

Aus der Universitätsklinik für Neurochirurgie  
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Direktor: Prof. Dr. med. I. Erol Sandalcioglu

**Die Rolle von DYNLT1 und UCHL1 als  
prognostische Biomarker in Gliomen und  
Glioblastomen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Jad Lehmann-Abi-Haidar  
aus Coburg

Magdeburg 2021

Bibliographische Beschreibung:

Lehmann-Abi-Haidar, Jad:

Die Rolle von DYNLT1 und UCHL1 als prognostische Biomarker in Gliomen und Glioblastomen. – 2021. – 68 Bl., 19 Abb., 11 Tab.

Kurzreferat:

Gliome sind aggressive, primäre Hirntumore, die trotz aktueller Fortschritte in den Bereichen der Diagnostik und Therapie mit einer schlechten Prognose einhergehen. Es besteht demnach ein dringender Bedarf, neue zelluläre und molekulare Mechanismen, die die Pathophysiologie dieser Tumore regulieren, zu identifizieren. Dynein light chain 1 (DYNLT1, Tctex-1) ist Bestandteil des Dynein-Motor-Komplexes und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen des Zellzyklus. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) ist ein deubiquitinierendes Enzym, welches in mehreren soliden Tumor-entitäten aberrant exprimiert wird. In der vorliegenden Studie wurden die beiden potentiellen Biomarker DYNLT1 und UCHL1 analysiert und in Bezug auf deren Prognosefähigkeit bei Patienten mit Astrozytomen und Glioblastomen (GBM) beurteilt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Klassifikation der Gliome	1
1.2 Astrozytome (WHO Grad I – III)	2
1.3 Glioblastom (WHO Grad IV)	4
1.4 Biomarker	9
1.5 DYNLT1	10
1.6 UCHL1	12
1.7 Zielsetzung	15
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1 Studienaufbau	16
2.2 Material	17
2.3 TMA-Herstellung	18
2.4 Immunhistochemie von DYNLT1 und UCHL1	19
2.5 MGMT-Methylierung	20
2.6 Statistische Auswertung	20
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>3.1 DYNLT1 und Überlebensanalyse bei Astrozytom- und GBM-Patienten</b>	<b>22</b>
3.1.1 DYNLT1 Expression und Auswertung	22
3.1.2 DYNLT1 und Gesamtüberleben	24
3.1.3 DYNLT1 und progressionsfreies Überleben	26
3.1.4 Korrelation zwischen DYNLT1 und weiteren Tumorparametern	28
3.1.5 DYNLT1 und Gesamtüberleben – Multivariatanalyse	29
3.1.6 DYNLT1 und progressionsfreies Überleben – Multivariatanalyse	30
3.1.7 DYNLT1 / MGMT-Methylierung und Gesamtüberleben	31
3.1.8 DYNLT1 / FZD7 und Gesamtüberleben	34
<b>3.2 UCHL1 und Überlebensanalyse bei Astrozytom- und GBM-Patienten</b>	<b>38</b>
3.2.1 UCHL1 Expression und Auswertung	38
3.2.2 UCHL1 und Gesamtüberleben	40
3.2.3 UCHL1 und progressionsfreies Überleben	42
3.2.4 Korrelation zwischen UCHL1 und weiteren Tumorparametern	44
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>58</b>
<b>VII. DANKSAGUNG</b>	<b>66</b>
<b>VIII. EHRENERKLÄRUNG</b>	<b>67</b>
<b>IX. LEBENSLAUF</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1)</b> H.E.-FÄRBUNG EINES GLIOBLASTOMS (WHO GRAD IV)	6
<b>ABBILDUNG 2)</b> MRT-BILDGEBUNG EINES GLIOBLASTOMS (WHO GRAD IV)	7
<b>ABBILDUNG 3)</b> DYNLT1 – FÄRBEVERHALTEN UND SCORING-SYSTEM	23
<b>ABBILDUNG 4)</b> DYNLT1 – EXPRESSIONSVERGLEICH MITTELS BOX-PLOT	24
<b>ABBILDUNG 5)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI PATIENTEN DER WHO GRADE II, III UND IV	26
<b>ABBILDUNG 6)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION UND DEM PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBEN BEI PATIENTEN DER WHO GRADE II, III UND IV	28
<b>ABBILDUNG 7)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MGMT-METHYLIERUNG UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN	31
<b>ABBILDUNG 8)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION, MGMT-METHYLIERUNG UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN	33
<b>ABBILDUNG 9)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN FZD7-EXPRESSION UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN	35
<b>ABBILDUNG 10)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION, FZD7-EXPRESSION UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN	36
<b>ABBILDUNG 11)</b> UCHL1 – FÄRBEVERHALTEN UND SCORING-SYSTEM	39
<b>ABBILDUNG 12)</b> UCHL1 – EXPRESSIONSVERGLEICH MITTELS BOX-PLOT	40
<b>ABBILDUNG 13)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN UCHL1-EXPRESSION UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI PATIENTEN DER WHO GRADE II, III UND IV	42
<b>ABBILDUNG 14)</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN UCHL1-EXPRESSION UND DEM PROGRESSIONSFREIEN ÜBERLEBEN BEI PATIENTEN DER WHO GRADE II, III UND IV	44
<b>ABBILDUNG 15)</b> ROLLE VON DYNLT1 IN DER REGULATION DES ZELLZYKLUS	48
<b>ABBILDUNG 16)</b> REIC/DKK-3-EXPRESSION IN GESUNDEM HIRNGEWEBE UND GLIOM-GEWEBE	49
<b>ABBILDUNG 17)</b> INTERAKTION ZWISCHEN P53 UND MDM2 / MDM4	53
<b>ABBILDUNG 18)</b> ROLLE VON UCHL1 IM CASPASE-ABHÄNGIGEN PATHWAY BEIM HCC	54
<b>ABBILDUNG 19)</b> ABLAUF EINER METHYLIERUNGSSPEZIFISCHEN PCR	56

## **Tabellenverzeichnis**

<b>TABELLE 1) WHO GRADE AUSGEWÄHLTER GLIOME</b>	1
<b>TABELLE 2) ÜBERSICHT DER UCH-SUBGRUPPEN</b>	13
<b>TABELLE 3) ABERRANTE UCHL1-EXPRESSION IN TUMORGEWEBEN</b>	14
<b>TABELLE 4) PATIENTENÜBERSICHT</b>	17
<b>TABELLE 5) MATERIALÜBERSICHT</b>	18
<b>TABELLE 6) KORRELATION ZWISCHEN DYNLT1 UND WEITEREN TUMORPARAMETERN</b>	29
<b>TABELLE 7) DYNLT1 – MULTIVARIATE COX-REGRESSION FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN</b>	30
<b>TABELLE 8) DYNLT1 – MULTIVARIATE COX-REGRESSION FÜR DAS PROGRESSIONSFREIE ÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN</b>	30
<b>TABELLE 9) ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION, MGMT-METHYLIERUNG UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER CO-FAKTOREN</b>	34
<b>TABELLE 10) ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DYNLT1-EXPRESSION, FZD7-EXPRESSION UND DEM GESAMTÜBERLEBEN BEI GBM-PATIENTEN IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER CO-FAKTOREN</b>	37
<b>TABELLE 11) KORRELATION VON UCHL1 &amp; WEITEREN TUMORPARAMETERN</b>	45

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Anaplastisches Astrozytom
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
AB	Antibody
AGT	O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
AML	Akute myeloische Leukämie
ARF	Alternative reading frame
AS	Aminosäuren
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1/2	BReast CAncer 1/2
CD31	Cluster of differentiation 31
CHI3L1	Chitinase 3 Like 1
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoxyribonucleic acid
DUB	Deubiquitinating enzyme
DYNLT1	Dynein light chain 1 / Tctex-1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FFPE	Formalin-fixed / paraffin-embedded
FZD7	Frizzled-7
GBM	Glioblastom
gDNA	genomic DNA (= deoxyribonucleic acid)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Gy	Gray
HCC	Hepatocellular carcinoma
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIER	Heat-induced epitope retrieval
HOTAIR	Hox antisense intergenic RNA
HPV	Humane Papillomaviren
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish peroxidase
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICR	Interquartil range
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase

KI	Konfidenzintervall
LGG	Low-grade gliomas
lncRNA	long non-coding RNA (= ribonucleic acid)
LOH	Loss of heterozygosity
MAP6	Microtubule-associated protein 6
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miRNA	microRNA (= ribonucleic acid)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS-PCR / MSP	Methylation specific polymerase chain reaction
MTOC	Microtubule organizing center
NEDD8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NOS	Not otherwise specified
OTU	Ovarian tumor
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor alpha
PHLPP1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAC1	Ras-related c3 botulinum toxin substrate 1
RB	Retinoblastom
RTK	Receptor tyrosine kinase
siRNA	small interfering RNA (= ribonucleic acid)
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1
USP	Ubiquitin specific protease
TBI	Traumatic brain injury
TBS	Tris Buffered Saline
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TMA	Tissue Microarray
TMZ	Temozolomid
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

# I. Einleitung

## 1.1 Klassifikation der Gliome

„Gliom“ ist ein Oberbegriff für primäre Hirntumore, die entsprechend ihrer Ursprungszelle klassifiziert werden (Hanif, Muzaffar et al. 2017). Hierzu zählen u.a. diffuse und anaplastische Astrozytome, Oligodendrogliome sowie Glioblastome (Louis, Perry et al. 2016).

Im Vergleich zu früheren Klassifikationen nutzt die im Jahre 2016 neu eingeführte WHO- (engl. für World Health Organization) Klassifikation neben der Berücksichtigung histologischer Eigenschaften zusätzlich molekulargenetische Parameter zur Beurteilung von Tumorentitäten. Mithilfe dieser Erweiterung soll das Patientenmanagement und die Einschätzung der Prognose verbessert werden. Darüber hinaus werden Gliome durch die WHO entsprechend ihrer Malignität in vier Grade eingeteilt. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl verschiedener Unterformen mit dazugehörigem WHO Grad (Louis, Perry et al. 2016).

Art des Tumors	WHO Grad
<i>Diffuse astrozytische und oligodendrogliale Tumore</i>	
Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert	II
Anaplastisches Astrozytom, IDH-mutiert	III
Glioblastom, IDH-Wildtyp	IV
Glioblastom, IDH-mutiert	IV
Diffuses Mittelliniengliom, H3 K27M-mutiert	IV
Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert	II
Anaplastisches Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert	III
<i>Andere astrozytische Tumore</i>	
Pilozytisches Astrozytom	I
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom	III

**Tabelle 1) WHO Grade ausgewählter Gliome (aus dem Englischen und modifiziert nach Louis, Perry et al. 2016)**

## 1.2 Astrozytome (WHO Grad I – III)

Astrozytome zählen zu den häufigsten primären Hirntumoren des Menschen. WHO Grad I umfasst benigne, langsam-wachsende Neoplasien wie beispielsweise pilozytische Astrozytome. Bei Grad II-Tumoren handelt es sich um diffuse Astrozytome mit einem invasiven, jedoch langsamen Wachstum. Grad III- und Grad IV-Tumore sind hochgradige Astrozytome, zu denen das anaplastische Astrozytom und das Glioblastom (GBM) gezählt werden. Diese sind charakterisiert durch nukleäre Atypien, Mitosen und Hyperzellularität (Chen, Tsai et al. 2018). Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Vorstellung diverser WHO Grad II- und III-Tumoren.

### „Low-grade“ Gliome (LGG, WHO Grad II)

LGGs (engl. für low-grade gliomas) werden als WHO Grad II-Tumore klassifiziert und umfassen hauptsächlich Oligodendrogliome und Astrozytome. Sie stellen etwa ein Drittel aller Gliome und 15 % aller primären Hirntumore dar (Rees 2015). Im Gegensatz zu hochgradigen Gliomen treten „Low-grade“ Gliome häufiger bei jüngeren Patienten auf (Oberheim Bush und Chang 2016).

Oligodendrogliome weisen per Definition sowohl eine IDH- (Isocitrat-Dehydrogenase) Mutation als auch eine 1p/19q-Kodeletion auf. Astrozytome sind i.d.R. durch ein vermehrtes Vorkommen von GFAP (engl. für glial fibrillary acidic protein) und eine IDH-Mutation charakterisiert, zeigen aber im Gegensatz zu Oligodendrogliomen intakte 1p- und 19q-Chromosome (Oberheim Bush und Chang 2016). Tumore mit IDH-Mutation gehen dabei insgesamt mit einer besseren Prognose einher (Houillier, Wang et al. 2010).

Bis zu 90 % der LGGs präsentieren sich mit Krampfanfällen (Pallud, Audureau et al. 2014). Fokale neurologische Defizite sind hingegen seltener als bei hochgradigen Gliomen (Oberheim Bush und Chang 2016). Darüber hinaus zeigen Patienten mit LGGs gegenüber Patienten mit hochgradigen Gliomen ein längeres Überleben. Das mediane Überleben beträgt bei Behandlung mit Radio- und Chemotherapie 13,3 Jahre (Buckner, Shaw et al. 2016).

Bei niedriggradigen Gliomen besteht häufig die Gefahr einer Transformation zu einem höhergradigen Gliom. So kann sich beispielsweise ein Grad II-Astrozytom zu einem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) oder einem Glioblastom (WHO Grad IV) entwickeln. Bei Oligodendrogliomen hingegen deutet die aktuelle Datenlage zwar darauf hin, dass diese sich auf Basis der i.d.R. vorhandenen 1p/19q-Kodeletion eher zu einem anaplastischen Oligodendrogliom (WHO Grad III) entwickeln (Oberheim Bush und Chang 2016), eine Transformation zu einem Glioblastom scheint bei zuvor beschriebenen GBM mit oligodendroglialer Komponente jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen (Klink, Schlingelhof et al. 2010).

### **Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III)**

Anaplastische Astrozytome (AA) sind maligne Gliome mit einer jährlichen, alters-adjustierten Inzidenz von 3,5 pro 1.000.000 Einwohnern, welche etwas häufiger bei Männern vorkommen (Smoll und Hamilton 2014). Etwa 25 % der anaplastischen Astrozytome entstehen als *de novo* Tumore, während sich in etwa drei Viertel aus niedriggradigen Astrozytomen entwickeln (Mechtler 2009, zitiert nach Grimm und Chamberlain 2016). Die Prognose der AA gilt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 27,3 % als schlecht (Ostrom, Gittleman et al. 2014).

Patienten mit einem AA zeigen häufig fokale oder generalisierte neurologische Symptome. Zu Ersteren zählen Müdigkeit, Sensibilitätsverlust sowie Seh-, Sprach- und Gangstörungen. Generalisierte Symptome hingegen umfassen Persönlichkeitsveränderungen, Krampfanfälle und Kopfschmerzen (Grimm und Chamberlain 2016).

Histologisch sind anaplastische Astrozytome durch mitotische Aktivität, nukleäre Atypie, verstärkte Zellulärität, das Vorkommen glialer Marker sowie die Abwesenheit neuronaler Marker charakterisiert. Vom Glioblastom (WHO Grad IV) können sie histologisch durch das Fehlen von Nekrosen oder Mikrovaskularisationen unterschieden werden (Grimm und Chamberlain 2016).

Ähnlich den LGGs weisen anaplastische Astrozytome mit IDH-Mutationen gegenüber solchen mit IDH-Wildtyp ein besseres Gesamtüberleben auf (Hartmann, Hentschel et al. 2010).

## 1.3 Glioblastom (WHO Grad IV)

### Klassifikation

Das Glioblastom (GBM) entspricht WHO Grad IV und gilt als einer der aggressivsten und invasivsten Tumortypen (Hanif, Muzaffar et al. 2017). Klinisch unterscheidet man primäre und sekundäre Glioblastome. Die meisten GBM entstehen *de novo* und werden demnach als primäre Glioblastome bezeichnet, während sich sekundäre GBM aus niedriggradigen Astrozytomen entwickeln (Aldape, Zadeh et al. 2015). Häufigste genetische Veränderung im Glioblastom ist „loss of heterozygosity“ (LOH) auf Chromosom 10 (Adamson, Kanu et al. 2009). Des Weiteren sind primäre GBM häufig durch Mutationen des TERT- (engl. für telomerase reverse transcriptase) Promoters und des PTEN- (engl. für phosphatase and tensin homolog) Tumorsuppressorgens sowie durch hochgradige Genamplifikationen einiger Protoonkogene, wie beispielsweise dem EGFR- (engl. für epidermal growth factor receptor) Gen, gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu findet sich bei sekundären Glioblastomen in 85 % der Fälle eine IDH1-/IDH2-Mutation, bei primären GBM hingegen nur in 5 % der Fälle (Aldape, Zadeh et al. 2015).

Jene Veränderungen am IDH1-/IDH2-Gen ermöglichen eine erweiterte differenzierte Betrachtung einzelner GBM-Unterformen. Zudem stellen sie die früheste nachweisbare genetische Veränderung in Vorläuferzellen niedriggradig diffuser Astrozytome dar, was – abgrenzend zum Glioblastom des IDH-Wildtyps – auf die gemeinsame Abstammung von neuronalen Vorläuferzellen schließen lässt. Grundsätzlich werden ein IDH-Wildtyp von einer IDH-mutierten sowie einer nicht weiter spezifizierten Form (NOS, engl. für not otherwise specified) unterschieden. Als bestimmendes Merkmal gilt das Vorliegen einer IDH-Mutation. Häufigste IDH1-Mutation und gleichzeitig häufigste IDH1-Mutation in Oligodendrogliomen, Astrozytomen und IDH-mutierten GBM, ist die IDH1 R132H-Mutation, welche immunhistochemisch mittels Antikörpern bestimmt werden kann. IDH2-Mutationen – am häufigsten handelt es hierbei um eine R172K-Mutation – finden sich hingegen selten in IDH-mutierten Glioblastomen. Histopathologisch lassen sich dagegen IDH-mutierte GBM von jenen des Wildtyps mit Ausnahme einer geringeren Ausprägung von Nekrosen nicht unterscheiden (Louis, Perry et al. 2016).

Eine expressionsbasierte molekulare Klassifizierung nach Verhaak et al. aus 2010 ermöglicht eine zusätzliche Differenzierung des Glioblastoms in verschiedene Subtypen.

Unterschieden wird ein klassischer von einem proneuralen, einem neuronalen sowie einem mesenchymalen Subtypen. Als Grundlage für die Einteilung dieser Subtypen dienen u.a. Aberrationen und Genexpressionen von EGFR, NF1 (Neurofibromatose Typ 1), IDH1 und PDGFRA (engl. für platelet-derived growth factor receptor alpha). Beispielsweise zeigt der proneurale Subtyp, der gehäuft bei jüngeren Patienten auftritt, eine Assoziation mit PDGFRA-Veränderungen, IDH1- sowie TP53-Mutationen. Der klassische Subtyp wird hingegen durch eine Kombination der häufigsten genomischen Aberrationen beim GBM (u.a. Amplifikation des Chromosoms 7, Deletion des Chromosoms 10 und EGFR-Amplifikationen) definiert, während sich TP53-, NF1-, PDGFRA- oder IDH1-Mutationen nur selten nachweisen lassen. Beim mesenchymalen Subtypen zeigen sich eine erhöhte CHI3L1- (engl. für Chitinase 3 Like 1) sowie MET-Expression, wobei insbesondere die starke Assoziation mit einem vermehrten Auftreten von NF1-Mutationen bzw. -Deletionen für diesen Subtypen bezeichnend ist. Anders als bei den bisher genannten Formen lassen sich dem neuronalen Subtypen keine spezifischen genetischen Veränderungen zuordnen (Verhaak, Hoadley et al. 2010).

## **Epidemiologie**

Das Glioblastom stellt ca. 45 – 50 % aller primären malignen Hirntumore dar. Die jährliche Inzidenz liegt in der westlichen Welt bei etwa 3 – 4 Fällen pro 100.000 Einwohnern und damit höher als beispielsweise in Südkorea mit einer jährlichen Inzidenz von 0,59 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Louis, Perry et al. 2016). Die meisten Glioblastome manifestieren sich bei älteren Patienten, das mediane Erkrankungsalter beim primären Glioblastom beträgt 62 Jahre. Sekundäre Glioblastome hingegen betreffen häufiger jüngere Menschen mit einem Haupterkrankungsalter von 45 Jahren (Adamson, Kanu et al. 2009). Die Prognose des GBMs gilt mit einem medianen Überleben von ca. 15 Monaten (Koshy, Villano et al. 2012) und einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % (Tamimi und Juweid 2017) insgesamt als schlecht.

## **Ätiologie**

Die Ätiologie des GBMs ist nicht bekannt (Adamson, Kanu et al. 2009). Hochdosierte, ionisierende Strahlung sowie einige genetische Syndrome (bspw. Neurofibromatose vom Typ I und II) gelten als mögliche Risikofaktoren für GBM (Hanif, Muzaffar et al. 2017).

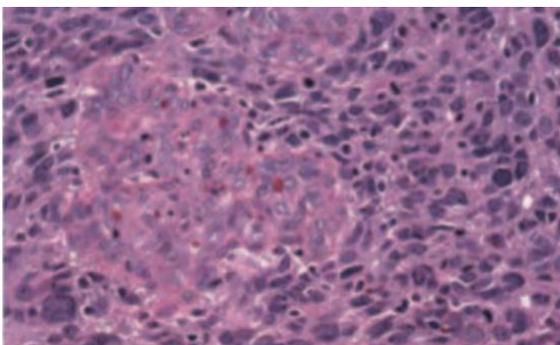
Zwischen Umweltfaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus und der Entstehung eines GBM konnte hingegen bisher kein Zusammenhang beobachtet werden (Hochberg, Toniolo et al. 1990).

## Pathogenese

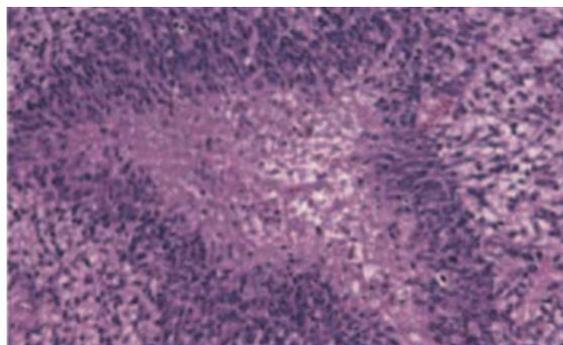
Zu den häufigsten Lokalisationen des GBMs zählen die zerebralen Hemisphären. 95 % finden sich in supratentoriellen Regionen, während ein geringerer Teil im Cerebellum, im Hirnstamm oder im Spinalkanal lokalisiert ist (Nakada, Kita et al. 2011). Allerdings zeigen sich auch Unterschiede zwischen einzelnen GBM-Unterformen: Während Glioblastome vom Wildtyp eine große Variabilität aufweisen, zeigen sich IDH-mutierte GBM überwiegend im Frontallappen (Louis, Perry et al. 2016). Eine Metastasierung außerhalb des ZNS (Zentralnervensystem) erfolgt i.d.R. nicht (Adamson, Kanu et al. 2009).

