

Aus dem Zentrum für Neurochirurgie der Universität zu Köln
Klinik für Allgemeine Neurochirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner

Analyse der quantitativen Expression von *IDH1 mut/wt* in verschiedenen
Gliomgraden und deren Korrelation zum Oberflächenmolekül CD133

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Moritz Perrech
aus Bochum

promoviert am
04. Juni 2014

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner
2. Berichterstatter: Frau Universitätsprofessor Dr. med. M. Deckert

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sich als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. Marco Timmer (Studiendesign und Datenauswertung)

Dr. Gabriele Röhn (PCR Etablierung und Datenauswertung)

Dr. Mohammad Toliat (DNA Sequenzierung)

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/ eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 11.04.2014

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. M. Timmer und Frau Dr. G. Röhn von mir selbst ausgeführt worden.

Die Sequenzierung der DNA wurde ohne meine Mitarbeit im Institut für Humangenetik (Dr. Mohammad Toliat) durchgeführt.

Die Krankengeschichten wurden teilweise von mir und teilweise von Frau Dr. G. Röhn ausgewertet.

Für Katja

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Roland Goldbrunner, Kliniksdirektor der Klinik für Allgemeine Neurochirurgie der Uniklinik Köln, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. med. Marco Timmer danke ich besonders für die Unterstützung bei der Themenstellung, die hervorragenden Betreuung und die ständige Hilfsbereitschaft. Auch für die zähe Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau Dr. Gabriele Röhn möchte ich danken für die geduldige Einführung in die Methodik und die umgehende Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen.

Mein besonderer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Insbesondere möchte ich Frau Nadine Breuer für die Unterstützung danken.

Danken möchte ich auch ganz besonders meiner Freundin, die mich in Studium und Beruf immer mit viel Liebe und Geduld unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
I. Einleitung.....	1
1. Gliome.....	1
1.1 Allgemeines:	1
1.2 Einteilung	1
1.2.1 WHO Klassifikation.....	1
1.2.2 Primäre vs. Sekundäre Glioblastome.....	2
1.3. Therapie der Gliome	4
2. <i>IDH1</i> Mutation.....	5
2.1. Allgemeines	5
2.2. Genetik.....	6
2.3 <i>IDH1 mut</i> Diagnostik.....	9
3. Gliomstammzelltheorie (<i>CD133</i>)	10
4. Fragestellungen.....	12
4.1 <i>IDH1 mut/wt</i>	12
4.2 <i>CD133</i>	12
II. Material und Methoden	13
1. Material.....	13
1.1 Verbrauchsmittel	13
1.2 Geräte	13
2. Vorarbeiten	14
2.1 Tumorbank	14
2.2 Selektion der Patientenproben	14
2.3 Erheben der klinischen Daten	15
3. Real-time RT-PCR (qPCR)	16
3.1 mRNA Isolation und cDNA Synthese	16
3.1.1 mRNA Isolation	16
3.1.2 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA.....	17
3.1.3 cDNA Synthese.....	17
3.2 Primerdesign/-auswahl	17
3.2.1 <i>IDH1 mut</i> und <i>wt Primer</i>	17
3.2.2 <i>CD133</i> Primer	18
3.3 qPCR Ansatz/-Etablierung.....	19
3.3.1 Ansetzen und Überprüfung des Primers.....	19
3.3.2 Messung der Standardkurven.....	20
3.4 Quantifizierung der <i>IDH1 mut</i> und <i>wt</i> sowie <i>CD133</i> Expression mittels qPCR....	21
3.4.1 Quantifizierung mittels qPCR.....	21
3.4.2 Bezug zur Expression des Referenzgens.....	22

4. DNA Sequenzierung.....	24
5. Statistik	24
III. Ergebnisse	25
1. Klinische Daten und Patientengruppen.....	25
2. <i>IDH1</i>	29
2.1 Expression von <i>IDH1 mut</i>	29
2.1.1 Sequenzierungsergebnisse.....	30
2.1.2 Analyse des <i>IDH1</i> Mutationsstatus mittels qPCR	32
2.1.3 Quantifizierung der <i>IDH1 mut</i> Expression	35
2.1.3.1 <i>IDH1 mut</i> Expression in Abhängigkeit des Tumorgrades	36
2.1.3.2 <i>IDH1 mut</i> Expression in Abhängigkeit von dem histologischen Subtyp	37
2.1.3.3 Einfluss von Chemotherapie auf die <i>IDH1 mut</i> Expression	37
2.1.3.4 <i>IDH1 mut</i> Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe)	38
2.2 <i>IDH1 wt</i> Expression.....	41
2.2.1 <i>IDH1 wt</i> Expression nach Gliomgrad	41
2.2.2 <i>IDH1 wt</i> Expression in Abhängigkeit von dem histologischen Subtyp	42
2.2.3 Einfluss von Chemotherapie auf die Expression von <i>IDH1 wt</i>	42
2.2.4 <i>IDH1 wt</i> Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe).....	43
2.3 Korrelation <i>IDH1 wt</i> und <i>IDH1 mut</i> Expression.....	46
3. <i>CD133</i>	48
3.1 Expression von <i>CD133</i>	48
3.2 <i>CD133</i> Expression nach Gliomgrad	48
3.3 Einfluss des histologischen Subtyps auf die Expression von <i>CD133</i>	49
3.4 Einfluss von Chemotherapie auf die Expression von <i>CD133</i>	50
3.5 <i>CD133</i> Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe).....	52
4. Korrelation zwischen <i>IDH1 mut</i> und <i>CD133</i>	54
IV. Diskussion	56
1. <i>IDH1 mut</i>	56
1.1 <i>IDH1 mut</i> qPCR – qualitative Analyse	57
1.2 <i>IDH1 mut</i> qPCR – quantitative Analyse	59
2. <i>IDH1 wt</i>	62
2.1 <i>IDH1 wt</i> Expression in unterschiedlichen Gliomgraden / malignisierenden Gliomen.....	63
2.2 Korrelation der Expression von <i>IDH1mut / wt</i>	64
3. <i>CD133</i>	64
V. Zusammenfassung.....	69

VI. Literaturverzeichnis.....	70
VII. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	81
VIII. Anhang	82
VIII.1 Abbildungsverzeichnis.....	82
VIII.2 Tabellenverzeichnis.....	84
IX. Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis

α -KG	alpha-Ketoglutarat
A	Astrozytome
AML	akute myeloische Leukämie
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DANN
ctrl	control
Cx	Chemotherapie
DNA	desoxyribonucleic acid
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CIMP	glioma-CpG-island methylator phenotype
GLUT1	Glucose transporter 1
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	gray
2-HG	2-Hydroxyglutarat
HGG	high grade glioma
HIF-1 α	Hypoxia-inducible-factor-1 α
HPSF	high purity salt free
IDH	Isocitratdehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
LGG	low grade glioma
MGMT	O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
mut	mutant
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight
OA	Oligoastrozytome
OD	optical density
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (=real-time RT-PCR)
pGBM	primäres Glioblastom
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
prim	primär
PTEN	Phosphatase und tensin homolog
Rez	Rezidiv
RT	Reverse Transcriptase
SD	standard deviation
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
sGBM	sekundäres Glioblastom
Tm	Temperatur des Schmelzpunktes

TP53	p53 Tumorsuppressorgen
Tx	Therapie
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
wt	wild type
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Einleitung

1. Gliome

1.1 Allgemeines:

Gliome stellen die häufigste primäre Hirntumorart im Erwachsenenalter dar. Die Inzidenz dieser Tumoren beträgt etwa 6/100.000 pro Jahr (Ricard et al., 2012). Die Ursachen für die Entstehung von Gliomen sind bisher weitestgehend ungeklärt. Eine vorherige Exposition mit ionisierenden Strahlen ist der einzige bisher bekannte Risikofaktor. Eine genetische Prädisposition zur Entwicklung glialer Tumoren besteht insbesondere im Rahmen seltener Syndrom-Erkrankungen wie der Neurofibromatose (Typ I & II), dem Li Fraumeni Syndrom, dem Turcot Syndrom etc. Diese machen jedoch deutlich weniger als 10% aller Gliome aus. Es wird daher vermutet, dass ein Zusammenspiel aus bisher unbekannten komplexen genetischen Aberrationen und externen Faktoren für die Entstehung von Gliomen verantwortlich ist (Shete et al., 2009; Wrensch et al., 2009).

1.2 Einteilung

1.2.1 WHO Klassifikation

Klassischerweise erfolgt die Gradierung der Gliome nach der WHO Klassifikation, welche zuletzt 2007 aktualisiert wurde und vor allem auf morphologischen Kriterien basiert. Hierbei wird zunächst eine Differenzierung anhand der Ähnlichkeit zwischen Tumorzellen und reifen glialen Zellen durchgeführt. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten kann dann die Zugehörigkeit des Tumors zu einem histologischen Subtyp (astrozytär, oligoastrozytär oder oligodendroglial) festgelegt werden (Louis et al, 2007).

Darüber hinaus werden die Tumoren basierend auf Kriterien wie der Differenzierung der Tumorzellen, der Zellularität, der mitotischen Aktivität/Mitoserate, dem Vorliegen von Kernatypien sowie von Gefäßproliferationen und Nekrosezonen in vier verschiedene Tumorgrade (I-IV) eingeteilt. Grad I Tumoren stellen vor allem die pilozytischen Astrozytome dar, welche bei Erwachsenen nur selten zu finden sind. Die Grad II-IV Gliome treten dagegen vor allem im Erwachsenenalter auf. Bei Grad II Tumoren handelt es sich um diffus infiltrierende niedrig-gradige Gliome (*engl. LGG: low grade glioma*). Grad III (anaplastische Gliome) und Grad IV Gliome (Glioblastome) zählen dagegen zu den malignen Gliomen (*engl. HGG: high grade glioma*) (Louis et al, 2007) (siehe Abbildung 1).

Diese klassische Einteilung der Gliome ist aufgrund ihrer rein morphologischen Kriterien in gewisser Weise Untersucher-abhängig, so dass zunehmendes Interesse an objektivierbaren Biomarkern besteht (van den Bent MJ, 2010).

	Phenotype	Grading						Median survival (years)
		Differentiation	Cell density	Nuclear atypia	Mitotic activity	Microvascular proliferation	Necrosis	
Astrocytoma								
Grade 2	Fibrillary or gemistocytic neoplastic astrocytes	Well differentiated	Moderate	Occasional	Generally absent	Absent	Absent	6 to 8
Grade 3	Same as grade 2 astrocytoma	Regional or diffuse anaplasia	Regionally or diffusely increased	Present	Present	Absent	Absent	3
Grade 4	Pleomorphic astrocytic tumour cells	Poor	High	Marked	Marked	Prominent	Present	1 to 2
Oligodendroglioma								
Grade 2	Monomorphic cells, uniform round nuclei, perinuclear halos	Well differentiated	Moderate	Possibly marked	Absent or occasional mitosis	Not prominent	Absent or not conspicuous	12
Grade 3	Same as grade 2 oligodendroglioma	Regional or diffuse anaplasia	Increased	Marked	Usually prominent	Often prominent	Possible	3 to >10
Mixed oligoastrocytoma								
Grade 2	Neoplastic glial cells with astrocytic or oligodendroglial phenotypes	Well differentiated	Moderate	Occasional	No or low	Absent	Absent	6
Grade 3	Same as grade 2 oligoastrocytoma	Anaplasia	High	Marked	High	Might be present	Absent (if present: GBMO)	3

GBMO= glioblastoma with oligodendroglial component.

Abbildung 1: Gradeinteilung und histologische Merkmale der Gliome sowie der histologischen Subtypen (Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome) (Abbildung aus Ricard et al., 2012). Innerhalb der Astrozytome gibt es vier Malignitätsgrade, bei den Oligodendrogliomen bzw. Oligoastrozytomen nur drei Grade. Grad 4 Astrozytome, auch Glioblastome genannt, weisen charakteristischerweise Nekroseareale und mikrovaskuläre Proliferate auf.

1.2.2 Primäre vs. Sekundäre Glioblastome

Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit niedrig-gradigen Gliomen beträgt etwa 5 bis 10 Jahre und ist damit deutlich länger als bei Patienten mit Glioblastomen (mediane Überlebenszeit 14 Monate) (Gannett et al., 1994; Leighton et al., 1997; Stupp et al., 2005).

Auch niedrig-gradige Gliome zeigen jedoch eine Progressionstendenz bzw. neigen zu einer malignen Transformation im weiteren Krankheitsverlauf. Diese sich aus niedrig-gradigeren Tumoranteilen entwickelnden malignen Tumoren werden als sekundäre Glioblastome bezeichnet und unterscheiden sich somit von den primären Glioblastomen, welche „*de novo*“ entstehen (Ohgaki und Kleihues, 2013).

Der Anteil der primären Glioblastome an der Gesamtzahl der Glioblastome beträgt etwa 90%. Die Patienten sind im Durchschnitt älter (medianes Alter: 62 Jahre) und weisen meist einen rascheren klinischen Verlauf auf. Patienten mit sekundären Glioblastomen

sind dagegen oft jünger (medianes Alter: 48 Jahre) und eher mit einer günstigeren klinischen Prognose assoziiert (Ohgaki und Kleihues, 2013).

Das histologische Bild der primären und sekundären Glioblastome ist jedoch weitestgehend ähnlich, so dass eine Unterscheidung anhand von rein histologischen Kriterien bisher nicht möglich war. Einzig ausgedehntere Nekroseareale scheinen ein Merkmal zu sein, welches vermehrt bei primären Glioblastomen gegenüber sekundären Glioblastomen zu finden ist. Eine Zuordnung zu einem speziellen Glioblastomsubtyp, primär oder sekundär, wurde daher bisher letztendlich basierend auf den klinischen Verläufe durchgeführt (Homma et al., 2006).

Mit zunehmendem Wissen über die molekular-genetischen Hintergründe der Gliome deutet sich jedoch an, dass sekundäre Glioblastome eine andere Tumorentität als die primären Glioblastome darstellen könnten (Ohgaki und Kleihues, 2013).

Bereits 1996 wurde eine hohe Inzidenz von *TP53* Mutationen in sekundären Glioblastomen beschrieben, welche nur selten in primären Glioblastomen zu finden war. Im Gegensatz dazu wurde eine *EGFR* Überexpression vor allem in primären Glioblastomen beschrieben (Watanabe et al., 1996). Über die letzten Jahre wurden weitere genetische Merkmale identifiziert, die in den beiden Glioblastom-Subtypen unterschiedlich exprimiert sind. Als typisch für primäre Glioblastome gelten eine *EGFR* Amplifikation, eine *PTEN* Mutation sowie ein Verlust des Chromosoms 10. Bei sekundären Glioblastomen finden sich dagegen meist eine *TP53* Mutation sowie ein Verlust der Heterozygosität auf Chromosom 19 (Ohgaki und Kleihues, 2007; Ohgaki et al., 2004; Fujisawa et al., 2000; Nakamura et al., 2000).

Da diese Unterschiede im genetischen Profil der Tumoren jedoch nicht ausreichend spezifisch sind, galten die genetischen Veränderungen nicht als beweisend für das Vorliegen einer der beiden Glioblastom Subtypen. Dies hat sich jedoch mit der Identifikation der *IDH1* Mutation (= *IDH1mut*) grundlegend geändert, welche nun als potentieller molekularer Marker zur Unterscheidung sekundärer von primären Glioblastomen angesehen wird (Parsons et al., 2008; Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009) (siehe Abbildung 2).

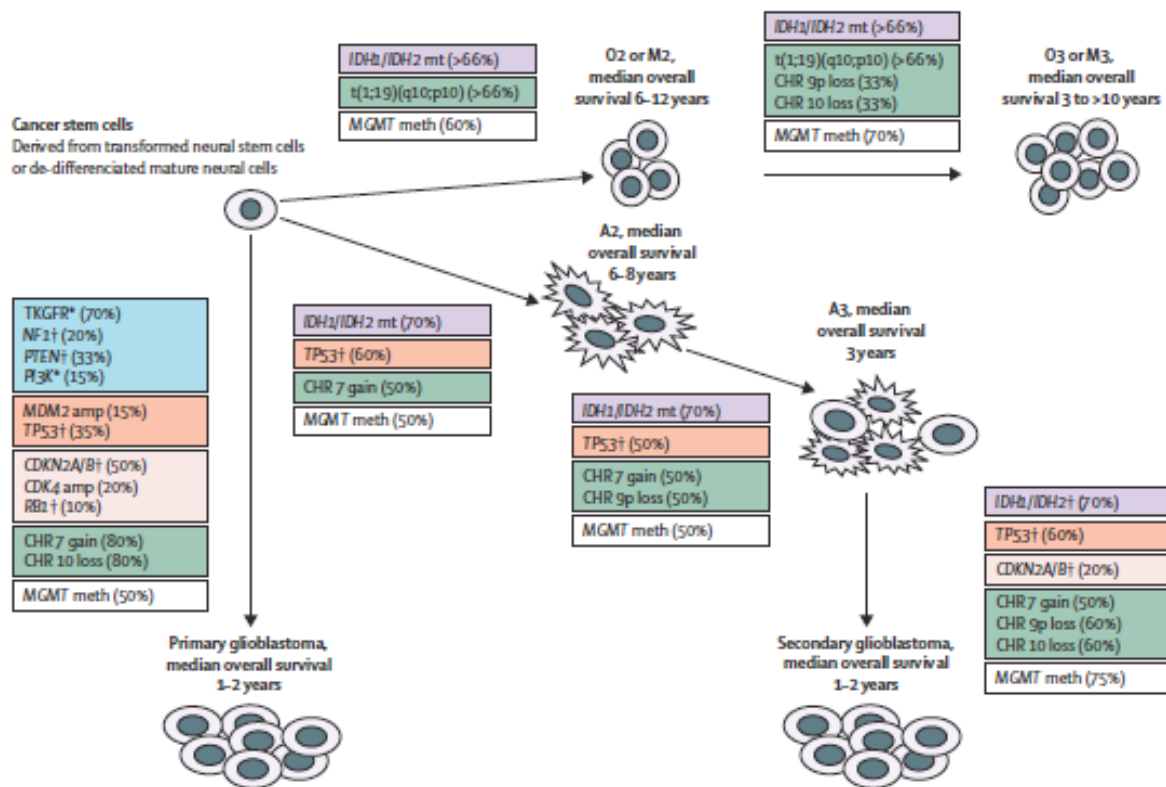


Abbildung 2: Unterschiede in den genetischen Profilen von primären Glioblastomen, sekundären Glioblastomen und Oligodendrogliomen (Abbildung aus Ricard et al., 2012). Das Auftreten der *IDH1/2* Mutation ist spezifisch für *LGG* und sekundäre *HGG*. Häufige genetische Veränderungen bei primären Glioblastomen sind dagegen eine *PTEN* Mutation und ein Verlust des Chromosom 10 (A2/A3=Grad II/III Astrozytome, O2/O3=Grad II/III Oligodendrogliome, M2/M3=Grad II/III Mischgliome).

1.3. Therapie der Gliome

Die Behandlung der Gliome unterscheidet sich bei den verschiedenen Tumorgraden.

Für Glioblastome gilt, dass eine vollständige Tumorresektion, soweit vom Risikoprofil vertretbar, angestrebt werden sollte. Hierdurch könnten Symptome bedingt durch den Tumormasseneffekt reduziert werden, sowie potentiell die Überlebenszeit verlängert und die Effektivität der weiteren adjuvanten Therapie verbessert werden (Stummer et al., 2011).

Als Standard in der adjuvanten Therapie gilt hierbei momentan das sogenannte „Stupp Schema“, welches auf einer konkomitanten Radiochemotherapie (60 Gy Strahlendosis+Temozolomid 75mg/m² Körperoberfläche pro Tag) mit anschließender Gabe von Temozolomid über 6 Zyklen (150-200mg/m² Körperoberfläche pro Tag für 5 Tage; anschließend 28d Pause bis zum nächsten Zyklus) beruht. Hierdurch konnte eine Verbes-

serung der medianen Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,6 Monate erreicht werden (Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005).

Bei Temozolomid handelt es sich um ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches oral gut verfügbar ist und die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Brandes et al., 2000). Aufgrund dieser günstigen pharmakologischen Eigenschaften und einer vergleichbaren Wirksamkeit hat Temozolomid die, zuvor meist als Chemotherapeutika in der Behandlung der Glioblastome verwendeten, Nitrosoharnstoffe wie Carmustin (BCNU) und Lomustin (CCNU) abgelöst (Adamson et al., 2000).

Innerhalb der Glioblastome wurde eine Patientensubgruppe identifiziert, welche in besonderem Maße auf eine alkylierende Chemotherapie mit Temozolomid anspricht. Gemeinsames Merkmal dieser Patienten ist eine Methylierung der Promotorregion des *MGMT* Gens (O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase) (Hegi et al., 2005).

In der Behandlung der anaplastischen Gliome steht ebenfalls die maximale Tumorresektion im Vordergrund, soweit diese bei überschaubarem Risiko zu erreichen ist. Die adjuvante Therapie bzw. die Behandlung nicht operabler Tumoren befindet sich dagegen derzeit noch in Evaluation im Rahmen verschiedener Studien. An chemotherapeutischen Optionen wird ebenfalls Temozolomid verwendet oder, insbesondere bei oligodendroglialen Tumoren, PCV (Procarbazin, Lomustin und Vincristin). Auch molekulare Marker wie die Deletion von 1p-19q werden zunehmend zur Entscheidungsfindung der weiteren adjuvanten Therapie verwandt (Ricard et al., 2012).

Die Therapie der niedrig-gradigen Gliome ist aktuell noch wenig standardisiert. Als Therapieoptionen gelten die Tumorexstirpation, eine Chemotherapie oder eine Radiation oft in Abhängigkeit von prognostischen Faktoren wie Alter und Resektabilität. Dabei besteht jedoch sowohl für die Auswahl der Therapiemodalität als auch für das Timing der Behandlung noch Bedarf an weiterführenden randomisierten Studien (Soffietti et al., 2010).

2. *IDH1* Mutation

2.1. Allgemeines

Parsons und Mitarbeitern gelang 2008, basierend auf der Genomsequenzierung von insgesamt 22 Tumorproben, die Identifikation der *IDH1* Mutation. Diese Proben waren ei-

nem Patientenkollektiv zuzuordnen, welches im Durchschnitt jünger und mit einer besseren Überlebenszeit assoziiert war. Vom klinischen Verlauf handelte es sich bei den meisten dieser Patienten um sekundäre Glioblastome (Parsons et al., 2008).

Die *IDH1* Mutation findet sich neben den sekundären Glioblastomen auch in >80% der diffusen und anaplastischen Gliome. In anderen soliden Tumoren des zentralen Nervensystems ist die Mutation dagegen extrem selten (Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009; Bleeker et al., 2009). *IDH2* Mutationen sind insgesamt deutlich seltener und finden sich eher in anaplastischen Oligodendrogliomen bzw. Oligoastrozytomen (Yan et al., 2009).

Neben den Gliomen stellt die akute myeloische Leukämie (AML) die einzige andere Tumorentität dar, bei welcher *IDH* Mutationen mit einer hohen Frequenz aufzufinden sind. Bei AML Patienten ist die Mutation jedoch im Gegensatz zu den Gliomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Wodurch diese Unterschiede im biologischen Verhalten der Tumoren, trotz Vorliegen der gleichen Mutation, bedingt sind, ist bisher unbekannt (Yen et al., 2010).

2.2. Genetik

IDH Mutationen sind Punktmutationen, welche zu einem Basenaustausch im Codon 132 (*IDH1*) bzw. Codon 172 (*IDH2*) führen. Die häufigste dieser Mutationen ist (>90% der *IDH1* Mutationen) ein Guanosin-Adenosin Austausch im Codon 132 (CGT->CAT) (Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009) (siehe Abbildung 3).

Das Auftreten der *IDH1* Mutation scheint ein frühes Ereignis in der Entstehung von Gliomen darzustellen. Diese Vermutung basiert darauf, dass sich die Mutation zu einem deutlich höheren Prozentsatz in niedrig-gradigen Gliomen finden lässt, als andere genetische Veränderungen wie z.B. die *TP53* Mutation oder der Verlust von 1p/19q.

Als weiteres Indiz für diese Hypothese gilt, dass im Rahmen von seriellen Biopsien bei individuellen Patienten kein einziger Fall identifiziert werden konnte, in dem die *IDH1* Mutation nach den übrigen Mutationen aufgetreten wäre.

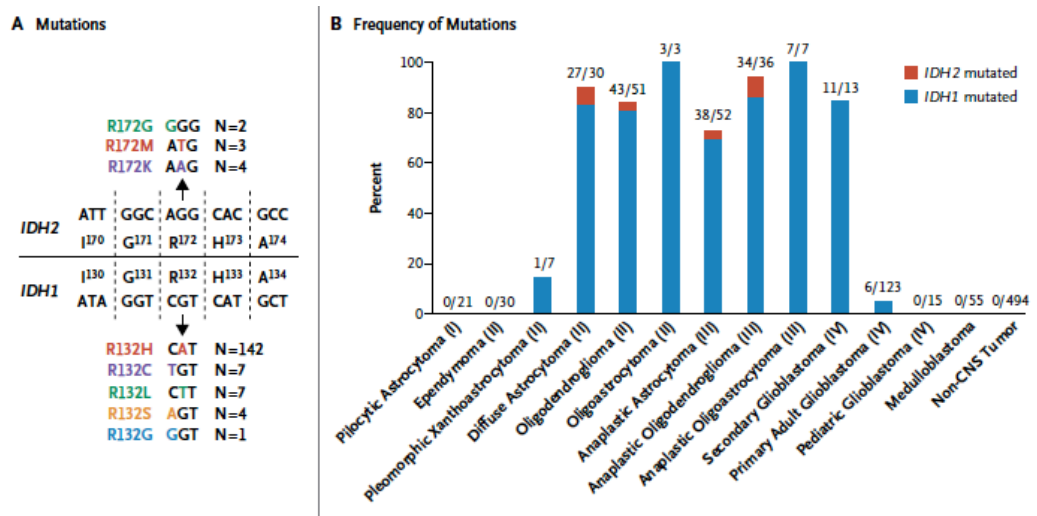


Abbildung 3: Häufigkeit verschiedener Punktmutationen in den Codons 172 für das *IDH2* Gen und Codon 132 des *IDH1* Gens (Darstellung links). Frequenz der *IDH1*/*IDH2* Mutation bei Tumoren des ZNS (Darstellung rechts) (Abbildung aus Yan et al., 2009). Die G395A (R132H) Mutation ist die häufigste Punktmutation in *IDH1* Gen. Die *IDH1* Mutation tritt mit einer hohen Frequenz bei Grad II und III Gliomen sowie sekundären Glioblastomen auf, bei anderen Tumoren des ZNS ist sie dagegen sehr selten.

