (Monotherapie, 149 Patienten) zugewiesen. Trotz eines verlängerten PFS führte die Behandlung mit Lomustin plus Bevacizumab zu keinem Überlebensvorteil im Vergleich zur Behandlung mit Lomustin allein bei Patienten mit Glioblastomprogress (OS-Kombinationstherapie: 9,1 Monate, 95% CI 8,1 bis 10,1 vs. OS-Monotherapie: 8,6 Monate, 95% CI 7,6 bis 10,4) (89). Schwere unerwünschte Nebenwirkungen (Grad 3 bis 5) traten bei 63,6% der Patienten in der Kombinationstherapie-Gruppe und bei 38,1% der Patienten in der Monotherapie-Gruppe auf. Die Zugabe von Bevacizumab zu Lomustin beeinflusste weder die Lebensqualität noch die neurokognitive Funktion (89).

### 2.6.2.6 ACT-IV-Studie

Die ACT-IV-Studie war eine randomisierte, doppelblinde Phase-III-Studie, die in 22 Ländern durchgeführt wurde. Sie richtete sich an Patienten mit Glioblastom, die das epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Variante-III-Gen exprimierten (90). Das Ziel der Studie bestand darin, die Wirksamkeit eines peptidbasierten Impfstoffs namens Rindopepimut zu untersuchen. Dieser Impfstoff soll das Immunsystem dazu anregen, gezielt gegen Tumorantigene vorzugehen, insbesondere gegen das EGFRvIII-Antigen. Das EGFRvIII-Antigen bezeichnet eine Mutation des EGFR, die häufig bei Glioblastom-Patienten auftritt. Obwohl die anfänglichen Daten vielversprechend ausfielen, zeigte sich letztlich kein Unterschied im OS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Später stellte sich heraus, dass bei Rezidiven bis zu 60 % der Tumorzellen die Expression des EGFRvIII-Gens verloren hatten (91).

### 2.6.3 Alleinige Strahlentherapie

Bis zur Einführung des Stupp-Protokolls in den frühen 2000er Jahren war die alleinige Strahlentherapie bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy in 1,8–2 Gy-Fractionen der Standard bei der Behandlung von Glioblastomen. Die Strahlentherapie führte zu einer ungefähren Verdopplung der medianen Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten, die nur ‚best supportive care‘ erhielten (OS-‚best supportive care‘: 17 Wochen vs OS-Radiotherapie: 37.5 Wochen)

(92). Patienten ab 70 Jahren profitieren von einer Strahlentherapie mit 50 Gy in 1,8-Gy-Fractionen mehr als von einer alleinigen ‚best supportive care‘, insbesondere wenn eine Resektion des Tumors nicht durchgeführt werden kann (93). Bei Patienten mit ungünstigen Prognosefaktoren, wie höherem Alter und schlechtem Allgemeinzustand, kann alternativ eine hypofraktionierte Strahlentherapie eingesetzt werden. Diese Methode verwendet größere Einzeldosen pro Sitzung (3 Gy) und erfordert dadurch weniger Sitzungen, was die Gesamtdauer der Behandlung verkürzt.

#### 2.6.4 Adjuvante Therapie bei Tumorrezidiv

Aktuell ist CCNU das Mittel der Wahl bei Tumorrezidiv. In geeigneten Fällen kann ein TMZ-Rechallenge-Konzept erwogen werden. Regorafenib bezeichnet einen oralen Multi-Kinase-Inhibitor, der hauptsächlich bei nicht resezierbaren gastrointestinalen Tumoren, metastasierten kolorektalen Tumoren und hepatozellulären Karzinomen eingesetzt wird. Die aktivierten Metaboliten des Regorafenibs blockieren multiple membrangebundene oder intrazelluläre Proteinkinasen. Diese umfassen zum einen Kinasen, die eine Rolle in der Angiogenese von Tumoren spielen, z. B. VEGFR 1 bis 3. Zum anderen werden Kinasen gehemmt, die eine Rolle bei der Entstehung von Karzinomen spielen. Dazu gehören v. a. Protoonkogene KIT und RET, deren Überexpression auch mit einer Resistenzentwicklung gegen herkömmliche antiangiogene Therapien in Verbindung gebracht wird. Kinasen wie FGFR und PDGFR, die mitverantwortlich für die Metastasierung von Tumoren sind, werden ebenso von Regorafenib blockiert (94).

Durch seinen Wirkmechanismus eignet sich Regorafenib für Patienten, die Resistenzen gegen einzelne Kinase-Inhibitoren entwickelt haben. In den letzten Jahren wurde dieses Mittel auch bei Patienten mit Glioblastom eingesetzt, die unter Therapie mit TMZ oder CCNU einen Tumorprogress zeigten.

In einer multizentrischen randomisierten Phase-II-Studie haben Lombardi et al. von einem längeren OS bei Patienten im Regorafenib- im Vergleich zu Patienten in CCNU-Gruppe berichtet. In dieser randomisierten Phase-II-Studie erhielten 59 Patienten mit Glioblastomrezidiv nur Regorafenib und 60 nur Lomustine. Zum Zeitpunkt der Daten-Analyse waren 99 (83 %) von 119 Patienten verstorben: 42 (71 %) von 59 in der Regorafenib-Gruppe und 57 (95 %) von 60 in der Lomustin-Gruppe. Das OS war in der Regorafenib-Gruppe signifikant besser im Vergleich zur Lomustin-Gruppe, mit einem medianen OS von 7,4 Monaten (95 % CI 5,8-12,0) in der Regorafenib-Gruppe und 5,6 Monaten (4,7-7,3) in der Lomustin-Gruppe (HR 0,50; 95 % CI 0,33-0,75;  $p = 0,0009$ ). Schwerwiegende therapiebedingte Nebenwirkungen (Grad 3-4) traten bei 33 (56 %) von 59 Patienten in der Regorafenib-Gruppe und bei 24 (40 %) von 60 Patienten in der Lomustin-Gruppe auf (95).

## 2.7 CMV-bezogene Therapieansätze

Es existieren vier Hauptbehandlungsmethoden, die auf CMV abzielen (96):

- I) **Valganciclovir** ist ein CMV-Replikationsinhibitor, der potenzielle Überlebensvorteile bezüglich Glioblastome zeigt (24, 25).
- II) **Immuntherapie** kann das CMV-pp65-Antigen als spezifisches Ziel auf Tumorzellen nutzen. Chimäre Antigenrezeptor-T-Zelle (CAR-T-Zelle) können so modifiziert werden, dass sie auf das CMV-pp65-Antigen abzielen und die Tumorzellen direkt abtöten (23).
- III) **Dendritische Zellen (DC)-basierte Impfstoffe**, die durch das CMV-pp65-Antigen aktiviert wurden, dienen dazu, zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu rekrutieren
- IV) **Peptid-Impfstoffe**: CMV kann auch zur Herstellung von Peptid-Impfstoffen verwendet werden, die eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen auslösen.

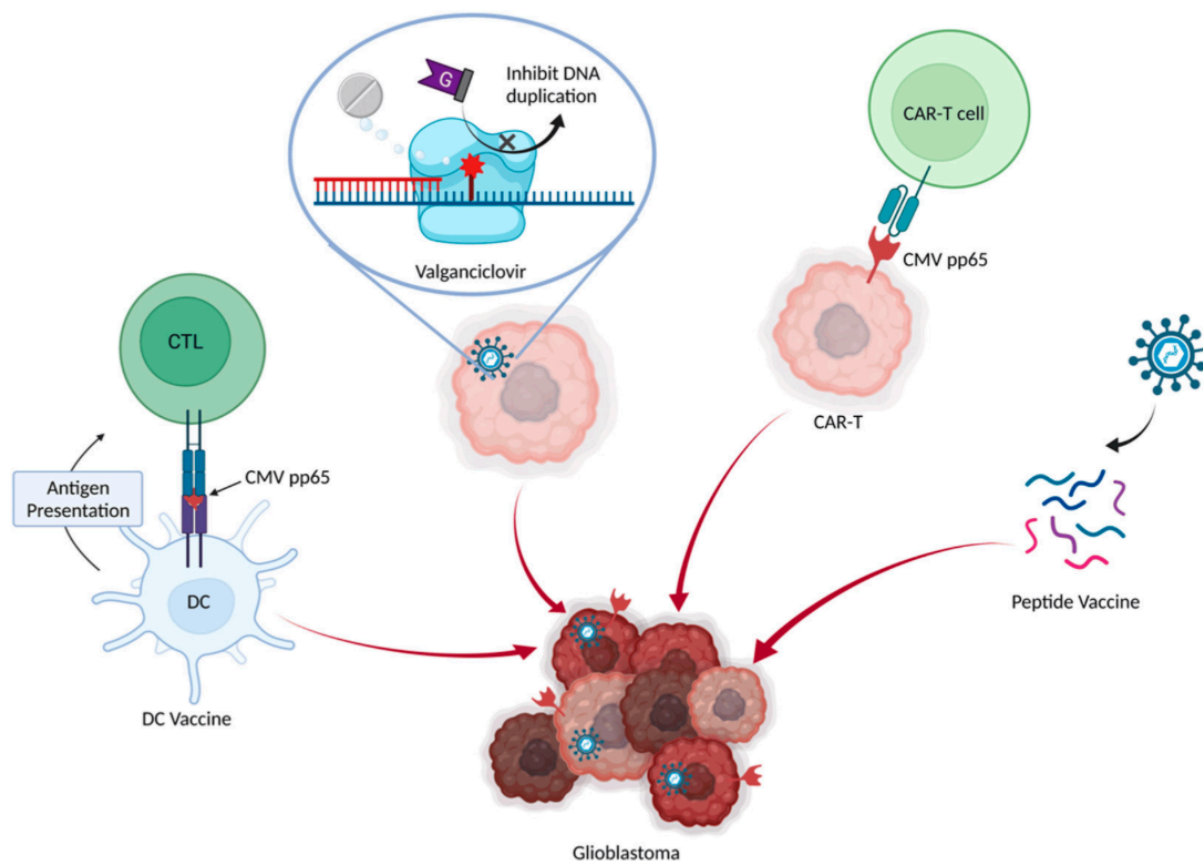


Abbildung 1: Wege der CMV-bezogenen Behandlung von Glioblastomen (Yang et al., J Clin Med)

### 2.7.1 CMV-Replikationsinhibitoren (Valganciclovir)

Der aktive Valganciclovir-Metabolit Ganciclovir ist ein Nukleosid-Analogon und kann als ‚falscher‘ Baustein in die virale Nukleinsäure eingebaut werden. Dies führt zur Hemmung der viralen DNA-Synthese und schließlich zur Apoptose der sich replizierenden Zellen.

Die zentralen diesbezüglichen Studien sind Valcyte Treatment of Glioblastom Patients in Sweden (VIGAS) und deren Folgestudien. Die initiale VIGAS-Studie war eine doppelblinde, randomisierte, kontrollierte Studie, die 42 neu diagnostizierte Glioblastom-Patienten einschloss und die Auswirkungen der Standardbehandlung mit oder ohne Standarddosis von Valganciclovir bis zum Fortschreiten der Krankheit oder freiwilligen Rückzug verglich. Diese randomisierte Phase-I/II-Studie im Karolinska Institut in Stockholm erbrachte vielversprechende Daten bezüglich Valganciclovir als Add-on-Therapie bei Glioblastom-Patienten nach einer Tumorresektion (24). Es gab keinen signifikanten Unterschied der Überlebensrate in 3- und 6-monatigen Endpunkten zwischen der Placebo- (n = 20) und der Valganciclovir-Gruppe (n = 22). Das könnte laut Autoren an der niedrigen Populationszahl gelegen haben. Relevant an dieser Studie ist aber das längere OS der Patienten im Valganciclovir-Arm, die das Medikament länger als 6 Monate eingenommen haben. 100 % dieser Patienten waren im ersten Jahr nach der Diagnose noch am Leben. Die vorliegende Studie ergab ein signifikant besseres OS von 24,1 Monaten für die Gruppe, die die Add-on-Therapie mit Valganciclovir für mehr als 6 Monate erhielt, im Vergleich zu 13,1 Monaten für die Gruppe, die ausschließlich die übliche Chemo- und Strahlentherapie erhielt ( $p < 0,0001$ ). Zusätzlich korrelierte eine längere Valganciclovir-Einnahme mit einer längeren Überlebensrate. Söderberg-Nauclér et al. behaupten, dass dies möglicherweise durch die Hemmung der späten Expression von CMV-Proteinen und CMV-induzierter Regulierungsmechanismen erklärt werden kann (97). Allerdings besteht Kritik an diesen Daten, da die Patienten der Placebo-Gruppe nach 6 Monaten zur Valganciclovir-Gruppe wechseln durften. Die gleiche Forschungsgruppe veröffentlichte 2020 die Ergebnisse einer Folgestudie. Diese zeigen, dass Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom, die Valganciclovir erhielten (n = 102), eine längere mediane Gesamtüberlebenszeit (OS 24,1 vs. 13,3 Monate,  $P < 0,0001$ ) und eine höhere 2-Jahres-Überlebensrate (49,8 % vs. 17,3 %) im Vergleich zu den Kontrollen (n = 231) aufwiesen. Die mediane Zeit bis zur Tumorprogression war ebenfalls länger als bei den Kontrollen; 9,9 (0,7–67,5 Monate) versus 7,3 (1,2–49 Monate), ( $P = 0,0003$ ) (25).

