

Aus dem Institut für allgemeine und spezielle Pathologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle

Vergleich der Immunhistochemie mit molekularpathologischen Methoden zur Detektion der IDH-1 Mutation in Gliomen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Eva Heubeck (geb. Binder)

geboren am: 08.03.1989 in Gunzenhausen

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm (10 ⁻⁶) |
| µl | Mikroliter (10 ⁻⁶) |
| µm | Mikrometer (10 ⁻⁶) |
| µM | Mikromol (10 ⁻⁶) |
| á | Je |
| AA | Anaplastisches Astrozytom |
| AL Buffer | Lysis Buffer |
| AO | Anaplastisches Oligodendrogliom |
| AOA | Anaplastisches Oligoastrozytom |
| aqua dest | Aqua destillata |
| ATL buffer | Tissue Lysis Buffer |
| AW1 buffer | Wash Buffer |
| AW2 buffer | Wash Buffer |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | Beziehungsweise |
| CCD Kamera | Charge-coupled device Kamera |
| CO ₂ | Kohlendioxyd |
| FMCA | Fluorescent melting curve analysis |
| d.h. | Das heißt |
| DA | Diffuses Astrozytom |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| ddNTP | Didesoxyribonukleotid-Triphosphat |
| dH ₂ O | Destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| CTP | Cytosintri-phosphat |
| GTP | Guanintri-phosphat |
| TTP | Thymintri-phosphat |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-Triphosphat |
| DOA | Diffuses Oligoastrozytom |
| EB Buffer | Elution Buffer |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| et al. | Und andere |
| EtOH | Ethanol |
| FFPE | Formalin fixed and paraffin embedded |
| HE | Hämatoxylin und Eosin |
| Hi-Di Formamide | Highly deionized Formamide |
| HIF-1 alpha | Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IHC | Immunhistochemie |
| IDH-1 | Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-1 R132C | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-1 R132G | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-1 R132H | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-1 R132L | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |

| | |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| IDH-1 R132S | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-1 R132V | Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 |
| IDH-2 | Isocitratdehydrogenase 2 |
| IRS | Immunreaktiver Score |
| LOH | Loss of Heterozygosity |
| M | Molar |
| Mg²⁺ | Magnesium ²⁺ |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter (10 ⁻³) |
| mM | Millimolar (10 ⁻³) |
| MR-Spektroskopie | Magnet-Resonanz Spektroskopie |
| n | Anzahl |
| NADP⁺, NADPH/H⁺ | Nicotinamidadeninukleotidphosphat |
| ng | Nanogramm (10 ⁻⁹) |
| nm | Nanomol (10 ⁻⁹) |
| Nr. | Nummer |
| OP | Operation |
| p | Kurzer Arm des Chromosoms |
| PB Buffer | Binding Buffer |
| PCR | Polymerase chain reaction: Polymerasekettenreaktion |
| PE Buffer | Wash Buffer |
| pGBM | Primäres Glioblastom |
| pH | potentium hydrogenii (-log [H ₃ O ⁺]) |
| pmol | Picomol (10 ⁻¹²) |
| PTEN gene | Gen der Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) |
| q | Langer Arm des Chromosoms |
| QG Puffer | Solubilization and Binding Buffer |
| R110 | Fluoreszenzfarbstoff |
| R6G | Fluoreszenzfarbstoff |
| ROX | Fluoreszenzfarbstoff |
| rpm | Rounds per minute |
| SD | Standard deviation, Standardabweichung |
| sGBM | Sekundäres Glioblastom |
| SPSS | Superior Performing Software System |
| TAMRA | Fluoreszenzfarbstoff |
| Taq Polymerase | Thermostabile DNA-Polymerase |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA-Puffer |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TP53 gene | Für das Protein p53 kodierende Gen |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| WHO | World Health Organization |
| WT | Wildtyp |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 8 |
| 1.1 | Summary..... | 10 |
| 2 | Einleitung | 12 |
| 3 | Material und Methodik | 18 |
| 3.1 | Patientenmaterial..... | 18 |
| 3.2 | Immunhistochemische Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation..... | 19 |
| 3.2.1 | Herstellung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte | 19 |
| 3.2.2 | IDH-1 Immunhistochemie | 20 |
| 3.2.3 | Auswertung | 22 |
| 3.3 | Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation durch Sanger Sequenzierung | 24 |
| 3.3.1 | Prinzip der Sequenzierung nach Sanger | 24 |
| 3.3.2 | DNA Isolierung aus FFPE Material | 24 |
| 3.3.3 | Amplifikation der isolierten DNA..... | 26 |
| 3.3.4 | Cycle Sequencing Reaktion..... | 30 |
| 3.3.5 | Sequenzanalyse | 32 |
| 3.4 | Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation durch Fragmentanalyse | 34 |
| 3.4.1 | Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Serum | 34 |
| 3.4.2 | Snap Shot PCR..... | 37 |
| 3.4.3 | Fragmentanalyse | 39 |
| 4 | Statistische Verfahren | 41 |
| 5 | Ergebnisse | 42 |
| 5.1 | Klinische Daten | 42 |
| 5.2 | Detektion der IDH-1 R132H Mutation..... | 43 |
| 5.2.1 | IDH-1 R132H Immunhistochemie..... | 43 |
| 5.2.2 | Sequenzierung | 46 |
| 5.2.3 | Fragmentanalyse | 47 |
| 5.2.4 | Serumanalyse | 48 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3 | Vergleich der einzelnen Nachweisverfahren und Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 49 |
| 5.4 | Überlebenszeitanalyse | 51 |
| 5.4.1 | IDH-1 R132H Immunhistochemie..... | 51 |
| 5.4.2 | Sequenzierung..... | 52 |
| 5.4.3 | Fragmentanalyse | 53 |
| 6 | Diskussion | 55 |
| 6.1 | Detektion der IDH-1 R132H Mutation..... | 55 |
| 6.1.1 | IDH-1 R132H Immunhistochemie..... | 55 |
| 6.1.2 | Sequenzierung..... | 56 |
| 6.1.3 | Fragmentanalyse | 58 |
| 6.1.4 | Serumanalyse | 60 |
| 6.2 | Vergleich der einzelnen Nachweisverfahren..... | 61 |
| 6.3 | Überlebenszeitanalyse | 64 |
| 6.4 | Ausblick..... | 65 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 67 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis..... | 75 |
| 9 | Diagrammverzeichnis | 76 |
| 10 | Tabellenverzeichnis..... | 77 |
| 11 | Anhang..... | 78 |
| 11.1 | Material- und Geräte-Liste | 78 |
| 11.1.1 | Immunhistochemie, HE-Färbung..... | 78 |
| 11.1.2 | Sequenzierung und Fragmentanalyse | 79 |
| 12 | Publikationen | 84 |
| 13 | Danksagung | 85 |

1 Zusammenfassung

Glioblastome sind primäre Hirntumoren, welche mit einer sehr schlechten Prognose behaftet sind. Abhängig vom gewählten Therapieregime liegt die 1-Jahres-Überlebensrate zwischen 35% und 41%. Es konnte gezeigt werden, dass sich primäre und sekundäre Glioblastome bezüglich ihres IDH-1 R132H Mutationsstatus unterscheiden. Hierbei handelt es sich um eine somatische Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 das Codon 132 betreffend, welche zu einem Aminosäureaustausch führt. Aufgrund eines veränderten metabolischen Produktes führt dies zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber oxidativem Stress und somit zu einem verlängerten Überleben dieser Patienten. Die Mutation tritt sehr früh in der Gliomentstehung auf und stellt einen prognostischen Marker dar, der einen Hinweis auf das Ansprechen der Chemo- und Radiotherapie liefert und somit das therapeutische Vorgehen beeinflussen kann. Um dieses Wissen in einer personalisierten Therapie nutzen zu können ist eine schnelle und sichere Detektionsmethode dieser Mutation notwendig.