Makroskopisch zeigen sich GBM sehr heterogen mit Hämorrhagien und Nekrosen sowie zystischen und gallertartigen Regionen. Zu den histologischen Kriterien zählen pleomorphe Tumorzellen (wenig differenziert bis multinukleär), multifokale Nekrosen mit palisadenartig angeordneten Zellkernen, zelluläre und nukleäre Atypien, eine erhöhte Mitoseaktivität, Neoangiogenese sowie vaskuläre Thrombosen (vgl. Abb. 1) (Hanif, Muzaffar et al. 2017). Die vaskuläre Hyperproliferation und das Vorhandensein von Nekrosen stellen dabei jene Kriterien dar, die das GBM von niedriggradigen Gliomen unterscheidet (Adamson, Kanu et al. 2009).

**A.**



**B.**



**Abbildung 1) H.E.-Färbung eines Glioblastoms (WHO Grad IV).** Buntes histologisches Schnittbild mit **A.** mikrovaskulärer Proliferation und **B.** palisadenförmigen Tumornekrosen. (Bildquelle: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, S. 32)

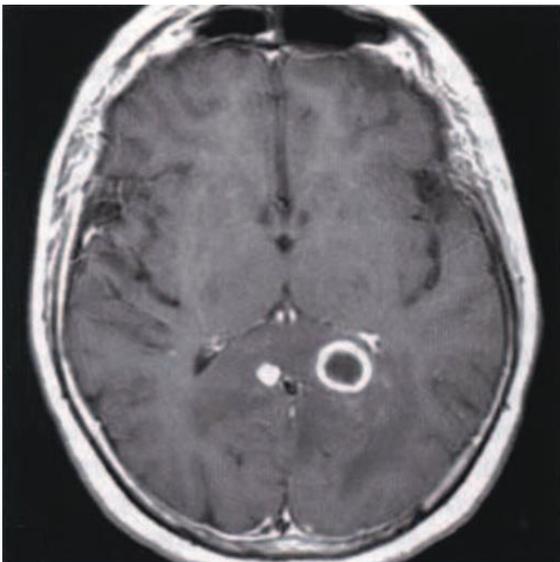
Zusätzlich weist die Mehrheit maligner Hirntumore – das GBM eingeschlossen – Mutationen im TP53-Pathway, im RB- (Retinoblastom) Pathway, im RTK- (engl. für receptor tyrosine kinase) Pathway oder in mehreren Signalwegen gleichzeitig auf (Adamson, Kanu et al. 2009).

## Klinische Präsentation und Behandlung

Bedingt durch die Zerstörung des Hirngewebes als Folge der Nekrosen und der Erhöhung des intrakraniellen Drucks zeigen sich fokale neurologische Defizite, Kopfschmerzen (unilateral bei 30 – 50 % der GBM-Patienten) mit progressiver Schwere sowie Krampfanfälle (partiell, komplex-partiell oder generalisiert) als typische Symptome des Glioblastoms. Gastrointestinale Beschwerden, Osteoporose, venöse Thromboembolien sowie Gemütsstörungen können sich als weitere mögliche Symptome des GBMs manifestieren (Hanif, Muzaffar et al. 2017).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) gilt als Goldstandard für die bildgebende Diagnostik des GBMs. Glioblastome sind dabei i.d.R. durch eine von Ödemen umgebende, zentrale Nekrose charakterisiert (vgl. Abb. 2) (Hanif, Muzaffar et al. 2017).

A.



B.

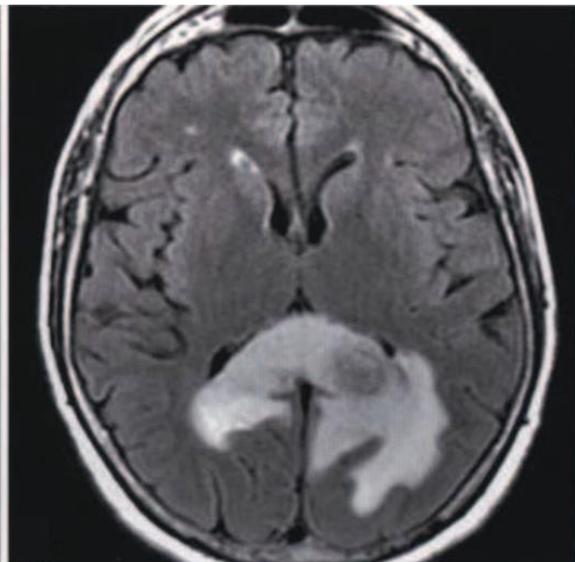


Abbildung 2) MRT-Bildgebung eines Glioblastoms (WHO Grad IV). Charakteristisch für ein GBM zeigt sich in **A.** eine helle, ringförmige Struktur (MRT mit T1-gewichteter Sequenz), umgeben von einem in **B.** sichtbaren Ödem (MRT mit T2-gewichteter Sequenz). (Bildquelle: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, S. 29)

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft existiert keine kurative Therapie für das Glioblastom (Tamimi und Juweid 2017). Allerdings haben Fortschritte in den Bereichen der Chirurgie, der Radiotherapie und der adjuvanten Chemotherapie graduelle Verbesserungen in Bezug auf das Überleben und die Lebensqualität gezeigt (Hanif, Muzaffar et al. 2017).

Als aktueller Standard in der Therapie des Glioblastoms hat sich die Behandlung entsprechend „Stupp-Protokoll“ etabliert. Diese setzt sich aus einer chirurgischen Tumorsektion mit anschließender Strahlentherapie und Temozolomid- (TMZ) Chemotherapie zusammen. Grundlage hierfür bildete eine im Jahre 2005 von Stupp et al. veröffentlichte Studie, welche bei einer Behandlung mit chirurgischer Resektion und anschließender Strahlentherapie mit folgender Temozolomid-Chemotherapie ein längeres mittleres Überleben (14,6 Monate) als bei chirurgischer Resektion und alleiniger Strahlentherapie (12,1 Monate) zeigte. Genauer betrachtet beinhaltet das „Stupp-Protokoll“ eine fraktionierte Strahlentherapie mit jeweils 2 Gy (Gray: Einheit für die Strahlendosis) an 5 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 6 Wochen sowie parallel zur Bestrahlung eine tägliche Chemotherapie mit 75 mg Temozolomid pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Dieser Therapie schließen sich insgesamt sechs Behandlungszyklen von je 28 Tagen mit 150 – 200 mg Temozolomid pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche an jeweils 5 Behandlungstagen an (Stupp, Mason et al. 2005). Kontraindikationen für eine chirurgische Therapie stellen ein schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index < 70), ein hohes Alter des Patienten sowie eine ungünstige Lokalisation des Tumors dar (Wilson, Karajannis et al. 2014).

Temozolomid wird zur Gruppe der Alkylanzien gezählt und entfaltet seine Wirkung über Methylierung der DNA (engl. für deoxyribonucleic acid) an der N7- und O6-Position des Guanins, was eine Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase mit anschließender Apoptose zur Folge hat (Hanif, Muzaffar et al. 2017). Dabei konnten Hegi et al. zeigen, dass vor allem jene GBM-Patienten von einer Temozolomid-Therapie profitierten, die einen positiven Methylierungsstatus des MGMT- (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) Promoters aufwiesen, während Patienten ohne MGMT-Methylierung schlechter auf Temozolomid ansprachen (Hegi, Diserens et al. 2005).

MGMT kodiert für das DNA-Reparaturprotein O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT), welches sowohl in Tumoren als auch im normalen Gewebe ein breites

Expressionsspektrum aufweist. Im Falle des Glioblastoms weist es als Angriffsziel für Chemotherapeutika eine besondere Bedeutung auf. Es entfernt alkylierende Läsionen an der Position des O<sup>6</sup> des Guanins und macht auf diese Weise die Wirkung des Temozolomids rückgängig. Eine Methylierung des MGMT-Promoters schaltet hingegen die MGMT-Expression in Tumoren aus und erhöht die Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie (Gerson 2004). Eine MGMT-Methylierung und eine daraus resultierende Stilllegung ist folglich mit einem besseren Ansprechen auf TMZ assoziiert (Adamson, Kanu et al. 2009).

Aufgrund der weiterhin schlechten Prognose des Glioblastoms werden bis heute zahlreiche neue Therapieansätze erforscht und verfolgt. Als Beispiel hierfür dient der Wirkstoff Bevacizumab. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher an VEGF-A (engl. für vascular endothelial growth factor A) bindet und dessen Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor inhibiert. Dies hat eine verminderte endotheliale Proliferation sowie ein vermindertes vaskuläres Wachstum zur Folge (Fernandes, Costa et al. 2017). Dabei konnte bei GBM-Patienten zwar keine Verbesserung des Gesamt-, dafür aber des progressionsfreien Überlebens beobachtet werden (Gilbert, Dignam et al. 2014).

## 1.4 Biomarker

Biomarker spielen in der modernen Medizin eine zunehmend wichtige Rolle. Sie sind per Definition objektive, quantifizierbare Merkmale biologischer Prozesse (Strimbu und Tavel 2010) und werden primär bei der Diagnostik verschiedener Krankheiten eingesetzt. Sie können unter anderem für prognostische Zwecke genutzt werden, indem sie eine Aussage über den Verlauf der jeweiligen Erkrankung treffen. Als Beispiel wären hier die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Brustkrebs verbundenen Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 (engl. für BReast CAncer 1/2) zu nennen. Prädiktive Biomarker geben Auskunft über das Ansprechen auf bestimmte Behandlungen und ermöglichen auf diese Weise eine bessere Therapieplanung. Ein Nachweis des Rezeptormoleküls HER2 (engl. für human epidermal growth factor receptor 2) bei Brustkrebs gilt beispielsweise als Voraussetzung für eine Behandlung mit Trastuzumab. Weitere Biomarker-Gruppen sind toxikologische, pharmakodynamische und sogenannte Surrogatbiomarker (Fiedler, Kubbutat et al. 2011).

Schiffgens et al. identifizierten das Transmembranprotein Frizzled-7 als prognostischen Faktor bei Patienten mit Glioblastom (Schiffgens, Wilkens et al. 2016). Frizzled-7 (FZD7) ist ein Transmembranprotein der Frizzled-Familie, welches als Rezeptor für Wnt-Liganden dient. *In vitro*-Versuche an Gliomen zeigten, dass eine FZD7-Überexpression die Proliferation von Gliomzellen begünstigte (Qiu, Jiao et al. 2016). Zudem war eine erhöhte FZD7-Expression mit einem kürzerem Überleben beim Magenkarzinom (Schmuck, Warneke et al. 2011) und kolorektalen Karzinom (Ueno, Hazama et al. 2009) assoziiert.

Neben Biomarkern wie dem MGMT-Methylierungsstatus und Frizzled-7 existieren für das Glioblastom andere etablierte prognostische Faktoren. Hierzu zählen u.a. das Alter und der Status des Patienten (Karnofsky-Index, Mini-Mental-Status-Test) sowie das Ausmaß der Resektion (Adamson, Kanu et al. 2009).

## 1.5 DYNLT1

### Aufbau

Dynein bezeichnet eine von drei Familien zytoskeletaler Motorproteine. Diese zeichnen sich durch einen intrazellulären Transport in Richtung des Minus-Endes von Mikrotubuli aus, welches üblicherweise in der Nähe des Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC, engl. für microtubule organizing center) nahe des Zellkerns lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu bewegt sich das Motorprotein Kinesin in Richtung Plus-Ende bzw. Zellperipherie. Weiterhin zählt Dynein zur Gruppe der AAA-Proteine (engl. für ATPases associated with diverse activities) und ist für den Transport von Endosomen, Lysosomen und Mitochondrien zuständig (Roberts, Kon et al. 2013).

Zytoplasmatisches Dynein setzt sich aus zwei schweren, drei mittelschweren und einigen leicht- bis mittelschweren sowie leichten Ketten zusammen (Williams, Xie et al. 2005). Jede schwere Kette enthält eine Motor-Domäne, die mit einer aminoterminalen Schwanzdomäne verbunden ist. Letztere weist Bindungsstellen für diverse Unter-einheiten auf (Roberts, Kon et al. 2013). Die Unterteilung der leichten Ketten erfolgt in insgesamt vier Klassen: DYNLT1 (Tctex-1), rp3 (DYNLT3), LC8 und LC7/robl (King, Bonilla et al. 2002).

Darüber hinaus existiert ein Teil des DYNLT1 außerhalb des Dynein-Komplexes (Li, Serr et al. 2004). Die neurogenen Effekte des DYNLT1 sind dabei von den Funktionen des Dynein-Transports unabhängig (Chuang, Yeh et al. 2005).

## **Funktion**

Eine Studie aus dem Jahr 2006 zeigte eine Anreicherung von DYNLT1 in Vorläuferzellen im adulten Gyrus dentatus (Dedesma, Chuang et al. 2006). DYNLT1 soll hierbei eine Schlüsselrolle in der Entwicklung hippocampaler Neurone spielen. Jene Wirkung umfasst Auswirkungen auf das Neuritenwachstum, den Ausbau der Dendriten sowie die Herstellung der axonalen Polarität. Über Modulation des Aktins und der Rac1- (engl. für ras-related c3 botulinum toxin substrate 1) Aktivität geht eine erhöhte DYNLT1-Expression beispielsweise mit einem schnellen Neuritenwachstum einher (Chuang, Yeh et al. 2005). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass MAP6 (engl. für microtubule-associated protein 6) mit DYNLT1 und Kalziumkanälen vom Typ Cav2.2 interagiert und so die Kalziumkanal-Aktivität in hippocampalen Neuronen reguliert (Brocard, Dufour et al. 2017).

DYNLT1 soll weiterhin eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielen. Grundlage dieser Hypothese ist der fehlende Abbau des vermehrt vorkommenden  $\alpha$ -Synucleins durch Lysosome, beispielsweise bei Vorliegen einer Mutation des DYNLT1-Gens (Dong, Zhang et al. 2017) (Martinez-Vicente 2012) (Xilouri, Brekk et al. 2013). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen DYNLT1 und dem Herpes-simplex-Virus (HSV) beschrieben. HS-Viren werden retrograd durch Bindung des HSV-Kapsid-Proteins pUL35 an DYNLT1 entlang des Mikrotubulus-Systems in Richtung Spinalganglion transportiert (Diefenbach, Miranda-Saksena et al. 2008).

Demgegenüber ist die Datenlage zur Rolle von DYNLT1 bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen als schwach einzustufen. 2013 identifizierten Sarma und Yaseen DYNLT1 als eine Komponente des Kernporen-Komplexes sowie als Interaktionspartner des Onkoproteins NUP98-HOXA9. NUP98-HOX98 und DYNLT1 beeinflussen die transkriptionelle Deregulierung und induzieren zusätzlich die Proliferation primär humaner CD34+ hämatopoetischer Vorläuferzellen. Diese Datenlage lässt eine Rolle des DYNLT1 in der Pathogenese der durch NUP98-Fusionen hervorgerufenen AML (Akute myeloische Leukämie) vermuten (Sarma und Yaseen 2013).

Zusätzlich wurde DYNLT1 indirekt in Zusammenhang mit Cervix-Karzinomen gebracht (Schneider, Spoden et al. 2011). Nicht zu vernachlässigen ist außerdem die Rolle von DYNLT1 bei der Regulation des Zellzyklus. Demnach wird phosphoryliertes Tctex-1 zur Ziliumpresorption und folglich zum Eintritt in die S-Phase benötigt (Li, Saito et al. 2011).

## 1.6 UCHL1

### Ubiquitinierung und Deubiquitinierung

Unter Ubiquitinierung versteht man die kovalente Übertragung von Ubiquitin auf ein Zielmolekül. Dieser Vorgang stellt eine posttranslationale Modifikation dar, welche die Stabilität, Funktion und Lokalisation des veränderten Proteins reguliert. Die Ubiquitinierung von Proteinen erfolgt dabei durch die Aktivität der Enzyme E1, E2 und E3 (Reyes-Turcu, Ventii et al. 2009).

Der selektive Abbau vieler kurzlebiger Proteine erfolgt durch das Ubiquitin-System. Insbesondere der Ubiquitin-abhängige Abbau von Regulatorproteinen spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle vieler Zellprozesse, beispielsweise bei der Signaltransduktion, der transkriptionellen Regulation, der Rezeptor-Downregulation, der Endozytose sowie beim Ablauf des Zellzyklus (Hershko und Ciechanover 1998).

Deubiquitinierende Enzyme (DUB, engl. für deubiquitinating enzyme) hingegen sind Proteasen, die Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine von Pro-Proteinen oder Zielproteinen abspalten. Neben ihren Aufgaben, Ubiquitin-Pro-Proteine kotranslational zu aktivieren und Ubiquitin-Reste zu recyceln, sind DUB für eine Umkehr der Ubiquitin-Modifikationen von Zielproteinen und somit für eine Antagonisierung zuständig (Reyes-Turcu, Ventii et al. 2009).

Das menschliche Genom kodiert für ca. 100 DUB, welche in fünf DUB-Familien untergliedert werden: UCH (engl. für Ubiquitin C-terminal hydrolases), USP (engl. für Ubiquitin specific protease), OTU (engl. für ovarian tumor), Jephin (Josephin domain) und JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) (Reyes-Turcu, Ventii et al. 2009). Der Mensch besitzt insgesamt vier UCH-DUB (vgl. Tabelle 2) (Bishop, Rocca et al. 2016).

UCH DUB	Länge (AS: Aminosäuren)	C-terminale Region	Funktion
UHL1	223 AS	Klein, formlos	Unbekannt; hohe Expression in Neuronen, Testes und Ovarien
UHL3	233 AS	Klein, formlos	Über 52 % sequenzielle Homologie mit UHL1; hohe Expression in Säugetiergewebe
UHL5	329 AS	Fibröse Domäne, die mit der Rpn13-Untereinheit des 26S-Proteasoms interagiert	Proteasomale Funktion; Recycling von Ubiquitin nach proteasomalem Abbau
BAP1	729 AS	Lange Erweiterung mit nukleärem Lokalisationssignal	Histon-Ubiquitinierung, Chromatin-Remodelling, transkriptionelle Regulation, Inhibierung der BRCA1-Aktivität

**Tabelle 2) Übersicht der UCH-Subgruppen (aus dem Englischen und modifiziert nach Bishop, Rocca et al. 2016)**

UHL1 ist ein häufig vorkommendes Protein im menschlichen Gehirn und macht ca. 1 – 5 % aller neuronalen Proteine aus. In anderen Geweben des menschlichen Körpers wird es hingegen nur wenig exprimiert (Bishop, Rocca et al. 2016). Das Protein existiert sowohl in einer membran-assoziierten (UHL1<sup>M</sup>) als auch in einer löslichen, zytoplasmatischen Form (UHL1<sup>C</sup>) (Liu, Meray et al. 2009). Darüber hinaus konnte UHL1 im Zellkern nachgewiesen werden (Caballero, Resto et al. 2002).

## Aufbau

Das UHL1-Monomer besteht aus zwei sog. „Lappen“. Der rechte „Lappen“ besteht aus fünf alpha-Helices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  und  $\alpha_6$ ), der linke aus zwei alpha-Helices ( $\alpha_2$  und  $\alpha_7$ ) und sechs  $\beta$ -Strängen ( $\beta_1$  –  $\beta_6$ ). Die genannten Sekundärstrukturen formen gemeinsam eine Helix- $\beta$ -Helix-Struktur. Zwischen den beiden „Lappen“ ist zusätzlich eine katalytische Triade bestehend aus Aspartat, Cystein und Histidin lokalisiert. Der Aufbau des Proteins UHL1 ähnelt dabei jenem des verwandten Proteins UHL3 (Bishop, Rocca et al. 2016).

## Funktion

UCHL1 weist eine hohe Affinität für monomeres Ubiquitin auf, welches sich *in vitro* leicht von der C-terminalen Region hydrolysieren lässt (Bishop, Rocca et al. 2016). Allerdings zeigt es sich bei der Hydrolyse ubiquitinerter Proteine aufgrund eines eingeschränkten Zugangs zum aktiven Zentrum als schwache Hydrolase (Das, Hoang et al. 2006). Dies wird beispielhaft am Ubiquitin-ähnlichen Molekül NEDD8 (engl. für neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8) deutlich, welches sich trotz starker Molekülaffinität nicht durch UCHL1 hydrolysieren lässt (Wada, Kito et al. 1998). Zudem wurde UCHL1 in einer früheren Studie eine gegensätzliche Funktion zugeschrieben. So soll das Protein als Ubiquitin-konjugierendes Enzym wirken und für das Anbinden von Ubiquitin an Proteine mit anschließendem Abbau des Substrats verantwortlich sein (Liu, Fallon et al. 2002).

Aberrante UCHL1-Expression findet sich in unterschiedlichsten, nicht-neuronalen Tumorgeweben und Krebszelllinien. Hierbei wird UCHL1 je nach Tumorerkrankung eine Rolle als Onkogen oder Tumorsuppressor zugeschrieben. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht aberranter UCHL1-Expression in verschiedenen Tumorgeweben (Hurst-Kennedy, Chin et al. 2012).

Erhöhte UCHL1-Expression	Verminderte UCHL1-Expression
Plattenepithelkarzinom	Prostatatumor
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	Primärer Brustkrebstumor
Osteosarkom	Primäres Nasopharyngealkarzinom
Adenokarzinom	Kolorektales Karzinom
Metastasiertes kolorektales Karzinom	Melanom
Brustkrebs	Magenkarzinom (diffuser Typ)
Duktales Pankreaskarzinom	
Karzinom der Nebenschilddrüse	

**Tabelle 3) Aberrante UCHL1-Expression in Tumorgeweben (aus dem Englischen und modifiziert nach Hurst-Kennedy, Chin et al. 2012)**

UCHL1 ist weiterhin für die Aufrechterhaltung axonaler Stabilität notwendig. Ein Verlust des Proteins führt demnach zu axonaler Degeneration und neuronalem Tod (Bishop, Rocca et al. 2016).

Des Weiteren soll UCHL1 an der Pathogenese neuronaler Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson und dem Morbus Alzheimer beteiligt sein. Einzig über die UCHL1-abhängige Spaltung der Poly-Ubiquitin-Kette des Polyubiquitin- $\alpha$ -Synuclein-Konjugats in einzelne Ubiquitin-Monomere kann jenes Konjugat erkannt, gebunden und schließlich abgebaut werden. Liegt allerdings eine UCHL1-Mutation vor, kommt es zu einer Akkumulation beschädigter oder fehlgefalteter Proteine. Intrazelluläre Aggregation (z.B. Lewy bodies bei  $\alpha$ -Synuclein), Neurodegeneration und Zelltod sind die Folge (Wang, Yang et al. 2017). Zusätzlich haben Erhöhungen des UCHL1-Spiegels im Liquor eine Korrelation mit dem Schweregrad einer traumatischen Hirnverletzung (TBI, engl. für traumatic brain injury) ergeben (Papa, Akinyi et al. 2010).

## 1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die beiden vorgestellten Biomarker-Kandidaten DYNLT1 und UCHL1 zu analysieren und in Bezug auf deren Prognosefähigkeit zu beurteilen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Gliome und hierbei insbesondere das Glioblastom trotz der Entwicklung neuer Therapiestrategien bis heute als unheilbar gelten. Gerade deshalb ist die Identifizierung neuer zellulärer bzw. molekularer Faktoren, die an der Pathogenese dieser Tumoren beteiligt sind, von elementarer Bedeutung. Nur auf diese Weise kann die Prognose jener Patienten verbessert und darüber hinaus zur Entwicklung neuer Therapiemethoden beigetragen werden.