Im weiteren Verlauf könnten dann die anderen genetischen Veränderungen, wie die *TP53* Mutation bzw. der 1p/19q Verlust den weiteren histologischen Subtyp beeinflussen. So tritt die *TP53* Mutation vor allem in astrozytären Tumoren auf, während der 1p/19q Verlust dagegen insbesondere in oligodendroglialen Tumoren zu finden ist (Watanabe et al., 2009; Kim et al., 2010) (siehe Abbildung 2).

Ob und in welcher Weise die *IDH1* Mutation die Progression von Gliomen bzw. deren Entstehung beeinflusst, ist bisher noch nicht geklärt. In seiner nicht-mutierten Form codiert das *IDH1* Gen die Isocitratdehydrogenase 1, ein Enzym des Citratzyklus (Krebs-Zyklus), welches die Umwandlung von Isocitrat in α -Ketoglutarat katalysiert (Geisbrecht und Gould, 1999). Mutationen des *IDH1* Gens reduzieren diese enzymatische Kapazität des Enzyms, indem sie die Bindungskapazität von Isocitrat verringern. In der Folge kommt es zu einem Anstieg des Transkriptionsfaktors HIF-1 α sowie dessen nachgeordneter Ziele wie VEGF, GLUT1 und PGK1 (Zhao et al., 2009).

Nachdem zunächst davon ausgegangen wurde, dass es sich bei der *IDH1* Mutation um eine sogenannte „loss-of-function“ Mutation handelt, gelang Dang und Mitarbeitern der massenspektrometrische Nachweis von 100-fach erhöhten 2-Hydroxyglutarat (2-HG) Spiegeln bei Patienten mit *IDH1* Mutationen (Dang et al., 2009). Ursächlich hierfür

scheint zu sein, dass das mutierte Enzym nicht seine Aktivität verliert, sondern im Gegenteil eine neue Enzymfunktion hinzugewinnt („*gain-of-function*“), mit welcher α -Ketoglutarat in 2-Hydroxyglutarat umgewandelt wird (Dang et al., 2009; Ward et al., 2010; Presner und Chinnaiyan, 2011) (siehe Abbildung 4).

Es wird vermutet, dass 2-Hydroxyglutarat wiederum verschiedene intrazelluläre Funktionen beeinflussen könnte. Von besonderer Bedeutung scheint hierbei der Einfluss auf die Tumorzell-Epigenetik zu sein. So konnte gezeigt werden, dass *IDH* Mutationen mit einem spezifischen DNA-(Hyper)Methylierungsprofil einhergehen, welches G-CIMP genannt wird (glioma CpG-island methylator phenotype) (Noushmehr et al., 2010). Bestätigt werden konnte dies unter anderem durch das Einbringen von *IDH1 mut* in primäre Astrozyten, was neben der Veränderung bestimmter Histonmarker auch zu einer ausgiebigen DNA Hypermethylierung führte (Turcan et al., 2012). Die Wirkung von 2-Hydroxyglutarat als sogenannter „Onkometabolit“ scheint dabei unter anderem durch die Hemmung von Histon-Demethylasen zustande zu kommen und könnte so die Differenzierung von Progenitorzellen inhibieren (Xu et al., 2011; Lu et al., 2012).

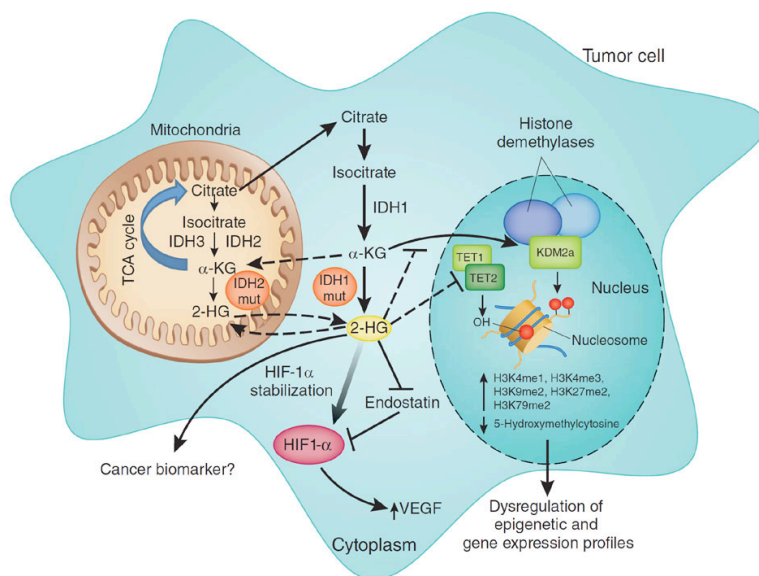


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Einflüsse von 2-Hydroxyglutarat (2-HG) in Tumorzellen mit einer *IDH1* Mutation (Abbildung aus Presner et al., 2011). Auf zellulärer Ebene führt die *IDH1* Mutation zu einer vermehrten Synthese von 2-HG, welches u.a. Histon-Demethylasen inhibiert und so die Differenzierung blockt.

Basierend auf der Analyse der cDNA Expressionsprofile von Glioblastomen wurden vier unterschiedliche genetische Subtypen identifiziert (proneural, neural, klassisch und mesenchymal). Glioblastome mit einer *IDH1* Mutation sind dabei meist dem proneuralen Subtyp zu zuordnen, während Glioblastome ohne *IDH1* Mutation in allen Subgruppen zu finden sind. Interessanterweise, sind auch niedrig-gradige Gliome dem proneuralen Subtyp zu zuordnen, so dass diese *IDH1 mut* Tumoren einem gemeinsamen Vorläuferzelltyp zu entspringen scheinen (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010; Cooper et al., 2010).

2.3 *IDH1 mut* Diagnostik

Sogenannte „Molekulare Marker“ gewinnen zunehmend an Bedeutung im Verständnis der Gliome und derer Behandlung. Genetische Veränderungen wie die Methylierung des *MGMT* Promotors haben daher bereits Einzug gehalten in Therapieentscheidungen sowie das Design von klinischen Studien bei Patienten mit Glioblastomen (Stupp et al., 2005; Weller et al., 2010). Für den *IDH1* Mutationsstatus wurde gezeigt, dass dieser in Verbindung mit dem *MGMT* Promotor-Methylierungsstatus prädiktiv für das Ansprechen einer chemotherapeutischen Behandlung sein könnte (Wick et al., 2013). Um so wichtiger erscheint daher eine akurate und rasche Bestimmung des *IDH1* Mutationsstatus.

Für die Detektion der *IDH1* Mutation in Gliomproben wurden zahlreiche Methoden beschrieben und validiert. Hierzu gehören PCR-Restriktion Fragment Polymorphismen, PCR-Einzelstrang Konformationspolymorphismen, Pyrosequenzierung und eine High-Resolution Schmelzkurven Analyse (Bujko et al., 2010; Meyer et al., 2010; Kang et al., 2009; Felsberg et al., 2010; Setty et al., 2010; Boisselier et al., 2010). Als „Goldstandard“ galt bisher die DNA Sequenzierung, welche die Diagnosestellung sämtlicher *IDH1* und *IDH2* Mutationen erlaubt. Alle dieser Methoden sind jedoch in ihrer Sensitivität und praktischen Anwendbarkeit limitiert (Loussouarn et al., 2012).

Als alternative Methoden wurden aktuell der immunhistochemische Nachweis der Mutation sowie der Nachweis mittels qPCR beschrieben. Für beide Methoden wurde eine hohe Sensitivität und Spezifität gezeigt (Loussouarn et al., 2012).

Alle zuvor erwähnten Methoden erlauben eine qualitative Aussage in dem Sinne, dass bestimmt werden kann, ob die *IDH1* Mutation vorliegt oder nicht. Sowohl die immunhistochemische Analyse als auch die qPCR ermöglichen dagegen auch eine Quantifizierung

der Genexpression, wobei die IHC eher als semiquantitative Methode anzusehen ist. Eine Quantifizierung der *IDH1 mut* Expression ist bisher in Gliomen noch nicht beschrieben worden.

3. Gliomstammzelltheorie (*CD133*)

Neben der Identifikation der *IDH1* Mutation als frühe Mutation in der Entstehung von Gliomen und sekundären Glioblastomen hat die Gliomstammzelltheorie viel Aufmerksamkeit erlangt. Die auf histologischer Ebene nachweisbare deutliche zelluläre Heterogenität der Glioblastome wird dabei auf zwei Entstehungsmodelle zurückgeführt.

Auf der einen Seite geht das „stochastische Modell“ davon aus, dass alle Tumorzellen das gleiche Potential haben Tumoren zu bilden, jedoch zufällig durch externe Faktoren aktiviert werden. Dem gegenüber geht das „hierarchische Modell“ davon aus, dass nur eine bestimmte Zellpopulation in der Lage ist unbegrenzt zu proliferieren und neue Tumoren zu bilden. Hierbei handelt es sich um sogenannte Tumorstammzellen (Reya et al., 2001). Als gemeinsame Charakteristika dieser Tumorstammzellen gelten die Fähigkeit Tumoren zu bilden, eine Selbsterneuerungskapazität sowie die Fähigkeit in nicht-tumorigene Tumorzellen zu differenzieren (Clevers H, 2011).

Hierbei ist es unklar ob es sich bei diesen Zellen um transformierte adulte Stammzellen handelt oder ob reife somatische Zellen durch genetische/epigenetische Veränderungen in einen Stammzellzustand gebracht wurden (Scaffidi und Misteli, 2011).

Der erste Hinweis auf die Existenz von Tumorstammzellen in Gliomen ergab sich durch die Isolation von klonogenen Neurosphaeren-bildenden Tumorzellen aus intraoperativen Glioblastomproben (Ignatova et al., 2002). Grundsätzlich scheint ein gemeinsames Merkmal dieser Zellpopulation eine Expression des Oberflächenmarkers *CD133* zu sein, welcher bisher vor allem als Marker gesunder neuronaler Vorläuferzellen angesehen wurde (Singh et al. 2003).

Für die *CD133+* Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass sie in besonderem Maße gegenüber Chemo- und Radiotherapie resistent sind. Dadurch bedingt könnten sie ein entscheidender Faktor in der Entstehung von Tumorrezidiven nach einer erfolgten Behandlung darstellen (Bao et al., 2006; Liu 2006). Eine eindeutige Identifikation dieser Zellpopulation bleibt jedoch problematisch, da sämtliche bisher etablierte Assays hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität deutlich limitiert sind (Wan et al., 2010).

Neben der noch unklaren Rolle der Tumorstammzellen in der Entstehung von Tumoren und der Entstehung von Tumorrezidiven nach einer vorherigen Therapie stellt sich darüber hinaus die Frage, inwiefern diese Zellen in den Prozess der Progression von niedrig-gradigen Gliomen zu Glioblastomen involviert sind. Diese Frage wurde unter anderem von Thon und Mitarbeitern adressiert, welche die Expression von *CD133* in Gliomen verschiedener Grade und histologischer Subtypen mittels Immunhistochemie und semi-quantitativer konventioneller PCR analysierten. Sie beschrieben hierbei zunächst die Anwesenheit von *CD133*+ Zellen auch in niedrig-gradigeren Gliomen. Darüber hinaus fanden sie jedoch auch eine Korrelation zwischen der Anzahl der *CD133*+ Zellen und der Malignität des Tumors, was sie schlussfolgern ließ, dass *CD133*+ Zellen tatsächlich in die Gliomprogression involviert sein könnten (Thon et al., 2010).

Auch Zeppernick und Mitarbeiter beschreiben eine Korrelation zwischen der Expression von *CD133* und dem Gliomgrad bzw. dem klinischen Outcome der Patienten, welches sie als weiteren Hinweis auf die Relevanz der Tumorstammzellen in der Pathogenese der Gliomen diskutierten (Zeppernick et al., 2008).

Die Ergebnisse beider dieser Arbeiten basieren zumindest teilweise auf immunhistochemischen Analysen, welche sich jedoch bei der Bestimmung der Expression von *CD133* als schwierig darstellen können. Ursächlich hierfür scheint die Verwendung unterschiedlicher Antikörper-Klone (AC133, W6B3C1, C24B9 und ab19898) zu sein, für die gezeigt werden konnte, dass sich mit ihnen teils deutlich abweichende Ergebnisse in immunhistochemischen Analysen ergeben (Hermansen et al., 2011).

Eine weitere Arbeitsgruppe hatte die Expression verschiedener Stammzellmarker, darunter auch *CD133*, in Gliomen unterschiedlicher Grade mittels qPCR untersucht und hierbei ebenfalls ein Anstieg der *CD133* Expression in Gliomen gegenüber Kontrollgewebe gefunden (Ma et al., 2007).

Bei sämtlichen dieser Arbeiten wurde vor allem untersucht, wie sich die *CD133* Expression je nach Tumorgrad verhält, Daten über die Entwicklung der *CD133* Expression während der Tumorprogression bei individuellen Krankheitsverläufen liegen dagegen nicht vor.

4. Fragestellungen

Aus den dargelegten wissenschaftlichen Hintergründen ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

4.1 *IDH1 mut/wt*

- Eignet sich die qPCR mit dem verwendeten Primer mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zur Analyse des *IDH1* Mutations-Status?
- Wie verhält sich die Expression von *IDH1 mut* in Gliomen verschiedener Grade bzw. Subtypen?
- Wie verhält sich die Expression von *IDH1 mut* in einzelnen Individuen im longitudinalen Krankheitsverlauf?
- Könnte sich die Analyse der *IDH1 mut* Expression als möglicher Biomarker für den Krankheitsverlauf eignen?
- Wie verhält sich parallel dazu die Expression von *IDH1 wt*? Besteht eine Korrelation zwischen der Expression der beiden Allele?

4.2 *CD133*

- Wie verhält sich die Expression von *CD133* bei Gliomen verschiedener Grade?
- Wie entwickelt sich die *CD133* Expression während der Gliomprogression im individuellen Krankheitsverlauf?
- Wird die Expression des Tumorstammzellmarkers durch die Behandlung (Chemotherapie) als Ausdruck der besonderen Chemoresistenz der Tumorstammzellen beeinflusst?
- Besteht eine Korrelation zwischen *CD133* und *IDH1 mut* Expression basierend auf der Tatsache, dass die *IDH1 mut* eine frühe genetische Veränderung darstellt und *CD133* ein potentieller Gliomstammzellmarker ist?

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Verbrauchsmittel

- RNeasy® Mini Kit *Quiagen, Hilden*
- QuantiTect® Reverse Transcription Kit *Quiagen, Hilden*
- QuantiTect SYBR® Green Master Mix *Quiagen, Hilden*
- iQ SYBR® Green Supermix *Biorad, Hercules, USA*
- RNase-Free Water *Quiagen, Hilden*
- Tris Puffer
- Ethanol 70%
- Filterspitzen TipOne® *Starlab, Hamburg*
(10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)
- BT10E Eppendorf Style Filter Tip (10µl) *Biotix, Potsdam*
- PCR Tubes (0,2ml, flacher Deckel) *Starlab, Hamburg*
- 1,6ml Tubes (DANN, DNase- und RNase-frei) *Biozym, Hameln*

1.2 Geräte

- Rotor-Gene Q Cycler *Quiagen, Hilden*
- GMC 060 Tischzentrifuge (6,600 rpm) *LMS, Tokyo, Japan*
- Work Bench „Clean Air“ *Thermo Scientific, Waltham, USA*
- Ultra Freezer (-86°C) *Thermo Scientific, Waltham, USA*
- Bosch Kältemaschine (-20°C) *Kirsch Medical, Offenburg*
- Kühlschrank (4-8°C) *Bosch, Gerlingen*
- Eppendorf Research® Pipetten *Eppendorf, Hamburg*
(0,5-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl)
- Finnpipette® Digital *Thermo Scientific, Waltham, USA*
(0,2-2µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 100-1000µl)

2. Vorarbeiten

2.1 Tumorbank

In der Klinik für Allgemeine Neurochirurgie wurden seit 1990 prospektiv Proben von sämtlichen Patienten asserviert, die an einer Raumforderung des peripheren oder zentralen Nervensystems (spinal oder kranial) operiert wurden.

Einschlusskriterien waren hierbei das Vorliegen einer Raumforderung des zentralen/peripheren Nervensystems, welches einer operativen Therapie bedurfte, sowie eine schriftliche Einwilligung in das von der hiesigen Ethikkommission genehmigte Einwilligungsformular (Ethikkommission: Uniklinik Köln AZ: 03-170).

Die Tumorproben wurden, bei vorliegender schriftlicher Einwilligung und ausreichendem Gewebe zur Aufarbeitung durch die Neuropathologie, nach Entnahme aus dem Situs schnellstmöglich in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Behälter gebracht. Die so „schockgefrorenen“ Proben wurden anschließend anonymisiert (z.B. HT 3456, HT=Hirntumor; Zahl entspricht der Probennummer). Die Proben wurden dann in einen -80°C-Gefrierschrank verbracht, in dem sie dauerhaft gelagert werden.

2.2 Selektion der Patientenproben

In der Tumorbank wurden seit Beginn des Probensammelns bisher insgesamt 9432 Tumorproben verschiedener Tumorentitäten und -gradierungen von über 4000 Patienten asserviert. Da im Rahmen dieser Arbeit die Expression von bestimmten Tumorgenen (*IDH1 mut / wt*; *CD133*) in Gliomen verschiedener Grade untersucht werden sollten und darüber hinaus aber auch die Entwicklung der Expression dieser Gene im Krankheitsverlauf analysiert werden sollte, wurden aus der Datenbank folgende Gruppen identifiziert

- diffuse Gliome (WHO II°)
- anaplastische Gliome (WHO III°)
- primäre Glioblastome (WHO IV°) Erstdiagnose vs. Rezidivtumor
- sekundäre Glioblastome (WHO IV°) +/- vorherige Chemotherapie
- Kontrollgruppe (peritumorales, mikroskopisch tumorfreies Gewebe)

Hierbei wurden astrozytäre und oligoastrozytäre Tumoren eingeschlossen, während oligodendrogiale Tumoren nicht Teil dieser Untersuchung waren.

Die histologische Diagnose wurde von zwei unabhängigen Neuropathologen bestätigt. Zur Bestimmung ob eine Tumorprobe Tumorgewebe enthielt bzw. als tumor-frei anzusehen war, wurden HE-Färbungen angefertigt, welche extern neuropathologisch begutachtet wurden. Erst bei Vorliegen von mehr als 80% Tumorzellen in dem Gewebeschnitt wurde das unmittelbar angrenzende Tumorgewebe zur RNA Isolierung verwendet. In gleicher Weise konnte so die Tumorfreiheit bestimmt werden.

Aus der Tumorbank konnten so insgesamt 104 Patienten identifiziert werden, von denen entsprechende Proben vorlagen. Diese Gesamtzahl der Patienten setzte sich zusammen aus 21 Patienten mit II° Gliomen, 22 Patienten mit III° Gliomen, 22 Patienten mit sekundären Glioblastomen und 30 Patienten mit primären Glioblastomen.

Bei 9 weiteren Proben handelte es sich um Kontrollgewebe, welches peritumorales Gewebe darstellte, das von einem Neuropathologen als tumor-frei klassifiziert worden war.

Von insgesamt 10 Patienten mit progredienten Gliomen lagen Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes vor (individuelle Verläufe). Ebenso waren von den 10 Patienten mit primären GBM Tumorproben von der Operation des Rezidivtumors vorhanden, so dass auch diese als „Individualverläufe“ angesehen werden konnten (siehe Tabellen 1 und 8).

2.3 Erheben der klinischen Daten

Nach Identifikation der Patienten der einzelnen Gruppen, wurden die Patientenakten aus dem hiesigen Archiv ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst nur einfache epidemiologische und klinische Daten erhoben.

Hierzu zählten:

- Alter und Geschlecht,
- Lage des Tumors,
- histologischer Subtyp (astrozytär oder oligoastrozytär),
- Zeit zur Reoperation.

3. Real-time RT-PCR (qPCR)

Der Level einer Genexpression spiegelt sich auf zellulärer Ebene unter anderem im Umsatz des Transkriptionsproduktes mRNA (*messenger* RNA), so dass durch die Quantifizierung der mRNA die Expression eines Genes gemessen werden kann. Die qPCR basiert dabei auf der klassischen PCR mit den Phasen der DNA-Denaturierung, des Anlagern der Primer (Annealing) und Verdopplung der DNA (Elongation), welche in zahlreichen Zyklen wiederholt werden. Da hierzu jedoch die Verwendung von DNA anstatt RNA erforderlich ist, steht zu Beginn der Methodik die reverse Transkription der mRNA in cDNA. Dies kann entweder in einem gemeinsamen Ansatz erfolgen (one-step qPCR) oder getrennt in zwei Ansätzen (two-step-qPCR) (Watson et al., 2004).

Die Quantifizierung der Genexpression wird durch die Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs (z.B. SYBR Green) ermöglicht. Ungebunden fluoreszieren diese Farbstoffe kaum, sobald sie jedoch an doppelsträngige DNA binden, kommt es zu einem fast 1000-fachen Anstieg der Fluoreszenz. Die Intensität der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und korreliert so mit der Menge an doppelsträngiger DNA. Theoretisch sollte sich die Menge der dsDNA Moleküle mit jedem Zyklus verdoppeln, so dass zu Beginn ein exponentieller Kurvenverlauf zu erkennen ist. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer Sättigungskinetik unter anderem durch das Aufbrauchen der benötigten Moleküle und somit wird die nicht-exponentielle Phase (Plateauphase) erreicht. Da hierbei nur die Fluoreszenz gemessen wird und unklar ist welche Anzahl an Molekülen anfänglich vorlagen, muss eine lineare Standardkurve bestimmt werden, anhand derer die Quantifizierung erfolgen kann. Darüber hinaus wird die errechnete Konzentration in Bezug gesetzt zu einem sogenannten „Referenzgen“ (z.B. GAPDH), welches zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet wird (Bustin SA, 2000).

3.1 mRNA Isolation und cDNA Synthese

3.1.1 mRNA Isolation

Die Isolation von mRNA zur weiteren Analyse wurde nur bei Proben durchgeführt, welche zuvor von einem externen Neuropathologen untersucht worden waren. Voraussetzung zur Verwendung der Probe war ein Tumorzellgehalt von mindestens 80%. Zur mRNA Isolation wurde das RNeasy® Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Entsprechend der Herstellerinformation wurde hierbei Tumorgewebe (je 20-30mg) zunächst mechanisch homogenisiert und dann lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert und

der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Der Überstand wurde mit 70% Ethanol gemischt und anschließend auf einer Zentrifugiersäule aufgetragen. Nach erster Zentrifugation erfolgte die Reinigung des, die RNA enthaltenen, Pellets mit drei Waschzyklen. Anschließend wurde die isolierte RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C eingefroren.

3.1.2 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA

Nach erfolgter mRNA Isolation wurde die Konzentration und Qualität photometrisch kontrolliert. Die Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, die Messungen wurden dabei in Triplikaten durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurde die Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen (A260/A280 Ratio). Die mRNA wurde dazu in 10mM Tris-Puffer, bei einem pH von 8, aufgenommen. Als Ziel galt eine A260/A280 Ratio von 1,9-2,1.

3.1.3 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese aus der isolierten mRNA wurde mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurde je 1µg RNA mit gDNA Wipeout Puffer und RNase-freiem Wasser (insgesamt 14µl) gemischt und bei 42°C für 10min inkubiert um genomische DNA Reste zu entfernen. Anschließend wurden hierzu 6µl eines Mastermixes bestehend aus 1µl Reverse Transcriptase, 4µl RT Puffer (5x) und 1µl RT Primer Mix hinzugegeben und vermischt. Dies wurde dann bei 42°C für 15min inkubiert. Die Reverse Transcriptase wurde dann durch eine drei-minütige Inkubation bei 95°C deaktiviert. Die so generierte cDNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2 Primerdesign/-auswahl

3.2.1 *IDH1* mut und wt Primer

Zur Analyse der Expression der *IDH1* Mutation sowie des *IDH1* Wildtypen wurden folgende Primer verwandt, welche von Loussouarn 2012 veröffentlicht wurden (Loussouarn et al., 2012).

IDH1 mut Primer-F:

Dieser forward-Primer ist spezifisch für die „c.395G>A“ IDH1 Mutation, welche bei weitem die häufigste Mutation darstellt.

Sequenz: 5`-GGGTAAAACCTATCATCATAGGTCA-3`

OD: 7,8; 207µg; 26,9 mmol T_m = 59,7°C GC= 40%

MW= 7674 g/mol [HPSF]

IDH1 wt Primer-F:

Ein forward-Primer spezifisch für das IDH1 wt Gen.