Da eine Tumorlokalisierung in eloquenten Hirnarealen ausgedehnte Tumorresektionen unter Erhalt der Lebensqualität der Patienten unmöglich macht und die Diagnose in diesen Fällen möglicherweise nur durch eine stereotaktische Biopsie gesichert wird, deren Größe für ausgedehnte Untersuchungen des Tumorgewebes nicht ausreichen, sind zusätzlich non-invasive Detektionsmethoden sinnvoll, um auch diesen Patienten eine Aussage über ihren Mutationsstatus liefern zu können.

Ziele dieser Arbeit waren daher:

- 1.) Verschiedene Detektionsmethoden dieser Mutation (Immunhistochemie, Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse) miteinander hinsichtlich Sensitivität und Spezifität sowie ihrer Durchführbarkeit im klinischen Alltag zu vergleichen sowie zusätzlich eine neue, non-invasive Detektionsmethode dieser Mutation („liquid-biopsy“) zu etablieren.
- 2.) Aufzuzeigen, durch welche der drei gewebebasierten Methoden die Prognose des Patienten am besten vorhergesagt werden kann.

Zum Nachweis der IDH-1 R132H Mutation wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe von 43 Glioblastom-Patienten sowie von 42 Patienten mit WHO-Grad II oder III Gliomen mittels IDH-1 R132H Immunhistochemie, Sequenzierung und Fragmentanalyse auf das Vorhandensein dieser Mutation untersucht. Zudem wurde DNA aus den Seren von 24 dieser Patienten isoliert und auf die IDH-1 R132H Mutation untersucht. Des Weiteren wurden die klinischen

Daten der 43 Glioblastom-Patienten analysiert und abhängig vom Mutationsstatus, der durch die jeweiligen Methoden ermittelt wurde, eine Lebenszeitanalyse durchgeführt.

Die IDH-1 R132H Mutation konnte am sensitivsten und mit geringstem zeitlichen Aufwand durch die IDH-1 R132H Immunhistochemie nachgewiesen werden. Auch bei sehr diffusen Neoplasien konnten auf diese Weise einzelne IDH-1 R132H positive Tumorzellen, anders als bei den anderen Methoden, detektiert werden. Die Fragmentanalyse zeigte sich vor allem bei kleinen Biopsien und diffusen Neoplasien der Sequenzierung überlegen. Der Nachweis der IDH-1 R132H Mutation im Serum dieser Patienten gelang nicht, was höchstwahrscheinlich auf die zu hohe Konzentration nicht-Tumor-spezifischer DNA zurückzuführen ist. Künftig muss weiter daran gearbeitet werden, den Anteil an nicht-Tumor DNA zu reduzieren, um eine spezifischere Amplifikation des gesuchten DNA Fragments zu erreichen.

Mit Hilfe der Lebenszeitanalysen konnte gezeigt werden, dass Glioblastompatienten mit IDH-1 R132H Mutation ein längeres Gesamtüberleben aufweisen als Glioblastompatienten ohne IDH-1 R132H Mutation. Die Prognose konnte am zuverlässigsten durch den mittels IDH-1 R132H Immunhistochemie detektierten Mutationsstatus vorhergesagt werden.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit ermittelten Daten, dass sich die IDH-1 R132H Immunhistochemie hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit, der Detektionsrate sowie dem prognostischen Vohersagewert am besten für den Gebrauch im klinischen Alltag eignet und einsetzen lässt.

1.1 Summary

Comparison of immunohistochemistry to molecular pathological methods for the detection of IDH-1 mutation in gliomas

Glioblastomas are primary brain tumours with a very poor prognosis. Depending on the chosen therapy the one year survival rate ranges between 35% and 41%. Recent studies showed that both entities differ in their IDH-1 R132H mutational status. It is a somatic point mutation affecting the isocitratdehydrogenase 1 gene in codon 132 which leads to an amino acid exchange. Due to a different metabolic product tumour cells are more vulnerable to oxidative stress. This may be responsible for a longer survival of patients. This mutation is an early event in the genesis of glioma and a prognostic parameter which gives a hint to the response to chemotherapy and radiotherapy and may affect therapy regimes. To use this knowledge in a personalized therapy it is necessary to detect the mutational status quickly and efficiently.

Tumour location in eloquent brain areas make gross tumour resections impossible without impairing the patient's life quality. In these cases diagnosis may be confirmed with a stereotactical biopsy which is too small for extended examinations. That's why a non-invasive method is desirable to detect the mutational status of those patients.

Purpose of this study was:

- 1.) To compare different detection methods of this mutation (immunohistochemistry, Sanger sequencing and fragment analysis) in terms of sensitivity, specificity and usability in daily routine and to establish a new, non-invasive detection method („liquid biopsy“).
- 2.) To find out which of these tissue based methods is the best to estimate the patient's prognosis.

For the detection of the IDH-1 R132H mutation in formalin fixed and paraffin embedded tumour tissue of 43 glioblastomas and 42 WHO grade II or III tumours, immunohistochemistry, Sanger sequencing and fragment analysis were used. In addition, DNA was isolated from the serum of 24 of these patients and examined for the IDH-1 R132H mutation. Furthermore, the clinical data of 43 glioblastoma patients were analysed and in response to the mutational status, detected by the different methods, lifetime analysis was performed.

The most sensitive and efficient way to detect the IDH-1 R132H mutation was the IDH-1 R132H immunohistochemistry. Different to the other methods it was even possible to detect single IDH-1

R132H positive tumour cells in very diffuse neoplasia. Fragment analysis showed superior to Sanger sequencing especially in small biopsies and diffuse neoplasia. The detection of the IDH-1 R132H mutation in serum DNA of these patients did not succeed owing to the high concentration of non-tumour-specific DNA. In the future, reduction of the amount of non-tumour DNA in those samples might be a way to amplify the tumour DNA fragment more specifically. Regarding the survival time it could be shown that patients with IDH-1 R132H mutations had a longer overall survival than those without. The prognosis was best predicted by the IDH-1 R132H status detected by immunohistochemistry.

Overall, the obtained data in this work shows that IDH-1 R132H immunohistochemistry is the most appropriate method to use in daily routine in terms of feasibility, detection rate as well as the predictive value to estimate the patient's remaining lifetime.

2 Einleitung

Glioblastome sind mit 12-15% die am häufigsten vorkommenden primären Hirntumoren (Kleihues et al. 2007). Mit einem Anteil von 60-75% machen sie außerdem den größten Anteil aller astrozytärer Tumore aus (Kleihues et al. 2007). Obwohl sich Glioblastome in jedem Alter manifestieren können, sind vor allem Patienten im mittleren Lebensalter zwischen 45-75 Jahren betroffen (Kleihues et al. 2007).

Glioblastome haben ihren Ursprung, wie alle Gliome, in den Gliazellen. Abhängig von ihrem histologischen Differenzierungsgrad werden Gliome in vier verschiedene WHO-Grade eingeteilt. WHO-Grad I und II Gliome werden als low-grade Gliome zusammengefasst, WHO-Grad III und IV Gliome hingegen als high-grade Gliome. Anhand dieser Einteilung wird versucht einen Rückschluss auf das Therapieansprechen und die Prognose zu ziehen (Kleihues et al. 2007).

