

Histologische und molekulare Charakterisierung von TSPO
Anreicherungen im humanen Hirngewebe



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lorraine Weidner
aus
Lauchhammer

im Jahr
2023

Histologische und molekulare Charakterisierung von TSPO
Anreicherungen im humanen Hirngewebe



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lorraine Weidner
aus
Lauchhammer

im Jahr
2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer/in: Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2024

Einleitung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Diffuse Gliome und Glioblastome (GBM) im erwachsenen Patienten ^{*1}	5
1.1.1	Definition nach WHO-Klassifizierung, klinisches Bild und Standard-Diagnostik	5
1.1.2	Standard-Therapie und Prognose	7
1.1.3	Neue Biomarker und experimentelle Therapie	8
1.2	Translokatorprotein (TSPO) und sein Potenzial als Bildgebungsmarker.....	10
1.2.1	Lokalisation und Regulation	10
1.2.2	Expression und Funktion unter normalen und pathologischen Bedingungen im Zentralnervensystem (ZNS)	11
1.2.3	TSPO-assoziierte Tracer zur Anwendung im erwachsenen Patienten mit diffusen Gliom im wissenschaftlichen Diskurs.....	14
1.2.4	TSPO in weiteren ZNS Neoplasien.....	15
1.3	Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit.....	16
2	Material	17
2.1	Proteine.....	17
2.1.1	Antikörper	17
2.1.2	Peptid.....	18
2.2	Oligonukleotide	18
2.2.1	Bisulfit-Methylierung PCR/Sequenzierung Primer	18
2.2.2	cDNA-Synthese und real-time Reverse Transkriptase PCR (qPCR) Primer	19
2.2.3	Small interfering RNAs (siRNAs)	19
2.3	Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)	20
2.4	Zellkulturmedium und Puffer	21
2.5	Chemikalien, Reagenzien, Gele und Membranen	23
2.6	Geräte und Laborausstattung	25
2.7	Bioinformatische Tools (Datenbanken und Software)	26

Einleitung

2.8	<i>In silico</i> Datensätze.....	27
2.8.1	HTSeq Count Expressionsdatensatz.....	27
2.8.2	K450 Illumina Methylierungsarraydatensatz	28
2.8.3	Kopienzahl-/Mutationsdatensätze	28
2.9	Kryo-konservierte Astrozytomfälle für Bisulfit-Methylierungsanalyse und Antikörpervalidierung	28
2.10	TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte	30
2.11	Kommerzielle Tissue-Microarrays (TMAs).....	36
2.12	Zelllinien für Antikörpervalidierung	38
3	Methoden.....	39
3.1	<i>In silico</i> Analysen	39
3.2	Molekularbiologische Verfahren für Methylierungsanalyse.....	40
3.2.1	cDNA-Synthese und qPCR für Quantifizierung der <i>TSPO</i> Expression.....	40
3.2.2	Bisulfit-Sequenzierung für Quantifizierung der <i>TSPO</i> CpG-Insel Methylierung.. ..	41
3.3	Zell-/molekularbiologische und proteinbiochemische Verfahren für Antikörpervalidierung	43
3.3.1	Herstellung der transienten TSPO-Knockdown Proteinlysate aus Gliomzelllinien.....	43
3.3.2	Western-Blot zuzüglich Blockierungsexperiment	44
3.4	Histologische Färbungen und Auswertung für histologische Analyse.....	44
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	44
3.4.2	Immunhistochemie (IHC), Blockierungsexperiment und Scoring.....	45
3.4.3	Multiplex-OPAL-Immunfluoreszenzfärbung (Multiplex OPAL IF) und Zellzählung.....	46
3.5	Next-Generation-RNA-Sequenzierung (RNA NGS) für molekulare Analyse.....	48
3.5.1	RNA-Isolierung und Library-Präparation	48
3.5.2	Sequenzierung des Library-Pools und bioinformatische Analyse	49

Einleitung

3.6	Statistik.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	<i>TSPO</i> Expressionsanstieg korreliert invers mit IDH-mutationsbedingter <i>TSPO</i> Promotormethylierung in Gliomen	52
4.2	<i>TSPO</i> -Antikörper Validierung ergab ein spezifisches Färbemuster ohne unspezifische Bindung	58
4.3	<i>TSPO</i> -IHC korreliert mit <i>TSPO</i> -PET Anreicherung und ist im soliden Tumorzentrum von IDH-wt GBMs am höchsten exprimiert.....	59
4.4	Diverse Zellpopulationen exprimieren <i>TSPO</i> und CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben die <i>TSPO</i> Expression in der Infiltrationszone	64
4.5	Rezidive zeigen eine höhere <i>TSPO</i> Expression und CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben auch hier die <i>TSPO</i> Expression in der Infiltrationszone..	68
4.6	Das <i>TSPO</i> Signal von schwach FET-PET anreichernden Bereichen kommt zum Großteil von der Infiltrationszone	71
4.7	<i>TSPO</i> Überexpression markiert transkriptionelle Muster, welche mit onkogenen Signalwegen, Organisation der extrazellulären Matrix und Immunsysteminteraktion in Zusammenhang stehen	72
4.8	Eine hohe <i>TSPO</i> Expression kennzeichnet mesenchymale Glioblastom-Zellsubpopulationen mit erhöhter Anzahl CD68-positiver Mikroglia/Makrophagen.....	76
4.9	Heterogene <i>TSPO</i> Expression in gesunden Hirnregionen und pathologischen Entitäten impliziert hirnregional spezifische Unterschiede sowie variable <i>TSPO</i> Funktionen in anderen Tumorentitäten	79
5	Diskussion.....	84
6	Zusammenfassung.....	92
7	Anhang	94
7.1	Bioinformatische Skripte (R und shell).....	94
7.1.1	<i>In silico</i> Analysen.....	94
7.1.2	RNA NGS Prozesse der <i>TSPO</i> Bildgebungsstudienkohorte.....	103
7.2	Input-Parameter und Output-Prozessierung für verwendete Onlinetools.....	128

Einleitung

7.2.1	Überrepräsentationsanalyse mit FUMA v1.4.1 GENE2FUNC	128
7.2.2	Gensatz-Anreicherungsanalyse mit GSEA am Beispiel des Hallmark Gensatzes für DeSeq-normalisierte Counts von TSPO LOW vs TSPO HIGH Studienfällen	129
7.2.3	Einzelproben-Gensatz-Anreicherungsanalyse mit ssGSEA am Beispiel des GBM-Expressionssubtypen Gensatzes von Brennan et al. 2013 für DeSeq-normalisierte Counts von TSPO LOW vs TSPO HIGH Studienfällen	130
7.2.4	Dekonvolution mit dREG BayesPrism und Output-Prozessierung.....	130
7.3	IDH-wt GBMs der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte.....	134
7.4	Tissue-Microarray TSPO H Score Tabellen.....	140
8	Verzeichnisse	144
8.1	Literatur	144
8.2	Abkürzungen	171
8.3	Abbildungen	175
8.4	Tabellen	177

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Diffuse Gliome und Glioblastome (GBM) im erwachsenen Patienten*¹

1.1.1 Definition nach WHO-Klassifizierung, klinisches Bild und Standard-Diagnostik

Diffuse Gliome im erwachsenen Patienten umfassen nach aktueller World Health Organization (WHO)-Klassifizierung der Tumore im Zentralnervensystem (ZNS) von 2021 (Louis et al., 2021) unter anderem Astrozytome (IDH-mutiert, WHO-Grad 2 bis 4), Oligodendrogliome (IDH-mutiert, 1p/19q-codel, WHO-Grad 2 bis 3) sowie Glioblastome (IDH-Wildtyp, WHO-Grad 4) und werden über eine Kombination von histologischen und molekularen Kriterien, vgl. allgemeine Übersicht in Abbildung 1 aus (Mauch-Mücke et al., 2022), voneinander abgegrenzt bzw. von weiteren Tumortypen unterschieden.

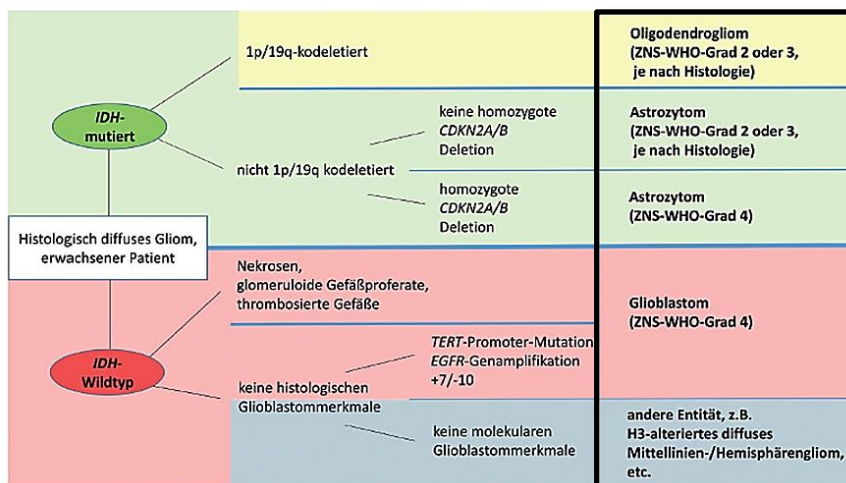


Abbildung 1: Schematische Einteilung der diffusen Gliome im erwachsenen Patienten nach der WHO-Klassifikation der ZNS Tumore von 2021 (Abbildung aus Mauch-Mücke et al., 2022)

Diese Unterscheidungskriterien beinhalten histologische Morphologien wie Gefäßproliferate und/oder Nekrosen sowie molekulare Veränderungen wie z.B. *IDH1/2* Mutationen, *ATRX* und/oder *CDKN2A/B* Erhalt bzw. Deletion, *H3.3G34* Mutationen, *TERT* Promotor-Mutationen, *EGFR* Amplifikationen und/oder chromosomale (1p19q-Kodeletionen oder +7/-10-Kombination) Veränderungen (Brat et al., 2018, 2020; Weller et al., 2021).

*¹ Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird im Text das generische Maskulinum verwendet. Gemeint sind jedoch immer alle Geschlechter.

Einleitung

Die diffusen Gliome stellen in der Gruppe der primären Hirntumore eine der häufigsten malignen Hirntumorentitäten dar (Ostrom et al., 2020). Basierend auf Datenabfragen im Krebsregister deutet sich an, dass wegen fortschreitender Verschiebungen der Alterstruktur zu einer älteren Gesellschaft trotz langfristig konstanter Erkrankungs- und Sterberaten die Zahl der Erkrankungsfälle (Männer: 0,8 %/Jahr, Frauen: 0,3 %/Jahr) und Sterberaten (Männer: 1,2 %/Jahr, Frauen: 0,6 %/Jahr) im Durchschnitt für bösartige Neubildungen des Gehirns weiter ansteigen wird (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2021).

Im klinischen Alltag sind die Symptomatik und die klinische Präsentation von Gliomen im erwachsenen Patienten in erster Linie von Tumorlokalisierung und der Funktion des betroffenen Hirnareals abhängig. Sie umfassen hauptsächlich Hirndruckzeichen, epileptische Anfälle und mitunter auch unspezifische Symptome wie Wesensveränderungen, pseudodementielle Entwicklungen und Leistungsminderungen (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2021).

Der momentane Goldstandard in der klinischen Diagnostik bei Erstdiagnose von diffusen Gliomen im erwachsenen Patienten beinhaltet anfangs zumeist Computertomographie (CT) und letztlich eine Kombination aus Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel, Aminosäuren-PET (z.B. mit F-18-Fluorethyltyrosin, kurz [¹⁸F]FET) und mit wenigen Ausnahmen eine obligate pathologische Bestätigung an Biopsie-/Resektionsmaterial gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2021; Weller et al., 2021).

Durch die Bildgebung wird das klinische Bild/die Verdachtsdiagnose und darüber hinaus der Biopsieort (Hotspots) abgeklärt. Zusätzlich dient die Bildgebung hier zur Therapieplanung vor Resektion oder Strahlentherapie sowie zur Differenzierung von Progression und Pseudoprogession im weiteren Krankheitsverlauf (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2021). FET-PET hat hierbei den Vorteil, dass mittels dieser Bildgebung gleichzeitig Aussagen bzgl. Tumolvolumen, Prognose und Therapie Response, zusammengefasst in (Albert et al., 2016), möglich sind, jedoch liefert FET-PET keine Informationen bzgl. der zellulären Zusammensetzung im Tumormikromilieu (TME) und damit keine Information bzgl. ansteuerbarer Therapietargets (Zinnhardt et al., 2020).

Einleitung

Über die pathologische Beurteilung werden nach Biopsie/Resektion die mittels Bildgebung getroffenen Befunde bestätigt und entsprechend der zuvor gelisteten Kriterien die morphologische/molekulare Klassifizierung bei Verdacht auf ein diffuses Gliom vorgenommen. Darüber hinaus liefert die pathologische Beurteilung den ersten Eindruck bzgl. vorhandener Ansatzmöglichkeiten für eine effektive Therapieplanung, wie man am Beispiel der niedriggradigen (Bell et al., 2020; Buckner et al., 2016; Van Den Bent et al., 2017; Weller et al., 2021) vs höhergradigen Astrozytome bzw. Glioblastome (GBMs) gut sehen kann (Hegi et al., 2005; Malmström et al., 2012; Perry et al., 2017; Roa et al., 2004; Stupp et al., 2005, 2009; Waitkus et al., 2018; Weller et al., 2021). So zeigten zum Beispiel Patienten mit niedriggradigen IDH-mutierten (IDH-mut) Astrozytomen ein längeres progressionsfreies Überleben bei sequenzieller Strahlenchemotherapie, wohingegen Patienten mit höhergradigen IDH-Wildtyp (IDH-wt) Astrozytomen diesen Unterschied nicht aufwiesen (Bell et al., 2020).

1.1.2 Standard-Therapie und Prognose

Allgemein gibt es bzgl. der Standard-Therapie gemäß EANO Leitlinien zurzeit drei Hauptpfeiler (Weller et al., 2021). Erstens, die komplette, soweit funktionell nicht einschränkende, Tumorresektion, zweitens, die Strahlentherapie und drittens, die medikamentöse Tumorthherapie. Diese kommen oft in Kombination miteinander bzw. sequenziell hintereinander zum Einsatz.

Die medikamentöse Tumorthherapie beinhaltet dabei unter anderem zugelassene Alkylantien, wie Temozolomid (TMZ), und Nitrosoharnstoffe, wie Lomustin (CCNU). Diese stellen in Kombination vor allem in Zusammenhang mit der *MGMT* Promotor-Methylierung für GBM-Patienten (Herrlinger et al., 2019) eine der wenigen momentan zugelassenen chemotherapeutischen Ansatzmöglichkeiten dar. Generell kommt TMZ in Form des Stupp-Schemas (75 mg/m^2 Körperoberfläche während Bestrahlung, $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ Körperoberfläche á 28 Tage) in Kombination mit einer Strahlentherapie (fraktionierte Bestrahlung mit je 2 Gy an 5 Tagen die Woche über einen Zeitraum von 6 Wochen) bei GBMs zur Anwendung (Weller et al., 2021).

Die Prognose variiert je nach Gliomtyp (Ostrom et al., 2020). Für diffuse Gliome kann sie von bestimmten molekularen Markern wie zum Beispiel *IDH1/2* abhängig sein, da diese in Folge von klinischen Studien prädiktiv für bestimmte Therapieansätze- bzw. -kombinationen in der Klinik verwendet werden (DGHO Deutsche Gesellschaft für

Einleitung

Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2021; Weller et al., 2021). Während Gliompatienten mit IDH-mut Tumor eine günstigere Prognose haben (mehr als 10 Jahre möglich), liegt die Überlebenszeit der meisten IDH-wt GBM-Patienten eher bei unter 2 Jahren (Bell et al., 2020).

Unter therapeutischer Behandlung kristallisieren sich dann weitere Überlebensunterschiede in Kombination mit prädiktiven Biomarkern heraus. So können zum Beispiel Patienten (≥ 65 Jahre alt) mit GBM Diagnose bei Vorliegen einer *MGMT* Promotor-Methylierung von einer kombinierten Strahlenchemotherapie bzgl. Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben profitieren (Perry et al., 2017). Patienten mit GBM Diagnose ohne *MGMT* Promotor-Methylierung hatten hingegen in dieser Studie keinen Vorteil von der zusätzlichen Chemotherapie. Es gilt jedoch zu beachten, dass dieser Vorteil zeitlich 1,4 bis 1,7 Monate je nach Analyseschwerpunkt umfasste und daher keinesfalls eine Heilung darstellt.

Trotz einiger Therapieoptionen gibt es im Großen und Ganzen eher schlechte Prognosen und weiterhin keine Heilung.

Intensive Forschungsbemühungen in Hinblick auf neue prädiktive Biomarker sind somit essentiell im klinischen Alltag für die behandelnden Ärzte, um die Situation der Patienten weiter zu verbessern und neue effektive Möglichkeiten für Therapien zu schaffen (Jin & Jin, 2020; Li et al., 2022; Sampson et al., 2020; White et al., 2023).

1.1.3 Neue Biomarker und experimentelle Therapie

Es existiert daher ein weites Forschungsfeld, welches sich mit der molekularen Stratifizierung von diffusen Gliomen befasst, um weitere Biomarker experimentiell herauszuarbeiten und ihre Relevanz für den klinischen Alltag zu evaluieren.

Hierbei wurde vor allem über genomweite Transkriptom- und Methylom-Analysen in den letzten Jahren die Diagnose und damit die Prognose der Gliome geschärft sowie Anstrengungen unternommen die Heterogenität der GBMs besser zu charakterisieren (Brennan et al., 2013; Ceccarelli et al., 2016; Louis et al., 2016, 2021; Wang et al., 2017).

Die zuvor mehrmals erwähnte IDH-abhängige Stratifizierung der Tumortypen basiert somit unter anderem darauf, dass sich verschiedene Profile in Methylierungsarrayanalysen beim Clustering definieren ließen. Hierbei lagen IDH-mut Gliome eng beieinander und grenzten

Einleitung

sich deutlich von IDH-wt GBMs ab (Capper et al., 2018; Louis et al., 2021). Außerdem ergab sich ein genomweiter Hypermethylierungsphänotyp bei IDH-mut Gliomen (Bledea et al., 2019; Ceccarelli et al., 2016; Unruh et al., 2019). Zusätzlich zeigt sich dort die Heterogenität der GBMs in methylierungsbedingten Subtypen (Brennan et al., 2013; Ceccarelli et al., 2016).

Die molekulare Heterogenität innerhalb der IDH-wt GBMs zeigt sich auch in variierenden transkriptomweiten RNA-Sequenzierungsprofilen (Verhaak et al., 2010). Sie werden oft in Form von Subgruppen zusammengefasst. Derzeit gibt es drei klinisch relevante GBM-Expressionssubtypen, die als proneural (PRO), mesenchymal (MES) und klassisch (CL) bezeichnet werden (Bhat et al., 2013; Brennan et al., 2013; Ceccarelli et al., 2016; Hoogstrate et al., 2023; Phillips et al., 2006; Wang et al., 2017).

Mesenchymale GBMs weisen hierbei von allen GBM-Expressionssubtypen den höchsten Prozentsatz an Mikroglia-, Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration auf (Martinez-Lage et al., 2019). Sie werden jedoch zumeist von Tumorzellen, wie in (Sampson et al., 2020) anschaulich zusammengefasst, über verschiedene Mechanismen/Signalmoleküle funktionell zugunsten des Tumors manipuliert.

Mit Hilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq) kristallisieren sich mittlerweile zusätzlich zelluläre Hauptzustände für GBMs heraus: ähnlich neuraler Vorläuferzellen (NPC1/2-like), ähnlich oligodendrozytenartiger Vorläuferzellen (OPC-like), ähnlich astrozytenartiger Zellen (AC-like) und ähnlich mesenchymaler Zellen (MES1/2-like).

Der zelluläre Zustand MES-like wird hierbei mittels Makrophagen produziertes Oncostatin M (OSM) induziert. Dieses interagiert im Komplex mit GP130 mit seinen Rezeptoren (OSMR und LIFR) und stößt somit STAT3 Signalwege an (Hara et al., 2021). Darüber hinaus sind MES-ähnliche Zellen in Tumoren des MES-Expressionssubtyps häufiger anzutreffen und stehen mit dem Gewebemikromilieu vor Ort in steter Interaktion (Nefitel et al., 2019).

Die MES-ähnlichen Zellpopulationen sowie der mesenchymale GBM-Expressionssubtyp wurden bereits mit einer schlechteren Prognose (Bhat et al., 2013; Hoogstrate et al., 2023; Phillips et al., 2006) und einer ausgeprägten Interaktion von Tumor- und Immunzellen (Hara et al., 2021) in Verbindung gebracht. Der mesenchymale GBM-Subtyp ist hierbei im Vergleich mit nicht-mesenchymalen GBM-Subtypen mit einer stärker verkürzten Überlebenszeit des betroffenen Patienten assoziiert (Wang et al., 2017).

Einleitung

Therapeutika mit immunologischen Fokus könnten hierfür eine weitere wenn auch noch eher experimentelle Therapieoption darstellen, sobald eine höhere Anzahl von Immunzellen verzeichnet werden kann (Martinez-Lage et al., 2019). Dazu gehören zum Beispiel die Gruppe der Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche für die zuvor beschriebenen MES-ähnlichen zellulären Subpopulationen potenziell geeignet sein könnten (Menevse et al., 2023; White et al., 2023). Auch Immuntherapeutika, welche direkt die Gruppe der tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), zusammengefasst in (Chen et al., 2021), ansteuern, zeigen Potenzial für eine zielgerichtete Therapie.

Biomarker zur Identifizierung solcher für die jeweilige Therapie geeigneten Subgruppen und damit potentiell verbundener zellulärer Therapietargets sind insbesondere für die Gruppe der therapielimitierten GBM-Patienten wichtig. Zusätzlich wäre ihre Anwendungsmöglichkeit auf bildgebender Ebene von noch größerer Bedeutung, da dies eine schnelle Diagnose und sodann eine zeitnahe Therapie ermöglichen würde.

1.2 Translokatorprotein (TSPO) und sein Potenzial als Bildgebungsmarker

1.2.1 Lokalisation und Regulation

TSPO ist ein Transmembranprotein, welches erstmals in Nieren, in Zusammenhang mit seiner Eigenschaft Benzodiazepine wie Diazepam zu binden, entdeckt worden war (Braestrup & Squires, 1977). Das Protein ist nach Transkription/Translation in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und ist genetisch auf vier Exonen auf 22q13.31 kodiert (Giatzakis & Papadopoulos, 2004).

Bezüglich seiner Regulation gibt es in Brustkrebszelllinien Evidenzen, dass es durch einen GC-reichen Promotor reguliert wird, der Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren, darunter SP1 und SP3, enthält (Batarseh et al., 2012).

Darüber hinaus konnte in MA-10-Leydig-Zellmodell gezeigt werden, dass der PKC ϵ -ERK1/2-AP1-STAT3-Signalweg (MAPK-Signalweg) die *TSPO* Transkription durch Hochregulierung der ETS- und SP1/SP3-Transkriptionsfaktoren (TFs) initiieren kann (Batarseh et al., 2010). Dies ist einer der Signalwege, welcher unter anderem häufig in GBMs dysreguliert vorliegt (Khabibov et al., 2022; Ou et al., 2020).

Einleitung

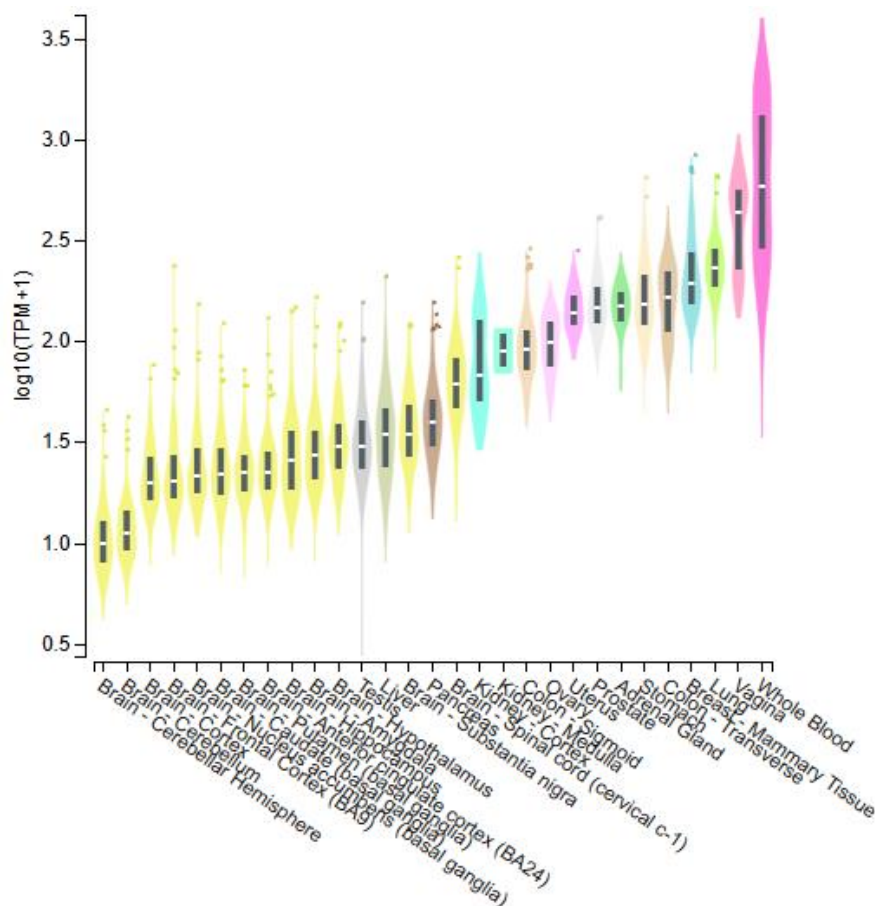
Das Bindungsvermögen von TFs wie z.B. ETS kann über DNA-Methylierung beeinträchtigt werden, was unter anderem in (Héberlé & Bardet, 2019) aufgeführt wurde. Ein Dosis-abhängiger Anstieg von *TSPO* mRNA konnte zusätzlich über eine 5-Aza-2'-Desoxycytidin bedingte epigenetische Demethylierung in humanen Jurkat T-Zell-Leukämie-Zelllinien gezeigt werden (Middleton et al., 2017).

TSPO Genamplifikationen sind schon im Zellmodell (Hardwick et al., 2002) als auch in Biopsien (Han et al., 2003) für Brustkrebsmetastasen beschrieben worden.

In Gliomen ist die Regulierung der *TSPO* Expression jedoch bisher noch nicht ausreichend untersucht worden.

1.2.2 Expression und Funktion unter normalen und pathologischen Bedingungen im Zentralnervensystem (ZNS)

TSPO wird im ZNS im Vergleich zu anderen Geweben auf mRNA Ebene nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Bhoola et al., 2018), siehe Abbildung 2 (Aguet et al., 2019; GTEx Consortium, 2020).



Einleitung

Abbildung 2: Auszug aus GTEx v8 für die transformierte *TSPO* Expression ($\log_{10}(\text{TPM}+1)$) im humanen Normalgewebe

Datenabfrage in GTEx v8 (dbGaP Accession phs000424.v8.p2) vom 15.06.2023. Eine Auswahl an Normalgewebe einschließlich verschiedener Hirnareale (gelb) ist im Vergleich zueinander dargestellt.

Auch auf Proteinebene wurde eine geringe *TSPO* Expression für gesundes, humanes Hirngewebe im Vergleich mit verschiedenen Pathologien beschrieben (Arif et al., 2019). Bereits unter Normalbedingungen können jedoch neurale Aktivitäten einen *TSPO* Anstieg innerhalb von Neuronen, aber nicht innerhalb von Astrozyten oder Mikroglia, verursachen (Notter et al., 2021).

Unter pathologischen Bedingungen steigt die *TSPO* Expression auf mRNA- und/oder Proteinebene unter anderem bei Entzündung oder Neurodegeneration an (Bhoola et al., 2018; Nutma et al., 2021). *TSPO* Anreicherungen sind somit als Biomarker für ZNS Pathologien mit entzündlicher Komponente von Interesse und werden wissenschaftlich diskutiert (Arif et al., 2019; Badiuk et al., 2022; Bhoola et al., 2018; C. Cerami et al., 2017; Guilarte, 2019; Nothdurfter et al., 2012; Rupprecht, Wetzel, et al., 2022; Zinnhardt et al., 2017).

Neoplasien, wie diffuse Gliome, zeigen ebenfalls eine Hochregulation von *TSPO* auf mRNA- und Proteinebene (Ammer et al., 2020; Arif et al., 2019; Bhoola et al., 2018; Cai et al., 2020; Vlodaysky & Soustiel, 2007; Zinnhardt et al., 2020). Ein Zusammenhang zwischen *TSPO* Anreicherungen und hoher Malignität wurde hierbei diskutiert.

Es wurde auch beschrieben, dass *TSPO* Mengenunterschiede über das myeloische Kompartiment das Tumormikroumieu (TME) markieren und therapiebedingte Veränderungen während der Tumorprogression anzeigen (Foray et al., 2021; Quach et al., 2022; Zinnhardt et al., 2020). Auch in großen *in silico* Analysen zeigte die *TSPO* Expression Potenzial als prognostischer Marker für diffuse Gliome, indem hohe *TSPO* Level mit einer kürzeren Überlebenszeit korrelierten. (Cai et al., 2020).

Hinsichtlich der zellulären *TSPO* Quelle wurden eine Vielzahl an Möglichkeiten im gesunden wie auch pathologischen ZNS Setting beschrieben. Es wurden dabei insbesondere Tumorzellen, reaktive Astrozyten, Endothelzellen sowie Makrophagen/Mikroglia intensiv diskutiert (Cai et al., 2020; Holzgreve et al., 2022; Nutma et al., 2021; Roncaroli et al., 2016; Zinnhardt et al., 2020). Des Weiteren schlugen (Cai et al., 2020) eine Kombination aus *TSPO*- und FET-PET als vielversprechende Methode zur Visualisierung tumorassoziierter

Einleitung

myeloider Zellen vor, um eine Patientenauswahl für dafür zugeschnittene Therapien zu finden.

Bezüglich der TSPO Funktionen zeichnet sich ein komplexes Bild ab. Angestoßen durch seine mitochondriale Lokalisation wurde TSPO schon mit Steroidbiosynthese (Nothdurfter et al., 2012; Rupprecht et al., 2010; Rupprecht, Wetzel, et al., 2022), Regulation von Proliferation (Veenman et al., 2004; L. Wu et al., 2020), Apoptose (Lin et al., 2014; Zeno et al., 2009) und Zellmigration (X. Wu & Gallo, 2013) sowie mit mitochondrialer Respiration (Bader et al., 2019; Lejri et al., 2019; Milenkovic et al., 2019) und Regulation von oxidativen Stress (Zeno et al., 2012) assoziiert.

Darüber hinaus wird allgemein diskutiert inwieweit der mitochondriale Metabolismus und dadurch mitunter auch TSPO sich auf das Erinnerungsvermögen (Biechele et al., 2021; Jung, 2020; Ye et al., 2020) und Emotionen, Stress, Angst sowie Furcht (Barron et al., 2021; Nothdurfter et al., 2012; Rupprecht, Wetzel, et al., 2022) auswirkt bzw. in die dafür nötigen Prozesse involviert sein kann.

Dies bedeutet, dass pathologische Veränderungen im Zusammenhang mit TSPO in Hinblick auf onkologische Vorgänge eine Vielfalt relevanter Auswirkungen haben könnten, welche in (Ammer et al., 2020) in Zusammenhang mit den Hallmarks of Cancer (Hanahan & Weinberg, 2011) zusammengefasst wurden (Abbildung 3).

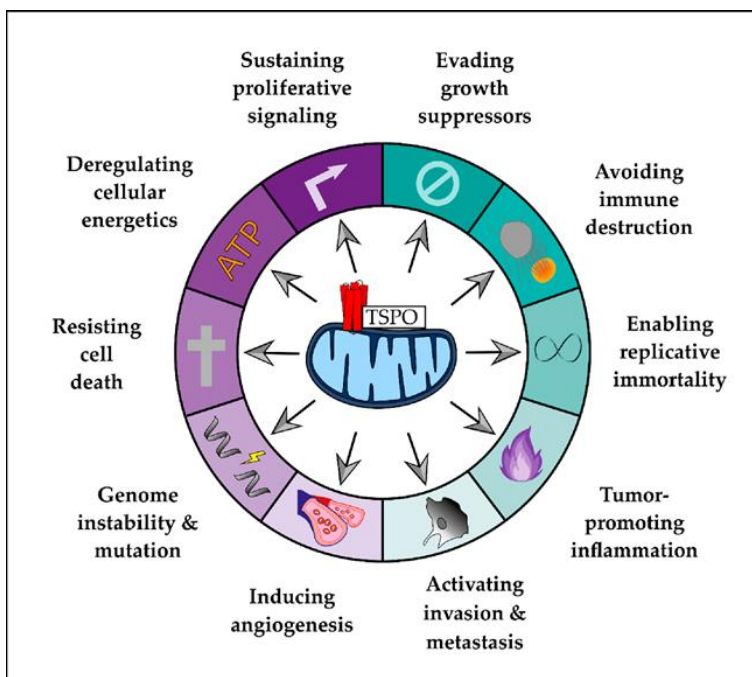


Abbildung 3: TSPO und die Hallmarks of Cancer (Ammer et al., 2020)

Diese Illustration umfasst die zehn von Hanahan und Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011) vorgeschlagenen Merkmale von Krebs, die durch TSPO moduliert werden könnten und von (Ammer et al., 2020) diesbezüglich angepasst wurden.

Einleitung

Diese onkologischen Funktionen schienen jedoch abhängig vom gewählten Modell, von der untersuchten Kohorte und von noch weiteren Faktoren zu variieren, sodass die Interpretation von TSPO Anreicherungen sich nach wie vor schwierig gestaltet.

1.2.3 TSPO-assoziierte Tracer zur Anwendung im erwachsenen Patienten mit diffusen Gliom im wissenschaftlichen Diskurs

Um TSPO als Target im Rahmen der Bildgebung anzusteuern, bedarf es radioaktiv-markierter spezifischer Liganden (TSPO Tracer). Für TSPO sind [¹⁸F]GE180 (Albert et al., 2017; Kaiser et al., 2021; Quach et al., 2022, 2023; Unterrainer et al., 2020), [¹⁸F]DPA-714 (Zinnhardt et al., 2020) sowie [¹¹C](R)PK11195 (Su et al., 2013, 2015) beschrieben und wurden bzw. werden in klinischen Studien und Tiermodellen (Bartos, Kunte, et al., 2022; Foray et al., 2021; Holzgreve et al., 2022) verwendet. Eine Übersicht hierzu ist in (Filippi et al., 2023) mit dem zugehörigem Analyseschwerpunkt dargestellt.

Für [¹¹C](R)PK11195 wurde mittels kinetischer Analysen in (Su et al., 2013) beschrieben, dass sein Bindungspotenzial eine Unterscheidung zwischen niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen ermöglichte. Später zeigte sich, dass auch hochgradige Gliome ein signifikant höheres Tracer Bindungspotenzial aufwiesen (Su et al., 2015). Jedoch konnten hierbei gliomassoziierte Mikroglia/Makrophagen nicht bzw. nur schwach mit diesen Anreicherungen assoziiert werden, hingegen zeigten neoplastische Zellen hauptsächlich höhere Werte innerhalb des Tumors. Die Korrelationsanalyse für das Tracer Bindungspotenzial und die TSPO Expression war hierbei über eine entitätsübergreifende Korrelation getätigt worden.

Für [¹⁸F]DPA-714 wurde über stereotaktische Biopsien von (Zinnhardt et al., 2020) in einer kleinen Kohorte (N = 9) von hauptsächlich IDH-mut Gliomen (nur ein IDH-wt) versucht, den Unterschied zwischen nach WHO 2016 klassifizierten (Louis et al., 2016) niedrig- und hochgradigen Gliomen herauszuarbeiten. Für [¹⁸F]DPA-714 ließ sich dort ein enger Zusammenhang zwischen Tracer Aufnahme und Aktivierung von gliomassoziierten myeloiden Zellen nachweisen. TSPO Expression war hierbei hauptsächlich in den tumorinfiltrierenden HLA-DR⁺ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) und TAMs feststellbar.

Einleitung

In einem NMRI^{nu/nu} Mausmodell mit GLi36dEGFR Zellimplantation ließ sich zusätzlich für [¹⁸F]DPA-714 zeigen, dass der TMZ-Therapie Response über Tracer-markierte reaktive Veränderungen überwacht werden konnte.

[¹⁸F]GE180, ein TSPO Ligand der 3. Generation (Filippi et al., 2023), wies in Analysen von unbehandelten sowie vorbehandelten GBMs bemerkenswert hohe Tumor-to-Background-Ratios, selbst in Arealen ohne MRT-Kontrastmittelanreicherung, auf (Albert et al., 2017). (Unterrainer et al., 2020) erweiterte diese Kohorte und konnte zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem histologischen WHO-Grad nach alter WHO-Klassifizierung (Louis et al., 2016) und TSPO Anreicherungen beschreiben. Die höchste Traceraufnahme war innerhalb der WHO-Grad 4 Gliome zu finden. Jedoch war die Tracerbindungsstärke an TSPO abhängig von verschiedenen genetischen *TSPO* Polymorphismen (Vettermann, Harris, et al., 2021), sodass für Patienten verschiedene Bindungstypen (LAB, MAB, HAB) definiert wurden. (Kaiser et al., 2021) konnte beweisen, dass [¹⁸F]GE180 Anreicherungen nicht nur eine beeinträchtigte Blut-Hirn-Schranke widerspiegeln. Darüber hinaus zeigte (Quach et al., 2023), dass nach erfolgter Radiochemotherapie ein TSPO Anreicherungsanstieg in IDH-wt Gliomen zu verzeichnen war. Des Weiteren ließen sich mittels dieses Tracers bei Patienten, welche ein diffuses Gliomrezidiv aufwiesen, längere Überlebenszeiten in Assoziation mit einer niedrigen TSPO-PET Anreicherung feststellen (Quach et al., 2023).

Im Tiermodell von GL261-transplantierten Mäusen zeigte sich ebenfalls eine höhere [¹⁸F]GE180 Aufnahme an der Inokulationsstelle. Diese nahm mit der Zeit (Tag 4 vs 11) zu (Holzgreve et al., 2022). Darüber hinaus waren [¹⁸F]GE180-markierte TSPO Anreicherungen im SB28-inokulierten Mausmodell vergleichbar mit der TSPO Proteinexpression im humanen GBM (Bartos, Kirchleitner, et al., 2022).

Eine histopathologische Analyse von Biospie/Resektat-Korrelaten, um direkte Zusammenhänge zwischen [¹⁸F]GE180 Aufnahme und TSPO Expression sowie signalbeitragenden zellulären TSPO Quellen im humanen Setting zu untersuchen, wurde noch nicht beschrieben und wird erstmals in dieser Doktorarbeit adressiert.

1.2.4 TSPO in weiteren ZNS Neoplasien

TSPO als PET Target könnte auch für weitere ZNS Neoplasien in Frage kommen. Denn in weiteren malignen Hirntumorentitäten sind sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene

Einleitung

Expressionsunterschiede für TSPO beschrieben (Arif et al., 2019; Bhoola et al., 2018). Darüber hinaus lassen sich jedoch eher wenig bis keine Forschungsarbeiten für TSPO als Biomarker/Bildgebungsmarker in anderen ZNS Neoplasien, vgl. Übersicht in (Verger et al., 2022), finden.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungslage ist es, für ein besseres Verständnis von TSPO als Biomarker bzw. Bildgebungsmarker in Gehirntumoren zu sorgen.

Hierfür wurden *in silico* Analysen mit *in vitro* Experimenten kombiniert, um die Expression und Regulation von TSPO in Gliomen besser charakterisieren zu können. Dadurch war eine Abklärung epigenetischer Veränderungen in Assoziation mit pathologischen TSPO Expressionsänderungen möglich.

Darüber hinaus wurde eine eingehende histologische und molekulare Charakterisierung von pathologisch neoplastisch transformierten Hirngewebe mittels validierter histologischer Färbeverfahren und RNA-Next-Generation-Sequenzierung (RNA NGS) vorgenommen. Darüber konnten differentielle TSPO-PET Muster im Zusammenhang mit histologischen und molekularen Merkmalen im Menschen innerhalb des FOR2858 TSPO-Studienkollektivs besser herausgearbeitet werden. Des Weiteren wurden hierüber Zellpopulationen (Tumorzellen, reaktive Glia, Mikroglia, etc.), die zum TSPO Signal beitrugen, in neoplastischem Hirngewebe des Studienkollektivs bestimmt.

Mittels eines TMA-Ansatzes, in welchem sowohl nicht-neoplastisches als auch pathologisch transformiertes Gewebe abgebildet war, wurde letztlich die TSPO Expression für weitere ZNS Neoplasien zuzüglich verschiedene Hirnregionen evaluiert.

Material

2 Material

2.1 Proteine

2.1.1 Antikörper

Aufgelistete Antikörper wurden im Rahmen der Antikörper-Validierung bzw. Immunohistochemie (IHC) und Multiplex-OPAL-Immunofluoreszenzfärbung (Multiplex OPAL IF) eingesetzt.

Tabelle 1: Antikörper für IHC und Multiplex OPAL IF

Antikörperbezeichnung	Target-Protein	Stock-Konzentration	Hersteller
CD11b Monoclonal Antibody (C67F154)	CD11b	0,5 mg/ml	eBioscience, San Diego, California, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell Clone JC70A	CD31	201 mg/l	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Clone PG-M1	CD68	30 mg/l	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein Clone 6F2	GFAP	46 mg/l	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein Clone DO-7	p53	237 mg/l	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA
Recombinant Anti-PBR antibody [EPR5384] (ab109497)	TSPO	956 ng/ml	abcam, Cambridge, GB
Monoklonaler Anti- α -Tubulin-Antikörper in Maus hergestellte Antikörper	α -Tubulin	nd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Goat anti-Mouse IgG-HRP	Mouse IgG	400 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Rabbit IgG (H+L)	0,8 mg/ml	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Material

2.1.2 Peptid

Nachfolgendes Peptid wurde im Rahmen des Epitop-Blockierungsexperimente für die Antikörper-Validierung von anti-TSPO [EPR5384] verwendet.

Tabelle 2: Peptid für Epitop-Blockierungsexperiment

Peptidbezeichnung	Targetprotein	Stock-Konzentration	Hersteller
Human PBR peptide ab170987	anti-TSPO [EPR5384] ab109497	1mg verdünnt zu 1µg/µl	abcam, Cambridge, GB

2.2 Oligonukleotide

2.2.1 Bisulfit-Methylierung PCR/Sequenzierung Primer

Primer wurden mittels Bisulfite primer seeker Software (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) basierend auf der in UCSC Genombrowser (Nassar et al., 2023) hinterlegten *TSPO* CpG-Insel Sequenz (Gardiner-Garden & Frommer, 1987) entworfen (hg38 22q13.2, Position: chr22:43.151.314-43.152.163, Länge: 850 bp) und sind somit gegen die Bisulfit-konvertierte DNA Sequenz gerichtet. Die Primer wurden über die Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und wurden in Form einer 100 µM Stocklösung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Primer für Bisulfit-Methylierung PCR/Sequenzierung mit Angaben zum Transkriptionsstart (TSS)-Abstand zum Haupttranskript, 5'-3'Sequenz und Fragmentgröße

ID	Bisulfit-PCR Primer	TSPO CpG Distanz zum TSS von ENST00000337 554.6 (bp)	5'-3' Sequenz	Fragmentgröße (bp)
Primerpaar 1 (NP1566)	TSPO_CpG_fwd1	-162 to +34 (CpG 5-29)	TTATTATGGGGAGGAGGAGG GG	249
Primerpaar 1 (NP1567)	TSPO_CpG_rev1	-162 to +34 (CpG 5-29)	AAACACTACCTAACAAAA ATTAACCAAA	249
Primerpaar 2 (NP1568)	TSPO_CpG_fwd2	+70 to +260 (CpG 30-51)	GGTTTGGTTAATTTTTGTT AGGTAG	247
Primerpaar 2 (NP1569)	TSPO_CpG_rev2	+70 to +260 (CpG 30-51)	AAAACCCAAACTCTACTA CCC	247
Primerpaar 3 (NP1570)	TSPO_CpG_fwd3	+353 to +453 (CpG 60-69)	GGGAGGGAAAATTTGGAT AATTT	160
Primerpaar 3 (NP1571)	TSPO_CpG_rev3	+353 to +453 (CpG 60-69)	CCAAATATTCTAAAACCC TCAAAAA	160
Primerpaar 4 (NP1601)	New_TSPO_CpG_fwd4	-201 to -118 (CpG 1-12)	TTTATAGATGGGAAAAGT GAGGTTAGAA	200
Primerpaar 4 (NP1603)	New_TSPO_CpG_rev4	-201 to -118 (CpG 1-12)	AAAACCTCACTCCTCAAAA CCAC	200

Material

Primerpaar 8 (NP1608)	New3_TSPO_Cp G_fwd8	+491 to +646 (CpG 70-80)	GGAATTTTTTTTGGAGGGTTT TAGAATA	232
Primerpaar 8 (NP1610)	New3_TSPO_Cp G_rev8	+491 to +646 (CpG 70-80)	AAAAAATAAAAAAAAAACA AACAAATCCCA	232

2.2.2 cDNA-Synthese und real-time Reverse Transkriptase PCR (qPCR)

Primer

Für die *TSPO* Expressionsbestimmung wurden im Rahmen der cDNA Synthese Random-Hexamer-Primer (#26-4000-03, Gene Link) bezogen. Darüber hinaus wurden die nachfolgend aufgelisteten Primer für den *TSPO* Nachweis im Rahmen der qPCR (Kapitel 3.2.1) verwendet. Die Primer wurden über die Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die Sequenzen für TSPO1-fwd/-rev sind in (Milenkovic et al., 2019) bereits beschrieben.

Tabelle 4: Primer für cDNA-Synthese und qPCR mit ihrer 5'-3' Sequenz und Fragmentgröße

ID	qPCR Primer	Target	5'-3' Sequenz	Fragmentgröße (bp)
NP1498	TSPO1-fwd	TSPO (NM_000714.6)	TCTTTGGTGCCCGACAAA T	87
NP1499	TSPO1-rev	TSPO (NM_000714.6)	GGTACCAGGCCACGGTAG T	87
NP176	SDprimer176 (ARF1)	ARF-1 (NM001658.4)	GACCACGATCCTCTACAA GC	111
NP177	SDprimer177 (ARF1)	ARF-1 (NM001658.4)	TCCCACACAGTGAAGCTG ATG	111

2.2.3 Small interfering RNAs (siRNAs)

Für die Herstellung des transienten *TSPO*-Knockdown (Kapitel 3.3.1) wurden folgende siRNA Pools eingesetzt.

Tabelle 5: Auflistung der siRNA Pools

siRNA Bezeichnung	Target	Stock-Konzentration	Hersteller	Bestellungsnummer
Dharmacon™ ON-TARGETplus <i>TSPO</i> siRNA - SMARTpool	<i>TSPO</i>	20 µM	Horizon Discovery, Cambridge, GB	L-009559-00-0005
ON-Target plus non targeting pool	non-target	20 µM	Horizon Discovery, Cambridge, GB	D-001810-10-05

Material

2.3 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)

Aufgelistete kommerzielle Kits wurden entsprechend dem aufgeführten Experimentzweck eingesetzt.

Tabelle 6: Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) und ihr Verwendungszweck

Reagenzien-Satz (Kit)	Hersteller	Zweck
DC™ Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA	anti-TSPO [EPR5384] Antikörper-Validierung
Dharmafect 1 Transfection Reagent	Horizon Discovery, Cambridge, GB	
Gibco™ Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies, Carlsbad, California, USA	
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	QIAGEN's EMEA headquarters in Hilden, Deutschland	Bisulfit-Methylierungsanalyse der kryo-konservierten Astrozytomfälle
EZ DNA Methylation-Gold® Kits	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	
SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit	Meridian Bioscience, Memphis, Tennessee, USA	
QIAquick PCR Purification Kit (50)	QIAGEN's EMEA headquarters in Hilden, Deutschland	
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA	
EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA	IHC
1X Plus Amplification Diluent	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	Multiplex IF/ OPAL™
OPAL 520 REAGENT PACK	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	
OPAL 570 REAGENT PACK	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	
OPAL 650 REAGENT PACK	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	
OPAL POLYMER HRP MS + RB, 1X	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	
SPECTRAL DAPI	Akoya Biosciences, Marlborough, Massachusetts, USA	
Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	RNA NGS der GBM-Patienten aus TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte
Illumina® Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 Samples)	Illumina Inc., San Diego, California, USA	
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles)	Illumina Inc., San Diego, California, USA	

Material

2.4 Zellkulturmedium und Puffer

Aufgeführte Puffer sowie Zellkulturmedien wurden für den aufgeführten Experimentzweck wie beschrieben hergestellt und eingesetzt.

Tabelle 7: Herstellungsanleitung und Verwendungszweck von Zellkulturmedium und Puffer

Puffer/Zellmedien	Gesamt-Volumen	Zusammensetzung/ Herstellung	Zweck
DMEM (10 % FCS, P/S)	500 ml	10 % (v/v) FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin zum DMEM hinzufügen	Herstellung des transienten TSPO-Knockdown
BSA/PBS (1 % BSA)	10 ml	0,1 g Bovines Serum Albumin in 10 ml 1x PBS, pH = 7,4 lösen	IHC/Multiplex OPAI IF
Citratpuffer (10 mM, pH = 6,0)	1 l	2,94 g C ₆ H ₇ NaO ₇ in dest. Wasser lösen pH mit 1N NaOH auf 6,0 einstellen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
Ethanolreihe (70 %)	100 ml	70 ml Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8% + 30 ml dest. Wasser	
Ethanolreihe (96 %)	100 ml	96 ml Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8% + 4 ml dest. Wasser	
PBST (0,05 % Tween*20, pH = 7,4)	1 l	800 ml 1x PBS, pH = 7,4 mit 500 µl Tween*20 versetzen auf 1 l mit 1x PBS, pH = 7,4 auffüllen	
Tris/EDTA-Puffer (1mM, pH = 9,0)	1 l	1,21 g Tris-Base + 0,37 g EDTA in dest. Wasser lösen pH mit 1 N NaOH auf 9,0 einstellen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
TBST (0,05 % Tween*20, pH = 7,5)	1 l	700 ml dest. Wasser mit 100 ml 10x TBS, pH = 7,5 versetzen 500 µl Tween*20 hinzufügen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
Agarosegel (2 %)	100 ml	2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer mittels 700 W Mikrowelle lösen + 5 µl RedSafe	PCR Kontrolle
Oranger Loading-Puffer	10 ml	0,14 g Ficoll + 10 ml dest. Wasser + Spatelspitze Orange-G	
TAE-Puffer (1x, pH = 8,0)	1 l	20 ml 50x TAE-Puffer, pH = 8,0 auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	

Material

Laufpuffer für SDS-Gele (10x)	1 l	30 g Tris-Base + 144,4 g Glycin + 50 ml SDS (20% w/v) in dest. Wasser lösen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	Puffer-Herstellung
PBS (1x, pH = 7,4)	1 l	100 ml 10x PBS, pH = 7,4 auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
PBS (10x, pH = 7,4)	1 l	80 g Natriumchlorid + 2 g Kaliumchlorid + 14,4 g (Di-)Natriumhydrogenphosphat + 2,4 g Kaliumhydrogenphosphat in dest. Wasser lösen pH mit 1 N NaOH auf 7,4 einstellen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
TAE-Puffer (50x, pH = 8,0)	1 l	242 g Tris-Base + 57,1 g Essigsäure + 100 ml 0,5 M EDTA, pH = 8,0 in dest. Wasser lösen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
TBS (10x, pH = 7,5)	1 l	39,4 g Tris-HCl + 87,66 g Natriumchlorid in dest. Wasser lösen pH mit 1 N NaOH auf 7,5 einstellen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
TBS (10x, pH = 7,4)	1 l	121,14 g Tris-Base + 58,44 g Natriumchlorid + 5,08 g Magnesiumchlorid in dest. Wasser lösen pH mit 1 N NaOH auf 7,4 einstellen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
Towbin-Puffer (10x)	1 l	30,3 g Tris-Base + 144,13 g Glycin in dest. Wasser lösen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	

Material

Lämmli-Puffer (4x)	50 ml	2,0 mg/Spatelspitze Bromophenolblau + 15 ml SDS (20% w/v) + 20 ml Glycerol + 5 ml 1M Tris-HCl, pH = 6,8 + 8,4 ml dest. Wasser + 1,6 ml beta-Mercaptoethanol	Western-Blot
Laufpuffer (1x)	1 l	100 ml 10x Laufpuffer für SDS-Gele auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
Magermilch/TBST (5 % Magermilch, 0,1 % Tween*20, pH = 7,4)	100 ml	5 g Magermilchpulver + 100 ml 1x TBST (0,1 % Tween*20), pH = 7,4	
RIPA-Puffer (pH = 8,0)	200 ml	1,58 g Tris-HCl + 1,75 g Natriumchlorid + 1 ml Triton X-100 + 1 g Natriumdeoxycholat + 1 ml SDS (20% w/v) in dest. Wasser lösen pH auf 8,0 einstellen auf 200 ml mit dest. Wasser auffüllen	
Stripping-Puffer	50 ml	0,38 g Glycin + 0,74 g Natriumchlorid + 350 µl beta-Mercaptoethanol auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen	
TBST (0,1 % Tween*20, pH = 7,4)	1 l	100 ml 10x TBS, pH = 7,4 mit 1 ml Tween*20 versetzen auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	
Towbin-Puffer (1x, frisch)	1 l	100 ml 10x Towbin-Puffer + 200 ml Methanol ROTIPURAN® 99,9 % auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen	

2.5 Chemikalien, Reagenzien, Gele und Membranen

Tabelle 8: Auflistung der Chemikalien, Reagenzien, Gele und Membranen

Chemikalien/Reagenzien/Gele/Membranen Bezeichnung	Hersteller
2x SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Mix	Bioline, London, GB
5x First Strand Buffer	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA
10x Buffer	QIAGEN's EMEA headquarters in Hilden, Deutschland
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
(Di-)Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
(Mono-)Natriumcitrat (C ₆ H ₇ NaO ₇)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas, Waltham, MA, USA

Material

Agarose (certified low range ultra)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromophenolblau Na-Salz für Elektrophorese	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Color Prestained Protein Standard, Broad Range Color Std 7712S	NEB, Ipswich, MA, USA
Desoxycholsäure Natriumsalz/ Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dharmafect 1 Transfection Reagent	Horizon Discovery, Cambridge, GB
DMEM	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Set (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Fermentas, Waltham, MA, USA
DTT	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure ROTIPURAN® ≥96% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS/FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Ficoll® 400	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filter Papier, 35 x 45 cm, 25 sheets (Whatman)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Gibco™ Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Gibco™ Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin PUFFERAN® ≥99% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin (S3301)	Dako/Agilent, Santa Clara, California, USA
HotStarTaq® DNA Polymerase	QIAGEN's EMEA headquarters in Hilden, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MagicMark™ Western Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol ROTIPURAN® 99,9 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, Blotting grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini-PROTEAN® Precast Gradient-Gel 4-20 %	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Orange G (C.I.16230)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS (Waschpuffer für Proteinisolierung)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease inhibitor cocktail (cOmplete ULTRA Tablets, mini, EDTA-free)	Roche, Basel, Schweiz
RedSafe™ nucleic acid staining solution	iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea
Rnasin® Plus (40 U/μl)	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
RNase-freies Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material

SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen AG, Carlsbad, California, USA
TRIS (Trizma base), > 99,9% (Tris-Base)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS-HCl PUFFERAN® ≥99% p.a. (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 reinst.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20 (Tween*20)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol (beta-Mercaptoethanol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Geräte und Laborausstattung

Nachfolgend sind alle verwendeten Geräte mit Ausnahme der Zellkultur-spezifischen Laborausstattung (Kapitel 2.12) aufgeführt.