Die Behandlung mit Valganciclovir bei sekundären und rezidivierenden Glioblastomen zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse. Im Jahr 2020 veröffentlichte diese Arbeitsgruppe die Ergebnisse einer Valganciclovir-Add-on-Studie bei 44 Patienten mit sekundärem Glioblastom, wobei 8 Patienten Valganciclovir zusätzlich zur Sekundärtherapie erhielten. Das OS nach dem Rezidiv verbesserte sich von 12,7 auf 19,1 Monate, und die 24-Monats-Überlebensrate stieg

von 2,8 auf 37,5 % (98). Eine retrospektive Folgestudie, ebenfalls von derselben Arbeitsgruppe aus der Karolinska Universitätsklinik, umfasste 29 Patienten mit rezidiviertem Glioblastom, die Valganciclovir zusätzlich zur Second-line-Therapie erhielten. Das OS verlängerte sich von 7,4 Monaten auf 12,1 Monate im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 109), unabhängig vom MGMT-Methylierungsstatus (30). Keine der beiden retrospektiven Studien testete auf CMV-Infektion oder Viruslast. Die Studien umfassten Zweitlinientherapien, einschließlich erneuter Operation, hypofraktionierte Strahlentherapie, TMZ, CCNU, Bevacizumab und/oder Gamma-Knife-Behandlung.

Ein weiteres Forschungsteam berichtete, dass die Kombination von Valganciclovir und Bevacizumab bei Patienten mit rezidivierendem Glioblastom zu einer verlängerten Überlebenszeit führte. Die Kohorte, die gleichzeitig Valganciclovir und Bevacizumab erhielt, wies eine 6-monatige progressionsfreie Überlebensrate (PFS-6) von 50 % und ein OS von 11,3 Monaten auf, was signifikant länger war als bei den historischen Kontrollen (99).

Die exakten Wirkmechanismen der Valganciclovir-Therapie bei Patienten mit Glioblastom sind noch nicht vollständig geklärt. Zellen im Glioblastom-Tumorgewebe präsentieren zwar CMV-assoziierte Proteine, jedoch konnte in den meisten Glioblastom-Tumorzellen keine CMV-Nukleinsäure nachgewiesen werden. Hellstrand et al. behaupten daher, dass sich CMV in diesen Zellen nur geringfügig repliziert, was erklärt, warum virale Replikationsinhibitoren wie Valganciclovir nur eine begrenzte Verbesserung der Therapieergebnisse bewirken (100). Aufgrund der guten Verträglichkeit von Valganciclovir und den nachgewiesenen positiven Auswirkungen auf das OS sind jedoch weitere klinische Studien zur Bewertung dieser Therapiemöglichkeit erforderlich (101).

### 2.7.2 Immuntherapie

Studien haben bereits von einem dysfunktionalen Immunsystem in Glioblastom-Patienten berichtet (18). Eine Folge dieses Phänomens ist z. B. die erhöhte Anzahl der regulatorischen T-Zellen ( $T_{regs}$ ) im Tumorgewebe, die eine dämpfende Wirkung auf die Immunantwort aufweisen (34). Mehrere Kommunikationsschleifen in der Mikroumgebung des Tumors sind für die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems verantwortlich. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CTL) spielen eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Eliminierung von Zellen, die aufgrund einer Virusinfektion oder einer malignen Transformation abnormale Peptide auf ihrer Oberfläche aufweisen (66). Basierend auf diesem Prinzip wurde zunächst versucht, durch die alleinige Gabe ex vivo produzierter CTL therapeutische Effekte zu erzielen. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die positiven Therapieeffekte nur von temporärer Natur sind. Weitere Studien ergaben, dass die adjuvante Injektion von Phosphoprotein 65 (PP65)-DC die Polyfunktionalität der Adoptive-T-cell-Therapie (ATCT)

verbessern und das OS verlängern kann, was auf Potenzial für eine Kombinationstherapie hinweist (102).

### 2.7.2.1 CAR-T-Zelltherapie

Bei CAR-T-Zelltherapien werden T-Zellen aus dem Blut des Patienten entnommen und im Labor durch Hinzufügen eines Gens für einen Rezeptor (genannt chimärer Antigenrezeptor oder CAR) verändert, was den T-Zellen hilft, ein spezifisches Krebszellantigen zu binden. Die CAR-T-Zellen werden dann dem Patienten zurückgegeben.

In einer präklinischen Studie haben Ghazi et al. 2012 versucht, eine polyklonale CMV-spezifische T-Zellgenerierung mittels antigenpräsentierender Zellen (APC) zu bewirken (103). Das Ziel war die ex vivo Expansion von CMV-spezifischen CTL. Nachdem sie zeigen konnten, dass 45 % der Glioblastom-Proben für PP65 und 91 % für Immediate Early Proteine (IE)-1 positiv waren, haben sie APC entwickelt, die sowohl IE1- als auch PP65-Antigene präsentierten, um sowohl PP65- als auch IE1-spezifische T-Zellen zu aktivieren und so eine breitere Immunantwort auf die CMV-Zellen zu bewirken. Dabei wurden Kulturen im peripheren Blut der Glioblastom-Patienten angelegt und für sechs Wochen beobachtet. Die Funktionstüchtigkeit der generierten CTL wurde (i) anhand deren Zytokin-Produktion nach Kontakt mit CMV-Proteinen und (ii) Zerstörung der CMV<sup>+</sup>-Glioblastomzellen beurteilt. Die T-Zellen-Funktion bei Glioblastom-Patienten befand sich nach der Behandlung quantitativ und qualitativ auf dem Niveau des gesunden Menschen (103).

Im Jahr 2014 veröffentlichten Schuessler et al. die Ergebnisse einer Phase-I-Studie, in der 19 Patienten mit einem Glioblastom-Rezidiv autologe, CMV-spezifische T-Zellen injiziert wurden (104). In dieser Studie erhielten die Patienten mindestens drei Infusionen aus autologen CMV-spezifischen CTL in 4-(+/- 2) -wöchigen Intervallen zusätzlich zur Chemotherapie. Die Infusionen sind gut vertragen worden und es hat nur bei einem Patienten ernsthafte Nebenwirkungen, nämlich einen epileptischen Anfall, gegeben. Insgesamt haben 10 Patienten die Studie abgeschlossen und 4 sind bis zur Datenveröffentlichung progressionsfrei geblieben. Das mediane OS betrug > 57 Wochen (Spannweite 15.4–254 Wochen) und das mediane PFS > 35 Wochen (Spannweite 15.4–254 Wochen) (104). Sie haben außerdem berichtet, dass die meisten CMV-spezifischen CTL, die aus dem Blut von Glioblastom-Patienten isoliert wurden, nicht polyfunktional waren und die jeweiligen Zytokine nicht adäquat produzierten, aber nach Antigenexposition ex vivo ihre Fähigkeit zur Produktion multipler Zytokine wiederhergestellt hatten und in der Lage waren, eine wirksame Antitumorantwort in vivo aufzubauen. Diese Fähigkeiten sind im Verlauf wieder verloren gegangen. Polyfunktionale T-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie mehrere Funktionen erfüllen können, einschließlich der Zytotoxizität (gekennzeichnet durch die Expression von

CD107) sowie der Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 (105). Polyfunktionale T-Zellen sind mit Immunschutz nach Impfungen (106), der Kontrolle von Infektionen wie dem CMV (107, 108) und günstigen Verläufen bei HIV/AIDS (109) sowie Tumorrückbildungen (110, 111) assoziiert. Zusammenfassend lässt sich laut dieser Studie sagen, dass die adoptive Immuntherapie von Patienten mit rezidivierendem Glioblastom mit CMV-spezifischen T-Zellen sicher ist und langfristige klinische Vorteile bieten kann (104).

In einer Phase-I/II-Studie aus dem Jahr 2018 publizierten Reap et al. Ergebnisse, die eine erhöhte Wirksamkeit eines CMV-spezifischen T-Zelltransfers durch adjuvante Injektion von PP65-DC zeigten (102). CMV-pp65-RNA-beladene DC verbessern die Polyfunktionalität von CMV-pp65-T-Zellen. Darüber hinaus konnte die eingeschränkte Polyfunktionalität der aus Glioblastomen gewonnenen CTL durch die simultane Applikation der DC-Impfstoffe langfristig behoben werden, was auf das Potenzial einer Kombinationstherapie hinwies.

Eine weitere prospektive Phase-I-Studie mit 25 neu diagnostizierten Glioblastom-Patienten, die mit CAR-T-Therapie behandelt wurden, ergab eine mediane OS von 21 Monaten und ein PFS von 10 Monaten (112). Die Subgruppenanalyse deutete darauf hin, dass Patienten, die die CAR-T-Therapie vor einem Rezidiv erhielten, eine mediane OS von 23 Monaten zeigten, im Vergleich zu Patienten, die CAR-T nach einem Rezidiv erhielten, deren mediane OS 14 Monate betrug (112). Es wurde zusätzlich beobachtet, dass Patienten mit CMV-positiven Blutserumproben nicht immer empfindlich auf CMV-spezifische T-Zellen reagierten (113).

### 2.7.3 Dendritische Zellen (DC)-basierte Impfstoffe

CMV kann von den T-Zellen oder dem Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) als fremder Stoff erkannt werden. Es ist im Tumorgewebe angereichert, jedoch kaum im peripheren Blut und anderen Geweben verstreut. Präklinische Studien haben die potenziellen Behandlungseffekte von Immuntherapien, die auf CMV-spezifische Immunzellen abzielen, vorhergesagt (29, 114). CMV-spezifische DC-Impfstoffe zielen üblicherweise auf das PP65-Antigen ab.

Im Jahr 2014 veröffentlichten Mitchell et al. die Ergebnisse einer präklinischen Studie mit PP65-spezifischen CTL, die einen positiven Effekt der Therapie zeigten (29). In diesem Versuch wurde beobachtet, dass die aus den PBMC von Patienten mit Glioblastom gewonnenen T-Zellen nach Stimulation mit CMV-pp65-RNA-gepulsten DC eine Polyfunktionalität aufwiesen. Diese in vitro stimulierten T-Zellen zeigten eine Zunahme ihrer Funktionalität, gemessen an der Expression von CD107 und der Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2, im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Die DC mit RNA-Spezies gepulst wurden als Zielzellen verwendet, um die Spezifität und Effektivität der CMV-pp65-spezifischen T-Zellen zu testen. Dies ermöglicht eine präzise Bewertung, ob die T-Zellen spezifisch das

CMV-pp65-Antigen erkennen und darauf reagieren können, was für die Entwicklung gezielter Immuntherapien zentral ist. Autologe Glioblastom-Tumorzellen wurden ebenfalls getestet, um zu zeigen, dass die T-Zellen nicht nur DC, sondern auch tatsächliche Tumorzellen des Patienten lysieren können. DC, die mit anderen RNA-Spezies gepulst wurden, dienten als Kontrollgruppe und zeigten eine geringere oder keine spezifische Lyse, was die Spezifität der T-Zellen für das CMV-pp65-Antigen belegt. Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass in vitro generierte CMV-pp65-spezifische T-Zellen in der Lage sind, autologe Glioblastom-Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Diese Daten belegen erstmals die immunologische Relevanz der CMV-spezifischen Immunität bei der gezielten Bekämpfung von Gliomen (29). Die Studie ergab, dass 20 bis 50 % der Tumorzellen durch immunologische Zielrichtung auf CMV pp65 erkannt und abgetötet werden konnten, da sie ausreichend Antigen-Peptide exprimieren, um in Zytotoxizitätstests als Zielzellen dienen zu können (29).

Die ATTAC-Studien (Adoptive T-Cell Therapy Against Cancer) wird die Verwendung autologer, CMV-spezifischer CTL zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem Glioblastom untersucht (28). In diesen Phase-I/II-Studien werden CMV-spezifische T-Zellen aus den peripheren Blutzellen der Patienten isoliert, ex vivo expandiert und anschließend in Kombination mit TMZ verabreicht. Das Hauptziel dieser Studien ist es, die Sicherheit und mögliche Wirksamkeit dieser Therapie zu bewerten. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Behandlung nicht nur sicher ist, sondern auch potenziell langfristige klinische Vorteile bietet, darunter eine Verlängerung des OS und PFS der Patienten.

Die erste Phase-I-Studie, ATTAC-GM, verwendete einen DC-Impfstoff zusammen mit TMZ sowie granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und zeigte vorläufige klinische Vorteile (28). Das mediane OS betrug 37,7 Monate und die Überlebensrate nach 60 Monaten lag bei 36,4 %. Insgesamt blieben 4 von 11 Patienten 59 bis 64 Monate nach der Diagnose ohne Progress/Rezidiv.

Eine weitere ATTAC-Studie verglich die Effekte der Tetanustoxoid-Präkonditionierung auf einen DC-Impfstoff mit TMZ (26). Hier zeigte sie, dass die Vorkonditionierung der Impfstelle mit einem starken Recall-Antigen wie Tetanus/Diphtherie-(Td)-Toxoid die Ansiedlung in den Lymphknoten und die Wirksamkeit von tumorantigen-spezifischen DC signifikant verbessern kann. Um die Wirkung der Vorkonditionierung der Impfstelle beim Menschen zu bewerten, randomisierten die Forschenden 12 Patienten mit Glioblastom zur Vorkonditionierung, entweder mit nicht gepulsten DC oder mit Td-Toxoid, bevor bilateral mit DC geimpft wurde, die mit pp65-RNA gepulst waren. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Besiedelung der injizierten DC in den die Impfstelle drainierenden Lymphknoten bei Patienten, die Td erhielten, signifikant höher lag. Das mediane OS betrug 38,3 Monate in der Versuchsgruppe,

mit einem 18-monatigen OS von 66,7 % und einem 60-monatigen OS von 33,3 %. Die nur mit DC behandelte Gruppe erreichte eine mediane OS von 13,9 Monaten.

