

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEUROPATHOLOGIE
PROF. DR. MED. MARKUS J. RIEMENSCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Vergleichende Analyse der Mismatch-Repair-Defizienz und des
hypermultierten Phänotyps von diffusen Gliomen in der Primär- und Rezidivsituation*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Reichinger

2024

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEUROPATHOLOGIE
PROF. DR. MED. MARKUS J. RIEMENSCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Vergleichende Analyse der Mismatch-Repair-Defizienz und des
hypermultierten Phänotyps von diffusen Gliomen in der Primär- und Rezidivsituation*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Reichinger

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl-Michael Schebesch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Epidemiologische Daten zu Tumoren des Nervensystems.....	7
1.2	WHO-Klassifikation der Gliome.....	7
1.2.1	Adulte diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren (ZNS-WHO Grad 2-4).....	8
1.3	Therapeutische Möglichkeiten bei diffusen Gliomen.....	9
1.3.1	Alkylierende Chemotherapie.....	10
1.3.2	Neue Therapieansätze.....	11
1.4	Mutationen und chromosomale Veränderungen in Gliomen.....	13
1.4.1	Ursachen von Mutationen.....	14
1.4.2	Mutationsklassen und chromosomale Veränderungen.....	15
1.5	Reparatur von DNA-Schäden.....	17
1.5.1	DNA-Fehlpaarungsreparatur.....	17
1.5.2	DNA-Polymerase Epsilon.....	18
1.6	Ziel der Arbeit.....	19
2	Material	21
2.1	Tumorgewebe.....	21
2.2	Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.4	Kommerzielle Reagenziensätze (Kits).....	27
2.5	Puffer.....	27
2.6	Antikörper und Enzyme.....	28
2.7	Oligonukleotide.....	28
2.8	Software.....	28
3	Methoden	30
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	30

3.1.1	Extraktion von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus FFPE-Material...	30
3.1.2	Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus kryokonserviertem Gewebe	30
3.1.3	PicoGreen Assay für doppelsträngige DNA.....	30
3.1.4	Primer-Design	31
3.1.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
3.1.6	Auswertung der PCR per Agarose-Gelelektrophorese	32
3.1.7	Aufreinigung der PCR-Produkte	32
3.1.8	Cycle Sequencing	32
3.1.9	Vorbereitung und Durchführung der Sanger-Sequenzierung	33
3.1.10	Next-Generation-Sequencing (NGS) – DNA-Panel Library-Präparation und Qualitätskontrolle.....	33
3.1.11	Library-Verdünnung/Denaturierung und klonale Sequenzierung.....	34
3.1.12	Bioinformatische Analyse der DNA-Panel Sequenzierung	34
3.1.13	Next-Generation-Sequencing (NGS) – RNA-Seq Library-Präparation und Sequenzierung	36
3.1.14	Bioinformatische Analyse der mRNA-Sequenzierung	36
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.2.1	Immunhistochemie.....	37
4	Ergebnisse	40
4.1	MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 Proteinexpression in Primär- und Rezidivtumoren	40
4.2	Resultate der DNA-Extraktion	46
4.3	Analyse von MSH6- und POLE-Mutationen in verschiedenen Gliom-Entitäten	48
4.4	NGS DNA-Panel Auswertung	53
4.5	Auswertung der NGS mRNA-Sequenzierung	59
5	Diskussion	67

6	Zusammenfassung	75
7	Anhang	76
7.1	Abbildungsverzeichnis	76
7.2	Tabellenverzeichnis	76
7.3	Abkürzungsverzeichnis	77
7.4	R-Skripte	80
8	Literaturverzeichnis	85
9	Danksagung	91
10	Lebenslauf	92

1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen eine enorme Herausforderung für unser Gesundheitssystem dar. Durch die demografische Alterung der Gesellschaft nimmt die Anzahl der Krebserkrankungen stetig zu. Seit 1970 hat sich die Zahl der Neuerkrankungen fast verdoppelt. In absoluten Zahlen waren das im Jahr 2013 482.500 Menschen in Deutschland. Gleichzeitig konnte man durch gezielte Maßnahmen in Vorsorge und Therapie die Krebssterblichkeit seit Anfang der 1990er Jahre immer weiter senken. Im EU-Vergleich ordnet sich Deutschland bei den Neuerkrankungsraten und Sterberaten im Mittelfeld ein. Die Erfolge in der Behandlung verschiedener Tumor-Entitäten sind trotz großer Anstrengungen in der Entwicklung neuer Therapieansätze sehr unterschiedlich (1). Bei bösartigen Tumoren des zentralen Nervensystems ist der Therapieerfolg oftmals nicht zufriedenstellend. Besonders höhergradige Gliome, wie das Glioblastom, sind mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Die Rate für das 5-Jahres-Überleben liegt bei unter 5 %. Die Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und sind ungefähr für die Hälfte der hirneigenen, malignen Tumoren bei Erwachsenen verantwortlich sowie der Hauptgrund für Hirntumor-assoziierte Todesfälle. Die Therapie besteht, wenn möglich, aus einer totalen Resektion des Tumors mit anschließender Radiochemotherapie. Durch den Einsatz der alkylierenden Substanz Temozolomid als Chemotherapeutikum hat sich das Gesamt-Überleben etwas verbessert (2). Trotzdem entsteht in den meisten Fällen ein Rezidiv-Tumor, welcher auf einen erneuten Einsatz von Temozolomid schlecht anspricht. Rezidive von Gliomen neigen also dazu, eine Temozolomid-Resistenz zu entwickeln (3). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden, jedoch konnten Zusammenhänge mit dem DNA-Reparatursystem der Tumorzelle aufgezeigt werden. Es gibt dabei zwei wichtige Komponenten, einerseits die Mismatch-Repair (MMR) Proteine und andererseits die DNA-Polymerase ϵ . Führen Mutationen in den MMR-Genen zu einer verminderten Expression der Reparaturenzyme, ist dies oftmals mit einer Temozolomid-Resistenz und einer erhöhten Mutationsrate im Rezidiv-Tumor verbunden (4). Eine besondere Rolle scheinen hierbei das MMR-Protein mutS Homolog (MSH) 6 und die DNA-Polymerase ϵ zu spielen. Kommt es in Tumorzellen zu überdurchschnittlich vielen Mutationen spricht man von einem hypermutierten Phänotyp (5, 6). Des Weiteren entstehen in Tumorzellen mit hohen Mutationsraten viele neue Antigene, sogenannte

Neoantigene. Die Identifizierung und Charakterisierung möglicher therapierelevanter Targets stellt das Ziel dieser Arbeit dar.

1.1 Epidemiologische Daten zu Tumoren des Nervensystems

Neoplasien des Nervensystems kann man in zwei große Gruppen einteilen: Tumoren, die primär im Nervensystem entstehen (hirneigene Tumoren) und sekundäre ZNS-Tumoren. Die Gruppe der sekundären Tumoren wird abgebildet durch Metastasen systemischer Tumoren, welche im Bereich des zentralen Nervensystems (ZNS) wachsen. Zahlenmäßig gehören die Metastasen zu den häufigsten Hirntumoren.

Von den 482.500 Krebserkrankungen, welche 2013 in Deutschland diagnostiziert wurden, entfallen 7.240 Erkrankungen auf bösartige primäre Hirntumoren. Davon waren 3.270 Frauen und 3.970 Männer betroffen. Mit zunehmenden Alter steigt das Erkrankungsrisiko (1).

Laut Daten des Central Brain Tumor Registry der Vereinigten Staaten (CBTRUS) sind Gliome für 74,6 % aller bösartigen Hirntumoren verantwortlich. Das Glioblastom ist mit 55,4 % nicht nur die häufigste Diagnose unter allen malignen Gliomen, sondern mit 46,6 % auch der häufigste bösartige ZNS-Tumor. Alle anderen Astrozytome haben zusammen einen Anteil von 17,1 % gefolgt von den Oligodendrogliomen mit 4,7 % (7).

1.2 WHO-Klassifikation der Gliome

Bereits im Jahre 1926 veröffentlichten Baily und Cushing den ersten Versuch einer Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems nach histologischen Gesichtspunkten. Auch heute, fast hundert Jahre später, ist das Grundkonzept dieser Klassifikation noch gültig (8). Bis zur Veröffentlichung der aktualisierten 4. Auflage der WHO-Klassifikation wurden ZNS-Tumoren offiziell nach dem histologischen Typ in sieben Hauptgruppen eingeteilt sowie bezüglich ihres Wachstumsverhaltens in vier WHO-Grade eingestuft. Durch die Identifizierung von molekularen Markern, welche für die Diagnose- und Prognosestellung von großer Bedeutung sind, hat sich die Klassifikation von ihrem traditionellen Prinzip losgelöst und kombinierte 2016 erstmals histologische Kriterien mit genetischen Veränderungen (9). In der aktuellen 5. Auflage der WHO-Klassifikation wurde die Einteilung der ZNS-Tumoren vor allem auf der Grundlage von zahlreichen neuen Erkenntnissen im Bereich der molekularen Veränderungen weiter verfeinert. Dies ermöglicht eine präzisere Einteilung in Tumorsubtypen, welche für die Erstellung eines zeitgemäßen individuellen

Therapiekonzepts notwendig ist. Des Weiteren wird durch die Betrachtung von Genotyp und Phänotyp der Prozess der Diagnosestellung objektiviert.

1.2.1 Adulte diffuse astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren (ZNS-WHO Grad 2-4)

In der aktualisierten Auflage der WHO-Klassifikation von 2021 wurden alle adulten, diffus infiltrativ im Hirngewebe wachsenden Gliome anhand von histopathologischen Kriterien und molekularen Veränderungen in drei Hauptgruppen eingeteilt. Dazu zählen die WHO-Grad 2, 3 und 4 astrozytären Tumoren (Astrozytom, IDH-mutiert), die WHO-Grad 2 und 3 oligodendroglialen Gliome (Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert) und das Grad 4 klassifizierte Glioblastom (Glioblastom, IDH-Wildtyp) (10).

Tabelle 1: Einteilung adulter diffuser Gliome in drei charakteristische molekulare Gruppen.

	Astrozytom mit IDH-Mutation	Oligodendrogliom mit IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion	Glioblastom ohne IDH-Mutation
<i>Molekulare Biomarker</i>			
IDH1/2	mutiert	mutiert	Wildtyp
1p/19q	intakt	kodeletiert	intakt
weitere molekulare Veränderungen	Verlust der nukleären Expression von ATRX	aktivierende Mutationen im hTERT-Promotor	Amplifikationen des EGFR-Gens
	Mutationen im TP53-Tumorsuppressor-Gen		aktivierende Mutationen im hTERT-Promotor
	homozygote Deletionen im CDKN2A/B-Gen		+ Chr 7/- Chr 10 Kopienzahlveränderungen
<i>Typischerweise assoziierte histologische Befunde und Prognose</i>			
Histologie	astrozytär	oligodendrogliale	astrozytär
WHO-Grad	2 oder 3 (selten 4)	2 oder 3	4
Medianes Gesamtüberleben	8-12 Jahre	> 15 Jahre	< 2-3 Jahre

Betrachtet man diese drei Hauptgruppen, so wird klar, dass man grundsätzlich jene Gliome, welche Mutationen im Gen der *Isocitrat-Dehydrogenase 1* bzw. *2* (IDH1 und IDH2) tragen, von denen, welche als IDH-Wildtyp eingestuft sind, unterscheiden muss. Durch eine heterozygote IDH-Mutation kommt es zur Synthese von 2-Hydroxyglutarat. Dies ist ein Onkometabolit, welcher sich in der Tumorzelle anhäuft und in der Lage ist, das Methylierungsmuster der DNA sowie die Histone zu modifizieren. Da das mutierte Protein in fast allen Tumorzellen exprimiert wird, ist es nicht nur ein diagnostischer Marker, sondern auch ein möglicher Ansatzpunkt für gezielte Therapieverfahren (11).

Bei IDH-mutierten Astrozytomen kann es nach Monaten bis Jahren zu einer „Malignisierung“ kommen, welche zur Entwicklung eines IDH-mutierten Astrozytoms ZNS-WHO Grad 4 führen kann.

Liegen bei einem diffusen Gliom keine Mutationen in den IDH-Genen vor, handelt es sich meistens um ein Glioblastom. Dies ist ein überwiegend astrozytär differenzierter Tumor mit hoher mitotischer Aktivität und starker Kernatypie. Weiters zeigen sich pathologische Gefäßproliferationen sowie mögliche Nekrosen. Das Glioblastom ist mit einer sehr schlechten Prognose verbunden.

Ein weiterer wichtiger molekularer Marker ist die Kodeletion 1p/19q, also ein Verlust von genetischem Material auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q). Wenn zusätzlich zu dieser Kodeletion auch eine IDH-Mutation vorliegt, ist dies mit einer oligodendroglialen Tumorphistologie verbunden. Für oligodendrogliale Hirntumoren ist die Prognose insgesamt günstiger, da ein gutes Ansprechen auf eine Radio- oder Chemotherapie bzw. deren Kombination wahrscheinlicher ist (12, 13). Der Verlust von 1p/19q sichert also nicht nur die Diagnose, sondern hat als prädiktiver Marker eine für den Patienten wichtige prognostische Aussagekraft.

Die weiteren typischen molekularen Veränderungen aus Tabelle 1, welche bei adulten diffusen Gliomen auftreten können, werden in Kapitel 1.4 ausführlich besprochen.

1.3 Therapeutische Möglichkeiten bei diffusen Gliomen

Die Fortschritte in der Identifizierung von molekularen Markern haben nicht nur einen wichtigen Einfluss auf die Einteilung von Hirntumoren, sondern führten auch zu einer Umstrukturierung der Therapieschemata. Der erste Schritt der Behandlung von diffusen Gliomen sollte, wenn möglich, aus einer vollständigen Resektion des Tumors bestehen, da dies einen prognostischen Vorteil für den Patienten bietet (14). Anschließend folgt meist eine Strahlen- und/oder Chemotherapie.

Durch den Einsatz einer Strahlentherapie kann die lokale Kontrolle über den Tumor verbessert werden. Die zeitliche Abfolge und die Dosierung der Bestrahlung sind abhängig von der Diagnose, dem Alter des Patienten, dem Karnofsky-Performance-Score und vom Ausmaß der Resektion (15).

Wie bereits erwähnt wird in den meisten Fällen auch eine Chemotherapie verabreicht. Weit verbreitet in der Therapie von Gliomen ist die oral verabreichte alkylierende Substanz Temozolomid. In Kombination mit einer Strahlentherapie gilt sie als

Standardtherapie beim Glioblastom (2). Die Wirksamkeit einer alkylierenden Chemotherapie wird entscheidend von einem genetischen Marker beeinflusst, nämlich von der Methylierung des *O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase*-(MGMT)Genpromotors. Durch die Methylierung des Promotors wird das MGMT-Gen stillgelegt. Dies hat zur Folge, dass die durch eine alkylierende Chemotherapie eingefügten Schäden nicht mehr repariert werden. Die Prognose für Patienten mit einem MGMT-Promotor-methylierten Glioblastom ist deutlich besser. Das 2-Jahres-Überleben konnte für diese Subgruppe durch die kombinierte Radiochemotherapie im Vergleich zu einer Monotherapie mit Bestrahlung auf 47 %, also um das 5-fache, erhöht werden (16). Ebenso haben die bereits erwähnten genetischen Alterationen (1p/19q-Kodeletion und IDH-Mutationen) und das Alter des Patienten einen Einfluss auf die definitive Therapie von diffusen Gliomen.

1.3.1 Alkylierende Chemotherapie

Als Modellsubstanz für ein alkylierendes Chemotherapeutikum wird im folgenden Temozolomid (TMZ, Handelsname Temodal®) näher betrachtet. Temozolomid ($C_6H_6N_6O_2$) ist ein Imidazotetrazin-Derivat. In wässriger Lösung wird die Substanz zuerst spontan hydrolytisch in *5-(3-methyl-1-triazen)-imidazole-4-carboxamid* (MTIC) gespalten und anschließend zerfällt dieses instabile Produkt zu Methylhydrazin. Durch Methylhydrazin werden Methylgruppen an verschiedene Moleküle der DNA angehängt. Dabei entstehen überwiegend folgende drei Addukte: N⁷-Methylguanin (70 %), N³-Methyladenin (9 %) und O⁶-Methylguanin (6 %) (17). Das Produkt O⁶-Methylguanin wird normalerweise von MGMT erkannt und durch den Transfer der Methylgruppe auf einen Cystein-Rest repariert. In dieser Konstellation ist die Methylierung von Guanin weder zytotoxisch noch mutagen (18). In vielen Fällen jedoch ist die Expression von MGMT unterdrückt und dadurch wird O⁶-Methylguanin während der Replikation der DNA fälschlicherweise mit Thymin gepaart. Das MMR-System initiiert daraufhin die Apoptose der Zelle, da eine Korrektur dieser Fehlpaarung nicht mehr möglich ist. Die Toxizität von alkylierenden Substanzen steht also in direktem Zusammenhang mit der Funktion der MMR-Proteine (17).

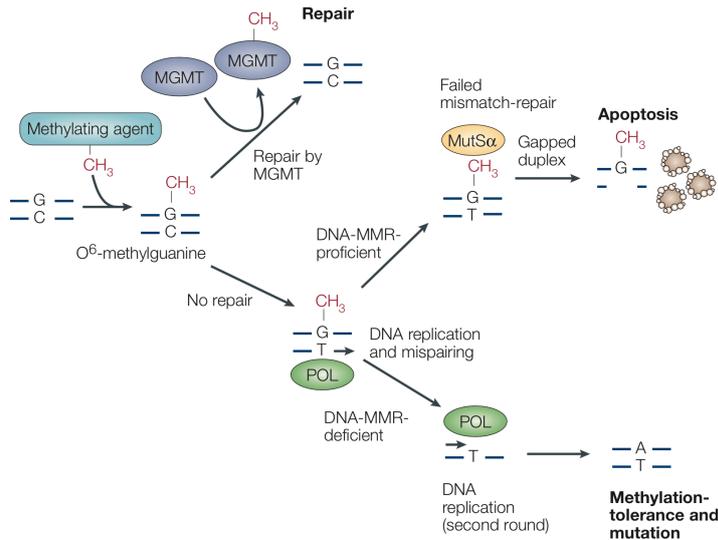


Abb. 1: Mögliche zelluläre Reaktionen auf die Anwendung einer alkylierenden Chemotherapie (19)

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Möglichkeiten einer Zelle, um einen Schaden in der DNA (z. B. O⁶-Methylguanin) zu prozessieren. Abhängig vom MGMT- und MMR-Status gibt es drei mögliche Endpunkte. Der Schaden kann entweder von MGMT repariert werden oder das MMR-System aktiviert die Apoptose. Funktionieren beide Mechanismen nicht, wird die Methylierung toleriert, was zu einer Induktion von Mutationen führt.

Außerdem ist bekannt, dass sich der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus von Gliomen während einer Behandlung mit Temozolomid nicht verändert. Trotzdem gibt es regelmäßig Gliom-Rezidive, welche auf eine erneute Behandlung mit Temozolomid nicht gut ansprechen (20). Dieser Zusammenhang lässt darauf schließen, dass durch die Anwendung von alkylierenden Substanzen eine Selektion für Zellen mit defizientem MMR-System stattfindet. Es entsteht eine erworbene Temozolomid-Resistenz. Die Tumorzellen sind nicht mehr in der Lage, die entstandenen Produkte (z. B. O⁶-Methylguanin) zu entfernen, wodurch es in den folgenden Replikationsrunden zu einer Vielzahl von Mutationen verteilt über das ganze Genom kommt. Das charakteristische Mutationsmuster ist eine C:G>T:A-Punktmutation bei CpC-Dinukleotiden (5, 21).

1.3.2 Neue Therapieansätze

Durch eine konsequente Anwendung der aktuellen Standardtherapie konnte die Prognose für Patienten mit der Diagnose eines diffusen Glioms verbessert werden. Insgesamt bleiben die Therapieerfolge jedoch im Vergleich zu anderen Tumorentitäten relativ ernüchternd. Durch ein besseres Verständnis der molekularen Veränderungen bei diffusen Gliomen haben sich Möglichkeiten für neue Therapieansätze ergeben.

Zwei wichtige Vertreter davon sind einerseits Immuncheckpoint-Inhibitoren und andererseits tumorspezifische Immuntherapien zur Vermeidung von Rezidivtumoren. Durch die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren konnten bei anderen Tumorentitäten, insbesondere beim malignen Melanom sowie beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom, teils bahnbrechende Therapieerfolge erzielt werden. Mittlerweile gibt es auch zahlreiche Daten für die Anwendung bei diffusen Gliomen. Untersuchungen von Samstein et al. (22) als auch von Gromeier et al. (23) zeigten, dass sich diffuse Gliome vielfach genau gegenteilig im Vergleich zu vielen anderen Tumorentitäten verhalten. Das Gesamtüberleben konnte vor allem bei Tumoren mit besonders niedrigen Mutationsraten gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Arbeit von Touat et al. (24). Detaillierte Erläuterungen zu diesen Publikationen folgen im Kapitel 5. Die molekularen Mechanismen für ein gegenteiliges Ansprechen auf die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht verstanden. Denn im Regelfall wird durch eine hohe Mutationslast die Expression einer großen Zahl von Neoantigenen begünstigt und diese fördern die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort (25). Diese Erkenntnisse unterstreichen auch die Notwendigkeit zur Identifizierung neuer Neoantigene als Targets für eine erfolgreiche Immuntherapie.

Der Therapieansatz einer tumorspezifischen Impfung nutzt die Möglichkeiten von bereits identifizierten Neoantigenen. Ein Target mit sehr guten Voraussetzungen ist das bereits aus Kapitel 1.2.1 bekannte mutierte IDH1-Gen. Von der Mutation betroffen ist das Codon 132 des Gens. Dadurch kommt es zum Austausch von Arginin gegen Histidin (IDH1R132H) und es bildet sich eine neue Proteinstruktur mit einem immunogenen Neoepitop. Ein Großteil aller diffusen Gliome entwickelt diese Mutation, welche auch bei den Rezidivtumoren erhalten bleibt (26). Platten et al. (27) konnten ein 20 Aminosäuren langes Peptid, das die ausschlaggebenden tumorspezifischen immunogenen Strukturen enthält, herstellen. Nach der Durchführung von erfolgreichen klinischen Tests folgte eine multizentrische Phase-1-Studie. Die Tumorstoffe waren hoch immunogen und insgesamt gut verträglich. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse ist bereits eine Phase-2-Studie mit einer Kontrollgruppe geplant.

1.4 Mutationen und chromosomale Veränderungen in Gliomen

Veränderungen im Genom bilden die Grundlage für die Evolution von Organismen und sind somit ein unverzichtbarer Bestandteil der Natur. Jedoch haben einige genetische Veränderungen auch schädliche Auswirkungen auf körpereigene Zellen und können so zur Bildung von Tumoren beitragen. Dieser Entstehungsprozess von malignen Tumoren (Karzinogenese) beinhaltet mehrere Stufen. Zur Steuerung der Zellproliferation gibt es zwei Gengruppen, die Protoonkogene und deren Gegenspieler, die Tumorsuppressorgene. Die Aufgabe der Tumorsuppressorgene ist die Kontrolle des Zellzyklus sowie des Zelltods, wodurch diese wachstumshemmend wirken. Ein wichtiger Vertreter dieser Gengruppe ist p53. Bei Auftreten von DNA-Schäden kann p53 den Zellzyklus stoppen oder bei irreparabilem Schaden eine kontrollierte Form des Zelltods (Apoptose) einleiten. Durch Auftreten von Mutationen in den Tumorsuppressorgen können diese ihre Funktion nicht mehr ausüben und können so zur Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle beitragen. Tumorzellen besitzen dadurch einen deutlichen Wachstumsvorteil (28).

Abhängig von der Tumorentität kommt es zu verschiedenen für den Tumor oftmals charakteristischen genetischen Veränderungen. Gliome sind genetisch sehr heterogen sowie inter- und intraindividuell. Bei einem Patienten können sich viele verschiedene Subklone ausbilden. Zusätzlich zu den bereits unter Kapitel 1.2.1 erwähnten genetischen Veränderungen findet man bei diffusen Gliomen weitere diagnose- als auch prognoserelevante Veränderungen.

Typische Veränderungen von IDH-mutierten Astrozytomen sind inaktivierende Mutationen im *ATRX-(α -thalassemia/mental retardation syndrome Xlinked-)*Gen mit Verlust der nukleären Expression, Mutationen im TP53-Tumorsuppressor-Gen sowie homozygote Deletionen im *CDKN2A/B-(Cyclin dependent kinase inhibitor-)*Gen. Der nukleäre Verlust von ATRX führt zu einer erhöhten Aktivität der Telomerase. Dadurch werden die Chromosomenenden stabilisiert und die Tumorzellen sind in ihrer Teilungsfähigkeit kaum mehr eingeschränkt (29). Das kombinierte Vorliegen einer IDH-Mutation mit einem nukleären Verlust der ATRX-Expression sichert die Diagnose eines IDH-mutierten Astrozytoms. Eine homozygote Deletion im *CDKN2A/B-Gen* ist prognostisch sehr relevant und führt zu einer Zuordnung zum WHO-Grad 4 bei IDH-mutierten Astrozytomen (30).

Bei IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen kommt es oftmals zu aktivierenden Mutationen im hTERT-(*Telomerase reverse Transkriptase*-)Promotor sowie zu Mutationen im CIC-(*Capicua transcriptional repressor*)Gen, FUBP1-(*Far upstream element-binding protein 1*)Gen und im NOTCH1-(*Neurogenic locus notch homolog protein 1*)Gen. Aktivierende Mutationen im hTERT-Promotor führen zu einer vermehrten Expression des Genprodukts und es kommt ähnlich wie beim nukleären Verlust von ATRX zu einer erhöhten Aktivität der Telomerase (31).

Die dritte Gruppe an adulten diffusen Gliomen bilden Glioblastome vom IDH-Wildtyp. Bei diesen Tumoren liegen regelmäßig aktivierende hTERT-Promotor-Mutationen, +7/-10-Kopienzahlveränderungen auf den entsprechenden Chromosomen, Amplifikationen des EGFR-(*Epidermal growth factor receptor*)Gens und Mutationen im PTEN-(*Phosphatase and tensin homolog*)Gen vor. Die drei erstgenannten genetischen Veränderungen sind voneinander unabhängig mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet (30). PTEN unterbricht den PI3K-(*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)Signalweg und wird den Tumorsuppressorgenen zugeordnet. Mutationen in diesem Gen treten bei etwa 60 % aller Glioblastome auf und sind ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (32).

