

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**Genexpressionsanalysen der tumor-/metastasierungsassoziierten Proteine ATF5,
KiSS1, RPS27, BRMS1 und TTK in neuroglialen Hirntumoren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dominik Schmitt

aus Würzburg

Würzburg, 2020

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

Korreferentin: PD Dr. med. C. Monoranu

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2021

Der Promovend ist Arzt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

1. Kessler AF, Feldheim J, Schmitt D, Feldheim JJ, Monoranu CM, Ernestus R-I, et al. Monopolar Spindle 1 Kinase (MPS1/TTK) mRNA Expression is Associated with Earlier Development of Clinical Symptoms, Tumor Aggressiveness and Survival of Glioma Patients. *Biomedicines* 2020, 8, 192, p. 1-13. [10.3390/biomedicines8070192](https://doi.org/10.3390/biomedicines8070192).
2. Feldheim J, Kessler AF, Schmitt D, Wilczek L, Linsenmann T, Dahlmann M, et al. Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is increased in astrocytomas of different WHO grades and correlates with survival of glioblastoma patients. *Onco Targets Ther.* 2018 (v11), p. 8673–8684. DOI: [10.2147/OTT.S176549](https://doi.org/10.2147/OTT.S176549).

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	NEUROGLIALE HIRNTUMOREN	1
1.1.1	Einteilung, klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie	1
1.1.2	Gliomklassifikation auf Basis molekulargenetischer Eigenschaften.....	2
1.2	UNTERSUCHTE PROTEINE	4
1.2.1	Ribosomales Protein S27 (RPS27)	4
1.2.2	Kisspeptin 1 (KiSS1)	5
1.2.3	Breast-Carcinoma-Metastasis-Suppressor-Gen 1 (BRMS1)	7
1.2.4	Activating-Transcription-Factor 5 (ATF5).....	7
1.2.5	Dual-Specifity-Proteinkinase MPS1	8
1.3	FRAGESTELLUNG	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	MATERIAL	11
2.1.1	Geräte.....	11
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.3	Antikörper und Sonden.....	12
2.1.4	Chemikalien	13
2.1.5	Kits.....	14
2.1.6	Software	14
2.1.7	Herstellung der Lösungen.....	14
2.1.7.1	Citratpuffer	14
2.1.7.2	Ethanol-Verdünnungsreihe	14
2.1.7.3	Wasserstoffperoxidblock	14
2.1.7.4	Puffer für qPCR-Analysen.....	15
2.2	METHODEN.....	15
2.2.1	Probenmaterial	15
2.2.2	Datenerhebung für das Patientenpanel	15
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen	16
2.2.3.1	Fixierung.....	16
2.2.3.2	Durchführung der Antikörperfärbung	17
2.2.3.3	Bildverarbeitung	18

2.2.4	Aufarbeitung der Hirntumorproben	18
2.2.4.1	RNA Isolation und Aufreinigung mit Trizol-Reagenz	18
2.2.4.2	RNA-Messung und Umschreiben in cDNA	19
2.2.5	Quantitative PCR-Analyse	19
2.2.5.1	Versuchsaufbau	19
2.2.6	Datenauswahl und Statistik	22
2.2.6.1	Testung auf Normalverteilung	23
2.2.6.2	Bestimmung der Korrelationskoeffizienten	23
2.2.6.2.1	Pearson-Korrelation	23
2.2.6.2.2	Spearman's Rho	23
2.2.6.2.3	Kendall's Tau	24
2.2.6.3	Zeitreihen- bzw. Regressionsanalysen	24
2.2.6.4	Expressionsanalysen	26
2.2.6.4.1	Relative RNA-Expression der Einzeltumoren	26
2.2.6.5	Relative RNA-Expression der Vorläufer- und Rezidivtumoren	26
2.2.6.6	Clusteranalysen	27
3	ERGEBNISSE	29
3.1	PATIENTENPANEL	29
3.1.1	Varianzanalyse und Normalverteilung der C _T -Werte	31
3.2	RPS27	32
3.2.1	Regressionsanalysen	32
3.2.2	Korrelationsanalysen	34
3.2.3	Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen	35
3.2.4	Verlaufsanalysen	40
3.2.5	Zusammenfassende Ergebnisse der RPS27-Untersuchung	44
3.3	KISS1	44
3.3.1	Regressionsanalysen	44
3.3.2	Korrelationsanalysen	45
3.3.3	Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen	46
3.3.4	Zusammenfassende Ergebnisse der KISS1-Untersuchung	50
3.4	BRMS1	52
3.4.1	Regressionsanalysen	52

3.4.2	Korrelationsanalysen	52
3.4.3	Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen.....	53
3.4.4	Verlaufsanalysen	58
3.4.5	Zusammenfassende Ergebnisse der BRMS1-Untersuchung	60
3.5	ATF5.....	61
3.5.1	Regressionsanalysen	61
3.5.2	Korrelationsanalysen	61
3.5.3	Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen.....	62
3.5.4	Verlaufsanalysen	67
3.5.5	Zusammenfassende Ergebnisse der ATF5-Untersuchung.....	68
3.6	TTK	69
3.6.1	Regressionsanalysen	69
3.6.2	Korrelationsanalysen	70
3.6.3	Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen.....	71
3.6.4	Verlaufsanalysen	75
3.6.5	Zusammenfassende Ergebnisse der TTK-Untersuchung	77
3.7	ZUSAMMENFASSUNG DER CLUSTERANALYSEN.....	77
4	DISKUSSION.....	78
4.1	METHODENDISKUSSION	78
4.1.1	Bestimmung der Patientenproben und Datenrecherche.....	78
4.1.2	Weiterführende Datenanalysen.....	79
4.2	ERGEBNISDISKUSSION, KLINISCHE RELEVANZ UND AUSBLICK	80
4.2.1	RPS27	80
4.2.2	KiSS1	82
4.2.3	BRMS1	83
4.2.4	ATF5.....	84
4.2.5	TTK	86
4.2.6	Gesamtzusammenfassung RPS27, KiSS1, BRMS1, ATF5 und TTK.....	87
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
6	LITERATURVERZEICHNIS	90
7	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101

1 Einleitung

1.1 Neurogliale Hirntumoren

1.1.1 Einteilung, klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie

Nach Angaben des amerikanischen Central-Brain-Tumor-Registers lag die durchschnittliche jährliche altersangepasste Inzidenz von Hirn- und weiteren zentralnervösen Tumoren bei den über Vierzigjährigen in den Jahren 2010-2014 bei 40,82 pro 100.000 Einwohnern in den USA (1). Die Sterblichkeitsrate lag in dieser Zielgruppe bei 8,94 pro 100.000 Einwohnern (1). Verglichen mit anderen Ursachen wie z.B. Herzerkrankungen mit einer Sterblichkeitsrate von 511,23 pro 100.000 Einwohnern ist die Sterblichkeit durch Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) deutlich geringer (1), jedoch zeigen einige der Hirntumorgruppen drastische Verläufe (1). Gliome sind mit 4-5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr die häufigsten unter den hirneigenen Tumoren (2). Zu diesen zählt mit einem Anteil von 12-20% unter allen Hirntumoren auch das Glioblastom (GBM), dessen Diagnose am häufigsten um die 55 Jahre gestellt wird und tendenziell vermehrt bei Männern als Frauen auftritt (1,3:1) (3). Zwar ist dieser Hirntumor im Vergleich zu anderen Tumoren relativ selten, jedoch zeigen GBM eine sehr ungünstige Prognose (3). Die zwei-Jahres-Überlebensrate liegt bei 5-12% und die mediane Lebenserwartung beträgt bei Behandlung mit einer kombinierten Radiochemotherapie mit dem Zytostatikum Temozolomid nach Stupp-Schema 14,6 Monate bzw. 12,1 Monate mit alleiniger Radiotherapie (3, 4). Aufgrund dieser Prognose steht die Gruppe der hochgradigen Gliome im besonderen Interesse der Forschung.

Gliome werden auf Basis der Malignität durch eine von der World Health Organization WHO etablierten Klassifikation in vier Grade (WHO° I-IV) eingeteilt (3, 5).

Hochgradige bzw. maligne Gliome werden WHO° III und °IV, gering maligne bzw. niedriggradige Gliome als WHO° I und II bezeichnet (3).

Während das meist lokal abgrenzbare pilozytische Astrozytom, ein v.a. im Kindesalter auftretendes Gliom WHO° I, eine sehr gute Prognose mit Heilungschancen aufweist, zeigen die WHO° II-IV-Gliome ein eher diffuses Wachstum (6). Bei pilozytischen Astrozytomen WHO° I liegt die 5-20 Jahre-Überlebensrate bei >85% (3). Für niedriggradige Astrozytome WHO° II (low-Grade-Astrocytoma, LGA) wie z.B. das

diffuse Astrozytom umfasst die Überlebenszeit einen Bereich von 6 bis 8 Jahren (3). Bei anaplastische Astrozytomen WHO° III ist die 2- und 5-Jahres-Überlebensrate von 38-60% bzw. 15-25% bereits geringer (3). GBM WHO° IV haben dabei die schlechteste Prognose hinsichtlich der Lebenserwartung (3).

1.1.2 Gliomklassifikation auf Basis molekulargenetischer Eigenschaften

Bis zur WHO-Klassifikation von 2016 wurde u.a. histologisch zwischen pilozytischen, diffusen, anaplastischen Gliomen und dem GBM unterschieden, wobei die Gruppe der diffusen Astrozytome weiterhin durch ihre Erscheinungsform als fibrillär, gemistozytisch und protoplasmatisch charakterisiert wurde (3, 5).

Die Graduierung der infiltrierenden, astrozytären Tumoren basiert nach WHO u.a. auf den neuropathologischen Auffälligkeiten wie z.B. der zytologischen Atypie, welche - allein vorliegend - den WHO° II definiert (7). Zeigt sich weiterhin auch eine Anaplasie und mitotische Aktivität wird WHO° III bzw. bei zusätzlicher mikrovaskulärer Proliferation und/oder Nekrose wird WHO° IV vergeben (7). Seit der WHO-Klassifikation von 2007 hat es große Fortschritte in der genetischen Analyse von Gliomen gegeben, die die Klassifikation grundlegend beeinflussten und zu einer Überarbeitung und damit zur Veröffentlichung der Klassifikation von 2016 führte. Zwar behielt man die Bezeichnungen der Tumoren mit den jeweiligen WHO-Graden bei, die glialen Tumorsubgruppen wurden jedoch neu gebildet (8). Dass die histologische Evaluation in Zukunft noch weiter an Bedeutung verlieren könnte, wurde als Möglichkeit in der aktuellen WHO-Klassifikation diskutiert (9).

In der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016 wurde die phänotypische Erscheinungsform genotypisch vor allem durch die Bestimmung des IDH-Mutationsstatus, eines möglichen ATRX-Verlustes und durch das Vorhandensein einer 1p/19q-Kodeletion ergänzt (8). Ein weiteres Klassifikationsmerkmal für die Unterteilung der Gliome ist der Nachweis von p53-Mutationen (8). Diese kommen häufig in glialen Tumoren vor und sind z.B. bei Patienten mit diffusen LGA mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert (10). Diese molekulargenetischen Untersuchungen ergaben, dass z.B. alle diffus infiltrierenden Tumoren als diffuse Gliome zusammengefasst werden können und sich daher diffuse Astrozytome und Oligodendrogliome nosologisch näher stehen als z.B. die pilozytischen Astrozytome,

die v.a. im Kindesalter auftreten (8).

Eine wesentliche Neuerung der aktuellen Einteilung der Tumore nach WHO ist der Nachweis von Mutationen in der Isozitatdehydrogenase (IDH) (8). Eine genomweite Mutationsanalyse und nachfolgende Sequenzierung ergab, dass mehr als 70% der Astrozytome WHO° II bzw. III eine mutierte IDH1 bzw. IDH2 aufweisen und dies zu einer veränderten Enzymaktivität führt (11). Es handelt sich hierbei um somatische Mutationen mit resultierendem Aminosäureaustausch am Codon R132 des IDH1-Gens bzw. analog am Codon R172 des IDH2-Gens (11). Die Gliome mit IDH1- bzw. IDH2-Mutationsnachweisen unterscheiden sich von denen des IDH-Wildtyps, wobei häufig niedriggradige Tumoren WHO° II und WHO° III mutiert vorlagen und deshalb vorgeschlagen wurde, dass die IDH-Mutationen bereits in einem frühen Stadium der Tumorentstehung stattgefunden haben könnten (11). Somit werden die Gliome nach IDH-mutiert, IDH-Wildtyp oder als „Not-Otherwise-Specified“ (NOS) nach Ausschluss oder unzureichender IDH-Mutationsanalyse bezeichnet (8).

In dieser Arbeit wurden neben LGA auch sekundäre GBM untersucht. Diese hochgradigen Tumoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich sekundär aus einem Astrozytom WHO° II bzw. WHO° III entwickeln und nicht neu entstehen (3). Ein IDH-Mutationsnachweis korreliert stark mit den seltener vorkommenden sekundären GBM (10% aller Fälle), die bei Patienten mit Vorläuferläsion auftreten (8). Bei einem nachgewiesenen IDH-Wildtyp liegt sehr wahrscheinlich das häufiger auftretende (90% aller Fälle) primäre oder de-novo GBM multiforme (GBM) vor, welches überwiegend bei Patienten über 55 Jahre vorzufinden ist (8). Tumoren vom IDH-Wildtyp weisen sowohl eine negative immunhistochemische Färbung für die mutierte IDH1-R132H als auch einen fehlenden Mutationsnachweis in der Sequenzierung für die Codons an der 132. Stelle für IDH1 bzw. für Codon 172 für IDH2 auf (8). Für manche Tumortypen ist eine diagnostische Bezeichnung als NOS bei unzureichendem Zugriff auf die Molekulardiagnostik zulässig (8).

Des Weiteren ist in der aktuellen Klassifikation der Gliome auch das ATRX-Protein von großer Bedeutung (8). Dieses hat eine wesentliche Aufgabe für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität und ist bedeutend für die Regulation des Chromatinumbaus sowie für den Zellzyklus (12). Ein ATRX-Verlust korreliert stark mit dem Nachweis einer IDH-Mutation (13). Ein gleichzeitiges Vorhandensein eines

ATRX-Verlustes und der 1p/19q-Kodeletion ist jedoch fast nicht existent (12). Diese Eigenschaft nutzt auch die aktuelle WHO-Klassifikation, in der die IDH-Mutation sowie der ATRX-Verlust typisch für diffuse Astrozytome sind (8). Der Nachweis einer IDH-Mutation und einer 1p/19q-Kodeletion sind hingegen für die Gruppe der Oligodendrogliome typisch (8). Durch diese Eigenschaften lassen sich die Tumorguppen relativ gut voneinander abgrenzen und es wird von der Diagnose des Oligoastrozytoms als historische Bezeichnung für astrozytäre und oligodendrogliale Mischtumoren abgeraten, da sie durch eine genetische Testung voneinander unterschieden werden können (8).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von LGA und teilweise von deren Rezidiven. Es stellte sich die Frage, ob es ggf. weitere Faktoren gibt, die neben der Funktion als Marker auch Bedeutung für etwaige Behandlungskonzepte haben könnten. Im Folgenden findet sich eine kurze Übersicht über die fünf Proteine und die Gründe, weshalb genau diese für diese Arbeit von besonderem Interesse waren.

1.2 Untersuchte Proteine

1.2.1 Ribosomales Protein S27 (RPS27)

Das ribosomale Protein S27 (RPS27), welches auch als Metallopanstimulin-1 (MPS-1) bekannt ist, sowie wenige weitere ribosomale Proteine weisen besondere Funktionen in der Wachstumsregulation und in der chemisch, viral, strahlenbedingt sowie Chemotherapie-induzierten Krebsentstehung auf (14).

Die mRNA dieses Metalloproteins kommt in einer Vielzahl von aktiv proliferierenden Zellen und Tumorgewebe vor. Die Zink-Finger-Domäne des Proteins ist sehr ähnlich zu der von Steroid- bzw. Thyroid-Hormonen und verschiedener DNA-Bindeproteinen (15). Aufgrund seiner nukleären Lokalisation und DNA-Bindeaktivität wurde für RPS27 vermutet, dass es in die Vermittlung der Zellantwort auf TGF- β -1 und einer Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren und Umgebungssignalen involviert ist (15).

Die RPS27-mRNA ist in menschlichen Mammakarzinom-, GBM- und Melanomzelllinien aber nicht in kultivierten Normalzelllinien erhöht (15). Eine Überexpression konnte in unterschiedlichem Ausmaß auch für tumoröse Gewebeproben von Ovarien, Endometrium, uterinem Zervixgewebe und von Melanomen nachgewiesen werden (15). In U-138-MG-GBM- und LAN-5-Neuroblastomzelllinien fanden sich mittlere RPS27-Level, während, kultivierte menschliche WI-38-Lungenfibroblasten die

niedrigste RPS27-mRNA-Expression hatten (15). Teilweise zeigte RPS27 drei- bis 15-fach höhere mRNA-Expressionswerte in Tumorzellen als im Vergleich zu den Normalzelllinien (15).

Es wird ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumlevel dieses Proteins in unterschiedlichen Tumorentitäten und die Möglichkeit für eine präventive Früherkennung und Therapie diskutiert (14). Gesunde Einzelpersonen ohne signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied hatten einen Referenzbereich von nicht-detectierbar bis hin zu 10 ng/ml (98%) (14). Bei Patienten mit Metastasen bildenden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, z.B. Prostata, Lunge oder Melanom, lagen die RPS27-Level in den meisten Fällen (>70%) in sehr hohen Wertebereichen von 100 bis 1000 ng/ml vor, wobei die Patienten mit metastasierten Prostatatumoren die höchsten Werte aufwiesen (14).

Eine ähnliche Aussage wurde auch für Mammakarzinome formuliert. I- und II-gradiger Brusttumoren wiesen darauf hin, dass eine stärkere Expression von RPS27 in größeren und hochgradigen Tumoren gefunden werden konnte und somit bei stärkerer Aggressivität auch mehr RPS27 vorlag (16). Dabei zeigten Regressionsanalysen Zusammenhänge zwischen Überexpression und krankheitsfreiem Überleben, wohingegen ein Zusammenhang zwischen übermäßiger Expression und dem Gesamtüberleben nicht bestätigt werden konnte (16).

Die Korrelationen zeigten, dass Brusttumoren der Stadien 0, I und II bereits frühzeitig in über 90% der Fälle mit einem RPS27-Test detektierbar waren (14). Durch die RPS27-Testung konnte ein Bereich beschrieben werden, nach dem zwischen Vorhandensein oder Abwesenheit eines tumorösen Prozesses unterschieden und somit Tumorstufen angezeigt werden konnten (14).

Da für gliale Tumoren in Versuchen mit Zelllinien zwar Werte für die RPS27-Expression beschrieben wurden (15) aber Korrelations- oder Regressionsanalysen in einer Patientengruppe von LGA noch nicht bekannt waren, war RPS27 ein interessantes Protein für die Analysen in dieser Arbeit.

1.2.2 Kisspeptin 1 (KiSS1)

Das Tumorsuppressorgen KiSS1 wurde in Hershey, Pennsylvania, entdeckt und vermutlich in Anlehnung an ein lokales, amerikanisches Schokoladenprodukt als KiSS1 bezeichnet (17-19). Durch das KiSS1-Gen werden Kisspeptine exprimiert, welche aus

einem Vorläuferpeptid durch anschließende Spaltung entstehen und als Liganden an den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor GPR54 binden (20). Dieser KiSS1-Rezeptor wird auch als KiSS1R oder AXOR12 bezeichnet (20-22).

KiSS1 ist reichlich in der Plazenta exprimiert und hemmt die Metastasenbildung, letztere durch Aktivierung der KiSS1-GPR54-Signalgebung, wodurch die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen inhibiert und so die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen beeinflusst wird (17-19, 23-26).

Eine Verminderung der KiSS1-Gentranskription war z.B. bei Magentumoren mit venös invasivem Verhalten sowie mit der Fernmetastasierung assoziiert (27). Dabei könnte die KiSS1-Expression auch als prognostischer Marker dienen (27).

Eine niedrige Expression von Metastin, einem KiSS1-Genprodukt und von AXOR12, dem zugehörigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, korrelierte mit der Aggressivität und dem Fortschreiten ovarieller Residualtumoren nach Resektion des Primärtumors (21).

Kim et al. haben die besondere Bedeutung von Kisspeptinen für das Tumorwachstum und die Metastasierung herausgearbeitet, die die Kinase EIF2AK2 induzieren (28). Sie zeigten in Tierversuchen mit Zellreihen des kolorektalen Adenokarzinoms, dass KiSS1 hier eine besondere Rolle in der Suppression der Fernmetastasierung zukommt (28).

Eine Reduktion der KiSS1- und/oder der GPR54-Expression war mit einer schlechteren Prognose von Patienten assoziiert und daher könnten beide nützliche prädiktive Marker für diese Tumorerkrankung darstellen (26).

Murat et al. haben den KiSS1-Rezeptor (KiSS1R) in hypoxischen Arealen und Endothelzellen der tumorzugehörigen Blutgefäße in GBM gefunden (22). KiSS1R könnte somit eine Rolle in der Angiogenese und Anpassung an hypoxische Bedingungen bei diesen Tumoren zukommen (22).

Der therapeutische Einsatz von Kisspeptinen könnte Metastasierung verhindern, da auf disseminierte Zellen und deren Interaktion mit der Mikroumgebung abgezielt wird (26).

Die systemische Gabe von Kisspeptinen könnte Tumorzellen erreichen und somit eine unkomplizierte Therapieoption darstellen, solange metastatische Tumorzellen den KiSS1-Rezeptor exprimieren (29). Da in glialen Tumoren nur wenig über das Kisspeptin-System bzw. den KiSS1R bekannt ist (22), wurde die KiSS1-Genexpression in dieser Arbeit an niedrig- und einigen höhergradigen Gliomen untersucht.

1.2.3 Breast-Carcinoma-Metastasis-Suppressor-Gen 1 (BRMS1)

Das Protein Breast-Carcinoma-Metastasis-Suppressor-Gen 1 (BRMS1) wird als Tumorsuppressor diskutiert (30, 31).

Obwohl es keine enzymatisch wirksamen Bereiche aufweist, vermittelt und reguliert es u.a. Protein-Protein-Interaktionen und inhibiert Metastasierung, indem es Einfluss auf Zellmigration, Invasivität, Kolonisierung, Angiogenese, Zellüberleben, Neugestaltung des Zytoskeletts sowie die Wahrnehmung durch das Immunsystem hat (32). Weiterhin ermöglicht eine reduzierte BRMS1-Expression die Tumorprogression durch verbesserte Zellinvasion, -migration und -adhäsion (33).

In mRNA-Untersuchungen von Brustkrebsproben von Patienten korrelierten die BRMS1-Expressionswerte u.a. mit dem Patientenalter und der Tumorgöße, wobei ältere Patienten (> 50 Jahre) und kleinere Tumoren (< 2cm) signifikant mehr BRMS1 exprimierten als die Proben der jüngeren Patienten (< 50 Jahre) sowie die größeren Tumoren (> 2 cm) (34). Außerdem hatten Patienten mit höheren Expressionswerten ein besseres krankheitsfreies sowie Gesamtüberleben (34).

In Gliomen war die BRMS1-Expression im Vergleich zum benachbarten Normalhirngewebe signifikant erniedrigt und mit dem WHO-Grad assoziiert (33). Ein ähnliches Bild ergab sich für das BRMS1-Like-Protein (BRMS1L), einem BRMS1 ähnlichen Protein, dessen erniedrigte Expression signifikant mit hochgradigen Gliomen und einer erhöhten Mortalität in Überlebensanalysen korrelierte (35). Ob BRMS1 in LGA exprimiert wird und Korrelationen mit klinischen Daten existieren, soll in dieser Forschungsarbeit geklärt werden.

1.2.4 Activating-Transcription-Factor 5 (ATF5)

Activating-Transcription-Factor 5 (ATF5) wurde bereits 1999 identifiziert und der ATF/cAMP-response-element-binding-protein-(CREB)-Familie zugeordnet (36, 37). Ein wesentliches Charakteristikum dieses Proteins ist eine Leucin-Zipper-Domäne, welche die Homodimerisierung von ATF5 vermittelt, welches dann Einfluss auf die Gentranskription nimmt (38). Eine wichtige Rolle scheint in der Differenzierung astrozytärer Progenitorzellen zu liegen, da eine hohe ATF5-Expression innerhalb der ventrikulären Zone des sich entwickelnden Hirngewebes als Ort neuraler Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesen wurde (39). Im Gegensatz dazu war die Expression an Orten migrierender und postmitotischer Neurone verringert (39). ATF5 ist ein Marker

für neurale Stammzellen jedoch nicht für ausgereifte Neurone (39), aber es ist in proliferierenden Precursorzellen der oligodendrozytären Linie exprimiert (40). Daher liegt es nahe, dass ATF5 auch in neuronalen Tumoren stark und konstitutiv exprimiert sein könnte (40). Tatsächlich wird ATF5 im GBM nukleär exprimiert. Die Frage, ob und wie stark ATF5 in GBM exprimiert wird, wurde 2006 von *Angelastro et al.* untersucht (41). An 29 chirurgisch resezierten GBM wurde eine spezifische positive immunhistologische Färbung der Tumorzellen in allen Proben und vereinzelter reaktiver Astrozyten sowie in Endothelzellen nachgewiesen, wohingegen die Neuronen wenig oder nicht gefärbt waren (41). Diese Ergebnisse wurden an acht GBM-Zelllinien bestätigt (41). Durch Herabregulation der ATF5-Expression konnte Apoptose in experimentellen GBM in Tiermodellen induziert werden, wohingegen das normale Hirngewebe unbeeinflusst blieb (41). *Sheng et al.* führten immunhistologische Färbungen für ATF5 an 38 GBM im Vergleich zu vier Normalhirnproben durch und überprüften, ob die Expression mit den Prognosen der Patienten korrelierte (42). Patienten mit ATF5-positivem GBM hatten eine wesentlich kürzere Überlebenszeit als ATF5-negative (42). Die ATF5-Expression lag in GBM- und anaplastischen Gliomgeweben im Vergleich zur Expression des normalen Cortexgewebes signifikant erhöht vor, wobei die Expression mit dem Tumorgrad assoziiert war (43). Eine verkürzte dominant-negative ATF5-Form wurde mit einer Domäne (Pen-d/n-ATF5-RP) fusioniert, die in Zellen eindringen kann (44). Dieses subkutan verabreichte Protein konnte erfolgreich die Blut-Hirn-Schranke von Mäusen mit GBM überwinden und in Normalhirn- und Tumorzellen eindringen, aber tötete selektiv nur Tumorzellen, was zu einer Eliminierung der Tumoren führte (44). Ein anderer Therapieansatz ist die Beladung des Apolipoproteins-E3-High-Density-Lipoproteins mit gegen ATF5 gerichteter siRNA sowie Calciumphosphat (45, 46). Diese siRNA inhibierte das Wachstum von GBM-Xenografts in Mäusen (45, 46). Da es nur vereinzelte Informationen zur ATF5-Expression in LGA gibt (47), wurde dieses Protein in die Analysen dieser Arbeit miteinbezogen.

1.2.5 Dual-Specificity-Proteinkinase MPS1

Monopolar-Spindle-1 (MPS1), auch als dual-specificity-Proteinkinase TTK bezeichnet, ist eine evolutionär hoch konservierte Kinase, die eine Schlüsselkomponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes ist und die korrekte chromosomale Anlagerung an

die Spindelmikrotubuli kontrolliert (48-50). Erst bei stabiler Orientierung der Chromosomen während der Metaphase kann die Trennung der Chromosomen stattfinden (49, 51). Tritt dies nicht ein, unterbrechen Proteine des mitotischen Kontrollpunktes das Fortschreiten des Zellzyklus so lange, bis alle Chromosomen richtig ausgerichtet und stabil mit dem Spindelapparat verbunden sind (49). TTK hat hierbei eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Proteinen an den Kinetochoren, Orte an denen die Spindeln mit den Chromosomen verbunden werden (49, 52, 53). Es ist weiterhin an der Chromosomenausrichtung während der Metaphase beteiligt (49, 50, 52, 54-56) und für die Duplikation der Zentrosomen sowie die Zytokinese von Bedeutung (48, 49). Außerdem ist TTK im p53-abhängigen postmitotischen Kontrollpunkt involviert (49, 57).

Eine missregulierte Aktivität von TTK führt zu chromosomaler Instabilität sowie Aneuploidie und trägt damit zur genetischen Heterogenität von Tumoren bei (49, 54, 58-60).

Ein siRNA-vermittelter Knock-down bei Glioma-Stem-Like-Cells (GSCs) verringerte die Zellproliferation und die Tumorentstehung deutlich (61, 62). In GBM-Zelllinien waren reduzierte Protein-Level mit einer signifikanten Abschwächung ihrer Lebensfähigkeit assoziiert und eine pharmakologische Inhibition induzierte weiterhin die mitotische Katastrophe (61). Zusätzlich erhöhte eine Kombination aus TTK-Inhibition mit Bestrahlung die Radiosensitivität von GBM-Zellen, wobei dieser Effekt für normale Astrozyten nur gering war und keine mitotische Katastrophe auslöste (61). Durch die Analyse von nativem Tumormaterial konnte die klinische Bedeutung von TTK bestätigt werden. TTK lag im GBM erhöht vor und dies korrelierte mit einer ungünstigeren Prognose (62).

Aufgrund dieser Entdeckungen wird die TTK-Inhibition als vielversprechendes Ziel für die Tumorthherapie gesehen und einige niedrigmolekulare Inhibitoren werden bereits für klinische Studien verwendet (63). Die TTK-Inhibitoren erhöhen die Empfindlichkeit von Tumorzelllinien in Kombination mit Chemotherapeutika wie Paclitaxel (63). Ein solcher Effekt konnte auch in Mausmodellen bei GBM nachgewiesen werden, bei welchen die Empfindlichkeit gegenüber antimitotischen Arzneimitteln wie Vincristin zunahm (49), eine Beobachtung, die sich auch für die Kombination mit Tumor-Treating-Fields (TTFields) bestätigte (64, 65). An diesen Beispielen zeigt sich der

Stellenwert, den TTK in derzeitigen und zukünftigen Behandlungskonzepten von GBM hat. Um herauszufinden, ob in Zukunft auch Patienten mit LGA von dieser Behandlung profitieren könnten, muss zunächst das grundlegende Expressionsverhalten für diese Tumoren beschrieben werden. Dies wurde in nachfolgenden Analysen untersucht.

1.3 Fragestellung

In einem Panel von 26 LGA und ihrer 5 Rezidiven wurde untersucht, ob ATF5, KiSS1, RPS27, BRMS1 und TTK exprimiert wurden. Hierzu wurde die mRNA-Expression mit Hilfe der Echtzeit-quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert und die Expressionslevel und klinischen Patientendaten anschließend mit Hilfe von Regressions-, Korrelations- Cluster- und Verlaufsanalysen, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser, Erlenmeyerkolben	Hartenstein
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Brutschrank 240i CO ₂ -Inkubator	Heracell
Dampfkochtopf	BEKA
Färbeküvetten	Hartenstein
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Leica DMI300B	Leica Microsystems
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Fryka-Kältetechnik
Glas-Homogenisator	Hartenstein
Kolbenhubpipetten div. Größen	Eppendorf, abimed
Kühlschrank	Liebherr
Leica Kryostat	Leica
Mikrotom Leica SM 2000R	Leica
Multipette	Eppendorf
Qubit Fluorometric (Fluorometer)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific
Step-One-Cycler	Thermo Fisher Scientific
Sterilwerkbank Hera safe	Heraeus Instruments
T3000 Thermocycler	Biometra
Thermo Mixer C	Eppendorf
Tischzentrifuge Micro Star 17 R	VWR
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wärmeplatte	MEDAX Nagel
Wasserbad Leica HI1210	Leica

Zentrifuge Mega Star 3.0R	VWR
---------------------------	-----

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Firma
Biosphere Filter Spitzen div. Größen	Sarstedt
Chirurgische Einmalskalpelle	Braun
Deckgläser	Marienfeld
Eppendorf Pipettenspitzen div. Größen, gestopft und ungestopft	Sarstedt
Eppendorf Reagenzgefäße (1,5ml, 2ml), herkömmliche und RNase-freie	Eppendorf
Insulinspritze Omnican 40	Braun
MicroAmp 96-Well Platten	Applied Biosystems
MicroAmp Optical adhesive Film	Applied Biosystems
Multiply Stripes (8er)	Sarstedt
Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck
Petrischalen	Corning
Qubit Assay Reaktionsgefäße	Invitrogen by Life Technologies
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Greiner bio-one

2.1.3 Antikörper und Sonden

Bezeichnung	Firma
Anti-ATF5 (101-0380, host: mouse)	Zytomed Systems
Anti-ATF5 (HPA030187, host: rabbit)	Sigma Life Science
Anti-ATRX (HPA001906, host: rabbit)	Sigma-Aldrich
Anti-BRMS1 antibody (ab65244, host: mouse)	abcam
Anti-IDH1-R132-H (DIA-H09, host: mouse)	Dianova
Anti-MPS1 (RPS27) (SAB5300026, host: mouse)	Sigma Aldrich
ATF5 FAM 750µl 20x	Thermo Fisher
BRMS1 FAM 750µl 20x	Thermo Fisher

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) VIC 967µl 60x	Thermo Fisher
Human TTK antibody (AF6028, host: sheep)	R&D Systems
KiSS1 FAM 750µl 20x	Thermo Fisher
RPS27 FAM 750µl 20x	Thermo Fisher
TTK FAM 750µl 20x	Thermo Fisher

2.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Aceton 100%	Roth
Antikörperverdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme
Aqua destilliert	HPLC Anlage Universitätsklinikum Würzburg
Chloroform	Roth
Citronensäuremonohydrat	AppliChem
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	Roth
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth
Histokitt (Eindeckmittel)	Roth
Isopropanol	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-Citrat	Roth
Pap-Pen	Zytomed
Peroxidase-Block	Sigma Aldrich
Protein-Block (Ziegen Serum 10%)	Invitrogen by Life Technologies
TaqMan Fast Universal PCR Master-Mix	Thermo Fisher
TBS – Puffer (Tris-buffered saline) + 0,1% Tween (10x)	Zytomed
Tris-EDTA-(TE)-Puffer pH 8,0	Invitrogen
Trizol-Reagenz	Ambion by Life Technologies
Ultrareines Wasser (steril)	Biochrom

Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich
Xylol	Sigma Aldrich

2.1.5 Kits

Bezeichnung	Firma
Envision-System-HRP (DAB) with Rabbit, with Mouse	Dako
High-Capacity-RNA-to-cDNA-Kit	Life Technologies
Qubit RNA-BR-Assay-Kit	Life Technologies
TaqMan PreAmp-Master-Mix-Kit	Life Technologies

2.1.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Leica Application Suite v4	Leica Microsystems
Wolfram Mathematica v2	Wolfram Research
XLSTAT für Excel v2018/7	Addinsoft
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific
ExpressionSuite Software v1.0.4	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Herstellung der Lösungen

2.1.7.1 Citratpuffer

Für die Herstellung des Citratpuffers (10mM, pH 6,0) wurde in 1l destilliertes Wasser 2,1g Citronensäure-Monohydrat gelöst und der pH-Wert mit Hilfe von NaOH auf 6 titriert.