Histopathologisch sind Glioblastome durch Kernatypien, Zellpleomorphie, gesteigerte mitotische Aktivität, vaskuläre Thrombosen, mikrovaskuläre Proliferation sowie strichförmige Nekrosen gekennzeichnet und sind einem WHO-Grad IV zuzuordnen (Kleihues et al. 2007). Trotz maximal ausgeschöpfter Therapieversuche mit ausgedehnten chirurgischen Resektionen, adjuvanter Strahlentherapie und hochdosierter Chemotherapie sind Glioblastome mit einer sehr schlechten Prognose behaftet. Nach einer Meta-Analyse von 12 randomisiert-kontrollierten Studien liegt die 1-Jahres-Überlebensrate, abhängig vom gewählten Therapieregime, zwischen 35% und 41%. Die 2-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 9% und 13% (Stewart 2002).

Lokalisiert sind Glioblastome vorwiegend im Temporal-, Parietal-, Frontal- oder Occipitallappen subcortikal in der weißen Substanz. Häufig findet sich bereits bei Diagnosestellung ein ausgedehnter Tumorbefund (zitiert nach Kleihues et al. 2007), da Glioblastome eine hohe Proliferationsrate aufweisen und kognitive Defizite, welche durch das Tumorwachstum entstehen, initial oft noch gut aufgrund der neuronalen Plastizität kompensiert werden können (zitiert nach Barulli et al. 2013). Symptomatisch werden Patienten abhängig von der Tumorlokalisation im Verlauf unter anderem durch Kopfschmerzen oder Erbrechen als Folge des erhöhten intrakraniellen Druckes, epileptischen Anfällen oder einer Persönlichkeitsveränderung (Kleihues et al. 2007). Bei Diagnosestellung zeigen sich Glioblastome meist als große, unilaterale, schlecht umschriebene Raumforderung. Makroskopisch sind eine bunte Schnittfläche sowie eine zentrale Nekrosebildung von bis zu 80% charakteristisch (Kleihues et al. 2007). Durch aggressives und diffus infiltratives Wachstum kommt es schnell zur Invasion angrenzender Gehirnstrukturen (zitiert nach Kleihues et al. 2007). Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer cerebrospinalen Metastasierung (zitiert nach Kleihues et al. 2007).

Bereits 1940 wurde durch den Neuropathologen Hans-Joachim Scherer beschrieben, dass primäre und sekundäre Glioblastome voneinander unterschieden werden müssen (Scherer 1940). Primäre Glioblastome entstehen de-novo ohne klinische oder histopathologische Vorläuferläsion innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Monaten durch Akkumulation von genetischen Veränderungen. Betroffen sind hiervon meist ältere Patienten mit einem mittleren Alter von 62 Jahren (Ohgaki et al. 2004; Ohgaki et al. 2005; Ohgaki et al. 2007).

Sekundäre Glioblastome entstehen langsam auf dem Boden einer WHO-Grad II oder III Vorläuferläsion. Die Diagnosestellung eines sekundären Glioblastoms erfordert den Nachweis einer niedrig malignen Vorläuferläsion mittels Bildgebung oder histologischer Sicherung. Betroffen sind hiervon eher jüngere Patienten mit einem mittleren Alter von 45 Jahren (Ohgaki et al. 2004; Ohgaki et al. 2005; Ohgaki et al. 2007). Die Zeit bis zur Tumorprogression ist interindividuell sehr unterschiedlich. Das mittlere Intervall beträgt 4-5 Jahre (zitiert nach Kleihues et al. 2007). Auch wenn es sich bei beiden Tumorentitäten um WHO-Grad IV Tumoren mit überwiegend astrozytärer Komponente handelt, unterscheiden sie sich bezüglich ihres genetischen Profils und ihres Ansprechens auf Chemotherapie (Ohgaki et al. 2004; Ohgaki et al. 2005; Ohgaki et al. 2007). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die bereits bekannten genetischen Veränderungen, welche im Verlauf der Tumorgenese auftreten.

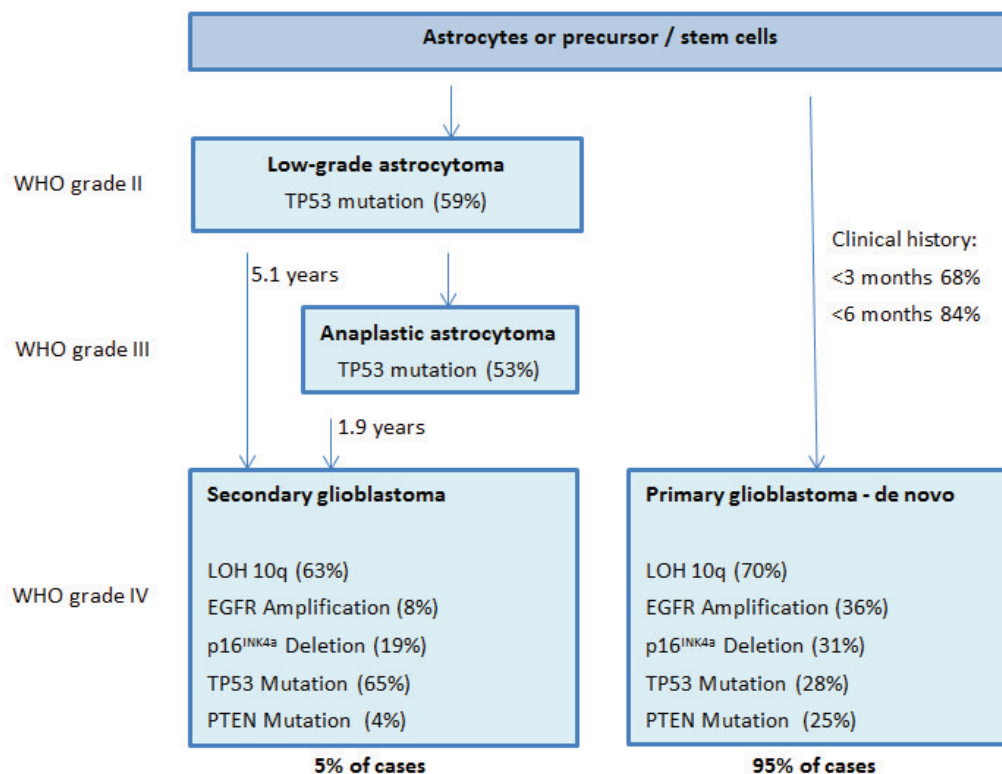


Abbildung 1: Häufigkeit und zeitliches Auftreten genetischer Veränderungen in der Glioblastomentstehung (Ohgaki et al. 2004; Kleihues et al. 2007)

Mutationen im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 und 2 treten meist sehr früh in der Gliomentstehung noch vor dem Auftreten von Mutationen im TP53 Gen oder einem 1p/19q Verlust auf und persistieren auch nach erfolgter Progression zu sekundären Glioblastomen (Watanabe et al. 2009; Kim et al. 2010). Diese Mutationen wurden unerwartet in Sequenzierprodukten von Glioblastomen entdeckt und 2008 erstmals durch Parsons et al. beschrieben. Hierbei handelt es sich um heterozygot auftretende Punktmutationen auf Chromosom 2q33 (Parsons et al. 2008). Mutationen im Gen der IDH-1 treten mit 70,9% häufiger auf als Mutationen im Gen der IDH-2 (3,1%) (Hartmann et al. 2009). Mutationen im Gen der IDH-2 finden sich vor allem bei oligodendroglialen Tumoren (Hartmann et al. 2009).