1.4.1 Ursachen von Mutationen

Das Auftreten von Mutationen kann verschiedene Gründe haben. Sie können durch physikalische Strahlung (UV-Licht, ionisierende Strahlung) bzw. von chemischen Substanzen induziert werden. Eine weitere Ursache für das Auftreten von Mutationen sind biologische Vorgänge.

Ultraviolette Strahlung wird von der DNA absorbiert, was oftmals zur Bildung von unüblichen Pyrimidin-Dimeren zwischen benachbarten Basen führt. Die Photoprodukte blockieren nicht nur die Transkription, sondern führen auch zu Deletionen bei der Replikation. Dieser Mechanismus hat vor allem bei der Entstehung von Hauttumoren einen hohen Stellenwert. Ionisierende Strahlen (Röntgenstrahlung, Gammastrahlung und verschiedene Arten der Teilchenstrahlung) sind in der Lage, tiefer ins Gewebe einzudringen und fördern dort die Bildung von Radikalen. Dadurch kann es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA kommen, welche umfangreiche Deletionen und Chromosomenbrüche auslösen.

Eine große Zahl chemischer Substanzen induziert Nukleotidveränderungen. Man unterscheidet folgende vier Gruppen: Basenanaloga, basenmodifizierende Agenzien

(alkylierende und methylierende Stoffe), interkalierende Mutagene und vernetzende Agenzien. Durch den Einsatz von basenmodifizierenden Agenzien und Basenanaloga kommt es in beiden Fällen zu Punktmutationen. Interkalierende Mutagene wie Ethidiumbromid lagern sich zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix ein und verursachen eine Verschiebung des Leserasters. Es können Frameshift-Mutationen entstehen. Vernetzende Agenzien bilden kovalente Verbindungen mit den Basen der DNA. Dadurch werden sowohl Replikation als auch Transkription unterbunden. Klassische Vertreter dieser Gruppe sind Platin-haltige Substanzen wie Cisplatin.

Es gibt einige Situationen im Zellzyklus, in denen normale Prozesse zu Mutationen führen können. Während der Replikation baut die DNA-Polymerase gelegentlich falsche Basen ein (etwa eine pro 10^4 Nukleotide). Da manche Polymerasen auch 3'-5'-Exonukleasen sind, können die meisten, aber nicht alle falsch eingebauten Basen korrigiert werden. Die Korrekturleseaktivität ist für eine fehlerfreie Replikation von großer Bedeutung. Eine weitere Fehlerquelle während der Replikation stellen Sequenzwiederholungen in der DNA dar. Diese Wiederholungen verursachen ein Rutschen der Polymerase, sogenanntes replication slippage. Dadurch können kleine Insertionen und Deletionen (Indels) entstehen. Man vermutet einen Zusammenhang zwischen replication slippage und bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington. Ebenso sind spontane Basenveränderungen und Fehler während der Meiose ein häufiger Grund für das Auftreten von Mutationen (33, 34).

1.4.2 Mutationsklassen und chromosomale Veränderungen

Anhand vom Umfang der Veränderungen unterscheidet man Punktmutationen, strukturelle Chromosomenaberrationen und numerische Chromosomenaberrationen. Punktmutationen betreffen nur eine oder wenige Basen. Sie entstehen durch Substitution, Insertion und Deletion von Basen. Die Auswirkungen einer Punktmutation kann in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Drei wichtige Einteilungen sind synonyme Mutationen, nicht-synonyme Missense-Mutationen und Nonsense-Mutationen. Bei synonymen Mutationen verändert sich nur das Codon, die Aminosäure bleibt unverändert. Im Gegensatz dazu steht die nicht-synonyme Missense-Mutation. Diese Mutation induziert ein Codon, welches für eine andere Aminosäure codiert. Abhängig von der Position der Aminosäure in einem Protein kann dies bis zu einem völligen Funktionsverlust des betroffenen Genprodukts führen. Ähnliche Auswirkungen können Nonsense-Mutationen haben. Dadurch entsteht ein

Stoppcodon und die Translation wird somit abgebrochen. Weitere relevante Mutationen, welche durch Punktmutationen verursacht werden können, sind Spleiß- und Frameshift-Mutationen. Ist zum Beispiel eine Spleißstelle mutiert, werden die Exons und Introns nicht mehr korrekt getrennt. Wenn die Basenzahl von Indels nicht durch drei teilbar ist, wird das Leseraster verschoben und es entsteht ein sog. Frameshift. Da die Folgen einer Mutation sehr unterschiedlich sein können, ist es notwendig, diese zu bewerten. Eine häufig genutzte Einteilung beinhaltet dabei die Kategorien benigne, potenziell pathogen sowie pathogen.

Strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen durch die fehlerhafte Reparatur von Chromosomenbrüchen. Man unterscheidet Duplikationen, Deletionen, Inversionen und Translokationen. Duplikationen und Deletionen werden auch als Kopienzahlvariationen (CNVs) bezeichnet. Beim Menschen sind ungefähr 30.000 CNVs bekannt. Durch die veränderte Kopienanzahl von chromosomalen Abschnitten wird auch die Expressionsstärke der darin enthaltenen Gene beeinflusst. Ein Beispiel dafür ist die Amplifikation des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR). Diese Veränderung ist typisch für das Glioblastom (35). Bei Translokationen werden die Bruchstücke auf ein anderes, nicht homologes Chromosom versetzt. Erfolgt der Austausch zwischen zwei Chromosomen, verändert sich die Menge des Erbguts nicht. Es können aber auch Abschnitte verloren gehen, wie bei der Deletion von 1p/19q (36).

Unter die Kategorie der numerischen Chromosomenaberrationen fallen alle Veränderungen, welche die Anzahl von Chromosomen bzw. Chromosomensätzen betreffen (33, 34).

1.5 Reparatur von DNA-Schäden

Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, Schäden in der DNA zu beheben. Im Einzelnen werden folgende Mechanismen unterschieden: Direkte Reparatur, Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur, DNA-Fehlpaarungsreparatur, Reparatur von DNA-Strangbrüchen und die SOS-Rekombinationsreparatur. Welches System vorrangig benutzt wird, ist abhängig vom Schadenstyp und vom Fortschritt im Zellzyklus.

1.5.1 DNA-Fehlpaarungsreparatur

Das DNA-Mismatch-Repair-System (MMR-System) ist ein bei verschiedenen Organismen hochkonservierter Reparaturmechanismus. Er ist in der Lage, Basen-Fehlpaarungen sowie kleine Insertionen/Deletionen, welche während der Replikation entstehen, zu reparieren. In *E. coli* sind die Mutator-Proteine MutH, MutS und MutL an diesem Prozess beteiligt. Die humanen Proteine sind zum prokaryotischen MutHLS-System verwandt und heißen daher MutS-Homolog bzw. MutL-Homolog. Dazu zählen die MutS-Homologe 2, 3 und 6 sowie die MutL-Homologe 1 und 3. Die Homologe zu MutS bilden zwei Heterodimere MutS α (MSH2/MSH6) und MutS β (MSH2/MSH3). Auch die MutL-Homologe bilden zur Ausübung ihrer Funktion Heterodimere, nämlich MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) und MutL γ (MLH1/MLH3).

Die Schlüsselschritte in der Reparatur beinhalten die Erkennung der Fehlpaarungsstelle, den Zusammenbau des Reparaturkomplexes, die Entfernung des fehlerhaften DNA-Strangs und eine anschließende Neusynthese der entstandenen Lücke. Zusätzlich zu den Mutator-Proteinen werden für diesen Vorgang Exonukleasen, Helikasen, die DNA-Polymerase δ , Einzelstrang-bindende Proteine (SSBs) und Ligasen benötigt (37, 38).

MutS α und MutS β sind in der Lage, an die Fehlpaarungsstelle zu binden. Dabei ist MutS α überwiegend an der Erkennung von Ein-Basen-Fehlpaarungen beteiligt. Diese Art der Fehlpaarung wird auch durch den Einsatz von Temozolomid initiiert. Anschließend wird durch die Wechselwirkung von MutS α bzw. MutS β mit MutL α die Endonuklease-Aktivität von MutL α aktiviert, um in der Nähe der Fehlpaarungsstelle die DNA zu schneiden. Dies sind wichtige Schritte, um die Integrität des Genoms zu bewahren (37, 39).

Liegt eine Keimbahnmutation in den Genen von MSH2, MLH1, MSH6 oder PMS2 vor, ist die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken, deutlich erhöht. Dazu gibt es zwei gängige Theorien. Einerseits kann es aufgrund der fehlenden Reparatur zur

Anhäufung von Mutationen in den Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen kommen und andererseits fehlt möglicherweise eine adäquate Zellreaktion auf Schäden in der DNA (39).

Bouffet et al. (25) haben 37 Tumoren von Patienten mit einer biallelischen MMR-Defizienz (bMMRD) auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht. Darunter befanden sich auch 21 Glioblastome. Bei 32 Patienten konnte ein hypermutierter Phänotyp nachgewiesen werden. Besonders viele Mutationen zeigten vor allem die Glioblastome. Da aufgrund der hohen Mutationslast auch viele Neoantigene exprimiert werden, sind Tumoren mit einem hypermutierten Phänotyp potenzielle Kandidaten für die Behandlung mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor.

Eine mögliche Ursache für die Chemotherapie-Resistenz von diffusen Gliomen wurde bereits im Kapitel 1.3.1 erwähnt. Die Anwendung einer alkylierenden Chemotherapie fördert die Entstehung von Mutationen in den MMR-Genen bzw. führt zu deren verminderter Expression. Dabei spielt MSH6 eine wichtige Rolle. Die erhöhte Resistenz gegenüber Temozolomid konnte auch bei MSH6-mutierten Zelllinien beobachtet werden (20, 40, 41).

Durch das Auftreten von Mutationen in den MMR-Genen bei Gliom-Rezidiven sind diese ebenfalls für die Entwicklung eines hypermutierten Phänotyps prädispositioniert (5, 6).

1.5.2 DNA-Polymerase Epsilon

Die DNA-Polymerase ϵ ist ein Heterotetramer und wird beim Menschen durch vier Gene codiert: POLE, POLE2, POLE3 und POLE4. Das Gen POLE kodiert für eine 261 kDa große Untereinheit. Es ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus 49 Exons. Am N-Terminus dieser Untereinheit befindet sich die Polymerase- und Exonuklease-Aktivität.

Bei der Replikation der DNA von Eukaryonten spielt die DNA-Polymerase ϵ eine wichtige Rolle. Nachdem die DNA-Polymerase α vom Replikationsfaktor C (RCF) und vom Kernantigen proliferierender Zellen (PCNA) verdrängt wurde, kann die DNA-Polymerase ϵ an die DNA binden und setzt die Synthese am Leitstrang fort. Da die Replikation ein sehr genauer Prozess sein muss, ist eine unmittelbare Produktkontrolle notwendig. Die DNA-Polymerase ϵ überprüft, ob das eingebaute Nukleotid auch tatsächlich eine Basenpaarung eingeht. Liegt eine Fehlpaarung vor, stoppt die Synthese und die falsch eingebaute Base wird durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität

der Untereinheit POLE hydrolytisch entfernt. Durch diese Maßnahmen kann die Fehlerrate auf 10^{-7} verringert werden. Ist die Funktion der DNA-Polymerase ϵ jedoch durch Mutationen eingeschränkt, kommt es zu einem massiven Anstieg an Mutationen (42, 43).

In verschiedenen Tumoren findet man Mutationen der POLE-Untereinheit, so auch bei diffusen Gliomen. In fast allen Fällen sind solche Mutationen mit einem ultramutierten Phänotyp und einer großen Anzahl von Neoantigenen assoziiert. Die Mutationsrate ist also im Vergleich zu MMR-defizienten Tumoren nochmals deutlich erhöht. Analysen der Mutationen zeigen überwiegend einen C > T Austausch und eine Rate von 160–240 Mutationen/Mb. Daher ist die POLE ein interessanter Biomarker für diffuse Gliome und hat ebenfalls eine relevante Aussagekraft für das Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (6, 25, 44).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, neue Einblicke in die molekularen Veränderungen von diffusen Gliomen, welche durch die Tumorthherapie mit alkylierenden Agenzien induziert werden, zu bekommen. Daraus entstehende Neoantigene sollen identifiziert und hinsichtlich ihrer möglichen Therapierelevanz charakterisiert werden.

Die Grundlage bilden Primär- und Rezidiv-Paare von verschiedenen Gliom-Entitäten (WHO-Grad 2-4). Entsprechende Paare wurden aus der Datenbank herausgefiltert. Im ersten Schritt wurde die Expression von vier MMR-Proteinen (MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2) untersucht. Dazu wurden von den Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten immunhistochemische Färbungen angefertigt. Diese wurden anschließend semiquantitativ ausgewertet. Von Paaren mit einer verminderten Expression der MMR-Proteine wurde für weitere Analysen DNA extrahiert. Diese wurde per Sanger-Sequenzierung auch auf das Vorhandensein von Mutationen in der POLE-Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ untersucht. Um die Therapie-assoziierten Veränderungen zu ermitteln, wurde außerdem eine DNA-Panel Analyse mittels Next-Generation-Sequencing durchgeführt. Dabei konnten Paare identifiziert werden, welche einen hypermutierten Phänotyp aufweisen. Mittels Whole-Exome-Sequencing und Sequenzierung des vollständigen Transkriptoms sollten nun in diesen hypermutierten Rezidivgliomen neu entstandene Mutationen, sowie kleine Insertionen und Deletionen detektiert werden, um daraus potenzielle Neoantigene zu identifizieren. In einer ersten Analyse wurde das vollständige Transkriptom

sequenziert (mRNA-Sequencing) um Gene zu identifizieren, die im Rezidivgliom hochreguliert sind und diese hinsichtlich ihrer möglichen Therapierelevanz eingeordnet. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden (DESeq2, Audic-Claverie) angewendet. Die Ergebnisse wurden speziell nach Membranproteinen gefiltert, da nur deren Genprodukte tatsächlich mit dem extrazellulären Milieu in Kontakt treten können. Ob es sich hierbei um Neoantigene handelt, die durch Mutationen bzw. Insertionen oder Deletionen neu entstanden sind, kann erst durch die anschließende Whole-Exome-Sequenzierung dieser Tumore geklärt werden.

2 Material

2.1 Tumorgewebe

Fallnummer	Diagnose nach Revised WHO 5 th Edition, 2021	ZNS-WHO Grad	Primär/ Rezidiv	Verfügbares Tumorgewebe
OA_1	Oligoastrozytom, NOS	3	Primär	FFPE
OA_2	Oligoastrozytom, NOS	3	Rezidiv	FFPE
GB_29	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_30	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_19	Astrozytom, NOS	3	Rezidiv (I)	FFPE
GB_31	Glioblastom, NOS	4	Rezidiv (II)	FFPE
PXA_2	Pleomorphes Xanthoastrozytom	3	Primär	FFPE
PXA_1	Pleomorphes Xanthoastrozytom	3	Rezidiv	FFPE
GB_32	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_33	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_34	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_35	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (III)	FFPE
A_11	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_31	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (I)	FFPE
A_32	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_38	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_39	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_40	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
O_3	Oligodendrogliom	3	Primär	FFPE
O_4	Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p19q ko-deletiert	3	Rezidiv (I)	FFPE
O_5	Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p19q ko-deletiert	3	Rezidiv (II)	FFPE
A_12	Astrozytom, NOS	2	Primär	FFPE
A_20	Astrozytom, IDH-Wildtyp, NOS	3	Rezidiv	FFPE
GB_41	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_42	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_43	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_44	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_45	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_46	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_22	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Primär	FFPE
A_23	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Rezidiv	FFPE
GB_47	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_48	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE

GB_49	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_50	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_51	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_33	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_34	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (III)	FFPE
GB_17	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE / Kryogewebe
GB_54	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE / Kryogewebe
GB_55	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE / Kryogewebe
GB_56	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (III)	FFPE / Kryogewebe
A_21	Astrozytom, IDH-Wildtyp, NOS	3	Primär	FFPE
GB_106	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
A_24	Astrozytom, IDH-Wildtyp, NOS	3	Primär	FFPE
GB_107	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_57	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_58	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_59	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_60	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_61	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_62	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_63	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE / Kryogewebe
GB_64	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE / Kryogewebe
O_6	Oligodendrogliom, IDH- mutiert, 1p19q ko-deletiert	3	Primär	FFPE
O_7	Oligodendrogliom, IDH- mutiert, 1p19q ko-deletiert	3	Rezidiv	FFPE
GB_65	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_66	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_67	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_68	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
A_4	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_25	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Rezidiv	FFPE
A_13	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_35	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (I)	FFPE
A_36	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_14	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_26	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Rezidiv (I)	FFPE
A_37	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_69	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_70	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE

GB_71	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_72	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_73	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_74	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_75	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_76	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_77	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_78	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_79	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_80	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_81	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_82	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
A_27	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Primär	FFPE
A_28	Astrozytom, IDH-mutiert	3	Rezidiv	FFPE
GB_83	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_84	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_85	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_86	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_87	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_88	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_89	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_101	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
A_15	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_38	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv (II)	FFPE
A_16	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_39	Astrozytom, IDH-mutiert	4	Rezidiv	FFPE
GB_90	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_91	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (I)	FFPE
GB_92	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv (II)	FFPE
GB_93	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_94	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_95	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_96	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_97	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_98	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
GB_99	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Primär	FFPE
GB_100	Glioblastom, IDH-Wildtyp	4	Rezidiv	FFPE
A_17	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Primär	FFPE
A_18	Astrozytom, IDH-mutiert	2	Rezidiv	FFPE

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas, MA, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, MA, USA
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) – high glucose	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol > 99,98%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70% (vergällt)	Otto Fischar, Saarbrücken
Fetales Rinderserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ficoll® 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formamid	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Hematoxylin	DAKO North America, Inc., CA, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mono-Natriumcitrat (C ₆ H ₇ NaO ₇)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Opti-MEM® (1x)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Orange G (C.I. 16230)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies GmbH, Darmstadt
peqGOLD Universal Agarose	VWR International, PA, USA
Phosphate bufferes saline (PBS)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs Inc., MA, USA
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON Biotechnology Co., Ltd., Südkorea
RNase freies Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
T7 Endonuclease I	New England Biolabs Inc., MA, USA
Tris-HCl Buffer 1M pH 8,5	Jena Bioscience GmbH, Jena
Trisbase	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA solution	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät und Verbrauchsmaterial	Modell/Größe	Hersteller
12-Well-Platte	TC-Platte, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Automatisierte Elektrophorese	4200 TapeStation System	Agilent Technologies, Inc., CA, USA
CO ₂ -Inkubator	HERAcell240 i	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Deckgläser	24 x 50 mm no. 1	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Elektrophorese-Apparatur	Sub-Cell® GT Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentations-system	Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Heizplattenrührer	Advanced Serie	VWR International, PA, USA
Homogenisator	VDI 12	VWR International, PA, USA
Inverses Mikroskop	Leitz DM IL Type 090-135.001	Leica Microsystems CMS, Bensheim
Kosmetiktücher	Tapira plus, 2-lagig	GVS Group eG, Friedewald
Kulturflaschen	T75	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Liquid Blocker	Super pap pen mini	Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan
Messzylinder	250 ml, 500 ml	VWR International, PA, USA
Mikroplatte	96-Well, schwarz, F-Bottom	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikroplatte	Sapphire, 96-Well, Natur, Universal	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikroplatten-Leser	FLUOstar Omega	BMG Labtech GmbH, Ortenburg
Mikroskop	BX53	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Mikrotom	HM 430 Schlittenmikrotom	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Mikrowelle	MW 2288 CB	C. Bomann GmbH, Kempen
Netzgerät-Elektrophorese	PowerPac™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Next-Generation Sequencing Plattform	MiniSeq™	Illumina, Inc., CA, USA
Objektträger	SuperFrost® Plus Objektträger, 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
PCR-Platten-Klebefolien	qPCR seal sheets	4titude, Dorking, UK

PCR-System (real-time)	StepOnePlus™	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
pH-Meter	FiveEasy	Mettler-Toledo Inc., OH, USA
Pipette	Eppendorf Research® Plus, 8-Kanal, 0,5 µl – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Research® Plus (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, serologisch	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips (0,5-20 µl, 2-20 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Ismaning
Reagenzglasschüttler	Vortex-Schüttler	VWR International, PA, USA
Reagiergefäße	SafeSeal (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Sanger-Sequenzierer	SeqStudio Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Schnitte Färbe-Set	Set mit 12 Behältern	Bio Optica Milano S.p.A, Mailand, Italien
Schüttelgerät	Shaker DOS-10L	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Schüttelgerät, 96-Well Platten	MS 3 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS/KSP	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Skalpell	No. 10, 11	FEATHER® Safety Razor, Co. Ltd., Osaka, Japan
Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Thermocycler	T3000	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler	TAdvanced	Biometra GmbH, Göttingen
Verschlussfolie	Parafilm®, 4 in. x 125 ft. roll	Bemis Company Inc., WI, USA
Waage	PBS/PBJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	AL 25	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zellschaber	16 cm, 2-Pos.-Klinge	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zentrifuge, groß	Rotina 420R	HettichLab, Tuttlingen
Zentrifuge, mikro	MiniStar silverline	VWR International, PA, USA

2.4 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)

Reagenziensatz	Artikelnummer	Hersteller
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	4337449	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit	69504	Qiagen GmbH, Hilden
DyeEx® 2.0 Spin Kit	63206	Qiagen GmbH, Hilden
EnVision™ + Dual Link System HRP (DAB+)	10128125	DAKO North America, Inc., CA, USA
GeneRead™ DNA FFPE Kit	180134	Qiagen GmbH, Hilden
HaloPlex HS Custom 501kb-2.5Mb, ILM, 96 Reactions	5190-7851	Agilent Technologies, Inc., CA, USA
High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay	5067-5585 5067-5584	Agilent Technologies, Inc., CA, USA
HotStarTaq® DNA Polymerase	203205	Qiagen GmbH, Hilden
MiniSeq High Output Reagent Kit (300-Zyklen)	FC-420-1001	Illumina, Inc., CA, USA
QIAquick® PCR Purification Kit	28106	Qiagen GmbH, Hilden
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	P11496	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
RNeasy® Plus Mini Kit	74134	Qiagen GmbH, Hilden
TruSeq RNA Library Prep Kit v2	RS-122-2001	Illumina, Inc., CA, USA

2.5 Puffer

Puffer	Zusammensetzung / Herstellung
10x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ in 900ml H ₂ O lösen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen danach auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
1x PBS	100 ml 10x PBS 900 ml H ₂ O
1x PBST (0,05 %)	100 ml 10x PBS 900 ml H ₂ O 500 µl Tween® 20
50x TAE	242 g Trisbase 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA, ph = 8,0 (0,5 M) danach auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
Natriumcitrat-Puffer	2,94 g/l Natriumcitrat in 1 l H ₂ O lösen und den pH-Wert auf 6,0 einstellen

Orange-Loading-Puffer	0,14 g Ficoll
	10 ml H ₂ O
	1 Spatelspitze Orange-G

2.6 Antikörper und Enzyme

Antikörper	Host-Spezies	Klonalität	Klon-Nummer	Verdünnung	Hersteller
MLH1	Mouse	Monoklonal	G168-15	1:40	BD Biosciences, NJ, USA
MLH1	Rabbit	Monoklonal	EPR3894	1:300	Abcam, Cambridge, UK
MSH2	Mouse	Monoklonal	G219-1129	1:100	Cell Marque, CA, USA
MSH6	Mouse	Monoklonal	44	1:150	BD Biosciences, NJ, USA
PMS2	Rabbit	Monoklonal	EPR3947	1:80	Abcam, Cambridge, UK

2.7 Oligonukleotide

Gen	Mutation	Forward-Sequenz (5'→3')	Reverse-Sequenz (5'→3')	Produktlänge
MSH6	NM_000179 ex4:c.G1558A p.G520S	GTAGCACGAGTG GAACAGACT	GCACGAGTATGGC CAGAAGA	227
MSH6	NM_000179 ex4:c.C2132T p.P711L	TGGGTTGACACC AGGAGAGA	CCAAGTTGTTTAAT GTCACTGCATC	224
POLE	NM_006231 ex9:c.C857G p.P286R ex9:c.C890T p.S297F	CAACCAGAGGGA GGTAGAGCA	GAACGGCTTGGTT GCTCCC	344
POLE	NM_006231 ex13:c.G1231T/C p.V411L	CTACACCATGTG GGCCTTG	GGATGTGGCTTAC GTGCCTG	298
POLE	NM_006231 ex14:c.G1366C p.A456P	GTTTTGTCCTGTG CCGGTC	TAATGCTCACCTCG TCGGG	256

2.8 Software

Software	Hersteller
4200 TapeStation Software (Version A.02.01)	Agilent Technologies, Inc., CA, USA
Annovar (Version 2016-02-019)	Wang K, Li M und Hakonarson H. (45)

Bcl2fastq Conversion Software v1.8.4	Illumina, Inc., CA, USA
BWA (Version 0.7.17)	Li H. und Durbin R. (46)
CASAVA (Version 1.8.2)	Illumina, Inc., CA, USA
Chromas (Version 2.6.6)	Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australien
Cutadapt (Version 1.14)	Marcel Martin, TU Dortmund (47)
DESeq2 (Version 3.11)	Michael Love, Constantin Ahlmann-Eltze, Simon Anders, Wolfgang Huber (48)
featureCounts	Liao Y, Smyth GK, Shi W (49)
ggplot (Version 3.3.1)	Hadley Wickham, Winston Chang (50)
HISAT2 (Version 2.2.0)	Chanhee Park, Ben Langmead, Yun Zhang, Steven Salzberg, Daehwan Kim (51)
ImageJ (Version 1.47)	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Intas Capture Software	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
MARS Data Analysis Software (Version 2.41)	BMG Labtech GmbH, Ortenburg
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000-Software (Version 1.4.2)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Omega Steuerungs-Software (Version 3.00)	BMG Labtech GmbH, Ortenburg
RStudio (Version 1.3.959)	RStudio, Inc., MA, USA
Samtools (Version 1.2)	Danecek et al. (52)
SeqStudio™ Plate Manager	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Sequencing Analysis Software 6 (Version 6.2)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
VarScan (Version 2.4.3)	Koboldt DC et al. (53)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Extraktion von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus FFPE-Material

Für die Isolierung von DNA aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe wurde das GeneRead™ DNA FFPE Kit der Firma Qiagen verwendet. Sämtliche Schritte, in denen eine Zentrifugation notwendig ist, wurden bei Raumtemperatur mit 20.000 g für 1 min durchgeführt. Von dem FFPE-Material wurden mit einem Mikrotom ungefähr 10 µm dicke Schnitte erzeugt und auf vorbeschriftete Objektträger aufgebracht. Zusätzlich wurde jeweils ein 3 µm dicker Schnitt angefertigt und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Am HE-Schnitt wurden mithilfe eines Lichtmikroskops Areale gekennzeichnet, welche möglichst nur Tumorgewebe beinhalten. Nun kann mit einem Skalpell das Tumorgewebe abgekratzt werden und in eine deparaffinierende Lösung überführt werden. Alle weiteren Reaktionsschritte wurden laut den Herstellerangaben durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, da zeitnah weitere Versuche folgten. Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde das Spektralfluorometer NanoDrop 2000 von Thermo Fisher Scientific verwendet.