2.1.7.2 Ethanol-Verdünnungsreihe

Für Ethanol-Verdünnungsstufen wurde Ethanol mit destilliertem Wasser verdünnt (960ml Ethanol mit 49,7ml destilliertem Wasser für 96%; 750ml Ethanol mit 280,9ml destilliertem Wasser für 75%).

2.1.7.3 Wasserstoffperoxidblock

Für den Wasserstoffperoxidblock wurde 250ml destilliertes Wasser mit 6ml Wasserstoffperoxid (30%) versetzt.

2.1.7.4 Puffer für qPCR-Analysen

Verdünnungspuffer und Master-Mix der Kits für die qPCR-Analysen wurden gemäß der Herstellerbeschreibung hergestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Probenmaterial

Es wurde Operationsmaterial aus der Kryosammlung der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik am Uniklinikum Würzburg verwendet. Weiterhin wurden Kryo- oder Paraffin-konservierte Gewebeschnitte der Sammlung in der Neuropathologie des Pathologischen Institutes von Würzburg entnommen. (Aktenzeichen des Ethikvotums: AZ-103/14).

Insgesamt wurden 26 Patientenproben mit der Diagnose eines glialen Tumors WHO° II untersucht. Von 5 Patienten konnte zusätzlich das Tumormaterial der Rezidive (2 LGA, 3 GBM) für die Analysen verwendet werden. Die Tumorklassifikation fand vor der Herausgabe der aktuellen 4. Edition der WHO-Klassifikation von 2016 statt. Um dieser Ausgabe gerecht zu werden, wurden die Tumorproben im Nachhinein immunhistochemisch hinsichtlich einer möglichen IDH1-R132H-Mutation sowie des ATRX-Expressionsverhaltens untersucht. Den Nachweis hierfür lieferten entsprechend positive bzw. negative Färbeergebnisse des Tumorschnittmaterials.

2.2.2 Datenerhebung für das Patientenpanel

Für die Analysen wurden zu den Patientenproben klinische Daten erhoben.

Informationen über WHO-Grad der pathologischen Begutachtung, Geschlecht, Geburts-, Todes- sowie Erstdiagnosedatum wurden den Patientenakten entnommen. Für die Untersuchungen wurden das Alter bei Erstdiagnose (AED), das progressionsfreie Überleben (progression-free-survival bzw. PFS) und das Gesamtüberleben (overall-survival bzw. OS) als sekundäre Daten verwendet. Diese sind wie folgt definiert:

Das AED ist das Patientenalter in Jahren, in dem erstmals ein Tumor durch CT- oder MRT-Bildgebung nachgewiesen werden konnte.

Das PFS in Monaten wurde als Zeitraum zwischen dem erstmaligen Nachweis des Tumors und dem Zeitpunkt des erneut durch Bildgebung nachgewiesenen Progresses bestimmt.

Das OS in Monaten umfasst den Zeitraum zwischen dem Alter bei erstmaliger Diagnose und dem Tod des Patienten.

An dieser Stelle muss auf die teilweise fehlenden Werte für OS oder PFS bei einigen Patienten hingewiesen werden, da trotz ausgiebiger, teilweise internationaler Recherche keine Informationen zu Todeszeitpunkten ermittelt werden konnten.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

2.2.3.1 Fixierung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde Tumorgewebe verwendet, welches überwiegend in Paraffin eingebettet oder vereinzelt kryoasserviert vorlag. Für die Vorbereitung der Gefrierschnitte wurden mit dem Kryostat ein bis zwei Gewebeschnitte mit einer maximalen Dicke von 10µm auf Superfrost-Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden 30min bei Raumtemperatur getrocknet, 10min in Aceton (100%) bei 20°C fixiert und im Anschluss bei 37°C auf der Heizplatte getrocknet. Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden nach 10min Vorkühlung bei -20°C am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 3µm auf Superfrost-Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entfernung des Paraffins wurde mit Hilfe einer Xylol- und Alkoholreihe durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in Küvetten in folgender Reihenfolge und Zeitdauer in den Bädern gelagert und anschließend in das nachfolgende Becken übergeben: Xylol 10min, Xylol 10min, Ethanol (100%) 30s, Ethanol (100%) 5min, Ethanol (96%) 30s, Ethanol (96%) 5min, Ethanol (75%) 30s, Ethanol (75%) 5min. Bis zum nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Um die Immunreaktion während der Färbung zu verbessern, wurden sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte in 2L siedendem Citratpuffer (20mM, pH=6) im geschlossenen Dampfkochtopf 10min bei 120°C erhitzt. Die anschließende Abkühlung auf Raumtemperatur wurde durch Zugabe von fließendem destilliertem Wasser beschleunigt. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2min im destillierten Wasser gewaschen und 15min im vorher hergestellten Wasserstoffperoxidblock (30%) aufbewahrt. Anschließend ruhten die Objektträger 10min in destilliertem Wasser und wurden in einfachem TBS-Puffer (pH=7,6) gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer.

2.2.3.2 Durchführung der Antikörperfärbung

Nach Applikation von 150µl Protein-Block (Ziegenerum 10%) auf die Gewebeschnitte wurden über einen Zeitraum von 20min die unspezifischen Bindestellen der Tumorschnitte geblockt. Nach Entfernung des Serums mit Zellstoff wurden 100µl Verdünnungspuffer mit Primärantikörper aufgebracht und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Verdünnungen waren pro Antikörper unterschiedlich und sind in Tabelle 1 gelistet.

Nach Abspülen des Primärantikörpers mit TBS-Puffer wurden die Schnitte zweimal in TBS-Puffer für 5min gewaschen. Nach Trocknung der Objektträger mit Zellstoff wurde für 30min das vom Hersteller bereitgestellte Meerrettich-Peroxidase-Polymer aufgetragen, welches am Primärantikörper gebunden die Färbung der DAB-Lösung bewirkte. Hierbei wurden 100µl DAB-Lösung für 5min auf die Schnitte aufgebracht, was bereits makroskopisch die typische Braunfärbung sichtbar werden ließ. Die Reaktion wurde durch Abspülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend 2min in Hämalaun gegengefärbt und 10min unter Leitungswasser gebläut. Nach 2min Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe entwässert. Hierfür wurden die Schnitte für je 2min in Färbeküvetten gegeben, wobei jede Konzentration zweifach hintereinander in folgender Reihenfolge durchlaufen wurde: Ethanol (70%), Ethanol (96%), Ethanol (100%) und Xylol. Für die Mikroskopie wurden Deckgläser mit xylolhaltigem Eindeckmittel aufgebracht und unter dem Abzug getrocknet. Zur Sicherstellung der Färbequalität wurde pro Färbegang mindestens eine interne Negativkontrolle mitgeführt, bei der der Primärantikörper nicht aufgebracht wurde. Wenn möglich wurden zusätzliche Gewebearten in den Versuchen mitgefärbt, für die eine positive oder negative Anfärbung zu erwarten war (Tabelle 1).

Tabelle 1: Antikörper und Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Positiv-Kontrolle	Negativ-Kontrolle
Anti-IDH1-R132H	1:20	mouse	diffuses Astrozytom	primäres GBM
Anti-ATF5	1:200	mouse/ rabbit	Nierengewebe	intern
Anti-ATRX	1:1.500	rabbit	Endothel	intern
Human TTK antibody	1:200	mouse	Colon	Muskel
Anti-MPS1 (RPS27)	1:200	mouse	Normalhirn (Neurone, reaktive Astrozyten)	Kleinhirn (Körnerzellen)
Anti-BRMS1 antibody	1:1.500	rabbit	Normalhirn	intern

Abkürzung: (GBM): Glioblastoma multiforme.

2.2.3.3 Bildverarbeitung

Für die Vergleichbarkeit der mikroskopischen Aufnahmen wurden diese unter gleichen Bedingungen mit offener Lochblende, gleichen Lichtverhältnissen und unter Durchlicht erstellt. Lediglich die Belichtungszeiten wurden in der Leica-Application-Suite an die Vergrößerungen angepasst, um eine ausreichende Helligkeit zu garantieren. Dabei wurde die 5x-Vergrößerung mit 22,5ms, die 10x-Vergrößerung mit 158,3ms und die 40x-Vergrößerung mit einer Zeit von 18,5ms belichtet.

2.2.4 Aufarbeitung der Hirntumorproben

2.2.4.1 RNA Isolation und Aufreinigung mit Trizol-Reagenz

Es wurden mindestens 50mg Gewebe für die Trizol-Aufarbeitung in Glashomogenisatoren überführt. In 1ml Trizol-Reagenz wurden die Proben zerkleinert und in 1,5ml RNase-freie Reagenzgefäße überführt. Anschließendes Aufziehen in einer Insulinspritze unterstützte die Homogenisation. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200µl Chloroform hinzugegeben. Es wurde manuell 15s geschüttelt und nochmals 2min inkubiert. Nach 15min Zentrifugation (12000xg und 4°C) zeigte sich die Probe dreiphasig mit dem klaren, RNA-haltigen Überstand, der Interphase und der Protein- und DNA-haltigen unteren Phenol-Chloroform Phase. Die wässrige Phase wurde in ein weiteres RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol (100%) versetzt, 10min inkubiert und anschließend 10min zentrifugiert (12000xg und 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1ml Ethanol (75%) gewaschen, indem es mit dem Vortexer resuspendiert und 5min zentrifugiert (7500xg und 4°C) wurde. Nach Verwerfung des Überstandes und 10min

Lufttrocknung wurde die RNA in 20µl ultrareinem Wasser gelöst und 15min im Heizblock (55°C) inkubiert.

2.2.4.2 RNA-Messung und Umschreiben in cDNA

Mit Hilfe des QUBIT-Systems wurden die RNA-Konzentrationen am Fluorometer gemessen. Für jede zu bestimmende Probe wurde eine Working Solution von 200µl hergestellt, in der das QUBIT-Reagenz im Verhältnis 1:200 mit dem zugehörigen QUBIT-Puffer gemischt wurde. Für die RNA-Bestimmung wurde in 199µl Working Solution 1µl RNA-Messprobe in glasklare 0,5µl Reagenzgefäße überführt. Jede Messung am QUBIT-Fluorometer wurde mit zwei Standardproben durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10µl der im Kit enthaltenen Standardproben 1 und 2 in 190µl Working Solution gegeben. Nach anschließender Vortexmischung wurden die Konzentrationen vom QUBIT-Fluorometer in µg/µl ausgegeben. Um für die anschließende quantitative PCR gleiche cDNA-Werte pro Messprobe einsetzen zu können, wurden die RNA-Konzentrationen zum Umschreiben in cDNA in Bezug auf den niedrigsten Messwert angeglichen und mit ultrareinem Wasser verdünnt, um in den jeweiligen Reaktionsgefäßen die Endkonzentrationen von 1,03ng RNA/µl für Kryogewebe bzw. von 0,103ng RNA/µl für Paraffingewebe zu erhalten. Generell waren die aus Paraffinmaterial isolierten RNA-Konzentrationen geringer als die des Kryogewebes. Mit dem High Capacity RNA-to-cDNA-Kit wurden für das Endvolumen von 100µl 50µl RT-Puffer (2x) mit 5µl RT-Enzym-Puffer (20x) und 45µl der angeglichenen RNA-Proben in ein RNase-freies Reagenzgefäß gegeben. Bei 37°C im Brutschrank wurde die RNA innerhalb von einer Stunde durch die RNA-abhängige-DNA-Polymerase umgeschrieben. Anschließend wurde 5min bei 95°C abgestoppt und bei -20°C kurzzeitig bzw. bei -80°C langfristig aufbewahrt.

2.2.5 Quantitative PCR-Analyse

2.2.5.1 Versuchsaufbau

In der Sterilwerkbank wurden in 96-Well-Reaktionsgefäße 16µl Master-Mix pro Well pipettiert. Der Master-Mix wurde für die Einzelreaktionen vorher vorbereitet, so dass in jedes Reaktionsgefäß 10µl Master-Mix, 1µl GAPDH FAM-Sonde, 1µl VIC-markierte Zielsonde mit 4µl ultrareinem Wasser gegeben wurden. Pro Reaktionsgefäß wurden anschließend 4µl cDNA auf ein Volumen von 20µl ergänzt. Für jede Tumorprobe

wurden drei Ansätze wiederholt. Auf jeder Reaktionsplatte wurde zur Kontrolle eine Wasserprobe mitlaufen gelassen, indem 4µl ultrareines Wasser anstelle der cDNA in das Reaktionsgefäß pipetiert wurde. Anschließend wurden die PCR-Versuche im StepOne-Gerät mit 50 Zyklen (Holding Stage: 2min bei 50°C und 10min bei 95°C; Cycling Stage: 15s bei 95°C und 1min bei 60°C) durchgeführt. Hierbei wurden durch die unterschiedlichen Markierungen der Zielgene (GAPDH als FAM markiert, KiSS1, RPS27, ATF5, TTK bzw. BMRS1 als VIC markiert) Lichtsignale vom Gerät detektiert und deren Kurvenverläufe aufgezeichnet.

Grundlegender Endwert dieses PCR-Verfahrens ist die Bestimmung des Threshold Cycle bzw. C_T -Wertes. Dieser Wert wird durch die lineare logarithmische Darstellung der während der PCR in Abhängigkeit des durchlaufenen Zyklus detektierten Signale bestimmt (66). Somit ist dieser Wert als der PCR-Zyklus definiert, bei dem das fluoreszierende Signal des Reporters, welcher die Amplifikationsmenge repräsentiert, einen fixen Schwellenwert überschreitet (66, 67). Dieser Schwellenwert wird durch die zur Verfügung gestellte StepOne-Software automatisch festgelegt. Der C_T -Wert steht im reziproken Zusammenhang mit der Menge des Amplicons in der Reaktion, d.h. je kleiner der C_T -Wert ist, desto größer ist die Menge des Amplicons (67). In dieser Arbeit wurde die quantitative PCR-Methode relativ ausgewertet, um Genexpressionsunterschiede zu beschreiben (66). Zur Analyse der qPCR-Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode verwendet, für die die Effizienzen der Amplifikation sowohl für die zu untersuchende RNA als auch für die Kontrolle ungefähr gleich sein sollten (66). Laborintern wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass sich die Sonden nicht gegenseitig beeinflussten (J. Feldheim, persönliche Mitteilung). Vorteile der vergleichenden C_T -Methode sind der einfache Gebrauch und die Möglichkeit, die Genexpression in den zu untersuchenden Geweben in Relation zu setzen, im Fachjargon und in der Literatur auch als „Fold Exchange“ bezeichnet (67). Die nachfolgende Formel (i) wurde verwendet, um final die Unterschiede in der Genexpression in zwei verschiedenen Proben anzugeben, die ausführliche Form (ii) sowie die Teilgleichung (iii) waren die Grundlagen für anschließende, detaillierte Berechnungen und Regressionsanalysen (67). Für die Auswertemethode in (ii) wurde B als Kontroll- und A als Untersuchungsprobe definiert (67):

$$\text{fold exchange} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (i)$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [\text{Sample A}(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) - \text{Sample B}(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control})] \text{ (ii)}$$

$$\Delta C_{T_{\text{Sample}}} = (C_{T_{\text{Sample}}} \text{ gene of interest}_T - C_{T_{\text{Sample}}} \text{ internal control}) \text{ (iii)}$$

$$\Delta C_{T_{\text{Sample}}} = (C_{T_{\text{Target}}} - C_{T_{\text{GAPDH}}}) \text{ (iv)}$$

Jeder Patientenprobe konnte ein bestimmter ΔC_T -Wert als Differenzwert des Zielgens, wie z.B. ATF5, und der internen Kontrolle, dem Haushaltsgen GAPDH (iv) zugeordnet werden.

Die GAPDH) wird als sog. „Housekeeping Gen“ gerne als internes Kontroll-Gen genutzt (67, 68). Die kennzeichnende Eigenschaft von Housekeeping Genen im Allgemeinen ist die, dass die Genexpression in den Zellen oder Geweben konstant bleibt, so dass die Daten der qPCR auf Grundlage dieser Expressionslevel normiert werden können (69). Es gibt zwar Hinweise, dass diese Normierung auf Basis eines einzelnen Genes vor allem innerhalb von verschiedenen Gewebearten aufgrund des unterschiedlichen glykolytischen Bedarfs unklug sein könnte, wozu auch der Vergleich von normalem zu krankhaftem Gewebe gezählt wird (69). Es wurde jedoch auch nachgewiesen, dass die GAPDH-mRNA-Expressionslevel gewebesintern generell wenig variieren (69). GAPDH wurde aus diesem Grund für die gesamten qPCR-Versuche als endogene Kontrolle verwendet.

Für die Datenpräsentation wird vorgeschlagen, die C_T -Werte in die lineare 2^{-C_T} -Form umzuwandeln, da diese die individuelle Variation bei wiederholten Reaktionen genauer abbilden (66). Für die weitere Datenverarbeitung wurde hier die $2^{-\Delta C_T}$ -Form verwendet, welche als Differenzwert zur internen Kontrolle (s. (iii)) in verschiedenen Versuchsansätzen vergleichbare Werte generierte (67).

Die qPCR-Versuche ergaben somit die o.g. C_T -Werte als Basis für die weiteren Analysen. Durch Export in ExpressionSuite konnten die Einzelversuche gesammelt ausgewertet und die C_T -Werte für das Zielgen und GAPDH bestimmt werden. Bei

Fehlermeldungen durch die StepOne-Software wurden zur Qualitätssicherung die Versuche wiederholt.

2.2.6 Datenauswahl und Statistik

Auswahlkriterien für die weiteren Datenanalysen waren die Bestimmbarkeit und das Vorliegen von mindestens 2 aus 3 nahe beieinanderliegenden C_T -Werten innerhalb einer Probe und eines Versuches. Die interne cDNA-freie Wasserprobe durfte keine Amplifikation aufzeigen. Sofern die Kriterien zutrafen, wurden die Daten verwendet. In die Analyse der untersuchten mRNAs konnten teilweise nur deutlich weniger Patienten des ursprünglichen Patientenpanels aufgenommen werden, da Werte nicht bei allen Proben bestimmbar waren.

Die ΔC_{Tm} -Werte wurden gemittelt (Formel v) und mit den Daten für OS, PFS und AED korreliert.

$$\Delta C_{T_{meanSample}} = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{T_{Target}} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{T_{GAPDH}} \right) (v)$$

Das Patientenpanel wurde auf drei verschiedenen Wegen analysiert. Als Erstes wurden alle ΔC_{Tm} -Werte gemeinsam unabhängig von der genaueren molekulargenetischen Unterteilung untersucht. Somit wurden auch die Daten der Verläufe, bei denen nicht unmittelbar ein IDH1-R132H-Mutationsnachweis vorlag, verwendet, um die maximale Anzahl der ΔC_{Tm} -Werte einschließen zu können. Als zweiter Schritt wurden nur die Tumoren analysiert, die eine positive Färbung für IDH1-R132H aufwiesen, um der aktuellen WHO-Klassifikation gerecht zu werden. Somit wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse in der kleineren Untersuchungsgruppe bestätigen ließen. Im dritten Schritt wurden die einzelnen Tumorverläufe der Patienten, von denen Tumorproben von Vorläufer- und Rezidivtumoren vorlagen, gesondert betrachtet. Standardabweichungen bzw. Varianzwerte finden sich am Ende der Korrelations- und Kointegrationsanalysen für die Fehlerbeschreibung. Im Patientenpanel fanden sich viele Datenpunkte für das PFS und AED jedoch weniger für OS, weshalb auf die begrenzte Aussagekraft für letztere hinzuweisen ist.

2.2.6.1 Testung auf Normalverteilung

Die Werte für ΔC_{Tm} bzw. der relativen Expression als $2^{-\Delta C_T}$ sowie für AED, OS und PFS wurden mit Hilfe von XLSTAT in Excel anhand des Shapiro-Wilk-, Anderson-Darling-, Lilliefors- und Jarque-Bera-Tests auf Normalverteilung getestet. Diese Eigenschaft ist wichtig für die Durchführung statistischer Untersuchungen - wie dem t-Test, Varianzanalysen oder Korrelationen (70). Den oben genannten Normalverteilungs-Tests ist gemeinsam, dass sie die zu untersuchenden Stichprobenwerte mit einer normalverteilten Wertemenge des gleichen Mittelwerts und gleicher Standardabweichung vergleichen (71). Die Nullhypothese, dass eine Normalverteilung vorliegt, wird bei einem signifikanten Ergebnis verworfen und stattdessen angenommen, dass es sich hier um nicht normal-verteilte Werte handelt (71).

2.2.6.2 Bestimmung der Korrelationskoeffizienten

2.2.6.2.1 Pearson-Korrelation

Ob lineare Zusammenhänge vorliegen könnten, wurde mit Hilfe der Pearson-Korrelation bestimmt, wobei als Ergebnis Werte von -1 bis +1 erhalten werden können mit ± 1 als perfekt positive bzw. negative Korrelation und mit 0 als Wert für keinen Zusammenhang zwischen den Variablen (72). Werden die Korrelationsergebnisse abgestuft betrachtet, spricht man bei Werten, die sehr nahe an ± 1 liegen, von einer stark direkten bzw. invers linearen Korrelation, bei $> 0,7$ von einer starken, bei Werten zwischen $>0,5$ und $<0,7$ von einer guten, zwischen $>0,3$ und $<0,5$ von einer moderaten und bei $<0,3$ von einer geringen Korrelation (73).

Bei einem nichtlinearen Zusammenhang bietet die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson jedoch kein informatives Maß, weshalb die folgenden Koeffizienten berechnet wurden, um einen solchen Zusammenhang nicht zu übersehen (72, 73).

2.2.6.2.2 Spearman's Rho

Um die Aussagekraft der limitierenden Pearson-Korrelation in Hinblick auf nichtlineare Zusammenhänge zu erweitern, wurde der Spearman's Rho, bzw. der Spearman Rangkorrelationskoeffizient verwendet, der die Zahlenränge berücksichtigt (72). Genauer gesagt handelt es sich hierbei um die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson, für die allerdings Rangwerte anstelle der tatsächlichen Werte verwendet werden (73). Aufgrund dieser Abwandlung der Annahme nach Pearson besitzt dieser

Rangkorrelationskoeffizient auch eine Aussagekraft für nichtlineare Beziehungen und die ideal positive bzw. negative Korrelation entspricht einer idealen Konkordanz bzw. Diskordanz (72).

2.2.6.2.3 Kendall's Tau

Wie die Ranganalysen nach Spearman nutzt Kendall's Tau ebenfalls das Konzept der Kon- und Diskordanz, um daraus das Ausmaß für bivariate Ergebnisse abzuleiten, wobei sich in diesem Fall die kon- und diskordanten Paare direkt in der Definition wiederfinden (72). Vergleichbar mit Spearman's Rho stimmen die Koeffizienzwerte von ± 1 mit idealer Dis- bzw. Konkordanz überein, wohingegen ein Wert nahe 0 einen schwächeren oder keinen Zusammenhang aufweist (72). Es wird vorgeschlagen, Kendall's Tau vor allem dann zu verwenden, wenn eine kleine Datenmenge und die Möglichkeit vorliegt, dass viele Werte den selben Rang aufweisen (73). Deshalb wird er als genauere Maßstab für die zugrunde liegende Population in Betracht gezogen (73).

2.2.6.3 Zeitreihen- bzw. Regressionsanalysen

Durch Hinzuziehen einer Methodik, die in anderen Forschungsgebieten, wie der Marktforschung verwendet wird (74), wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen den Δ_{CTM} -Werten und PFS, OS bzw. AED zu erkennen. Ein einfacher Weg für eine solche Beschreibung sind neben der Bestimmung der Korrelationskoeffizienten weitere Kointegrationsanalysen auf Basis des Einheitswurzeltests - wie in diesem Fall der Augmented-Dickey-Fuller-Test (74). Auf dessen Basis wurde zunächst geprüft, ob die einzelnen Datenpunkte der Δ_{CTM} -Werte, des PFS, OS bzw. AED stationär oder nicht stationär vorliegen (75).

Für die Beschreibung, ob eine Stationarität vorliegt oder nicht, werden Zeitreihenmodelle verwendet, durch welche die Variablen, die erklärt werden sollen, als stochastische Prozesse modelliert werden (76). Die einzelnen Δ_{CTM} -Werte bzw. die Werte für OS, PFS und AED wurden für diese Modellierung verwendet. Dadurch dass die Zeitreihen stationäre stochastische Prozesse abbilden sollen, muss das Kriterium der Stationarität erfüllt sein (76). Wenn dies nicht der Fall ist und die Prozesse kointegriert sind, werden z.B. Kointegrationsmodelle verwendet oder die Werte in die stationäre Form überführt (76).

Eine Zeitreihenanalyse wird als stationär bezeichnet, wenn ihre statistischen Eigenschaften ähnlich zu jenen sind, die zeitverändert vorliegen (77). Stationäre

Prozesse können als schwach oder stark eingeteilt werden, wobei schwach stationäre Prozesse dadurch gekennzeichnet sind, dass Erwartungswert und Varianz endlich sowie zeitunabhängig sind und die Autokovarianzen nur von einer zeitlichen Verschiebung abhängen (78). Als stark stationär wird die Tatsache beschrieben, dass die gemeinsame Verteilungsfunktion einer Untergruppe der Zeitreihenelemente nicht zeitabhängig ist (78). Mit Hilfe des Dickey-Fuller-Tests wurde in meiner Arbeit geprüft, ob das Kriterium der Stationarität vorliegt oder ob die Datenpunkte Trends unterliegen könnten (79-83).

Es wurde analysiert, ob eine Reihung der Tumorproben und die damit zusammenhängenden Werte bestimmte Trends oder Zusammenhänge haben könnten. Um die Tumorproben, obwohl sie von verschiedenen Patienten stammten und damit nur eingeschränkt vergleichbar waren, in eine zeitliche Ordnung zu bringen, wurden die Patienten aufsteigend nach dem AED aufgereiht, wodurch auch OS, PFS und die ΔC_{TM} -Werte in eine Reihenfolge gebracht wurden.

Zunächst wurde an Hand des augmented Dickey-Fuller-Tests überprüft, ob Stationarität in den Zeitreihen vorlag (74). Mit Hilfe einer Erweiterung des ursprünglichen Dickey-Fuller-Tests wurde überprüft, ob ein stochastischer Prozess H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und er ist damit nicht stationär, gegenüber H_1 , es gibt keine stochastische möglicherweise jedoch eine deterministische Instationarität, vorliegt (75, 77, 84). Mit Hilfe von Wolfram-Mathematica wurde dieser Test für die Zeitreihen durchgeführt (74). Durch die Ablehnung der oben genannten Nullhypothese waren die Zeitreihen vermutlich nicht stationär, die ΔC_{TM} -Werte, OS und PFS könnten Trends unterliegen und ähnliche Entwicklungen oder Tendenzen haben. Es wurden jeweils zwei Reihen, eine erste für die ΔC_{TM} -Werte, und eine zweite für OS bzw. PFS, gebildet.

Mit Hilfe der gewöhnlichen Kleinstquadratmethode, auch Ordinary Least Squares oder OLS bezeichnet, wurde eine Regressionskurve erstellt, deren Parameter dadurch festgelegt wurden, dass die Summe der quadrierten Abweichungen von den Datenpunkten, hier in erster und zweiter Reihung, kleinstmöglich waren und eine Gerade mit der Steigung β bildeten (74, 76, 85):

$$Y_t = \alpha + \beta X_t + e_t (vi)$$

Durch Multiplikation letzterer mit einer der beiden Zeitreihen, entweder jener für die ΔC_{TM} -Werte oder das OS bzw. PFS, wurde eine dritte Reihe generiert. Durch Subtraktion dieser dritten von der zweiten Reihe bzw. der ersten, nicht mit der Steigung multiplizierten Reihe, ergab sich eine vierte Zeitreihe. Diese entwickelte sich aus den ΔC_{TM} -Werten und dem PFS bzw. aus den ΔC_{TM} -Werten und dem OS und konnte mit Hilfe des Dickey-Fuller-Tests auf Stationarität überprüft werden. War dies der Fall, wurde die Nullhypothese verworfen, und es lag mit einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit eine Kointegration vor. Es bestand also unter diesen Prozessen eine Beziehung (86).

Für eine anschließende Fehlerrechnung wurde die Varianz bzw. Standardabweichung für die OLS angegeben, ein t-Test bzw. Standardfehler beschrieb den x- bzw. y-Wert der Regressionsgerade.

2.2.6.4 Expressionsanalysen

Um nicht nur die Frage zu beantworten, wie die Einzelfaktoren in Relation zum Haushaltsgen exprimiert vorlagen, sondern um auch die einzelnen Patientenproben in Relation zueinander setzen zu können, wurden auch $\Delta\Delta C_T$ -Werte bzw. deren $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Form berechnet. Wie in Formel (ii) beschrieben wurden hierfür mindestens zwei unterschiedliche Proben in Relation zueinander gesetzt.

2.2.6.4.1 Relative RNA-Expression der Einzeltumoren

Zur Bestimmung der relativen $\Delta\Delta C_T$ -RNA-Expressionslevel einzelner Tumoren wurden diese in Relation zum gemittelten ΔC_{TM} -Expressionswert gesetzt, welcher durch die ΔC_T -Expressionswerte der Patientenproben gebildet wurde, die histologisch als niedriggradig mit einer IDH1-R132H-Mutation beschrieben worden waren.

2.2.6.5 Relative RNA-Expression der Vorläufer- und Rezidivtumoren

Die Tumorverlaufsproben einzelner Patienten boten die Möglichkeit, die Expression der Proteine am Beispiel von Vorläufern zu Rezidiven zu untersuchen. In Anlehnung an die Auswertung nach *Livak et al. (2001)* wurde die relative Expression in ΔC_T - bzw. $\Delta\Delta C_T$ -Form bestimmt (67). Es wurde in beiden Varianten entweder ein Mittelwert oder Einzelwert der zugehörigen Vorläuferläsionen verwendet (67). Durch die Wertepaare konnte eine Aussage über die Expression des Zielgens in Relation zur internen Kontrolle in der behandelten Probe, hier ΔC_T von Probe A, im Vergleich zur

unbehandelten Kontrolle, hier ΔC_T von Probe B, gemacht werden (67). Dieses Konzept wurde auf die Verlaufstumorproben dieser Arbeit übertragen.

Das Expressionsverhalten von Tumoren und deren Verläufen wurde in Form von Tabellen bzw. Balkendiagrammen dargestellt.

2.2.6.6 Clusteranalysen

Diese Methode bietet die Möglichkeit, Cluster zu bilden, welche homogen und gut voneinander abgrenzbar sind (87). Es sollte geklärt werden, ob sich ähnliche Muster in der Genexpression und in den weiteren erhobenen Daten fanden. Clusteranalysen können explorative und somit hypothesenbildende oder auch bestätigende Ziele verfolgen, wobei deren Gemeinsamkeit die Bildung von Gruppen z.B. für Modelle oder für Analyseergebnisse ist (88). Letztere werden in dieser Arbeit geclustert. Die wesentlichen Schritte der Clusteranalysen sind neben der Bestimmung der Genexpressionsdaten die Berechnung einer Ähnlichkeitsmatrix, das tatsächliche Clustering und die anschließende Darstellung der Lösung (87). Die Clusteranalysen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von XLSTAT in Excel durchgeführt. Als Distanzmaß wurde der Euklidische Abstand für metrische Daten sowie als Agglomerationsmethode das Ward-Verfahren gewählt, weil für die Beschreibung der Heterogenität der Schwerpunkt auf die Binnenvarianz gelegt wird, welche die Gruppen so zusammenfasst, dass die Varianzwerte kleinstmöglich erhöht werden (89). Der Euklidische Abstand ist gebräuchlich, um die Nähe im zwei- oder dreidimensionalen Raum zu beurteilen, und ein gutes Abstandsmaß, um die Unterschiedlichkeit zwischen zwei Verhaltensmustern widerzuspiegeln (88).