Nach unserem derzeitigen Wissensstand wurde bis dato keine Studie durchgeführt, in welcher ein möglicher prognostischer Einfluss von DYNLT1 und UCHL1 auf Patienten mit Gliomen untersucht wurde. Um dieser Fragestellung nachzugehen, erfolgte in der vorliegenden Studie eine immunhistochemische Analyse von Patienten mit Astrozytom und Glioblastom. Zusätzlich führten wir eine kombinierte Untersuchung mit den zuvor beschriebenen Biomarkern MGMT und FZD7 durch.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Studienaufbau

Bei der vorliegenden Studie wurden retrospektive Analysen an FFPE- (engl. für formalin-fixed / paraffin-embedded) Tumormaterialien von Patienten mit Astrozytomen und primären Glioblastomen durchgeführt (vgl. Tabelle 4). Alle Patienten wurden zwischen 2002 und 2010 in der Neurochirurgischen Klinik des KRH Klinikum Nordstadt in Hannover operiert und behandelt. Zusätzlich wurden zu jedem Patienten krankheitsbezogene Daten elektronisch erfasst und u.a. folgende Parameter ermittelt: Alter, Geschlecht, Karnofsky-Index, Tumor- und Ödem-Größe, Therapieverfahren, Ausmaß der Resektion und MGMT-Methylierung. Von insgesamt 28 Patienten wurden zudem histopathologisch tumorfreie Gewebereiche ausgewählt. Jene Proben dienten später als „gesunde Kontrolle“. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde schließlich die Expression von DYNLT1 und UCHL1 analysiert.

Für die Studie wurde ein positives Votum durch das Ethikkomitee der Medizinischen Hochschule Hannover eingeholt und alle Patientendaten pseudonymisiert. Hinsichtlich der Fortführung jener Forschungsprojekte an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg liegt zusätzlich ein positives Votum des dortigen Ethikkomitees vor.

	WHO Grad II		WHO Grad III		GBM (WHO Grad IV)	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Gesamt</b>	22	100,0	19	100,0	113	100,0
<b>Geschlecht</b>						
weiblich	10	45,5	9	47,4	49	43,4
männlich	12	54,5	10	52,6	64	56,6
<b>Karnofsky-Index</b>						
10	0	0,0	0	0,0	1	0,9
20	0	0,0	0	0,0	1	0,9
30	1	4,5	1	5,3	1	0,9
40	0	0,0	0	0,0	2	1,8
50	0	0,0	1	5,3	13	11,5
60	0	0,0	3	15,8	15	13,3
70	1	4,5	5	26,3	15	13,3
80	11	50,0	5	26,3	37	32,7
90	8	36,4	4	21,1	21	18,6
100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
n.d.	1	4,5	0	0,0	7	6,2

<b>Ausmaß der Resektion</b>						
subtotal	6	27,3	6	31,6	51	45,1
total	12	54,5	9	47,4	50	44,2
n.d.	4	18,2	4	21,1	12	10,6
<b>Therapie</b>						
OP	10	45,5	0	0,0	10	8,8
OP + RTX	3	13,6	3	15,8	18	15,9
OP + CTX	1	4,5	3	15,8	3	2,7
OP + RCTX	7	31,8	13	68,4	78	69,0
n.d.	1	4,5	0	0,0	4	3,5
<b>MGMT-Methylierung</b>						
nein	6	27,3	5	26,3	52	46,0
ja	9	40,9	11	57,9	51	45,1
n.d.	7	31,8	3	15,8	10	8,8

**Tabelle 4) Patientenübersicht** (RTX: Radiotherapie; CTX: Chemotherapie; RCTX: Radio- / Chemotherapie; n.d.: not determinable)

## 2.2 Material

<b>Laboraausstattung</b>	
Aperio AT2 High Resolution Scanner	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Arraymold Kit E	Arraymold, Riverton, UT, USA
BioDoc Analyse Systems	Biometra, Göttingen, Deutschland
Mikrotom	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Paraffin-Gießmaschine	Leica Biosystems, Nussloch Deutschland
<b>Chemikalien</b>	
Antibody Diluent OP Quanto 125 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
DAB Quanto 125 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin sauer nach MAYER 2500 ml	Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland
Isopropanol rein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mountex	Medite, Burgdorf, Deutschland
Paraffin	Sasol Wax, Hamburg, Deutschland
Primary Antibody Enhancer 125 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
PT Module Buffer 1 (100x - citrate buffer, pH = 6) 250 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tris Buffered Saline & Tween 20 (20X) 1000 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
UltraVision Hydrogen Peroxide Block 60 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
UltraVision Protein Block 125 ml	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Xylol recycled	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper	
DYNLT1	Proteintech Europe, Manchester, UK
UCHL1 (D3T2E) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology Europe, B.V.
Software	
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland
Aperio ImageScope	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Biometra BioDoc Analysis	Biometra, Göttingen, Deutschland
Image J	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/index.html">https://imagej.nih.gov/ij/index.html</a>
SAP	SAP, Walldorf, Deutschland
SPPS	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

Tabelle 5) Materialübersicht

## 2.3 TMA-Herstellung

Die Tissue Microarray- (TMA) Methode diente als Basis für die immunhistochemischen Färbungen der Tumorgewebe. TMAs gelten seit Etablierung der Methode durch Kononen et al. im Jahre 1998 (Kononen, Bubendorf et al. 1998) als elementarer Bestandteil molekularer und immunhistochemischer Studien (Milanes-Yearsley, Hammond et al. 2002). Vorteile der Methode sind die simultane Auswertung mehrerer hunderter Gewebeproben, eine geringe experimentelle Variabilität und Artefaktanfälligkeit sowie geringe Kosten, die mit der Herstellung und Aufarbeitung der TMAs verbunden sind.

In der hier vorliegenden Studie wurden die TMA-Blöcke mithilfe des Arraymold Kit E hergestellt. Hierbei erfolgte zunächst eine Fixierung der Gewebeproben in Formaldehyd mit anschließender Einbettung der Proben in Paraffin. Im Anschluss wurden jene Spenderblöcke ausgewählt, welche reichlich Tumorgewebe und wenig nekrotische Areale enthielten. Schließlich wurden diese Proben ausgestanzt, in Empfängerblöcke überführt und in 2 µm Bereiche geschnitten.

## 2.4 Immunhistochemie von DYNLT1 und UCHL1

Um eine Färbung bzw. Antikörperbindung zu ermöglichen, mussten die Gewebeprobe(n) zunächst entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Die Entparaffinierung erfolgte durch Xylol, die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe in Isopropanol und destilliertem Wasser. Die zunächst verlorene Immunreaktivität des formalinfixierten und paraffineingebetteten (FFPE) Gewebes wurde schließlich mittels Antigendemaskierung wiederhergestellt. Die in einem Citratpuffer mit pH = 6 verdünnten Gewebeprobe(n) wurden hierfür erhitzt (HIER, engl. für heat-induced epitope retrieval) und die durch Formaldehyd entstandenen Vernetzungen auf diese Weise aufgebrochen. Der Citratpuffer, der an dieser Stelle zur Bindung störender Calcium-Ionen diente, wurde nach und nach mit Wasser ersetzt und die Gewebeprobe(n) mit TBS- (engl. für Tris Buffered Saline)-Tween-Puffer durchtränkt. Zwischen den im Folgenden erläuterten Schritten erfolgte jeweils eine Waschung in TBS-Tween-Puffer.

Im nächsten Schritt wurden die Proben zur Inhibition der gewebeeigenen Peroxidase-Aktivität mittels Peroxide Block blockiert. Da es bei immunhistochemischen Nachweisreaktionen zu unspezifischen Bindungen zwischen Primär- und Sekundärantikörpern kommen kann, wurde vor Inkubation mit dem Primärantikörper zusätzlich ein sog. Proteinblock hinzugegeben.

Im Anschluss erfolgte die Verdünnung der Antikörper mit einer Endkonzentration von 132 ng/ml für UCHL1 und einer Endkonzentration von 406 ng/ml für DYNLT1. Über Nacht wurden die Gewebeprobe(n) schließlich bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde ein Primary AB (engl. für antibody) Enhancer als Verstärkungsreagenz hinzugegeben, um die Signalintensität und -sensitivität der Färbungen zu verbessern. Weiterhin erfolgte eine Zugabe von HRP- (engl. für horseradish peroxidase) Polymer. Die zusätzlich hinzugegebene DAB- (Diaminobenzidin) Lösung diente in Reaktion mit dem HRP Polymer als Substrat- und Chromogenlösung. DAB bildet dabei mittels Oxidation am Ort des Zielantigens ein dunkelbraunes Präzipitat, welches sich mithilfe eines Lichtmikroskops darstellen lässt. Nach anschließender Waschung in destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin, wodurch sich die Zellkerne gegenfärbten.

Die weiteren Schritte umfassten die Waschung der Gewebeproben in lauwarmen Wasser und Isopropanol sowie die abschließende Eindeckung der Proben mit Mountex. Alle TMAs wurden schließlich mithilfe des Aperio AT2 Scanners digitalisiert und mittels Aperio ImageScope Software untersucht.

## 2.5 MGMT-Methylierung

Für die vorliegende Patientenkohorte bestimmten Schiffgens et al. in einer früheren Studie den Methylierungsstatus des MGMT-Promoters mithilfe einer methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR / MSP, engl. für methylation specific polymerase chain reaction). Zunächst erfolgte jedoch eine Isolierung der genomischen DNA (gDNA, engl. für genomic DNA) mit anschließender Bisulfit-Konvertierung. Nach erfolgter PCR wurden die entstandenen Produkte schließlich mittels Elektrophorese getrennt und im Anschluss analysiert. Wurde eine Bande mit methylierter PCR sichtbar, galt diese als methylierte, andernfalls als unmethylierte Tumorprobe (Schiffgens, Wilkens et al. 2016).

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Patientendaten erfolgte mittels der Statistiksoftware SPSS. Der Box-Plot diente zur Bestimmung der Unterschiede hinsichtlich der Expression von DYNLT1 und UCHL1 in gesundem Hirngewebe sowie in Astrozytomen und GBM. Mittels Kaplan-Meier-Methode wurden weiterhin Kurven für das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben erstellt. Das Gesamtüberleben (5-Jahres-Cutoff) wurde hierbei als der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und dem Eintritt des Todes bzw. dem Zeitpunkt der letzten Datenerhebung definiert. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mittels Log-Rank-Test.

Im Anschluss führten wir unter Anwendung der Cox-Regression und Bestimmung der Hazard Ratio multivariate Analysen durch. Für Faktoren, für welche in der Vergangenheit eine prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben bei Glioblastom-Patienten ermittelt werden konnte, bestimmten wir die Cox's proportional hazard linear regression. Folgende Faktoren wurden hierbei betrachtet: Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie, MGMT-Methylierung und FZD7-Expression.

Unter Anwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman-Rho) wurden weiterhin mögliche Zusammenhänge bzw. Korrelationen zwischen DYNLT1 bzw. UCHL1 und den im Folgenden aufgeführten Parametern untersucht:

**Tumorvolumen:** Die Berechnung des Tumorvolumens (in  $\text{cm}^3$ ) erfolgte mittels präoperativer MRT-Bilder mit T1-Gewichtung.

**Ödemvolumen:** Die Berechnung des Ödemvolumens (in  $\text{cm}^3$ ) erfolgte mittels präoperativer MRT-Bilder mit T2-Gewichtung.

**Ki-67-Positivität:** Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, welcher während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert wird. Ruhende Zellen in der G0-Phase exprimieren das Ki-67-Antigen hingegen nicht. Mithilfe eines monoklonalen Antikörpers kann der Anteil proliferierender Zellen in Tumoren bestimmt werden. In der vorliegenden Studie wurden die ermittelten Werte (Ki-67-Positivität > 10 %) den histopathologischen Befunden entnommen.

**Mikrovaskuläre Proliferationsdichte:** Die vaskuläre Hyperproliferation ist ein wichtiges histopathologisches Charakteristikum des GBMs. **CD31** (engl. für cluster of differentiation 31) gilt dabei als ein Oberflächenmarker, welcher vermehrt auf reifen Endothelzellen exprimiert wird. Durch Färbung dieses Markers konnte in der hier beschriebenen Studie auf die Proliferationsdichte im Gewebe geschlossen werden.

Die Signifikanzgrenze wurde bei allen durchgeführten Analysen auf  $p \leq 0,05$  gesetzt.

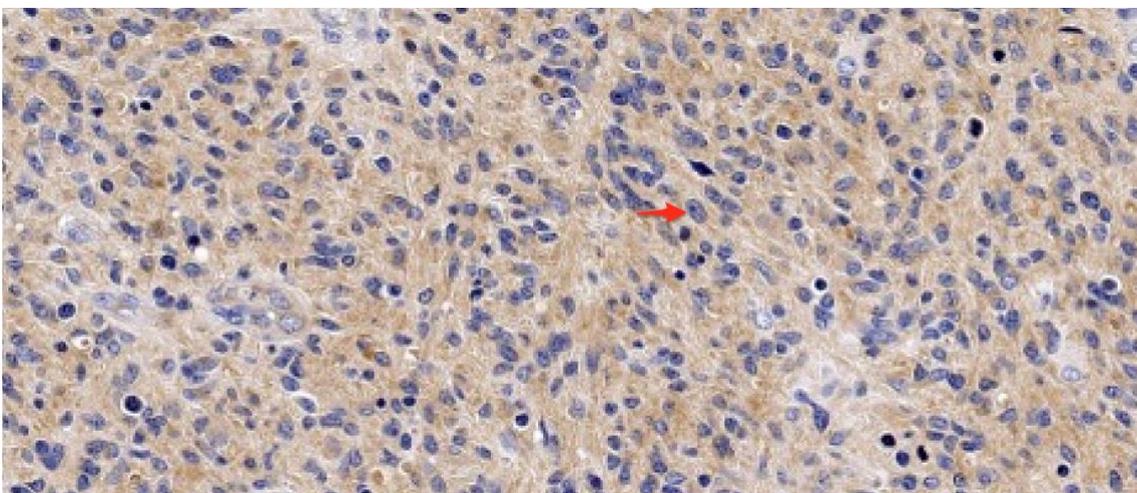
## III. Ergebnisse

### **3.1 DYNLT1 und Überlebensanalyse bei Astrozytom- und GBM-Patienten**

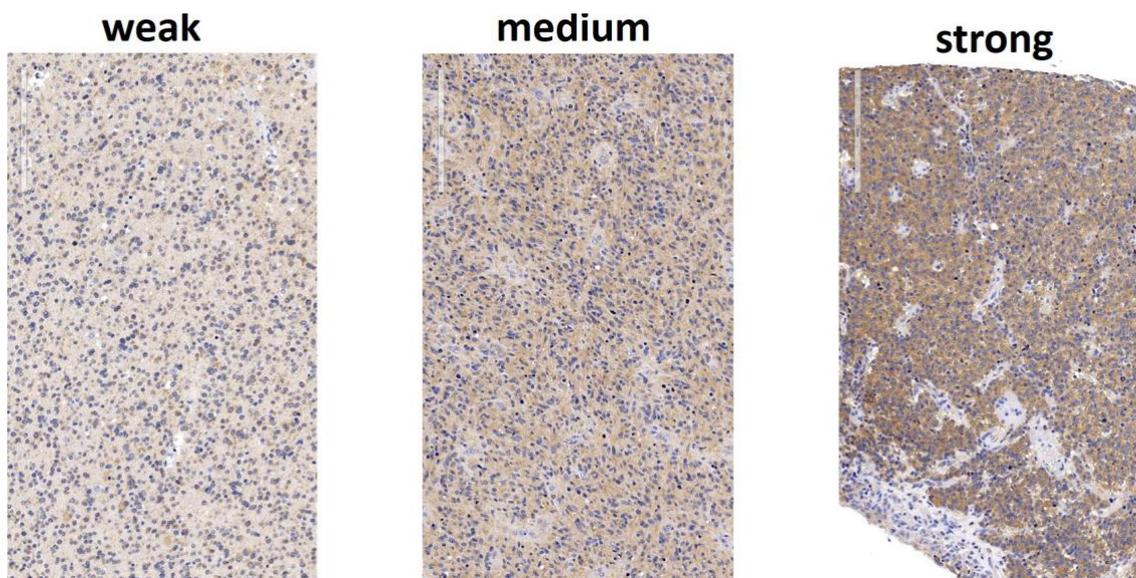
#### **3.1.1 DYNLT1 Expression und Auswertung**

Die Expression von DYNLT1 wurde von zwei unabhängigen Untersuchern mittels H-Score bestimmt. DYNLT1 zeigte hierbei eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung mit Aussparung der Zellkerne (vgl. Abb. 3 A). Für die Auswertung der Proben, die bei 20-facher Vergrößerung erfolgte, wurde jeder Gewebeschnitt hinsichtlich des Färbeverhaltens beurteilt. Hierfür erfolgte eine Unterteilung in die Kategorien „weak“, „medium“ und „strong“ (vgl. Abb. 3 B). Demnach wurde ein schwach gefärbter Gewebeabschnitt der Kategorie „weak“ (1 Punkt), ein mittelstark gefärbter Abschnitt der Kategorie „medium“ (2 Punkte) sowie ein stark gefärbter Gewebeabschnitt der Kategorie „strong“ (3 Punkte) zugeordnet. Viele Gewebeproben wiesen dabei eine starke Heterogenität der Färbung auf. Zur besseren Beurteilung der jeweiligen Expression wurde deshalb zusätzlich der prozentuale Anteil positiver Zellen (0 – 100 %) berücksichtigt. Beide Faktoren fanden schließlich Anwendung in der folgenden Formel:  $(1 \text{ Punkt} \times x) + (2 \text{ Punkte} \times y) + (3 \text{ Punkte} \times z)$ .  $x + y + z$  entsprachen dabei 100 % der Tumorfläche.

**Abb. 3**  
**A.**



B.

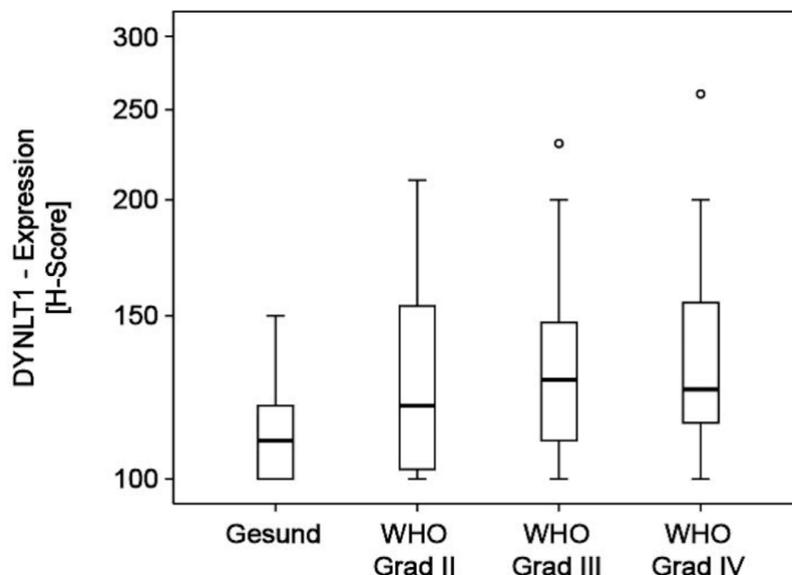


**Abbildung 3) DYNLT1 – Färbeverhalten und Scoring-System.** A. DYNLT1 weist eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung auf. Die ungefärbten Zellkerne stellen sich blau dar (roter Pfeil). (Vergrößerung: 20 x) B. Die Beurteilung der Expression bzw. die Einteilung in die jeweilige Kategorie erfolgte auf Basis der Farbintensität und Heterogenität. (Vergrößerung: 20 x)

Anschließend wurde mittels Box-Plot-Analyse untersucht, ob in Astrozytomen (WHO Grad II und III) und Glioblastomen (WHO Grad IV) eine höhere DYNLT1-Expression als in gesundem Hirngewebe vorliegt und ob Unterschiede zwischen den einzelnen WHO Graden festzustellen sind. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Der untere Bereich einer Box entspricht hierbei dem 25%-Perzentil, das obere Quartil entsprechend dem 75%-Perzentil. Der Median ist jeweils durch eine horizontale, schwarze Linie innerhalb einer Box dargestellt. Weiterhin entspricht die Länge der Box, also die Differenz zwischen dem oberen und unteren Quartil, dem Interquartilsabstand (ICR, engl. für interquartil range). Der ICR gilt in der Statistik als Streuungsmaß und gibt die Breite des Intervalls an, in dem die mittleren 50 % der Stichprobe liegen. In den hier vorliegenden Ergebnissen wies die Patientengruppe mit WHO Grad II die größte Streuung auf. Die „Antennen“ bzw. „Whisker“ schließen die außerhalb der Box liegenden Werte mit ein. Ausreißer sind entsprechend gekennzeichnet.

Die vorliegenden Ergebnisse (vgl. Abb. 4) zeigten im Tumorgewebe bei Astrozytom- und GBM-Patienten (WHO Grad II: 120,00; WHO-Grad III: 128,00; WHO Grad IV: 125,00) eine im Vergleich zu gesundem Hirngewebe (Median: 110) leicht erhöhte DYNLT1-Expression. Hinsichtlich der DYNLT1-Expression konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorgraden beobachtet werden. Weiterhin lassen die sich innerhalb der

Box zum unteren Quartil gerichteten bzw. sich leicht (WHO Grad II) bzw. stark links (WHO Grad IV) befindenden Medianwerte auf eine Rechtsschiefe der zugrundeliegenden Verteilung der Messdaten schließen. Bei WHO Grad III hingegen zeigte sich eine leichte rechtssteile bzw. linksschiefe Verteilung.

**Abb. 4****A.****B.**

WHO Grad	Median	Minimum	Maximum
Gesund	110,00	100,00	150,00
Grad II	120,00	100,00	210,00
Grad III	128,00	100,00	230,00
Grad IV	125,00	100,00	260,00

**Abbildung 4) DYNLT1 – Expressionsvergleich mittels Box-Plot. A.** Vergleichende Darstellung der DYNLT1-Expression zwischen gesunden Patienten und Patienten mit den WHO Graden II, III und IV. Das 25%- und 75%-Perzentil wird jeweils durch einen vertikalen Kasten dargestellt. Die schwarze Linie entspricht dem Median. Ausreißer sind als Kreise gekennzeichnet. **B.** Übersicht der den einzelnen Patientengruppen zugehörigen Werte (Median, Minimum, Maximum).