3.1.2 Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus kryokonserviertem Gewebe

Für die Isolierung von RNA aus kryokonserviertem Gewebe wurde das RNeasy® Plus Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Sämtliche Schritte, in denen eine Zentrifugation notwendig ist, wurden bei Raumtemperatur mit 20.000 g für 1 min durchgeführt. Bis zu 30 mg der Proben wurden zuerst lysiert und homogenisiert. Für größere Gewebestücke wurde dafür der Homogenisator VDI 12 der Firma VWR™ (30-60 Sekunden) verwendet. Bei sehr kleinen Gewebestücken erfolgte die Lyse und Homogenisierung mittels Spritze und Kanüle (10x hoch- und runterziehen). Alle weiteren Reaktionsschritte wie die Eliminierung von gDNA und anderen Verunreinigungen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Am Ende des Protokolls erfolgte die Eluierung der gereinigten RNA mit 30 µl H₂O (RNase-/DNase-frei).

3.1.3 PicoGreen Assay für doppelsträngige DNA

Für eine präzise Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

PicoGreen ist ein fluoreszierender Farbstoff, welche an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die genaue chemische Bezeichnung lautet 2-(n-bis-(3-dimethylaminopropyl)-amino)-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenyl-quinolinium. Durch die Bindung an die DNA erhöht sich die Fähigkeit zur Fluoreszenz von PicoGreen um mehr als den Faktor 1000. Dieser Effekt dient als Basis für viele Quantifizierungs-Assays von DNA (54). Bei dem verwendeten Assay werden die Proben durch Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm zur Fluoreszenz angeregt und die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird bei 520 nm gemessen.

Alle notwendigen Schritte zur Probenvorbereitung für die Messung erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Messung der DNA-Konzentration mit einem multi-mode Mikrotiterplatten-Leser der Firma BMG Labtech durchgeführt.

3.1.4 Primer-Design

Um das Vorhandensein von Punktmutationen in verschiedenen Genen per Sanger-Sequenzierung untersuchen zu können ist es notwendig, spezifische Primer-Paare zu verwenden. Mit diesen Primer-Paaren werden nur kurze Abschnitte des gewünschten Gens amplifiziert. Als Hilfestellung für das Finden geeigneter Primer-Sequenzen wurde das Primer-Blast-Tool vom National Center for Biotechnology Information verwendet (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; [Primer designing tool \(nih.gov\)](#)). Es ist darauf zu achten, Primer-Paare auszuwählen, bei denen die Forward- und Reverse-Primer eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur (T_m) besitzen. Des Weiteren sollte bei der Auswahl der Primer der GC-Gehalt und die Selbstkomplementarität beachtet werden.

3.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte wurde das HotStarTaq[®] DNA Polymerase Kit von Qiaagen verwendet. Das Gesamtvolumen einer Reaktion beträgt 50 µl. Der Master-Mix setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 5 µl 10x PCR Puffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Forward- und Reverse-Primer (10 µM), 0,5 µl HotStarTaq DNA Polymerase (2,5 U/Reaktion) und H₂O (RNase-/DNase-frei). Alle Reagenzien werden zum Pipettieren auf Eis gelagert. Anschließend werden noch ungefähr 25 ng der Template-DNA zugegeben. Als Kontrolle wird für jedes Primer-Paar auch immer eine Negativkontrolle ohne Template-DNA mitgeführt. Bei dem PCR-Programm handelt es sich um ein für die Polymerase optimiertes Programm mit initialer 15-minütiger Polymerase-Aktivierung bei 95 °C und darauffolgenden 35 Zyklen

mit abwechselnd 94 °C für 1 min (Denaturierung), 55 °C für 1 min (Annealing) und 72 °C für 1 min (Extension). Danach folgt noch eine finale Extension bei 72 °C für 10 min. Wird das PCR-Produkt unter Standard-Bedingungen nicht effizient amplifiziert, kann die Zusammensetzung des Master-Mixes modifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, die MgCl₂-Konzentration zum Beispiel auf 2,5 mM zu erhöhen oder man erhöht die Ausbeute der PCR durch Zugabe von Q-Solution.

3.1.6 Auswertung der PCR per Agarose-Gelelektrophorese

Das Vorhandensein der PCR-Produkte wurde per Gelelektrophorese kontrolliert. Dabei werden die DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zunächst erfolgte das Gießen eines 2%igen Agarosegels, welchem 5 µl der RedSafe™ Nucleic Acid Staining Lösung beigemischt wurden. Dieses Gel wurde nach vollständiger Aushärtung in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Von den zu analysierenden PCR-Produkten wurden 5 µl-Aliquote mit 3 µl Orange-Loading-Puffer gemischt. Neben den PCR-Produkten wurden auch 5 µl einer 100-bp-DNA-Leiter mit auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer Stromspannung von 110 V über 30 min. Um die Banden auszuwerten, wurde das Gel in ein Geldokumentationssystem transferiert und unter UV-Licht bewertet. Nun kann man überprüfen, ob mithilfe der Primer das erwartete Produkt vervielfältigt wurde.

3.1.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Wenn sich bei der Elektrophorese die erwartete Bande gezeigt hat, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Dazu wurde das QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Die Zentrifugation wurde mit 17.900 g bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend den Hersteller-Angaben ausgeführt. Die nun gereinigte DNA wurde mit 30 µl Puffer eluiert, um eine höhere Konzentration zu erreichen. Anschließend ist es noch notwendig, die DNA-Konzentration zu bestimmen. Dies erfolgte am Spektralphotometer NanoDrop 2000 von Thermo Fisher Scientific.

3.1.8 Cycle Sequencing

Das Cycle Sequencing bereitet die gereinigten PCR-Produkte auf die Sequenzierung vor. Bei der verwendeten Kettenabbruch-Methode nach Sanger werden bei der Verlängerung der Primer neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (di-Desoxynukleotide) eingebaut. Wird ein solches ddNTP in die wachsende Nukleotidkette eingebaut, kommt es zum Abbruch der Elongation. Es entstehen

dadurch fluoreszenzmarkierte PCR-Fragmente mit jeder möglichen Nukleotidanzahl (55). Für diesen Schritt wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Von den gereinigten PCR-Produkten wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 3 ng/µl hergestellt. Es ist wichtig, für den Forward- und Reverse-Primer separate Reaktionen vorzusehen. Alle Reagenzien werden zum Pipettieren auf Eis gelagert. Das Gesamtvolumen einer Reaktion beträgt 10 µl und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 2 µl BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix, 1 µl 5x Sequencing-Puffer, 2 µl PCR-Produkt (3 ng/µl), 1 µl Forward- oder Reverse-Primer (3,2 µM), 4 µl H₂O (RNase-/DNase-frei). Das PCR-Programm startet mit einer einminütigen Inkubation bei 96 °C und darauf folgen 25 Zyklen mit abwechselnd 96 °C für 15 s (Denaturierung), 55 °C für 15 s (Annealing) und 60 °C für 4 min (Extension). Der Thermocycler hält eine Temperatur von 4 °C, bis die PCR-Produkte aufgereinigt werden.

3.1.9 Vorbereitung und Durchführung der Sanger-Sequenzierung

Vor der tatsächlichen Sequenzierung müssen freie ddNTPs aus den Proben entfernt werden. Dazu wurde das DyeEx® 2.0 Spin Kit von Qiagen verwendet. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 750 g mit einer konventionellen Tischzentrifuge durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend den Hersteller-Angaben durchgeführt. Danach werden jeweils zu 5 µl der gereinigten Probe 20 µl Hidi (highly de-ionized)-Formamid hinzugefügt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte mit dem SeqStudio Genetic Analyzer von Thermo Fisher Scientific. Zur Auswertung der generierten Chromatogramme wurde das Programm Chromas von Technelysium verwendet.

3.1.10 Next-Generation-Sequencing (NGS) – DNA-Panel Library-Präparation und Qualitätskontrolle

Für die Durchführung einer DNA-Panel-Sequenzierung wurde das HaloPlex^{HS} Custom Kit von Agilent Technologies (Version 3; Design-ID: 04818-1518016832) verwendet. Dieses System bietet die Möglichkeit, ein individuelles Set an Genen zu untersuchen. Als Referenzgenom wurde die Version hg19 des humanen Genoms verwendet. Insgesamt können mit dem individualisierten Panel 57 Gene analysiert werden. Bei einigen Genen, wie IDH1, IDH2, H3F3A, HIST1H3B, HIST1H3C, CTNNB1, JAK2 sowie vom TERT-Promotor, werden nur Bereiche abgedeckt, in denen die jeweiligen Hotspot-Mutationen auftreten. Für die Mehrzahl der Gene wurde das Panel jedoch so

designt, dass die meist vollständige kodierende Sequenz abgedeckt ist. Dies trifft zu für AKT1, ALK, ATRX, BRAF, CIC, DDX3X, FUBP1, JAK3, KIAA1549, KLF4, KMT2D, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, NOTCH1/2, PIK3CA, PIK3R1, PTCH2, RB1, SMO, SUFU, TP53, TRAF7, TSC1, TSC2, VHL, CDK6, CDKN2A/B, CTDNEP1, EGFR, GLI2, KIT, KRAS, MET, MYC, MCYN, NF2, OTX2, PDGFRA, PMS, PTCH1, PTEN, SMARCA4 und SMARCB1. Zusätzlich werden noch einige bekannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) abgebildet, um die Amplifikation bzw. den Verlust folgender Chromosomenarme untersuchen zu können: Chr1p, chr19q, chr7, chr10, chr17, chr6, chr9 und 19q13.42 (C19MC). Zusammengefasst werden also 471 kbp bei diesem Paneldesign sequenziert.

Als Ausgangsmaterial diente gereinigte DNA isoliert aus FFPE-Material. Es wurden jeweils 200 ng an DNA verwendet. Diese wurde mit 10 mM Tris-HCl-Puffer auf eine Konzentration von 7,2 ng/µl verdünnt. Alle weiteren Schritte, wie die enzymatische DNA-Fragmentation, die Adapter-Ligation und die Aufreinigung der Library wurden laut Herstellerangaben durchgeführt (HaloPlex Target Enrichment System, Agilent). Für die Quantifizierung der Library wurde die 4200 TapeStation von Agilent Technologies verwendet. Diese kann mit 2 µl gereinigter Library per automatisierter Elektrophorese die Molarität der produzierten Library bestimmen.

3.1.11 Library-Verdünnung/Denaturierung und klonale Sequenzierung

Für die weiteren Schritte musste die Library auf eine Konzentration von 10.000 pM verdünnt werden. Dazu werden zu je 10 µl Library entsprechend viel 10 mM Tris-HCl-Puffer zugegeben. Anschließend konnten die einzelnen Library äquimolar „gepoolt“ werden. Die „gepoolten“ Libraries wurden auf eine finale Konzentration von 1,1 pM verdünnt und vor der Sequenzierung denaturiert. Diese Schritte erfolgen laut den Angaben des Herstellers. Danach sind die Libraries bereit in die Sequenzier-Kartusche (MiniSeq High Output Reagent Kit, 300-Zyklen, Illumina) geladen zu werden. Zusammen mit einer Flowcell wurde diese in den MiniSeq™ der Firma Illumina eingebracht und der Sequenzierlauf kann gestartet werden. Folgende Parameter wurden dazu am Sequenziergerät verwendet: Modus: Stand-alone, Read 1: 149, Index 1: 8, Index 2: 10, Read 2: 149.

3.1.12 Bioinformatische Analyse der DNA-Panel Sequenzierung

NGS generiert sehr große Datenmengen und es sind einige rechenintensive Schritte notwendig, um Aussagen zu Veränderungen im untersuchten Material treffen zu

können. Die Sequenzierplattform speichert die unverarbeiteten Daten in einer bcl-Datei ab. Da alle Proben gemeinsam sequenziert wurden, müssen diese erst demultiplext werden. Die Trennung in einzelne Datensätze ist möglich, da für jede Probe ein individueller Index während der Library-Präparation verwendet wurde. Mit der Software bcl2fastq (siehe 2.8 Software) werden somit FASTQ-Dateien generiert. Danach müssen noch die Adapter, welche für die Sequenzierung notwendig waren, mit cutadapt (siehe 2.8 Software) entfernt werden. Nun sind die Dateien soweit vorbereitet, dass die DNA-Sequenzen gemappt werden können. Dabei werden die Sequenzen der vielen einzelnen DNA-Fragmente mit einem Referenzgenom verglichen und der richtigen Stelle zugewiesen. Dies geschieht mit dem Programm BWA MEM (siehe 2.8 Software). Abhängig davon, wie oft ein sequenzgleicher Read einer definierten Region zuordnet werden kann, lässt sich die erreichte Abdeckung bei einem Sequenzierlauf bestimmen. Sind über 70 % der sequenzierten Regionen mit mindestens 50 Reads abgedeckt, kann man von einem guten Ergebnis sprechen. Mit LocatIt_v3.5.1.46 und samtools 1.2 (siehe 2.8 Software) werden von den gemappten Daten Duplikate entfernt und es entsteht eine sortierte sowie indexierte BAM-Datei. Ausgehend von dieser Datei ist es nun möglich, die genauen Unterschiede zwischen der Probe und einem als Referenz verwendeten Genom zu bestimmen. Dies basiert auf der Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), kleinen Insertionen und Deletionen (Indels), Kopienzahlvariationen (CNVs) und größeren strukturellen Alterationen (Insertionen, Inversionen und Translokationen). SNPs werden mit VarScan somatic v.2.4.3 (siehe 2.8 Software) detektiert sowie gefiltert und mit Annovar 2016-02-01 (siehe 2.8 Software) wird jeder entdeckte SNP mithilfe von verschiedenen Datenbanken auf seine individuelle Relevanz für den Organismus überprüft. Die detektierten SNPs entsprechen keinen somatischen SNPs, sondern bilden nur den Unterschied zwischen Primär- und Rezidivtumor ab. Für die Analyse der CNVs wird das Tool VarScan copynumber und copycaller v2.4.3 (siehe 2.8 Software) angewendet. Dabei muss man zwischen der Kopienzahl-Analyse von ganzen Chromosomen und jener einzelner Gene unterscheiden. Zur Berechnung der Mutationslast wurden sämtliche neuauftretenden Mutationen welche nur in den Rezidivtumoren, jedoch nicht in den Primärtumoren vorliegen, einbezogen. Die Gesamtzahl der Mutationen wurde mithilfe der Panelgröße auf ein Megabasenpaar normiert. Eine Filterung der Mutationen nach nur exonisch und nicht-synonym hat dabei nicht stattgefunden.

Die Resultate dieser Algorithmen müssen anschließend noch manuell unter Verwendung von verschiedenen Datenbanken weiter analysiert werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

3.1.13 Next-Generation-Sequencing (NGS) – RNA-Seq Library-Präparation und Sequenzierung

Für die Vorbereitung einer mRNA-Sequenzierung wurde das TruSeq RNA Library Prep Kit v2 von Illumina verwendet. Dieses System bietet die Möglichkeit, eine mRNA-Sequenzier-Library ausgehend von der kompletten zellulären RNA zu erzeugen.

Als Ausgangsmaterial diente gereinigte RNA isoliert aus kryokonserviertem Gewebe. Es wurden jeweils 1 µg an RNA verwendet. Alle weiteren Schritte, wie die Reinigung und Fragmentierung der mRNA, die cDNA-Synthese, die Ligation der Adapter, die Vervielfältigung per PCR und die Aufreinigung der Library wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Für die Quantifizierung der Library wurde die 4200 TapeStation von Agilent Technologies verwendet. Diese kann mit 2 µl gereinigter Library per automatisierter Elektrophorese die Molarität der produzierten Library bestimmen.

Nach der Konzentrationsbestimmung können die einzelnen Libraries äquimolar „gepoolt“ werden. Anschließend muss erneut mit der 4200 TapeStation die Molarität bestimmt werden. Danach wird die Library noch weiter verdünnt und denaturiert. Diese Schritte erfolgten gemäß Herstellerangaben.

Danach sind die Libraries bereit, in die Sequenzier-Kartusche geladen zu werden. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines Single read (SR)-Protokolls für 75 bp mit einem NextSeq 550 von Illumina durchgeführt.

3.1.14 Bioinformatische Analyse der mRNA-Sequenzierung

Die Sequenzierplattform speichert die Rohdaten in einer bcl-Datei ab. Diese werden mit dem Programm CASAVA 1.8.2 (siehe 2.8 Software) in FASTQ-Dateien konvertiert. Nun sind die Dateien soweit vorbereitet, dass die FASTQ-Dateien mit HISAT 2.2.0 (siehe 2.8 Software) gemappt werden können. Als Referenzgenom wurde die Version hg38 des humanen Genoms verwendet.

Damit ist es möglich, für jede sequenzierte Probe eine Count-Tabelle aus den gemappten Sequenzierdaten zu erstellen. Dafür wurde die Software featureCounts verwendet (siehe 2.8 Software). Die Count-Tabelle gibt an, in welcher Häufigkeit die

jeweiligen mRNA, in Form von Anzahl der Reads, dem zugehörigen Gen zugeordnet ist. Diese Tabellen bilden die Grundlage für die nachfolgenden Analysen.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) basiert auf den RPKM (Reads per kilobase per million mapped reads) Expressionswerten der 1000 variabelsten Genen und wurde mittels der `prcomp` Funktion in R berechnet (siehe 2.8 Software sowie 7.4 R-Skripte). Visualisiert wurde die Analyse mit einem Biplot, welcher mithilfe eines individuell erstellten R-Skripts und dem Paket `ggplot` (siehe 2.8 Software) erstellt wurde.

Die differentielle Expression der einzelnen Gene in Bezug auf alle sequenzierten Proben wurde mit einem individuellem R-Skript (siehe 7.4 R-Skripte) und dem Paket `DESeq2` (siehe 2.8 Software) berechnet. Des Weiteren wurde die differentielle Expression der Gene für jeweils zwei Proben berechnet. Dafür wurde ein individuelles R-Skript (siehe 7.4 R-Skripte) unter der Verwendung der Methode nach Audic-Claverie (56) erstellt. Bei beiden Methoden wurden für jedes Gen der $\log_2(\text{fold-change})$ und der p-Wert berechnet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie können spezifische Proteine indirekt über antikörpergekoppelte Markierungsreaktionen nachgewiesen werden. Für die Markierungsreaktion wurde das EnVision™ + Dual Link System HRP (DAB+) Kit der Firma Dako verwendet.

Als Ausgangsmaterial diente Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe. Davon wurden mit einem Mikrotom 3–4 μm dicke Schnitte erzeugt, welche auf einen Objektträger aufgebracht wurden. Zum Entparaffinieren der Schnittpräparate wurden diese zuerst 2x 10 min in Xylol gestellt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (99,98 % Ethanol \rightarrow 95 % Ethanol \rightarrow 70 % Ethanol). Um die Antikörperbindungsstellen frei zu legen, wurden die Schnittpräparate für 40 min in heißen 10 mM Natriumcitrat-Puffer gestellt. Der Puffer wurde mithilfe eines Mikrowellenofens alle 10 min wieder zum Kochen gebracht. Danach wurden die Schnitte in 1x PBST abgekühlt. Zum Entfernen überschüssiger Flüssigkeit auf den Objektträgern wurden staubfreie Papiertücher verwendet. Dieser Schritt ist notwendig, bevor das Gewebe mit einem Reagenz in Kontakt gebracht wird. Zusätzlich wird das Gewebe mit einem „Liquid-Blocker“ eingekreist. Nun wurden auf die Schnittpräparate 2–3 Tropfen Dual Endogenous Enzyme Block (EnVision™ + Dual Link System HRP)

aufgebracht und 10 min inkubiert. Dadurch wird die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes blockiert. Danach wurden die Schnittpräparate wieder in 1x PBST gewaschen. Bevor der Primärantikörper aufgebracht wird, muss dieser verdünnt werden. Für die jeweiligen Verdünnungen siehe Tabelle unter Punkt 2.6. Dazu verwendet man eine 1 %-ige Lösung von bovinem Serum Albumin gelöst in 1x PBS. Jetzt können pro Schnitt etwa 100 µl des verdünnten Primärantikörpers aufgebracht werden. Dieser inkubiert für 120 min. Es folgt ein Waschschrift mit 1x PBST. Nun werden 2–3 Tropfen des Sekundärantikörpers (Labelled Polymer HRP) aufgebracht. An diesen ist eine Peroxidase, isoliert aus dem Meerrettich (HRP), gekoppelt. Nach 30 min Inkubation folgt ein Waschschrift mit 1x PBST. Im nächsten Schritt wird das gesuchte Protein sichtbar gemacht. Dafür muss das Gewebe 3 min mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) inkubiert werden. DAB wird durch die HRP und Wasserstoffperoxid, welches dem Inkubationsmedium ebenfalls zugesetzt ist, zu einem schwarz-braunen Polymer oxidiert.

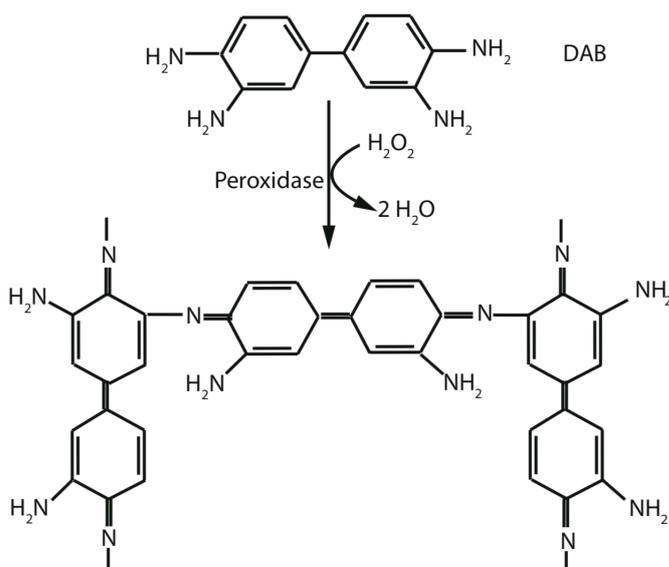


Abb. 2 Oxidierung von 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in ein schwarz-braunes Polymer (57)

Zum Stoppen der Reaktion werden die Schnittpräparate in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gewaschen. Danach muss eine sogenannte Gegenfärbung mit dem blauen Farbstoff Hämatoxylin erfolgen. Dazu wurde das Gewebe mit dem Farbstoff benetzt und 8 min lang inkubiert. Für ein gutes Färbeergebnis müssen die Schnittpräparate anschließend ungefähr 4 min unter fließendem heißem Leitungswasser gewaschen werden. Darauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe und eine letzte Inkubation von 2x 10 min in Xylol. Jetzt kann zum Konservieren ein mit Entellan bestrichenes

Deckglas auf die Schnittpräparate gelegt werden. Nach ungefähr 24 h Trocknungszeit kann das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

Tabelle 2: Semiquantitatives Auswertungsschema für die immunhistochemischen Färbungen

Score (Immunoreactivity score)	0	1	2	3	4
Positive Zellen in %	keine pos. Zellen	< 10	10-50	51-80	> 80

Damit die Ergebnisse objektiviert werden, wurde eine semiquantitative Bewertung (Tabelle 2) durchgeführt. Der Anteil an positiven Zellen entspricht jenen Zellen, bei denen eine Braunfärbung des Zellkerns, hervorgerufen durch die Oxidierung von DAB, sichtbar ist. Dieser Anteil wird entsprechend mit der gesamten Tumormasse in Relation gesetzt und anschließend in einen Immunoreactivity Score (IRS) von 0 bis 4 übersetzt.

4 Ergebnisse

4.1 MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 Proteinexpression in Primär- und Rezidivtumoren

Die MMR-Proteine haben, wie in der Einleitung beschrieben, nicht nur einen Einfluss auf die Wirksamkeit einer alkylierenden Chemotherapie, sondern sind möglicherweise auch an der Entwicklung eines hypermutierten Phänotyps beteiligt. Daher wurde untersucht, ob und wenn ja, in welcher Menge diese Proteine von den Tumorzellen exprimiert werden. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die humanen MMR-Proteine MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 angefertigt. Zur Analyse wurden sämtliche Gliom-Entitäten ab ZNS-WHO Grad 2 herangezogen. Die Voraussetzung war jedoch, dass es zum Primärtumor immer mindestens einen Rezidivtumor geben muss. Nur so kann der Einfluss der Therapie auf die Expression der MMR-Proteine ermittelt werden.

Nach intensiver Datenbankrecherche wurde Tumormaterial von insgesamt 47 Patienten ausgewählt.

Tabelle 3: Übersicht der Gliom-Entitäten und der Geschlechterverteilung

	Diagnose Primärtumor						Alle Patienten
	Astrozytom, IDH-mutiert	Astrozytom, NOS	Glioblastom, IDH-Wildtyp	Oligodendrogliom, IDH-mutiert, 1p19q ko-deletiert	Oligoastrozytom, NOS	pleomorphes Xantoastrozytom	
Anzahl n	10	4	29	2	1	1	47 (22 w und 25 m)

Die Primärtumoren umfassen folgende sechs Diagnosen: Astrozytom, IDH-mutiert und NOS, Glioblastom, IDH-Wildtyp, Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p19q ko-deletiert, Oligoastrozytom, NOS und ein pleomorphes Xantoastrozytom. Von den 47 Patienten sind 22 Frauen und 25 Männer. Bei der Erstdiagnose waren diese im Mittel 51 Jahre alt. Zu den Primärtumoren gibt es je nach Patient bis zu 3 Rezidivtumoren. Daher beinhaltet ein sogenanntes „Tumorkörper“ maximal vier unterschiedliche Fallnummern. Für jede Fallnummer wurden vier Schnitte angefertigt und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Die Bewertung erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben, nach einem semiquantitativen Auswertungsschema. Aufgrund von verschiedenen Ursachen war es leider nicht möglich, jedes Paar vollständig zu bewerten. Teilweise war zu wenig oder kein Material mehr vorhanden. Trotzdem wurden zur Übersicht (Tabelle 4) Daten von allen 47 Patienten einbezogen.