Insgesamt werden in der Literatur sechs verschiedene Punktmutationen der IDH-1 beschrieben, die mit einer unterschiedlichen Häufigkeit vorkommen und alle in Exon 4 das Codon 132 betreffen. Hierbei tritt die R132H Mutation mit 93% am häufigsten auf, die R132C mit 4%, die R132S und die R132G mit je 1,5% sowie die R132L und die R132V Mutation mit <1% hingegen seltener (zitiert nach Mellai et al. 2011).

Das Enzym Isocitratdehydrogenase 1 ist sowohl im Zytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum als auch in Peroxisomen lokalisiert und katalysiert NADP⁺-abhängig die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat (Geisbrecht et al. 1999; Margittai et al. 2008)(Abbildung 2).

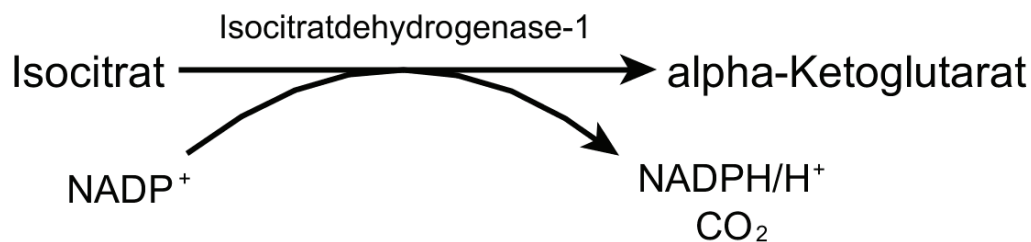


Abbildung 2: Aus Isocitrat wird unter Abspaltung von CO₂ alpha-Ketoglutarat gebildet.

Auf diese Weise wird zytosolisches alpha-Ketoglutarat für den Aminosäurestoffwechsel und den Abbau von HIF-alpha erzeugt (Zhao et al. 2009) und das Reduktionsäquivalent NADPH/H⁺ für die zytosolische Fettsäurebiosynthese (Koh et al. 2004), das Glutathion- und das Thioredoxin-Reduktionssystem bereitgestellt (Lee et al. 2002). Der normale Anteil an durch die Isocitratdehydrogenase 1 produziertem Reduktionsäquivalent NADPH/H⁺ beträgt 65% (Bleeker et al. 2010).

Folge der bekannten Punktmutationen im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 ist jeweils ein Aminosäureaustausch. Hierbei wird im Falle der am häufigsten vorkommenden R132H Punktmutation die Aminosäure Arginin durch Histidin ersetzt, was zu einer strukturellen Veränderung im katalytischen Zentrum der Isocitratdehydrogenase 1 führt (Dang et al. 2009). Arginin bildet zusammen mit anderen Aminosäuren die Substratbindestelle der Isocitratdehydrogenase 1 und geht mit den alpha- und beta-Carboxylgruppen des Isocitrats hydrophile Wechselwirkungen ein (Xu et al. 2004). Aus genetischer Sicht handelt es sich bei der IDH-1 R132H Mutation um eine somatische „gain-of-function“ Mutation, bei der die eigentliche Enzymaktivität inaktiviert und durch eine neue Funktion ersetzt wird (Dang et al. 2009). Durch die strukturellen Veränderungen der Substratbindestelle unterbleibt die Bildung von Isocitrat zu alpha-Ketoglutarat (Abbildung 3).

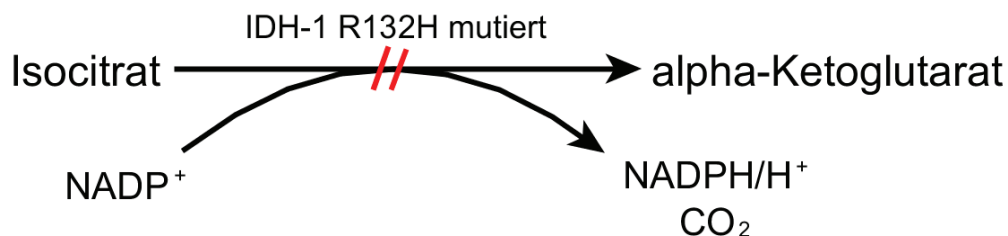


Abbildung 3: Durch Mutation der IDH-1 unterbleibt die Bildung von alpha-Ketoglutarat.

Stattdessen wird das im Zytosol vorhandene alpha-Ketoglutarat unter Verbrauch von NADPH/H⁺ zu 2-Hydroxyglutarat reduziert. Hierdurch kommt es zu einer pathologischen Anreicherung von 2-Hydroxyglutarat (Dang et al. 2009) (Abbildung 4).

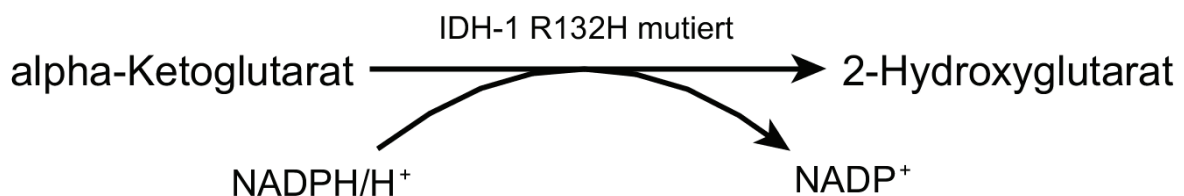


Abbildung 4: Durch Mutation der IDH-1 erfolgt die vermehrte Bildung von 2-Hydroxyglutarat.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten mit einer angeborenen Störung im 2-Hydroxyglutarat-Metabolismus und einem daraus resultierenden hohen 2-Hydroxyglutarat-Spiegel ein erhöhtes Risiko aufweisen, an einem Hirntumor zu erkranken (zitiert nach Patay et al. 2012).

Zusätzlich folgen eine Abnahme des zytosolischen Reduktionsäquivalents NADPH/H^+ und der Aminosäure alpha-Ketoglutarat. Durch den verminderten zytosolischen alpha-Ketoglutarat-Spiegel kommt es zu einem verminderten Abbau von HIF-1 alpha (Zhao et al. 2009). Hieraus resultiert die Induktion von HIF-1 alpha Zielgenen, wodurch unter anderem Angiogenese, Zellmetabolismus, Wachstum, Differenzierung sowie Apoptose und Autophagozytose beeinflusst werden (Cohen et al. 2013).

Durch die verminderte zytosolische Konzentration von NADPH/H^+ für das Glutathion- und Thioredoxin-Reduktionssystem sind die Zellen anfälliger gegenüber oxidativen Stress (zitiert nach Koehler et al. 2003) und somit empfindlicher gegenüber Chemo- und Strahlentherapie (Bleeker et al. 2010). SongTao et al. konnten bereits zeigen, dass die IDH-1 Mutation neben dem MGMT-Methylierungsstatus mit einer erhöhten Ansprechrate der Temozolomid-Chemotherapie einhergeht und das progressionsfreie Überleben verbessert (SongTao et al. 2012). Die IDH-1 Mutation ist ein starker, vom WHO-Grad unabhängiger, prognostischer Marker (Sanson et al. 2009). In prospektiven Studien wurde bereits ein signifikant längeres progressfreies Überleben (Weller et al. 2009) bzw. ein signifikant längeres Gesamtüberleben bei Vorliegen der IDH-1 Mutation nachgewiesen (Sanson et al. 2009; Combs et al. 2011; Yan et al. 2009; Weller et al. 2009).