### 3.1.2 DYNLT1 und Gesamtüberleben

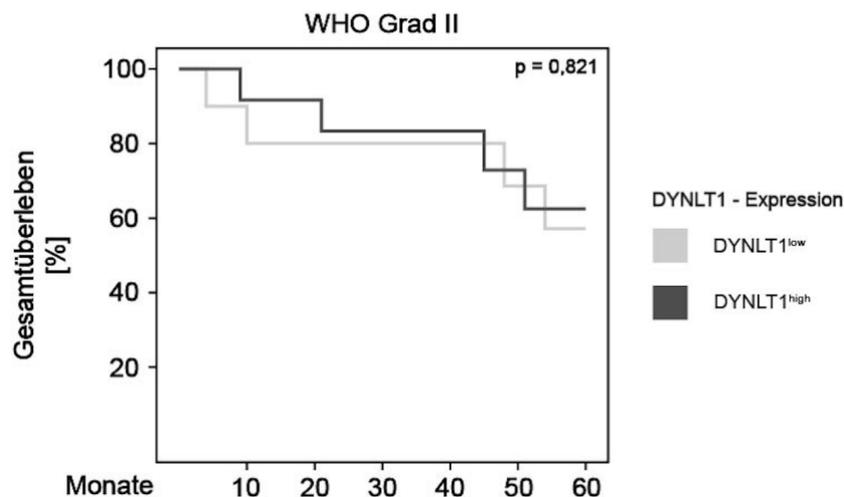
Im nächsten Schritt wurde die Assoziation zwischen der DYNLT1-Expression und dem Gesamtüberleben bei WHO Grad II-, Grad III- und Grad IV-Patienten ermittelt. Basierend auf der Median-Split-Methode erfolgte zunächst eine Dichotomisierung in DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup>. Alle Werte unterhalb des Medianwerts wurden demnach als DYNLT1<sup>low</sup>, alle Werte oberhalb des Medianwerts als DYNLT1<sup>high</sup> eingestuft.

Mittels Kaplan-Meier-Methoden wurden anschließend Kurven erstellt, die das prozentuale Gesamtüberleben in Beziehung zum 60-monatigen Follow-up setzten. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mittels Log-Rank-Test.

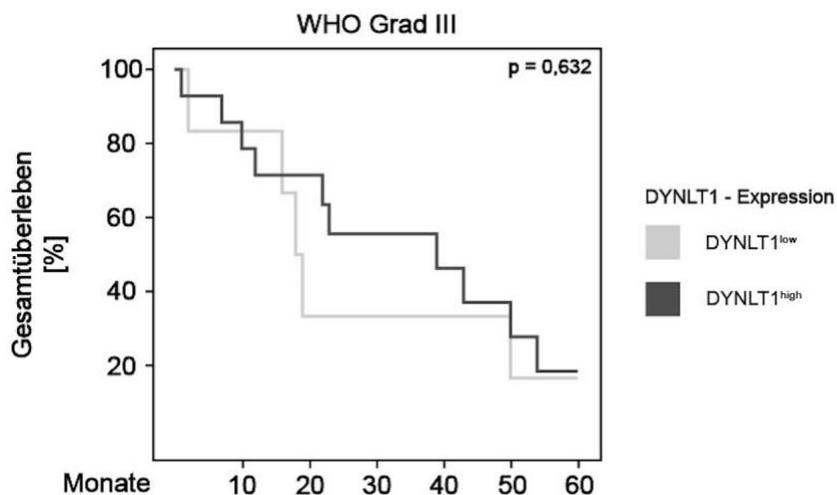
Die Ergebnisse zeigten, dass erhöhte Level von DYNLT1 (DYNLT1<sup>high</sup>) bei GBM-Patienten (Grad IV) mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert waren ( $p = 0,007$ , log rank) (vgl. Abb. 5 C und D). Demnach hatten Patienten mit einer erhöhten Expression von DYNLT1 mit ca. 9 Monaten (95 % KI = 5,706 – 12,294) eine wesentlich kürzere Überlebenszeit als jene Patienten mit einer niedrigen DYNLT1-Expression, welche eine Überlebenszeit von ca. 28 Monaten (95 % KI = 16,625 – 39,375) aufweisen konnten (vgl. Abb. 5 D). Bei Grad II- ( $p = 0,821$ , log rank) und Grad III-Patienten ( $p = 0,632$ , log rank) konnte dieser Sachverhalt nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 5 A, B und D).

**Abb. 5**

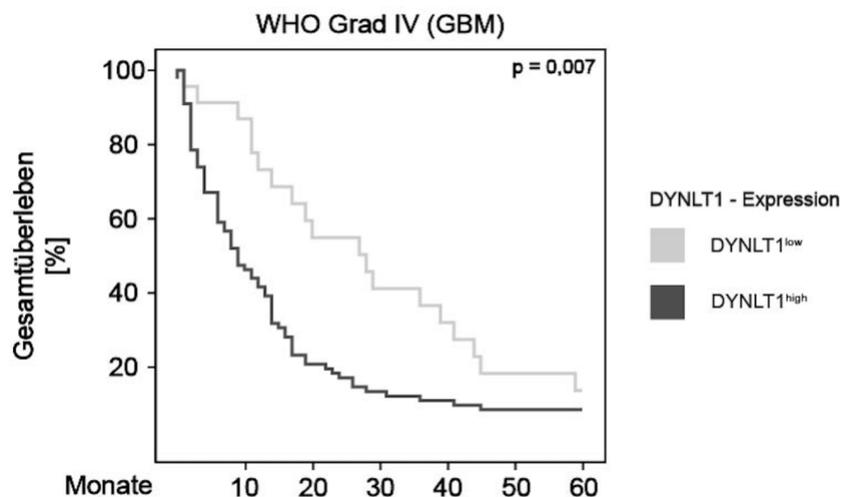
**A.**



**B.**



C.



D.

WHO Grad	DYNLT1	Mittelwert				Median			
		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
II	DYNLT1 <sup>low</sup>	47,343	6,528	34,548	60,138	-	-	-	-
	DYNLT1 <sup>high</sup>	50,000	4,843	40,508	59,492	-	-	-	-
	Gesamt	48,800	3,981	40,998	56,602	-	-	-	-
III	DYNLT1 <sup>low</sup>	27,500	8,346	11,142	43,858	18,000	1,837	14,399	21,601
	DYNLT1 <sup>high</sup>	34,048	5,631	23,011	45,084	39,000	15,301	9,010	68,990
	Gesamt	32,232	4,728	22,966	41,498	23,000	13,327	< 0,001	49,122
IV	DYNLT1 <sup>low</sup>	29,490	4,017	21,616	37,364	28,000	5,804	16,625	39,375
	DYNLT1 <sup>high</sup>	14,880	1,809	11,334	18,425	9,000	1,681	5,706	12,294
	Gesamt	17,944	1,754	14,507	21,381	12,000	1,481	9,098	14,902

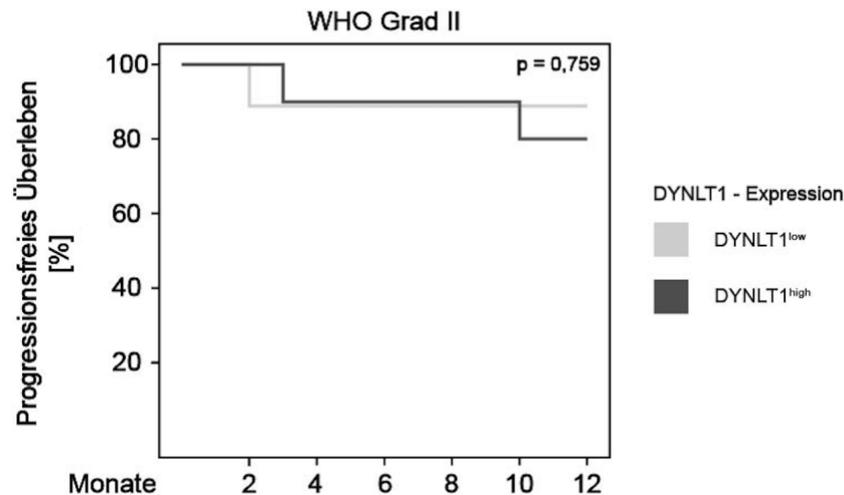
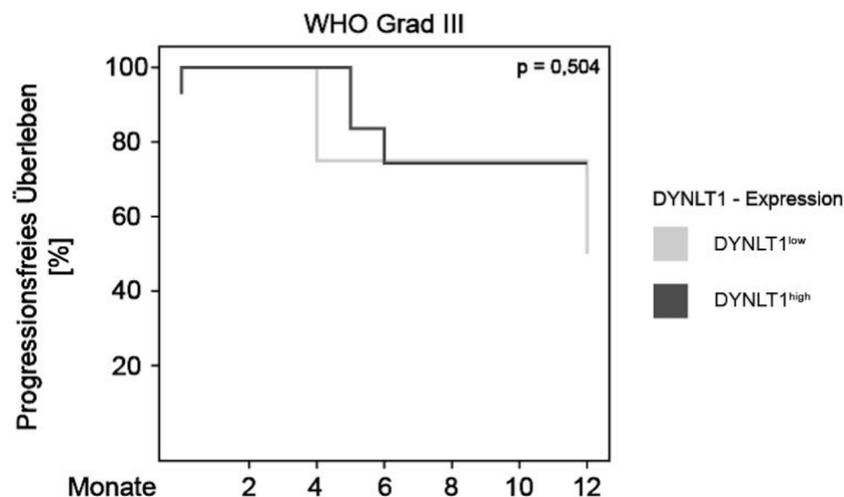
**Abbildung 5) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression und dem Gesamtüberleben bei Patienten der WHO Grade II, III und IV. A - C.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup> den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gesamtüberleben und dem 60-monatigen Follow-up bei Patienten der WHO-Grade II, III und IV. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **D.** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup>.

### 3.1.3 DYNLT1 und progressionsfreies Überleben

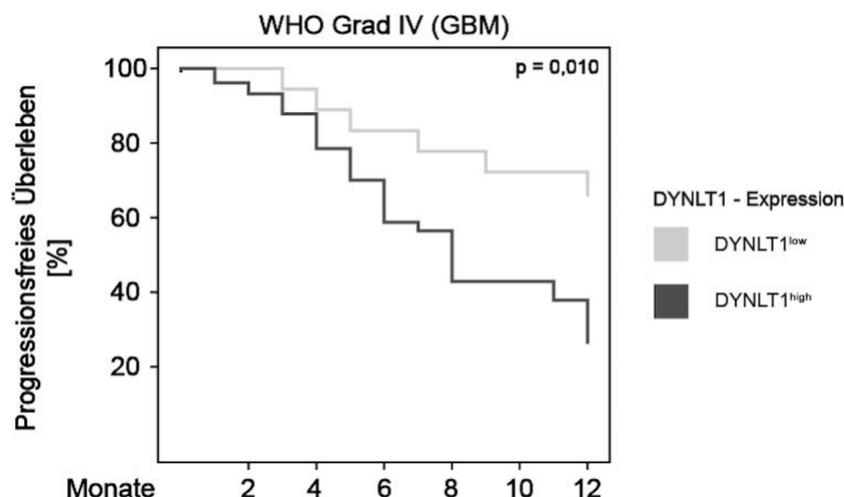
Ähnliche Untersuchungen erfolgten hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen DYNLT1 und dem progressionsfreien Überleben. Mittels Kaplan-Meier-Methode wurde hierbei das prozentuale progressionsfreie Überleben in Beziehung zu einem 12-monatigen Follow-up gesetzt. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte wie zuvor mittels Log-Rank-Test.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte DYNLT1-Expression (DYNLT1<sup>high</sup>) bei GBM-Patienten mit einem kürzeren, progressionsfreien Überleben einherging ( $p = 0,010$ , log rank) (vgl. Abb. 6 C und D). Bei Grad II- ( $p = 0,759$ , log rank) und Grad III-Patienten ( $p = 0,504$ , log rank) konnte dieser Nachweis wiederum nicht erbracht werden (vgl. Abb. 6 A, B und D).

Mithilfe univariater Analysen konnte folglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben bzw. dem progressionsfreien Überleben und der Expression von DYNLT1 bei GBM-Patienten (WHO Grad IV) nachgewiesen werden. Für Patienten mit WHO Grad IV erfolgten deshalb zusätzlich multivariate Analysen, welche in Abschnitt 3.1.5 vorgestellt werden.

**Abb. 6****A.****B.**

C.



D.

WHO Grad	DYNLT1	Mittelwert				Median			
		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
II	DYNLT1 <sup>low</sup>	10,889	1,048	8,836	12,942	-	-	-	-
	DYNLT1 <sup>high</sup>	10,900	0,854	9,227	12,573	-	-	-	-
	Gesamt	10,878	0,672	9,560	12,195	-	-	-	-
III	DYNLT1 <sup>low</sup>	10,000	2,449	5,199	14,801	12,000	-	-	-
	DYNLT1 <sup>high</sup>	9,936	1,063	7,853	12,019	-	-	-	-
	Gesamt	9,975	1,002	8,011	11,939	-	-	-	-
IV	DYNLT1 <sup>low</sup>	10,222	0,796	8,662	11,783	-	-	-	-
	DYNLT1 <sup>high</sup>	8,063	0,515	7,053	9,073	8,000	0,533	6,955	9,045
	Gesamt	8,632	0,441	7,768	9,497	11,000	1,262	8,526	13,474

**Abbildung 6) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression und dem progressionsfreien Überleben bei Patienten der WHO Grade II, III und IV.** A - C. Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup> den Zusammenhang zwischen dem prozentualen progressionsfreien Überleben und dem 12-monatigen Follow-up bei Patienten der WHO-Grade II, III und IV. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **D.** Mittel- und Medianwerte für das progressionsfreie Überleben der Patientengruppen DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup>.

### 3.1.4 Korrelation zwischen DYNLT1 und weiteren Tumorparametern

Unter Anwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman-Rho) wurden zusätzlich mögliche Korrelationen zwischen DYNLT1 und weiteren Tumorparametern bei GBM-Patienten untersucht. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman misst dabei den Zusammenhang zwischen zwei Variablen und kann Werte von -1 (perfekte negative Korrelation) bis +1 (perfekte positive Korrelation) einnehmen. Bei dem Wert 0 würde hingegen keine Korrelation vorliegen.

Korrelation DYNLT1 bei WHO Grad IV (Spearman-Rho)	Tumorvolumen (cm <sup>3</sup> )	Ödemvolumen (cm <sup>3</sup> )	Ki-67-Positivität > 10 %	Mikrovaskuläre Proliferationsdichte
Korrelationskoeffizient	0,124	0,078	0,044	0,095
Signifikanz (2-seitig)	0,249	0,489	0,643	0,320
N	88	80	112	111

**Tabelle 6) Korrelation zwischen DYNLT1 und weiteren Tumorparametern.** Anwendung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten zur Ermittlung der Korrelation zwischen DYNLT1 und Tumorvolumen, Ödemvolumen, Ki-67-Positivität sowie mikrovaskulärer Proliferationsdichte bei GBM-Patienten. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Wie in Tabelle 6 dargestellt, zeigte DYNLT1 bei GBM-Patienten eine positive Korrelation unter gleichzeitiger Betrachtung des Tumorvolumens (Rho = 0,124), des Ödemvolumens (Rho = 0,078), der Ki-67-Positivität (Rho = 0,044) sowie der mikrovaskulären Proliferationsdichte (Rho = 0,095). Eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) konnte jedoch für keines der genannten Ergebnisse gezeigt werden (Tumorvolumen:  $p = 0,249$ ; Ödemvolumen:  $p = 0,489$ ; Ki-67-Positivität:  $p = 0,643$ ; mikrovaskuläre Proliferationsdichte:  $p = 0,320$ ).

### 3.1.5 DYNLT1 und Gesamtüberleben – Multivariatanalyse

Mittels Cox-Regression sollte der Einfluss verschiedener Parameter, die sich in der Vergangenheit als Prognosefaktoren beim Glioblastom behauptet haben, berücksichtigt werden. Voraussetzung für die Nutzung dieser Regressionsanalyse ist ein über die Zeit konstanter „Hazard Ratio“. Entsprechend Abbildung 5 C war bei DYNLT1<sup>high</sup> eine gleichmäßige Überlegenheit gegenüber DYNLT1<sup>low</sup> zu erkennen und diese Voraussetzung somit erfüllt.

In der vorliegenden Studie wurden das Alter, der Karnofsky-Index, das Ausmaß der Resektion sowie die Therapie als bekannte Prognosefaktoren berücksichtigt. Entsprechend Tabelle 7 zeigte sich bei erhöhter DYNLT1-Expression (DYNLT1<sup>high</sup>) nach jeweiliger Adjustierung ein bis zu 1,9-fach höheres Sterberisiko (Model 1: HR = 1,735, 95 % KI = 1,037 – 2,902,  $p = 0,036$ ; Model 2: HR = 1,826, 95 % KI = 1,075 – 3,103,  $p = 0,026$ ; Model 3: HR = 1,904, 95 % KI = 1,144 – 3,170,  $p = 0,013$ ; Model 4: HR = 1,991, 95 % KI = 1,181 – 3,357,  $p = 0,010$ ) als in der Referenzgruppe mit niedriger DYNLT1-Expression (DYNLT1<sup>low</sup>).

Multivariate Cox-Regression	HR	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Model 1 (adjustiert für Alter)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	1,735	1,037 - 2,902	0,036
<b>Model 2 (adjustiert für Karnofsky-Index)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	1,826	1,075 - 3,103	0,026
<b>Model 3 (adjustiert für Ausmaß der Resektion)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	1,904	1,144 - 3,170	0,013
<b>Model 4 (adjustiert für Therapie)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	1,991	1,181 - 3,357	0,010

**Tabelle 7) DYNLT1 – Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben bei GBM-Patienten.** Durchführung multivariater Analysen mittels Cox-Regression mit bereits bekannten Co-Faktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) für DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup> bezogen auf das Gesamtüberleben bei GBM-Patienten. Dummy-Variable: DYNLT1<sup>low</sup>; HR: Hazard Ratio;  $p \leq 0,05$ .

### 3.1.6 DYNLT1 und progressionsfreies Überleben – Multivariatanalyse

Für das progressionsfreie Überleben bei GBM-Patienten konnten ähnliche Zusammenhänge beobachtet werden. Mit Ausnahme des Models 2 (HR = 2,351, 95 % KI = 0,957 – 5,772,  $p = 0,062$ ) ging auch hier eine erhöhte DYNLT1-Expression (DYNLT1<sup>high</sup>) mit einem signifikant höheren Sterberisiko (Model 1: HR = 2,730, 95 % KI = 1,136 – 6,563,  $p = 0,025$ ; Model 3: HR = 2,865, 95 % KI = 1,197 – 6,858,  $p = 0,018$ ; Model 4: HR = 2,759, 95 % KI = 1,149 – 6,621,  $p = 0,023$ ) einher (vgl. Tabelle 8).

Multivariate Cox-Regression	HR	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Model 1 (adjustiert für Alter)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	2,730	1,136 - 6,563	0,025
<b>Model 2 (adjustiert für Karnofsky-Index)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	2,351	0,957 - 5,772	0,062
<b>Model 3 (adjustiert für Ausmaß der Resektion)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	2,865	1,197 - 6,858	0,018
<b>Model 4 (adjustiert für Therapie)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>high</sup>	2,759	1,149 - 6,621	0,023

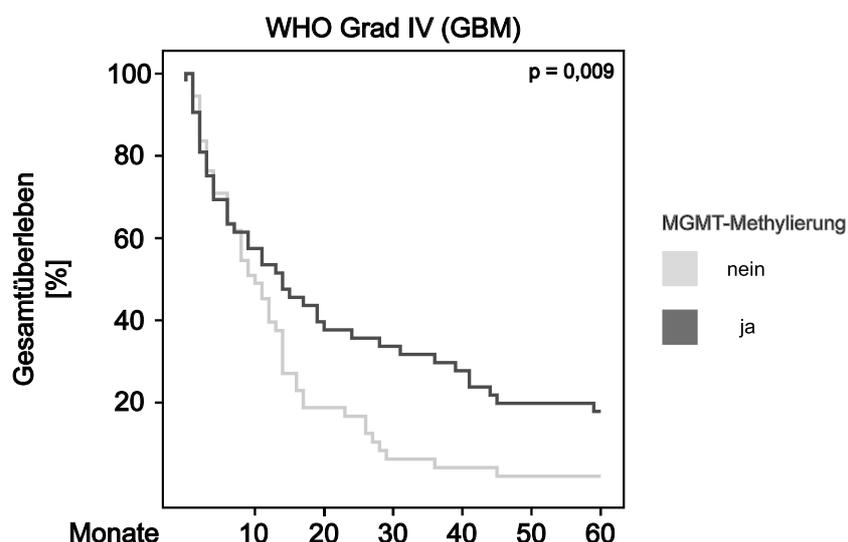
**Tabelle 8) DYNLT1 – Multivariate Cox-Regression für das progressionsfreie Überleben bei GBM-Patienten.** Durchführung multivariater Analysen mittels Cox-Regression mit bereits bekannten Co-Faktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) für DYNLT1<sup>low</sup> und DYNLT1<sup>high</sup> bezogen auf das progressionsfreie Überleben bei GBM-Patienten. Dummy-Variable: DYNLT1<sup>low</sup>; HR: Hazard Ratio;  $p \leq 0,05$ .

Hinsichtlich Gesamtüberleben sowie progressionsfreies Überleben zeigte sich DYNLT1 folglich als ein signifikanter, unabhängiger prognostischer Marker bei GBM-Patienten.

### 3.1.7 DYNLT1 / MGMT-Methylierung und Gesamtüberleben

In einer früheren Studie mit gleicher Patientenkohorte untersuchten Schiffgens et al. die Relevanz der MGMT-Methylierung bei GBM-Patienten bezogen auf das Gesamtüberleben. Patienten mit MGMT-Methylierung zeigten dabei ein signifikant höheres Gesamtüberleben ( $p = 0,009$ , log rank) als Patienten mit fehlendem Methylierungsstatus (vgl. Abb. 7) (Schiffgens, Wilkens et al. 2016).

**Abb. 7**  
**A.**



**B.**

MGMT-Methylierung	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	12,591	1,427	9,794	15,388	11,000	1,739	7,592	14,408
ja	18,498	2,045	14,490	22,506	15,000	3,915	7,327	22,673
<b>Gesamt</b>	<b>15,567</b>	<b>1,283</b>	<b>13,052</b>	<b>18,083</b>	<b>12,000</b>	<b>1,188</b>	<b>9,671</b>	<b>14,329</b>

**Abbildung 7) Zusammenhang zwischen MGMT-Methylierung und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten (Schiffgens, Wilkens et al. 2016).** **A.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für Patientengruppen mit fehlender bzw. vorhandener MGMT-Methylierung den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gesamtüberleben und dem 60-monatigen Follow-up bei GBM-Patienten. Die Bestimmung der Signifikanz ( $p$ -Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **B.** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen mit fehlendem bzw. vorhandenem MGMT-Methylierungsstatus.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Wirkung von DYNLT1 in Kombination mit dem MGMT-Methylierungsstatus bezogen auf das Gesamtüberleben untersucht. Die Patientenkohorte wurde hierfür in vier Untergruppen unterteilt: DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>, DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>methyliert</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / MGMT<sup>methyliert</sup>. Abbildung 8 A zeigt die entsprechenden Häufigkeiten. Für die Analyse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven gemäß der o.g. Kombinationen erstellt.