Tabelle 4: Auswertung der Immunhistochemie – Primärtumor, 1. Rezidiv, 2. Rezidiv und 3. Rezidiv

Die Tabelle zeigt die Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate mit einem IRS von 0–4. Trotz mehrfacher Versuche konnte ein IRS nicht immer bestimmt werden. Diese Felder bleiben leer. Ein IRS von 0 wurde in keinem Fall vergeben. Von einigen Paaren sind nicht alle Präparate verfügbar.

	Fallnummer Primärtumor	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 1. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 2. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 3. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2
1	OA_1	1	3	3	1	OA_2		3	3	2										
2						GB_29	2	1	2	1	GB_30	2	3	3	3					
3						A_19	3	3	2	3	GB_31	3	3	2	4					
4	PXA_2					PXA_1	3	2	2	3										
5	GB_32	2	3	3	3	GB_33	2	2	3	2	GB_34	3	2	3	3	GB_35	3	3	3	3
6	A_11	2	1	2	2	A_31	3	3	2	3	A_32	2	2	2	2					
7	GB_38	3	2	3	3	GB_39	2	1		3	GB_40	1	1	2	2					
8	O_3					O_4	3	3	4	4	O_5	3	3	3	4					
9	A_12	2	2	3	3	A_20	1	2	3	2										
10	GB_41	2	2	2	3	GB_42	2	2	2	3	GB_43									
11	GB_44	2	3	3	3	GB_45	2	2	3	3	GB_46	1	2	3	3					
12	A_22	2	3	3	3	A_23	2	3	3	3										
13	GB_47	3	3	4	4	GB_48	2	3	3	3										
14	GB_49	3	3	3	2	GB_50	3	2	2	2	GB_51	3	2	2	2					
15											A_33	3	2	2	4	A_34	3	3	2	4
16	GB_17	3	4	4	4	GB_54	2	3	2	3	GB_55	2	2	2	2	GB_56	3	2	2	3
17	A_21	2	2	2	2	GB_106		1	2	1										
18	A_24	2	2	2	2	GB_107	3	2	3	3										
19						GB_57	3	3	3	3	GB_58	3	3	3	3					
20	GB_59	3	3	3	3	GB_60	3	2	4	4										
21	GB_61	2	3	3	3						GB_62									
22	GB_63	3	4	4	4	GB_64	2	1	1	2										
23	O_6	4	4	4	4	O_7	4	4	4	3										
24	GB_65	3	3	3	3	GB_66	2	3	3	3										
25	GB_67	4	3	3	3	GB_68	3	2	3	2										
26	A_4	2	3	3	3	A_25	1	2	2	2										
27	A_13	2	3	2	2	A_35	3	3	2	3	A_36	4	3	1	3					
28	A_14	2	2	3	3	A_26	1	2	2	3	A_37	3	2	1	3					
29	GB_69	3	4	3	3	GB_70	2	3	3	3										
30	GB_71	2	3	3	3	GB_72	2	2	2	2	GB_73	2	2	2	2					
31	GB_74	3	3	3	3	GB_75	2	3	3	3	GB_76	2	3	2	3					
32	GB_77	3	3	4	3	GB_78	3	3	3	2										
33						GB_79	2	1	1	3	GB_80	3	3	3	3					
34	GB_81	3	4	3	4	GB_82	1	1	3	1										
35	A_27	4	4	4	3	A_28		2	2	2										
36	GB_83	1	3	2	2	GB_84	2	3	2	2										
37	GB_85	2	4	4	4	GB_86	3	2	4	3										
38	GB_87	2	2	2	3	GB_88	3	4	3	3										
39	GB_89	4	3	3	4	GB_101	2	2	2	3										
40	A_15	3	3	3	3						A_38	3	3	3	4					
41	A_16	3	3	3	2	A_39	4	2	3	4										
42	GB_90	3	3	4	4	GB_91	3	3	3	3	GB_92	2	3	3	3					
43	GB_93	4	4	4	3	GB_94	2	2	2	2										
44	GB_95	4	4	4	4	GB_96	2	2	2	2										
45	GB_97	1	2	3	2	GB_98														
46	GB_99	3	4	3	4	GB_100	3	3	3	4										
47	A_17	3	3	3	3	A_18	2	3	3	3										

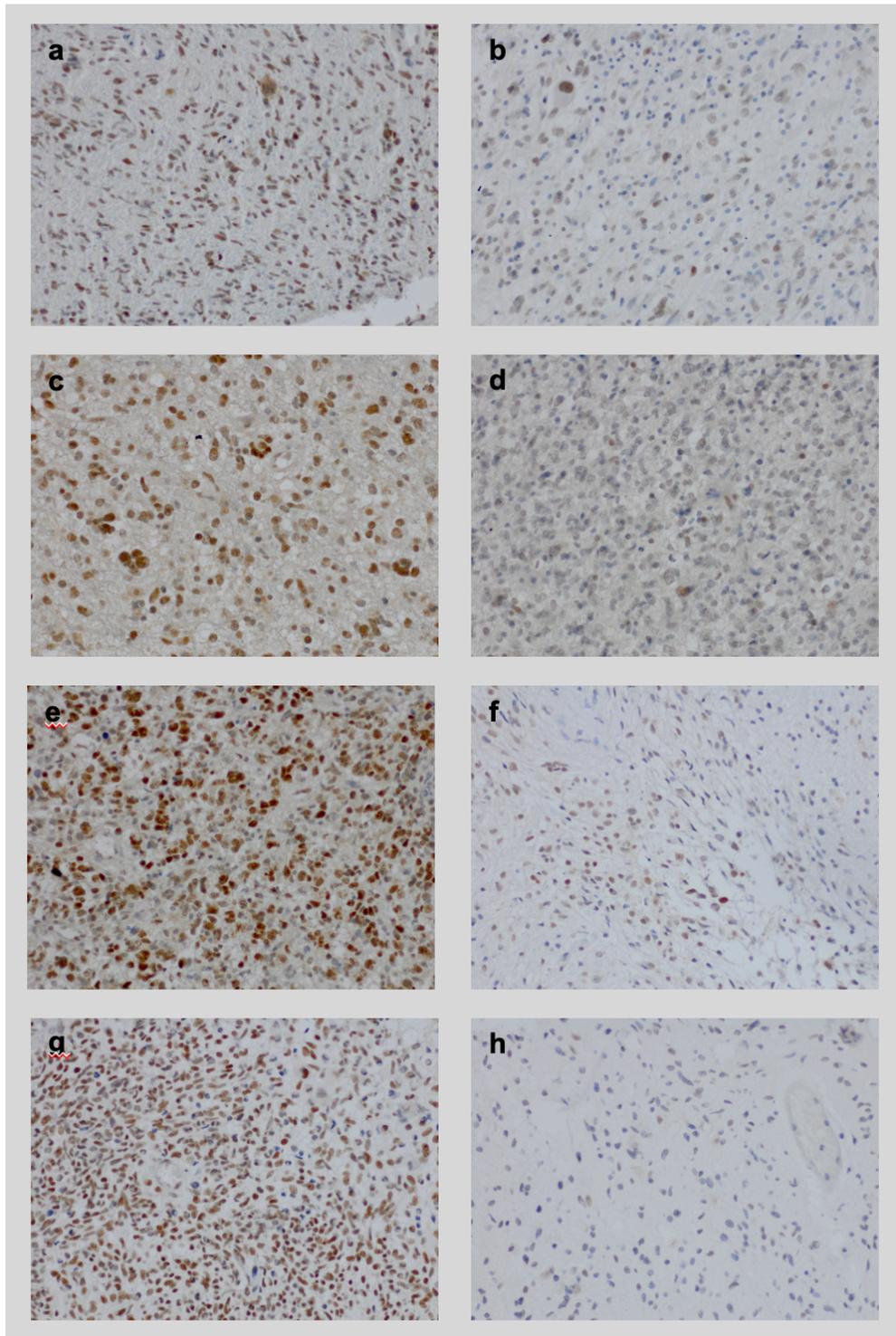


Abb. 3: Beispiele der Immunhistochemie für die Expression der MMR-Proteine im Primär- und Rezidivtumor

(a, b) MLH1 (GB_81 und GB_82); (c, d) ; MSH2 (GB_81 und GB_82); (e, f) MSH6 (GB_89 und GB_101); (g, h) PMS2 (GB_63 und GB_64). Abgebildet sind Beispiele für Rezidive (b, d, f, h) mit einer verminderten Expression der MMR-Proteine im Vergleich zu den Primärtumoren (a, c, e, g). Alle Bilder wurden bei einer Vergrößerung von x200 aufgenommen.

Tabelle 5: Mittelwerte bzw. Mediane des IRS von MSH6, MLH1, PMS2 und MSH2

	<i>MSH6</i>				<i>MLH1</i>				<i>PMS2</i>				<i>MSH2</i>			
	Primär	1. Rez.	2. Rez.	3. Rez.	Primär	1. Rez.	2. Rez.	3. Rez.	Primär	1. Rez.	2. Rez.	3. Rez.	Primär	1. Rez.	2. Rez.	3. Rez.
Anzahl n	40	40	18	3	40	43	18	3	40	42	18	3	40	43	18	3
Mittelwert	2,6	2,4	2,5	3,0	3,0	2,3	2,4	2,7	3,1	2,6	2,3	2,3	3,0	2,7	2,9	3,3
Median	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	2,0	2,5	3,0	3,0	3,0	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0

Vergleicht man die Mittelwerte der einzelnen Antikörper (Tabelle 5), zeigt sich kein eindeutiges Ergebnis. Nur die Expression von MLH1 und PMS2 nimmt tendenziell ab. MSH6 und MSH2 werden im Primärtumor und in den Rezidivtumoren auf annähernd konstantem Level exprimiert. Mittelwert und Median vom 3. Rezidivtumor ist bei jedem Antikörper mit Vorsicht zu bewerten, da jeweils nur drei Werte zur Verfügung stehen. Damit man die Veränderungen in der Expression der vier MMR-Proteine besser beurteilen kann, wurde zusätzlich der IR-Score von jedem verfügbaren Primärtumor mit dem IR-Score des jeweils zuletzt aufgetretenen Rezidivs verglichen (Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9).

Tabelle 6: Vergleich der Expression von MSH6 zwischen Primär- und Rezidivtumor

	Fallnummer Primärtumor	MSH6	Fallnummer letztes Rezidiv	MSH6	Trend
1	GB_32	2	GB_35 (R3)	3	+
2	A_11	2	A_32 (R2)	2	=
3	GB_38	3	GB_40 (R2)	1	-
4	A_12	2	A_20 (R1)	1	-
5	GB_41	2	GB_42 (R1)	2	=
6	GB_44	2	GB_46 (R2)	1	-
7	A_22	2	A_23 (R1)	2	=
8	GB_47	3	GB_48 (R1)	2	-
9	GB_49	3	GB_51 (R2)	3	=
10	GB_17	3	GB_56 (R3)	3	=
11	A_24	2	GB_107 (R1)	3	+
12	GB_59	3	GB_60 (R1)	3	=
13	GB_63	3	GB_64 (R1)	2	-
14	O_6	4	O_7 (R1)	4	=
15	GB_65	3	GB_66 (R1)	2	-
16	GB_67	4	GB_68 (R1)	3	-
17	A_4	2	A_25 (R1)	1	-
18	A_13	2	A_36 (R2)	4	+
19	A_14	2	A_37 (R2)	3	+
20	GB_69	3	GB_70 (R1)	2	-
21	GB_71	2	GB_73 (R2)	2	=
22	GB_74	3	GB_76 (R2)	2	-
23	GB_77	3	GB_78 (R1)	3	=
24	GB_81	3	GB_82 (R1)	1	-
25	GB_83	1	GB_84 (R1)	2	+
26	GB_85	2	GB_86 (R1)	3	+
27	GB_87	2	GB_88 (R1)	3	+
28	GB_89	4	GB_101 (R1)	2	-
29	A_15	3	A_38 (R2)	3	=
30	A_16	3	A_39 (R1)	4	+
31	GB_90	3	GB_92 (R2)	2	-
32	GB_93	4	GB_94 (R1)	2	-
33	GB_95	4	GB_96 (R1)	2	-
34	GB_99	3	GB_100 (R1)	3	=
35	A_17	3	A_18 (R1)	2	-

Tabelle 7: Vergleich der Expression von MLH1 zwischen Primär- und Rezidivtumor

	Fallnummer Primärtumor	MLH1	Fallnummer letztes Rezidiv	MLH1	Trend
1	OA_1	3	OA_2 (R1)	3	=
2	GB_32	3	GB_35 (R3)	3	=
3	A_11	1	A_32 (R2)	2	+
4	GB_38	2	GB_40 (R2)	1	-
5	A_12	2	A_20 (R1)	2	=
6	GB_41	2	GB_42 (R1)	2	=
7	GB_44	3	GB_46 (R2)	2	-
8	A_22	3	A_23 (R1)	3	=
9	GB_47	3	GB_48 (R1)	3	=
10	GB_49	3	GB_51 (R2)	2	-
11	GB_17	4	GB_56 (R3)	2	-
12	A_21	2	GB_106 (R1)	1	-
13	A_24	2	GB_107 (R1)	2	=
14	GB_59	3	GB_60 (R1)	2	-
15	GB_63	4	GB_64 (R1)	1	-
16	O_6	4	O_7 (R1)	4	=
17	GB_65	3	GB_66 (R1)	3	=
18	GB_67	3	GB_68 (R1)	2	-
19	A_4	3	A_25 (R1)	2	-
20	A_13	3	A_36 (R2)	3	=
21	A_14	2	A_37 (R2)	2	=
22	GB_69	4	GB_70 (R1)	3	-
23	GB_71	3	GB_73 (R2)	2	-
24	GB_74	3	GB_76 (R2)	3	=
25	GB_77	3	GB_78 (R1)	3	=
26	GB_81	4	GB_82 (R1)	1	-
27	A_27	4	A_28 (R1)	2	-
28	GB_83	3	GB_84 (R1)	3	=
29	GB_85	4	GB_86 (R1)	2	-
30	GB_87	2	GB_88 (R1)	4	+
31	GB_89	3	GB_101 (R1)	2	-
32	A_15	3	A_38 (R2)	3	=
33	A_16	3	A_39 (R1)	2	-
34	GB_90	3	GB_92 (R2)	3	=
35	GB_93	4	GB_94 (R1)	2	-
36	GB_95	4	GB_96 (R1)	2	-
37	GB_99	4	GB_100 (R1)	3	-
38	A_17	3	A_18 (R1)	3	=

Tabelle 8: Vergleich der Expression von PMS2 zwischen Primär- und Rezidivtumor

	Fallnummer Primärtumor	PMS2	Fallnummer letztes Rezidiv	PMS2	Trend
1	OA_1	3	OA_2 (R1)	3	=
2	GB_32	3	GB_35 (R3)	3	=
3	A_11	2	A_32 (R2)	2	=
4	GB_38	3	GB_40 (R2)	2	-
5	A_12	3	A_20 (R1)	3	=
6	GB_41	2	GB_42 (R1)	2	=
7	GB_44	3	GB_46 (R2)	3	=
8	A_22	3	A_23 (R1)	3	=
9	GB_47	4	GB_48 (R1)	3	-
10	GB_49	3	GB_51 (R2)	2	-
11	GB_17	4	GB_56 (R3)	2	-
12	A_21	2	GB_106 (R1)	2	=
13	A_24	2	GB_107 (R1)	3	+
14	GB_59	3	GB_60 (R1)	4	+
15	GB_63	4	GB_64 (R1)	1	-
16	O_6	4	O_7 (R1)	4	=
17	GB_65	3	GB_66 (R1)	3	=
18	GB_67	3	GB_68 (R1)	3	=
19	A_4	3	A_25 (R1)	2	-
20	A_13	2	A_36 (R2)	1	-
21	A_14	3	A_37 (R2)	1	-
22	GB_69	3	GB_70 (R1)	3	=
23	GB_71	3	GB_73 (R2)	2	-
24	GB_74	3	GB_76 (R2)	2	-
25	GB_77	4	GB_78 (R1)	3	-
26	GB_81	3	GB_82 (R1)	3	=
27	A_27	4	A_28 (R1)	2	-
28	GB_83	2	GB_84 (R1)	2	=
29	GB_85	4	GB_86 (R1)	4	=
30	GB_87	2	GB_88 (R1)	3	+
31	GB_89	3	GB_101 (R1)	2	-
32	A_15	3	A_38 (R2)	3	=
33	A_16	3	A_39 (R1)	3	=
34	GB_90	4	GB_92 (R2)	3	-
35	GB_93	4	GB_94 (R1)	2	-
36	GB_95	4	GB_96 (R1)	2	-
37	GB_99	3	GB_100 (R1)	3	=
38	A_17	3	A_18 (R1)	3	=

Tabelle 9: Vergleich der Expression von MSH2 zwischen Primär- und Rezidivtumor

	Fallnummer Primärtumor	MSH2	Fallnummer letztes Rezidiv	MSH2	Trend
1	OA_1	1	OA_2 (R1)	2	+
2	GB_32	3	GB_35 (R3)	3	=
3	A_11	2	A_32 (R2)	2	=
4	GB_38	3	GB_40 (R2)	2	-
5	A_12	3	A_20 (R1)	2	-
6	GB_41	3	GB_42 (R1)	3	=
7	GB_44	3	GB_46 (R2)	3	=
8	A_22	3	A_23 (R1)	3	=
9	GB_47	4	GB_48 (R1)	3	-
10	GB_49	2	GB_51 (R2)	2	=
11	GB_17	4	GB_56 (R3)	3	-
12	A_21	2	GB_106 (R1)	1	-
13	A_24	2	GB_107 (R1)	3	+
14	GB_59	3	GB_60 (R1)	4	+
15	GB_63	4	GB_64 (R1)	2	-
16	O_6	4	O_7 (R1)	3	-
17	GB_65	3	GB_66 (R1)	3	=
18	GB_67	3	GB_68 (R1)	2	-
19	A_4	3	A_25 (R1)	2	-
20	A_13	2	A_36 (R2)	3	+
21	A_14	3	A_37 (R2)	3	=
22	GB_69	3	GB_70 (R1)	3	=
23	GB_71	3	GB_73 (R2)	2	-
24	GB_74	3	GB_76 (R2)	3	=
25	GB_77	3	GB_78 (R1)	2	-
26	GB_81	4	GB_82 (R1)	1	-
27	A_27	3	A_28 (R1)	2	-
28	GB_83	2	GB_84 (R1)	2	=
29	GB_85	4	GB_86 (R1)	3	-
30	GB_87	3	GB_88 (R1)	3	=
31	GB_89	4	GB_101 (R1)	3	-
32	A_15	3	A_38 (R2)	4	+
33	A_16	2	A_39 (R1)	4	+
34	GB_90	4	GB_92 (R2)	3	-
35	GB_93	3	GB_94 (R1)	2	-
36	GB_95	4	GB_96 (R1)	2	-
37	GB_99	4	GB_100 (R1)	4	=
38	A_17	3	A_18 (R1)	3	=

Es gibt drei Möglichkeiten, die Gegenüberstellung zu bewerten. Nimmt der IRS im Rezidiv zu, wurde ein „Plus“ vergeben. Bleibt der Score gleich oder nimmt er im Rezidiv ab, wurde ein „Ist-Gleich“ bzw. ein „Minus“ vergeben. Die Veränderungen für MSH6, MLH1, PMS2 und MSH2 wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Eine verminderte Expression von MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 in den Rezidivtumoren konnte bei 19 (50,0 %), 18 (47,4 %), 16 (45,7 %) und 16 (42,1 %) Patienten beobachtet werden. In 17 (44,7 %), 14 (36,8 %), 11 (31,4 %) und 19 (50,0 %) Fällen blieb der IRS für MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 unverändert. Die Expression von MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 steigerte sich bei 2 (5,3 %), 6 (15,8 %), 8 (22,9 %) und 3 (7,9 %) Rezidivtumoren im Vergleich zum Primärtumor.

Tabelle 10: Vergleich der Expression der MMR-Proteine zwischen Primär- und Rezidivtumor

	<i>Immunoreactivity score im Rezidiv-Tumor</i>			Insgesamt, n
	niedriger als im Primär, n (%)	identisch zum Primär, n (%)	höher als im Primär, n (%)	
MLH1	19 (50,0)	17 (44,7)	2 (5,3)	38
MSH2	18 (47,4)	14 (36,8)	6 (15,8)	38
MSH6	16 (45,7)	11 (31,4)	8 (22,9)	35
PMS2	16 (42,1)	19 (50,0)	3 (7,9)	38

4.2 Resultate der DNA-Extraktion

Nachdem die immunhistochemisch gefärbten Präparate ausgewertet waren, wurden für weitere Analysen die relevantesten Paare ausgewählt (Tabelle 11). Die Auswahl erfolgte nach verschiedenen Kriterien. Von großem Interesse sind jene Paare, bei denen im Primärtumor die MMR-Proteine stark (IRS 3 bzw. 4) im Vergleich zum Rezidivtumor (IRS 1 bzw. 2) exprimiert werden. Dies entspricht einer Abnahme des IRS von mindestens zwei Punkten. Doch auch Paare, bei denen bereits im Primärtumor die Expression der MMR-Proteine nur schwach vorhanden ist (IRS 1 bzw. 2), sind für weitere Untersuchungen von Bedeutung und wurden daher in die Auswahl miteinbezogen.

Nach demselben Prinzip wie in Tabelle 10 wurden in Tabelle 12 die Veränderungen der IR-Scores der vorausgewählten Paare bewertet und zusammengefasst. Eine verminderte Expression von MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 in den Rezidivtumoren konnte bei 9 (81,8 %), 8 (72,7 %), 6 (54,5 %) und 8 (72,7 %) Patienten beobachtet werden. In 2 (18,2 %), 2 (18,2 %), 1 (9,1 %) und 3 (27,3 %) Fällen blieb der IRS für MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 unverändert. Die Expression von MLH1, MSH2,

MSH6 und PMS2 steigerte sich bei 0 (0 %), 1 (9,1 %), 3 (27,3 %) und 0 (0 %) Rezidivtumoren im Vergleich zum Primärtumor.

Tabelle 11: Auswahl der Primär- und Rezidivtumoren aufgrund von Ergebnissen in der Immunhistochemie

	Fallnummer Primärtumor	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 1. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 2. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	Fallnummer 3. Rezidiv	MSH6	MLH1	PMS2	MSH2	
1	GB_38	3	2	3	3	GB_39	2	1		3	GB_40	1	1	2	2						
2	GB_44	2	3	3	3	GB_45	2	2	3	3	GB_46	1	2	3	3						
3	GB_17	3	4	4	4	GB_54	2	3	2	3	GB_55	2	2	2	2	GB_56	3	2	2	3	
4	GB_63	3	4	4	4	GB_64	2	1	1	2											
5	A_4	2	3	3	3	A_25	1	2	2	2											
6	A_13	2	3	2	2	A_35	3	3	2	3	A_36	4	3	1	3						
7	A_14	2	2	3	3	A_26	1	2	2	3	A_37	3	2	1	3						
8	GB_81	3	4	3	4	GB_82	1	1	3	1											
9	A_27	4	4	4	3	A_28		2	2	2											
10	GB_85	2	4	4	4	GB_86	3	2	4	3											
11	GB_89	4	3	3	4	GB_101	2	2	2	3											

Tabelle 12: Vergleich der Expression der MMR-Proteine bei den ausgewählten Primär- und Rezidivtumoren

	Immunoreactivity score im Rezidiv-Tumor			Insgesamt, n
	niedriger als im Primär, n (%)	identisch zum Primär, n (%)	höher als im Primär, n (%)	
MLH1	9 (81,8)	2 (18,2)	0 (0)	11
MSH2	8 (72,7)	2 (18,2)	1 (9,1)	11
MSH6	6 (54,5)	1 (9,1)	3 (27,3)	10
PMS2	8 (72,7)	3 (27,3)	0 (0)	11

Für jede Fallnummer wurde aus dem verfügbaren FFPE-Material DNA isoliert. Dies war notwendig, um die ausgewählten Paare auf das Vorhandensein einer Polymerase Epsilon Mutation zu analysieren bzw. eine DNA-Panel-Sequenzierung durchführen zu können. Von der extrahierten DNA wurde, wie im Methodenteil beschrieben, die Konzentration mithilfe des PicoGreen-Assays bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Konzentrationen der aus FFPE-Material isolierten DNA

	Fallnummer Primärtumor	DNA-Konz. (ng/µl)	Fallnummer 1. Rezidiv	DNA-Konz. (ng/µl)	Fallnummer 2. Rezidiv	DNA-Konz. (ng/µl)	Fallnummer 3. Rezidiv	DNA-Konz. (ng/µl)
1	GB_38	11,7	GB_39	1,2	GB_40	0,3		
2	GB_44	25,7	GB_45	7,2	GB_46	47,7		
3	GB_17	60,4	GB_54	36,1	GB_55	12,3	GB_56	58,6
4	GB_63	93,6	GB_64	16,5				
5	A_4	31,2	A_25	25,7				
6	A_13	18,5	A_35	8,5	A_36	89,7		
7	A_14	22,4	A_26	4,5	A_37	23,5		
8	GB_81	18,1	GB_82	36,7				
9	A_27	20,0	A_28	6,4				
10	GB_85	12,3	GB_86	54,8				
11	GB_89	2,1	GB_101	10,1				

Nur 9 der 11 Paare können im vollen Umfang für weitere Analysen verwendet werden, da die Menge der isolierten DNA von Paar 1 (GB_38, GB_39 und GB_40) und Paar 11 (GB_89 und GB_101) teilweise nicht ausreicht für weitere Untersuchungen.