Hierarchische Clusteranalysen haben in dieser Arbeit vor allem Bedeutung für die Beschreibung des Expressionsverhaltens der Faktoren jedes Patienten und für die Charakterisierung von Wertepaaren der Vorläufer- Rezidivanalysen. Genauer gesagt wurde der Schwerpunkt einerseits auf das Clustern des Expressionsverhaltens der Einzelfaktoren allein und anschließend auf das Clustern der Faktoren mit klinischen Daten gelegt. Limitierender Faktor war die Menge der vorliegenden Datenpunkte, da als Einschlusskriterium nur Patientendaten geclustert werden konnten, bei denen sowohl Werte für die zu untersuchenden Faktoren als auch für klinische Daten vorlagen. Die Auswahl der Analyse Kriterien in Clusteranalysen ist weitestgehend subjektiv und daher gibt es mit Ausnahme einiger Teilbereiche keinen Goldstandard für den Aufbau dieser

Analysen (88).

Die Ergebnisse wurden durch Dendrogramme veranschaulicht und boten die Option, den ursprünglichen Daten Subgruppen zuzuordnen, welche durch parallele Koordinaten visualisiert und statistisch genauer beschrieben werden konnten.

Durch diese Analyseform lassen sich somit Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede in Datensätzen erkennen und die zu untersuchenden Faktoren konnten fokussierter und unabhängig von ihrer vorherigen Klassifizierung betrachtet werden, um dem tatsächlichen Expressionsverhalten gerecht zu werden.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenpanel

Es findet sich im Folgenden eine Zusammenfassung der Patientendaten (Tabelle 2). Gemäß der WHO-Klassifikation von 2016 wurden die Tumorbezeichnungen aktualisiert (Tabelle 3). Insgesamt war bei 19 von 26 Patienten eine IDH1-R132H-Mutation und bei 18 von 26 Patienten die ATRX-Expression nachweisbar. Für 3 Patienten war eine Bestimmung der ATRX-Expression nicht möglich. Durch Nachweis der IDH1-R132H-Mutation und des ATRX-Verlustes konnten 16 von 31 untersuchten Proben (Vorläufer- und Rezidivtumoren) als diffuse Astrozytome, IDH1-mutiert bestimmt werden. Die übrigen Tumoren wurden teilweise als NOS bezeichnet.

Tabelle 2: Klinische Daten der Patientenkohorte

Zusammenfassung der Patientendaten				
Geschlechterverteilung	männlich: n=20 (77%)	weiblich: n=6 (23%)		gesamt: n=26
Alter bei Erstdiagnose (median)	38 Jahre	Min.: 1 Jahr	Max.: 66 Jahre	gesamt: n=25
PFS (median)	22,5 Monate	Min.: Monate	Max.: Monate	gesamt: n=24
OS (median)	41 Monate	Min.: 14 Monate	Max.: 74 Monate	gesamt: n=9
IDH1-R132H- Mutationsnachweis	positiv n=19 (73%)	negativ n=7 (27%)		gesamt: 26
ATRX-Expression	positiv n=18 (69%)	negativ n=5 (16%)	n.b. n=3 (12%)	gesamt: 26

Abkürzungen: (Max): maximal, (Min): minimal, (n): Anzahl, (n.b.): nicht bestimmt, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben.

Tabelle 3: Patientendaten

Pat.	Geschlecht	IDH1-R132H Mutationsstatus	ATRX-Expression	AED (Jahre)	PFS (Monate)	OS (Monate)	WHO°	Einteilung nach der WHO-Klassifikation (2016)
1	m	mutiert	negativ	48	47	47	II	Diffuses Astrozytom
2	m	mutiert	n.b.	36	21	33	II	NOS***
3	m	mutiert	negativ	45	17	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
4	m	mutiert	negativ	34	40	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
5	m	mutiert	positiv	51	56	n.b.	II	NOS***
6	m	mutiert	negativ	37	15	74	II	Diffuses Astrozytom
6*		mutiert	negativ	---	---	---	IV	Glioblastom
7	w	mutiert	negativ	39	9	41	II	Diffuses Astrozytom
8	m	mutiert	negativ	38	n.b.	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
9	m	mutiert	negativ	30	36	72	II	Diffuses Astrozytom
9*		mutiert	negativ	---	---	---	II	Diffuses Astrozytom
10	w	NOS***	negativ	34	48	n.b.	II	NOS***
11	m	mutiert	negativ	n.b.	n.b.	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
12	m	mutiert	negativ	34	15	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
12*		mutiert	negativ	---	---	---	II	Diffuses Astrozytom
13	m	mutiert	n.b.	46	24	n.b.	II	NOS***
14 **	m	NOS***	positiv	1	5	n.b.	II	**
15	m	mutiert	negativ	33	31	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
16	m	NOS***	positiv	66	41	n.b.	II	NOS***
17	m	NOS***	negativ	53	6	14	II	NOS***
17*		NOS***	negativ	---	---	---	IV	NOS***
18	w	NOS***	negativ	45	197	n.b.	II	NOS***
19	m	mutiert	positiv	36	40	n.b.	II	NOS***
20	w	NOS***	positiv	53	10	n.b.	II	NOS***
21	m	mutiert	negativ	40	8	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
22	m	NOS***	negativ	31	47	65	II	NOS***
23	w	mutiert	n.b.	64	31	n.b.	II	NOS***
24	w	mutiert	negativ	36	14	23	II	Diffuses Astrozytom
25	m	mutiert	negativ	38	20	n.b.	II	Diffuses Astrozytom
26	m	mutiert	negativ	33	12	37	II	Diffuses Astrozytom
26*		mutiert	negativ	---	---	---	IV	Glioblastom

Abkürzungen:
(AED): Alter bei
Erstdiagnose, (ATRX-
negativ): ATRX-
Expressionsverlust,
(ATRX-positiv): erhaltene
ATRX-Expression, (m):
männlich, (n.b.): nicht
bestimmbar, (NOS): nicht
eindeutig bestimmbar,
(OS): Gesamtüberleben,
(Pat.): Patient, (PFS)
progressionsfreies
Überleben, (w): weiblich,
(WHO°): Tumoreinteilung
nach WHO-Klassifikation.

*Patienten mit
Rezidivtumoren

** astrozytärer Tumor im
Kindesalter (pilozytisches
Astrozytom)

*** Bei fehlender IDH1-
R132H-Mutation ist keine
genauere Bestimmung
möglich bzw. histologisch
nicht eindeutig bestimmbar
(NOS).

3.1.1 Varianzanalyse und Normalverteilung der C_T-Werte

Die Endpunkte der qPCR-Analysen waren die C_T-Werte für die zu untersuchende mRNA sowie für GAPDH als endogener Kontrolle. In Tabelle 4 finden sich die verschiedenen Standardabweichungen als Maß für die Eigenschaft, wie stark sich die C_T-Werte im dreifachen Versuchsansatz pro Tumorprobe unterschieden. Es wurden die minimalen, maximalen und gemittelten Standardabweichungen sowohl für die Ziel-mRNA als auch für GAPDH bestimmt. Die ΔC_{Tm}-Werte für ATF5, BRMS1, TTK und KiSS1 unterschieden sich um weniger als einen C_T-Wert. Der maximale Wert fand sich bei TTK (SD=0,57). Die Standardabweichungen bei GAPDH lagen sogar unter diesem Maximalwert. Lediglich bei RPS27 unterschieden sich die C_T-Werte um mehr als einen Zyklus sowohl für das Target (1,47) als auch für GAPDH (1,97). In den gemittelten Standardabweichungen zeigte sich ein tendenziell höherer Wert für die endogene Kontrolle (qPCR-Untersuchungen für RPS27), die C_T-Werte für das Target waren den anderen Faktoren (SD=0,18) ähnlich.

Tabelle 4: Standardabweichungen der C_T-Werte in der qPCR

Target	Target					GAPDH			
	n	SD MW	SD Min	SD Max	C _T -Min	SD MW	SD Min	SD Max	C _T -Min
ATF5	31	0,11	0,01	0,30	26,93	0,13	0,03	0,39	22,78
BRMS1	31	0,09	0,03	0,31	26,28	0,07	0,01	0,26	21,64
TTK	29	0,19	0,03	0,57	27,97	0,11	0,02	0,29	21,84
RPS27	31	0,18	0,02	1,47	21,21	0,30	0,05	1,97	21,32
KiSS1	11	0,20	0,05	0,50	35,46	0,20	0,09	0,42	23,98

Die Standardabweichungen beziehen sich auf die C_T-m-Werte der Dreifachansätze pro Versuch innerhalb der Reaktionsgefäße. Abkürzungen: (C_T): Schwellenwertzyklus, (Max): maximaler Wert, (Min): minimaler Wert, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (SD) Standardabweichung.

Tabelle 5 fasst die Tests auf Normalverteilung der verwendeten ΔC_{Tm}-Werte und der Daten von AED, PFS und OS zusammen. Vor allem für Korrelationen und die Beschreibung von Zusammenhängen ist diese Testung von Interesse. Es zeigte sich, dass bei Umrechnung der Daten von ATF5, BRMS1 und TTK von der ΔC_{Tm}- in die 2^{-ΔC_{Tm}}-Form diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr normalverteilt vorlagen. Nur bei der Testung nach Lilliefors und Jarque-Bera konnte für RPS27 und KiSS1 ein p-Wert größer des Signifikanzniveaus von 0,05 festgestellt werden, so dass von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Die Daten für das OS könnten generell

und für AED lediglich nach Jarque-Bera ($p=0,074$) könnten als normalverteilt angenommen werden, für das PFS eher nicht.

Tabelle 5: Testung auf Normalverteilung

Target	Form	n	MW	SD	p-Wert			
					Shapiro-Wilk	Anderson-Darling	Lilliefors	Jarque-Bera
ATF5	ΔC_{Tm}	31	3,996	1,095	0,104	0,117	0,397	0,253
	$2^{-\Delta C_{Tm}}$	31	0,087	0,090	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
BRMS1	ΔC_{Tm}	31	4,315	0,754	0,028	0,076	0,449	0,128
	$2^{-\Delta C_{Tm}}$	31	0,059	0,040	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001
TTK	ΔC_{Tm}	29	9,665	2,047	0,374	0,210	0,347	0,610
	$2^{-\Delta C_{Tm}}$	29	0,004	0,008	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
RPS27	ΔC_{Tm}	31	-1,044	0,945	0,0002	< 0,0001	0,002	0,031
	$2^{-\Delta C_{Tm}}$	31	2,421	1,111	0,024	0,036	0,311	0,282
KiSS1	ΔC_{Tm}	12	12,901	1,630	0,285	0,361	0,526	0,627
	$2^{-\Delta C_{Tm}}$	12	0,0002	0,0002	0,006	0,005	0,097	0,238
AED	(Jahre)	24	42,253	9,888	0,006	0,007	0,031	0,074
PFS	(Monate)	23	34,130	38,583	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
OS	(Monate)	9	45,111	21,339	0,577	0,623	0,748	0,739

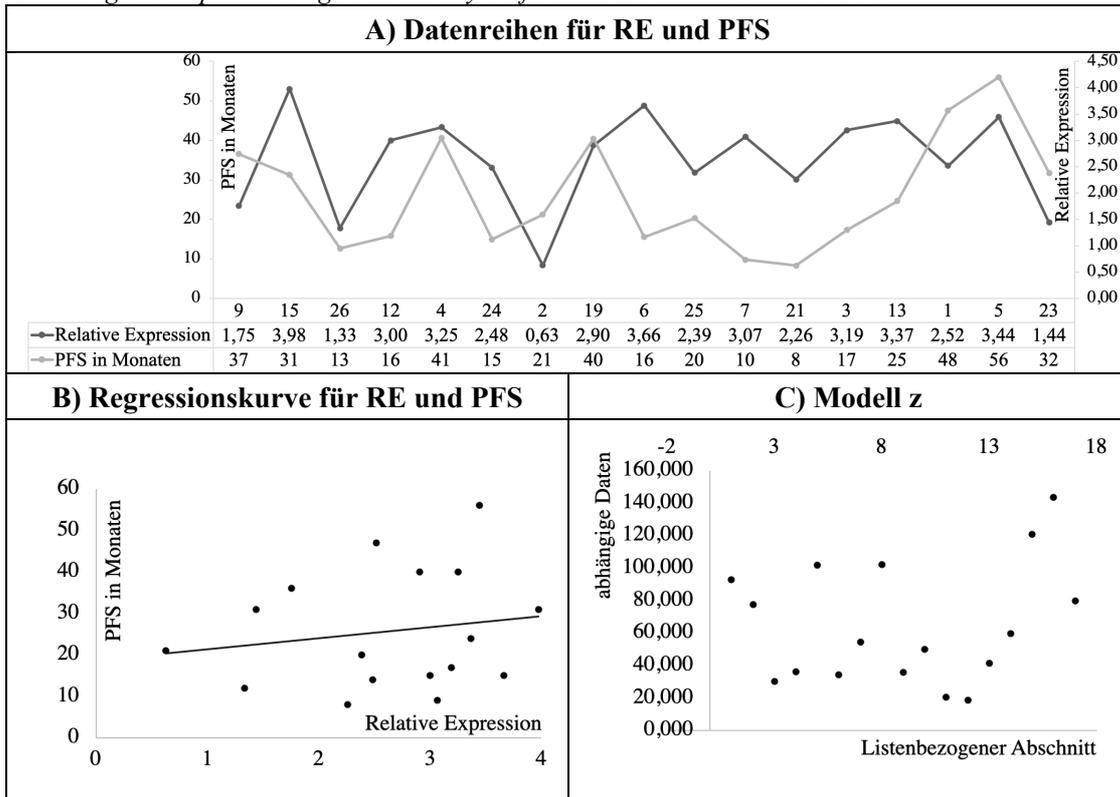
Testung auf Normalverteilung. Angabe als p-Wert mit H_0 , die Variable unterliegt einer Normalverteilung, und H_1 , die Variable unterliegt keiner Normalverteilung. Signifikanzniveau ($p=0,05$); wenn nicht signifikant ($p > 0,05$) wird die Nullhypothese nicht verworfen und von einer Normalverteilung ausgegangen; Abkürzungen: (ΔC_{Tm}): gemittelter relativer Schwellenwertzyklus, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (SD): Standardabweichung, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.2 RPS27

3.2.1 Regressionsanalysen

Am Beispiel für RPS27 werden die Annahmen der Regressionsanalysen für RE und PFS exemplarisch im Detail dargestellt (Abbildung 1). Die Ergebnisse der Regressionanalysen für die anderen untersuchten Faktoren werden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6). In den Kointegrationsanalysen (Tabelle 6) hatten die x- und y-Werte sowohl bei $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS sowie OS nicht signifikante p-Werte sowie hohe Varianzen (206,04 und 384); Mathematisch konnte zwar eine Kointegration bestimmt werden, welche aber statistisch unwahrscheinlich die Wirklichkeit abbildet.

Abbildung 1: Beispiel der Regressionsanalysen für die RE und das PFS von RPS27



A) Nach aufsteigender Reihung der Werte für das AED wurden die übrigen Datenpunkte für RE (in $(2^{-\Delta C_{Tm}})$ -Form) und PFS (sowie auch für RE und OS; hier nicht dargestellt) durch zwei Kurven beschrieben.
 B) Werte für PFS und RE (in $(2^{-\Delta C_{Tm}})$ -Form) geplottet mit grafischer Darstellung der Regressionsgeraden.
 C) Modell z: Datenpunkte der modellierten, geplotteten Kointegrationsfunktion; z als Daten der Kointegrationsanalyse der Funktion $f(x)=[x,x*(Steigung x)]/PFS-C_{Tm}$
 Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (x): Steigung der Kointegrationsfunktion, (z): modellierte Kointegrationsfunktion.

Tabelle 6: Kointegrationsanalysen für RPS27

Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS n=17							
	Lineare Modellanpassung=19,26+2,63x					p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (PFS)	0,24
y-Wert	19,26	10,92	1,76	0,10	206,04	Unit Root Test (C_{Tm})	0,28
x-Wert	2,63	3,94	0,67	0,51		Unit Root Test (z)	0,23
Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und OS n=7							
	Lineare Modellanpassung=30,73+7,24x					p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (OS)	0,34
y-Wert	30,73	18,52	1,66	0,16	384	Unit Root Test (C_{Tm})	0,42
x-Wert	7,24	7,69	0,94	0,39		Unit Root Test (z)	0,34

z als Daten der Kointegrationsanalyse: Funktion $f(x)=[x,x(Steigung x)]/pfs-C_{Tm}$
 Unit Root Test mit H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und ist nicht stationär, und H_1 , es liegt keine Einheitswurzel vor. Signifikanzlevel 0,05. Bei $p < 0,05$ kann die Nullhypothese verworfen und Stationarität nachgewiesen werden.
 Weitere Abkürzungen: (C_{Tm}): gemittelter C_T -Wert, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (x- bzw. y-Wert): Variablen zur Beschreibung einer Geraden, (z): modellierte Kointegrationsfunktion, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.2.2 Korrelationsanalysen

Die Korrelationsanalysen zwischen RE, OS, PFS & AED finden sich in folgender Tabelle 7. Keines der Wertepaare zwischen Korrelationskoeffizient und RE zeigte signifikante Ergebnisse, weshalb statistisch die Nullhypothese nicht verworfen werden und in diesem Fall keine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Der niedrigste p-Wert von 0,108 nach Spearman fand sich bei der Beschreibung vom PFS und OS unter Berücksichtigung aller LGA mit einer Korrelation von 0,366 mit einer moderaten Effektstärke, was bedeutet, dass tendenziell ein höheres PFS mit einem höherem OS einherginge.

Die Zusammenhänge, welche die niedrigsten Irrtumswahrscheinlichkeiten für mögliche Zusammenhänge hinsichtlich der relativen Expression hätten, fanden sich zwischen dem OS und der relativen Expression bei den LGA mit IDH1-Mutation. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 20% nach Spearman könnten höhere Werte der relativen Expression mit höheren Werten des OS einhergehen (0,571). Hier fand sich ein ähnlicher Wert nach Kendall (0,429; $p=0,23$), nach Pearson zeigte sich dies unwahrscheinlicher (0,388; $p=0,39$).

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationswerte der $2^{\Delta C_T^m}$ -Werte von RPS27 mit den klinischen Parametern. Der niedrigste p-Wert für die Korrelation (-0,259) der Expressionsdaten von allen LGA zwischen RE und AED hatte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 21,1% nach Pearson. Diese Beschreibung war unwahrscheinlicher in den LGA-Expressionsdaten mit IDH1-Mutation. Dort lag für einen möglichen Zusammenhang zwischen RE und OS eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 20% (0,571) vor. Die wahrscheinlichste Korrelation in diesen Daten fand sich zwischen PFS und OS bei allen Expressionsdaten (0,592; $p=0,108$).

Tabelle 7: Korrelationsanalysen klinische Parameter und RE von RPS27

Korrelationen aller LGA-Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) n=26								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,259	0,211	0,067	0,864	0,231	0,278
AED	-0,259	0,211	1	0	-0,549	0,126	0,162	0,450
OS	0,067	0,864	-0,549	0,126	1	0	0,565	0,113
PFS	0,231	0,278	0,162	0,450	0,565	0,113	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,155	0,457	0,133	0,744	0,104	0,627
AED	-0,155	0,457	1	0	-0,377	0,313	0,060	0,782
OS	0,133	0,744	-0,377	0,313	1	0	0,594	0,108
PFS	0,104	0,627	0,060	0,782	0,594	0,108	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,095	0,527	0,056	0,911	0,102	0,503
AED	-0,095	0,527	1	0	-0,310	0,295	0,033	0,842
OS	0,056	0,911	-0,310	0,295	1	0	0,366	0,208
PFS	0,102	0,503	0,033	0,842	0,366	0,208	1	0
Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) mit positiver IDH1-Mutation n=18, ohne Pat. 14								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,040	0,876	0,388	0,390	0,170	0,515
AED	-0,040	0,876	1	0	-0,126	0,788	0,291	0,257
OS	0,388	0,390	-0,126	0,788	1	0	0,328	0,473
PFS	0,170	0,515	0,291	0,257	0,328	0,473	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,077	0,761	0,571	0,200	0,206	0,426
AED	0,077	0,761	1	0	0,179	0,713	0,174	0,503
OS	0,571	0,200	0,179	0,713	1	0	0,357	0,444
PFS	0,206	0,426	0,174	0,503	0,357	0,444	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,059	0,762	0,429	0,230	0,162	0,387
AED	0,059	0,762	1	0	0,143	0,764	0,118	0,537
OS	0,429	0,230	0,143	0,764	1	0	0,143	0,764
PFS	0,162	0,387	0,118	0,537	0,143	0,764	1	0

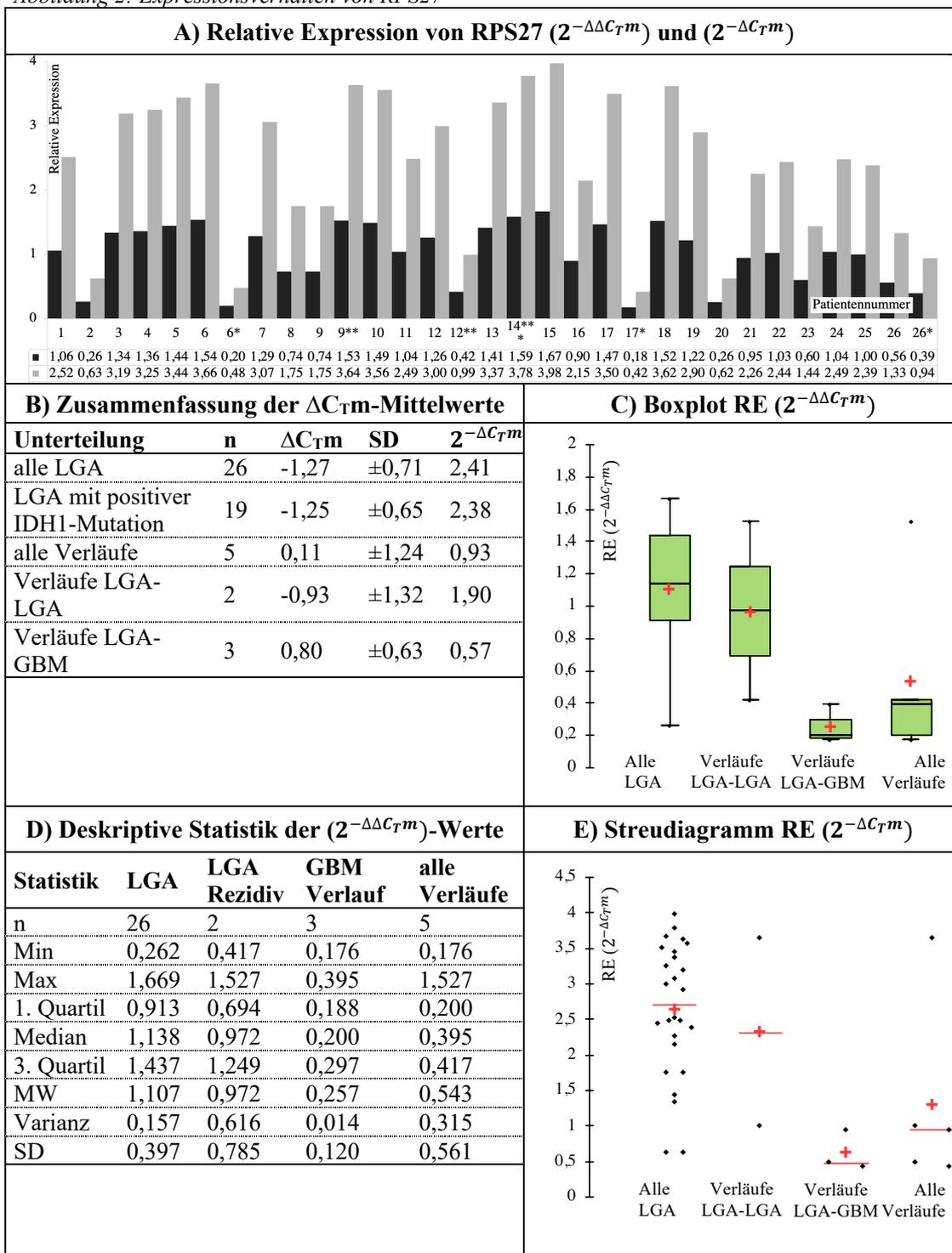
Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten betragen 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (Pat.): Patient, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.2.3 Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen

Die Probe von Patient 15 (Abbildung 2A) zeigte die maximal vorliegende Expression von RPS27 mit einer 3,98-fachen Differenz in Relation zur internen Kontrolle. Die ΔC_{Tm} -Werte der Tumoren wurden in Relation zum Mittelwert der IDH1-mutierten LGA-Tumoren ($\Delta C_{Tm}=-1,25$) gesetzt. Durch diese Kalibrierung wurde ersichtlich, dass die Mittelwerte der $2^{\Delta \Delta C_{Tm}}$ -Form bei den Verläufen im Durchschnitt niedriger waren

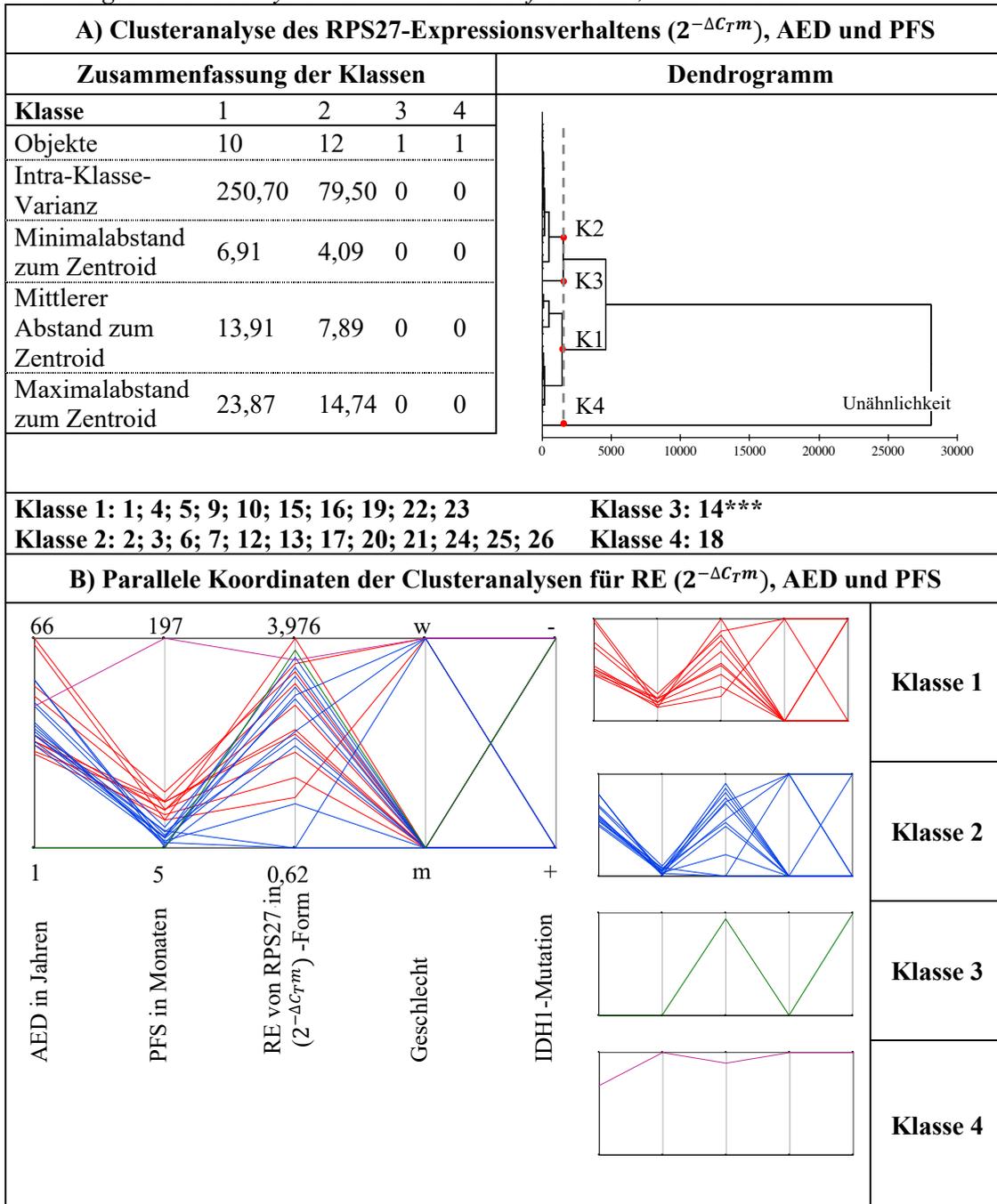
(0,93; n=5). Die Rezidive als GBM hatten niedrigere Expressionswerte (0,57; n=3) als die LGA-Rezidive (1,9; n=2) (Abbildung 2B). Die Clusteranalyse für die RE von RPS27 zusammen mit dem PFS und dem AED generierte 4 Klassen (Klasse 1 mit 10, Klasse 2 mit 12 und Klasse 3 bzw. 4 mit jeweils 1 Patienten). Klassen 1, 2 und 3 wurden im Dendrogramm auf deutlich niedrigeren Ebenen zusammengefasst als Klasse 4. Besonders Klasse 3 mit Patient 14 bzw. Klasse 4 mit Patient 18 schien den übrigen Klassen 1 und 2 mit relativ hohen Intra-Klasse-Varianzen unähnlicher (Abbildung 3). Wurde nur nach dem Expressionsverhalten von RPS27 isoliert geclustert, wurden 3 Klassen gebildet (Klasse 1 mit 11, Klasse 2 mit 6 und Klasse 3 mit 14 Patienten). Klasse 3 war gegenüber den übrigen Klassen 1 und 2 am unähnlichsten und wurde an einem späteren Punkt als Klassen 1 und 2 im Dendrogramm mit diesen vereinigt. Rezidive sowie Vorläufer wurden nicht durch unterschiedliche Klassen getrennt (Abbildung 4).