Tabelle 9: Auflistung der Geräte und Laborausstattung

Gerät/Ausstattung	Modell/Größe(n)	Hersteller
Brutschrank	B 6120	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Elektrophorese-PowerSupply	POWER PAC 3000	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Eppis, SafeSeal	1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Geldokumentationssystem	ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare, München, Deutschland
Magnetständer	Magnetic Stand-96	Life technologies, Carlsbad, California, USA
Mehrkanalpipette	5-100 μl	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikroskop	OLYMPUS IX81	Evident, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan
Mikroskop	M2 Imager mit Axiocam 503 color camera	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	Microm HM430 Sliding Microtome	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrowelle 700 W	MW2226CB	Bomann, Kempten, Deutschland
Mirkoplaten-Reader	FLUOStar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Next-Generation-Sequenzierer	NextSeq500/ 550Dx	Illumina Inc., San Diego, California, USA
Nukleinsäuren-Isolierer	Maxwell® RSC Instrument	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
PCR-Platten	96-Well	4titude, Dorking, GB
PCR-Platten-Klebefolien	qPCR seal sheets	4titude, Dorking, GB
PCR-System (real-time)	ABI-310/ StepOnePlus™ cycler	Applied Biosystems/ Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-System (Thermocycler)	T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	FiveEasy	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Pipetten, Research plus	0,5-10 μl; 2-20 μl; 20-200 μl; 100-1000 μl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten, serologisch	2 ml; 5 ml; 10 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft	0,5-10 μl; 2-20 μl; 20-200 μl; 100-1000 μl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand, Ismaning, Deutschland
Reagenzglasschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Material

Rotationsgerät	Tube Rotator	Snijders Labs, Tilburg, NL
Schraubröhre	15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spektrophotometer, fein	4200 Tape Station	Agilent, Santa Clara, California, USA
Spektrophotometer, grob	NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermo-Mixer	Compact 5350	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallstabgerät	Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
Waage, Labor	Hotplate Stirrer	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Zentrifuge, mikro	MINISTAR SILVERLINE	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Zentrifuge, Tisch	Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

2.7 Bioinformatische Tools (Datenbanken und Software)

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Datenbanken und Software

Datenbank/Software Bezeichnung	Version/Module/Projekte	Hersteller/Zitation/Projektadresse
Bisulfite primer seeker	28.10.2021-15.07.2022	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
cBioportal	"TCGA Firehose Legacy brain lower grade glioma"- Datensatz (N = 283) sowie Glioblastom-Datensatz (N = 248) von Brennan et al. 2013	https://www.cbioportal.org/datasets ; Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013
Cell Counter plugin	v3.0.0	Kurt De Vos 2010
Chromas (free)	v2.6.6	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia
Citavi	v6	Swiss Academic Software GmbH, Zürich, Schweiz
DeepL Übersetzer (Online)	2019-2023	DeepL SE, Köln, Deutschland
dREG	BayesPrism	Danko et al. 2015
Ensembl/Biomart	human genome assembly GRCh38.87 v102	Cunningham et al. 2022
Fiji Image J	ImageJ2	Schindelin et al. 2012
FUMA GENE2FUNC	v1.3.6a -v1.4.1	Watanabe et al. 2017
Gene Pattern	GSEA v20.3.5 von Mootha et al. 2003; Subramanian et al. 2005 sowie ssGSEA v10.0.11 von Subramanian et al. 2005; Barbie et al. 2009	Reich et al. 2006
GEO	GSE131928 (Einzelzellreferenz für Dekonvolution)	Barrett et al. 2012
GraphPad Prism	v8/9	GraphPad Software, La Jolla, California, USA
GTEX portal	v8/data release 8 19.12.2021	Aguet et al. 2019; The GTEx Consortium et al. 2020
JASPAR	9th release of 2022	Castro-Mondragon et al. 2022

Material

MARS Data Analysis Software	v3.32 R5	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Microsoft Office	Home and Student 2010 (Home Office), Standard 2013 (UKR)	Microsoft, Redmond, Washington, USA
MSigDB	Versionen eingebettet in Gene Pattern Module/ FUMA GENE2FUNC	Liberzon et al. 2011
NanoDrop 2000-Software	v1.6.198	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Notepad++	v8.5.3	Don Ho 2019
Omega Steuerungs-Software	v5.50 R4	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
R	<i>in silico</i> v3.5.3 - 4.0.2, RNA NGS v4.1.2	R Core Team (2021)
R Studio	RStudio 2023.03.0+386 "Cherry Blossom" Release for Windows	Posit team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL http://www.posit.co/ .
Reactome	Release 82 Pathway browser 3.7	Jassal et al. 2020; Gillespie et al. 2022
R-Pakete	Versionen aufgelistet in Methodenteil	Referenzen zitiert im Methodenteil
SPSS	v25/28	IBM, Armonk, New York, USA
StepOneTM Software	v2.3	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
TapeStation Software	v3.2	Agilent, Santa Clara, California, USA
TCGA	TCGA-GBM	https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-GBM
TCGA	TCGA-LGG	https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LGG
UCSC genome browser (UCSC Genombrowser)	letztes Update bei Verwendung: 13.03.2020	http://genome.ucsc.edu/ ; Gardiner-Garden & Frommer 1987; Nassar et al. 2023
Zotero	v6.0.20	Roy Rosenzweig Center, for History and New Media, George Mason University, Fairfax, Virginia, USA

2.8 *In silico* Datensätze

2.8.1 HTSeq Count Expressionsdatensatz

Open-access HTSeq Count Daten aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://www.cancer.gov/tcga>) wurden für Expressionsanalysen verwendet (Projekte TCGA-LGG/-GBM: N = 630 qualitätskontrollierte Fälle, 38,3 % weiblich, $\text{Alter}_{\text{Mittelwert}} = 47 \pm 15,2$ Jahre, WHO-Klassifizierung entsprechend (Louis et al., 2016), Zugriffsdatum: 28.02.2021). WHO-Grad und *IDH1/2*-Mutationsstatus waren für N = 566 Fälle angegeben: 36,4 % hatten

Material

ein Gliom mit WHO-Grad 2 (18 IDH-wt, 188 IDH-mut), 40,1 % ein Gliom mit WHO-Grad 3 (66 IDH-wt, 161 IDH-mut) und 23,5 % ein GBMs mit WHO-Grad 4 (127 IDH-wt, 6 IDH-mut). Hinsichtlich der Expressionssubtypen waren 56 IDH-wt GBMs mesenchymal, 43 IDH-wt GBMs klassisch und 12 IDH-wt plus 4 IDH-mut GBMs proneural.

2.8.2 K450 Illumina Methylierungsarraydatensatz

Es wurden open-access K450 Illumina Methylierungsarray Daten des TCGA-Forschungsnetzwerkes (<https://www.cancer.gov/tcga>) verwendet (Zugriffdatum: 01.04.2020, 04.11.2020), welche die *TSPO* CpG-Insel (hg38 22q13.2, Position: chr22: 43.151.314-43.152.163, Länge: 850 bp) abdecken. Nach Ausschluss von Fällen mit unklaren Annotationen verblieben 130 hochgradige (Projekt: TCGA-GBM) und 515 niedriggradige Gliome (Projekt: TCGA-LGG) für die Datenevaluation. Entitäten waren nach (Louis et al., 2016) klassifiziert. Abschließende Analysen schlossen folgende Patientenzahlen ein: 76 anaplastische Oligodendrogliome (AOD, ICD-O-Code: 9451/3), 118 nicht anderweitig spezifizierte Oligodendrogliome (NOS OD, ICD-O-Code: 9450/3), 130 Mischgliome (MG, ICD-O-Code: 9382/3), 62 nicht näher bezeichnete Astrozytome (NOS A, ICD-O-Code: 9400/3), 129 anaplastische Astrozytome (AA, ICD-O-Code: 9401/3) und 130 Glioblastome (GBM, ICD-O-Code: 9440/3).

2.8.3 Kopienzahl-/Mutationsdatensätze

Für die Analyse von somatischen Mutationen und Kopienzahlveränderungen für *TSPO* wurde der in (Brennan et al., 2013) veröffentlichte GBM-Datensatz (N = 248) und der TCGA, Firehose Legacy brain lower grade Gliom-Datensatz (N = 283), beide hinterlegt in cBioportal (E. Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013), für Oncoprint-Recherchen herangezogen.

2.9 Kryo-konservierte Astrozytomfälle für Bisulfit-Methylierungsanalyse und Antikörpervalidierung

Für die Bisulfit-Methylierungsanalyse sowie die Antikörpervalidierung von anti-*TSPO* [EPR5384] wurde frisch eingefrorenes Tumorgewebe aus dem Tumorgewebearchiv der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Regensburg ausgewählt (Tabelle 11). Dieses Gewebe wurde nach Protokollen untersucht, die von der Ethikkommission der

Material

Universität Regensburg genehmigt worden waren (Ethikgremium-Approval-Nr: 18-1207-101 und 20-1799-101). Die Tumore waren entsprechend der WHO-Klassifikation von 2016 (Louis et al., 2016) klassifiziert worden und wurden für diese Doktorarbeit entsprechend der WHO-Klassifikation von 2021 (Louis et al., 2021) reklassifiziert. Tumorbestandteile wurden im Vorfeld dieser Doktorarbeit direkt nach der Operation auf einem Korkplättchen fixiert, mittels N₂-vorgekühltem 2-Methylbutan schonend eingefroren und bei - 80 °C aufbewahrt. Nur Gewebeproben/-isolate mit einem Tumorzellgehalt von $\geq 70\%$ sind für die Methylierungsanalysen verwendet worden.

Zwei nicht-neoplastische Gehirnproben von unterschiedlichen Individuen (NB01, NB02) dienten als Referenz für gesundes Hirngewebe (D1234062, Biochain, Newark, New Jersey, USA und X11001-1, Epigentek, Farmingdale, New York, USA).

Als weitere Methodenkontrollen kamen handelsübliche hypermethylierte DNA (S7821, Millipore/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), abgekürzt HMC, und unmethylierte Blut-DNA zum Einsatz.

Die Antikörpervalidierung wurde an Proteinlysaten von 4 Glioblastomen, IDH-Wildtyp (ZNS-WHO-Grad 4) durchgeführt.

Tabelle 11: Kryo-konservierte Astrozytomfälle für Bisulfit-Methylierungsanalyse und Antikörpervalidierung

Fall ID ¹	Entität WHO2021 ²	WHO-Grad ³	IDH-Status ⁴	1p19q LOH ⁵	MGMT Methylierung ⁶
NB01	non-neoplastisches Hirngewebe	---	---	---	---
NB02	non-neoplastisches Hirngewebe	---	---	---	---
R_DA01	diffuses Astrozytom	WHO 2	IDH1:p.R132H	nocodel	0,33
R_DA02	diffuses Astrozytom	WHO 2	IDH1:p.R132H	nocodel	0,03
R_DA03	diffuses Astrozytom	WHO 2	IDH1:p.R132H	nocodel	<3%
R_DA04	diffuses Astrozytom	WHO 2	IDH1:p.R132H	nocodel	0,08
R_DA05	diffuses Astrozytom	WHO 2	IDH1:p.R132G	nocodel	<3%
R_AA01	anaplastisches Astrozytom	WHO 3	IDH1:p.R132H	nocodel	0,27
R_AA02	anaplastisches Astrozytom	WHO 3	IDH1:p.R132H	nocodel	0,9
R_AA03	anaplastisches Astrozytom	WHO 3	IDH1:p.R132H	nocodel	<3%
R_AA04	anaplastisches Astrozytom	WHO 3	IDH1:p.R132H	nocodel	0,46
R_AA05	anaplastisches Astrozytom	WHO 3	IDH1:p.R132H	nocodel	0,06
R_GB01	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nocodel	1
R_GB02	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	0,52
R_GB03	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nocodel	<3%

Material

R_GB04	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nocodel	<3%
R_GB05	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	0,15
R_GB06	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	0,81
R_GB07	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	0,31
R_GB08	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	0,25
R_GB09	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	<3%
R_GB10	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	<3%
R_GB11	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	<3%
R_GB12	Glioblastom	WHO 4	IDHwt	nd	<3%
HMC	hypermethylierte DNA	---	---	---	---
Blut	hypomethylierte DNA	---	---	---	---

- ¹ Anonymisierte Fall ID; NB: non-neoplastisches Hirngewebe, R_DA: diffuses Astrozytom, R_AA: anaplastisches Astrozytom, R_GB: Glioblastom, HMC: hypermethylierte DNA, Blut: hypomethylierte DNA
- ² Tumor Entität gemäß WHO-Klassifizierung von 2021
- ³ WHO-Grad gemäß WHO-Klassifizierung von 2021
- ⁴ Mutation-Status der Iso-citratdehydrogenase; IDHwt: IDH-wt, IDH1:p.R132H: *IDH1*-Mutation an Position p.R132
- ⁵ Verlust der Heterozygotie auf Chromosomarm 1p und 19q; codel: 1p19q Kodeletion, nocodel: 1p19q intakt
- ⁶ Methylierungsgrad des *O*-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) Promotor
- nd nicht bestimmt

2.10 TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte

Es wurden Biopsien sowie Resektionen von Gliompatienten im Rahmen der gemeinschaftlich erhobenen FOR2858 (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) TSPO-PET Bildgebungsstudie, erstmals in (Quach et al., 2023) beschrieben, im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgearbeitet (Abbildung 4 für allgemeine Studien-Übersicht). Dafür wurde das Material in Zusammenarbeit zwischen den Standorten des Universitätsklinikums München (LMU München, München, Deutschland) und des Universitätsklinikums Regensburg (UKR, Regensburg, Deutschland) prozessiert.

Das Material wurde im Zentrum für Neurochirurgie/ Neuropathologie/Nuklearmedizin des Universitätsklinikums München (LMU München, München, Deutschland) im Einklang mit örtlichen Ethikvotum (Ethikgremium-Approval-Nr.: 18-783) gesammelt. Ziel der Studie war es hierbei eine detaillierte Untersuchung von Gliommaterial zu ermöglichen, indem Patienten ein ausführliches Imaging/Bildgebungs-Protokoll durchliefen ehe basierend auf diesen Informationen entlang einer definierten Trajektorie die stereotaktische Probenentnahme erfolgte.

Material

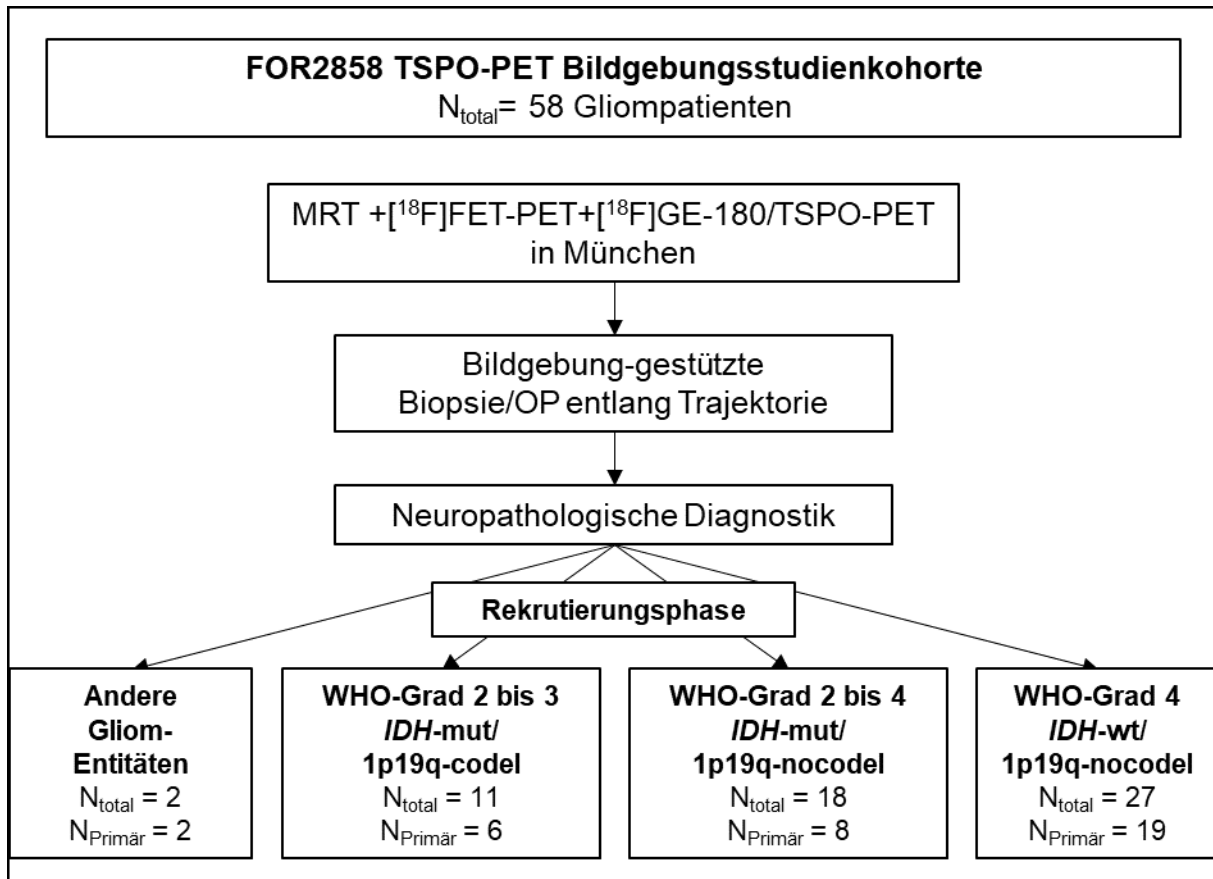


Abbildung 4: CONSORT-Diagramm der Fallakquize für FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudie

Material wurde im Zentrum für Neurochirurgie/Neuropathologie/Nuklearmedizin des Universitätsklinikum München (LMU München, München, Deutschland) im Einklang mit örtlicher Ethikkommissionsgenehmigung (Ethikgremium-Approval-Nr.: 18-783) von 58 Gliompatienten gesammelt. Das ergab in Summe 27 Patienten mit Glioblastom (IDH-wt, 1p19q-nocodel, WHO-Grad 4), 18 mit diffusem/anaplastischem Astrozytom (IDH-mut, 1p19q-nocodel, WHO-Grad 2 bis 4), 11 mit Oligodendrogliom (IDH-mut, 1p19q-codel, WHO-Grad 2 bis 3) und 2 Patienten mit anderweitigen Diagnosen während der Rekrutierungsphase. Ziel der Studie war es eine detaillierte Untersuchung von Gliommateriale zu ermöglichen, indem Patienten ein ausführliches Bildgebungs-Protokoll durchliefen ehe basierend auf diesen Informationen entlang einer definierten Trajektorie die stereotaktische Probenentnahme erfolgte.

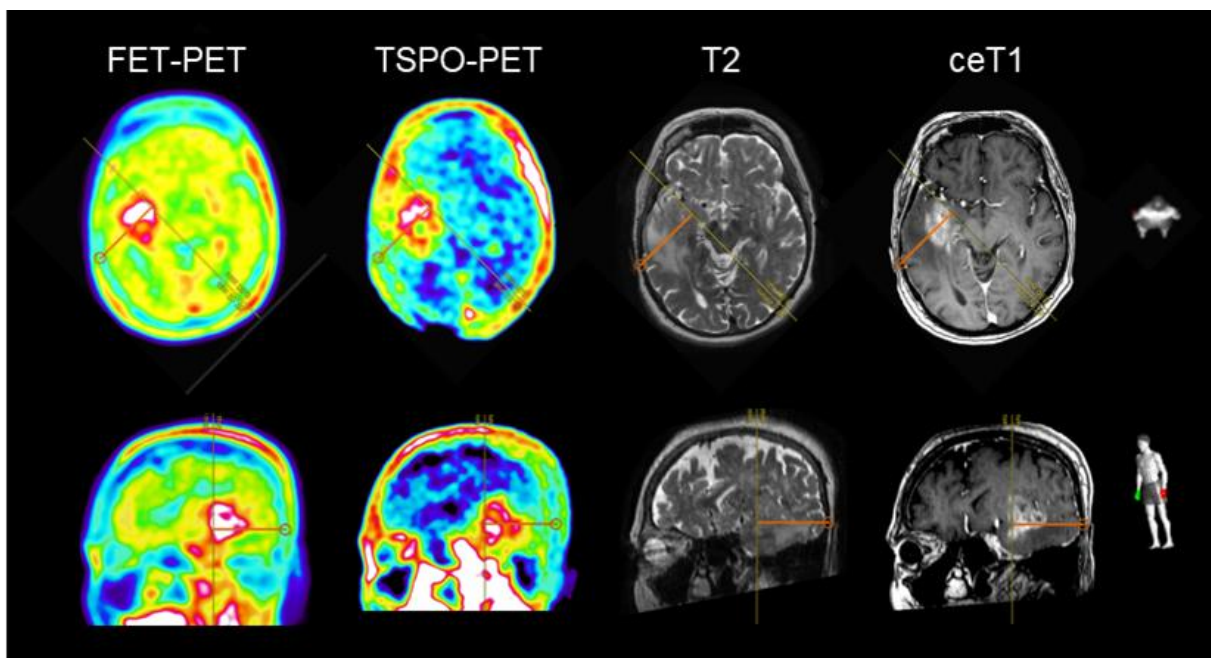
Im Detail: Patienten mit Verdachtsdiagnose „diffuses Gliom“ ($N_{\text{total}} = 58$) hatten innerhalb eines Zeitraums von maximal 18 Tagen (Median = 3) vor der Operation ein kontrastverstärktes MRT, TSPO-PET (Tracer: $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$) und $[^{18}\text{F}]\text{FET-PET}$ erhalten (Abbildung 5). Das MRT umfasste gadoliniumverstärkte T1- (1 mm-Schichten) und T2-gewichtete Scans (2 mm-Schichten). Beim TSPO-PET wurden ca. 180 MBq $[^{18}\text{F}]\text{GE180}$ intravenös injiziert und 60 bis 80 min nach der Injektion Summationsscans zur Bildanalyse verwendet. Beim $[^{18}\text{F}]\text{FET-PET}$ wurden ca. 180 MBq $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ injiziert und 40 min nach der

Material

Injektion wurden Summationsbilder, wie zuvor beschrieben (Unterrainer et al., 2020), analysiert.

Interessante Bereiche wurden in einem interdisziplinären Austausch zwischen dem behandelnden Neurochirurgen und Nuklearmedizinern festgelegt. Die Brainlab-Planungssoftware (Brainlab, München, Deutschland) wurde für die Bildfusion und für die Biopsieplanung (Abbildung 5) oder für die intraoperative Navigation im Falle einer offenen Tumorresektion verwendet. Die TSPO-PET und FET-PET Anreicherung an der exakten Lokalisationskoordinate der entnommenen Gewebeprobe wurde retrospektiv gemessen, indem die intraoperativen CT- oder intraoperativ erfassten Navigationspunkte mit den PET-Bildern auf einer Hermes-Workstation (Hermes Medical Solutions, Stockholm, Schweden) fusioniert wurden.

Standard histologische und molekulare Diagnostik wurde am Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (LMU München, München, Deutschland) gemäß WHO-Kriterien (Louis et al., 2016, 2021) im Zeitraum dieser Doktorarbeit durchgeführt bzw. auf die neue Klassifizierung aktualisiert. Insgesamt wurden somit 27 Patienten mit Glioblastom (IDH-wt, 1p19q-nocodel, WHO-Grad 4), 18 mit diffusen/anaplastischen Astrozytom (IDH-mut, 1p19q-nocodel, WHO-Grad 2 bis 4), 11 mit Oligodendrogliom (IDH-mut, 1p19q-codel, WHO-Grad 2 bis 3) und 2 Patienten mit anderweitigen Diagnosen innerhalb der Rekrutierungsphase gesammelt.



Material

Abbildung 5: Bildfusionsbeispiel eines IDH-wt GBM der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte (von Dr. Stefanie Quach erstellt)

Patienten mit Verdachtsdiagnose „diffuses Gliom“ hatten innerhalb eines Zeitraums von maximal 18 Tagen (Median = 3) vor der Operation ein kontrastverstärktes MRT, TSPO -PET (Tracer: [¹⁸F]GE180) und [¹⁸F]FET-PET erhalten. Das MRT umfasste gadoliniumverstärkte T1- (1 mm-Schichten) und T2-gewichtete Scans (2 mm-Schichten). Beim TSPO-PET wurden ca. 180 MBq [¹⁸F]GE180 intravenös injiziert und 60 bis 80 min nach der Injektion Summationsscans zur Bildanalyse verwendet. Beim [¹⁸F]FET-PET wurden ca. 180 MBq [¹⁸F]FET injiziert und 40 min nach der Injektion wurden Summationsbilder, wie zuvor beschrieben (Unterrainer et al., 2020), analysiert. Interessante Bereiche wurden in einem interdisziplinären Austausch zwischen dem behandelnden Neurochirurgen und Nuklearmediziner festgelegt. Die Brainlab-Planungssoftware (Brainlab, München, Deutschland) wurde für die Bildfusion und für die Biopsieplanung oder für die intraoperative Navigation im Falle einer offenen Tumoresektion verwendet. Das dargestellte Bildfusionsbeispiel wurde mit Brainlab-Planungssoftware durch Dr. Stefanie Quach erstellt.

Für alle Patienten wurden die neurochirurgisch entnommenen Gewebeproben mit den zugehörigen Bildgebungsdaten verlinkt und in SPSS v25/28 in einem Datensatz erfasst. Dieser Datensatz wurde mit extrahierten klinischen Daten und Befundinformationen für weitere Analysen in Zusammenarbeit mit Dr. Franziska Dekorsy (Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum München, LMU München, München, Deutschland) und Dr. Stefanie Quach (Abteilung für Neurochirurgie, Universitätsklinikum München, LMU München, München, Deutschland) ergänzt bzw. erweitert.

Die größte Gruppe innerhalb der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte stellte hierbei die Gruppe der IDH-wt/1p19q-nocodel, WHO-Grad 4 Glioblastompatienten (GBM-Patienten) mit insgesamt 27 Patienten dar (Abbildung 6), für welche nur ein Drop out in Folge der Probenasservation zu verzeichnen war. Somit wurde diese Gruppe in ihrer Proben-Prozessierung und Datenevaluation priorisiert und war Hauptfokus bei der Auswertung des Studienkollektivs.

Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe von 26 IDH-wt GBM-Patienten (18 Primär- und 8 Rezidivtumoren) wurde für weitere immunologische Färbungen und die Bewertung des Tumorgehalts (Detailinformationen in Tabelle 22 im Anhang unter Kapitel 7.3) in der Abteilung für Neuropathologie am Universitätsklinikums Regensburg (UKR, Regensburg, Deutschland) im Rahmen von histologischen Analysen verwendet.

Material

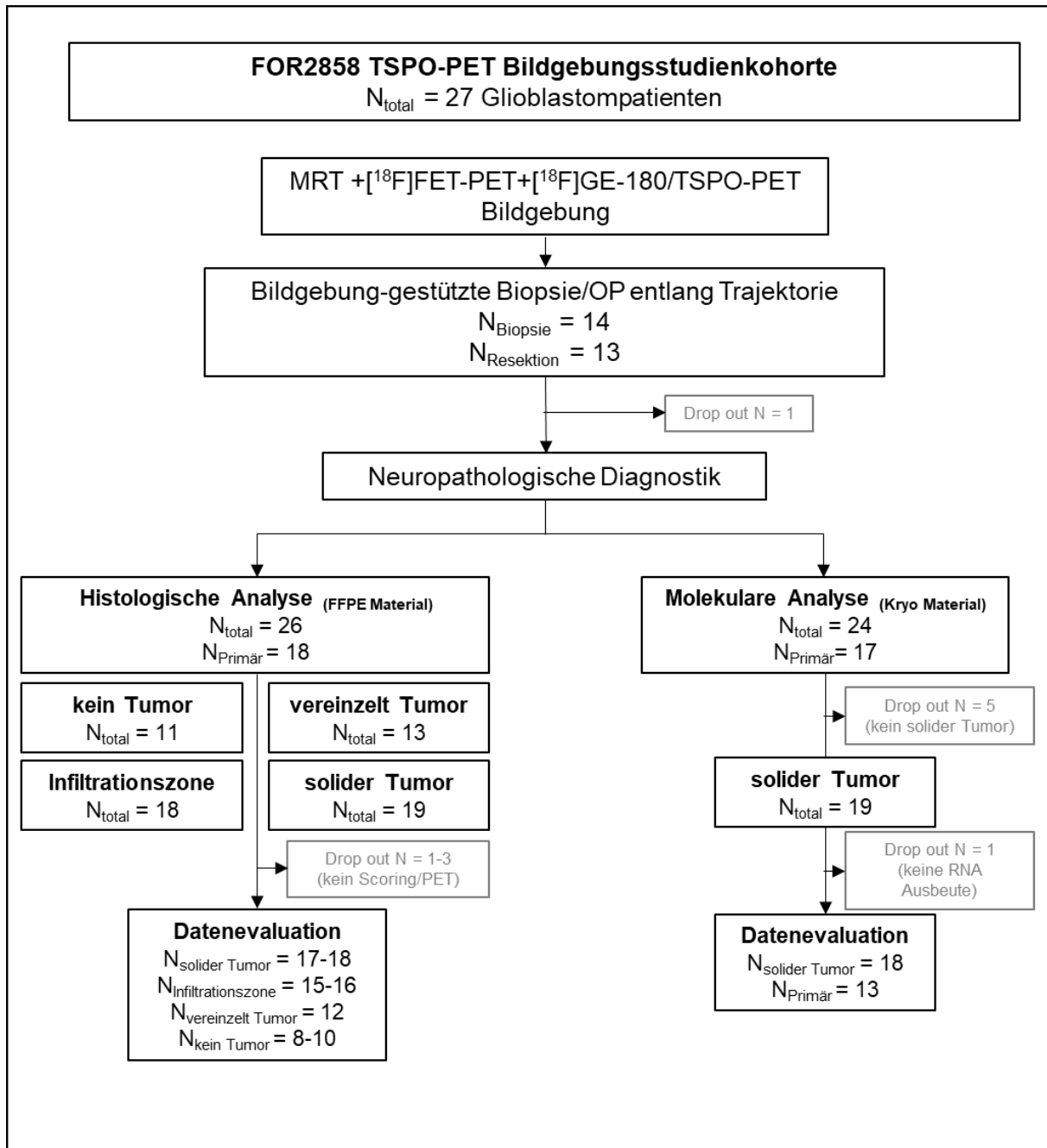


Abbildung 6: CONSORT-Diagramm der gewebebasierten Aspekte für Glioblastompatienten der FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudie

Die FOR2858 TSPO-Studienkohorte umfasste insgesamt 27 GBM-Patienten. Bei allen Patienten wurde eine kontrastverstärkte MRT, TSPO-PET und Aminosäure-PET durchgeführt. Die zu untersuchenden Bereiche wurden in einem interdisziplinären Austausch zwischen dem behandelnden Neurochirurgen und dem Nuklearmediziner festgelegt. Durch eine mit der Bildgebung koordinierte Biopsie/Resektion entlang der Trajektorie konnte bei 14 Patienten Biopsiematerial und bei 13 Patienten Resektionsmaterial für weitere Analysen gewonnen werden. Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Material von 26 IDH-wt GBM-Patienten (18 Primär- und 8 Rezidivtumoren) wurde für weitere histologische/molekulare Analysen verwendet. Der Gehalt an Tumorzellen wurde anhand von HE-Färbungen jedes Präparats bewertet und in die folgenden Kategorien unterteilt: "kein Tumor", "vereinzelt Tumor", "Infiltrationszone", "solider Tumor" (siehe Text für weitere Erläuterungen der Kategoriecharakteristika). Beim verwendeten stereotaktischen Ansatz wurden von jedem einzelnen Patienten mehrere Gewebeproben, die verschiedenen Kategorien

Material

des Tumorzellgehalts zugeordnet werden konnten (Tabelle 22 für Detailinformationen je Probe), gesammelt. Nach einigen Drop outs, bei denen keine zuverlässige immunohistochemische Färbung oder keine Extraktion von TSPO-PET Werten möglich war, standen, abhängig von der jeweiligen analysierten Variabel, 17-18 Patienten mit soliden Tumorproben, 15-16 Patienten mit Infiltrationszonenproben, 12 Patienten mit Proben mit vereinzelt Tumor und 8-10 Patienten mit Proben ohne Tumor für die Datenauswertung zur Verfügung. Für die molekularen Analysen wurde neben dem FFPE-Material auch frisch eingefrorenes Kryomaterial von 24 GBM-Patienten mit IDH-wt gesammelt. Nach Ausschluss von Proben mit Tumorgehalt unterhalb der Kategorie „solider Tumor“ (5 Patienten) und Proben ohne ausreichende RNA-Ausbeute (1 Patient) stand eine Untergruppe von 18 IDH-wt GBM-Patienten (13 Primär- und 5 Rezidivtumoren) für die molekulare Datenauswertung zur Verfügung.

Der Gehalt an Tumorzellen wurde anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen (Kapitel 3.4.1) je Präparat mit den folgenden Kategorien bewertet: "kein Tumor" ist gekennzeichnet durch Kortex und weiße Substanz, "vereinzelt Tumor" durch Kortex, Satellitosen und/oder sporadisch infiltrierende Tumorzellen, "Infiltrationszone" wies höhere Tumorzellmengen auf und "solider Tumor" war durch Tumorzellgehalt $\geq 80\%$ gekennzeichnet. Nach Ausschluss der Drop outs, bei denen keine Färbung oder keine Extraktion von TSPO-PET Werten möglich war, standen, abhängig von den jeweils analysierten Variablen, für die Datenevaluation 17-18 Patienten (77-109 Einzelproben) mit soliden Tumor, 15-16 Patienten mit Proben aus der Infiltrationszone (49-78 Einzelproben), 12 Patienten aus der Kategorie „vereinzelt“ Tumor (37-56 Einzelproben) und 10 Patienten aus der Kategorie „kein Tumor“ (20-25 Einzelproben) zur Verfügung. Zum besseren Verständnis standen zum Beispiel für die Spearman-Rho-Korrelationsanalyse der Einzelwerte zwischen TSPO-PET (SUVmax) und TSPO-IHC (%Fläche) letztlich 73 Proben mit soliden Tumor und 50 Proben aus der Infiltrationszone zur Verfügung.

Für die molekularen Analysen wurde neben dem FFPE-Material auch frisch eingefrorenes Material (Kryo) von IDH-wt 24 GBM-Patienten gesammelt. Nach Ausschluss von Proben mit Tumorgehalt unterhalb dem der Kategorie „solider Tumor“ (5 Patienten) sowie von Proben ohne ausreichende RNA-Ausbeute (1 Patient) stand eine Subkohorte von 18 IDH-wt GBM-Patienten (13 Primär- und 5 Rezidivtumoren) für die molekulare Datenevaluation zur Verfügung (Tabelle 12).

Material

Tabelle 12: RNA NGS Subkohorte der IDH-wt GBM-Patienten der TSPO-PET Bildgebungsstudie

Fallparameter		Probenentnahme und -asservation					Molekularparameter				
TSPO ID ¹	Rezidiv ²	OP ³	Block ID ⁴	Proben ID ⁵	Tumorgehalt-gruppe ⁶	Asservation ⁷	DeSeq-normalisierte TSPO Counts ⁸	TSPO Expressions-gruppe ⁹	Expressions-subtyp ¹⁰	TSPO Cluster ¹¹	NGS Batch ID ¹²
TSPO-04	Rezidiv	Biopsie	A	-14	solider Tumor	Kryo	84,95	TSPO_LOW	PRO/CL	TSPO LOW	6
TSPO-06	Primär	Biopsie	II	-4	solider Tumor	Kryo	100,84	TSPO_HIGH	CL	TSPO HIGH	6
TSPO-10	Primär	Biopsie	B	-3	solider Tumor	Kryo	150,67	TSPO_HIGH	MES	TSPO HIGH	5
TSPO-11	Primär	Biopsie	A	-13	solider Tumor	Kryo	80,96	TSPO_LOW	CL	TSPO LOW	5
TSPO-12	Primär	Resektion	II	II	solider Tumor	Kryo	389,78	TSPO_HIGH	MES	TSPO HIGH	7
TSPO-13	Primär	Resektion	II	II	solider Tumor	Kryo	189,82	TSPO_HIGH	CL	TSPO HIGH	1
TSPO-14	Primär	Resektion	II	II	solider Tumor	Kryo	146,2	TSPO_HIGH	CL	TSPO HIGH	5
TSPO-19	Primär	Resektion	IX	IX	solider Tumor	Kryo	67,65	TSPO_LOW	PRO/CL	TSPO LOW	6
TSPO-21	Rezidiv	Resektion	IA	IA	solider Tumor	Kryo	73,08	TSPO_LOW	PRO/CL	TSPO LOW	5
TSPO-45	Primär	Biopsie	IIA	-8	solider Tumor	Kryo	62,38	TSPO_LOW	CL	TSPO LOW	1
TSPO-57	Primär	Biopsie	B	-2	solider Tumor	Kryo	77,79	TSPO_LOW	PRO/CL	TSPO LOW	5
TSPO-65	Primär	Resektion	I	I	solider Tumor	Kryo	148,95	TSPO_HIGH	CL	TSPO HIGH	5
TSPO-70	Primär	Biopsie	A	-5	solider Tumor	Kryo	24,18	TSPO_LOW	PRO	TSPO LOW	5
TSPO-73	Rezidiv	Biopsie	B	-10	solider Tumor	Kryo	436,32	TSPO_HIGH	MES/CL	TSPO HIGH	5
TSPO-83	Primär	Biopsie	I	-12	solider Tumor	Kryo	67,72	TSPO_LOW	CL	TSPO LOW	7
TSPO-84	Primär	Resektion	IIA	IIA	solider Tumor	Kryo	260,52	TSPO_HIGH	MES/CL	TSPO HIGH	7
TSPO-85	Rezidiv	Resektion	III	III	solider Tumor	Kryo	220,98	TSPO_HIGH	MES/CL	TSPO HIGH	7
TSPO-89	Rezidiv	Resektion	I	I	solider Tumor	Kryo	38,32	TSPO_LOW	PRO/CL	TSPO LOW	7

- 1 TSPO-PET Bildgebungsstudien ID
- 2 Tumorstatus; Primär: Tumor ist ein Primärtumor, Rezidiv: Tumor ist ein Rezidivtumor
- 3 Probeentnahme Status; Biopsie: Biopsie mit Proben Koordinate entlang Trajektorie, Resektion: Resektion eines definierten Tumorareals
- 4 Block ID der entnommenen Probe
- 5 Proben ID bzw. Trajektorienkoordinate der entnommenen Probe
- 6 Tumorzellgehaltgruppe; kein Tumor: Kortex+weiße Substanz, vereinzelt Tumor: Kortex/Satellitosen und/oder sporadisch infiltrierende Tumorzellen, Infiltrationszone: höherer Tumorgehalt als "kein Tumor/vereinzelt Tumor", solider Tumor: Tumorzellgehalt $\geq 80\%$
- 7 Probenasservation; FFPE: Formalin fixiert und Paraffin eingebettet Material, Kryo: kryokonserviert, frisch eingefrorenes Material
- 8 DeSeq-normalisierte TSPO Counts der analysierten Probe
- 9 TSPO Expressionsgruppe basierend auf Mediansplit
- 10 Expressionsuntergruppe basierend auf ssGSEA mit Gensätzen aus (Brennan et al. 2013); PRO: proneural, CL: klassisch, MES: mesenchymal, PRO/CL: Mischtyp aus proneural und klassisch, MES/CL: Mischtyp aus mesenchymal und klassisch
- 11 TSPO Cluster basierend auf Clustering der differentiell exprimierten Gene
- 12 NGS Batch ID für Batcheffektkorrektur mittels Combat SeqModul des SVA-Pakets (Zhang et al., 2020)
- nd nicht bestimmt

2.11 Kommerzielle Tissue-Microarrays (TMAs)

Es wurden Tissue-Microarrays (Array IDs: CNS2081, BNC17011c) von US Biomax (Derwood, Maryland, USA) verwendet. Array CNS2081 umfasste 208 Gewebeduplikate von insgesamt 104 Gewebespendern (51,0 % weiblich, Altersdurchschnitt = $38 \pm 15,7$) aus nicht-neoplastisch und anderweitig pathologisch verändertem Hirngewebe. Array BNC17011c umfasste 80 Gewebekerne aus verschiedenen Hirnregionen, mehrheitlich von jeweils 3 Patienten (32,5 % weiblich, Altersmittelwert = $35,5 \pm 13,3$). Die Proben für den Nucleus caudatus wurden hingegen aus nur einem Patienten entnommen. Eine allgemeine Übersicht

Material

über alle erfassten Hirnregionen bzw. Pathologien ist in Tabelle 13 aufgeführt. Detailinformationen sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 im Anhang unter Kapitel 7.4 hinterlegt.

Tabelle 13: Allgemeine Übersicht der Entitäten/Hirnregionen auf den kommerziellen Tissue-Microarrays BNC17011c und CNS2081

Entität/Hirnregion ¹	WHO-Grad 2016 ²	N (Patient) ³	N (Gewebekerne) ⁴	Array ID ⁵
Corpus Callosum	-	3	6	BNC17011c
Frontal-Lappen	-	3	6	BNC17011c
Hippocampus	-	3	6	BNC17011c
Kleinhirn (in Auswertung mit CNS2081 zusammengefasst)	-	3	6	BNC17011c
Medulla oblongata	-	3	6	BNC17011c
Mittelhirn	-	3	6	BNC17011c
Nucleus Caudatus	-	1	2	BNC17011c
Occipital-Lappen	-	3	6	BNC17011c
Optischer Nerv	-	3	6	BNC17011c
Parietal-Lappen	-	3	6	BNC17011c
Pons	-	3	6	BNC17011c
Rückenmark	-	3	6	BNC17011c
Temporal-Lappen	-	3	6	BNC17011c
Thalamus	-	3	6	BNC17011c
Astrozytom	2+3	20	40	CNS2081
Entzündung	-	4	8	CNS2081
Ependymom	2+3	8	16	CNS2081
Gesundes zerebellares Gewebe	-	5	10	CNS2081
Gesundes zerebrales Gewebe	-	3	6	CNS2081
Glioblastom	4	8	16	CNS2081
Gliose	-	2	4	CNS2081
Medulloblastom	4	10	20	CNS2081
Meningiom	-	24	48	CNS2081
Normales Gewebe neben dem Krebsareal (NTC)	-	10	20	CNS2081
Oligodendrogliom	2+3	10	20	CNS2081

¹ Entität bzw. Hirnregion auf Tissue-Microarray

² WHO-Grad nach WHO-Klassifizierung von 2016

³ Anzahl Patienten nach neuropathologischer Begutachtung

⁴ Anzahl Gewebekerne nach neuropathologischer Begutachtung

⁵ Array ID von US Biomax (Derwood, Maryland, USA)

Material

2.12 Zelllinien für Antikörpervalidierung

U251MG (Glioblastom, WHO-Grad 2016: 4, Alter: NA, Geschlecht: männlich) und U87MG (Glioblastom, WHO-Grad 2016: 4, Alter: 44 Jahre, Geschlecht: männlich) Glioblastomzelllinien wurden über Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany) bezogen. Sie werden im weiteren Verlauf mit U87 und U251 abgekürzt.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten etablierten, adhärenenten Gliom-Zelllinien wurden bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in einem Heraecell Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) in DMEM (10 % FCS, P/S) kultiviert. Die dauerhafte Lagerung der Zelllinien erfolgte in FCS (10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff.

CRISPR/Cas9 TSPO-Knockout C20 Mikrogliazellen Zellpellets wurden durch AG Prof. Dr. Christian Wetzel, Regensburg (Milenkovic et al., 2019) zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 *In silico* Analysen

Für die *TSPO* mRNA-Expressionsanalysen wurden open-access HTSeq Count Daten aus der TCGA-Datenbank verwendet (Kapitel 2.8.1). Es wurden R-Pakete `data.table` v1.14.2 (Dowle & Srinivasan, 2021) und `R.utils` v2.12.2 (Bengtsson, 2022) in R v4.0.2 und v4.0.5 (R Core Team 2021) für Dekompression und Extraktion der Count Daten genutzt. Mittels der über TCGA bereit gestellten Gencode v22 Referenz wurden die Genexpressionswerte (read per kilobase million, RPKM) für jedes Gen und jede Fall ID kalkuliert. Es wurden WHO2016-hochgradige Glioblastom- (IDH-wt/-mut) und WHO2016-niedriggradige Astrozytom-Fälle (IDH-wt/-mut) auf der Grundlage der in (Ceccarelli et al., 2016) veröffentlichten klinischen Histologie-Informationen für statistische Aufbereitung herausgefiltert und in Hinblick auf *TSPO* Expression analysiert. Skripte zum Extraktionsvorgang der Daten (Kapitel 7.1.1.1) und Berechnung der Genexpressionswerte (Kapitel 7.1.1.2) sind im Anhang hinterlegt.

Für die Analyse der Promotor-Methylierung im Bereich der *TSPO* CpG-Insel wurden open-access K450 Illumina Methylierungsarraydatensätze (Kapitel 2.8.2) aus der TCGA-Datenbank verwendet. Mit R-Paketen `data.table` v1.14.2 (Dowle & Srinivasan, 2021) und `tidyverse` v1.3.2 (Wickham et al., 2019) in R v3.5.3 (R Core Team 2021) wurden Beta-Werte für chr22 extrahiert und nach *TSPO* CpG-Inselareal gefiltert. Unter Verwendung zusätzlicher Referenzen von TCGA erfolgte eine Annotation der klinischen Informationen pro Patient für die Array-Sonden innerhalb des *TSPO* CpG-Inselbereichs (Sonden: cg00343092, cg01633858, cg08314021, cg10822314, cg20390150, cg24899361, cg26131049). Der statistische Vergleich der Methylierung erfolgte zwischen den Entitätgruppen. Das R Skript zum Extraktionsvorgang und Annotationsprozess ist im Anhang (Kapitel 7.1.1.3) hinterlegt.

Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche in Zusammenhang mit *TSPO* diskutiert werden (ETS1/2, SP1/3 und STAT3), wurden für den gesamten *TSPO* CpG-Inselbereich (850 bp) mittels JASPAR-Abfrage (Castro-Mondragon et al., 2022) ermittelt.

Methoden

3.2 Molekularbiologische Verfahren für Methylierungsanalyse

3.2.1 cDNA-Synthese und qPCR für Quantifizierung der *TSPO* Expression

Die RNA wurde mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit wurde im Vorfeld dieser Doktorarbeit gemäß Herstelleranweisungen isoliert.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Rahmen dieser Doktorarbeit mit 200-400 ng RNA, Random-Hexamer-Primern und dem SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit gemäß den Herstelleranweisungen.

Im Detail: RNA wurde auf ein Volumen von 10 µl mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Ein Volumen von 2 µl Mastermix 1 (Tabelle 14) wurde je Probe hinzugefügt und die Röhren denaturiert (5 min, 65 °C).

Tabelle 14: Mastermix 1 für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen [µl]
Random-Hexamer-Primern	1,0
dNTP (10 nM)	1,0

Nach der Denaturierung wurden 7 µl Mastermix 2 (Tabelle 15) je Probe hinzugefügt und die Röhren inkubiert (2 min, 25°C).

Tabelle 15: Mastermix 2 für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen [µl]
5x First Strand Buffer	4,0
RNasin plus (40 U/µl)	1,0
DTT (100 mM)	2,0

Anschließend wurde nach Zugabe von 1 µl Super Script® II Reverse Transkriptase (200 U/µL) der letzte cDNA-Synthese-Schritt (10 min bei 25°C, gefolgt von 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C) durchgeführt.

Die qPCR wurde mit 1:2,5 (200 ng Input) bzw. 1:5 (400 ng Input) cDNA-Verdünnung unter Verwendung des SensiFAST™ SYBR Hi-Rox-Kit auf einem StepOnePlus™ Cycler, wie zuvor beschrieben (Schulze et al., 2018), durchgeführt. Dafür wurde ein qPCR-Mastermix (Tabelle 16) je Primerpaar hergestellt. Zugehörige Volumina der verwendeten Reagenzien waren für eine äquimolare Primer-Reaktionsmischung kalkuliert.

Methoden

Tabelle 16: qPCR-Mastermix für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen [μ l]
SensiFAST™ Sybr HI-Rox Mix	12,50
Nuklease-freies Wasser	6,00
Primer-fwd (1:10 Stock)	0,75
Primer-rev (1:10 Stock)	0,75

Zu 20 μ l qPCR-Mastermix wurden 5 μ l verdünntes cDNA-Produkt je Probe zugegeben. Anschließend wurde die qPCR (95°C für 2 min; 40 Zyklen von 95°C für 5 s/60°C für 15 s zzgl. Schmelzkurve am Laufende) durchgeführt.

Relative Expressionswerte wurden mit der $\Delta\Delta$ ct-Methode (Analyse der relativen Genexpression) berechnet (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet. *ARF-1* diente hierbei als Referenzen. Verwendete Primer sind in Kapitel 2.2.2 aufgelistet.

3.2.2 Bisulfit-Sequenzierung für Quantifizierung der *TSPO* CpG-Insel Methylierung

Eine Bisulfit-Methylierungsanalyse wurde für 72 der 80 möglichen CpG-Positionen (CpGs) der *TSPO* CpG-Insel aus frisch eingefrorenem Tumorgewebe (Kapitel 2.9) durchgeführt. Die DNA wurde gemäß den Herstelleranweisungen mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit im Vorfeld dieser Doktorarbeit gemäß Herstelleranweisungen isoliert.

Für die Bisulfit-Konvertierung der DNA kam im Rahmen dieser Doktorarbeit das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit zum Einsatz. Damit wurden alle nicht-methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, sodass sie von methylierten Cytosinen abgegrenzt werden können. Als Input dienten hierfür 200 ng isolierte DNA. Das Konvertierungsprotokoll wurde gemäß Herstelleranweisungen durchgeführt.

Im Detail: Frischer CT-Konversionsreagenz-Mix (130 μ l) wurde mit 20 μ l DNA/Nuklease-freies Wasser vermischt. Während nachgeschalteter Konvertierungs-PCR (98°C für 10 min, 64°C für 2,5 h, 4°C \leq 20 h) wurden je Probe eine Zymo-Spin™ IC Säule mit 600 μ l M-Binding Buffer vorbereitet. Das komplette PCR-Produkt wurde zugegeben und die Säule mehrmals invertiert. Nach Zentrifugation (\geq 10 000 g, 30 s) und Verwerfen des Durchflusses wurden 100 μ l M-Wash Buffer zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden 200 μ l M-Desulphonation Buffer zugegeben. Nach Inkubation (20 min, RT) folgte ein weiterer

Methoden

Zentrifugationsschritt. Die Säule wurde 2-mal mit 200 µl M-Wash Buffer gewaschen, bevor die konvertierte DNA mit 10 µl M-Elution Buffer und einem weiteren Zentrifugationsschritt eluiert wurde.

Für die Amplifikation der konvertierten DNA (Amplify-PCR) waren spezifische Oligonukleotide/Primer mit Hilfe der Bisulfite primer seeker Software (Kapitel 2.2.1) entworfen worden. Diese wurden in folgendem Mastermix (Tabelle 17) eingesetzt.

Tabelle 17: Amplify-PCR Mastermix für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	31,87
10x Buffer	5,60
dNTPs (10 mM)	1,12
Primer-fwd (1:10 Stock)	0,56
Primer-rev (1:10 Stock)	0,56
HotStar-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,29

40µl dieses Mastermixes wurden zu 10 µl Probe (60 ng konvertierte DNA) bzw. Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) hinzugegeben.

Anschließend wurde die mittels Primerpaare abgedeckte Region mit folgenden Temperaturprogrammen (Tabelle 18) amplifiziert:

Tabelle 18: Amplify-PCR Temperaturprogramme je Primerpaar

Primerpaar	Amplify-PCR Parameter			
	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Primer 1	50	95 °C, 30 s	60 °C, 1 min	72 °C, 2 min
Primer 2	40	95 °C, 30 s	52 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Primer 3	40	95 °C, 30 s	52 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Primer 4	40	95 °C, 30 s	51 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Primer 8	40	95 °C, 30 s	51 °C, 30 s	72 °C, 30 s

Nach PCR-Kontrolle mit einem Agarosegel wurden die Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit gemäß Herstelleranweisungen aufgereinigt.

Die PCR-Produkte wurden im StarSEQ-Auftragslabor (Mainz, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Chromas-Software v2.6.6, wie zuvor beschrieben (Rothhammer-Hampl et al., 2021), ausgewertet. Hierfür wurde jede Primerpaar-erfasste CpG-Position auf einer Skala von 0 (100% T: nicht methyliert) bis 3 (100% C: methyliert) bewertet. Diese Werte wurden statistisch zwischen niedriggradigen und hochgradigen Gliomen verglichen.

Methoden

3.3 Zell-/molekularbiologische und proteinbiochemische Verfahren für Antikörpervalidierung

3.3.1 Herstellung der transienten TSPO-Knockdown Proteinlysate aus Gliomzelllinien

Der TSPO-Knockdown wurde durch Transfektion von zwei Gliomzelllinien (Kapitel 2.12) mit 30nM ON-TARGETplus TSPO siRNA - SMARTpool entsprechend dem DharmaFECT™-System (Version: V0318) erzielt. Alle Zellkultur-spezifischen Arbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank der Marke HERAsafe KS/KSP (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

Im Detail: Es wurden, gemäß Tabelle 19, Tube 1 und Tube 2 angesetzt und inkubiert (5 min, RT). Diese Ansätze wurden vermischt und erneut inkubiert (20 min, RT). Nach dieser Zeitspanne wurde 3360 µl Opti-MEM für die Herstellung des Transfektionsmedium hinzugegeben. DMEM (10 % FCS, P/S) wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml/well (6-well Plattenansatz) vom Transfektionsmedium gleichmäßig auf die Zellen gegeben.

Tabelle 19: Volumina der Reagenzien für Herstellung des Transfektionsmediums

Ansatz	Dharmafect Reagenz [µl]	Opti-MEM [µl]	siRNA 20 µM (non-target/TSPO)	Volumina [µl]
Tube 1	4,2	415,8		420
Tube 2		413,7	6,3	420
Opti-MEM				3360
			$\Sigma_{(\text{total})}$	4200

Das Transfektionsmedium wurde nach 24 h durch DMEM (10 % FCS, P/S) ersetzt. 48 h nach Transfektionstart wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen gewaschen und in RIPA-Lysepuffer, der einen Proteaseinhibitor-Cocktail (cOmplete ULTRA Tabletten, mini, EDTA-frei, Roche) enthielt, geerntet. Für die Generierung der Proteinlysate wurde die Zellsuspension gemischt (15 min, 4°C) und zentrifugiert (10 min, 4°C, 4754 g). Der Proteingehalt wurde mit dem Bio-Rad DC™-Protein-Assay Kit auf einem FLUOstar Omega-Reader basierend auf einem modifizierten Lowry-Verfahren ermittelt.

Methoden

3.3.2 Western-Blot zuzüglich Blockierungsexperiment

Für die Antikörper-Validierung von anti-TSPO [EPR5384] wurden Western-Blots mit transienten TSPO-Knockdown Gliom-Zelllinien (Kapitel 3.3.1) und archivierten GBM-Protein-Lysaten (Kapitel 2.9) gemäß (Schulze et al., 2018) mit folgenden Spezifikationen durchgeführt:

Der primäre Antikörper (anti-TSPO, 1:10 000) wurde in 5 % Milch/TBST (0,1 % Tween*20) verdünnt. Für das Epitop-Blockierungsexperiment wurde der primäre Antikörper vor Applikation auf die Membran mit der fünffachen Menge an humanem TSPO-Peptid inkubiert (30 min, RT). Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-gekoppelter anti-Rabbit Antikörper (1:10 000) verwendet (60 min, RT). Die Signalvisualisierung erfolgte mit SuperSignal™-Kit und wurde mit ImageQuant LAS 4000 mini quantifiziert. Die Ladekontrolle bestand aus primären anti- α -Tubulin Antikörper (1:3333) und sekundären anti-Mouse Antikörper (1:10 000). Die Membranen wurden vor Ladekontrollen-Färbung mit Stripping-Puffer behandelt.

3.4 Histologische Färbungen und Auswertung für histologische Analyse

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Menge an Tumorzellen wurde mittels HE-gefärbten Präparaten für jede entnommene TSPO-Studienkohortenprobe (Kapitel 2.10) bestimmt. Die Mehrheit der HE-Präparate wurde durch das Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (LMU München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In Abwesenheit eines HE-Präparates, wurde die Färbung, wie folgt, durchgeführt:

Es wurden 3 μ m FFPE- bzw. 5 μ m Kryo-Schnitte mittels Mikrotom vorbereitet. Im Falle von FFPE-Material wurde der Objektträger in Xylol entparaffiniert (2x 10 min, RT), gefolgt von Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe (2x 100 %, 2x 96 %, 1x 70 % je 3 min, RT). Nach Spülen der Objektträger mit dest. Wasser wurde mit Hämatoxylin inkubiert (5 min, RT). Dann folgte fließendes Bläuen mit warmen Leitungswasser (5 min). Danach folgte ein zweiter Färbevorgang mit Eosin (30 s, RT), bevor eine Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe (je 3 min, RT) durchgeführt wurde. Nach Inkubation in Xylol (2x 5 min, RT) wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt. Nach Aushärtung über Nacht bei Raumtemperatur (RT) wurden die Objektträger für die Bestimmung des Tumorgehalts verwendet.

Methoden

Bei Kryo-Material wurden die Objektträger vor der Färbung an der Luft getrocknet (über Nacht, RT). Dann erfolgte die Hämatoxylin-Färbung (4 min, RT) und das fließende Bläuen mit warmen Leitungswasser (4 min). Die nachgeschaltete Eosin-Färbung (13 s, RT) wurde kürzer gestaltet. Nachfolgende Schritte entsprachen denen bei der HE-Färbung von FFPE-Material.

Die HE-Präparate wurden mikroskopisch gesichtet und ihr Tumorgehalt auf Grundlage histologischer Kriterien bewertet und eingruppiert. Diese Bewertung und Eingruppierung wurde in der Abteilung für Neuropathologie am Universitätsklinikum Regensburg (UKR, Regensburg, Deutschland) von einem erfahrenen Neuropathologen vorgenommen. Die vier möglichen Kategorien/Tumorgehaltgruppen und ihre festgelegten Charakteristika sind in Kapitel 2.10 hinterlegt.