4.3 Analyse von MSH6- und POLE-Mutationen in verschiedenen Gliom-Entitäten

In einem ersten Schritt wurden mit der aus FFPE-Material isolierten Patienten-DNA Sanger-Sequenzierungen durchgeführt, um das Vorhandensein bestimmter Einzelbasen-Mutationen in den Genen von MSH6 und der DNA-Polymerase ϵ abzuklären. Alle Regionen von Interesse wurden forward und reverse sequenziert. MSH6-Mutationen wurden bei zwei Patienten in der Routine-Diagnostik im Zuge des NGS DNA-Panels detektiert und sollten nun per Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Dabei handelt es sich um Proben aus Tabelle 14 mit der Fallnummer O_8 und O_9. Diese finden sich in Tabelle 4 bei der Auswertung der Immunhistochemie nicht wieder. Beide Proben wurden lediglich als Kontrollen für die Expression von MSH6 in der Immunhistochemie verwendet. Da es sich um zwei unterschiedliche Mutationen, nämlich MSH6:NM_000179:exon4:c.G1558A:p.G520S und MSH6:NM_000179:exon4c.C2132T:p.P711L, handelt, wurde für jede davon ein passendes Primer-Paar designed. Als Kontrolle wurde DNA von einem anderen Patienten, welche aus Blut isoliert wurde, verwendet. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung für MSH6 zusammengefasst.

Tabelle 14: Analyse der MSH6-Mutationen c.G1558A und c.C2132T

Aus den Elektropherogrammen wurden jeweils die Basen an den Positionen 1558 und 2132 in der forward- und reverse-Sequenz abgelesen. Die absolute Position der Base in der Sequenz wurde daneben in Klammern protokolliert. A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin und C = Cytosin.

Fallnummer	c.G1558A		c.C2132T	
	forward	reverse	forward	reverse
O_8	G / A (98)	C / T (170)		
O_9			C / T (104)	G / A (73)

Bei dem Patienten mit der Fallnummer O_8 konnte die bereits bekannte Mutation bestätigt werden. Es liegt ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Adenin an der Position 1558 in der codierenden DNA vor. Dasselbe gilt für den Patienten mit der Fallnummer O_9. Auch bei diesem Patienten konnte ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position 2132 bestätigt werden (Abb. 4). Für die Fallnummer O_8 bzw. O_9 wurde in der Immunhistochemie die Expression der MMR-Proteine MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 mit 1, 0, 1 und 1 bzw. mit 1, 1, 2 und 2 bewertet.

Damit konnte der Zusammenhang zwischen einer Mutation und der daraus folgenden verminderten Expression der MMR-Proteine dargestellt werden.

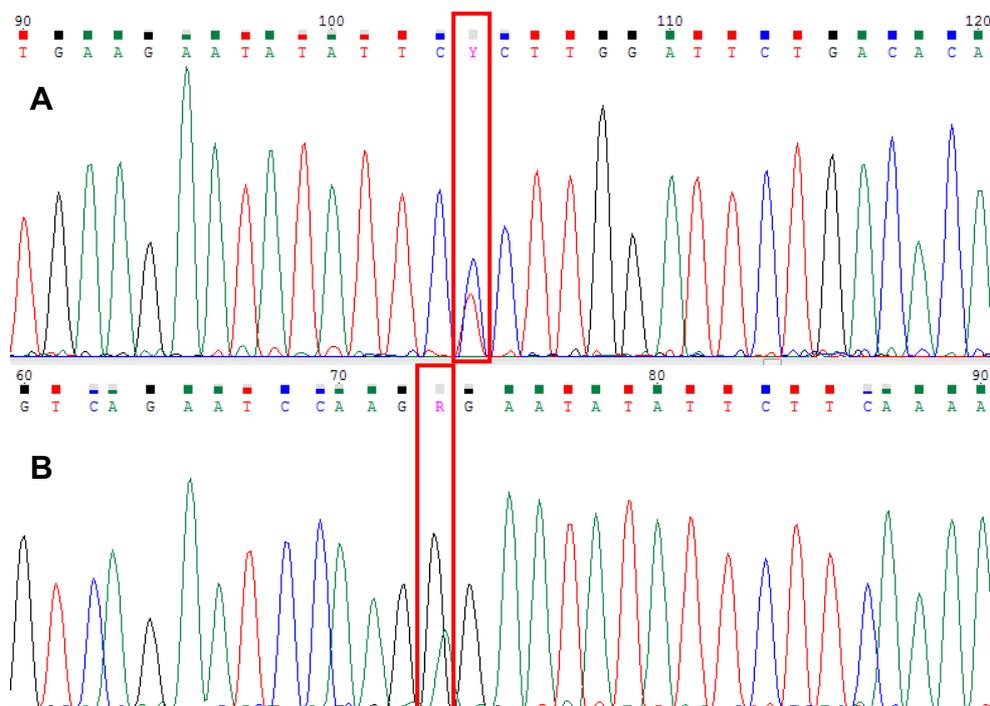


Abb. 4: Exemplarische Elektropherogramme von O_9

Ausschnitt aus der (A) Forward-Sequenz und der (B) Reverse-Sequenz für die Mutation c.C2132T. Die mutierte Position ist jeweils mit einem roten Rahmen markiert.

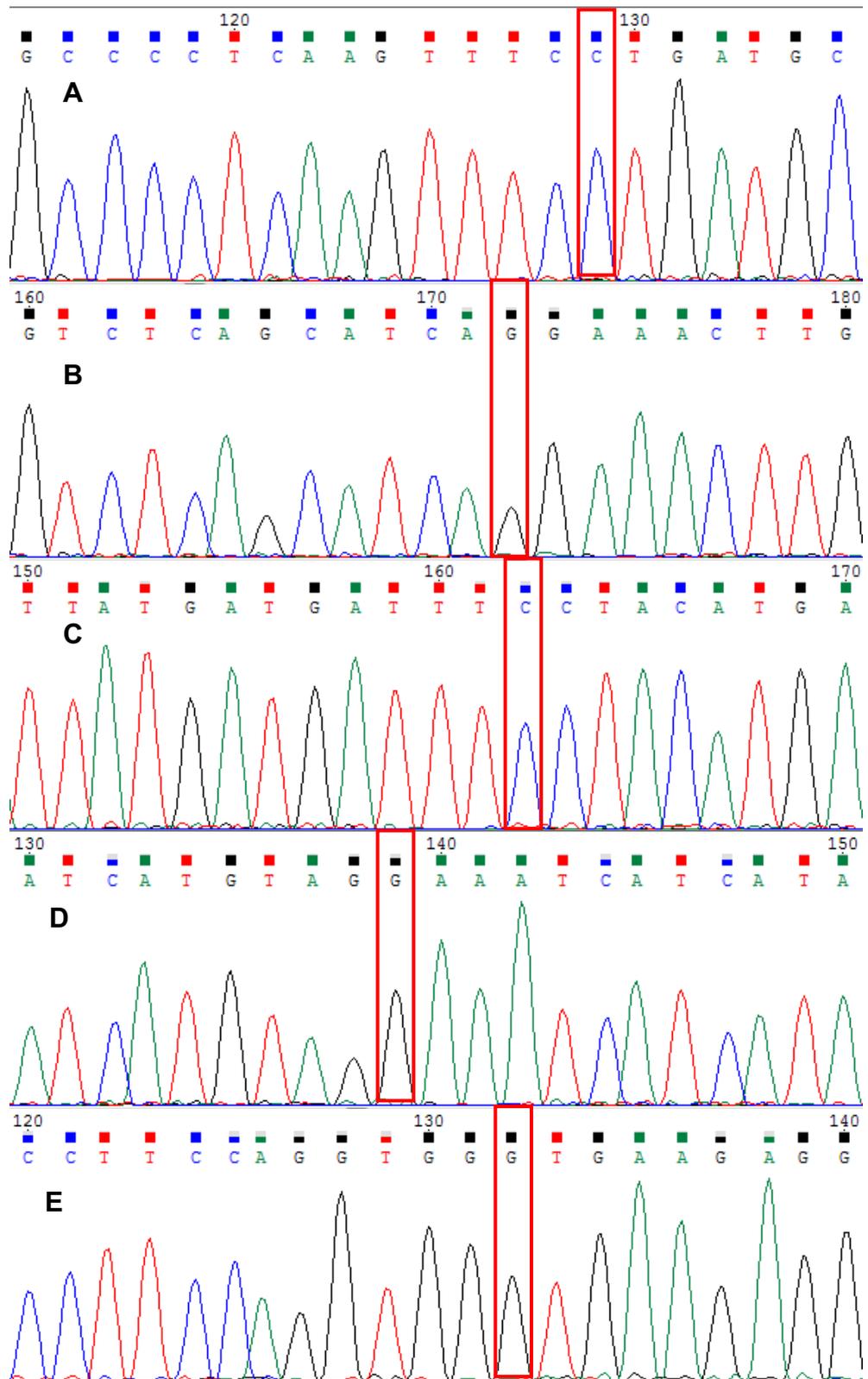
Mutationen in der DNA-Polymerase ϵ treten gehäuft an bestimmten Positionen auf. Besonders häufig sind die Mutationen POLE:NM_00631:exon9:c.C857G:p.P286R und POLE:NM_00631:exon9:c.C890T:p.S297F sowie POLE:NM_00631:exon13:c.G1231T/C:c.V411L und POLE:NM_00631:exon14:c.G1366C:p.A456P. Daher wurden auch für diese Positionen drei spezifische Primer-Paare designed. In diesem Fall reichen drei Primer-Paare aus, da die Mutationen im Exon 9 mit einem Paar abgedeckt werden können. Von den 10 vorselektierten Primär- und Rezidivpaaren wurde immer nur das aktuellste Rezidiv auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht. Die ausgewerteten Ergebnisse wurden in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tabelle 15: Analyse der POLE-Mutationen c.C857G, c.C890T, c.G1231T/C und c.G1366C

Aus den Elektropherogrammen wurden jeweils die Basen an den Positionen 857, 890, 1231 und 1366 in der forward- und reverse-Sequenz abgelesen. Die absolute Position der Base in der Sequenz wurde daneben in Klammern protokolliert. A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin und C = Cytosin.

	Fallnummer	c.C857G		c.C890T		c.G1231T/C		c.G1366C	
		forward	reverse	forward	reverse	forward	reverse	forward	reverse
1	GB_46	C / C (129)	G / G (170)	C / C (162)	G / G (137)	G / G (132)	C / C (122)	G / G (117)	C / C (96)
2	GB_56	C / C (129)	G / G (170)	C / C (162)	G / G (137)	G / G (132)	C / C (123)	G / G (117)	C / C (96)
3	GB_64	C / C (130)	G / G (173)	C / C (163)	G / G (140)	G / G (133)	C / C (126)		C / C (100)
4	A_25	C / C (129)	G / G (171)	C / C (162)	G / G (138)	G / G (133)	C / C (127)	G / G (119)	C / C (96)
5	A_36	C / C (130)	G / G (176)	C / C (163)	G / G (143)	G / G (133)	C / C (126)	G / G (120)	C / C (97)
6	A_37	C / C (129)	G / G (172)	C / C (162)	G / G (139)	G / G (132)	C / C (122)	G / G (117)	C / C (95)
7	GB_82	C / C (129)	G / G (170)	C / C (162)	G / G (137)	G / G (133)	C / C (125)	G / G (117)	C / C (95)
8	A_28	C / C (129)	G / G (170)	C / C (162)	G / G (137)	G / G (132)	C / C (124)	G / G (117)	C / C (96)
9	GB_86	C / C (129)	G / G (171)	C / C (162)	G / G (138)	G / G (133)	C / C (126)	G / G (117)	C / C (96)
10	GB_101	C / C (129)	G / G (170)	C / C (162)	G / G (137)	G / G (133)	C / C (124)	G / G (117)	C / C (95)

Bei den analysierten Rezidivtumoren konnte keine Hotspotmutation in der POLE-Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ detektiert werden. Die Elektropherogramme für die Fallnummer GB_64 konnten aufgrund schlechter Lesequalität nicht vollständig ausgewertet werden.



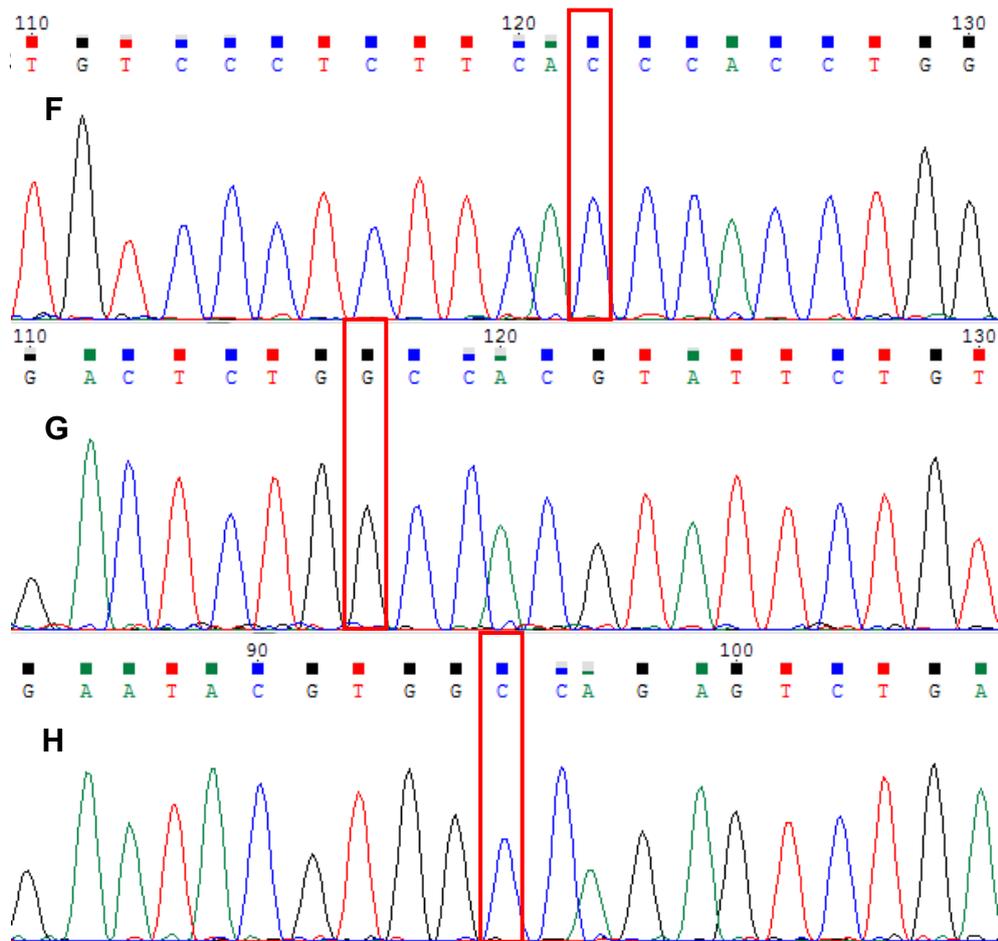


Abb. 5: Exemplarische Elektropherogramme von A_37

Ausschnitt aus den (A)(C)(E)(G) Forward-Sequenzen und den (B)(D)(F)(H) Reverse-Sequenzen. Untersucht wurden die Mutationen POLE:NM_00631:exon9:c.C857G:p.P286R (A)(B) und c.C890T:p.S297F (C)(D) sowie exon13:c.G1231T/C:c.V411L (E)(F) und exon14:c.G1366C:p.A456P (G)(H). Die potentiell mutierten Basen sind jeweils mit einem roten Rahmen markiert.

4.4 NGS DNA-Panel Auswertung

Um einen besseren Eindruck über die Auswirkungen der Tumorbehandlung zu bekommen, wurden die vorselektierten 9 Primär- und Rezidivpaare mittels DNA-Panel Sequenzierung untersucht. Die Diagnosen der Primärtumoren umfassen 5 Glioblastome, IDH-Wildtyp sowie 4 Astrozytome, IDH-mutiert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Auswahl für NGS DNA-Panel mit den dazugehörigen Diagnosen

	Fallnummer Primärtumor	Diagnose	Fallnummer 1. Rezidiv	Diagnose	Fallnummer 2. Rezidiv	Diagnose	Fallnummer 3. Rezidiv	Diagnose
1	GB_44	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_45	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_46	Glioblastom, IDH-Wildtyp		
2	GB_17	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_54	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_55	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_56	Glioblastom, IDH-Wildtyp
3	GB_63	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_64	Glioblastom, IDH-Wildtyp				
4	A_4	Astrozytom, IDH-mutiert	A_25	Astrozytom, IDH-mutiert				
5	A_13	Astrozytom, IDH-mutiert	A_35	Astrozytom, IDH-mutiert	A_36	Astrozytom, IDH-mutiert		
6	A_14	Astrozytom, IDH-mutiert	A_26	Astrozytom, IDH-mutiert	A_37	Astrozytom, IDH-mutiert		
7	GB_81	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_82	Glioblastom, IDH-Wildtyp				
8	A_27	Astrozytom, IDH-mutiert	A_28	Astrozytom, IDH-mutiert				
9	GB_85	Glioblastom, IDH-Wildtyp	GB_86	Glioblastom, IDH-Wildtyp				

Als Referenz wurde bei der Sequenzierung die Version hg19 des humanen Genoms verwendet. Für die Auswertung von somatischen Mutationen, Insertionen/Deletionen, Amplifikationen und Deletionen ganzer Chromosomenarme und Amplifikationen oder Deletionen von einzelnen Genen wurde der Rezidivtumor immer mit dem jeweiligen Primärtumor verglichen. Dadurch können die molekularen Unterschiede zwischen Primär- und Rezidivtumor aufgedeckt werden.

Tabelle 17: Übersicht relevanter Parameter und der Mutationsrate

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Primärtumoren durch Schrägstriche von den Rezidivtumoren getrennt. Die Anzahl der Mutationen ist ausgehend vom Rezidivtumor auf den jeweiligen Primärtumor bezogen.

	% Abdeckung mit mind. 50 Reads	% Deduplikationsrate	Mutationen pro Mbp
1	35,8 / 35,0 / 49,9	59,56 / 53,64 / 27,8	47 / 78
2	61,7 / 71,1 / 59,0 / 64,6	16,64 / 20,21 / 52,92 / 22,35	337 / 196 / 94
3	67,4 / 70,6	23,19 / 23,56	376
4	77,7 / 81,7	25,79 / 30,47	27
5	68,8 / 60,04 / 77,3	51,46 / 63,74 / 25,79	78 / 55
6	65,9 / 66,6 / 68,2	48,42 / 30,53 / 28,36	59 / 71
7	78,2 / 71,5	22,67 / 35,71	101
8	69,8 / 67,0	20,1 / 23,56	31
9	67,0 / 66,6	25,06 / 24,11	47

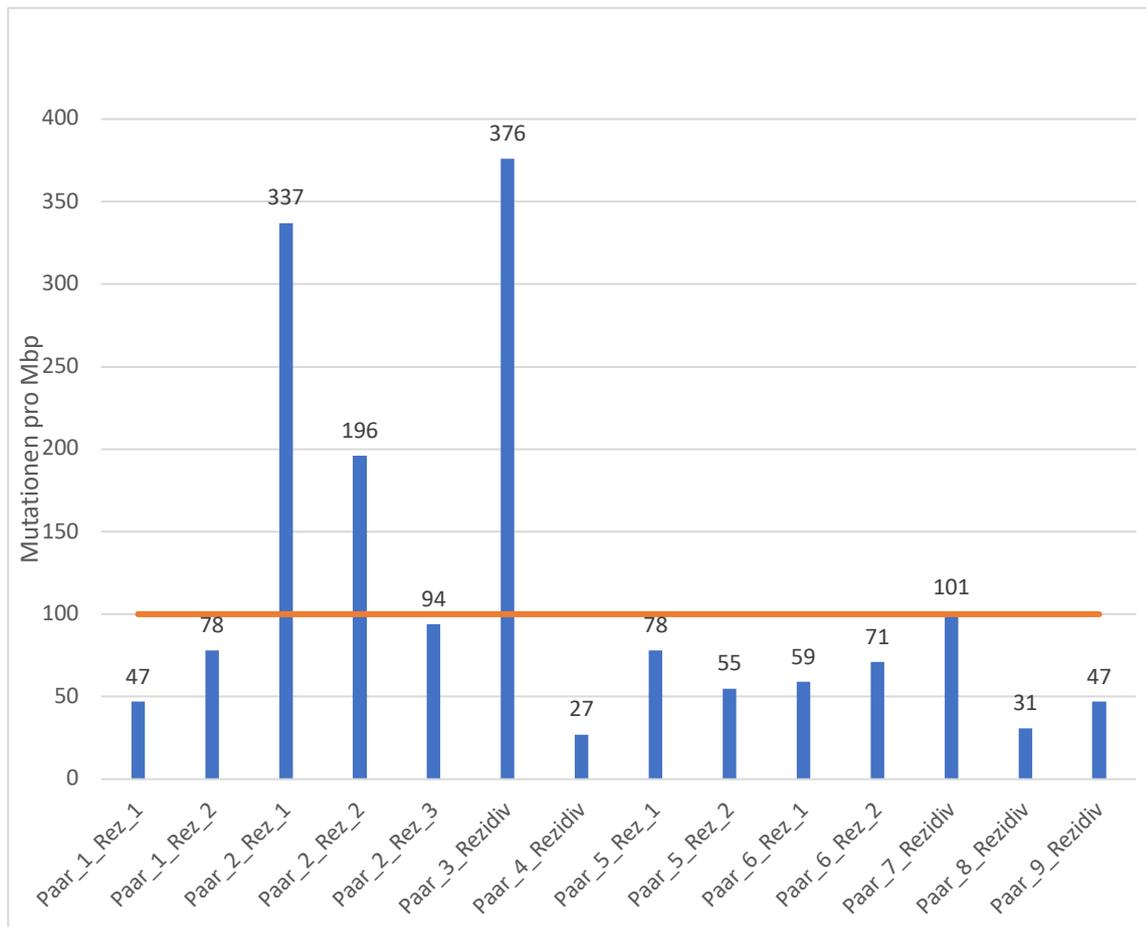


Abb. 6: Übersicht der Mutationslast in den Rezidivtumoren

Im Balkendiagramm wurde auf der y-Achse die Anzahl der Mutationen und auf der x-Achse die jeweiligen Rezidivtumoren aufgetragen. Die Mutationsrate im Rezidiv ist immer auf den dazugehörigen Primärtumor bezogen. Der Grenzwert für einen hypermutierten Phänotyp liegt bei 100 somatischen Mutationen pro Megabase und wird durch die orange horizontale Linie veranschaulicht.

In Tabelle 17 wurden die Parameter der NGS DNA-Panel Sequenzierung für jeden Rezidivtumor dargestellt. Der Grenzwert für einen hypermutierten Phänotyp wurde auf

100 Mutationen pro Megabase festgelegt. Rezidivtumoren von 3 Paaren (Paar 2, 3 und 7) überschreiten diesen Grenzwert teilweise sehr deutlich (Mutationsrate 101–376 Mutationen/Mbp). Diese Fälle wurden alle als Glioblastom klassifiziert. 3 der 5 untersuchten Glioblastome entsprechen der Kategorie hypermutierter Phänotyp (Abb. 6).

Tabelle 18: IRS sowie Median der Tumoren mit hypermutiertem Phänotyp

	Paar 2, 1. Rezidiv Mutationsrate 337 /Mbp	Paar 2, 2. Rezidiv Mutationsrate 196 /Mbp	Paar 2, 3. Rezidiv Mutationsrate 94 /Mbp	Paar 3, 1. Rezidiv Mutationsrate 376 /Mbp	Paar 7, 1. Rezidiv Mutationsrate 101 /Mbp	Median
MLH6	2	2	3	2	1	2
MLH1	3	2	2	1	1	2
PMS2	2	2	2	1	3	2
MSH2	3	2	3	2	1	2

Zusätzlich zur Gegenüberstellung von Immunhistochemie und den Mutationsraten der Rezidivtumoren wurde Tabelle 18 erstellt. Dabei liegt der Fokus auf den IR-Scores jener Tumoren, welche einen hypermutierten Phänotyp aufweisen. Dazu wurde von jedem MMR-Protein der Median gebildet. Im Mittel beträgt der IR-Score von MSH6, MLH1, PMS2 und MSH2 jeweils 2, 2, 2 und 2. Die Expression der einzelnen MMR-Proteine ist mit einem Median von jeweils 2 sehr ähnlich ausgeprägt.

Bei Paar 2 nimmt in der Immunhistochemie die Expression von MLH1 und PMS2 am deutlichsten ab. Dazu passend wurde im 3. Rezidiv eine Deletion sowie eine Mutation von MLH1 festgestellt (siehe Abb. 7). Nur bereits bestehende Mutationen wie hTERT-Promotor, ATRX, EGFR, MET und OTX2 können in allen Rezidivtumoren von Paar 2 nachgewiesen werden. Zu Deletionen kam es beim 1. Rezidiv auf den Chromosomen Chr7q und Chr9p sowie zu einem Loss of heterozygosity (LOH) auf Chr9p. Beim 2. Rezidiv wurden Amplifikationen des Gens PTEN und auf Chr10q detektiert. Ebenso wurde eine Deletion im Gen von EGFR festgestellt. Weitere Deletionen beim 3. Rezidiv von Paar 2 gab es in den Genen von NOTCH1, KLF4, TSC1 und auf Chr9p.

Die Expression der MMR-Proteine beim Rezidivtumor von Paar 3 ist in der Immunhistochemie deutlich vermindert. Die stärkste Abnahme zeigt sich bei MLH1 und PMS2. In der Auswertung der Sequenzierdaten können jedoch keine korrespondierenden Veränderungen festgestellt werden, welche die verminderte Expression erklären können. Beim Rezidiv von Paar 3 kam es zu einer Amplifikation auf Chr1p sowie zu einem LOH auf Chr7q und einer Deletion auf Chr6q. Zusätzlich liegt eine Mutation im EGFR-Gen vor.

Auch bei Paar 7 gibt es eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Immunhistochemie und DNA-Panel. Im Rezidivtumor kam es zu einer Deletion im MSH6-Gen, diese hatte einen Frameshift zur Folge. Desweiteren konnte bereits im Primärtumor von Paar 7 eine Punktmutation im MLH1-Gen festgestellt werden. Die Immunhistochemie zeigt übereinstimmend eine starke Abnahme der Expression von MSH6, MLH1 und MSH2. Zusätzlich kam es zu Punktmutationen in den Genen CIC und FUBP1 sowie zu einer Amplifikation im KIT-Gen. Auf Chr7q wurde ein LOH und auf Chr10q eine Deletion detektiert.