Die ATTAC-Studien zeigen, dass das immunadjuvante Td-Toxoid in Kombination mit dem DC-Impfstoff eine vielversprechende Therapie darstellt. Die Präkonditionierung mit Tetanustoxoid vor DC-Impfung fördert die Migration der DC-Zellen, stimuliert die Immunantwort und ist mit einer verlängerten Überlebenszeit verbunden. Zusammengefasst zeigten Follow-up-Daten aus der ersten verblindeten, randomisierten Phase-II-Studie (NCT00639639), dass fast ein Drittel dieser Kohorte 5 Jahre nach der Diagnose kein Tumorrezidiv aufwies. Die zweite klinische Studie (NCT00639639) ergab eine Überlebensrate von 36 % nach 5 Jahren ab Diagnose (27). Diese Daten liefern Hinweise darauf, dass CMV pp65 ein geeignetes antigenes Ziel in Glioblastom-Tumoren darstellt, und unterstützen die Begründung für eine CMV-gerichtete Immuntherapie zur Behandlung von Glioblastomen. Diese Studien stützen die Annahme, dass eine Immunität gegen CMV mit einer besseren Prognose bei Patienten mit Glioblastom zusammenhängt.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign**

In dieser prospektiven Beobachtungsstudie wurden Patienten mit der Diagnose Glioblastom auf Anti-CMV-IgG und -IgM im peripheren Blut untersucht. Die Blutproben zur Bestimmung von Anti-CMV-IgG und -IgM wurden nach der Tumorresektion und der histopathologischen Sicherung der Diagnose entnommen und im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz mittels Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA)-Tests ausgewertet. Anschließend wurden die Patienten über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr beobachtet. Für den primären Endpunkt wurde das PFS festgelegt und für den sekundären Endpunkt das OS. Zur Beurteilung eines Tumorprogresses wurden cMRT sowie die neuroradiologischen Befunde herangezogen. Zur Verlaufskontrolle erfolgte bei allen nicht palliativen Patienten in dreimonatigen Abständen eine cMRT. Das Fortschreiten des Tumors wurde anhand von mindestens zwei aufeinanderfolgenden MRT-Aufnahmen bestimmt, die von einem Radiologen auf Hinweise eines Tumorprogresses ausgewertet wurden. Im Rahmen der Strahlenbehandlung kann es zu Veränderungen im Hirngewebe kommen, die im MRT als Enhancements erscheinen. Diese sind oft schwer von einem echten Tumorprogress zu unterscheiden, da es sich auch um eine Strahlennekrose handeln könnte. Daher wird nach einer individuell festgelegten Zeit eine erneute cMRT durchgeführt, um diese Veränderungen im Verlauf zu beurteilen. Nehmen die Enhancements zu, spricht dies eher für Tumorwachstum als für eine Pseudoprogression. In diesem Fall wird die erste Aufnahme rückblickend als

Hinweis auf Tumorprogress gewertet. Die Daten wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode analysiert, um das PFS und das OS zu bestimmen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des Log-Rank-Tests analysiert. Zusätzlich wurde eine multivariate Analyse mit der Cox-Regression durchgeführt, um den Einfluss mehrerer Variablen auf das Überleben zu analysieren. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

## 3.2 Ethikstatement

Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz lag vor (Lfd. Nr. 2018-13276). Die Ethik-Kommission erhob keine Einwände gegen die Durchführung der Studie. Alle Patienten wurden über den Zweck und Ablauf der Studie aufgeklärt und darüber informiert, dass ihre Teilnahme freiwillig ist. Eine Ablehnung oder ein Abbruch der Teilnahme hatte keinerlei negative Auswirkungen auf ihre weitere Behandlung oder ihr Therapieverfahren.

## 3.3 Patientenpopulation

Im Zeitraum vom 15.01.2021 bis zum 15.02.2022 wurde das periphere Blut von 92 Patienten mit Glioblastom auf Anti-CMV-IgG untersucht, und der Krankheitsverlauf wurde für mindestens 12 Monate weiterbeobachtet. 9 Patienten wurden von der Datenauswertung ausgeschlossen, darunter 2 Patienten mit initial low-grade Gliomen, 2 Patienten mit dem histopathologischen Befund eines anaplastischen Astrozytoms, 2 Patienten mit nur Merkmalen eines Glioblastoms, 2 mit Gliosarkom und 1 Patient mit einem Riesenzellglioblastom.

Bei den 83 eingeschlossenen Patienten wurde der Anti-CMV-Serostatus einmalig nach der Operation und im Rahmen der routinemäßigen Laborkontrollen durch Blutentnahme bestimmt. Diese Blutentnahmen erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Therapieplan der Patienten, entweder nach dem zweiten Rezidiv oder bei Erstdiagnose (ED). Die zeitlichen Unterschiede bei der Durchführung der Blutentnahme resultierten zum Teil daraus, dass die Studie bei einigen Patienten zeitlich versetzt nach der Erstdiagnose begann. Darüber hinaus wurden einige Patienten kurzfristig entlassen, sodass die Blutentnahme erst Wochen bis Monate später im Rahmen der ambulanten Wiedervorstellung zur Kontrolle im universitären Zentrum für Tumorerkrankungen (UCT) erfolgen konnte.

Die regelmäßigen Follow-ups alle 3 Monate erfolgten bei allen Patienten, mit Ausnahme einer Patientin, bis der Tod eintrat oder eine ‚best supportive care‘ Therapie (BSC) beschlossen wurde. 10 Patienten stellten sich nach Beschluss einer BSC-Therapie nicht mehr im UCT vor, und eine weitere Patientin stellte sich wahrscheinlich aus psychischen Gründen nicht mehr vor.

Zur Bestimmung der Prävalenz einer CMV-Infektion außerhalb der Glioblastom-Kohorte wurde eine Kontrollgruppe aus 106 Patienten ohne gliale Tumoren, hauptsächlich mit degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen, herangezogen.

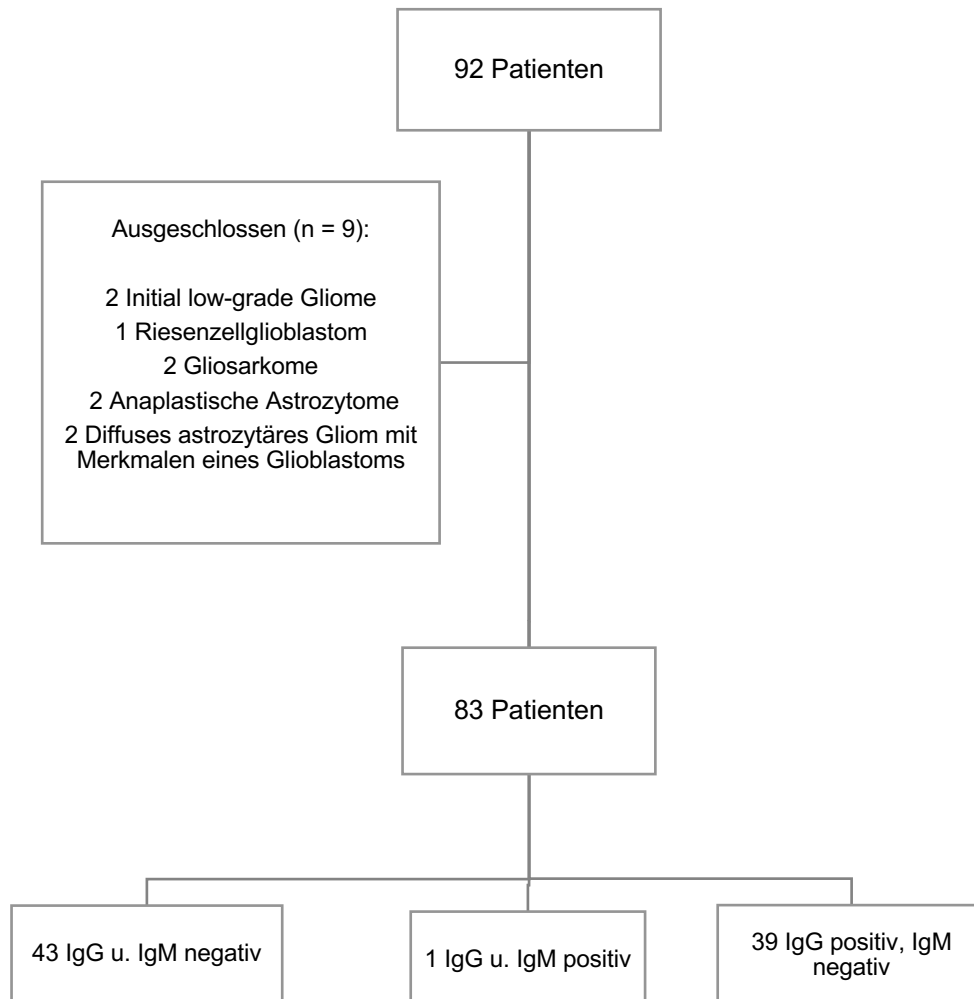


Abbildung 2: Patientenscreening

### 3.4 Anti-CMV-IgG-Bestimmung

Hierzu wurde im Rahmen der Routinelaborkontrollen einmalig Serummaterial aus dem peripheren Blut gewonnen. Die Patienten befanden sich entweder postoperativ auf den neurochirurgischen Stationen der Universitätsmedizin Mainz oder in der Ambulanz des UCTs. Die Bestimmung des Anti-CMV-IgG- und -IgM-Serostatus erfolgte mittels ELISA durch Kollegen des Zentrallabors in der Universitätsmedizin Mainz. CMV-spezifische Antigene wurden auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Kontrollen oder Testproben wurden in die

Vertiefungen oder die sogenannten Wells gegeben und inkubiert. Während der Inkubation wurden CMV-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden. Als Nächstes wurden die Wells gewaschen, um alle ungebundenen menschlichen Anti-Antigen-Antikörper (Ig) zu entfernen. Ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiertes Anti-Human-Ig-Konjugat wurde in die Wells gegeben. Während einer zweiten Inkubation band dieses Konjugat spezifisch IgG-Antikörper, was zur Bildung enzymgebundener Immunkomplexe führte. Nach einem zweiten Waschschrift zur Entfernung ungebundenen Konjugats wurden die gebildeten Immunkomplexe (bei positiven Ergebnissen) durch Inkubation mit Tetramethylbenzidine-(TMB)-Substrat und Entwicklung einer blauen Farbe nachgewiesen. Die blaue Farbe änderte sich nach Zugabe einer sauren Stopplösung (z. B. Schwefelsäure) in Gelb um. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zur Menge an CMV-spezifischen IgG-Antikörpern in der Patientenprobe. Die optische Dichte bei 450 nm wurde mit einem ELISA-Mikrotiterplattenlesegerät abgelesen. Die Stichproben haben als positiv gegolten, wenn das Verhältnis  $> 6$  IU/ml betrug, und als negativ, wenn das Verhältnis darunter lag.

### 3.5 Statistische Verfahren

Die erhobenen Daten wurden retrospektiv anonymisiert ausgewertet. Verglichen wurden der gemessene Anti-CMV-IgG-Serostatus und die -Konzentration nach der histopathologischen Diagnosesicherung mit den erhobenen Verlaufsparemtern PFS und OS. Die statistischen Analysen wurden mit der SPSS-Version 27.0 durchgeführt. Überlebenskurven wurden für das OS und PFS unter Verwendung der Kaplan-Meier-Schätzungen erstellt und mit dem Log-Rank-Test verglichen. Die Cox-Regression-Methode wurde verwendet, um HR und 95%-CI für den Vergleich der zwei Serostatus-Gruppen und der vier Anti-CMV-Serum-Konzentrationen zu berechnen, wobei für MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, Ausmaß der Resektion sowie ECOG vor Beginn und bei Abschluss der RCT adjustiert wurde. Berücksichtigt wurden dabei:

- I. Das Vorhandensein eines Tumorrests bei den Patienten
- II. Der AZ der Patienten nach der Operation und vor Beginn der adjuvanten Therapie
- III. Der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus
- IV. Abgeschlossene RCT

## 4 Datenanalyse und Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik

Von den 83 untersuchten Patienten waren 34 weiblich und 49 männlich. Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer betrug 65 Jahre ( $\pm$  13). Bei allen 83 eingeschlossenen Patienten wurde ein operativer Eingriff zur Gewinnung histopathologischer Präparate und Diagnosesicherung durchgeführt. Das Ausmaß der Resektion unterschied sich jedoch je nach AZ des Patienten und Lage des Tumors. Eine größtotale Resektion ohne makroskopisch sichtbare Tumorresiduen konnte bei 56,6 % der Patienten erreicht werden. Bei 34,9 % der Patienten erfolgte eine Teilresektion und bei 8,4 % der Patienten lediglich eine Biopsie. Somit gab es in den postoperativen MRT-Bildern bei 56,6 % keinen Anhalt auf einen Tumorrest und bei 43,3 % konnten Anzeichen auf einen solchen detektiert werden.

Der MGMT-Promotor war bei 34 Patienten (41 %) methyliert und bei 49 (59 %) nicht methyliert. 74 % der Patienten haben die primäre Resektion ohne Komplikationen überstanden. Bei 19,3 % sind Minor-Komplikationen aufgetreten und 6 % erlitten Major-Komplikationen. Komplikationen, die den ECOG-Status auf 2 oder höher verschlechterten, wurden dabei als Major bezeichnet, vorausgesetzt, dass der präoperative ECOG-Status 0 oder 1 betrug. Kleinere Ischämien, Wortfindungsstörungen und revisionsbedürftige Wundheilungsstörungen wurden als Minor-Komplikationen bewertet. Zu den Major-Komplikationen gehörten u. a. große postoperative Infarkte, Vigilanzminderung unklarer Genese und Paresen. 84,21 % der Patienten, bei denen der Tumor teil- oder vollständig reseziert wurde, erhielten eine adjuvante RCT. Bei 15,79 % der Patienten war dies nicht möglich.