Sequenz: 5`-GGTAAAACCTATCATCATAGGTCTG-3`

OD: 7,0; 188µg; 25,5nmol T_m = 59,3°C GC= 41,7%

MW= 7360 g/mol [HSPF]

IDH1 Primer-R:

Reverse Primer für beide Gene Mutation und Wildtyp.

Sequenz: 5`-CACATACAAGTTGGAAATTTCTGG-3`

OD: 7,5; 200µg; 27,2nmol T_m = 57,6°C GC= 37,5%

MW= 7375 g/mol [HSPF]

3.2.2 CD133 Primer

CD133 Primer-F:

Sequenz: 5`-AGCACTCTATACCAAAGCGTCAA-3`

OD: 8,9; 236µg; 33,8nmol T_m = 58,9°C GC= 43,5%

MW= 6985 g/mol [HSPF]

CD133 Primer-R:

Sequenz: 5`-CTCCCATACTTCTTAGTTTCCTCAA-3`

OD: 8,4; 253µg; 33,8nmol T_m = 59,7°C GC= 40,0%

MW= 7477 g/mol [HSPF]

3.3 qPCR Ansatz/-Etablierung

Die Etablierung der qPCR erfolgte in folgenden Schritten: 1) Ansetzen und überprüfen des Primers und 2) Messung der Standardkurven.

3.3.1 Ansetzen und Überprüfung des Primers

Die vom Hersteller als Trockenpulver gelieferten Primer wurden zunächst nach Herstellerangaben mit TE Puffer angesetzt. Hierzu wurden für den Primer *IDH1 wt*-F 255µl Puffer, für *IDH1 mut*-F 269µl und für *IDH1*-R 272µl verwendet um eine Stockkonzentration von 100pmol/µl=100µM (100X) zu erreichen. Für die *CD133* Primer wurden sowohl für den *forward* als auch für den *reverse* Primer 338µl TE Puffer verwendet

Um zu überprüfen ob die Primer das Ziel-Gen amplifizieren, wurde dann zunächst in Probeläufen analysiert ob eine Amplifikation stattfindet.

Dazu wurden folgende Ansätze durchgeführt:

- DNA:	5µl	[cDNA Gliompool (=Mischung aus Rest cDNA Proben verschiedenster Gliomsubtypen) 1:5 verdünnt mit H ₂ O]
oder H₂O:	5µl	[im Falle der Negativkontrollen]
- Mastermix:	15µl	[bestehend aus 10µl SYBR Green Supermix (IQSYBR Green Supermix, Biorad, #170-8885), 5µl Primer (F+R)]
- Total:	20µl	

Zur Durchführung der qPCR wurde der Rotorgene Q Cyclyer von Quiagen verwendet. Die Geräteparameter wurden dazu in folgender Weise eingestellt:

- Denaturierung bei 95°C für 3 min
- Anschließend 50 Zyklen bestehend aus
 - ➔ 95°C 10s (Denaturation)
 - ➔ 63°C 15s (Annealing)
 - ➔ 72°C 20s (Extension)
- Schmelzkurvenanalyse von 72°C bis 95°C und Anstieg um 1°C.

3.3.2 Messung der Standardkurven

Um die relative Genexpression bestimmen zu können ist die Messung von Standardkurven notwendig. Hierzu wurde die Expression der Zielgene in einem Gliompool (Grundverdünnung 1:5 mit H₂O) in den Verdünnungen 1, 1:10, 1:100, 1:1000 sowie 1:10000 gemessen. Die Versuche wurden dabei in Triplikaten durchgeführt.

Die PCR Proben wurden in folgender Weise angesetzt:

-	Mastermix	15µl
-	DNA	5µl
-	Total	20µl

Mastermix: 10µl IQ SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, USA) oder Quantitec SYBR Green (Quiagen, Hilden) + 5 µl *Primer* (F+R) (1µM)

DNA: 1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000

Die qPCR wurde vollständig mit dem Rotorgene Q Lightcycler bei folgenden Einstellungen des Gerätes durchgeführt:

- two-step
 - 95°C 3min
 - 60°C 5s
 - 60°C 10s
 - Schmelzkurvenanalyse von 60°C bis 90°C.
- } 50x

Mit diesen Einstellungen konnten für die Expressionsanalyse des *CD133* suffiziente Standardkurven gemessen werden, so dass diese Parameter für sämtliche weiteren Messungen beibehalten wurden.

Für die Expressionsanalyse der *IDH1 wt* und *mut* waren dagegen suffiziente Standardkurven nur im höheren Konzentrationsbereich zu erreichen, so dass mit einer DNA-Verdünnungsreihe von 1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100 gemessen wurde.

Die Verwendung des Quantitec SYBR Green (Quiagen, Hilden) führte zu einer Optimierung der Standardkurven, so dass dies auch im Weiteren als Mastermix verwendet wurde.

Als Qualitätskriterium für eine ausreichend gute Standardkurve galten dabei

- eine Efficiency=0,90 bis 1,10 sowie
- ein $R^2 > 0,99$.

Die so ermittelten Standardkurven waren:

- *IDH1 wt*: $CT = -3,414 \times \log(\text{conc.}) + 24,451$ (eff=0,96; $R^2=0,997$)
- *IDH1 mut*: $CT = -3,286 \times \log(\text{conc.}) + 26,209$ (eff=1,02; $R^2=0,997$)
- *CD133*: $CT = -3,105 \times \log(\text{conc.}) + 21,163$ (eff=1,12; $R^2=0,997$)

Die Standardkurven für das Referenzgen *SDHA* waren bereits im Rahmen anderer Versuche bestimmt worden.

3.4 Quantifizierung der *IDH1 mut* und *wt* sowie *CD133* Expression mittels qPCR

Nach Messung der Standardkurven wurde 1) die Quantifizierung der Genexpression der Zielgene (*IDH1 wt*, *IDH1 mut*, *CD133*) in den o.g. Proben durchgeführt und 2) in Bezug zur Expression des Referenzgens (*SDHA*) gesetzt.

3.4.1 Quantifizierung mittels qPCR

Die qPCR Proben wurden folgendermaßen (entsprechend der Messung der Standardkurven) angesetzt:

15µl Mastermix	(10µl Quantitec SYBR Green [Quiagen, Hilden]+ 5µl Primer (F+R))
5µl DNA	(für <i>IDH1 wt/mut</i> 1:50 verdünnt, für <i>CD133</i> 1:200)
20µl Total	

Der Ansatz erfolgte jeweils in Triplikaten, zwei Proben wurden als Negativkontrollen gemessen, bei denen 5µl H₂O die DNA ersetzte. Als Positivkontrolle wurde eine Probe verwendet, bei der ein positiver G395A *IDH1* Mutationsstatus bereits mittels Gensequenzierung bestimmt worden war.

Sämtliche Messungen wurden bei gleichen Bedingungen mit dem Rotorgene Q Lightcycler durchgeführt (siehe Einstellungen unter 2.2.3).

3.4.2 Bezug zur Expression des Referenzgens

Die relative Expression der Zielgene wurde in Bezug gesetzt zur Expression des Referenzgens nach der Methode

$$TG/RG = \Delta TG \quad (TG = \text{target gene}; RG = \text{reference gene}).$$

Hierzu wurde die Expression verschiedener potentieller Referenzgene (*ACTB*, *GAPDH*, *RPL13A*, *SDHA*, *POLR2A*, *TBP*) in den verwendeten Gliomproben gemessen.

Die entsprechenden Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Symbol	Genname	Funktion	Gen ID	Accession Nr	Ensembl ID	Amplikon Länge bp	Effizienz %
ACTB	Beta-actin	Cytoskeletal structural protein	60	NM_001101	ENST00000158302	146	102
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis enzyme	2597	NM_002046	ENST00000229239	95	104
RPL13A	60S ribosomal protein L13A	Ribosomal protein	23521	NM_012423	ENST00000270634	161	102
SDHA	Succinate dehydrogenase A	Oxidative phosphorylation	6389	NM_004168	ENST00000264932	147	101
POLR2A	Polypeptide A, 220 kDa	RNA polymerase II (DNA directed) polypeptide A	5430	NM_000937	ENST00000322644	61	106
TBP	TATA-box binding protein	Transcription factor	6908	NM_003194	ENST00000230354	132	88

Tabelle 1: Primer der Referenzgene

Hierbei zeigte sich eine homogene Expression aller Referenzgene in den untersuchten Gliomproben (siehe Abbildung 5).

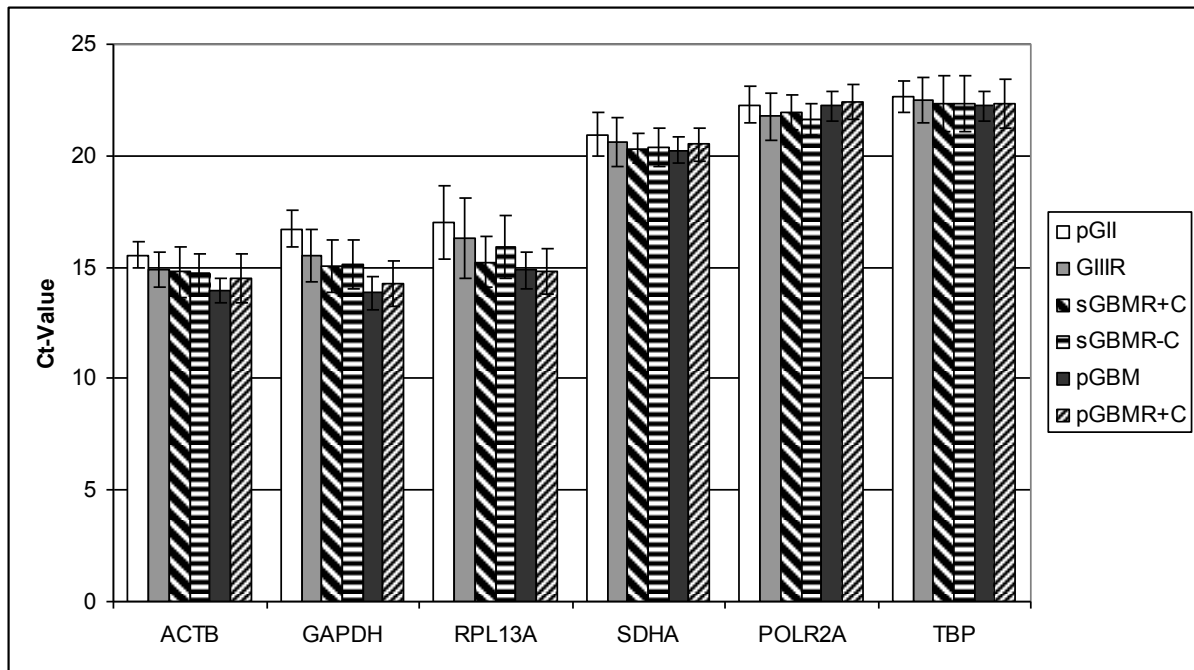


Abbildung 5: Darstellung der Ct Werte der Referenzgene (qPCR Analyse).

Sämtliche gemessenen Referenzgene sind stabil exprimiert in den unterschiedlichen Gliomgraden (pGII= Grad II Gliome, GIIIR=Grad III Gliome, sGBMR+C/-C= sekundäre GBM mit/ohne vorherige Chemotherapie, pGBM= primäre GBM, pGBM+C= primäre GBM mit vorheriger Chemotherapie).

Unter Anwendung eines Analyseprogramms („NormFinder“; <http://moma.dk/normfinder-software>), wurde das am besten geeignete Referenzgen ermittelt (Andersen et al., 2004). Aufgrund der hohen Expressionsstabilität des *SDHA* Gens sowie des hohen *Ct-threshold* des Gens, welcher im Bereich des mutierten *IDH1* Gens lag, wurde das *SDHA* Gen als Referenzgen ausgewählt (siehe Tabelle 2).

Gen Name	Stabilitäts-wert
ACTB	0,237
SDHA	0,263
TBP	0,324
GAPDH	0,428
POLR2A	0,439
RPL13A	0,461

Tabelle 2: Expressionsstabilität der untersuchten Referenzgene.

Analysiert mit der „NormFinder“ Software, welche nach einem vorgegebenen Algorithmus die Stabilität einer Genexpression in verschiedenen Geweben misst (Andersen et al., 2004).

Für *SDHA* konnte bereits in Vorarbeiten gezeigt werden, dass es in verschiedenen Gliomgraden und -subtypen weitestgehend gleichmäßig exprimiert ist und so einen Vergleich der Genexpression von Zielgenen zwischen diesen Gruppen ermöglicht (Kreth et al., 2010).

Aufgrund dieser Vorarbeiten und der Analyse der Referenzgene in den verwendeten Proben wurde die Normierung bezogen auf ein Referenzgen (*SDHA*) durchgeführt.

4. DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der Tumorproben wurde im Institut für Genetik der Universität Köln durchgeführt.

5. Statistik

Die Daten wurden in einer Excel-Datenbank (Microsoft, Redmond, USA) gespeichert. Zur Auswertung sowie Erstellung der Graphiken wurde Prism Graphpad Version 6 verwandt (Graphpad, San Diego, USA).

Die qPCR Ergebnisse wurden als „**relative Expression $\pm$ SEM**“ dargestellt.

Die **Normalverteilung** innerhalb der Gruppen wurde mittels **D'Agostino-Pearson Test** überprüft ($p > 0,05$). Je nachdem ob die Werte innerhalb einer Gruppe normalverteilt waren, wurden die weiteren statistischen Tests gewählt.

Bei Analyse mehrerer nicht-normalverteilter Gruppen wurde der **Kruskal-Wallis Test** durchgeführt mit anschließendem post hoc **Dunn's Test**. Bei dem Vergleich mehrerer normalverteilter Gruppen wurde ein **ANOVA Test** durchgeführt mit anschließendem post hoc **Bonferroni Test**. Einzelne Gruppen wurden bei Nicht-Normalverteilung mittels **Mann-Whitney-Test** und bei Normalverteilung mittels einfachem **t-Test** verglichen. Ein $p < 0,05$ wurde jeweils als statistisch signifikant gewertet. In den Abbildungen ist eine einfache Signifikanz (0,01-0,05) mit * dargestellt, höhere Signifikanzen mit ** (0,001-0,01), *** (0,0001-0,001) und **** ($< 0,0001$).

Zur Analyse der Korrelation der Genexpressionen (IDH1wt/mut, IDH1 mut/CD133) wurde der **Pearson Test** verwendet. Auch hierbei wurde eine signifikante Korrelation bei einem $p < 0,05$ angenommen. Bei der Subgruppenanalyse mit kleineren Gruppen wurde wegen der nicht vorliegenden Normalverteilung der **Spearman Test** verwendet.

III. Ergebnisse

1. Klinische Daten und Patientengruppen

Insgesamt wurden 132 DNA Proben von 104 Patienten analysiert. Diese 132 Proben setzen sich zusammen aus 21 Proben von Patienten mit Grad II Gliomen, 22 Proben von Patienten mit Grad III Gliomen und 52 Proben von Patienten mit Glioblastomen. Zusätzlich lagen 9 Proben von Patienten vor, bei denen peritumorales Gewebe (Kontrollgewebe) entnommen worden war (Übersicht siehe Tabelle 3).

Die Glioblastomproben ließen sich anhand des klinischen Verlaufes unterteilen in primäre GBM (n=30) und sekundäre GBM (n=22). Bei den sekundären GBM war außerdem eine nochmalige Unterteilung in bisher unbehandelte Patienten (n=13) und vorbehandelte Patienten (n=9) möglich.

Auch bei den Grad III Gliomen war eine Unterteilung der Proben in primäre Grad III Tumoren und rezidierte Grad III Tumoren basierend auf klinischen Daten möglich. Primäre Grad III Tumoren stellten dabei Tumoren dar, welche „de novo“ entstanden waren ohne vorherige Diagnosestellung eines niedrig-gradigeren Glioms. Die rezidierten Gliome waren dagegen aus Grad II Gliomen entstanden, die bereits vorbekannt waren (siehe Tabelle 5).

Insgesamt 31 Proben waren von individuellen Patienten entnommen worden, die im Verlauf ihrer Erkrankung erneut einer operativen Therapie bedurften (Individualverläufe). Dazu gehörten sämtliche Proben der primären GBM Patienten, bei denen im Rezidivfall erneut Tumorgewebe gewonnen werden konnte (pGBM-Rez; n=10), sowie weitere 21 Proben von 10 Patienten, die im Verlauf eines malignisierenden Glioms wiederholt operativ behandelt werden mussten.

Im Einzelnen waren dies (Individualverläufe):

- II° mit Progress zu III° (n=2),
- II° mit Progress zu III° und später sGBM (n=1),
- II° mit Progress zu sGBM (n=4),
- III° mit III° Rezidiv (n=1),
- III° mit Progress zu sGBM (n=2).

Die Alters- und Geschlechtsverteilung der eingeschlossenen Patienten ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Gruppe	Pat Nr	Ini- tia- lien	Alter	Ge- schlecht	Tumorage	histolog. Subtyp	Grad	IDH1 mut	Analyse	Individualverlauf
Grad II Gliome	1	AR	22	m	li. frontal	A	G 2	j (G394A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3)
	2	NH	29	m	li. frontal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3)
	3	CS	27	w	re. fr.-parasag.	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	4	JK	33	m	li. frontal	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, sGBM-Cx)
	5	AW	31	w	li. fr.-temp.	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	j (G2, sGBM-Cx)
	6	IS	41	w	li. frontal	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3)
	7	WV	48	w	re. temporal	OA	G 2	n	CD133, IDH1 mut	
	8	RZ	22	m	re. präzentral	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, sGBM-Cx)
	9	MF	39	w	re. fr.-präz.	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3, sGBM+Cx)
	10	FH	26	m	li. frontal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, sGBM-Cx)
	11	MC	34	w	li. temporal	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	12	SÜ	47	m	li. frontal	A	G 2	n	CD133, IDH1 mut	
	13	JH	53	m	re. occipital	A	G 2	j (G394G)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3, sGBM-Cx)
	14	KW	26	w	re. frontal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3, G3)
	15	DB	50	m	li. frontal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	16	MW	28	m	re. frontal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	17	HB	32	m	li. temporal	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	18	DM	38	w	re. temporal	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	19	AS	49	w	li. temporal	A	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	20	EH	63	w	re. fr.-lat.	A	G 2	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, sGBM-Cx)
	21	HB	34	m	li. präzentral	OA	G 2	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (G2, G3, sGBM+Cx)
primäre Grad III Gliome	22	BR	64	m	li. par.-occ.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	23	GJ	48	m	re. temp.-par.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	24	WK	44	m	re. fr.-temp.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	25	WL	31	m	re. frontal	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	26	TB	32	m	li. par.-temp.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	27	OK	73	m	li. frontal	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	28	RB	40	m	re. temp.-bas.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	29	HW	65	w	li. frontal	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	30	PT	15	w	re. Thalamus	A	G 3	n	CD133, IDH1 mut	
	31	KM	58	m	li. temporal	A	G 3	n	CD133, IDH1 mut	
Rezidiv Grad III Gliome	32	FS	53	m	re. parietal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	33	VP	52	m	li. frontal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	34	NP	54	m	li. fr.-präzent.	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	35	AF	59	m	re. parietal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	j (G3, sGBM+Cx)
	36	LL	41	m	re. temporal	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	37	CS	35	m	li. par.-occ.	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	38	AD	50	m	li. frontal	A	G 3	n	CD133, IDH1 mut	j (G3, sGBM+Cx)
	39	FM	45	m	re. frontal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	40	KB	55	m	li. fr.-par.	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	41	HS	47	m	li. frontal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	42	AM	43	m	re. temporal	OA	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	43	AK	33	m	li. parietal	A	G 3	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	

Gruppe	Pat Nr	Ini- tia- lien	Alter	Ge- schlecht	Tumorage	histolog. Subtyp	Grad	IDH1 mut	Analyse	Individualverlauf
Gruppe sekundäre GBM	44	RO	27	m	re. par.-occ.	GBM	G 4	j (C394A)	CD133, IDH1 wt &mut	
-Cx	45	FU	42	m	re. parietal	GBM	G 4	j (C394A)	CD133, IDH1 mut	
	46	JB	55	w	re. fr.-präzent.	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	47	PD	43	m	li. temporal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	48	SH	33	w	re. occipital	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	49	AZ	36	w	li. fr.-par.	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	50	HH	61	w	re. frontal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	51	DM	34	w	re. temp.-par.	GBM	G 4	j (C394A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	52	VS	49	w	re. frontal	GBM	G 4	j (C394A)	CD133, IDH1 mut	
	53	HD	27	m	li. parietal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	54	MF	38	m	li. temp.-par.	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	55	MP	41	w	li. fr.-präzent.	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	56	MN	63	w	re. par.-occ.	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 mut	
sekundäre GBM	57	HE	47	m	re. parietal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
+Cx	58	SS	7	m	li. KHBW	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	59	NT	49	m	re. temporal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	60	HB	43	m	li. temporal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	61	SF	45	m	re. frontal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
	62	DS	49	m	re. frontal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	63	SC	33	w	re. frontal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	64	TJ	34	m	li. frontal	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 wt &mut	
	65	CT	35	m	li. temp.-pol.	GBM	G 4	j (G395A)	CD133, IDH1 mut	
primäre GBM	66	AR	53	m	re. frontal	GBM	G 4	j (C394A)	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
-Cx	67	PM	34	w	re. par.-occ.	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	68	IS	60	w	re. postzentral	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	69	HD	46	w	re. temporal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	70	HS	69	m	li. temporal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	71	FH	36	m	li. frontal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	72	HZ	56	m	re. frontal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	73	HW	60	m	li. parietal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	74	WP	48	m	re. fr.-temp.	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	75	KN	51	m	re. frontal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	j (pGBM, pGBM Rez)
	76	HD	68	w	li. par.-occ.	GBM	G 4	nd	CD133	
	77	HH	53	m	re. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	78	AB	70	m	li. occipital	GBM	G 4	nd	CD133	
	79	KA	48	w	li. postzentral	GBM	G 4	nd	CD133	
	80	WO	52	w	li. fr.-präzent.	GBM	G 4	nd	CD133	
	81	HH	69	m	li. par.-occ.	GBM	G 4	nd	CD133	
	82	ME	40	m	re. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	83	KF	48	m	re. temp.-par.	GBM	G 4	nd	CD133	
	84	US	63	w	re. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	85	WD	57	w	re. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	

Gruppe	Pat Nr	Ini-tia-lien	Alter	Ge-schlecht	Tumorkategorie	histolog. Subtyp	Grad	IDH1 mut	Analyse	Individualverlauf
Gruppe primäre GBM +Cx	86	KH	50	m	li. temp.-dors.	GBM	G 4	nd	CD133	
	87	AS	68	w	re. frontal	GBM	G 4	nd	CD133	
	88	GK	65	m	li. temp.-mes.	GBM	G 4	nd	CD133	
	89	AP	59	m	li. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	90	HR	62	m	li. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	91	BH	72	m	li. par.-occ.	GBM	G 4	nd	CD133	
	92	TH	61	w	re. frontal	GBM	G 4	nd	CD133	
	93	AH	56	w	li. temporal	GBM	G 4	nd	CD133	
	94	RR	54	w	re. frontal	GBM	G 4	nd	CD133	
	95	OB	51	m	li. Frontal	GBM	G 4	nd	CD133	
Kontrollen	96	MW	39	m	li. fr.-temp.	Gliose Hamar-tom	-	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	97	KH	26	m	Hirnstamm	GBM	G 1	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	98	HB	66	m	li. occipital	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	99	FS	52	m	re. temporal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	100	NO	35	m	li. temp.-bas.	A	G 2	n	CD133, IDH1 wt &mut	
						Metasta-se Bronchial				
	101	HB	70	m	re. par.-occ.	CA	-	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	102	WO	66	w	li. temporal	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	103	RR	40	m	li. occipital	GBM	G 4	n	CD133, IDH1 wt &mut	
	104	JS	43	m	li. temporal	O	G 2	j (C394G)	CD133, IDH1 wt &mut	

Tabelle 3: Übersicht über die eingeschlossenen Patienten. Angaben sind grundlegende epidemiologische Daten (Alter, Geschlecht und Initialien) sowie Angaben zur Histologie (Tumorkategorie, histologischer Subtyp, IDH1 mut Status), Außerdem angegeben ist, welche Gene analysiert wurden und ob bei den Patienten longitudinale Verläufe untersucht wurden („Individualverläufe“). (OA= Oligoastrozytom, A= Astrozytom, O = Oligodendrogliom, GBM= Glioblastom, nd= nicht bestimmt).

Sämtliche Proben von Patienten mit Grad II und Grad III Gliomen (primäre und rezidierte) waren als „therapie-naiv“ hinsichtlich einer gentoxischen Behandlung anzusehen, d.h. die Patienten hatten bis zur Probenentnahmen keine chemotherapeutische Therapie erhalten. Gleiches galt auch für die sekundären und primären Glioblastome ohne Vorbehandlung (pGBM-Cx, sGBM+Cx). Sämtliche chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten waren dagegen den Subgruppen pGBM+Cx und sGBM+Cx zuzuordnen. Die dabei verabreichte Chemotherapie ist Tabelle 4 zu entnehmen.

		TMZ	TMZ	PCV+TMZ	PCV+TMZ	ACNU	ACNU	sonstige	sonstige
Subgruppe	n	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
pGBM+Cx	18	12	66,7	2	11,1	1	1,5	3	27,0
sGBM+Cx	13	7	53,8	1	7,7	1	1,9	4	52,0

Tabelle 4: Übersicht über die verabreichten Chemotherapeutika bei Patienten mit primären und sekundären GBM. Die Mehrzahl der Patienten beider Gruppen wurde mit TMZ therapiert.