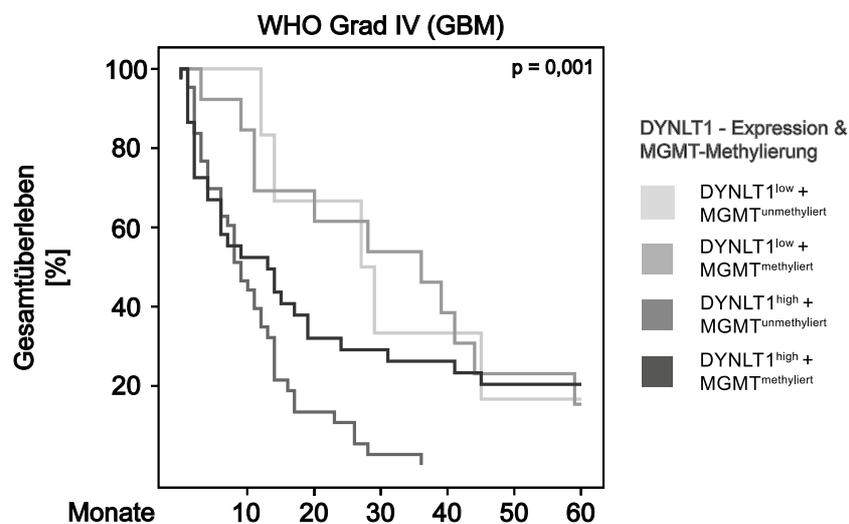
In Abschnitt 3.1.2 zeigte sich, dass eine erhöhte DYNLT1-Expression im Vergleich zu einer niedrigen Expression eine wesentlich kürzere Überlebenszeit aufwies (vgl. Abb. 5 C und D). Schiffgens et al. wiesen zudem nach, dass eine fehlende MGMT-Methylierung mit einer kürzeren Überlebenszeit ( $p = 0,009$ , log rank) einherging (vgl. Abb. 7). Die Kombinationsanalyse von DYNLT1 und MGMT zeigte, dass Patienten mit DYNLT1<sup>high</sup> und MGMT<sup>unmethyliert</sup> ein signifikant kürzeres Überleben als andere Patientengruppen aufwiesen ( $p = 0,001$ , log rank) (vgl. Abb. 8 B und C).

**Abb. 8**

**A.**

DYNLT1 & MGMT-Methylierung	Häufigkeit
1) DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	7
2) DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	13
3) DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	43
4) DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	37

**B.**



## C.

DYNLT1 & MGMT-Methylierung	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	25,667	3,906	18,010	33,323	27,000	9,186	8,996	45,004
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	25,692	3,446	18,938	32,446	-	-	-	-
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	10,714	1,297	8,172	13,255	9,000	1,402	6,253	11,747
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	15,865	2,341	11,276	20,454	13,000	5,064	3,074	22,926
<b>Gesamt</b>	15,694	1,290	13,166	18,223	12,000	1,183	9,682	14,318

**Abbildung 8) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression, MGMT-Methylierung und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten.** **A.** Unterteilung und Häufigkeiten der GBM-Patienten entsprechend der Kombinationsmöglichkeiten DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>, DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>methyliert</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / MGMT<sup>methyliert</sup>. **B.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen das jeweilige Gesamtüberleben von GBM-Patienten in Abhängigkeit vom 60-monatigen Follow-up. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **C.** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der jeweiligen Kombinationsmöglichkeit.

Zur weiteren Beurteilung der prognostischen Aussagekraft für das Gesamtüberleben bei GBM-Patienten erfolgten im Anschluss multivariate Cox-Regression-Analysen, die den Einfluss bekannter Prognosefaktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) berücksichtigen sollten. Die Patientengruppe mit geringer DYNLT1-Expression und fehlendem Methylierungsstatus (DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>) wurde hierbei stets als Dummy-Variable (Wert = 1) gesetzt.

Patienten mit erhöhter DYNLT1-Expression und fehlender MGMT-Methylierung (DYNLT1<sup>high</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>) zeigten im Vergleich zu deren Referenzgruppen ein signifikant höheres Sterberisiko (Model 1: HR = 3,384, 95 % KI = 1,309 – 8,747, p = 0,012; Model 3: HR = 3,259, 95 % KI = 1,268 – 8,378, p = 0,014; Model 4: HR = 2,965, 95 % KI = 1,137 – 7,734, p = 0,026). Nach Adjustierung des Karnofsky-Index‘ wurde zwar der Signifikanz-Schwellenwert nicht erreicht, eine starke Tendenz war allerdings zu erkennen (Model 2: HR = 2,542, 95 % KI = 0,987 – 6,549, p = 0,053) (vgl. Tabelle 9).

Multivariate Cox-Regression	HR	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Model 1 (adjustiert für Alter)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,258	0,435 - 3,638	0,672
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	3,384	1,309 - 8,747	0,012
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,481	0,570 - 3,844	0,420
<b>Model 2 (adjustiert für Karnofsky-Index)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	0,963	0,329 - 2,820	0,945
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	2,542	0,987 - 6,549	0,053
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,210	0,463 - 3,157	0,697
<b>Model 3 (adjustiert für Ausmaß der Resektion)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,114	0,385 - 3,219	0,842
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	3,259	1,268 - 8,378	0,014
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,517	0,584 - 3,940	0,392
<b>Model 4 (adjustiert für Therapie)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,031	0,357 - 2,978	0,955
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>unmethyliert</sup>	2,965	1,137 - 7,734	0,026
DYNLT1 <sup>high</sup> + MGMT <sup>methyliert</sup>	1,432	0,549 - 3,735	0,463

**Tabelle 9) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression, MGMT-Methylierung und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten in Abhängigkeit verschiedener Co-Faktoren.** Durchführung multivariater Analysen mittels Cox-Regression mit bereits bekannten Co-Faktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) bezogen auf das Gesamtüberleben bei GBM-Patienten. Dummy-Variable: DYNLT1<sup>low</sup> / MGMT<sup>unmethyliert</sup>; HR: Hazard Ratio;  $p \leq 0,05$ .

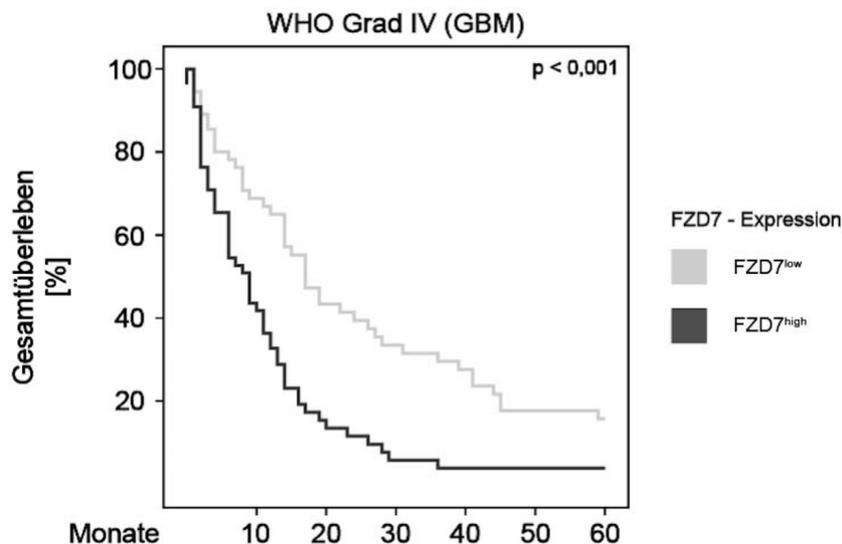
Zusammenfassend zeigte sich, dass eine erhöhte DYNLT1-Expression in Kombination mit einem fehlenden Methylierungsstatus unabhängig von ausgewählten Co-Faktoren eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit bei GBM besitzt.

### 3.1.8 DYNLT1 / FZD7 und Gesamtüberleben

Schiffgens et al. identifizierten das Transmembranprotein FZD7 (Frizzled-7) als prognostischen Faktor für Glioblastome. Demnach war eine erhöhte FZD7-Expression bei Patienten mit GBM mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p < 0,001$ , log rank) (vgl. Abb. 9) (Schiffgens, Wilkens et al. 2016).

Abb. 9

A.



B.

FZD7	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
FZD7 <sup>low</sup>	24,763	2,816	19,243	30,282	17,000	2,334	12,426	21,574
FZD7 <sup>high</sup>	11,574	1,724	8,195	14,954	9,000	1,532	5,996	12,004
Gesamt	18,097	1,763	14,642	21,551	12,000	1,252	9,546	14,454

Abbildung 9) Zusammenhang zwischen FZD7-Expression und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten (Schiffgens, Wilkens et al. 2016). **A.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für Patientengruppen mit niedriger bzw. erhöhter FZD7-Expression den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gesamtüberleben und dem 60-monatigen Follow-up bei GBM-Patienten. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **B.** Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen mit niedriger bzw. erhöhter FZD7-Expression.

In der vorliegenden Studie wurde auf Basis dieser Resultate die Rolle von DYNLT1 in Kombination mit der FZD7-Expression bei GBM-Patienten bezogen auf das Gesamtüberleben untersucht. Es erfolgte eine Aufteilung in Untergruppen entsprechend der Häufigkeiten in Abbildung 10 A. Für die Analyse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die jeweilige Kombinationsmöglichkeit erstellt.

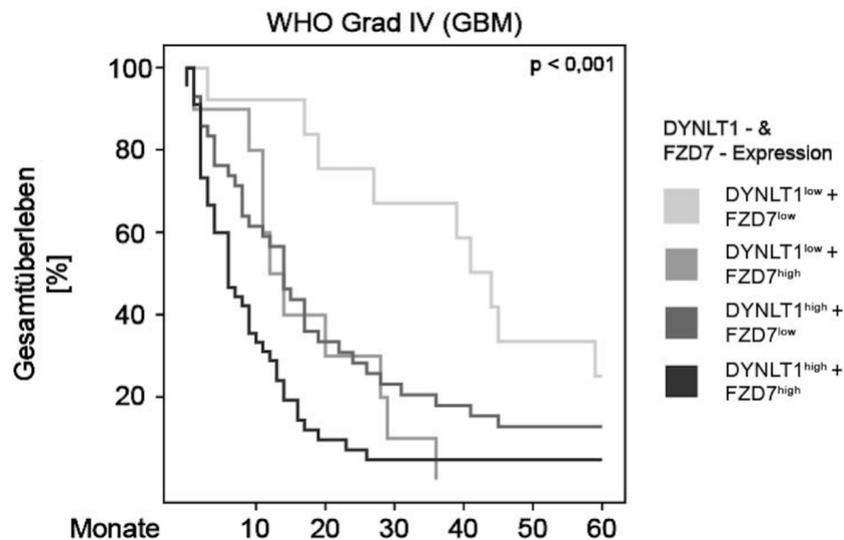
Eine erhöhte DYNLT1-Expression kombiniert mit einer erhöhten FZD7-Expression (DYNLT1<sup>high</sup> / FZD7<sup>high</sup>) war hierbei mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p < 0,001$ , log rank). Demnach betrug die Überlebenszeit bei „double-high“-Patienten nur etwa 6 Monate (95 % KI = 3,189 – 8,811), jene bei „double-low“-Patienten hingegen knapp 4 Jahre (95 % KI = 35,674 – 52,326) (vgl. Abb. 10 B und C).

Abb. 10

A.

DYNLT1 & FZD7	Häufigkeit
1) DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	13
2) DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	10
3) DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	43
4) DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	45

B.



C.

DYNLT1 & FZD7	Mittelwert				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	39,755	5,231	29,503	50,008	44,000	4,248	35,674	52,326
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	17,100	3,433	10,371	23,829	12,000	2,372	7,351	16,649
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	20,134	2,957	14,337	25,930	14,000	1,829	10,416	17,584
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	10,339	1,948	6,521	14,157	6,000	1,434	3,189	8,811
Gesamt	18,097	1,763	14,642	21,551	12,000	1,252	9,546	14,454

Abbildung 10) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression, FZD7-Expression und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten. A. Unterteilung und Häufigkeiten der GBM-Patienten entsprechend der Kombinationsmöglichkeiten DYNLT1<sup>low</sup> / FZD7<sup>low</sup>, DYNLT1<sup>low</sup> / FZD7<sup>high</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / FZD7<sup>low</sup>, DYNLT1<sup>high</sup> / FZD7<sup>high</sup>. B. Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen das jeweilige Gesamtüberleben von GBM-Patienten in Abhängigkeit vom 60-monatigen Follow-up. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. C. Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der jeweiligen Kombinationsmöglichkeit.

Im Anschluss erfolgten multivariate Cox-Regressions-Analysen mit DYNLT1<sup>low</sup> / FZD7<sup>low</sup> als Dummy-Variable (Wert = 1). Diese zeigten nach Adjustierung des Alters, des Karnofsky-Index, des Ausmaßes der Resektion und der Therapie, dass eine erhöhte

DYNLT1- und FZD7-Expression (DYNLT1<sup>high</sup> / FZD7<sup>high</sup>) mit einem signifikant höheren Sterberisiko (Model 1: HR = 3,665, 95 % KI = 1,729 – 7,769, p = 0,001; Model 2: HR = 3,866, 95 % KI = 1,831 – 8,161, p < 0,001; Model 3: HR = 4,254, 95 % KI = 2,018 – 8,964, p < 0,001; Model 4: HR = 4,205, 95 % KI = 1,986 – 8,903, p < 0,001) vergesellschaftet war (vgl. Tabelle 10).

Multivariate Cox-Regression	HR	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
<b>Model 1 (adjustiert für Alter)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	2,733	1,093 - 6,833	0,032
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	2,064	0,983 - 4,334	0,055
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	3,665	1,729 - 7,769	0,001
<b>Model 2 (adjustiert für Karnofsky-Index)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	2,368	0,924 - 6,067	0,073
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	1,851	0,877 - 3,908	0,106
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	3,866	1,831 - 8,161	< 0,001
<b>Model 3 (adjustiert für Ausmaß der Resektion)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	2,524	1,008 - 6,319	0,048
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	2,068	0,985 - 4,339	0,055
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	4,254	2,018 - 8,964	< 0,001
<b>Model 4 (adjustiert für Therapie)</b>			
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	1		
DYNLT1 <sup>low</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	2,414	0,944 - 6,175	0,066
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>low</sup>	2,174	1,039 - 4,551	0,039
DYNLT1 <sup>high</sup> + FZD7 <sup>high</sup>	4,205	1,986 - 8,903	< 0,001

**Tabelle 10) Zusammenhang zwischen DYNLT1-Expression, FZD7-Expression und dem Gesamtüberleben bei GBM-Patienten in Abhängigkeit verschiedener Co-Faktoren.** Durchführung multivariater Analysen mittels Cox-Regression mit bereits bekannten Co-Faktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) bezogen auf das Gesamtüberleben bei GBM-Patienten. Dummy-Variablen: DYNLT1<sup>low</sup> / FZD7<sup>low</sup>; HR: Hazard Ratio; p ≤ 0,05.

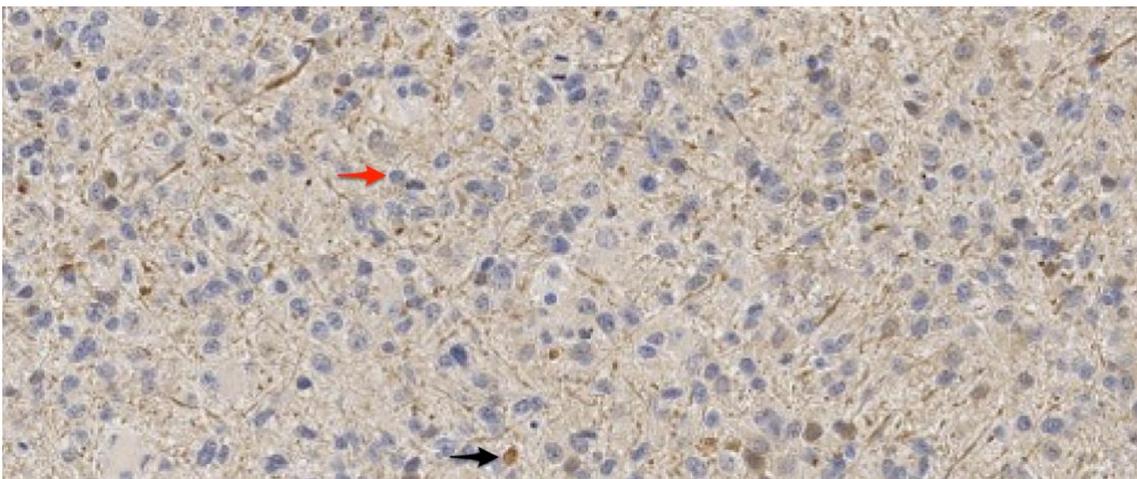
Eine erhöhte DYNLT1-Expression kombiniert mit einer vermehrten FZD7-Expression stellt demnach eine Möglichkeit dar, eine prognostische Aussage hinsichtlich des Gesamtüberlebens von GBM-Patienten unabhängig von ausgewählten Co-Faktoren (Alter, Karnofsky-Index, Ausmaß der Resektion, Therapie) zu treffen.

## 3.2 UCHL1 und Überlebensanalyse bei Astrozytom- und GBM-Patienten

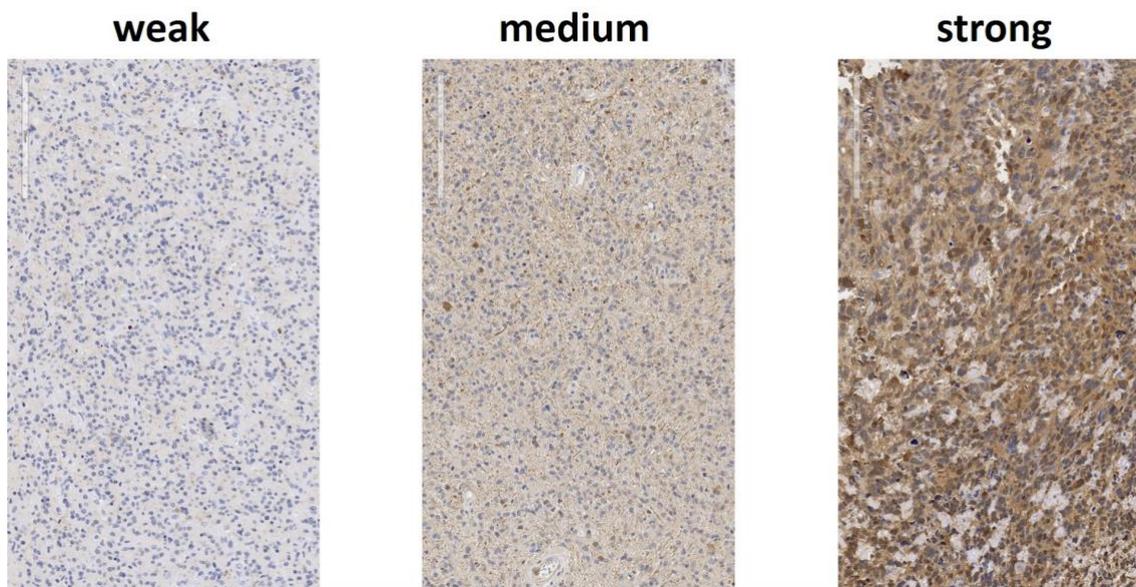
### 3.2.1 UCHL1 Expression und Auswertung

Entsprechend dem Vorgehen bei DYNLT1 erfolgte mittels H-Score die Bestimmung der UCHL1-Expression durch zwei unabhängige Untersucher. UCHL1 wies dabei eine nahezu ausschließlich zytoplasmatische Färbung auf. Vereinzelt zeigten sich braune, nukleär gefärbte Zellkerne (vgl. Abb. 11 A). Die Auswertung der Proben erfolgte in 20-facher Vergrößerung. Dabei wurde jeder Gewebeschnitt hinsichtlich des Färbeverhaltens beurteilt. Abbildung 11 B zeigt die erfolgte Einteilung entsprechend der jeweiligen Intensität in die Kategorien „weak“ (schwach gefärbt, 1 Punkt), „medium“ (mittelstark gefärbt, 2 Punkte) und „strong“ (stark gefärbt, 3 Punkte). Ähnlich der DYNLT1-Expression zeigte sich auch hier ein stark heterogenes Färbeverhalten. Zur besseren Beurteilung der jeweiligen Expression wurde deshalb zusätzlich der prozentuale Anteil positiver Zellen (0 – 100 %) bestimmt und in Kombination mit den vergebenen Punkten in folgender Formel berücksichtigt:  $(1 \text{ Punkt} \times x) + (2 \text{ Punkte} \times y) + (3 \text{ Punkte} \times z)$ . Dabei entsprachen  $x + y + z$  100 % der Tumorfläche.

**Abb. 11**  
**A.**



## B.



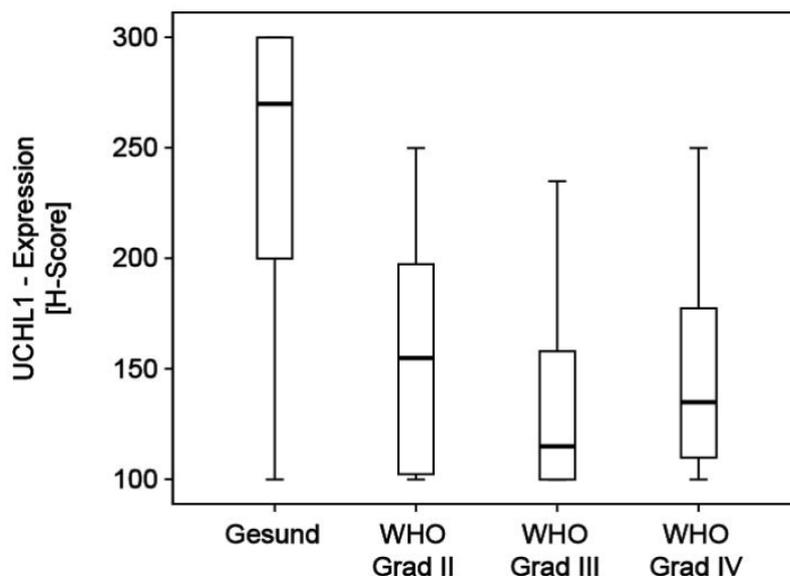
**Abbildung 11) UCHL1 – Färbeverhalten und Scoring-System.** A. UCHL1 weist eine nahezu ausschließlich zytoplasmatische Färbung auf. Vereinzelt sind braune, gefärbte Zellkerne erkennbar (schwarzer Pfeil). Die ungefärbten Zellkerne stellen sich blau dar (roter Pfeil). (Vergrößerung: 20 x) B. Die Beurteilung der Expression bzw. die Einteilung in die jeweilige Kategorie erfolgte auf Basis der Farbintensität und Heterogenität. (Vergrößerung: 20 x)

Mittels Box-Plot-Analyse erfolgte anschließend eine vergleichende Untersuchung des Färbeverhaltens zwischen gesundem Hirngewebe und jenem bei Astrozytomen und Glioblastomen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit Unterschiede zwischen den einzelnen WHO Graden vorliegen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 12 A dargestellt.