Bei Paar 1 zeigt sich in der Immunhistochemie die Expression von MSH6 stark vermindert. Die Ergebnisse der Panel-Sequenzierung liefern keine übereinstimmenden Veränderungen in den MMR-Genen. Beide Rezidivtumoren weisen eine exonische Mutation in TP53 auf. Beim 2. Rezidiv liegen zusätzlich eine Deletion sowie ein LOH auf Chr19q vor.

Die Expression von MSH6 bei Paar 4 ist in der Immunhistochemie ebenfalls stark vermindert. Jedoch konnten bis auf bereits im Primärtumor vorhandene Mutationen von IDH1, TP53, ATRX und SMO keine neuen genetischen Veränderungen festgestellt werden.

Die Paare 5 und 6 überschreiten den Grenzwert für einen hypermutierten Phänotyp nicht, weisen aber relevante Mutationen bzw. Amplifikationen und Deletionen in den MMR-Genen auf.

Beim 2. Rezidiv von Paar 5 kam es zu einer Deletion im PMS2-Gen. Übereinstimmend damit konnte eine stark verminderte Expression von PMS2 in der Immunhistochemie festgestellt werden. Die Expression von MLH1 blieb jedoch unverändert. Zusätzlich weisen beide Rezidive eine Amplifikation von MYC und Chr9p sowie Deletionen in den Genen von CDKN2A/B und Chr17p auf. Weiter kam es zu einem LOH bei beiden Rezidiven auf Chr7q, Chr17q und Chr9p. Im 1. Rezidiv liegen exonische Mutationen in den Genen von CIC und ATRX sowie Deletionen in PTEN und auf Chr10q vor. LOHs findet man beim 1. Rezidiv auf Chr10q. Das 2. Rezidiv zeigte exonische Mutationen in den Genen CDK6 und KIAA1549 sowie eine Amplifikation von MET und eine Deletion auf Chr7q.

Bei Paar 6 liegen Mutationen im Gen von MSH2 und PMS2 beim 2. Rezidiv vor. Ebenfalls konnte eine bereits bestehende Mutation des PMS2-Gens im Primärtumor und im 1. Rezidiv nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr im 2. Rezidiv. Das PMS2-Gen weist zusätzlich eine Deletion im 1. und 2. Rezidiv auf. Dazu passend ist die

Expression von PMS2 vor allem im 2. Rezidiv in der Immunhistochemie eingeschränkt. Das 2. Rezidiv weist eine Frameshift-Deletion im CDKN2A-Gen, eine Frameshift-Insertion im CIC-Gen, Amplifikationen von PDGFRA und KIT, eine Deletion auf Chr10p sowie LOHs auf Chr10q, Chr7q und Chr9p auf.

Die Tumorpaaare 8 und 9 zeigten im Vergleich mit den anderen Paaren eine geringere Abnahme der Expression von den MMR-Proteinen in den Rezidivtumoren. Entsprechend konnten auch in der Panel-Sequenzierung keine Veränderungen in den MMR-Genen festgestellt werden. Im Rezidiv von Paar 8 finden sich Deletionen bei PDGFRA und KIT sowie Amplifikationen von Chr17p, Chr17q und auf Chr9p. Im Rezidivtumor von Paar 9 liegt eine Spleiß-Mutation im SUFU-Gen sowie eine Deletion und ein LOH auf Chr10q vor.

Vergleicht man alle sequenzierten Proben, so weist das 2. Rezidiv von Paar 6 die meisten Veränderungen in Bezug auf die hier detektierten Gene und Chromosomen auf. Dies korreliert jedoch nicht mit dem Vorliegen eines hypermutierten Phänotyps. Insgesamt sind die Veränderungen zwischen den Primärtumoren und den dazugehörigen Rezidiven sehr heterogen. Daher wurde ein sogenannter *OncoPrint* erstellt. Dabei werden alle Ergebnisse der DNA-Panel Sequenzierung zusammengefasst und grafisch aufbereitet (Abb. 7). Die Auswertung aller detektierten Veränderungen zeigt keine wiederkehrenden Muster. Jedes Tumorkpaar hat eine individuelle Zusammensetzung.

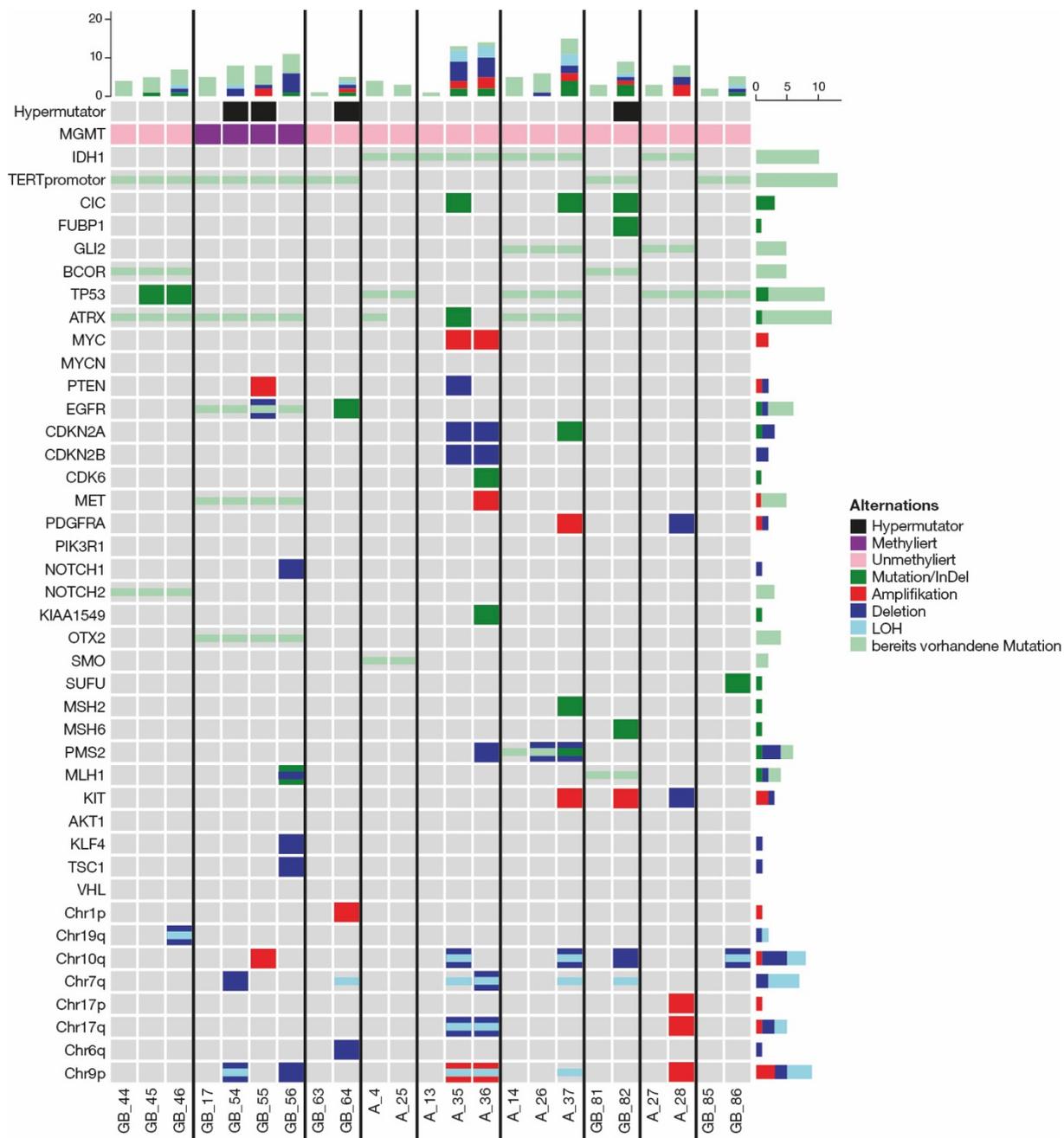


Abb. 7: Ergebnisse der DNA-Panel Sequenzierung von ausgewählten Paaren

Alle detektierten Veränderungen (hypermutierter Phänotyp, MGMT-Promotor methyliert/unmethyliert, kleine Mutationen bzw. Insertionen/Deletionen, Amplifikationen, LOHs sowie bereits im Primärtumor vorhandene Mutationen) sind mit einer eigenen Farbe hinterlegt. Auf der x-Achse sind alle Primärtumoren und die dazugehörigen Rezidive aufgetragen. Auf der y-Achse sind verschiedene Eigenschaften der Tumorpaae, Gene sowie die untersuchten Chromosomen hinterlegt.

4.5 Auswertung der NGS mRNA-Sequenzierung

Ergänzend zur DNA-Panel Sequenzierung wurde von zwei Primär- und Rezidivpaaren eine mRNA-Sequenzierung (mRNA-Seq) durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, die Unterschiede im Transkriptom zwischen den Primär- und Rezidivtumoren zu analysieren. Besonders interessant ist hierbei die Quantifizierung der Genexpression, um mögliche therapierrelevante Veränderungen zu identifizieren.

Die Auswahl der Tumorpaaere für die mRNA-Seq basiert auf den Ergebnissen der DNA-Panel Sequenzierung. Drei Paare (Paar 2, 3 und 7) weisen einen hypermutierten Phänotyp auf, also eine Mutationsrate von mehr als 100 somatischen Mutationen pro Megabase. Aufgrund des hypermutierten Phänotyps der Rezidivtumoren erwartet man bei diesen Paaren die relevantesten Unterschiede in der Genexpression.

Als Ausgangsmaterial für die mRNA-Seq benötigt man kryokonserviertes Tumorgewebe. Dieses war nur von Tumorpaaer 2 (ohne 2. Rezidivtumor) und 3 verfügbar. Beide Primärtumoren wurden als Glioblastom klassifiziert.

Tabelle 19: Auswahl für NGS mRNA-Seq mit den dazugehörigen Diagnosen

	Fallnummer Primärtumor	Diagnose	Fallnummer 1. Rezidiv	Diagnose	Fallnummer 2. Rezidiv	Diagnose	Fallnummer 3. Rezidiv	Diagnose
2	GB_17	Glioblastom	GB_54	Glioblastom, Rezidiv	GB_55	Glioblastom, Rezidiv	GB_56	Glioblastom, Rezidiv
3	GB_63	Glioblastom	GB_64	Glioblastom, Rezidiv				

Die Genexpressionsdaten der fünf untersuchten Proben wurden grafisch in einem Biplot (Abb. 8) aufbereitet. Dafür wurde eine Hauptkomponentenanalyse, besser bekannt als Principal Component Analysis (PCA), erstellt. Dies ist ein Verfahren der Statistik und dient dazu, eine große Anzahl von Variablen durch möglichst wenige aussagekräftige Hauptkomponenten abzubilden. Für die PCA wurden von den 35.742 untersuchten Genen die 1.000 am stärksten exprimierten Gene herangezogen.

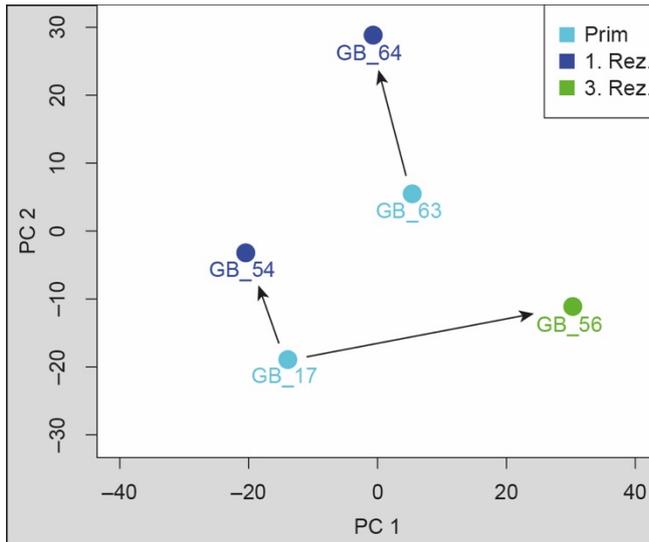


Abb. 8: PCA mit den Genexpressionsdaten der fünf sequenzierten Proben

Im Biplot wurde auf der x-Achse die erste Hauptkomponente PC1 mit einem Wert von 19,48% und einer Varianz von 0,38 auftragen. Auf der y-Achse ist die zweite Hauptkomponente mit einem Wert von 18,03% und einer Varianz von 0,33 abgebildet. Die Primärtumoren (Prim), die 1. Rezidive (1. Rez.) und das 3. Rezidiv (3. Rez.) wurden jeweils farblich unterschiedlich markiert und mit einem Pfeil vom jeweiligen Primärtumor zu den Rezidivtumoren verbunden.

Bei den Primärtumoren zeigt sich keine Clusterbildung im Biplot, diese ist jedoch aufgrund der Inter-Patienten-Variabilität bei diffusen Gliomen auch grundsätzlich nicht zu erwarten. Die Genexpressionsdaten der einzelnen Proben zeigen aber insgesamt einen klaren Trend entlang der PC2-Achse. Die Primärtumoren und die 1. Rezidive (Paar 2: GB_17 und GB_54, Paar 3: GB_63 und GB_64) werden vor allem durch die zweite Hauptkomponente PC2 getrennt. Es kommt also zu einer deutlichen Veränderung auf Ebene der Genexpression. Ebenso sieht man bei Paar 2 einen Shift vom Primärtumor (GB_17) zum 3. Rezidiv (GB_56) entlang der PC1-Achse, dies ist jedoch aufgrund dem nicht verfügbaren 2. Rezidiv schwierig zu beurteilen. Eine mögliche Erklärung für das deutlich unterschiedliche Expressionsverhalten der beiden Rezidivtumoren von Paar 2 liefert die bekannte ausgeprägte intratumorale Heterogenität von MMR-defizienten Gliomen (24).

Für die Auswertung der Genexpressionsdaten gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. Das Ziel ist es jene Gene herauszufiltern, welche statistisch signifikant in den Rezidivtumoren im Vergleich zu den Primärtumoren überexprimiert werden. Zwei unterschiedliche Methoden wurden dazu in individuellen R-Skripten implementiert.

Mit der Methode DESeq2 (58) ist es möglich, die Expressionsdaten mehrerer Primärtumoren (Paar 2: GB_17, Paar 3: GB_63) mit den jeweiligen Rezidivtumoren (Paar 2: GB_54, Paar 3: GB_64) zu analysieren.

Möchte man die differentielle Expression von genau zwei Proben berechnen, eignet sich dazu die Methode nach Audic-Claverie (AC) (56). Bei beiden Methoden erhält man zu dem jeweiligen Gen einen $\log_2(\text{fold-change})$ und einen p-Wert. Folgende Filterkriterien wurden bei den initial erstellten Genlisten angewendet: $\log_2(\text{fold-change}) > 2$, > 4 bzw. $< 0,5$ und p-Wert $< 0,001$. Mit der Methode DESeq2 konnten 160 ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$), 101 ($\log_2(\text{fold-change}) > 4$) bzw. 17 ($\log_2(\text{fold-change}) < 0,5$) differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Mit der Methode nach Audic-Claverie konnten bei Paar 2 (GB_17 (Primärtumor) & GB_54 (1.Rezidiv)) 272 ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$), 64 ($\log_2(\text{fold-change}) > 4$) bzw. 446 ($\log_2(\text{fold-change}) < 0,5$) differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Ebenso konnten bei Paar 2 (GB_17 (Primärtumor) & GB_56 (3.Rezidiv)) 331 ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$), 43 ($\log_2(\text{fold-change}) > 4$) bzw. 765 ($\log_2(\text{fold-change}) < 0,5$) differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Bei Paar 3 (GB_63 (Primärtumor) & GB_64 (1.Rezidiv)) konnten 259 ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$), 58 ($\log_2(\text{fold-change}) > 4$) bzw. 486 ($\log_2(\text{fold-change}) < 0,5$) differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

Fagerberg et al. (59) konnten mit verschiedenen Algorithmen 5.539 Gene identifizieren, welche für Membranproteine kodieren. Diese Anzahl an Genen entspricht ungefähr einem Viertel aller proteinkodierenden Gene. Auf Basis dieser identifizierten Gene wurden sämtliche Genlisten abgeglichen und gefiltert. Dieser Abgleich ist notwendig, um in die Auswertung nur jene Gene einzuschließen, deren Genprodukte tatsächlich mit dem extrazellulären Milieu in Kontakt treten können.

Durch die Anwendung der Methode DESeq2 konnten nach Filterung insgesamt 45 Gene identifiziert werden, welche statistisch signifikant mit einem $\log_2(\text{fold-change}) > 4$ überexprimiert werden (Tabelle 21). Die Methode nach Audic-Claverie wurde insgesamt in drei unterschiedlichen Konstellationen angewendet (Paar 2: GB_17 (Primärtumor) & GB_54 (1.Rezidiv), GB_17 (Primärtumor) & GB_56 (3.Rezidiv), Paar 3: GB_63 (Primärtumor) & GB_64 (1.Rezidiv)). Dabei konnten nach der Filterung jeweils 22 bzw. 14 (Tabelle 23) sowie 19 (Tabelle 22) Gene identifiziert werden, welche statistisch signifikant mit einem $\log_2(\text{fold-change}) > 4$ überexprimiert werden.

Zur Visualisierung der Gemeinsamkeiten der jeweiligen Tumoren wurden die gefilterten Genlisten ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$ bzw. > 4 , p-Wert $< 0,001$ und nur

Membranproteine) der Methode nach Audic-Claverie mit dem Tool Venny 2.1 (60) überlagert und jeweils ein Schnittmengendiagramm erstellt. Die Expressionsmuster sind insgesamt betrachtet sehr unterschiedlich. Es ergeben sich nur wenige Überschneidungen. Im Schnittmengen-Diagramm $\log_2(\text{fold-change}) > 4$ (Abb. 9) werden in Summe 5 Gene in mehr als einer Genliste überexprimiert. Die größte Schnittmenge (4 Gene: CACNA1E, LRAT, PLPP4 und TLR8) ergibt sich zwischen den Genlisten des 1. und 3. Rezidivs von Paar 2 (GB_54 & GB_56). Die Schnittmenge des 3. Rezidivs von Paar 2 und des 1. Rezidivs von Paar 3 (GB_56 & GB_64) beinhaltet insgesamt nur 1 Gen (CLEC12A). Vergleicht man diese 5 in der Schnittmenge enthaltenen Gene mit der gefilterten Genliste der Methode DESeq2 ($\log_2(\text{fold-change}) > 4$, p-Wert $< 0,001$ und nur Membranproteine) findet man keine Übereinstimmung. Im Schnittmengen-Diagramm $\log_2(\text{fold-change}) > 2$ (Abb. 10) werden in Summe 17 Gene in mehr als einer Genliste überexprimiert. Die größte Schnittmenge (7 Gene: CD48, CLEC12A, KIRREL3, LRRC15, LYVE1, MARCO und TLR10) ergibt sich zwischen den Genlisten des 3. Rezidivs von Paar 2 und des 1. Rezidivs von Paar 3 (GB_56 & GB_64). Die Schnittmengen des 1. und 3. Rezidivs von Paar 2 (GB_54 & GB_56) bzw. des 1. Rezidivs von Paar 2 und des 1. Rezidivs von Paar 3 (GB_54 & GB_64) beinhalten beide jeweils 5 Gene (CACNA1E, LRAT, NTSR2, PLPP4 und TLR8) bzw. (ANO4, GABRG1, NPIP13, PKD2L1 und TRPM6). Vergleicht man diese 17 in der Schnittmenge enthaltenen Gene mit der gefilterten Genliste der Methode DESeq2 ($\log_2(\text{fold-change}) > 2$, p-Wert $< 0,001$ und nur Membranproteine) findet man insgesamt 7 übereinstimmende Gene (CACNAE1, LRAT, ANO4, GABRG1, NPIP13, PKD2L1 und TRPM6).

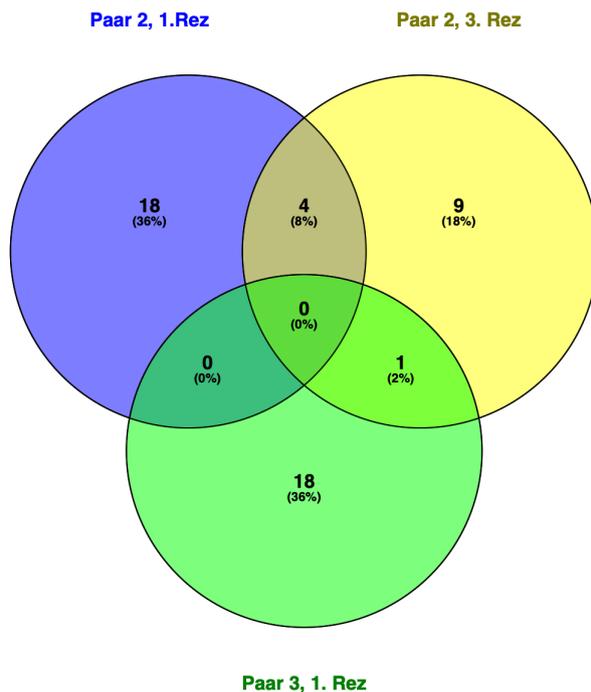


Abb. 9: Schnittmengen-Diagramm mit $\log_2(\text{fold-change}) > 4$ (60)

Mit dem Online-Tool Venny 2.1 wurden die Schnittmenge der Genlisten visualisiert. Filterkriterien: $\log_2(\text{fold-change}) > 4$, p-Wert $< 0,001$, nur Membranproteine. Blau -> Paar 2: Primärtumor (GB_17) & 1. Rezidiv (GB_54), Gelb -> Paar 2: Primärtumor (GB_17) & 3.Rezidiv (GB_56), Grün -> Paar 3: Primärtumor (GB_63) & 1. Rezidiv (GB_64).

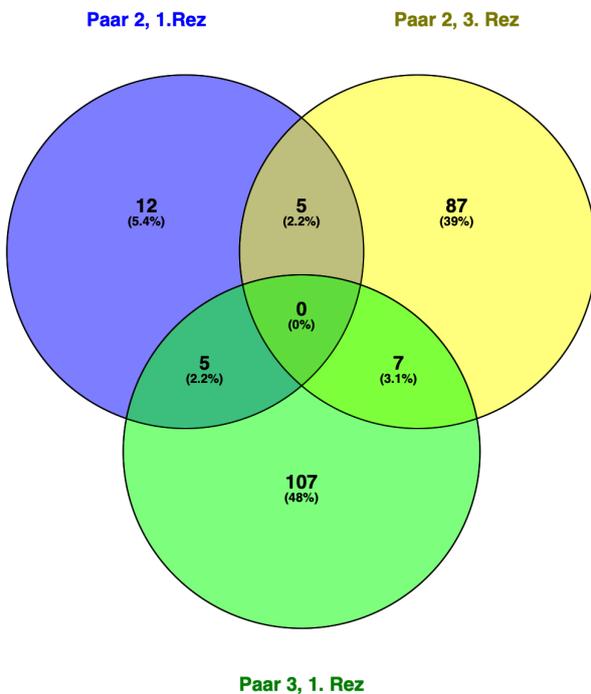


Abb. 10: Schnittmengen-Diagramm mit $\log_2(\text{fold-change}) > 2$ (60)

Mit dem Online-Tool Venny 2.1 wurden die Schnittmenge der Genlisten visualisiert. Filterkriterien: $\log_2(\text{fold-change}) > 2$, p-Wert $< 0,001$, nur Membranproteine. Blau -> Paar 2: Primärtumor (GB_17) & 1. Rezidiv (GB_54), Gelb -> Paar 2: Primärtumor (GB_17) & 3.Rezidiv (GB_56), Grün -> Paar 3: Primärtumor (GB_63) & 1. Rezidiv (GB_64).

Zusätzlich wurden alle überexprimierten Gene auf Funktion und Relevanz ihrer Genprodukte untersucht. Diese Informationen wurden mithilfe des Projekts www.proteinatlas.org (61) gesammelt. Besonders interessant sind jene Proteine, welche auch in anderen Tumorentitäten eine positive bzw. negative prognostische Relevanz besitzen und gleichzeitig im Normalfall nicht in den Zellen des menschlichen Gehirns exprimiert werden. Ebenso sind sämtliche Proteine von Interesse, welche für die Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems notwendig sind. Eine Übersicht dieser Gene findet sich in Tabelle 20. Insgesamt konnten auf diese Weise 9 relevante Gene identifiziert werden.

Tabelle 20: Übersicht relevanter überexprimierter Gene

Die Auswahl der Gene beruht auf den Tabellen 21-23. Sämtliche Informationen zu den einzelnen Genen stammen vom Projekt www.proteinatlas.org.

Gene	Funktion des Proteins	Bemerkung
CD2	Findet sich als Oberflächenantigen auf allen T-Zellen. Ist über CD58 an der Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen beteiligt.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: Nierenzellkarzinom, Endometriumkarzinom, malignes Melanom, HNO-Tumoren, Zervixkarzinom, Mamma-Ca und Ovarialkarzinom. Niedrige Gehirnspezifität.
CD5	Fungiert wahrscheinlich als Rezeptor zur Regulation der T-Zell-Proliferation.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: HNO-Tumoren, Nierenzellkarzinom, Endometriumkarzinom, Zervixkarzinom, malignes Melanom und Mamma-Ca. Niedrige Gehirnspezifität.
CD6	Findet sich als Oberflächenantigen vor allem auf T-Zellen. Ist über die Interaktion mit ALCAM/CD166 an der T-Zell-Antwort beteiligt.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: HNO-Tumoren, Zervixkarzinom, Nierenzellkarzinom, Mamma-Ca und Endometriumkarzinom. Niedrige Gehirnspezifität.
FMO3	Enzym in Leberzellen, welches wichtig für die Katalyse von NADPH-abhängigen Metabolisierungen ist.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom und HCC. Vermehrte Expression im menschlichen Gehirn (Pons und Medulla).
MSLN	Zellmembran assoziierte Formen sind wahrscheinlich relevant bei der Zelladhäsion.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: Nierenzellkarzinom und Pankreaskarzi. Wird nicht im menschlichen Gehirn exprimiert.
PIGR	Bindet als Rezeptor IgA und IgM Antikörper an der basolateralen Seite von Epithelzellen.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: Mamma-Ca, Nierenzellkarzinom und Endometriumkarzinom. Wird nicht im menschlichen Gehirn exprimiert.
PTCRA	Bildet den Prä-T-Zell Rezeptorkomplex und ist an der Frühdifferentenzierung beteiligt.	Nicht prognostisch und wird nicht exprimiert im menschlichen Gehirn.
SLAMF7	Ist als Rezeptor an der Aktivierung und Differenzierung von verschiedenen Zellen des Immunsystems beteiligt.	Prognostischer Marker bei folgenden Tumorentitäten: Nierenzellkarzinom und Ovarialkarzinom. Wird nicht exprimiert im menschlichen Gehirn.
SLC6A20	Vermittelt einen Kalzium-abhängigen Transport von Aminosäuren in die Zelle.	Prognostischer Marker beim Nierenzellkarzinom. Vermehrte Expression im menschlichen Gehirn (Pons und Medulla).