3.4.2 Immunhistochemie (IHC), Blockierungsexperiment und Scoring

IHC-Färbungen wurden mit dem EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)-Kit, ähnlich zu (Vettermann, Diekmann, et al., 2021), durchgeführt.

Im Detail: Für die Antikörperfärbung wurden FFPE-Schnitte (3 µm) bei 37 °C über Nacht inkubiert und in Xylol (2x je 10 min, RT) entparaffiniert. Es folgte eine Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe (2x 100 %, 2x 96 %, 1x 70 % je 2 min, RT). Nach einem Waschschrift mit dest. Wasser wurde das hitzeinduzierte Epitopretrival (HIER) für 3x 10 min (Mikrowelle, 700 W) in Citratpuffer (Targets: TSPO/CD68) durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurden PBST (0,05 % Tween*20) als Waschpuffer und RT als Standardtemperatur, sofern nicht anders angegeben, verwendet. Endogene Peroxidasen wurden nach dem Waschschrift durch Inkubation mit einem dem Kit zugehörigen Enzym-Block (10 min) blockiert. Die Schnitte wurden mit Primärantikörper nach einem kurzem Waschschrift inkubiert (1 h). Primäre Antikörper waren anti-TSPO [EPR5384] (1:5000) und anti-CD68 [PGM1] (1:200). Nach einem weiterem Waschschrift wurde Kit-zugehöriges Polymer-HRP auf die Objektträger aufgetragen (30 min), gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Vorbereitetes DAB-Substrat (1 Tropfen je 1 ml kit-zugehörigem Puffer) wurde appliziert. Die braune Farbreaktion wurde nach 3 min mit dest. Wasser gestoppt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin und fließendem Bläuen gefärbt (je 4 min), die Gewebe in ansteigender Ethanolreihe je 2 min dehydriert und in Xylol (2x je 5 min) inkubiert. Zum Eindeckeln wurde Entellan verwendet.

Methoden

Epitop-Blockierungsexperimente zur TSPO-Antikörper Validierung wurden mit humanem TSPO-Peptid durchgeführt. Hierfür wurden vor Verwendung des primären anti-TSPO Antikörper dieser mit der fünffachen Menge an Peptid inkubiert (30 min, RT).

Für das Scoring der TSPO IHC-Färbungsintensität wurde unter anderem ein H Score-orientierter Ansatz (Hatanaka et al., 2003) gewählt. Die Färbungen wurden dafür mit einem Zeiss Imager M2 (200x, DL=40-41 %, 0,80 Apertur, FL= on) bewertet. Es wurde die komplette Biopsie-Probe für Biopsien bzw. vier zufällig ausgewählte Gesichtsfelder für Resektionen ausgewertet.

Für die TSPO/CD68 IHC-Flächenanalyse wurden die TSPO-positive bzw. CD68-positive prozentuale Fläche (%Fläche) in Resektionen mit mindestens 5 Bildern und in Biopsien mit 1-3 Bildern (400x, DL = 59,1 %, 0,90 Blende, FL= on) ermittelt. Die Bilder wurden hierfür mit Fiji Image J (Schindelin et al., 2012) unter Verwendung von Background Subtraction (Settings: 50 Pixel, Color Separation, Light Background), Color Threshold (Settings: Hue 0-32, Methodik: Moments), Binary Conversion (Befehl: Make Binary) und dem Modul Analyze Particles verarbeitet.

3.4.3 Multiplex-OPAL-Immunfluoreszenzfärbung (Multiplex OPAL IF) und Zellzählung

Für die Visualisierung der Koexpression von TSPO zusammen mit verschiedenen Zellpopulationsmarkern wurde das OPAL™-System (Kapitel 2.3) für die Färbung der folgenden Target Kombinationen verwendet: TSPO/CD68, TSPO/CD11b, TSPO/GFAP und p53/TSPO. Die verwendeten Targets markieren hierbei nur die Tumorzellen (p53) bzw. Tumorzellen und reaktive Astrozyten (GFAP) (Chaurasia et al., 2016; Hol & Pekny, 2015; Watanabe et al., 1996), CD11b/CD68 markierten die Mikroglia sowie TAMs (Jurga et al., 2020) und CD31 die Endothelzellen (L. Liu & Shi, 2012).

Das OPAL™-System basiert auf einer sequenziellen Färbung mit Tyramid-Signalverstärkung (TSA), welches das Signal um das 10-fache im Vergleich mit einer konventionellen IHC verstärkt (Faget & Hnasko, 2015). Die Färbeprozedur war wie folgt:

FFPE-Schnitte (3 µm) wurden bei 50 °C über Nacht gebacken, wie bei IHC deparaffiniert sowie rehydriert.

Methoden

Erste Target Färbung: HIER wurde für 30 min (3x je 10 min, Mikrowelle, 700 W) durchgeführt. Nach dem Waschen (1x PBS, 0,05 % Tween*20) wurden endogene Peroxidasen mit dem im EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)-Kit enthaltenen endogenen Enzym-Block blockiert (10 min, RT). Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1% BSA/PBS (10 min, RT) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörpern wurde anschließend durchgeführt (1 h, RT). Nach erneutem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit dem Opal Polymer HRP Ms+Rb markiert (10 min, RT). Nach weiterem Waschen wurden die gebundenen HRP-Moleküle mit der Opal-Farbstoff-Arbeitslösung (Opal Farbstoff verdünnt in 1X Plus Amplification Diluent) inkubiert (10 min, RT) und somit die gebundene Antigen-Stelle kovalent mit dem verwendeten OPAL Farbstoff markiert. Die Spezifikationen für verwendete HIER-Puffer, primäre Antikörper und OPAL Farbstoffe sind in Tabelle 20 hinterlegt.

Tabelle 20: Multiplex OPAL IF Spezifikationen für HIER-Puffer, primäre Antikörper und OPAL-Fluoreszenzfarbstoffe je Target-Färbung

1. Target					
Target Kombination	HIER Puffer	Target	Antikörper Verdünnung	Antikörper Informationen	OPAL Farbstoff
TSPO/CD11b TSPO/CD31 TSPO/CD68 TSPO/GFAP	Citratpuffer	TSPO	1:5000	ab109497, abcam	1:50/1:100 Opal 570 FP1488001KT
p53/TSPO	Tris/EDTA-Puffer	p53	1:50	M7001, Dako	1:50/1:100 Opal 520/650 FP1487001KT FP1496001KT
2. Target					
Target Kombination	HIER Puffer	Target	Antikörper Verdünnung	Antikörper Informationen	OPAL Farbstoff
TSPO/CD11b	Citratpuffer	CD11b	1:500	14-0196-82, eBioscience	1:50/1:100 Opal 520/650 FP1487001KT FP1496001KT
TSPO/CD31	Citratpuffer	CD31	1:40	M0823, Dako	1:50/1:100 Opal 520/650 FP1487001KT FP1496001KT
TSPO/CD68	Citratpuffer	CD68	1:50	M0876, Dako	1:50/1:100 Opal 520/650 FP1487001KT FP1496001KT
TSPO/GFAP	Citratpuffer	GFAP	1:100	M0761, Dako	1:50/1:100 Opal 520/650 FP1487001KT FP1496001KT

Methoden

p53/TSPO	Citratpuffer	TSPO	1:5000	ab109497, abcam	1:50/1:100 Opal 570 FP1488001KT
----------	--------------	------	--------	--------------------	---------------------------------------

Nach einem erneuten Waschschrift wurde die zweite Target Färbung ähnlich zur ersten bis einschließlich des OPAL Farbstoff-Arbeitslösungsschritts durchgeführt. Hierbei dient der vorgeschaltete HIER Schritt der Entfernung aller nicht-kovalent gebundenen Antikörper/Polymere aus dem Färbvorgang des ersten Targets.

Nach einem abschließenden HIER in Citratpuffer erfolgte die Kernfärbung mit Spectral DAPI-Lösung (1 Tropfen Spectral DAPI/ml TBST, pH 7,5, 0,05 % Tween*20) für 5 min bei RT. Die Objektträger wurden mit Aquatex® eingedeckelt. Die JPEG-Bilder (400x) wurden mittels OLYMPUS IX81 aufgenommen (Tabelle 21).

Tabelle 21: OLYMPUS IX81 Parameter

Target	OPAL Farbstoff	Fluoreszenz Kanal	Wellenlänge [nm]	Farbe in JPEG
TSPO	OPAL 570	Cy3	555	rot
CD11b CD31 CD68 GFAP p53	OPAL 520/650	FITC/APC	475/627	grün
Nukleus	Spectral DAPI	DAPI	385	blau

Mit Fiji Image J (Schindelin et al., 2012) und dem Cell Counter Plugin (Kurt De Vos, 2010) erfolgte manuell die quantitative Auswertung einfach positiver und doppelt positiver Zellen in Bezug auf die mittels DAPI erfasste Gesamtzellenanzahl je Bild (%positive Zellen).

3.5 Next-Generation-RNA-Sequenzierung (RNA NGS) für molekulare Analyse

3.5.1 RNA-Isolierung und Library-Präparation

Die RNA für RNA NGS wurde mit dem Maxwell® RSC Simply RNA Tissue Kit gemäß den Herstelleranweisungen isoliert.

Im Detail: Tumorgewebe von Kryo-Schnitten (5 µm) wurde in 400 µl Homogenisation Buffer/2-Thioglycerol (HMG/THG)-Mix überführt. Die Probe wurde dann mit Ultraschall

Methoden

homogenisiert (40 % Leistung, 2x je 6 s). Dieser Prozess wurde auf Eis mit einer MS72-Sonotrode und dem Sonoplus HD2070 Gerät durchgeführt. Ein Volumen von 300 µl der transparenten Mischung wurde mit 200 µl MC501 Lysis-Puffer gemischt (15 s, RT) und inkubiert (10 min, RT). In der Zwischenzeit wurde die Kit-zugehörige Kartusche vorbereitet. Nach Beladen der Kartusche wurde die Gesamt-RNA in 60 µl Nuklease-freiem Wasser mittels RSC SimplyRNA Tissue (AS1340) Programm an einem Maxwell® RSC Instrument isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem TapeStation-System gemäß den Herstelleranweisungen gemessen.

Aufgrund der Qualität der Proben-Mehrheit (RIN-Wert < 6) wurde eine Gesamt-RNA-Library-Präparation gewählt. NGS-Libraries wurden mit 10 ng Gesamt-RNA als Input und dem Illumina® Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus-Kit gemäß den Herstelleranweisungen hergestellt.

Im Detail: Nach Depletion der rRNA wurde die restliche RNA fragmentiert und denaturiert. Dann erfolgte in zwei Schritten die cDNA-Synthese mit nachgeschalteter 3'-Adenylierung. Danach wurden entsprechende Anker an die cDNA ligiert, bevor die modifizierten Fragmente aufgereinigt wurden. Nach einer Amplifikation der NGS-Libraries, in welcher die Indizes an die Anker angebracht wurden, erfolgte eine weitere Aufreinigung. Abschließend wurden die NGS-Libraries mit TapeStation-System gemäß den Herstelleranweisungen kontrolliert, gepoolt (18 Proben je RNA NGS Lauf), verdünnt und denaturiert. Dann wurde der Libraries-Pool (1-1,2 pM) auf einer NextSeq550Dx Sequenzierer von Illumina oder extern am IKMB (Kiel, Deutschland) auf einem NextSeq500 mit einem NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Zyklen) geladen.

Die verwendeten Indizes stammten aus den IDT® for Illumina® RNA UD Indexes Satz A bzw. B.

3.5.2 Sequenzierung des Library-Pools und bioinformatische Analyse

Die RNA NGS wurde auf einem NextSeq 500- oder 550Dx-Sequenzierer unter Verwendung des indizierten, 75 Zyklen umfassenden Single-End-Read-Protokolls mit NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 durchgeführt.

Für die Analyse der RNA NGS Daten wurden open-access, anpassbare Tools zuzüglich einer Linux Workstation und ein Windows 10 Betriebssystem verwendet. Die Bildanalyse und das

Methoden

Base-Calling führten zu .bcl-Dateien, die mit dem Tool bcl2fastq2 v2.17.1.14 (Illumina Inc., San Diego, Kalifornien, USA) in .fastq-Dateien umgewandelt wurden. Mit dem HiSat2 Mapper (Kim et al., 2015) wurde ein Sequenz-Alignment zum menschlichen Genom (GRCh38.87/hg38 v102), bezogen via Ensembl/Biomart (Cunningham et al., 2022), mit einem erlaubten Mismatch durchgeführt. Alle eindeutigen Treffer wurden mit featureCounts v2.0.1 (Liao et al., 2014) quantitativ prozessiert. Die Reads wurden hierbei locusbasiert gezählt, d. h. Exonen-übergreifend pro Gen. Batch-Effekte, die hier durch unterschiedliche Sequenzierungsläufe verursacht wurden, sind mittels CombatSeq Modul des SVA-Pakets (Zhang et al., 2020) unter Verwendung eines negativen Binomialregressionsmodells, welches die ganzzahlige Integrität der Zählraten beibehält, entfernt worden. Eine Auflistung der Sequenzierungsläufe je analysierter GBM-Probe (NGS Batch ID) ist in Tabelle 12 in Kapitel 2.10 hinterlegt. Principal Component Analysen (PCA) und differentielle Expressionsanalysen wurden in R v4.1.2 (R Core Team 2021) mit DeSeq2 (Love et al., 2014) durchgeführt. Analyseergebnisse wurden mittels Interactive Complex Heatmap (Gu & Hübschmann, 2021) für einen ersten Überblick begutachtet (Daten nicht gezeigt). Letztlich wurden Volcano-Plots und Heatmaps mit dem R-Paket Enhanced Volcano (Blighe et al., 2022) und dem R-Paket Complex Heatmap (Gu et al., 2016; Gu, 2022) erstellt. Funktionelle Annotationsanalysen/Überrepräsentationsanalysen wurden auf der Grundlage von differenziell exprimierten Genen ($\log_{2}FC \geq 1$, $p_{adj} \leq 0,05$) mit FUMA v1.4.1 GENE2FUNC (Watanabe et al., 2017) und Reactome Release 82/Pathway browser 3.7 (Jassal et al., 2020; Gillespie et al., 2022) durchgeführt. Gensatz-Anreicherungsanalysen (GSEA) und Einzelproben-Gensatz-Anreicherungsanalysen (ssGSEA) wurden mit DeSeq2-normalisierten Expressionswerten (DeSeq2-normalisierte Counts) unter Verwendung des GSEA-Moduls v20.3.5 (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005) bzw. des ssGSEA-Moduls v10.0.11 (Subramanian et al., 2005; Barbie et al., 2009) über Gene Pattern (Reich et al., 2006) durchgeführt. DeSeq2-normalisierte Counts wurden hierfür über das Gene Pattern zugehörige DeSeq2 Modul generiert. Gensätze für GBM-Expressionssubtypen wurden von (Brennan et al., 2013; Wang et al., 2017) verwendet. Gensätze, die die vier wichtigen zellulären GBM-Zustände definieren, wurden von (Nefitel et al., 2019) bezogen. Des Weiteren wurden Gensätze für Hallmark-Gene sowie onkogene Signaturen von (Liberzon et al., 2011) und Gene, die mesenchymal-ähnliche (MES-like) Tumor/Immunzell-Interaktionen beschreiben, aus (Hara et al., 2021) als Referenz verwendet. Für die Einzelzell-Dekonvolution wurde dREG BayesPrism (Danko et al., 2015) und extrahierte Expressionswerte (Transkripte pro Million/TPMs) einer open-access IDH-wt GBM-Referenz (GEO-Zugangsnummer:

Methoden

GSE131928) von GEO (Barrett et al., 2012) verwendet. Skripte (Kapitel 7.1.2) bzw. Input Parameter für die hier beschriebenen Analyseschritte sind im Anhang (Kapitel 7.2) hinterlegt.

3.6 Statistik

Allgemein wurde, falls nicht anders angegeben, die deskriptive Statistik mit SPSS v25/v28 oder GraphPad Prism v8/9 durchgeführt.

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurden nichtparametrische Verfahren (Mann Whitney U bei $N_{\text{Gruppen}} = 2$, Post hoc Games Howell bei $N_{\text{Gruppen}} > 2$) gewählt, sobald die Daten die Voraussetzungen (keine Datenausreißer, Normalverteilung der Daten, usw.) für parametrische Verfahren nicht erfüllt haben. Eine ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test kam in einer Mittelwertanalyse zur Anwendung.

Für Korrelationsanalysen wurde die Spearman-Rho-Methode verwendet.

Wenn pro Patient mehr als eine Probe in die statistische Analyse eingegangen war, wurde eine Gewichtung entsprechend der Probenhäufigkeit je Tumorgehaltgruppe pro Patient vorgenommen.

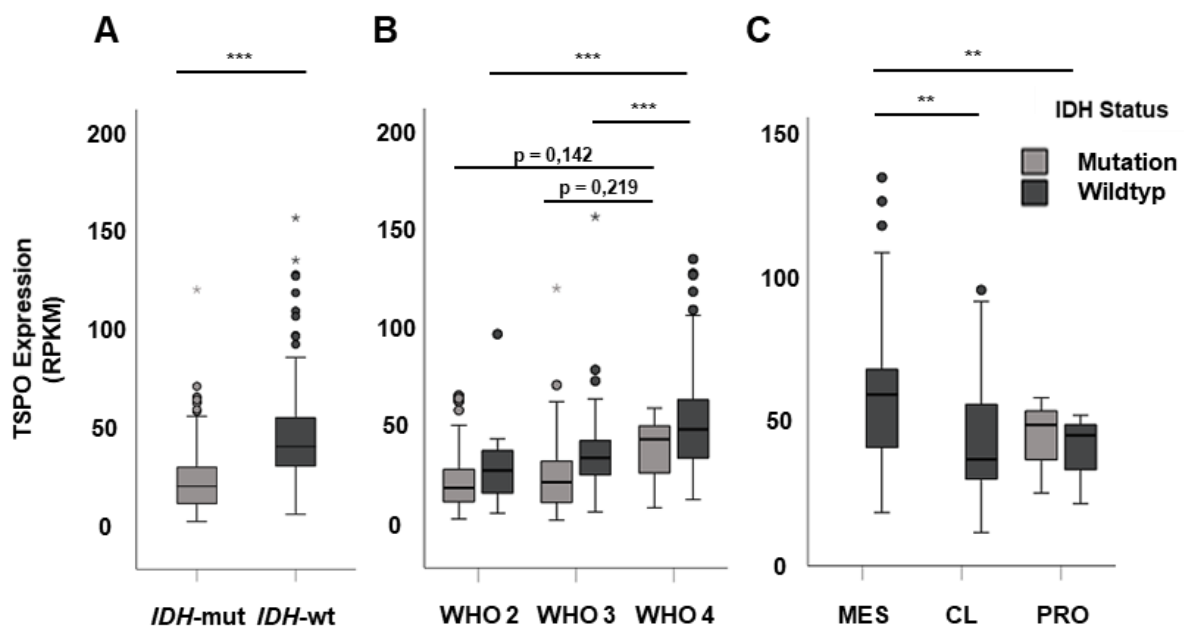
Die Signifikanzen sind in den Abbildungen wie folgt dargestellt: $p > 0,05 = \text{n.s.}$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$.

4 Ergebnisse

4.1 *TSPO* Expressionsanstieg korreliert invers mit IDH-mutationsbedingter *TSPO* Promotormethylierung in Gliomen

Vorhergegangene Studien konnten eine Überexpression von *TSPO* in Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe zeigen. Sie deuteten darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen *TSPO* Expression und Malignität von Gliomen an (Cai et al., 2020; Vlodavsky & Soustiel, 2007). Der Mechanismus für die Hochregulierung von *TSPO* in Gliomen ist jedoch noch nicht beschrieben.

Um diesen Aspekt genauer zu ergründen, wurden in dieser wissenschaftlichen Arbeit zunächst *in silico* *TSPO* Expressionsdaten aus open-access RNA NGS Datenbanken herangezogen. In Folge wurden normalisierte Expressionswerte (RPKM) für *TSPO* in Gliomen basierend auf ihrem hinterlegten *IDH1/2*-Mutationsstatus, WHO-Grad und den transkriptionellen GBM-Subtypen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die *TSPO* Expressionswerte in IDH-wt Gliomen im Mittel höher ($p < 0,001$) als in IDH-mut Gliomen waren und sie signifikant mit dem WHO-Grad zunahmen ($p \leq 0,001$) (Abbildung 7 A/B). Innerhalb der transkriptionellen GBM-Expressionssubtypen ließ sich darüber hinaus eine signifikant höhere *TSPO* Expression in der prognostisch ungünstigen mesenchymalen Subgruppe im Vergleich zu der klassischen ($p = 0,004$) bzw. proneuralen ($p = 0,002$) Subgruppe beobachten (Abbildung 7 C).



Ergebnisse

Abbildung 7: *TSPO* mRNA-Expressionszunahme in *in silico* Gliomen mit unterschiedlichem IDH-Status, ansteigendem WHO-Grad und variierendem GBM-Expressionssubtyp

(A-C) Die *TSPO* mRNA-Expression (RPKM) wurde in *in silico* Datensätzen (TCGA-LGG und TCGA-GBM) analysiert. (A) Eine Analyse auf der Grundlage des *IDH1/2*-Mutationsstatus (IDH-mut: 355, IDH-wt: 211) ergab eine signifikant höhere *TSPO* Expression in IDH-wt Gliomen im Vergleich zu IDH-mut Gliomen (Mann Whitney U, $p \leq 0,001$). (B). Die *TSPO* Expression wurde anhand der WHO-Grade analysiert (WHO 2: 18 IDH-wt, 188 IDH-mut; WHO 3: 66 IDH-wt, 161 IDH-mut; WHO 4: 127 IDH-wt, 6 IDH-mut). Der Post hoc Games Howell ergab einen signifikanten Anstieg der *TSPO* Expression in Gliomen des WHO-Grad 4 ($p < 0,001$) im Vergleich zu WHO-Grad 2 und 3. (C) Beim Vergleich der Expressionssubtypen von GBMs des WHO-Grad 4 (MES: 56 IDH-wt; CL: 43 IDH-wt; PRO: 12 IDH-wt, 4 IDH-mut) war die *TSPO* Expression bei mesenchymalen GBMs signifikant höher als bei klassischen und proneuralen GBMs (Post hoc Games Howell, $p < 0,01$).

Um einen möglichen epigenetischen Methylierungs-Regulationsmechanismus für die *TSPO* Expressionsmuster zu eruieren, wurden open-access Daten von Illumina K450 Methylierungsarrays aus den selben *in silico* Gliom-Projektkohorten (TCGA-LGG und TCGA-GBM) verwendet.

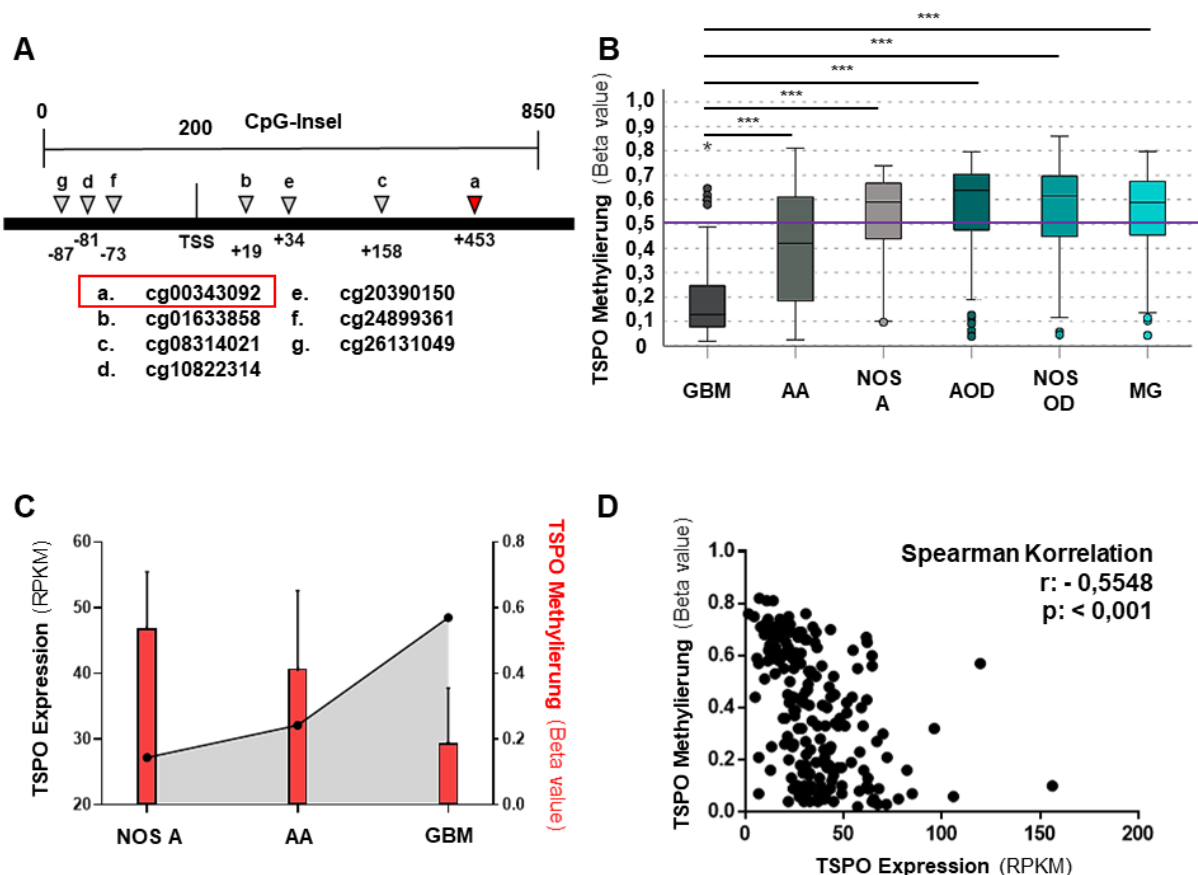


Abbildung 8: Fokale *TSPO* Promotor-Methylierungsabnahme mit ansteigender Malignität der Astrozytome in Korrelation mit ansteigender *TSPO* Expression.

(A) Eine schematische Darstellung, die das *TSPO* CpG-Inselareal auf dem Ensembl GRCh38-Referenzgenom (hg38), welches von sieben Sonden (a-g) auf dem Infinium® HumanMethylation450

Ergebnisse

Bead Chip abgedeckt wird, und deren Abstand zum TSS des *TSPO* Haupttranskripts ENST00000337554 darstellt. (B) Die statistische Methylierungsanalyse (Post hoc Games Howell) der Beta-Werte wurde an der TCGA-GBM- und TCGA-LGG-Kohorte für die Sonde cg00343092 (rot markiert) durchgeführt und ergab signifikant niedrigere Methylierungswerte bei GBM (N = 130) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (AA: N = 129, NOS A: N = 62, AOD; N = 79, NOS OD: N = 118 und MG: N = 130). (C) Die mittlere *TSPO* CpG-Insel-Methylierung an Position der Sonde cg00343092 (Beta-Wert) und die mittlere *TSPO* mRNA-Expression (RPKM) zeigten ein inverses Korrelationsmuster. (D) Die Spearman-Rho-Korrelation der Astrozytompatienten-Paare (N = 209) zeigte eine signifikante inverse Korrelation ($r = -0,5548$, $p < 0,001$) zwischen Methylierung (Sonde cg00343092) und *TSPO* mRNA-Expression.

Die Methylierungs-Beta-Werte von 15 Sonden, die den *TSPO* Promotorbereich abdecken, wurden extrahiert (Suppl. Abbildung 2a in (Weidner et al., 2023)). Sieben Sonden, die die CpG-Insel abdeckten, wiesen eine geringere Methylierung auf, sodass weitere Analysen auf diesen Bereich fokussiert wurden (Abbildung 8 A).

Es zeigte sich, dass eine dieser Sonden (cg00343092) ein signifikant niedrigeres Methylierungsniveau in GBMs im Vergleich zu den anaplastischen Astrozytomen (intermediäre Beta-Werte, $p < 0,001$) und zu weiteren Gliomtypen (hohe Beta-Werte, $p < 0,001$) aufwies (Abbildung 8 B).

Basierend darauf wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen niedriger Methylierung und der hohen *TSPO* Expression in astrozytären Gliomen untersucht, indem Expression/Methylierung-Patientendatenpaare analysiert wurden. Das resultierende Diagramm (Beobachtungen aufgetrennt nach Entität) der *TSPO* Expressionswerte (RPKM) sowie der Beta-Werte von Sonde cg00343092 zeigte ein klar inverses Korrelationsmuster innerhalb der astrozytären Gliome (Abbildung 8 C). Die statistische Signifikanz dieses Musters konnte über Spearman-Rho-Analyse ($r = -0,5548$, $p < 0,001$) bestätigt werden (Abbildung 8 D).

Um alternative Regulationsmechanismen zu bewerten, wurden weitere große DNA-basierte Gliom-Datensätze (insgesamt 531 Proben) mittels cBioportal (Oncoprint) bzgl. *TSPO* analysiert. Es ließen hierbei aber weder relevante somatische Mutationen in *TSPO* noch eine Anhäufung von *TSPO* Genamplifikationen feststellen (Daten nicht gezeigt).

Um die Regulierung via Methylierung noch besser zu verstehen, wurde die Methylierungsanalyse über die *in silico* analysierten 7 CpG-Positionen hinaus mittels direkter Bisulfit-Sequenzierung erweitert. Dadurch konnte nahezu der gesamte CpG-Inselbereich des *TSPO* Promotors (72 von 80 erfassten CpGs) in 22 humanen Proben (10 IDH-mut

Ergebnisse

Astrozytome vs 12 IDH-wt GBMs) erfasst werden. Die zugehörige *TSPO* Expression wurde mittels qPCR analysiert.

Die Bisulfit-Sequenzierung ergab, dass in IDH-mut Gliomen Bereiche eher stark methyliert vorlagen, wohingegen diese Areale in IDH-wt Gliomen eher schwach oder gar nicht methyliert waren (Suppl. Tabelle 1 in (Weidner et al., 2023)). Besonders ausgeprägt waren diese Unterschiede in einem Teilbereich der *TSPO* CpG-Insel um die Sonde cg00343092 herum (chr22: 43.151.840-43.152.163), welche bereits *in silico* auffällig gewesen war (Abbildung 9).

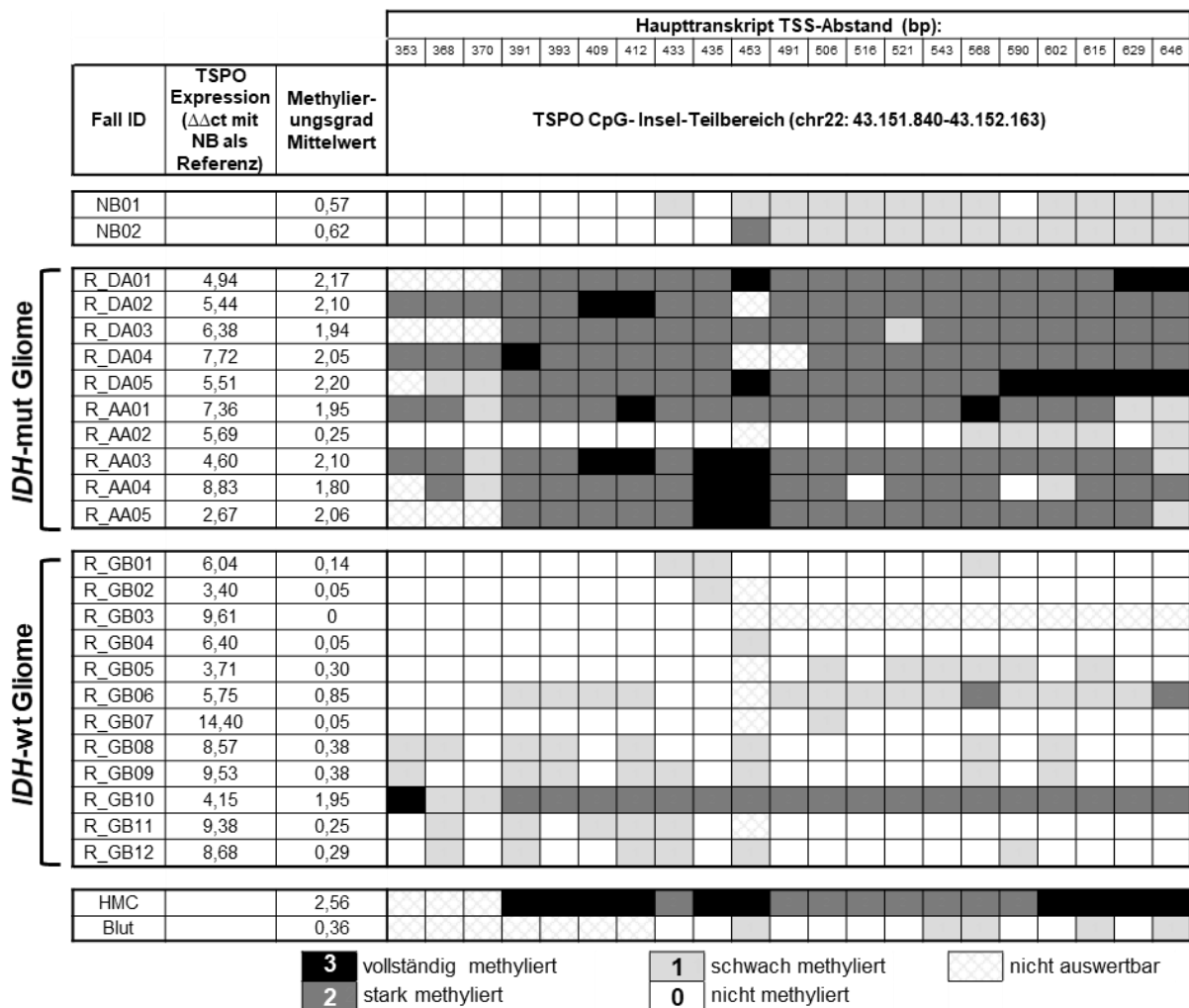


Abbildung 9: *TSPO* CpG-Insel-Methylierungsgewinn im *TSPO* CpG-Insel-Teilbereich in einer Mehrheit von IDH-mut Astrozytomen.

Übersicht der Methylierungsgrade und qPCR-Expressionswerte für *TSPO* in IDH-mut (R_DA01-R_AA05) und IDH-wt Gliomen (R_GB01-R_GB12) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gehirn- (NB01-02) und Methylierungskontrollen (HMC: Hyper-Methylierung, Blut: Hypo-Methylierung) des *TSPO* CpG-Insel-Teilbereichs (chr22: 43.151.840-43.152.163) durch direkte Bisulfit-Sequenzierung bzw. qPCR. Die Methylierungsgrade für jede CpG-Stelle wurden mit der Chromas-Software ausgewertet und sind in 4 definierten Kategorien aufgeteilt: vollständig methyliert (schwarz), stark

Ergebnisse

methyliert (dunkelgrau), schwach methyliert (hellgrau) und nicht methyliert (weiß). In einer Mehrheit der IDH-mut Astrozytome war optisch ein Methylierungsgewinn zu verzeichnen.

Statistisch unterschieden sich schließlich die mittleren Methylierungswerte in diesem identifizierten *TSPO* CpG-Insel-Teilbereich signifikant ($p < 0,001$) zwischen den IDH-mut (hohe Methylierung) und IDH-wt Gliomen (niedrige/keine Methylierung) (Abbildung 10 A). Eine weitere Spearman-Rho-Korrelationsanalyse zu den gemittelten Methylierungs- und Expressionswerten ($\Delta\Delta ct$) ergab, wie bereits in der vorherigen *in silico* Analyse beobachtet, eine signifikante, wenn auch hier schwächere inverse Korrelation ($r = -0,4404$, $p = 0,0403$) (Abbildung 10 B).

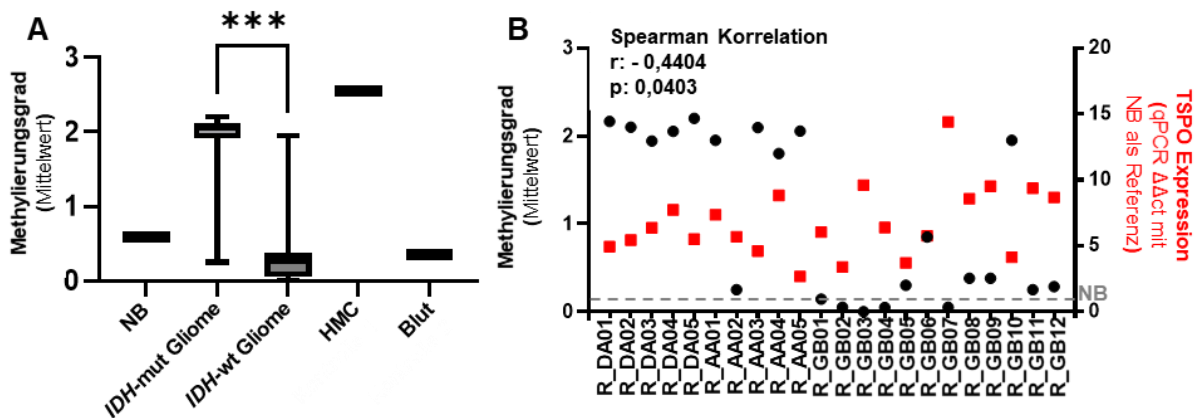


Abbildung 10: *TSPO* CpG-Insel-Methylierung in einer Mehrheit von IDH-mut Astrozytomen.

(A) Boxplots, welche die Verteilung der mittleren Methylierungsgrade in den analysierten Gruppen darstellen. Der statistische Vergleich ergab einen signifikanten Unterschied zwischen IDH-mut und IDH-wt Gliomen (Mann Whitney U, $p < 0,001$). Die Gruppe mit non-neoplastischen Gehirn wies im Mittel einen Methylierungsgrad auf, der leicht über dem von IDH-wt Gliomen lag. (B) Die Spearman-Rho-Korrelation der Methylierungsgrade und der qPCR-Expressionswerte der Gliome ergab eine schwache, aber signifikante inverse Korrelation ($r = -0,4404$, $p = 0,0403$).

Herausstechend war, dass nicht-neoplastisches Hirngewebe ebenfalls eine geringe bis keine Methylierung innerhalb des identifizierten *TSPO* CpG-Insel-Teilbereichs aufwies und eher mit dem Methylierungsniveau der IDH-wt Gliome vergleichbar waren.

Mithilfe von JASPAR Abfragen ließen sich des Weiteren für den gesamten CpG-Inselbereich des *TSPO* Promotors potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (ETS1/2, SP1/2 und STAT3) ermitteln. Es wurden hierbei jene verwendet, von denen bekannt ist, dass sie an

Ergebnisse

der *TSPO* Regulierung anderweitig beteiligt sind (Batarseh et al., 2010). Einige potentielle Bindungsstellen für ETS1/2 bzw. SP1/2 ließen sich entlang der CpG-Insel finden und auch ein paar für STAT3 konnten ermittelt werden.

Hierbei war eine Akkumulation von potentiellen ETS1/2 Bindungsstellen in dem CpG-Insel-Teilbereich vorzufinden (Abbildung 11), welcher bereits während der Methylierungsanalyse auffällig geworden war.

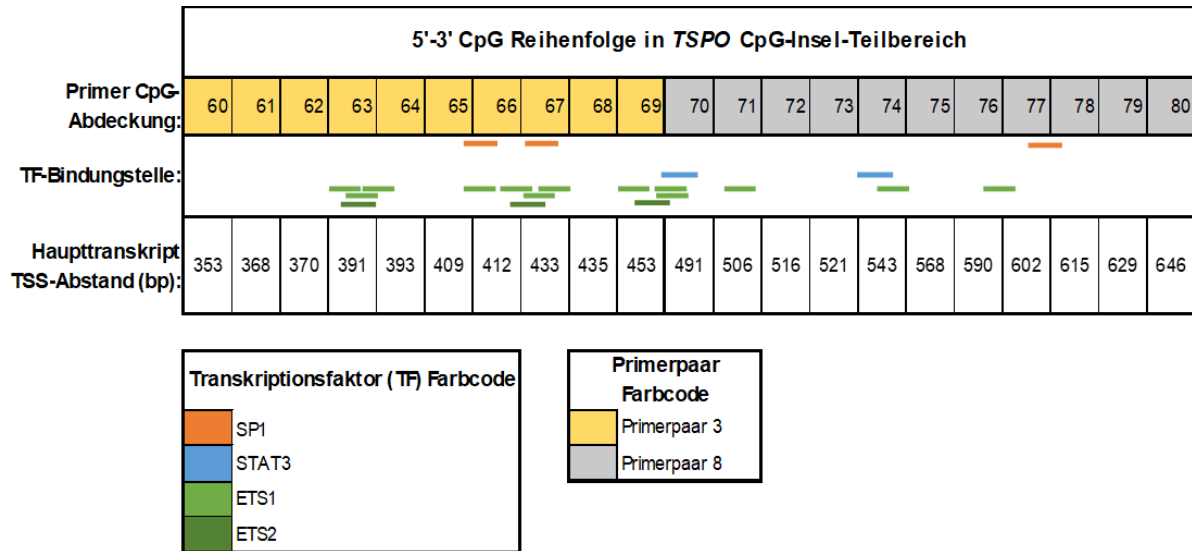


Abbildung 11: Akkumulation potentieller Transkriptionsfaktor Bindungsstellen für ETS1/2 im *TSPO* CpG-Insel-Teilbereich.

Schematische Darstellung, die die Verteilung der mittels JASPAR Abfrage ermittelten potentiellen TF-Bindungsstellen im *TSPO* CpG-Insel-Teilbereich (chr22: 43.151.840-43.152.163) zeigt. SP1 und STAT3 wiesen vereinzelt zwei bis drei potentielle Bindungsstellen im auf, wohingegen ETS1 und ETS2 mit insgesamt 16 potentiellen Stellen vertreten waren.

Daher ließ sich schlussfolgern, dass hier keine Hypomethylierung in GBMs, sondern eine *de novo* Methylierung in IDH-mut Tumoren vorzuliegen scheint. Somit könnte die im Vergleich zu IDH-wt Gliomen reduzierte *TSPO* Expression in IDH-mut Gliomen durch eine Hypermethylierung dieses *TSPO* Promotor-Teilbereichs bedingt sein.

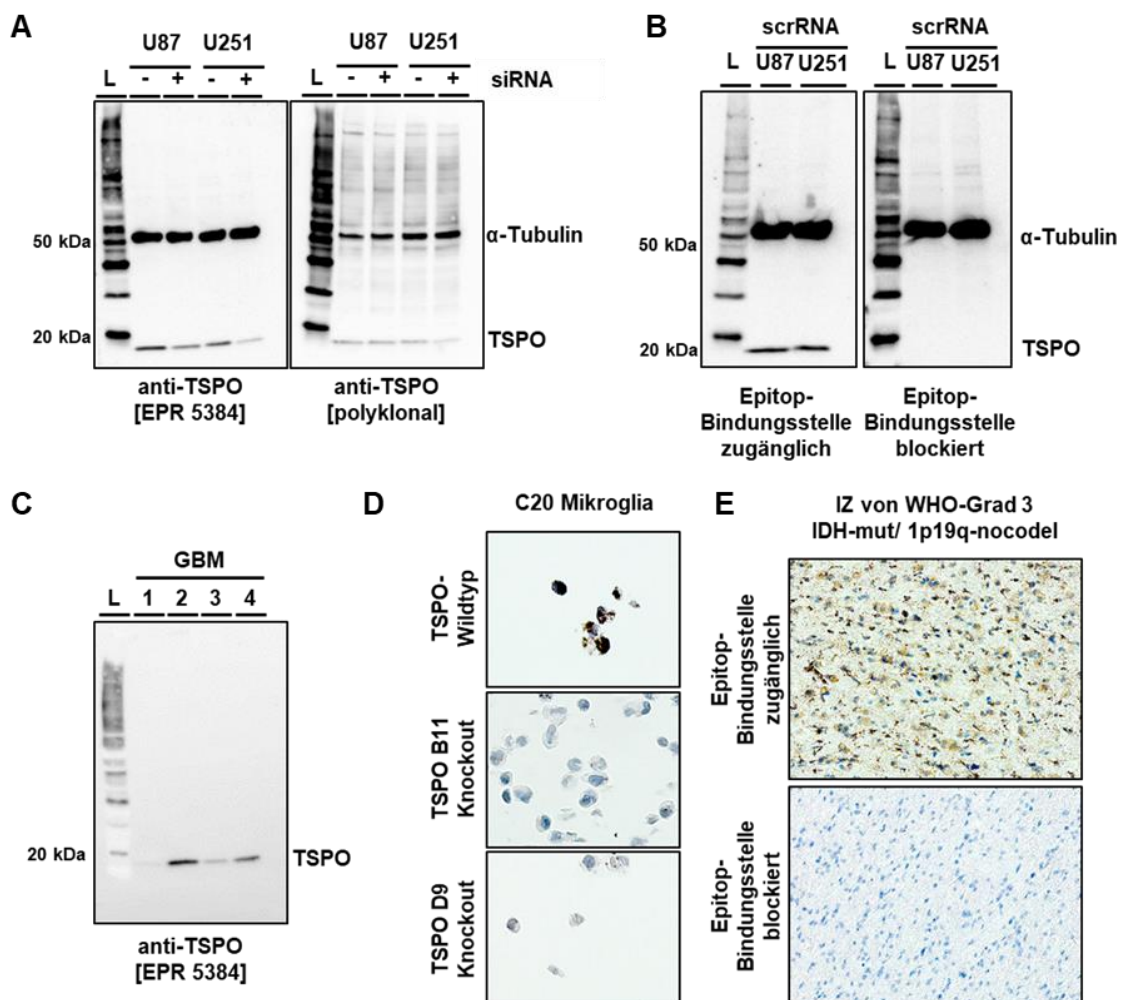
Die Überexpression von *TSPO* in GBMs im Vergleich zu den Normalkontrollen könnte hingegen durch Mechanismen wie zum Beispiel dysregulierte Signalwege, die sich letztlich auf die TFs auswirken, bedingt sein.

Ergebnisse

4.2 TSPO-Antikörper Validierung ergab ein spezifisches Färbemuster ohne unspezifische Bindung

Um über die *TSPO* Expression/Methylierung hinaus histologische Muster im Zusammenhang mit *TSPO* Anreicherungen untersuchen zu können, bedurfte es eines spezifischen anti-*TSPO* Antikörpers.

So wurden verschiedene Validierungsexperimente für einen monoklonalen anti-*TSPO* Antikörper [EPR 5384] vorgenommen, darunter Western-Blot Experimente an transienten *TSPO*-Knockdown Gliomzellen sowie an Gliomzellen jeweils in Kombination mit einem Antikörper-Epitop-Blocking-Ansatz und an Proteinlysaten von vier verschiedenen kryokonservierten GBM-Proben. Zusätzlich wurde der Antikörper mittels IHC an *TSPO*-Knockout Mikroglia und an einem anaplastischen Astrozytom mit und ohne Antikörper-Epitop-Blockierung getestet (Abbildung 12).



Ergebnisse

Abbildung 12: Validierung von anti-TSPO [EPR5384] Antikörper.

(A) Western-Blot-Analyse mit einem anti-TSPO [EPR 5384] und einer polyklonalen Kontrolle in zwei transienten TSPO-Knockdown (+) Gliomzellmodellen (U87+U251) im Vergleich zu einer scrRNA-Kontrolle (-), die eine Signalabnahme in der TSPO-Knockdown-Probe (+) und nur eine Bande in der erwarteten TSPO-Höhe (18kDa) bei Verwendung von anti-TSPO [EPR 5384] zeigt. Ein anderer polyklonaler anti-TSPO Antikörper zeigte ein unspezifisches Färbungsmuster und wurde nicht weiter verwendet. (B) Das Western-Blot-Signal eines Antikörper-Epitop-Blockierungsexperiments in zwei scrRNA-transfizierten Gliomzellmodellen (U87+U251) verschwindet vollständig, wenn die Epitop-Bindungsstelle des Antikörpers blockiert ist. (C) Der Western-Blot von anti-TSPO [EPR 5384] in 4 GBM-Proteinlysaten zeigt spezifische Bindungsmuster in allen Proben. (D) TSPO-IHC zeigt eine sehr starke TSPO-Färbung in einer TSPO-Wildtyp-Kontrolle, während zwei TSPO-Knockout-C20-Mikroglia-Zellmodelle (B11+D9) keine nachweisbare TSPO-Färbung aufwiesen. (E) Experiment zur Blockierung von Antikörper-Epitopen: TSPO-IHC in der Infiltrationszone eines anaplastischen Astrozytoms zeigt keine Antikörperbindung, wenn die Epitop-Bindungsstelle blockiert ist.

Die Western-Blots der Gliomzellen zeigten eine Abnahme des Antikörperbindungssignals im transienten TSPO-Knockdown sowie eine einzelne Bande auf der erwarteten TSPO Höhe (18 kDa). Ein weiterer polyklonaler Antikörper zeigte hierbei unspezifische Bindungsmuster und wurde daher nicht weiter genutzt (Abbildung 12 A).

Die Blockierung des Epitops führte zu einem vollständigen Verlust des TSPO Bandensignals in Gliomzellen (Abbildung 12 B). Des Weiteren zeigten GBM-Proteinlysaten bei Analyse auch nur eine einzige Bande auf der erwarteten TSPO Höhe (Abbildung 12 C). Die IHC-Färbung ergab eine starke TSPO Expression in Wildtyp-Mikroglia und keine relevante Expression nach TSPO-Knockout (Abbildung 12 D). Schließlich führte auch die Blockierung der Epitop-Bindungsstelle in einem anaplastischen Astrozytom zu einem vollständigen Verlust der bräunlichen IHC-Färbung (Abbildung 12 E).

Zusammenfassend zeigten die Experimente eindeutig ein spezifisches Färbemuster für den getesteten monoklonalen TSPO-Antikörper ohne Hinweise auf eine unspezifische Bindung. Der Antikörper konnte somit für die histopathologische Bewertung von TSPO als Bildgebungsmarker verwendet werden.

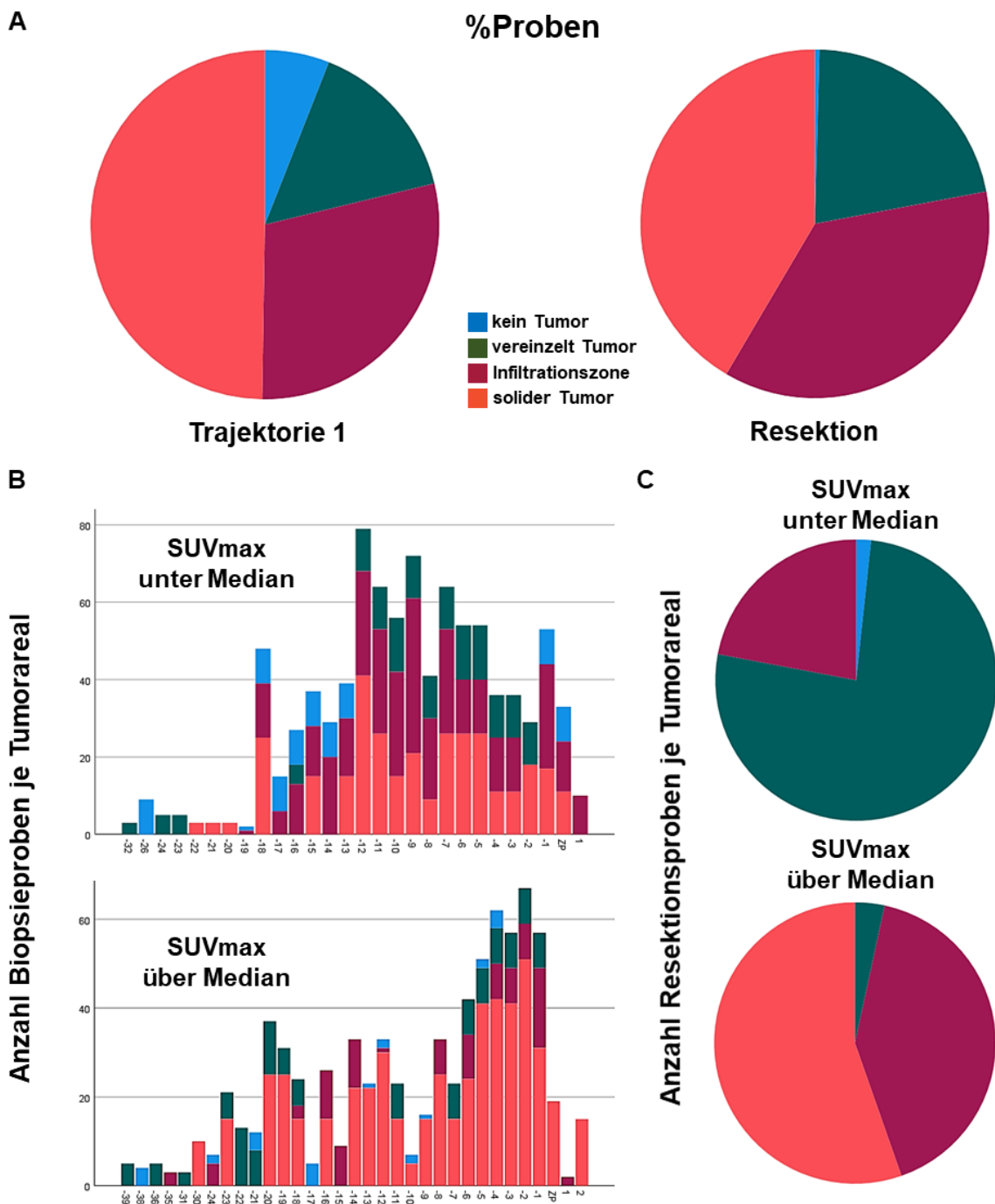
4.3 TSPO-IHC korreliert mit TSPO-PET Anreicherung und ist im soliden Tumorzentrum von IDH-wt GBMs am höchsten exprimiert

Für die histopathologische Bewertung von TSPO Anreicherungen stand die gemeinschaftlich erhobene TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte zur Verfügung (Kapitel 2.10). Die größte Patientengruppe stellten hierbei die Patienten (N = 27) mit IDH-wt/1p19q-nocodel WHO-

Ergebnisse

Grad 4 GBM (19 Primär- und 8 Rezidivtumore) dar. Von 14 Patienten lagen Biopsieproben, von 13 Patienten Resektionsproben vor.

Aus diesem Probenpool wurden insgesamt 230 FFPE-Proben in die histopathologische Analyse eingeschlossen. Es wurden TSPO-PET Bildgebungswerte extrahiert, die TSPO Proteinexpression immunhistochemisch analysiert und der Tumorzellgehalt (Kategorien: solider Tumor, Infiltrationszone, vereinzelt Tumor und kein Tumor) histologisch beurteilt (Einteilungskriterien im Detail in Kapitel 2.10).



Ergebnisse

Abbildung 13: Überblick bzgl. Häufigkeit der histologisch ermittelten Tumorgehaltgruppen in IDH-wt GBM-Proben.

(A) Gezeigt ist der prozentuale Anteil (%Proben) von biopsierten (Trajektorie 1) und resezierten (Resektion) Proben eingefärbt nach Tumorgehaltkategorie (blau: kein Tumor, grün: vereinzelt Tumor, rot: Infiltrationszone, orange: solider Tumor). Hinsichtlich der definierten Tumorgehaltgruppen fielen 49,7 % der Biopsieproben aus Trajektorie 1 und 44,7 % der Resektionen in die Gruppe der soliden Tumore, 28,2 bzw. 33,3 % in die Infiltrationszone und 14,8 sowie 21,1 % in die Gruppe mit vereinzelt Tumor. 7,3 bzw. 0,9 % der jeweiligen Gewebeproben enthielten keinen Tumor ("kein Tumor") nach mikroskopischer Sichtung. (B) Anzahl Biopsie- und (C) Resektions-Proben aufgetrennt nach zugehörigen TSPO-PET Anreicherungs-Median ($SUV_{max} = 0,86$) und eingefärbt nach Tumorgehaltkategorie. Biopsie-Proben wurden zusätzlich entsprechend Trajektorienkoordinate auf x-Achse aufgetragen, um Tumorgehaltverlauf in Bezug zum angegebenen Signal-Zentralpunkt (ZP) im TSPO-PET darstellen zu können. Oberhalb des ermittelten Medians wurden sowohl durch Biopsie als auch Resektion mehrheitlich solide Tumorareale erfasst.

Hinsichtlich der definierten Tumorzellgehaltgruppen fielen 49,7 % der Biopsieproben aus Trajektorie 1 und 44,7 % der Resektionen in die Gruppe der soliden Tumore, 28,2 bzw. 33,3 % in die Gruppe Infiltrationszone und 14,8 sowie 21,1 % in die Gruppe mit vereinzelt Tumorzellen. 7,3 bzw. 0,9 % der jeweiligen Gewebeproben enthielten histologisch keinen Tumor (Abbildung 13 A).

Proben mit positiver TSPO-PET Anreicherung ($SUV_{max} > 0,86$) waren sowohl bei Biopsien (Abbildung 13 B) als auch Resektionen (Abbildung 13 C) mehrheitlich solide Tumorareale.