Mutationen im Gen der IDH-1 können durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Bisher erfolgte die Detektion gewebebasiert unter anderem durch direkte Sequenzierung (Parsons et al. 2008) und Immunhistochemie (Capper et al. 2009). Weitere Detektionsmethoden stellen die Pyrosequenzierung (Arita et al. 2014), quantitative Real time PCR (Catteau et al. 2014), real-time COLD-PCR/FMCA (Pang et al. 2013) sowie die Detektion der Mutation im Plasma durch Kombination einer Koamplifikation bei niedriger Denaturierungstemperatur und digitaler PCR (Boisselier et al. 2012) dar. Zusätzlich konnten erhöhte 2-Hydroxyglutarat-Spiegel, die Folge einer IDH-1 Mutation sind, mittels MR Spektroskopie (Elkhaled et al. 2012) nachgewiesen werden.

Ziele der Arbeit

Die Mutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 tritt sehr früh in der Gliomentstehung auf und stellt einen, vom WHO-Grad unabhängigen, prognostischen Marker dar, der einen Hinweis auf das Ansprechen der Chemo- und Radiotherapie gibt und somit das therapeutische Vorgehen beeinflusst.

Um den Patienten eine möglichst sichere und schnelle Detektion der Mutation zu gewährleisten, war es Ziel der vorliegenden Arbeit diese durch verschiedene Verfahren, sowohl im FFPE-Material als auch non-invasiv im Serum zu detektieren. Als Detektionsverfahren wurden hierfür die Immunhistochemie (IHC), die Sanger-Sequenzierung sowie die Fragmentanalyse herangezogen und hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen. In dieser Arbeit soll explizit der Fragestellung nachgegangen werden, welches der 3 Nachweisverfahren sich im klinischen Alltag hinsichtlich Genauigkeit und Durchführbarkeit am besten für die Mutationsdetektion eignet.

Da eine Tumorlokalisierung in eloquenten Hirnarealen ausgedehnte Tumoresektionen unter Erhalt der Lebensqualität der Patienten unmöglich macht und die Diagnose in diesen Fällen möglicherweise nur durch eine stereotaktische Biopsie gesichert wird, deren Größe nicht für ausgedehnte Untersuchungen des Tumormaterials ausreicht, wurde versucht die Mutation ebenfalls non-invasiv im Serum zu detektieren. Auf diese Weise könnte bereits präoperativ eine Aussage über den Mutationsstatus des Tumorgewebes getroffen und somit das weitere therapeutische Vorgehen beeinflusst werden.

Zudem sollte aufgezeigt werden, inwieweit die Prognose der Erkrankung durch den IDH-1 Mutationsstatus beeinflusst wird. Hierzu wurden Überlebenszeitanalysen für den jeweils entsprechenden durch die drei gewebebasierten Methoden ermittelten IDH-1 Mutationsstatus, mit der Fragestellung durch welche Methode die Prognose der Patienten am besten vorhergesagt werden kann, durchgeführt.

3 Material und Methodik

3.1 Patientenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde der IDH-1 Mutationsstatus von 43 Patienten mit primären und sekundären Glioblastomen sowie, soweit vorhanden, deren Vorläuferläsionen mit unterschiedlichen Methoden bestimmt. Zusätzlich wurde der IDH-1 Mutationsstatus von 42 Patienten mit WHO-Grad II-III Gliomen bestimmt. Für diese Arbeit wurde FFPE-Tumormaterial von insgesamt 85 Gliom-Patienten verwendet, die zwischen 1992 und 2011 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden. Das Tumormaterial wurde im Anschluss an die Operation am Institut für Neuropathologie in 4% gepuffertem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert. Patienten deren OP-Präparate einen Tumoranteil von unter 30% Prozent enthielten wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde von diesen Patienten, soweit vorhanden, Blutserum untersucht. Dieses stammt aus Blutentnahmen, die zeitnah zur Operation stattgefunden haben. Das geronnene Blut wurde im Anschluss an die Entnahme im Institut für Humangenetik durch Zentrifugieren in seine flüssigen und festen Bestandteile aufgetrennt. Nach Abtragen des Serums wurde dieses bei -20°C gelagert. Insgesamt wurden 85 FFPE-Tumorproben sowie 24 Seren auf den IDH-1 Mutationsstatus untersucht. Die Entwicklung einer minimal-invasiven Diagnostik für Gliome wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr. 67/06).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die klinischen Daten der Patienten.

| Tumor-Typ | Männer | Frauen | Gesamt (n=85) | Mittleres Alter ± SD |
|-----------------------------------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------------------------|
| Diffus infiltrierendes Astrozytom | 5 | 1 | 6 | 24,8 ± 8,7 |
| Diffus infiltrierendes Oligoastrozytom | 4 | 1 | 5 | 37,8 ± 21,5 |
| Anaplastisches Astrozytom | 8 | 6 | 14 | 42,5 ± 20,3 |
| Anaplastisches Oligodendrogliom | 4 | 3 | 7 | 47,3 ± 15,9 |
| Anaplastisches Oligoastrozytom | 5 | 5 | 10 | 36,5 ± 9,6 |
| Sekundäres Glioblastom | 11 | 2 | 13 | 37,0 ± 12,0 |
| Primäres Glioblastom | 14 | 16 | 30 | 57,3 ± 16,8 |

Tabelle 1: Klinische Patientendaten

3.2 Immunhistochemische Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation

3.2.1 Herstellung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Zur immunhistochemischen Bestimmung des Mutationsstatus der Isocitratdehydrogenase 1 wurden zunächst Paraffinschnitte der verwendeten Gliome hergestellt. Hierfür wurde das FFPE-Tumorgewebe mittels Mikrotom (2300 Biocut, Reichert-Jung) in 2µm dicke Gewebeschnitte geschnitten und diese auf beschichtete Objektträger (SuperFrost®plus, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik) aufgezogen. Die Objektträger wurden anschließend 24 Stunden in einem Wärmeschrank (Heraeus Instruments Function Line, Thermo Scientific) bei 37°C getrocknet.

Da die Formalinfixierung und die Einbettung des Gewebes in Paraffin zur intra- und intermolekularen Vernetzung der Proteine und damit zur Maskierung der Antigene führt, würde die direkte Verwendung der Schnitte in der Immunhistochemie zum partiellen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität und somit zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Dafür müssen die Antigene zunächst für die verwendeten Antikörper wieder zugänglich gemacht („demaskiert“) werden. Laut Herstellerangaben des in der Arbeit verwendeten Anti-Human IDH-1^{R132H} Antikörpers (DIA H09; Dianova GmbH), welcher spezifisch die R132H-Mutation des IDH-1 Proteins erkennt, ist eine hitzeinduzierte Antikörperdemaskierung erforderlich. Hierbei wird durch Garen der Schnitte in einem Demaskierungspuffer die Immunreaktivität des Gewebes wieder hergestellt (Key 2003).