Tabelle 21: Genliste der Methode DESeq2

Filterkriterien: $\log_2(\text{fold-change}) > 4$,
 $p\text{-Wert} < 0,001$, nur Membranproteine.

Differenzielle Expression DESeq2		
Gene	\log_2 (foldchance)	p-Value
ANO4	5,89	1,000E-05
C10orf128	4,26	1,000E-05
CLCA2	6,51	8,150E-03
CLCA4	9,16	1,000E-05
CNTNAP2	4,13	1,100E-04
DHRS9	7,90	3,700E-04
DMRT2	6,56	5,900E-04
EPCAM	5,37	1,440E-03
EVI2A	4,37	1,000E-05
FAAH	4,04	1,000E-05
GABRG1	5,04	7,000E-04
GJB1	4,72	1,100E-04
GJC2	4,41	1,000E-04
GPR37	4,02	7,100E-04
GRM3	5,34	3,000E-05
IL1RAPL1	7,11	3,850E-03
KCNE5	5,24	2,680E-03
KCNK1	4,86	1,400E-04
KCNK2	4,55	7,710E-03
MAG	8,35	6,610E-03
MOG	7,69	3,510E-03
MYRF	4,83	1,000E-05
NINJ2	4,90	4,000E-05
OPALIN	12,78	3,500E-04
OR2L13	6,76	4,900E-04
P2RY12	4,10	6,900E-04
PIGR	6,60	7,250E-03
PKD2L1	4,38	1,580E-03
PLP1	4,52	1,100E-04
POPDC3	4,20	5,940E-03
PTCRA	5,14	5,490E-03
RYR2	4,51	1,650E-03
SCARA5	5,61	7,020E-03
SLC5A11	6,34	1,000E-05
SLC6A15	4,19	1,410E-03
SLC7A14	4,84	7,000E-05
SMIM6	5,70	7,310E-03
SYT9	5,99	1,000E-05
TMEM151A	4,79	5,000E-05
TMEM229A	5,01	2,370E-03
TMEM88B	5,95	1,000E-04
TRPM6	5,02	3,500E-04
TSPAN8	4,85	3,600E-03
VNN2	5,46	1,680E-03
WNT4	4,00	9,980E-03

**Tabelle 22: Genliste der Methode AC,
(Paar 3: GB_63 & GB_64)**

Filterkriterien: $\log_2(\text{fold-change}) > 4$,
 $p\text{-Wert} < 0,001$, nur Membranproteine.

Differenzielle Expression AC (Paar 3: GB_63 & GB_64)		
Gene	\log_2 (foldchance)	p-Value
APCDD1L	4,18	2,960E-07
C11orf87	4,03	1,410E-09
CCR2	4,13	1,327E-03
CD2	6,06	5,290E-16
CD5	4,13	1,327E-03
CD6	4,03	2,449E-03
CEACAM1	4,81	4,290E-06
CLEC12A	4,18	2,960E-07
EPCAM	4,75	2,000E-17
KLRD1	5,40	1,330E-09
PIEZO2	5,03	3,050E-07
SCARA5	4,93	1,160E-06
SLAMF7	4,23	1,530E-07
SLC6A20	4,03	2,449E-03
SMCO2	4,23	7,144E-04
TMEFF2	4,23	2,660E-11
TMEM125	5,69	5,010E-12
TMEM235	4,55	5,630E-05
VNN2	4,65	1,040E-10

Tabelle 23: Genliste der Methode AC, (Paar 2: GB_17 & GB_54, GB_17 & GB_56)

Filterkriterien: $\log_2(\text{fold-change}) > 4$, p-Wert $< 0,001$, nur Membranproteine

Differentielle Expression AC Paar 2					
Primärtumor & 1. Rezidiv			Primärtumor & 3. Rezidiv		
Gene	\log_2 (foldchange)	p-Value	Gene	\log_2 (foldchange)	p-Value
ANO4	7,24	4,510E-40	ACPP	4,86	9,950E-07
BVES	4,77	7,830E-31	CACNA1E	4,14	8,493E-04
CACNA1E	5,25	7,560E-09	CD300C	4,48	6,770E-10
CALN1	5,39	1,520E-40	CLEC12A	4,86	9,950E-07
CHRM5	4,47	4,320E-19	CLEC17A	5,38	4,720E-10
ENPP5	5,94	3,730E-15	FCGR1B	4,42	3,370E-14
GABRG1	5,59	1,560E-11	FMO3	4,60	2,020E-16
JAKMIP3	6,24	1,530E-38	IL21R	4,10	3,290E-07
KCNK2	5,29	3,830E-09	KISS1R	4,91	5,420E-07
KEL	4,48	8,230E-05	LINC00672	4,45	1,790E-14
LRAT	5,07	1,110E-07	LRAT	4,64	1,210E-05
MSLN	4,33	1,680E-08	PLPP4	4,58	2,240E-05
NPIP13	4,16	2,230E-07	STEAP1	4,61	3,670E-22
NTSR2	5,54	4,500E-34	TLR8	5,18	1,190E-08
OR7A5	5,94	3,730E-15			
PAQR5	4,81	3,050E-06			
PKD2L1	4,86	1,590E-06			
PLPP4	5,65	3,980E-12			
RYR2	5,81	1,260E-13			
SLC22A15	4,53	1,060E-35			
TLR8	4,48	8,230E-05			
TRPM6	5,99	9,180E-16			

5 Diskussion

Die Grundlage dieser Arbeit bilden 47 Primär- und Rezidiv-Paare sämtlicher diffus infiltrativ im Hirngewebe wachsender Gliome, unabhängig davon, ob sie einen astrozytären oder oligodendroglialen Ursprung haben.

Die therapeutische Herangehensweise besteht, wenn möglich, aus einer vollständigen Resektion des Tumors sowie einer anschließenden Strahlen- und/oder Chemotherapie mit der alkylierenden Substanz Temozolomid (14). Rezidive von diffusen Gliomen neigen jedoch dazu, eine Temozolomid-Resistenz zu entwickeln (3). Entscheidend beteiligt an der Entwicklung von resistenten Rezidivtumoren ist das DNA-Mismatch-Repair-System. Führen Mutationen in den MMR-Genen zu einer verminderten Expression der Reparaturenzyme, ist dies oftmals mit einer Temozolomid-Resistenz und einer erhöhten Mutationsrate im Rezidiv-Tumor verbunden (4).

Durch die Anwendung von Temozolomid entstehen drei Addukte, unter anderem O⁶-Methylguanin. Während der DNA-Replikation wird O⁶-Methylguanin fälschlicherweise mit Thymin gepaart. Ein intaktes MMR-System initiiert daraufhin die Apoptose der Zelle, da eine Korrektur dieser Fehlpaarung nicht mehr möglich ist. Die Toxizität alkylierender Substanzen steht also in direktem Zusammenhang mit der Funktion der MMR-Proteine (17).

Liegt in einer Tumorzelle jedoch ein defizientes MMR-System vor, werden die entstandenen Fehlpaarungen akzeptiert. Dadurch kommt es in den folgenden Replikationsrunden zu einer Vielzahl von Mutationen verteilt über das ganze Genom. Das charakteristische Mutationsmuster ist eine C:G>T:A-Punktmutation bei CpC-Dinukleotiden.

Dieser Zusammenhang lässt darauf schließen, dass durch die Anwendung alkylierender Substanzen eine Selektion für Zellen mit defizientem MMR-System stattfindet. Somit entsteht eine erworbene Temozolomid-Resistenz (5, 21). Weitere Eigenschaften MMR-defizienter Gliome sind laut Touat et al. (24) oftmals fehlende T-Zell-Infiltrate, eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität sowie eine Assoziation mit einem verminderten Gesamtüberleben.

Barthel et al. (62) konnten in einer longitudinalen molekularen Analyse von 222 Patienten mit diffusen Gliomen zeigen, dass der Selektionsdruck vor allem in der

frühen Entwicklung eines Glioms am höchsten ist und es durch die Anwendung aktueller Therapien hauptsächlich zu zufälligen molekularen Veränderungen kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden von allen 47 Primär- und Rezidivtumoren immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die humanen MMR-Proteine MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 angefertigt. Die Anwendung der Immunhistochemie diente in diesem Fall als Screeningmethode und sollte zu einer Selektion jener Primär- und Rezidiv-Paare führen, welche eine deutlich verminderte Expression der MMR-Proteine in der Rezidiv-Situation zeigen. Die tatsächliche Ursache für eine verminderte Expression steht in diesem ersten Schritt also nicht im Vordergrund. Die Ergebnisse der IHC bestätigen die Theorie einer verminderten Expression in Rezidivtumoren. Es zeigt sich auch eine deutliche Übereinstimmung mit den Resultaten einer Arbeit von Felsberg et al. (20). Dabei wurden insgesamt von 43 Primär- und Rezidiv-Paaren immunhistochemische Färbungen angefertigt. Diese wurden ebenfalls semiquantitativ ausgewertet und mit einem IRS von 0 bis 4 bewertet. Die statistische Auswertung offenbart eine signifikante Verringerung des IRS bei MSH6, MSH2 und PMS2, jedoch nicht bei MLH1. Zusätzlich findet sich kein Zusammenhang zwischen der Methylierung des MGMT-Promotors und einer verminderten Expression der MMR-Proteine.

Einen besonderen Stellenwert unter den MMR-Proteinen nimmt MSH6 ein. Durch den Einsatz von Temozolomid kann man in Rezidivtumoren eine erhöhte Frequenz von inaktivierenden Mutationen im MSH6-Gen beobachten. In einer Übersichtsarbeit von Xie et al. (63) werden die Folgen einer Mutation im MSH6-Gen zusammengefasst. Diese beinhalten eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Tumoren bei einer vorliegenden Keimbahnmutation, die bereits erwähnte Temozolomid-Resistenz sowie ein Trend zur klonalen Selektion für einen hypermutierten Phänotyp im Rezidivtumor. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch eine Mutation im MSH6-Gen die Transkription des Gens zwar stattfindet, jedoch das fertige Protein nicht mehr messbar ist. Übereinstimmend zu dieser Erkenntnis wurde in dieser Arbeit eine IHC von zwei Oligodendrogliomen mit bekannten MSH6-Mutationen als Negativkontrolle angefertigt. Dabei zeigte sich auch eine deutlich verminderte Expression des MSH6-Proteins aufgrund der vorliegenden Mutation im Sinne einer relevanten Reduktion an gefärbten Tumorzellen. Es gibt jedoch noch weitere Gründe, warum ein MMR-Protein nur vermindert exprimiert wird. Ein Beispiel dafür ist die veränderte Promotor-Methylierung. Solche Veränderungen können durch

eine Sequenzierung nicht detektiert werden und unterstreichen damit den Stellenwert der IHC (24).

Das Gen POLE ist eine von vier Untereinheiten der DNA-Polymerase ϵ . Mutationen im Bereich der Exonuklease des POLE-Gens beeinflussen die Funktion der Korrekturlesefähigkeit. Dies führt bei verschiedenen Tumorentitäten, so auch bei diffusen Gliomen, oftmals zur Bildung eines hypermutierten bzw. ultramutierten Phänotyps (6, 42). In einer Publikation von Andrianova et al. (64) konnte gezeigt werden, dass eine bMMRD mit dem Auftreten von somatischen Mutationen in den Genen von POLE und POLD1 assoziiert ist. Eine Keimbahnmutation im PMS2-Gen sowie zwei verschiedene somatische Mutationen im POLE-Gen führten bei zwei Patienten zu einem sehr früh auftretenden Glioblastom bzw. einem Astrozytom mit einer Mutationsrate von 237/Mb bzw. 123/Mb. Das Mutationsmuster ist dominiert von C>T- bzw. C>A-Mutationen. Trotz der insgesamt hohen Mutationslast in den Tumoren ist die Anzahl an Mutationen bezogen auf die Tumorsuppressorgene deutlich niedriger als in vergleichbaren Glioblastomen. Diese Hypothese wurde für die vorliegende Arbeit übernommen und somit wurden nur die aktuellen Rezidivtumoren der vorselektierten Tumorpaare auf das Vorhandensein einer Hotspotmutation im POLE-Gen untersucht. Die anfänglich 47 Primär- und Rezidivtumoren wurden durch das Screening mittels IHC auf 12 Tumorpaare reduziert. Von großem Interesse sind jene Paare, bei denen im Primärtumor die MMR-Proteine stark (IRS 3 bzw. 4) im Vergleich zum Rezidivtumor (IRS 1 bzw. 2) exprimiert werden. Dies entspricht einer Abnahme des IRS von mindestens zwei Punkten. Doch auch Paare, bei denen bereits im Primärtumor die Expression der MMR-Proteine nur schwach vorhanden ist (IRS 1 bzw. 2), sind für weitere Untersuchungen von Bedeutung und wurden daher in die Auswahl miteinbezogen.

In dieser kleinen Stichprobe konnten keine Mutationen im POLE-Gen detektiert werden. Eine Erklärung dafür bieten die Ergebnisse von Hodges et al. (6). Dabei wurden insgesamt 327 Patienten mit diffusen Gliomen, davon 198 mit einem Glioblastom, auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Biomarkern untersucht, um ein Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren prognostizieren zu können. Unter anderem wurden auch alle Tumoren mittels NGS auf Mutationen im POLE-Gen untersucht. Nur bei 2 der 327 Tumoren konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Mutationen im POLE-Gen sind also insgesamt sehr selten, jedoch fast immer mit einem hypermutierten bzw. ultramutierten Phänotyp assoziiert.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Prognose von höhergradigen Gliomen, insbesondere von Glioblastomen, sehr schlecht. Durch den kombinierten Einsatz von Strahlentherapie und Temozolomid konnte das mittlere Überleben von 12,1 auf 14,6 Monate gesteigert werden (65). Trotzdem entsteht in nahezu allen Fällen ein Rezidivtumor, welcher als Endpunkt immer den Tod des Patienten beinhaltet. Dieser Umstand macht es umso wichtiger, die durch die Therapie induzierten molekularen Veränderungen zu verstehen (66). Von besonderem Interesse sind dabei aufgrund der zahlreichen Veränderungen sowie der potenziellen prognostischen Relevanz Tumoren mit einem hypermutierten Phänotyp. Zur Detektion der Mutationsrate wurden in dieser Arbeit die Sequenzierdaten eines NGS-DNA-Panels verwendet. Dieses Panel deckt mit einer Größe von 226.926 kbp nur einen Bruchteil des Genoms ab. Es gibt jedoch laut Samstein et al. (22) eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Messungen der Mutationsrate mittels WES und dem MSK-Impact-Panel (67) (Memorial Sloan Kettering Cancer Center – Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets, Analyse von 341 tumorrelevanten Genen). Aufgrund dieser vergleichenden Analyse von Samstein et al. konnten die Mutationsraten pro Megabasenpaar aus den Daten der NGS-DNA Panel Sequenzierung hochgerechnet werden, wobei es dabei keine Aussage zur endgültigen Genauigkeit bei unterschiedlichen Panelgrößen gibt. Insgesamt weisen 3 der 9 untersuchten Primär- und Rezidivpaare einen hypermutierten Phänotyp auf. Es handelt sich dabei in allen Fällen um Glioblastome. Der Mechanismus bzw. die molekularen Veränderungen, welche zur Bildung eines hypermutierten Phänotyps führen, sind noch immer nicht genau verstanden. Touat et al. (24) beschreibt zwei mögliche Erklärungen für die Entstehung eines solchen Phänotyps. Einerseits führen bereits bestehende Mutationen in den MMR-Genen bzw. im POLE-Gen zur Bildung von Tumoren mit einer deutlich erhöhten Mutationsrate und andererseits gibt es den bereits beschriebenen Weg einer erworbenen MMR-Defizienz sowie Temozolomid-Resistenz in Rezidivtumoren durch die Anwendung von Temozolomid. In der Studie von Touat et al. wurden 225 mit Temozolomid behandelte diffuse Gliome untersucht. Davon konnte man bei 58 Tumoren einen hypermutierten Phänotyp nachweisen. Zur Klärung der molekularen Ursachen wurde eine Panelsequenzierung durchgeführt. Dabei zeigten sich bei 36 Genen vermehrt Mutationen, darunter vor allem bei den MMR-Genen und im Speziellen bei MSH6. Passend dazu wurden auch bei dieser Arbeit in der Panel-Sequenzierung Veränderungen bei 2 von 3 hypermutierten Tumorpaaren in den MMR-Genen

festgestellt. Bei Touat et al. (24) war eine eindeutige Zuordnung von Tumoren mit hypermutiertem Phänotyp nach Temozolomid-Behandlung zu einer bestimmten Mutationssignatur (Signatur 11 der Cosmic signatures v2) möglich. Diese Signatur konnte ebenfalls bei MMR-defizienten Zelllinien nach Temozolomid-Exposition nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Mutationssignatur bei Gliomen mit hypermutiertem Phänotyp dient somit als potenzieller Biomarker für eine MMR-Defizienz sowie eine Temozolomid-Resistenz. Von den drei Tumorkomplexen mit hypermutiertem Phänotyp in dieser Arbeit sind keine Daten vorliegend bezüglich der Behandlungsdauer mit Temozolomid. Damit bleibt unklar, ob diese Patienten eine besonders intensive Therapie mit Temozolomid erhalten haben. Ebenso war aufgrund der noch nicht durchgeführten Whole-Exome-Sequenzierung eine Zuordnung zu den entsprechenden Mutationssignaturen nicht möglich.

Auch bei Barthel et al. (62) wurden die molekularen Veränderungen von diffusen Gliomen anhand von Primär- und Rezidivpaaren untersucht. Von den insgesamt 222 Paaren wurden 139 mit Temozolomid behandelt und davon weisen 33 Rezidivtumoren einen hypermutierten Phänotyp auf. Mit einem Anteil von 47 % findet sich dieser am häufigsten beim Subtyp IDH-mutiert ohne 1p/19q-Kodeletion. Jedoch gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines hypermutierten Phänotyps und einem verbesserten Gesamtüberleben. Weitere Untersuchungen wurden anhand von bestimmten Treiber-Genen vorgenommen. Dabei gibt es viele Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Panel-Sequenzierung. Es zeigen sich teilweise Veränderungen bei Rezidivtumoren in Genen, welche den Zellzyklus betreffen (CDKN2A, CDK4, CDK6 und RB1). Diese sind oftmals mit einer genomischen Instabilität assoziiert. Eine Deletion von CDKN2A/B zeigt sich auch in Abb. 7 bei Paar 5, dieses weist jedoch keinen hypermutierten Phänotyp auf. Insgesamt gibt es bei Barthel et al. (62) keinen Nachweis dafür, dass es durch die Therapie zu einer Selektion von spezifischen molekularen Veränderungen kommt.

Durch den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren wurden die therapeutischen Möglichkeiten vor allem bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen deutlich verbessert. Die Therapie definiert sich durch eine Anwendung von Antikörpern, welche überwiegend gegen CTLA-4 oder PD-1/PD-L1 gerichtet sind. Ein nachhaltiger Nutzen kann jedoch nur bei wenigen Patienten erreicht werden. Deshalb haben Samstein et al. (22) Daten von insgesamt 1.662 Patienten ausgewertet, welche mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor behandelt wurden. Betrachtet man sämtliche

Tumorentitäten, zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Tumoren mit erhöhter Mutationsrate und einer Steigerung des Gesamtüberlebens. Die Daten liefern bei diffusen Gliomen jedoch eine gegenteilige Aussage. Werden Gliome mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt, reduziert sich das Gesamtüberleben der Patienten bei erhöhten Mutationsraten. Ähnliche Ergebnisse liefern Untersuchungen von Touat et al. (24). Dabei wurden diffuse Gliome mit einer MMR-Defizienz, welche wie bereits erwähnt oftmals einen Zusammenhang mit der Entwicklung eines hypermutierten Phänotyps aufweisen, auf das therapeutische Ansprechen mit einem PD-1-Inhibitor untersucht. Es zeigten sich keine positiven Effekte bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens. Damit wird wiederum die diagnostische Relevanz der Mutationsrate unterstrichen.

Um die durch den Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren bewirkten molekularen Veränderungen zu verstehen, wurden bei Zhao et al. (68) die Tumoren von 66 Glioblastom-Patienten, welche zusätzlich mit einem PD-1-Inhibitor (Nivolumab bzw. Pembrolizumab) behandelt wurden, unter anderem mittels Whole-Exome-Sequencing und mRNA-Sequenzierung untersucht. 17 Patienten zeigten ein gutes Langzeitansprechen auf die Therapie mit einem PD-1-Inhibitor. Bei dieser Gruppe konnten vor allem Mutationen in den Genen des MAPK-(*Mitogen-activated protein Kinase*)Signalwegs (PTPN11, BRAF) beobachtet werden. Daher könnten diese Patienten von einer Kombination aus PD-1-Inhibitor und einer gezielten Blockade des MAPK-Signalwegs profitieren. Bei fehlendem Therapieansprechen stellte man eine signifikante Häufung von Mutationen im PTEN-Gen fest und eine damit verbundene potenziell immunsuppressiv wirkende Tumormikroumgebung. Die vorliegenden Daten der mRNA-Sequenzierung dieser Arbeit zeigen für die Gene PTPN11 und BRAF in sämtlichen Auswertungen jeweils mit einem $\log_2(\text{fold-change}) < 0,5$ eine deutliche Abnahme in der Genexpression. Eine Häufung von Mutationen in diesen Genen konnte nicht bestätigt werden, da diese in der DNA-Panel Sequenzierung nicht abgedeckt sind. Mutationen im PTEN-Gen konnten bei insgesamt zwei Tumoren festgestellt werden. Das 2. Rezidiv von Paar 2 (GB_55) weist zusätzlich zur deutlich erhöhten Mutationsrate eine Amplifikation im PTEN-Gen auf. Beim 1. Rezidiv von Paar 5 (A_35) wurde eine Deletion detektiert. Eine deutlich erhöhte Frequenz von PTEN-Mutationen liegt also nicht vor.

Die Methode der NGS-mRNA-Sequenzierung wurde in dieser Arbeit bei zwei von drei Tumorpaaren, welche hypermutierte Rezidivtumoren beinhalten, angewendet. Eine

wichtige Erkenntnis daraus ist die Heterogenität der Tumoren zueinander, jedoch auch innerhalb eines Tumorraars. Daraus lässt sich ableiten, dass durch die Therapie zwar die klonale Selektion verstärkt wird, allerdings die Auswirkungen auf Ebene des Transkriptoms eher zufällig sind. Mit Hilfe der Methoden DESeq2 sowie Audic-Claverie konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, welche statistisch signifikant in den Rezidivtumoren überexprimiert werden. Eine Auswahl an möglicherweise relevanten überexprimierten Genen wurde in Tabelle 20 dargestellt. CD2, CD5 als auch CD6 befinden sich derzeit in der präklinischen Erprobung als mögliche Ziele einer CAR- (chimärer Antigenrezeptor) T-Zell-Therapie. Dabei handelt es sich um eine Form der Immuntherapie, bei welcher der Antigenrezeptor der T-Zellen modifiziert wird, um bestimmte Zielstrukturen wie CD2, CD5 oder CD6 auf den Tumorzellen zu erkennen. Bisher ist diese Form der Immuntherapie nur für die B-Zell-Leukämie bzw. für B-Zell-Lymphome zugelassen (69). In einigen klinischen Studien wurden zusätzlich anti-SLAMF7 CAR-T-Zellen zur Therapie des bis dato als nicht heilbar klassifizierten multiplen Myeloms eingesetzt. Ergebnisse zur Wirksamkeit sind noch ausständig (70). Des Weiteren wird CD6 als Zielprotein für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in verschiedenen Tumorentitäten und zur Immunsuppression nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation eingesetzt (71). MSLN wird in einer Vielzahl von soliden Tumoren deutlich überexprimiert und hat sich daher zu einem wichtigen Zielprotein von Immuntherapien entwickelt. Es wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien als Zielstruktur von CAR-T-Zellen getestet. Grundsätzlich werden anti-MSLN CAR-T-Zellen als sicher, jedoch mit limitierter Wirkung in der Tumorthherapie eingestuft (72). FMO3, PIGR, PTCRA und SLC6A20 werden ebenfalls in den Rezidivtumoren mit teils hypermutiertem Phänotyp deutlich überexprimiert, deren Genprodukte wurden jedoch als Zielstruktur in Tumortherapien noch nicht untersucht. Insgesamt sind fünf von neun Genprodukten aus Tabelle 20 potenzielle Kandidatengene für eine Immuntherapie, wobei die Wirkung im Bereich der soliden Tumoren noch als limitiert zu bewerten ist. Für die tatsächliche Identifikation von therapierelevanten Neoantigenen sind weitere Auswertungen mittels Whole-Exome-Sequencing notwendig. Als Beispiel für ein aussichtsreiches Kandidatengen einer tumorspezifischen Immuntherapie kann das Gen IDH-1 genannt werden. Dies wurde bereits in der Einleitung ausführlich besprochen und befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung. Insgesamt ist die Auswertung der NGS-mRNA-Sequenzierung mit Vorbehalten zu interpretieren, da die Stichprobe nur zwei Tumorraare umfasst und somit sehr klein

ist. Des Weiteren ist Paar 2 mit drei Rezidivtumoren verglichen zu Paar 3 deutlich überrepräsentiert. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Mutationsrate des 3. Rezidivs mit 94 Mutationen/Mbp von Paar 2 bereits unter dem Grenzwert für einen hypermutierten Phänotyp von 100 Mutationen/Mbp liegt. Somit wurden in die Auswertung der NGS-mRNA-Sequenzierung nicht ausschließlich hypermutierte Rezidivtumoren eingeschlossen. Um diese Problematik in zukünftigen Arbeiten zu adressieren, sollte bereits bei der initialen Auswahl geeigneter Tumorkollektive darauf geachtet werden, dass entsprechendes Tumorgewebe für sämtliche geplante Untersuchungen tatsächlich verfügbar ist.