Nachfolgende Analysen nach Ausschluss der Drop outs zeigten, dass sowohl bei der TSPO-PET Bildgebung als auch bei der TSPO-IHC eine inter- als auch intratumorale Heterogenität festzustellen war (Tabelle 22). Abbildung 14 zeigt hierfür exemplarisch einen Fall mit niedriger Tracer Anreicherung (TSPO-29, Abbildung 14 A) und einen Fall mit hoher Tracer Anreicherung (TSPO-73, Abbildung 14 B) im TSPO-PET. FET-PET und MRT beider Fälle zeigten im Tumorzentrum hingegen eher ein ähnliches, wenn auch flächenmäßig variables Anreicherungsmuster.

Ergebnisse

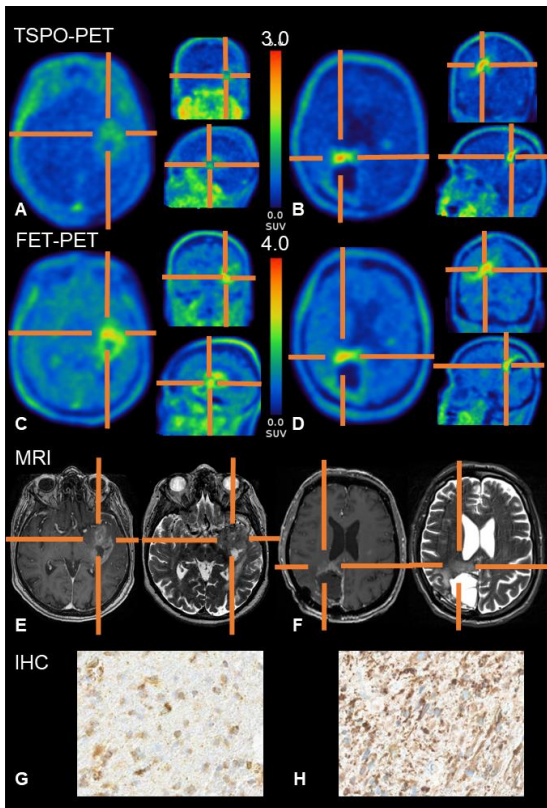
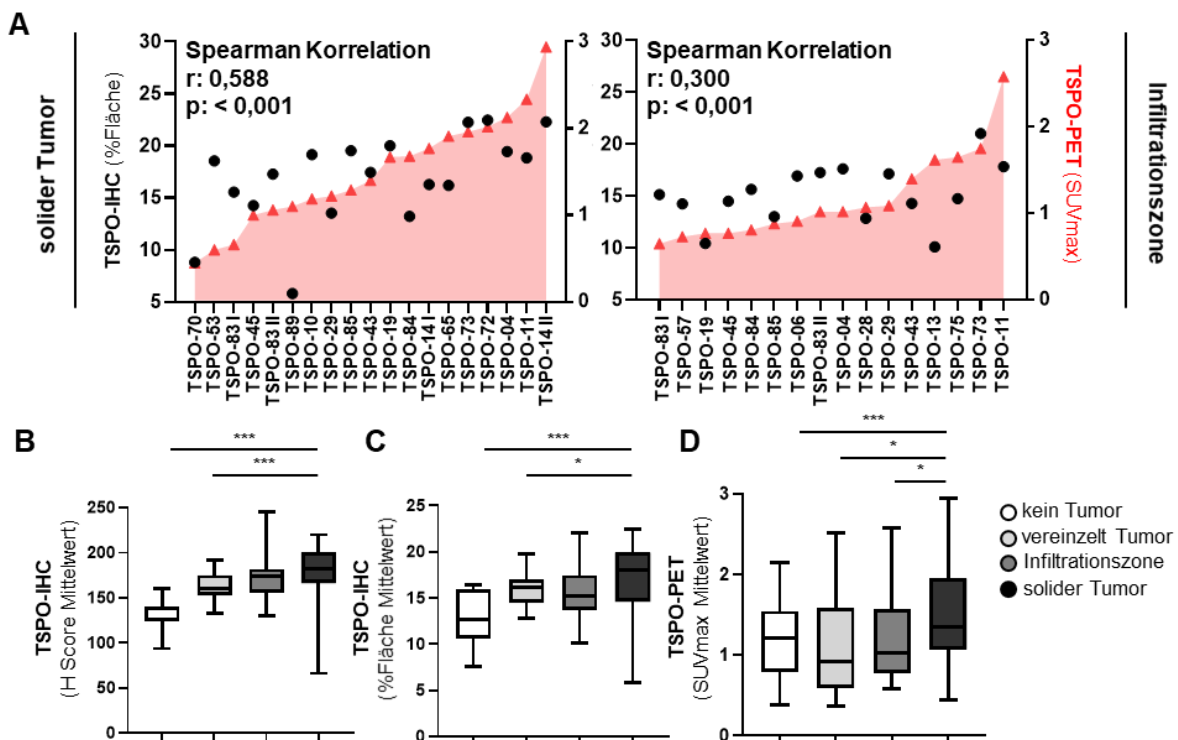


Abbildung 14: Bildgebungsbeispiel von IDH-wt GBM-Patienten der FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte.

(A) TSPO-PET eines Falls mit niedriger Tracer Anreicherung im soliden Tumorzentrum (TSPO-29) und (B) eines Falls mit hoher Tracer Anreicherung im soliden Tumorzentrum (TSPO-73). (C) FET-PET des in A dargestellten Falls und (D) des in B dargestellten Falls. (E) MRT des in A dargestellten Falls und (F) des in B dargestellten Falls. (G-H) TSPO-IHC (400x) des Falls mit niedrigem TSPO-PET Signal (TSPO-29) und des Falls mit hohem TSPO-PET Signal (TSPO-73).

Der Fall mit geringer TSPO-PET Anreicherung zeigte bei weiterer Analyse auch eine schwache Färbung in der TSPO-IHC (Abbildung 14 G), wohingegen der Fall mit hoher TSPO-PET Anreicherung ein optisch stärkeres TSPO Färbesignal (Abbildung 14 H) aufwies.



Ergebnisse

Abbildung 15: Die TSPO Expression korreliert mit dem TSPO-PET Signal und ist im soliden Tumoreal im Mittel am Höchsten.

(A) Spearman-Rho-Korrelationsanalyse zwischen TSPO-IHC (%Fläche) und TSPO-PET (SUVmax) innerhalb solider Tumor- und Infiltrationszonenareale von IDH-wt GBMs. TSPO-IHC %Fläche zeigt im Durchschnitt eine moderate Assoziation mit TSPO-PET Anreicherung (Spearman-Rho-Korrelation, $r = 0,588$, $p < 0,001$) in soliden Tumorealen, wohingegen in Infiltrationszonen die Assoziation zwischen TSPO-IHC %Fläche und TSPO-PET Anreicherung an Stärke abnimmt (Spearman-Rho-Korrelation, $r = 0,300$, $p < 0,001$). (B) Gemittelte TSPO H Score, (C) TSPO-IHC %Fläche und (D) TSPO-PET Anreicherungsgrade wurden für verschiedene Tumorzellgehaltgruppen analysiert und die soliden Tumorbereiche mit dem höchsten Tumorzellgehalt wiesen in allen Vergleichen das höchste TSPO-Signal (Expression/Anreicherung) auf (Tukey multiple comparison test, $p < 0,001$, $p < 0,05$).

Um eine Korrelation zwischen TSPO-PET Bildgebung und TSPO-IHC weiter zu evaluieren, wurden SUVmax-Werte der TSPO-PET Bildgebung den zugehörigen positiven %Flächen der TSPO-IHC gegenübergestellt. Es wurden hierfür alle Proben der soliden Tumorgruppe (73 Biopsien/Resektionspräparate von 17 Patienten) und der Infiltrationszonengruppe (50 Biopsien/Resektionspräparate von 15 Patienten) verwendet.

Die resultierenden Doppelachsen-Punkt-Streu-Diagramme, aufgetrennt nach Patienten (Abbildung 15 A), zeigten klar positive Korrelationsmuster zwischen den beiden Parametern. Die statistische Signifikanz konnte mittels nachfolgender Spearman-Rho-Einzelwert-Analyse innerhalb der jeweiligen Tumorgehaltgruppe, gewichtet nach Probenzahl der Patienten, bestätigt werden (solider Tumor: $r = 0,588$, $p < 0,001$; Infiltrationszone: $r = 0,300$, $p < 0,001$).

Das solide Tumorzentrum zeigte eine tendenziell höhere Assoziation als die infiltrativen Randareale. Folgend wurde ein Vergleich der gemittelten TSPO Signalintensität über die verschiedenen Tumorgehaltgruppen hinweg durchgeführt.

Bei der Analyse der TSPO-IHC, die sowohl mit einem intensitätsbasierten H Score als auch mit einem %Flächen Score Ansatz semiquantifiziert wurde, konnte im Mittel eine signifikant höhere TSPO Expression in soliden Tumorealen im Vergleich zu den zwei Gruppen mit mikroskopisch niedrigsten Tumorgehalt ($p < 0,05$, $p < 0,001$) gefunden werden (Abbildung 15 B/C).

Die TSPO-PET (SUVmax) Werte wurden auf die gleiche Weise analysiert, wobei auch dort ein signifikant höheres TSPO Signal in den soliden Tumorealen im Vergleich zu allen anderen Tumorbereichen ($p < 0,001$, $p < 0,05$) zu finden war (Abbildung 15 D).

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass solide Tumorareale einen großen Teil des TSPO Signals ausmachen und dass die TSPO-PET Bildgebung und die TSPO-IHC miteinander korrelieren.

4.4 Diverse Zellpopulationen exprimieren TSPO und CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben die TSPO Expression in der Infiltrationszone

Um die zelluläre Quelle der TSPO Expression im soliden Tumor zu analysieren, wurden bei einem GBM-Patienten (TSPO-14) mit intra-tumoral variierender TSPO-PET Anreicherung (I: SUVmax = 1,77 und II: SUVmax = 2,94) Multiplex OPAL IF Färbungen gegen TSPO zusammen mit Zelltypdifferenzierungs- und Tumormarkern durchgeführt.

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, können Mikroglia/Makrophagen, Endothelzellen und Tumorzellen eine Quelle für TSPO sein. Daher wurden Antikörper gegen p53/GFAP zur Färbung astrozytärer Tumorzellen bzw. reaktiver Astrozyten (Chaurasia et al., 2016; Hol & Pekny, 2015; Watanabe et al., 1996), CD11b/CD68 für Mikroglia und Makrophagen (Jurga et al., 2020) und CD31 für Endothelzellen (L. Liu & Shi, 2012) als Zelltypdifferenzierungsmarker verwendet (Abbildung 16 A-D). Beobachtete Färbemuster wurden zusammen mit zugehörigen HE und korrespondierender TSPO/CD68-IHC (Abbildung 16 F) dargestellt.

Die Doppelfärbung zeigte, dass TSPO auf Einzelzellebene in Tumorzentrum mehrheitlich von diesen Zellpopulationen exprimiert wurde (d. h. von p53/GFAP-positiven astrozytären Tumorzellen, CD68/CD11b-positiver/n Mikroglia/ Makrophagen und CD31-positiven Endothelzellen).

Es zeigten sich jedoch auch intra-tumorale Unterschiede. Bei den Markern waren CD68-positive Makrophagen/Mikroglia eher im stärker TSPO Tracer-anreichernden Areal vertreten, wohingegen die CD11b-positive Mikroglia stärker in dem niedriger TSPO Tracer-anreichernden Areal beobachtet wurden.

Ergebnisse

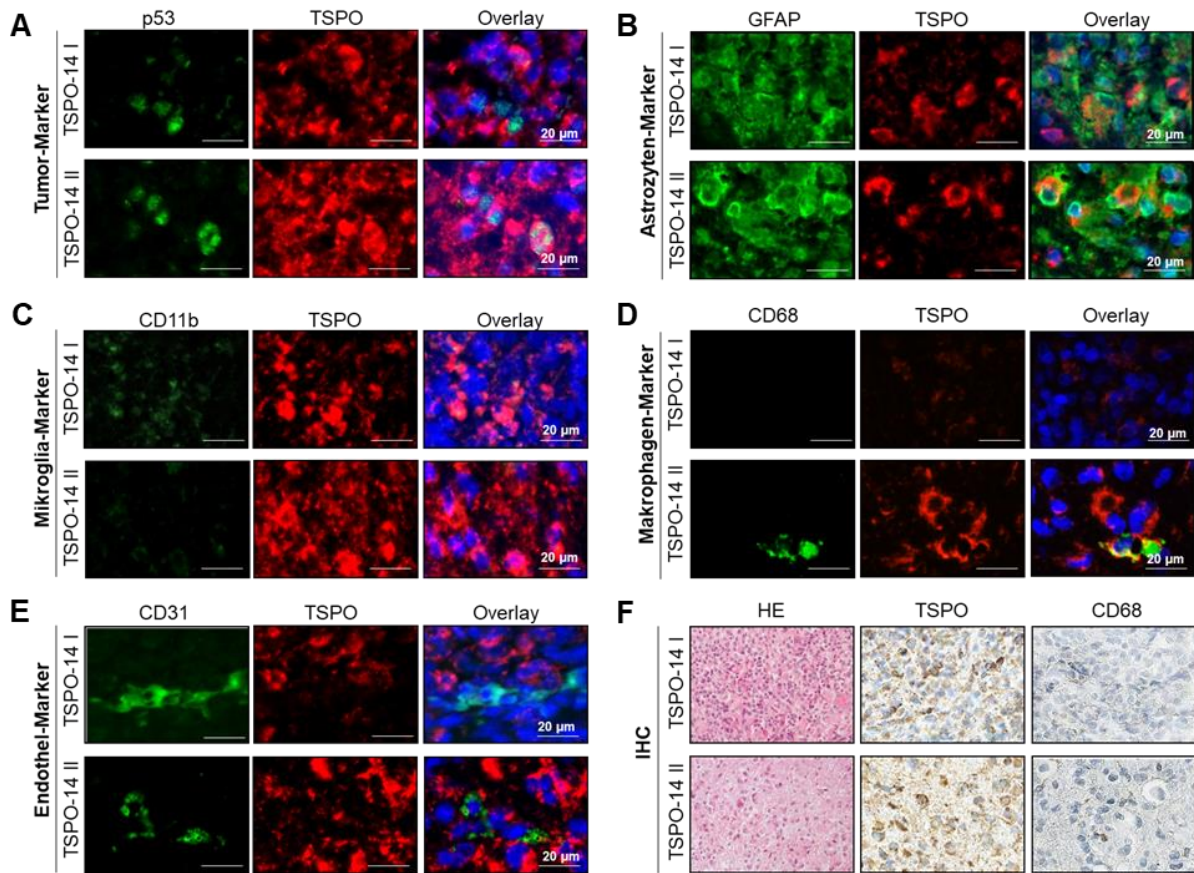


Abbildung 16: TSPO wird in diversen Zellpopulationen exprimiert am Beispiel eines IDH-wt GBMs mit unterschiedlich TSPO Tracer-anreichernden Arealen.

(A-E) Multiplex OPAL IF Färbungen (400x) von einem TSPO-PET intermediär anreichernden (TSPO-14 I, SUVmax = 1,77) und TSPO-PET stark anreichernden (TSPO-14 II, SUVmax = 2,94) soliden Tumoreal eines IDH-wt GBM-Patienten (TSPO-14). (A) TSPO/p53 Ko-Färbung, im Kern p53-positive Tumorzellen (grün) exprimieren TSPO (rot) in beiden Tumorealen. (B) TSPO/GFAP Ko-Färbung, GFAP-positive reaktive Astrozyten (grün) exprimieren TSPO (rot) in beiden Tumorealen. (C) TSPO/CD11b Ko-Färbung, CD11b-positive Mikroglia (grün) exprimieren vor allem im TSPO-niedrigeren Areal TSPO (rot). (D) TSPO/CD68 Ko-Färbung, CD68-positive Makrophagen (grün) exprimieren vor allem im TSPO-höheren Areal TSPO (rot). (E) TSPO/CD31 Ko-Färbung, CD31-positive Endothelzellen (grün) exprimieren teilweise im TSPO-höheren Areal TSPO (rot). (F) HE (200x) und CD68/TSPO-IHC (400x) der in A-E dargestellten soliden Tumoreale TSPO-14 I und TSPO-14 II.

Da Mikroglia/Makrophagen häufig als zelluläre Quelle von TSPO beschrieben werden (Foray et al., 2021; Zinnhardt et al., 2020), wurden alle IDH-wt GBM-Patienten auch mit einem gut etablierten anti-CD68 [PG-M1] Antikörper angefärbt. Repräsentative Beispiele hierfür sind für den bereits bekannten, schwach TSPO-anreichernden Fall (TSPO-29) sowie den stark TSPO-anreichernden Fall (TSPO-73) in Abbildung 17 A aufgeführt.

Ergebnisse

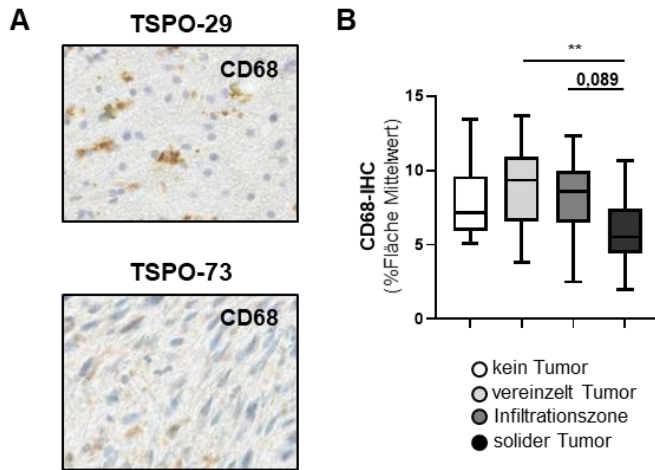


Abbildung 17: CD68 Expression ist in Tumorrandbereichen in IDH-wt GBMs höher.

(A) CD68-IHC (400x) eines IDH-wt GBM-Falls mit niedrigem TSPO-PET (TSPO-29) und eines IDH-wt GBM-Falls mit hohem TSPO-PET (TSPO-73) zeigen beide CD68-positive Färbemuster im soliden Tumor. (B) Der Vergleich der mittleren CD68-IHC %Flächen über verschiedene Tumorzell-gehaltgruppen hinweg zeigte die geringsten Werte in soliden Tumorregionen (Tukey multiple comparison test, $p < 0,01$) im Vergleich zu tumorbenachbarten Regionen.

Bei der Analyse der CD68-IHC (%Fläche) über die verschiedenen Tumorgehaltgruppen kristallisierten sich sodann deutliche Unterschiede in der CD68 Expression zwischen den Tumorarealen heraus. Die niedrigste mittlere CD68 Expression war hierbei in den soliden Tumorarealen zu verzeichnen, wohingegen in den Tumorrandbereichen eine höhere CD68 Expression vorlag (Abbildung 17 B).

Ergebnisse

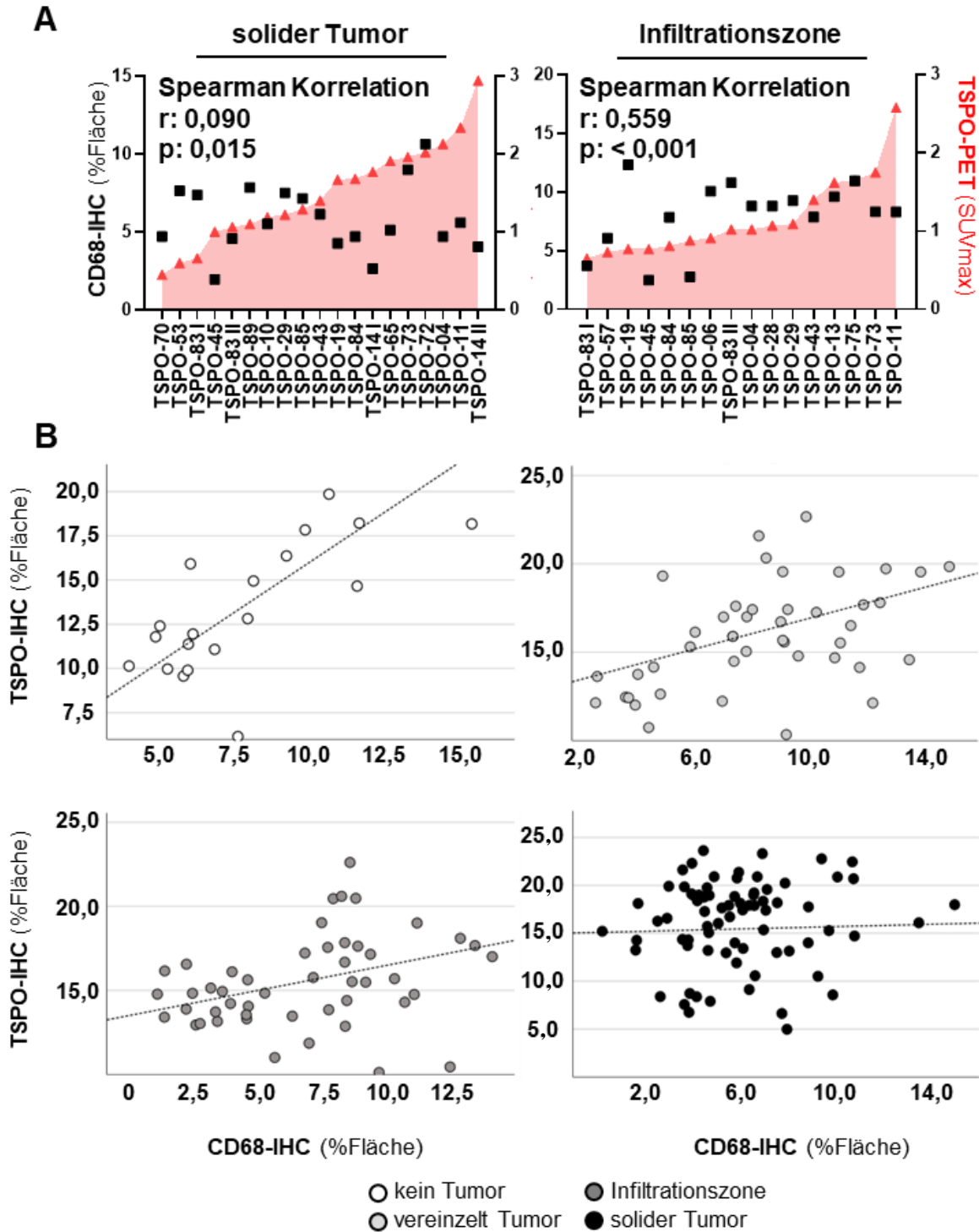


Abbildung 18: CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben die TSPO Expression in der Infiltrationszone.

(A) Die Spearman-Rho-Korrelation der CD68-IHC (%Fläche) mit TSPO-PET (SUVmax) in soliden Tumorarealen zeigte nahezu keine Assoziation ($r = 0,090$, $p = 0,015$), wohingegen in Infiltrationszonen eine deutliche Assoziation ($r = 0,559$, $p < 0,001$) beobachtet werden konnte. (B) Die Spearman-Rho-Korrelation von TSPO-IHC mit CD68-IHC (%Fläche) innerhalb der Tumorgehaltgruppen kein Tumor (weiß), vereinzelt Tumor (hellgrau), Infiltrationszone (dunkelgrau) und solider Tumor (schwarz) ergab die stärkste TSPO/CD68-IHC Assoziation bei Proben ohne histologische Tumormerkmale ($r = 0,686$, $p < 0,001$). Mit zunehmendem Gehalt an glialen

Ergebnisse

Tumorzellen nahm die Assoziation ab (vereinzelt Tumor: $r = 0,414$, $p < 0,001$, Infiltrationszone: $r = 0,403$, $p < 0,001$, solider Tumor: $r = 0,027$, $p = 0,472$).

Bei Korrelationsanalyse von CD68-IHC mit TSPO-PET ergaben sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Tumorealen (Abbildung 18 A): Während in den soliden Tumorbereichen kein oder nur ein schwacher Zusammenhang zwischen TSPO-PET und CD68-IHC bestand (Spearman-Rho-Korrelation: $r = 0,090$, $p = 0,015$), zeigte sich in den Infiltrationszonen ein markant stärkerer, signifikanter Zusammenhang zwischen TSPO-PET und CD68-IHC (Spearman-Rho-Korrelation: $r = 0,559$, $p < 0,001$). Die analysierten Einzelwerte wurden hierbei ebenfalls nach Probenzahl je Patient gewichtet.

Angesichts dieser Ergebnisse wurde die Abhängigkeit der TSPO/CD68 Expression weiter evaluiert, indem direkte Spearman-Rho-Korrelationsanalysen zwischen TSPO-IHC (%Fläche) und CD68-IHC (%Fläche) in den verschiedenen Tumorgehaltgruppen durchgeführt wurden (Abbildung 18 B). Dadurch wurde eine Abnahme der Assoziation zwischen TSPO Expression und CD68 Expression mit zunehmendem Tumorgehalt deutlich (kein Tumor: $r = 0,686$, $p < 0,001$; vereinzelt Tumor: $r = 0,414$, $p < 0,001$; Infiltrationszone: $r = 0,403$, $p < 0,001$; solider Tumor: $r = 0,027$, $p = 0,472$).

Somit scheinen CD68-positive Mikroglia/Makrophagen eine relevante Quelle der TSPO Expression im Tumorrandbereich darzustellen.

4.5 Rezidive zeigen eine höhere TSPO Expression und CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben auch hier die TSPO Expression in der Infiltrationszone

Da für die IDH-wt GBM-Rezidivtumore höhere TSPO-PET Anreicherungen in (Quach et al., 2023) beschrieben sind, wurde dieser Aspekt hier auf TSPO Expressionsebene weiter untersucht. In dieser Analyse wurden die Einzelwerte nach Probenzahl der Patienten je Tumoreal gewichtet um die statistische Aussagekraft trotz geringer Fallzahlen (nur 8 Rezidivtumore insgesamt) zu erhöhen.

Somit ließ sich sowohl für solide Tumoreale (Mann Whitney U, $p < 0,001$) als auch Infiltrationszonenabschnitte (Mann Whitney U, $p < 0,001$) eine erhöhte TSPO Expression in den GBM-Rezidiven verifizieren (Abbildung 19 A).

Ergebnisse

Bezüglich der CD68 Expression zeigten sich in den Infiltrationszonenarealen höhere Werte in Rezidivtumoren im Vergleich mit Primärtumoren (Mann Whitney U, $p < 0,001$), jedoch war kein signifikanter Unterschied im soliden Tumorzentrum festzustellen (Mann Whitney U, $p = 0,143$) (Abbildung 19 B).

Die Spearman-Rho-Korrelationsanalyse zeigte, dass innerhalb der Infiltrationszonen der TSPO-IHC und CD68-IHC (%Fläche) bei Rezidiv- und bei Primärtumoren korreliert (Primärtumore: $r = 0,337$, $p = < 0,001$; Rezidivtumore: $r = 0,415$, $p = < 0,001$) (Abbildung 19 C). Im Gegensatz dazu zeigten die soliden Tumorareale auch bei Rezidivtumoren weiterhin keine signifikante TSPO/CD68-IHC Assoziation (Primärtumore: $r = 0,049$, $p = 0,217$; Rezidivtumore: $r = -0,059$, $p = 0,637$).

Zusammenfassend wurde eine erhöhte TSPO Expression in Rezidivtumoren beobachtet und auch dort sind innerhalb der Infiltrationszone CD68-positive Makrophagen/Mikroglia als eine treibende zelluläre Quelle für TSPO Expression anzusehen.

Ergebnisse

4.6 Das TSPO Signal von schwach FET-PET anreichernden Bereichen kommt zum Großteil von der Infiltrationszone

Um die TSPO Expression in Zusammenhang mit der FET-PET Anreicherung innerhalb der Tumorareale zu untersuchen, wurde das Studienkollektiv in eine nicht bis intermediär anreichernde und intermediär bis stark anreichernde Gruppe gemäß ihrem FET-PET Signal (TBRmax) eingeteilt. Hierfür wurde nach Rücksprache mit Dr. Stefanie Quach ein TBRmax Cut-off = 1,6 (Poulsen et al., 2017) verwendet (Abbildung 20).

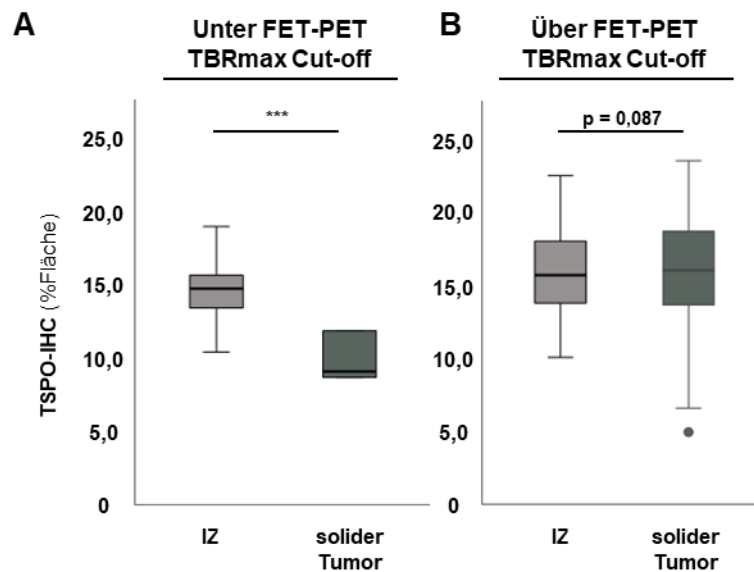


Abbildung 20: TSPO Expression variiert in IDH-wt GBMs mit schwacher FET-PET Anreicherung.

TSPO-IHC (%Fläche), aufgetragen für Proben aus Infiltrationszonen und soliden Tumorarealen (A) mit keiner bis intermediärer FET-PET Anreicherung (Cut-off: TBRmax = 1,6) und (B) mit intermediärer bis starker FET-PET Anreicherung. Areale mit keiner bis schwacher FET-PET Anreicherung zeigten innerhalb der Infiltrationszonen höhere TSPO Expression (Post hoc Games Howell, $p < 0,001$). Areale mit intermediärer bis starker FET-PET Anreicherung zeigten hingegen ähnliche TSPO Expression (Post hoc Games Howell, $p = 0,087$).

Es zeigte sich, dass in Arealen mit keiner bis schwacher FET-PET Anreicherung ($TBR_{max} < \text{Cut-off}$) die TSPO Expression vor allem in Infiltrationszonen im Vergleich mit soliden Tumorproben höher ausgeprägt war (Post hoc Games Howell, $p < 0,001$).

In Arealen mit intermediärer bis starker FET-PET Anreicherung ($TBR_{max} > \text{Cut-off}$) befand sich hingegen die TSPO Expression in Infiltrationszonen und soliden Tumorarealen auf einem eher ähnlichen Niveau (Post hoc Games Howell, $p = 0,087$).

Ergebnisse

Zusammenfassend scheint das TSPO Signal von schwach FET-PET anreichernden Bereichen zum Großteil von der Infiltrationszone zu kommen. Dieses Ergebnis spricht für die Hypothese durch eine Kombination aus FET-PET und TSPO-PET entzündliche infiltrative Areale des Tumors mittels Bildgebung erkennen zu können.

4.7 *TSPO* Überexpression markiert transkriptionelle Muster, welche mit onkogenen Signalwegen, Organisation der extrazellulären Matrix und Immunsysteminteraktion in Zusammenhang stehen

Um molekulare Muster im Zusammenhang mit der *TSPO* Überexpression in GBMs besser zu verstehen, wurde kryo-konserviertes Material aus soliden Tumorarealen von GBM-Patienten der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte (N = 18, Tumoranteil > 80%) mittels RNA NGS analysiert (Tabelle 12).

Hierbei ergaben sowohl RPKMs als auch DeSeq-normalisierte Counts innerhalb der Principal Component Analyse (PCA) ähnliche Verteilungsmuster für die sequenzierten GBMs (Abbildung 21 A-B). Des Weiteren korrelierte die *TSPO* Expression (RNA NGS, Kryo-Gewebe, DeSeq-normalisierte Counts) signifikant mit der TSPO Proteinexpression (IHC, FFPE-Gewebe, TSPO %Fläche) angrenzender solider Tumorareale (Spearman-Rho-Korrelation, $r = 0,504$, $p = 0,04$) (Abbildung 21 C).

Ergebnisse

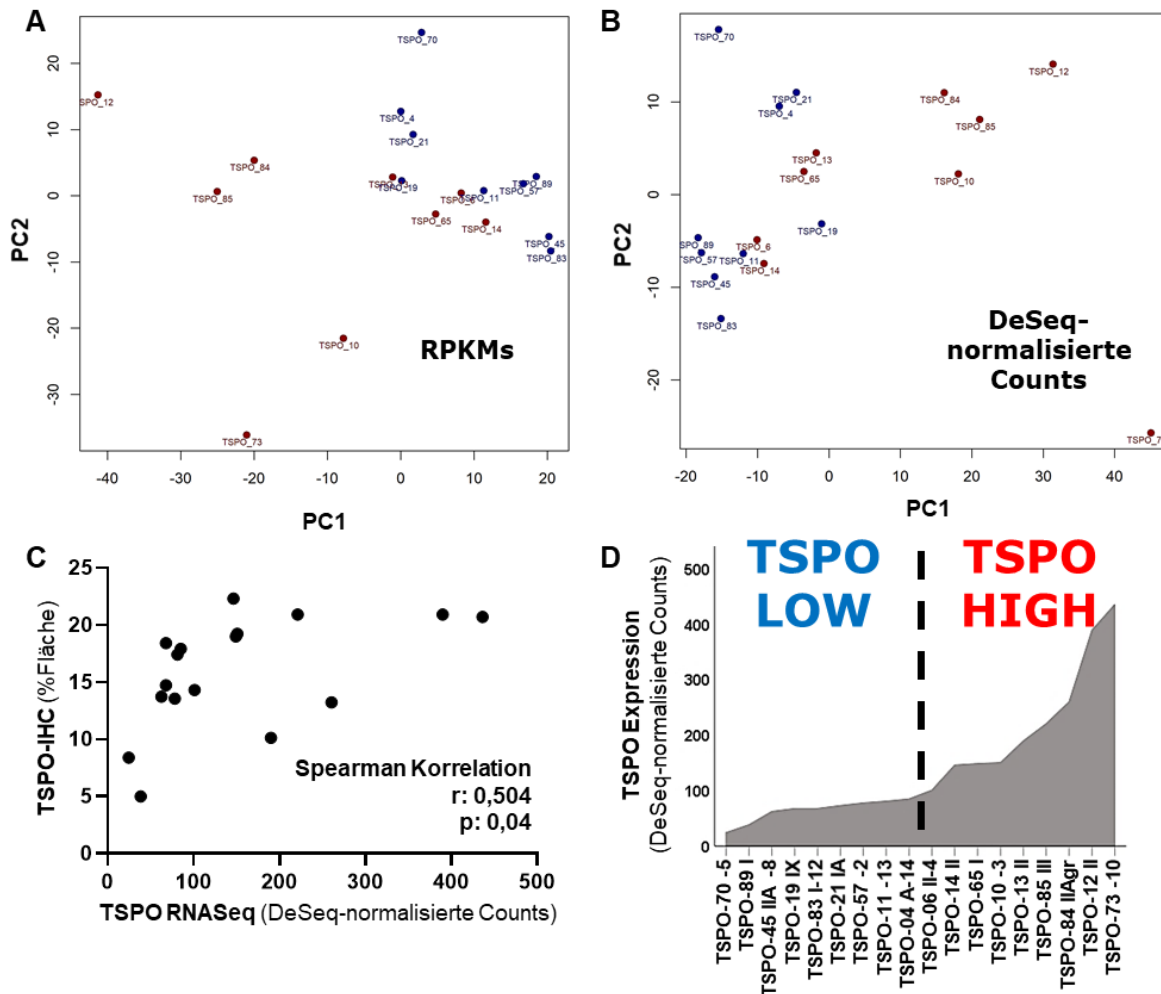


Abbildung 21: Gruppeneinteilung für molekulare Follow-up Analysen der sequenzierten IDH-wt GBMs aus FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte.

(A-B) PCA der in die Auswertung eingegangenen soliden Tumoreareale von IDH-wt GBMs aus dem FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudienkollektiv. (A) zeigt die PCA Ergebnisse der RPKM Werte (PC1: 29,72 % Varianz erklärt, PC2: 17,90 % Varianz erklärt) und (B) die der DeSeq-normalisierten Counts (PC1: 34,36 % Varianz erklärt, PC2: 12,10 % Varianz erklärt). Die Fälle in beiden Grafiken wurden zur besseren Übersicht bereits als TSPO-niedrig (blau, Gruppe: TSPO LOW) bzw. –hoch (rot, Gruppe: TSPO HIGH) basierend auf (D) eingefärbt. (C) Spearman-Rho-Korrelationsanalyse zeigte signifikanten Zusammenhang zwischen TSPO-IHC %Flächen und DeSeq-normalisierten Counts, wodurch diese Expressionswerte für den in (D) dargestellten Mediansplit (DeSeq-normalisierte Counts = 92,90) und daraus resultierende Gruppeneinteilung (9 TSPO LOW vs 9 TSPO HIGH) in weiteren Analyseprozess verwendet wurden.

Somit wurden die Fälle für die weitere Analyse basierend auf dem übergreifenden Median der TSPO Expression (DeSeq-normalisierte Counts = 92,90) in eine *TSPO*-niedrige (TSPO LOW, 3 Rezidivtumore) und eine *TSPO*-hohe (TSPO HIGH, 2 Rezidivtumore) Gruppe unterteilt. Eine Übersicht der Expressionswerte-Verteilung der eingeschlossenen Patienten sowie ihre Gruppenzugehörigkeit sind in Abbildung 21 D dargestellt.

Ergebnisse

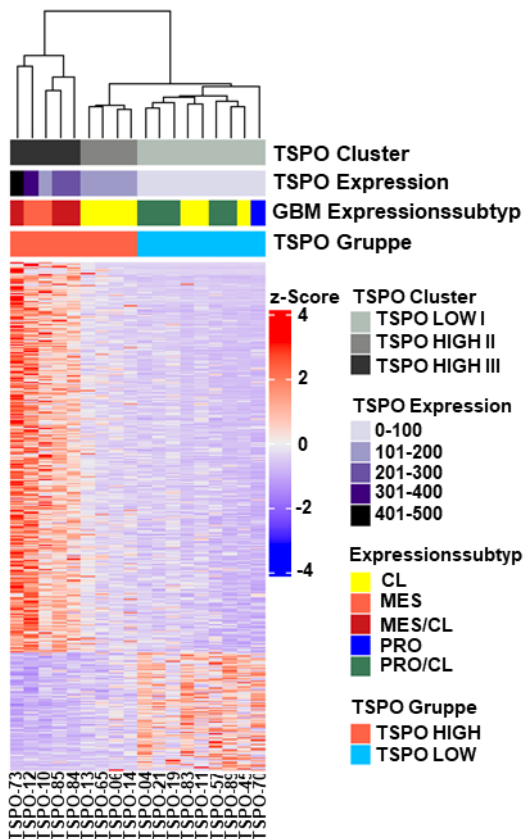


Abbildung 22: Differentielle Expressionsanalyse der 9 TSPO LOW vs 9 TSPO HIGH GBMs.

Gezeigt ist eine Heatmap mit Annotation und Clustering der differentiell exprimierten Gene vom Vergleich von 9 TSPO LOW vs. 9 TSPO HIGH GBMs, die mit RNA-Seq analysiert wurden. Annotation beinhaltet TSPO Cluster (TSPO LOW I: hellgrau, TSPO HIGH II: dunkelgrau, TSPO HIGH III: schwarz), *TSPO* Expression basierend auf adjustierten DeSeq-normalisierten Counts (Blaue Skala, 0-500), Expressionstypen (CL: gelb, MES: orange, MES/CL: dunkelorange, PRO: dunkelblau, PRO/CL: dunkelgrün) basierend auf (Brennan et al. 2013) und *TSPO* Gruppe (TSPO LOW: hellblau, TSPO HIGH: hellrot). Differentielle Expressionsanalyse ergab 1581 ($\log_{FC} \pm 1$, $p_{adj} < 0,05$) differentiell exprimierte Gene, davon war die Mehrheit ($N = 1213$) hochreguliert, wohingegen nur 368 Gene herunterreguliert vorlagen.

Die Analyse der differentiellen Expression zwischen diesen beiden Gruppen zeigte, dass insgesamt 1581 Gene differentiell exprimiert vorlagen ($\log_{FC} \pm 1$, $p_{adj} < 0,05$), wobei 1213 Gene hochreguliert und 368 Gene herunterreguliert waren (Abbildung 22).

In den anschließenden funktionellen Annotationsanalysen (Reactome und FUMA) ergaben vor allem die hochregulierten Gene signifikante Anreicherungen. Die 50 am stärksten überrepräsentierten Signalwege aus der FUMA/Reactome Datenbank, welche unter Verwendung aller differentiell exprimierten Gene (Reactome: $FDR \leq 0,25$, FUMA: $p_{adj} \leq 0,05$) erzielt wurden, stammten hauptsächlich aus drei funktionellen Clustern: Reorganisation der extrazellulären Matrix (ECM)/Zellmigration (16 Signalwege), Interaktion mit dem Immunsystem (13 Signalwege) und onkogene/maligne Signalwege (2 Signalwege) (Abbildung 23 A).

Darüber hinaus ergab auch die Analyse der normalisierten Expressionswerte (DeSeq-normalisierte Counts) mittels GSEA 30 signifikant angereicherte Hallmark-Gensätze ($FDR \leq 0,05$, $NES > 2,0$), hauptsächlich aus denselben funktionellen Clustern (Abbildung 23 B). Davon waren 8 Gensätze an der Interaktion mit dem Immunsystem beteiligt, 6 Gensätze wiesen auf eine höhere Malignität des Tumors hin und 1 Gensatz stand mit der Organisation der extrazellulären Matrix in Zusammenhang. Zusätzlich ergab die GSEA innerhalb

Ergebnisse

onkogener Signatur-Gensätze 136 signifikante Anreicherungen ($FDR < 0,25$) für die sequenzierten Proben (Abbildung 23 C). Die Mehrheit der Gensätze ($N = 133$) war dabei in der *TSPO*-hohen Gruppe angereichert, was wiederum einen onkogeneren Transkriptomphänotyp in dieser Gruppe andeutet.

Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse, dass eine erhöhte *TSPO* Expression als Marker Tumorregionen hervorheben könnte, welche einen maligneren Phänotyp aufweisen sowie markante Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem vorweisen. Eventuell markieren sie auch eine veränderte extrazelluläre Matrixorganisation.

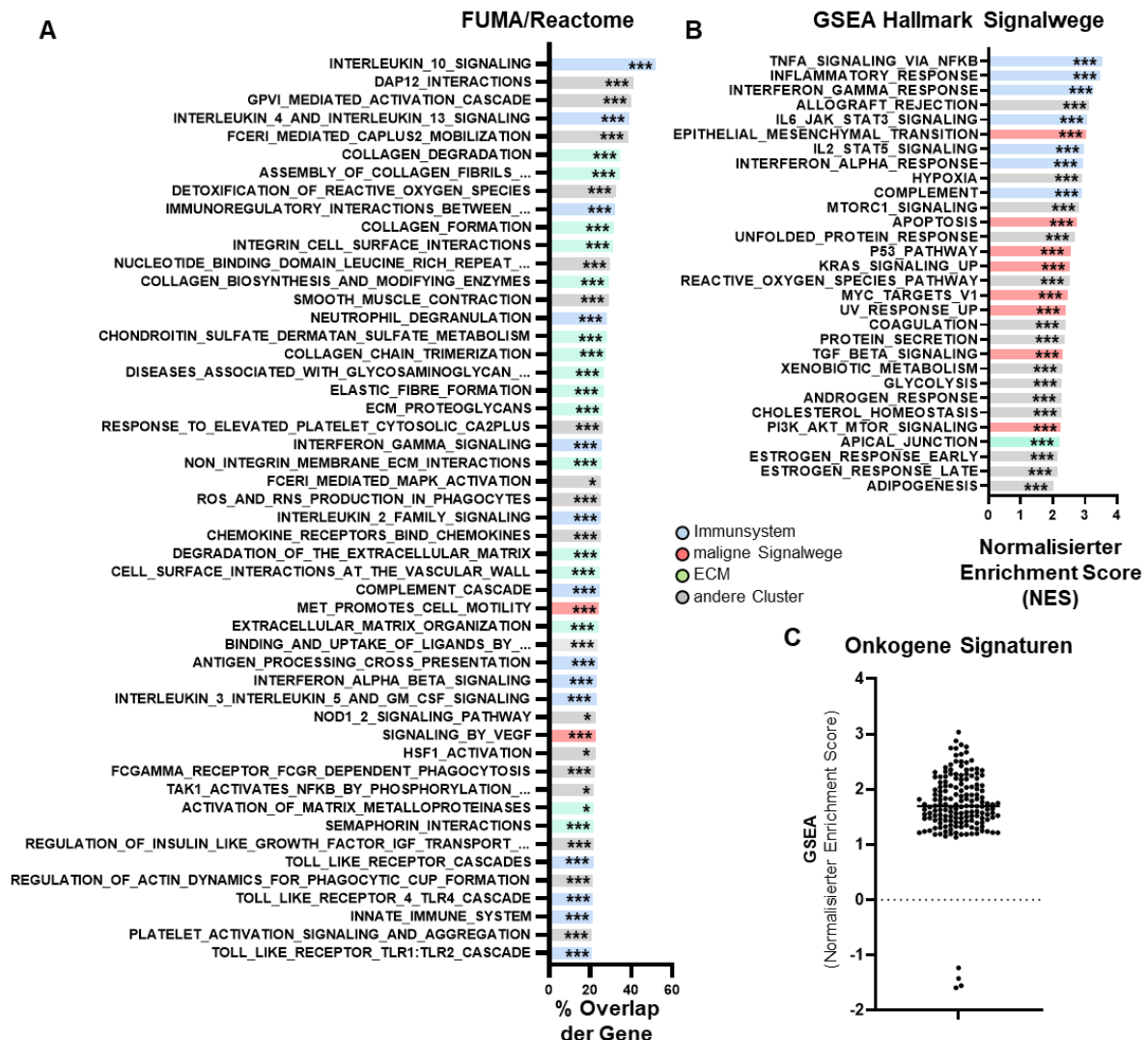


Abbildung 23: *TSPO* Überexpression markiert transkriptionelle Muster, welche mit onkogenen Signalwegen, Organisation der extrazellulären Matrix und Immunsysteminteraktion in Zusammenhang stehen.

(A) Follow-up Analysen in Reactome/FUMA mit den differenziell exprimierten Genen ergaben überwiegend Anreicherungen in drei funktionellen Clustern unter Berücksichtigung der 50 am stärksten überrepräsentierten Signalwege (Reactome: $FDR \leq 0,25$, FUMA: $padj \leq 0,05$):

Ergebnisse

Extrazelluläre Matrix (ECM)-Organisation, Interaktion mit dem Immunsystem und maligne/onkogene Signalwege. (B) GSEA unter Verwendung von Hallmark-Gensätzen ergab 30 signifikant angereicherte Gensätze ($FDR \leq 0,05$, $NES > 2,0$) ebenfalls aus diesen drei funktionellen Clustern und (C) eine Anreicherung von onkogenen Signaturen in *TSPO*-hohen GBMs ($FDR \leq 0,05$, $FWER \leq 0,05$).

4.8 Eine hohe *TSPO* Expression kennzeichnet mesenchymale Glioblastom-Zellsubpopulationen mit erhöhter Anzahl CD68-positiver Mikroglia/Makrophagen

Bei der weiteren Charakterisierung der GBMs im Hinblick auf ihre molekularen Expressionssubtypen (Brennan et al., 2013; Wang et al., 2017) fiel auf, dass alle 5 GBM-Proben mit dem prognostisch ungünstigen mesenchymalen Subtyp in der *TSPO*-hohen Gruppe vertreten waren (Abbildung 22). Das Clustering differenziell exprimierter Gene offenbarte hierbei zwei separate Cluster innerhalb der *TSPO*-hohen Gruppe, wobei eines davon nur aus diesen 5 mesenchymalen GBM-Proben bestand.

Auch die PCA zeigte ein ähnlich separiertes Cluster mit diesen 5 GBMs (Abbildung 24 A). Bemerkenswert ist, dass diese 5 GBM-Proben auch die höchste *TSPO* Expression aufwiesen (Abbildung 22). Für die Patienten mit eindeutig mesenchymalen Expressionssubtyp ($N = 2$) in der ssGSEA ließ sich eine höhere *TSPO* Expression auch auf Proteinebene nachvollziehen (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden weitere Analysen mit diesen drei Clustern (*TSPO* LOW I, *TSPO* HIGH II und *TSPO* HIGH III), welche durch das Clustering der differentiell exprimierten Gene deutlich wurden, durchgeführt.

Ergebnisse

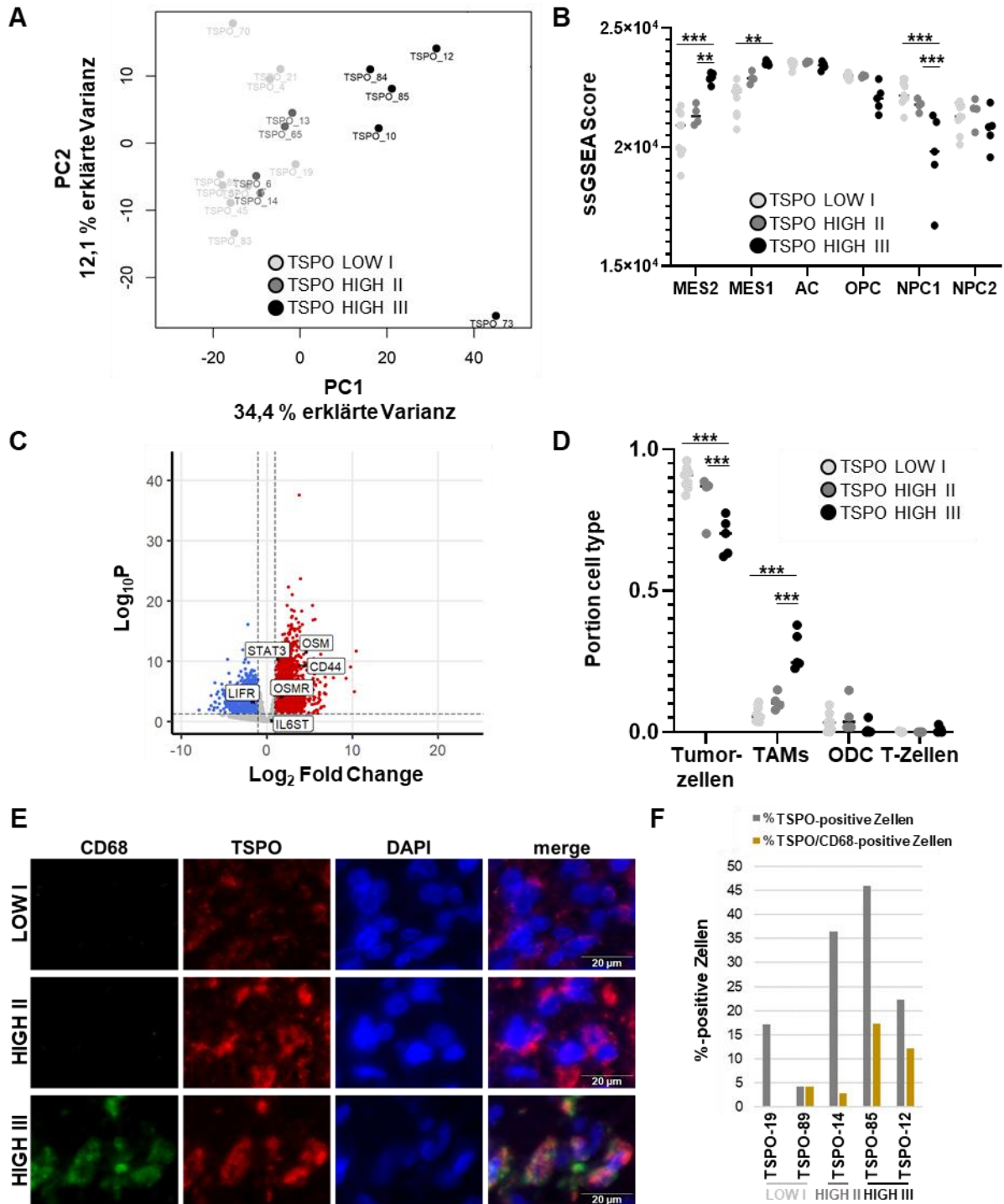


Abbildung 24: Eine hohe *TSP0* Expression kennzeichnet Subpopulationen mesenchymaler Glioblastomzellen, die durch eine erhöhte Anzahl CD68-positiver TAMs gekennzeichnet sind.

(A) Die PCA der RNA-Seq Daten zeigte ein Cluster (TSP0 HIGH III), das aus allen mesenchymalen GBMs bestand. Dieses lag von den nicht-mesenchymalen GBMs (TSP0 LOW I, TSP0 HIGH II) separiert vor. (B) ssGSEA mit Gegensätzen, die zelluläre Zustände in GBM definieren (Neffel et al., 2019), ergab eine Anreicherung der MES1/2-ähnlichen zellulären Zustände im TSP0 HIGH III Cluster der TSP0 HIGH Gruppe. (C) Die Genexpression von MES-ähnlichen Interaktionsgenen zwischen Tumorzellen und TAMs (Hara et al., 2021) ist im TSP0 HIGH III Cluster im Vergleich zum TSP0 LOW I Cluster hochreguliert. (D) Die Dekonvolution von den sequenzierten GBMs zeigte einen signifikant größeren Anteil an TAMs im TSP0 HIGH III Cluster im Vergleich zu TSP0 HIGH

Ergebnisse

II und TSPO LOW I. (E) Repräsentative Bilder der OPAL Multiplex-IF zeigten einen erhöhten TSPO/CD68-doppelt positiven Zellanteil in einem TSPO HIGH III (TSPO-85) Fall im Vergleich zu TSPO HIGH II (TSPO-14 II) und TSPO LOW I (TSPO-19) Fällen. (F) Die Quantifizierung (%positive Zellen) des TSPO-positiven und TSPO/CD68-doppelt positiven Zellanteils durch Auszählung von N = 2 TSPO LOW I, N = 1 TSPO HIGH II und N = 2 TSPO HIGH III Fällen bestätigten diese Ergebnisse zusätzlich.

Mittels Einzelzell-RNA-Seq Analyse (scRNA-Seq) sind an einer großen Glioblastomkohorte vier zelluläre Hauptzustände beschrieben worden: neurale Vorläuferzellen-ähnlich (NPC1/2-like), Oligodendrozytenvorläufer-ähnlich (OPC-like), Astrozyten-ähnlich (AC-like) und Mesenchymal-ähnlich (MES1/2-like) (Neftel et al., 2019). MES-ähnliche Zustände wurden dabei mit *NFI*-Mutationen und der Interaktion mit dem Mikromilieu des Gewebes in Verbindung gebracht und sind im mesenchymalen Expressionssubtyp häufiger anzutreffen.

Eine ssGSEA mit diesen Gensätzen offenbarte in der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte (Abbildung 24 B) eine signifikante Anreicherung von MES1/2-ähnlichen Genen, vor allem im TSPO HIGH III Cluster.

Hara et al. konnten MES-ähnliche zelluläre Zustände in Glioblastomzellen via Makrophagenproduziertes Oncostatin M (OSM) induzieren, indem OSM mit seinen Rezeptoren (OSMR und LIFR) im Komplex mit GP130 (auch bekannt als IL6ST) interagiert und dadurch letztlich mittels STAT3 Signalwege angesteuert wurden (Hara et al., 2021).

Tatsächlich ließ sich auch in den analysierten GBM-Proben des TSPO HIGH III Clusters eine signifikante Überexpression der Gene (*OSM*, *OSMR*, *STAT3* und *CD44*), die für die Interaktion zwischen Makrophagen und Tumorzellen beschrieben wurden, nachweisen (Abbildung 24 C).

Diese RNA NGS Ergebnisse deuteten daher eindeutig auf eine starke Beteiligung des Immunsystems in Tumoren des TSPO HIGH III Clusters hin.

Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wurde eine Dekonvolutionsanalyse mit einem scRNA-Seq Datensatz als Referenz für spezifische Zelltyp-Gene durchgeführt. Die dadurch abgebildeten Zelltypen beinhalteten Tumorzellen, tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), Oligodendrozytenzellen (ODC) und T-Zellen (Neftel et al., 2019).

Wie in Abbildung 24 D dargestellt, zeigten die Tumore des TSPO HIGH III Clusters eine signifikante Abnahme für Tumorzellen- und eine signifikante Zunahme für TAM-Zellpopulationsmuster.