Zunächst wurden die Gewebeschnitte durch dreimalige Inkubation für jeweils 5min im Xylolbad entparaffiniert und im Anschluss durch Inkubation in 100% Ethanol für 4min rehydriert. Zur Blockierung der endogen im Gewebe vorkommenden Peroxidasen wurden die Schnitte anschließend für 10min in einer Lösung aus 1% Wasserstoffperoxid, gelöst in Methanol, bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen massiven Substratüberschuss werden endogene Peroxidasen irreversibel blockiert und somit eine unspezifische Hintergrundfärbung in der IHC vermieden (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, User manual, 3rd edition). Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua destillata gespült und für 15min im auf 90°C vorgewärmten Demaskierungspuffer (Dako Target Retrieval Solution, pH9; Dako Deutschland GmbH) in einen Dampfgerar (FS10 Typ 3216, Braun GmbH) gestellt. Nach 10- bis 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte noch einmal mit Aqua destillata gespült und bis zur weiteren Bearbeitung in TRIS-Waschpuffer (Dako Wash Buffer 10x, Dako Deutschland GmbH) gelagert.

3.2.2 IDH-1 Immunhistochemie

Zum Nachweis der IDH-1 R132H Punktmutation wurden die nach Abschnitt 3.2.1 vorbehandelten Schnitte zunächst mit einem unkonjugierten monoklonalen Mausantikörper als Primärantikörper (Anti-Human IDH-1^{R132H}, DIA H09, Dianova GmbH) inkubiert, der diese Mutation spezifisch erkennt. Dieser Mausantikörper wird im Anschluss durch einen sekundären Antikörper aus Ziegen, welcher gegen Maus-Immunglobuline gerichtet ist, gebunden (Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse). Der sekundäre Antikörper ist wiederum an ein synthetisches Polymer (Dextran) gekoppelt, an dem neben mehreren Antikörpermolekülen auch mehrere Moleküle der Meerrettich-Peroxidase binden (Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, User manual, 3rd edition). Da immer mehrere Dextrane an einem Primärantikörper binden können, kommt es zur Signalverstärkung. Durch Zugabe einer Substrat/Chromogen-Lösung kann diese Bindung sichtbar gemacht werden. Hierbei fungiert das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB+) als Elektronendonator für den Umsatz von Wasserstoffperoxid durch das Enzym Peroxidase und wird dadurch oxidiert (http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung_immunhistochemie.pdf). Es entsteht ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das in normalem Licht detektiert werden kann und nicht ausbleicht. Zur Erhöhung des Kontrasts im Schnittpräparat folgt zum Schluss eine Gegenfärbung mittels Hämatoxylin. Hierdurch wird eine Blaufärbung des Zellkerns hervorgerufen. Alle Schritte der immunhistochemischen Färbung werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden die Objektträger luftblasenfrei auf sogenannte Coverplates (Shandon CoverplateTM Disposable Immunostaining Chamber, Thermo Scientific) aufgebracht. Es entsteht ein kleiner Spalt zwischen dem Objektträger und dem Coverplate, in welchen die einzelnen Lösungen eingebracht werden. Diese verbleiben dort stets bis zum Befüllen der Coverplates mit der nächsten Lösung und sorgen für ein gleichmäßiges Färbeergebnis. Zur Überprüfung der korrekten Lage der Objektträger wurden die Coverplates zunächst mit TRIS-Waschpuffer befüllt. Anschließend wurden 100µl der Primärantikörper-Lösung (Anti-Human IDH-1R132H, 1:100 in Dako RealTM Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH) verdünnt) aufgebracht und die Objektträger 30min inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Coverplates mit TRIS-Waschpuffer wurden die Schnitte in 100µl EnvisionTM FLEX+ MOUSE LINKER (Dako Deutschland GmbH) für 15min inkubiert. Diese Lösung soll das Signal des Primärantikörpers erhöhen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit TRIS-Waschpuffer gespült und mit 100µl der sekundären Antikörperlösung (Dako REALTM EnVisionTM) für 30min inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte in TRIS-Waschpuffer erfolgte die enzymatische Detektion durch Zugabe von 200µl DAB-Substrat-Lösung, bestehend aus einer gepufferten Lösung mit Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Dako REALTM DAB+ Chromogen (50x), 1:50 in Dako REALTM Substrate Buffer verdünnt). Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden

die Objektträger aus den Coverplates entnommen, in Aqua destillata gespült und anschließend in ein Bad aus Kupfersulfatlösung, bestehend aus ddH₂O und einer Messerspitze Kupfer-(II)-Sulfat-Pentahydrat (Merck KGaA), getaucht. Dies erhöht die Sensitivität und Intensität der Farbreaktion. Anschließend wurden die Objektträger mit Aqua destillata gespült und für 2min in Hämatoxylin (Shandon Instant Hematoxylin, Thermo Scientific) inkubiert. Nach Entfernen des Hämatoxylins durch Spülen mit Aqua destillata wurden die Schnitte für 1min in Shandon Bluing Reagent-Lösung (Thermo Scientific) inkubiert. Diese Lösung bläut Hämatoxylin und ersetzt damit stark alkalische Lösungen oder langes Stehen der Objektträger unter fließendem Wasser. Auf diese Weise wird die Gefahr Zellen oder Gewebeteile zu verlieren, reduziert (<http://www.thermoscientific.com/en/product/shandon-bluing-reagent.html>). Die Schnitte wurden anschließend durch kurzes, aufeinanderfolgendes Schwenken in Aqua destillata sowie in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 100%) entwässert. Es folgte die Fixierung der Färbung durch mehrmaliges Schwenken der Objektträger in Xylol. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Tropfen Entellan (Microscopy Entellan, Merck KGaA) und einem Deckglas versehen.

3.2.3 Auswertung

Mikroskopische, visuelle Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte in Anlehnung an den immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele, welcher im Folgenden kurz erläutert wird (Remmele et al. 1987). Als Kriterien fließen einerseits der prozentuale Anteil an positiv gefärbten Zellen, andererseits die Färbeintensität der einzelnen Zellen in die Bewertung ein. Die Präparate werden anhand der einzelnen Beurteilungskriterien in verschiedene Gruppen unterteilt und mit Punktwerten versehen (Tabelle 2 und Tabelle 3).

| <u>A: Beurteilung des Prozentsatzes an positiv gefärbten Zellen</u> | | |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| Gruppe | Anteil gefärbter Zellen | Punktwert A |
| Gruppe 1 | ≤ 10 % | 1 Punkt |
| Gruppe 2 | 11-50% | 2 Punkte |
| Gruppe 3 | 51-80% | 3 Punkte |
| Gruppe 4 | > 80% | 4 Punkte |

Tabelle 2: Beurteilung des Prozentsatzes an positiv gefärbten Zellen

| <u>B: Beurteilung der Färbeintensität</u> | | |
|--------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Gruppe | Intensität | Punktwert B |
| Gruppe 1 | schwach positiv | 1 Punkt |
| Gruppe 2 | mäßig positiv | 2 Punkte |
| Gruppe 3 | stark positiv | 3 Punkte |

Tabelle 3: Beurteilung der Färbeintensität

Durch Multiplikation der beiden Punktwerte A und B, die für jedes Schnittpräparat ermittelt wurden, konnte jedem Präparat ein IRS zwischen 0 und 12 zugewiesen werden. Präparate mit einem Punktwert von 9 oder 12 wurden als stark, Präparate mit Punktwerten von 4, 6 oder 8 als mäßig und Präparate mit Punktwerten von 1, 2, oder 3 als schwach IDH-1 R132H positiv bewertet. Präparate mit einem Punktwert von 0 wurden als negativ interpretiert, d. h. es liegt hier keine immunhistochemisch detektierbare IDH-1 R132H Mutation vor. In Abbildung 5 und Abbildung 6 sind exemplarisch einzelne Färbungen und ihre Beurteilung bezüglich des Prozentsatzes an positiv gefärbten Zellen sowie der Färbeintensität dargestellt.