		Patienten	Proben
N	total	104	132
	m	70	
	w	34	
Alter	(mittleres)	46	
Lokalisation	links	54	
	rechts	50	
	frontal	43	
	temporal	32	
	parietal	20	
	occipital	5	
	other	4	
Histol. Subtyp	astrozytär	24	
	oligoastrozytär	15	
WHO Grad	II	21	21
	III	22	30
	>primär	10	10
	>Rezidiv	12	20
	sGBM	22	32
	-Cx	13	19
	+Cx	9	13
	pGBM	30	30
	-Cx	20	20
	+Cx	10	10
Kontrollen		9	9

Tabelle 5: Alters- und Geschlechtsverteilung sowie Tumorklokalisation (m=männlich, w=weiblich; sGBM=sekundäres Glioblastom, pGBM= primäres Glioblastom; -Cx/+Cx= mit/ohne Chemotherapie).

2. *IDH1*

Die Messungen der Expression des *IDH1* Gens bestand aus mehreren Schritten. Zunächst wurden die qPCR Messungen selbst durchgeführt und anschließend die Ergebnisse der *IDH1* mut Analyse mittels Sequenzierung überprüft.

2.1 Expression von *IDH1* mut

Die Analyse der *IDH1* mut Expression wurde in insgesamt 113 Proben durchgeführt (n=113). Dabei wurde zunächst mit dem mutations-spezifischen *IDH1* Primer qPCR die Expression der (G395A) *IDH1* Mutation gemessen. Die durchschnittliche Genexpression sämtlicher Proben lag bei einer relativen Expression von $1,93 \pm 0,42$ (rel.Expr. $\pm$ SEM). Nach Identifikation und Entfernung von Ausreißerwerten ($>3 \times$ SD) wurden letztlich noch 107 Patientenproben ausgewertet (n=107).

Hierbei zeigte sich in der Kontrollgruppe ($0,09 \pm 0,03$) und bei Patienten mit primären Glioblastomen ($0,23 \pm 0,03$) im Vergleich zu den Proben von Patienten mit niedriggradigen Gliomen und sekundären Glioblastomen eine sehr niedrige *IDH1 mut* Expression. Zwischen den einzelnen Gliomsubgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der *IDH1 mut* Expression, wobei die *IDH1 mut* Expression geringgradig höher ausfiel bei sekundären Glioblastomen als bei den Grad II und III Gliomen ($\text{II}^\circ = 1,19 \pm 0,2$; prim $\text{III}^\circ = 1,38 \pm 0,42$; Rez $\text{III}^\circ = 1,41 \pm 0,24$; sGBM $= 2,25 \pm 0,5$) (siehe Tabelle 6 und Abbildung 6).

	n	<i>IDH1 mut</i>	SEM
Kontrollen	9	0,09	0,03
II°	18	1,19	0,00
III°	29		
- primär	9	1,38	0,42
- Rezidiv	20	1,41	0,24
sGBM	31		
-Cx	19	2,25	0,49
+Cx	12	1,66	0,44
pGBM	20		
-Cx	10	0,23	0,03
+Cx	10	0,21	0,05
Total	107		

Tabelle 6: Übersicht über die Expression der *IDH1* Mutation in verschiedenen Gliomgraden und nach erfolgter Therapie.

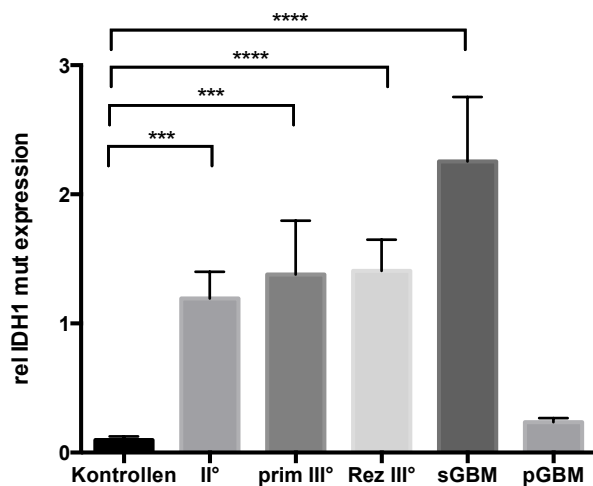


Abbildung 6: *IDH1 mut* Expression nach Gliomgrad. *IDH1 mut* ist signifikant höher exprimiert in LGG und sekundären HGG als in Kontrollgewebe und primären GBM.

2.1.1 Sequenzierungsergebnisse

Da zur Zeit am ehesten die Sequenzierung als „Goldstandard“ der Analyse des *IDH1* Mutationsstatus gelten darf, wurden die qPCR Ergebnisse in Korrelation zu den Ergebnis-

sen der Sequenzierung gesetzt. Die Sequenzierung wurde bei sämtlichen 113 Proben durchgeführt, in denen auch die *IDH1* Expression mittels qPCR gemessen worden waren. Eine Mutation des *IDH1* Gens wurde dabei in 62,8% der Proben gefunden (71/113). Die häufigste Punktmutation war dabei die G395A Mutation (61/71; 85,9%), während andere Punktmutationsformen nur einen geringen Anteil hatten (10/71; 14,1%) (siehe Tabelle 7). Im Einzelnen wurde bei zwei Proben eine C394T Mutation und bei je vier Proben eine C394A und eine C394G Mutation gefunden.

	Patienten	Proben
n	84	113
<i>IDH1 mut</i>	55	71
<i>IDH1 mut</i> (%)	65,5	62,8
G395A	48	61
G395A (%)	87,3	85,9
394 mut	7	10
394 mut (%)	12,7	14,1
C394T	1	2
C394A	4	4
C394G	2	4

Tabelle 7: Anteil der *IDH1 mut* Proben an der Gesamtheit der Proben und Patienten-bezogen (Sequenzierung).

Da die G395A Mutation mit Abstand die häufigste *IDH1* Mutation darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Primer gewählt, welcher spezifisch diese Punktmutation amplifiziert. Die G395A Mutation wurde zu hohen Anteilen in diffusen Gliomen (18/21; 86%), anaplastischen Gliomen (19/22; 86%) und sekundären Glioblastomen (17/22; 77%) gefunden (siehe Tabelle 7). In den Proben der Patienten mit primären Glioblastomen fand sich dagegen keine G395A Mutation des *IDH1* Gens, jedoch bei einem Patienten eine C394A Mutation (siehe Abbildung 7 und Tabelle 8).

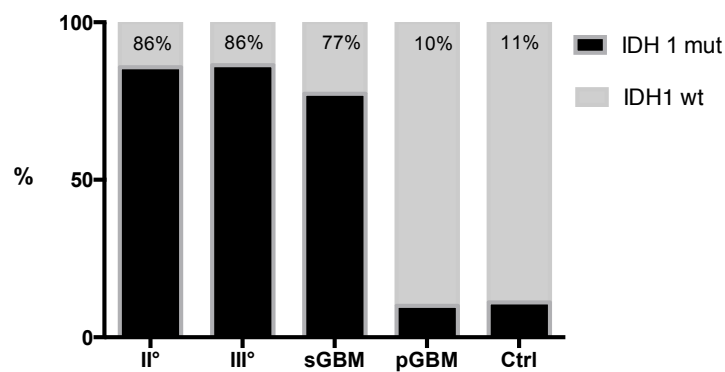


Abbildung 7: Anteil der *IDH1 mut* in Grad II bis Grad IV Gliomen (Sequenzierung). Ein hoher Anteil der Grad II und III Gliome sowie sGBM weist eine *IDH1* Mutation auf. Bei der *IDH1 mut* Probe bei den Kontrollen handelte es sich um eine „peritumorale Probe“ eines *IDH1 mut* Glioms.

	n	IDH1 mut	IDH1 mut(%)	G395A	G395A(%)	
II°	21	18	85,7	16	88,9	
III°	22	19	86,4	19	100	
	prim III°	(10)	8	80	8	100
	Rez III°	(12)	11	91,7	11	100
sGBM	22	17	77,3	13	76,5	
	sGBM-Cx	(13)	12	85,7	8	66,7
	sGBM+Cx	(9)	5	62,5	5	100
pGBM	10	1	10	0	0	
Ctrl	9	1	11,1	0	0	

Tabelle 8: Anteil der *IDH1 mut* (insgesamt) und speziell der G395A Mutation in den Patientensubgruppen (Sequenzierung) (Gesamtes n=84).

2.1.2 Analyse des *IDH1* Mutationsstatus mittels qPCR

Eines der primären Ziele dieser Arbeit, war es zu überprüfen, ob eine Messung der *IDH1 mut* Expression mittels qPCR zuverlässig eine Bestimmung des *IDH1 mut* Status ermöglicht. Die Ergebnisse der qPCR Analyse wurden daher in Korrelation zu den Sequenzierungsergebnissen gebracht (siehe Tabelle 9).

Hierbei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der qPCR Ergebnisse mit den Sequenzierungsergebnissen. So waren bei einer *IDH1 mut* Expression von >0,59, mit einer Ausnahme, alle Proben in der DNA Sequenzierung *IDH1* mutiert.

Bei dieser Probe handelt es sich um einen Patienten, von dem Proben eines initial niedrig-gradigen Glioms sowie von späteren Grad III Tumoren vorlagen. Die DNA Sequenzierung ergab bei diesen Proben einen Wechsel des *IDH1 mut* Status vom ersten Tumor (II°, *IDH1 mut*) zum Rezidivtumor (III°, *IDH1 wt*) und erneut zum weiteren Tumorrezidiv

(III°, *IDH1 mut*). Die Analyse der *IDH1 mut* Expression mittels qPCR zeigte dagegen für beide Tumorrezidive Werte von >0,59 relativer *IDH1 mut* Expression (1. Rezidiv (III°)= 0,95; 2.Rezidiv (III°)=1,41) (siehe Tabelle 9, rote Markierung). Da bei sämtlichen übrigen Individualverläufen der *IDH1 mut* Status konsistent blieb und auch die Literatur eine Konstanz des *IDH1* Mutationsstatus beschreibt, schien hier ein Fehler in der DNA Sequenzierung vorzuliegen (Juratli et al., 2013).

Nach Entfernen dieses am ehesten fehlerhaften Wertes wurde bei einer relativen *IDH1 mut* Expression >0,59 eine Sensitivität und Spezifität von 100% erreicht (siehe Tabelle 9, Werte in blauer Schrift).

Gleiches galt für eine *IDH1 mut* Expression von <0,26, unterhalb derer mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% der *IDH1* Wildtyp vorlag (siehe Tabelle 9, Werte in grüner Schrift).

Bei den übrigen Werten zwischen diesen beiden „Grenzwerten“ fiel auf, dass ab einer relativen *IDH1 mut* Expression von >0,5 die meisten Proben durch die Sequenzierung als *IDH1 mut* identifiziert wurden und bei Werten ≤0,5 mit hoher Wahrscheinlichkeit keine G395A Mutation vorlag (rel. Expression= 0,5-0,26; 19 Werte; 2 Proben G395A Mutation).

Aufgrund dessen konnte eine relative *IDH1 mut* Expression von ≥0,51 als „cut-off-value“ definiert werden, wobei Werte oberhalb dieses Wertes mit hoher Wahrscheinlichkeit eine G395A Mutation aufweisen (siehe Tabelle 9).

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte mittels qPCR eine *IDH1* Mutation in 60 Proben ermittelt werden (60/113; 53%). Bei den diffusen Gliomen waren dies 70% der Proben, bei anaplastischen Gliomen 83% und bei sekundären Glioblastomen 58% der Proben. Auch die Ergebnisse der qPCR ergaben keine G395A *IDH1* Mutation bei primären Glioblastomen.

Unter Verwendung dieses „cut-off“-Wertes (rel. Expr.≥0,51) erreichte die qPCR im Vergleich mit der DNA Sequenzierung als „Goldstandard“ eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 96% in der Diagnosestellung von G395A *IDH1* Mutationen (siehe Tabelle 10).

Tumorgrad	seq	qPCR	grade	seq	qPCR	grade	seq	qPCR
II°	G/A	39,46	Rez III°	G/A	1,41	pGBM+Cx	G/G	0,31
prim III°	G/A	23,22	Rez III°	G/A	1,22	ctrl	G/G	0,30
sGBM-Cx	G/A	11,11	Rez III°	G/A	1,19	sGBM-Cx	G/G	0,26
II°	G/A	7,01	II°	G/A	1,18	sGBM+Cx	G/A	0,26
sGBM-Cx	G/A	6,79	II°	G/A	1,13	pGBM+Cx	G/G	0,25
II°	G/A	6,27	sGBM+Cx	G/A	1,11	sGBM+Cx	G/G	0,25
sGBM-Cx	G/A	6,08	II°	G/A	1,06	pGBM-Cx	G/G	0,24
sGBM-Cx	G/A	4,51	prim III°	G/A	1,06	sGBM-Cx	G/G	0,22
sGBM+Cx	G/A	4,43	sGBM-Cx	G/A	0,97	sGBM+Cx	G/G	0,22
sGBM-Cx	G/A	4,37	Rez III°	G/G	0,95	pGBM-Cx	G/G	0,21
sGBM-Cx	G/A	4,26	Rez III°	G/A	0,90	pGBM-Cx	G/G	0,21
Rez III°	G/A	4,25	sGBM+Cx	G/A	0,90	pGBM-Cx	G/G	0,21
prim III°	G/A	4,19	II°	G/A	0,88	pGBM-Cx	G/G	0,19
sGBM-Cx	G/A	3,72	prim III°	G/A	0,83	pGBM+Cx	G/G	0,18
sGBM+Cx	G/A	3,50	prim III°	G/A	0,75	Rez III°	G/G	0,18
sGBM+Cx	G/A	3,38	Rez III°	G/A	0,73	pGBM+Cx	G/G	0,18
sGBM-Cx	G/A	3,25	Rez III°	G/A	0,73	pGBM+Cx	G/G	0,17
Rez III°	G/A	3,13	rec III°	G/A	0,72	II°	G/G	0,17
Rez III°	G/A	2,98	ctrl	G/A	0,64	pGBM+Cx	G/G	0,16
II°	G/A	2,90	Rez III°	G/A	0,62	ctrl	G/G	0,13
II°	G/A	2,87	pGBM+Cx	G/G	0,59	pGBM-Cx	G/G	0,12
sGBM-Cx	G/A	2,86	prim III°	G/A	0,51	sGBM-Cx	G/G	0,12
sGBM+Cx	G/A	2,67	II°	G/A	0,51	ctrl	G/G	0,12
sGBM+Cx	G/A	2,51	II°	G/A	0,50	pGBM+Cx	G/G	0,11
prim III°	G/A	2,29	sGBM-Cx	G/G	0,50	Rez III°	G/G	0,11
II°	G/A	2,16	II°	G/G	0,48	sGBM-Cx	G/G	0,10
Rez III°	G/A	2,08	sGBM-Cx	G/G	0,44	pGBM-Cx	G/G	0,08
Rez III°	G/A	1,98	prim III°	G/G	0,44	pGBM+Cx	G/G	0,08
prim III°	G/A	1,94	pGBM-Cx	G/G	0,42	ctrl	G/G	0,08
sGBM-Cx	G/A	1,93	II°	G/G	0,40	ctrl	G/G	0,07
Rez III°	G/A	1,92	prim III°	G/G	0,40	ctrl	G/G	0,07
II°	G/A	1,86	sGBM-Cx	G/G	0,38	II°	G/G	0,07
II°	G/A	1,72	sGBM+Cx	G/G	0,38	Rez III°	G/G	0,06
sGBM-Cx	G/A	1,72	II°	G/G	0,36	ctrl	G/G	0,05
II°	G/A	1,66	pGBM-Cx	G/G	0,36	pGBM+Cx	G/G	0,03
II°	G/A	1,59	sGBM-Cx	G/G	0,34	ctrl	G/G	0,03
Rez III°	G/A	1,54	sGBM+Cx	G/G	0,33	ctrl	G/G	0,02
Rez III°	G/A	1,42	pGBM-Cx	G/G	0,31			

Tabelle 9: IDH1 mut Expression in den einzelnen Proben (sortiert nach Höhe der Expression). Die erste Spalte gibt die Subgruppe an, die zweite Spalte das Sequenzierungsergebnis und in der dritten Spalte die relative IDH1 mut Expression. Blaue Schrift: Proben >0,59 rel. IDH1 mut Expression (Diagnose IDH1 mut mit Spezifität und Sensitivität 100%); grüne Schrift: Proben <0,26 rel. IDH1 mut Expression (Diagnose IDH1 wt mit Spezifität und Sensitivität 100%); rote Schrift: „Fehler“. Schwarze Linie markiert „cut-off-value“ (rel. Expr. $\geq$ 0,51). Rote Markierung: Probe mit a.e. fehlerhaftem Sequenzierungsergebnis (siehe Text).

	sequenc +	sequenc -	total
qPCr +	59	2	61
qPCr -	2	50	52
total	61	52	113
qPCR Sensitivität (%)	96,7		
qPCR Spezifität (%)	96,2		

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität der qPCR. Mit dem zuvor definierten „Cut-off-Wert“ (rel.Expr. $\geq$ 0,51) weist die qPCR eine hohe Sensitivität und Spezifität auf.

Bei einem weiteren Individualverlauf lagen insgesamt zwei Proben vor. Eine dieser Proben war aus peritumoralem Gewebe und war mittels HE Schnitten als tumorfrei klassifiziert worden. Die andere Probe war dagegen histologisch als sicheres Tumorgewebe (>80% der Zellen tumorös) eines Glioblastoms gewertet worden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HE Färbung ergab sowohl die Sequenzierung als auch die qPCR (rel Expr.= 0,64) bei beiden Proben den Nachweis einer G395A *IDH1* Mutation, so dass davon auszugehen ist, dass in der als „tumorfrei“ gewerteten Probe Tumorzellen vorhanden waren (siehe Abbildung 8). Die qPCR hat in diesem Fall auch bei niedriger Tumorzellanzahl die *IDH1* Mutation detektiert.

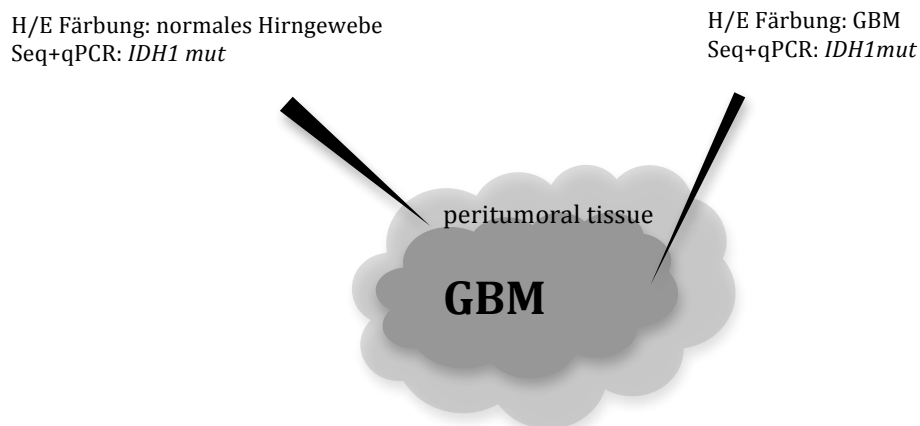


Abbildung 8: *IDH1 mut* Expression in peritumoralen Gewebe (qPCR & DNA Sequenzierung). Schematische Darstellung eines GBM mit peritumoralen Gewebe, welches mittels H/E Färbung als tumorfrei klassifiziert wurde. Sequenzierung und qPCR detektieren hier jedoch eine geringe Tumoralast anhand des *IDH1 mut* Nachweises.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die qPCR eine sehr sensitive und spezifische Methode zur Detektion der G395A *IDH1* Mutation darstellt. Die molekulare Diagnostik mittels Sequenzierung und qPCR ermöglicht hier scheinbar eine bessere Identifikation der Anwesenheit von Tumorzellen als die konventionelle HE Färbung.

2.1.3 Quantifizierung der *IDH1 mut* Expression

Neben der reinen qualitativen Analyse liegt ein potentieller Vorteil der qPCR in einer Quantifizierung der Genexpression, welche mit anderen etablierten Methoden zur Bestimmung der *IDH1* Mutation nicht (Sequenzierung) oder nur begrenzt (IHC) möglich ist. Aus diesem Grunde wurden die Ergebnisse der Patienten mit einer *IDH1* Mutation hinsichtlich des Expressionslevels von *IDH1 mut* analysiert.

Verwertbare Ergebnisse lagen bei 56 Proben (n=56) vor, bei denen die G395A *IDH1* Mutation nachgewiesen worden war. Die mittlere *IDH1 mut* Expression dieser Proben lag bei $2,29 \pm 0,25$ (rel.Expr. $\pm$ SEM).

Im Weiteren wurde untersucht inwiefern sich die Expression von *IDH1 mut* in Abhängigkeit von Faktoren wie 1) Tumorgrad, 2) histologischem Subtyp sowie 3) vorheriger Therapie unterscheidet.

2.1.3.1 *IDH1 mut* Expression in Abhängigkeit des Tumorgrades

Dem Tumorgrad entsprechend konnten diese 56 Proben insgesamt 3 Gruppen zugeordnet werden. Darunter waren 13 Grad II Tumore, 23 Grad III Tumore sowie 20 sekundäre Glioblastome (sGBM-Cx n=12; sGBM+Cx n=8).

In der Analyse der *IDH1 mut* Expression in Abhängigkeit des Tumorgrades zeigte sich bei diesen Gruppen ein Anstieg der *IDH1 mut* Expression von den niedrig-gradigeren Tumoren zu den sekundären Glioblastomen. Insbesondere die sekundären Glioblastome (sGBM-Cx: rel. Expr.= $4,29 \pm 0,79$) wiesen dabei eine signifikant höhere *IDH1 mut* Expression auf als die diffusen (rel. Expr.= $1,54 \pm 0,22$; $p=0,0002$) und anaplastischen Astrozytome (rel. Expr.= $1,67 \pm 0,23$; $p=0,0001$) (siehe Abbildung 9 und Tabelle 11).

Unter den WHO Grad III Tumoren befanden sich 6 primäre Tumoren, die „de novo“ diagnostiziert worden waren, und 17 Tumoren, welche aus einem niedrig-gradigeren Tumovorläufer entstanden waren. Zwischen diesen Subgruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der *IDH1 mut* Expression (primäre III°: $1,65 \pm 0,49$ vs. Rezidiv (sekundäre) III°= $1,68 \pm 0,26$; $p=0,8$) (siehe Abbildung 10 und Tabelle 11).

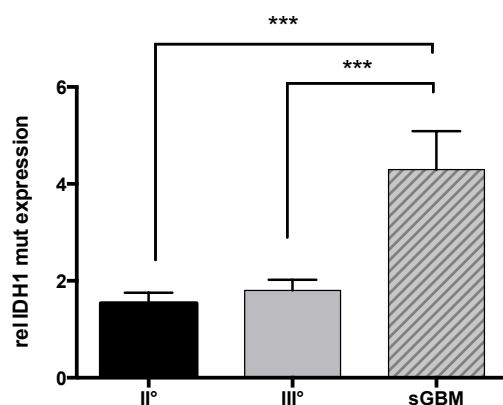


Abbildung 9: Quantifizierung der *IDH1 mut* Expression nach Gliomgrad (*IDH1 mut* Proben). Die *IDH1 mut* Expression ist signifikant höher in sGBM als in WHO Grad II und III Tumoren (II° n= 13, III° n= 23, sGBM n= 20).

	n	<i>IDH1</i> <i>mut</i>	SEM
II°	13	1,54	0,22
III°	23	1,67	0,23
primär	(6)	1,65	0,49
sekundär	(17)	1,68	0,26
sGBM	20	3,52	0,55
-Cx	(12)	4,29	0,79
+Cx	(8)	2,34	0,51
Total	56	2,29	0,25

Tabelle 11: Übersicht über die *IDH1 mut* Expression in Abhängigkeit von Tumorgrad und vorheriger Chemotherapie.

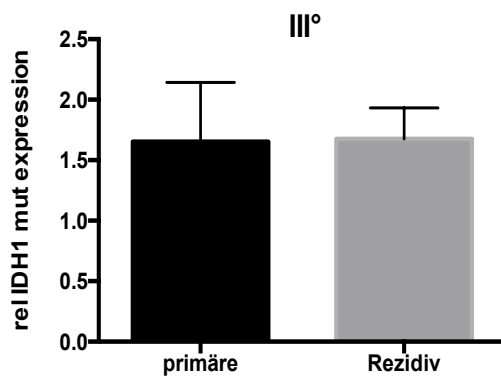


Abbildung 10: *IDH1 mut* Expression in primären und Rezidiv-Grad III Gliomen. Es zeigt sich kein Unterschied in der *IDH1 mut* Expression zwischen primären Grad III Gliomen (n=6) und Rezidiv Grad III Gliomen (n=17).

2.1.3.2 *IDH1 mut* Expression in Abhängigkeit von dem histologischen Subtyp

Da histologische Subtypen der Gliome durchaus variable klinische Verläufe zeigen, wurde untersucht ob astrozytäre oder oligoastrozytäre Tumoren eine unterschiedliche Expression der *IDH1* Mutation aufweisen. Insgesamt 18 Proben waren dabei den reinen Astrozytomen zuzuordnen, während 15 Proben oligoastrozytäre „Mischgliome“ waren.

Der Vergleich der Expression der *IDH1* Mutation zwischen diesen histologischen Subgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied (OA: $1,6 \pm 0,27$ vs. A: $1,87 \pm 0,38$; $p=0,8$). Dies deutet daraufhin, dass der Grad der *IDH1 mut* Expression unabhängig von dem histologischen Subtyp ist (siehe Abbildung 11).