Ergebnisse

Eine relative Zunahme der TAM-Menge konnten über eine Ausweitung der Multiplex OPAL IF Färbungen in Hinblick auf die hier definierten TSPO Cluster (TSPO LOW I, N = 2, TSPO HIGH II, N = 1 und TSPO HIGH III, N = 2) auf Proteinebene bestätigt werden. Repräsentative Bilder (TSPO-19 = TSPO LOW I, TSPO-14 = TSPO HIGH II, TSPO-85 = TSPO HIGH III) zeigten hierbei, dass die höchste relative Menge an CD68-positiven Makrophagen/Mikroglia in den Tumoren des TSPO HIGH III Clusters zu finden waren (Abbildung 24 E).

Eine quantitative Analyse der Zellpopulationen in allen doppelt-gefärbten Proben bestätigte einen höheren relativen Gehalt an TSPO/CD68-positiven Makrophagen/Mikroglia in den TSPO HIGH III Clustertumoren (Abbildung 24 F).

Zusammengenommen bestand die *TSPO*-hohe Gruppe in der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte aus zwei molekularen Clustern, von denen der Cluster mit der höchsten *TSPO* Expression eine Anreicherung von mesenchymalen Signaturen sowie Immunsystem-relevanten Genen aufweist und eine veränderte zelluläre Zusammensetzung mit einem erhöhten Anteil an TSPO/CD68-positiven Makrophagen/Mikroglia enthält.

4.9 Heterogene TSPO Expression in gesunden Hirnregionen und pathologischen Entitäten impliziert hirnregional spezifische Unterschiede sowie variable TSPO Funktionen in anderen Tumorentitäten

Um einen Ausblick über die TSPO Expressionmuster jenseits der IDH-wt Glioblastome zu bekommen und somit einen Eindruck verschiedener Hirnpathologien und Hirnregionen im Rahmen dieser Arbeit darstellen zu können, wurde auf zwei kommerziellen Tissue-Microarrays (TMAs) die TSPO Expression untersucht (Kapitel 2.11). Diese zwei TMAs deckten insgesamt 16 nicht-neoplastische/gesunde Gewebekategorien und 8 verschiedene Hirnpathologien ab (Tabelle 13).

Eine Panorama-Übersichtsaufnahme der TSPO-IHC für TMA CNS2081, welcher sowohl pathologische als auch gesunde Hirngewebe enthält, ist in Abbildung 25 dargestellt. Leichte TSPO Intensitätsunterschiede zeichneten sich hier bereits vor dem Scoring innerhalb der Gruppe der astrozytären Gliome (Abbildung 25, Bsp.: B6, D11) sowie Oligodendrogliome (Abbildung 25, Bsp.: E4) ab, wobei tendenziell die Gruppe der Glioblastome am stärksten angefärbt war.

Ergebnisse

Im Gegensatz zu dem flächig positiven Signal der diffusen Gliome, zeigten Fälle mit Inflammation eine stark positive, jedoch eher zellulär begrenzte TSPO Färbung (Abbildung 25, Bsp.: K14).

Nicht-neoplastische/gesunde Hirnareale waren auf TMA CNS2081 für TSPO weitestgehend homogen negativ bis schwach positiv (Abbildung 25, Bsp.: M1, M14).

Innerhalb bestimmter Tumortypen ließen sich heterogene Färbungen feststellen. So waren heterogene TSPO Färbemuster bei Ependymomen (Abbildung 25, Bsp.: F1, F12) und noch prägnanter bei Medulloblastomen (Abbildung 25, Bsp.: G6, G11) zu beobachten.

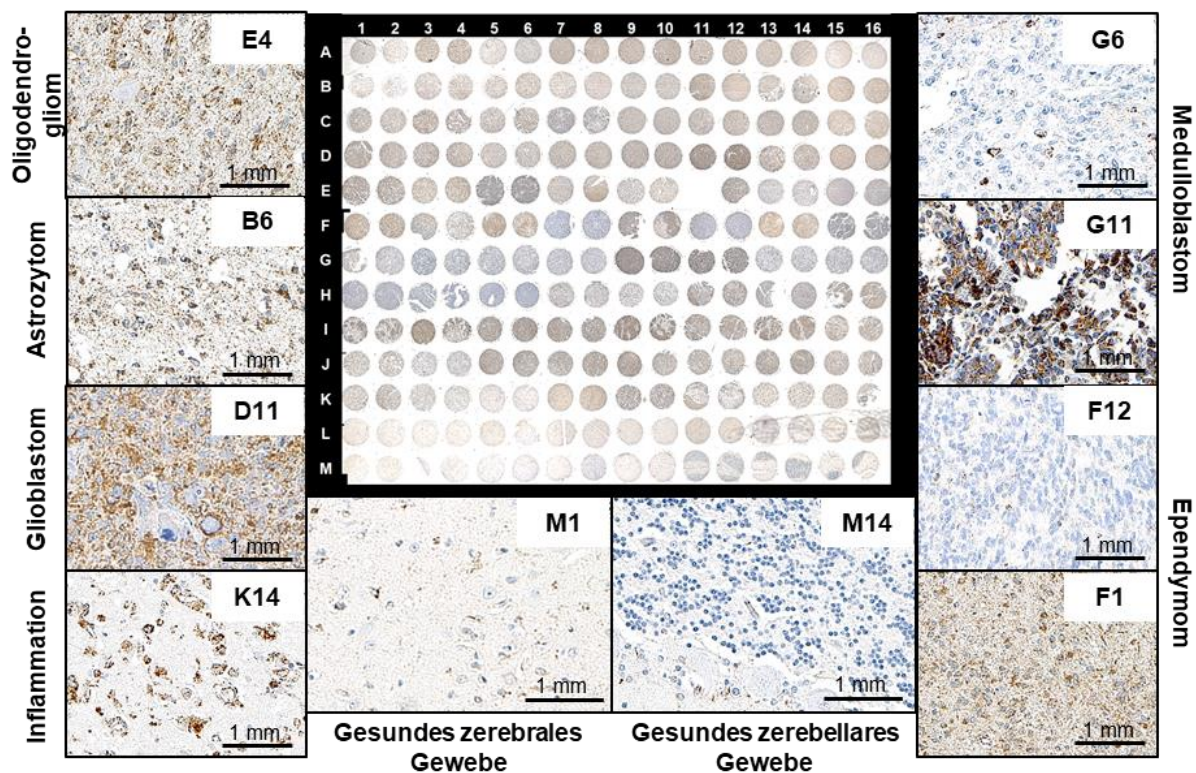


Abbildung 25: TSPO-IHC Aufnahmen für Tissue Microarray (TMA) CNS2081.

Dargestellt ist eine Panorama-Übersichtsaufnahme der TSPO-IHC des TMA CNS2081 (braun, 50x): A1-A2/A5-A6/L1-L16 enthält gesundes, an Tumor angrenzendes Hirngewebe (NTC), A3-A4/A7-A8/A11-A14/B1-C16 enthält WHO-Grad 2+3 Astrozytom, A9-A10/A15-A16/E1-E16 WHO-Grad 2+3 Oligodendrogliom, D1-D16 WHO-Grad 4 Glioblastom, F1-F16 WHO Grad 2+3 Ependyom, G1-H4 WHO Grad 4 Medulloblastom, H5-K4 Meningiom, K5-K8 Gliose, K9-K16 Inflammation, M1-M6 gesundes zerebrales Gewebe und M7-M16 deckt gesundes zerebellares Gewebe ab.

Detailaufnahmen (400x) zeigen die TSPO Expression exemplarisch für ein WHO-Grad 2+3 Oligodendrogliom (E4), ein WHO-Grad 2+3 Astrozytom (B6), ein WHO-Grad 4 Glioblastom (D11), eine Inflammation (K14), gesundes zerebrales Gewebe (M1), gesundes zerebellares Gewebe (M14), zwei WHO-Grad 4 Medulloblastome (G6 und G11) und zwei WHO-Grad 2+3 Ependymome (F1 und F12).

Ergebnisse

Mittels H Score-orientierter Semi-Quantifizierung der TSPO-IHC Intensität unter Einschluss beider TMAs ließ sich diese Beobachtungen bestätigen (Abbildung 26), wobei eine tendenziell höhere TSPO Expression vermehrt in den Hirnpathologien im Vergleich zu den meisten gesunden Hirnregionen vorzufinden war (Detailinformationen zu den TSPO H Score Mittelwerten in Tabelle 23 und Tabelle 24 im Anhang unter Kapitel 7.3 hinterlegt).

Ähnlich zum ersten Färbeeindruck (Abbildung 25) zeigten Glioblastome (WHO-Grad 2016: 4) tendenziell eine höhere TSPO Expression (Gruppen-Mittelwert: $184,4 \pm 27,9$) im Vergleich mit Astrozytomen (Gruppen-Mittelwert: $157,9 \pm 42,5$) und Oligodendrogliomen (Gruppen-Mittelwert: $149,5 \pm 62,9$) (jeweils WHO-Grad 2016: 2 bis 3). Die statistische Analyse der Scores zeigte eine tendenziell geringere TSPO Expression bei Astrozytomen ($p = 0,079$) im Vergleich zu GBMs. Die im Mittel geringere TSPO Expression bei Oligodendrogliomen im Vergleich zu GBMs war nicht signifikant ($p = 0,315$), vermutlich aufgrund der hohen Streuung der H Scores.

Inflammatorische Areale hatten im Mittel tendenziell etwas niedrigere TSPO H Scores (Gruppen-Mittelwert: $176,3 \pm 36,4$) als die Glioblastome.

Interessanterweise wiesen die hoch malignen Medulloblastome in der Mehrheit sehr niedrige TSPO Intensitäten auf ($4,50$ bis $85,0$), die zum Teil ähnlich zu den zerebellaren Hirnregionen (0 bis $20,0$) waren. Sie waren darüber hinaus im Vergleich zu den GBMs signifikant niedriger ($p = 0,034$). Bei zwei Medulloblastomduplikaten wurden jedoch sehr hohe TSPO Expressionen beobachtet (TSPO H Score Mittelwerte: $245,0$ und $250,0$), die oberhalb des Bereichs der GBM Scores lagen. Diese intratumorale Heterogenität in der TSPO Expression ist interessant und sollte zukünftig genauer untersucht werden.

Intratumorale TSPO Heterogenität zeigte sich auch bei Meningiomen und Ependymomen, wo stark schwankende TSPO H Scores vorlagen (Meningiome: $13,0$ bis $227,5$, Ependymome: $27,5$ bis $200,0$).

Ergebnisse

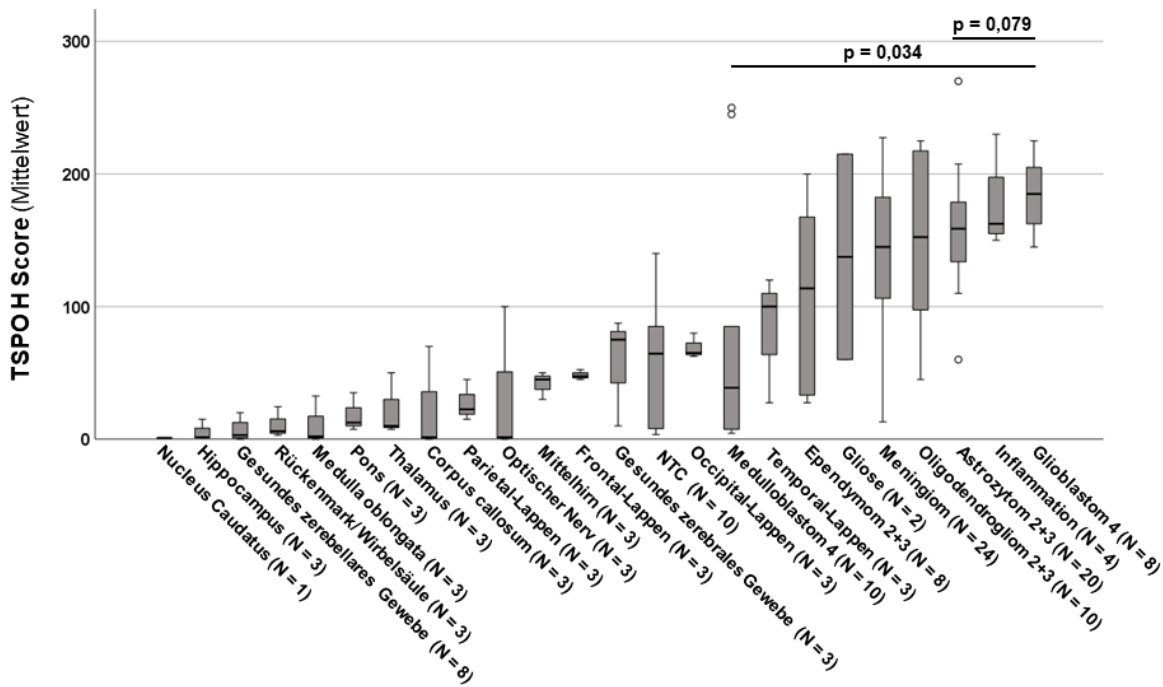


Abbildung 26: Heterogene TSPO Expression in simultan gefärbten, gesunden Hirnregionen und pathologischen Entitäten der TMAs CNS2081 und BNC17011c.

Mittlere TSPO H Score-Verteilung der TMAs CNS2081 und BNC17011c zusammen dargestellt. Glioblastom-Patienten (N = 8) wiesen im Mittel die höchsten TSPO H Scores auf. Gewebe mit ausgeprägter Inflammation (N = 4) hatten ebenfalls eine sehr hohe TSPO Expression. Astrozytome mit niedrigerem WHO-Grad (N = 20) sowie WHO-Grade 2+3 Oligodendrogliome (N = 10) zeigten zueinander sehr ähnliche TSPO H Scores, welche im Durchschnitt etwas unter denen von Inflammationen lagen. Eine geringe TSPO Expression wurde bei gesunden zerebralen Gewebe (N = 3) und gesunden zerebellaren Gewebe (N = 8) festgestellt. WHO-Grad 2+3 Meningeome (N = 24) sowie Ependymome (N = 8) ordneten sich dicht hinter den Gliosen (N = 2) ein. Unerwartet zeigten die WHO-Grad 4 Medulloblastome (N = 10), eine pädiatrische Tumorentität, hier mehrheitlich TSPO H Scores im Bereich der non-neoplastischen/gesunden Hirnregionen. Ein statistischer Vergleich der TSPO H Score Mittelwerte von WHO-Grad 2+3 Astrozytomen mit denen der WHO-Grad 4 Glioblastome zeigte einen ansteigenden Trend (Mann Whitney U Test, $p = 0,079$). Dies deutete darauf hin, dass die TSPO Proteinexpression mit WHO-Grad ansteigen könnte. Im Gegensatz zu WHO-Grad 4 Glioblastomen wurde für WHO-Grad 4 Medulloblastome signifikant niedrigere TSPO H Scores gefunden (Mann Whitney U, $p = 0,034$). Somit könnte sich die Schlussfolgerung, dass ein TSPO Überexpression in einem Tumoreal eine erhöhte Malignität anzeigt, zwischen Tumorentitäten unterscheiden und somit auch regionale Unterschiede bzgl. der TSPO Funktion angedeutet werden. Darüber hinaus zeigten zwei Medulloblastom-Patienten im Gegensatz zur Medulloblastomgruppenmehrheit eine sehr hohe TSPO Expression (vgl. G9-G11 in Abbildung 25). Angesichts dieses Ergebnisses wäre es möglich, dass variable TSPO Expression innerhalb von Tumorentitäten auch auf spezifische Unterschiede bzgl. der TSPO Funktion hindeutet.

Darüber hinaus zeigten einige nicht-neoplastische Hirnregionen TSPO Intensitäten/Expression im Streuungsbereich der pathologischen Entitäten.

Ergebnisse

Insbesondere die Temporallappenregion zeigte Werte (27,5 bis 120,0) im Bereich der Ependymome und übertraf sogar im Mittel die der Medulloblastome (Gruppen-Mittelwert; Temporallappen: $82,5 \pm 48,7$, Medulloblastome: $75,1 \pm 94,4$). Hingegen zeigten Hippocampusareale mit die niedrigsten Werte (1,0 bis 15,0). Die Scores der weiteren nicht-neoplastischen Hirnregionen sind mit variierender Wertestreuung zwischen diesen beiden gesunden Hirnregionen vorzufinden.

Dies könnte *summa summarum* auf variable TSPO Funktionen, abhängig von der vorliegenden Tumorentität sowie der jeweiligen Hirnregion, hindeuten.

5 Diskussion

TSPO wird in Gliomen häufig überexprimiert (Ammer et al., 2020; Bhoola et al., 2018; Cai et al., 2020; Vlodaysky & Soustiel, 2007; Zinnhardt et al., 2020) und es wurde dabei ein möglicher Zusammenhang zwischen TSPO Anreicherung und hoher Malignität vermutet. TSPO wird intensiv als Target in der Bildgebung für die Prognose (Cai et al., 2020; Quach et al., 2023), während der Therapie (Foray et al., 2021; Menevse et al., 2023; Quach et al., 2022; Rupprecht, Pradhan, et al., 2022; Rupprecht, Wetzell, et al., 2022) und bei ZNS Pathologien mit neuroinflammatorischer Komponente diskutiert (Badiuk et al., 2022; C. Cerami et al., 2017; Guilarte, 2019; Zinnhardt et al., 2017).

Dennoch sind systematische Ansätze zur Verknüpfung der TSPO Bildgebung mit ihren histopathologischen Korrelaten, die den Informationsgehalt von TSPO als Marker erhöhen würden, in ihrer Menge und Fallanzahl für Gliome, insbesondere IDH-wt GBMs, weitestgehend limitiert (Cai et al., 2020; Su et al., 2015; Zinnhardt et al., 2020). Des Weiteren ist immer noch unklar, wie die TSPO Expression in Gliomen reguliert wird und allgemein wenig darüber bekannt, wie die TSPO Expression in anderen ZNS Neoplasien aussieht (Bhoola et al., 2018).

Um diese offenen Fragen zu klären, wurden große *in silico* Datensätze und gemeinschaftlich erhobene, klinisch präzise annotierte Patientenkollektive verwendet, von denen passende TSPO-PET Bildgebungsdaten und Gewebeproben für histologische und molekulare Analysen vorlagen, sowie ein Färbeansatz mit kommerziellen TMAs verwendet.

Bezüglich der Regulierung von TSPO zeigten *in silico* Analysen und Analysen an einem kryo-konservierten Gewebekollektiv, dass eine Hypermethylierung eines *TSPO* Promotor-Teilbereichs eine Rolle bei der Verringerung der *TSPO* Expression in IDH-mut Astrozytomen spielen könnte. Dieser Befund einer epigenetischen Regulierung von TSPO steht im Einklang mit Ergebnissen, die für die humane Jurkat T-Zell-Leukämie-Zelllinie berichtet wurden. Dort konnte mittels 5-Aza-2'-Desoxycytidin über eine Demethylierung ein dosisabhängiger zellulärer Anstieg der *TSPO* mRNA Expression verursacht werden (Middleton et al., 2017).

Es ist darüber hinaus bekannt, dass IDH-mut Gliome häufig einen genomweiten Hypermethylierungsphänotyp aufweisen (Bledea et al., 2019; Unruh et al., 2019), sodass die beobachtete *TSPO* Hypermethylierung eine Folge davon sein könnte. Des Weiteren war zu sehen, dass der hypermethylierte *TSPO* Promotor-Teilbereich eine Reihe von potentiellen TF-

Diskussion

Bindungsstellen enthält, die über Methylierung möglicherweise blockiert werden. Dadurch betroffene TFs wären ETS1 und ETS2. Für diese TFs wurden bereits eine transkriptionelle Regulierung von *TSPO* in anderen Pathologien (Batarseh et al., 2010) sowie eine Bindungshemmung durch DNA-Methylierung, mit aufgelistet in (Héberlé & Bardet, 2019), beschrieben.

Bemerkenswert war, dass der *TSPO* Promotor-Teilbereich in nicht-neoplastischem Hirngewebe unmethyliert vorlag. Bei der hier berichteten Hypermethylierung handelt es sich also eher um eine *de novo* Methylierung, die auf IDH-mut Astrozytome beschränkt zu sein scheint, da IDH-wt GBMs ebenso wie die nicht-neoplastischen Kontrollen in dem Teilbereich unmethyliert waren. Somit kann die pathologische allgemeine *TSPO* Überexpression in Gliomen nicht durch einen Verlust der Promotor-Methylierung erklärt werden. Durch hier nicht gezeigte *in silico* Analysen zu *TSPO* Genamplifikationen und *TSPO* Mutationen mit Funktionsgewinn konnten diese beiden Möglichkeiten als Ursache der *TSPO* Überexpression für Gliome ebenfalls ausgeschlossen werden.

Vor diesem Hintergrund würde somit eher die Bindung von dysregulierten TFs an einen unmethylierten *TSPO* Promotor höchstwahrscheinlich die pathologische *TSPO* Überexpression in IDH-Wildtyp Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erklären können. Dafür spräche, dass sich in MA-10 Leydig-Zellen zeigen ließ, dass PKC ϵ die *TSPO* Genexpression durch MAPK (Raf-1-MEK1/2-ERK1/2)-vermittelte Transkriptionsaktivierung reguliert (Batarseh et al., 2010), ein Signalweg, welcher unter anderem beim GBM häufig dysreguliert vorliegt (Khabibov et al., 2022; Ou et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *TSPO* Transkriptionsregulation in Gliomen ein komplexes Zusammenspiel zwischen Veränderungen der *TSPO* Promotor-Methylierung und damit einhergehenden Auswirkungen auf die TF-Bindung beinhalten könnte. Dies stellt jedoch nicht den alleinigen regulatorischen Mechanismus dar.

Die aktuelle Literatur zu *TSPO* als Bildgebungsmarker (Übersicht in (Li et al., 2022) sowie (Filippi et al., 2023; Yan et al., 2023)) unterstreicht eindeutig die Notwendigkeit von histopathologischen Bewertungen von *TSPO*-PET Bildgebungskorrelaten. Der in dieser Doktorarbeit dafür herangezogene, hochaffine *TSPO* Ligand [^{18}F]GE180 wurde erstmals von Albert et al. für die *TSPO*-PET Bildgebung von unbehandeltem und vorbehandeltem GBMs verwendet und zeigte eine bemerkenswert hohe Tumor-to-Background-Ratio (TBR) sowie *TSPO*-PET Signale selbst in Bereichen ohne nachweisbare Kontrastmittelanreicherung im

Diskussion

MRT (Albert et al., 2017). Diese Studie wurde von Unterrainer et al. um weitere Fälle mit IDH-wt/-mut Gliomen erweitert (Unterrainer et al., 2020).

In (Quach et al., 2023) wurden weitere diffuse Gliome unter anderem Analyseschwerpunkt in Zusammenhang mit ihren [¹⁸F]GE180 Anreicherungen im TSPO-PET beschrieben. Dabei wurden 88 konsekutive Patienten (IDH-mut: N = 46, IDH-wt: N = 42) bzgl. ihrer Überlebenszeit nach Auftreten eines Rezidivs bzw. der Zeit bis zum Therapieversagen untersucht. In beiden Gruppen zeigten Patienten mit einer niedrigen Anreicherung im TSPO-PET (SUVmax) längere Überlebenszeiten sowie einen längeren Therapieerfolgzeitraum.

Diese Doktorarbeit stellt für dieses Kollektiv eine erweiterende bzw. ergänzende histopathologische Bewertung von GBM-Patienten vor, die sich dem [¹⁸F]GE180 TSPO-PET Bildgebungsprotokoll unterzogen haben.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass das mittels [¹⁸F]GE180 ermittelte TSPO-PET Signal mit der TSPO Expression, die durch IHC mit einem sorgfältig validierten Antikörper nachgewiesen wurde, korreliert. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass das TSPO Signal im soliden Tumorbereich von IDH-wt GBMs von mehreren zellulären Quellen, darunter Tumorzellen, reaktive Astrozyten, Mikroglia/Makrophagen und Endothelzellen, stammt. Die Bewertung der regionalen Heterogenität von TSPO ergab, dass solide, tumorzellreiche Bereiche hier den größten Beitrag zum TSPO Gesamtsignal im analysierten Kollektiv leisteten. Tumorrandbereiche zeigten hingegen eine etwas geringere TSPO Anreicherung/Expression. Auffällig war, dass in den Tumorrandarealen das TSPO Signal hauptsächlich von CD68-positiven Mikroglia/Makrophagen verursacht zu werden scheint.

Derzeit gibt es zwei ähnlich strukturierte Humanstudien, in welchen die TSPO-PET Bildgebung und histopathologische Merkmale in ihrer Korrelation untersucht wurden (Su et al., 2015; Zinnhardt et al., 2020). In der Studie von (Zinnhardt et al., 2020) wurde jedoch der Tracer [¹⁸F]DPA-714 verwendet, wohingegen bei (Su et al., 2015) ¹¹C-(R)PK11195 zum Einsatz kam.

Des Weiteren war in (Zinnhardt et al., 2020) ein anderes Tumorspektrum (geringere Gesamtzahl: 9 vs. 26 Patienten in dieser Doktorarbeit, Schwerpunkt auf IDH-mutierten Gliomen) und in (Su et al., 2015) ein gemischtes Gliomkollektiv (N = 22) untersucht worden. Somit ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse möglicherweise nicht in ihrer Gänze vergleichbar sind.

Diskussion

Zinnhardt et al. fanden hierbei einen engen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von [¹⁸F]DPA-714 und der Aktivierung von Gliom-assoziierten myeloiden Zellen. Die TSPO Expression war hauptsächlich auf tumorinfiltrierende HLA-DR⁺ MDSCs und TAMs beschränkt. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in der Tumorinfiltrationszone in dieser Doktorarbeit überein. Hier wurde jedoch zusätzlich ein relevantes Maß an intratumoraler Heterogenität mit höherer TSPO Expression im soliden Tumorzentrum, welches wiederum durch den höchsten relativen Tumorzellgehalt gekennzeichnet ist, beobachtet. Es scheint in der Tat wahrscheinlich, dass in der analysierten Patientenkohorte ein stärkerer Beitrag von Tumorzellen zum gesamten TSPO Signal besteht, da IDH-wt GBMs (wie zuvor aufgeführt) insgesamt höhere *TSPO* Expressionswerte als IDH-mut Gliome aufwiesen, letztere wurden mehrheitlich in der Zinnhardt-Studie untersucht (Zinnhardt et al., 2020).

Somit würden das tumorgetriebene TSPO Signal in der in dieser Doktorarbeit untersuchten TSPO-PET Bildgebungskohorte eher zu den Ergebnissen von (Su et al., 2013, 2015) passen, da ¹¹C-(R)PK11195 Anreicherungen in dortigen Gliom TSPO-PET Scans vorwiegend die TSPO Expression in Tumorzellen widerzuspiegeln schienen.

Beobachtungen, dass unterschiedliche Zellpopulationen zum TSPO Signal beitragen, werden darüber hinaus durch Untersuchungen an humanen oder GBM-Implantationsmausmodellen bestätigt (Cai et al., 2020). Dort wurde, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, eine TSPO Expression in Tumorzellen, Mikroglia, tumorassoziierten Makrophagen und Endothelzellen beobachtet. Des Weiteren schlugen die Autoren eine Kombination aus TSPO-PET und FET-PET als vielversprechende Methode zur Visualisierung tumorassoziiertes myeloider Zellen vor.

Interessanterweise wurde in einer anderen Studie an GBM-Mausmodellen ein Anstieg der Traceraufnahme für [¹⁸F]DPA-714 während Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) beschrieben (Foray et al., 2021). Das für diese Doktorarbeit analysierte Kollektiv umfasste nur eine begrenzte Anzahl an GBM-Rezidiven (N = 8), aber es ließ sich auch bei diesen Tumoren eine höhere TSPO Expression im Vergleich zu primären, therapienaiven GBMs feststellen. Analysen von GBMs mit Fokus auf Bildgebung mittels [¹⁸F]GE180 hatten parallel zu dieser Arbeit eine erhöhte Tracer Anreicherung im TSPO-PET in Rezidivtumoren zeigen können (Quach et al., 2023). Es ist in der Tat sehr wahrscheinlich, dass sich die zelluläre Zusammensetzung unter Therapie verändert (Abnahme der Tumorzellen, Zunahme von

Diskussion

reaktiven und myeloiden Zellen) und dadurch auch die lokalen Eigenschaften, welche mittels *TSPO* Expressionsänderungen markiert werden.

Daher wird diese Humanstudie in der Folge auf eine Longitudinalstudie ausgedehnt werden, um die Anzahl der Analysepaare (Primär- und Rezidivtumore) zu erhöhen und somit Veränderungen in der *TSPO* Anreicherung/Expression im Verlauf der Erkrankung untersuchen zu können.

Die molekulare Charakterisierung in dem aktuellen Studienkollektiv brachte noch weitere wichtige Erkenntnisse im Rahmen dieser Doktorarbeit hervor. Mittels RNA NGS konnte eine hohe *TSPO* Expression als Biomarker in Zusammenhang mit folgenden drei Funktionsclustern gebracht werden: onkogene Signaturen/maligne Signalwege, Interaktion mit dem Immunsystem und extrazelluläre Matrixorganisation.

Es ließ sich darüber hinaus herausfinden, dass eine hohe *TSPO* Expression auf den mesenchymalen Expressionssubtyp und MES-ähnliche Zellsubpopulationen hinweist, die bereits mit einer schlechteren Prognose (Bhat et al., 2013; Hoogstrate et al., 2023) und einer ausgeprägten Interaktion der Tumorzellen mit dem Immunsystem (Hara et al., 2021) assoziiert sind. In Übereinstimmung mit weiteren Erkenntnissen, welche in (Ammer et al., 2020) anschaulich zusammengefasst wurden, sind verschiedene Signalwege, die mit Entzündungen zusammenhängen, in Tumoren mit hoher *TSPO* Expression hochreguliert. *TSPO* kann entweder an einem antitumoralen/proinflammatorischen Setting mit Mikroglia/Makrophagen vom Typ M1 oder an einer pro-tumoralen/anti-inflammatorischen Setting mit Mikroglia/Makrophagen vom Typ M2 beteiligt sein (S.-Y. Wu & Watabe, 2017). Molekulare Ergebnisse dieser Doktorarbeit deuten ebenfalls auf eine komplexe Rolle von *TSPO* bei der tumorassoziierten Entzündung hin. In GBMs mit hoher *TSPO* Expression ist einerseits eine Anreicherung von *IFN/TNF*-Signalen, die typisch für Mikroglia/Makrophagen vom Typ M1 sind, zu beobachten. Andererseits lässt sich eine Überrepräsentation von *IL-10/-4/-13*-Signalgenen, die die Mikroglia-/Makrophagen vom Typ M2 reaktivieren, feststellen. Interessanterweise sind M2-Makrophagen signifikant mit dem mesenchymalen Phänotyp assoziiert (Wang et al., 2017), dem GBM-Phänotyp, für den in dieser Doktorarbeit die höchste *TSPO* Expression festzustellen war.

Durch eine *in silico* Analyse von GBM-Patientenproben aus der TCGA-Datenbank haben Cai et al. erstmals beschrieben, dass *TSPO* in dem prognostisch ungünstigen mesenchymalen

Diskussion

GBM-Expressionssubtyp hoch exprimiert wird (Cai et al., 2020). Dieser Befund konnte nun mittels der hier analysierten TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte bestätigt werden.

Darüber hinaus ließ sich die hohe *TSPO* Expression mit den kürzlich beschriebenen MES-ähnlichen Zellzuständen (Neftel et al., 2019) und deren via Makrophagen induziertes Transkriptommuster (Hara et al., 2021) zuzüglich hoher CD68-positiver TAM-Anzahlen in Verbindung bringen. Tatsächlich weisen mesenchymale GBMs von allen GBM-Expressionssubtypen den höchsten Prozentsatz an Mikroglia-, Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration auf (Martinez-Lage et al., 2019).

Interessanterweise könnte *TSPO* als Marker für MES-ähnliche zelluläre Zellsubpopulationen von therapeutischem Interesse sein. Angesichts ihrer starken Interaktion mit Immunzellen sind MES-ähnliche Zellen potenzielle neue Ziele für die Hemmung von Immun-Checkpoints (Menevse et al., 2023; White et al., 2023). Darüber hinaus könnte sich *TSPO* als Biomarker für eine auf TAM abzielende Immuntherapie eignen (Chen et al., 2021). Dass *TSPO* eventuell auch direkt als Therapietarget in ZNS Neoplasien, wie bereits in anderen ZNS Pathologien gezeigt (Rupprecht, Pradhan, et al., 2022; Rupprecht, Wetzel, et al., 2022), herangezogen werden könnte, deutet sich an (Menevse et al., 2023), muss aber noch weiter untersucht werden.

Schließlich konnte in dieser Doktorarbeit durch TMAs aufgezeigt werden, dass die *TSPO* Überexpression in ihrer Intensität zwischen verschiedenen neoplastischen Hirnpathologien tendenziell variiert und Expressionsunterschiede in gesunden Hirngeweben zu beobachten sind. Ein ähnlicher TMA Ansatz mit *TSPO*-IHC wurde von Arif et al. unter einem anderen Analyseschwerpunkt durchgeführt (Arif et al., 2019). Dort wurde analysiert, inwieweit sich die mitochondriale VDAC1 Depletion auf den Metabolismus von Krebszellen auswirkt. Während dieses Prozesses wurde anhand von quantitativen IHC-Analysen in dem kommerziellen TMA MC5003 (gesunde vs neoplastische humane Proben) gezeigt, dass die *TSPO* Konzentration in GBM-Gehirngewebe im Vergleich mit dem gesunden Gehirn um das 10-fache erhöht war. Eine pathologische *TSPO* Überexpression konnte mit der *TSPO*-IHC von TMA CNS2081 und BNC17011c in dieser Doktorarbeit bestätigt werden. Jedoch zeigten sich innerhalb der gesunden Hirnregionen ebenfalls Expressionsunterschiede hinsichtlich *TSPO*.

Holzgreve et al. konnte in einem murinen Modell zeigen, dass die *TSPO* Expression im Kleinhirn, im Hippocampus/Temporallappen und in ependymalen Abschnitten zusätzlich zum

Diskussion

wachsenden Tumor, der durch inokulierte murine GL261 Zellen induziert wurde, am ausgeprägtesten war (Holzgreve et al., 2022). Dies ließ sich in dieser Doktorarbeit im humanen Setting für Kleinhirn- und Hippocampusproben nicht bestätigen. Im Temporallappen zeigten sich jedoch im Mittel tendenziell die höchste TSPO Expression im Vergleich mit anderen gesunden Hirnregionen. Im Temporallappen lokalisierte neurale Strukturen werden in der Regel mit der Verarbeitung von Emotionen und der Kodierung von Erinnerungen in Verbindung gebracht (Meisner et al., 2022; Robertson, 2002; Rolls, 2015) und es wird diskutiert inwieweit der mitochondriale Metabolismus, in welchen TSPO involviert sein könnte (Fu et al., 2019; G.-J. Liu et al., 2017; Milenkovic et al., 2019), sich auf das Erinnerungsvermögen (Biechele et al., 2021; Jung, 2020; Ye et al., 2020) und Emotionen (Rupprecht, Wetzel, et al., 2022) auswirkt. TSPO wurde bereits mit Stress, Angst und Furcht in Verbindung gebracht (Barron et al., 2021; Nothdurfter et al., 2012; Rupprecht, Wetzel, et al., 2022), wohingegen über TSPO im Zusammenhang mit ZNS Neoplasien jenseits von Astrozytomen/Oligodendrogliomen/Glioblastomen relativ wenig bekannt ist (Bhoola et al., 2018; Cai et al., 2020; Zinnhardt et al., 2020).

Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit das neoplastische Spektrum für TSPO-IHC mittels der erwähnten TMAs erweitert. Hierbei präsentierte sich die Gruppe der hochmalignen pädiatrischen Medulloblastome aufgrund einer markant heterogenen Expression am auffälligsten. Dort zeigten die Tumore mehrheitlich eine niedrige TSPO Expression (ähnlich zum zerebellaren Ursprungsgewebe (Raffel 2004)), jedoch wiesen zwei Patienten sehr hohe TSPO Expressionswerte auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass hier eventuell Tumorsubtypen mit verschiedenartiger molekularer Ausstattung und Signalwegaktivierung eine Rolle zu spielen scheinen. Es werden dadurch variable Funktionen für TSPO, abhängig von der vorliegenden Tumorentität sowie Hirnregion, impliziert. Expressionsvariationen wurden darüber hinaus auch bei Meningiomen/Ependymomen beobachtet. Ob diese Variationen auf unterschiedliche Subtypen zurückzuführen sind, muss neben der Möglichkeit äußerer Einflüsse in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich schließlich sagen, dass die Erkenntnisse dieser Doktorarbeit das Verständnis von TSPO als Bildgebungsmarker in Gliomen verbessert haben. Es konnte ein potentieller Mechanismus für die *TSPO* Inaktivierung in IDH-mut Astrozytomen beschrieben werden. Die histologische und molekulare Auswertung von 26 GBM-Patienten, die sich einem definierten TSPO-PET Bildgebungsverfahren unterzogen, lieferte neue Erkenntnisse über die intratumorale Heterogenität des TSPO Signals. Während in den tumorzellreichen

Diskussion

soliden Regionen aus dem Tumorzentrum hohe Signalintensitäten zu beobachten waren, wurden geringere TSPO Signale im Tumorrandbereich hauptsächlich von CD68-positiver/n Mikrogli/Makrophagen verursacht. Schließlich konnte die *TSPO* Expression als Indikator für Vorhandensein einer prognostisch ungünstigen mesenchymalen GBM-Zell-Subpopulation, die durch einen höheren Anteil an TAMs und eine ausgeprägte Immunsystem-Signalgebung gekennzeichnet ist, identifiziert werden. Dass diese Aspekte nicht eins zu eins auf andere zerebrale/zerebellare Neoplasien übertragbar sind, deuteten TSPO-IHC in TMAs an. Hieraus eröffnen sich Fragestellungen für wissenschaftliche Folgeprojekte.

Darüber hinaus werden zukünftige longitudinale Studienansätze klären müssen, inwieweit die hier gefunden Erkenntnisse im Rezidiv-Setting in GBM-Patienten erhalten bleiben oder sich unter Therapie verändern. Bereits jetzt lässt sich jedoch feststellen, dass durch die gewonnenen Erkenntnisse die Aussagekraft von TSPO als Tracer-Target in Kombination mit dem FET-PET/MRT Goldstandard weiter geschärft werden konnte, wodurch in Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Benefit für die klinische non-invasive Diagnostik sowie zielgerichtete Therapieplanung erzielt werden kann.

6 Zusammenfassung

TSPO ist ein vielversprechendes neues Tracer-Target für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Bildgebung von Hirntumoren. Es birgt das Potenzial, die non-invasive Informationsgewinnung für gliale Neoplasien des zentralen Nervensystems (ZNS) weiter zu schärfen und somit eine zielgerichtete Therapieplanung zu ermöglichen. Aufgrund der Heterogenität der Zellpopulationen, die zum TSPO-PET Signal beitragen, kann die Interpretation der Bildgebung jedoch schwierig sein. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher die TSPO Anreicherung/Expression in Verbindung mit zugrundeliegenden histopathologischen und molekularen Merkmalen in Gliomen, insbesondere Glioblastomen, analysiert und darüber hinaus die TSPO Expression in weiteren ZNS Neoplasien wie Meningiomen, Ependymomen und Medulloblastomen untersucht.

Es wurden hierfür die *TSPO* Expression und potentielle Regulationsmechanismen in großen *in silico* Datensätzen und durch direkte Bisulfit-Sequenzierung im *TSPO* Promotorareal untersucht. In Glioblastomen (GBMs) unserer TSPO-PET Bildgebungsstudie konnte durch Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-Multiplex-Färbungen (Multiplex OPAL IF) analysiert werden, inwieweit [¹⁸F]GE180 Anreicherungen (SUVmax) und TSPO Proteinexpression (%Fläche/H Score) in verschiedenen Tumorealen miteinander assoziiert sind und welche Zellpopulationen (%positive Zellen) am kumulativen TSPO Signal beteiligt waren. Darüber hinaus wurde untersucht, welche transkriptionellen Muster in den Tumorzellen mit einer *TSPO* Überexpression assoziiert sind. Mittels Tissue-Microarrays (TMAs) wurde außerdem die TSPO Expression in weiteren ZNS Pathologien und verschiedenen Hirnarealen analysiert.

Ich konnte in meiner Doktorarbeit zeigen, dass die *TSPO* Expression mit prognostisch ungünstigen GBM-Phänotypen assoziiert ist und dass die Methylierung der *TSPO* CpG-Insel mit der *IDH*-Mutation in Astrozytomen in Verbindung steht. Eine genaue histologische Analyse ergab, dass die TSPO-IHC mit dem TSPO-PET Signal in Glioblastomen korreliert und dass TSPO dort von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert wird. Während im soliden Tumorzentrum die Tumorzellen den wesentlichen Beitrag zum Gesamtsignal leisten, werden die TSPO Signale im Tumorsaum hauptsächlich von CD68-positiver/n Mikroglia/Makrophagen verursacht. Auf molekularer Ebene markiert eine hohe *TSPO* Expression prognostisch ungünstige GBM-Zellsubpopulationen, die durch eine Anreicherung mesenchymaler Zellen und höhere Mengen an CD68-positiven tumorassoziierten

Zusammenfassung

Makrophagen (TAMs) gekennzeichnet sind. Andere Tumortypen, wie z.B. Medulloblastome, zeigen eine auffällige Heterogenität bzgl. der TSPO Expression, die Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein kann.

Zusammenfassend verbessert diese wissenschaftliche Arbeit das Verständnis von TSPO als Bildgebungsmarker in Gliomen, indem sie IDH-abhängige Unterschiede in der *TSPO* Expression/Regulation, die regionale Heterogenität des TSPO-PET Signals und die Assoziationen von TSPO als Biomarker in Bezug auf die Interaktionen zwischen Tumor und Immunzellen weiter herausarbeitet. Perspektivisch konnte außerdem aufgezeigt werden, dass TSPO auch in weiteren Hirnpathologien als Biomarker eine Rolle spielen könnte.

7 Anhang

7.1 Bioinformatische Skripte (R und shell)

7.1.1 *In silico* Analysen

In den nachfolgenden Unterkapiteln sind Skripte in R für die Daten-Extraktion aus im Materialteil (Kapitel 2.8) aufgelisteten *in silico* Datensätzen aufgeführt, welche mittels Notepad++ erstellt bzw. dokumentiert wurden (Don HO - Author/Maintainer of Notepad++, 2019). Code-Abschnitte (##) und -Teilabschnitte (#) wurden durch die aufgeführte Auskommentierung und zusätzlich durch Unterstreichung hervorgehoben. Zur Platzersparnis wurde statt 1,5-fachen ein einfacher Zeilenabstand und Schriftgröße 11 für die Skriptdokumentation gewählt.

7.1.1.1 Extraktion der *in silico* TSPO HTSeq Count Daten

##Laden der R Pakete

```
library(data.table)
library(R.utils)
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/001-Verhaak2016_Cell")
```

##Funktion für Daten-Filterung erstellen

```
`%nin%` = Negate(`%in%`)
```

##Einlesen von Referenzen, Samplesheets und klinischer Daten

```
gencode_ref <-
fread("gencode.gene.info.v22.tsv",header=TRUE,stringsAsFactors=FALSE,sep="\t")
Samplesheet_ref <- fread("gdc_sample_sheet.2021-02-
28.tsv",header=TRUE,stringsAsFactors=FALSE,sep="\t")
Clinical_Verhaak <- read.delim("Verhaak_2016_Cell_CaseIDs_1-s2.0-S009286741501692X-
mmc2_sheet1.txt",skip=1,header=TRUE,stringsAsFactors=FALSE,sep="\t",dec=",")
```

##Herausfilterung der Fälle mit unklarer Annotation

```
#Erstellen des Ordernamen-Vektor
```

```
Foldernames_vector <- list.files("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/001-
Verhaak2016_Cell/gdc_download_20210228_184517.703847.tar")
```

```
#Kontrolle der Vektorlänge
```

```
summary(Foldernames_vector)
# Length Class Mode
# 689 character character
#Download entsprach 687 Files. Somit müssen Manifest Datei
#und tar-Verzeichnis aus Ordernamen-Vektor entfernt werden.
```

Anhang

```
#Entfernen von Manifest Datei und tar Verzeichnis aus Vektor
  Foldernames_vector2 <- Foldernames_vector[-c(688,689)]

#Einbetten des Vektors in einen Dateipfad-Vektor
  Path_vector <- file.path("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/001-
  Verhaak2016_Cell/gdc_download_20210228_184517.703847.tar",c(Foldernames_vector2))

#Kontrolle des Dateipfad-Vektors
  list.files(Path_vector)

#for-Schleife für Herausfilterung der Fälle
  corrected_allMethylationFolderNames <- rep(NA,2)

  for(i in 1:length(Foldernames_vector2)){
    File_name <- Foldernames_vector2[i]
    File_list <- list.files(Path_vector[i])
    if("annotations.txt" %nin% File_list){
      test_tables <- File_name
    }
    corrected_allMethylationFolderNames <- c(corrected_allMethylationFolderNames,test_tables)
  }

#Obligatorische Modifizierung des gefilterten Ordernamen-Vektors
  corrected_allMethylationFolderNames <- corrected_allMethylationFolderNames[-(1:2)]
  corrected_allMethylationFolderNames2 <- unique(corrected_allMethylationFolderNames)

#Einbetten des gefilterten Vektors in einen Dateipfad-Vektor
  allMethylationFilesPaths2 <- file.path("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/001-
  Verhaak2016_Cell/gdc_download_20210228_184517.703847.tar",c(corrected_allMethylation
  FolderNames2))
  #650 Ordernamen blieben übrig

##Herausfilterung der TSPO Counts aus den komprimierten Ordnern
#for-Schleife für Herausfilterung der TSPO Counts aus den Ordnern
  count_summary <- seqdata[,1]
  #erst nach einem Schleifen-Durchlauf mit i=1 befüllbar

  for(i in 1:length(allMethylationFilesPaths2)){
    #Für decompressFile Funktion Benennung Input und Output Objekt
    File_Ort <- paste(allMethylationFilesPaths2[i],list.files(allMethylationFilesPaths2[i]),sep="/")
    Output <- paste(corrected_allMethylationFolderNames2[i],"counts",sep=".")
    Output_Path <- paste("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/001-
    Verhaak2016_Cell/gdc_download_20210228_184517.703847.tar",Output,sep="/")
    #decompressFile funktioniert nur, solange nicht bereits ein dekomprimiertes Output File
    existiert bzw. erstellt wurde
    seqdata <-
    fread(decompressFile(filename=File_Ort,destname=Output_Path,remove=FALSE,ext="gz",F
    UN=gzfile), header=FALSE,stringsAsFactors = FALSE, sep="\t")
    colnames(seqdata) <- c("gene_id",corrected_allMethylationFolderNames2[i])
    #Zuordnung nun via Ordnerbezeichnung möglich
    seqdata <- seqdata[-(60484:60488)]
    count_summary <- merge(count_summary,seqdata,by="gene_id")
    #Marker für Progress
    print(paste(i,"done",sep="_"))
  }
```

Anhang

##File IDs in colnames durch Case IDs ersetzen

Reihenfolge passt, da Samplesheet_ref_short nur 2 Spalten aufweist und sich somit anpasst !!!

Dennoch immer die erstellten R Objekte diesbezüglich überprüfen!!!

```
colnames_count_summary <- as.data.frame(colnames(count_summary))
colnames(colnames_count_summary) <- "File ID"
Samplesheet_ref_short <- Samplesheet_ref[,c("File ID","Case ID")]
merge_patientID <- merge(colnames_count_summary,Samplesheet_ref_short,by.y="File ID",all.x=TRUE)
merge_patientID <- merge_patientID[-651,]
colnames(count_summary) [2:length(count_summary)] <- merge_patientID$"Case ID"
```

##Einfügen der Genlänge und Genename in die Count Tabelle

```
gencode_ref_short <-
data.frame(gencode_ref$gene_id,gencode_ref$gene_name,gencode_ref$exon_length)
table1 <-
merge(gencode_ref_short,count_summary,by.x="gencode_ref.gene_id",by.y="gene_id",y.all=TRUE)
```

#Kontrolle des finale Schritts der Daten-Extraktion

```
table1[1:10,1:10]
dim(table1)
```

Anhang

7.1.1.2 Berechnung der *in silico* TSPO Genexpressionswerte (RPKMs und TPMs)

##RPKM-Berechnung

##Eingrenzen der extrahierten Tabelle auf Count Daten

```
counts <-table1[,4:length(table1)]
```

##Zuweisung der Genbezeichnung als Zeilenbezeichnung

```
rownames(counts)<-paste(table1[,1],table1[,2],sep="_") #in which column are the names
```

##Tabelle mit Count-Summe je Probenspalte erzeugen

#Summenfunktion

```
summedcounts<-apply(counts,2,sum)
```

#Tabelle mit summedcounts erzeugen

```
summedcounts2<-matrix(summedcounts, nrow=60483, ncol=650, byrow=TRUE)
```

```
#how many rows and columns with count data are in the file
```

##Tabelle mit Genlängen je Gen erzeugen

```
length<-rep(table1[,3],650)
```

```
length2<-matrix(length, nrow=60483, ncol=650)
```

##RPKM Formel

#Berechnung

```
myrpkm2<-((table1[,4:653])*10^9/length2/summedcounts2
```

#Kontrolle

```
head(myrpkm2)
```

#Hinzufügen der Geninformationen

```
gene_id <- table1 [,1]
```

```
gene_name <- table1 [,2]
```

```
exon_length <- table1 [,3]
```

```
myrpkm3 <- data.frame(gene_id,gene_name,exon_length,myrpkm2)
```

#Ersetzen der Punkte in Fall IDs durch Bindestriche

```
colnames(myrpkm3) [4:653] <- colnames(table1) [4:653]
```

##Annotation klinischer Daten

```
order_patientID <- as.data.frame(colnames(myrpkm3) [4:653])
```

```
colnames(order_patientID) <- "Case"
```

```
Clinical_Verhaak_short <-
```

```
Clinical_Verhaak[,c("Case","Study","Histology","Grade","Survival..months.,""Vital.status..1.  
dead.,""IDH.status",""TERT.promoter.status",""X1p.19q.codeletion")]
```

```
merge_clinical <- Clinical_Verhaak_short[match(colnames(myrpkm3)  
[4:653],Clinical_Verhaak_short$Case),]
```

```
merge_clinical_all <- Clinical_Verhaak[match(colnames(myrpkm3)  
[4:653],Clinical_Verhaak$Case),]
```

```
transpose_myrpkm3 <- t(myrpkm3[,4:length(myrpkm3)])
```

```
colnames(transpose_myrpkm3) <- myrpkm3$gene_name
```

```
transpose_myrpkm3 <- as.data.frame(transpose_myrpkm3)
```

```
transpose_myrpkm3$Patient_ID <- rownames(transpose_myrpkm3)
```

Anhang

```
final_merge <-
merge(merge_clinical,transpose_myrpkm3,by.x="Case",by.y="Patient_ID",all.x=TRUE)
final_merge_all <-
merge(merge_clinical_all,transpose_myrpkm3,by.x="Case",by.y="Patient_ID",all.x=TRUE)

write.table(final_merge, file = "Verhaak_2016_Cell_All_RPKM_combined.txt", sep = "\t",
dec=".", row.names = FALSE,col.names=TRUE)
write.table(final_merge_all, file = "Verhaak_2016_Cell_All_RPKM_combined_280721.txt",
sep = "\t", dec=".", row.names = FALSE,col.names=TRUE)

##Eingrenzen der kleinen Tabellengröße auf ausgewählte Entitäten und TSPO
gbm_RPKM <- final_merge[which(final_merge$Histology == "glioblastoma"),]
astro_RPKM <- final_merge[which(final_merge$Histology == "astrocytoma"),]

gbm_RPKM_TSPO <- gbm_RPKM[,c(1:9,2264)]
astro_RPKM_TSPO <- astro_RPKM[,c(1:9,2264)]

write.table(gbm_RPKM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_GBM_RPKM_TSPO.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = FALSE,col.names=TRUE)
write.table(astro_RPKM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_LGG_RPKM_TSPO.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = FALSE,col.names=TRUE)

##Eingrenzen der großen Tabelle auf TSPO und Expression-Subtypen
all_RPKM_TSPO <- final_merge_all[,c(1:51,2306)]

write.table(all_RPKM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_ExpSubtyp_RPKM_TSPO.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = FALSE,col.names=TRUE)

##TPM-Berechnung
##Eingrenzen der extrahierten Tabelle auf Count Daten
counts <-table1[,4:length(table1)]

##Zuweisung der Genbezeichnung als Zeilenbezeichnung
rownames(counts)<-paste(table1[,1],table1[,2],sep="_")

##Tabelle mit Genlängen je Gen erzeugen
length<-rep(table1[,3],650)
length2<-matrix(length, nrow=60483, ncol=650) #-1 for the first row is not data but header!!

##Reads pro Kilobase berechnen
RPK <- counts/(length2/(10^3))

##Scaling-Faktor berechnen und den Vektor in eine Matrix umwandeln
summedRPK <- apply(RPK,2,sum)
perMillionScalingFactor <- summedRPK/(10^6)
perMillionScalingFactor2 <- matrix(perMillionScalingFactor, nrow=60483, ncol=650,
byrow=TRUE)

##TPM Formel
#Berechnung
myTPM2 <- RPK/perMillionScalingFactor2
#Hinzufügen der Geninformationen und
gene_id <- table1 [,1]
```

Anhang

```
gene_name <- table1 [,2]
exon_length <- table1 [,3]
myTPM2_withID <- data.frame(gene_id, gene_name, exon_length, myTPM2)

#Ersetzen der Punkte in Fall IDs durch Bindestriche
colnames(myTPM2_withID)[4:653] <- colnames(table1)[4:653]
rownames(myTPM2_withID) <- myTPM2_withID$gene_id

write.table(myTPM2_withID, file = "Verhaak_2016_Cell_All_TPM.txt", sep = "\t", dec=".",
row.names = FALSE, col.names=TRUE)

##Annotation klinischer Daten
transpose_myrpkm3 <- t(myTPM2_withID[,4:length(myTPM2_withID)])
colnames(transpose_myrpkm3) <- myTPM2_withID$gene_id
transpose_myrpkm3 <- as.data.frame(transpose_myrpkm3)
transpose_myrpkm3$Patient_ID <- rownames(transpose_myrpkm3)

final_merge <-
merge(merge_clinical, transpose_myrpkm3, by.x="Case", by.y="Patient_ID", all.x=TRUE)
final_merge_all <-
merge(merge_clinical_all, transpose_myrpkm3, by.x="Case", by.y="Patient_ID", all.x=TRUE)

##Eingrenzen der kleinen Tabellengröße auf ausgewählte Entitäten und TSPO
gbm_TPM <- final_merge[which(final_merge$Histology == "glioblastoma"),]
astro_TPM <- final_merge[which(final_merge$Histology == "astrocytoma"),]

gbm_TPM_TSPO <- gbm_TPM[,c(1:9, 2264)]
astro_TPM_TSPO <- astro_TPM[,c(1:9, 2264)]

write.table(gbm_TPM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_GBM_TPM_TSPO.txt", sep = "\t",
dec=".", row.names = FALSE, col.names=TRUE)
write.table(astro_TPM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_LGG_TPM_TSPO.txt", sep = "\t",
dec=".", row.names = FALSE, col.names=TRUE)

##Eingrenzen der großen Tabelle auf TSPO und Expression-Subtypen
all_TPM_TSPO <- final_merge_all[,c(1:51, 2306)]

write.table(all_TPM_TSPO, file = "Verhaak_2016_Cell_ExpSubtyp_TPM_TSPO.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = FALSE, col.names=TRUE)

##Eingrenzen der großen Tabelle auf Glioblastopatienten
all_gbm_TPM <- final_merge_all[which(final_merge$Histology == "glioblastoma"),]

write.table(all_gbm_TPM, file = "Verhaak_2016_Cell_GBM_TPM_all.txt", sep = "\t",
dec=".", row.names = FALSE, col.names=TRUE)
```

Anhang

7.1.1.3 Extraktion der *in silico* TSPO CpG-Insel Methylierungsarraydaten (Beta-Werte) anhand TCGA-LGG Beispiel

##Laden der R Pakete

```
library(data.table)
library(tidyverse)
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("C:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG Query_fromHome")
```

##Funktion für Daten-Filterung erstellen

```
`%nin%` = Negate(`%in%`)
```

##Herausfilterung der Fälle mit unklarer Annotation

```
#Erstellen des Ordernamen-Vektor
```

```
allMethylationFolderNames <- list.files(path="C:/Users/user/Documents/101-
LorraineWeidner/01-FE-Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG
Query_fromHome/Entpackt")
```

```
#Entfernen von Manifest Datei, tar Verzeichnis, usw. aus Vektor und
```

```
#Einbetten des Vektors in einen Dateipfad-Vektor
```

```
allMethylationFilePaths <- file.path("C:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG
Query_fromHome/Entpackt",c(allMethylationFolderNames))
allMethylationFilePaths <- allMethylationFilePaths[-c(370,414,537,538)]
allMethylationFolderNames <- allMethylationFolderNames[-c(370,414,537,538)]
```

```
#Kontrolle des Dateipfad-Vektors
```

```
list.files(allMethylationFilePaths)
```

```
#for-Schleife für Herausfilterung der Fälle
```

```
corrected_allMethylationFolderNames <- rep(NA,2)
```

```
for(i in 1:534){
```

```
File_name <- allMethylationFolderNames[i]
```

```
File_list <- list.files(allMethylationFilePaths[i])
```

```
if("annotations.txt" %nin% File_list){
```

```
test_tables <- File_name
```

```
}
```

```
corrected_allMethylationFolderNames <- c(corrected_allMethylationFolderNames,test_tables)
```

```
}
```

```
#Obligatorische Modifizierung des gefilterten Ordernamen-Vektors
```

```
corrected_allMethylationFolderNames <- corrected_allMethylationFolderNames[-(1:2)]
```

```
corrected_allMethylationFolderNames2 <- unique(corrected_allMethylationFolderNames)
```

```
#Einbetten des gefilterten Vektors in einen Dateipfad-Vektor
```

```
allMethylationFilePaths2 <- file.path("C:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-
FE-Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG
Query_fromHome/Entpackt",c(corrected_allMethylationFolderNames2))
```

##Herausfilterung der TSPO Beta-Werte aus den Ordnern

```
All_TSPOfiltered_Results <- data.frame()
```


Anhang

```
for(i in 1:516) {
  File_name2 <- list.files(allMethylationFilesPaths2[i])
  Filesum <- paste(allMethylationFilesPaths2[i],"/",File_name2,sep="")
  test_table2 <- fread(Filesum,header=TRUE,sep="\t",dec=".",stringsAsFactors=FALSE)
  test_table3 <- test_table2[which(test_table2$Chromosome == "chr22"),]
  test_table3$Identifier_ID <- corrected_allMethylationFolderNames2 [i]
  split_GeneSymbol <- str_split(test_table3$Gene_Symbol,";")
  for (k in 1:nrow(test_table3)){

    if ("TSPO" %in% split_GeneSymbol[[k]]) {
      Extract_Row <- test_table3[k,]
      print(paste(i,k,sep="-"))
      All_TSPOfiltered_Results <- rbind(All_TSPOfiltered_Results,Extract_Row)}
    if ("TSPO" %nin% split_GeneSymbol[[k]]) {
      print(paste("not present in",i,k,sep="-"))
    }
  }
}
```

##Herausfilterung der TSPO Beta-Werte im CpG Island aus den Ordnern

```
All_TSPOfiltered_Results_Island <-
All_TSPOfiltered_Results[which(All_TSPOfiltered_Results$Feature_Type == "Island"),]
```

##Einlesen von Referenzen, Samplesheets und klinischer Daten

```
Phäntyp_table <- fread("C:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG Query_fromHome/gdc_sample_sheet.2020-07-
01.tsv",header=TRUE,sep="\t",dec=".",quote="",stringsAsFactors=FALSE)
Clinical_table <- fread("C:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/Projekt_TSPO_Epigenetik/TCGA-LGG
Query_fromHome/clinical.tsv",header=TRUE,sep="\t",dec=".",quote="",stringsAsFactors=FA
LSE)
```

##Erstellen eines Linkfiles in Vorbereitung für Annotation klinischer Daten während Filterprozess

```
Linkfile <- data.frame()

for(i in 1:nrow(Phäntyp_table)) {
  Integer_interest <- which(Clinical_table$case_submitter_id %in% Phäntyp_table[,"Case ID"]
[i])
  Extract_Row <- Clinical_table[Integer_interest,]
  Extract_Row$File_ID <- Phäntyp_table[,"File ID"] [i]
  Extract_Row$Sample_Type <- Phäntyp_table[,"Sample Type"] [i]
  Linkfile <- rbind(Linkfile,Extract_Row)
}

#> unique(Linkfile$treatment_type)
#[1] "Radiation Therapy, NOS" "Pharmaceutical Therapy, NOS"

#noch doppelt wegen verschiedenen Treatments a
Linkfile[which(Linkfile$treatment_type == "Radiation Therapy, NOS"),]
Linkfile_woDup <- Linkfile[which(Linkfile$treatment_type == "Radiation Therapy, NOS"),]

#noch doppelt wegen verschiedenen Treatments b
Linkfile[which(Linkfile$treatment_type == "Pharmaceutical Therapy, NOS"),]
Linkfile_woDup_Pharm <- Linkfile[which(Linkfile$treatment_type == "Pharmaceutical
Therapy, NOS"),]
#erstmal nur weiter mit a
```

Anhang

```
Identifier_forFilter <- unique(All_TSPOfiltered_Results_Island$Identifier_ID)
Linkfile_woDup_short <-
data.frame(Linkfile_woDup$primary_diagnosis,Linkfile_woDup$Sample_Type,Linkfile_wo
Dup$File_ID)
colnames(Linkfile_woDup_short) <- c("primary_diagnosis","Sample_Type","File_ID")
```

##Daten-Aufbereitung und Filterungsprozess

```
All_TSPOfiltered_Results_Island_split <-
split(All_TSPOfiltered_Results_Island,All_TSPOfiltered_Results_Island$Identifier_ID)
All_TSPOfiltered_Results_Island_splitProbes <-
split(All_TSPOfiltered_Results_Island,All_TSPOfiltered_Results_Island$`Composite
Element REF`)

#unique(All_TSPOfiltered_Results_Island$`Composite Element REF`)
#[1] "cg00343092" "cg01633858" "cg08314021" "cg10822314" "cg20390150" "cg24899361"
"cg26131049"

All_Probes <-
c("cg00343092","cg01633858","cg08314021","cg10822314","cg20390150","cg24899361","c
g26131049")

#Schleife für finale Filterung
File_ID_Table <- rep(NA,1)
Entity_Table <- rep(NA,1)
Beta_value_Table <- data.frame()
Position_Table <- data.frame()

for (i in 1:length(All_TSPOfiltered_Results_Island_split)) {
  List_interest <- All_TSPOfiltered_Results_Island_split[[i]]
  List_interest <- List_interest[order(List_interest$`Composite Element REF`),]
  List_interest <-
merge(List_interest,Linkfile_woDup_short,by.x="Identifier_ID",by.y="File_ID",all.x=TRUE)
  File_ID <- unique(All_TSPOfiltered_Results_Island$Identifier_ID) [i]
  Entity <- unique(List_interest$primary_diagnosis)
  File_ID_Table <- c(File_ID_Table,File_ID)
  Entity_Table <- c(Entity_Table,Entity)
  Vector_Betavalue <- List_interest$Beta_value
  Beta_value_Table <- rbind(Beta_value_Table,Vector_Betavalue)
  Vector_Position <- List_interest$Start
  Position_Table <- rbind(Position_Table,Vector_Position)
}

File_ID_Table <- File_ID_Table[-1]
Entity_Table <- Entity_Table [-1]

Complete_Table <- data.frame(File_ID_Table,Entity_Table,Beta_value_Table,
stringsAsFactors=FALSE)

fileOut7 ="20210506_TCGA_LGG+Entity_TSPO-Island_BetaValues.txt"
fwrite(Complete_Table,fileOut7,row.names=F,quote=T,col.names=F,sep="\t",dec=".",na="N
A")
```

Anhang

7.1.2 RNA NGS Prozesse der TSPO Bildgebungsstudienkohorte

In den nachfolgenden Unterkapiteln sind Skripte für die RNA NGS Daten-Prozessierung der im Materialteil (Kapitel 2.10) aufgelisteten Fälle der TSPO-Bildgebungsstudienkohorte aufgeführt. Code-Abschnitte (##) und -Teilabschnitte (#) wurden durch Auskommentierung bzw. Unterstreichung hervorgehoben. Zur Platzersparnis wurde statt 1,5-fachen Zeilenabstand ein einfacher Zeilenabstand und Schriftgröße 11 für die Skriptdokumentation gewählt.