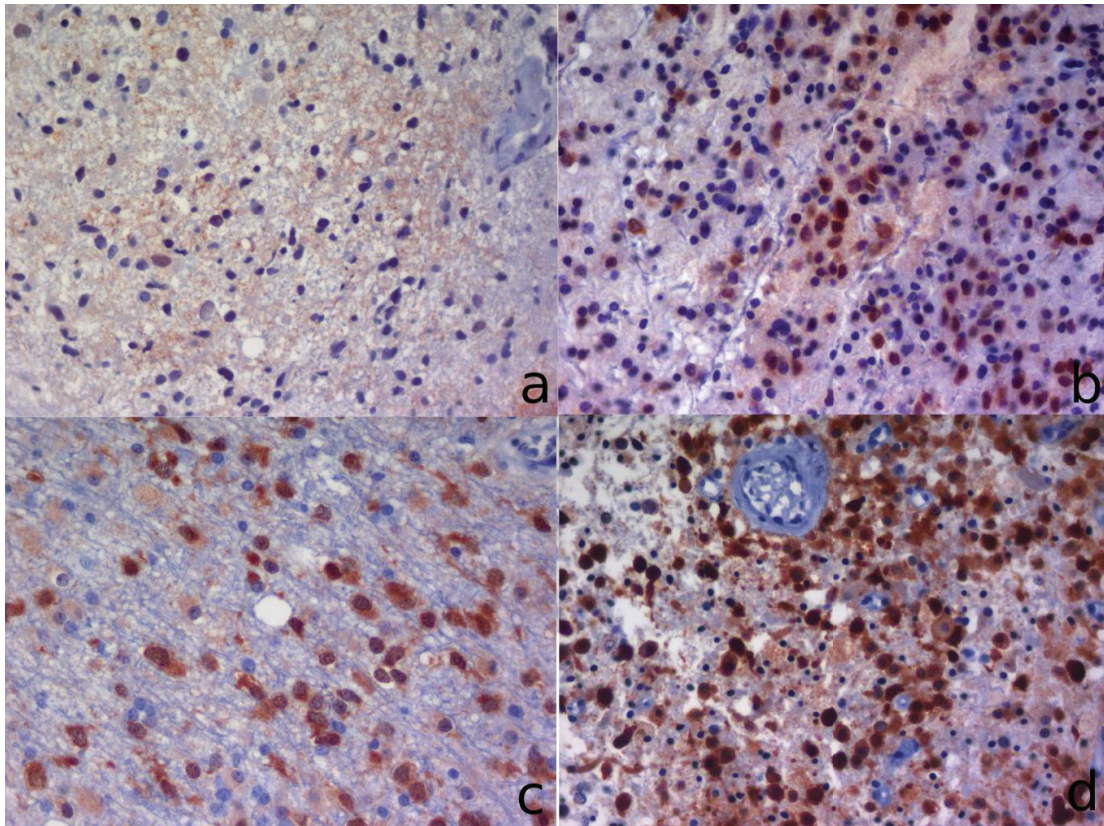


Abbildung 5: Prozentsatz positiv gefärbter Tumorzellen (400-fache Vergrößerung): a $\leq 10\%$, b 11-50%, c 51-80%, d $> 80\%$

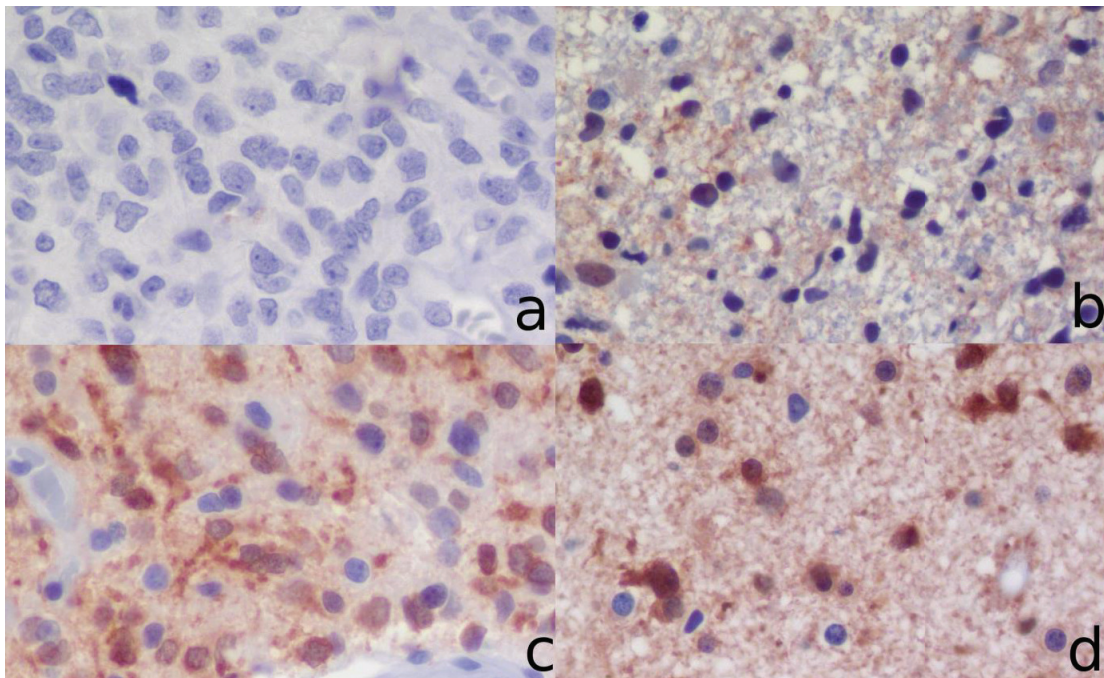


Abbildung 6: Färbintensität (400-fache Vergrößerung): a negativ, b schwach positiv, c mäßig positiv, d stark positiv

3.3 Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation durch Sanger Sequenzierung

3.3.1 Prinzip der Sequenzierung nach Sanger

Die in dieser Arbeit verwendete Sequenziermethode basiert auf der in den 1970er Jahren von Frederick Sanger entwickelten Didesoxy- oder auch Kettenabbruch-Methode.

Ausgangspunkt dieser Methode stellen DNA-Einzelstränge (Matrize) und eine kurze Sequenz komplementärer DNA (Primer) dar, wobei letztere der DNA-Polymerase als Startpunkt dient. Die Sequenzierung erfolgt in vier verschiedenen Ansätzen, in denen der DNA-Polymerase Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs) sowie in geringer Menge entweder Didesoxy-ATP, Didesoxy-GTP, Didesoxy-CTP oder Didesoxy-TTP angeboten werden (zitiert nach Hirsch-Kauffmann et al. 2006). Die DNA-Polymerase synthetisiert einen DNA-Strang komplementär zur Matrize. In diesen werden die angebotenen dNTPs und die radioaktiv markierten Didesoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTPs) gleichermaßen eingebaut. Nach Einbau eines ddNTPs ist es der DNA-Polymerase nicht mehr möglich, weitere Triphosphate in den synthetisierten DNA-Strang einzubauen. Es kommt zum Abbruch der DNA-Synthese. Dies ist auf das fehlende, freie 3'-OH Ende zurückzuführen, welches für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe eines weiteren Triphosphats nötig wäre (Sanger et al. 1977). Die entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Sequenz kann von der Autoradiographie abgelesen werden. Mittlerweile wurde diese Methode dahingehend verbessert, dass anstelle von radioaktiv markierten Nukleotiden fluoreszenz-markierte Nukleotide verwendet werden, die über eine mit Gelmatrix gefüllte Kapillare aufgetrennt werden können. Durch die Markierung der vier Nukleotide dd-ATP, -GTP, -CTP und -TTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen kann eine Probe so in einem Ansatz sequenziert werden (Alberts et al. 2005).