Die Entscheidung bezüglich der adjuvanten Therapie wurde individuell anhand des postoperativen ECOG- und des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus getroffen. Eine Teilnahme an einer RCT setzte u. a. einen guten ECOG-Status voraus. Insgesamt erhielten 79,5 % eine kombinierte RCT, die sich in Dosis und Intensität unterschied. Davon erhielten 45,8 % der Patienten eine kombinierte RCT nach dem Stupp-Protokoll, 8,4 % eine sequentielle RCT-Therapie, 9,6 % eine hypofraktionierte RCT, 6 % nur eine RCT und 3,65 % nur eine Chemotherapie. 8,4 % wurden in der CeTeG-Studie und 4,8 % in der N2M2-Studie eingeschlossen. 13,3 % erhielten nur supportive Maßnahmen.

17,3 % der Patienten, die an einer RCT teilnahmen, entwickelten im Laufe der adjuvanten Therapie handlungsbedürftige Komplikationen. Diese beruhten hauptsächlich auf den myelosuppressiven Effekten der Chemotherapeutika und präsentierten sich in Form von Thrombozytopenien und Leukopenien. In der Folge wurde die Chemotherapie pausiert und nach Stabilisierung des Blutbildes fortgesetzt. Lediglich eine Patientin entwickelte aufgrund

der Neutropenie nach dem ersten Zyklus TMZ einen septischen Schock, weswegen ein Chemotherapie-Wechsel auf CCNU erfolgte.

52 % der Patienten (n = 35), die mit einer adjuvanten RCT angefangen hatten (n = 67), konnten die Therapie vor einem Tumorprogress bzw. -rezidiv erfolgreich abschließen, d. h., 47 % der Patienten zeigten einen Tumorprogress oder ein -rezidiv unter laufenden RCT (n = 32). Bei 51,8 % der Patientenkohorte (n = 43) konnte keine Anti-CMV-IgG im Serum nachgewiesen werden. Bei ca. 48 % (n = 40) konnten hingegen Anti-CMV-IgG in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt werden. Darunter gab es nur bei einer Patientin Anhalt auf eine akute Infektion, deren Serum sowohl Anti-CMV-IgG- als auch -IgM-positiv war. Die Kontrollgruppe bestätigte mit 61,3 % seropositiven und 38,7 % seronegativen Ergebnissen die epidemiologische Datenlage bezüglich der Durchseuchungsrate in der Bevölkerung.

*Tabelle 2: Patienten-Charakteristika (n = 83)*

Charakteristika (N = 83)		N (%)	IgG- (%)	IgG+ (%)
Geschlecht	Männlich	49 (59)	26 (60,5)	23 (57,5)
	Weiblich	34 (41)	17 (39,5)	17 (42,5)
ECOG bei Admission	0	3 (3,6)	3 (7,0)	0 (0,0)
	1	20 (24,1)	10 (23,3)	10 (25,0)
	2	28 (33,7)	14 (32,6)	14 (35)
	3	26 (31,3)	13 (30,2)	13 (32,5)
	4	6 (7,2)	3 (7,0)	3 (7,5)
Ausmaß der Resektion	Nur Biopsie	7 (8,4)	4 (9,3)	3 (7,5)
	Partielle Resektion	29 (34,9)	14 (32,6)	15 (37,5)
	Gross totale Resektion	47 (56,6)	25 (58,1)	22 (55,0)
Postoperative Komplikationen	Keine	62 (74,7)	32 (74,4)	30 (75,0)
	Minor	16 (19,3)	9 (20,9)	7 (17,5)
	Major	5 (6,0)	2 (4,7)	3 (7,5)
ECOG nach Resektion	0	9 (10,8)	4 (9,3)	5 (12,5)
	1	25 (30,1)	15 (34,9)	10 (25,0)
	2	22 (26,5)	9 (20,9)	13 (32,5)
	3	16 (19,3)	10 (23,3)	6 (15,0)
	4	11 (13,3)	5 (11,6)	

MGMT-Promotor-Methylierungsstatus	Methyliert	34 (41,0)	18 (41,9)	16 (40,0)
	Nicht-Methyliert	49 (59,0)	25 (58,1)	24 (60,0)
Radiocheotherapie	Nein	17 (20,5)	5 (11,6)	12 (30,0)
	Ja	66 (79,5)	38 (88,4)	28 (70,0)
Komplikation bei der Radiochemotherapie	Nein	67 (82,7)	35 (83,3)	32 (82,1)
	Ja	14 (17,3)	7 (16,7)	7 (17,9)
Progress unter adjuvante Therapie	Ja	32 (39,5)	17 (40,5)	15 (38,5)
	Nein	35 (43,2)	18 (42,9)	17 (43,6)
	Palliatives	14 (17,3)	7 (16,7)	7 (17,9)
	Therapiekonzept			

Unter den Patienten mit einer nachweisbaren Menge an Anti-CMV-IgG (n = 40) konnten bei 39 Patienten unterschiedliche Konzentrationen an IgG festgestellt werden. Die unterste Grenze lag bei 6 UI/ml und die oberste Grenze lag bei 250 UI/ml. Die Ergebnisse wurden in drei Gruppen unterteilt, und für jede Gruppe wurden, wie in Tabelle 3 dargestellt, Grenzen gesetzt. Nach diesem Schema wiesen 17 Patienten sehr hohe CMV-spezifische IgG-Konzentrationen auf, 15 hohe/moderate Konzentrationen und 7 niedrige Konzentrationen.

Tabelle 3 Anti-CMV-IgG-Serumkonzentration: Subgruppenreferenzen

<b>Gruppe</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Anzahl</b>
<b>Sehr hoch</b>	210 < [Serum-Anti-CMV-IgG] < 250 UI/ml	N = 17
<b>Moderat/hoch</b>	50 < [Serum-Anti-CMV-IgG] < 211 UI/ml	N = 15
<b>Niedrig</b>	6 < [Serum-Anti-CMV-IgG] < 50 UI/ml	N = 7

## 4.2 Survival-Analysen

Beim Betrachten der gesamten Population (n = 83) und ohne Berücksichtigung anderer Einflussfaktoren konnte keinen signifikanten Unterschied im OS ( $p = 0,8$ ) und PFS ( $p = 0,78$ ) zwischen seronegativen und seropositiven Patienten festgestellt werden. Dies könnte auf die Heterogenität der Gesamtpopulation zurückzuführen sein, da Faktoren wie MGMT-Methylierungsstatus, ECOG, Ausmaß der Resektion und adjuvante Therapie ebenso Einfluss auf PFS und OS haben.

#### 4.2.1 PFS

Für die progressfreie Überlebensanalyse anhand des IgG-Serostatus wurden 72 Patienten mit bekanntem PFS (in Tagen) eingeschlossen. Davon war die Hälfte ( $n = 36$ ) seropositiv und die andere Hälfte seronegativ. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Kaplan-Meier-Kurve präsentiert. Die seropositive (grüne Linie) und die seronegative Gruppe (rote Linie) zeigen allerdings einen ähnlichen Verlauf mit steilem Abfall in beiden Gruppen. Die mediane progressionsfreie Überlebenswahrscheinlichkeit in der seronegativen Gruppe betrug 177 Tage (95% CI: 147–207 Tage) und in der seropositiven Gruppe 169 Tage (95% CI: 89–248 Tage).

Der Log-Rank-Test zeigte auch, dass kein signifikanter Unterschied in den Überlebensverteilungen zwischen den Anti-CMV-IgG-negativen und -positiven Gruppen vorliegt ( $p = 0,786$ ). Die Überlebenskurven bestätigen diesen Befund, da die Unterschiede im PFS zwischen beiden Gruppen minimal ausfallen.

Im nächsten Schritt erfolgte die progressfreie Überlebensanalyse anhand der IgG-Konzentration. Für diese Analyse wurde eine Person aufgrund eines fehlenden Konzentrationswertes ausgeschlossen und die Analyse erfolgte anhand von Daten von 71 Patienten mit bekanntem PFS (in Tagen). Davon zeigten 15 Patienten sehr hohe Konzentrationen, 14 Patienten moderat bis hohe Konzentrationen, 6 Patienten sehr niedrige Konzentrationen und 36 Patienten keine nachweisbaren Konzentrationen (seronegativ). Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Kaplan-Meier-Kurve präsentiert. Die mediane progressionsfreie Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe mit sehr hohen Konzentrationen betrug 339 Tage (95% CI: 276–402 Tage), in der Gruppe mit moderat bis hohen Konzentrationen 121 Tage (95% CI: 73–169 Tage), in der Gruppe mit sehr niedrigen Konzentrationen 133 Tage (95% CI: 77–190 Tage) und in der seronegativen Gruppe 170 Tage (95% CI: 141–207 Tage).

Die Anti-CMV-IgG-Konzentration im Serum zeigt einen signifikanten Einfluss auf die progressionsfreie Überlebenszeit gemäß dem Log-Rank-Test ( $p = 0,026$ ). Der Kaplan-Meier-Plot deutet darauf hin, dass Patienten mit sehr hoher Konzentration möglicherweise bessere Überlebenswahrscheinlichkeiten haben. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Trends zu bestätigen und deren klinische Bedeutung zu bewerten (siehe Cox-Analyse).

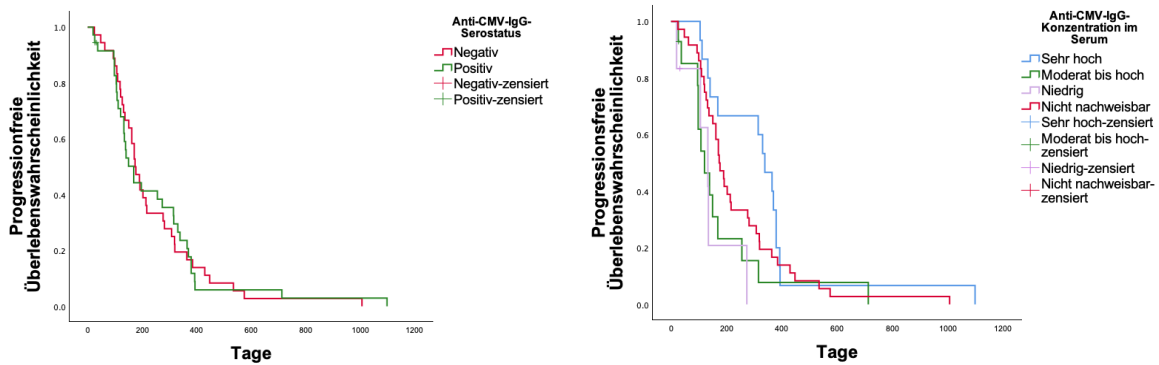


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven für PFS anhand des Anti-CMV-IgG-Serostatus und der -Serumkonzentration

#### 4.2.2 OS

Für die Gesamtüberlebensanalyse anhand des IgG-Serostatus wurden alle 83 Patienten einbezogen, darunter 40 seropositive und 43 seronegative Patienten. Insgesamt wurden 14 Patienten zensiert: darunter 6 Patienten, die bis zum Auswertungsdatum (15.08.2023) noch lebten, eine Patientin, die aus anderen Gründen verstarb (Exitus letalis), 3 Patienten, die sich nicht mehr vorstellten (lost to follow up) und 4 Patienten, bei denen ein palliatives Konzept eingeleitet wurde, jedoch kein Todesdatum vorlag. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die seropositive (grüne Linie) und die seronegative Gruppe (rote Linie) zeigen einen ähnlichen Verlauf mit steilem Abfall in beiden Gruppen. Die mediane Überlebenszeit betrug in der seronegativen Gruppe 421 Tage (95% CI: 311,54–530,46 Tage) und in der seropositiven Gruppe 375 Tage (95% CI: 328,13–421,86 Tage). Der Log-Rank-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Überlebensverteilungen zwischen den Anti-CMV-IgG-negativen und -positiven Gruppen gibt ( $p = 0,68$ ). Die Überlebenskurven bestätigen diesen Befund, da die Unterschiede im OS zwischen den beiden Gruppen minimal ausfallen und keinen signifikanten Unterschied zeigen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Gesamtüberlebensanalyse anhand der IgG-Serumkonzentration. Für diese Analyse wurde eine Person aufgrund eines fehlenden Konzentrationswertes ausgeschlossen und die Analyse erfolgte anhand von 82 Patienten. Die Zensierung fand wie in der PFS-Analyse statt. Von den 82 Patienten zeigten 17 Patienten sehr hohe Konzentrationen, 15 Patienten moderat bis hohe Konzentrationen, 7 Patienten sehr niedrige Konzentrationen und 43 Patienten nicht nachweisbare Konzentrationen (seronegativ). Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Kaplan-Meier-Kurve präsentiert. Die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe mit sehr hohen Konzentrationen betrug 520 Tage (95% CI: 245,36–794,63 Tage), in der Gruppe mit moderat bis hohen Konzentrationen 330 Tage (95% CI: 189,9–470,12 Tage), in der Gruppe mit sehr niedrigen Konzentrationen 241 Tage (95% CI: 211–271 Tage) und in der seronegativen Gruppe 423 Tage (95% CI: 305,5–540,47 Tage). Der Log-Rank-Test zeigt, dass ein signifikanter

Unterschied in den Überlebensverteilungen zwischen den verschiedenen Konzentrationsstufen vorliegt ( $p = 0,033$ ). Die Überlebenskurven bestätigen diesen Befund basierend auf der Konzentration von Anti-CMV-IgG im Serum. Patienten mit sehr hoher Konzentration haben die beste Überlebenswahrscheinlichkeit, während Patienten mit niedriger Konzentration die schlechteste haben. Die Gruppe mit nicht nachweisbarer Konzentration liegt in der Mitte und weist eine bessere Prognose auf als die Gruppen mit niedrig bis hohen Konzentrationen, aber eine schlechtere als die Gruppe mit sehr hoher Konzentration.