2.1.3.3 Einfluss von Chemotherapie auf die *IDH1 mut* Expression

Um zu analysieren ob eine vorherige chemotherapeutische Behandlung die Expression von *IDH1 mut* beeinflusst, wurde eine Gruppe von bisher therapie-naiven sekundären Glioblastomen (sGBM-Cx) mit *IDH1* Mutation mit einer weiteren Gruppe von sekundä-

ren Glioblastomen verglichen, welche bereits eine chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten (sGBM+Cx).

Die dabei ermittelte *IDH1 mut* Expression war zwar in der Gruppe der untherapierten sekundären Glioblastome (sGBM-Cx: rel. Expr.=4,29±0,79; n=12) höher als in der Gruppe der chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten (sGBM+Cx: rel. Expr.=2,34±0,51; n=8), dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 12 und Tabelle 11).

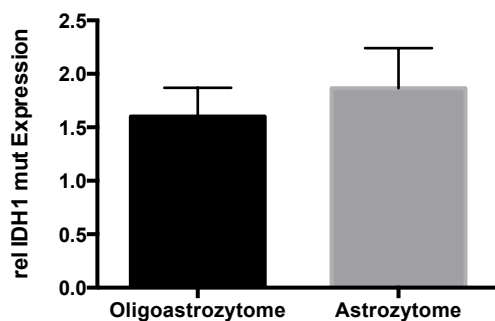


Abbildung 11: *IDH1 mut* Expression in Abhängigkeit des histologischen Subtyps. Im Vergleich der histologischen Subtypen ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der *IDH1 mut* Expression (OA n=15, A n=18).

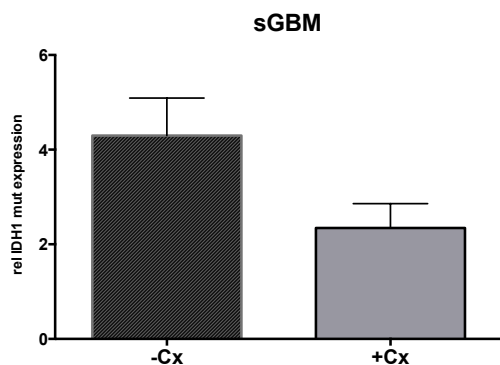


Abbildung 12: *IDH1 mut* Expression in sGBM in Abhängigkeit von vorheriger Chemotherapie. Die *IDH1 mut* Expression ist tendenziell niedriger bei chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten (-Cx n=12; +Cx n=8).

Die Aufschlüsselung der verabreichten Chemotherapeutika ist Tabelle 4 zu entnehmen, eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Anzahl der einzelnen Gruppen (Temodal, PCV+Temodal, ACNU) nicht möglich.

2.1.3.4 *IDH1 mut* Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe)

Das Vorliegen von mehreren Tumorproben von Patienten über unterschiedliche Zeitpunkte des Krankheitsverlaufes machte es möglich die *IDH1 mut* Expression im individuellen Krankheitsverlauf zu untersuchen.

Dazu wurden 21 Proben von insgesamt zehn Patienten untersucht. Unter diesen Proben befanden sich je sieben Proben des Tumorgrades II° und III° sowie sieben sekundäre Glioblastom-Proben (sGBM-Cx), von denen wiederum drei Patienten eine vorherige chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten (sGBM+Cx) (siehe Tabelle 12).

Pat-Init.	Alter	Geschlecht	Tumorage	Histo	Subtyp	1.OP	adjuvante Cx	2.OP	Histo	adjuvante Cx	3.OP	Histo
NH	29	m	li frontal	II°	OA	10/1991	-	11/1995	III°	n	n	n
JK	33	m	li frontal	II°	A	02/1992	-	05/1996	sGBM (-Cx)	n	n	n
AW	31	w	li fr.-temp.	II°	A	02/1992	-	09/1997	sGBM (-Cx)	n	n	n
IS	41	w	li frontal	II°	A	01/1993	-	09/2004	III°	n	n	n
RZ	22	m	re frontal	II°	A	05/1993	-	07/1997	sGBM (-Cx)	n	n	n
MF	39	w	re frontal	II°	A	01/1994	-	10/1997	III°	ACNU	12/1998	sGBM (+Cx)
FH	26	m	li frontal	II°	OA	02/1994	-	08/1999	sGBM (-Cx)	n	n	n
HB	34	m	li frontal	II°	OA	05/1995	-	06/2001	III°	Sonstige	06/2002	sGBM (+Cx)
AF	59	m	re parietal	III°	OA	08/1993	Sonstige	10/1994	sGBM (+Cx)	n	n	n
KW	26	w	re frontal	II°	OA	11/1994	-	06/1998	III°	Cx	04/1999	III°

Tabelle 12: Übersicht über die klinischen und epidemiologischen Daten der Individualverläufe (A=Astrozytom; OA= Oligoastrozytom; n=nicht zutreffend).

In der Analyse der *IDH1 mut* Expression dieser Proben zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Gruppenanalyse (siehe 2.1.3.1) mit einem Anstieg der *IDH1 mut* Expression mit dem Tumorgrad (II°: rel. Expr.=1,15±0,23; III°: rel. Expr.=1,81±0,36; sGBM: rel. Expr.=3,35±0,46; sGBM vs. II° p=0,014; II° vs. III° ns; III° vs. sGBM ns) (siehe Abbildung 13).

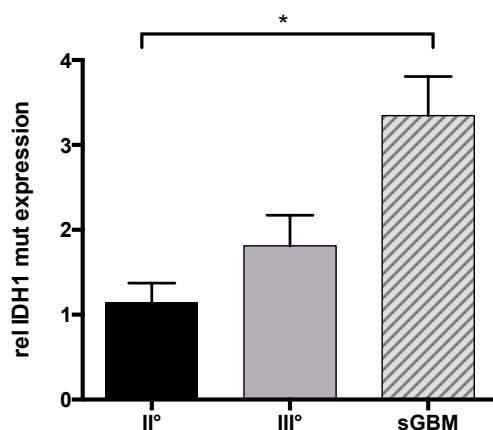


Abbildung 13: *IDH1 mut* Expression in Patienten mit progressiven Gliomen. Die *IDH1 mut* Expression steigt mit dem Tumorgrad der Gliome hin zu den sekundären GBM (gepoolte Analyse, Gesamt n=21; je Gruppe n=7).

Bei der Analyse der individuellen Verläufe zeigte sich ebenfalls bei der Mehrheit der Patienten (8/10; 80%) ein Anstieg der *IDH1 mut* Expression im Krankheitsverlauf (siehe Abbildungen 14 a-c).

Ausnahmen stellten hierbei zwei Patienten (2/10; 20%) dar, die vor der Operation ihres sekundären Glioblastoms bereits eine chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten (siehe Abbildung 14 d).

In Anbetracht der Ergebnisse der Analyse des Einflusses einer vorherigen chemotherapeutischen Behandlung auf die *IDH1 mut* Expression (siehe 2.1.3.3) könnte die vorherige Chemotherapie bei diesen beiden Patienten der Faktor sein, der für den unterschiedlichen Verlauf der *IDH1 mut* Expression verantwortlich ist.

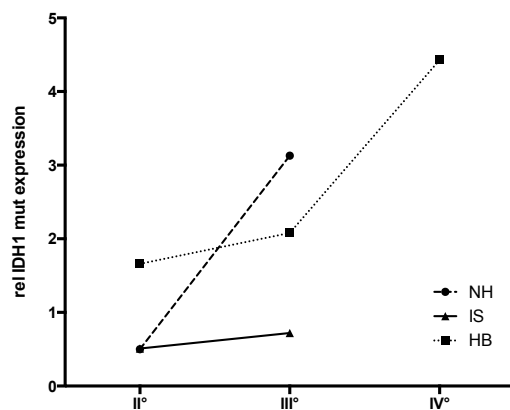


Abbildung 14a

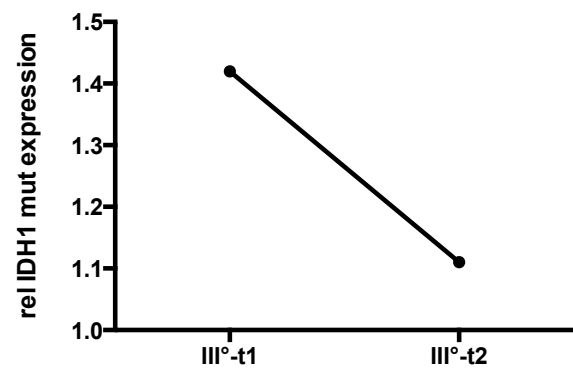


Abbildung 14b

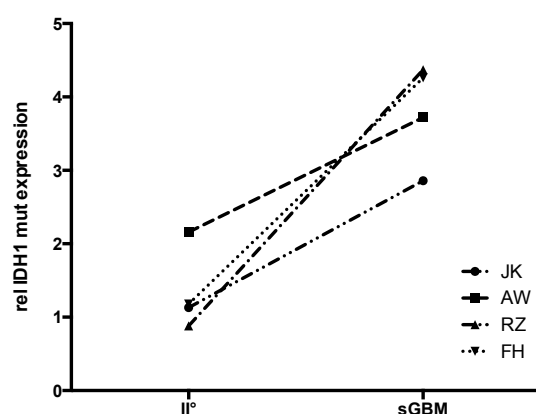


Abbildung 14c

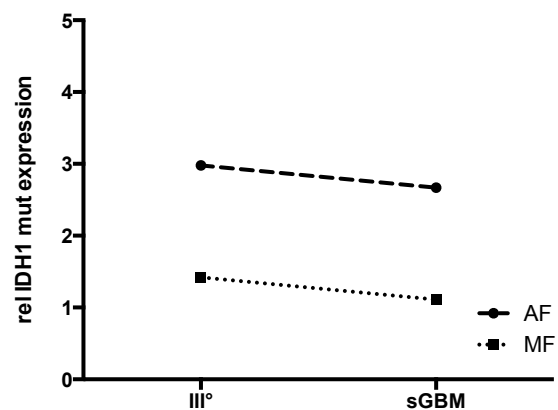


Abbildung 14d

Abbildung 14 a-d: Darstellung der individuellen *IDH1 mut* Expression über den Krankheitsverlauf bei progressiven Gliomen. Bei der überwiegenden Mehrheit der Fälle zeigt sich ein Anstieg der *IDH1 mut* Expression über den Krankheitsverlauf, Ausnahmen sind zwei Fälle (AF, MF; Abb. 13d), die eine vorherige Chemotherapie erhalten hatten, und ein Patient, bei dem Proben von zwei Grad III Biopsien unterschiedlicher Zeitpunkte vorlagen (KW; Abb. 13b) (Pat. Initialien angegeben; III°-t1 und III°-t2=Grad III Tumor zum ersten und zweiten Zeitpunkt).

2.2 *IDH1* wt Expression

2.2.1 *IDH1* wt Expression nach Gliomgrad

Die Expression von *IDH1* wt wurde bei insgesamt 70 Proben gemessen (n=70). Die durchschnittliche *IDH1* wt Expression lag dabei bei $0,08 \pm 0,01$ (rel. Expr. $\pm$ SEM). Unterschiede in der *IDH1* wt Expression bestanden bei den untersuchten Gruppen nur zwischen den Tumorproben und den Kontrollproben, welche eine deutlich niedrigere Expression von *IDH1* wt aufwiesen (siehe Tabelle 13 und Abbildung 15).

Zwischen den unterschiedlichen Gliomgraden bestand dagegen kein signifikanter Unterschied in der *IDH1* wt Expression (II°: rel. Expr.= $0,07 \pm 0,02$; n=10; III°: $0,11 \pm 0,02$; n=10; sGBM: $0,09 \pm 0,01$; n=10; pGBM: $0,12 \pm 0,02$; n=10), insbesondere ließ sich keine Tendenz zu einem Anstieg der Expression mit dem Tumorgrad erkennen.

	n	<i>IDH1</i> wt	SEM
Ctrl	10	0,09	0,03
II°	10	0,73	0,21
III°	10	1,09	0,15
sGBM	20	0,98	0,21
-Cx	(10)	0,88	0,11
+Cx	(10)	1,08	0,12
pGBM	20	1,08	0,13
-Cx	(10)	1,16	0,17
+Cx	(10)	1,01	0,21
total	70	0,86	0,07

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der *IDH1* wt Expression nach Gliomgrad.

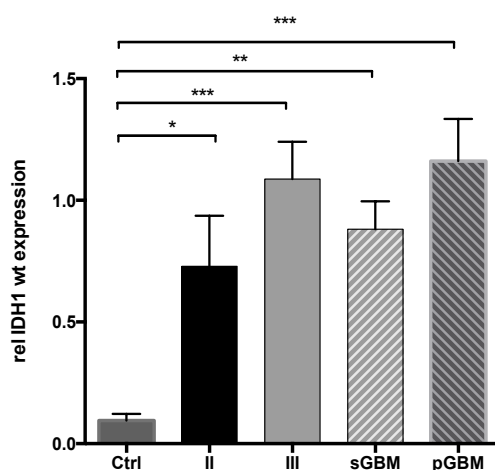


Abbildung 15: *IDH1* wt Expression in verschiedenen Gliomsubgruppen. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der *IDH1* wt Expression zwischen den Kontrollproben und sämtlichen Tumorgraden, innerhalb der Gliomsubgruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

2.2.2 *IDH1 wt* Expression in Abhängigkeit von dem histologischen Subtyp

Die Expression von *IDH1 wt* wurde bei insgesamt 19 Proben gemessen, bei denen Informationen über den histologischen Subtyp vorlagen. Nahezu die Hälfte dieser Proben war oligoastrozytärer (n=9) Herkunft und die andere Hälfte astrozytär (n=10).

In der Analyse der *IDH1 wt* Expression wurde kein Unterschied in der Expression von *IDH1 wt* zwischen diesen beiden Gruppen gemessen (OA: rel. Expr.= $0,92 \pm 0,17$; A: rel. Expr.= $0,9 \pm 0,23$). Zusammenfassend ergibt sich kein Hinweis auf eine Abhängigkeit der *IDH1 wt* Expression von dem histologischen Subtyp (siehe Abbildung 16).

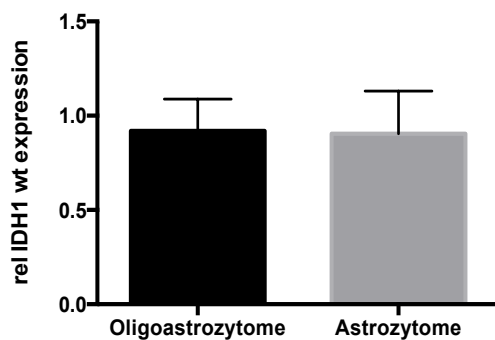


Abbildung 16: *IDH1 wt* Expression in Abhängigkeit des histologischen Subtyps. Es besteht kein Unterschied in der Expression von *IDH1 wt* zwischen rein astrozytären (n=10) und oligoastrozytären (n=9) Tumoren.

2.2.3 Einfluss von Chemotherapie auf die Expression von *IDH1 wt*

Um einen Einfluss einer vorherigen chemotherapeutischen Behandlung zu untersuchen wurde die *IDH1 wt* Expression zwischen den Gruppen der sekundären Glioblastome mit (sGBM+Cx) und ohne vorherige Chemotherapie (sGBM-Cx) verglichen (jeweils n=10).

Die Genexpressionslevel dieser beiden Gruppen unterschieden sich hierbei nicht signifikant von einander (sGBM-Cx: rel. Expr.= $0,88 \pm 0,11$; sGBM+Cx: rel. Expr.= $1,08 \pm 0,13$) (siehe Abbildung 17).

Auch für einen Einfluss einer vorherigen chemotherapeutischen Behandlung auf die Expression von *IDH1 wt* ergab sich aus diesen Ergebnissen kein Hinweis.

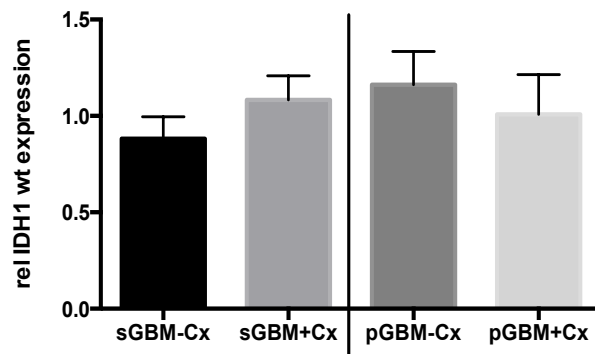


Abbildung 17: *IDH1* wt Expression in primären und sekundären GBM mit/ohne vorherige Chemotherapie. Während sich bei sekundären GBM eher eine Tendenz zu einer höheren *IDH1* wt Expression zeigt, deutet sich bei primären GBM ein entgegengesetzter Trend an.

2.2.4 *IDH1* wt Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe)

Um die Expression von *IDH1* wt im individuellen Krankheitsverlauf untersuchen zu können wurden die Ergebnisse der Patienten analysiert, von denen im Verlauf der Erkrankung mehrere Tumorproben entnommen worden waren (Individualverläufe).

Bezogen auf die Expressionsanalyse von *IDH1* wt lagen hierzu 25 Tumorproben von 11 Patienten mit niedrig-gradigeren Gliomen bzw. sekundären Glioblastomen vor, sowie 20 Proben von 10 Patienten mit primären Glioblastomen (Primärtumorgewebe und Gewebe des Rezidivtumors) (siehe Tabellen 14 und 15).

Pat. Init	Alter	Geschl.	Tumorage	Histo	IDH1 mut	Subty p	1.OP	Ad-juvTx	2.OP	Histo	Ad-juvTx	3.OP	Histo
AR	22	m	li frontal	II°	C394T	A	06/91	-	11/93	III°	n	n	n
NH	29	m	li frontal	II°	G395A	OA	10/91	-	11/95	III°	n	n	n
JK	33	m	li frontal	II°	G395A	A	02/92	-	05/96	sGBM(-Cx)	n	n	n
IS	41	w	li frontal	II°	G395A	A	01/93	-	09/04	III°	n	n	n
RZ	22	m	re frontal	II°	G395A	A	05/93	-	07/97	sGBM(-Cx)	n	n	n
MF	39	w	re frontal	II°	G395A	A	01/94	-	10/97	III°	Cx	12/98	sGBM(+Cx)
FH	26	m	li frontal	II°	G395A	OA	02/94	-	08/99	sGBM(-Cx)	n	n	n
JH	53	m	re okzipital	II°	C394G	A	08/94	-	02/99	III°	-	05/99	sGBM(-Cx)
EH	63	w	re frontal	II°	wt	A	11/99	-	03/00	sGBM(-Cx)	n	n	n
HB	34	m	li frontal	II°	G395A	OA	05/95	-	06/01	III°	Cx	06/02	sGBM(+Cx)
KW	26	w	re frontal	II°	G395A	OA	11/94	-	06/98	III°	Cx	04/99	III°

Tabelle 14: Klinische und epidemiologische Daten der Individualverläufe von Patienten mit progressiven Gliomen zur *IDH1* wt Analyse.

Pat.-Init.	Alter	Geschlecht	Tumorage	Histo	1.OP	adjuvante Tx	2.OP	Histo
AR	53	m	re frontal	pGBM-Cx	11/1995	+	02/1997	pGBM+Cx
PM	34	w	re parietal	pGBM-Cx	01/1997	+	10/1997	pGBM+Cx
IS	60	w	re parietal	pGBM-Cx	11/1997	+	03/1998	pGBM+Cx
HD	46	w	re temporal	pGBM-Cx	02/1998	+	06/1998	pGBM+Cx
HS	69	m	li temporal	pGBM-Cx	08/1998	+	05/1999	pGBM+Cx
FH	36	m	li frontal	pGBM-Cx	01/2000	+	n	pGBM+Cx
HZ	56	m	re frontal	pGBM-Cx	03/2001	+	10/2002	pGBM+Cx
HW	60	m	li parietal	pGBM-Cx	11/2001	+	09/2003	pGBM+Cx
WP	48	m	re frontal	pGBM-Cx	02/2002	+	n	pGBM+Cx
KN	51	m	re frontal	pGBM-Cx	07/2002	+	11/2003	pGBM+Cx

Tabelle 15: Klinische und epidemiologische Daten der Individualverläufe von Patienten mit pGBM.

Auch bei der Analyse der *IDH1 wt* Expression bei Patienten mit malignisierenden Gliomen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gliomgraden gefunden werden. Dies galt sowohl bei der Betrachtung sämtlicher Patienten (II°: rel. Expr.=0,73±0,21; III°: 1,03±0,17; sGBM:1,07±0,15) als auch bei der Analyse einzig der *IDH1 mut* Patienten (II°: rel. Expr.=0,53±0,11; III°: 1,11±0,32; sGBM:1,08±0,19) (siehe Abbildung 18).

Die Analyse der Einzelfälle zeigte bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten eine tendenziell ansteigende *IDH1 wt* Expression mit Fortschreiten der Erkrankung (siehe Abbildung 19 a-c).

Diesem Trend entgegen verhielt sich die *IDH1 wt* Expression vor allem bei einem Patienten (AF; siehe Abb. 19 b), bei dem auch die *IDH1 mut* Expression bereits eine gegenläufige Entwicklung gezeigt hatte (siehe Abbildung 14 d). Dieser Patient (MF) hatte wie unter 2.1.3.4 bereits erläutert eine vorherige Chemotherapie erhalten.

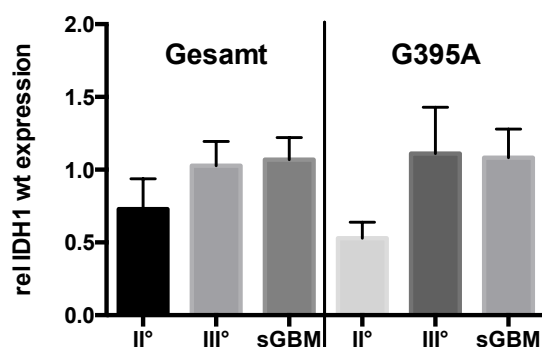


Abbildung 18: *IDH1 wt* Expression in Individualverläufen malignisierender Gliome (gepoolte Darstellung). Gesamte Patienten links dargestellt (n=11). Rechts nur Patienten mit *IDH1* (G395A) Mutation.

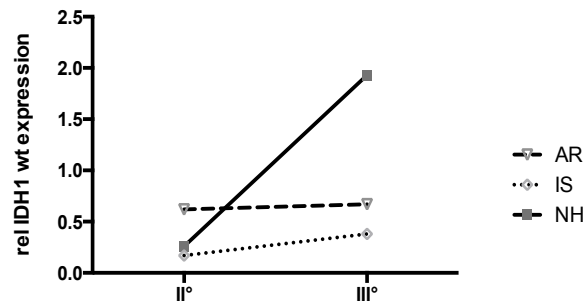


Abbildung 19a

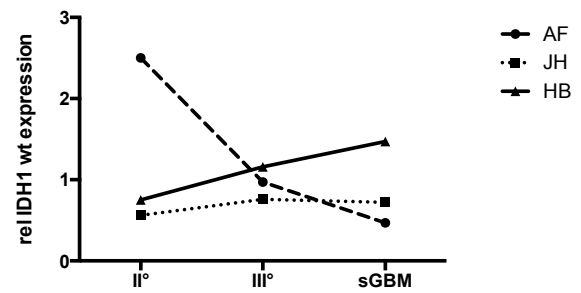


Abbildung 19b

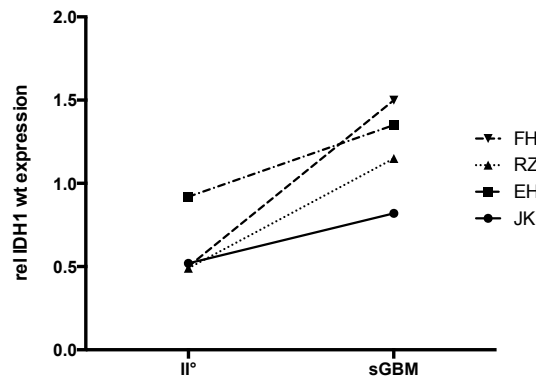


Abbildung 19c

Abbildung 19 a-c: Entwicklung der *IDH1 wt* Expression in Individualverläufen bei malignisierenden Gliomen (Einzeldarstellung). Es zeigt sich ein Trend zu einem Anstieg der Expression im Krankheitsverlauf.

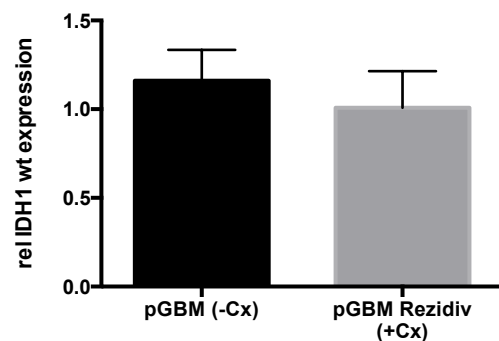


Abbildung 20: *IDH1 wt* Expression in Individualverläufen primärer Glioblastome (Primärsituation vs. Rezidiv; Patienten n=10).

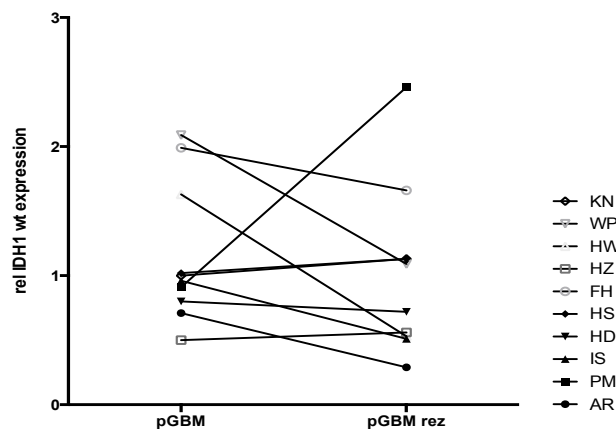


Abbildung 21: *IDH1 wt* Expression in Individualverläufen primärer Glioblastome (Einzeldarstellung). Bei den Individualverläufen primärer GBM Patienten lässt sich kein eindeutiger Trend in der *IDH1 wt* Expression erkennen.