In der hier vorliegenden Studie wies die Kontrollgruppe „gesund“ die größte Streuung (Minimum: 100; Maximum: 300) auf. Gleichzeitig zeigte sich im Gewebe jener Patienten eine deutlich höhere UCHL1-Expression als bei Astrozytom- und GBM-Patienten (vgl. Abb. 12). Demnach liegen 50 % der Werte in einem Bereich  $\geq 200$  (H-Score). Darüber hinaus lässt der sich stark rechts befindende Medianwert (Median: 270) auf eine rechtssteile bzw. linksschiefe Verteilung und damit auf eine erhöhte UCHL1-Expression in gesundem Hirngewebe schließen. Die WHO Grade II, III und IV hingegen zeigten allesamt eine schwache und damit abnehmende UCHL1-Expression (WHO Grad II: 155, WHO Grad III: 115, WHO Grad IV: 135). Zwischen den einzelnen WHO Graden wurden keine großen Unterschiede bezüglich der UCHL1-Expression beobachtet. Allerdings wiesen „high-grade“ Gliome (WHO Grad III und IV) eine noch niedrigere UCHL1-Expression als „low-grade“ Gliome (WHO Grad II) auf.

Abb. 12

A.



B.

WHO Grad	Median	Minimum	Maximum
Gesund	270,00	100,00	300,00
Grad II	155,00	100,00	250,00
Grad III	115,00	100,00	235,00
Grad IV	135,00	100,00	250,00

Abbildung 12) UCHL1 – Expressionsvergleich mittels Box-Plot. A. Vergleichende Darstellung der UCHL1-Expression zwischen gesunden Patienten und jenen mit WHO Grad II, III oder IV. Das 25%- und 75%-Perzentil wird jeweils durch einen vertikalen Kasten dargestellt. Die schwarze Linie entspricht dem Median. B. Übersicht der den einzelnen Patientengruppen zugehörigen Werte (Median, Minimum, Max.).

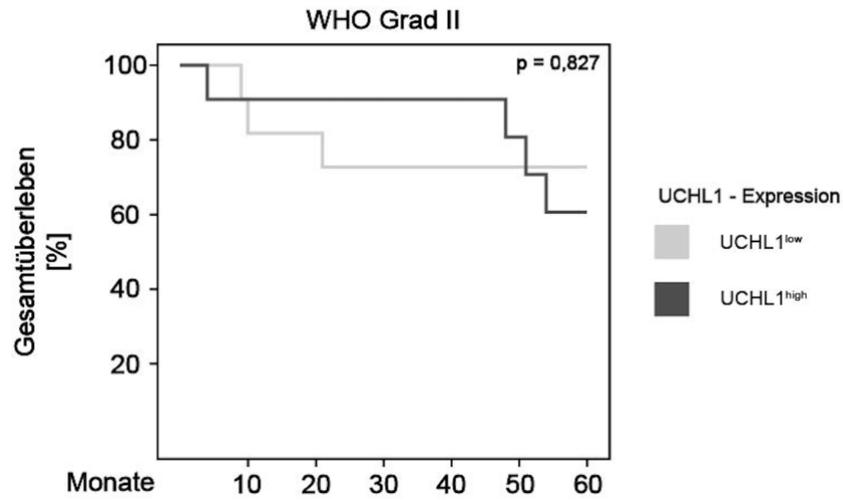
### 3.2.2 UCHL1 und Gesamtüberleben

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen UCHL1-Expression und dem Gesamtüberleben bei WHO Grad II-, Grad III- und Grad IV-Patienten zu ermitteln, wurden im Anschluss entsprechende Kurven mittels Kaplan-Meier-Methoden erstellt und die jeweilige Signifikanz mittels Log-Rank-Test bestimmt. Zuvor erfolgte eine Dichotomisierung in UCHL1<sup>low</sup> und UCHL1<sup>high</sup>. Alle Werte unterhalb des jeweiligen Medianwerts wurden demnach als UCHL1<sup>low</sup>, alle Werte oberhalb des Medianwerts als UCHL1<sup>high</sup> eingestuft.

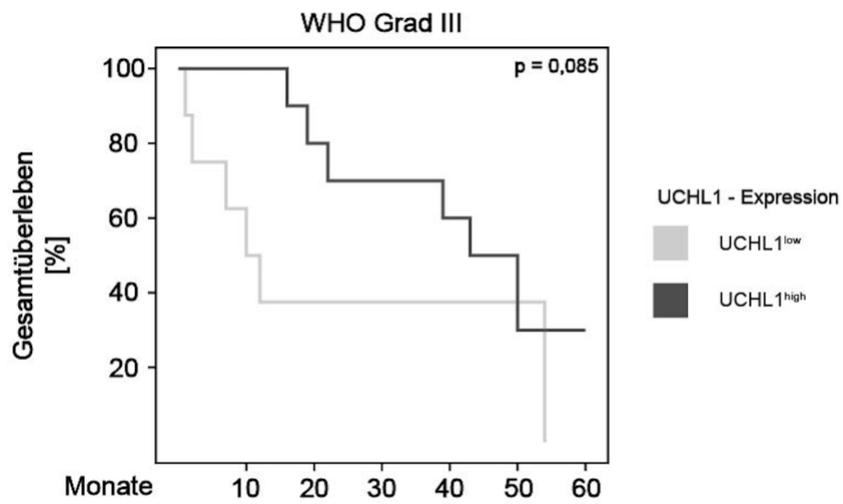
Dabei zeigte sich im Hinblick auf das Gesamtüberleben weder bei Grad II- ( $p = 0,827$ , log rank) und Grad III- ( $p = 0,085$ , log rank) noch bei Grad IV-Patienten ( $p = 0,461$ , log rank) ein signifikanter Unterschied zwischen einer niedrigen (UCHL1<sup>low</sup>) und einer vermehrten (UCHL1<sup>high</sup>) UCHL1-Expression (vgl. Abb. 13).

Abb. 13

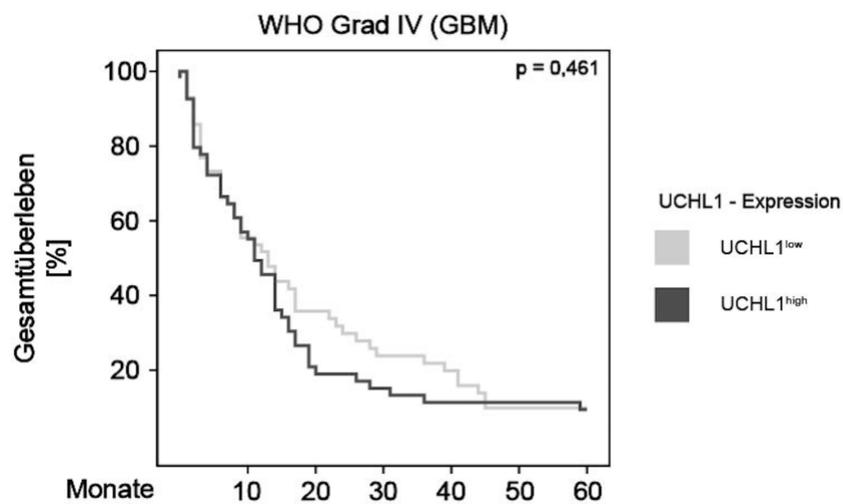
A.



B.



C.



## D.

WHO Grad	UCHL1	Mittelwert				Median			
		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
II	UCHL1 <sup>low</sup>	47,273	6,325	34,876	59,669	-	-	-	-
	UCHL1 <sup>high</sup>	52,182	4,790	42,794	61,570	-	-	-	-
	Gesamt	49,618	4,002	41,775	57,462	-	-	-	-
III	UCHL1 <sup>low</sup>	24,250	9,022	6,566	41,934	10,000	3,536	3,070	16,930
	UCHL1 <sup>high</sup>	41,900	5,210	31,687	52,113	43,000	5,798	31,637	54,363
	Gesamt	33,667	5,152	23,569	43,764	39,000	18,641	2,464	75,536
IV	UCHL1 <sup>low</sup>	19,548	2,556	14,538	24,557	13,000	2,893	7,330	18,670
	UCHL1 <sup>high</sup>	16,443	2,399	11,742	21,145	11,000	1,444	8,170	13,830
	Gesamt	17,980	1,762	14,527	21,433	12,000	1,252	9,546	14,454

Abbildung 13) Zusammenhang zwischen UCHL1-Expression und dem Gesamtüberleben bei Patienten der WHO Grade II, III und IV. A - C. Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für UCHL1<sup>low</sup> und UCHL1<sup>high</sup> den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Gesamtüberleben und dem 60-monatigen Follow-up bei Patienten der WHO-Grade II, III und IV. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. D. Mittel- und Medianwerte für das Gesamtüberleben der Patientengruppen UCHL1<sup>low</sup> und UCHL1<sup>high</sup>.

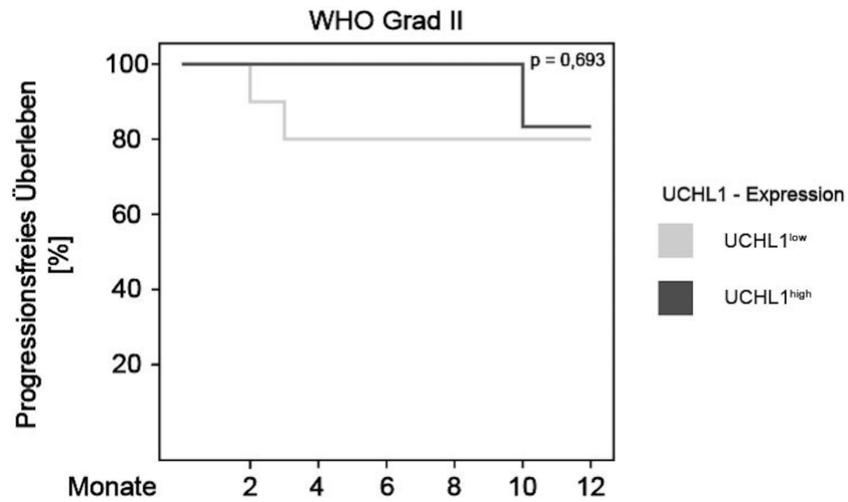
### 3.2.3 UCHL1 und progressionsfreies Überleben

Im nächsten Schritt wurde die Assoziation zwischen der UCHL1-Expression und dem progressionsfreien Überleben bei WHO Grad II-, Grad III- und Grad IV-Patienten ermittelt. Hierfür wurden wie zuvor beschrieben entsprechende Kurven erstellt und die jeweilige Signifikanz bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben kein signifikanter Unterschied zwischen einer niedrigen (UCHL1<sup>low</sup>) und einer vermehrten (UCHL1<sup>high</sup>) UCHL1-Expression bestand (WHO Grad II:  $p = 0,693$ , log rank; WHO Grad III:  $p = 0,417$ , log rank; WHO Grad IV (GBM):  $p = 0,636$ , log rank) (vgl. Abb. 14).

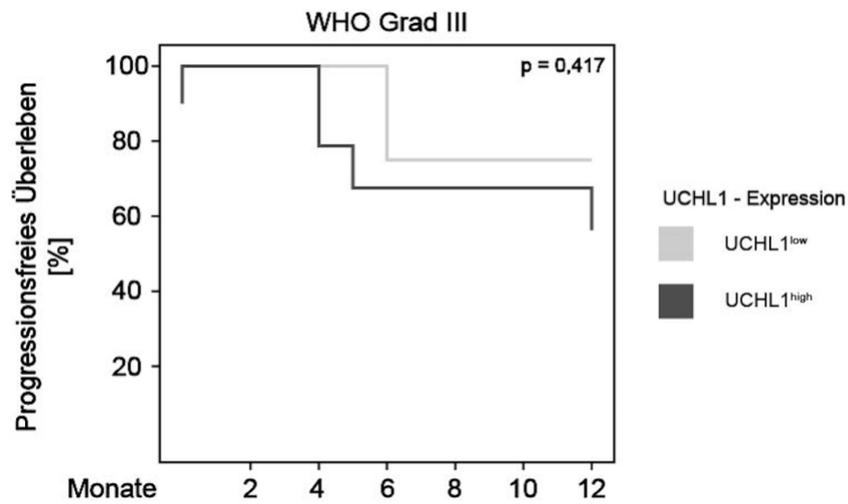
In Zusammenschau der Ergebnisse konnte demnach kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben bzw. dem progressionsfreien Überleben und der Expression von UCHL1 bei Astrozytom- (WHO Grad II und III) und GBM-Patienten (WHO Grad IV) nachgewiesen werden. Die hohe Expression im gesunden Hirngewebe mit Abnahme im tumorösen Gewebe lässt allerdings eine Beteiligung an der Tumorgenese des Glioblastoms vermuten.

Abb. 14

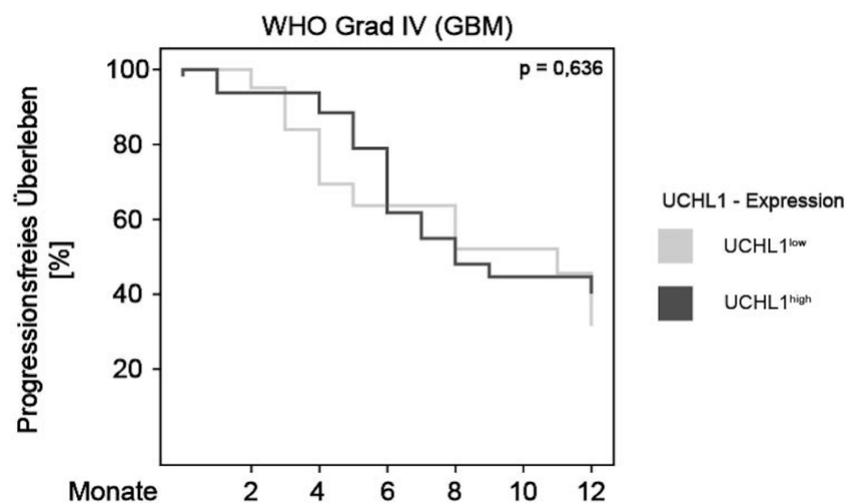
A.



B.



C.



## D.

WHO Grad	UCHL1	Mittelwert				Median			
		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
II	UCHL1 <sup>low</sup>	10,100	1,204	7,741	12,459	-	-	-	-
	UCHL1 <sup>high</sup>	11,667	0,304	11,070	12,263	-	-	-	-
	Gesamt	10,814	0,707	9,428	12,200	-	-	-	-
III	UCHL1 <sup>low</sup>	10,500	1,299	7,954	13,046	-	-	-	-
	UCHL1 <sup>high</sup>	9,112	1,632	5,914	12,311	-	-	-	-
	Gesamt	9,681	1,119	7,488	11,874	-	-	-	-
IV	UCHL1 <sup>low</sup>	8,414	0,665	7,110	9,718	11,000	1,863	7,348	14,652
	UCHL1 <sup>high</sup>	8,455	0,623	7,235	9,676	8,000	1,579	4,904	11,096
	Gesamt	8,509	0,444	7,638	9,380	9,000	1,242	6,566	11,434

**Abbildung 14) Zusammenhang zwischen UCHL1-Expression und dem progressionsfreien Überleben bei Patienten der WHO Grade II, III und IV.** A - C. Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen vergleichend für UCHL1<sup>low</sup> und UCHL1<sup>high</sup> den Zusammenhang zwischen dem prozentualen progressionsfreien Überleben und dem 12-monatigen Follow-up bei Patienten der WHO-Grade II, III und IV. Die Bestimmung der Signifikanz (p-Wert) erfolgte mittels Log-Rank-Test. **D.** Mittel- und Medianwerte für das progressionsfreie Überleben der Patientengruppen UCHL1<sup>low</sup> und UCHL1<sup>high</sup>.

### 3.2.4 Korrelation zwischen UCHL1 und weiteren Tumorparametern

Analog zu Kapitel 3.1.4 wurden bei GBM-Patienten mögliche Korrelationen zwischen UCHL1 und den in Kapitel 2.6 vorgestellten Tumorparametern untersucht. Entsprechend Tabelle 11 zeigte UCHL1 eine negative Korrelation unter gleichzeitiger Betrachtung des Tumolvolumens ( $Rho = -0,013$ ), des Ödemvolumens ( $Rho = -0,134$ ) sowie der mikrovaskulären Proliferationsdichte ( $Rho = -0,025$ ). So scheint beispielsweise eine erhöhte UCHL1-Expression mit einem verminderten Tumolvolumen einherzugehen. Anders stellte sich die Situation bezüglich der Ki-67-Positivität dar. Eine erhöhte UCHL1-Expression scheint mit einer erhöhten Ki-67-Positivität zu korrelieren ( $Rho = 0,044$ ). Allerdings ist zu beachten, dass keines der genannten Ergebnisse statistisch signifikant war (Tumolvolumen:  $p = 0,902$ ; Ödemvolumen:  $p = 0,239$ ; Ki-67-Positivität:  $p = 0,644$ ; mikrovaskuläre Proliferationsdichte:  $p = 0,792$ ).

Korrelation UCHL1 bei WHO Grad IV (Spearman-Rho)	Tumorvolumen (cm <sup>3</sup> )	Ödemvolumen (cm <sup>3</sup> )	Ki-67-Positivität > 10 %	Mikrovaskuläre Proliferationsdichte
<b>Korrelationskoeffizient</b>	- 0,013	- 0,134	0,044	- 0,025
<b>Signifikanz (2-seitig)</b>	0,902	0,239	0,644	0,792
<b>N</b>	87	79	111	110

**Tabelle 11) Korrelation von UCHL1 und weiteren Tumorparametern.** Anwendung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten zur Ermittlung der Korrelation zwischen UCHL1 und Tumorvolumen, Ödemvolumen, Ki-67-Positivität sowie mikrovaskulärer Proliferationsdichte bei GBM-Patienten. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

## IV. Diskussion

Das Glioblastom (GBM) gilt mit einem medianen Überleben von etwa 15 Monaten (Koshy, Villano et al. 2012) und einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 % (Tamimi und Juweid 2017) als einer der bösartigsten Tumore des ZNS. Trotz der Entwicklung neuer Therapiemodalitäten und -strategien existiert bis heute kein kurativer Ansatz (Tamimi und Juweid 2017). Daher besteht der dringende Bedarf nach der Identifizierung neuer zellulärer und molekularer Mechanismen, die die Pathophysiologie dieser Tumore regulieren.

### **DYNLT1**

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Bedeutung von DYNLT1 in Bezug auf das Überleben von Patienten mit Glioblastom beschrieben. Das Gewebe von Gliom- und GBM-Patienten zeigte hierbei im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe eine leicht erhöhte DYNLT1-Expression. Zusätzlich war eine erhöhte Expression von DYNLT1 mit einem kürzeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben bei GBM-Patienten assoziiert. Nachdem kombinierte Analysen mehrerer Biomarker im Vergleich zur Analyse einzelner Marker eine höhere prognostische Aussagekraft besitzen (Dumitru, Bankfalvi et al. 2013) (Weller, Bankfalvi et al. 2014) und MGMT (Chen, Hu et al. 2013) und FZD7 (Schiffgens, Wilkens et al. 2016) in früheren Studien bereits als prognostische Marker beschrieben wurden, erfolgte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Analyse der Prognosefähigkeit von DYNLT1 in Kombination mit MGMT und FZD7 bei GBM-Patienten. Multivariate Analysen mittels Cox-Regression zeigten hierbei im Vergleich zur Referenzgruppe sowohl bei Kombination von DYNLT1<sup>high</sup> und MGMT<sup>unmethyliert</sup> als auch bei Kombination von DYNLT1<sup>high</sup> und FZD7<sup>high</sup> ein signifikant höheres Sterberisiko. Demnach kann DYNLT1 als ein signifikanter, unabhängiger Prognosefaktor bei GBM-Patienten dienen, dessen prognostische Aussagekraft in Kombination mit Biomarkern wie MGMT und FZD7 zusätzlich verstärkt wird.

Dynein light chain 1 (DYNLT1, Tctex-1) ist Bestandteil des Dynein-Motor-Komplexes (King, Bonilla et al. 2002) und damit am intrazellulären Transport beteiligt (Roberts, Kon et al. 2013), wohingegen ein Teil des Proteins auch außerhalb des Dynein-Komplexes existiert (Li, Serr et al. 2004). Die Funktionen von DYNLT1 sind vielseitig.

Der Fokus soll im Folgenden jedoch auf dessen Rolle bei Tumorerkrankungen sowie auf Erklärungsansätzen für die Rolle von DYNLT1 in der Pathogenese des GBMs liegen.

Grundsätzlich ist die Datenlage zur Beteiligung von DYNLT1 an der Pathogenese von Tumorerkrankungen als schwach einzustufen. Ein in der Literatur beschriebenes Beispiel ist dessen Funktion bei der Pathogenese von Cervix-Karzinomen. Dort wird DYNLT1 eine essentielle Rolle beim Infektionsvorgang mit Cervix-Karzinom-assoziierten HPV-Subtypen (Humane Papillomaviren, v.a. HPV 16 und 18) zugeschrieben. Grundlage der Infektion ist hierbei der über Bindung des Kapsidproteins L2 des humanen Papillomavirus an DYNLT1 vermittelte Transport des Virus-DNA-Genoms durch das Zytosol in den Zellkern. Eine über siRNA- (engl. für small interfering RNA) vermittelte Depletion bzw. die Anwendung DYNLT1-spezifischer Antikörper führte hingegen zur Reduktion der Infektiosität (Schneider, Spoden et al. 2011).

Im Hinblick auf die Rolle des DYNLT1 in der Pathogenese des Glioblastoms ist unserer Ansicht nach jedoch nicht dessen Transportfähigkeit, sondern eher die Wirkung des Proteins auf den Zellzyklus Teil möglicher Erklärungsansätze. Grundlage dieser Überlegung ist das Zusammenspiel zwischen Ziliogenese und Zellzyklus. Eine Zellteilung wird solange verhindert, solange sich ein Zilium auf der Oberfläche von Zellen befindet. Bei Aufforderung der Zelle zur Teilung durch extrazelluläre Signale kommt es demnach zum Abbau des Ziliums. Defekte im Zilienapparat sind folglich oft mit unkontrollierter Zellteilung assoziiert, was nicht zuletzt ein charakteristisches Merkmal maligner Zellen darstellt (Lorentzen und Taschner 2015). In diesem Zusammenhang wiesen Li et al. phosphoryliertem (T94)Tctex-1 in neuronalen Vorläuferzellen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Länge der G1-Phase nach. Zilien halten Zellen in der G0/G1-Phase, während zum Eintritt in die S-Phase phosphoryliertes Tctex-1 zur Zilienresorption benötigt wird. Vermutlich führt hierbei die Phosphorylierung an Thr94 zur Dissoziation vom Dynein-Komplex sowie zur Aktivierung der lokalen F-Aktin-Polymerisation, was eine Kaskade verschiedener zellulärer Ereignisse triggert, welche für die Reabsorption der Zilien verantwortlich sind (Li, Saito et al. 2011). Auf unsere Studie bezogen würde demnach eine erhöhte DYNLT1-Expression mit einer vermehrten Zilienresorption und folglich mit einem unkontrollierten Zelleintritt in die S-Phase einhergehen, was letztlich eine Ursache einer vermehrten dysregulierten Zellteilung bzw. Tumorprogression und damit einen Erklärungsansatz für das kürzere Gesamt- und progressionsfreie Überleben bei GBM-Patienten mit erhöhter DYNLT1-Expression darstellen würde (vgl. Abb. 15).