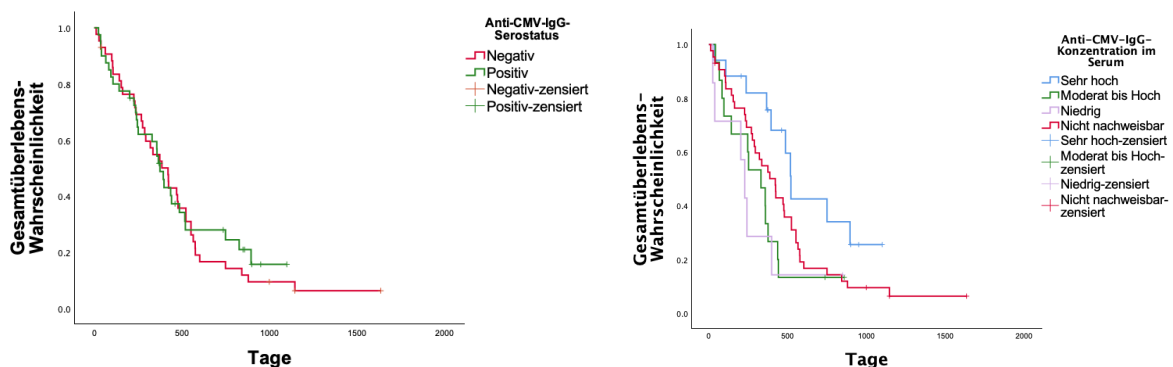


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurven für das OS in Bezug auf Anti-CMV-IgG-Serostatus und -Serumkonzentration

### 4.3 RCT- und MGMT-Promotor-Methylierungsstatus

Der Einfluss des MGMT-Methylierungsstatus auf das OS wurde in den Gruppen mit und ohne abgeschlossene RCT verglichen. In der untersuchten Population wurden die Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen zwei Gruppen verglichen: Patienten mit methylierter und nicht methylierter MGMT-Promotorregion. Diese Population wurde in zwei Hauptkohorten unterteilt: eine mit abgeschlossener RCT und eine ohne.

Für diese Analyse wurden insgesamt 82 Patienten eingeschlossen. Davon hatten insgesamt 49 die RCT abgeschlossen, bevor ein Rezidiv eintrat oder die Therapie aufgrund starker Nebenwirkungen abgebrochen werden musste, wie es bei den restlichen 33 der Fall war. Von den 49 mit abgeschlossener RCT waren 27 nicht methyliert und 22 methyliert und von den 33 Patienten ohne abgeschlossene RCT waren 22 nicht methyliert und 11 methyliert.

In beiden Kohorten zeigten die Überlebenswahrscheinlichkeiten signifikante Unterschiede zugunsten der Patienten mit methylierter MGMT-Promotorregion ( $p = 0,016$ ). Diese Gruppe wies eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit auf, was auf eine positive Reaktion auf die Behandlung in Verbindung mit dem Methylierungsstatus hindeutet.

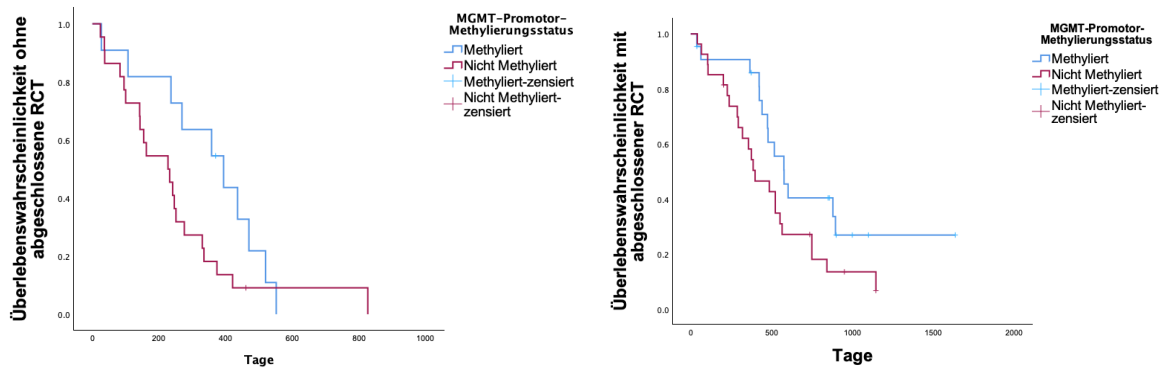
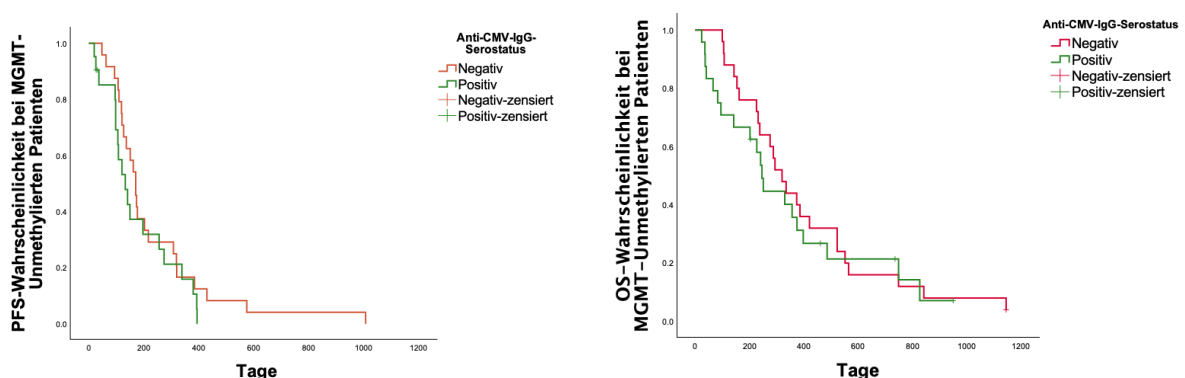


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven für OS bei Patienten mit und ohne abgeschlossene RCT anhand des MGMT-Methylierungsstatus

#### 4.3.1 Survival-Analyse für MGMT-unmethylierte Patienten

Im nächsten Schritt erfolgte die Überlebensanalyse der MGMT-unmethylierten Patienten (n = 45) für PFS und OS jeweils anhand deren Serostatus und IgG-Konzentration. Der Log-Rank-Test für das PFS anhand IgG-Status ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,28$ ) und anhand der IgG-Konzentrationen wurde einen signifikant besseren Verlauf für die hoch konzentrierten (blau) Patienten beobachtet ( $p = 0,003$ ). Die Log-rank-Tests für das OS erbrachten ähnliche Ergebnisse ohne signifikanten Unterschied zwischen seropositiven (grün) und -negativen (rot) Gruppen ( $p = 0,56$ ) und mit signifikanten Unterschieden des OS beim Betrachten der Konzentrationen ( $p = 0,02$ ). Auch hier sind ein längeres OS für hoch konzentrierte Patienten sowie ein besserer Verlauf der seronegativen Gruppe (nicht nachweisbar) (rot) im Vergleich zu den niedrig (lila) und moderat bis hoch (grün) konzentrierten Gruppen erkennbar.



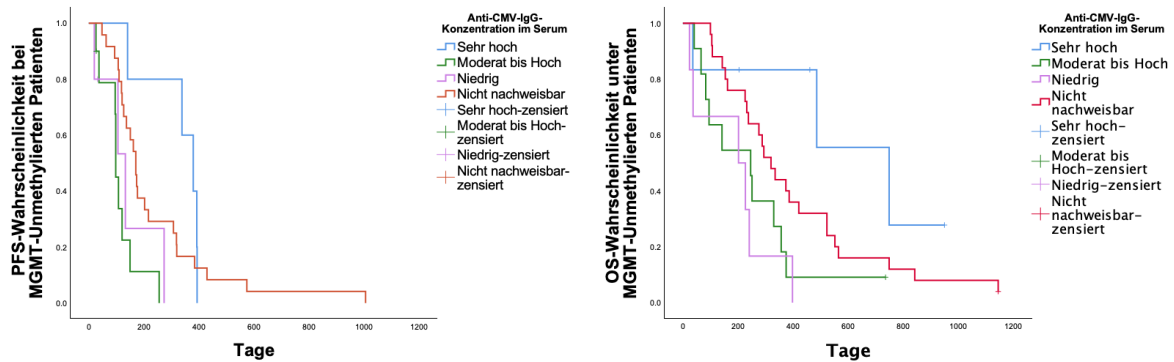


Abbildung 6: PFS und OS unter MGMT-Promotor-unmethylierten Patienten in Bezug auf den Anti-CMV-IgG-Serostatus und die -Serumkonzentration

#### 4.4 Multivariable Cox-Regression-Analyse

In der vorliegenden klinischen Studie wurde eine multivariable Cox-Regression-Analyse durchgeführt, um die zentralen Einflussfaktoren auf PFS und OS zu untersuchen. Dabei wurden Prädiktoren berücksichtigt, die potenziell einen Einfluss auf PFS und OS haben. Zu den in die Analyse einbezogenen Variablen gehörten:

1. Vorhandensein eines Tumorrests bei den Patienten
2. ECOG-Status nach der Operation und vor Beginn der adjuvanten Therapie
3. MGMT-Promotor-Methylierungsstatus
4. Abschluss der kombinierten RCT
5. Anti-CMV-IgG-
  - a. -Serostatus oder
  - b. -Serumkonzentration

##### 4.4.1 Cox-Analyse für das PFS

Für die multivariable Cox-Analyse in Bezug auf das PFS wurden alle 83 Patienten einbezogen. 11 Fälle wurden vom Statistik-Programm ausgeschlossen, da Daten von mindestens einer Kategorie fehlten. Von den verbleibenden 72 Patienten hatten 42 eine vollständige Resektion ohne Tumorrest und bei 30 war ein Tumorrest vorhanden. 27 Patienten waren methyliert und 45 nicht methyliert. 45 Patienten hatten die RCT vor einem Progress oder Rezidiv abgeschlossen, 27 nicht. Der Anti-CMV-IgG-Serostatus fiel bei der Hälfte der Patienten (n = 36) positiv und bei der anderen Hälfte negativ aus.

Der Omnibus-Test der Modellkoeffizienten zeigt, dass das Modell insgesamt signifikant ist ( $p < 0,01$ ). Dies deutet darauf hin, dass das Modell eine gelungene Anpassung an die Daten

aufweist und die eingeschlossenen Prädiktoren insgesamt einen signifikanten Beitrag zur Erklärung der Varianz der abhängigen Variable leisten.

Der Abschluss der RCT und Tumorrest sind die einzigen signifikanten Prädiktoren in Bezug auf das PFS. Der Tumorrest führt einen negativen Koeffizienten, was darauf hindeutet, dass ein größerer Tumorrest mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines verkürzten PFS verbunden ist (s. Tabelle 4). Der Serostatus scheint hier keinen signifikanten Einfluss auf das PFS zu haben.

	B	SE	Wald	Df	Signifikanz	Exp(B)	95% CI für Exp(B)	
							Untere	Obere
Tumorrest	-0.694	0.277	6.265	1	0.012	0,500	0,290	0,860
MGMT-Methylierungsstatus	-,0428	0,266	2,582	1	0,108	0,652	0,387	1,099
ECOG nach der Resektion	0,228	0,132	2,972	1	0,085	1,256	0,969	1,627
RCT abgeschlossen	0,906	0,294	9,476	1	0,002	2,474	1,39	4,405
Anti-CMV-IgG-Serostatus (+ vs. -)	-0,002	0,258	,000	1	0,993	0,998	0,602	1,653

*Tabelle 4 Multivariable Cox-Regression-Analyse für PFS in Bezug auf IgG-Serostatus (n = 72)*

Im nächsten Schritt erfolgte die multivariable Cox-Analyse für das PFS anhand der Anti-CMV-IgG-Konzentration. Auch hier musste eine Person aufgrund des fehlenden Anti-CMV-IgG-Konzentrationswertes und 11 mussten aufgrund fehlenden Daten ausgeschlossen werden, sodass letztendlich Daten von 71 Patienten berücksichtigt werden konnten (s. Tabelle 5).

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Tumorrest (B = -0,709, p = 0,015) und der Abschluss der RCT (B = 0,977, p = 0,002) signifikant das PFS beeinflussen, wobei eine abgeschlossene RCT das Risiko reduziert und ein Tumorrest das Risiko erhöht (da bei der Kodierung der Daten ‚Vorhandensein eines Tumorrests‘ mit 1 kodiert und 0 für ‚fehlender Tumorrest‘ verwendet wurde, ist die Relation negativ). Der ECOG-Status nach der Resektion (B = 0,299, p = 0,029) ist ebenfalls signifikant und zeigt, dass ein schlechterer Status das Risiko erhöht. Der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (B = -0,425, p = 0,128) fällt nicht signifikant aus. Die Anti-CMV-IgG-Konzentration im Serum, kodiert in vier Kategorien (sehr hoch, moderat bis hoch, niedrig, nicht nachweisbar), zeigt, dass insbesondere niedrige Konzentrationen (B =

1,427,  $p = 0,006$ ) mit einem signifikant erhöhten Risiko verbunden sind, wobei die nicht nachweisbare Konzentration als Referenzkategorie verwendet wurde.