Abbildung 2: Expressionsverhalten von RPS27



A) Proteinexpression der Einzel Tumoren in Relation zum Mittelwert (MW) der IDH1-mutierten Astrozytome ($2^{-\Delta\Delta C_T m}$)-Form in schwarz bzw. zur endogenen Kontrolle ($2^{-\Delta C_T m}$)-Form in grau (jeweils gerundet auf zwei Nachkommastellen), B) $\Delta C_T m$ -Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Verlaufsgruppen, C) $2^{-\Delta\Delta C_T m}$ -Form visualisiert als Boxplots, D) Deskriptive Statistik der Verlaufsgruppe E) ($2^{-\Delta C_T m}$)-Form visualisiert als Streudiagramm. Abkürzungen: ($\Delta C_T m$): gemittelter relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, (SD): Standardabweichung, ($2^{-\Delta C_T m}$): gemittelter relativer Expressionswert, ($2^{-\Delta\Delta C_T m}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 3: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für RPS27, AED und PFS

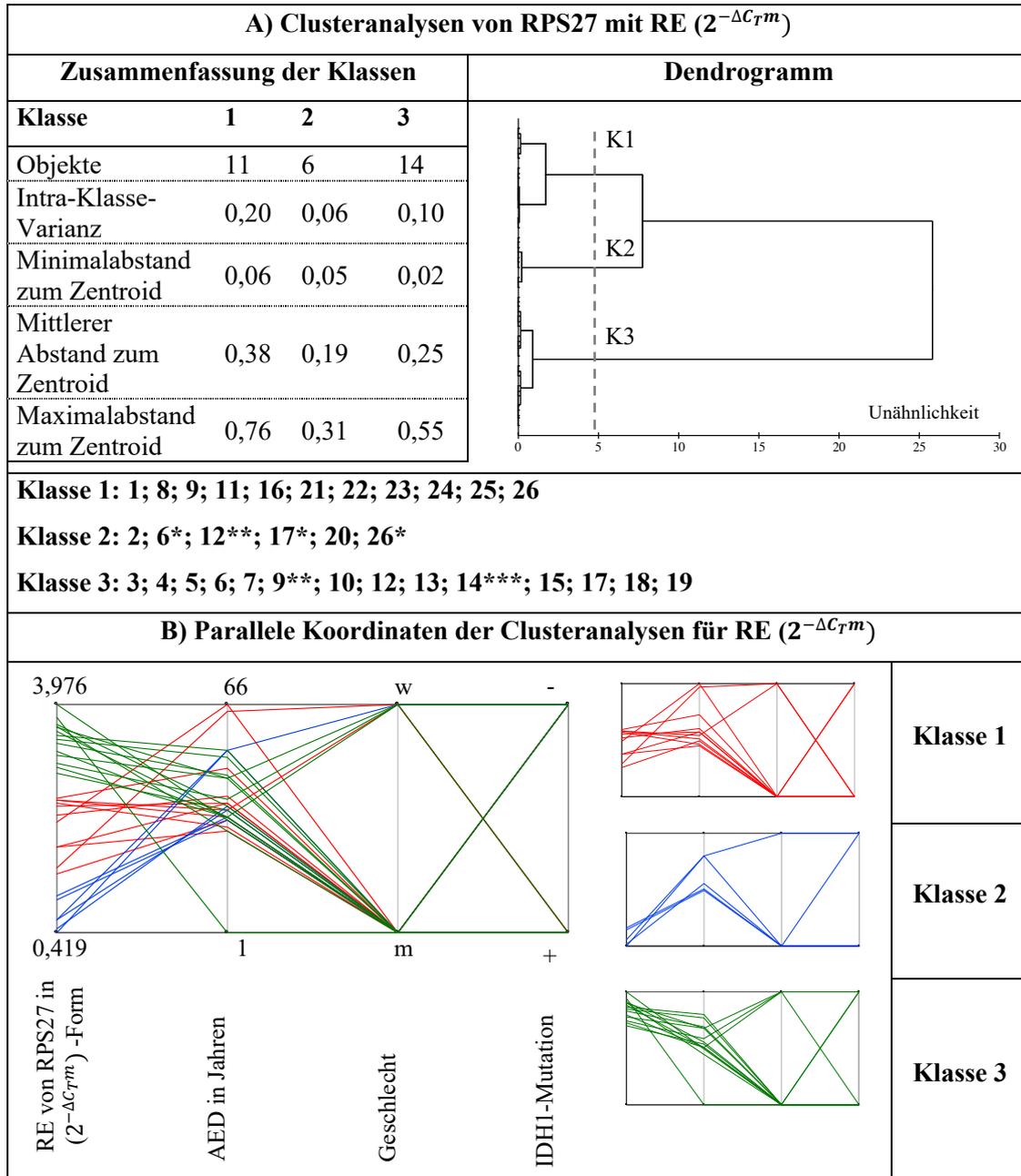


*** Pat. 14 (Pilozytisches Astrozytom)

A) Clusterbildung auf Basis der relativen Expression (RE) (in $2^{-\Delta C_{Tm}}$ -Form), Alter bei Erstdiagnose (AED) und progressionsfreies Überleben (PFS), statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 4: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von RPS27 in allen Tumorproben



*Rezidiv als WHO° IV, **Rezidiv als WHO° II, ***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung auf Basis von RE ($2^{-\Delta C_{Tm}}$), AED und PFS, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen. Weitere Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K3): Klasse(n) 1 bis 3, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.2.4 Verlaufsanalysen

Die Mittelwerte zeigten, dass die Expression von RPS27 in LGA in Relation zur internen Kontrolle größer als in der Gruppe der Rezidive war (Tabelle 9). Die Werte der LGA-LGA- bzw. LGA-GBM-Verlaufsgruppen waren jedoch sehr unterschiedlich und brachten in der Einzelbetrachtung teilweise gegensätzliche Aussagen; z.B. hatte das LGA-LGA Wertepaar von Patient 9 eine RE von 0,48, wohingegen der weitere LGA-LGA-Verlauf von Patient 12 eine RE von 3,02 aufwies (Tabelle 9). Dass die Proteinexpression in den Vorläuferläsionen der LGA-GBM-Verläufe stärker war, lies sich nur in 2 von 3 Fällen, an Patienten 6 und 17, zeigen, wohingegen Patient 26 eine Expressionsrate von 1,06 aufwies.

In den Clusteranalysen (Abbildung 5) wurden 3 Klassen unterschieden, Klasse 1 mit 4, Klasse 2 mit 2 und Klasse 3 mit 4 Patienten. Klasse 2 und 3 waren sich deutlich ähnlicher und wurden bereits auf einer niedrigen Stufe durch das Dendrogramm im Vergleich zu Klasse 1 zusammengefasst. Es zeigte sich somit, dass auf Basis der ΔC_{Tm} -Expressionsrate Klasse 1 den übrigen Klassen aufgrund der höheren Expressionswerte am unähnlichsten war. Die Clusteranalysen unterschieden nicht zwischen Vorläufer- und Rezidivtumoren.

Tabelle 8: Exemplarische Berechnung der Verläufe in Anlehnung an Livak et al. (2001)

Expression von RPS27 in Vorläufer und Rezidivtumoren							
Patient	RPS27 C _T	C _{Tm}	GAPDH C _T	C _{Tm}	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_{Tm}}
Patient 6, m. IDH1-Mut. (+), ATRX-Expression. (-)							
LGA	21,293	21,275 ± 0,05	23,439	23,148 ± 0,25	-1,87	-2,94	7,67
	21,214		22,975				
	21,318		23,031				
GBM	24,313	24,280 ± 0,03	23,220	23,214 ± 0,05	1,08		
	24,262		23,164				
	24,266		23,257				
Patient 9, m. IDH1-Mut. (+), ATRX-Expression. (-)							
LGA	28,195	28,248 ± 0,05	28,841	29,059 ± 0,31	-0,81	1,05	0,48
	28,283		29,414				
	28,267		28,923				
LGA	25,288	25,400 ± 0,10	27,437	27,263 ± 0,16	-1,86		
	25,481		27,109				
	25,432		27,244				
Patient 12, m. IDH1-Mut. (+), ATRX-Expression. (-)							
LGA	26,639	26,569 ± 0,14	28,387	28,153 ± 0,22	-1,56	-1,59	3,02
	26,405		28,126				
	26,662		27,947				
LGA	25,257	25,278 ± 0,02	25,291	25,268 ± 0,08	0,01		
	25,297		25,334				
	25,280		25,180				
Patient 17, m. IDH1-Mut. (-), ATRX-Expression. (-)							
LGA	26,586	26,428 ± 0,16	28,043	28,237 ± 0,25	-1,81	-3,07	8,37
	26,433		28,144				
	26,265		28,525				
GBM	23,898	23,903 ± 0,02	22,725	22,646 ± 0,09	1,26		
	23,928		22,543				
	23,882		22,671				
Patient 26, m. IDH1-Mut. (+), ATRX-Expression. (-)							
LGA	22,481	22,095 ± 0,38	23,986	22,512 ± 1,39	-0,42	-0,09	1,06
	22,532		24,045				
	n.b.		n.b.				
	21,799		21,824				
	21,814		21,317				
	21,851		21,386				
GBM	22,483	22,494 ± 0,02	22,447	22,405 ± 0,15	0,09		
	22,481		22,534				
	22,518		22,233				

Berechnete relative 2^{-ΔΔC_{Tm}}-Expressionswerte zwischen Vorläufer- und Rezidivtumoren; ΔC_T (gemittelter C_T von RPS27 - gemittelter C_T von GAPDH),

ΔΔC_T (gemittelter ΔC_T des Rezidivs - gemittelter ΔC_T des Vorläufers),

2^{-ΔΔC_{Tm}}-als gerundete, normierte Menge von RPS27 in Relation zum Vorläufer.

Abkürzungen: (ATRX -): ATRX-Expressionsverlust, (ATRX +): erhaltene ATRX-Expression, (C_T):

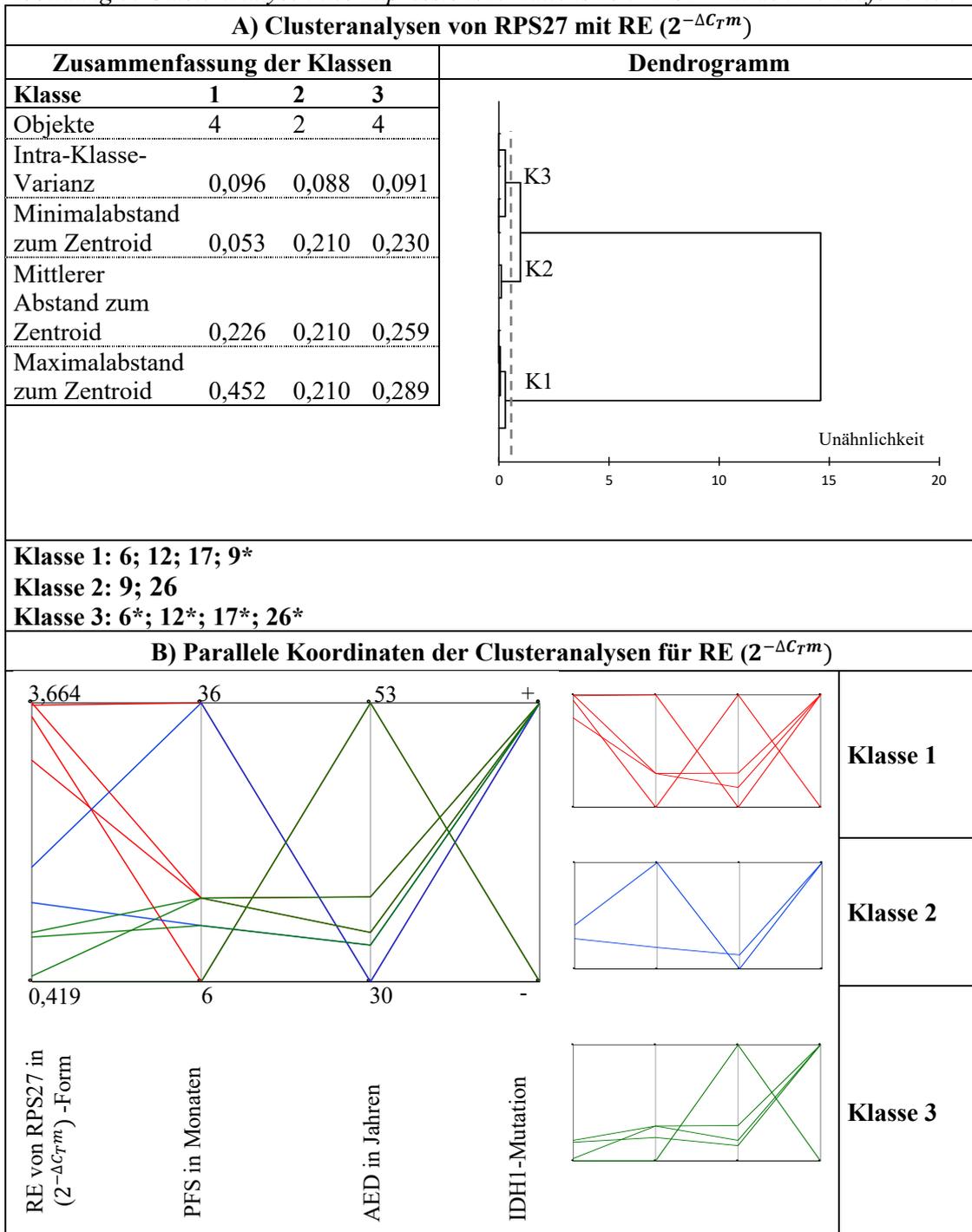
Schwellenwertzyklus, (ΔC_T): siehe oben, (ΔC_{Tm}): siehe oben, (ΔΔC_T): siehe oben, (GBM): Glioblastoma multiforme, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (w): weiblich.

Tabelle 9: Stichprobenanalysen der Verläufe von RPS27

Relative Expression ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$) ($\Delta C_T(\text{Vorläufer})-\Delta C_T(\text{Rezidiv})$)					
Patient	6	9	12	17	26
	LGA-GBM	LGA-LGA	LGA-LGA	LGA-GBM	LGA-GBM
RE	7,67	0,48	3,02	8,37	1,06
Stichprobenanalysen der Verläufe LGA-LGA im Vergleich zu den Verläufen LGA-GBM					
Verläufe	MW	Vorzeichentest (zweiseitig)		Wilcoxon-Rang-Test (zweiseitig)	
		p-Wert	Varianz	p-Wert	Varianz
LGA-LGA n=2	1,75	0,25	0,75	0,25	3,5
LGA-GBM n=3	5,7				

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, das Signifikanzniveau α ist 0,05. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (ΔC_T): relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 5: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von RPS27 mit den Verlaufswerten



*Rezidivtumoren

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K3): Klasse(n) 1 bis 3, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.2.5 Zusammenfassende Ergebnisse der RPS27-Untersuchung

In den Analysen für RPS27 waren die Daten für die logarithmische Form normalverteilt. Für die Kointegrationsanalysen fanden sich hier hohe Fehlerwerte (Tabelle 6). Die Korrelationsanalysen ergaben keine signifikanten Paare, p-Werte zwischen der RE und den klinischen Daten waren fern etwaig vertretbarer Signifikanzniveaus. Die Expressionsdaten zeigten, dass RPS27 unterschiedlich stark in Relation zum Haushaltsgen exprimiert wurde, wobei sich die Expressionsrate von der Hälfte bis über das 3-Fache in Relation zu GAPDH erstreckte. Die Verläufe zeigten tendenziell niedrigere Expressionswerte im Vergleich zu den LGA. In vier von fünf Tumorpaaaren war RPS27 in den Vorläufertumoren maximal 8-fach höher als in den Rezidiven exprimiert.

3.3 KiSS1

3.3.1 Regressionsanalysen

Generell lag bei KiSS1 die niedrigste Anzahl an verwertbaren Ergebnissen vor. Die Kointegrationsanalysen für $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS (n=9) bzw. OS (n=4) zeigten hohe Varianz- (267 und 145) und x-Werte auf (Tabelle 10). Eine Kointegration konnte daher mit diesen Werten als eher unwahrscheinlich beschrieben werden.

Tabelle 10: Kointegrationsanalysen für KiSS1

Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS n=9							
Lineare Modellanpassung=34,61-29316x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (PFS)	0,596
y-Wert	34,61	7,85	4,41	0,003	267,09	Unit Root Test (C _{Tm})	0,053
x-Wert	-29315,9	26267,50	-1,12	0,30		Unit Root Test (z)	0,596
Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und OS n=4							
Lineare Modellanpassung=32,92+11039x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (OS)	0,663
y-Wert	32,92	12,07	2,73	0,11	145	Unit Root Test (C _{Tm})	0,260
x-Wert	11038,80	28311,10	0,39	0,73		Unit Root Test (z)	0,663

z als Daten der Kointegrationsanalyse: Funktion $f(x)=[x,x(\text{Steigung } x)]/\text{pfs-C}_{Tm}$

Unit Root Test mit H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und ist nicht stationär, und H_1 , es liegt keine Einheitswurzel vor. Signifikanzlevel 0,05. Bei $p < 0,05$ kann die Nullhypothese verworfen und Stationarität nachgewiesen werden.

Weitere Abkürzungen: (C_{Tm}): gemittelter C_T-Wert, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (x- bzw. y-Wert): Variablen zur Beschreibung einer Geraden, (z): modellierte Kointegrationsfunktion, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.3.2 Korrelationsanalysen

Es zeigten sich in den Korrelationstabellen keine signifikanten Ergebnisse der $2^{-\Delta C_{Tm}}$ -Werte mit den klinischen Parametern (Tabelle 11). Am niedrigsten war die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen RE und AED mit 25,5% bei allen LGA-Expressionsdaten. P-Werte, die einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% am nächsten sind, fanden sich nach Pearson bei allen LGA-Expressionsdaten zwischen OS und AED (-0,549; p=0,126) sowie OS und PFS (0,565; p=0,113). Die Irrtumswahrscheinlichkeit eines Zusammenhanges zwischen OS und PFS war nach Spearman sogar geringer (0,594, p=0,108). Weitere wahrscheinliche Zusammenhänge zeigten sich nicht in den Daten der IDH1-mutierten Tumoren.

Tabelle 11: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von KiSS1

Korrelationen aller LGA-Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) n=11								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,375	0,255	0,257	0,743	-0,225	0,507
AED	0,375	0,255	1	0	-0,549	0,126	0,162	0,450
OS	0,257	0,743	-0,549	0,126	1	0	0,565	0,113
PFS	-0,225	0,507	0,162	0,450	0,565	0,113	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,265	0,432	0,400	0,750	-0,209	0,539
AED	0,265	0,432	1	0	-0,377	0,313	0,060	0,782
OS	0,400	0,750	-0,377	0,313	1	0	0,594	0,108
PFS	-0,209	0,539	0,060	0,782	0,594	0,108	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,278	0,273	0,333	0,699	-0,164	0,531
AED	0,278	0,273	1	0	-0,310	0,295	0,033	0,842
OS	0,333	0,699	-0,310	0,295	1	0	0,366	0,208
PFS	-0,164	0,531	0,033	0,842	0,366	0,208	1	0
Korrelationen aller LGA-Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) mit positiver IDH1-Mutation n=9, ohne Pat. 14								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,193	0,619	0,265	0,735	-0,389	0,301
AED	-0,193	0,619	1	0	0,703	0,297	0,492	0,179
OS	0,265	0,735	0,703	0,297	1	0	0,565	0,435
PFS	-0,389	0,301	0,492	0,179	0,565	0,435	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,200	0,613	0,400	0,750	-0,333	0,385
AED	0,200	0,613	1	0	0,800	0,333	0,450	0,250
OS	0,400	0,750	0,800	0,333	1	0	0,200	0,917
PFS	-0,333	0,385	0,450	0,250	0,200	0,917	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,167	0,602	0,333	0,734	-0,222	0,466
AED	0,167	0,602	1	0	0,667	0,308	0,389	0,175
OS	0,333	0,734	0,667	0,308	1	0	0,000	1,000
PFS	-0,222	0,466	0,389	0,175	0,000	1,000	1	0

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (Pat.): Patient, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

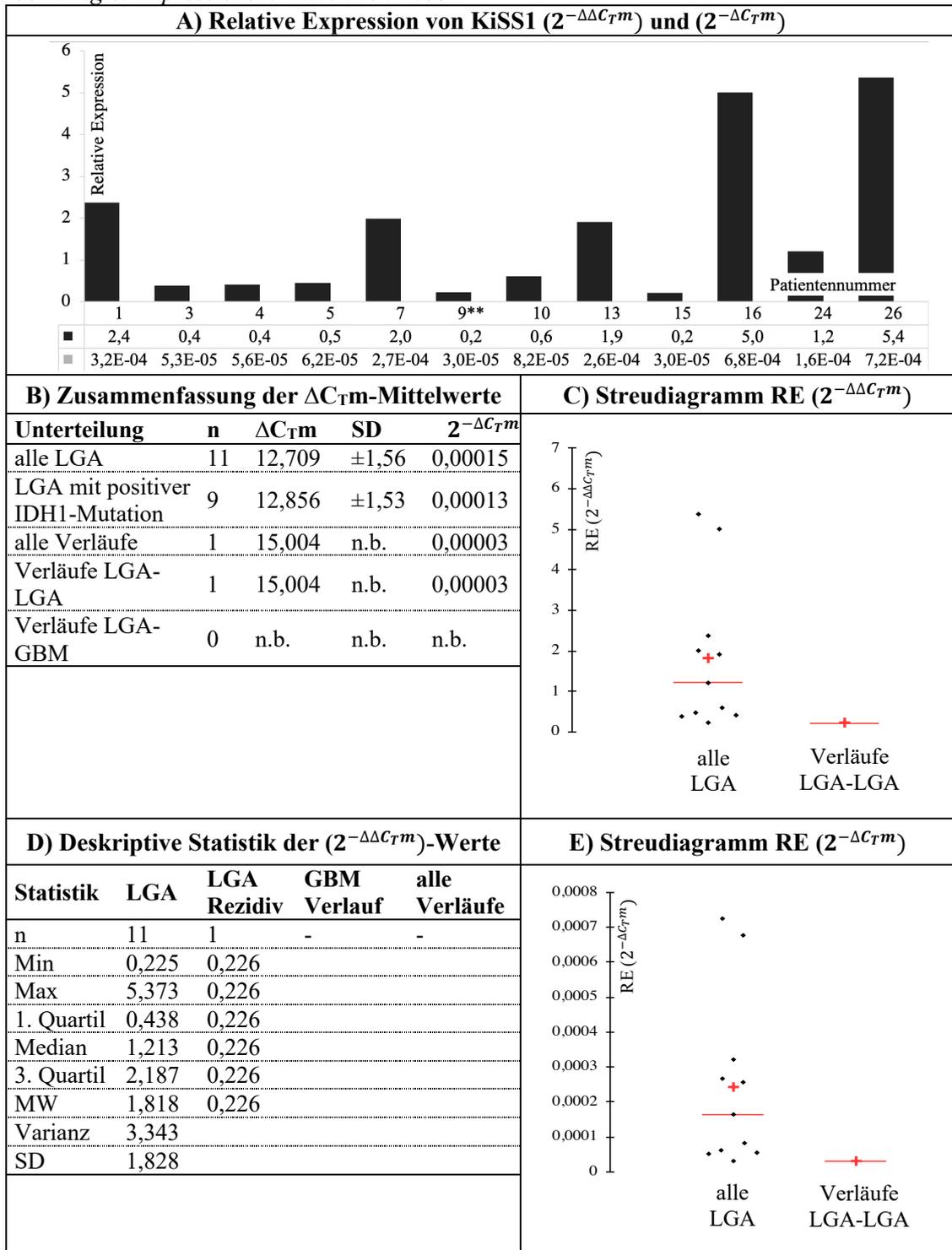
3.3.3 Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen

KiSS1 war in Relation zu GAPDH mit einer maximalen Differenz von 0,00072 bei Patient 26 äußerst niedrig exprimiert (Abbildung 6). Die übrigen Werte lagen deutlich unter diesem Wert. Die ΔC_{Tm} -Werte der Tumoren wurden in Relation zum Mittelwert der IDH1-mutierten LGA-Tumoren ($\Delta C_{Tm}=12,86$) gesetzt.

In den qPCR-Ergebnissen konnte nur ein Wert für das LGA-Rezidiv von Patient 9 festgestellt werden.

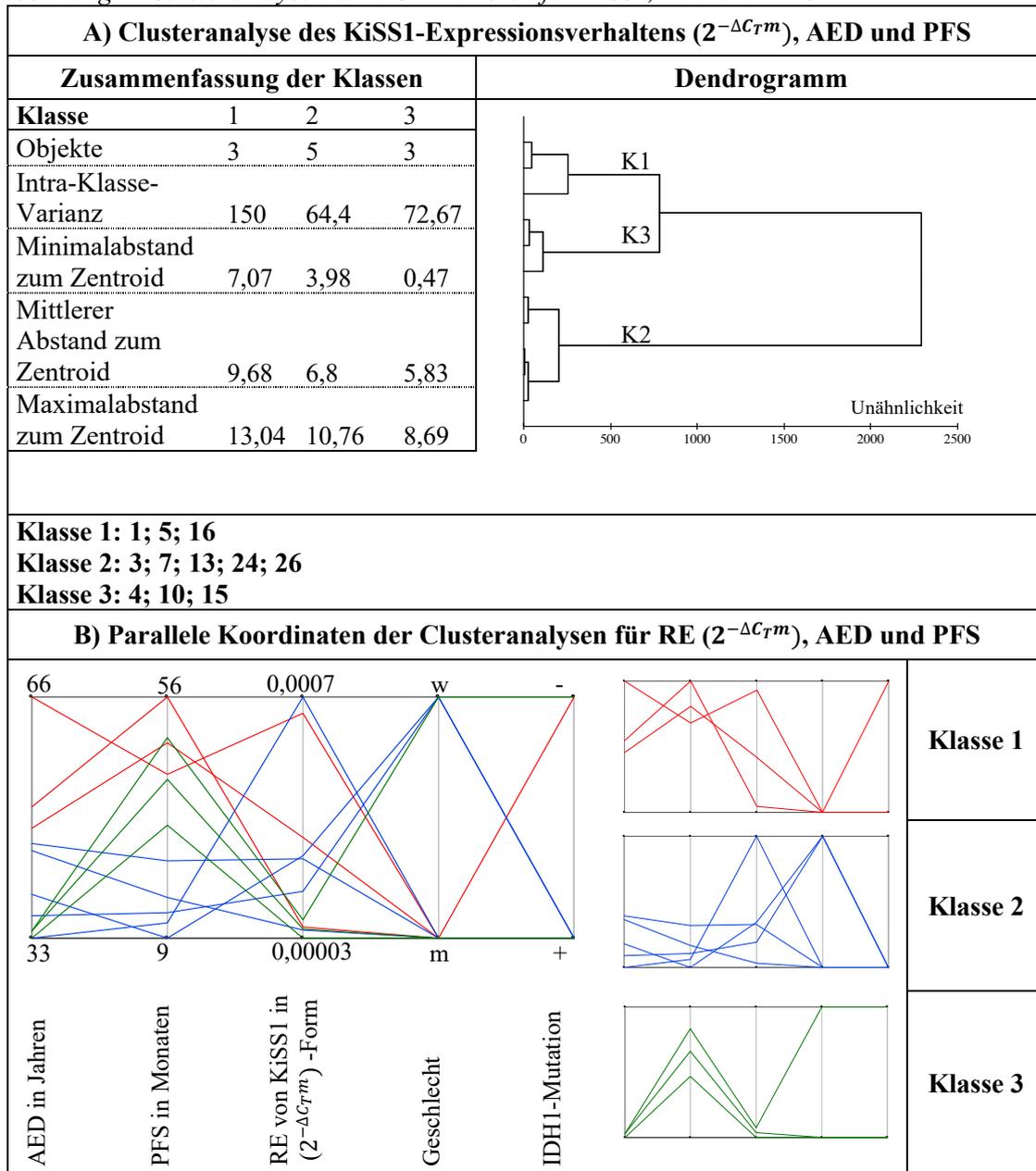
Die Clusteranalysen unterschieden 3 Klassen (Klasse 1 mit 3, Klasse 2 mit 5, Klasse 3 mit 3 Patienten) (Abbildung 7). Die Tumoren der Klasse 2 unterschieden sich stärker von 1 und 3, wobei die maximalen und minimalen Expressionsdaten sehr nahe beieinander lagen, was durch die parallelen Koordinaten verdeutlicht wurde. Die Clusteranalysen des KiSS1-Expressionsverhaltens teilten die Tumoren in 4 Klassen ein (Klasse 1 mit 3, Klasse 2 mit 6, Klasse 3 mit 2 und Klasse 4 mit 1 Patienten) (Abbildung 8). Klasse 3 mit Patienten 16 und 26 war den übrigen Klassen am unähnlichsten, wobei sich die $2^{-\Delta C_T^m}$ -Werte nur minimal unterschieden. Das Expressionsverhalten von Vorläufer- und Rezidivtumoren konnte aufgrund unbestimmbarer Daten nicht beschrieben werden.

Abbildung 6: Expressionsverhalten von KiSS1



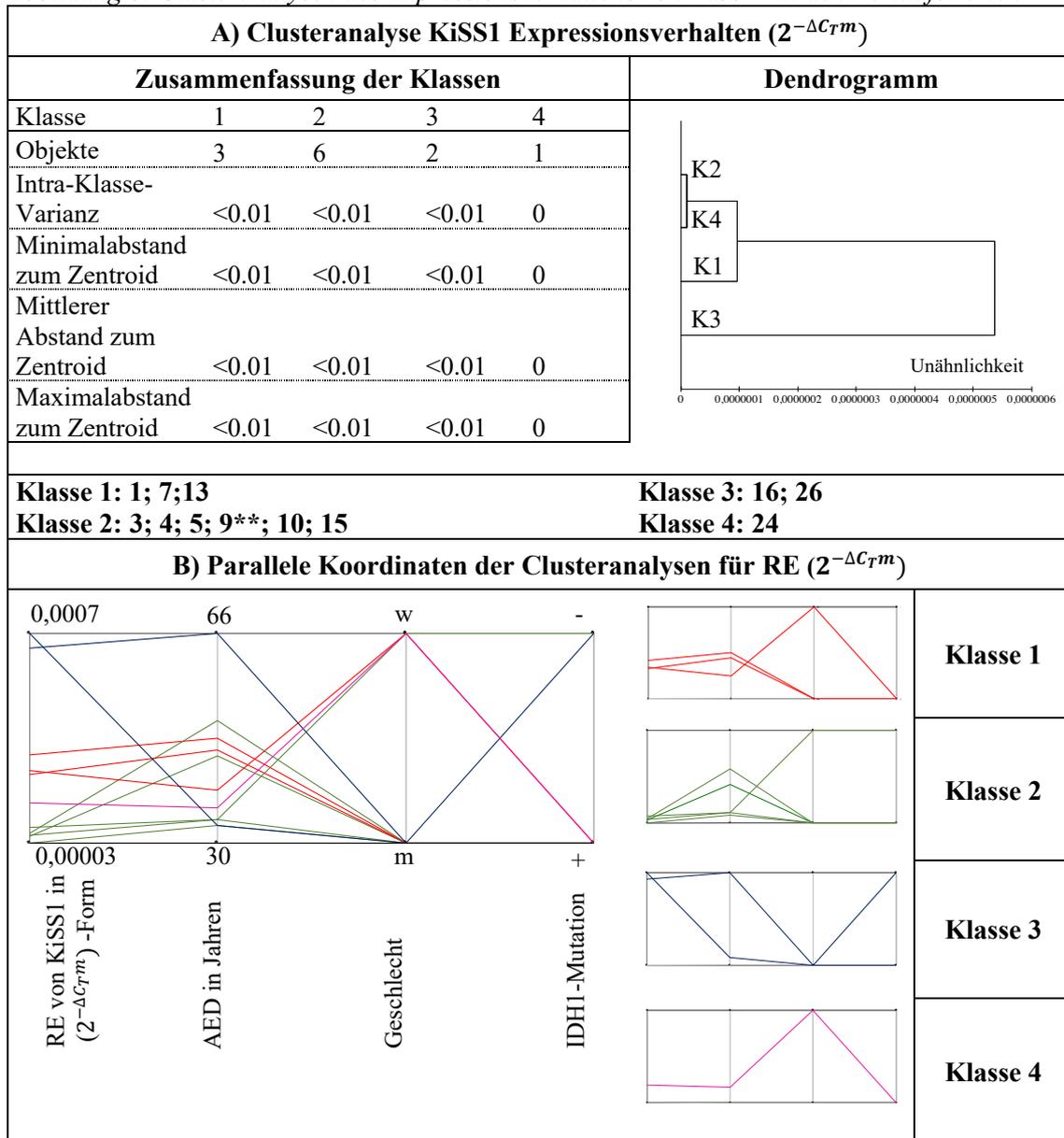
A) Proteinexpression der Einzeltumoren in Relation zum Mittelwert (MW) der IDH1-mutierten Astrozytome ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form in schwarz (auf eine Nachkommastelle gerundet) bzw. zur endogenen Kontrolle ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form in grau (im wissenschaftlichen Format; Exponent (E) entspricht dem Faktor x10), B) ΔC_{Tm} -Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Verlaufsgruppen, C) $2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$ -Form visualisiert als Streudiagramm, D) Deskriptive Statistik der Verlaufsgruppen E) ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Streudiagramm. Abkürzungen: (ΔC_{Tm}): gemittelter relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, (SD): Standardabweichung. ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert, ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 7: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für KiSS1, AED und PFS



A) Clusterbildung auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, Alter bei Erstdiagnose (AED) und progressionsfreies Überleben (PFS), statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen. Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K3): Klasse(n) 1 bis 3, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 8: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von KiSS1 mit den Verlaufswerten



**Rezidiv als WHO° II

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

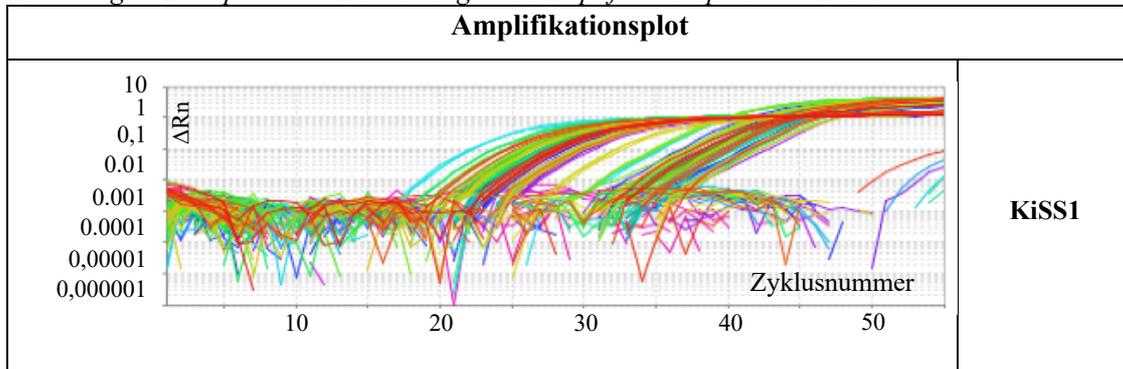
Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.3.4 Zusammenfassende Ergebnisse der KiSS1-Untersuchung

Trotz wiederholter qPCR-Analysen konnten nur vereinzelte C_T -Werte bestimmt werden. Die weiteren Versuche mussten mit deutlich kleineren Fallzahlen durchgeführt werden. Für die Kointegrations- bzw. Zeitreihenanalysen ergaben sich sehr hohe

Varianzen und unwahrscheinliche Werte für die Beschreibungen von x - und y . Die Korrelationsanalysen ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Die p -Werte waren deutlich von einer akzeptablen Irrtumswahrscheinlich entfernt. Die Expressionsanalysen konnten für einzelne Proben durchgeführt werden und wiesen äußerst niedrige ΔC_T -Werte auf. Aufgrund der wenigen verfügbaren Daten müssen die Kalibratoren für die unterschiedlichen Ansätze der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ebenso kritisch betrachtet werden. Clusteranalysen zeigten zwei Ausreißer mit ähnlich niedrigen ΔC_T -Werten an. Auch der kleinste C_T -Wert für KiSS1 hatte bereits einen relativ hohen Wert (35,459). Deutlich spätere C_T -Werte fanden sich in den übrigen Tumorproben. Teilweise erreichten die Werte kein Plateau innerhalb der maximalen Zyklusanzahl von 50 (Abbildung 9).

Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines Amplifikationsplots von KiSS1



Exemplarische Darstellung der wiederholten qPCR für KiSS1 und GAPDH. Hervorzuheben sind die Amplifikationen in relativ späten Zyklen. Abweichend wurden hier insgesamt 55 Zyklen durchlaufen, um die Plateauphase zu erreichen;
 Abkürzungen: (ΔR_n): Differenz von R_n mit der Basislinie (90), (R_n): normalisiertes Reportersignal als Division von Reporter- zu Referenzfarbstoff.

3.4 BRMS1

3.4.1 Regressionsanalysen

In den Kointegrationsanalysen fanden sich für die Beschreibung von $2^{-\Delta C_{Tm}}$ mit dem PFS bzw. OS relativ hohe Varianzwerte (212 und 450) sowie für die Steigung keine signifikanten p-Werte, so dass diese Werte auch unter Vernachlässigung der fehlenden Normalverteilung nicht kointegriert vorlagen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Kointegrationsanalysen für BRMS1

Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS n=17							
Lineare Modellanpassung=26,69-7,77x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (PFS)	0,24
y-Wert	26,69	6,19141	4,31	0,00062	212,00	Unit Root Test (C_{Tm})	0,02
x-Wert	-7,77	74,03	-0,10	0,92		Unit Root Test (z)	0,24
Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und OS n=7							
Lineare Modellanpassung=45,14+18,34x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (OS)	0,34
y-Wert	45,14	13,05	3,46	0,018	450,18	Unit Root Test (C_{Tm})	0,08
x-Wert	18,34	119,97	0,15	0,88		Unit Root Test (z)	0,34

z als Daten der Kointegrationsanalyse: Funktion $f(x)=[x,x(Steigung x)]/pfs-C_{Tm}$

Unit Root Test mit H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und ist nicht stationär, und H_1 , es liegt keine Einheitswurzel vor. Signifikanzlevel 0,05. Bei $p < 0,05$ kann die Nullhypothese verworfen und Stationarität nachgewiesen werden.

Weitere Abkürzungen: (C_{Tm}): gemittelter C_{Tm} -Wert, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (x- bzw. y-Wert): Variablen zur Beschreibung einer Geraden, (z): modellierte Kointegrationsfunktion, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.4.2 Korrelationsanalysen

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Werte mit den klinischen Parametern (Tabelle 13). Der niedrigste Wert zwischen RE und OS hatte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 35,9% bei allen LGA-Expressionsdaten. Wäre eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% akzeptabel, könnte mit diesen Daten beinahe eine negative Korrelation zwischen AED und OS von -0,549 mit 12,6% bzw. zwischen PFS und OS mit 11,3% Irrtumswahrscheinlichkeit eine Korrelation von 0,565 nachgewiesen werden. Diese Aussagen wurden jedoch durch die p-Werte der LGA-Tumoren mit positiver IDH1-Mutation unwahrscheinlicher.

Tabelle 13: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von BRMSI

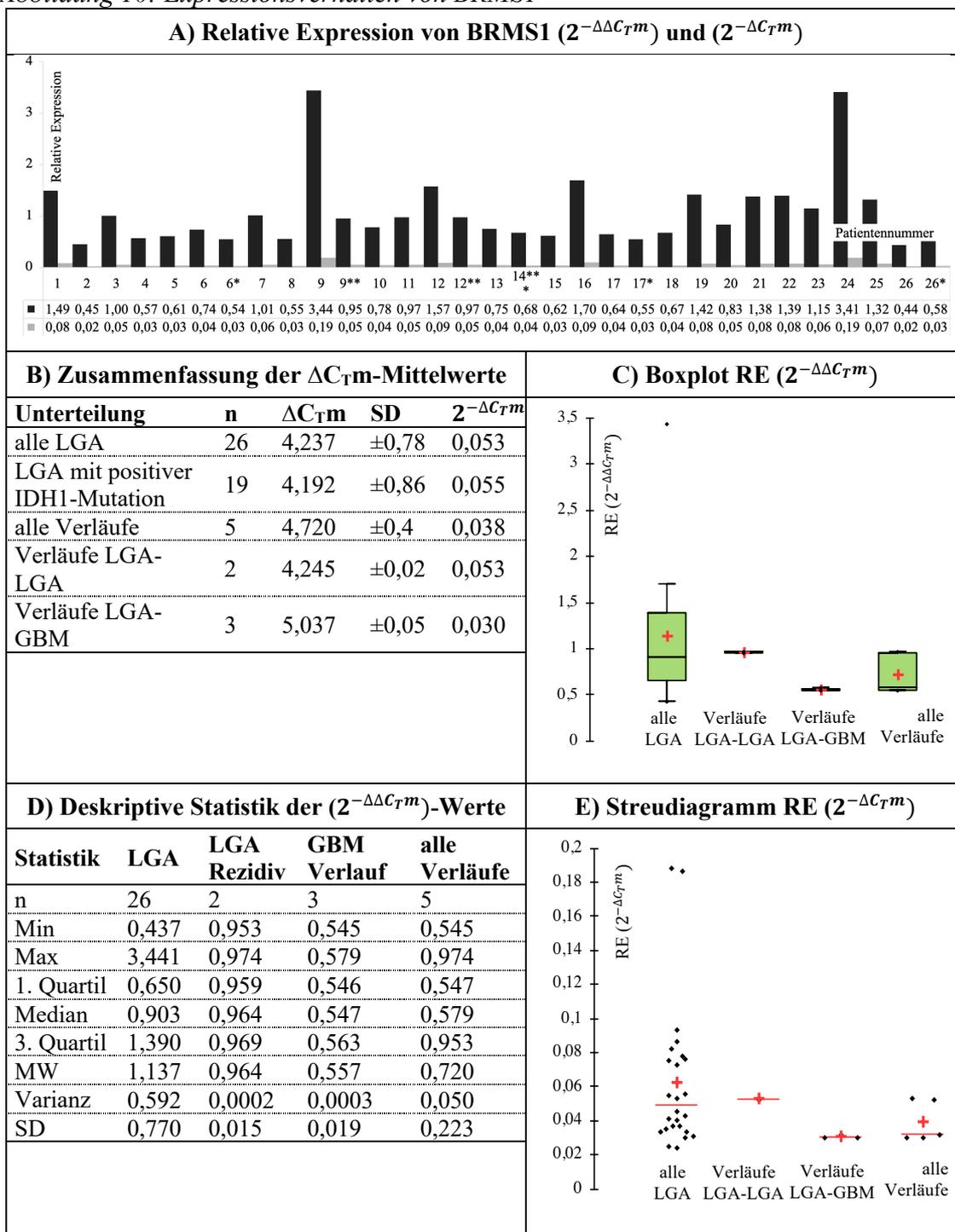
Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_T^m}$) n=26								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,022	0,918	0,177	0,648	-0,089	0,679
AED	-0,022	0,918	1	0	-0,549	0,126	0,162	0,450
OS	0,177	0,648	-0,549	0,126	1	0	0,565	0,113
PFS	-0,089	0,679	0,162	0,450	0,565	0,113	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,061	0,771	0,350	0,359	0,067	0,755
AED	0,061	0,771	1	0	-0,377	0,313	0,060	0,782
OS	0,350	0,359	-0,377	0,313	1	0	0,594	0,108
PFS	0,067	0,755	0,060	0,782	0,594	0,108	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,041	0,797	0,222	0,436	0,044	0,785
AED	0,041	0,797	1	0	-0,310	0,295	0,033	0,842
OS	0,222	0,436	-0,310	0,295	1	0	0,366	0,208
PFS	0,044	0,785	0,033	0,842	0,366	0,208	1	0
Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_T^m}$) mit positiver IDH1-Mutation n=17, ohne Pat. 14								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,219	0,399	0,068	0,884	-0,027	0,918
AED	-0,219	0,399	1	0	-0,126	0,788	0,291	0,257
OS	0,068	0,884	-0,126	0,788	1	0	0,328	0,473
PFS	-0,027	0,918	0,291	0,257	0,328	0,473	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,012	0,966	0,179	0,713	-0,032	0,906
AED	-0,012	0,966	1	0	0,179	0,713	0,174	0,503
OS	0,179	0,713	0,179	0,713	1	0	0,357	0,444
PFS	-0,032	0,906	0,174	0,503	0,357	0,444	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,029	0,902	0,143	0,764	-0,029	0,902
AED	-0,029	0,902	1	0	0,143	0,764	0,118	0,537
OS	0,143	0,764	0,143	0,764	1	0	0,143	0,764
PFS	-0,029	0,902	0,118	0,537	0,143	0,764	1	0

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{-\Delta C_T^m}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (Pat.): Patient, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta C_T^m}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.4.3 Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen

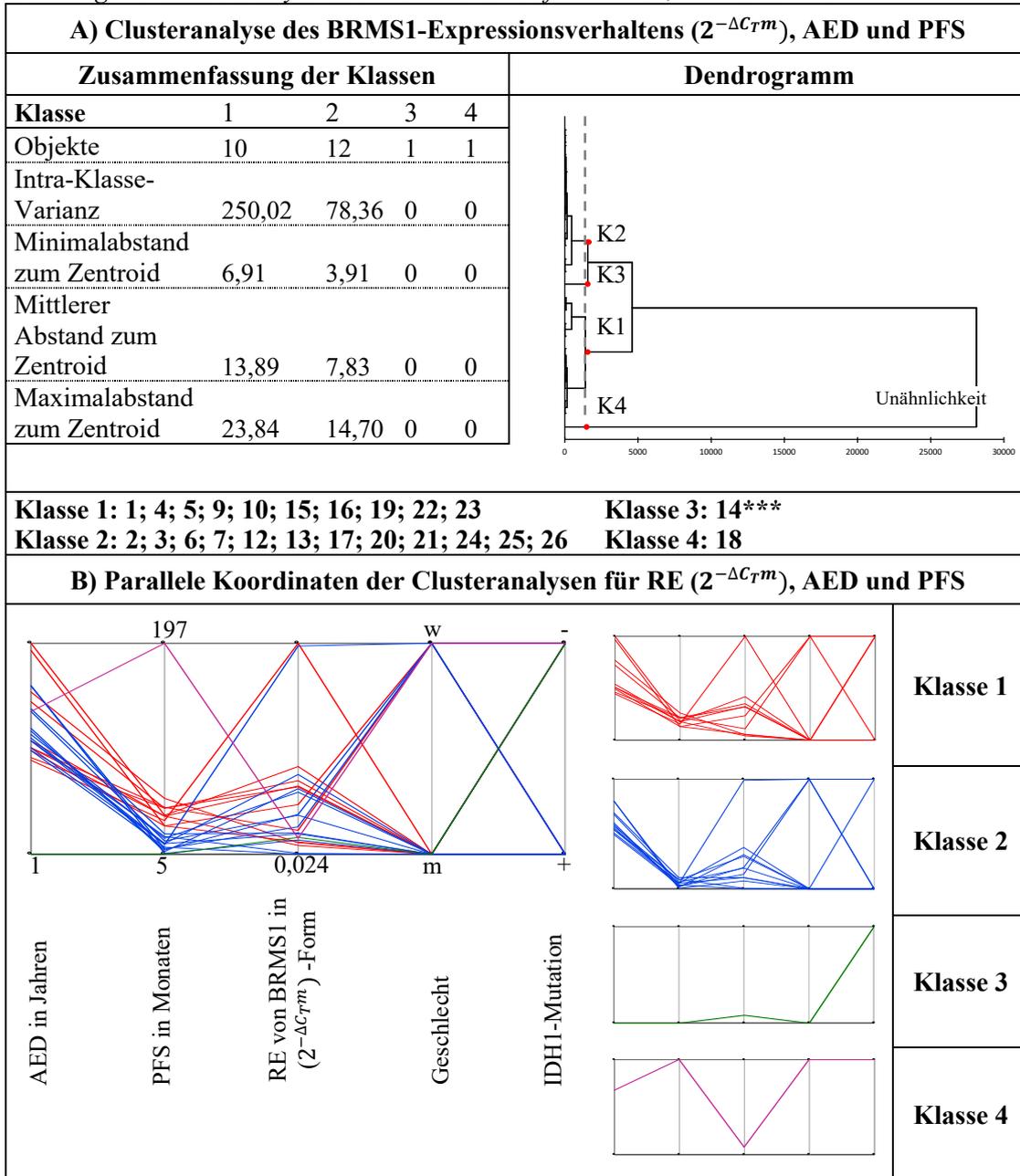
Analog zum vorherigen Abschnitt finden sich wie folgt eine Zusammenfassung der Expressionsanalysen der einzelnen Tumorproben (Abbildung 10), die Clusteranalysen von RE in $2^{-\Delta C_T^m}$ -Form mit dem AED und PFS (Abbildung 11) und die Clusteranalysen der Einzelbetrachtung von RE in $2^{-\Delta C_T^m}$ -Form (Abbildung 12).

Abbildung 10: Expressionsverhalten von BRMS1



A) Proteinexpression der Einzeltumoren in Relation zum Mittelwert (MW) der IDH1-mutierten Astrozytome ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form in schwarz bzw. zur endogenen Kontrolle ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form in grau (jeweils auf zwei Nachkommastellen gerundet), B) ΔC_{Tm} -Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Verlaufsgruppen, C) ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Boxplot, D) Deskriptive Statistik der Verlaufsgruppe E) ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Streudiagramm. Abkürzungen: (ΔC_{Tm}): gemittelter Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, (SD): Standardabweichung, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert, ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 11: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für BRMS1, AED und PFS

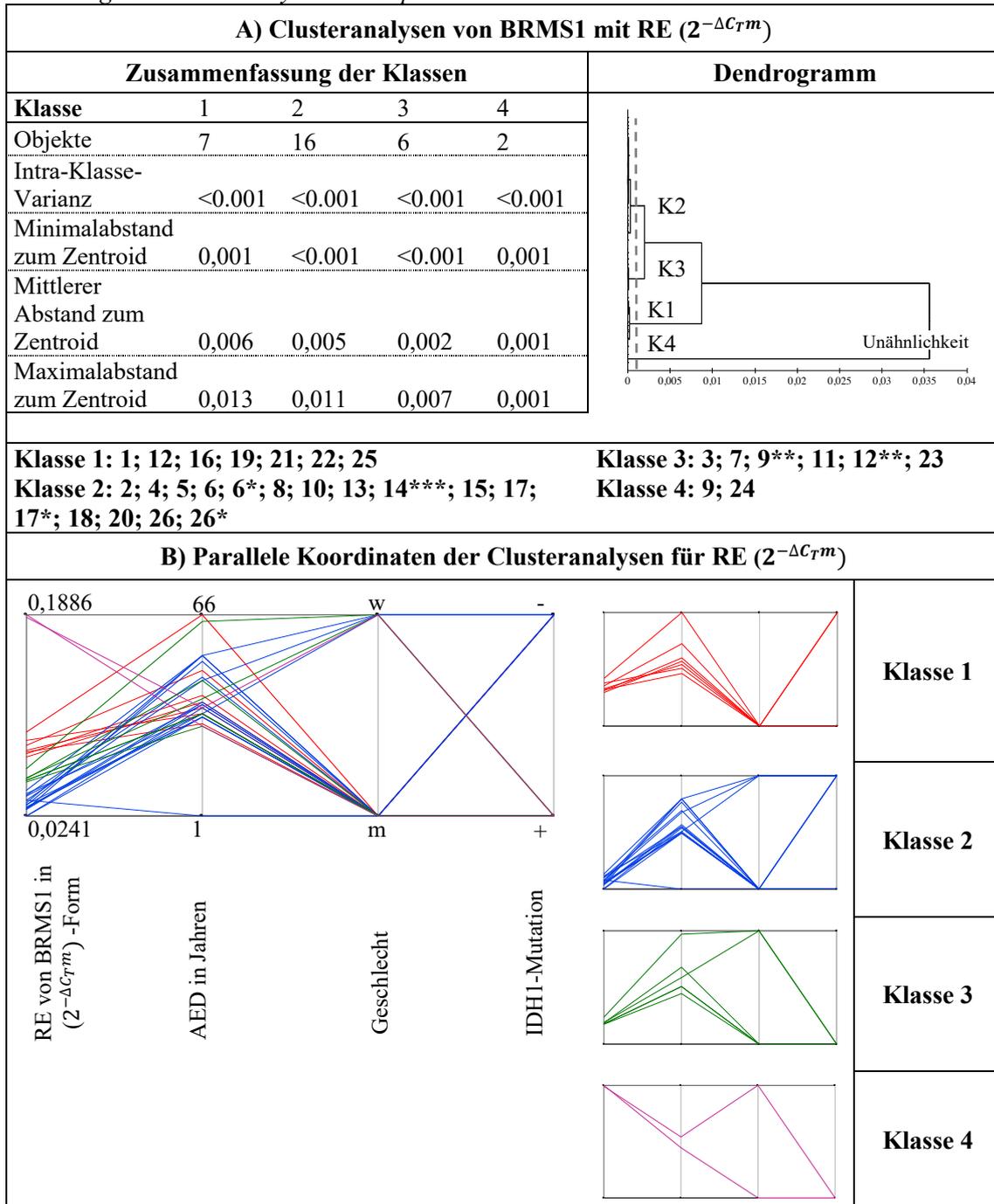


***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, Alter bei Erstdiagnose (AED) und progressionsfreies Überleben (PFS), statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 12: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von BRMS1



*Rezidiv als WHO° IV, **Rezidiv als WHO° II, ***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Bei der Untersuchung aller Tumورproben zeigte sich, dass die maximale relative

Expression von BRMS1 in Relation zu GAPDH 0,188-fach in der Probe des Vorläufertumors von Patient 9 war. Die meisten Expressionswerte lagen deutlich unter der 0,1-fachen Expression (Abbildung 10).

Die ΔC_{Tm} -Werte der Tumoren wurden in Relation zum Mittelwert der IDH1-mutierten LGA-Tumoren ($\Delta C_{Tm}=4,192$) gesetzt. Dadurch ist ersichtlich, dass im Durchschnitt die Mittelwerte der $2^{\Delta\Delta C_{Tm}}$ -Form von den Verläufen niedriger (0,72; n=5) als die des Mittelwertes der niedergradigen Tumoren (1,137; n=26) waren. In der detaillierten Betrachtung zeigte sich weiterhin, dass die Rezidive als GBM niedrigere Expressionswerte (0,557; n=3) als die LGA-Rezidive aufwiesen (0,964; n=2) (Abbildung 10).

Die Clusteranalyse, die auf der RE, dem PFS sowie dem AED basierte (Abbildung 11), unterschied zwischen 4 Klassen (Klasse 1 mit 10, Klasse 2 mit 12 und Klassen 3 und 4 mit je einem Patienten). Klassen 1, 2 und 3 wurden im Dendrogramm auf deutlich niedrigeren Ebenen zusammengefasst als Klasse 4. Wiederum sind hier Klasse 3 mit Patient 14 und Klasse 4 mit Patient 18 den übrigen Klassen 1 und 2 am unähnlichsten. Die isolierte Clusteranalyse des $2^{-\Delta C_{Tm}}$ -Expressionsverhaltens unterteilte 4 Klassen (Klasse 1 mit 7, Klasse 2 mit 16, Klasse 3 mit 6 und Klasse 4 mit 2 Patienten) (Abbildung 12). Die Werte der Patienten 9 und 24 in Klasse 4 waren den übrigen Tumoren am unähnlichsten, wobei Rezidivtumoren und Vorläufer bereits auf einer niedrigen Unähnlichkeitsstufe in gemeinsamen Gruppen zusammengefasst wurden.

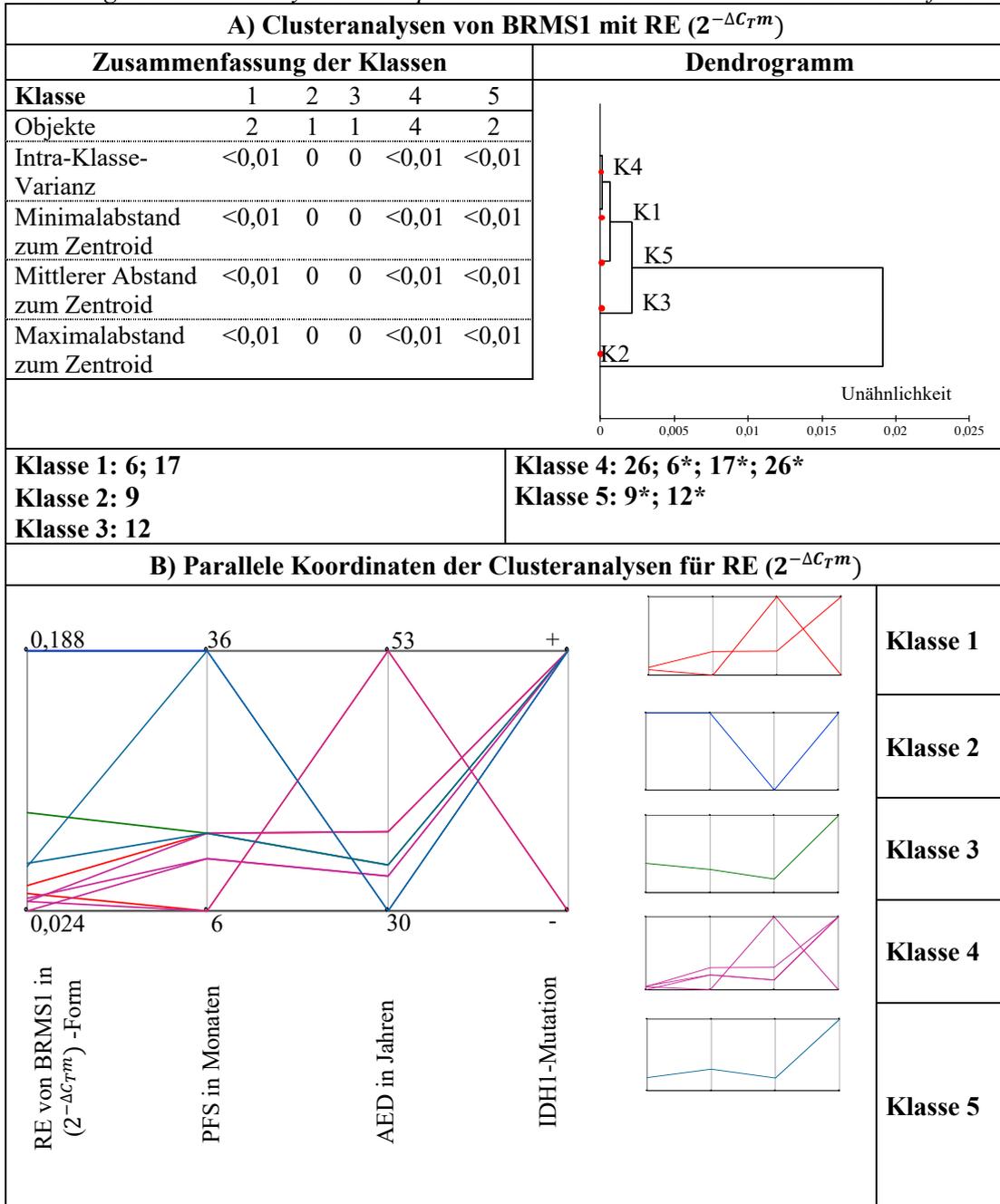
3.4.4 Verlaufsanalysen

Tabelle 14: Stichprobenanalysen der Verläufe von BRMSI

Relative Expression ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$) ($\Delta C_T(\text{Vorläufer})-\Delta C_T(\text{Rezidiv})$)					
Patient	6	9	12	17	26
	LGA-GBM	LGA-LGA	LGA-LGA	LGA-GBM	LGA-GBM
RE	1,35	3,61	1,61	1,17	0,75
Stichprobenanalysen					
Verläufe LGA-LGA im Vergleich zu den Verläufen LGA-GBM					
Verläufe	MW	Vorzeichentest (zweiseitig)		Wilcoxon-Rang-Test (zweiseitig)	
		p-Wert	Varianz	p-Wert	Varianz
LGA-LGA n=2	2,61	1,0	0,75	0,75	3,5
LGA-GBM n=3	1,09				

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_T^m}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (ΔC_T): relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 13: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von BRMS1 mit den Verlaufswerten



*Rezidivtumoren

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K5): Klasse(n) 1 bis 5, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Bis auf Patient 26 mit einer RE von 0,75 wiesen die übrigen Patienten eine höhere Expression in den Verläufen gegenüber den Rezidivtumoren auf. Dies könnte als Hinweis dienen, dass die BRMS1-Genexpression in den Rezidivtumoren abnahm. Die niedrigen Stichprobenwerte der LGA-LGA- bzw. LGA-GBM-Verläufe zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 14). Die Clusteranalysen bildeten auf Basis der ΔC_{Tm} -Expressionsrate 5 Klassen (Klasse 1 mit 2, Klassen 2 und 3 mit jeweils 1, Klasse 4 mit 4 und Klasse 5 mit 2 Patienten) (Abbildung 13). Im Dendrogramm zeigte sich Klasse 2 mit Patient 9 den übrigen Tumoren aufgrund der hohen Expression am unähnlichsten. Auf Basis der Expression wurden die Tumoren nicht nach Rezidiv und Vorläufer unterschieden.

3.4.5 Zusammenfassende Ergebnisse der BRMS1-Untersuchung

BRMS1 schien für die ΔC_{Tm} -Werte normalverteilt. Die Kointegrationsanalysen waren nicht signifikant und hatten hohe Varianzwerte (Tabelle 14). Keine Korrelationen der RE-Wertepaare mit den klinischen Daten waren signifikant (Tabelle 13). BRMS1 lag in den untersuchten Proben gering exprimiert vor. Zwei Tumoren mit dennoch niedriger Expression gegenüber GAPDH wiesen Ausreißerwerte auf, die im Vergleich zu den übrigen Proben erhöht waren. In vier von fünf Verläufen waren die Vorläufertumoren etwas stärker, das fünfte Verlaufspaar etwas schwächer als die jeweiligen Rezidive exprimiert.

3.5 ATF5

3.5.1 Regressionsanalysen

Tabelle 15: Kointegrationsanalysen für ATF5

Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS n=17							
	Lineare Modellanpassung= $31,33-49,12x$					p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (PFS)	0,24
y-Wert	31,33	4,47	7,01	0,000004	178,54	Unit Root Test (C_{Tm})	0,05
x-Wert	-49,12	29,23	-1,68	0,11		Unit Root Test (z)	0,24
Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und OS n=7							
	Lineare Modellanpassung= $457828+7,03x$					p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (OS)	0,34
y-Wert	45,78	12,64	3,62	0,015	451	Unit Root Test (C_{Tm})	0,14
x-Wert	7,03	73,68	0,10	0,93		Unit Root Test (z)	0,34

z als Daten der Kointegrationsanalyse: Funktion $f(x)=[x,x(\text{Steigung } x)]/\text{pfs}-C_{Tm}$
 Unit Root Test mit H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und ist nicht stationär, und H_1 , es liegt keine Einheitswurzel vor. Signifikanzlevel 0,05. Bei $p < 0,05$ kann die Nullhypothese verworfen und Stationarität nachgewiesen werden. Weitere Abkürzungen: (C_{Tm}): gemittelter C_T -Wert, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (x- bzw. y-Wert): Variablen zur Beschreibung einer Geraden, (z): modellierte Kointegrationsfunktion, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Die x- und y-Werte für die Modellierung der Daten zwischen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS zeigten relativ niedrige p-Werte, wobei der x-Wert jedoch nicht signifikant war. Die relativ hohen Varianzen in beiden Modellierungen wiesen jedoch darauf hin, dass eine Kointegration mit diesen Daten eher unwahrscheinlich war.

3.5.2 Korrelationsanalysen

In Nähe eines höheren Akzeptanzwertes für das Signifikanzniveau von 10% fanden sich Korrelationen zwischen OS und AED (-0,549; $p=0,126$) sowie OS und PFS (0,565; $p=0,113$) nach Pearson und PFS und OS (0,594; $p=0,108$) nach Spearman innerhalb aller LGA-Expressionsdaten (Tabelle 16).

Bei der ATF5-Expression war mit den Daten aller LGA-Tumoren ein Zusammenhang zwischen der Expression und den Variablen eher unwahrscheinlich. Der niedrigste Wert fand sich nach Kendall zwischen RE und PFS (-0,197; $p=0,188$).

Wurden lediglich die Daten der IDH1-mutierten LGA-Tumoren betrachtet, fanden sich wahrscheinliche, mögliche Zusammenhänge zwischen RE und PFS nach Pearson (-0,398; $p=0,114$), RE und PFS nach Spearman (-0,382; $p=0,131$) sowie RE und PFS nach Kendall (-0,324; $p=0,077$). Letzteres Paar war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% signifikant.

Tabelle 16: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von ATF5

Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) n=26								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,002	0,994	-0,137	0,726	-0,174	0,415
AED	0,002	0,994	1	0	-0,549	0,126	0,162	0,450
OS	-0,137	0,726	-0,549	0,126	1	0	0,565	0,113
PFS	-0,174	0,415	0,162	0,450	0,565	0,113	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,031	0,883	-0,083	0,843	-0,253	0,233
AED	0,031	0,883	1	0	-0,377	0,313	0,060	0,782
OS	-0,083	0,843	-0,377	0,313	1	0	0,594	0,108
PFS	-0,253	0,233	0,060	0,782	0,594	0,108	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,007	0,981	-0,111	0,737	-0,197	0,188
AED	0,007	0,981	1	0	-0,310	0,295	0,033	0,842
OS	-0,111	0,737	-0,310	0,295	1	0	0,366	0,208
PFS	-0,197	0,188	0,033	0,842	0,366	0,208	1	0
Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) mit positiver IDH1-Mutation n=17, ohne Pat. 14								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,086	0,744	0,043	0,928	-0,398	0,114
AED	-0,086	0,744	1	0	-0,126	0,788	0,291	0,257
OS	0,043	0,928	-0,126	0,788	1	0	0,328	0,473
PFS	-0,398	0,114	0,291	0,257	0,328	0,473	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,044	0,869	0,214	0,662	-0,382	0,131
AED	-0,044	0,869	1	0	0,179	0,713	0,174	0,503
OS	0,214	0,662	0,179	0,713	1	0	0,357	0,444
PFS	-0,382	0,131	0,174	0,503	0,357	0,444	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,029	0,902	0,143	0,764	-0,324	0,077
AED	-0,029	0,902	1	0	0,143	0,764	0,118	0,537
OS	0,143	0,764	0,143	0,764	1	0	0,143	0,764
PFS	-0,324	0,077	0,118	0,537	0,143	0,764	1	0

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (Pat.): Patient, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

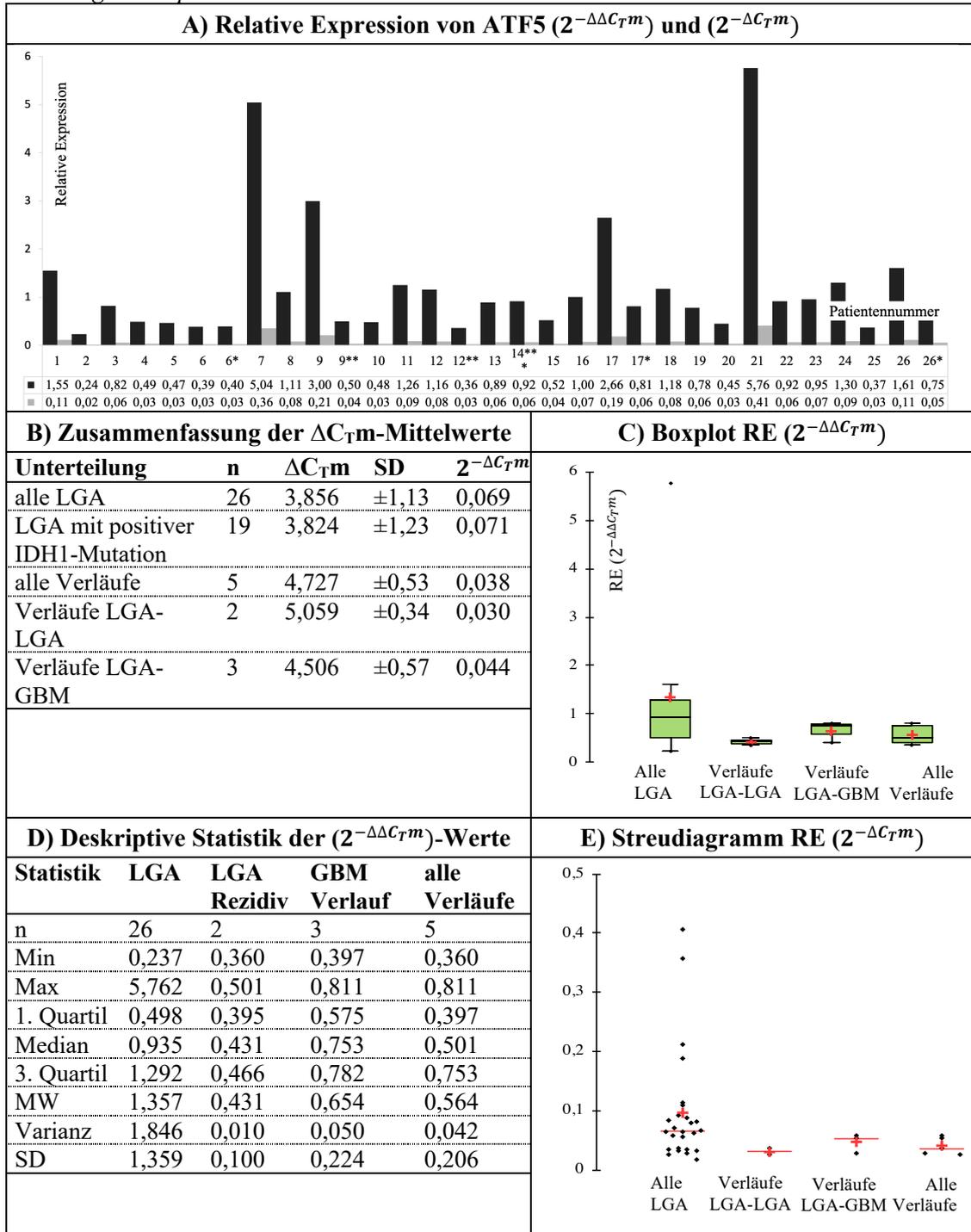
3.5.3 Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen

Die Expression von ATF5 in Relation zu GAPDH hatte maximal eine 0,407-fache Differenz bei Patient 21 (Abbildung 14). Mit Ausnahme einer Tumorprobe lag die $2^{-\Delta C_{Tm}}$ -Expression generell eher unter 0,1. Wurden die Tumorproben in Relation zum Mittelwert der IDH1-mutierten LGA ($\Delta C_{Tm}=3,824$) gesetzt, zeigten die Mittelwerte aller Verläufe eine tendenziell niedrigere Expression ($\Delta C_{Tm}=4,727$). Unterteilte man die Verlaufsproben noch weiter, wiesen die LGA-LGA-Verläufe minimal niedrigere

Expressionsdaten als die LGA-GBM-Verläufe (0,03 vs. 0,044) auf.