7.1.2.1 Sequenz-Alignment und Zählung auf Linux Workstation

(„Raw“ Counts)

```
#!/bin/bash
##bash /mRNA_script_TEST_A01.sh <SampleName>
## hg38 release 102

##hisat2-2.2.1 use with
    PATH="/home/neuropatho/hisat2-2.2.1:$PATH"

##Referenzgenom in
    PATH=$PATH:/home/neuropatho/hisat2-2.2.1/GRCh38.102 export PATH

##Subread für featureCounts
    PATH=$PATH:/home/neuropatho/subread-2.0.1-source/bin export PATH

##samtools 1.11 mit:
    PATH="/home/neuropatho/samtools-1.11:$PATH"

##Genom indexieren
#(nur 1x nach Download des Referenzgenom, um hg38 v102 verwenden zu können!!!)
    #hisat2-build -p 16 /home/neuropatho/Genome/Genome_hg38/hg38_UCSC.fa genome

##Ordner-Pfade zu den Inputfiles
# Order 338 - ist nun das RNA_Data_LW Verzeichnis
#cd /media/neuropatho/SSD480/RNA_Seq_WDH-
Download/Auswertung_RNASeq/Order338/${1}

# Ordner 300 - ist nun das RNA_Data_LW Verzeichnis
#cd /media/neuropatho/SSD480/RNA_Seq_WDH-
Download/Auswertung_RNASeq/Order300/${1}

#Ordnerpfad für RNA_Seq005, RNA_Seq006 und RNA_Seq007
#cd /media/neuropatho/RNA_Data_LW/TSPO_Study_woOrder300/<Lauf
ID>/Data/Intensities/BaseCalls/${1}

##Trim Prozess mit cutadapt 1.11 read trimmer
cutadapt -a CTGTCTCTTATACACATCT -u 1 --nextseq-trim=20 -o ${1}_trimmed.fastq.gz
${1}.fastq.gz &> ${1}_cutadapt.info
```

Anhang

##Alignment mit hisat2-2.2.1

```
hisat2 -p 4 -x /home/neuropatho/hisat2-2.2.1/GRCh38.102 -U ${1}_trimmed.fastq.gz --  
summary-file ${1}_summaryhisat | samtools sort -o ${1}_sort.bam -O bam -T _deleteme &>  
${1}_hisat2.info  
samtools index ${1}_sort.bam
```

##Erstellen der Count Tabelle aus sam File mit featureCounts subread-2.0.1

```
featureCounts -T 5 -M -t exon -g gene_id -a  
/media/neuropatho/RNA_Data_LW/RNA_Seq_WDH-  
Download/hg38v102_GTF/Homo_sapiens.GRCh38.102.gtf -o ${1}_count_table.txt  
${1}_sort.bam &> ${1}_featureCounts.info
```

Anhang

7.1.2.2 Batch-Effekt Korrektur

(„Adjusted“ Counts)

Skript durch Julian Sax zur Verfügung gestellt und für Studie angepasst

##Laden der R Pakete

```
library(data.table)
library(RSQLite)
library(genefilter)
library(sva)
library(gprofiler2)
library(tidyverse)
library(ggfortify)
library(ggplot2)
library(network)
library(dplyr)
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007")
```

##Laden der Counts für Batchkorrektur

```
#im Skript: load("26092022_GBM_IDHwt_adjCounts_onlySABgroups.RData")
#im Detail:
countdata_old <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220117_RNA_Seq001bis006/RNA_Seq001bis006_Counts_Symbol.txt",header=TR
UE,sep="\t",dec="," ,stringsAsFactors=FALSE)
countdata_new <-
fread("14042022_RNA_Seq007_Counts_Symbol.txt",header=TRUE,sep="\t",dec="," ,strings
AsFactors=FALSE)
```

##Laden der Sampleinfo (Stand: 26.09.2022) und eingrenzen dieser auf zu analysierende GBM Proben

```
sampleinfo2 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/RNA_Seq007/sampleinfo_26092022_forPaper_Sabgroups.txt",header=TRUE, dec="," ,
sep="\t" , stringsAsFactors=FALSE)
sampleinfo3 <- sampleinfo2[c(which(sampleinfo2$New_SABgroup == "low" &
sampleinfo2$WHO_grade_recode == "4"),which(sampleinfo2$New_SABgroup == "high"&
sampleinfo2$WHO_grade_recode == "4")),]
sampleinfo3_unique <- sampleinfo3[c(which(sampleinfo3$Unique_Filter_SUV == "1")),]
```

##Vorbereiten der Count Matrix mit Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

###Immer prüfen ob Spaltenreihenfolge zur Case Reihenfolge in Sampleinfo passt!!!

```
#Reihenfolge prüfen
sampleinfo2$Sample
colnames(countdata_old)
colnames(countdata_new)
which(countdata_old[,2] == countdata_new[,2])
all_countdata <- data.frame(countdata_old[,1:45],countdata_new[,4:21])
```

```
#Counts filtern, in Matrix umwandeln und NA entfernen
all_countdata2 <- all_countdata[,4:length(all_countdata)]
```

Anhang

```
rownames(all_countdata2) <-  
paste(all_countdata$EnsemblID_Linkfile.Gene.stable.ID.,all_countdata$EnsemblID_Linkfile.  
.Gene.name.,sep=";")  
all_countdata2_SABgroup <- all_countdata2[,c(which(sampleinfo2$New_SABgroup ==  
"low" & sampleinfo2$WHO_grade_recode == "4"),which(sampleinfo2$New_SABgroup ==  
"high"& sampleinfo2$WHO_grade_recode == "4"))]  
all_countdata2_SABgroup_unique <-  
all_countdata2_SABgroup[,c(which(sampleinfo3$Unique_Filter_SUV == "1"))]  
  
subsetLowVsHigh_WHO4 <- as.matrix(all_countdata2_SABgroup_unique)  
rownames(subsetLowVsHigh_WHO4) <- rownames(all_countdata2_SABgroup_unique)  
fibroblasts <- subsetLowVsHigh_WHO4  
rownames(fibroblasts)  
fibroblasts <- na.omit(fibroblasts)
```

##Zuweisen der R Objekte für Batchkorrektur Code

```
SampleDescription <- sampleinfo3_unique  
count_matrix <- fibroblasts
```

##Transformation der Count Matrix

```
pcamat <- as.data.frame(log2(t(count_matrix) + 1))  
dim(pcamat)  
rownames(pcamat)[1:9]  
  
pcamat2 <- pcamat
```

##Dataset und Phänotyp Variabel für Batchkorrektur zuweisen

```
dataset <- as.factor(SampleDescription$RNA_RUN)  
pcamat2$dataset <- dataset  
phenotype <- SampleDescription$New_SABgroup  
pcamat2$phenotype <- phenotype
```

##Graphische Darstellung der Proben PCA ohne Batchkorrektur

```
pre_pca <- prcomp(pcamat)  
pc_eigenvalues <- pre_pca$sdev^2  
pc_eigenvalues <- tibble(PC = factor(1:length(pc_eigenvalues)),  
variance = pc_eigenvalues) %>%  
# add a new column with the percent variance  
mutate(pct = variance/sum(variance)*100) %>%  
# add another column with the cumulative variance explained  
mutate(pct_cum = cumsum(pct))  
tiff(filename = "ScreePlot_Pre_SABgroup_28092022.tiff", width = 1500, height = 700, units  
= "px")  
pc_eigenvalues %>%  
ggplot(aes(x = PC)) +  
geom_col(aes(y = pct)) +  
geom_line(aes(y = pct_cum, group = 1)) +  
geom_point(aes(y = pct_cum)) +  
labs(x = "Principal component", y = "Fraction variance explained")  
dev.off()  
  
tiff(filename = "PCAPlot_Pre_SABgroup_28092022.tiff", width = 1200, height = 1000, units  
= "px")  
autoplot(pre_pca, data = pcamat2, colour = "dataset", shape = "phenotype", size = 3)  
dev.off()
```

Anhang

##Batchkorrektur

```
batch = dataset
group = phenotype

adjusted2 <- ComBat_seq(as.matrix(count_matrix), batch = batch, group = group)
adjusted2_withoutgroup <- ComBat_seq(as.matrix(count_matrix), batch = batch, group =
NULL)

#Test mit/ohne Group Spezifikation
which(rownames(adjusted2)=="ENSG00000100300;TSPO")
withoutgroup <- boxplot(adjusted2_withoutgroup [2254,] ~ group)
withgroup <- boxplot(adjusted2 [2254,] ~ group)
#Fazit: Keine massiven Unterschiede

adjusted2[1:5,1:5]

write.table(adjusted2, file = "GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022.txt", sep
= "\t", dec=".", row.names = TRUE)
```

##Graphische Darstellung der Proben PCA ohne Batchkorrektur

```
pcamatCSG <- as.data.frame(log2(t(adjusted2) + 1))
dim(pcamatCSG)
rownames(pcamatCSG)[1:9]

pcamatCSG2 <- pcamatCSG
pcamatCSG2$dataset <- dataset
pcamatCSG2$phenotype <- phenotype

CSG_pca <- prcomp(pcamatCSG)
pc_eigenvalues <- CSG_pca$sdev^2
pc_eigenvalues <- tibble(PC = factor(1:length(pc_eigenvalues)),
variance = pc_eigenvalues) %>%
# add a new column with the percent variance
mutate(pct = variance/sum(variance)*100) %>%
# add another column with the cumulative variance explained
mutate(pct_cum = cumsum(pct))
dev.off()
tiff(filename = "ScreePlot_CS_Grouping_26092022.tiff", width = 1500, height = 700, units =
"px")
pc_eigenvalues %>%
ggplot(aes(x = PC)) +
geom_col(aes(y = pct)) +
geom_line(aes(y = pct_cum, group = 1)) +
geom_point(aes(y = pct_cum)) +
labs(x = "Principal component", y = "Fraction variance explained")
dev.off()

autoplot(CSG_pca)
dev.off()
tiff(filename = "PCAPlot_CS_Grouping_26092022.tiff", width = 1200, height = 1200, units =
"px")
autoplot(CSG_pca, data = pcamatCSG2, colour = "dataset", shape = "phenotype", size = 3)
dev.off()
```

Anhang

7.1.2.3 Differentielle Expressionsanalyse mit adjustierten Counts

##Laden der R Pakete

```
library("Biobase")
library("DESeq2")
library("gplots")
library("RColorBrewer")
library("FactoMineR")
library("ggplot2")
library("devtools")
library("genefilter")
library("dplyr")
library("data.table")
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007")
```

##Laden der Counts und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
countdata_subset_unique1 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007/GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_2609202
2.txt",header=TRUE, dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
```

```
countdata_subset_unique1_woID <- countdata_subset_unique1[,-c(1:2)]
countdata_subset_unique2 <-
countdata_subset_unique1_woID[,c(1,2,3,12,13,14,15,4,5,6,7,8,16,17,9,18,10,11)]
```

```
> dim(countdata_subset_unique2)
[1] 60674 18
```

```
> colnames(countdata_subset_unique2)
[1] "TSPO_4_A_Kryo.14_sort.bam" "TSPO_6_II_Kryo.4_sort.bam"
[3] "TSPO9_12_II_sort.bam"      "TSPO10_3_sort.bam"
[5] "TSPO11_13_sort.bam"       "TSPO13_II_sort.bam"
[7] "TSPO14_II_sort.bam"       "TSPO19_IX_sort.bam"
[9] "TSPO21_IA_sort.bam"       "TSPO45_IIA_8_sort.bam"
[11] "TSPO57.2_sort.bam"        "TSPO70.5_sort.bam"
[13] "TSPO73.10_sort.bam"       "TSPO65_I_sort.bam"
[15] "TSPO83_I_12_sort.bam"     "TSPO84_IIA_gros_sort.bam"
[17] "TSPO85_III_sort.bam"      "TSPO89_I_sort.bam"
```

##Laden der Sampleinfo und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
sampleinfo2 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/RNA_Seq007/sampleinfo_13102022_forPaper_Expgroups.txt",header=TRUE,
dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
sampleinfo3 <- sampleinfo2[c(which(sampleinfo2$Unique_Filter_SUV == "1")),]
sampleinfo3_unique <- sampleinfo3
```

```
> dim(sampleinfo3_unique)
[1] 18 27
```

```
> sampleinfo3_unique$Case
```


Anhang

```
[1] "TSPO_4" "TSPO_6" "TSPO_12" "TSPO_10" "TSPO_11" "TSPO_13"  
[7] "TSPO_14" "TSPO_19" "TSPO_21" "TSPO_45" "TSPO_57" "TSPO_70"  
[13] "TSPO_73" "TSPO_65" "TSPO_83" "TSPO_84" "TSPO_85" "TSPO_89"
```

##Vorbereiten der Count Matrix

```
rownames(countdata_subset_unique2) <-  
paste(countdata_subset_unique1$Geneid,countdata_subset_unique1$Symbol,sep=";")  
subsetLowVsHigh_WHO4 <- as.matrix(countdata_subset_unique2  
[,1:length(countdata_subset_unique2)])  
rownames(subsetLowVsHigh_WHO4) <- rownames(countdata_subset_unique2)
```

```
> dim(subsetLowVsHigh_WHO4)  
[1] 60674 18
```

```
fibroblasts <- subsetLowVsHigh_WHO4  
rownames(fibroblasts)  
fibroblasts <- na.omit(fibroblasts)
```

##Setzen der zu vergleichenden Gruppen/Level und differentielle Expressionsanalyse

```
myfactors1 <- sampleinfo3_unique$New_DESEQgroup_13102022  
colData <- data.frame(dex = factor(myfactors1,levels=c("low","high")))  
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = fibroblasts, colData, formula(~ dex))  
keep = rowSums(counts(dds)) >= 10  
dds = dds[keep, ]
```

```
dds <- DESeq(dds)  
res <- results(dds)  
res = as.data.frame(res)
```

```
write.table(res,"diffexpGenes_AfterRecode_GBM_IDHwt_DESEQgroup_13102022_adjusted  
.txt",row.names=TRUE,col.names=TRUE,dec=".",sep="\t")  
save.image("20221013_DeSeq_DESEQgroup_adjusted.RData")
```

##Interactive Complex Heatmap Skript für Visualisierung der Analyseergebnisse

#Skript wurde von DOI: 10.1093/bioinformatics/btab806 geschrieben/entworfen und wurde für die Studie angepasst

```
library(InteractiveComplexHeatmap)  
library(ComplexHeatmap)  
library(circlize)  
library(GetoptLong)
```

```
env = new.env()
```

```
make_heatmap = function(fdr = 0.01, base_mean = 0, log2fc = 0)  
{  
  l = res$padj <= fdr & res$baseMean >= base_mean &  
    abs(res$log2FoldChange) >= log2fc; l[is.na(l)] = FALSE  
  if(sum(l) == 0) return(NULL)  
  m = counts(dds, normalized = TRUE)  
  m = m[l, ]  
  env$row_index = which(l)  
  ht = Heatmap(t(scale(t(m))), name = "z-score",  
    top_annotation = HeatmapAnnotation(  
      dex = colData(dds)$dex,
```

Anhang

```
    sizeFactor = anno_points(colData(dds)$sizeFactor)
  ),
  show_row_names = FALSE, show_column_names = FALSE, row_km = 2,
  column_title = paste0(sum(1, " significant genes with FDR < ", fdr),
  show_row_dend = FALSE) +
  Heatmap(log10(res$baseMean[1]+1), show_row_names = FALSE, width = unit(5,
"mm"),
    name = "log10(baseMean+1)", show_column_names = FALSE) +
  Heatmap(res$log2FoldChange[1], show_row_names = FALSE, width = unit(5, "mm"),
    name = "log2FoldChange", show_column_names = FALSE,
    col = colorRamp2(c(-2, 0, 2), c("green", "white", "red")))
  ht = draw(ht, merge_legend = TRUE)
  ht
}
```

make the MA-plot with some genes highlighted

```
make_maplot = function(res, highlight = NULL) {
  col = rep("#00000020", nrow(res))
  cex = rep(0.5, nrow(res))
  names(col) = rownames(res)
  names(cex) = rownames(res)
  if(!is.null(highlight)) {
    col[highlight] = "red"
    cex[highlight] = 1
  }
  x = res$baseMean
  y = res$log2FoldChange
  y[y > 2] = 2
  y[y < -2] = -2
  col[col == "red" & y < 0] = "darkgreen"
  par(mar = c(4, 4, 1, 1))

  suppressWarnings(
    plot(x, y, col = col,
      pch = ifelse(res$log2FoldChange > 2 | res$log2FoldChange < -2, 1, 16),
      cex = cex, log = "x",
      xlab = "baseMean", ylab = "log2 fold change")
  )
}
```

make the volcano plot with some genes highlighted

```
make_volcano = function(res, highlight = NULL) {
  col = rep("#00000020", nrow(res))
  cex = rep(0.5, nrow(res))
  names(col) = rownames(res)
  names(cex) = rownames(res)
  if(!is.null(highlight)) {
    col[highlight] = "red"
    cex[highlight] = 1
  }
  x = res$log2FoldChange
  y = -log10(res$padj)
  col[col == "red" & x < 0] = "darkgreen"
  par(mar = c(4, 4, 1, 1))
}
```

Anhang

```
suppressWarnings(  
  plot(x, y, col = col,  
       pch = 16,  
       cex = cex,  
       xlab = "log2 fold change", ylab = "-log10(FDR)")  
)  
}  
  
#We use shinydashboard to organize the interactive heatmap components. It has a three-  
column layout:  
#The first column: the original heatmap,  
#The second column: the sub-heatmap and the default output,  
#The third column: the self-defined output.  
  
#We separately specify the three interaction heatmap components by  
originalHeatmapOutput(), subHeatmapOutput() and HeatmapInfoOutput().  
  
#One additional htmlOutput("note") is only for printing some friendly message in the app.  
  
library(DT)  
library(shiny)  
library(shinydashboard)  
body = dashboardBody(  
  fluidRow(  
    column(width = 4,  
      box(title = "Differential heatmap", width = NULL, solidHeader = TRUE, status =  
"primary",originalHeatmapOutput("ht", height = 800, containment = TRUE))),  
      column(width = 4,id = "column2",box(title = "Sub-heatmap", width = NULL,  
solidHeader = TRUE, status = "primary",subHeatmapOutput("ht", title = NULL, containment  
= TRUE)  
    ),  
      box(title = "Output", width = NULL, solidHeader = TRUE, status = "primary",  
HeatmapInfoOutput("ht", title = NULL)  
    ),  
      box(title = "Note", width = NULL, solidHeader = TRUE, status = "primary",  
htmlOutput("note")  
    ),  
  ),  
  column(width = 4,  
    box(title = "MA-plot", width = NULL, solidHeader = TRUE, status = "primary",  
plotOutput("ma_plot")  
  ),  
    box(title = "Volcano plot", width = NULL, solidHeader = TRUE, status = "primary",  
plotOutput("volcano_plot")  
  ),  
    box(title = "Result table of the selected genes", width = NULL, solidHeader = TRUE,  
status = "primary",  
DTOutput("res_table")  
  )  
),  
tags$style("  
  .content-wrapper, .right-side {  
    overflow-x: auto;  
  }  
)
```

Anhang

```
        .content {
          min-width:1500px;
        }
      ")
    )
  )
)
```

#In previous code, we add self-defined CSS code to set the minimal width of the area that contains the boxes.

#We will have several self-defined actions to respond brushing event on heatmap. We put all these actions into one brush_action() call. Note here we use env\$row_index[row_index] to get the indices of the selected genes that correspond to the complete gene set.

```
library(GetoptLong) # for qq() function
brush_action = function(df, input, output, session) {

  row_index = unique(unlist(df$row_index))
  selected = env$row_index[row_index]

  output[["ma_plot"]] = renderPlot({
    make_maplot(res, selected)
  })

  output[["volcano_plot"]] = renderPlot({
    make_volcano(res, selected)
  })

  output[["res_table"]] = renderDT(
    formatRound(datatable(res[selected, c("baseMean", "log2FoldChange", "padj")],
rownames = TRUE), columns = 1:3, digits = 3)
  )

  output[["note"]] = renderUI({
    if(!is.null(df)) {
      HTML(qq("<p>Row indices captured in <b>Output</b> only correspond to the matrix
of the differential genes. To get the row indices in the original matrix, you need to
perform:</p>
<pre>
l = res$padj <= @ {input$fdr} &
  res$baseMean >= @ {input$base_mean} &
  abs(res$log2FoldChange) >= @ {input$log2fc}
l[is.na(l)] = FALSE
which(l)[row_index]
</pre>
<p>where <code>res</code> is the complete data frame from DESeq2 analysis and
<code>row_index</code> is the <code>row_index</code> column captured from the code in
<b>Output</b>.</p>"))
    }
  })
}
```

Anhang

#Side bar contains settings for cutoffs to select significant genes, i.e., FDR, base mean and log2 fold change. We also add an action button to trigger the generation of heatmap.

```
ui = dashboardPage(
  dashboardHeader(title = "DESeq2 results"),
  dashboardSidebar(
    selectInput("fdr", label = "Cutoff for FDRs:", c("0.001" = 0.001, "0.01" = 0.01, "0.05" =
0.05, "0.25" =0.25)),
    numericInput("base_mean", label = "Minimal base mean:", value = 0),
    numericInput("log2fc", label = "Minimal abs(log2 fold change):", value = 0),
    actionButton("filter", label = "Generate heatmap")
  ),
  body
)
```

#On the server side, we only respond to the action button, because heatmap generation does not happen instantly (1 to 2 seconds lag). We want to generate the heatmap only when all the cutoffs are configured by users.

#ignoreNULL = FALSE is set to ensure that the heatmap will be generated right after the app is loaded.

```
server = function(input, output, session) {
  observeEvent(input$filter, {
    ht = make_heatmap(fdr = as.numeric(input$fdr), base_mean = input$base_mean, log2fc
= input$log2fc)
    if(!is.null(ht)) {
      makeInteractiveComplexHeatmap(input, output, session, ht, "ht",
brush_action = brush_action)
    } else {
      # The ID for the heatmap plot is encoded as @{heatmap_id}_heatmap, thus, it is
ht_heatmap here.
      output$ht_heatmap = renderPlot({
        grid.newpage()
        grid.text("No row exists after filtering.")
      })
    }
  }, ignoreNULL = FALSE)
}
```

#Everything is ready, and we generate the app with shinyApp():

```
shinyApp(ui, server)
```

Anhang

7.1.2.4 Extrahieren der TPMs aus scRNA-Seq Referenz für Dekonvolution

Skript durch Ayse N. Menevse und Abir Hussein zur Verfügung gestellt und für die Studie angepasst. Das Heranziehen von open-access Daten hat hier zur Folge, dass im Seurat Objekt im „counts“ Slot prozessierte Expressionsdaten (TPMs) hinterlegt waren und somit keine Counts für die Dekonvolution verwendet werden konnten.

##Laden der R Pakete

```
library("sctransform")
library("dplyr")
library("Seurat")
library("patchwork")
library("data.table")
library("Seurat")
suppressPackageStartupMessages(library(dplyr))
library("patchwork")
library("cowplot")
library("ggplot2")
library("cerebroApp")
```

```
# Ayse-Nur spezifische R-Pakete
```

```
library("stringr")
library("gplots")
library("harmony")
library("broman")
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007/scRNASeq_GSE131928/wetransfer_smartseq-scRNA-
seq-neftel-paper_2022-11-14_1337")
```

##Laden des Seurat Objekts der scRNA-Seq Referenz

```
load('labelled_smartseq_GBM_harmony.rds')
```

```
head(labelled_GBM, 5)
dim(labelled_GBM)
```

##Extrahieren der Zelltypen für Cellprofile Input in dREG Onlinetool

```
Celltypes <- as.data.frame(Idents(labelled_GBM))
```

```
write.table(Celltypes , file = "cellprofile_All_TPM.txt", sep = "\t", dec=".", row.names =
TRUE,col.names=TRUE)
```

```
#Basierend auf Formatvorlage wurde die Cellprofile Datei in eine .csv Datei umgewandelt und
die Spaltentrennung mittels Komma über Notepad++ vorgenommen.
```

##Extrahieren der Genexpressionswerte (TPMs) aus scRNA-Seq Referenz

```
mycounts <- as.data.frame(GetAssayData(labelled_GBM, slot = "counts"))
```

```
write.table(mycounts , file = "matREF_All_TPM.txt", sep = "\t", dec=".", row.names =
TRUE,col.names=TRUE)
```

Anhang

7.1.2.5 Berechnung der TSPO Genexpressionswerte aus adjustierten Counts (TPMs, DeSeq-normalisierte Counts und RPKMs)

##TPM Berechnung

##Laden der R Pakete

```
library(Biobase)
library(DESeq2)
library(gplots)
library(RColorBrewer)
library(FactoMineR)
library(ggplot2)
library(devtools)
library(genefilter)
library(dplyr)
library(stats)
library(data.table)
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007")
```

##Laden der Counts und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
countdata_subset_unique1 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007/GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_2609202
2.txt",header=TRUE, dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
```

```
countdata_subset_unique1_woID <- countdata_subset_unique1[,-c(1:2)]
countdata_subset_unique2 <-
countdata_subset_unique1_woID[,c(1,2,3,12,13,14,15,4,5,6,7,8,16,17,9,18,10,11)]
```

```
> colnames(countdata_subset_unique2)
[1] "TSPO_4_A_Kryo.14_sort.bam" "TSPO_6_II_Kryo.4_sort.bam"
[3] "TSPO9_12_II_sort.bam"      "TSPO10_3_sort.bam"
[5] "TSPO11_13_sort.bam"       "TSPO13_II_sort.bam"
[7] "TSPO14_II_sort.bam"       "TSPO19_IX_sort.bam"
[9] "TSPO21_IA_sort.bam"       "TSPO45_IIA_8_sort.bam"
[11] "TSPO57.2_sort.bam"        "TSPO70.5_sort.bam"
[13] "TSPO73.10_sort.bam"       "TSPO65_I_sort.bam"
[15] "TSPO83_I_12_sort.bam"     "TSPO84_IIA_gros_sort.bam"
[17] "TSPO85_III_sort.bam"      "TSPO89_I_sort.bam"
```

##Ladern der Sampleinfo und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
sampleinfo2 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/RNA_Seq007/sampleinfo_13102022_forPaper_Expgroups.txt",header=TRUE,
dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
sampleinfo3 <- sampleinfo2[c(which(sampleinfo2$Unique_Filter_SUV == "1"),)]
sampleinfo3_unique <- sampleinfo3
```

```
> sampleinfo3_unique$Case
[1] "TSPO_4" "TSPO_6" "TSPO_12" "TSPO_10" "TSPO_11" "TSPO_13"
[7] "TSPO_14" "TSPO_19" "TSPO_21" "TSPO_45" "TSPO_57" "TSPO_70"
[13] "TSPO_73" "TSPO_65" "TSPO_83" "TSPO_84" "TSPO_85" "TSPO_89"
```

Anhang

##Vorbereiten der Count Matrix

```
rownames(countdata_subset_unique2) <-  
paste(countdata_subset_unique1$Geneid,countdata_subset_unique1$Symbol,sep=";")
```

```
countdata_subset_unique2$Geneid <- countdata_subset_unique1$Geneid  
countdata_subset_unique2$Symbol <- countdata_subset_unique1$Symbol  
countdata_subset_unique2 <- countdata_subset_unique2[,c(19:20,1:18)]
```

##Merge der Genlängen

```
#R Pakekte laden  
library(data.table)  
library(ggplot2)  
library(R.utils)
```

```
lenght_ref_seqdata <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-  
Daten/TSPO-Studie/RNA_Seq001/Count_Table_Summary_Order300.txt",  
header=TRUE,stringsAsFactors = FALSE, sep="\t",dec=".")
```

```
lenght_ref_seqdata_short <- lenght_ref_seqdata[,c(1:2)]
```

```
seqdata <- countdata_subset_unique2
```

```
merge_length <- merge(seqdata,lenght_ref_seqdata_short,by="Geneid",x.all=TRUE)
```

```
merge_length2 <- merge_length[,c(1:2,21,3:20)]
```

##Vorbereiten der Count Matrix Part 2

```
table1 <- merge_length2
```

```
> dim(table1)  
[1] 60674 21
```

```
counts <- as.matrix(table1[,4:length(table1)])  
rownames(counts) <- paste(table1$Geneid,table1$Symbol,sep="_")
```

##Tabelle mit Genlänge je Gen erzeugen

```
length <- rep(table1$Length,18)  
length2 <- matrix(length, nrow=60674, ncol=18)
```

##Reads pro Kilobase berechnen

```
RPK <- counts/(length2/(10^3))
```

##Scaling-Faktor berechnen und in eine Matrix umwandeln

```
summedRPK <- apply(RPK,2,sum)  
perMillionScalingFactor <- summedRPK/(10^6)  
perMillionScalingFactor2 <- matrix(perMillionScalingFactor, nrow=60674, ncol=18,  
byrow=TRUE)
```

##TPM Formel

```
myTPM2 <- RPK/perMillionScalingFactor2
```

##Annotation klinischer Daten

```
gene_id <- table1$Geneid  
gene_name <- table1$Symbol  
exon_length <- table1$Length
```


Anhang

```
myTPM2_withID <- data.frame(gene_id,gene_name,exon_length,myTPM2)
colnames(myTPM2_withID)[4:21] <- colnames(table1)[4:21]
rownames(myTPM2_withID) <- myTPM2_withID$gene_id

write.table(myTPM2_withID, file =
"GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adjusted_26092022.txt", sep = "\t", dec=".", row.names =
FALSE,col.names=TRUE)
```

##Angleichen der „dimnames“ für Dekonvolution mit dREG (chronologisch nach Kapitel 7.1.2.4)

```
mycounts <- read.delim("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSPO-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007/scRNASeq_GSE131928/wettransfer_smartseq-scrna-
seq-neftel-paper_2022-11-
14_1337/matREF_All_TPM.txt",header=TRUE,row.names=1,stringsAsFactors=FALSE,sep=
"\t",dec=",")

mycounts$gene_name <- rownames(mycounts)
name_of_interest <- as.data.frame(mycounts$gene_name)
name_of_interest2 <- as.data.frame(myTPM2_withID$gene_name)
colnames(name_of_interest) <- "gene_name"
colnames(name_of_interest2) <- "gene_name"

name_of_interest_merge <- merge(name_of_interest,name_of_interest2,by="gene_name")

myTPM2_withID_match <- myTPM2_withID[which(myTPM2_withID$gene_name %in%
name_of_interest_merge$gene_name),]
mycounts_match <- mycounts[which(mycounts$gene_name %in%
name_of_interest_merge$gene_name),]

which(duplicated(myTPM2_withID_match$gene_name))
which(duplicated(mycounts_match$gene_name))

myTPM2_withID_match2 <- myTPM2_withID_match[-
(which(duplicated(myTPM2_withID_match$gene_name))),]

mycounts_match2 <- mycounts_match[,-(5462)]

write.table(myTPM2_withID_match2, file =
"GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adjusted_26092022_dREG.txt", sep = "\t", dec=".",
row.names = FALSE,col.names=TRUE)
write.table(mycounts_match2, file = "matREF_All_TPM_forStudy_05122022.txt", sep = "\t",
dec=".", row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

##Formatanpassung für Dekonvolution mit Onlinetool dREG

#Für dREG in matBulk_All_TPM_forStudy_05122022.txt gespeichert, nachdem
Kommastellen gerundet und die Header sowie Geninformationen der vorgegebenen
Formatvorlage angepasst wurden!

##DeSeq-normalisierte Counts

Von Julia Lorenz mittels in GenePattern DeSeq2 Modul ermittelt und für diese Doktorarbeit in Form
von GBM_IDHwt_Counts_DESEQgroups_adjusted_normalized.txt hinterlegt.

Anhang

##RPKM Berechnung

##Laden der R Pakete

```
library(Biobase)
library(DESeq2)
library(gplots)
library(RColorBrewer)
library(FactoMineR)
library(ggplot2)
library(devtools)
library(genefilter)
library(dplyr)
library(stats)
library(data.table)
```

##Arbeitsverzeichnis zuweisen

```
setwd("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSP0-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007")
```

##Laden der Counts und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
countdata_subset_unique1 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/TSP0-
Studie/20220412_RNA_Seq001bis007/GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_2609202
2.txt",header=TRUE, dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
```

```
countdata_subset_unique1_woID <- countdata_subset_unique1[,-c(1:2)]
countdata_subset_unique2 <-
countdata_subset_unique1_woID[,c(1,2,3,12,13,14,15,4,5,6,7,8,16,17,9,18,10,11)]
```

```
> dim(countdata_subset_unique2)
[1] 60674 18
```

##Ladern der Sampleinfo und Herausfiltern der zu analysierenden Fälle

```
sampleinfo2 <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-Daten/TSP0-
Studie/RNA_Seq007/sampleinfo_13102022_forPaper_Expgroups.txt",header=TRUE,
dec=",", sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
sampleinfo3 <- sampleinfo2[c(which(sampleinfo2$Unique_Filter_SUV == "1"),)]
sampleinfo3_unique <- sampleinfo3
```

```
> dim(sampleinfo3_unique)
[1] 18 27
```

##Zuweisung der Genbezeichnung als Zeilenbezeichnung und Entfernung von NAs

```
rownames(countdata_subset_unique2) <-
paste(countdata_subset_unique1$Geneid,countdata_subset_unique1$Symbol,sep=";")
subsetLowVsHigh_WHO4 <- as.matrix(countdata_subset_unique2
[,1:length(countdata_subset_unique2)])
rownames(subsetLowVsHigh_WHO4) <- rownames(countdata_subset_unique2)
```

```
countdata_subset_unique2$Geneid <- countdata_subset_unique1$Geneid
countdata_subset_unique2$Symbol <- countdata_subset_unique1$Symbol
countdata_subset_unique2 <- countdata_subset_unique2[,c(19:20,1:18)]
```

```
seqdata <- countdata_subset_unique2
NA_list <- which(is.na(seqdata))
```

Anhang

```
NA_list_genes <- seqdata[c(NA_list),]
seqdata <- na.omit(seqdata)
#entfernt komplette Reihe wo NA enthalten

##Merge der Genlängen
lenght_ref_seqdata <- fread("c:/Users/user/Documents/101-LorraineWeidner/01-FE-
Daten/TSP0-Studie/RNA_Seq001/Count_Table_Summary_Order300.txt",
header=TRUE,stringsAsFactors = FALSE, sep="\t",dec=".")

lenght_ref_seqdata_short <- lenght_ref_seqdata[,c(1:2)]

merge_length <- merge(seqdata,lenght_ref_seqdata_short,by="Geneid",x.all=TRUE)
merge_length2 <- merge_length[,c(1:2,21,3:20)]

counts <- merge_length2[,-(1:3)]
rownames(counts) <- merge_length2$Geneid

##Tabelle mit Count-Summe je Probenspalte erzeugen
#Summenfunktion
summedcounts<-apply(counts,2,sum)

#Tabelle mit summedcounts erzeugen
summedcounts2<-matrix(summedcounts, nrow=60674, ncol=18, byrow=TRUE)

##Tabelle mit Genlängen je Gen erzeugen
length2<-matrix(merge_length2$Length, nrow=60674, ncol=18,byrow=FALSE)

##RPKM Formel
#Berechnung
myrpkm2<- (counts)*10^9/length2/summedcounts2

#Kontrolle
head(myrpkm2)

#Hinzufügen der Geninformationen und
table_myrpkm2 <- myrpkm2
table_myrpkm2$Geneid <- rownames(counts)

merge_length2_short <- merge_length2[,c(1:2)]
merge_rpkms <- merge(table_myrpkm2,merge_length2_short,by="Geneid",x.all=TRUE)
merge_rpkms2 <- merge_rpkms[,c(20,1,2:19)]

write.table(merge_rpkms2, file =
"GBM_IDHwt_RPKM_DESEQgroup_adjusted_14102022.txt", sep = "\t", dec=".",
row.names = FALSE)

#Gensymbol-Duplikate entfernen
merge_rpkms2_wodup <- merge_rpkms2[-(which(duplicated(merge_rpkms2$Symbol))),]
write.table(merge_rpkms2_wodup, file =
"GBM_IDHwt_RPKM_DESEQgroup_adjusted_14102022_wodup.txt", sep = "\t", dec=".",
row.names = FALSE)
```

Anhang

7.1.2.6 Principal Component Analyse (PCA) für RPKMs und DeSeq-normalisierte Counts

Nachfolgende Skripte basieren auf vorherigen Skripten zur RPKM/DeSeq-normalisierte Counts Berechnung aus Kapitel 7.1.2.5. Verwendete R-Pakete und zugewiesenes Arbeitsverzeichnis sind somit in Kapitel 7.1.2.5 angegeben.

##PCA für RPKM

```
group_name <- sampleinfo3_unique$New_DESEQgroup_13102022
mycounts <- merge_rpk2[,c(1:2)]
colnames(mycounts) <- c(group_name)
top1000forPCA <- head(order(rowVars(mycounts), decreasing=TRUE), 1000)
pca2 <- prcomp(t(mycounts[top1000forPCA,]), center = TRUE, scale=TRUE)
summary(pca2)
mypca <- as.data.frame(predict(pca2))
label <- colnames(mycounts)
dataforpca <- t(mycounts[top1000forPCA,])

> summary(pca2)
Importance of components:
      PC1  PC2  PC3  PC4  PC5  PC6
Standard deviation  17.2390 13.3781 9.64421 9.10292 7.6488 6.69759
Proportion of Variance  0.2972 0.1790 0.09301 0.08286 0.0585 0.04486
Cumulative Proportion  0.2972 0.4762 0.56917 0.65203 0.7105 0.75539
      PC7  PC8  PC9  PC10  PC11  PC12
Standard deviation   6.25191 6.17466 5.59056 5.47305 5.07800 4.9696
Proportion of Variance 0.03909 0.03813 0.03125 0.02995 0.02579 0.0247
Cumulative Proportion 0.79448 0.83260 0.86386 0.89381 0.91960 0.9443
      PC13  PC14  PC15  PC16  PC17  PC18
Standard deviation   4.52699 3.95307 3.63231 2.05227 1.47604 7.476e-15
Proportion of Variance 0.02049 0.01563 0.01319 0.00421 0.00218 0.000e+00
Cumulative Proportion 0.96479 0.98042 0.99361 0.99782 1.00000 1.000e+00
```

##Graphische Darstellung der PCA

```
colors <- sampleinfo3_unique$Color_DESEQgroup

mydata = pca2$x[,1:2]
x = pca2$x[,1]
y = pca2$x[,2]

png("PCA_plot_RPKM_DESEQgroup_adjusted.png",width=2000,height=2000,res=300)
plot(mydata, col=colors,pch=19,cex=1)
text(x,y,labels=sampleinfo3_unique$Case, cex=0.6,adj=c(0.6,1.5),col=colors)
dev.off()
```

Anhang

##PCA für DeSeq-normalisierte Counts

##Einlesen der DeSeq-normalisierten Counts

```
normalizedDESEQcounts <-  
fread("GBM_IDHwt_Counts_DESEQgroups_adjusted_normalized.txt",header=TRUE,  
dec="," , sep="\t", stringsAsFactors=FALSE)
```

```
mycounts <- normalizedDESEQcounts[,-c(1)]  
mycounts <- mycounts[,c(18,1,3,5,17,6,2,13,15,12,16,10,7,8,14,9,4,11)]
```

##Gruppenzuordnung und Farbcodierung

```
group_name <- sampleinfo3_unique$New_DESEQgroup_13102022  
colnames(mycounts) <- c(group_name)
```

##PCA

```
top1000forPCA <- head(order(rowVars(mycounts), decreasing=TRUE), 1000)  
pca2 <- prcomp(t(mycounts[top1000forPCA,]), center = TRUE, scale=TRUE)  
summary(pca2)  
mypca <- as.data.frame(predict(pca2))  
label <- colnames(mycounts)  
dataforpca <- t(mycounts[top1000forPCA,])
```

```
> summary(pca2)
```

Importance of components:

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Standard deviation	18.5375	10.9986	9.90320	9.24056	7.62627	6.86003
Proportion of Variance	0.3436	0.1210	0.09807	0.08539	0.05816	0.04706
Cumulative Proportion	0.3436	0.4646	0.56268	0.64807	0.70623	0.75329

	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
Standard deviation	6.31920	6.24104	5.96931	5.50744	5.04512	4.77015
Proportion of Variance	0.03993	0.03895	0.03563	0.03033	0.02545	0.02275
Cumulative Proportion	0.79322	0.83217	0.86781	0.89814	0.92359	0.94635

	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18
Standard deviation	4.41483	3.93887	3.6473	1.72575	1.53860	8.822e-15
Proportion of Variance	0.01949	0.01551	0.0133	0.00298	0.00237	0.000e+00
Cumulative Proportion	0.96584	0.98135	0.9947	0.99763	1.00000	1.000e+00

##Graphische Darstellung der PCA

```
colors <- sampleinfo3_unique$Color_DESEQgroup
```

```
mydata = pca2$x[,1:2]
```

```
x = pca2$x[,1]
```

```
y = pca2$x[,2]
```

```
png("PCA_plot_normalizedCounts_DESEQgroup_adjusted.png",width=2000,height=2000,res  
=300)
```

```
plot(mydata, col=colors,pch=19,cex=1)
```

```
text(x,y,labels=sampleinfo3_unique$Case, cex=0.6,adj=c(0.6,1.5),col=colors)
```

```
dev.off()
```

Anhang

7.1.2.7 Volcano-Plot und Complex Heatmap Erstellung

Nachfolgende Skripte wurden durch Julia Lorenz für Volcano-Plot und Complex Heatmap im Rahmen der TSPO-PET Bildgebungsstudie modifiziert.

##Volcano-Plot

##Arbeitsverzeichnis und Laden der R-Pakete für differentielle Expressionsanalyse

```
setwd("N:/20220926_RNASeq_SABgroup/groups_HIGH-IIIvsLOW")
```

```
library("Biobase")
library("DESeq2")
library("gplots")
library("RColorBrewer")
library("FactoMineR")
library("ggplot2")
library("devtools")
library("ggbiplot")
library("genefilter")
library("dplyr")
```

##Einlesen der Counts und differentielle Expressionsanalyse

```
countdata <-
read.delim("GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022_sortHeatmap.txt",
header=TRUE)
attach(countdata)
fibroblasts <- countdata[,2:15]
rownames(fibroblasts) <- countdata[,1]
myfactors1 <-c(rep("TSPO_HIGH",5), rep("TSPO_LOW",9))
colData <- data.frame(dex = factor(myfactors1, levels=c("TSPO_LOW","TSPO_HIGH")))
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = fibroblasts, colData, formula(~ dex))
keep = rowSums(counts(dds)) >= 10
dds = dds[keep, ]

dds <- DESeq(dds)
res <- results(dds)
```

##Laden der R-Pakete für Volcano-Plot

```
library(EnhancedVolcano)
```

##Erstellen des Volcano-Plots

```
keyvals <- ifelse(
  res$log2FoldChange < -1 & res$pvalue < 0.05, 'royalblue',
  ifelse(res$log2FoldChange > 1 & res$pvalue < 0.05, 'red3',
  'grey'))
keyvals[is.na(keyvals)] <- 'grey'
names(keyvals)[keyvals == 'red3'] <- 'high'
names(keyvals)[keyvals == 'grey'] <- 'mid'
names(keyvals)[keyvals == 'royalblue'] <- 'low'

EnhancedVolcano(res,
  lab = rownames(res),
```

Anhang

```
x = 'log2FoldChange',
y = 'pvalue',
selectLab = c('STAT3','CD44','OSM','OSMR','GP130','LIFR'),
xlab = bquote(~Log[2]~ 'fold change'),
title = 'Custom colour over-ride',
pCutoff = 0.05,
FCcutoff = 1.0,
pointSize = 1.5,
labSize = 5.0,
boxedLabels = TRUE,
  shape = c(16, 16, 16, 16),
colCustom = keyvals,
colAlpha = 1,
#legendPosition = 'left',
legendLabSize = 15,
legendIconSize = 5.0,
drawConnectors = TRUE,
widthConnectors = 1.0,
colConnectors = 'black',
arrowheads = TRUE,
gridlines.major = TRUE,
gridlines.minor = FALSE,
border = 'partial',
borderWidth = 1.5,
borderColour = 'black')
```

##Complex Heatmap

##Arbeitsverzeichnis und Laden der R-Pakete für differentielle Expressionsanalyse

```
setwd("E:/20221124_Oncoprint_Heatmap/20221207_differentiallyExpressedGenes")
```

```
library("Biobase")
library("DESeq2")
library("gplots")
library("RColorBrewer")
library("FactoMineR")
library("ggplot2")
library("devtools")
library("ggbiplot")
library("genefilter")
library("dplyr")
```

##Einlesen der Counts und differentielle Expressionsanalyse

```
countdata <-
read.delim("GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022_sortHeatmap.txt",
header=TRUE)
attach(countdata)
fibroblasts <- countdata[,2:19]
rownames(fibroblasts) <- countdata[,1]
myfactors1 <-c(rep("TSPO_HIGH",9), rep("TSPO_LOW",9))
colData <- data.frame(dex = factor(myfactors1, levels=c("TSPO_LOW","TSPO_HIGH")))
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = fibroblasts, colData, formula(~ dex))
keep = rowSums(counts(dds)) >= 10
dds = dds[keep, ]
```

Anhang

```
dds <- DESeq(dds)
res <- results(dds)
```

##Laden der R-Pakete für Complex Heatmap Erstellung

```
library(ComplexHeatmap)
library(circlize)
library(RColorBrewer)
library(digest)
library(cluster)
```

##Erstellen der DeSeq-normalisierten Counts

```
mat = counts(dds, normalized = TRUE)
head(mat)
```

```
write.table(mat, file = "normalized_expression_values.txt", sep="\t", row.names=TRUE)
```

##Laden der Metadaten

```
metadata <- read.table("metadata.txt", sep = '\t', row.names = 1,header = TRUE,
stringsAsFactors = FALSE)
head(metadata)
```

##Gen-Subset erstellen basierend auf Gegensätzen für GBM-Expressionssubtypen und differentiell exprimierter Gene

```
#laden über imprt Dataset, vorher DiffExpressed.txt bearbeiten --> Symbol einfügen
differentiallyexpressed_TSPO_LOWvsHIGH <-
read.delim("E:/20220926_RNASeq_SABgroup/04_Heatmap_Volcano/Heatmap_GBMSubgro
upVerhaak2017_all18/differentiallyexpressed_TSPO_LOWvsHIGH.txt")
View(differentiallyexpressed_TSPO_LOWvsHIGH)
sig_genes_GBMSubgroupsVerhaak2017 <-
read.delim("E:/20220926_RNASeq_SABgroup/04_Heatmap_Volcano/Heatmap_GBMSubgro
upVerhaak2017_all18/sig_genes_GBMSubgroupsVerhaak2017.txt")
View(sig_genes_GBMSubgroupsVerhaak2017)

c3<- merge(sig_genes_GBMSubgroupsVerhaak2017,
differentiallyexpressed_TSPO_LOWvsHIGH, by="Symbol")
```

```
write.table(c3, file = "sig_genes_DifEx.txt", sep = "\t", dec=".", row.names = FALSE)
```

```
#gene subset aus sig_genes_DifEx.txt in sig_genes.txt kopieren
sig_genes <- read.table("sig_genes.txt", sep = '\t', header = FALSE, stringsAsFactors =
FALSE)[,1]
head(sig_genes)
```

##Kontrolle der Datenintegrität

```
dim(mat)
dim(metadata)
length(sig_genes)
```

```
# verify integrity of metadata and expression matrix:
# --check that both objects are aligned by name
```


Anhang

```
all(rownames(metadata) == colnames(mat))
```

##Aus Studiendaten das Gen-Subset ziehen

```
# Subset the expression matrix for the statistically significant genes
mat_sub1 <- mat[sig_genes,]
```

##Daten-Standardisierung

```
#scale the data to Z-scores (by row)
heat <- t(scale(t(mat_sub1)))
```

##Farbkodierung und Break-Wahl für Z Scores

```
#set colour scheme and choose breaks
myCol <- colorRampPalette(c('red', '#EEEEEE', 'blue4'))(100)
myBreaks <- seq(-3, 3, length.out = 100)
```

##Annotationsdaten aus Metadaten ziehen

```
# Create an initial data-frame of the annotation that we want to use
# In this example, the 'ann' object turns out to be the exact same as 'metadata'
ann <- data.frame(SUVmax_Faktor = metadata$SUVmax_Faktor, TSPO_Faktor =
metadata$TSPO_Faktor, expression_subgroup = metadata$expression_subgroup, condition =
metadata$condition, stringsAsFactors = FALSE)
```

##Farbkodierung für TSPO-PET, TSPO Expression, GBM-Expressionssubtypen und TSPO Cluster

```
# create the colour mapping
colours <- list(SUVmax_Faktor = c('0' = 'grey', '1' = '#beige', '2' = '#bisque1', '3' = '#bisque2',
'4' = '#bisque3', '5' = 'bisque4'),
TSPO_Faktor = c('1' = '#DADAEB', '2' = '#9E9AC8', '3' = '#6A51A3', '4' = '#3F007D', '5' =
'black'),
expression_subgroup = c('CL' = 'yellow', 'PRO' = 'Blue', 'PRO/CL' =
'#3B7A57', 'MES/CL' = '#CB181D', 'MES' = 'tomato'),
condition = c('TSPO_LOW' = 'DeepSkyBlue', 'TSPO_HIGH' = 'tomato'))
```

##Complex Heatmap Annotationsobjekt erstellen

```
# now create the ComplexHeatmap annotation object
colAnn <- HeatmapAnnotation(
df = ann,
which = 'col', # 'col' (samples) or 'row' (gene) annotation?
na_col = 'white', # default colour for any NA values in the annotation data-frame, 'ann'
col = colours,
annotation_height = 50,
annotation_width = unit(1, 'cm'),
gap = unit(1, 'mm'),
annotation_legend_param = list(
SUVmax_Faktor = list(
nrow = 5, # number of rows across which the legend will be arranged
title = 'TSPO PET',
title_position = 'topleft',
legend_direction = 'vertical',
title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
labels_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold')),
TSPO_Faktor = list(
```

Anhang

```
nrow = 5, # number of rows across which the legend will be arranged
title = 'TSPO expression',
title_position = 'topleft',
legend_direction = 'vertical',
title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
labels_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold')),
expression_subgroup = list(
  nrow = 5, # number of rows across which the legend will be arranged
  title = 'GBM expression subgroup',
  title_position = 'topleft',
  legend_direction = 'vertical',
  title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
  labels_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold')),
condition = list(
  nrow = 5, # number of rows across which the legend will be arranged
  title = 'condition',
  title_position = 'topleft',
  legend_direction = 'vertical',
  title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
  labels_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'))))

pd = packLegend()
```

##Heatmap Befehl erstellen

```
hmap <- Heatmap(heat,
  width = unit(5, "cm"), height = unit(10, "cm"),
  heatmap_legend_param = list(
    legend_direction = 'vertical',
    title = 'z-score',
    legend_width = unit(50, 'cm'),
    legend_height = unit(5.0, 'cm'),
    title_position = 'topleft',
    title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
    labels_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold')),
  cluster_rows = FALSE,
  show_row_dend = FALSE,
  row_title_side = 'right',
  row_title_gp = gpar(fontsize = 12, fontface = 'bold'),
  row_title_rot = 90,
  show_row_names = TRUE,
  row_names_gp = gpar(fontsize = 8, fontface = 'bold'),
  row_names_side = 'right',
  row_dend_width = unit(25, 'mm'),
  cluster_columns = TRUE,
  show_column_dend = TRUE,
  column_title = "",
  column_title_side = 'bottom',
  column_title_gp = gpar(fontsize = 12, fontface = 'bold'),
  column_title_rot = 0,
  show_column_names = TRUE,
  column_names_gp = gpar(fontsize = 10, fontface = 'bold'),
  column_names_max_height = unit(10, 'cm'),
  column_dend_height = unit(25, 'mm'),
```

Anhang

```
top_annotation = colAnn)  
  
##Heatmap erstellen  
#without genelabels  
draw(hmap,  
      heatmap_legend_side = 'right',  
      annotation_legend_side = 'right',  
      row_sub_title_side = 'left')
```

Anhang

7.2 Input-Parameter und Output-Prozessierung für verwendete Onlinetools

In den nachfolgenden Unterkapiteln sind für die aufgeführten Analysen vorgenommene Einstellungen für die verwendeten Onlinetools dokumentiert. Zur Platzersparnis wurde ein einfacher Zeilenabstand und Schriftgröße 11 gewählt.