Ist die Verfügbarkeit von Tumorgewebe sichergestellt, sollte eine kontinuierliche Analyse von Primär- und Rezidivtumoren zur Datensammlung durchgeführt werden. Somit kann das Tumorkollektiv stetig wachsen und die statistische Relevanz der gesammelten Daten nimmt zu. An der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Regensburg wurde das TruSight Oncology 500 (TSO500) mittlerweile in der prädiktiven Diagnostik implementiert. Das TSO500 ist ein auf Next Generation Sequencing basierendes DNA-Panel mit guter Verfügbarkeit, schneller Bearbeitungszeit sowie einer standardisierten bioinformatischen Auswertung. Ein Schwerpunkt bei dieser DNA-Panel-Analyse besteht in der Ermittlung der Mutationslast. Damit kann diese nicht nur im Rezidivtumor bezogen auf den entsprechenden Primärtumor bestimmt werden, sondern kann bereits als absolute Mutationslast im Primärtumor ermittelt werden. Somit können Tumorkollektive mit einem hypermutierten Phänotyp sicher herausgefiltert werden und weiteren Analysen wie Whole-Exome-Sequenzierung und NGS-mRNA-Sequenzierung zugeführt werden. Die Kenntnis über das Vorliegen eines hypermutierten Phänotyps dient zusätzlich als wichtiger prädiktiver Biomarker, um ein Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren als auch das Gesamtüberleben der Patienten besser beurteilen zu können. Durch ein kontinuierliches Screening mithilfe des TSO500-Panels soll es möglich sein, entsprechende therapierelevante Neoantigene zu identifizieren und damit die Therapieoptionen in Zukunft zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Diffuse Gliome, insbesondere das Glioblastom, sind mit einer sehr schlechten Prognose für den Patienten verbunden und bieten nur limitierte therapeutische Optionen. Um ein besseres Verständnis für die durch die Anwendung alkylierender Agenzien induzierten molekularen Veränderungen zu bekommen, wurden in dieser Arbeit Tumoren von insgesamt 47 Patienten longitudinal in der Primär- und Rezidivsituation untersucht. Von besonderem Interesse war die Analyse der Mismatch-Repair-Defizienz sowie die Entwicklung eines hypermutierten Phänotyps.

Die Auswertung der Immunhistochemie offenbarte eine deutlich verminderte Expression der Mismatch-Repair-Proteine in Rezidivtumoren. Der Zusammenhang zwischen einer Mutation der MMR-Gene und einer folglich verminderten Expression konnte dargestellt werden. Damit war eine Selektion für potenziell MMR-defiziente Tumorkollektive möglich. Innerhalb dieser vorselektierten Kollektive konnten keine Hotspotmutationen des POLE-Gens detektiert werden. Als Erklärung dafür dient die Größe der Stichprobe sowie die Seltenheit solcher Mutationen. Eine MMR-Defizienz sowie Mutationen des POLE-Gens bei Gliomen sind entscheidende Veränderungen bei der Bildung eines hypermutierten Phänotyps. Ein Drittel der untersuchten Tumorkollektive weist einen hypermutierten Phänotyp auf. Jedoch zeigen sich keine spezifischen Genveränderungen in den Rezidivtumoren im Vergleich zu den Primärtumoren. Die Veränderungen auf Ebene des Transkriptom durch die Anwendung einer alkylierenden Chemotherapie können am ehesten als zufällig interpretiert werden. Trotzdem konnte damit die Heterogenität der Tumoren zueinander als auch innerhalb eines Tumorkollektives bewiesen werden. Insgesamt konnten im Rahmen der NGS-mRNA-Sequenzierung neun relevant überexprimierte Kandidatengene (CD2, CD5, CD6, FMO3, MSLN, PIGR, PTCRA, SLAMF7 und SLC6A20) identifiziert werden. Für eine exaktere Einordnung, ob es sich dabei um mögliche therapierelevante Neoantigene handelt, sind weitere Auswertungen mittels Whole-Exome-Sequencing notwendig.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mögliche zelluläre Reaktionen auf die Anwendung einer alkylierenden Chemotherapie (19).....	11
Abb. 2 Oxidierung von 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in ein schwarz-braunes Polymer (57).....	38
Abb. 3: Beispiele der Immunhistochemie für die Expression der MMR-Proteine im Primär- und Rezidivtumor.....	42
Abb. 4: Exemplarische Elektropherogramme von O_9	49
Abb. 5: Exemplarische Elektropherogramme von A_37	52
Abb. 6: Übersicht der Mutationslast in den Rezidivtumoren.....	54
Abb. 7: Ergebnisse der DNA-Panel Sequenzierung von ausgewählten Paaren	58
Abb. 8: PCA mit den Genexpressionsdaten der fünf sequenzierten Proben.....	60
Abb. 9: Schnittmengen-Diagramm mit $\log_2(\text{fold-change}) > 4$ (60)	63
Abb. 10: Schnittmengen-Diagramm mit $\log_2(\text{fold-change}) > 2$ (60)	63

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung adulter diffuser Gliome in drei charakteristische molekulare Gruppen.....	8
Tabelle 2: Semiquantitatives Auswertungsschema für die immunhistochemischen Färbungen	39
Tabelle 3: Übersicht der Gliom-Entitäten und der Geschlechterverteilung.....	40
Tabelle 4: Auswertung der Immunhistochemie – Primärtumor, 1. Rezidiv, 2. Rezidiv und 3. Rezidiv	41
Tabelle 5: Mittelwerte bzw. Mediane des IRS von MSH6, MLH1, PMS2 und MSH2	43
Tabelle 6: Vergleich der Expression von MSH6 zwischen Primär- und Rezidivtumor	44
Tabelle 7: Vergleich der Expression von MLH1 zwischen Primär- und Rezidivtumor	44
Tabelle 8: Vergleich der Expression von PMS2 zwischen Primär- und Rezidivtumor	45
Tabelle 9: Vergleich der Expression von MSH2 zwischen Primär- und Rezidivtumor	45

Tabelle 10: Vergleich der Expression der MMR-Proteine zwischen Primär- und Rezidivtumor.....	46
Tabelle 11: Auswahl der Primär- und Rezidivtumoren aufgrund von Ergebnissen in der Immunhistochemie	47
Tabelle 12: Vergleich der Expression der MMR-Proteine bei den ausgewählten Primär- und Rezidivtumoren.....	47
Tabelle 13: Konzentrationen der aus FFPE-Material isolierten DNA	48
Tabelle 14: Analyse der MSH6-Mutationen c.G1558A und c.C2132T	49
Tabelle 15: Analyse der POLE-Mutationen c.C857G, c.C890T, c.G1231T/C und c.G1366C	50
Tabelle 16: Auswahl für NGS DNA-Panel mit den dazugehörigen Diagnosen	53
Tabelle 17: Übersicht relevanter Parameter und der Mutationsrate.....	54
Tabelle 18: IRS sowie Median der Tumoren mit hypermutiertem Phänotyp	55
Tabelle 19: Auswahl für NGS mRNA-Seq mit den dazugehörigen Diagnosen	59
Tabelle 20: Übersicht relevanter überexprimierter Gene.....	64
Tabelle 21: Genliste der Methode DESeq2	65
Tabelle 22: Genliste der Methode AC, (Paar 3: GB_63 & GB_64).....	65
Tabelle 23: Genliste der Methode AC, (Paar 2: GB_17 & GB_54, GB_17 & GB_56).....	66

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
AC	Audic-Claverie
ATRX	α -thalassemia/mental retardation syndrome Xlinked
bMMRD	biallelischen MMR-Defizienz
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry der Vereinigten Staaten
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CDKN	Cyclin dependent kinase inhibitor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIC	Capicua transcriptional repressor
CNV	Kopienzahlvariation
DAB	3,3-Diaminobenzidin
ddNTPs	di-Desoxynukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure

E. coli	Escherichia coli
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptors
FFPE-Material	Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe
FUBP	Far upstream element-binding protein
G	Guanin
GBM	Glioblastom
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hidi-Formamid	highly de-ionized-Formamid
HRP	Meerrettichperoxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
Indel	Insertion und Deletion
IRS	Immunoreactivity Score
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
Mb	Megabase
Mbp	Megabasenpaare
MGMT	O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
MLH	MutL-Homolog
MMR	Mismatch-Repair
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mRNA-Seq	mRNA-Sequenzierung
MSH	MutS-Homolog
MSK-Impact-Panel	Memorial Sloan Kettering Cancer Center-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets-Panel
MTIC	5-(3-methyl-1-triazen)-imidazole-4-carboxamid
NGS	Next-Generation Sequencing
NOS	Not otherwise specified (ältere Fälle mit unvollständiger molekularer Diagnostik)
NOTCH	Neurogenic locus notch homolog protein
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCNA	Kernantigen proliferierender Zellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
POLE	DNA-Polymerase Epsilon
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCF	Replikationsfaktor C
Rez	Rezidiv
RNA	Ribonukleinsäure
RPKM	Reads per kilobase per million mapped reads
SNPs	Single Nucleotide Polymorphismen
SR	Single read

SSBs	Einzelstrang-bindende Proteine
T	Thymin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
T _m	Schmelztemperatur
TMZ	Temozolomid
TSO500	TruSight Oncology 500
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WES	Whole-Exome-Sequencing
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

7.4 R-Skripte

OncoPrint (R-Version 3.6.0)

```
setwd("D:/")
library(ComplexHeatmap)
mat <- read.table("Uebersicht_NGS_DNA-Panel.txt",
  header = TRUE, stringsAsFactors=FALSE, sep = "\t")
mat[is.na(mat)] = ""
rownames(mat) = mat[, 1]
mat = mat[, -1]
mat= mat[, -ncol(mat)]
mat = t(as.matrix(mat))
mat[1:3, 1:3]

alter_fun = list(
  background = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "#CCCCCC", col = NA))
  },
  HYP = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "#3B2F2F", col = NA))
  },
  MET = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "#333399", col = NA))
  },
  UNMET = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "#FFB7C5", col = NA))
  },
  MUT = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h*0.33, gp = gpar(fill = "#008000", col = NA))
  },
  AMP = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "red", col = NA))
  },
  DEL = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h-unit(0.5, "mm"), gp = gpar(fill = "blue", col = NA))
  },
  LOH = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h*0.33, gp = gpar(fill = "#7DF9FF", col = NA))
  },
  MUTGER = function(x, y, w, h) {
    grid.rect(x, y, w-unit(0.5, "mm"), h*0.33, gp = gpar(fill = "#ACE1AF", col = NA))
  }
)

col = c("HYP"="#3B2F2F", "MET"="#333399", "UNMET"="#FFB7C5", "MUT" = "#008000", "AMP" =
"red", "DEL" = "blue", "LOH" = "#7DF9FF", "MUTGER" = "#ACE1AF")
```

```

sample_order = scan(paste0("sample_order.txt"), what = "character")

oncoPrint(mat, get_type = function(x) strsplit(x, ";")[[1]],
  alter_fun = alter_fun,
  col = col, row_order = NULL, column_order = NULL, axis_gp = gpar(fontsize = 10),
  row_names_gp = gpar(fontsize = 10),
  column_title = "OncoPrint NGS DNA-Panel ausgewaehlter Paare",
  heatmap_legend_param = list(title = "Alternations", at =
c("HYP", "MET", "UNMET", "MUT", "AMP", "DEL", "LOH", "MUTGER"),
  labels = c("Hypermutator", "Methyliert", "Unmethyliert", "Mutation/InDel", "Amplifikation", "Deletion",
"LOH", "bereits vorhandene Mutation")))

```

ENSEMBLE-ID zu Genbezeichnung (R-Version 3.6.2)

```

setwd("D:/ ")
library (dplyr)

table1 <- read.delim("Symbol_ENSBL_ID_GRCh38_87.txt", header=TRUE)
table9 <- read.delim("Count_table_Prim_Rez.txt", header=TRUE)

Gesamt<-semi_join(table1, table9, by.x="Geneid")
Gesamt2<- left_join(Gesamt, table9, by.x="Geneid")

write.table(Gesamt2, file = "Count_table_Prim_Rez_Symbol.txt", sep = "\t", dec=".", row.names =
FALSE)

```

Erstellen einer RPKM-Tabelle (R-Version 3.6.2)

```

setwd("D:/ ")

table1<-read.delim("Count_table_Prim_Rez_Symbol.txt")
counts <-table1[,3:7]
rownames(counts)<-table1[,1]

summedcounts<-apply(counts,2,sum)
summedcounts2<-matrix(summedcounts, nrow=35742, ncol=5, byrow=TRUE)
length<-rep(table1[,2],5)
length2<-matrix(length, nrow=35742, ncol=5)

myrpkm2<-((table1[,3:7])*10^9/length2/summedcounts2)
head(myrpkm2)

write.table(myrpkm2, file = "RPKM_Prim_Rez_Symbol.txt", sep = "\t", dec=".", row.names = TRUE)

```

Hauptkomponentenanalyse (PCA) (R-Version 3.6.2)

```

library(Biobase)
library(DESeq2)
library(gplots)

```

```

library(RColorBrewer)
library(FactoMineR)
library(ggplot2)
library(devtools)
library(genefilter)
library(dplyr)
library(stats)

setwd("D:/ ")
countdata <- read.delim("RPKM_Prim_Rez_Symbol.txt", header=TRUE)
attach(countdata)

mycounts <- countdata[,2:6]
rownames(mycounts) <- countdata [,1]

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,])

groups=c(rep("Prim",2), rep("R1",2), rep("R3",1))
colors=c(rep("cyan",2) , rep("blue",2), rep("green",1))
namer = colnames(mycounts)

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

plot(mydata, col=colors,pch=19,cex=1.5,xlim=c(-40,40),ylim=c(-30,30))

legend("topright",legend=c("Prim", "1.Rez", "3.Rez"),pch=c(15,15,15,15),
      col=c("cyan","blue","green"),cex=1.0)

text(x,y,labels=namer, cex=0.8,adj=c(0.8,1.5),col=colors)

```

DESeq2 (R-Version 3.6.2)

```

library("Biobase")
library("DESeq2")
library("gplots")
library("RColorBrewer")
library("FactoMineR")
library("ggplot2")
library("devtools")

```

```

library("ggbiplot")
library("genefilter")
library("dplyr")

setwd("D:/ ")
countdata <- read.delim("Count_table_Prim_Rez_Symbol.txt", header=TRUE)
attach(countdata)

tumors <- countdata[,3:6]
rownames(tumors) <- countdata[,1]
myfactors1 <-c(rep("Prim",2), rep("Rez",2))
colData <- data.frame(condition= factor(myfactors1))
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = tumors, colData, formula(~ condition))
dds2 <- DESeq(dds)
res <- results(dds2)

plotMA(res, main="DESeq2", ylim=c(-5,5))
hist(res$pvalue)

write.table(res, file = "Diff_express_Prim_Rez_tumor.txt", sep="\t", row.names=TRUE)

```

Audic-Claverie RNA-Seq (R-Version 3.6.2)

```

library(edgeR)
library(multtest)

setwd("D:/ ")
data <- read.csv("Count_table_AC.csv", header=TRUE, sep =";")
CTRL_count=data[,3]
TREAT_count=data[,4]
length=data[,2]
names(data)
row.names(data)

N1=sum(CTRL_count)
N2=sum(TREAT_count)
x=CTRL_count
y=TREAT_count

log2Fold = log2((y/N2)/(x/N1))

a=(N2/N1)^y
b=factorial(x+y)
c=factorial(x)
d=factorial(y)
f=(1+(N2/N1))

```

```

g=(x+y+1)
NE.x= x/N1
NE.y= y/N2

Audic_Claverie_p=a*(b/(c*d*f^g))
adjusted.p = p.adjust(Audic_Claverie_p,method="BH",n=length(Audic_Claverie_p))
myresult=cbind(log2Fold,Audic_Claverie_p,adjusted.p,x,y,NE.x,NE.y)

names(myresult)=
c("log2Fold","Audic_Claverie_p","adjusted.p","CTRL_count","TREAT_count","NE.CTRL","NE.TREAT")

rownames (myresult)=data[,1]

write.table(myresult, file = "Prim_Rez_AC.txt", sep="\t", row.names=TRUE)

Filter für extrazelluläre Proteine (R-Version 3.6.2)
library (dplyr)

setwd ("D:/ ")
Liste1 <- read.delim("Diff_express_Prim_Rez_tumor.txt", header=TRUE)
attach(Liste1)
Liste2 <- read.delim("Genliste.txt", header=TRUE)
attach(Liste2)

Gesamt<-semi_join(Liste1, Liste2, by.x="Gene")
Gesamt2<- left_join(Gesamt, Liste2, by.x="Gene")

write.table(Gesamt2,file="Overlap_Diff_express_Prim_Rez_tumor",sep="\t",dec=".")

```

8 Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut RR. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin; 2016.
2. Stupp R, Weber DC. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*. 2005;28(6-7):315-7.
3. Lonardi S, Tosoni A, Brandes AA. Adjuvant chemotherapy in the treatment of high grade gliomas. *Cancer Treat Rev*. 2005;31(2):79-89.
4. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Hedderich J, Hattermann K, Maximilian Mehdorn H, et al. Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurol Res*. 2015;37(2):95-105.
5. Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, et al. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res*. 2006;66(8):3987-91.
6. Hodges TR, Ott M, Xiu J, Gatalica Z, Swensen J, Zhou S, et al. Mutational burden, immune checkpoint expression, and mismatch repair in glioma: implications for immune checkpoint immunotherapy. *Neuro Oncol*. 2017;19(8):1047-57.
7. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*. 2016;18(suppl_5):v1-v75.
8. Bailey P CH. A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia 1926.
9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
10. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231-51.
11. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-73.
12. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(19):1473-9.

13. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66(20):9852-61.
14. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e315-e29.
15. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 2002;64(3):259-73.
16. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
17. Zhang J, Stevens MF, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology.* 2010;78(2):103-14.
18. Margison GP, Santibanez-Koref MF. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays.* 2002;24(3):255-66.
19. Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(12):943-55.
20. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer.* 2011;129(3):659-70.
21. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2038-45.
22. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51(2):202-6.
23. Gromeier M, Brown MC, Zhang G, Lin X, Chen Y, Wei Z, et al. Very low mutation burden is a feature of inflamed recurrent glioblastomas responsive to cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2021;12(1):352.

24. Touat M, Li YY, Boynton AN, Spurr LF, Iorgulescu JB, Bohrson CL, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. *Nature*. 2020;580(7804):517-23.
25. Bouffet E, Larouche V, Campbell BB, Merico D, de Borja R, Aronson M, et al. Immune Checkpoint Inhibition for Hypermutant Glioblastoma Multiforme Resulting From Germline Biallelic Mismatch Repair Deficiency. *J Clin Oncol*. 2016;34(19):2206-11.
26. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*. 2014;512(7514):324-7.
27. Platten M, Bunse L, Wick A, Bunse T, Le Cornet L, Harting I, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature*. 2021;592(7854):463-8.
28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
29. Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front Oncol*. 2017;7:236.
30. Weller M, Knobbe-Thomsen CB, Le Rhun E, Reifenberger G. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Der Onkologe*. 2022;28(2):155-63.
31. Yuan Y, Qi C, Maling G, Xiang W, Yanhui L, Ruofei L, et al. TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *J Clin Neurosci*. 2016;26:57-62.
32. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(9):1321-5.
33. Graw J. Genetik. Berlin; Heidelberg: Springer Spektrum; 2015.
34. Schmidt O. Genetik und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2017.
35. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol*. 2010;23(6):856-65.
36. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*. 1994;145(5):1175-90.
37. Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*. 2010;2010.

38. Szadkowski M, Jiricny J. Identification and functional characterization of the promoter region of the human MSH6 gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(1):36-46.
39. Yang G, Scherer SJ, Shell SS, Yang K, Kim M, Lipkin M, et al. Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell*. 2004;6(2):139-50.
40. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
41. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res*. 2009;15(14):4622-9.
42. Pospiech H, Syvaaja JE. DNA polymerase epsilon - more than a polymerase. *ScientificWorldJournal*. 2003;3:87-104.
43. Korona DA, Lecompte KG, Pursell ZF. The high fidelity and unique error signature of human DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(5):1763-73.
44. Mackay A, Burford A, Molinari V, Jones DTW, Izquierdo E, Brouwer-Visser J, et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell*. 2018;33(5):829-42.e5.
45. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):e164.
46. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
47. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal*; Vol 17, No 1: Next Generation Sequencing Data AnalysisDO - 1014806/ej171200. 2011.
48. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15(12):550.
49. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
50. Wickham H. ggplot2. *Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer Cham; 2016. p. XVI, 260.

51. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):907-15.
52. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience.* 2021;10(2).
53. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568-76.
54. Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophys J.* 2010;99(9):3010-9.
55. Estrada-Rivadeneira D. Sanger sequencing. *Febs j.* 2017;284(24):4174.
56. Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 1997;7(10):986-95.
57. Hermey G. *Der Experimentator Neurowissenschaften.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
58. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
59. Fagerberg L, Jonasson K, von Heijne G, Uhlén M, Berglund L. Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics.* 2010;10(6):1141-9.
60. Oliveros JC. *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.* 2007-2015 [
61. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science.* 2017;356(6340).
62. Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, Moskalik AD, Tanner G, Kocakavuk E, et al. Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature.* 2019;576(7785):112-20.
63. Xie C, Sheng H, Zhang N, Li S, Wei X, Zheng X. Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression. *Mol Clin Oncol.* 2016;5(2):236-40.
64. Andrianova MA, Chetan GK, Sibin MK, McKee T, Merkler D, Narasinga RK, et al. Germline PMS2 and somatic POLE exonuclease mutations cause hypermutability of the leading DNA strand in biallelic mismatch repair deficiency syndrome brain tumours. *J Pathol.* 2017;243(3):331-41.

65. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
66. Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, et al. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):2900-8.
67. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):251-64.
68. Zhao J, Chen AX, Gartrell RD, Silverman AM, Aparicio L, Chu T, et al. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat Med*. 2019;25(3):462-9.
69. Xiang J, Devenport JM, Carter AJ, Staser KW, Kim MY, J ON, et al. An "off-the-shelf" CD2 universal CAR-T therapy for T-cell malignancies. *Leukemia*. 2023;37(12):2448-56.
70. Kegyes D, Constantinescu C, Vrancken L, Rasche L, Gregoire C, Tigu B, et al. Patient selection for CAR T or BiTE therapy in multiple myeloma: Which treatment for each patient? *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):78.
71. Aragón-Serrano L, Carrillo-Serradell L, Planells-Romeo V, Isamat M, Velasco-de Andrés M, Lozano F. CD6 and Its Interacting Partners: Newcomers to the Block of Cancer Immunotherapies. *Int J Mol Sci*. 2023;24(24).
72. Klampatsa A, Dimou V, Albelda SM. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors. *Expert Opin Biol Ther*. 2021;21(4):473-86.

9 Danksagung

Ich möchte die vorliegende Dissertation meinen Eltern, Elisabeth Kisters und Johannes Reichinger sowie meinem Stiefvater Stefan Kisters, widmen, die mich seit jeher bedingungslos unterstützt und mir in jeder Situation immer Rückhalt gegeben haben. Danke, dass ich in all den Jahren immer zu 100 % auf euch zählen konnte.

Ein großes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider aussprechen, der für meine Anliegen immer ein offenes Ohr hatte und die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichte. Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Tanja Rothhammer-Hampl für die großartige Betreuung. Sie war stets engagiert und motivierte mich zu jeder Zeit bei der Entstehung dieser Dissertation. Ohne ihre fächerübergreifende Kompetenz in sämtlichen Fragestellungen wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Vielen Dank an Dr. sc. Julia Lorenz, Maria Hirblinger, Lydia Pawelko, Irene Schardt und Susanne Brüggemann für die kurzweilige und äußerst lehrreiche Zeit im Labor. Danke für all eure Ratschläge und Hilfestellungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Arbeit mit euch hat mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Frau Petra bedanken, die mir das ganze Studium über bedingungslos zur Seite gestanden ist und immer zu mir gehalten hat. Ohne ihre kritische Durchsicht wäre diese Arbeit so nicht gelungen. Auch all meinen Freunden möchte ich meinen Dank aussprechen. Ihr habt mir durch eure moralische Unterstützung und der notwendigen Ablenkung in schwierigen Zeiten immer viel Kraft gegeben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Reichinger
E-Mail	reichinger.m@gmail.com
Geburtsdatum	08.10.1993
Geburtsort	Oberndorf bei Salzburg
Staatsbürgerschaft	Österreich

Beruflicher Werdegang

seit 05/2022	Arzt in Ausbildung zum Facharzt für Orthopädie und Traumatologie, A.ö. Krankenhaus Oberndorf, Salzburg
11/2021-04/2022	Arzt in Basisausbildung, A.ö. Krankenhaus Oberndorf, Salzburg
08/2021-10/2021	Arzt in Basisausbildung, Universitätsklinik für Innere Medizin I, LKH Salzburg

Schulische und universitäre Ausbildung

06/2021	Erlangung der Approbation
05/2021	3. Staatsexamen
04/2021	2. Staatsexamen
03/2017	1. Staatsexamen
09/2008-06/2013	HTBLuVA Salzburg für Elektronik/Biomedizinische Technik
09/2004-07/2008	Bundesgymnasium Zaunergasse, Salzburg

Klinische Erfahrung

11/2020-02/2021	Universitätsklinik für Orthopädie und Traumatologie, LKH Salzburg
08/2020-11/2020	Abteilung für Nephrologie / Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg
04/2020-08/2020	Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg
09/2019	Klinik für plastische Chirurgie, Caritas-Krankenhaus St. Josef Regensburg
03/2019	Allgemeinmedizin, Hausarztpraxis in Regensburg
02/2018	Chirurgie, A.ö. Krankenhaus Oberndorf, Salzburg
09/2017	Klinik für Innere Medizin, Caritas-Krankenhaus St. Josef Regensburg

Promotion

Titel: Vergleichende Analyse der Mismatch-Repair-Defizienz und des hypermutierten Phänotyps von diffusen Gliomen in der Primär- und Rezidivsituation