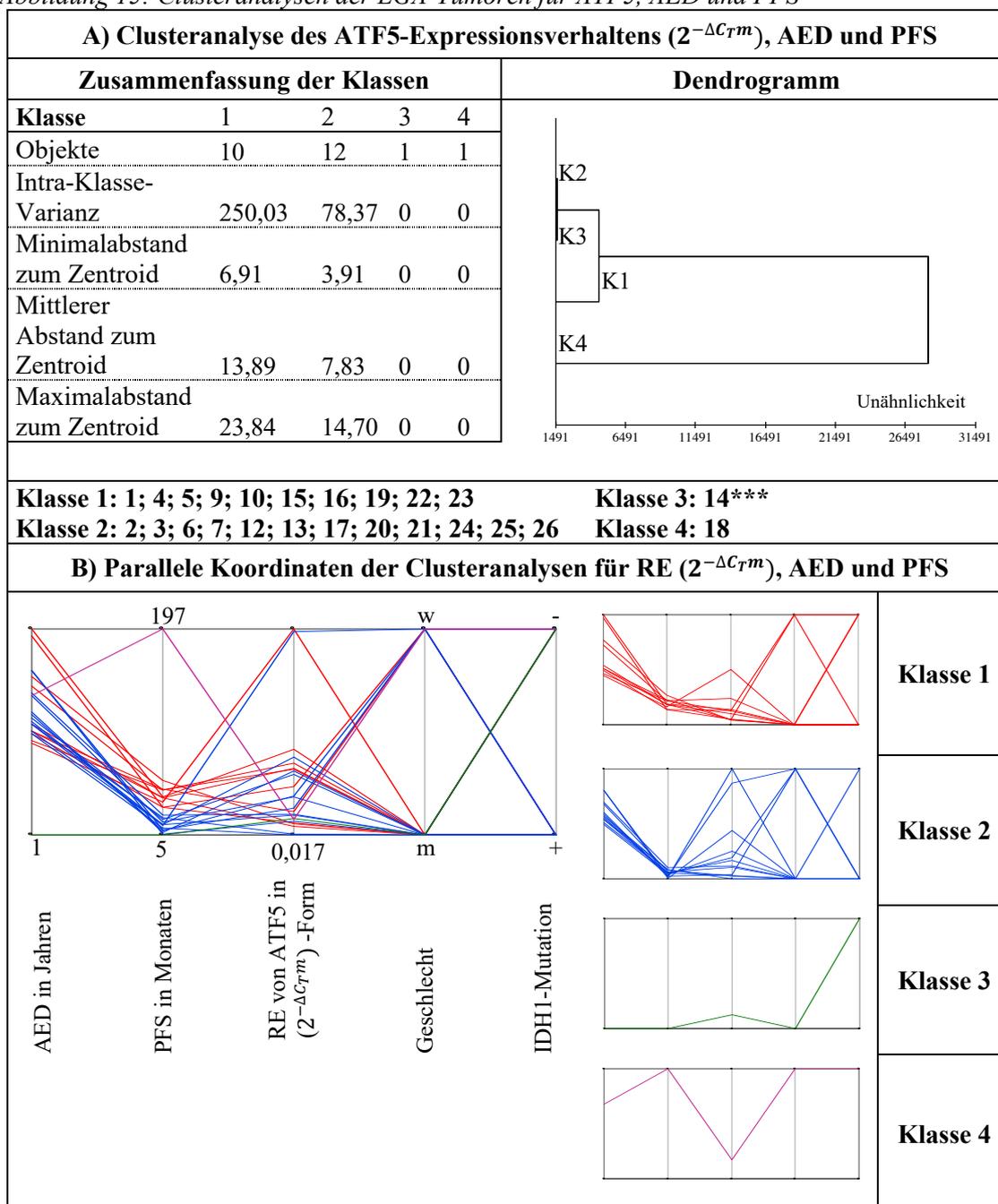
Durch die Clusteranalysen wurden 4 Klassen (Klasse 1 mit 10, Klasse 2 mit 12, Klassen 3 und 4 mit jeweils 1 Patienten) gebildet (Abbildung 15). Aufgrund des hohen Wertes für das PFS war Klasse 4 mit Patient 18 den übrigen Tumoren am unähnlichsten. Ähnlich verhielt sich Klasse 3 mit Patient 14 und einem niedrigen AED. Die parallelen Daten teilten die übrigen Tumoren in etwa gleich große Gruppen ein, die als Klasse 1 bzw. 3 zusammengefasst wurden. Das Dendrogramm ergab, dass sich die Mehrzahl der Tumorproben der Klassen 1, 2 und 3 in ihrem Expressionsverhalten ähnlicher als Klassen 4 und 5 waren (Abbildung 16).

Abbildung 14: Expressionsverhalten von ATF5



A) Proteinexpression der Einzeltumoren in Relation zum Mittelwert (MW) der IDH1-mutierten Astrozytome ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form in schwarz bzw. zur endogenen Kontrolle ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form in grau, B) ΔC_{Tm} -Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Verlaufsgruppen, C) ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Boxplot, D) Deskriptive Statistik der Verlaufsgruppe E) ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Streudiagramm. Abkürzungen: (ΔC_{Tm}): gemittelter relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, (SD): Standardabweichung, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert, ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 15: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für ATF5, AED und PFS

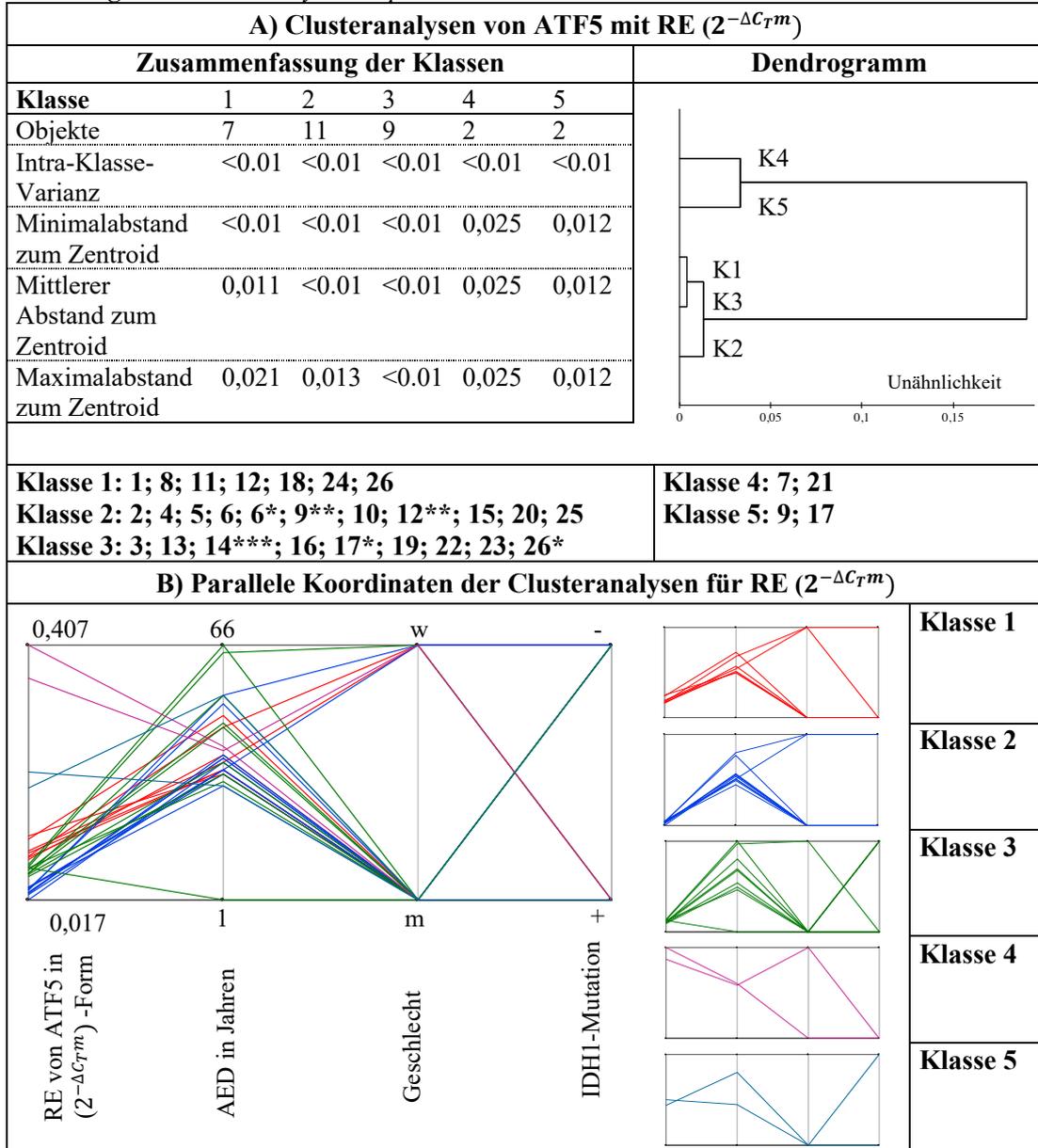


***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, Alter bei Erstdiagnose (AED) und progressionsfreies Überleben (PFS), statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 16: Clusteranalysen Expressionsverhalten ATF5



*Rezidiv als WHO° IV, **Rezidiv als WHO° II, ***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_T^m}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K5): Klasse(n) 1 bis 5, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_T^m}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.5.4 Verlaufsanalysen

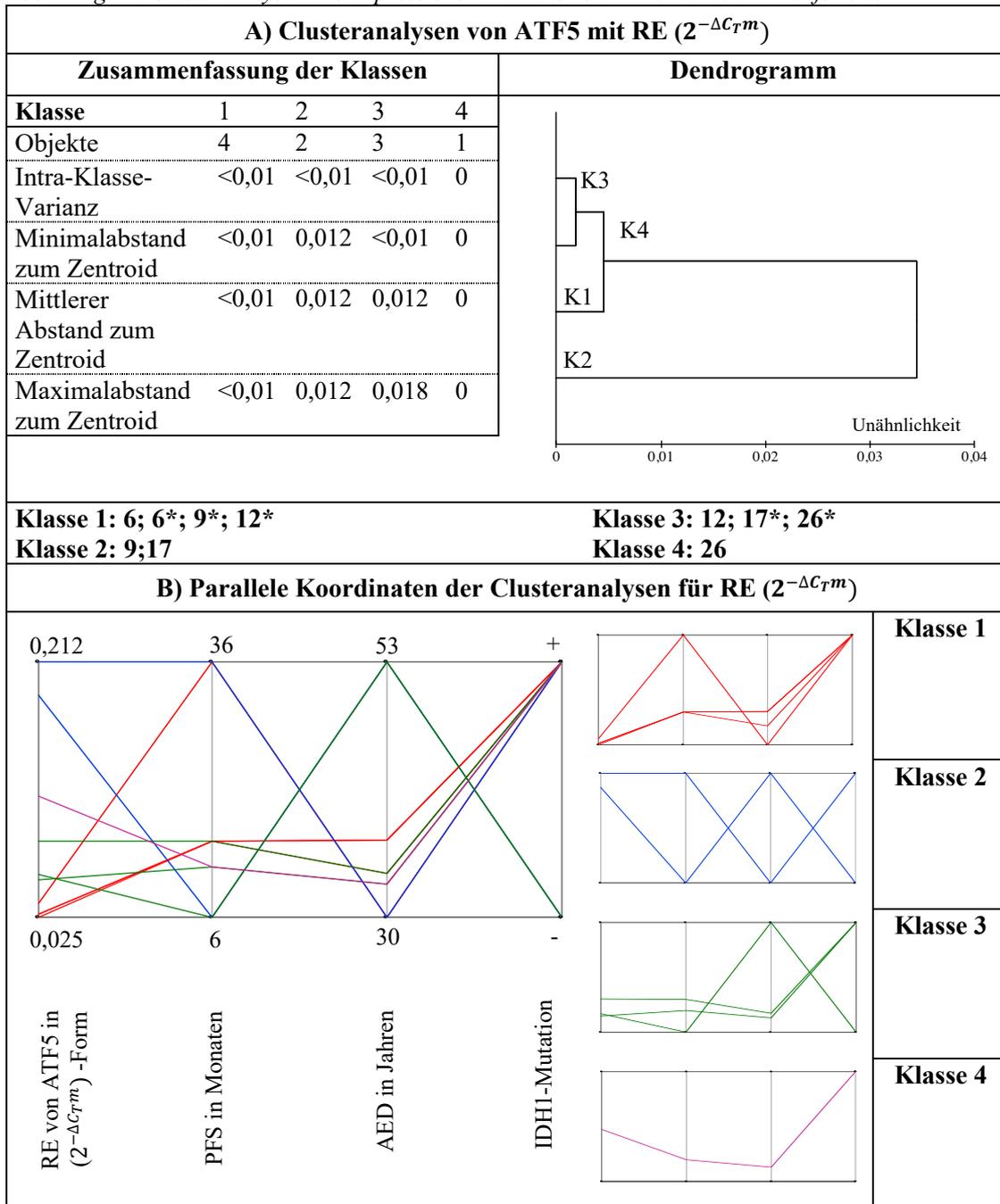
ATF5 zeigte in Relation zur internen Kontrolle bei den LGA eine größere Expression als bei den Rezidiven mit Ausnahme von Patient 6 (RE von 0,98) (Tabelle 17). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die ATF5-Genexpression in den Rezidiven abnahm. Diese Aussage konnte jedoch nicht bestätigt werden, wurden die Tumoraare nach LGA-LGA- bzw. LGA-GBM-Verläufen unterteilt, deren Mittelwerte sich nicht signifikant unterschieden. Die Tumorproben wurden in 4 Klassen (Klasse 1 mit 4, Klasse 2 mit 2, Klasse 3 mit 3 und Klasse 4 mit 1 Patienten) eingeteilt (Abbildung 17). Tumorproben wurden nicht nach Vorläufer und Rezidiven geclustert, sondern es unterschied sich vor allem Klasse 2 mit den Patienten 9 und 17 von den übrigen Klassen.

Tabelle 17: Stichprobenanalysen der Verläufe von ATF5

Relative Expression ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$) ($\Delta C_T(\text{Vorläufer})-\Delta C_T(\text{Rezidiv})$)					
Patient	6	9	12	17	26
	LGA-GBM	LGA-LGA	LGA-LGA	LGA-GBM	LGA-GBM
RE	0,98	5,98	3,21	3,28	2,14
Stichprobenanalysen					
Verläufe LGA-LGA im Vergleich zu den Verläufen LGA-GBM					
Verläufe	MW	Vorzeichentest (zweiseitig)		Wilcoxon-Rang-Test (zweiseitig)	
		p-Wert	Varianz	p-Wert	Varianz
LGA-LGA n=2	4,59	1,0	0,75	0,75	3,5
LGA-GBM n=3	2,13				

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_T^m}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Abkürzungen: (ΔC_T): relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 17: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von ATF5 mit den Verlaufswerten



A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm
 B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.
 Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K4): Klasse(n) 1 bis 4, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.5.5 Zusammenfassende Ergebnisse der ATF5-Untersuchung

Die Daten für ATF5 lagen nur in der ΔC_{Tm} -Form normalverteilt vor. Aufgrund der hohen Varianz- und Standardfehlerwerte konnte für ATF5 eine Kointegration als eher

unwahrscheinlich beschrieben werden (Tabelle 15). Ein Wert der Korrelationskoeffizienten war mit einer höheren Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% bei den LGA-Expressionsdaten nach Kendall negativ gut korreliert. Die Expressionsraten waren mit einzelnen Ausreißerwerten eher uneinheitlich verteilt, wobei sich in diesen Daten hochgradige Tumoren nicht wesentlich von den LGA unterschieden, die als Referenz gesetzt wurden. In vier von fünf Tumorkombinationen war die ATF5-Expression in den Vorläufertumoren höher als in den Rezidiven exprimiert, im letzteren Paar etwa gleich stark. Die Unähnlichkeitslevel der Vergleichswerte waren sehr niedrig.

3.6 TTK

3.6.1 Regressionsanalysen

Tabelle 18: Kointegrationsanalysen für TTK

Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und PFS n=16							
Lineare Modellanpassung=29,93-613,47x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (PFS)	0,25
y-Wert	29,93	3,54	8,45	0,000001	165,5	Unit Root Test (C_{Tm})	0,001
x-Wert	-613,47	343,77	-1,78	0,10		Unit Root Test (z)	0,25
Kointegrationsanalysen $2^{-\Delta C_{Tm}}$ und OS n=7							
Lineare Modellanpassung=50,53-430,95x						p-Wert Modell z*	
	Schätzwert	Standardfehler	t-Statistik	p-Wert	Varianz	Unit Root Test (OS)	0,34
y-Wert	50,53	9,31	5,43	0,0029	410	Unit Root Test (C_{Tm})	0,05
x-Wert	-430,95	599,26	-0,72	0,50		Unit Root Test (z)	0,34

z als Daten der Kointegrationsanalyse: Funktion $f(x)=[x, x^(\text{Steigung } x)]/\text{pfs} - C_{Tm}$

Unit Root Test mit H_0 , es liegt eine Einheitswurzel vor und ist nicht stationär, und H_1 , es liegt keine Einheitswurzel vor. Signifikanzlevel 0,05. Bei $p < 0,05$ kann die Nullhypothese verworfen und Stationarität nachgewiesen werden.

Weitere Abkürzungen: (C_{Tm}): gemittelter C_T -Wert, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben, (x- bzw. y-Wert): Variablen zur Beschreibung einer Geraden, (z): modellierte Kointegrationsfunktion, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Die Kointegrationsanalysen hatten für beide Modellierungen relativ hohe Varianzwerte (165,5 und 410), die angenommenen x-bzw. y-Werte von $2^{-\Delta C_{Tm}}$ mit dem PFS wiesen niedrige p-Werte auf. Dennoch fand sich in beiden Modellen ein relativ hoher Standardfehler, so dass eine mögliche Kointegration kritisch betrachtet werden muss.

3.6.2 Korrelationsanalysen

Tabelle 19: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von TTK

Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) n=24								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,072	0,745	-0,240	0,535	-0,325	0,140
AED	-0,072	0,745	1	0	-0,549	0,126	0,226	0,311
OS	-0,240	0,535	-0,549	0,126	1	0	0,565	0,113
PFS	-0,325	0,140	0,226	0,311	0,565	0,113	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,169	0,439	-0,450	0,230	-0,191	0,393
AED	0,169	0,439	1	0	-0,377	0,313	0,030	0,896
OS	-0,450	0,230	-0,377	0,313	1	0	0,594	0,108
PFS	-0,191	0,393	0,030	0,896	0,594	0,108	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,145	0,354	-0,444	0,097	-0,074	0,651
AED	0,145	0,354	1	0	-0,310	0,295	0,031	0,865
OS	-0,444	0,097	-0,310	0,295	1	0	0,366	0,208
PFS	-0,074	0,651	0,031	0,865	0,366	0,208	1	0
Korrelationen aller LGA Expressionsdaten ($2^{-\Delta C_{Tm}}$) mit positiver IDH1-Mutation n=16, ohne Pat. 14								
Pearson	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	-0,187	0,488	-0,306	0,504	-0,430	0,096
AED	-0,187	0,488	1	0	-0,126	0,788	0,310	0,242
OS	-0,306	0,504	-0,126	0,788	1	0	0,328	0,473
PFS	-0,430	0,096	0,310	0,242	0,328	0,473	1	0
Spearman	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,076	0,780	-0,286	0,556	-0,235	0,379
AED	0,076	0,780	1	0	0,179	0,713	0,241	0,367
OS	-0,286	0,556	0,179	0,713	1	0	0,357	0,444
PFS	-0,235	0,379	0,241	0,367	0,357	0,444	1	0
Kendall	RE	p-Wert	AED	p-Wert	OS	p-Wert	PFS	p-Wert
RE	1	0	0,067	0,753	-0,333	0,368	-0,117	0,558
AED	0,067	0,753	1	0	0,143	0,764	0,183	0,344
OS	-0,333	0,368	0,143	0,764	1	0	0,143	0,764
PFS	-0,117	0,558	0,183	0,344	0,143	0,764	1	0

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta C_{Tm}}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Weitere Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (OS): Gesamtüberleben, (PFS): progressionsfreies Überleben.

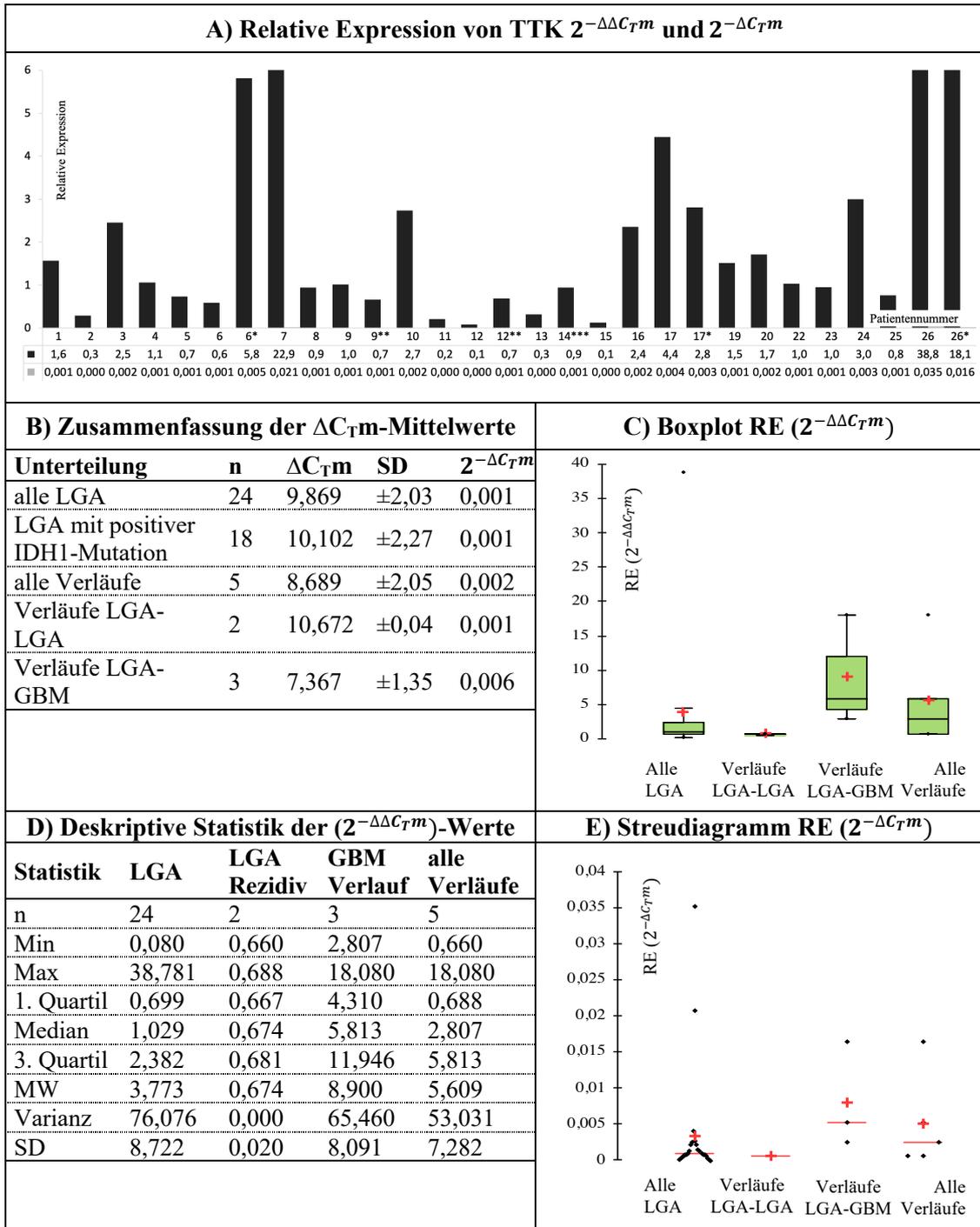
Wurde eine höhere Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% akzeptiert, fanden sich signifikante Ergebnisse für einen möglichen, negativen Zusammenhang zwischen OS und RE (-0,444; p=0,097) in der Korrelation aller Expressionsdaten nach Kendall. Diese Korrelation konnte in der Untergruppe der IDH1-mutierten LGA nicht bestätigt werden. In letzterer Gruppe fand sich jedoch nach Pearson ein signifikanter, negativer Zusammenhang zwischen RE und PFS (-0,43; p=0,096).

3.6.3 Expressionsverhalten und Ähnlichkeitsanalysen

Die Tumoren zeigten maximal eine 0,035-fache Expression für TTK bei Patient 26 in Relation zu GAPDH (Abbildung 18). In den übrigen Tumoren fand sich das Zielgen im Bereich 1:1000 exprimiert. Ausnahmen bildeten Patient 7 und beide Tumoren von Patient 26.

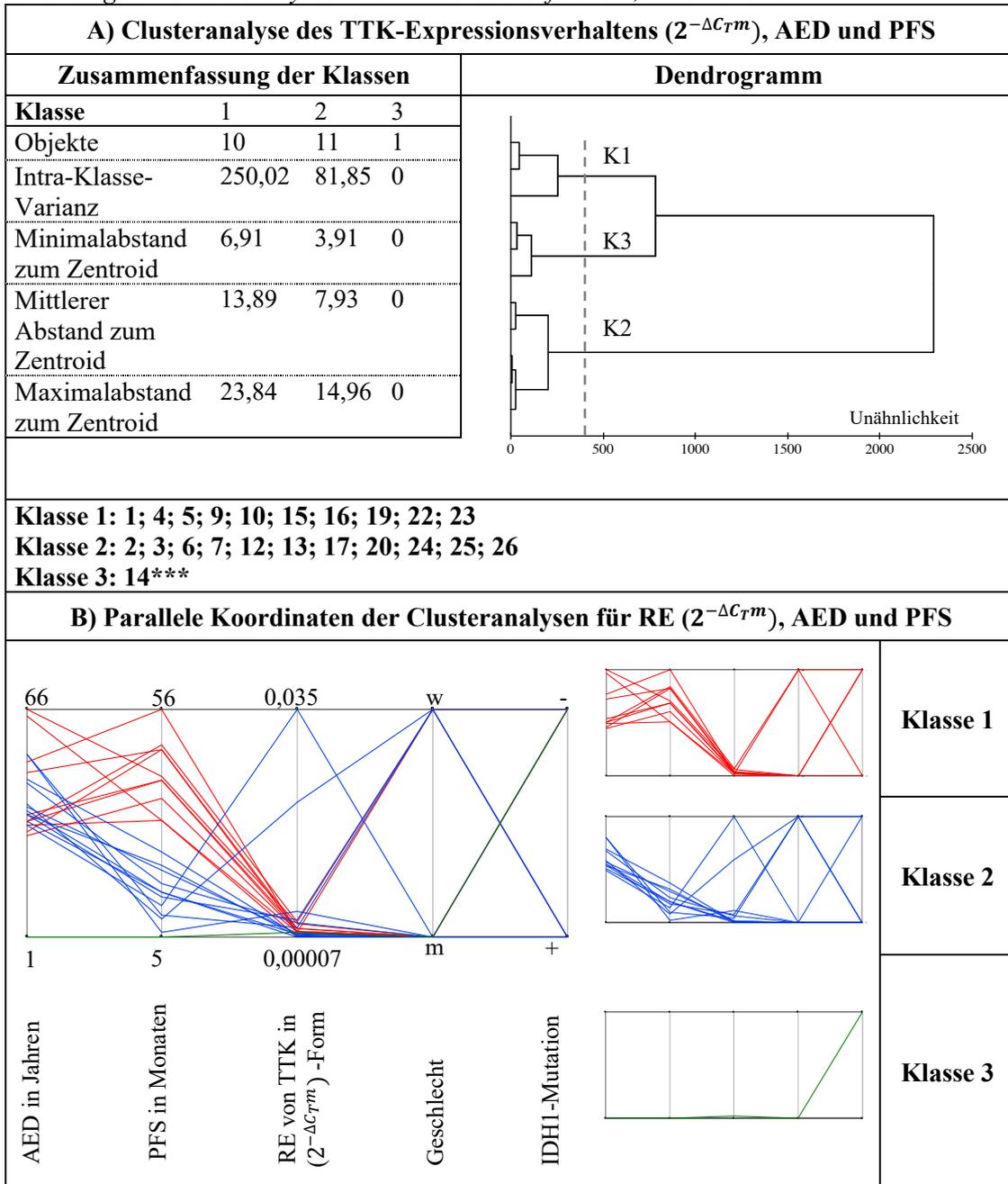
Die ΔC_{Tm} -Werte der Tumoren wurden in Relation zum Mittelwert der IDH1-mutierten LGA-Tumoren ($\Delta C_{Tm}=10,102$) gesetzt. Die Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$ -Form zeigten bei den Verläufen im Durchschnitt etwas höher Werte (0,002; n=5). Genauer gesehen waren es vor allem die LGA-GBM-Verläufe, welche im Durchschnitt minimal höhere Expressionswerte hatten (0,006; n=3), bei beiden LGA-LGA-Verläufen traf dies nicht zu (0,001; n=2). Durch die Clusteranalysen (kombinierte Betrachtung von RE, PFS und AED) konnten 3 Klassen gebildet werden (Klasse 1 mit 10, Klasse 2 mit 11 und Klasse 3 mit 1 Patienten) (Abbildung 19). Es wurden zwei ähnliche Gruppen, Klasse 1 und 2, gebildet. Patient 14 (AED=1 Jahr) bildete als pilozytisches Astrozytom eine eigene Gruppe. Die Clusteranalysen, welche nur auf die RE basierten, zeigten, dass die Tumoren in fünf ähnliche Gruppen (Klasse 1 mit 19, Klasse 2 mit 7 und Klassen 3 bis 5 mit jeweils 1 Patienten) unterteilt werden konnten. Dabei unterschieden sich die Gruppen 1 und 2 deutlicher von 3, 4 und 5 (Abbildung 20).