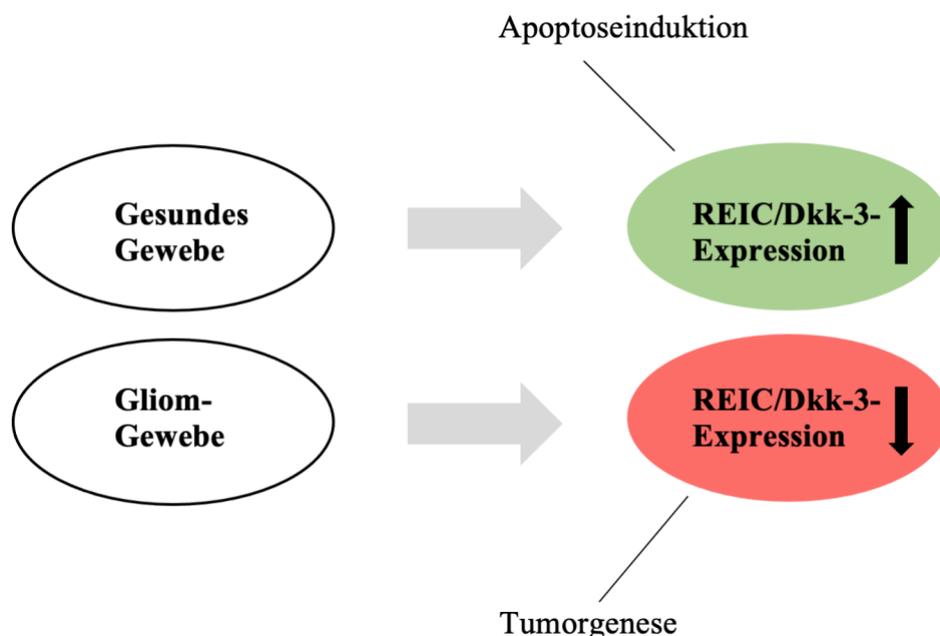


**Abbildung 15) Rolle von DYNLT1 in der Regulation des Zellzyklus.** Auf Grundlage der Studienergebnisse von Li et al. würde eine erhöhte DYNLT1-Expression mit einer vermehrten Zilienresorption und folglich mit einem unkontrollierten Zelleintritt in die S-Phase einhergehen. Mögliche Folgen wären eine dysregulierte Zellteilung und eine damit verbundene Tumorprogression (Li, Saito et al. 2011).

Ein weiterer Erklärungsansatz zielt auf die Interaktion zwischen DYNLT1 und REIC/Dkk-3, einem Protein der Dickkopf-Familie, ab. Diese Interaktion wurde erstmals 2011 von Ochiai et al. beschrieben. REIC/Dkk-3 ist ein Wnt-Antagonist und in einer Reihe von Tumorentitäten herunterreguliert (Ochiai, Watanabe et al. 2011). Als Beispiele sind u.a. das Prostatakarzinom (Abarzua, Sakaguchi et al. 2005) sowie das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Tsuji, Nozaki et al. 2001) zu nennen. In einer früheren Studie erfolgte zudem eine vergleichende Untersuchung zwischen gesundem Hirngewebe und Gliom-Gewebe. Hierbei war die REIC/Dkk-3-Expression im tumorösen Gewebe im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe herunterreguliert. Darüber hinaus korrelierte der Malignitätsgrad der Gliome invers mit der REIC/Dkk-3-Expression. Auf Grundlage dieser Ergebnisse präsentiert sich REIC/Dkk-3 über Apoptoseinduktion als möglicher Tumorsuppressor, wohingegen eine herunterregulierte Expression von REIC/Dkk-3 die Tumorgenese begünstigen soll (vgl. Abb. 16) (Mizobuchi, Matsuzaki et al. 2008).

Die entsprechenden intrazellulären Interaktionspartner des REIC/Dkk-3 gelten allerdings bis heute als nicht ausreichend erforscht. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass sowohl REIC/Dkk-3 als auch DYNLT1 im endoplasmatischen Retikulum humaner Fibroblasten lokalisiert sind. Möglich ist demnach eine Interaktion zwischen DYNLT1 und REIC/Dkk-3 mit daraus resultierender Modifikation des REIC/Dkk-3-abhängigen zellulären Signalwegs. Wegen des hohen Vesikeltransports um das endoplasmatische Retikulum herum ist jedoch auch eine Beteiligung am Verteilungs- und Transportsystem beider Proteine denkbar (Ochiai, Watanabe et al. 2011).

Auf Basis dieser Ergebnisse untersuchten Oka et al. die *in vitro*- und *in vivo*-Effekte von Ad-SGE-REIC, einem Adenovirus-REIC-Vektor, mit dem Ziel, eine Steigerung der REIC/Dkk-3-Expression zu erreichen. Jene Studie zeigte einen Anti-Gliom-Effekt und damit einen möglichen Ansatzpunkt bei der Behandlung maligner Gliome (Oka, Kurozumi et al. 2016). Inwieweit DYNLT1 mit REIC/Dkk-3 interagiert, bleibt jedoch weiterhin ungewiss und demnach möglicher Bestandteil künftiger Studien.



**Abbildung 16) REIC/Dkk-3-Expression in gesundem Hirngewebe und Gliom-Gewebe.** Im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe zeigte sich die REIC/Dkk-3-Expression im tumorösen Gewebe herunterreguliert. Dies lässt REIC/Dkk-3 eine Rolle als möglicher Tumorsuppressor zukommen, wohingegen eine herunterregulierte Expression die Tumorgenese von Gliomen begünstigen soll (Mizobuchi, Matsuzaki et al. 2008).

Die in Abschnitt 1.5 von Sarma und Yaseen beschriebene Interaktion zwischen dem Onkoprotein NUP98-HOXA9 und DYNLT1 (Sarma und Yaseen 2013) gibt neben den bisher ausgeführten Erklärungsansätzen weitere Hinweise auf eine Rolle des DYNLT1 bei der Pathogenese des Glioblastoms. HOXA9 gilt als unabhängiger Regulator von HOTAIR (engl. für Hox antisense intergenic RNA), einer lncRNA (engl. für long non-coding RNA), welche bei vermehrter Expression mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben bei GBM-Patienten einherging (Xavier-Magalhaes, Goncalves et al. 2018). Zudem konnte HOTAIR als eine den Zellzyklus regulierende lncRNA identifiziert werden, welche sich als essentiell für die Proliferation von Gliom-Zellen herausstellte und demnach ein entscheidender Akteur bei der Zellzyklusprogression sein könnte (Zhang, Sun et al. 2015).

Im Gegensatz zu den bisherigen Ausführungen zu DYNLT1 und dessen Beteiligung an der Pathogenese diverser Tumorerkrankungen offenbart eine neue Studie von Wei et al. eine Rolle als Tumorsuppressor. Mittelpunkt der Studie bildete dabei die miR-15b-3p. Demnach korrelierte eine erhöhte miR-15b-3p-Expression in Zellreihen von Patienten mit Magenkarzinom mit einem schlechteren Gesamtüberleben. Auf molekularer Ebene zeigte sich eine Verstärkung der Migration, Invasion und Proliferation sowie eine Hemmung der Apoptose durch miR-15b-3p, wohingegen die Expression von DYNLT1, Bax (engl. für Bcl-2-associated X) und den gespaltenen Formen der Caspase-3 und -9 durch die miRNA (engl. für microRNA) gehemmt wurde. Darüber hinaus zeigten Tumore mit hohem miR-15b-3p-Spiegel eine vermehrte Expression von Bcl-2 (engl. für B-cell lymphoma 2) (Wei, Peng et al. 2020).

Proteine der Bcl-2-Familie, zu denen auch das gleichnamige Bcl-2 gezählt wird, spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des intrinsischen Apoptosewegs. Nach DNA-Schädigung kommt es zu einem Permeabilitätsanstieg der äußeren Mitochondrienmembran und anschließend zur Freisetzung diverser pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c und Smac (engl. für second mitochondria-derived activator of caspases). Letztgenannter Schritt wird über Bildung einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran durch die beiden pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak (engl. für Bcl-2 homologous antagonist killer) ermöglicht, während das anti-apoptotische Bcl-2 über Bindung an jene Proteine die Porenbildung verhindert. Neben Proteinen der Bcl-2-Familie sind auch Caspasen fester Bestandteil des intrinsischen Apoptosewegs. In den finalen Schritten der Apoptose-Einleitung kommt es über Bildung von enzymatisch aktiven Caspase-9-Heterotetrameren zur Prozessierung und Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 (Heinrich, Müller et al. 2014). In Zusammenschau der Studienergebnisse von Wei et al. und der zwar gegenteiligen, aber dennoch nicht unwichtigen Rolle des DYNLT1 als Tumorsuppressor, vermuten wir im Hinblick auf die Pathogenese des GBMs eine Interaktion von DYNLT1 mit wichtigen Apoptoseregulatoren.

Ein weiterer, vermeintlich wichtiger Akteur auf zellulärer Ebene, welcher ebenfalls mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 (Abu-Hamad, Arbel et al. 2009) und DYNLT1 (Schwarzer, Barnikol-Watanabe et al. 2002) interagiert, ist VDAC1 (engl. für voltage-dependent anion channel 1). VDAC1 ist ein Ionenkanal in der äußeren Mitochondrienmembran, welcher für die Freisetzung von Cytochrom c und damit für den apoptotischen Zelltod erforderlich ist (Abu-Hamad, Arbel et al. 2009).

Einen auf zellulärer Ebene nicht unwesentlichen Interaktionspartner stellt dabei das Protein DYNLT1 dar, welchem modulierende Fähigkeiten auf Kanaleigenschaften des VDAC1 zugeschrieben werden (Schwarzer, Barnikol-Watanabe et al. 2002). Ein experimenteller DYNLT1-Knockdown zeigte bei zuvor nachgewiesener Interaktion mit VDCA1 eine Zunahme der durch Hypoxie verursachten mitochondrialen Schäden (Fang, Xu et al. 2011), sodass auch hier von einer protektiven Rolle des DYNLT1 ausgegangen werden kann. Demgegenüber stehen Versuche an subkutanen und intrakraniellen orthotopen GBM-Xenograft-Mausmodellen, bei welchen sich nach VDAC1-Depletion eine Inhibierung der Angiogenese und Invasivität zeigte (Arif, Krelin et al. 2017).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zwar weiterer Studien zur genauen Identifizierung der molekularen Mechanismen bei der Pathogenese des Glioblastoms bedarf, frühere Studien jedoch bereits Interaktionen des DYNLT1 mit an der Apoptose und der Zellzyklusregulation beteiligten Akteuren aufzeigen konnten.

## **UCHL1**

Neben DYNLT1 wurde in der vorliegenden Studie auch das Protein Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) analysiert. Hierbei zeigte UCHL1 in Bezug auf das Überleben bei Gliom- und GBM-Patienten im Gegensatz zu DYNLT1 keinen signifikanten Zusammenhang, dafür aber im Vergleich zum Tumorgewebe eine wesentlich stärkere Expression im gesunden Hirngewebe. Dieses Ergebnis lässt eine Beteiligung von UCHL1 an der Entstehung von Gliomen vermuten.

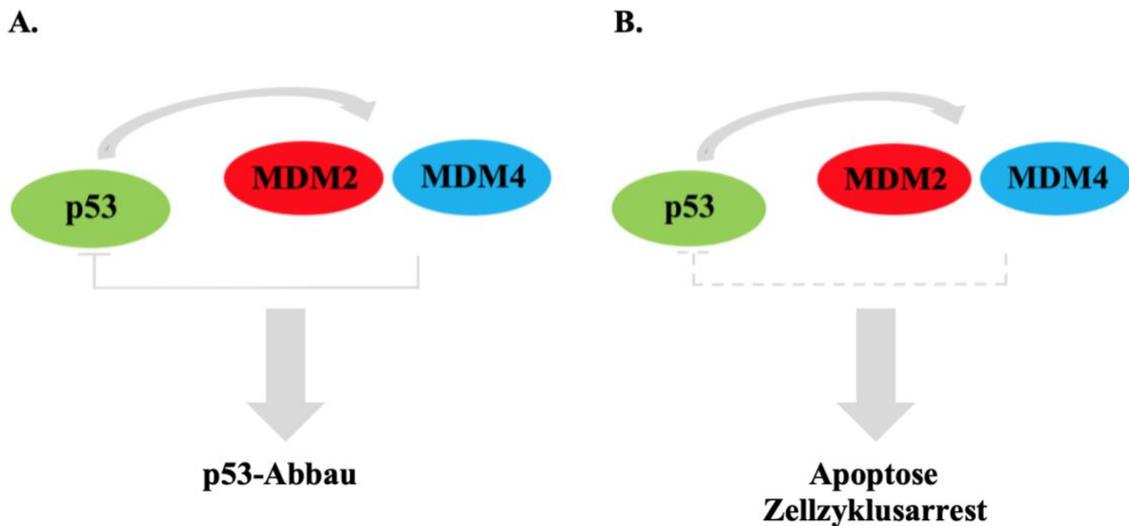
UCHL1 ist ein Enzym der DUB-Familie, welches gehäuft im menschlichen Gehirn vorkommt (Bishop, Rocca et al. 2016) und sowohl Ubiquitin-hydrolysierende (Bishop, Rocca et al. 2016) als auch Ubiquitin-konjugierende Eigenschaften (Liu, Fallon et al. 2002) besitzt. Neben der Beteiligung an der Pathogenese neuronaler Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson und dem Morbus Alzheimer (Wang, Yang et al. 2017), soll UCHL1 eine Rolle in der Tumorgenese und -progression verschiedener Tumorentitäten spielen und dabei entweder tumorbegünstigende oder tumorsuppressive Eigenschaften besitzen (Hurst-Kennedy, Chin et al. 2012).

Eine Rolle als Onkogen entfaltet UCHL1 beispielsweise beim kolorektalen Karzinom. In Abhängigkeit der deubiquitinierenden Aktivität von UCHL1 kommt es bedingt durch

einen verlangsamten Abbau zu einer hochregulierten Expression von  $\beta$ -Catenin und folglich zu einer Akkumulation jenes Proteins. Dies führt zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin-Translokation in den Zellkern, einer Upregulation von cyclin D1 und UpA und damit zu einer Förderung der Zellzyklusprogression (Zhong, Zhao et al. 2012). Ein weiteres Beispiel, in dem UCHL1 eine Rolle als Onkogen zugeschrieben wird, stellt das Lymphom dar. Dort beeinflusst UCHL1 über Downregulation der antagonistisch wirkenden PHLPP1 (engl. für PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1) den AKT-Signalweg (Hussain, Foreman et al. 2010). PHLPP1 ist eine Phosphatase, welche durch Dephosphorylierung und damit verbundener AKT-Inaktivierung die Apoptose triggert bzw. das Tumorwachstum inhibiert. Passend hierzu konnte bei GBM-Zelllinien mit reduzierten PHLPP-Leveln nach PHLPP-Zugabe eine Suppression des Tumorwachstums beobachtet werden (Gao, Furnari et al. 2005).

Sanchez-Diaz et al. untersuchten weiterhin das Expressionsverhalten von UCHL1 bei pädiatrischen Gliomen. In der genannten Studie zeigte sich in höhergradigen Gliomen eine stärkere UCHL1-Expression als in „low-grade“-Gliomen. Ein Knockdown hingegen führte zu einer verminderten Zellproliferation und einer geringeren zellulären Invasivität. Grundlage eines möglichen Erklärungsansatzes ist hierbei eine intrazelluläre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit Begünstigung der Zellinvasion (Sanchez-Diaz, Chang et al. 2017).

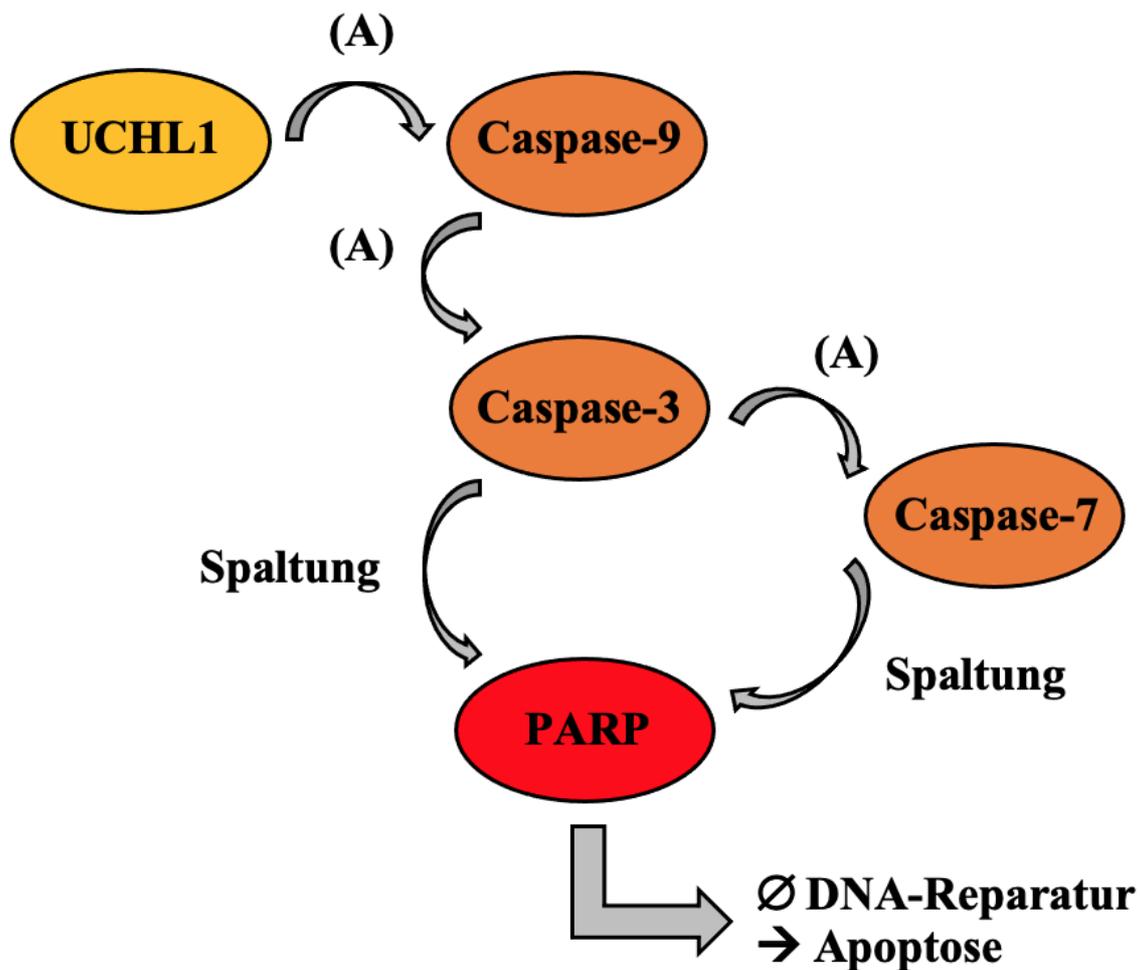
In der hier vorliegenden Studie scheint jedoch in Anbetracht der verminderten UCHL1-Expression im Tumorgewebe eine Rolle als Tumorsuppressor wahrscheinlicher. Dieser Sachverhalt konnte bereits in einigen Tumorentitäten beobachtet werden. So korreliert beispielsweise beim Neuroblastom eine abnehmende UCHL1-Expression mit fortschreitenden Tumorstadien (Gu, Lv et al. 2018), beim Ovarialkarzinom eine verminderte UCHL1-Expression mit reduzierter Apoptose (Jin, Yu et al. 2013). Zusätzlich zeigte sich beim Mammakarzinom eine in tumorösen Abschnitten verminderte UCHL1-Expression (Xiang, Li et al. 2012). Sowohl beim Ovarial- als auch beim Mammakarzinom gilt dabei das über Hypermethylierung-vermittelte Silencing als Ursache für die Downregulation von UCHL1 (Jin, Yu et al. 2013) (Xiang, Li et al. 2012). In einer Studie zur Rolle von UCHL1 im Nasopharynxkarzinom wiesen Li et al. neben eines analog zu den vorherigen Beispielen genannten Hypermethylierungs-vermittelten Silencings zusätzlich erhöhte p14<sup>ARF</sup>- (engl. für alternative reading frame) und p53-Spiegel sowie verminderte MDM2-Proteinspiegel in UCHL1-transfizierten Zellen nach (Li, Tao et al. 2010).



**Abbildung 17) Interaktion zwischen p53 und MDM2 / MDM4.** **A.** Unter normalen Zellbedingungen wird der p53-Spiegel in Zusammenspiel mit MDM2 und MDM4 über eine Rückkopplungsschleife niedrig gehalten. MDM2 wird im Zellkern exprimiert und nach Aktivierung durch die transkriptionelle Aktivität des p53 ins Zytosol transloziert. Dort bindet es an den N-Terminus des p53 und initiiert mittels eigener E3-Ubiquitinligase-Funktion den Abbau von p53. **B.** Unter Stressbedingungen, beispielsweise bei DNA-Schäden, wird p53 posttranslational phosphoryliert, wodurch es einer Interaktion mit MDM2 bzw. einem Abbau entgeht. Auf diese Weise wird eine Apoptose bzw. ein Zellzyklusarrest ermöglicht. (aus dem Englischen und modifiziert nach Urso, Calabrese et al. 2016)

Letztgenannter Punkt stellt unserer Ansicht nach einen möglichen Erklärungsansatz für die Wirkungsweise und Beteiligung von UCHL1 an der Tumorgenese in Astrozytomen und GBM dar. Entsprechend der Ergebnisse der hier vorliegenden Studie ginge eine erhöhte UCHL1-Expression im gesunden Gewebe mit einer vermehrten p53-Expression einher, während tumoröses Gewebe von Astrozytom- und GBM-Patienten durch eine verminderte UCHL1- bzw. p53-Expression gekennzeichnet wäre. Dieser Ansatz wird durch die Tatsache, dass die Mehrheit maligner Hirntumore Mutationen im TP53-Pathway aufweist (Adamson, Kanu et al. 2009), weiter unterstützt. Auf molekularer Ebene lässt sich dieser Ansatz über die wechselseitige Beziehung zwischen p53 und MDM2 erklären (vgl. Abb. 17). MDM2 gilt dabei als wichtiger negativer Regulator des p53. Erhöhte MDM2-Level initiieren über dessen E3-Ubiquitinligase-Funktion den p53-Abbau und inhibieren so die Apoptose sowie den Zellzyklusarrest. Umgekehrt aktiviert p53 transkriptionell das MDM2-Gen über Bindung an den MDM2-Promoter. Es bildet sich eine negative Rückkopplungsschleife, welche die p53-Funktion streng reguliert. Kommt es zu Schädigungen der DNA, wird p53 posttranslational phosphoryliert, wodurch es Interaktionen mit MDM2 bzw. einem Abbau entgeht (Iwakuma und Lozano 2003) (Urso, Calabrese et al. 2016).