	B	SE	Wald	Df	Signifikanz	Exp(B)	95% CI für Exp(B)	
							Untere	Obere
Tumorrest	-0.709	0.290	5,972	1	0.015	0,492	0,279	0,869
MGMT-Methylierungsstatus	-,0425	0,279	2,319	1	0,128	0,654	0,378	1,130
ECOG nach der Resektion	0,299	0,137	4,733	1	0,029	1,349	1,031	1,764
RCT abgeschlossen	0,977	0,312	9,793	1	0,002	2,657	1,441	4,899
Anti-CMV-IgG-negativ (Referenz)			13.237	3	0,004			
Anti-CMV-IgG-Konz.: <i>Sehr hoch</i>	-0,558	0,337	2,740	1	0,098	0,572	0,295	1,108
<i>Moderat bis hoch</i>	0,492	0,353	1,941	1	0,164	1,636	0,818	3,271
<i>Niedrig</i>	1,427	0,520	7,527	1	0,006	4,165	1,503	11,539

Tabelle 5: Multivariable Cox-Regression-Analyse für PFS in Bezug auf IgG-Serum-Konzentration ( $n = 71$ )

#### 4.4.2 Cox-Analyse für das OS

Von den 83 eingeschlossenen Patienten konnten 73 (88,0 %) in die Analyse des OS einbezogen werden, während 10 Fälle (12,0 %) aufgrund fehlender Werte (wie Todesdatum) nicht verwendet werden konnten. Die meisten verfügbaren Fälle (68,7 %) verfügten über ein dokumentiertes Ereignis (Tod), während 19,3 % zensiert wurden.

	B	SE	Wald	Df	Signifikanz	Exp(B)	95% CI für Exp(B)	
							Untere	Obere
Tumorrest	-0,980	0,325	9,086	1	0,003	0,375	0,199	0,710
MGMT- Methylierungsstatus	-1,112	0,311	12,783	1	<0,001	0,329	0,179	0,605
ECOG nach der Resektion	0,580	0,146	15,729	1	<0,001	1,787	1,341	2,380
RCT abgeschlossen	1,172	0,314	13,906	1	<0,001	3,228	1,744	5,976
Anti-CMV-IgG- Serostatus (+ vs. -)	-,058	0,280	0,042	1	0,837	0,944	0,545	1,634

*Tabelle 6: Multivariable Cox-Regression-Analyse für das OS mit dem Anti-CMV-Serostatus*

Der Tumorrest zeigt einen signifikanten negativen Einfluss auf das OS ( $B = -0,980$ ,  $p = 0,003$ ), wobei das Fehlen eines Tumorrests das Sterberisiko um etwa 62,5 % reduziert ( $\text{Exp}(B) = 0,375$ ). Der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus hat ebenfalls einen signifikanten Einfluss ( $B = -1,112$ ,  $p < 0,001$ ), wobei eine Methylierung mit einem um 67,1 % reduzierten Sterberisiko verbunden ist ( $\text{Exp}(B) = 0,329$ ). Der ECOG-Status nach der Resektion zeigt einen signifikanten positiven Einfluss ( $B = 0,580$ ,  $p < 0,001$ ), was bedeutet, dass ein höherer ECOG-Status das Sterberisiko um etwa 78,7 % erhöht ( $\text{Exp}(B) = 1,787$ ). Der Abschluss der RCT hat einen starken signifikanten Einfluss auf das OS ( $B = 1,172$ ,  $p < 0,001$ ), wobei der Abschluss der Therapie das Sterberisiko um das 3,228-fache senkt. Der Anti-CMV-IgG-Serostatus zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das OS ( $B = -0,058$ ,  $p = 0,837$ ). Insgesamt identifiziert die Analyse den Tumorrest, den MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, den ECOG-Status und den Abschluss der RCT als signifikante Prädiktoren für das OS, während der Anti-CMV-IgG-Serostatus keinen signifikanten Einfluss zeigt.

Im nächsten Schritt erfolgte die multivariable Cox-Analyse für das OS anhand der Anti-CMV-IgG-Konzentration. Von den 83 insgesamt betrachteten Fällen waren 72 (86,7 %) für die Analyse verfügbar, wobei 56 Fälle (67,5 %) ein Ereignis (Tod) aufwiesen und 16 Fälle (19,3 %) zensiert wurden. Acht Fälle (9,6 %) konnten aufgrund fehlenden Todesdatums nicht verwendet werden und drei weitere Fälle (3,6 %) wurden ausgeschlossen, da sie zensiert wurden, bevor das früheste Ereignis in der Analyse auftrat. Insgesamt wurden somit 11 Fälle (13,3 %) nicht in die Analyse einbezogen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Tumorrest ( $B = -0,878$ ,  $p = 0,010$ ), der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus ( $B = -1,042$ ,  $p = 0,002$ ), der ECOG-Status nach der

Resektion (B = 0,565, p < 0,001) und der Abschluss der RCT (B = 1,226, p < 0,001) signifikante Prädiktoren für das OS darstellen. Eine MGMT-Methylierung, das Fehlen eines Tumorrestes und der Abschluss der RCT zeigen dabei bessere Ergebnisse an. Auch hier ist zu sehen, dass die Anti-CMV-IgG-Konzentration im Serum, insbesondere niedrige Konzentrationen (Kategorie 3), signifikant mit einem erhöhten Risiko (B = 1,746, p = 0,002) verbunden ist, wobei die nicht nachweisbare Konzentration (negativer Status) als Referenzkategorie dient (s. Tabelle 7).

	B	SE	Wald	Df	Signifikanz	Exp(B)	95% CI für Exp(B)	
							Untere	Obere
Tumorrest	-0.878	0.339	6,709	1	0.010	0,416	0,214	0,808
MGMT-Methylierungsstatus	-1,042	0,328	10,064	1	0,002	0,353	0,185	0,672
ECOG nach der Resektion	0,565	0,154	13,536	1	<0,001	1,760	1,302	2,377
RCT abgeschlossen	1,226	0,358	11,742	1	<0,001	3,407	1,690	6,870
Anti-CMV-IgG-negativ (Referenz)			10,002	3	0,019			
Anti-CMV-IgG-Konz.: <i>Sehr hoch</i>	-0,199	0,392	0,257	1	0,612	0,820	0,380	1,768
<i>Moderat bis hoch</i>	0,073	0,396	0,034	1	0,854	1,076	0,495	2,337
<i>Niedrig</i>	1,746	0,575	9,233	1	0,002	5,731	1,858	17,671

Tabelle 7: Multivariable Cox-Regression-Analyse für das OS mit der Anti-CMV-Serum-Konzentration

#### 4.5 Tumorprogress und Second-Line-Therapie

Im Verlauf zeigten Anti-CMV-IgG-seropositive und -negative Kohorten einen ähnlichen Verlauf bezüglich eines Tumorprogresses unter adjuvanter Therapie, wie im untenstehenden Diagramm präsentiert. Insgesamt haben von den seronegativen Patienten 24,1 % keine Second-Line-Chemotherapie benötigt, 20,5 % erhielten Lomustin, 6,02 % TMZ-Rechallenge und 1,2 % Pembrolizumab. Von den seropositiven Patienten benötigten 19,3 % keine Second-Line-Chemotherapie, 25,3 % erhielten Lomustin und 3,6 % TMZ.

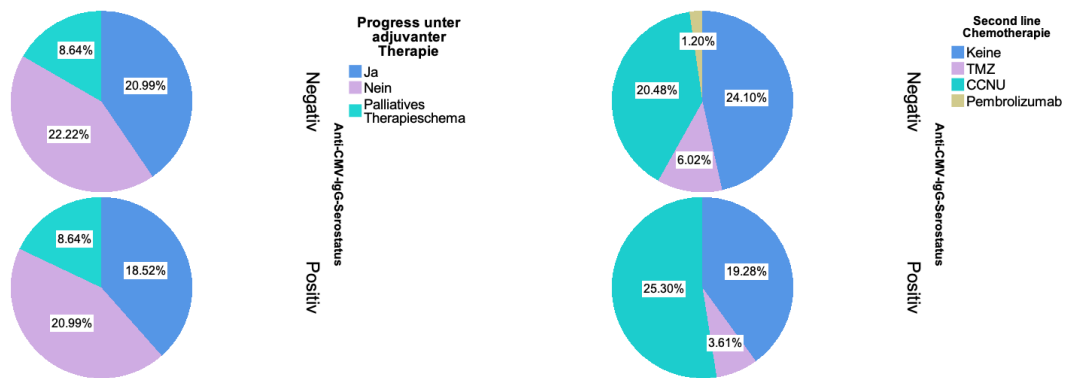


Abbildung 7: Progress vor Beendigung der adjuvanten Therapie und Second-Line-Chemotherapie anhand des Serostatus

## 5 Diskussion der Ergebnisse

### 5.1 CMV-Prävalenz und der Einfluss auf das PFS und OS

Die Anti-CMV-Seropositivitätsverteilung in unserer Patientenkohorte lag bei ca. 54 % seronegativen und 46 % seropositiven Patienten und entsprach damit den Ergebnissen der Studie von Cobbs et al., die eine Seropositivitätsrate von 51 % bei Glioblastom-Patienten berichteten (19). In der Kontrollgruppe wurden 61,3 % seropositive und 38,7 % seronegative Ergebnisse gefunden, was die epidemiologische Datenlage zur CMV-Durchseuchungsrate in der Allgemeinbevölkerung bestätigt. Diese hohe Durchseuchungsrate erschwert jedoch die Ableitung kausaler Zusammenhänge zwischen einer CMV-Infektion und dem Auftreten von Glioblastomen. Darüber hinaus wurde die Kausalitätsthese in einem Tierversuch widerlegt (58).

Die primäre Fragestellung dieser Studie lautete, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anti-CMV-IgG-Serostatus und dem OS bei Patienten mit Glioblastom besteht. Als primärer Endpunkt wurde das PFS, und als sekundärer Endpunkt das OS nach der Diagnose für jeden Patienten festgelegt. Mithilfe der multivariablen Cox-Analyse wurden die HR und das CI zum Vergleich der Anti-CMV-IgG-Serostatus-Gruppen berechnet. Diese Methode ermöglichte es, den Einfluss des Serostatus auf das PFS und OS zu bewerten, während gleichzeitig potenziell störende Variablen wie Tumorstadium, MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und der ECOG-Status nach der Resektion sowie nach Abschluss der RCT adjustiert wurden. Dies stellte sicher, dass die beobachteten Unterschiede im Überleben tatsächlich auf den Serostatus zurückzuführen waren und nicht durch andere Faktoren verfälscht wurden.

Bei Betrachtung der gesamten Population (n = 83) und ohne Berücksichtigung anderer Einflussfaktoren konnten keine signifikanten Unterschiede im OS (p = 0,8) und PFS (p = 0,68)

zwischen seronegativen und seropositiven Patienten festgestellt werden. Diese Ergebnisse widersprechen teilweise den bisherigen Erkenntnissen (19). In der genannten Studie wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im OS zwischen den seropositiven und seronegativen Gruppen bei MGMT-methylierten Patienten gefunden. Die Autoren berichteten jedoch von einem signifikant verlängerten OS der seronegativen Patienten sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der MGMT-unmethylierten Gruppe. In unserer Arbeit konnte im Hinblick auf das OS und das PFS bei MGMT-unmethylierten Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen seropositiven und seronegativen Gruppen beobachtet werden. Es ist jedoch anzumerken, dass unsere Kohorte weniger als die Hälfte der Teilnehmer der genannten Studie umfasst (n = 83 vs. n = 188).

Im nächsten Schritt wurden die Anti-CMV-seropositiven Patienten anhand ihrer Anti-CMV-IgG-Konzentrationen in Untergruppen aufgeteilt. Diese Aufteilung unterscheidet unsere Studie von bisherigen Arbeiten mit ähnlichen Fragestellungen und erschwert einen direkten Vergleich der Ergebnisse.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anti-CMV-IgG-Serumkonzentration ein signifikanter Prädiktor für PFS und OS bei Patienten mit Glioblastom sein könnte. Patienten mit sehr hohen Anti-CMV-IgG-Konzentrationen wiesen die besten Überlebenszeiten auf ( $p < 0,05$ ), während Patienten mit niedrigeren Konzentrationen die schlechtesten Überlebenszeiten zeigten (Log-Rank:  $p = 0,033$  und in der Cox-Analyse:  $p = 0,002$ ). Seronegative Patienten zeigten bessere Überlebenszeiten als die Gruppe mit niedriger Konzentration, jedoch schlechtere Überlebenszeiten als die Gruppe mit sehr hoher Konzentration. Diese Ergebnisse konnten in einer kleineren Kohorte von MGMT-Promotor-unmethylierten Patienten bestätigt werden. In den Überlebensanalysen der MGMT-Promotor-unmethylierten Patienten zeigte sich sowohl für das OS als auch für das PFS ein besserer Verlauf bei Patienten mit hohen IgG-Konzentrationen. Seronegative Patienten zeigten zudem einen besseren Verlauf im Vergleich zu niedrigkonzentrierten, seropositiven Patienten ( $p$ -Werte 0,02 und 0,003).

In klinischen Studien mit pp65-gepulsten dendritischen Zell-Impfstoffen wurde ein signifikanter Vorteil der Therapiegruppen hinsichtlich des OS und PFS beobachtet (27). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine ausreichende Immunität gegen CMV und dessen Proteine einen positiven Einfluss auf das Outcome dieser Patienten haben könnte. Unsere Ergebnisse stützen diese Hypothese und weisen darauf hin, dass CMV eine Rolle bei der Progression des Glioblastoms spielen könnte und die Anti-CMV-IgG-Serumkonzentration als potenzieller Marker für die Prognose verwendet werden könnte.