Abbildung 18: Expressionsverhalten von TTK



A) Proteinxpression der Einzel Tumoren in Relation zum Mittelwert (MW) der IDH1-mutierten Astrozytome ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$)-Form in schwarz bzw. zur endogenen Kontrolle ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form in grau (Patient 26 ist nicht komplett abgebildet), B) ΔC_{Tm} -Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) der Verlaufsgruppen, C) $2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$ -Form visualisiert als Streudiagramm, D) Deskriptive Statistik der Verlaufsgruppen E) ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form visualisiert als Streudiagramm. Abkürzungen: (ΔC_{Tm}): gemittelter relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, (SD): Standardabweichung, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert, ($2^{-\Delta\Delta C_{Tm}}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 19: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für TTK, AED und PFS

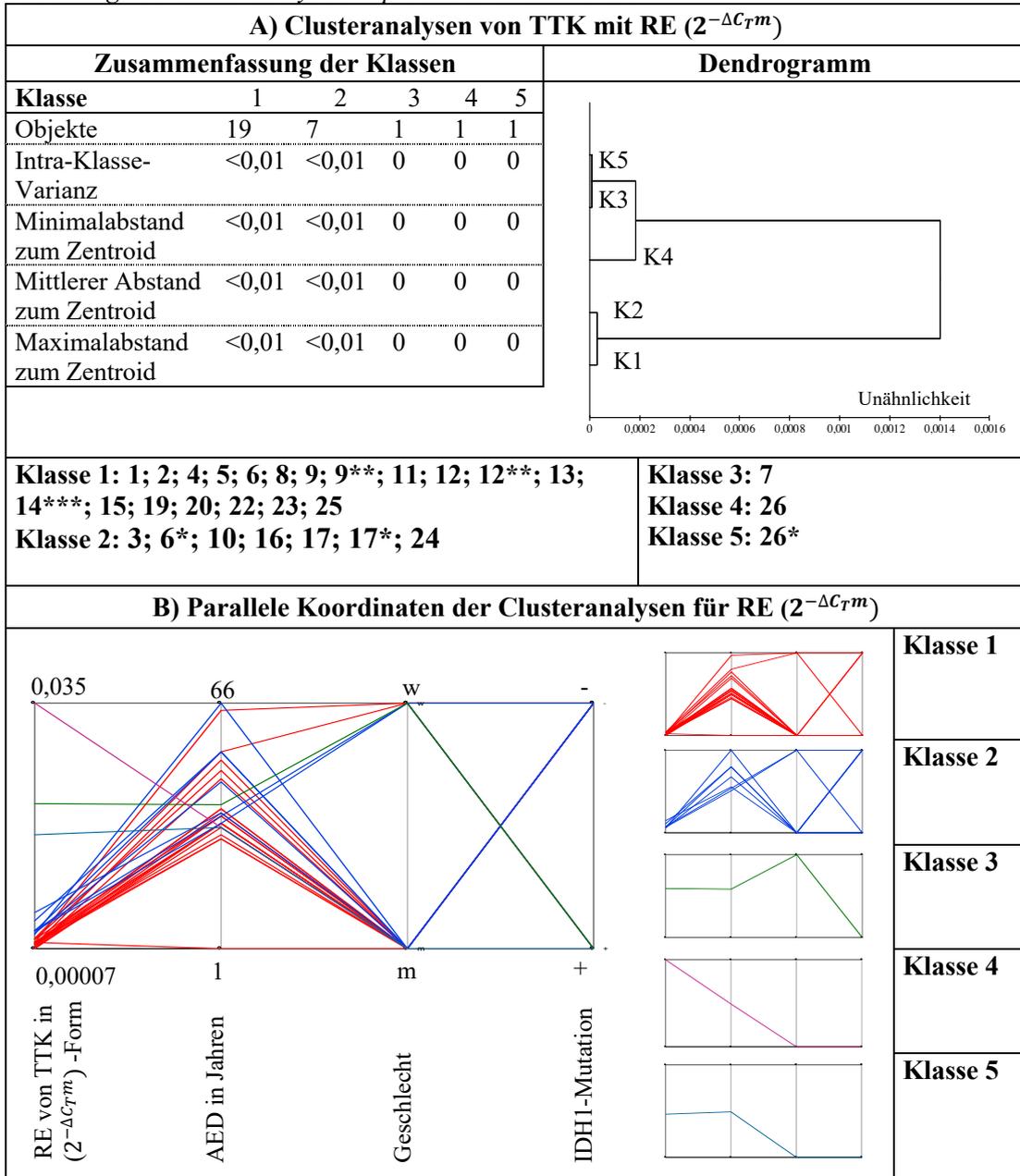


***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, Alter bei Erstdiagnose (AED) und progressionsfreies Überleben (PFS), statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm, B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K3): Klasse(n) 1 bis 3, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (m): männlich, (PFS): progressionsfreies Überleben, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 20: Clusteranalysen Expressionsverhalten von TTK



*Rezidiv als WHO° IV, **Rezidiv als WHO° II, ***Pilozytisches Astrozytom

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_T^m}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K5): Klasse(n) 1 bis 5, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_T^m}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.6.4 Verlaufsanalysen

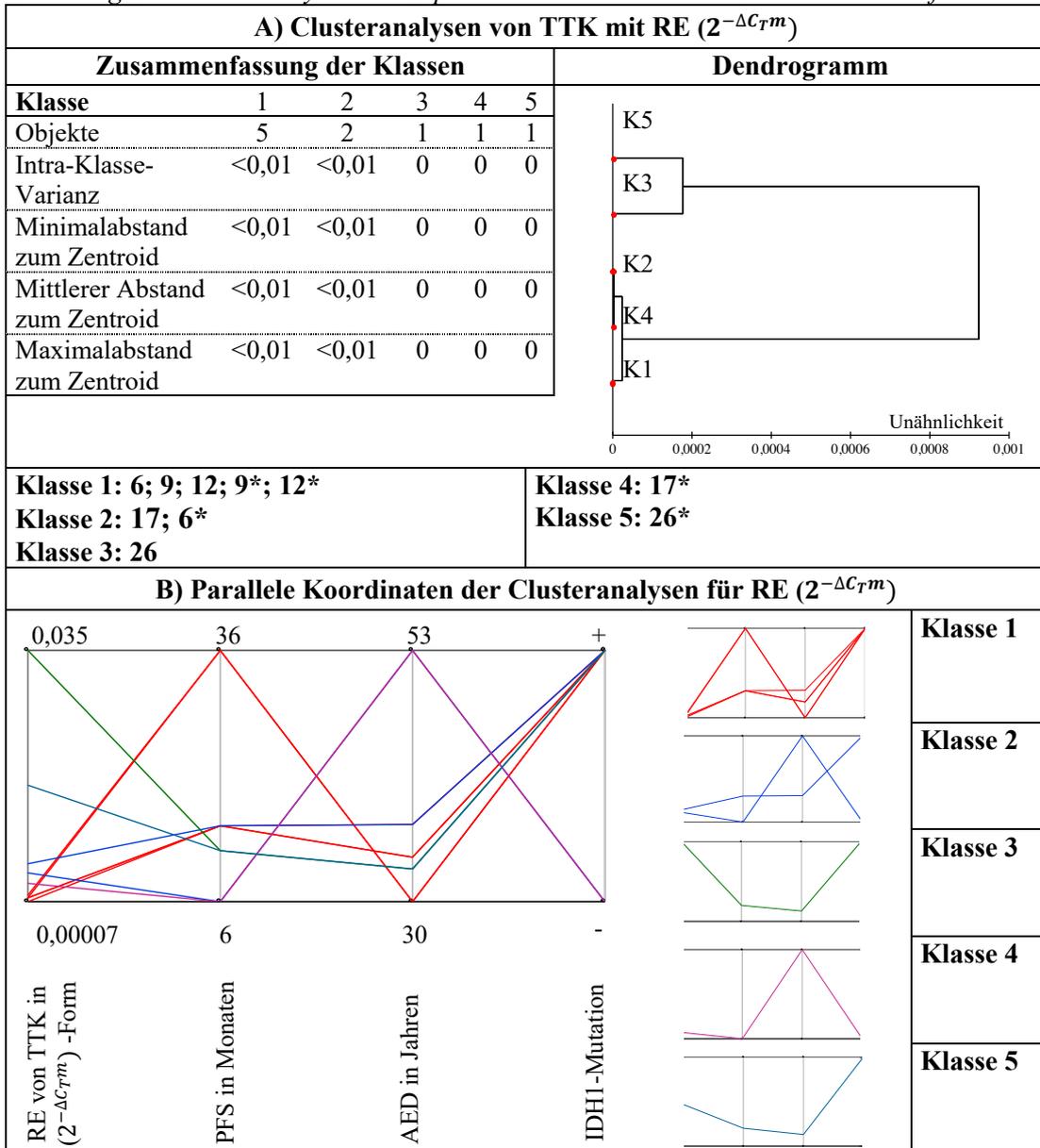
Die Mittelwerte der Verläufe erwecken bei der TTK-Expression den Eindruck, dass sie in Relation zur internen Kontrolle der LGA in der Gruppe der LGA-LGA niedriger als in der Gruppe der LGA-GBM war (Tabelle 20). Die statistische Untersuchung der Mittelwerte war jedoch nicht signifikant. In der RE der Einzelverläufe zeigte sich die Gruppe der LGA-LGA-Verläufe sehr inhomogen (0,12 und 1,54). Ähnliches konnte für die LGA-GBM-Verläufe beschrieben werden. Die Clusteranalysen ergaben, dass sich die Gruppen 1, 2 und 4 einheitlicher als die Gruppen 3 und 5 waren, die durch den Vorläufer- bzw. Rezidivtumor von Patient 26 gebildet wurden (Abbildung 21).

Tabelle 20: Stichprobenanalysen der Verläufe von TTK

Relative Expression ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$) ($\Delta C_T(\text{Vorläufer})-\Delta C_T(\text{Rezidiv})$)					
Patient	6	9	12	17	26
	LGA-GBM	LGA-LGA	LGA-LGA	LGA-GBM	LGA-GBM
RE	0,10	1,54	0,12	1,58	2,14
Stichprobenanalysen					
Verläufe LGA-LGA im Vergleich zu den Verläufen LGA-GBM					
Verläufe	MW	Vorzeichentest (zweiseitig)		Wilcoxon-Rang-Test (zweiseitig)	
		p-Wert	Varianz	p-Wert	Varianz
LGA-LGA n=2	0,83	1,0	0,75	0,5	3,5
LGA-GBM n=3	1,28				

Korrelationsanalyse mit H_0 , die Korrelationskoeffizienten sind 0, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$. Relative Expression (RE) in $2^{\Delta\Delta C_T^m}$ -Form. Fehlende Datenpunkte wurden paarweise gelöscht. Korrelationskoeffizienten (Pearson/Spearman/Kendall) im Bereich von -1 als perfekt negative, 0 als keine bzw. +1 als perfekt positive Korrelation. Weitere Abkürzungen: (ΔC_T): relativer Schwellenwertzyklus, (GBM): Glioblastoma multiforme, (LGA): niedriggradiges Astrozytom, (MW): Mittelwert, (n): Anzahl, (RE): relative Expression, ($2^{-\Delta\Delta C_T^m}$): zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert.

Abbildung 21: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von TTK mit den Verlaufswerten



*Rezidivtumoren

A) Clusterbildung der Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der relativen Expression (RE) in ($2^{-\Delta C_{Tm}}$)-Form, statistische Beschreibung sowie tabellarische bzw. visuelle Darstellung als Dendrogramm

B) visualisierte parallele Koordinaten der gebildeten Klassen.

Abkürzungen: (AED): Alter bei Erstdiagnose, (IDH1-Mutation +): nachgewiesene IDH1-Mutation, (IDH1-Mutation -): nicht nachgewiesene IDH1-Mutation, (K1-K5): Klasse(n) 1 bis 5, (m): männlich, (RE): relative Expression, (w): weiblich, ($2^{-\Delta C_{Tm}}$): gemittelter relativer Expressionswert.

3.6.5 Zusammenfassende Ergebnisse der TTK-Untersuchung

Die ΔC_{Tm} -Werte für TTK waren normalverteilt. In den Kointegrationsanalysen könnten die x- und y-Werte für die Beschreibung der RE und des PFS als signifikant bezeichnet werden, der größere Datensatz zeigte hier einen relativ geringen Varianzwert (Tabelle 18). Dennoch gab es relativ hohe Standardfehler. Mit Irrtumswahrscheinlichkeiten unter 10% könnte ein gut korrelierter, negativer Zusammenhang zwischen OS und RE im gesamten Datensatz vorliegen. Als ebenso negativ und gut korreliert könnte der Zusammenhang zwischen RE und PFS in den IDH1-mutierten Tumoren bezeichnet werden (Tabelle 19). TTK zeigte sich generell gegenüber GAPDH sehr gering exprimiert. Einzelne Tumoren bildeten hierbei Ausnahmen, die sich mit ebenfalls niedriger Expression gegenüber GAPDH von der Vergleichsgruppe unterschieden. In drei Verläufen zeigten sich die Vorläufer stärker, in den beiden übrigen schwächer gegenüber den Rezidiven exprimiert.

3.7 Zusammenfassung der Clusteranalysen

Mit Hilfe von deskriptiven Clusteranalysen auf Basis des Ward-Verfahrens und des Euklidischen Abstandes wurde das Expressionsverhalten der untersuchten Proteine bzw. wurden ähnliche Gruppen bzw. Ausreißer beschrieben. In einer abschließenden Zusammenschau der Clusteranalysen zeigten sich ähnliche Einteilungen wiederholt. Exemplarisch werden hierfür Patientenprobe 14, ein pilozytisches Astrozytom mit dem AED von 1 Jahr, und Probe 18, ein diffuses Astrozytom mit dem PFS von 197 Monaten, genannt. Diese beiden Patienten fanden sich aufgrund der o.g. besonderen klinischen Besonderheiten häufiger als eigene Gruppen in den Analysen.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Bestimmung der Patientenproben und Datenrecherche

Die Aussagen der Untersuchungsergebnisse könnten aufgrund der geringen Fallzahlen, fehlenden klinischen Daten sowie der inkompletten molekulargenetischen Charakterisierung mancher Tumorproben beeinflusst sein.

Für die WHO-Klassifikation von 2016 ist die Bestimmung der ATRX-Expression, der IDH1-Mutationen, teilweise der Nachweis einer TP53-Mutation sowie die 1p/19q-Kodeletion von zentraler Bedeutung (8, 9). Die teilweise sehr alten Tumorproben, deren Charakterisierung auf vorherigen WHO-Klassifikationen basierte, wurden nachgefärbt. Allerdings lag das Tumormaterial nur in begrenzter Menge vor und die Anforderungen der FISH-Analysen für die 1p/19q-Kodeletionen konnten nicht erfüllt werden. Es musste sich darauf verlassen werden, dass mit dem immunhistochemischen Nachweis für die IDH1-R132H-Punktmutation der IDH1-Mutationsstatus der Tumoren ausreichend bestimmt wurde. Weitere Mutationsnachweise mussten vernachlässigt werden. Auch der ATRX-Verlust konnte nicht komplett für sämtliche Tumoren bestimmt werden. Da einige der genetischen Parameter wie die TP53-Mutation und 1p/19q-Kodeletion nicht vorlagen bzw. aufgrund des begrenzten Tumormaterials nicht durchführbar waren, konnten nicht alle Merkmale beschrieben werden, die zur Unterscheidung zwischen dem diffusen Astrozytom und dem Oligodendrogliom durch die WHO-Klassifikation vorgeschlagen werden. Für die Verifikation eines LGA vom IDH1-Wildtyp hätten die Tumorproben, deren Färbung für die IDH1-R132H-Punktmutation negativ war, im Einzelnen sequenziert werden müssen (Mitteilung durch das Labor). In dieser Arbeit wurde versucht, die Balance zwischen notwendigen Charakterisierungen und den begrenzten Ressourcen bzw. dem raren Tumormaterial zu finden. Für alle der aus der pathologischen bzw. tumorbiologischen Sammlung entnommenen Patientenproben wurde eine ausgiebige Recherche für die klinischen Verlaufsdaten durchgeführt, die für die Analysen notwendig waren. Dennoch waren nicht alle Daten zu erheben, was die Analysen und deren Aussagekraft teilweise einschränkte. Zusätzlich hatte dies einen wesentlichen Einfluss auf die Auswahl geeigneter statistischer Methoden.

Trotz dieser Schwierigkeiten konnten LGA in dieser Arbeit aufgearbeitet und die zu

untersuchenden Proteine an einigen Tumorverläufen genauer beschrieben werden. Zusätzlich konnte durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode das Expressionsverhalten in Relation zu unterschiedlichen Vergleichsgruppen gesetzt werden.

4.1.2 Weiterführende Datenanalysen

Die Aussagekraft der einzelnen, statistischen Methoden unterliegt Einschränkungen. Die komplexeste dieser Analysen war die Kointegrations- oder Zeitreihenanalyse. Wie in 2.2.6.3 genauer beschrieben mussten einige Behauptungen formuliert werden, auf deren Basis diese Methode durchgeführt wurde. Durch diese Methode bot sich die Möglichkeit, Patientendaten und Expressionslevel in eine Reihenfolge zu bringen und ggf. Trends zu erkennen. Die Frage, ob zeitlich oder in Abhängigkeit des AED eine lineare Änderung des Expressionsverhalten stattgefunden haben könnte, lies sich mit den vorliegenden Daten leider nicht generalisierend beschreiben. Gründe für die Einschränkung sind u.a. wenige Datenpunkte sowie der experimentelle Charakter dieser Methodik, mit welcher Zeitreihenuntersuchungen auf Basis des AED in einer Gruppe unterschiedlicher Patienten und Tumorproben durchgeführt wurden. Teilweise lagen die Daten für die verwendeten Analysen nicht normalverteilt vor, weshalb deren Übertragbarkeit für eine größere Population erschwert ist. Dadurch könnte die getroffene Annahme nicht der Wirklichkeit entsprechen. Statistisch bestünde die Möglichkeit, durch logarithmische Transformation Daten in eine normalverteilte Form zu bringen (70). Für die ΔC_T -Methode gibt es solch eine Möglichkeit allerdings nicht (66, 67). Generell könnten die durch Kointegrations- bzw. Zeitreihenanalysen formulierten Annahmen für weitere Fragestellungen wie z.B. Zelllinienanalysen in vitro oder bildgebende Verfahren in vivo z.B. in Tierversuchen von Nutzen sein. Clusteranalysen sind vor allem für größere Datenpunktmengen sowie Probenzahlen interessant, die generalisierbare Aussagen z.B. über das Expressionsverhalten machen könnten. In meiner Arbeit entstanden teilweise sehr kleine und ähnliche Subgruppen, indem z.B. die RE und klinische Daten gemeinsam betrachtet wurden. Auf Basis der parallelen Koordinaten und gebildeten Subgruppen könnten weitere statistische Auswertungen durchgeführt oder die Gruppen miteinander verglichen werden (Mitteilung durch XLStat). Aufgrund der begrenzten Datenpunkte wurde jedoch darauf verzichtet.

Für die verwendeten Methoden zeigten sich teilweise Einschränkungen für die

Generalisierbarkeit der Ergebnisse. Trotz der begrenzten Anzahl dieser seltenen Tumorproben konnte durch die Auswahl und die Durchführung der verwendeten, statistischen Methoden folgende interessante Aussagen über die Proteinexpressionen sowie die klinischen Daten getroffen werden.

4.2 Ergebnisdiskussion, klinische Relevanz und Ausblick

4.2.1 RPS27

Erhöhte RPS27-Expressionswerte wurden in tumorösen Geweben von Ovarien, Endometrium, uteriner Zervix, Melanomen, Mamma sowie in menschlichen Mammakarzinom-, GBM- und Melanomzelllinien nachgewiesen (15, 16). Dabei war die RPS27-mRNA in GBM-Zelllinien erhöht exprimiert (15). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Serum von GBM-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine signifikante Herabregulierung von RPS27-mRNA in Serumvesikeln (91). Für die Klinik wurde auf Basis der Serumlevel ein RPS27-Test zur Detektion von Tumorstufen vorgeschlagen (14). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass RPS27 sowohl in LGA als auch in GBM exprimiert wurde. Während es sich bei ersterem Befund um neue Daten handelt, bestätigt letzteres Aussagen von *Fernandez et al.* (15). Die Expressions- und Clusteranalysen ergaben inhomogene Expressionsraten.

Die Expressionsanalysen ergaben, dass Rezidivtumoren bzw. hochgradige Tumoren RPS27 tendenziell weniger stark exprimierten als die LGA.

Zusätzlich konnte durch die Verlaufsanalysen dargestellt werden, dass die Mehrzahl der Verlaufspaare eine höhere Expression in den Vorläufertumoren als in den Rezidiven aufwies. Zwar gab es eine tendenziell sehr inhomogene Expressionsverteilung, jedoch könnte die mRNA-Expression von RPS27 im Tumorprogress von niedrig- zu höhergradig abnehmen.

Um diese Aussage zu verifizieren, wurden die hier vorliegenden Daten in einer größeren Analyse mit weiteren Proben für GBM und niedriggradigen Hirntumoren eingebracht (92). Hierbei bestätigte sich, dass die RPS27-mRNA der LGA und der GBM im Vergleich zu NB mit 3- bis 15-fach höheren Expressionswerten überexprimiert war (92). Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen LGA und GBM bzw. zwischen primären Tumoren und ihren Rezidiven (92). Für diese größere Untersuchung wurde die RPS27-mRNA-Expression mit Normalhirn (normal brain, NB) als Kalibrator für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt. Wahrscheinlich beruhen

meine zu diesen Befunden gegensätzlichen Aussagen auf der geringen Probenanzahl und der Betrachtung von Einzelfällen. Im Gegensatz zu der größeren Analyse wurden die $\Delta\Delta C_{Tm}$ -Untersuchungen der hier bestimmten Tumorverläufe für jeden einzelnen Patienten in Relation zu ihren jeweiligen Vorläuferläsion gesetzt. Um in zukünftige Arbeiten den Expressionsverlauf von RPS27 genauer zu beschreiben, könnten auf Basis verbundener Stichproben mit einer größeren Fallzahl die Vorläufer- direkt in Relation zu zugehörigen Rezidivtumoren gesetzt werden. Dadurch könnten die Fragen geklärt werden, ob und wie sich das Expressionsverhalten von RPS27 während der Tumorprogression ändert und ob sich verschiedene Verläufe (LGA-LGA oder LGA-GBM) hinsichtlich der RPS27-Expression unterscheiden.

In Regressionsanalysen von Brusttumoren konnte nachgewiesen werden, dass RPS27 in hochgradigen Tumoren sowie bei stärkerer Aggressivität erhöht vorlag und dass es Zusammenhänge zwischen Überexpression und dem krankheitsfreiem Überleben jedoch nicht dem Gesamtüberleben gab (16). Ein solcher Zusammenhang konnte auf Basis der RNA-Untersuchungen und statistischen Analysen für LGA nicht gezeigt werden.

Auch anhand der größeren Untersuchungsgruppe konnte kein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von RPS27 und dem PFS oder OS gefunden werden (92).

Die Aussagen für RPS27 von *Sundblad et al.* scheinen daher nicht generell von Brusttumoren auf andere Entitäten übertragbar (16). Die Dysregulation von RPS27 könnte ein früher Schritt in der Entstehung von Gliomen sein und RPS27 als neuer molekularer Marker für astrozytäre Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade dienen (92).

Sieht man von den Verlaufsanalysen meiner Arbeit ab, die an Einzelbeispielen und einer kleinen Fallzahl den Anschein erweckten, dass es zu einer Abnahme in den Tumorverläufen kam, so bestätigten die inhomogenen Expressionsmuster der Clusteranalysen und die nicht signifikanten Korrelations- und Kointegrationanalysen die Aussagen von *Feldheim et al.* (92).

Zukünftig könnte z.B. durch Zell- und/oder Tierversuche geprüft werden, ob und wie sich das Expressionsverhalten von RPS27 während der Tumorprogression ändert und wie sich ein RPS27-Silencing auf Hirntumoren auswirken könnte. Inwiefern sich neben der klinischen bzw. diagnostischen Relevanz, die bei RPS27 bereits beschreiben wurde

(14, 91), auch therapeutische Behandlungsmöglichkeiten ergeben, ist Frage zukünftiger, weiterführender Forschung.

4.2.2 KiSS1

KiSS1 hat inhibierende Eigenschaften gegenüber der Metastasierung und daher wurde ein möglicher therapeutischer Einsatz von Kisspeptinen diskutiert (17-19, 21, 26, 27, 29). Die bisherige Literatur über das Kisspeptin-Signal-System beschränkt sich vor allem auf die Rolle in der Reproduktion und Tumormetastasierung, wobei Kisspeptin auch weitere physiologische Funktionen im Nervensystem haben soll (93). Für gliale Tumoren wurde bisher lediglich die Bedeutung vom KiSS1R für die Angiogenese beschrieben (26). Daher sind die hier gezeigten Daten die ersten für LGA, wobei die Expressionsanalysen nur für einige wenige Tumoren eine Expression nachweisen konnten. Es gibt noch keine übereinstimmende Haltung, wie mit nicht detektierten Ergebnissen in nachfolgenden Analysen umgegangen werden sollte (94). Das standardmäßige Ersetzen von nicht detektierbaren Ergebnissen in qPCR-Analysen mit einem C_T -Wert von >40 kann zu einem großen Bias für nachfolgende Schlussfolgerungen führen (94). Als fehlende Detektion wurden z.B. C_T -Werte über >40 mit ggf. noch späterer Amplifikation, ein komplett nicht exprimiertes Transkript ohne Amplifikation bzw. auch das Misslingen, einen C_T -Wert <40 zu erhalten, bezeichnet (94). Das könnte bedeuten, dass die hier analysierten Tumoren KiSS1 nicht exprimierten. In einzelnen Tumoren zeigte sich KiSS1 deutlich unter 0,001% des Haushaltsgens exprimiert.

Ein Selektionsproblem könnte dadurch entstanden sein, dass für anschließende Untersuchungen nur die Tumoren weiter analysiert wurden, für welche C_T -Werte generiert werden konnten. Aufgrund der wenigen Datenpunkte konnten keine Aussagen über die KiSS1-Expression in den Verlaufstumoren gemacht werden. Ähnlich niedrige Expressionswerte für Kisspeptine wurden in der Literatur in weiteren Tumorgeweben beschrieben. So war eine verminderte Kisspeptin-Gentranskription z.B. an der Invasivität bzw. Fernmetastasierung von Magentumoren beteiligt (27), mit aggressiveren und fortgeschrittenen ovariellen Residualtumoren assoziiert (21) oder mit einer schlechteren Prognose bei kolorektalen Adenokarzinomen verbunden (28). Somit könnte KiSS1 als Vertreter der Kisspeptine auch in niedrig- sowie hochgradigen Hirntumoren bedeutend sein. Inwiefern diese Hypothese zutrifft, konnte durch die

Ergebnisse nicht bestätigt werden und ist Fragestellung zukünftiger Forschung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mRNA von KiSS1 als Vertreter der Kisspeptine kaum in Hirntumoren exprimiert war, wobei darauf hinzuweisen ist, dass lediglich die mRNA von KiSS-1 bestimmt wurde.

4.2.3 BRMS1

Niedrige mRNA-Expressionswerte des Tumorsuppressors BRMS1 sind mit größeren Tumoren und jüngerem Patientenalter assoziiert, wogegen höhere Werte mit einem besseren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben bei Brustkrebstumoren in Zusammenhang gebracht werden(34). Für Gliome zeigte sich eine Korrelation mit dem WHO-Grad, wobei BRMS1 im Vergleich zum umgebenden Normalhirngewebe erniedrigt vorlag (33). Ähnliches wurde für BRMS1L beschrieben werden, dessen erniedrigte Expressionswerte signifikant mit hochgradigen Gliomen und erhöhter Mortalität zusammenhängen (35).

Die Analysen meiner Arbeit sollten die Frage klären, ob Ähnliches auch für LGA gilt. BRMS1 wurde auf mRNA-Ebene sowohl von LGA als auch GBM exprimiert. Es konnten für alle Tumorproben mRNA-Expressionswerte bestimmt werden, wobei diese bis auf zwei Ausreißerwerte unter 10% des Haushaltgens GAPDH lagen. Während die Daten von *Mei et al.* auf immunhistochemischen Proteinnachweisen in Tissue-Micro-Arrays beruhen (33), wies meine Arbeit die BRMS1-Expression auf mRNA-Ebene nach.

Zwar konnte durch die Clusteranalysen kein besonderer Unterschied zwischen Vorläufer- und Rezidivtumoren auf Basis der RE von BRMS1 gefunden werden, jedoch zeigten die Boxplots der Expressionsanalysen, dass die GBM tendenziell weniger BRMS1 exprimierten als die LGA. Zusätzlich zeigten die Verlaufsanalysen, dass vier von fünf Tumorverläufen eine stärkere relative Expression in den Vorläuferläsionen hatten. Daher könnte es sein, dass die BRMS1-Expression im Verlauf abnimmt. *Mei et al.* zeigten eine verminderte Expression in den hochgradigen Gliomen WHO° III bzw. IV im Vergleich zu den niedriggradigen WHO° I und II (33). Auch *Lv et al.* beschrieben einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erniedrigten BRMS1L-Expression und hochgradigen Gliomen (35).

In den Kointegrations- und Korrelationsanalysen zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen der BRMS1-Expression und dem OS, PFS oder AED. Möglicherweise tritt

ein solcher Zusammenhang erst bei hochgradigen Tumoren auf (33). Auch eine erniedrigte BRMS1L-Expression war mit hochgradigen Gliomen bzw. einer erhöhten Mortalität in Überlebensanalysen assoziiert (35).

BRMS1-Silencing-Versuche in Zell- und Tiermodellen könnten den Einfluss von BRMS1 auf gliale Tumoren untersuchen, wobei geklärt werden kann, ob eine Herabregulation von BRMS1 Einfluss auf das Tumorstadium hat oder wie sich die BRMS1-Expressionsraten im Verlauf verändern. BRMS1 wird als möglicher prognostischer Tumormarker sowie als therapeutisches Ziel in klinischen Studien diskutiert (32). Es wurde zwar ein Zusammenhang zwischen der BRMS1-Expression und der Tumorentwicklung nachgewiesen, jedoch gibt es nur wenige klinische Forschungsergebnisse zur Frage, ob eine erhöhte BRMS1-Expression mit einem niedrigeren Potential für Metastasierung einhergeht (32). Aus diesem Grund wird vorgeschlagen, in Zukunft BRMS1 als prognostischen Faktor auch in klinischen Studien zu testen (32).

4.2.4 ATF5

ATF5 wurde in niedrig- und hochgradigen Gliomen nachgewiesen und die Expression war u.a. in glialen Tumoren gegenüber Normalgewebe signifikant erhöht (40-47). Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen dem Nachweis von ATF5 mit der Krankheitsprognose sowie einer wesentlich kürzeren Überlebenszeit von Patienten mit ATF5-positiven GBM (42). Weiterhin waren die Expressionslevel von ATF5 auch mit der Klassifikation von Gliomen, nicht aber dem Patientenalter oder Geschlecht assoziiert (43). Durch Herabregulation von ATF5 wurde die Apoptose der Tumorzellen in Zell- und Tierversuchen gefördert, wobei das umgebende Gewebe bzw. aktivierte Astrozyten unbeeinflusst blieben (41). Meine Analysen ergaben, dass ATF5 auf mRNA-Ebene sowohl in LGA als auch GBM exprimiert war. Die Clusteranalysen zeigten in Relation zur GAPDH-Expression eher uneinheitliche Expressionsraten von größtenteils unter 10% bis hin zu über 40%. Es konnten für alle Tumorproben die RE- bzw. ΔC_{Tm} -Werte bestimmt werden. Die Daten bestätigten, dass ATF5 in höher- und auch niedriggradigen Gliomen exprimiert vorlag (40-43, 45-47). In einer zusätzlichen laborinternen Untersuchung mit einem größeren Panel von NB und GBM wurde gezeigt, dass ATF5 unabhängig des WHO-Grades ubiquitär in astrozytären Tumoren exprimiert ist (95).

In den Verlaufsanalysen konnte in vier von fünf Tumorpaaren eine 2- bis 5-fach höhere ATF5-mRNA-Expression bei den Vorläufer- in Relation zu den Rezidivtumoren gefunden werden. Nur ein Verlaufspaar verhielt sich konträr.

Das könnte darauf hinweisen, dass es zu einer Abnahme der ATF5-Expression im Verlauf der Tumorentwicklung kommt.

Huang et al. berichteten auf Basis immunhistochemischer Analysen humaner Gewebeproben, dass sich die ATF5-Expressionslevel zwischen den Proben von LGA und normalem Cortexgewebe nur gering unterschieden, anaplastische Gliome und GBM jedoch deutlich höhere Proteinexpressionen aufwiesen (43). Zusätzliche qPCR-Analysen unterstützen die immunhistochemischen Annahmen (43). Meine Ergebnisse sind konträr zu denen von *Huang et al.*, allerdings hat letztere Forschungsgruppe eine größere Fallzahl (25 Patientenproben mit der Diagnose eines GBM, 19 Proben anaplastischer Gliome und 16 Proben von LGA) untersucht, so dass die statistische Aussage größer ist. Die Analyse der ATF5-Expression in einem größeren Patientenpanel, in die auch die hier vorliegenden Daten einfließen, ergab dann eine - im Vergleich zum Normalhirngewebe - im LGA siebenfach und im GBM zehnfach erhöhte Expression, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen LGA und GBM gefunden wurde (95).

In den Korrelationsanalysen nach Kendall konnte eine moderate negative Korrelation der RE mit dem PFS in der Gruppe der LGA mit IDH1-R132H-Mutation gefunden werden. Trotz eines relativ hohen Varianzwertes konnten wahrscheinliche Werte für die x- und y-Koordinaten einer zusammenhängenden Funktion für PFS und RE in den Kointegrationsanalysen bestimmt werden. Tatsächlich wurden solche Zusammenhänge zwischen der ATF5-Expression und klinischen Daten bereits beschrieben (42, 43).