7.2.1 Überrepräsentationsanalyse mit FUMA v1.4.1 GENE2FUNC

[jobinfo]

created_at=2022-10-13 14:24:09

title=diff_ALL_LowVsHigh_DESEQgroups

[version]

FUMA=v1.4.1

MsigDB=v7.0

WikiPathways=20191010

GWAScatalog=e104_r2021-09-15

[params]

gtype=text

bkgtype=select

bkgval=protein_coding

ensembl=v92

gsFileN=0

gsFiles=NA

gene_exp=GTEX/v8/gtex_v8_ts_avg_log2TPM:GTEX/v8/gtex_v8_ts_general_avg_log2TPM

MHC=0

adjPmeth=fdr_bh

adjPcut=0.05

minOverlap=2

Number of background genes 20260

Number of input genes with recognised Ensembl ID 1468

Number of background genes with recognised Ensembl ID 20260

Background genes without recognised Ensembl ID NA

Number of input genes with unique entrez ID 1358

Number of background genes with unique entrez ID 19277

Output wurde für signifikante Anreicherungen gefiltert und mit dem Output der anderen Onlinetools verglichen.

Anhang

7.2.2 Gegensatz-Anreicherungsanalyse mit GSEA am Beispiel des Hallmark Gegensatzes für DeSeq-normalisierte Counts von TSPO LOW vs TSPO HIGH Studienfällen

```
# Job: 469045
# User: JuliaLorenz
# Submitted: 2022-10-13 11:42:38.0
# Completed: 2022-10-13 11:45:21.873
# ET(ms): 163873 server: https://cloud.genepattern.org/gp/
# Module: GSEA urn:lsid:broad.mit.edu:cancer.software.genepattern.module.analysis:00072:20.3.5
# Parameters:
# expression.dataset =
GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022.LOW.vs.HIGH.normalized_counts.gct
https://cloud.genepattern.org/gp/users/JuliaLorenz/tmp/run5593925813370394286.tmp/expression.dat
aset/1/GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022.LOW.vs.HIGH.normalized_counts.gct
# gene.sets.database = gene.sets.database.list.txt
https://cloud.genepattern.org/gp/users/JuliaLorenz/tmp/run2935912788227876021.tmp/gene.sets.datab
ase.list.txt
# number.of.permutations = 1000
# phenotype.labels = TSPO-study_RNASeq.cls
https://cloud.genepattern.org/gp/users/JuliaLorenz/tmp/run6603672776448157783.tmp/phenotype.labe
ls/2/TSPO-study_RNASeq.cls
# target.profile =
# collapse.dataset = Collapse
# permutation.type = gene_set
# chip.platform.file =
ftp://ftp.broadinstitute.org/pub/gsea/annotations_versioned/Human_Gene_Symbol_with_Remapping_
MSigDB.v2022.1.Hs.chip
# scoring.scheme = weighted
# metric.for.ranking.genes = Signal2Noise
# gene.list.sorting.mode = real
# gene.list.ordering.mode = descending
# max.gene.set.size = 500
# min.gene.set.size = 15
# collapsing.mode.for.probe.sets.with.more.than.one.match = Max_probe
# normalization.mode = meandiv
# randomization.mode = no_balance
# omit.features.with.no.symbol.match = true
# make.detailed.gene.set.report = true
# median.for.class.metrics = false
# number.of.markers = 100
# plot.graphs.for.the.top.sets.of.each.phenotype = 200
# random.seed = timestamp
# save.random.ranked.lists = false
# create.svg = false
# selected.gene.sets =
# output.file.name = <expression.dataset_basename>.zip
# alt.delim =
# create.gcts = false
# dev.mode = false
```

Output wurde für signifikante Anreicherungen gefiltert und mit dem Output der anderen Onlinetools verglichen.

Anhang

7.2.3 Einzelproben-Gensatz-Anreicherungsanalyse mit ssGSEA am Beispiel des GBM-Expressionsubtypen Gensatzes von Brennan et al. 2013 für DeSeq-normalisierte Counts von TSPO LOW vs TSPO HIGH Studienfällen

```
# Job: 478070
# User: JuliaLorenz
# Submitted: 2022-11-24 12:01:57.0
# Completed: 02022-04-24 12:04:08.705
# ET(ms): 131705 server: https://cloud.genepattern.org/gp/
# Module: ssGSEA urn:lsid:broad.mit.edu:cancer.software.genepattern.module.analysis:00270:10.1.0
# Parameters:
# input.gct.file =
GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022.LOW.vs.HIGH.normalized_counts.gct
https://cloud.genepattern.org/gp/users/JuliaLorenz/tmp/run8848122891631531073.tmp/input.gct.file/1
/GBM_IDHwt_Counts_SABgroups_adjusted_26092022.LOW.vs.HIGH.normalized_counts.gct # file
size 11906319 47590 18
# output.file.prefix =
# gene.sets.database.files = gene.sets.database.files.list.txt
https://cloud.genepattern.org/gp/users/JuliaLorenz/tmp/run4071205359167157008.tmp/gene.sets.datab
ase.files.list.txt # file size 127
# gene.symbol.column = Column 1
# gene.set.selection = ALL
# sample.normalization.method = none
# weighting.exponent = 0.75
# min.gene.set.size = 10
# combine.mode = combine.add
```

Output wurde auf Score-Abweichungen < 10 % zwischen den GBM-Expressionsubtypen je Fall geprüft. Bei positiven Abweichungstest wurde dem betroffenen Fall ein gemischter Expressionsubtyp zugeordnet, bei negativem Abweichungstest der Expressionsubtyp mit dem höheren Score.

7.2.4 Dekonvolution mit dREG BayesPrism und Output-Prozessierung

##Dekonvolution

```
Using: R --vanilla --slave --args 16 /ocean/projects/bio210011p/dreg2016/BayesPrism-gateway -x
matBulk_All_TPM_forStudy_05122022.txt -x.type tsv -ref
matREF_All_TPM_forStudy_05122022.txt -ref.file.type tsv -ref.data.type scRNA -file.cell.type
cellprofile3_GSE131928.csv -species hs -out ALL_StudyCases_out <
/ocean/projects/bio210011p/dreg2016/BayesPrism-gateway/run_bayes.R
CPU cores: 16
Bulk count matrix: matBulk_All_TPM_forStudy_05122022.txt
Bulk file type: tsv
Reference count matrix: matREF_All_TPM_forStudy_05122022.txt
Reference file type: tsv
Reference data type: scrna
file of cell type: cellprofile3_GSE131928.csv
Output prefix: ALL_StudyCases_out
Species: hs
1) ----- Load count matrix
[1] "[X matrix]\n"
int [1:19483, 1:18] 17 1 41 8 9 9 16 15 11 23 ...
- attr(*, "dimnames")=List of 2
..$: chr [1:19483] "TSPAN6" "TNMD" "DPM1" "SCYL3" ...
..$: chr [1:18] "TSPO_4_A_Kryo_14" "TSPO_6_II_Kryo_4" "TSPO9_12_II" "TSPO10_3" ...
```

Anhang

```
NULL
  TSPO_4_A_Kryo_14 TSPO_6_II_Kryo_4 TSPO9_12_II TSPO10_3 TSPO11_13
TSPAN6           17           25           13           7           17
TNMD              1            1            0            1            0
DPM1             41           37           55           26           26
SCYL3            8            8            4            5            4
C1orf112         9            7           12            2            4
FGR              9            9           38            5            6
[1] "[Reference matrix]\n"
num [1:19483, 1:5461] 0 0 0 0 0 ...
- attr(*, "dimnames")=List of 2
..$: chr [1:19483] "A1BG" "A1BG-AS1" "A1CF" "A2M" ...
..$: chr [1:5461] "MGH101_P1_A04" "MGH101_P1_A05" "MGH101_P1_A07"
"MGH101_P1_A09" ...
NULL
  MGH101_P1_A04 MGH101_P1_A05 MGH101_P1_A07 MGH101_P1_A09
MGH101_P1_A10
A1BG      0.00000  0.000  0.00000  0.00000  0.00000
A1BG-AS1  0.00000  0.000  0.00000  0.00000  0.00000
A1CF      0.00000  0.000  0.00000  0.00000  0.00000
A2M       0.00000  5.327  0.00000  8.69834  8.20509
A2M-AS1   0.00000  0.000  0.00000  0.00000  0.00000
A2ML1     0.06488  0.000  0.07176  0.07724  0.04684
[1] "[Cell type]\n"
'data.frame': 5461 obs. of 4 variables:
 $ cell_id : chr "MGH101_P1_A04" "MGH101_P1_A05" "MGH101_P1_A07"
"MGH101_P1_A09" ...
 $ cell_type : chr "Macrophages" "Macrophages" "Macrophages" "Macrophages" ...
 $ cell_subtype: chr "Macrophages" "Macrophages" "Macrophages" "Macrophages" ...
 $ tumor_state : int 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
NULL
  cell_id cell_type cell_subtype tumor_state
1 MGH101_P1_A04 Macrophages Macrophages 0
2 MGH101_P1_A05 Macrophages Macrophages 0
3 MGH101_P1_A07 Macrophages Macrophages 0
4 MGH101_P1_A09 Macrophages Macrophages 0
5 MGH101_P1_A10 Macrophages Macrophages 0
6 MGH101_P1_A11 Macrophages Macrophages 0
  cell_id cell_type cell_subtype tumor_state
1 MGH101_P1_A04 Macrophages Macrophages 0
2 MGH101_P1_A05 Macrophages Macrophages 0
3 MGH101_P1_A07 Macrophages Macrophages 0
4 MGH101_P1_A09 Macrophages Macrophages 0
5 MGH101_P1_A10 Macrophages Macrophages 0
* Warning: 5461 Cells in your reference matrix are used to proceed the next step.
null device
1
null device
1
Gene symbols detected. Recommend to use EMSEMBLE IDs for more unique mapping.
Gene symbols detected. Recommend to use EMSEMBLE IDs for more unique mapping.
./file194eb466051a9/
./file194eb466051a9/ALL_StudyCases_out.stat_scRNA_outlier.pdf
./file194eb466051a9/ALL_StudyCases_out.bk.stat_bulk_outlier.pdf
./file194eb466051a9/ALL_StudyCases_out.cor.cs_cor_phi.pdf
```

Anhang

```
./file194eb466051a9/ALL_StudyCases_out.cor.ct_cor_phi.pdf
```

```
2) ----- Start bayesPrism
```

```
Gene symbols detected. Recommend to use EMSEMBLE IDs for more unique mapping.
```

```
number of genes filtered in each category:
```

```
  Rb   Mrp other_Rb  chrM MALAT1  chrX  chrY
  89   77   41     0    1   782   81
```

```
A total of 1027 genes from Rb Mrp other_Rb chrM MALAT1 chrX chrY have been excluded
```

```
A total of 840 gene expressed in fewer than 5 cells have been excluded
```

```
Gene symbols detected. Recommend to use EMSEMBLE IDs for more unique mapping.
```

```
number of cells in each cell state
```

```
cell.state.labels
```

```
      T cells   Oligodendrocytes   Macrophages Malignant cells_tumor
      28         211             526         4696
```

```
Number of outlier genes filtered from mixture = 4
```

```
Aligning reference and mixture...
```

```
Normalizing reference...
```

```
Called from: top level
```

```
Run Gibbs sampling...
```

```
Current time: 2022-12-06 04:10:08
```

```
Estimated time to complete: 8mins
```

```
Estimated finishing time: 2022-12-06 04:17:08
```

```
Start run...
```

```
R Version: R version 4.0.3 (2020-10-10)
```

```
Update the reference matrix ...
```

```
Run Gibbs sampling using updated reference ...
```

```
Current time: 2022-12-06 04:13:54
```

```
Estimated time to complete: 7mins
```

```
Estimated finishing time: 2022-12-06 04:20:17
```

```
Start run...
```

```
3) ----- Learning embeddings of tumor expression BayesPrism
```

```
4) ----- save RDS.
```

```
./file194eb3a9e8f6a/
```

```
./file194eb3a9e8f6a/bp.posterior.initial.cellType.theta.rds
```

```
./file194eb3a9e8f6a/bp.posterior.theta_f.theta.rds
```

```
./file194eb3a9e8f6a/bp.posterior.initial.cellType.theta.cv.rds
```

```
./file194eb3a9e8f6a/bp.posterior.theta_f.theta.cv.rds
```

```
5) ----- End successfully.
```

Laden der dREG Output .RData Datei in R Studio und Herausfiltern der Zellfraktionen wie folgt:

```
##Herausfiltern der Zellfraktionen
```

```
bp
```

```
theta <- get.fraction (bp=bp,  
+                      which.theta="final",  
+                      state.or.type="type")
```

```
head(theta)
```

```
rownames(theta)
```

```
dim(theta)
```


Anhang

```
write.table(theta, file = "GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adj_26092022_dREG_fractions.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

##Herausfiltern der Genexpressionsdaten der Zellfraktionen

```
Z.tumor <- get.exp (bp=bp,
                    state.or.type="type",
                    cell.name="Malignant cells_tumor")
```

```
Z.macrophage <- get.exp (bp=bp,
                        state.or.type="type",
                        cell.name="Macrophages")
```

```
Z.oligo <- get.exp (bp=bp,
                   state.or.type="type",
                   cell.name="Oligodendrocytes")
```

```
Z.tcell <- get.exp (bp=bp,
                   state.or.type="type",
                   cell.name="T cells")
```

```
write.table(Z.tumor, file = "GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adj_26092022_dREG_tumor.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

```
write.table(Z.macrophage, file =
"GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adj_26092022_dREG_macrophage.txt", sep = "\t", dec=".",
row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

```
write.table(Z.oligo, file = "GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adj_26092022_dREG_oligo.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

```
write.table(Z.tcell, file = "GBM_IDHwt_TPM_SABgroups_adj_26092022_dREG_tcell.txt", sep =
"\t", dec=".", row.names = TRUE,col.names=TRUE)
```

7.3 IDH-wt GBMs der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte

Tabelle 22: Detailinformationen der IDH-wt GBM-Patientenproben aus der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte

Fallparameter		Bildgebung			Probenentnahme und -asservierung			Immunhistochemie		Molekular									
TSPO-ID ¹	Entität	WHO-Grade ²	IDH1-Status ³	MGMT-Methylierung ⁴	TER-T-Status ⁵	Rezidiv ⁷	TSPO-PET (SUVmax) ⁸	Bindungsstyp ⁹	FET-PET Anreicherung ¹⁰	MRT Anreicherung ¹¹	OP ¹²	Block ID ¹³	Proben ID ¹⁴	Tumorgehaltgruppe ¹⁵	Asservierung ¹⁶	%Area positiv für TSPO ¹⁷	%Area positiv für CD68 ¹⁸	TSPO H Score ¹⁹	Molekular RNA-Seq ²⁰
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	1,74	LAB	ja	nein	Resektion	I	I	kein Tumor	FFPE	14,66	11,52	147,5	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	1,44	LAB	ja	nein	Resektion	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	15,53	10,99	197,5	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	2,38	LAB	ja	nein	Resektion	III	III	vereinzelte Tumor	FFPE	17,01	3,79	135	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	1,78	LAB	ja	ja	Resektion	IV	IV	kein Tumor	FFPE	12,13	12,1	143,5	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	2,41	LAB	ja	nein	Resektion	VI	VI	kein Tumor	FFPE	12,82	7,94	177,5	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	1,97	LAB	ja	nein	Resektion	VII	VII	vereinzelte Tumor	FFPE	14,58	13,35	167,5	nd
TSPO-01	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C238T mut	Primär	2,27	LAB	ja	ja	Resektion	VIII	VIII	kein Tumor	FFPE	nd	nd	197,5	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,02	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	Infiltrationszone	FFPE	17,63	8,8	245	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,21	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	sokler Tumor	Kryo	17,9	6,61	265	sequenziert
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,21	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	sokler Tumor	FFPE	9,57	5,84	117,5	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,62	HAB	ja	ja	Biopsie	A	A	kein Tumor	FFPE	5,65	nd	70	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,29	HAB	ja	ja	Biopsie	A	A	kein Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,89	HAB	ja	ja	Biopsie	B	B	sokler Tumor	FFPE	21,62	3,67	220	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	2,34	HAB	ja	ja	Biopsie	B	B	sokler Tumor	FFPE	19,76	4,67	215	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	2,41	HAB	ja	ja	Biopsie	B	B	sokler Tumor	FFPE	18,78	4,55	195	nd
TSPO-04	GBM	WHO 4	IDHwt	partiell methylert	C238T mut	Rezidiv	1,32	HAB	ja	ja	Biopsie	B	B	sokler Tumor	FFPE	19,12	4,03	190	sequenziert
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,56	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	kein Tumor	FFPE	nd	nd	130	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,45	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	Infiltrationszone	Kryo	16,14	6,02	172,5	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,47	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	vereinzelte Tumor	FFPE	17	6,99	175	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,51	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,56	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	vereinzelte Tumor	FFPE	15,9	7,31	155	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,61	HAB	ja	nein	Biopsie	A	A	vereinzelte Tumor	FFPE	14,49	7,35	185	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,61	HAB	ja	nein	Biopsie	B	B	vereinzelte Tumor	FFPE	15,05	7,77	175	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,57	HAB	ja	nein	Biopsie	B	B	vereinzelte Tumor	FFPE	17,61	7,41	175	nd
TSPO-05	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,51	HAB	ja	nein	Biopsie	B	B	vereinzelte Tumor	FFPE	19,32	4,91	155	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	1,21	MAB	ja	ja	Biopsie	I	I	kein Tumor	Kryo	15,92	6,07	140	nicht sequenziert
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	MAB	nd	nein	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	1,07	MAB	ja	ja	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	FFPE	17,67	13,27	145	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,91	MAB	ja	ja	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	FFPE	18,1	12,71	170	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,86	MAB	ja	nein	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	FFPE	19,01	11,06	205	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,76	MAB	nein	nein	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	FFPE	14,03	3,43	220	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,91	MAB	nein	nein	Biopsie	II	II	Infiltrationszone	FFPE	15,7	10,2	175	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,91	MAB	nein	nein	Biopsie	II	II	Infiltrationszone	FFPE	14,3	10,59	160	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,86	MAB	nd	nd	Biopsie	II	II	sokler Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,86	MAB	nein	nein	Biopsie	II	II	Infiltrationszone	FFPE	14,84	5,25	190	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,88	MAB	ja	nein	Biopsie	III	III	Infiltrationszone	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,54	MAB	nd	nd	Biopsie	III	III	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,54	MAB	ja	nein	Biopsie	III	III	vereinzelte Tumor	FFPE	13,75	4,06	150	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,5	MAB	nd	nein	Biopsie	III	III	kein Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,5	MAB	ja	nein	Biopsie	III	III	vereinzelte Tumor	FFPE	12,46	3,64	160	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,51	MAB	ja	nein	Biopsie	III	III	vereinzelte Tumor	FFPE	12,63	4,83	150	nd
TSPO-06	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	0,53	MAB	ja	nein	Biopsie	III	III	vereinzelte Tumor	FFPE	12,14	2,61	150	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	sokler Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	Infiltrationszone	FFPE	18,99	4,33	160	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	sokler Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	sokler Tumor	FFPE	20,24	7,87	190	nicht sequenziert
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	sokler Tumor	FFPE	20,77	5,9	180	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	I	I	kein Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	nein	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	16,73	8,95	135	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	14,14	11,65	140	nicht sequenziert
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	kein Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	15,58	9,07	160	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	10,17	10,17	145	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	nein	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	17,42	9,19	190	nd
TSPO-09	HGBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C238T mut	Primär	nd	nd	ja	nein	Biopsie	II	II	vereinzelte Tumor	FFPE	19,55	10,94	180	nd

Anhang

Fallparameter				Bildgebung				Probenentnahme und -asservation				Immunhistochemie		Molekular					
TSPO-ID ¹	Entität	WHO-Grad ²	IDH-Status ³	MGMT-Methylierung ⁵	TERT-Status ⁶	Reziiv ⁷	TSPO-PET SUVmax ⁸	Bindungstyp ⁹	FEET-PET Anreicherung ¹⁰	MRT Anreicherung ¹¹	Op ¹²	Block ID ¹³	Proben ID ¹⁴	Tumorgehaltgruppe ¹⁵	Asservation ¹⁶	%Area positiv für TSPO ¹⁷	%Area positiv für CD68 ¹⁸	TSPO H Score ¹⁹	RNA-Seq ²⁰
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	ja	ja	Resektion	II	II	solider Tumor	FFPE	20,91	4,96	212,5	nd
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	ja	ja	Resektion	III	III	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	nein	nein	Resektion	III	III	verezelt Tumor	FFPE	12,23	6,95	130	nd
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	nein	nein	Resektion	III	III	verezelt Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	nein	nein	Resektion	V	V	verezelt Tumor	FFPE	10,34	9,14	141,25	nd
TSPO-0913	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	nd	nein	nein	Resektion	V	V	verezelt Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,87 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	34	verezelt Tumor	FFPE	nd	nd	160	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,76 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	32	verezelt Tumor	FFPE	10,74	4,43	170	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,94 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	31	verezelt Tumor	FFPE	21,59	8,2	245	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,94 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	30	solider Tumor	FFPE	19,85	3,74	247,5	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,33 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	25	solider Tumor	FFPE	21,37	5,97	232,5	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,06 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	21	nd	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,06 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	20	solider Tumor	FFPE	17,91	5,56	222,5	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,97 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	19	solider Tumor	FFPE	4,87	5,6	230	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	0,76 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	18	solider Tumor	FFPE	16,72	5,6	202,5	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,49 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	4	solider Tumor	FFPE	20,88	10,02	190	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	HAB	ja	ja	Biopsie	B	3	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,53 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	2	solider Tumor	FFPE	19,22	6,6	172,5	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	nd	HAB	ja	ja	Biopsie	B	1	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-10	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C228Tmut	Primär	1,46 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	ZP	solider Tumor	FFPE	18,12	1,84	165	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	nd	MAB	nein	nein	Biopsie	A	21	kein Tumor	FFPE	nd	nd	62,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,52 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	A	20	verezelt Tumor	FFPE	16,51	11,35	160	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,58 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	A	16	Infiltrationszone	FFPE	17,84	8,3	182,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	nd	MAB	nd	nein	Biopsie	A	15	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,49 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	A	14	Infiltrationszone	FFPE	17,22	6,78	187,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	nd	MAB	nd	nein	Biopsie	A	13	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,42 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	A	12	solider Tumor	FFPE	17,41	7,08	202,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,5 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	B	11	solider Tumor	FFPE	18	nd	222,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,39 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	B	9	solider Tumor	FFPE	19,91	3,1	220	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,4 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	B	8	solider Tumor	FFPE	18,85	5,8	230	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,32 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	B	7	solider Tumor	FFPE	17,92	6,4	210	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,3 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	C	5	solider Tumor	FFPE	4,52	4,52	185	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,17 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	C	4	solider Tumor	FFPE	18,96	4,76	192,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,19 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	C	3	solider Tumor	FFPE	17,65	5,28	187,5	nd
TSPO-11	GBM	WHO 4	IDHwt	methyliert	C250Tmut	Primär	2,19 MAB	MAB	ja	nein	Biopsie	C	2	solider Tumor	FFPE	19,01	6,58	170	nd
TSPO-13	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C250Tmut	Primär	0,82 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	I	I	kein Tumor	FFPE	12,4	5,07	140	nd
TSPO-13	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C250Tmut	Primär	1,62 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	I	I	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-13	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C250Tmut	Primär	1,62 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	II	II	Infiltrationszone	FFPE	10,12	9,61	147,5	nd
TSPO-14	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,77 nd	nd	ja	ja	Resektion	I	I	solider Tumor	FFPE	16,27	2,64	162,5	nd
TSPO-14	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	2,94 nd	nd	ja	nein	Resektion	II	II	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-14	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	2,94 nd	nd	ja	nein	Resektion	II	II	solider Tumor	FFPE	22,31	4,05	184,75	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,7 HAB	HAB	ja	nein	Resektion	VII	VII	solider Tumor	FFPE	21,65	nd	205	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,64 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	IX	IX	solider Tumor	FFPE	18,4	4,27	152,5	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,77 HAB	HAB	nein	nein	Resektion	VI	VI	verezelt Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,7 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	VII	VII	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,64 HAB	HAB	ja	ja	Resektion	IX	IX	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-19	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,77 HAB	HAB	nein	nein	Resektion	VI	VI	Infiltrationszone	FFPE	10,45	12,32	177,5	nd
TSPO-21	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,24 MAB	MAB	ja	ja	Resektion	IIA	IIA	verezelt Tumor	FFPE	14,69	10,8	163,75	nd
TSPO-21	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,28 MAB	MAB	ja	ja	Resektion	IIA	IIA	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd
TSPO-21	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,24 MAB	MAB	ja	ja	Resektion	IIA	IIA	verezelt Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-21	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,28 MAB	MAB	ja	ja	Resektion	IIA	IIA	solider Tumor	FFPE	3,11	nd	100	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,13 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	38	kein Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	0,98 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	36	verezelt Tumor	FFPE	10,37	11,0	110	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	0,99 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	35	Infiltrationszone	FFPE	nd	nd	185	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	0,99 HAB	HAB	nein	nein	Biopsie	A	24	Infiltrationszone	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,11 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	22	verezelt Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,11 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	21	kein Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,09 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	20	verezelt Tumor	FFPE	17,69	11,78	190	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,14 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	18	Infiltrationszone	FFPE	12,87	8,32	125	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,14 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	17	kein Tumor	FFPE	14,95	8,13	102,5	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	nd	HAB	ja	ja	Biopsie	B	6	verezelt Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,03 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	B	4	kein Tumor	FFPE	6,15	7,62	150	nd
TSPO-28	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methyliert	C228Tmut	Rezidiv	1,15 HAB	HAB	ja	ja	Biopsie	A	39	verezelt Tumor	FFPE	15,31	5,85	97,5	nd

Anhang

Endität				Fallparameter				Bildgebung				Probenahme und -asservation				Immunhistochemie				Molekular
TSPO-ID ¹	WHO-Grad ²	IDH-Status ³	MGMT-Methylierung ⁵	TERT-Status ⁶	Reaktiv ⁷	TSPO-PET SUVmax ⁸	Bindungstyp ⁹	FEI-PET Anreicherung ¹⁰	MRT Anreicherung ¹¹	Op ¹²	Block ID ¹³	Proben ID ¹⁴	Tumorgehaltgruppe ¹⁵	Asservation ¹⁶	%Area positiv für TSPO ¹⁷	%Area positiv für CD68 ¹⁸	TSPO H Score ¹⁹	RNA-Seq ²⁰		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,09 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-24	Infiltrationszone	FFPE	17,15	9,28	155	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,09 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-23	solitär Tumor	FFPE	15,28	9,67	145	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,09 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-22	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,09 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-21	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,09 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-20	solitär Tumor	FFPE	14	5,81	165	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,06 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-19	solitär Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,08 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie A	A	-18	solitär Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,08 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-16	solitär Tumor	FFPE	12,96	5,45	180	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,2 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-14	solitär Tumor	FFPE	10,51	9,22	140	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,21 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-13	solitär Tumor	FFPE	nd	nd	238	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,23 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-12	solitär Tumor	FFPE	8,57	9,83	160	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,18 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-8	solitär Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,18 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-7	nd	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,18 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-6	solitär Tumor	FFPE	14,01	8,82	150	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,31 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie B	B	-5	solitär Tumor	FFPE	18,14	6,03	135	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,34 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	-3	solitär Tumor	FFPE	12,99	7,53	175	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,29 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	-2	solitär Tumor	FFPE	13,15	8,04	180	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,29 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	-1	solitär Tumor	FFPE	15,72	4,68	210	nd		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,2 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	ZP	nd	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,19 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	-1	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-29 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C250T mut	Primär	1,14 MAB	MAB	ja	ja	Biopsie C	C	-2	solitär Tumor	FFPE	nd	nd	nd	nd		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,38 nd	nd	ja	ja	Resektion III	III	III	Infiltrationszone	FFPE	11,86	6,94	152,5	nd		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,4 nd	nd	ja	ja	Resektion III	III	III	solitär Tumor	FFPE	17,44	6,13	192,5	nd		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,51 nd	nd	ja	nein	Resektion IV	IV	I	Infiltrationszone	Kryo	14,4	8,38	147,5	nd		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,38 nd	nd	ja	ja	Resektion III	III	III	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,4 nd	nd	ja	ja	Resektion III	III	III	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,51 nd	nd	ja	nein	Resektion IV	IV	IV	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-43 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezidiv	1,51 nd	nd	ja	nein	Resektion IV	IV	IV	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,77 nd	nd	ja	ja	Biopsie IA	IA	-10	vereinzelte Tumor	FFPE	16,68	8,3	178,75	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,83 nd	nd	ja	ja	Biopsie IA	IA	-9	Infiltrationszone	FFPE	12,43	3,74	145	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	1,07 nd	nd	ja	ja	Biopsie IA	IA	-6	solitär Tumor	Kryo	13,16	3,44	160	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	1,07 nd	nd	ja	ja	Biopsie IA	IA	-5	solitär Tumor	FFPE	14,27	1,78	165	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	1,09 nd	nd	ja	ja	Biopsie IA	IA	-4	solitär Tumor	FFPE	15,21	0,37	165	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	1,06 nd	nd	ja	ja	Biopsie IB	IB	-2	solitär Tumor	FFPE	nd	1,05	210	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,95 nd	nd	ja	ja	Biopsie IB	IB	-1	solitär Tumor	Kryo	13,25	1,74	185	sequenziert		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,91 nd	nd	ja	nein	Biopsie IB	IB	ZP	solitär Tumor	FFPE	14,32	3,9	170	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,78 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-16	Infiltrationszone	FFPE	16,56	2,26	209	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,75 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-15	Infiltrationszone	FFPE	16,16	1,43	190	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,69 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-12	Infiltrationszone	FFPE	13,89	2,25	170	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,71 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-11	Infiltrationszone	FFPE	14,78	1,15	170	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,72 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-9	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,72 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-8	solitär Tumor	FFPE	13,72	3,37	195	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,73 nd	nd	nein	nein	Biopsie IA	IA	-7	Infiltrationszone	FFPE	13,41	1,42	150	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,76 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-6	vereinzelte Tumor	FFPE	12,01	3,97	150	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,84 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-5	vereinzelte Tumor	FFPE	14,16	4,6	160	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,86 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-4	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,86 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-3	Infiltrationszone	FFPE	14,94	3,63	190	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,84 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-2	Infiltrationszone	FFPE	14,83	2,49	155	nd		
TSPO-45 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	methylert	C228T mut	Primär	0,84 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	-1	Infiltrationszone	FFPE	14,06	4,62	160	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,84 nd	nd	nein	nein	Biopsie IB	IB	ZP	Infiltrationszone	FFPE	12,95	2,62	160	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,55 nd	nd	ja	ja	Biopsie A	A	-26	kein Tumor	FFPE	11,79	4,93	130	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,62 nd	nd	ja	ja	Biopsie A	A	-22	solitär Tumor	FFPE	19,58	7,13	210	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,59 nd	nd	ja	ja	Biopsie A	A	-21	solitär Tumor	FFPE	18,35	6,97	210	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,58 nd	nd	ja	ja	Biopsie A	A	-20	solitär Tumor	FFPE	17,36	8,83	240	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,55 nd	nd	ja	nein	Biopsie A	A	-19	Infiltrationszone	FFPE	22,03 nd	nd	nd	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,42 nd	nd	nein	nein	Biopsie B	B	-17	kein Tumor	FFPE	10,14	4,06	170	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,37 nd	nd	nein	nein	Biopsie B	B	-16	kein Tumor	FFPE	11,95	6,15	130	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,35 nd	nd	nein	nein	Biopsie B	B	-15	kein Tumor	FFPE	9,97	5,32	140	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,35 nd	nd	nein	nein	Biopsie B	B	-14	kein Tumor	FFPE	11,38	6	135	nd		
TSPO-53 GBM	WHO-4 IDHwt	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,34 nd	nd	nein	nein	Biopsie B	B	-13	kein Tumor	FFPE	11,08	6,86	145	nd		

Anhang

Fallparameter			Bildgebung				Probentnahme und -aservation				Immunhistochemie			Molekular					
TSPO ID ¹	Entität WHO2021 ²	WHO-Grad ³	IDHW-Status ⁴	MGMT-Methylierung ⁵	TERT-Status ⁶	Reziiv ⁷	TSPO-PET SUVmax ⁸	Bindungstyp ⁹	FEET-PET Anreicherung ¹⁰	MRT Anreicherung ¹¹	Op ¹²	Block ID ¹³	Proben ID ¹⁴	Tumorgehaltgruppe ¹⁵	Asservation ¹⁶	%Area positiv für TSPO ¹⁷	%Area positiv für CD68 ¹⁸	TSPO H Score ¹⁹	RNA-Seq ²⁰
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,33	nd	nein	nein	Biopsie	C-12	vereinzelte Tumor	FPPE	15,68	9,02	150	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,33	nd	nein	nein	Biopsie	C-11	vereinzelte Tumor	FPPE	20,34	8,45	145	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,34	nd	nein	nein	Biopsie	C-10	vereinzelte Tumor	FPPE	15,9	7,31	150	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,41	nd	nein	nein	Biopsie	C-9	vereinzelte Tumor	FPPE	19,56	9,02	170	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,4	nd	nein	nein	Biopsie	C-8	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,38	nd	nein	nein	Biopsie	C-7	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,35	nd	nein	nein	Biopsie	C-6	vereinzelte Tumor	FPPE	22,68	9,82	150	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,34	nd	nein	nein	Biopsie	D-5	vereinzelte Tumor	FPPE	nd	11,18	nd	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,38	nd	nein	nein	Biopsie	D-4	vereinzelte Tumor	FPPE	20,29	nd	160	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,35	nd	nein	nein	Biopsie	D-3	vereinzelte Tumor	FPPE	17,81	12,35	155	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,32	nd	nein	nein	Biopsie	D-2	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,3	nd	nein	nein	Biopsie	D-1	kein Tumor	FPPE	19,86	10,6	140	nd	
TSPO-53	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,28	nd	nein	nein	Biopsie	D-ZP	kein Tumor	FPPE	17,84	9,82	170	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,77	HAB	nein	nein	Biopsie	A-19	kein Tumor	FPPE	16,37	9,21	135	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,77	HAB	nein	nein	Biopsie	A-18	Infiltrationszone	FPPE	15,49	9,1	165	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,7	HAB	nein	nein	Biopsie	A-14	Infiltrationszone	FPPE	16,25	nd	160	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,73	HAB	nein	nein	Biopsie	A-13	Infiltrationszone	FPPE	15,86	nd	155	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,77	HAB	nein	nein	Biopsie	A-12	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	135	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,78	HAB	nein	nein	Biopsie	A-11	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,8	HAB	nein	nein	Biopsie	A-10	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	150	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,82	HAB	nein	nein	Biopsie	B-9	Infiltrationszone	FPPE	13,31	4,56	170	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,8	HAB	nein	nein	Biopsie	B-8	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,8	HAB	nein	nein	Biopsie	B-7	Infiltrationszone	FPPE	11,01	5,63	185	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,78	HAB	nein	nein	Biopsie	B-6	Infiltrationszone	FPPE	13,47	6,53	175	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,75	HAB	nein	nein	Biopsie	B-5	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,68	HAB	ja	nein	Biopsie	B-4	Infiltrationszone	FPPE	15,63	4,98	160	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,64	HAB	ja	nein	Biopsie	B-3	Infiltrationszone	FPPE	13,85	7,69	160	nd	
TSPO-57	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,62	HAB	ja	nein	Biopsie	B-2	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd	
TSPO-65	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	0,55	HAB	ja	nein	Biopsie	B-1	Infiltrationszone	FPPE	13,55	4,845	145	nd	
TSPO-65	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,98	nd	ja	ja	Resektion	I	solider Tumor	FPPE	18,98	4,1	165	nd	
TSPO-65	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,84	nd	ja	ja	Resektion	II	solider Tumor	FPPE	13,42	6,15	165	nd	
TSPO-65	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Primär	1,84	nd	ja	ja	Resektion	II	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,54	HAB	nein	nein	Biopsie	A-15	vereinzelte Tumor	FPPE	nd	nd	nd	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,59	HAB	ja	nein	Biopsie	A-13	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	nd	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,47	HAB	ja	nein	Biopsie	A-12	solider Tumor	FPPE	8,39	2,75	140	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,47	HAB	ja	nein	Biopsie	A-11	solider Tumor	FPPE	6,75	3,93	85	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,46	HAB	ja	nein	Biopsie	A-7	solider Tumor	FPPE	7,9	4,8	120	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,47	HAB	ja	nein	Biopsie	A-6	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,47	HAB	ja	nein	Biopsie	A-5	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,44	HAB	ja	nein	Biopsie	A-4	solider Tumor	FPPE	8,38	4,24	140	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,43	HAB	ja	nein	Biopsie	B-3	solider Tumor	FPPE	7,57	3,74	140	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,42	HAB	ja	nein	Biopsie	B-2	solider Tumor	FPPE	10,57	6,64	200	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,39	HAB	nein	nein	Biopsie	B-1	solider Tumor	FPPE	9,13	6,4	160	nd	
TSPO-70	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	0,39	HAB	nein	nein	Biopsie	ZP	solider Tumor	FPPE	8,72	3,96	160	nd	
TSPO-72	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	wt	Primär	2,02	nd	nein	nein	Resektion	B	solider Tumor	FPPE	11,91	5,88	165	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,14	HAB	ja	ja	Resektion	I	solider Tumor	FPPE	22,46	10,63	180	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,3	HAB	ja	ja	Biopsie	A-24	kein Tumor	FPPE	18,18	15,27	140	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,33	HAB	ja	ja	Biopsie	A-23	vereinzelte Tumor	FPPE	19,73	12,55	150	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,67	HAB	ja	ja	Biopsie	A-22	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,67	HAB	ja	ja	Biopsie	A-20	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,84	HAB	ja	ja	Biopsie	A-19	vereinzelte Tumor	FPPE	19,55	13,74	180	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,3	HAB	ja	ja	Biopsie	A-18	vereinzelte Tumor	FPPE	nd	nd	180	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,41	HAB	ja	ja	Biopsie	A-16	Infiltrationszone	FPPE	20,46	7,86	160	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,45	HAB	ja	ja	Biopsie	nd	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,39	HAB	ja	ja	Biopsie	B-14	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	nd	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,35	HAB	ja	ja	Biopsie	B-13	nd	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	2,19	HAB	ja	ja	Biopsie	B-12	solider Tumor	FPPE	22,78	9,37	210	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,99	HAB	ja	ja	Biopsie	B-11	solider Tumor	FPPE	nd	nd	220	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,88	HAB	ja	ja	Biopsie	B-10	solider Tumor	Kryo	nd	nd	sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,88	HAB	ja	ja	Biopsie	B-9	solider Tumor	FPPE	20,7	10,68	190	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,81	HAB	ja	ja	Biopsie	B-8	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nicht sequenziert	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,79	HAB	ja	ja	Biopsie	B-7	solider Tumor	FPPE	23,32	6,94	180	nd	
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHWt	nicht methyliert	C228Tmut	Reziiv	1,79	HAB	ja	ja	Biopsie	B-6	nd	FPPE	nd	nd	nd	nd	

Anhang

TSPO ID ¹	Entität WHO2012 ²	Fallparameter			Bildgebung			MRT			Probenahme und -asservation			Immunhistochemie			Molekular RNA-Seq ³⁰		
		WHO-Grade ³	IDH-Status ⁴	MGMT-Methylierung ⁵	TERT-Status ⁶	Rezivität ⁷	TSPO-PET [SUVmax] ⁸	Bindungstyp ⁹	FET-PET Anreicherung ¹⁰	MRT Anreicherung ¹¹	Op ¹²	Block ID ¹³	Proben ID ¹⁴	Tumorgehaltgruppe ¹⁵	Asservation ¹⁶	%Area positiv für TSPO ¹⁷		%Area positiv für CD68 ¹⁸	TSPO H Score ¹⁹
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezitiv	1,63 HAB	ja	ja	ja	Biopsie	C	-5	kein Tumor	FPPE	18,22	11,59	180	nd
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezitiv	1,63 HAB	ja	ja	ja	Biopsie	C	-4	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	180	nd
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezitiv	1,6 HAB	ja	ja	ja	Biopsie	C	-3	Infiltrationszone	FPPE	20,48	8,72	180	nd
TSPO-73	GBM	WHO 4	IDHwt	methylert	C228T mut	Rezitiv	1,49 HAB	ja	ja	ja	Biopsie	C	-2	Infiltrationszone	FPPE	20,6	8,18	180	nd
TSPO-75	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	wt	Rezitiv	1,49 HAB	ja	ja	ja	Resektion	C	-1	Infiltrationszone	FPPE	22,61	8,5	170	nd
TSPO-75	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	wt	Rezitiv	1,45 HAB	ja	ja	ja	Resektion	C	-1	Infiltrationszone	FPPE	14,76	10,95	166,25	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,76 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IA	-24	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,71 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IA	-23	vereinzelte Tumor	FPPE	14,79	9,55	200	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,8 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IA	-18	solider Tumor	FPPE	17,99	14,83	240	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,76 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IA	-17	Infiltrationszone	FPPE	15,14	3,19	230	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,7 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IA	-16	vereinzelte Tumor	FPPE	13,03	2,67	140	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,65 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	I	-15	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,59 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-14	Infiltrationszone	FPPE	14,22	3,94	250	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,55 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-13	solider Tumor	FPPE	14,72	10,72	190	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,52 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	I	-12	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,52 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-12	solider Tumor	FPPE	16,1	13,36	220	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,52 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-11	solider Tumor	FPPE	15,07	4,74	180	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,56 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-10	solider Tumor	FPPE	13,72	3,87	150	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,61 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IB	-9	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,61 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IC	-8	solider Tumor	FPPE	16,11	4	160	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,64 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IC	-7	solider Tumor	FPPE	16,57	3,03	nd	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,67 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IC	-6	solider Tumor	FPPE	15,36	6,99	140	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,83 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IC	-5	solider Tumor	FPPE	16,04	5,13	160	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,86 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	IC	-4	solider Tumor	FPPE	14,36	3,66	150	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,91 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-8	vereinzelte Tumor	FPPE	nd	nd	nd	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	1,04 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-7	Infiltrationszone	FPPE	17,01	13,93	215	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	1,05 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-6	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	1,06 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-5	vereinzelte Tumor	FPPE	17,42	7,98	195	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	1,06 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-4	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,99 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-3	Infiltrationszone	FPPE	17,56	7,65	228	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	1,06 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-2	Infiltrationszone	FPPE	17,28	4,57	210	nd
TSPO-83	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Primär	0,99 LAB	ja	ja	ja	Biopsie	II	-1	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	0,97 HAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	Infiltrationszone	FPPE	15,52	8,58	207,5	nd
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,68 HAB	ja	ja	ja	Resektion	II	II	solider Tumor	FPPE	13,21	4,71	160	nd
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	0,65 HAB	ja	ja	ja	Resektion	III	III	Infiltrationszone	FPPE	15,77	7,1	151,25	nd
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	0,97 HAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,68 HAB	ja	ja	ja	Resektion	IIA	IIA	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	1,68 HAB	ja	ja	ja	Resektion	IIIB	IIIB	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-84	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C250T mut	Primär	0,65 HAB	ja	ja	ja	Resektion	III	III	Infiltrationszone	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	0,88 MAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	Infiltrationszone	FPPE	13,03	2,78	130	nd
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	0,96 MAB	ja	ja	ja	Resektion	III	III	solider Tumor	FPPE	20,9	6,73	180	nd
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	1,62 MAB	ja	ja	ja	Resektion	IV	IV	solider Tumor	FPPE	18,19	7,55	187,5	nd
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	0,88 MAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	Infiltrationszone	FPPE	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	0,88 MAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	vereinzelte Tumor	Kryo	nd	nd	nd	nicht sequenziert
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	0,96 MAB	ja	ja	ja	Resektion	III	III	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-85	GBM	WHO 4	IDHwt	nicht methylert	C228T mut	Rezitiv	1,62 MAB	ja	ja	ja	Resektion	IV	IV	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-89	GBM	WHO 4	IDHwt	partial methylert	C250T mut	Rezitiv	1,23 HAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	solider Tumor	FPPE	4,98	7,95	55	nd
TSPO-89	GBM	WHO 4	IDHwt	partial methylert	C250T mut	Rezitiv	1,23 HAB	ja	ja	ja	Resektion	II	II	solider Tumor	FPPE	6,63	7,74	77,5	nd
TSPO-89	GBM	WHO 4	IDHwt	partial methylert	C250T mut	Rezitiv	1,23 HAB	ja	ja	ja	Resektion	I	I	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert
TSPO-89	GBM	WHO 4	IDHwt	partial methylert	C250T mut	Rezitiv	1,23 HAB	ja	ja	ja	Resektion	II	II	solider Tumor	Kryo	nd	nd	nd	sequenziert

Anhang

1	TSPO-PET Bildgebungsstudien ID
2	Tumor Entität nach WHO-Klassifizierung von 2021; GBM: Glioblastom
3	WHO-Grad nach WHO-Klassifizierung von 2021; WHO 4: WHO Grad 4
4	Mutationsstatus von Iso-citratdehydrogenase; IDHwt: IDH-wt, IDHmut: IDH-mut
5	Methylierungsstatus des <i>O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)</i> Promotors
6	Mutation im <i>Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT)</i> Promotor; wt: Wildtyp, C250Tmut: Cytosin zu Thymin Switch in Position 250, C228T: Cytosin zu Thymin Switch in Position 228
7	Tumorstatus; Primär: Tumor ist ein Primär, Rezidiv: Tumor ist ein Rezidivtumor
8	Standardisierter maximaler Aufnahme (SUVmax) für [¹⁸ F]GE180 in TSPO-PET
9	Affinitätsbindungsstatus für [¹⁸ F]GE180; LAB: Bindungstyp mit niedriger Affinität, MAB: Bindungstyp mit mittlerer Affinität, HAB: Bindungstyp mit hoher Affinität
10	Festgestellte Tracer-Aufnahme für O-(2-[¹⁸ F]-Fluorethyl)-L-Tyrosin ([¹⁸ F]FET) im FET-PET (Tumor-to-Background-Ratio Maximum (TBRmax) Cut-off: 1,6)
11	Registrierte Kontrastmittel Anreicherung in MRT
12	Probeentnahme Status; Biopsie: Biopsie mit definierter Koordinate entlang Trajektorie, Resektion: Resektion eines definierten Tumorareals
13	Block ID der entnommenen Probe
14	Proben ID/Trajektorienkoordinate der entnommenen Probe
15	Tumorzellgehaltgruppe; kein Tumor: Kortex+weiße Substanz, vereinzelt Tumor: Kortex/Satellitosen und/oder sporadisch infiltrierende Tumorzellen, Infiltrationszone: höherer Tumorgehalt als "kein Tumor/vereinzelt Tumor", solider Tumor: Tumorzellgehalt ≥ 80 %
16	Probenasservat; FFPE: Formalin fixiert und Paraffin eingebettet Material, Kryo: kryokonserviert, frisch eingefrorenes Material
17	Prozentuale TSPO-positive Fläche (%Fläche) in IHC bestimmt mittels Fiji Software in 400x JPEGs
18	Prozentuale CD68-positive Fläche (%Fläche) in IHC bestimmt mittels Fiji Software in 400x JPEGs
19	TSPO H Score in IHC (kalkulierter Wert aus dem Prozentsatz positiver Zellen und der Färbeintensität, Wertebereich: 0 bis 300)
20	RNA NGS möglich für kryo-konservierte Probe
nd	nicht bestimmt

Anhang

7.4 Tissue-Microarray TSPO H Score Tabellen

Tabelle 23: Detailinformationen für Tissue-Microarray BNC17011c

Array ID ¹	Fallparameter			Gewebeparameter		
	Gewebe-spender ID ²	Alter ³	Geschlecht ⁴	Gewebetyp ⁵	Hirnregion/Entität ⁶	TSPO H Score Mittelwert ⁷
BNC17011c	1	54	f	normal	Frontal-Lappen	47,5
BNC17011c	2	36	f	normal	Frontal-Lappen	45,0
BNC17011c	3	45	m	normal	Frontal-Lappen	52,5
BNC17011c	4	54	f	normal	Parietal-Lappen	15,0
BNC17011c	5	45	m	normal	Parietal-Lappen	22,5
BNC17011c	6	23	m	normal	Parietal-Lappen	45,0
BNC17011c	7	23	m	normal	Occipital-Lappen	65,0
BNC17011c	8	45	m	normal	Occipital-Lappen	80,0
BNC17011c	9	27	m	normal	Occipital-Lappen	62,5
BNC17011c	10	45	m	normal	Temporal-Lappen	27,5
BNC17011c	11	27	m	normal	Temporal-Lappen	100,0
BNC17011c	12	41	f	normal	Temporal-Lappen	120,0
BNC17011c	13	27	m	normal	Mittelhirn	50,0
BNC17011c	14	38	m	normal	Mittelhirn	45,0
BNC17011c	15	2	f	normal	Mittelhirn	30,0
BNC17011c	16	37	m	normal	Pons	12,5
BNC17011c	17	46	m	normal	Pons	35,0
BNC17011c	18	2	f	normal	Pons	7,5
BNC17011c	19	50	m	normal	Medulla oblongata	0,0
BNC17011c	20	27	f	normal	Medulla oblongata	2,0
BNC17011c	21	27	m	normal	Medulla oblongata	32,5
BNC17011c	22	35	m	normal	Thalamus	10,0
BNC17011c	23	54	f	normal	Thalamus	50,0
BNC17011c	24	43	m	normal	Thalamus	7,5
BNC17011c	25	54	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	0,0
BNC17011c	26	36	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	20,0
BNC17011c	27	23	m	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	15,0
BNC17011c	28	47	m	normal	Hippocampus	15,0
BNC17011c	29	28	m	normal	Hippocampus	1,5
BNC17011c	30	41	f	normal	Hippocampus	1,0
BNC17011c	31	37	m	normal	Corpus Callosum	70,0
BNC17011c	32	21	f	normal	Corpus Callosum	0,0
BNC17011c	33	47	m	normal	Corpus Callosum	1,5
BNC17011c	34	18	f	normal	Optischer Nerv	0,0
BNC17011c	35	50	m	normal	Optischer Nerv	1,5
BNC17011c	36	33	m	normal	Optischer Nerv	100,0
BNC17011c	37	30	m	normal	Rückenmark/Wirbelsäule	24,5
BNC17011c	38	40	m	normal	Rückenmark/Wirbelsäule	6,0
BNC17011c	39	45	m	normal	Rückenmark/Wirbelsäule	3,0
BNC17011c	40	15	m	normal	Nucleus caudatus	1,0

Anhang

- 1 Array ID von US Biomax (Derwood, Maryland, USA)
 2 Anonymisierte Fall ID des Gewebespenders
 3 Alter des Gewebespenders während Probeentnahme in Jahren
 4 Geschlecht des Gewebespenders während Probeentnahme; f: weiblich, m: männlich
 5 Gewebetyp; normal: gesundes Hirngewebe, NTC: gesundes Hirngewebe entnommen aus Areal neben Tumorgewebe, Inflammation: entzündetes Hirngewebe, Hyperplasie: hyperplasiertes Hirngewebe, benigne: benigne Neoplasie, maligne: maligne Neoplasie
 6 Entität bzw. Hirnregion auf Tissue-Microarray nach neuropathologischer HE-Kontrolle
 7 TSPO H Score Mittelwert je Patient für TSPO-IHC Intensität Evaluation (möglicher Bereich von 0 bis 300)

Tabelle 24: Detailinformationen für Tissue-Microarray CNS2081

Array ID ¹	Fallparameter			Gewebeparameter		
	Gewebe-spenders ID ²	Alter ³	Geschlecht ⁴	Gewebetyp ⁵	Hirnregion/Entität ⁶	TSPO H Score Mittelwert ⁷
CNS2081	41	62	m	NTC	NTC	140,0
CNS2081	42	31	m	maligne	Astrozytom 2+3	270,0
CNS2081	43	52	m	NTC	NTC	52,5
CNS2081	44	41	m	maligne	Astrozytom 2+3	185,0
CNS2081	45	36	f	maligne	Oligodendrogliom 2+3	190,0
CNS2081	46	33	m	maligne	Astrozytom 2+3	192,5
CNS2081	47	29	m	maligne	Astrozytom 2+3	160,0
CNS2081	48	46	f	maligne	Oligodendrogliom 2+3	45,0
CNS2081	49	17	m	maligne	Astrozytom 2+3	60,0
CNS2081	50	10	m	maligne	Astrozytom 2+3	110,0
CNS2081	51	46	m	maligne	Astrozytom 2+3	207,5
CNS2081	52	16	f	maligne	Astrozytom 2+3	127,5
CNS2081	53	36	f	maligne	Astrozytom 2+3	165,0
CNS2081	54	53	m	maligne	Astrozytom 2+3	157,5
CNS2081	55	40	m	maligne	Astrozytom 2+3	135,0
CNS2081	56	50	f	maligne	Astrozytom 2+3	150,0
CNS2081	57	48	m	maligne	Astrozytom 2+3	160,0
CNS2081	58	36	f	maligne	Astrozytom 2+3	187,5
CNS2081	59	36	f	maligne	Astrozytom 2+3	170,0
CNS2081	60	61	m	maligne	Astrozytom 2+3	117,5
CNS2081	61	40	m	maligne	Astrozytom 2+3	132,5
CNS2081	62	41	f	maligne	Astrozytom 2+3	172,5
CNS2081	63	52	f	maligne	Astrozytom 2+3	157,5
CNS2081	64	56	m	maligne	Astrozytom 2+3	140,0
CNS2081	65	31	m	maligne	Glioblastom 4	225,0
CNS2081	66	42	m	maligne	Glioblastom 4	205,0
CNS2081	67	68	f	maligne	Glioblastom 4	147,5
CNS2081	68	65	f	maligne	Glioblastom 4	145,0
CNS2081	69	9	m	maligne	Glioblastom 4	185,0
CNS2081	70	43	m	maligne	Glioblastom 4	205,0
CNS2081	71	33	f	maligne	Glioblastom 4	185,0
CNS2081	72	37	m	maligne	Glioblastom 4	177,5
CNS2081	73	52	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	217,5
CNS2081	74	56	f	maligne	Oligodendrogliom 2+3	162,5
CNS2081	75	38	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	217,5
CNS2081	76	30	f	maligne	Oligodendrogliom 2+3	142,5