Ein weiteres Beispiel für die Funktion von UCHL1 als Tumorsuppressor und damit einen weiteren Erklärungsansatz für unsere Studie stellt dessen Rolle beim hepatozellulären Karzinom (HCC, engl. für hepatocellular carcinoma) dar. Über Induktion des Zellzyklusarrests in der G2/M-Phase und Induktion der Apoptose über den intrinsischen Caspase-abhängigen Pathway konnte eine Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden. Bei Letzterem erfolgt zunächst die Aktivierung der Caspase-9 mit anschließender Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Jene Effektoren initiieren schließlich die Spaltung von PARP (engl. für Poly(ADP-ribose) polymerase), was zu einem Verlust der Fähigkeit zur DNA-Reparatur mit anschließender Apoptose führt (vgl. Abb. 18) (Yu, Tao et al. 2008).

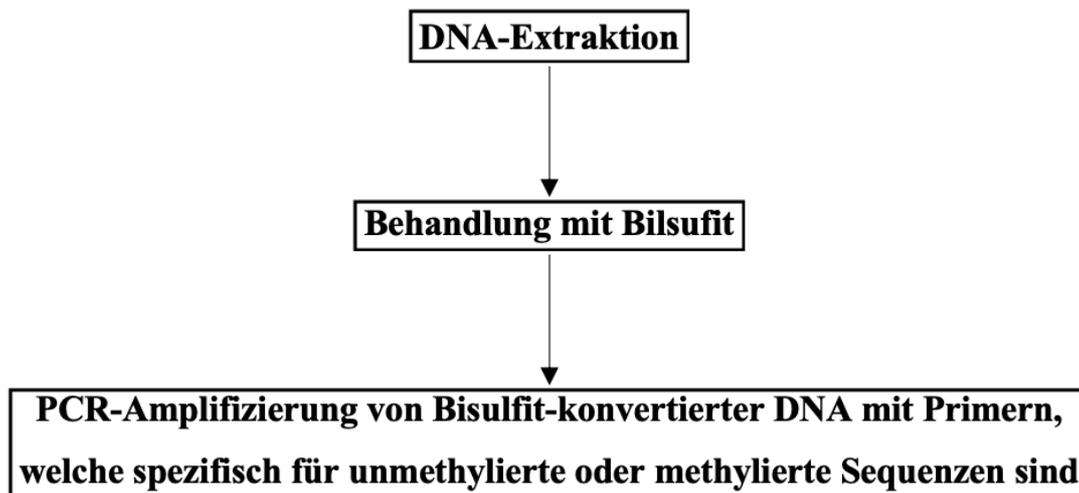


**Abbildung 18) Rolle von UCHL1 im Caspase-abhängigen Pathway beim HCC.** Im Caspase-abhängigen Signalweg kommt es zunächst zur Aktivierung (A) der Caspase-9 mit anschließender Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Jene Effektoren initiieren schließlich die Spaltung von PARP, was den Verlust der Fähigkeit zur DNA-Reparatur mit anschließender Apoptose zur Folge hat. (aus dem Englischen und modifiziert nach Yu et al. 2008)

## Limitationen der Studie

Für die Erstellung der immunhistochemischen Färbungen der Tumorgewebe wurde die Tissue Microarray- (TMA) Methode angewandt. Vorteile dieser Methode sind neben der kostengünstigen Durchführung u.a. die gleichzeitige Auswertung vieler hunderter Gewebeproben sowie die geringe Menge an Antikörpern, die zur Färbung des histologischen Gewebes benötigt wird. Zusätzlich kann einer experimentellen Variabilität durch die Färbung mehrerer Gewebeproben eines TMA-Blocks unter folglich identischen Versuchsbedingungen entgegengewirkt werden. Einen Nachteil dieser Methode stellt hingegen die Tatsache dar, dass die in Abschnitt 1.3 beschriebene Heterogenität des Glioblastoms und das damit verbundene vielseitige histologische und molekulargenetische Profil nur schwer abzubilden sind. Aus diesem Grund erfolgte in der hier vorliegenden Studie der Einschluss mehrerer Stenzen aus verschiedenen Tumorregionen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR / MSP) dar. MSP ist ein Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsstatus von CpG-Stellen innerhalb einer CpG-Insel, welches auf der sog. „Bisulfitkonversion“ beruht. Hierbei wird nach DNA-Behandlung mit Bisulfit unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt (vgl. Abb. 19) (Galm und Herman 2005). Und obwohl die MSP das bis heute am weitesten verbreitete Verfahren für den Nachweis von DNA-Methylierungen darstellt, geht auch sie mit einigen Nachteilen einher. Ein Problem der Bisulfitkonversion ist beispielsweise der große Verlust intakter amplifizierbarer DNA aufgrund extremer chemischer Versuchsbedingungen sowie die fehlende Möglichkeit der Standardisierung. Zusätzlich besteht aufgrund einer möglicherweise unvollständigen Bisulfitbehandlung und der fehlenden Kontrollmöglichkeit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse. Darüber hinaus lässt sich der Methylierungsgrad der genomischen DNA nicht quantifizieren. Eine Alternative zur MSP stellt die Pyrosequenzierung dar. Sie beruht auf dem Einbau eines Nukleotids mit anschließender Pyrophosphat-Freisetzung und Erzeugung eines Lichtblitzes, dessen Stärke direkt proportional zur Menge an eingebautem Nukleotid ist. Sie erlaubt die Kontrolle der Vollständigkeit der Bisulfitbehandlung und ermöglicht eine genaue Quantifizierung des Methylierungsgrades jeder einzelnen Methylierungsstelle. Ein Nachteil der Pyrosequenzierung ist dagegen die begrenzte Leseweite sowie das anspruchsvolle Assay-Design (Lehmann 2010).



**Abbildung 19) Ablauf einer methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR / MSP).** Nach DNA-Extraktion und Bisulfitbehandlung der genomischen DNA erfolgt die PCR-Amplifikation in zwei getrennten Reaktionen mit zwei verschiedenen Primer-Paaren, welche spezifisch für unmethylierte oder methylierte Sequenzen sind. (aus dem Englischen und modifiziert nach Galm und Herman 2005)

Die Beurteilung der Expression von DYNLT1 und UCHL1 erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher entsprechend der Ausführungen in Abschnitt 3.1.1 und 3.2.1. Da es sich hierbei um eine jeweils subjektive Einschätzung und Bewertung des jeweiligen Auswerters handelte, zeigt sich auch hier eine mögliche Fehlerquelle. Aus diesem Grund wurde bei starken Unterschieden in der Bewertung des Expressionsverhaltens der jeweiligen Marker ein dritter unabhängiger Untersucher hinzugezogen und nach erneuter Beurteilung ein Mittelwert aus allen drei Scoring-Ergebnissen gebildet.

## Perspektive

In der vorliegenden Arbeit konnte DYNLT1 als neuer Biomarker mit signifikanter prognostischer Relevanz bei Patienten mit Glioblastom identifiziert werden. Darüber hinaus lassen unsere Ergebnisse eine Beteiligung von UCHL1 an der Pathogenese des Glioblastoms vermuten.

Diese Ergebnisse eröffnen uns neue Therapieansätze sowie Möglichkeiten zur Beurteilung der Prognose bei GBM-Patienten bei Kombination mit zuvor beschriebenen Markern wie MGMT und FZD7. Weiterhin zeigt unsere Studie die Wichtigkeit der Betrachtung molekularer Prozesse auf, die an der Pathophysiologie dieser Tumore beteiligt sind. Hierfür bedarf es in Zukunft weiterer Studien und Untersuchungen.

## V. Zusammenfassung

Gliome sind aggressive, primäre Hirntumore, die trotz aktueller Fortschritte in den Bereichen der Diagnostik und Therapie mit einer schlechten Prognose einhergehen. Es besteht demnach ein dringender Bedarf, neue zelluläre und molekulare Mechanismen, die die Pathophysiologie dieser Tumore regulieren, zu identifizieren. Dynein light chain 1 (DYNLT1, Tctex-1) ist Bestandteil des Dynein-Motor-Komplexes und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen des Zellzyklus. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) ist ein deubiquitinierendes Enzym, welches in mehreren soliden Tumorentitäten aberrant exprimiert wird. In der vorliegenden Studie wurden die beiden potentiellen Biomarker DYNLT1 und UCHL1 analysiert und in Bezug auf deren Prognosefähigkeit bei Patienten mit Astrozytomen und Glioblastomen (GBM) beurteilt.

Die Tissue Microarray- (TMA) Methode diente hierbei als Basis für die immunhistochemischen Färbungen der Tumorgewebe von Patienten mit diffusen Astrozytomen (WHO Grad II; n = 22), anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III; n = 19) und GBM (WHO Grad IV; n = 113). Tumorfrees, benachbartes Hirngewebe diente als Kontrollgewebe (n = 28). Nach Beurteilung der Expression und Lokalisation von DYNLT1 und UCHL1 erfolgte die statistische Auswertung mittels univariater und multivariater Analyse des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens sowie bivariater Korrelation mit neuroradiologischen und histopathologischen Tumorparametern und Box-Whisket-Plot-Analyse.

Hirngewebe von Patienten mit Gliomen und GBM zeigte im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe eine erhöhte Expression von DYNLT1. Bei GBM-Patienten war zudem eine vermehrte DYNLT1-Expression mit einem kürzeren Gesamt- ( $p = 0,007$ , log rank) und progressionsfreien Überleben ( $p = 0,010$ , log rank) assoziiert. Multivariate Analysen mittels Cox-Regression stellten DYNLT1 zusätzlich als einen signifikanten, unabhängigen Prognosefaktor zur Beurteilung des Überlebens jener Patienten dar. Weiterhin konnte die prognostische Aussagekraft von DYNLT1 durch die Kombination mit den zuvor beschriebenen Markern MGMT und Frizzled-7 (FZD7) verstärkt werden. UCHL1 hingegen zeigte in Bezug auf das Überleben bei Gliom- und GBM-Patienten keinen signifikanten Zusammenhang, dafür aber im Vergleich zum Tumorgewebe (Median H-Score = 155, 115 und 135 für die WHO Grade II, III und IV) eine wesentlich stärkere Expression im gesunden Hirngewebe (Median H-Score = 270).

Die vorliegenden Ergebnisse identifizierten DYNLT1 als einen neuen individuellen Kombinationsmarker mit prognostischer und potentiell therapeutischer Relevanz beim GBM. UCHL1 hingegen zeigte sich nicht als prognostischer Marker. Der starke Verlust im Hirngewebe bei Gliom- und GBM-Patienten lässt jedoch eine Beteiligung an der Entstehung von Gliomen vermuten.

## VI. Literaturverzeichnis

- 1) Abarzua, F., et al. (2005). "Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase." Cancer Res **65**(21): 9617-9622.
- 2) Abu-Hamad, S., et al. (2009). "The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins." J Cell Sci **122**(Pt 11): 1906-1916.
- 3) Adamson, C., et al. (2009). "Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going." Expert Opin Investig Drugs **18**(8): 1061-1083.
- 4) Aldape, K., et al. (2015). "Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers." Acta Neuropathol **129**(6): 829-848.
- 5) Arif, T., et al. (2017). "VDAC1 is a molecular target in glioblastoma, with its depletion leading to reprogrammed metabolism and reversed oncogenic properties." Neuro Oncol **19**(7): 951-964.
- 6) Bishop, P., et al. (2016). "Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction." Biochem J **473**(16): 2453-2462.
- 7) Brocard, J., et al. (2017). "MAP6 interacts with Tctex1 and Cav 2.2/N-type calcium channels to regulate calcium signalling in neurons." Eur J Neurosci **46**(11): 2754-2767.
- 8) Buckner, J. C., et al. (2016). "Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma." N Engl J Med **374**(14): 1344-1355.
- 9) Caballero, O. L., et al. (2002). "Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27(Kip1)." Oncogene **21**(19): 3003-3010.
- 10) Chen, Y., et al. (2013). "MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and meta-analysis." Arch Med Res **44**(4): 281-290.
- 11) Chen, Y. T., et al. (2018). "High-level Sp1 is Associated with Proliferation, Invasion, and Poor Prognosis in Astrocytoma." Pathol Oncol Res.
- 12) Chuang, J. Z., et al. (2005). "The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth." Dev Cell **9**(1): 75-86.

- 13) Das, C., et al. (2006). "Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4675-4680.
- 14) Dedesma, C., et al. (2006). "Dynein light chain Tctex-1 identifies neural progenitors in adult brain." J Comp Neurol **496**(6): 773-786.
- 15) Diefenbach, R. J., et al. (2008). "Transport and egress of herpes simplex virus in neurons." Rev Med Virol **18**(1): 35-51.
- 16) Dong, S., et al. (2017). "Tctex1 plays a key role in the alpha-synuclein autophagy lysosomal degradation pathway." Neurosci Lett **661**: 90-95.
- 17) Dumitru, C. A., et al. (2013). "AHNAK and inflammatory markers predict poor survival in laryngeal carcinoma." PLoS One **8**(2): e56420.
- 18) Fang, Y. D., et al. (2011). "MAP4 mechanism that stabilizes mitochondrial permeability transition in hypoxia: microtubule enhancement and DYNLT1 interaction with VDAC1." PLoS One **6**(12): e28052.
- 19) Fernandes, C., et al. (2017). Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. Glioblastoma. S. De Vleeschouwer. Brisbane (AU).
- 20) Fiedler, U., et al. (2011). "Biomarker in der Onkologie – Definitionen und Interpretationen." Krankenhaushauspharmazie **32**(10):523-529.
- 21) Galm, O. und J. G. Herman (2005). "Methylation-specific polymerase chain reaction." Methods Mol Med **113**: 279-291.
- 22) Gao, T., et al. (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Mol Cell **18**(1): 13-24.
- 23) Gerson, S. L. (2004). "MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics." Nat Rev Cancer **4**(4): 296-307.
- 24) Gilbert, M. R., et al. (2014). "A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma." N Engl J Med **370**(8): 699-708.
- 25) Grimm, S. A. und M. C. Chamberlain (2016). "Anaplastic astrocytoma." CNS Oncol **5**(3): 145-157.

- 26) Gu, Y., et al. (2018). "The deubiquitinating enzyme UCHL1 is a favorable prognostic marker in neuroblastoma as it promotes neuronal differentiation." J Exp Clin Cancer Res **37**(1): 258.
- 27) Hanif, F., et al. (2017). "Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment." Asian Pac J Cancer Prev **18**(1): 3-9.
- 28) Hartmann, C., et al. (2010). "Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas." Acta Neuropathol **120**(6): 707-718.
- 29) Hegi, M. E., et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- 30) Heinrich, P. C., et al. (2014). "Apoptose – Der programmierte Zelltod." Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie 9.Auflage: 635-636.
- 31) Hershko, A. und A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- 32) Hochberg, F., et al. (1990). "Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults." J Neurooncol **8**(1): 55-60.
- 33) Houillier, C., et al. (2010). "IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas." Neurology **75**(17): 1560-1566.
- 34) Hurst-Kennedy, J., et al. (2012). "Ubiquitin C-terminal hydrolase 11 in tumorigenesis." Biochem Res Int **2012**: 123706.
- 35) Hussain, S., et al. (2010). "The de-ubiquitinase UCH-L1 is an oncogene that drives the development of lymphoma in vivo by deregulating PHLPP1 and Akt signaling." Leukemia **24**(9): 1641-1655.
- 36) Iwakuma, T. und G. Lozano (2003). "MDM2, an introduction." Mol Cancer Res **1**(14): 993-1000.
- 37) Jin, C., et al. (2013). "UCHL1 Is a Putative Tumor Suppressor in Ovarian Cancer Cells and Contributes to Cisplatin Resistance." J Cancer **4**(8): 662-670.

- 38) King, S. J., et al. (2002). "Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes." Protein Sci **11**(5): 1239-1250.
- 39) Klink, B., et al. (2010). "Glioblastomas with oligodendroglial component - common origin of the different histological parts and genetic subclassification." Anal Cell Pathol (Amst) **33**(1): 37-54.
- 40) Kononen, J., et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-847.
- 41) Koshy, M., et al. (2012). "Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries." J Neurooncol **107**(1): 207-212.
- 42) Lehmann, U. (2010). "[DNA methylation. From basic research to routine diagnostics]." Pathologe **31 Suppl 2**: 274-279.
- 43) Li, A., et al. (2011). "Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors." Nat Cell Biol **13**(4): 402-411.
- 44) Li, L., et al. (2010). "The tumor suppressor UCHL1 forms a complex with p53/MDM2/ARF to promote p53 signaling and is frequently silenced in nasopharyngeal carcinoma." Clin Cancer Res **16**(11): 2949-2958.
- 45) Li, M. G., et al. (2004). "The Drosophila tctex-1 light chain is dispensable for essential cytoplasmic dynein functions but is required during spermatid differentiation." Mol Biol Cell **15**(7): 3005-3014.
- 46) Liu, Y., et al. (2002). "The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility." Cell **111**(2): 209-218.
- 47) Liu, Z., et al. (2009). "Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4635-4640.
- 48) Lorentzen, E. und Taschner, M. (2015). "Zilien – die Antennen der Zelle." Forschungsbericht 2015 – Max-Planck-Institut für Biochemie.
- 49) Louis, D. N., et al. (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.

- 50) Martinez-Vicente, M. (2012). "Multiple ways for a-synuclein degradation." Mov Disord **27**(3): 345.
- 51) Mechtler, L. (2009). "Neuroimaging in neuro-oncology." Neurol Clin **27**(1): 171-201, ix.
- 52) Milanes-Yearsley, M., et al. (2002). "Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups." Mod Pathol **15**(12): 1366-1373.
- 53) Mizobuchi, Y., et al. (2008). "REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma." Neuro Oncol **10**(3): 244-253.
- 54) Nakada, M., et al. (2011). "Aberrant signaling pathways in glioma." Cancers (Basel) **3**(3): 3242-3278.
- 55) Oberheim Bush, N. A. und S. Chang (2016). "Treatment Strategies for Low-Grade Glioma in Adults." J Oncol Pract **12**(12): 1235-1241.
- 56) Ochiai, K., et al. (2011). "Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1." Biochem Biophys Res Commun **412**(2): 391-395.
- 57) Oka, T., et al. (2016). "A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy." Sci Rep **6**: 33319.
- 58) Ostrom, Q. T., et al. (2014). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011." Neuro Oncol **16** **Suppl 4**: iv1-63.
- 59) Pallud, J., et al. (2014). "Epileptic seizures in diffuse low-grade gliomas in adults." Brain **137**(Pt 2): 449-462.
- 60) Papa, L., et al. (2010). "Ubiquitin C-terminal hydrolase is a novel biomarker in humans for severe traumatic brain injury." Crit Care Med **38**(1): 138-144.
- 61) Qiu, X., et al. (2016). "Overexpression of FZD7 promotes glioma cell proliferation by upregulating TAZ." Oncotarget **7**(52): 85987-85999.
- 62) Rees, J. (2015). "Temozolomide in low-grade gliomas: living longer and better." J Neurol Neurosurg Psychiatry **86**(4): 359-360.

- 63) Reyes-Turcu, F. E., et al. (2009). "Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes." Annu Rev Biochem **78**: 363-397.
- 64) Roberts, A. J., et al. (2013). "Functions and mechanics of dynein motor proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(11): 713-726.
- 65) Sanchez-Diaz, P. C., et al. (2017). "Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) is associated with stem-like cancer cell functions in pediatric high-grade glioma." PLoS One **12**(5): e0176879.
- 66) Sarma, N. J. und N. R. Yaseen (2013). "Dynein Light Chain 1 (DYNL1) Interacts with Normal and Oncogenic Nucleoporins." PLoS One **8**(6): e67032.
- 67) Schiffgens, S., et al. (2016). "Sex-specific clinicopathological significance of novel (Frizzled-7) and established (MGMT, IDH1) biomarkers in glioblastoma." Oncotarget **7**(34): 55169-55180.
- 68) Schmuck, R., et al. (2011). "Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines." Am J Pathol **178**(4): 1792-1804.
- 69) Schneider, M. A., et al. (2011). "Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection." Cell Microbiol **13**(1): 32-46.
- 70) Schwarzer, C., et al. (2002). "Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74." Int J Biochem Cell Biol **34**(9): 1059-1070.
- 71) Smoll, N. R. und B. Hamilton (2014). "Incidence and relative survival of anaplastic astrocytomas." Neuro Oncol **16**(10): 1400-1407.
- 72) Strimbu, K. und J. A. Tavel (2010). "What are biomarkers?" Curr Opin HIV AIDS **5**(6): 463-466.
- 73) Stupp, R., et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- 74) Tamimi, A. F. und M. Juweid (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Glioblastoma. S. De Vleeschouwer. Brisbane (AU).
- 75) Tsuji, T., et al. (2001). "Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas." Biochem Biophys Res Commun **289**(1): 257-263.

- 76) Ueno, K., et al. (2009). "Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells." Br J Cancer **101**(8): 1374-1381.
- 77) Urso, L., et al. (2016). "Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment." Crit Rev Oncol Hematol **97**: 220-230.
- 78) Verhaak, R. G., et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- 79) Wada, H., et al. (1998). "Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3." Biochem Biophys Res Commun **251**(3): 688-692.
- 80) Wang, K. K., et al. (2017). "Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) as a therapeutic and diagnostic target in neurodegeneration, neurotrauma and neuro-injuries." Expert Opin Ther Targets **21**(6): 627-638.
- 81) Wei, S., et al. (2020). "Exosomal transfer of miR-15b-3p enhances tumorigenesis and malignant transformation through the DYNLT1/Caspase-3/Caspase-9 signaling pathway in gastric cancer." J Exp Clin Cancer Res **39**(1): 32.
- 82) Weller, P., et al. (2014). "The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer." Eur J Cancer **50**(7): 1291-1300.
- 83) Williams, J. C., et al. (2005). "Crystal structure of dynein light chain TcTex-1." J Biol Chem **280**(23): 21981-21986.
- 84) Wilson, T. A., et al. (2014). "Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics." Surg Neurol Int **5**: 64.
- 85) Xavier-Magalhaes, A., et al. (2018). "The long non-coding RNA HOTAIR is transcriptionally activated by HOXA9 and is an independent prognostic marker in patients with malignant glioma." Oncotarget **9**(21): 15740-15756.
- 86) Xiang, T., et al. (2012). "The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer." PLoS One **7**(1): e29783.
- 87) Xilouri, M., et al. (2013). "alpha-Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship." Mol Neurobiol **47**(2): 537-551.

- 88) Yu, J., et al. (2008). "Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors." Hepatology **48**(2): 508-518.
- 89) Zhang, K., et al. (2015). "Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner." Oncotarget **6**(1): 537-546.
- 90) Zhong, J., et al. (2012). "UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the beta-catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity." Int J Mol Med **30**(2): 430-436.

## VII. Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## VIII. Ehrenerklärung

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

**„Die Rolle von DYNLT1 und UCHL1 als prognostische Biomarker in Gliomen und Glioblastomen“**

an der Universitätsklinik für Neurochirurgie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. I. Erol Sandalcioglu und Dr. rer. nat. Claudia A. Dumitru

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

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

Magdeburg, den

---

Unterschrift

## IX. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.