Bei der Analyse der *IDH1 wt* Expression in der Gesamtgruppe der Individualverläufe der primären GBM Patienten zeigte sich kein Unterschied in der *IDH1 wt* Expression zwischen der Primärtumorsituation und der Rezidivsituation (pGBM: $1,16 \pm 0,17$; pGBM Rez: $1,01 \pm 0,21$) (siehe Abbildung 20). Dem entsprechend war auch in der Einzelfallanalyse kein Trend ersichtlich, welcher die *IDH1 wt* Expression bei der Progression primärer Glioblastome kennzeichnen würde (siehe Abbildung 21).

Zusammenfassend konnte in der Analyse der Gesamtgruppen der Individualverläufe weder bei den progressiven Gliomen bzw. sekundären Glioblastomen noch beim Progress von primären Glioblastomen ein Anstieg der *IDH1 wt* Expression im Krankheitsverlauf festgestellt werden.

In der Einzelverlaufsanalyse zeigte sich bei den malignisierenden Gliomen ein Trend zu einer ansteigenden *IDH1 wt* Expression (siehe Abbildung 19). Die Ergebnisse der primären GBM Individualverläufe folgten dagegen keinem eindeutigen Trend (siehe Abbildung 21).

2.3 Korrelation *IDH1 wt* und *IDH1 mut* Expression

Zur Analyse einer möglichen Korrelation zwischen der Expression von *IDH1 mut* und *IDH1 wt* wurden die (G395A) *IDH1 mut* Expressionsdaten mit den entsprechenden *IDH1 wt* Expressionsdaten korreliert. Insgesamt konnten dabei 26 Wert-Paare (jeweils *IDH1 wt / mut*) untersucht werden.

Die Analyse erbrachte den Nachweis einer moderaten Korrelation zwischen der Expression der beiden Gene ($r=0,56$; $R^2=0,31$; $n=26$; $p=0,003$) (siehe Abbildung 22).

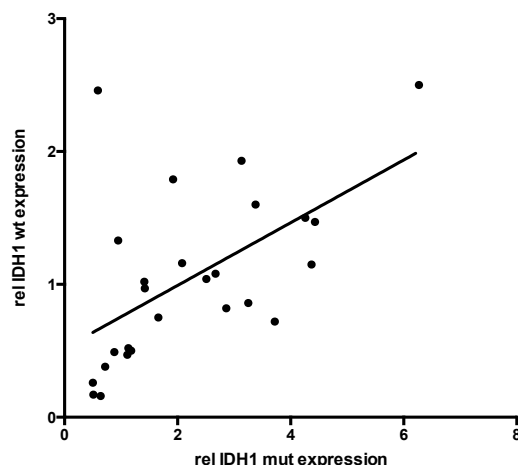


Abbildung 22: Korrelation zwischen der Expression von *IDH1 wt* und *IDH1 mut*.

Die Analyse zeigte eine moderate Abhängigkeit der Expression der beiden Gene ($n=26$; $r=0,56$; $R^2=0,31$; $p=0,003$).

Bei der gesonderten Analyse der Korrelation zwischen *IDH1 mut* und *wt* in den unterschiedlichen Untergruppen (nach Gliomgraden) ergab sich insbesondere bei den Grad II Gliomen eine hohe Korrelation ($r=0,97$; $R^2=0,93$; $n=6$; $p=0,002$) (siehe Abbildung 23 a). Bei den Grad III Gliomen war die Korrelation dagegen bereits weniger ausgeprägt ($r=0,78$; $R^2=0,61$; $n=7$; $p=0,04$) (siehe Abbildung 23 b) und bei den sekundären Glioblastomen bestand keine Korrelation zwischen der Expression der beiden Gene ($r=0,02$; $R^2=0,0005$; $n=11$; $p=0,95$) (siehe Abbildung 23 c).

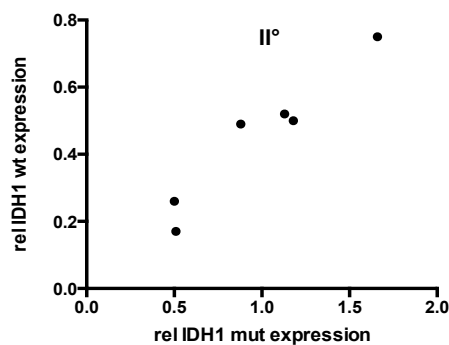


Abbildung 23a

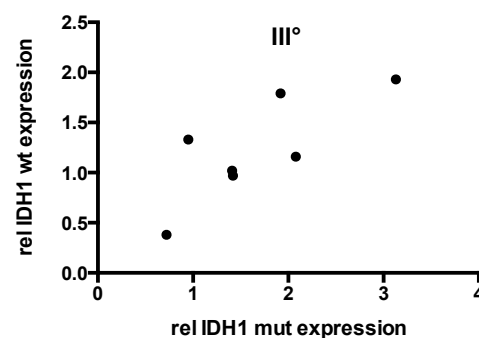


Abbildung 23b

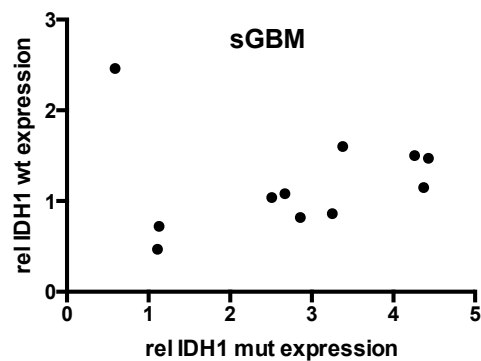


Abbildung 23c

Abbildung 23 a-c: Korrelation zwischen *IDH1 mut* und *wt* Expression aufgegliedert nach Tumorggrad. a) Grad II Tumoren ($R^2=0,93$), b) Grad III Tumoren ($R^2=0,61$) und c) sGBM ($R^2=0,0005$).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit zunehmender Malignisierung der Gliome die Korrelation zwischen *IDH1 wt* und *IDH1* sinkt. Insbesondere bei den sekundären Glioblastomen ist die Expression von *IDH1 mut* unabhängig von der Expression von *IDH1 wt*.

3. CD133

3.1 Expression von CD133

Die Zusammensetzung der Proben, in denen die Expression von *CD133* gemessen wurde, unterschied sich in einigen wenigen Punkten von den Proben, welche für die Messung von *IDH1 mut* und *wt* verwendet wurden (siehe Tabellen 3, 5 & 16).

Die Expression von *CD133* wurde in insgesamt 129 Proben gemessen (Kontrollen n=9; II° n=18; primäre III° n=10; Rezidiv III° n=20; sGBM-Cx n=20; sGBM+Cx n=12; pGBM n=20; pGBM rez n=20). Von diesen Proben waren 117 Proben verwertbar. Die mittlere Expression von *CD133* in sämtlichen Proben lag bei $1,22 \pm 0,15$ (rel. Expr. $\pm$ SEM).

		Proben(n)	Alter MW (Jahre)	Geschlecht (m/w)	CD133 $\pm$ SEM
WHO Grad	II	18	35	9/9	0,72 $\pm$ 0,11
	III	28		22/6	0,71 $\pm$ 0,14
	> primäre	(9)	46	7/2	1,33 $\pm$ 0,33
	> Rezidiv	(19)	43	15/4	0,42 $\pm$ 0,06
	sGBM	29		17/12	
	-Cx	(18)	43	8/10	1,55 $\pm$ 0,4
	+Cx	(11)	40	9/2	0,9 $\pm$ 0,21
	pGBM	32		20/12	
	-Cx	(17)	53	11/6	1,68 $\pm$ 0,42
	+Cx	(15)	57	9/6	2,5 $\pm$ 0,77
	Kontrollen	10	48	9/1	0,59 $\pm$ 0,08
	Total	117	45	77/40	1,22 $\pm$ 0,15

Tabelle 16: Übersicht über die Tumorguppen (epidemiologische Daten und *CD133* Expression) der *CD133* Analyse.

3.2 *CD133* Expression nach Gliomgrad

Ähnlich wie bei der Analyse der *IDH1* Daten wurden die *CD133* Expressionsdaten ebenfalls nach dem Gliomgrad untersucht. Bei dieser Analyse ergab sich eine höhere Expression des Stammzellmarkers *CD133* sowohl in sekundären als auch in primären Glioblastomen verglichen mit Kontrollgewebe und niedrig-gradigeren Tumoren (Kontrollen: rel. Expr.: $0,59 \pm 0,08$; II°: $0,72 \pm 0,11$; III°: $0,71 \pm 0,14$; sGBM: $1,55 \pm 0,4$; pGBM: $1,68 \pm 0,42$) (siehe Tabelle 16 und Abbildung 24).

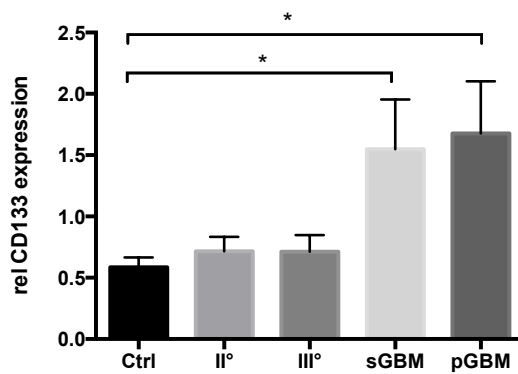


Abbildung 24: *CD133* Expression nach Tumorgrad. *CD133* ist signifikant höher exprimiert in sGBM und pGBM verglichen mit Kontrollgewebe. Grad II und III Tumoren zeigen dagegen nur eine gering höhere *CD133* Expression (Ctrl vs. sGBM $p=0,04$; Ctrl vs. pGBM $p=0,02$).

Ähnlich wie bei den Glioblastomen ließen sich auch innerhalb der Grad III Gliome vom klinischen Verlauf primäre („*de novo*“) Gliome ($n=9$) von Rezidiv-Gliomen (entstanden aus Grad II Vorläufern; $n=19$) unterscheiden. Im Vergleich der *CD133* Expression zwischen diesen unterschiedlichen Grad III° Tumoren zeigt sich eine höhere Expression von *CD133* in primären Grad III Tumoren (rel. Expr.= $1,33\pm0,33$) als in Rezidivgliomen ($0,42\pm0,06$; $p=0,008$) (siehe Abbildung 25).

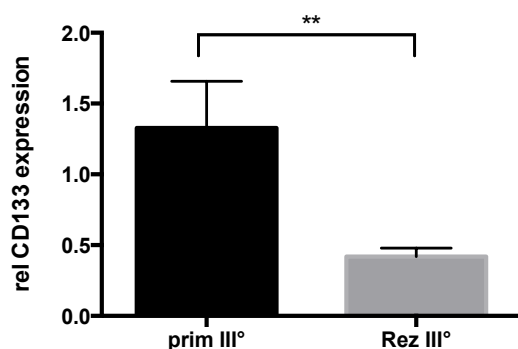


Abbildung 25: Vergleich der *CD133* Expression zwischen primären III° Gliomen und Rezidiv (sekundären) III° Gliomen. *CD133* ist signifikant höher exprimiert in primären Grad III Tumoren verglichen mit malignisierten Grad III Tumoren ($p=0,008$).

3.3 Einfluss des histologischen Subtyps auf die Expression von *CD133*

Um zu untersuchen ob der histologische Subtyp (astrozytäre Tumoren vs. oligoastrozytäre Tumoren) die Expression von *CD133* beeinflusst, wurden die Grad II und III Gliome gesondert nach ihrem histologischen Subtyp analysiert. Insgesamt 22 Proben waren astrozytär und 20 Proben oligoastrozytär. Innerhalb dieser Gruppen konnte eine weitere Unterscheidung nach Tumorgrad erfolgen (II A vs. II OA; III A vs. III OA), dabei stan-

den 14 Grad II Astrozytom-Proben und 8 Oligoastrozytom-Proben sowie 8 Grad III astrozytäre und 12 Grad III oligoastrozytäre Proben zur Verfügung.

Die *CD133* Expression lag bei den astrozytären Tumoren (rel. Expres.: $1,35 \pm 0,44$) diskret aber nicht statistische signifikant höher als bei den oligoastrozytären Tumoren ($0,73 \pm 0,27$; ns). Dieser Trend zu niedrigeren *CD133* Expression bei oligoastrozytären Tumoren bestätigte sich in der Subanalyse sowohl für die Grad II Tumoren (II A: $1,73 \pm 0,66$ vs. II OA: $1,25 \pm 0,66$; ns) als auch für die Grad III Tumoren (III A: $0,69 \pm 0,24$ vs. III OA: $0,38 \pm 0,06$; ns) (siehe Abbildung 26). Bei fehlender statistischer Signifikanz dieser Unterschiede zeigten die Ergebnisse keine sichere Abhängigkeit der *CD133* Expression von dem histologischen Subtyp.

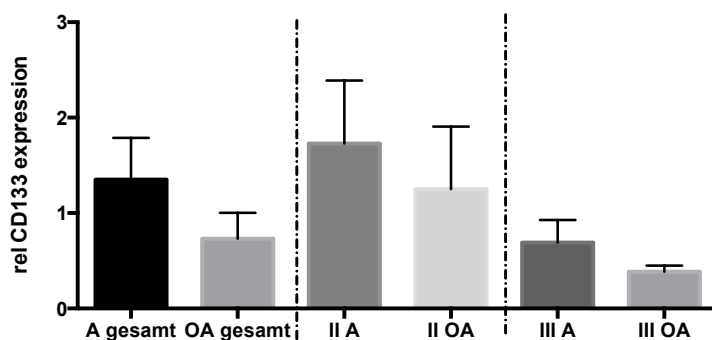


Abbildung 26: Vergleich der *CD133* Expression zwischen astrozytären und oligoastrozytären Tumoren.

Es deutet sich ein Trend zu einer niedrigeren Expression von *CD133* in oligoastrozytären Tumoren an (ohne statistische Signifikanz). Dies gilt für die Gesamtheit der Tumoren und die Grad II und III Tumoren im Einzelnen (A=Astrozytome; OA=Oligoastrozytome).

3.4 Einfluss von Chemotherapie auf die Expression von *CD133*

Wie bei der Analyse der *IDH1 mut* Expression war die Gruppe der sekundären Glioblastome auch bei der Messung der *CD133* Expression unterteilbar in Proben von Patienten, die bisher chemotherapeutisch noch nicht vorbehandelt waren (sGBM-Cx: n=18) und von Patienten, die bereits eine Chemotherapie erhalten hatten (sGBM+Cx: n=11).

Des Weiteren konnte die Expression von *CD133* auch bei Patienten mit primären Glioblastomen (pGBM-Cx: n=7), die bisher keine Chemotherapie erhalten hatten, verglichen werden mit der *CD133* Expression bei Rezidivtumoren, welche chemotherapeutisch vorbehandelt waren (pGBM+Cx: n=5) (biologisch voneinander unabhängige Proben).

Zusätzlich zu diesen Patienten lagen weitere Proben von insgesamt 10 Patienten vor, denen zum Zeitpunkt der Ersttumoroperation eines primären Glioblastoms (pGBM; n=10) und dann zum Zeitpunkt der jeweiligen Rezidivoperation (pGBM Rez; n=10) Tumorproben entnommen worden waren, so dass auch bei diesen 10 individuellen Patienten der Einfluss der chemotherapeutischen Vorbehandlung untersucht werden konnte (Individualverläufe).

Während sich bei den Patienten mit sekundären Glioblastomen ein Trend zu einer niedrigeren Expression von *CD133* im Falle einer vorherigen chemotherapeutischen Behandlung zeigte (sGBM-Cx: rel. Expr.=1,55±0,4 vs. sGBM+Cx: 0,89±0,21), fiel bei den primären Glioblastomen dagegen eine ansteigende *CD133* Expression im Rezidivfall und somit nach vorheriger Chemotherapie auf.

Dies galt sowohl für die Patientenproben, die von unterschiedlichen Patienten waren und somit biologisch und statistisch unabhängig waren, (pGBM-Cx: rel. Expr.=1,47±0,58 vs. pGBM+Cx: 2,87±1,64) als auch für die Proben der 10 individuellen Patienten (pGBM: rel. Expr.=1,82±0,62 vs. pGBM rez: 2,31±0,89) (siehe Abbildungen 27 und 29 e).

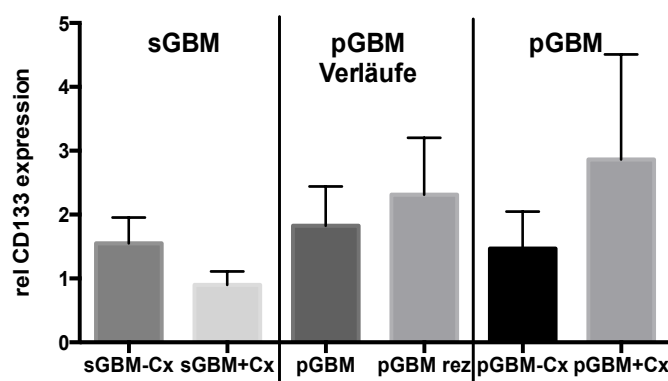


Abbildung 27: Einfluss vorheriger chemotherapeutischer Behandlung auf die *CD133* Expression in primären und sekundären GBM. Bei sekundären GBM zeigt sich ein Trend zu einer niedrigeren *CD133* Expression nach Chemotherapie. Bei primären GBM deutet sich dagegen sowohl bei Individualverläufen als auch bei unabhängigen Proben eine Tendenz zu einer ansteigenden Expression an.

Obwohl die Unterschiede in der *CD133* Expression in der einzelnen Analyse nicht statistisch signifikant waren (sGBM-Cx vs. sGBM+Cx; pGBM vs. pGBM rez; pGBM-Cx vs. pGBM+Cx), zeigte sich ein tendenziell unterschiedlicher *CD133* Expressionslevel nach einer vorherigen Chemotherapie zwischen primären und sekundären Glioblastomen. Während die *CD133* Expression bei den sekundären Glioblastomen nach einer vorheri-

gen Chemotherapie eher niedriger lag, war sie bei den primären Glioblastomen in beiden Vergleichen tendenziell höher nach einer vorherigen Chemotherapie.

3.5 *CD133* Expression während der Gliomprogression (Individualverläufe)

Zusätzlich zur Analyse der Individualverläufe der Patienten mit einem primären Glioblastom (siehe 3.4, Tabelle 15) wurden auch die Individualverläufe der Patienten mit malignisierenden Gliomen bzw. sekundären Glioblastomen untersucht. Hierbei wurden die Proben der 11 Patienten analysiert, die auch für die Messungen der *IDH1 wt* Expression verwendet worden waren (siehe Tabelle 14) sowie zusätzlich drei weitere Patienten, deren Daten in Tabelle 17 aufgeführt sind (WHO Grad II & III Tumoren sowie sekundäre GBM, 29 Proben von 14 Patienten) (siehe Tabellen 14 und 17).

Pat.- Initialien	Alter	Geschlecht	Tumortage	Histo	IDH1 mut	Subtyp	1.OP	adjuvante Tx	2.OP	Histo
AW	31	w	li fr.-temp.	II°	G395A	A	02/1992	-	09/1997	sGBM (-Cx)
AF	59	m	re parietal	III°	G395A	OA	08/1993	Cx	10/1994	sGBM (+Cx)
AD	50	m	li frontal	III°	wt	A	01/2000	Cx	04/2001	sGBM (+Cx)

Tabelle 17: Epidemiologische und klinische Daten der Patienten der *CD133* Expressionsanalyse (übrige 11 Patienten in Tabelle 10 aufgeführt).

In der Analyse der Gesamtgruppe (gepoolte Analyse) dieser 29 Patientenproben zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, wobei die *CD133* Expression bei den III° Tumoren niedriger ausfiel als in den übrigen Gruppen (II°: rel.Expr.=0,71±0,18, n=11; III°: 0,45±0,11, n=8; sGBM: 0,88±0,26; n=10) (siehe Abbildung 28).

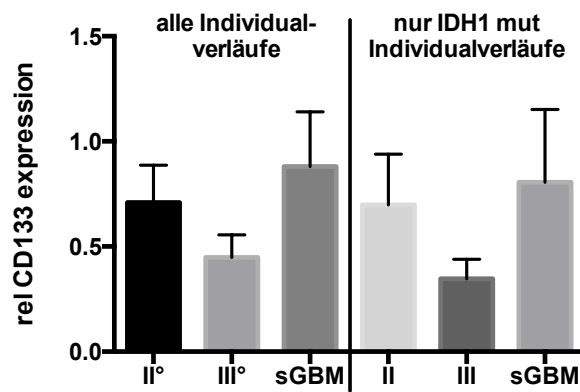


Abbildung 28: Darstellung der gepoolten *CD133* Expression der Individualverläufe.

Gesondert dargestellt sind die Expression aller Einzelfälle (linke Balken) und nur der *IDH1 mut* Einzelfälle (rechte Balken).

Die Analyse der einzelnen Verläufe zeigte hinsichtlich einer Veränderung der *CD133* Expression mit der Progression der Gliome (II°->III°->sGBM) kein einheitliches Bild (siehe Abbildungen 29 a-d), so dass sich aus den vorliegenden Ergebnissen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von *CD133* und dem Tumorprogress erkennen lässt.

Bei den Individualverläufen der primären Glioblastome war die *CD133* Expression bei 60% (6/10) der Patienten im Rezidiv höher als bei dem Primärtumor. Im Wilcoxon Test ergab sich bei dem gepaarten Vergleich der Expressionswerte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der *CD133* Expression vom Primär- zum Rezidivtumor ($p=0,49$) (siehe Abbildungen 27 und 29 e).

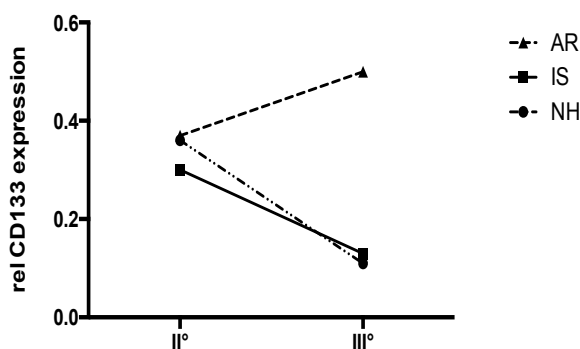


Abbildung 29 a

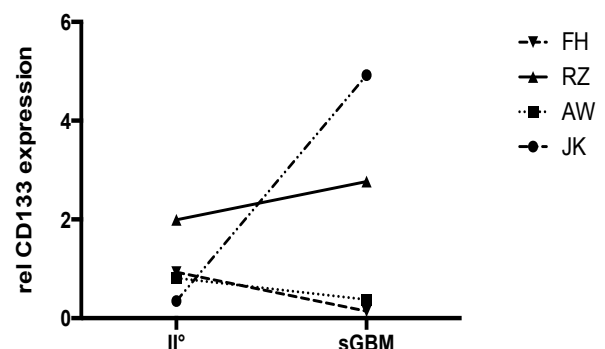


Abbildung 29 c

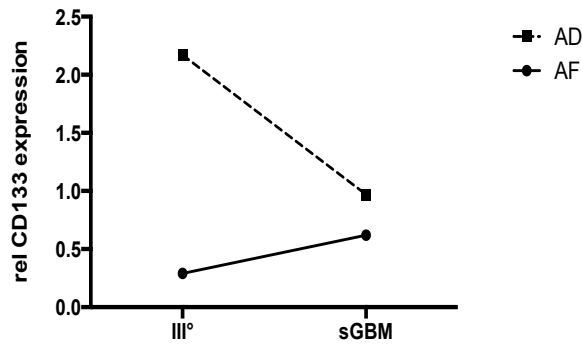


Abbildung 29 b

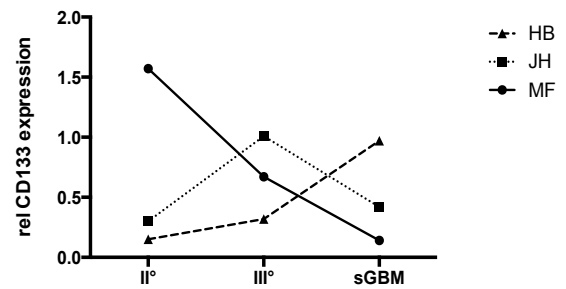


Abbildung 29 d

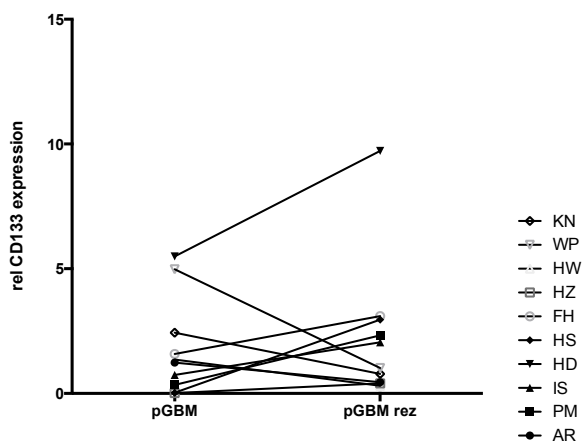


Abbildung 29 e

Abbildung 29 a-e: Darstellung der *CD133* Expression in Individualverläufen. a-d) Individualverläufe der malignisierenden Gliome. e) Individualverläufe der primären Glioblastome (Primärsituation und Rezidivsituation).