In meiner Arbeit konnte der Zusammenhang mit dem OS, den *Sheng et al.* beschreiben, nicht bestätigt werden. Da die LGA-Patienten deutlich längere Überlebenszeiten haben, konnten keine Kaplan-Mayer-Untersuchungen durchgeführt werden und nur wenige Datenpunkte lagen für das OS vor.

Dennoch könnte der Zusammenhang zwischen RE und PFS eine wichtige Ergänzung zur bisherigen Datenlage sein. Interessanterweise zeigte sich ein Zusammenhang hierfür nur in der Gruppe der IDH1-R132H-mutierten Tumoren. Die Korrelationsanalysen, die in einem größeren Panel durchgeführt wurden, bestätigten meine Ergebnisse (95).

ATF5 war also in LGA und GBM exprimiert und erhöhte Werte könnten sich negativ auf das PFS auswirken. Damit werden auch die LGA interessant für die weitere klinische Forschung, da eine Herabregulation des ATF5-Proteins zur Tumoringhibition führen könnte (44-46). Ob außerhalb von Tier- und Zellversuchen (41, 44-46) zukünftig eine Therapieoption für Patienten bestehen kann, die auf das ATF5-Protein abzielt, ist Frage zukünftiger Forschung.

4.2.5 TTK

Eine fehlregulierte Aktivität der für die Spindelpole und Kinetochoren bedeutenden Kinase TTK führt zellulär u.a. zu chromosomaler Instabilität bzw. Aneuploidie und wirkt sich negativ auf die Prognose von GBM-Patienten aus (48-60). Bei GBM-Zelllinien führte ein erniedrigtes TTK-Level zu reduzierter Lebensfähigkeit (61). TTK-Silencing verringerte das Zellwachstum und die Tumorentstehung in Glioma-Stem-Like-Cells (GSCs) (62) bzw. es kam durch die pharmakologische Inhibition zur mitotischen Katastrophe in GBM-Zelllinien (61). Des Weiteren wurde die Radiosensitivität und Empfindlichkeit gegenüber antimitotischer Arzneimittel in vivo verstärkt (49, 61). Klinisch zeigte sich eine stärkere TTK-Expression im GBM mit einer ungünstigen Prognose korreliert (62). Auch in der klinischen Tumorbehandlung gewinnt die Inhibition von TTK an Bedeutung (63-65).

In meinen Untersuchungen war die TTK-mRNA sowohl in LGA, als auch in GBM nur in geringen Mengen exprimiert. Kombiniert mit einem größeren Panel an Tumorproben war die TTK-mRNA in den Tumoren gegenüber NB signifikant überexprimiert, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen LGA und GBM (96). Dies bestätigt die Daten von Wang *et al.*, die immunhistochemisch eine höhere Expression in GBM und niedrigere Werte in LGA und NB nachwiesen (62). Hinweise für TTK-Expressionsveränderungen im Verlauf von Vorläufer- zu Rezidivtumoren gab es auch aufgrund der geringen Fallzahl nicht.

Erhöhte TTK-mRNA-Expressionswerte waren negativ mit dem OS und PFS in LGA korreliert.

Ein moderater negativer Zusammenhang ergab sich nach Kendall für alle LGA-Expressionsdaten zwischen der RE und dem OS. Erhöhte TTK-Expressionen scheinen mit geringerem Gesamtüberleben bei IDH1-mutierten LGA zusammenzuhängen. Auf RNA-Ebene bestätigte meine Arbeit die Aussage von Wang *et*

al. In dortigen immunhistochemischen Färbeauswertungen war bei der Gruppe mit niedrigerer TTK-Anfärbung das OS signifikant länger als in der Gruppe mit höheren Expressionswerten (62).

Außer dem möglichen Zusammenhang zwischen OS und RE könnte auch eine Korrelation zwischen PFS und RE vorliegen. Nach Pearson bestand in der Gruppe der IDH1-mutierten LGA ein moderater, negativer Zusammenhang zwischen PFS und RE. Auch in den Kointegrationsanalysen ergab sich ein Zusammenhang für das PFS bei IDH1-mutierten LGA nicht aber für die Gesamtgruppe. Aufgrund der Korrelationen, die für PFS und RE in den IDH1-mutierten Tumoren und für RE und OS in der Gesamtgruppe beschrieben wurden, könnte die RE in IDH1-mutierten LGA zwar keinen unmittelbaren Einfluss auf das Gesamtüberleben aber mittelbar auf die Tumorprogression bzw. das PFS nehmen.

In der Gesamtgruppe der LGA, die auch Tumoren ohne IDH1-R132H enthält, könnte die RE von TTK einen mittelbaren Effekt auf das OS aber nicht auf das PFS haben. Ergebnisse von Zellversuchen, in denen TTK inhibiert wurde, lassen einen negativen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von TTK und dem Zellüberleben wahrscheinlich erscheinen (61, 62). Ein negativer Zusammenhang mit einer ungünstigeren Prognose wurde z.B. bei *Wang et al.* bereits beschrieben (62).

Die TTK-mRNA-Expression konnte in LGA und teilweise deren Rezidiven unabhängig des WHO-Grades nachgewiesen werden. Hinweise auf eindeutige Expressionsveränderungen von Vorläufertumoren- zu Rezidiven zeigten sich nicht. Klinisch gab es einen Zusammenhang zwischen der Expression von TTK und niedrigerem PFS bzw. OS. Insgesamt erscheint TTK auch für LGA interessant. Somit könnte in Zukunft für höher- und niedriggradige Hirntumoren eine Inhibition von TTK für kombinierte, klinische Therapien genutzt werden (49, 61-65).

4.2.6 Gesamtzusammenfassung RPS27, KiSS1, BRMS1, ATF5 und TTK

Alle in dieser Arbeit untersuchten Faktoren stehen im Zentrum der Tumorforschung. Die vier Faktoren (RPS27, BRMS1, ATF5, TTK) konnten auf Basis ihrer mRNA in LGA bzw. in GBM nachgewiesen werden. Durch diese Arbeit an seltenem LGA- mit dazugehörigem Rezidiv-Tumorgewebe konnten mRNA-Expressionsdaten für diese Subgruppen generiert und teilweise aktuelle Forschungsergebnisse bzw. Zusammenhänge zwischen RE und klinischen Daten bestätigt werden. Aufgrund der

begrenzten Anzahl sowie Menge der Tumorproben ergab sich bei allen Faktoren generell ein Interpretationsproblem, bei welchem versucht wurde, sich dieser Problematik durch Anwendung mehrerer statischer Methoden entgegenzustellen. Trotz dieser Limitierung der Studie lieferte die Arbeit eine wichtige Ergänzung, wie sich das Expressionsverhalten im Bereich der LGA sowie GBM verhält.

5 Zusammenfassung

Hirntumoren werden nach histologischen und molekulargenetischen Gesichtspunkten unterteilt. Neben dem Krankheitsverlauf unterscheiden sich LGA auch genetisch von GBM. Wie die mRNA der Proteine ATF5, KiSS1, RPS27, BRMS1 und TTK in LGA exprimiert ist bzw. sich im Verlauf verändert, war in dieser Form noch nicht in einem Patientenpanel untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es, die mRNA-Expressionsraten zu bestimmen sowie Korrelationen und Kointegrationen mit klinischen Daten zu analysieren. Außerdem wurden Besonderheiten der Verteilung innerhalb des Patientenpanels beschrieben. Quantitative-PCR-Analysen wurden durchgeführt. Die Expressionswerte wurden auf die Expression des Haushaltgens GAPDH normalisiert. Die resultierenden ΔC_{Tm} - bzw. $\Delta\Delta C_T$ -Werte sowie die klinischen Patientendaten waren Basis für Kointegrations-, Korrelations-, Expressions-, Ähnlichkeits- und Verlaufsanalysen. KiSS1 schien generell kaum oder nicht in der Vielzahl der Tumoren exprimiert zu sein, Aussagen zur klinischen Korrelation erwiesen sich als schwierig. Für RPS27 konnten tendenziell niedrigere Werte in den Verlaufstumoren im Vergleich zu den LGA gefunden werden. Auch für BRMS1 war in der Mehrzahl der Fälle die mRNA der Vorläufertumoren in Relation zu den Rezidiven stärker exprimiert. ATF5 korrelierte nach Kendall RE und PFS (-0,324; p=0,077) in der Gruppe der IDH1-mutierten LGA, für TTK nach Kendall OS und RE (-0,444; p=0,097) im Gesamtpanel und nach Pearson auch RE und PFS (-0,43; p=0,096) in der Gruppe der IDH1-mutierten LGA.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* 2017; 19 (suppl_5): p. v1-v88. DOI: 10.1093/neuonc/nox158.
- (2) Poeck K, Hacke W. *Neurologie [E-Book]*. Heidelberg: Springer; 2006. XXIV: p. 294-338. DOI: 10.1007/3-540-29998-X.
- (3) Klöppel G, Remmele W, Paulus W. *Pathologie [E-Book]*. Berlin [u.a.]: Springer; 2012. XVIII: p. 483-549. DOI: 10.1007/978-3-642-02324-8.
- (4) Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: p. 987-996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
- (5) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee, W.K, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Publ. 2007: p. 1-309.
- (6) Weller M, Reifenberger G, Tonn JC, Wick W. Gliome: Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113(6): p. 18-20. DOI: 10.3238/PersOnko/2016.02.12.04.
- (7) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: p. 97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- (8) Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6): p. 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- (9) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee, W.K, Ellison DW, Figarella-Branger D, et al. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Publ. 2016: p. 1-408.

- (10) Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004; 108(1): p. 49–56. DOI: 10.1007/s00401-004-0861-z.
- (11) Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 2009; 360(8): p. 765-773. DOI: 10.1056/NEJMoa0808710.
- (12) Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front Oncol.* 2017; Volume 7, Article 236: p. 1-8. DOI: 10.3389/fonc.2017.00236.
- (13) Leeper HE, Caron AA, Decker PA, Jenkins RB, Lachance DH, Giannini C. IDH mutation, 1p19q codeletion and ATRX loss in WHO grade II gliomas. *Oncotarget.* 2015; 6(30): p. 30295-30305. DOI: 10.18632/oncotarget.4497.
- (14) Fernandez-Pol JA. Increased serum level of RPMPS-1/S27 protein in patients with various types of cancer is useful for the early detection, prevention and therapy. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012; 9(4): p. 203-256. PMID: 22798506.
- (15) Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD. A growth factor-inducible gene encodes a novel nuclear protein with zinc finger structure. *J Biol Chem.* 1993; 268(28): p. 21198-21204. PMID: 8407955.
- (16) Sundblad AS, Ricci L, Xynos FP, Fernandez-Pol JA. Metallopanstimulin / S27 ribosomal antigen expression in stages I and II breast cancer: its relationship with clinicopathologic factors. *Cancer Genomics Proteomics.* 2005; Vol. 2 No. 1: p. 53-60. Online ISSN: 1790-6245.
- (17) Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KiSS1 to Kisspeptins: An Historical Perspective and Suggested Nomenclature. *Peptides.* 2009; 30(1): p.1-11. DOI:10.1016/j.peptides.2008.06.016.
- (18) Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer.* 1997; 71(6): p.1035–1044. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19970611)71:6<1035::aid-ijc20>3.0.co;2-b.

- (19) Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(23): p. 1731–1737. DOI: 10.1093/jnci/88.23.1731.
- (20) Prabhu VV, Sakthivel K, Guruvayoorappan C. Kisspeptins (KiSS-1): essential players in suppressing tumor metastasis. *Asian Pac J of Cancer Prev.* 2013; 14(11): p. 6215-6220. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.11.6215.
- (21) Hata K, Dhar DK, Watanabe Y, Nakai H, Hoshiai H. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2007; 43(9): p. 1452-1459. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.03.004.
- (22) Murat A, Migliavacca E, Hussain SF, Heimberger AB, Desbaillets I, Hamou MF, et al. Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia. *PLoS One.* 2009; 4(6): e5947. DOI: 10.1371/journal.pone.0005947.
- (23) Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt. 8): p. 1319–1328. DOI:10.1242/jcs.00971.
- (24) Hesling C, D’Incan M, Mansard S, Franck F, Corbin-Duval A, Chevenet C, et al. In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. *Br J Dermatol.* 2004;150(4): p. 761–767. DOI: 10.1111/j.0007-0963.2004.05898.x.
- (25) Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by downregulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem.* 2001; 276(2): p.1164–1172. DOI: 10.1074/jbc.M008681200.
- (26) Ciaramella V, Della Corte CM, Ciardiello F, Morgillo F. Kisspeptin and Cancer: Molecular Interaction, Biological Functions, and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; V.9: p. 1-5. DOI: 10.3389/fendo.2018.00115.

- (27) Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, et al. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 2004; 111(6): p. 868-872. DOI: 10.1002/ijc.20357.
- (28) Kim TH, Cho SG. Kisspeptin inhibits cancer growth and metastasis via activation of EIF2AK2. *Mol Med Rep*. 2017; 16(5): p. 7585-7590. DOI: 10.3892/mmr.2017.7578.
- (29) Beck BH, Welch DR. The KISS1 metastasis suppressor: A good night kiss for disseminated cancer cells. *Eur J Cancer*. 2010; 46(7): p. 1283-1289. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.02.023.
- (30) Samant RS, Seraj MJ, Saunders MM, Sakamaki TS, Shevde LA, Harms JF, et al. Analysis of mechanisms underlying BRMS1 suppression of metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18(8): p. 683-693. PMID: 11827072.
- (31) Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res*. 2000; 60(11): p. 2764-2769. PMID: 10850410.
- (32) Kodura MA, Souchelnytskyi S. Breast carcinoma metastasis suppressor gene 1 (BRMS1): update on its role as the suppressor of cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev*. 2015; 34(4): p. 611-618. DOI: 10.1007/s10555-015-9583-z.
- (33) Mei P, Bai J, Shi M, Liu Q, Li Z, Fan Y, et al. BRMS1 suppresses glioma progression by regulating invasion, migration and adhesion of glioma cells. *PLoS One*. 2014; 9(5): p. 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0098544.
- (34) Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Yamamoto Y, Kawasoe T, Iwase H. Reduced expression of the breast cancer metastasis suppressor 1 mRNA is correlated with poor progress in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(21): p. 6410-6414. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1347.
- (35) Lv J, Yang H, Wang X, He R, Ding L, Sun X. Decreased BRMS1L expression is correlated with glioma grade and predicts poor survival in glioblastoma via an invasive phenotype. *Cancer Biomark*. 2018; 22(2): p. 311-316. DOI: 10.3233/CBM-171019.

- (36) Pati D, Meistrich ML, Plon SE. Human Cdc34 and Rad6B ubiquitin-conjugating enzymes target repressors of cyclic AMP-induced transcription for proteolysis. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(7): p. 5001-5013. PMID: 10373550.
- (37) Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene.* 2001; 273(1): p. 1-11. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00551-0.
- (38) Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(18): p. 6321-6335. DOI: 10.1128/MCB.22.18.6321-6335.2002.
- (39) Angelastro JM, Ignatova TN, Kukekov VG, Steindler DA, Stengren GB, Mendelsohn C, et al. Regulated Expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. *J Neurosci.* 2003; 23(11): p. 4590-4600. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-11-04590.2003.
- (40) Greene LA, Lee HY, Angelastro JM. The transcription factor ATF5: role in neurodevelopment and neural tumors. *J Neurochem.* 2009; 108 (1): p. 11-22. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05749.x.
- (41) Angelastro JM, Canoll PD, Kuo J, Weicker M, Costa A, Bruce JN, et al. Selective destruction of glioblastoma cells by interference with the activity or expression of ATF5. *Oncogene.* 2006; 25: p. 907-916. DOI: 10.1038/sj.onc.1209116.
- (42) Sheng Z, Li L, Zhu LJ, Smith TW, Demers A, Ross AH, et al. A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nat Med.* 2010; 16(6): p. 671-677. DOI: 10.1038/nm.2158.
- (43) Huang R, Qian D, Hu M, Zhang X, Song J, Li L, et al. Association between human cytomegalovirus infection and histone acetylation level in various histological types of glioma. *Oncol Lett.* 2015; 10(5): p. 2812-2820. DOI: 10.3892/ol.2015.3638.
- (44) Cates CC, Arias AD, Nakayama Wong LS, Lamé MW, Sidorov M, Cayanan G, et al. Regression/eradication of gliomas in mice by a systemically-

- deliverable ATF5 dominant-negative peptide. *Oncotarget*. 2016; 7(11): p. 12718-12730. DOI: 10.18632/oncotarget.7212.
- (45) Sears TK, Angelastro JM. The transcription factor ATF5: role in cellular differentiation, stress responses, and cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(48): p. 84595-84609. DOI: 10.18632/oncotarget.21102.
- (46) Huang JL, Jiang G, Song QX, Gu X, Hu M, Wang XL, et al. Lipoprotein-biomimetic nanostructure enables efficient targeting delivery of siRNA to Ras-activated glioblastoma cells via macropinocytosis. *Nat Commun*. 2017; 8:15144. DOI: 10.1038/ncomms15144.
- (47) Hua XM, Wang J, Qian DM, Song JY, Chen H, Zhu X. et al. DNA methylation level of promoter region of activating transcription factor 5 in glioma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(9): p. 757–762. DOI: 10.1631/jzus.B1500067.
- (48) Fisk HA, Mattison CP, Winey M. A field guide to the Mps1 family of protein kinases. *Cell Cycle*. 2004; 3(4): p. 439–442.
- (49) Tannous BA, Kerami M, Van der Stoop PM, Kwiatkowski N, Wang J, Zhou W, et al. Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimitotic drugs. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(17): p. 1322–1331. DOI:10.1093/jnci/djt168.
- (50) Jelluma N, Brenkman AB, van den Broek NJ, Cruijssen CW, van Osch MH, Lens SM et al. Mps1 phosphorylates borealin to control aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*. 2008; 132(2): p. 233–246. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.046.
- (51) Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(5): p. 379–393. DOI:10.1038/nrm2163.
- (52) Maciejowski J, George KA, Terret ME, Zhang C, Shokat KM, Jallepalli PV. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol*. 2010; 190(1): p. 89–100. DOI: 10.1083/jcb.201001050.
- (53) Tighe A, Staples O, Taylor S. Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J Cell Biol*. 2008; 181(6): p. 893–901. DOI: 10.1083/jcb.200712028.

- (54) Jelluma N, Brenkman AB, McLeod I, Yates III JR, Cleveland DW, Medema RH et al. Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS One*. 2008; 3(6): e2415 DOI: 10.1371/journal.pone.0002415.
- (55) Maure JF, Kitamura E, Tanaka TU. Mps1 kinase promotes sister-kinetochore bi-orientation by a tension-dependent mechanism. *Curr Biol*. 2007; 17(24): p. 2175–2182. DOI:10.1016/j.cub.2007.11.032.
- (56) Santaguida S, Tighe A, D’Alise AM, Taylor SS, Musacchio A. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol*. 2010; 190(1): p.73–87. DOI: 10.1083/jcb.201001036.
- (57) Huang YF, Chang MD, Shieh SY. TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(11): p. 2935–2944. DOI: 10.1128/MCB.01837-08.
- (58) Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998; 396(6712): p. 643–649. DOI:10.1038/25292.
- (59) Nishizaki T, Harada K, Kubota H, Harada K, Furuya T, Suzuki M et al. Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neurooncol*. 2002; 56(2): p. 159–165. PMID:11995817.
- (60) Zeng WF, Navaratne K, Prayson RA, Weil RJ. Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme. *J Clin Pathol*. 2007; 60(2): p. 218–221. DOI 10.1136/jcp.2006.036806.
- (61) Maachani UB, Kramp T, Hanson R, Zhao S, Celiku O, Shankavaram U, et al. Targeting MPS1 enhances radiosensitization of human glioblastoma by modulating DNA repair proteins. *Mol Cancer Res*. 2015; 13(5): p. 852-862. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0462-T.
- (62) Wang J, Xie Y, Bai X, Wang N, Yu H, Deng Z, et al. Targeting dual specificity protein kinase TTK attenuates tumorigenesis of glioblastoma. *Oncotarget*. 2018; 9(3): p. 3081-3088. DOI: 10.18632/oncotarget.23152.
- (63) Wang S, Zhang M, Liang D, Sun W, Zhang C, Jiang M, et al. Molecular design and anticancer activities of small-molecule monopolar spindle 1

- inhibitors: A Medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2019; 175: p. 247-268. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.04.047.
- (64) Kessler AF, Frömbling GE, Gross F, Hahn M, Dzokou W, Ernestus R-I, et al. Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition. *Cell Death Discov.* 2018; 4:77: p. 1-10. DOI: 10.1038/s41420-018-0079-9.
- (65) Wenger C, Miranda P, Salvador R, Thielscher A, Bomzon Z, Giladi M, et al. A review on Tumor Treating Fields (TTFields): Clinical implications inferred from computational modeling. *IEEE Rev Biomed Eng.* 2018; Vol. 11: p.195-207. DOI: 10.1109/RBME.2017.2765282.
- (66) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001; 25(4): p. 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- (67) Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008; Vol. 3, No. 6: p. 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- (68) Said HM, Hagemann C, Stojic J, Schoemig B, Vince GH, Flentje M, et al. GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Mol Biol.* 2007; 8, 55: p. 1-13. DOI: 10.1186/1471-2199-8-55.
- (69) Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 2005; 21(3): p. 389-395. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
- (70) Rowe P, Heinisch C. *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten [E-Book].* Weinheim: Wiley-VCH; 2012. 1. Auflage: p. 251-274.
- (71) Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab.* 2012; 10(2): p. 486-489. DOI: 10.5812/ijem.3505.
- (72) Liu J, Tang W, Chen G, Lu Y, Feng C, Tu XM. Correlation and agreement: overview and clarification of competing concepts and measures. *Shanghai Arch Psychiatry.* 2016; 28(2): p. 115-120. DOI: 10.11919/j.issn.1002-0829.216045.

- (73) Hazra A, Gogtay N. Biostatistics series module 6: correlation and linear regression. *Indian J Dermatol.* 2016; 61(6): p. 593-601. DOI: 10.4103/0019-5154.193662.
- (74) Ahmad N, Husain F. The relation between stock prices and money supply in Pakistan: an investigation. *JISR MSSE.* 2007; Vol. 5, No. 2: p. 30-32. SSRN: <https://ssrn.com/abstract=2065919>.
- (75) Dickey DA, Fuller WA. Distribution of the estimators for autoregressive time series with a unit root. *J Am Stat Assoc.* 1979; 74(366): p. 427-431. DOI: 10.2307/2286348.
- (76) Rottmann H, Auer BR, editors. *Zeitreihenmodelle* [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 26. Aug 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/zeitreihenmodelle-48778/version-272025>.
- (77) Brockwell PJ, Davis AR. *Introduction to time series and forecasting* [E-Book]. New York: Springer; 2002. 2nd ed. XIV: p. 1-437. DOI: 10.1007/b97391.
- (78) Rottmann H, Auer BR, editors. *Stationarität* [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/stationaritaet-43164/version-266496>.
- (79) Rottmann H, Auer BR, editors. *Einheitswurzeltest* [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/einheitswurzeltest-32839/version-256373>.
- (80) Rottmann H, Auer BR, editors. *AR(p)-Prozess* [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/arp-prozess-31612/version-255165>.
- (81) Rottmann H, Auer BR, editors. *Weißes Rauschen* [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/weisses-rauschen-50294/version-273515>.

- (82) Sube R, Eisenreich G. Physik: N-Z. Berlin: VEB Verlag Technik; 1980. Band 2.
- (83) Rottmann H, Auer BR, editors. Random Walk [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/random-walk-45066/version-268366>.
- (84) Rottmann H, Auer BR, editors. Dickey-Fuller-Test [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/dickey-fuller-test-27694/version-251338>.
- (85) Rottmann H, Auer BR, editors. Regressionsmodell [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/regressionsmodell-44852/version-268156>.
- (86) Rottmann H, Auer BR, editors. Kointegration [Internet]. Wiesbaden: Gabler Wirtschaftslexikon; 2018 [abgerufen am 25. Feb 2019]. Verfügbar unter: <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/kointegration-39604/version-263009>.
- (87) Ben-Dor A, Shamir R, Yakhini Z. Clustering gene expression patterns. *J Comput Biol.* 1999; 6(3-4): p. 281-297 p. DOI: 10.1089/106652799318274.
- (88) Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM Comput Surv (CSUR).* 1999; 31(3): p. 264-323. DOI: 10.1145/331499.331504.
- (89) Wiedenbeck M, Zuell C. Klassifikation mit Clusteranalyse: Grundlegende Techniken hierarchischer und K-means-Verfahren. *Methoden Daten Anal.* 2001; GESIS-How-to 10: p. 1-18. PID: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0168-ssoar-201428>.
- (90) Thermo Fisher Scientific (2019). Real-time PCR: C_t-Wert verstehen [Internet]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> [abgerufen am 25. Feb 2019].
- (91) Noerholm M, Balaj, L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH et al. RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with

- glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer*. 2012; 12, 22; p. 1-11.
DOI: 10.1186/1471-2407-12-22.
- (92) Feldheim J, Kessler AF, Monoranu C, Krapp J, Schmitt D, Wilczek L, et al. Meeting Abstract: Ribosomal Protein S27 (RPS27) – A new marker for astrocytic tumours [Internet]. Würzburg: 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC); 2019 [abgerufen am 16. Aug 2019]. Verfügbar unter:
<https://www.egms.de/static/en/meetings/dgnc2019/19dgnc274.shtml> DOI: 10.3205/19dgnc274.
- (93) Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009; 30(6). p. 713–743 DOI: 10.1210/er.2009-0005
- (94) McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A. On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics*. 2014; 30(16): p. 2310-2316. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu239.
- (95) Feldheim J, Kessler AF, Schmitt D, Wilczek L, Linsenmann T, Dahlmann M, et al. Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is increased in astrocytomas of different WHO grades and correlates with survival of glioblastoma patients. *Onco Targets Ther*. 2018 (v11), p. 8673–8684. DOI: 10.2147/OTT.S176549.
- (96) Kessler AF, Feldheim J, Schmitt D, Feldheim JJ, Monoranu CM, Ernestus R-I, et al. Monopolar Spindle 1 Kinase (MPS1/TTK) mRNA Expression is Associated with Earlier Development of Clinical Symptoms, Tumor Aggressiveness and Survival of Glioma Patients. *Biomedicines*. 2020, 8, 192, p. 1-13. 10.3390/biomedicines8070192.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper und Verdünnungen	18
Tabelle 2: Klinische Daten der Patientenkohorte	29
Tabelle 3: Patientendaten.....	30
Tabelle 6: Standardabweichungen der CT-Werte in der qPCR	31
Tabelle 7: Testung auf Normalverteilung.....	32
Tabelle 8: Kointegrationsanalysen für RPS27.....	33
Tabelle 9: Korrelationsanalysen klinische Parameter und RE von RPS27	35
Tabelle 10: Exemplarische Berechnung der Verläufe in Anlehnung an Livak et al. (2001).....	41
Tabelle 11: Stichprobenanalysen der Verläufe von RPS27.....	42
Tabelle 12: Kointegrationsanalysen für KiSS1	44
Tabelle 13: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von KiSS1	46
Tabelle 14: Kointegrationsanalysen für BRMS1.....	52
Tabelle 15: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von BRMS1	53
Tabelle 16: Stichprobenanalysen der Verläufe von BRMS1.....	58
Tabelle 17: Kointegrationsanalysen für ATF5	61
Tabelle 18: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von ATF5	62
Tabelle 19: Stichprobenanalysen der Verläufe von ATF5	67
Tabelle 20: Kointegrationsanalysen für TTK	69
Tabelle 21: Korrelationsanalysen klinischer Parameter und der RE von TTK	70
Tabelle 22: Stichprobenanalysen der Verläufe von TTK	75
Abbildung 2: Beispiel der Regressionsanalysen für die RE und das PFS von RPS27... 33	
Abbildung 3: Expressionsverhalten von RPS27.....	37
Abbildung 4: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für RPS27, AED und PFS	38
Abbildung 5: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von RPS27 in allen Tumorproben	39
Abbildung 6: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von RPS27 mit den Verlaufswerten.....	43
Abbildung 7: Expressionsverhalten von KiSS1	48
Abbildung 8: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für KiSS1, AED und PFS	49

Abbildung 9: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von KiSS1 mit den Verlaufswerten.....	50
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung eines Amplifikationsplots von KiSS1	51
Abbildung 11: Expressionsverhalten von BRMS1	54
Abbildung 12: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für BRMS1, AED und PFS	55
Abbildung 13: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von BRMS1	56
Abbildung 14: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von BRMS1 mit den Verlaufswerten.....	59
Abbildung 15: Expressionsverhalten von ATF5	64
Abbildung 16: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für ATF5, AED und PFS	65
Abbildung 17: Clusteranalysen Expressionsverhalten ATF5.....	66
Abbildung 18: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von ATF5 mit den Verlaufswerten.....	68
Abbildung 19: Expressionsverhalten von TTK	72
Abbildung 20: Clusteranalysen der LGA-Tumoren für TTK, AED und PFS	73
Abbildung 21: Clusteranalysen Expressionsverhalten von TTK	74
Abbildung 22: Clusteranalysen des Expressionsverhaltens von TTK mit den Verlaufswerten.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AED	Alter bei Erstdiagnose	m	männlich
ATRX	ATP-Abhängige Helikase ATRX	max	maximal
AXOR12	KiSS1-Rezeptor	min	minimal
BR	Broad-Range	MPS-1	Metallopanstimulin-1 bzw. RPS27 oder Monopolar-Spindle-1 bzw. TTK
BRMS1	Breast-Carcinoma-Metastasis- Suppressor-Gen 1	mRNA	messenger RNA
bzw.	beziehungsweise	MRT	Magnetresonanztomographie
cDNA	complementary DNA	MW	Mittelwert
CREB	cAMP-Response-Element-Binding- Protein	n, n	Anzahl
CT	Computertomographie	n.b.	nicht bestimmbar
C _T	Cycle-Threshold, Schwellenwertzyklus	NB	Normalhirn bzw. Normal Brain
C _{Tm}	gemittelter Wert für C _T	NOS	Not Otherwise Specified
ΔC _T	relativer Wert für C _T	o.g.	oben genannt(e), genannt(en)
ΔC _{Tm}	gemittelter relativer Wert für C _T	OLS	Ordinary Least Squares
DAB	Diaminobenzidin	p53	Tumor Protein P53
DNA	Desoxyribonucleic Acid	Pat.	Patient
E	Exponent	Pen-d/n-ATF5-RP	ATF-Form nach Cates et al.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	qPCR	Real Time Quantitative PCR
EIF2AK2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 2	RP27	Ribosomales Protein 27
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	SD	Standard Deviation bzw. Standardabweichung
GBM	Glioblastoma multiforme	siRNA	Small Interfering RNA
GPR54	KiSS1-Rezeptor	TBS-Puffer	Tris-Buffered Saline-Puffer
GSCs	Glioma-Stem-Like-Cells	TE-Puffer	TRIS- und EDTA-Puffer
H ₀	Nullhypothese	TGF	Transforming Growth Factor
H ₁	Gegenhypothese	TTFields	Tumor-Treating-Fields
HRP	Horseradish- bzw. Meerrettich-Peroxidase	TTK	Dual-Specificity-Proteinkinase TTK
IDH	Isozitatdehydrogenase	u.a.	unter anderem
KiSS1	Kisspeptin 1	U-138	Glioblastomzelllinie U-138
KiSS1R	KiSS1-Rezeptor	v.a.	vor allem
LAN-5	Neuroblastomzelllinie LAN-5	w	weiblich
LGA	Low-Grade-Astrocytoma bzw. niedriggradiges Astrozytom	WHO	World Health Organization
		WHO°	Tumorgrad nach WHO
		(2 ^{-ΔC_{Tm}})	gemittelter relativer Expressionswert
		(2 ^{-ΔΔC_{Tm}})	zur Vergleichsgruppe gemittelter relativer Expressionswert

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ernestus (Direktor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik) für die Möglichkeit zur Durchführung einer Promotion, der Projektfinanzierung sowie die Supervision und Gutachtertätigkeit bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Hagemann (Leiter des Tumorbiologischen Labors) und Frau Dr. med. Keßler (Funktionsoberärztin der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik) für die für die Betreuung sowie wissenschaftliche und klinische Unterstützung. Vielen Dank auch an Frau PD Dr. med. Monoranu (Leiterin der Abteilung für Neuropathologie am Pathologischen Institut) für die Unterstützung im Rahmen der Materialgewinnung, Paraffinschnittherstellung, pathologischen Begutachtung und Bewertung, der Supervision und Gutachtertätigkeit.

Ein Dank gilt dem ärztlichen Kollegen Herrn Jonas Feldheim, der im Rahmen seiner Doktorarbeit die thematischen Grundlagen für meine Doktorarbeit legte und mich in die statistischen Analyseprogramme eingeführt hat. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Johannes Laier, der mich im Bereich der Kointegrationsanalysen hinsichtlich Auswertung und Dateninterpretation unterstützt hat.

Herzlichen Dank auch an Frau Karl und Frau Kühnel (MTAs im Tumorbiologischen Labor) für die wissenschaftliche sowie auch ermutigende, persönliche Hilfe während meiner Labortätigkeit.

Zuletzt danke ich besonders meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer unterstützend auf meinem Lebensweg begleitet haben.