Anhang

CNS2081	77	39	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	105,0
CNS2081	78	17	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	225,0
CNS2081	79	43	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	92,5
CNS2081	80	73	m	maligne	Oligodendrogliom 2+3	97,5
CNS2081	81	41	f	maligne	Ependymom 2+3	200,0
CNS2081	82	46	m	maligne	Ependymom 2+3	92,5
CNS2081	83	55	f	maligne	Ependymom 2+3	177,5
CNS2081	84	5	m	maligne	Ependymom 2+3	37,5
CNS2081	85	33	m	maligne	Ependymom 2+3	157,5
CNS2081	86	24	f	maligne	Ependymom 2+3	29,0
CNS2081	87	18	m	maligne	Ependymom 2+3	135,0
CNS2081	88	29	f	maligne	Ependymom 2+3	27,5
CNS2081	89	3	f	maligne	Medulloblastom 4	55,0
CNS2081	90	11	m	maligne	Medulloblastom 4	4,5
CNS2081	91	47	f	maligne	Medulloblastom 4	20,0
CNS2081	92	30	m	maligne	Medulloblastom 4	47,5
CNS2081	93	8	f	maligne	Medulloblastom 4	245,0
CNS2081	94	32	f	maligne	Medulloblastom 4	250,0
CNS2081	95	14	f	maligne	Medulloblastom 4	30,0
CNS2081	96	33	f	maligne	Medulloblastom 4	6,0
CNS2081	97	14	m	maligne	Medulloblastom 4	85,0
CNS2081	98	7	m	maligne	Medulloblastom 4	7,5
CNS2081	99	50	m	maligne	Meningiom	13,0
CNS2081	100	43	m	maligne	Meningiom	100,0
CNS2081	101	63	f	benigne	Meningiom	72,5
CNS2081	102	67	m	benigne	Meningiom	132,5
CNS2081	103	40	f	benigne	Meningiom	67,5
CNS2081	104	44	m	benigne	Meningiom	160,0
CNS2081	105	46	m	benigne	Meningiom	112,5
CNS2081	106	28	m	benigne	Meningiom	212,5
CNS2081	107	44	f	benigne	Meningiom	210,0
CNS2081	108	61	f	benigne	Meningiom	227,5
CNS2081	109	47	f	benigne	Meningiom	205,0
CNS2081	110	29	f	benigne	Meningiom	122,5
CNS2081	111	74	m	benigne	Meningiom	190,0
CNS2081	112	38	m	benigne	Meningiom	145,0
CNS2081	113	25	f	benigne	Meningiom	145,0
CNS2081	114	38	m	benigne	Meningiom	22,5
CNS2081	115	35	f	benigne	Meningiom	180,0
CNS2081	116	36	f	benigne	Meningiom	172,5
CNS2081	117	46	f	benigne	Meningiom	172,5
CNS2081	118	31	f	benigne	Meningiom	120,0
CNS2081	119	37	f	benigne	Meningiom	182,5
CNS2081	120	60	f	benigne	Meningiom	125,0
CNS2081	121	48	f	benigne	Meningiom	182,5
CNS2081	122	38	f	benigne	Meningiom	75,0
CNS2081	123	32	m	Hyperplasie	Gliose	60,0
CNS2081	124	30	m	Hyperplasie	Gliose	215,0
CNS2081	125	31	m	Inflammation	Inflammation	230,0
CNS2081	126	18	f	Inflammation	Inflammation	160,0
CNS2081	127	40	f	Inflammation	Inflammation	150,0
CNS2081	128	34	f	Inflammation	Inflammation	165,0
CNS2081	129	37	f	NTC	NTC	37,5

Anhang

CNS2081	130	39	m	NTC	NTC	8,0
CNS2081	131	47	f	NTC	NTC	76,5
CNS2081	132	38	m	NTC	NTC	82,5
CNS2081	133	30	m	NTC	NTC	8,0
CNS2081	134	38	m	NTC	NTC	90,0
CNS2081	135	38	f	NTC	NTC	3,5
CNS2081	136	49	f	NTC	NTC	85,0
CNS2081	137	2	f	normal	Gesundes zerebrales Gewebe	87,5
CNS2081	138	50	f	normal	Gesundes zerebrales Gewebe	75,0
CNS2081	139	38	f	normal	Gesundes zerebrales Gewebe	10,0
CNS2081	140	28	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	0,0
CNS2081	141	58	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	2,5
CNS2081	142	8	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	3,5
CNS2081	143	24	f	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	10,0
CNS2081	144	26	m	normal	Gesundes zerebellares Gewebe	2,0

- 1 Array ID von US Biomax (Derwood, Maryland, USA)
- 2 Anonymisierte Fall ID des Gewebespenders
- 3 Alter des Gewebespenders während Probeentnahme in Jahren
- 4 Geschlecht des Gewebespenders während Probeentnahme; f: weiblich, m: männlich
- 5 Gewebetyp; normal: gesundes Hirngewebe, NTC: gesundes Hirngewebe entnommen aus Areal neben Tumorgewebe, Inflammation: entzündetes Hirngewebe, Hyperplasie: hyperplasiertes Hirngewebe, benigne: benigne Neoplasie, maligne: maligne Neoplasie
- 6 Entität bzw. Hirnregion auf Tissue-Microarray nach neuropathologischer HE-Kontrolle
- 7 TSPO H Score Mittelwert je Patient für TSPO-IHC Intensität Evaluation (möglicher Bereich von 0 bis 300)

8 Verzeichnisse

8.1 Literatur

- Aguet, F., Barbeira, A. N., Bonazzola, R., Brown, A., Castel, S. E., Jo, B., Kasela, S., Kim-Hellmuth, S., Liang, Y., Oliva, M., Parsana, P. E., Flynn, E., Fresard, L., Gaamzon, E. R., Hamel, A. R., He, Y., Hormozdiari, F., Mohammadi, P., Muñoz-Aguirre, M., ... Lappalainen, T. (2019). *The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues*. <https://doi.org/10.1101/787903>
- Albert, N. L., Unterrainer, M., Fleischmann, D. F., Lindner, S., Vettermann, F., Brunegrab, A., Vomacka, L., Brendel, M., Wenter, V., Wetzel, C., Rupprecht, R., Tonn, J.-C., Belka, C., Bartenstein, P., & Niyazi, M. (2017). TSPO PET for glioma imaging using the novel ligand 18F-GE-180: First results in patients with glioblastoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *44*(13), 2230–2238. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3799-9>
- Albert, N. L., Weller, M., Suchorska, B., Galldiks, N., Soffiatti, R., Kim, M. M., La Fougère, C., Pope, W., Law, I., Arbizu, J., Chamberlain, M. C., Vogelbaum, M., Ellingson, B. M., & Tonn, J. C. (2016). Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro-Oncology*, *18*(9), 1199–1208. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now058>
- Ammer, L.-M., Vollmann-Zwerenz, A., Ruf, V., Wetzel, C. H., Riemenschneider, M. J., Albert, N. L., Beckhove, P., & Hau, P. (2020). The Role of Translocator Protein TSPO in Hallmarks of Glioblastoma. *Cancers*, *12*(10). <https://doi.org/10.3390/cancers12102973>
- Arif, T., Stern, O., Pittala, S., Chalifa-Caspi, V., & Shoshan-Barmatz, V. (2019). Rewiring of Cancer Cell Metabolism by Mitochondrial VDAC1 Depletion Results in Time-

Verzeichnisse

- Dependent Tumor Reprogramming: Glioblastoma as a Proof of Concept. *Cells*, 8(11).
<https://doi.org/10.3390/cells8111330>
- Bader, S., Wolf, L., Milenkovic, V. M., Gruber, M., Nothdurfter, C., Rupprecht, R., & Wetzel, C. H. (2019). Differential effects of TSPO ligands on mitochondrial function in mouse microglia cells. *Psychoneuroendocrinology*, 106, 65–76.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.03.029>
- Badiuk, S. R., Thiessen, J. D., Maleki Vareki, S., Foster, P. J., Chen, J. Z., & Wong, E. (2022). Glial activation positron emission tomography imaging in radiation treatment of breast cancer brain metastases. *Physics and Imaging in Radiation Oncology*, 21, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.phro.2022.02.016>
- Barbie, D. A., Tamayo, P., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Moody, S. E., Dunn, I. F., Schinzel, A. C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., Fröhling, S., Chan, E. M., Sos, M. L., Michel, K., Mermel, C., Silver, S. J., Weir, B. A., Reiling, J. H., Sheng, Q., ... Hahn, W. C. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*, 462(7269), 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature08460>
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2012). NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Barron, A. M., Higuchi, M., Hattori, S., Kito, S., Suhara, T., & Ji, B. (2021). Regulation of Anxiety and Depression by Mitochondrial Translocator Protein-Mediated Steroidogenesis: The Role of Neurons. *Molecular Neurobiology*, 58(2), 550–563.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02136-5>

Verzeichnisse

- Bartos, L. M., Kirchleitner, S. V., Blobner, J., Wind, K., Kunze, L. H., Holzgreve, A., Gold, L., Zatcepin, A., Kolabas, Z. I., Ulukaya, S., Weidner, L., Quach, S., Messerer, D., Bartenstein, P., Tonn, J. C., Riemenschneider, M. J., Ziegler, S., Baumgarten, L., Albert, N. L., & Brendel, M. (2022). 18 kDa translocator protein positron emission tomography facilitates early and robust tumor detection in the immunocompetent SB28 glioblastoma mouse model. *Frontiers in Medicine*, *9*, 992993. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.992993>
- Bartos, L. M., Kunte, S. T., Beumers, P., Xiang, X., Wind, K., Ziegler, S., Bartenstein, P., Choi, H., Lee, D. S., Haass, C., Baumgarten, L., Tahirovic, S., Albert, N. L., Lindner, S., & Brendel, M. (2022). Single cell radiotracer allocation via immunomagnetic sorting (scRadiotracing) to disentangle PET signals at cellular resolution. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. <https://doi.org/10.2967/jnumed.122.264171>
- Batarseh, A., Barlow, K. D., Martinez-Arguelles, D. B., & Papadopoulos, V. (2012). Functional characterization of the human translocator protein (18kDa) gene promoter in human breast cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1819*(1), 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.09.001>
- Batarseh, A., Li, J., & Papadopoulos, V. (2010). Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) Tspo gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors. *Biochemistry*, *49*(23), 4766–4778. <https://doi.org/10.1021/bi100020e>
- Bell, E. H., Zhang, P., Shaw, E. G., Buckner, J. C., Barger, G. R., Bullard, D. E., Mehta, M. P., Gilbert, M. R., Brown, P. D., Stelzer, K. J., McElroy, J. P., Fleming, J. L., Timmers, C. D., Becker, A. P., Salavaggione, A. L., Liu, Z., Aldape, K., Brachman, D. G., Gertler, S. Z., ... Chakravarti, A. (2020). Comprehensive Genomic Analysis in

Verzeichnisse

- NRG Oncology/RTOG 9802: A Phase III Trial of Radiation Versus Radiation Plus Procarbazine, Lomustine (CCNU), and Vincristine in High-Risk Low-Grade Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 38(29), 3407–3417. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02983>
- Bengtsson, H. (2022). *R.utils* [Software]. <https://CRAN.R-project.org/package=R.utils>
- Bhat, K. P. L., Balasubramanian, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., Wani, K., Heathcock, L., James, J. D., Goodman, L. D., Conroy, S., Long, L., Lelic, N., Wang, S., Gumin, J., Raj, D., Kodama, Y., Raghunathan, A., Olar, A., ... Aldape, K. (2013). Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*, 24(3), 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>
- Bhoola, N. H., Mbita, Z., Hull, R., & Dlamini, Z. (2018). Translocator Protein (TSPO) as a Potential Biomarker in Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082176>
- Biechele, G., Wind, K., Blume, T., Sacher, C., Beyer, L., Eckenweber, F., Franzmeier, N., Ewers, M., Zott, B., Lindner, S., Gildehaus, F.-J., Von Ungern-Sternberg, B., Tahirovic, S., Willem, M., Bartenstein, P., Cumming, P., Rominger, A., Herms, J., & Brendel, M. (2021). Microglial activation in the right amygdala-entorhinal-hippocampal complex is associated with preserved spatial learning in App mice. *NeuroImage*, 230, 117707. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117707>
- Bledea, R., Vasudevaraja, V., Patel, S., Stafford, J., Serrano, J., Esposito, G., Tredwin, L. M., Goodman, N., Kloetgen, A., Golfinos, J. G., Zagzag, D., Weigelt, B., Iafrate, A. J., Sulman, E. P., Chi, A. S., Dogan, S., Reis-Filho, J. S., Chiang, S., Placantonakis, D., ... Snuderl, M. (2019). Functional and topographic effects on DNA methylation in

Verzeichnisse

- IDH1/2 mutant cancers. *Scientific Reports*, 9(1), 16830.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53262-7>
- Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2022). *EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling*.
<https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>
- Braestrup, C., & Squires, R. F. (1977). Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(9), 3805–3809.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3805>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., Van Den Bent, M. J., Von Deimling, A., & Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: Recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathologica*, 139(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02127-9>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Holland, E. C., Louis, D. N., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Perry, A., Reifenberger, G., Stupp, R., Von Deimling, A., & Weller, M. (2018). cIMPACT-NOW update 3: Recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 805–810.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1913-0>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhim, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L.,

Verzeichnisse

- Vegesna, R., Shukla, S. A., ... Chin, L. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Buckner, J. C., Chakravarti, A., Curran, W., & et al. (2016). Radiation plus Chemotherapy in Low-Grade Glioma. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 489–491. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1605897>
- Cai, L., Kirchleitner, S. V., Zhao, D., Li, M., Tonn, J.-C., Glass, R., & Kälin, R. E. (2020). Glioblastoma Exhibits Inter-Individual Heterogeneity of TSPO and LAT1 Expression in Neoplastic and Parenchymal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020612>
- Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., ... Pfister, S. M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555(7697), 469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
- Castro-Mondragon, J. A., Riudavets-Puig, R., Rauluseviciute, I., Berhanu Lemma, R., Turchi, L., Blanc-Mathieu, R., Lucas, J., Boddie, P., Khan, A., Manosalva Pérez, N., Fornes, O., Leung, T. Y., Aguirre, A., Hammal, F., Schmelter, D., Baranasic, D., Ballester, B., Sandelin, A., Lenhard, B., ... Mathelier, A. (2022). JASPAR 2022: The 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*, 50(D1), D165–D173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1113>
- Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A., Morozova, O., Newton, Y., Radenbaugh, A., Pagnotta, S. M., Anjum, S., Wang, J., Manyam, G., Zoppoli, P., Ling, S., Rao, A. A., Grifford, M., Cherniack, A. D., Zhang, H., ... Verhaak, R. G. W. (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete

Verzeichnisse

- Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*, 164(3), 550–563.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.028>
- Cerami, C., Iaccarino, L., & Perani, D. (2017). Molecular Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Dementias: The Role of In Vivo PET Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050993>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chaurasia, A., Park, S.-H., Seo, J.-W., & Park, C.-K. (2016). Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *Journal of Korean Medical Science*, 31(8), 1208–1214. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.8.1208>
- Chen, Y., Jin, H., Song, Y., Huang, T., Cao, J., Tang, Q., & Zou, Z. (2021). Targeting tumor-associated macrophages: A potential treatment for solid tumors. *Journal of Cellular Physiology*, 236(5), 3445–3465. <https://doi.org/10.1002/jcp.30139>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Danko, C. G., Hyland, S. L., Core, L. J., Martins, A. L., Waters, C. T., Lee, H. W., Cheung, V. G., Kraus, W. L., Lis, J. T., & Siepel, A. (2015). Identification of active

Verzeichnisse

- transcriptional regulatory elements from GRO-seq data. *Nature Methods*, 12(5), 433–438. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3329>
- DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (Hrsg.). (2021). *Leitlinie für Gliome im Erwachsenenalter: Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html#litID0EHSCI>
- Don HO - Author/Maintainer of Notepad++. (2019). *Notepad++* (v8.5.3) [Software]. <https://notepad-plus-plus.org/>
- Dowle, M., & Srinivasan, A. (2021). *Data.table* [Software]. <https://CRAN.R-project.org/package=data.table>
- Faget, L., & Hnasko, T. S. (2015). Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1318, 161–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_16
- Filippi, L., Frantellizzi, V., Vincentis, G. D., Schillaci, O., & Evangelista, L. (2023). Clinical Applications of TSPO PET for Glioma Imaging: Current Evidence and Future Perspective—A Systematic Review. *Diagnostics*, 13(10), 1813. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13101813>
- Foray, C., Valtorta, S., Barca, C., Winkeler, A., Roll, W., Müther, M., Wagner, S., Gardner, M. L., Hermann, S., Schäfers, M., Grauer, O. M., Moresco, R. M., Zinnhardt, B., & Jacobs, A. H. (2021). Imaging temozolomide-induced changes in the myeloid glioma microenvironment. *Theranostics*, 11(5), 2020–2033. <https://doi.org/10.7150/thno.47269>
- Fu, Y., Wang, D., Wang, H., Cai, M., Li, C., Zhang, X., Chen, H., Hu, Y., Zhang, X., Ying, M., He, W., & Zhang, J. (2019). TSPO deficiency induces mitochondrial dysfunction,

Verzeichnisse

- leading to hypoxia, angiogenesis, and a growth-promoting metabolic shift toward glycolysis in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, noz183. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz183>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261–282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Giatzakis, C., & Papadopoulos, V. (2004). Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. *Endocrinology*, 145(3), 1113–1123. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1330>
- Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., ... D'Eustachio, P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>
- GTEX Consortium. (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6509), 1318–1330. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
- Gu, Z. (2022). Complex heatmap visualization. *iMeta*, 1(3). <https://doi.org/10.1002/imt2.43>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(18), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>

Verzeichnisse

- Gu, Z., & Hübschmann, D. (2021). Make Interactive Complex Heatmaps in R. *Bioinformatics* (Oxford, England). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab806>
- Guilarte, T. R. (2019). TSPO in diverse CNS pathologies and psychiatric disease: A critical review and a way forward. *Pharmacology & Therapeutics*, *194*, 44–58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.003>
- Han, Z., Slack, R. S., Li, W., & Papadopoulos, V. (2003). Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: Relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, *23*(2–3), 225–238. <https://doi.org/10.1081/rrs-120025210>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hara, T., Chanoch-Myers, R., Mathewson, N. D., Myskiw, C., Atta, L., Bussema, L., Eichhorn, S. W., Greenwald, A. C., Kinker, G. S., Rodman, C., Gonzalez Castro, L. N., Wakimoto, H., Rozenblatt-Rosen, O., Zhuang, X., Fan, J., Hunter, T., Verma, I. M., Wucherpfennig, K. W., Regev, A., ... Tirosh, I. (2021). Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma. *Cancer Cell*, *39*(6), 779-792.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.002>
- Hardwick, M., Cavalli, L. R., Barlow, K. D., Haddad, B. R., & Papadopoulos, V. (2002). Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) gene amplification in MDA-MB-231 aggressive breast cancer cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *139*(1), 48–51. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(02\)00604-0](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(02)00604-0)
- Hatanaka, Y., Hashizume, K., Nitta, K., Kato, T., Itoh, I., & Tani, Y. (2003). Cytometrical image analysis for immunohistochemical hormone receptor status in breast

Verzeichnisse

- carcinomas. *Pathology International*, 53(10), 693–699. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2003.01547.x>
- Héberlé, É., & Bardet, A. F. (2019). Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 727–741. <https://doi.org/10.1042/EBC20190033>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., ... Glas, M. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated *MGMT* promoter (CeTeG/NOA-09): A randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 393(10172), 678–688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31791-4)
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Holzgreve, A., Pötter, D., Brendel, M., Orth, M., Weidner, L., Gold, L., Kirchner, M. A., Bartos, L. M., Unterrainer, L. M., Unterrainer, M., Steiger, K., Baumgarten, L., Niyazi, M., Belka, C., Bartenstein, P., Riemenschneider, M. J., Lauber, K., & Albert, N. L. (2022). Longitudinal 18FGE-180 PET Imaging Facilitates In Vivo Monitoring of TSPO Expression in the GL261 Glioblastoma Mouse Model. *Biomedicines*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040738>

Verzeichnisse

- Hoogstrate, Y., Draaisma, K., Ghisai, S. A., van Hijfte, L., Barin, N., Heer, I., Coppieters, W., van den Bosch, T. P. P., Bolleboom, A., Gao, Z., Vincent, A. J. P. E., Karim, L., Deckers, M., Taphoorn, M. J. B., Kerkhof, M., Weyerbrock, A., Sanson, M., Hoeben, A., Lukacova, S., ... French, P. J. (2023). Transcriptome analysis reveals tumor microenvironment changes in glioblastoma. *Cancer Cell*, *41*(4), 678-692.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.019>
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorsler, S., Varusai, T., Weiser, J., ... D'Eustachio, P. (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- Jin, M.-Z., & Jin, W.-L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 166. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x>
- Jung, M. E. (2020). A Protective Role of Translocator Protein in Alzheimer's Disease Brain. *Current Alzheimer Research*, *17*(1), 3–15. <https://doi.org/10.2174/1567205017666200217105950>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kaiser, L., Holzgreve, A., Quach, S., Ingrisich, M., Unterrainer, M., Dekorsy, F. J., Lindner, S., Ruf, V., Brosch-Lenz, J., Delker, A., Böning, G., Suchorska, B., Niyazi, M., Wetzels, C. H., Riemenschneider, M. J., Stöcklein, S., Brendel, M., Rupprecht, R., Thon, N., ... Albert, N. L. (2021). Differential Spatial Distribution of TSPO or Amino

Verzeichnisse

- Acid PET Signal and MRI Contrast Enhancement in Gliomas. *Cancers*, 14(1), 53.
<https://doi.org/10.3390/cancers14010053>
- Khabibov, M., Garifullin, A., Boumber, Y., Khaddour, K., Fernandez, M., Khamitov, F., Khalikova, L., Kuznetsova, N., Kit, O., & Kharin, L. (2022). Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *International Journal of Oncology*, 60(6). <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5359>
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357–360.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Kurt De Vos. (2010). *Cell Counter*. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>
- Lejri, I., Grimm, A., Hallé, F., Abarghaz, M., Klein, C., Maitre, M., Schmitt, M., Bourguignon, J.-J., Mensah-Nyagan, A. G., Bihel, F., & Eckert, A. (2019). TSPO Ligands Boost Mitochondrial Function and Pregnenolone Synthesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(4), 1045–1058. <https://doi.org/10.3233/JAD-190127>
- Li, X., Wang, R., Zhang, Y., Han, S., Gan, Y., Liang, Q., Ma, X., Rong, P., Wang, W., & Li, W. (2022). Molecular imaging of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 14, 17588359221076194. <https://doi.org/10.1177/17588359221076194>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdóttir, H., Tamayo, P., & Mesirov, J. P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(12), 1739–1740. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>

Verzeichnisse

- Lin, R., Angelin, A., Da Settimo, F., Martini, C., Taliani, S., Zhu, S., & Wallace, D. C. (2014). Genetic analysis of dTSPO , an outer mitochondrial membrane protein, reveals its functions in apoptosis, longevity, and A β 42-induced neurodegeneration. *Aging Cell*, *13*(3), 507–518. <https://doi.org/10.1111/accel.12200>
- Liu, G.-J., Middleton, R. J., Kam, W. W.-Y., Chin, D. Y., Hatty, C. R., Chan, R. H. Y., & Banati, R. B. (2017). Functional gains in energy and cell metabolism after *TSPO* gene insertion. *Cell Cycle*, *16*(5), 436–447. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1281477>
- Liu, L., & Shi, G.-P. (2012). CD31: Beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovascular Research*, *94*(1), 3–5. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs108>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, *23*(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Verzeichnisse

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Malmström, A., Grønberg, B. H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M. E., Rosell, J., & Henriksson, R. (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: The Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *13*(9), 916–926. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70265-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70265-6)
- Martinez-Lage, M., Lynch, T. M., Bi, Y., Cocito, C., Way, G. P., Pal, S., Haller, J., Yan, R. E., Ziober, A., Nguyen, A., Kandpal, M., O'Rourke, D. M., Greenfield, J. P., Greene, C. S., Davuluri, R. V., & Dahmane, N. (2019). Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0803-6>
- Mauch-Mücke, K., Pohl, S., & Riemenschneider, M. J. (2022). Hirntumordiagnostik: Neue Entwicklungen und Zukunftsperspektiven. *Trillium Diagnostik*, *20*(1), 81–86. <https://doi.org/10.47184/td.2022.01.09>
- Meisner, O. C., Nair, A., & Chang, S. W. C. (2022). Amygdala connectivity and implications for social cognition and disorders. In *Handbook of Clinical Neurology* (Bd. 187, S. 381–403). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823493-8.00017-1>
- Menevse, A. N., Ammer, L.-M., Vollmann-Zwerenz, A., Kupczyk, M., Lorenz, J., Weidner, L., Hussein, A., Sax, J., Mühlbauer, J., Heuschneider, N., Rohrmus, C., Mai, L. S., Jachnik, B., Stamova, S., Volpin, V., Durst, F. C., Sorrentino, A., Xydia, M., Milenkovic, V. M., ... Hau, P. (2023). TSPO acts as an immune resistance gene involved in the T cell mediated immune control of glioblastoma. *Acta*

Verzeichnisse

- Neuropathologica Communications*, 11(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01550-9>
- Middleton, R. J., Kam, W. W.-Y., Liu, G.-J., & Banati, R. B. (2017). Epigenetic Silencing of the Human 18 kDa Translocator Protein in a T Cell Leukemia Cell Line. *DNA and Cell Biology*, 36(2), 103–108. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3385>
- Milenkovic, V. M., Slim, D., Bader, S., Koch, V., Heintl, E.-S., Alvarez-Carbonell, D., Nothdurfter, C., Rupprecht, R., & Wetzel, C. H. (2019). CRISPR-Cas9 Mediated TSPO Gene Knockout alters Respiration and Cellular Metabolism in Human Primary Microglia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133359>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., ... Groop, L. C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34(3), 267–273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Nassar, L. R., Barber, G. P., Benet-Pagès, A., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Fischer, C., Gonzalez, J. N., Hinrichs, A. S., Lee, B. T., Lee, C. M., Muthuraman, P., Nguy, B., Pereira, T., Nejad, P., Perez, G., Raney, B. J., Schmelter, D., Speir, M. L., ... Kent, W. J. (2023). The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1188–D1195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072>
- Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics

Verzeichnisse

- for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
- Nothdurfter, C., Baghai, T. C., Schüle, C., & Rupprecht, R. (2012). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for anxiety and neurologic disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 262 Suppl 2, S107-12.
<https://doi.org/10.1007/s00406-012-0352-5>
- Notter, T., Schalbetter, S. M., Clifton, N. E., Mattei, D., Richetto, J., Thomas, K., Meyer, U., & Hall, J. (2021). Neuronal activity increases translocator protein (TSPO) levels. *Molecular Psychiatry*, 26(6), 2025–2037. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0745-1>
- Nutma, E., Ceyzériat, K., Amor, S., Tsartsalis, S., Millet, P., Owen, D. R., Papadopoulos, V., & Tournier, B. B. (2021). Cellular sources of TSPO expression in healthy and diseased brain. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(1), 146–163. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05166-2>
- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncology*, 22(12 Suppl 2), iv1–iv96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>
- Ou, A., Yung, W. K. A., & Majd, N. (2020). Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1).
<https://doi.org/10.3390/ijms22010351>
- Perry, J. R., Laperriere, N., O’Callaghan, C. J., Brandes, A. A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J. G., Roa, W., Osoba, D., Rossiter, J. P., Sahgal, A., Hirte, H., Laigle-Donadey, F., Franceschi, E., Chinot, O., Golfopoulos, V., Fariselli, L., ... Mason, W. P. (2017). Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly

Verzeichnisse

- Patients with Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 376(11), 1027–1037.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611977>
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P. M., Modrusan, Z., Feuerstein, B. G., & Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019>
- Poulsen, S. H., Urup, T., Grunnet, K., Christensen, I. J., Larsen, V. A., Jensen, M. L., Af Rosenschöld, P. M., Poulsen, H. S., & Law, I. (2017). The prognostic value of FET PET at radiotherapy planning in newly diagnosed glioblastoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(3), 373–381.
<https://doi.org/10.1007/s00259-016-3494-2>
- Quach, S., Holzgreve, A., Baumgarten, L., Niyazi, M., Unterrainer, M., Thon, N., Stöcklein, S., Bartenstein, P., Tonn, J.-C., & Albert, N. L. (2022). Increased TSPO PET signal after radiochemotherapy in IDH-wildtype glioma-indicator for treatment-induced immune activation? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*.
<https://doi.org/10.1007/s00259-022-05844-3>
- Quach, S., Holzgreve, A., Kaiser, L., Unterrainer, M., Dekorsy, F. J., Nelwan, D. V., Bartos, L. M., Kirchleitner, S. V., Weller, J., Weidner, L., Niyazi, M., Ruf, V. C., Herms, J., Stöcklein, S., Wetzels, C., Riemenschneider, M. J., V Baumgarten, L., Thon, N., Brendel, M., ... Albert, N. L. (2023). TSPO PET signal using 18FGE180 is associated with survival in recurrent gliomas. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 50(3), 859–869. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-06006-1>
- Reich, M., Liefeld, T., Gould, J., Lerner, J., Tamayo, P., & Mesirov, J. P. (2006). GenePattern 2.0. *Nature Genetics*, 38(5), 500–501. <https://doi.org/10.1038/ng0506-500>

Verzeichnisse

- Roa, W., Brasher, P. M. A., Bauman, G., Anthes, M., Bruera, E., Chan, A., Fisher, B., Fulton, D., Gulavita, S., Hao, C., Husain, S., Murtha, A., Petruk, K., Stewart, D., Tai, P., Urtasun, R., Cairncross, J. G., & Forsyth, P. (2004). Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 22(9), 1583–1588. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.06.082>
- Robertson, L. T. (2002). Memory and the Brain. *Journal of Dental Education*, 66(1), 30–42. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2002.66.1.tb03506.x>
- Rolls, E. T. (2015). Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. *Cortex*, 62, 119–157. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2013.12.005>
- Roncaroli, F., Su, Z., Herholz, K., Gerhard, A., & Turkheimer, F. E. (2016). TSPO expression in brain tumours: Is TSPO a target for brain tumour imaging? *Clinical and Translational Imaging*, 4, 145–156. <https://doi.org/10.1007/s40336-016-0168-9>
- Rothhammer-Hampl, T., Liesenberg, F., Hansen, N., Hoja, S., Delic, S., Reifenberger, G., & Riemenschneider, M. J. (2021). Frequent Epigenetic Inactivation of DIRAS-1 and DIRAS-2 Contributes to Chemo-Resistance in Gliomas. *Cancers*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/cancers13205113>
- Rupprecht, R., Papadopoulos, V., Rammes, G., Baghai, T. C., Fan, J., Akula, N., Groyer, G., Adams, D., & Schumacher, M. (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(12), 971–988. <https://doi.org/10.1038/nrd3295>
- Rupprecht, R., Pradhan, A. K., Kufner, M., Brunner, L. M., Nothdurfter, C., Wein, S., Schwarzbach, J., Puig, X., Rupprecht, C., & Rammes, G. (2022). Neurosteroids and translocator protein 18 kDa (TSPO) in depression: Implications for synaptic plasticity,

Verzeichnisse

- cognition, and treatment options. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01532-3>
- Rupprecht, R., Wetzel, C. H., Dorostkar, M., Herms, J., Albert, N. L., Schwarzbach, J., Schumacher, M., & Neumann, I. D. (2022). Translocator protein (18kDa) TSPO: a new diagnostic or therapeutic target for stress-related disorders? *Molecular Psychiatry*, *27*(7), 2918–2926. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01561-3>
- Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E., & Ashley, D. M. (2020). Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nature Reviews Cancer*, *20*(1), 12–25. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0224-7>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schulze, M., Hutterer, M., Sabo, A., Hoja, S., Lorenz, J., Rothhammer-Hampl, T., Herold-Mende, C., Floßbach, L., Monoranu, C., & Riemenschneider, M. J. (2018). Chronophin regulates active vitamin B6 levels and transcriptomic features of glioblastoma cell lines cultured under non-adherent, serum-free conditions. *BMC Cancer*, *18*(1), 524. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4440-4>
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R.-O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC

Verzeichnisse

- trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Su, Z., Herholz, K., Gerhard, A., Roncaroli, F., Du Plessis, D., Jackson, A., Turkheimer, F., & Hinz, R. (2013). [11C]-(R)PK11195 tracer kinetics in the brain of glioma patients and a comparison of two referencing approaches. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 40(9), 1406–1419. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2447-2>
- Su, Z., Roncaroli, F., Durrenberger, P. F., Coope, D. J., Karabatsou, K., Hinz, R., Thompson, G., Turkheimer, F. E., Janczar, K., Du Plessis, D., Brodbelt, A., Jackson, A., Gerhard, A., & Herholz, K. (2015). The 18-kDa mitochondrial translocator protein in human gliomas. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 56(4), 512–517. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.151621>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

Verzeichnisse

- Unruh, D., Zewde, M., Buss, A., Drumm, M. R., Tran, A. N., Scholtens, D. M., & Horbinski, C. (2019). Methylation and transcription patterns are distinct in IDH mutant gliomas compared to other IDH mutant cancers. *Scientific Reports*, 9(1), 8946. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45346-1>
- Unterrainer, M., Fleischmann, D. F., Vettermann, F., Ruf, V., Kaiser, L., Nelwan, D., Lindner, S., Brendel, M., Wenter, V., Stöcklein, S., Herms, J., Milenkovic, V. M., Rupprecht, R., Tonn, J. C., Belka, C., Bartenstein, P., Niyazi, M., & Albert, N. L. (2020). TSPO PET, tumour grading and molecular genetics in histologically verified glioma: A correlative 18F-GE-180 PET study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47(6), 1368–1380. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04491-5>
- Van Den Bent, M. J., Baumert, B., Erridge, S. C., Vogelbaum, M. A., Nowak, A. K., Sanson, M., Brandes, A. A., Clement, P. M., Baurain, J. F., Mason, W. P., Wheeler, H., Chinot, O. L., Gill, S., Griffin, M., Brachman, D. G., Taal, W., Rudà, R., Weller, M., McBain, C., ... Kros, J. M. (2017). Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: A phase 3, randomised, open-label intergroup study. *The Lancet*, 390(10103), 1645–1653. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31442-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31442-3)
- Veenman, L., Levin, E., Weisinger, G., Leschiner, S., Spanier, I., Snyder, S. H., Weizman, A., & Gavish, M. (2004). Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 68(4), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.011>

Verzeichnisse

- Verger, A., Kas, A., Darcourt, J., & Guedj, E. (2022). PET Imaging in Neuro-Oncology: An Update and Overview of a Rapidly Growing Area. *Cancers*, *14*(5), 1103. <https://doi.org/10.3390/cancers14051103>
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, *17*(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vettermann, F. J., Diekmann, C., Weidner, L., Unterrainer, M., Suchorska, B., Ruf, V., Dorostkar, M., Wenter, V., Herms, J., Tonn, J.-C., Bartenstein, P., Riemenschneider, M. J., & Albert, N. L. (2021). L-type amino acid transporter (LAT) 1 expression in 18F-FET-negative gliomas. *EJNMMI Research*, *11*(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00865-9>
- Vettermann, F. J., Harris, S., Schmitt, J., Unterrainer, M., Lindner, S., Rauchmann, B.-S., Palleis, C., Weidinger, E., Beyer, L., Eckenweber, F., Schuster, S., Biechele, G., Ferschmann, C., Milenkovic, V. M., Wetzel, C. H., Rupprecht, R., Janowitz, D., Buerger, K., Pernecky, R., ... Brendel, M. (2021). Impact of TSPO Receptor Polymorphism on [18F]GE-180 Binding in Healthy Brain and Pseudo-Reference Regions of Neurooncological and Neurodegenerative Disorders. *Life*, *11*(6), 484. <https://doi.org/10.3390/life11060484>
- Vlodavsky, E., & Soustiel, J. F. (2007). Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. *Journal of Neuro-Oncology*, *81*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9199-9>

Verzeichnisse

- Waitkus, M. S., Diplas, B. H., & Yan, H. (2018). Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell*, 34(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.011>
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., Barthel, F., Cho, H. J., Lin, Y.-H., Satani, N., Martinez-Ledesma, E., Zheng, S., Chang, E., Sauv , C.-E. G., Olar, A., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32(1), 42-56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 6(3), 217–223; discussion 23-4. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00848.x>
- Watanabe, K., Taskesen, E., van Bochoven, A., & Posthuma, D. (2017). Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nature Communications*, 8(1), 1826. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01261-5>
- Weidner, L., Lorenz, J., Quach, S., Braun, F. K., Rothhammer-Hampl, T., Ammer, L.-M., Vollmann-Zwerenz, A., Bartos, L. M., Dekorsy, F. J., Holzgreve, A., Kirchleitner, S. V., Thon, N., Greve, T., Ruf, V., Herms, J., Bader, S., Milenkovic, V. M., Von Baumgarten, L., Menevse, A. N., ... Riemenschneider, M. J. (2023). Translocator protein (18kDA) (TSPO) marks mesenchymal glioblastoma cell populations characterized by elevated numbers of tumor-associated macrophages. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01651-5>

Verzeichnisse

- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., ... Wick, W. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *18*(3), 170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>
- White, K., Connor, K., Meylan, M., Bougoüin, A., Salvucci, M., Bielle, F., O’Farrell, A. C., Sweeney, K., Weng, L., Bergers, G., Dicker, P., Ashley, D. M., Lipp, E. S., Low, J. T., Zhao, J., Wen, P., Prins, R., Verreault, M., Idbah, A., ... Byrne, A. T. (2023). Identification, validation and biological characterisation of novel glioblastoma tumour microenvironment subtypes: Implications for precision immunotherapy. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *34*(3), 300–314. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.11.008>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wu, L., Gong, Z., Wang, H., Zhou, Z., Zhang, M., Liu, C., Ren, H., Yang, J., Han, Y., & Zeng, C. (2020). TSPO ligands prevent the proliferation of vascular smooth muscle cells and attenuate neointima formation through AMPK activation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0293-x>
- Wu, S.-Y., & Watabe, K. (2017). The roles of microglia/macrophages in tumor progression of brain cancer and metastatic disease. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *22*(10), 1805–1829. <https://doi.org/10.2741/4573>

Verzeichnisse

- Wu, X., & Gallo, K. A. (2013). The 18-kDa Translocator Protein (TSPO) Disrupts Mammary Epithelial Morphogenesis and Promotes Breast Cancer Cell Migration. *PLoS ONE*, 8(8), e71258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071258>
- Yan, X., Siméon, F. G., Liow, J.-S., Morse, C. L., Montero Santamaria, J. A., Jenkins, M., Manly, L. S., Van Buskirk, M., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., Innis, R. B., & Zanotti-Fregonara, P. (2023). In vivo evaluation of a novel 18F-labeled PET radioligand for translocator protein 18 kDa (TSPO) in monkey brain. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. <https://doi.org/10.1007/s00259-023-06270-9>
- Ye, C., Lin, L., Zhang, P., Chen, Y., Huang, J., & Lin, X. (2020). The protective effect of PK11195 on D-galactose-induced amnesic mild cognitive impairment in rats. *Annals of Translational Medicine*, 8(18), 1190–1190. <https://doi.org/10.21037/atm-20-6157>
- Zeno, S., Veenman, L., Katz, Y., Bode, J., Gavish, M., & Zaaroor, M. (2012). The 18 kDa Mitochondrial Translocator Protein (TSPO) Prevents Accumulation of Protoporphyrin IX. Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS). *Current Molecular Medicine*, 12(4), 494–501. <https://doi.org/10.2174/1566524011207040494>
- Zeno, S., Zaaroor, M., Leschiner, S., Veenman, L., & Gavish, M. (2009). CoCl₂ Induces Apoptosis via the 18 kDa Translocator Protein in U118MG Human Glioblastoma Cells. *Biochemistry*, 48(21), 4652–4661. <https://doi.org/10.1021/bi900064t>
- Zhang, Y., Parmigiani, G., & Johnson, W. E. (2020). ComBat-seq: Batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(3), lqaa078. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>
- Zinnhardt, B., Müther, M., Roll, W., Backhaus, P., Jeibmann, A., Foray, C., Barca, C., Döring, C., Tavitian, B., Dollé, F., Weckesser, M., Winkeler, A., Hermann, S., Wagner, S., Wiendl, H., Stummer, W., Jacobs, A. H., Schäfers, M., & Grauer, O. M. (2020). TSPO imaging-guided characterization of the immunosuppressive myeloid

Verzeichnisse

tumor microenvironment in patients with malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 22(7), 1030–1043. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa023>

Zinnhardt, B., Pigeon, H., Thézé, B., Viel, T., Wachsmuth, L., Fricke, I. B., Schelhaas, S., Honold, L., Schwegmann, K., Wagner, S., Faust, A., Faber, C., Kuhlmann, M. T., Hermann, S., Schäfers, M., Winkeler, A., & Jacobs, A. H. (2017). Combined PET Imaging of the Inflammatory Tumor Microenvironment Identifies Margins of Unique Radiotracer Uptake. *Cancer Research*, 77(8), 1831–1841. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2628>

Verzeichnisse

8.2 Abkürzungen

AA	anaplastisches Astrozytom
AC	Astrozyten
AG	Arbeitsgruppe
AOD	Anaplastisches Oligodendrogliom
APC	Allophycocyanin
ARF-1	ADP ribosylation factor 1
BSA	Bovines Serum Albumin
C228Tmut	Mutation im Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT) Promotor; C228T: Cytosin zu Thymin Switch in Position 228
C250Tmut	Mutation im Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT) Promotor; C250T: Cytosin zu Thymin Switch in Position 250
CD11b	cluster of differentiation 11b (ITGAM -integrin subunit alpha M)
CD31	cluster of differentaion 31 (PECAM1 - platelet and endothelial cell adhesion molecule 1)
CD44	cluster of differentaion 44 (Indian blood group)
CD68	cluster of differentiation 68
cDNA	komplementäre DNS
CL	GBM-Expressionssubtyp "klassisch" nach Brennan et al. 2013
codel	chromosomale 1p19q-Kodeletion
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-assoziiertes Protein
Cy3	Cyanin 3
DA	Diffuses Astrozytom
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK1/2	aliases for mitogen-activated protein kinase 3/1 (MAPK3/1)
ETS1/2	ETS proto-oncogene 1/2, transcription factor
FDR	False Discovery Rate (Benjamini Hochberg)
FET	F-18-Fluorethyltyrosin

Verzeichnisse

FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FITC	Fluorescein
GEO	Gene Expression Omnibus
GBM/GBMs	Glioblastom/e
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GP130/IL6ST	interleukin 6 cytokine family signal transducer
GSEA	Gensatz-Anreicherungsanalysen
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
HAB	high affinity binder
HE	Hämatoxylin&Eosin
HIER	heat induced epitope retrieval
HMC	hypermethylierte Kontrolle
HMG	homogenisation buffer
HPA	Human Protein Atlas
HRP	horseradish peroxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDH-mut/IDHmut	Isocitrat-Dehydrogenase-mutiert
IDH-wt/IDHwt	Isocitrat-Dehydrogenase-Wildtyp
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG (H+L)	Immunglobulin G (schwere+leichte Ketten)
IHC	Immunhistochemie
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-4	Interleukin-4
IZ	Infiltrationszone
Kryo	kryo-konserviert
LAB	low affinity binder
LIFR	LIF receptor subunit alpha
logFC	log fold change
MAB	medium affinity binder
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MEK1/2	mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MAP2K1/2)
MES	GBM-Expressionsstyp "mesenchymal" nach Brennan et al. 2013
MES1/2	zellulärer Hauptzustand "MES-ähnlich" nach Neftel et al. 2019
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSigDB	Molecular Signatures Database
Multiplex OPAL IF	Multiplex OPAL Immunofluoreszenz

Verzeichnisse

NB01/02	Non-neoplastisches Kontrolle
nd	nicht bestimmt
NES	normalized enrichment score
NF1	Neurofibromin 1
NGS	Next-Generation Sequencing
nocodel/noncodel	chromosomal 1p19q-intakt
NOS A	not otherwise specified astrocytoma
NOS OD	not otherwise specified oligodendroglioma
NPC1/2	zellulärer Hauptzustand "neurale Vorläuferzellen-ähnlich" nach Nefitel et al. 2019
$N_{\text{Primär}}$	Anzahl von Patienten mit Primärtumor
NTC	an Krebs angrenzendes Hirngewebe
N_{total}	Gesamtanzahl der Patienten
OD	Oligodendrogliom
ODC	Oligodendrozytenzellen
OP	neurochirurgische Operation
OPC	zellulärer Hauptzustand "Oligodendrozytenvorläufer-ähnlich" nach Nefitel et al. 2019
Opti-MEM	Gibco™ Opti-MEM Reduced Serum Medium
OSM	oncostatin M
OSMR	oncostatin M receptor
p53	Tumorprotein p53
padj	adjustierter p-Wert
PBR	alias for translocator protein
PBS	phosphate buffered saline
PC1/2	principal component 1/2
PCA	principal component analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKC ϵ	protein kinase c isotype epsilon
PRO	GBM-Expressionssubtyp "proneural" nach Brennan et al. 2013
qPCR	Real Time Quantitative PCR
R_AA01-R_AA05	Kryo-konservierte anaplastische Astrozytome aus Regensburg
R_DA01-R_DA05	Kryo-konservierte diffuse Astrozytome aus Regensburg
R_GB01-R_GB12	Kryo-konservierte Gliosblastome aus Regensburg
Raf-1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RNA	ribonucleic acid
RPKM	reads per kilobase million
rRNA	ribosomal RNA
RT	Zimmertemperatur (20°C bis 25°C)

Verzeichnisse

scrRNA	non-target RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SP1/3	Sp1 /3 transcription factor
ssGSEA	Einzelproben-Gensatz-Anreicherungsanalysen
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SUVmax	maximum standardized uptake value
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAM/TAMs	tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-buffered saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TF	Transkriptionsfaktor
THG	Thioglycerol
TMA/TMAAs	Tissue-Microarray/s
TME	Tumormikromileu
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
TPM	transcripts per million
TSA	Trichostatin A
TSPO	translocator protein
TSS	transcription start site
Typ M1 und M2	M1: proinflammatorischer Phänotyp, M2: antiinflammatorischer Phänotyp
UCSC	Univeristy of California, Santa Cruz
VDAC1	voltage dependent anion channel 1
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
ZP	Zentralpunkt
#Sonderzeichen $\Delta\Delta ct$	delta delta Ct

Verzeichnisse

8.3 Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Einteilung der diffusen Gliome im erwachsenen Patienten nach der WHO-Klassifikation der ZNS Tumore von 2021 (Abbildung aus Mauch-Mücke et al., 2022).....	5
Abbildung 2: Auszug aus GTEx v8 für die transformierte <i>TSPO</i> Expression ($\log_{10}(\text{TPM}+1)$) im humanen Normalgewebe.....	11-12
Abbildung 3: <i>TSPO</i> und die Hallmarks of Cancer (Ammer et al., 2020)	13
Abbildung 4: CONSORT-Diagramm der Fallakquize für FOR2858 <i>TSPO</i> -PET Bildgebungsstudie	31
Abbildung 5: Bildfusionsbeispiel eines IDH-wt GBM der <i>TSPO</i> -PET Bildgebungsstudienkohorte (von Dr. Stefanie Quach erstellt).....	32-33
Abbildung 6: CONSORT-Diagramm der gewebebasierten Aspekte für Glioblastompatienten der FOR2858 <i>TSPO</i> -PET Bildgebungsstudie	34
Abbildung 7: <i>TSPO</i> mRNA-Expressionszunahme in <i>in silico</i> Gliomen mit unterschiedlichem IDH-Status, ansteigendem WHO-Grad und variierenden GBM-Expressionssubtyp	52-53
Abbildung 8: Fokale <i>TSPO</i> Promotor-Methylierungsabnahme mit ansteigender Malignität der Astrozytome in Korrelation mit ansteigender <i>TSPO</i> Expression.....	53
Abbildung 9: <i>TSPO</i> CpG-Insel-Methylierungsgewinn im <i>TSPO</i> CpG-Insel-Teilbereich in einer Mehrheit von IDH-mut Astrozytomen.	55
Abbildung 10: <i>TSPO</i> CpG-Insel-Methylierung in einer Mehrheit von IDH-mut Astrozytomen.	56
Abbildung 11: Akkumulation potentieller Transkriptionsfaktor Bindungsstellen für ETS1/2 im <i>TSPO</i> CpG-Insel-Teilbereich.	57
Abbildung 12: Validierung von anti- <i>TSPO</i> [EPR5384] Antikörper.....	58-59
Abbildung 13: Überblick bzgl. Häufigkeit der histologisch ermittelten Tumorgehaltgruppen in IDH-wt GBM-Proben.....	60-61
Abbildung 14: Bildgebungsbeispiel von IDH-wt GBM-Patienten der FOR2858 <i>TSPO</i> -PET Bildgebungsstudienkohorte.....	62
Abbildung 15: Die <i>TSPO</i> Expression korreliert mit dem <i>TSPO</i> -PET Signal und ist im soliden Tumorareal im Mittel am Höchsten.	62-63
Abbildung 16: <i>TSPO</i> wird in diversen Zellpopulationen exprimiert am Beispiel eines IDH-wt GBMs mit unterschiedlich <i>TSPO</i> Tracer-anreichernden Arealen.....	65
Abbildung 17: CD68 Expression ist in Tumorrandbereichen in IDH-wt GBMs höher.....	66

Verzeichnisse

Abbildung 18: CD68-positive Makrophagen/Mikroglia treiben die TSPO Expression in der Infiltrationszone.	67
Abbildung 19: TSPO/CD68 Expression ist mehrheitlich in IDH-wt GBM-Rezidivtumoren erhöht.....	70
Abbildung 20: TSPO Expression variiert in IDH-wt GBMs mit schwacher FET-PET Anreicherung.....	71
Abbildung 21: Gruppeneinteilung für molekulare Follow-up Analysen der sequenzierten IDH-wt GBMs aus FOR2858 TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte.	73
Abbildung 22: Differentielle Expressionsanalyse der 9 TSPO LOW vs 9 TSPO HIGH GBMs.	74
Abbildung 23: <i>TSPO</i> Überexpression markiert transkriptionelle Muster, welche mit onkogenen Signalwegen, Organisation der extrazellulären Matrix und Immunsysteminteraktion in Zusammenhang stehen.	75
Abbildung 24: Eine hohe <i>TSPO</i> Expression kennzeichnet Subpopulationen mesenchymaler Glioblastomzellen, die durch eine erhöhte Anzahl CD68-positiver TAMs gekennzeichnet sind.	77
Abbildung 25: TSPO-IHC Aufnahmen für Tissuemicroarray (TMA) CNS2081.....	80
Abbildung 26: Heterogene TSPO Expression in simultan gefärbten, gesunden Hirnregionen und pathologischen Entitäten der TMAs CNS2081 und BNC17011c.....	82

Verzeichnisse

8.4 Tabellen

Tabelle 1: Antikörper für IHC und Multiplex OPAL IF	17
Tabelle 2: Peptid für Epitop-Blockierungsexperiment.....	18
Tabelle 3: Primer für Bisulfit-Methylierung PCR/Sequenzierung mit Angaben zum Transkriptionsstart (TSS)-Abstand zum Haupttranskript, 5'-3'Sequenz und Fragmentgröße..	18
Tabelle 4: Primer für cDNA-Synthese und qPCR mit ihrer 5'-3' Sequenz und Fragmentgröße	19
Tabelle 5: Auflistung der siRNA Pools.....	19
Tabelle 6: Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) und ihr Verwendungszweck	20
Tabelle 7: Herstellungsanleitung und Verwendungszweck von Zellkulturmedium und Puffer	21
Tabelle 8: Auflistung der Chemikalien, Reagenzien, Gele und Membranen.....	23
Tabelle 9: Auflistung der Geräte und Laborausstattung	25
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Datenbanken und Software.....	26
Tabelle 11: Kryo-konservierte Astrozytomfälle für Bisulfit-Methylierungsanalyse und Antikörpervalidierung	29
Tabelle 12: RNA NGS Subkohorte der IDH-wt GBM-Patienten der TSPO-PET Bildgebungsstudie	36
Tabelle 13: Allgemeine Übersicht der Entitäten/Hirnregionen auf den kommerziellen Tissue- Microarrays BNC17011c und CNS2081.....	37
Tabelle 14: Mastermix 1 für 1 Reaktion	40
Tabelle 15: Mastermix 2 für 1 Reaktion	40
Tabelle 16: qPCR-Mastermix für 1 Reaktion	41
Tabelle 17: Amplify-PCR Mastermix für 1 Reaktion.....	42
Tabelle 18: Amplify-PCR Temperaturprogramme je Primerpaar.....	42
Tabelle 19: Volumina der Reagenzien für Herstellung des Transfektionsmediums.....	43
Tabelle 20: Multiplex OPAL IF Spezifikationen für HIER-Puffer, primäre Antikörper und OPAL-Fluoreszenzfarbstoffe je Target-Färbung	47
Tabelle 21: OLYMPUS IX81 Parameter	48
Tabelle 22: Detailinformationen der IDH-wt GBM-Patientenproben aus der TSPO-PET Bildgebungsstudienkohorte.....	134
Tabelle 23: Detailinformationen für Tissue-Microarray BNC17011c.....	140
Tabelle 24: Detailinformationen für Tissue-Microarray CNS2081	141

Danksagung

Bedanken möchte ich mich an allererster Stelle bei Herrn Prof. Markus J. Riemenschneider für die Möglichkeit dieses hochinteressante wissenschaftliche Thema im Rahmen meiner Doktorarbeit im Labor der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg bearbeiten zu dürfen. Ich danke ihm für die kompetente Betreuung, für die engagierte Bereitstellung neuropathologischer Expertise sowie für die Korrektur des Manuskripts und die zuvorkommende Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Philipp Beckhove, Frau Prof. Silke Härteis und Prof. Nathalie Albert danke ich für die stets motivierende Mentoren-Tätigkeit sowie für die Übernahme des Vorsitzes bei meiner Prüfung bzw. die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern und Kolleg*innen der Abteilung für Neuropathologie ganz herzlich bedanken für die stets lehrreiche Zusammenarbeit und für ein hervorragendes Arbeitsklima. Ein besonderer Dank geht hierbei an Julia Lorenz und Christina Mikolajek, die mir auf jede erdenkliche Weise mit Rat und Tat und exzellenter technischer und fachlicher Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit zur Seite standen. Ebenso danke ich Irene Schardt, Susanne Brüggemann, Lydia Pawelko, Maria Hirblinger, Kathrin Mauch-Mücke und Tanja Rothhammer-Hampl für ihre stets freundliche und kollegiale Unterstützung. Mein Dank gilt auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Frank Braun und Sandra Pohl, mit denen ich in meiner Doktorarbeit ebenfalls das Vergnügen hatte zusammenarbeiten zu dürfen.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern des FOR2858 Forschungsverbundes bedanken für ihre zuvorkommende Hilfe und Unterstützung im Rahmen der gemeinschaftlich erhobenen TSPO-PET Bildgebungsstudie. Hierbei insbesondere noch einmal Dank an Frau Prof. Nathalie Albert für den stets zuvorkommenden Einsatz für die Frauenförderung in Zusammenarbeit mit Doris Melchner. Des Weiteren auch liebsten Dank an Herrn Prof. Christian Wetzel für die Übernahme des Ersatzprüferpostens. Danke auch an Stefanie Quach und Viktoria Ruf für die sehr gute Zusammenarbeit in der Probenverwaltung/-dokumentation.

Außerdem herzlichen Dank an Frau Prof. Marina Kreutz für die Übernahme des dritten Prüferpostens.

Besonderen Dank auch an Laura-Marie Ammer und weitere Promovend*innen der BIOMEDIGS Graduiertenschule für die stets gute fachliche Unterstützung und den hilfreichen wissenschaftlichen Diskurs.

Mein Dank gilt ferner Frau Prof. Iris Heid, Herrn Prof. Klaus Stark sowie meinen weiteren ehemaligen Kolleg*innen vom Lehrstuhl für Genetische Epidemiologie, denen ich die äußerst hilfreichen Programmier- und Bioinformatik-Kenntnisse verdanke.

Zu guter Letzt gebührt mein allergrößter Dank meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, die mich Zeit meines Lebens unterstützt und an mich geglaubt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Publikationshinweis

Ich, Weidner, Lorraine; geboren am 16.06.1992 in Lauchhammer, erkläre hiermit, dass Teile der vorliegenden Monographie in einem wissenschaftlichen Fachjournal in Form eines Erstautorenmanuskripts publiziert wurden.

Weidner, L., Lorenz, J., Quach, S. *et al.* Translocator protein (18kDA) (TSPO) marks mesenchymal glioblastoma cell populations characterized by elevated numbers of tumor-associated macrophages. *acta neuropathol commun* **11**, 147 (2023).
<https://doi.org/10.1186/s40478-023-01651-5>

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift

des/r Promovenden*in

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Weidner, Lorraine; geboren am 16.06.1992 in Lauchhammer, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater*innen oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift

des/r Promovenden*in