4. Korrelation zwischen *IDH1 mut* und *CD133*

Da sowohl der *IDH1* Mutation als auch der Präsenz von sogenannten Gliomstammzellen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Gliomen zugesprochen wird, wurde als nächstes eine potentielle Korrelation zwischen der Expression von *CD133* und *IDH1 mut* untersucht.

Insgesamt lagen die Ergebnisse von 92 Datenpaaren (*IDH1 mut* + *CD133*) vor, anhand derer die Korrelation analysiert wurde. Die Ergebnisse zeigen eine Unabhängigkeit der Expression der *IDH1* Mutation von der *CD133* Expression ($r=-0,05$; $R^2=0,003$) (siehe Abbildung 30).

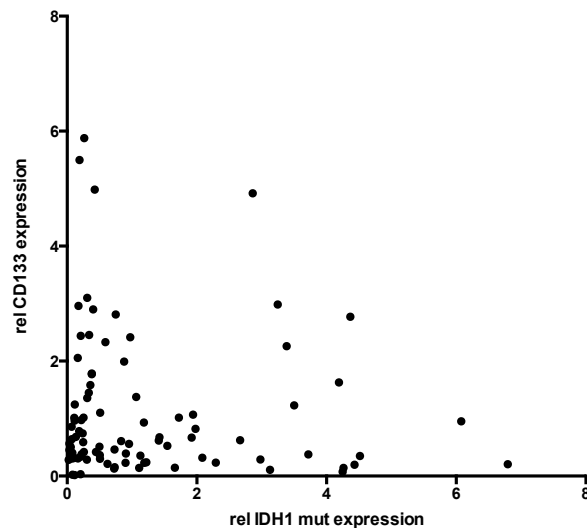


Abbildung 30: Korrelation zwischen *IDH1 mut* Expression und *CD133* Expression. Die Expression von *CD133* ist unabhängig von der *IDH1 mut* Expression

Gleiches gilt für die Analyse der einzelnen Subgruppen, in denen ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression von *IDH1 mut* und *CD133* gefunden werden konnte (Daten nicht im Detail dargestellt).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die *IDH1* Mutation, die eine frühe Mutation in der Entstehung von sekundären Glioblastomen darstellt, nicht mit einer vermehrten Expression von Stammzellmarkern einhergeht.

IV. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene (*IDH1 wt/mut* und *CD133*) in Gliomen unterschiedlicher Tumorgade untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression dieser Gene longitudinal bei individuellen Krankheitsverläufen analysiert.

1. *IDH1 mut*

Die *IDH1* Mutation ist eine häufige Mutation in niedrig-gradigen Gliomen und sekundären Glioblastomen (Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009). In der Entstehung dieser Tumoren scheint die *IDH1* Mutation ein frühes Ereignis darzustellen (Ohgaki und Kleihues, 2011). Auf welche Art die *IDH1* Mutation Einfluss auf die Entstehung von Gliomen nimmt, ist bisher unbekannt. Neuere Veröffentlichungen postulierten, dass die *IDH1* Mutation eine sogenannte „gain-of-function“ Mutation darstellt, die zu einer veränderten enzymatischen Funktion führt mit der Folge einer Bildung von 2-Hydroxyglutarat, welches als sogenannter Onkometabolit agieren könnte (Presner und Chinnaiyan, 2011; Ohgaki und Kleihues, 2011).

Diese Zusammenhänge sowie die klinische Relevanz der Akkumulation von 2-Hydroxyglutarat sind bisher noch nicht ausreichend belegt. So konnte gezeigt werden, dass bei *IDH1* mutierten niedrig-gradigen Gliomen der 2-Hydroxyglutarat Level nicht mit der klinischen Progression korreliert (Juratli et al., 2013).

Andererseits erfahren sogenannte „molekulare Marker“ wie der *MGMT* Promotormethylierungsstatus aber auch das Vorliegen der *IDH1* Mutation in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit. Für die *IDH1* Mutation konnte gezeigt werden, dass diese bei Patienten mit Gliomen mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Hartmann et al., 2009; Sanson et al., 2009). Darüber hinaus scheint die *IDH1* Mutation in Zusammenhang mit dem *MGMT* Status prädiktiv für die Effektivität einer chemotherapeutischen Therapie zu sein (Wick et al., 2013).

Zusammenfassend deuten aktuelle Daten daraufhin, dass die *IDH1* Mutation eine a) frühe und möglicherweise zentrale Mutation in der Entstehung progressiver Gliome darstellen könnte und dass b) der *IDH1 mut* Status für die Therapiesteuerung von besonderer Bedeutung sein könnte. Die Beantwortung der damit verbundenen Fragen wird aktuell mit großem Aufwand betrieben.

Hinsichtlich der Diagnosestellung des *IDH1 mut* Status bei Gliomproben sind immunhistochemische Analysen und die Gensequenzierung die am weitesten verbreiteten Methoden, wobei die Gensequenzierung am ehesten als „Goldstandard“ angesehen werden kann (Preusser et al., 2011). In einer neueren Publikation wurde die allel-spezifische qPCR als alternative Methode eingeführt. Die Autoren untersuchten die Übereinstimmung der qPCR Ergebnisse gegenüber der DNA Sequenzierung bei insgesamt 91 Patienten mit Grad II und III Oligodendrogliomen. Sie beschreiben hierbei eine hohe Spezifität und Sensitivität der Methode gegenüber der DNA Sequenzierung (Loussouran et al., 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der von Loussouran veröffentlichte qPCR Primer verwendet um die Frage zu beantworten ob 1.1) die hohe Genauigkeit der Methode auch mit anderen Gliomproben reproduzierbar ist (Astrozytome, Oligoastrozytome, sekundäre und primäre Glioblastome) (**qualitative Analyse**).

Darüber hinaus bietet die qPCR im Gegensatz zur DNA Sequenzierung die Möglichkeit der Quantifizierung der Genexpression, so dass vor dem Hintergrund der potentiellen Rolle der *IDH1 mut* in der Gliomentstehung die Frage zu beantworten war wie sich 1.2) die Expression von *IDH1 mut* in Gliomen verhält (**quantitative Analyse**).

Um diese Fragen zu beantworten wurden insgesamt 113 Proben von 84 Patienten unterschiedlicher Gliomgrade sowie von tumorfreien Kontrollgewebe hinsichtlich der Expression von *IDH1 mut* mittels DNA Sequenzierung und qPCR untersucht.

1.1 *IDH1 mut* qPCR – qualitative Analyse

Die in dieser Arbeit erhobenen qualitativen Ergebnisse bestätigen zunächst die von Loussouran veröffentlichten Daten (Loussouran et al., 2012).

Die Ergebnisse der DNA Sequenzierung ergaben eine *IDH1* Mutation bei 65,5% aller Patienten. Im Einzelnen war die *IDH1* Mutation bei 85,7% der Grad II Tumoren, bei 86,4% der Grad III Tumoren und bei 77,3% der sekundären Glioblastome nachweisbar. Diese Ergebnisse sind somit vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die *IDH1* Mutation mit einer Rate von 71-100% bei Grad II Gliomen und 66-100% bei Grad III Tumoren beschrieben (Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009; Hartmann et al., 2009).

Die absolute Mehrheit der *IDH1* Mutationen stellte die G395A Mutation des Codons 132 dar (48/55; 87.3%), was ebenfalls den Literaturwerten entspricht. So beschrieben Hartmann und Mitarbeiter bei 1010 ausgewerteten Proben einen Anteil von 93% der R132H (G395A) Mutation an sämtlichen *IDH1* Mutationen (Hartmann et al., 2009).

Bei den übrigen Patienten (7/55; 12.7%) lag eine der weniger häufigen *IDH1* Mutationen im Codon 132 vor. Da der in dieser Studie verwendete Primer diese Mutationen nicht amplifiziert, waren diese für die weitere Auswertung nicht relevant.

Die *IDH1 mut* (G395A) spezifische qPCR zeigte eine hohe Korrelation der Ergebnisse zu den Ergebnissen der DNA Sequenzierung. Mit den vorliegenden qPCR Daten konnten Expressionsgrenzwerte bestimmt werden, über bzw. unter denen eine *IDH1* Mutation mit 100% Sensitivität und Spezifität nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden konnte (oberer Grenzwert: rel. Expression $\geq 0,59$; unterer Grenzwert: $\leq 0,26$). Darüber hinaus konnte ein „cut-off-Wert“ (rel. Expression $\geq 0,51$) festgelegt werden, mit dem sich eine Sensitivität der Methode von 97% und eine Spezifität von 96% ergab.

Insofern bestätigen die Ergebnisse zunächst, dass die qPCR eine präzise und mit überschaubaren Mitteln durchzuführende Methode ist um den *IDH1 mut* Status bei verschiedenen Gliom Graden (II°, III° und GBM) und histologischen Subtypen (Astrozytome, Oligoastrozytome) zu bestimmen.

Die Abweichungen in der Genauigkeit gegenüber der DNA Sequenzierung müssen dabei nicht notwendigerweise auf einen Fehler der qPCR zurückzuführen sein. So beschrieben bereits Loussouran und Mitarbeiter, dass Proben zwar in der DNA Sequenzierung negativ sein können, die entsprechenden Ergebnisse der Immunhistochemie und der qPCR jedoch für eine *IDH1 mut* sprechen können (Loussouran et al., 2012).

Dies bezüglich fand sich bei einem Patienten, von dem insgesamt drei Proben über den gesamten Krankheitsverlauf vorlagen, in der DNA Sequenzierung ein Wechsel des *IDH1 mut* Status von der Erstdiagnose (*IDH1 mut*) zum Rezidiv Tumor (*IDH1 wt*) und zum erneuten Rezidiv (*IDH1 mut*). Die Ergebnisse der qPCR zeigten dagegen bei diesem Patienten kontinuierlich das Vorliegen einer *IDH1 mut* an. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass der *IDH1 mut* Status über den Krankheitsverlauf stabil bleibt (Juratli et al., 2013), so dass vor diesem Hintergrund am ehesten ein Fehler in der DNA Sequenzierung vorzuliegen scheint.

Die in der vorliegenden Arbeit mituntersuchten Kontrollproben entsprachen sogenanntem „peritumoralen Gewebe“, welches von einem unabhängigen Neuropathologen anhand von Routinefärbungen als tumorfrei klassifiziert worden war. In einem Fall lagen von demselben Patienten eine „sekundäre Glioblastom“-Probe und eine „Kontroll“-Probe vor. Bei beiden Proben ergaben die Ergebnisse der qPCR den Nachweis der *IDH1* Mutation, so dass davon auszugehen ist, dass auch in der „Kontroll“-Probe noch eine signifikante Menge Tumorzellen vorlagen. Hier könnte die qPCR also auch bei geringen Gewebe-/Tumormengen eine bessere Differenzierung zwischen Infiltrationszone und reaktiver Gliosezone erlauben. Die Tatsache, dass sowohl die Ergebnisse der Sequenzierung als auch der qPCR die Präsenz von *IDH1 mut* Zellen und damit Tumorzellen nahelegen, deutet an, dass die molekulargenetische Diagnostik auch in der Beurteilung von Infiltrationszonen bzw. der Tumorränder von Bedeutung sein könnte.

Interessanterweise wurde bereits in der Veröffentlichung von Loussouarn spekuliert, dass aufgrund der hohen Sensitivität der qPCR, sich diese auch bei einer geringen Menge an vorliegendem Gewebe (z.B. stereotaktische Biopsie) eignen könnte um anhand des *IDH1 mut* Status eine Differenzierung zwischen reaktiver Gliose und Infiltrationszone zu ermöglichen (Loussouarn et al., 2012; Capper et al., 2010; Camelo-Piragua et al., 2010).

Die qPCR scheint daher qualitativ nicht nur eine vergleichbar genaue Methode wie die DNA Sequenzierung zur Analyse des *IDH1 mut* Status darzustellen, sondern sie könnte demgegenüber bei gewissen Fragestellungen und geringen Gewebemengen von Vorteil sein. Hierbei wurde ein Mutations-spezifischer Primer verwendet, welcher die häufigste Mutation (G395A) und somit die Mehrheit der *IDH1 mut* Fälle erkennt.

1.2 *IDH1 mut* qPCR – quantitative Analyse

Die bisher etablierten Methoden zur Analyse der *IDH1* Mutation wie die DNA Sequenzierung oder die Immunhistochemie (IHC) erlauben keine Quantifizierung bzw. im Falle der IHC bestenfalls eine semiquantitative Analyse der *IDH1 mut* Expression. Dem gegenüber ermöglicht die qPCR die quantitative Analyse der Genexpression der *IDH1* Mutation. Obwohl spekuliert worden ist, dass die *IDH1* Mutation von zentraler Bedeutung für die Entstehung und das Fortschreiten von Gliomen sein könnte (Balss et al., 2008; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009), gab es bisher keine veröffentlichten Daten darüber, wie sich die Expression der *IDH1* Mutation während der Gliomprogression verhält.

Einer neueren Veröffentlichung von Juratli und Mitarbeitern ist zu entnehmen, dass der *IDH1 mut* Status über den Krankheitsverlauf unverändert bleibt und der Level der 2-Hydroxyglutaratkonzentration nicht mit dem Progress von Gliomen korreliert (Juratli et al., 2013).

Das Ziel dieser Arbeit war daher unter anderem zu untersuchen, wie sich die Expression von *IDH1 mut* auf den Tumorgrad bezogen verhält, bzw. ob es im Rahmen der zunehmenden Tumormalignisierung zu einem Anstieg der Genexpression kommt und inwiefern sonstige Faktoren wie der histologische Subtyp oder eine chemotherapeutische Vorbehandlung die *IDH1 mut* Expression beeinflussen.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete qPCR Primer amplifiziert die mit Abstand am häufigsten auftretende *IDH1* Mutation (G395A). Die quantitative Analyse konnte mit diesem Primer daher bei den 56 *IDH1 mut* (G395A) Patienten durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der *IDH1 mut* Expression insbesondere der sekundären Glioblastome gegenüber den Grad II und III Tumoren. Im Vergleich der Grad II und Grad III Gliome zeigte sich zwar ein Trend zu einer ausgeprägteren *IDH1 mut* Expression bei höher-gradigen Tumoren, eine statistische Signifikanz bestand allerdings nicht.

In ähnlicher Weise bestätigten sich diese Ergebnisse bei der Analyse der *IDH1 mut* Expression in den sogenannten „Individualverläufen“, d.h. bei Patienten, von denen im Rahmen der fortschreitenden Erkrankung, mehrfach Tumorproben entnommen wurden. Auch bei diesen Patienten zeigte sich ein progredienter Anstieg der *IDH1 mut* Expression von Grad II zu Grad IV Tumoren, wobei auch hier ein statistisch signifikanter Unterschied nur zwischen den Grad II Tumoren und den sekundären Glioblastomen bestand.

In der Analyse der individuellen *IDH1 mut* Expression bei den Einzelverläufen bestätigte sich diese Beobachtung. Dem entgegengesetzt verlief die Expression von *IDH1 mut* nur bei zwei Patienten, die zuvor eine chemotherapeutische Behandlung erhalten hatten. Insofern stellte sich die Frage, ob eine vorherige chemotherapeutische Behandlung zu einer Reduktion der *IDH1 mut* Expression führen könnte.

In der Analyse der *IDH1 mut* Expression bei den chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten mit sekundären Glioblastom fiel dabei gegenüber den untherapierten Patienten ebenfalls eine geringere *IDH1 mut* Expression auf. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten in Chemotherapie-Subgruppen (TMZ, TMZ+PCV, ACNU) konnte hier keine sta-

tistische Analyse möglicher Unterschiede in der *IDH1 mut* Expression je nach Substanz durchgeführt werden.

Eine mögliche Ursache für die reduzierte *IDH1 mut* Expression bei chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten könnte sein, dass Zellen mit einer *IDH1* Mutation in besonderem Maße empfindlich sind für eine chemotherapeutische Behandlung. So konnten Mohrenz und Mitarbeiter zeigen, dass mutiertes *IDH1* Gliomzellen empfindlicher gegenüber oxidativem Stress macht, welcher durch die Gabe von Chemotherapeutika verursacht werden kann (Mohrenz et al., 2013).

Für andere Faktoren wie den histologischen Subtyp (Astrozytome vs. Oligoastrozytome) ergaben sich in der Datenanalyse dagegen keine Hinweise auf eine Beeinflussung der *IDH1 mut* Expression.

Inwiefern diese Beobachtungen von klinischer Relevanz sind, bzw. ob die Expression von *IDH1 mut* ein potentieller Biomarker für den Tumorprogress bzw. das Ansprechen auf Chemotherapie darstellen könnte, bleibt jedoch zunächst unbeantwortet. Zwar scheint es eine gewisse Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad des Glioms und dem Level der *IDH1 mut* Expression zu geben und es deutet sich ein Einfluss der vorherigen Therapiemaßnahmen auf die *IDH1 mut* Expression an, aber im Rahmen dieser Arbeit lagen nicht ausreichend klinische Daten vor, um beantworten zu können ob der Level der *IDH1 mut* Expression mit dem Zeitpunkt zum Tumorprogress bzw. dem Überleben korreliert und somit eine klinische Relevanz besteht.

Darüber muss bedacht werden, dass auch ein theoretisch vielversprechender Parameter wie das 2-Hydroxyglutarat zwar eine noch ungeklärte Rolle in der Entstehung der Gliome zuspiesen scheint, jedoch bisher noch nicht gezeigt werden konnte, dass dies unmittelbar mit den klinischen Verläufen korreliert und sich somit nicht als Biomarker eignet (Juratli et al., 2013).

Insofern deuten die vorliegenden Daten zwar einen Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad bzw. der zunehmenden Tumormalignisierung und der *IDH1 mut* Expression an, die Zusammenhänge zum klinischen Verlauf sind jedoch vermutlich komplexer. Hierbei muss außerdem bedacht werden, dass die Messung der Genexpression nur eine Ebene der Analyse darstellt und posttranskriptionelle Einflüsse dabei nicht mituntersucht werden.

Denkbar wäre zum Beispiel, dass zwar die Genexpression während der Tumorprogression zunimmt, es jedoch zu einer posttranskriptionellen Inaktivierung der mRNA kommt und es daher zu keinem mit dem Tumorgrad korrelierenden Anstieg des Enzymproduktes 2-Hydroxyglutarat kommt.

Eine zur Beantwortung dieser Frage notwendige Analyse der 2-Hydroxyglutarat Konzentrationen in den vorliegenden Proben wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

2. *IDH1 wt*

Ähnlich wie für die Expression von *IDH1 mut* gilt auch für die Expression von *IDH1 wt*, dass bisher wenig darüber bekannt ist, wie sich die Genexpression bei malignisierenden Gliomen bzw. bei Gliomen im Allgemeinen verhält.

Die Isozitatdehydrogenase (IDH) ist ein Enzym des Zitratzyklus, welches die Oxidation und Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat katalysiert (Parsons et al., 2008). Die IDH1 Isoform befindet sich insbesondere in den zytoplasmatischen Peroxysomen (Nekrutenko et al., 1998).

Der Zusammenhang zwischen den Enzymen des Citratzyklus und Tumorzellen ist noch weitestgehend unverstanden. Eine Dysregulation des Zellmetabolismus wird jedoch als zentrales Charakteristikum von Tumorzellen angesehen (DeBerardinis et al., 2008; Hanahan und Weinberg, 2011).

Auch für den Glioblastom-Metabolismus wurde bisher vermutet, dass er vornehmlich auf einer hohen Glykolyse und Glutaminolyse beruht, während die Glukoseoxidation dagegen nur einen geringen Anteil hat (DeBerardinis et al., 2007; Portais et al., 1996). Neuere Daten deuten jedoch daraufhin, dass auch die Glukoseoxidation über den Zitratzyklus eine wichtige Rolle im Gliom-Metabolismus einnehmen könnte (Maher et al., 2012).

Neben der reinen Energiegewinnung für den erhöhten Tumorzellmetabolismus werden die Produkte des Zitratzyklus (Zitrat und Acetyl-CoA) auch für die Lipidsynthese benötigt, welche für die Tumorentwicklung bedeutend ist (DeBerardinis et al., 2007). Interessanterweise scheint es außerdem bei Tumoren, bei denen es durch Genmutationen zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion gekommen ist, zu einer Reversion des Zitratzyklus zu kommen mit einer reduktiven Carboxylierung von α -

Ketoglutarat zu Isocitrat. Hiermit entsteht somit für die Tumorzelle ein alternativer Weg zur Lipidsynthese und Tumorwachstum (Mullen et al., 2012).

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage wie sich 2.1) die Expression von *IDH1 wt* bei verschiedenen Gliomgraden und bei malignisierenden Gliomen verhält, und 2.2) wie sich die Expression von *IDH1 wt* gegenüber *IDH1 mut* bei diesen Tumoren entwickelt.

2.1 *IDH1 wt* Expression in unterschiedlichen Gliomgraden / malignisierenden Gliomen

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Expression von *IDH1 wt* in insgesamt 70 Proben von 46 Patienten mittels qPCR gemessen. Die Analyse der *IDH1 wt* Expression zeigte dabei vor allem einen deutlichen Anstieg der Expression in allen Tumorgraden gegenüber dem Kontrollgewebe. Zwischen den einzelnen Tumorgraden zeigten sich dagegen keine signifikanten Unterschiede in der *IDH1 wt* Expression.

Auch andere Faktoren wie der histologische Subtyp oder eine chemotherapeutische Behandlung hatten bei den untersuchten Gliomproben keinen Einfluss auf die Expression von *IDH1 wt*.

Um auch die Entwicklung der Expression des *IDH1* Wildtypen im individuellen Krankheitsverlauf untersuchen zu können, wurde zusätzlich die Expression des *IDH1* Wildtypen in insgesamt 25 Proben von 11 Patienten als „Individualverläufe“ gemessen. Darüber hinaus wurde die *IDH1 wt* Expression auch bei den Patienten mit primären Glioblastomen untersucht, von denen Tumorproben sowohl des Primärtumors (pGBM-Cx) als auch des Rezidivtumors (pGBM+Cx) vorlagen. Die Ergebnisse der Individualverläufe bestätigten dabei die Ergebnisse der gepoolten Analyse. Es zeigte sich kein Anstieg der *IDH1 wt* Expression mit zunehmender Malignisierung des Tumors bzw. im Tumorprogress.

Diese Ergebnisse bestätigen zunächst, dass es bei sämtlichen Gliomgraden (II, III, sGBM und pGBM) zu einem Anstieg der *IDH1 wt* Expression kommt, welche den erhöhten metabolischen Umsatz bzw. die erhöhte Proliferationsrate der Zellen widerspiegeln könnte. Dies würde mit den Beobachtungen übereinstimmen, dass der Zitratzyklus auch bei Gliomen eine zentrale Rolle im Zellmetabolismus einnimmt (Maher et al., 2012; DeBernardinis et al., 2007).

Ähnlich wie bei der Analyse der *IDH1 mut* Expression basiert auch die Analyse der *IDH1 wt* Expression auf der Quantifizierung eines Gens. Diese Arbeit umfasst keine differenzierte Analyse anderer Gene des Zitratzyklus bzw. deren Metaboliten, so dass die Ergebnisse nur im Kontext der bisher veröffentlichten Daten zu werten sind.

2.2 Korrelation der Expression von *IDH1mut* / *wt*

Die Auswertung der Korrelation zwischen der *IDH1 wt* und *IDH1 mut* Expression wurde bei sämtlichen (G395A) *IDH1 mut* Proben durchgeführt, da bei den übrigen Proben durch den Allel-spezifischen Primer keine Quantifizierung der *IDH1 mut* Expression möglich war.

In der Analyse der „Individualverläufe“ war kein Unterschied in der Expression von *IDH1 wt* erkennbar im Vergleich der Wildtyp Tumoren und der Tumoren mit der *IDH1* Mutation. Die Korrelationsanalyse der beiden Gene zeigte dagegen eine moderate Korrelation zwischen *IDH1 mut* und *IDH wt* Expression. Interessanterweise fiel in der Subgruppenanalyse auf, dass die Korrelation zwischen den beiden Genen mit dem Tumorgrad abnimmt. Während eine stärkere Korrelation bei den Grad II Gliomen vorlag, bestand keine Korrelation zwischen der Expression von *IDH1 mut* und *wt* bei den sekundären Glioblastomen.

Dies könnte daraufhin deuten, dass der Anstieg der Expression von *IDH1 mut* zu Beginn der Gliomentwicklung noch parallel zur allgemeinen Steigerung des Tumorzellmetabolismus verläuft, sich jedoch mit steigender Malignität davon entkoppelt. Ursächlich hierfür könnte zum Beispiel eine klonale Expansion der *IDH1 mut* Tumorzellen sein.

3. *CD133*

Die Gliomstammzelltheorie besagt, dass eine Subpopulation von Tumorzellen für das Entstehen bzw. Fortschreiten der Gliome sowie das Auftreten von Tumorrediven nach erfolgter Behandlung verantwortlich sein könnte (Reya et al., 2001; Bao et al., 2006; Liu, 2006). Trotz aller Einschränkungen hinsichtlich seiner Aussagekraft ist der Oberflächenmarker *CD133* bisher der am häufigsten verwendete Marker zur Identifikation dieser Stammzellpopulation in Gliomen (Wan et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression dieses Markers mittels qPCR in 117 Proben verschiedener Gliomgrade (II°, III°, IV°) und Subtypen (pGBM, sGBM; Oligoastrozytome und Astrozytome) gemessen.

Die Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte Expression von *CD133* in Glioblastomen gegenüber Kontrollgewebe und auch, weniger ausgeprägt, gegenüber niedriggradigeren Gliomen (II°&III°). Zwischen den niedriggradigeren Tumoren und gesundem Kontrollgewebe waren dagegen keine Unterschiede in der *CD133* Expression ersichtlich, so dass keine eindeutige Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der *CD133* Expression bestand. Dies könnte darauf hindeuten, dass die *CD133*+ Zellpopulation in diesen Tumoren möglicherweise noch einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamttumorzellmasse als bei Glioblastomen ausmacht.