Das Betrachten der Anti-CMV-IgG-Serumkonzentration wurde bisher in keiner Studie über gliale Tumoren genauer untersucht. Ein längeres PFS bei Patienten mit sehr hohen Anti-CMV-IgG-Konzentrationen im Serum wurde jedoch in einer Studie über Patienten mit malignem

Melanom beschrieben (78). Es wird spekuliert, dass Tumor-neo-Epitope möglicherweise Ähnlichkeiten mit CMV-Epitopen aufweisen. Diese Mimikry könnte das Immunsystem begünstigen, indem Tumorzellen erkennbarer gemacht werden. Eine bessere Erkennung durch spezifische Immunglobuline könnte dazu beitragen, die Tumorzellen zu unterdrücken und die progressionsfreien Intervalle zu verlängern. Eine alternative Erklärung für diese Beobachtung könnte in einem grundsätzlich stärkeren Immunsystem der Patienten mit hohen IgG-Konzentrationen liegen. Die schlechtere Prognose bei Patienten mit niedrigen Anti-CMV-IgG-Serumkonzentrationen könnte auf ein generell schwächeres Immunsystem hinweisen. Eine niedrige IgG-Konzentration könnte auf eine unzureichende Immunantwort hindeuten, was zu einer schnelleren Tumorprogression und einer ungünstigeren Prognose führt.

Auf Basis dieser Ergebnisse könnte ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Studien darin bestehen, den Einfluss der intrathekalen oder intravenösen Gabe von Anti-CMV-IgG in Glioblastom-Mausmodellen zu untersuchen. Sollte sich unsere Hypothese bestätigen, könnte dies zu einer Verlängerung des PFS und OS nach intrathekalen Gabe von Anti-CMV-IgG führen.

## 5.2 Kritische Betrachtung des Studiendesigns

### 5.2.1 Bestimmung des Anti-CMV-Serostatus in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung

Eine Studie von Goerig et al. zeigte, dass CMV während einer RCT reaktiviert werden kann, was zu Virämie und weiteren Folgeerscheinungen einschließlich einer möglicherweise tödlichen Enzephalitis führt (115). Die Bestimmung des CMV-Serostatus fand bei den vorliegenden Patienten zu uneinheitlichen Zeitpunkten statt. Diese hätte nach der Tumorsektion und vor Beginn der adjuvanten Therapie durchgeführt werden müssen, was allerdings nicht bei allen Patienten möglich war, da zu Beginn der Studie (Januar 2021) viele von diesen bereits mit der adjuvanten Therapie begonnen hatten. Außerdem war eine Blutentnahme bei einigen Patienten aus logistischen Gründen nicht direkt bei der Diagnosestellung möglich, da die Entlassung wenige Tage nach der Resektion stattfand und die Serumbestimmung erst bei Wiedervorstellung in der UCT durchgeführt werden konnte. Bei manchen Patienten lag die ED bereits bis zu 2 Jahre zurück, weshalb diese sich in weiteren Stadien der Erkrankung befanden und bereits mehrere RCT-Zyklen durchlaufen hatten. Bei diesen Patienten erfolgte trotzdem die CMV-Serumuntersuchung und die Krankengeschichte wurde aus den Krankenakten retrospektiv gewonnen.

## 5.2.2 Heterogene Patientengruppen

Heterogene Patientengruppen lassen sich im klinischen Rahmen nicht vermeiden, vor allem wenn die Erkrankung eine niedrige Inzidenz aufweist. Glioblastome mit einer Inzidenz von ca. 3,2 pro 100 000 Einwohner zählen zu einer der seltensten Tumorerkrankungen (3). Die Patienten befinden sich bei der ED in unterschiedlichem AZ und Alter und weisen unterschiedliche molekulare Eigenschaften auf, die den weiteren Therapieverlauf beeinflussen. Jede Subgruppierung zur Erhöhung der Homogenität führt somit zu einer noch kleineren Population mit weiterhin bestehenden Unterschieden, wie Geschlecht, Resektionsausmaß, komplizierter Verlauf der Therapie etc. Beispielsweise wurde eine Subgruppe mit Patienten, die mit dem gleichen Chemotherapeutikum, TMZ, behandelt worden sind, bezüglich der Effekte einer systemischen CMV-Infektion auf PFS und OS separat analysiert. In dieser Gruppe (n = 69) bestehen aber unvermeidbare Unterschiede wie MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, Alter, Geschlecht, Resektionsausmaß etc. weiterhin. Eine weitere Herausforderung stellte der Verlauf bei Patienten dar, die nach Abschluss des Stupp-Protokolls ein Rezidiv bekamen und infolgedessen andere Chemotherapeutika wie CCNU oder Regorafenib erhielten. Dies stellte einen anderen Heterogenitätsfaktor im Verlauf und in Bezug auf das OS dar.

### 5.2.2.1 Unterschiedliche Größen der Subgruppen

Durch die Aufteilung von Patienten mit positivem IgG-Serostatus, die ursprünglich etwa die Hälfte der Gesamtkohorte darstellten, in weitere Untergruppen – basierend auf ihrer IgG-Serumkonzentration – entstanden kleinere Subgruppen. Diese wurden anschließend sowohl untereinander als auch mit der seronegativen Gruppe verglichen. Die divergierenden Gruppengrößen erschwerten die Erlangung statistisch belastbarer Ergebnisse.

### 5.2.3 Fehlen eines zweiten Arms mit antiviraler Medikation zum Vergleich bei seropositiven Patienten

In einer randomisierten Phase-I/II-Studie zur Untersuchung von Valganciclovir als zusätzliche Therapieoption bei Patienten mit Glioblastom wurde ein signifikant längeres OS von 24,1 Monaten für die Gruppe festgestellt, die Valganciclovir als Add-on-Therapie für mehr als 6 Monate erhielt, im Vergleich zu 13,1 Monaten für die Gruppe, die ausschließlich die übliche Chemo- und Strahlentherapie erhielt ( $p < 0,0001$ ) (24). In der vorliegenden Studie fehlte jedoch ein zweiter Arm für die Add-on-Therapie, da Valganciclovir in Deutschland nicht zur Behandlung von Glioblastomen zugelassen ist und ein solcher Einsatz der Therapie die Zustimmung mehrerer Gremien erfordert, was über den Rahmen der Studie hinausging.

#### 5.2.4 Keine CMV-Bestimmung in den Tumorgeweben

Söderberg-Nauclér et al. berichten, dass CMV-Antigene in mehr als 99 % der menschlichen Glioblastome nachweisbar sind. Allerdings konnten in einer Phase-II-Studie zur Evaluierung von Valganciclovir als Add-on-Therapie bei Glioblastom-Patienten mit 49 Teilnehmern nur bei 71 % dieser Patienten seropositive und bei den restlichen 29 % keine CMV-spezifischen IgG gefunden werden (45). Daraus lässt sich schließen, dass möglicherweise eine Diskrepanz zwischen Serostatus und CMV-Präsenz im Tumor vorliegt. Eine CMV-Bestimmung im Tumorgewebe war im initialen Studiendesign nicht vorgesehen, daher konnte der periphere CMV-Nachweis im Nachhinein nicht zurückverfolgt werden. Hier stellt sich die Frage, ob die periphere Nachweisbarkeit aufgrund einer reaktiven Immunantwort auf die zentrale CMV-Infektion im Tumorgewebe zustande gekommen ist oder ob es sich um eine systemische CMV-Infektion handelte.

#### 5.3 Schlussfolgerung der Diskussion

Diese Studie liefert Hinweise darauf, dass die Anti-CMV-IgG-Konzentration im Serum ein signifikanter Prädiktor für das PFS und das OS bei Patienten mit Glioblastom sein könnte. Patienten mit sehr hohen Anti-CMV-IgG-Konzentrationen zeigten die besten Überlebenszeiten, während Patienten mit niedrigen Konzentrationen die schlechtesten aufwiesen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass CMV eine Rolle in der Progression des Glioblastoms spielt und eine Immunität gegen das Virus mit einer besseren Prognose verbunden ist. In diesem Zusammenhang könnte die Anti-CMV-IgG-Konzentration als potenzieller prognostischer Marker dienen.

Die in der vorliegenden Studie aufgedeckten Limitationen, wie die Heterogenität der Patientengruppen, die fehlenden CMV-Bestimmungen im Tumorgewebe und das Fehlen einer antiviralen Therapiegruppe, weisen auf relevante Aspekte hin, die in zukünftigen Forschungen berücksichtigt werden sollten. Um robustere und generalisierbare Ergebnisse zu erhalten, sind multizentrische Studien mit größeren Patientengruppen notwendig. Zukünftige Forschungen sollten auch den potenziellen Nutzen antiviraler Therapien und die Rolle von CMV in der Tumorbilogie weiter untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Das Glioblastom bezeichnet ein WHO-Grad-4-Gliom und ist der häufigste bösartige primäre Hirntumor, dessen 5-Jahres-Überlebensrate bei unter 10 % liegt. Aufgrund der infiltrativen Natur, genetischen Heterogenität und des Schutzes durch die BHS stellt die Behandlung von Glioblastomen eine Herausforderung dar. Derzeitige Standardtherapien umfassen die chirurgische Resektion, gefolgt von RCT. Allerdings fördern die DNA-Reparaturmechanismen und die selbsterneuernden Fähigkeiten von Glioblastomzellen eine Resistenz gegen alle aktuellen Behandlungsansätze. Insbesondere Patienten ohne MGMT-Promotor-(Hyper)Methylierung benötigen neue Therapieansätze, da diese Gruppe auf herkömmliche Behandlungsprotokolle wie das Stupp-Protokoll häufig unempfindlich reagiert und das MGMT-Enzym die Wirkung des Chemotherapeutikums (TMZ) beeinträchtigen kann. Seit den 2000er-Jahren gibt es Hinweise darauf, dass eine CMV-Infektion das OS von Patienten mit Glioblastom negativ beeinflussen könnte. Klinische Studien deuten darauf hin, dass antivirale Therapien das Überleben von Glioblastom-Patienten verlängern könnten, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Immunität gegen CMV und dem Krankheitsverlauf hinweist.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkungen einer systematischen CMV-Infektion auf PFS und OS untersucht. Mittels ELISA wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen der Anti-CMV-IgG- und -IgM-Serostatus der Patienten mit Glioblastom bestimmt. Das PFS und OS wurden in Bezug auf den Anti-CMV-IgG-Serostatus und die -Serumkonzentration mittels Kaplan-Meier-Kurven analysiert, und die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Log-rank-Test überprüft. Ein tendenziell besserer Verlauf bezüglich des OS unter IgG-seronegativen Patienten wurde beobachtet. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu berichteten Foster et al. von einem signifikant besseren Verlauf bei seronegativen Patienten (19).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Patienten mit niedrigen Konzentrationen an IgG gegen CMV eine signifikant ungünstigere Prognose haben als solche, die keinen peripheren Nachweis einer systemischen CMV-Infektion aufweisen. Auffälligerweise haben auch Patienten mit sehr hohen Konzentrationen an Immunglobulinen gegen CMV die beste Prognose gezeigt, was auch in einer Studie mit Patienten mit malignem Melanom beschrieben wurde.

In klinischen Studien mit PP65-gepulsten DC-Impfstoffen konnte ein signifikanter Vorteil der Therapiegruppen hinsichtlich des OS und des PFS beobachtet werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine ausreichende Immunität gegen CMV und dessen Proteine einen positiven Einfluss auf das Outcome dieser Patienten haben könnten. Diese Daten

unterstützen die vorliegenden Ergebnisse in der Hinsicht, dass eine höhere Konzentration an CMV-spezifischen IgG einen positiven Einfluss auf PFS und OS haben könnte und eine nicht ausreichende Immunität nach stattgehabter CMV-Infektion den Verlauf im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis einer stattgehabten Infektion verschlechtern kann.

Um robuste statistische Daten zu erhalten, wäre es notwendig, die Folgestudien multizentrisch durchzuführen, um größere Patientengruppen für Erkrankungen mit niedriger Prävalenz zu erfassen. Dies würde eine Validierung der Ergebnisse ermöglichen und eine Grundlage für weitere Forschungen auf diesem Gebiet schaffen. Ein weiterer Ansatz für zukünftige Studien könnte darin bestehen, den Einfluss der intrathekalen Gabe von Anti-CMV-IgG in Mäusen mit Glioblastom zu untersuchen. Sollte die Annahme zutreffen, dass eine Immunität gegen CMV mit einem längeren Überleben zusammenhängt, könnte die intrathekale Gabe von Anti-CMV-IgG bei Mäusen mit Glioblastom das OS und PFS verlängern.

Aufgrund des prognostischen Werts von zirkulierenden Anti-CMV-IgG-Antikörpern und des potenziellen Nutzens des CMV-IgG-Serostatus als Indikator für Patienten, die während der Behandlung möglicherweise weitere Interventionen (z. B. antivirale Medikamente) benötigen, liefert diese Studie die Begründung für die Notwendigkeit von Routinebestimmungen des Anti-CMV-IgG-Serostatus und der -Serumkonzentration. Diese Information kann bei allen Patienten mit hochgradigen Gliomen von Vorteil sein.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(suppl\_4):iv1-iv86.
2. Voisin MR, Sasikumar S, Mansouri A, Zadeh G. Incidence and prevalence of primary malignant brain tumours in Canada from 1992 to 2017: an epidemiologic study. *CMAJ Open.* 2021;9(4):E973-e9.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology.* 2013;15(suppl\_2):ii1-ii56.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
5. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp's Regimen After a Decade. *Front Oncol.* 2020;10:840.
6. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-66.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
8. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 2:S31-42.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-5.
10. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):266-82.
11. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):757-68.
12. Geder L, Sanford EJ, Rohner TJ, Rapp F. Cytomegalovirus and cancer of the prostate: in vitro transformation of human cells. *Cancer Treat Rep.* 1977;61(2):139-46.

13. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer research*. 2002;62(12):3347-50.
14. Söderberg-Nauclér C, Johnsen JI. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options. *World J Exp Med*. 2015;5(1):1-10.
15. Soroceanu L, Matlaf L, Khan S, Akhavan A, Singer E, Bezrookove V, et al. Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2015;75(15):3065-76.
16. Krenzlin H, Zdioruk M, Nowicki MO, Finkelberg T, Keric N, Lemmermann N, et al. Cytomegalovirus infection of glioblastoma cells leads to NF- $\kappa$ B dependent upregulation of the c-MET oncogenic tyrosine kinase. *Cancer Lett*. 2021;513:26-35.
17. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29(3):e2034.
18. Bahador M, Gras Navarro A, Rahman MA, Dominguez-Valentin M, Sarowar S, Ulvestad E, et al. Increased infiltration and tolerised antigen-specific CD8(+) T(EM) cells in tumor but not peripheral blood have no impact on survival of HCMV(+) glioblastoma patients. *Oncoimmunology*. 2017;6(8):e1336272.
19. Foster H, Piper K, DePledge L, Li HF, Scanlan J, Jae-Guen Y, et al. Human cytomegalovirus seropositivity is associated with decreased survival in glioblastoma patients. *Neurooncol Adv*. 2019;1(1):vdz020.
20. Foster H, Ulasov IV, Cobbs CS. Human cytomegalovirus-mediated immunomodulation: Effects on glioblastoma progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017;1868(1):273-6.
21. Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, et al. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer research*. 2008;68(15):6043-8.
22. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60.
23. Stragliotto G, Pantalone MR, Rahbar A, Bartek J, Söderberg-Naucler C. Valganciclovir as Add-on to Standard Therapy in Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*. 2020;26(15):4031-9.
24. Rahbar A, Orrego A, Peredo I, Dzabic M, Wolmer-Solberg N, Strååt K, et al. Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. *J Clin Virol*. 2013;57(1):36-42.

25. Stragliotto G, Pantalone MR, Rahbar A, Bartek J, Söderberg-Naucler C. Valganciclovir as add-on to standard therapy in glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(15):4031-9.
26. Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD, Huang MN, Sanchez-Perez L, Nair SK, et al. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature*. 2015;519(7543):366-9.
27. Batich KA, Mitchell DA, Healy P, Herndon JE, Sampson JH. Once, twice, three times a finding: reproducibility of dendritic cell vaccine trials targeting cytomegalovirus in glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(20):5297-303.
28. Batich KA, Reap EA, Archer GE, Sanchez-Perez L, Nair SK, Schmittling RJ, et al. Long-term Survival in Glioblastoma with Cytomegalovirus pp65-Targeted Vaccination. *Clin Cancer Res*. 2017;23(8):1898-909.
29. Nair SK, De Leon G, Boczkowski D, Schmittling R, Xie W, Staats J, et al. Recognition and killing of autologous, primary glioblastoma tumor cells by human cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T cells. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2684-94.
30. Pantalone MR, Rahbar A, Söderberg-Naucler C, Stragliotto G. Valganciclovir as Add-on to Second-Line Therapy in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(8).
31. Jhaveri N, Chen TC, Hofman FM. Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. *Cancer Lett*. 2016;380(2):545-51.
32. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
33. Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
34. See AP, Parker JJ, Waziri A. The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *J Neurooncol*. 2015;123(3):405-12.
35. Okolie O, Bago JR, Schmid RS, Irvin DM, Bash RE, Miller CR, Hingtgen SD. Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model. *Neuro Oncol*. 2016;18(12):1622-33.
36. Dirks PB. Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(17):2916-24.
37. Fine HA. Glioma stem cells: not all created equal. *Cancer cell*. 2009;15(4):247-9.
38. Dziurzynski K, Wei J, Qiao W, Hatiboglu MA, Kong LY, Wu A, et al. Glioma-associated cytomegalovirus mediates subversion of the monocyte lineage to a tumor propagating phenotype. *Clin Cancer Res*. 2011;17(14):4642-9.

39. Pappenheimer JR, Renkin E, Borrero L. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes: a contribution to the pore theory of capillary permeability. *American journal of physiology-legacy content*. 1951;167(1):13-46.
40. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699-708.
41. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):26-41.
42. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013;153(1):139-52.
43. Sarkaria JN, Hu LS, Parney IF, Pafundi DH, Brinkmann DH, Laack NN, et al. Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro Oncol*. 2018;20(2):184-91.
44. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538-43.
45. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
46. Ratnam NM, Gilbert MR, Giles AJ. Immunotherapy in CNS cancers: the role of immune cell trafficking. *Neuro-oncology*. 2019;21(1):37-46.
47. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-7.
48. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
49. Hu F, Dzaye O, Hahn A, Yu Y, Scavetta RJ, Dittmar G, et al. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro Oncol*. 2015;17(2):200-10.
50. Du R, Petritsch C, Lu K, Liu P, Haller A, Ganss R, et al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro Oncol*. 2008;10(3):254-64.
51. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):102-14.
52. Karachi A, Dastmalchi F, Mitchell DA, Rahman M. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2018;20(12):1566-72.

53. Kirstein A, Schilling D, Combs SE, Schmid TE. Lomeguatrib Increases the Radiosensitivity of MGMT Unmethylated Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).
54. 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.
55. Malmström A, Grønberg 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.
56. Kessler T, Sahm F, Sadik A, Stichel D, Hertenstein A, Reifenberger G, et al. Molecular differences in IDH wildtype glioblastoma according to MGMT promoter methylation. *Neuro Oncol.* 2018;20(3):367-79.
57. Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, Albrecht T, El-Zein R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2008;116(1):79-86.
58. Price RL, Song J, Bingmer K, Kim TH, Yi JY, Nowicki MO, et al. Cytomegalovirus contributes to glioblastoma in the context of tumor suppressor mutations. *Cancer Res.* 2013;73(11):3441-50.
59. Krenzlin H, Behera P, Lorenz V, Passaro C, Zdioruk M, Nowicki MO, et al. Cytomegalovirus promotes murine glioblastoma growth via pericyte recruitment and angiogenesis. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1671-83.
60. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):624-35.
61. Alcendor DJ, Charest AM, Zhu WQ, Vigil HE, Knobel SM. Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus. *J Neuroinflammation.* 2012;9:95.
62. Birbrair A. Pericyte Biology: Development, Homeostasis, and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1109:1-3.
63. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014;508(7494):55-60.
64. Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One.* 2014;9(7):e101402.
65. Zhou W, Chen C, Shi Y, Wu Q, Gimple RC, Fang X, et al. Targeting Glioma Stem Cell-Derived Pericytes Disrupts the Blood-Tumor Barrier and Improves Chemotherapeutic Efficacy. *Cell Stem Cell.* 2017;21(5):591-603.e4.

66. Bentzen AK, Such L, Jensen KK, Marquard AM, Jessen LE, Miller NJ, et al. T cell receptor fingerprinting enables in-depth characterization of the interactions governing recognition of peptide–MHC complexes. *Nature biotechnology*. 2018;36(12):1191-6.
67. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(1):75-82.
68. Rochford R, Cannon MJ, Moormann AM. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(2):182-7.
69. Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. *J Neurovirol*. 2006;12(2):90-9.
70. Lau SK, Chen YY, Chen WG, Diamond DJ, Mamelak AN, Zaia JA, Weiss LM. Lack of association of cytomegalovirus with human brain tumors. *Mod Pathol*. 2005;18(6):838-43.
71. Sabatier J, Uro-Coste E, Pommepuy I, Labrousse F, Allart S, Trémoulet M, et al. Detection of human cytomegalovirus genome and gene products in central nervous system tumours. *Br J Cancer*. 2005;92(4):747-50.
72. Mitchell DA, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, Sampson JH. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2008;10(1):10-8.
73. Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, et al. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012;14(3):246-55.
74. Arbustini E, Morbini P, Grasso M, Diegoli M, Fasani R, Porcu E, et al. Human cytomegalovirus early infection, acute rejection, and major histocompatibility class II expression in transplanted lung. Molecular, immunocytochemical, and histopathologic investigations. *Transplantation*. 1996;61(3):418-27.
75. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2189-99.
76. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-8.
77. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69-74.
78. Chiaro J, Kasanen HHE, Whalley T, Capasso C, Grönholm M, Feola S, et al. Viral Molecular Mimicry Influences the Antitumor Immune Response in Murine and Human Melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2021;9(8):981-93.

79. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.
80. 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.
81. Schucht P, Knittel S, Slotboom J, Seidel K, Murek M, Jilch A, et al. 5-ALA complete resections go beyond MR contrast enhancement: shift corrected volumetric analysis of the extent of resection in surgery for glioblastoma. *Acta neurochirurgica*. 2014;156:305-12.
82. Michael AP, Watson VL, Ryan D, Delfino KR, Bekker SV, Cozzens JW. Effects of 5-ALA dose on resection of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2019;141(3):523-31.
83. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(7):372-85.
84. Weller J, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Hau P, et al. Health-related quality of life and neurocognitive functioning with lomustine-temozolomide versus temozolomide in patients with newly diagnosed, MGMT-methylated glioblastoma (CeTeG/NOA-09): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(10):1444-53.
85. Lomustin [Internet]. Gelbe Liste. 2023. Available from: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Lomustin\\_1193](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Lomustin_1193).
86. Wick W, Dettmer S, Berberich A, Kessler T, Karapanagiotou-Schenkel I, Wick A, et al. N2M2 (NOA-20) phase I/II trial of molecularly matched targeted therapies plus radiotherapy in patients with newly diagnosed non-MGMT hypermethylated glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2019;21(1):95-105.
87. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1027-37.
88. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2017;318(23):2306-16.
89. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1954-63.
90. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1373-85.

91. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJ, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science translational medicine*. 2017;9(399):eaaa0984.
92. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 1978;49(3):333-43.
93. 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.
94. GmbH BV. Fachinformation  
Stivarga. 2023.
95. Lombardi G, De Salvo GL, Brandes AA, Eoli M, Rudà R, Faedi M, et al. Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):110-9.
96. Yang T, Liu D, Fang S, Ma W, Wang Y. Cytomegalovirus and Glioblastoma: A Review of the Biological Associations and Therapeutic Strategies. *J Clin Med*. 2022;11(17).
97. Söderberg-Nauclér C, Peredo I, Stragliotto G. Valganciclovir in patients with glioblastoma. *N Engl J Med*. 2013;369(21):2066-7.
98. Stragliotto G, Pantalone MR, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Valganciclovir as Add-On to Standard Therapy in Secondary Glioblastoma. *Microorganisms*. 2020;8(10).
99. Peng C, Wang J, Tanksley JP, Mobley BC, Ayers GD, Moots PL, Clark SW. Valganciclovir and bevacizumab for recurrent glioblastoma: A single-institution experience. *Molecular and Clinical Oncology*. 2016;4(2):154-8.
100. Hellstrand K, Martner A, Bergström T. Valganciclovir in patients with glioblastoma. *N Engl J Med*. 2013;369(21):2066.
101. Cobbs CS. Cytomegalovirus and brain tumor: epidemiology, biology and therapeutic aspects. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(6):682-8.
102. Reap EA, Suryadevara CM, Batich KA, Sanchez-Perez L, Archer GE, Schmittling RJ, et al. Dendritic Cells Enhance Polyfunctionality of Adoptively Transferred T Cells That Target Cytomegalovirus in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2018;78(1):256-64.
103. Ghazi A, Ashoori A, Hanley PJ, Brawley VS, Shaffer DR, Kew Y, et al. Generation of polyclonal CMV-specific T cells for the adoptive immunotherapy of glioblastoma. *J Immunother*. 2012;35(2):159-68.
104. Schuessler A, Smith C, Beagley L, Boyle GM, Rehan S, Matthews K, et al. Autologous T-cell therapy for cytomegalovirus as a consolidative treatment for recurrent glioblastoma. *Cancer Res*. 2014;74(13):3466-76.

105. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):247-58.
106. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204(6):1405-16.
107. Lachmann R, Bajwa M, Vita S, Smith H, Cheek E, Akbar A, Kern F. Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *J Virol*. 2012;86(2):1001-9.
108. Muñoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia MJ, de la Cámara R, et al. Functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells and kinetics of NKG2C+ NK cells associated with the resolution of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*. 2012;84(2):259-67.
109. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473-85.
110. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Wang L, Wang L, Nishikawa H, et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor stimulation enhances the multifunctionality of adoptively transferred tumor antigen-specific CD8+ T cells with tumor regression. *Cancer Sci*. 2009;100(7):1317-25.
111. Yuan J, Gnjatic S, Li H, Powel S, Gallardo HF, Ritter E, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20410-5.
112. Smith C, Lineburg KE, Martins JP, Ambalathingal GR, Neller MA, Morrison B, et al. Autologous CMV-specific T cells are a safe adjuvant immunotherapy for primary glioblastoma multiforme. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(11):6041-53.
113. Weathers S-P, Penas-Prado M, Pei B-L, Ling X, Kassab C, Banerjee P, et al. Glioblastoma-mediated immune dysfunction limits CMV-specific T cells and therapeutic responses: results from a phase I/II trial. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(14):3565-77.
114. Kim JW, Kane JR, Panek WK, Young JS, Rashidi A, Yu D, et al. A Dendritic Cell-Targeted Adenoviral Vector Facilitates Adaptive Immune Response Against Human Glioma Antigen (CMV-IE) and Prolongs Survival in a Human Glioma Tumor Model. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):1127-38.
115. Goerig NL, Frey B, Korn K, Fleckenstein B, Überla K, Schmidt MA, et al. Frequent occurrence of therapeutically reversible CMV-associated encephalopathy during radiotherapy of the brain. *Neuro Oncol*. 2016;18(12):1664-72.