Diese Ergebnisse entsprechen damit den Daten von Ma und Mitarbeitern, welche die Expression von verschiedenen Stammzellmarkern bei Gliomen unterschiedlicher Grade mittels qPCR und IHC gemessen haben. Sie beschrieben dabei ebenfalls eine erhöhte Expression von *CD133* bei höheren Tumorgraden, wobei auch in ihrer Arbeit bei der qPCR Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen Grad II und Grad III Tumoren erkennbar waren (Ma et al., 2008).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Ma et al.* und auch zu den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten stehen dagegen die Ergebnisse von Thon und Mitarbeitern, die eine klare Korrelation zwischen der Expression von *CD133* und der Malignität des Tumors beschrieben. Diese Korrelation wurde in ihrer Arbeit beobachtet anhand von immunhistochemischen und konventionellen PCR Daten sowie Western Blot Ergebnissen (Thon et al., 2010).

Bei den hierbei verwandten Methoden handelt es sich jedoch allenfalls um semiquantitative Methoden, so dass eine Aussage über die Quantifizierung der Expression von *CD133* nur teilweise verwertbar erscheint. Andererseits wäre es jedoch denkbar, dass auf Proteinebene, welche im Western Blot und der Immunhistochemie gut dargestellt wird, letztendlich eine Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der *CD133* Expression besteht, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit, in der nur die mRNA Ebene (qPCR) untersucht wurde, nicht detektiert werden konnte.

Die *CD133* Expression zeigte im Vergleich der sekundären zu den primären Glioblastomen keine signifikanten Unterschiede. Obwohl neuere Erkenntnisse darauf hindeuten,

dass es sich hierbei um biologisch doch deutlich unterschiedliche Tumorentitäten handeln könnte, scheint sich zumindest die *CD133* Expression in beiden Subgruppen ähnlich zu verhalten (Ricard et al., 2012). Dies könnte daraufhin deuten, dass Tumorstammzellen bei beiden Glioblastomsubgruppen in größerer Anzahl vorhanden sind. Zu bedenken bleibt jedoch auch hierbei, dass *CD133* weiterhin als relativ unspezifischer Stammzellmarker angesehen werden muss.

Interessanterweise zeigte sich eine höhere *CD133* Expression bei primären Grad III Tumoren im Vergleich zu sekundären Grad III Tumoren, wobei die Unterscheidung hierbei basierend auf den klinischen Verläufen erfolgte. Während primäre Grad III Tumoren ähnlich wie die primären Glioblastome „de novo“ entstanden waren, waren die sekundären Grad III Tumoren aus einem niedrig-gradigeren Vorläufertumor hervorgegangen.

Die zuletzt aktualisierte WHO Klassifikation der Hirntumoren von 2007 fordert eine Unterscheidung zwischen Grad III Tumoren und Glioblastomen anhand von Kriterien wie Gefäßproliferaten, Nekrosezonen und anderen morphologischen Kriterien, welche zumindest in gewissem Maße einer subjektiven Wertung unterliegen (Louis et al., 2007). Die Definition von objektiven Biomarkern ist daher von zunehmendem Interesse (van den Bent MJ, 2010).

Vor diesem Hintergrund könnte man spekulieren, ob es sich bei den untersuchten „primären Grad III Tumoren“ nicht auch um „unterdiagnostizierte“ Grad IV Tumoren handeln könnte. Letztendlich wäre eine Beantwortung dieser Frage jedoch nur möglich, wenn auch die klinischen Verläufe für aggressivere Tumoren sprechen als die „sekundären Grad III Tumoren“. Grundsätzlich denkbar wäre jedoch, dass *CD133* einen zusätzlichen molekularen Marker für ein maligneres Wachstumsverhalten von primären Gliomen darstellt, welcher durch die rein morphologische Gradierung bisher nicht zu erfassen war.

Denkbar wäre es jedoch auch, dass die Grad III Gliome eine heterogene Tumorgruppe darstellen, ähnlich den Glioblastomen, in der es Tumoren mit unterschiedlichen genetischen Profilen gibt. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Gliom-Subgruppen eine unterschiedlich hohe Expression von Stammzellmarkern aufweisen. Da die Analyse der Unterschiede der Expression anderer Gene zwischen diesen Tumorgruppen jedoch nicht Teil dieser Arbeit war, kann diese Frage nicht abschließend beantwortet werden.

Eine unterschiedliche Entwicklung in der *CD133* Expression fiel auch im Vergleich der primären und sekundären Glioblastome in Abhängigkeit von einer vorherigen Chemotherapie auf.

Während bei den sekundären Glioblastomen nur zwei, biologisch unabhängige Gruppen zur Verfügung standen, welche entweder im vorherigen Krankheitsverlauf eine Chemotherapie erhalten hatten (sGBM+Cx) oder nicht (sGBM-Cx), lagen von Patienten mit primären Glioblastomen ähnliche Gruppen vor (pGBM+Cx/-Cx) zusätzlich jedoch auch Proben von 10 individuellen Verläufen, bei denen Tumorgewebe in der Situation des Primärtumors und des Rezidivtumors gewonnen werden konnte (pGBM prim/ pGBM Rez). Somit bestand für die primären Glioblastome sowohl die Möglichkeit biologisch/statistisch unabhängige Proben zu untersuchen als auch Proben von Individualverläufen.

Während sich bei den sekundären Glioblastomen ein Trend zu einer niedrigeren *CD133* Expression nach vorheriger Chemotherapie andeutete, lag die Expression von *CD133* bei den primären Glioblastomen in beiden Gruppen (unabhängige Patienten und Individualverläufe) höher nach einer vorherigen Chemotherapie.

Hierbei könnten die erwähnten biologischen Unterschiede zwischen primären und sekundären Glioblastomen zum Tragen kommen, auch wenn in beiden Subtypen eine erhöhte Expression von *CD133* vorhanden zu sein scheint.

So könnte der Anstieg der *CD133* Expression im Tumorreizidiv bei den primären Glioblastomen der Beobachtung entsprechen, dass Tumorstammzellen in besonderem Maße chemoresistent sind und daher nach erfolgter Therapie bzw. im Rezidivfall einen höheren Anteil an der Tumormasse einnehmen (Bao et al., 2006; Liu, 2006). Bei den sekundären Glioblastomen scheint dieser Effekt dagegen entweder nicht zum Tragen zu kommen oder die dortige *CD133*+ Zellpopulation ist empfindlicher für eine chemotherapeutische Behandlung möglicherweise bedingt durch die *IDH1* Mutation, die zu einer erhöhten Chemosensitivität führen könnte (Mohrenz et al., 2013).

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Expression von *CD133* und *IDH1 mut* zeigte keine Korrelation bei den untersuchten 92 Proben, von denen sowohl *IDH1 mut* als auch *CD133* Daten vorlagen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die *IDH1 mut* eine frühe Mutation in der Entstehung der Gliome darstellt und daher davon ausgegangen werden kann, dass sämtliche Tumorzellen, unabhängig ob Tumorstammzellen oder daraus hervorgegangene sekundäre Tumorzellen, die Mutation tragen (Watanabe et al.,

2009; Kim et al., 2010). Aber auch hierbei muss bedacht werden, dass *CD133* ein relativ unspezifischer Stammzellmarker ist, so dass andererseits die hohe *CD133* Expression in Glioblastomen auch auf eine Zunahme endothelialer Stammzellen oder anderer CD133+ Zellen zurückzuführen sein könnte.

V. Zusammenfassung

Gliome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren des zentralen Nervensystems bei erwachsenen Patienten (Ricard et al., 2012). Die *IDH1* Mutation tritt vermehrt auf bei niedriggradigen Gliomen und sekundären Glioblastomen und scheint eine frühe Mutation in der Entstehung dieser Tumoren darzustellen (Watanabe et al., 2007). Auch sogenannten Gliomstammzellen wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Gliome unterstellt. Eines der am häufigsten verwandten Marker stellt hierbei *CD133* dar (Singh et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht wie sich die Expression von *IDH1 mut/IDH1 wt* und *CD133* in Gliomen verschiedener Grade und nach vorheriger Chemotherapie verhält. Darüber hinaus wurde untersucht wie sich die Expression dieser Gene im longitudinalen Verlauf bei individuellen Patienten verhält. Hierzu wurden Proben entsprechender Patienten identifiziert, die mRNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Expression der genannten Gene wurde mittels qPCR analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die qPCR eine sensitive und spezifische Methode zur Festlegung des *IDH1 mut* Status darstellt. Darüber hinaus zeigte sich in der Quantifizierung eine zunehmende Expression von *IDH1 mut* mit dem Gliomgrad, welche mit fortschreitender Malignisierung auch zunehmend unabhängig ist von der *IDH1 wt* Expression. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch im individuellen Krankheitsverlauf. Sowohl bei den Individualverläufen als auch in der Gruppenanalyse zeigte sich eine niedrigere *IDH1 mut* Expression nach einer vorherigen Chemotherapie, so dass *IDH1 mut* Zellen in besonderem Maße anfällig für die toxischen Effekte der Chemotherapie sein könnten.

Die Expression von *CD133* war insbesondere bei Glioblastomen erhöht, während bei den Grad II und III Tumoren keine höhere Expression zu verzeichnen war. Die Ergebnisse bestätigen dabei nur teilweise die Literaturdaten. Obwohl kein Unterschied in der *CD133* Expression zwischen primären und sekundären Glioblastomen bestand, waren unterschiedliche Tendenzen in der Expression nach einer vorherigen Chemotherapie zu beobachten. Während bei primären Glioblastomen die *CD133* Expression anstieg, fiel sie bei sekundären Glioblastomen ab. Dies könnte ein weiterer Ausdruck der vermuteten biologischen und genetischen Unterschiede zwischen primären und sekundären Glioblastomen darstellen. Eine Korrelation zwischen der Expression von *IDH1 mut* und *CD133* lag nicht vor.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die gestiegene Wertigkeit molekularer Marker in der Einteilung der Gliome. Die Quantifizierung der *IDH1* Mutation weist dabei Parallelen zur Progression von Gliomen auf, zur Bestätigung dieser Ergebnisse sind jedoch weitere Arbeiten erforderlich.

VI. Literaturverzeichnis

1. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Lin N, Mattox AK, Bigner DD (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 18(8): 1061-83.
2. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64 (15): 5245-50.
3. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116: 596-602.
4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444 (7120): 756-60.
5. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, Bardelli A (2009). IDH1 mutations at residue p.R 132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Human Mutat* 30(1): 7-11.
6. Boisselier B, Marie Y, Labussiere M, Ciccarino P, Desestret V, Wang X, Capelle L, Delattre JY, Sanson M (2010). COLD PCR HRM: a highly sensitive detection method for IDH1 mutations. *Hum Mutat* 31(12): 1360-5.
7. Brandes AA, Pasetto LM, Vastola F, Monfardini S (2000). Temozolomide in patients with high grade gliomas. *Oncology* 59(3): 181-6.
8. Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Mol Endocrinol* 25(2): 169-93.

9. Bujko M, Kober P, Nauman P, Dyttus-Cebulok K, Czeremszynska B, Bonicki W, Siedlecki JA (2010). Prognostic value of IDH1 mutations identified with PCR-RFLP assay in glioblastoma patients. *Mol Diagn Ther* 14(3): 163-9.
10. Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jäger D, Ackermann U, Tessmer C, Korshunov A, Zentgraf, Hartmann C, von Deimling A (2010). Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 20(1): 245-54.
11. Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, Kim JC, Louis DN and Nutt CL (2010). Mutant IDH1-specific immunohistochemistry distinguishes diffuse astrocytoma from astrocytosis. *Acta Neuropathol* 119: 509-11.
12. Clevers H (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17: 313-9.
13. Cooper LA, Gutman DA, Long Q, Johnson BA, Cholleti SR, Kurc T, Saltz JH, Brat DJ, Moreno CS (2010). The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas. *PLoS One* 5(9): e12548. doi: 10.1371/journal.pone.0012548.
14. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 10;462(7274):739-44.
15. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7:11-20.
16. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 19345-50.

17. Felsberg J, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Göppert M, Sabel MC, Reifenberger G (2010). Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol* 119(4): 501-7.
18. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80(1): 65-72.
19. Gannet DE, Wisbeck WM, Silbergeld DL, Berger MS (1994). The role of postoperative irradiation in the treatment of oligodendroglioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 (3): 567-73.
20. Geisbrecht BV, Gould SJ (1999). The human PCID gene encodes a cytoplasmatic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 274: 30527-33.
21. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.
22. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A (2009): Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 118(4): 469-74.
23. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10): 997-1003.
24. Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, Kristensen BW (2011). Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem* 59(4): 391-407.

25. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H (2006). Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(9): 846-54.
26. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39: 193-206.
27. Juratli TA, Peitzsch M, Geiger K, Schackert G, Eisenhofer G, Krex D (2013). Accumulation of 2-hydroxyglutarate is not a biomarker for malignant progression in IDH1-mutated low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 15(6): 682-90.
28. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2009). Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* 125(2): 353-5.
29. Kim Yh, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, Vital A, Mariani L, Stawski R, Watanabe T, De Girolami U, Kleihues P, Ohgaki H (2010). Molecular classification of low-grade diffuse glioma. *Am J Pathol* 177(6): 2708-14.
30. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretschmar HA, Egensperger R, Kreth FW (2010). Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol* 12(6): 570-9.
31. Leighton C, Fisher B, Bauman G, Depiero S, Stitt L, MacDonald D, Cairncross G (1997). Supratentorial low-grade glioma in adults: an analysis of prognostic factors and timing of radiation. *J Clin Oncol* 15(4): 1294-301.
32. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5:67.

33. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114: 97-119.
34. Loussouarn D, Le Loupp AG, Frenel JS, Leclair F, von Deimling A, Aumont M, Martin S, Campone M, Denis MG (2012). Comparison of immunohistochemistry, DNA sequencing and allele-specific PCR for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *Int J Oncol* 40: 2058-62.
35. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483(7390): 474-8.
36. Ma YH, Mentlein R, Friederike K, Kruse ML, Mehdorn M, Janka HF (2007). Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*. 86: 31-45.
37. Maher EA, Marin-Valencia I, Bachoo RM, Mashimo T, Raisanen J, Hatanpaa KJ, Jindal A, Jeffrey FM, Choi C, Madden C, Mathews D, Pascual JM, Mickey BE, Malloy CR, DeBerardinis RJ (2012). Metabolism of [U-13 C]glucose in human brain tumors in vivo. *NMR Biomed*. 25(11): 1234-44.
38. Meyer J, Pusch S, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Hartmann C, von Deimling A (2010). PCR- and restriction endonuclease based detection of IDH1 mutations. *Brain Pathol* 20(2): 298-300.
39. Mohrenz IV, Antonietti P, Pusch S, Capper D, Balss J, Voigt S, Weissert S, Mukrowsky A, Frank J, Senft C, Seifert V, von Deimling A, Kögel D (2013). Isocitrate dehydrogenase 1 mutant R132H sensitizes glioma cells to BCNU-induced oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 18(11): 1416-25.

40. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumor cells with defective mitochondria. *481(7381)*: 385-8.
41. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 539-43.
42. Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, Bradley RD, Baker RJ (1998). Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Molec Biol Evol* 15: 1674-84.
43. Nounshmer H, Weisenberger DJ, Diefes K, Philips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, van den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17 (5): 510-22.
44. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maikora PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19): 6892-9.
45. Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170: 1445-53.
46. Ohgaki H, Kleihues P (2011). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28: 177-83.
47. Ohgaki H, Kleihues P (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19(4): 764-72.

48. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321(5897): 1807-12.
49. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9(3): 157-73.
50. Portais JC, Voisin P, Merle M, Canioni P (1996). Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR. *Biochimie* 78(3): 155-64.
51. Presner JR, Chinnaiyan AM (2011). Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat Med* 17: 291-3.
52. Preusser M, Capper D, Hartmann C (2011). IDH1 testing in diagnostic neuropathology: review and practical guideline article invited by the Euro-CNS research committee. *Clin Neuropathol* 30: 217-30.
53. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-11.
54. Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY (2012). Primary brain tumors in adults. *Lancet* 379 (9830): 1984-96.
55. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 27(25): 4150-4.
56. Scaffidi P, Misteli T (2011). In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. *Nat Cell Biol* 13(9): 1051-61.

57. Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirov V, Kramm CM, Pietsch T, Waha A (2010). A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J Mol Diagn* 12(6): 750-6.
58. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, Simon M, Marie Y, Boisselier B, Delattre JY, Hoang-Xuan K, El Hallani S, Idbaih A, Zelenika D, Andersson U, Henriksson R, Bergenheim AT, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Schramm J, Linnebank M, Hemminki K, Kumar R, Hepworth SJ, Price A, Armstrong G, Liu Y, Gu X, Yu R, Lau C, Schoemaker M, Muir J, Swerdlow A, Lathrop M, Bony M, Houlston RS (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 41(8): 899-904.
59. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-28.
60. Soffietti R, Baumert BG, Bello L, von Deimling A, Duffeau H, Frenay M, Grisold W, Grant R, Graus F, Hoang-Xuan K, Klein M, Melin B, Rees J, Siegal T, Smits A, Stupp R, Wick W (2010). Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO Task Force. *Eur J Neurol* 17(9): 1124-33.
61. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M (2011). Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien)* 153: 1211-18.
62. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10): 987-96.
63. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ,

Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase II study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10(5): 459-66.

64. Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn JC, Goldbrunner R (2010). Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci* 43(1): 51-9.

65. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483(7390): 479-83.

66. Van den Bent MJ (2010). Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 120: 297-30.

67. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research Network (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 17(1):98-110.

68. Wan F, Zhang S, Xie R, Gao B, Campos B, Herold-Mende C, Lei T (2010). The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioblastoma stem cell research. *Brain Pathol* 20(5): 877-89.

69. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a

neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17(3): 225-34.

70. Watanabe K, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174: 1149-53.

71. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-24.

72. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.

73. Weller M, Wick W, Hegi ME, Stupp R, Tabatabai G (2010). Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncol* 6(9): 1407-14.

74. Wick W, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, Sabel MC, Koepfen S, Ketter R, Weiler M, Tabatabai G, von Deimling A, Gramatzki D, Westphal M, Schackert G, Loeffler M, Simon M, Reifenberger G, Weller M (2013). Prognostic or predictive value of MGMT promotor methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 81(17): 1515-22.

75. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, Ballman KV, Berger M, Buckner JC, Chang S, Giannini C, Halder C, Kollmeyer TM, Kosel ML, LaChance DH, McCoy L, O'Neill BP, Patoka J, Pico AR, Prados M, Quesenberry C, Rice T, Ryneerson AL, Smirnov I, Tihan T, Wiemels J, Yang P, Wiencke JK (2009). Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet* 41: 905-8.

76. Xu W, Yang H, Liu Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19(1):17-30

77. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Frieman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360(8): 765-73.
78. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR (2010). Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 29(49): 6409-17.
79. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14(1): 123-9.
80. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*. 10;324(5924):261-5.

VII. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Qualitative and quantitative analysis of IDH1 mutation in progressive glioma by real-time RT-PCR.

Perrech M, Dreher L, Röhn G, Toliat M, Breuer N, Tijong R, Goldbrunner R, Timmer M.
Submitted in J Neurooncol.

„Analysis of IDH1 mut expression in human astrocytoms by rt-PCR“

Perrech M, Dreher L, Roehn G, Goldbrunner R, Timmer M.

Neuro-Oncology. 2013; 15 Suppl. 3: 149, 4. Meeting der WFNO zusammen mit 18.
Jahrestagung der SNO, San Francisco, November 2013.

„CD133 expression in human gliomas of different grades before and after chemotherapy and in the recurrent situation quantified by real-time RT-PCR“

Perrech M, Röhn G, Goldbrunner R, Timmer M.

GMS Ger Med Sci. 2013, DOI: 10.3205/13dgnc558; 64. Jahrestagung der DGNC, Düsseldorf.

VIII. Anhang

VIII.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gradeinteilung und histologische Merkmale der Gliome sowie der histologischen Subtypen	2
Abbildung 2: Unterschiede in den genetischen Profilen von primären Glioblastomen, sekundären Glioblastomen und Oligodendrogliomen	4
Abbildung 3: Frequenz der <i>IDH1/IDH2</i> Mutation in Gliomen.	7
Abbildung 4: Intrazelluläre Einflüsse von 2-Hydroxyglutarat in <i>IDH1</i> mut Zellen	8
Abbildung 5: Darstellung der Ct-Werte der Referenzgene (qPCR Analyse).....	23
Abbildung 6: <i>IDH1</i> mut Expression nach Gliomgrad (alle Proben).....	30
Abbildung 7: Anteil der <i>IDH1</i> mut Patienten bei WHO Grad II bis IV Gliomen (Sequenzierung).....	32
Abbildung 8: <i>IDH1</i> mut Expression in peritumoralen Gewebe (qPCR & Sequenzierung).....	35
Abbildung 9: Quantifizierung der <i>IDH1</i> mut Expression nach Gliomgrad (<i>IDH1</i> mut Proben)	36
Abbildung 10: <i>IDH1</i> mut Expression in primären und Rezidiv-Grad III Gliomen.....	37
Abbildung 11: <i>IDH1</i> mut Expression in Abhängigkeit des histologischen Subtyps.....	38
Abbildung 12: <i>IDH1</i> mut Expression in sGBM in Abhängigkeit von vorheriger Chemotherapie.....	38
Abbildung 13: <i>IDH1</i> mut Expression in Patienten mit progressiven Gliomen (gepoolte Analyse).....	39
Abbildung 14 a-d: Darstellung der individuellen <i>IDH1</i> mut Expression über den Krankheitsverlauf bei progressiven Gliomen	40
Abbildung 15: <i>IDH1</i> wt Expression in verschiedenen Gliomsubgruppen	41
Abbildung 16: <i>IDH1</i> wt Expression in Abhängigkeit des histologischen Subtyps	42
Abbildung 17: <i>IDH1</i> wt Expression in primären und sekundären GBM mit / ohne vorherige Chemotherapie	43
Abbildung 18: <i>IDH1</i> wt Expression in Individualverläufen malignisierender Gliome (gepoolte Analyse)	45
Abbildung 19 a-c: Entwicklung der <i>IDH1</i> wt Expression in Individualverläufen bei progressiven Gliomen.....	45
Abbildung 20: <i>IDH1</i> wt Expression in Individualverläufen primärer Glioblastome (Gruppenanalyse).....	45
Abbildung 21: <i>IDH1</i> wt Expression in Individualverläufen primärer Glioblastome (Einzeldarstellung)	45
Abbildung 22: Korrelation zwischen der Expression von <i>IDH1</i> wt und <i>IDH1</i> mut	46
Abbildung 23 a-c: Korrelation zwischen <i>IDH1</i> mut und wt Expression nach Tumorgrad.....	47
Abbildung 24: <i>CD133</i> Expression nach Tumorgrad.....	49

Abbildung 25: Vergleich der <i>CD133</i> Expression zwischen primären und Rezidiv Grad III Gliomen	49
Abbildung 26: Vergleich der <i>CD133</i> Expression zwischen astrozytären und oligastro- zytären Tumoren.....	50
Abbildung 27: Einfluss vorheriger chemotherapeutischer Behandlung auf die <i>CD133</i> Expression in primären und sekundären GBM	51
Abbildung 28: Darstellung der <i>CD133</i> Expression der Individualverläufe (gepoolte Anaylse)	53
Abbildung 29 a-e: Einzeldarstellung der <i>CD133</i> Expression der Individualverläufe	53
Abbildung 30: Korrelation zwischen <i>IDH1 mut</i> und <i>CD133</i> Expression	55

VIII.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: Expressionsstabilität der untersuchten Referenzgen.....	23
Tabelle 3: Übersicht über die eingeschlossenen Patienten.....	28
Tabelle 4: Übersicht über die verabreichten Chemotherapeutika.....	28
Tabelle 5: Alters- und Geschlechtsverteilung sowie Tumorlokalisation.....	29
Tabelle 6: Übersicht über die Expression der <i>IDH1</i> Mutation in verschiedenen Gliomgraden und nach vorheriger Therapie.....	30
Tabelle 7: Anteil der <i>IDH1 mut</i> Proben an der Gesamtheit der Proben und Patientenbezogen (Sequenzierung).....	31
Tabelle 8: Anteil der <i>IDH1</i> Mutation (insgesamt) und G395A Mutation in den Patientensubgruppen (Sequenzierung).....	32
Tabelle 9: <i>IDH1 mut</i> Expression in den einzelnen Proben	34
Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität der qPCR.	34
Tabelle 11: Übersicht über die <i>IDH1 mut</i> Expression in Abhängigkeit von Tumorgrad und vorheriger Chemotherapie.....	37
Tabelle 12: Übersicht über die klinischen und epidemiologischen Daten der Individualverläufe (<i>IDH1 mut</i> Analyse).....	39
Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der <i>IDH1 wt</i> Expression nach Gliomgrad.	41
Tabelle 14: Klinische und epidemiologische Daten der Individualverläufe von Patienten mit progressiven Gliomen (<i>IDH1 wt</i> Analyse).	43
Tabelle 15: Klinische und epidemiologische Daten der Individualverläufe von Patienten mit pGBM (<i>IDH1 wt</i> Analyse)	44
Tabelle 16: Übersicht über die Tumorgruppen der <i>CD133</i> Analyse (epidemiologische Daten und <i>CD133</i> Expression)	48
Tabelle 17: Epidemiologische und klinische Daten der Patienten der <i>CD133</i> Expressionsanalyse.	52

IX. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.