3.3.2 DNA Isolierung aus FFPE Material

Herstellung von Paraffinschnitten und Vorbehandlung des Tumormaterials

Um ein aussagekräftiges Ergebnis über den Mutationsstatus der Gliome bei der Sequenzierung zu erhalten, müssen die eingesetzten Gewebeproben einen Tumoranteil von mindestens 25-30% aufweisen (Jancik et al. 2012; Pinto et al. 2011; Tsiatis et al. 2010). Hierzu wurde vor Anfertigung der Paraffinschnitte der Tumoranteil der verwendeten Gliome auf Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Schnitten durch einen Neuropathologen (PD Dr. Y.-J. Kim) markiert. Anschließend wurden mittels Mikrotom 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Um genügend Tumor-DNA für die Sequenzierung zu gewinnen wurden, abhängig von der Tumorgröße, bei Resektaten 2 bis 4 und bei Biopsien 8 bis 12 Paraffinschnitte

benötigt. Anschließend wurde anhand des markierten HE-Schnittes von den angefertigten Paraffinschnitten der jeweilige Tumoranteil der Gewebeproben in ein mit 1000µl Xylol befülltes und beschriftetes Eppendorf-Gefäß gekratzt. Um kein Gewebe zu verschleppen wurden zwischen den einzelnen Proben Handschuhe und Kanülen gewechselt. Zur Kontrolle, ob bei der Makrodissektion der Tumoranteil der verwendeten Paraffinschnitte abgekratzt wurde, wurden die Schnitte anschließend HE gefärbt und mit dem initial tumormarkierten HE-Schnitt verglichen.

Um das an den Tumorproben befindliche Paraffin in Xylol zu lösen, wurden diese zunächst gemischt (Vibrofix VF1, IKA® Labortechnik) und anschließend bei 14.000rpm für 5min zentrifugiert (Hochgeschwindigkeits-Mikroliterzentrifuge Model CT15E/CT15RE, VWR International GmbH). Durch das Zentrifugieren setzt sich das Tumorgewebe ab und das in Xylol gelöste Paraffin kann abpipettiert werden. Das Tumormaterial verbleibt als Pellet am Boden der Eppendorfgefäße. Zur Rehydrierung der Gewebeproben wurde dieser Schritt zweimal mit jeweils 1000µl Ethanol 100% wiederholt. Das Pellet wurde anschließend im geöffneten Eppendorf-Gefäß bei 37°C für 15min im Thermoblock (Thermomixer comfort 1,5ml, Eppendorf AG) getrocknet.

Zum Zellaufschluss wurde das aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* gewonnene Enzym Proteinase K, welches zum Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäure genutzt wird, verwendet (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6556?lang=de®ion=DE>). Hierfür wurden auf die getrockneten Pellets jeweils 180µl ATL Buffer und 20µl Proteinase K pipettiert. Anschließend wurden die Proben mittels Vortex gemischt und im Thermoblock unter Denaturierungsbedingungen bei 56°C zweieinhalb Stunden inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten bei 90°C, wodurch die fixationsbedingten Crosslinks der DNA gelöst und somit sowohl die Quantität als auch die Qualität der DNA verbessert wurden.

Aufreinigung und Elution der gewonnenen DNA

Um die gewonnene DNA von Proteinen, Nukleasen und Verunreinigungen zu befreien, wurde eine Aufreinigung mithilfe des QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN GmbH) nach Herstellerangaben halbautomatisch im QIAcube durchgeführt.

Diese Methode basiert auf der unter hohen Salz- und Alkoholkonzentrationen selektiven Bindung von DNA an eine Silica Membran, die anschließend mehrfach gewaschen wird. Durch die einzelnen Waschschrte werden Proteine, Nukleasen und Verunreinigungen aus den Proben herausgelöst und können als Durchfluss verworfen werden (QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook, <https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=63a84dc7-d904-418e-b71a-1521cf318e82&lang=en>). Zuletzt wird die DNA mittels HPLC-H₂O aus der Membran in ein sauberes Eppendorfgefäß gelöst.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über den Ablauf des Programms.

| Vorgang | Zweck |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Probe + 200µl AL Buffer + 200µl EtOH | Herstellung der optimalen Bedingungen zur Bindung der DNA an die Säulenmatrix |
| Aufbringen der Probe auf Säule | |
| Zentrifugieren | Bindung DNA an Säule |
| +500µl Puffer AW1-Buffer | Waschen gebundener DNA |
| Zentrifugieren | Herauslösen von Verunreinigungen aus den Proben |
| + 500µl AW2-Buffer | Waschen gebundener DNA |
| Zentrifugieren | Herauslösen von Verunreinigungen und Trocknen der Membran |
| +15 bzw. 30µl HPLC-H ₂ O (abhängig von der Probengröße), Zentrifugieren | Eluieren der DNA aus der Membran |

Tabelle 4: Aufreinigung isolierter DNA

Messung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit

Zur Qualitätskontrolle wurde im Anschluss an die Elution die DNA-Reinheit und die DNA-Konzentration mittels Spectrophotometer (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH) gemessen. Hierbei wird die Menge an Licht einer bestimmten Wellenlänge bestimmt, die von der auf den Messpunkt aufgetragenen DNA-Probe absorbiert wird (Karp 2005). Die DNA-Reinheit wurde anhand des Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm ermittelt. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260nm, das von Proteinen hingegen bei 280nm. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 kann die isolierte DNA als „rein“ angesehen werden (Technical Bulletin, NanoDrop Spectrophotometers).

Zunächst wurde das Gerät mit 1,5µl HPLC-H₂O geeicht. Anschließend wurden jeweils 1,5µl einer Probe auf den Messpunkt des Gerätes aufgebracht und die Messung durchgeführt. Um die Fehlerquelle möglichst gering zu halten, wurde der Messpunkt nach jeder Probe gründlich gereinigt.

3.3.3 Amplifikation der isolierten DNA

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Da die Menge an isolierter DNA für die Sequenzierung nicht ausreichend ist, muss der zu untersuchende DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Die im Jahr 1983 von Kary Mullis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein Verfahren zur Amplifikation von

spezifischen DNA-Fragmenten dar. Benötigt werden hierfür neben der isolierten DNA, welche als Matrize fungiert, eine hitzebeständige DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide sowie eine kurze Sequenz komplementärer DNA (Primer) im Überschuss (Karp 2005). Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden drei Phasen voneinander unterschieden, die zusammen einen Zyklus bilden und automatisiert in einem Thermocycler stattfinden. In der Denaturierungsphase kommt es durch Erhitzen der DNA-Proben auf 95°C zur Auftrennung der DNA-Doppelhelix. Während der Hybridisierungsphase lagert sich der Primer bei einer, von der Sequenz der Primer abhängigen Annealingtemperatur (hier 56°C) an die DNA-Einzelstränge an. In der Elongationsphase synthetisiert das Enzym Taq-Polymerase, ausgehend von den Primern, einen DNA-Strang komplementär zur Matrize. Dieser Schritt findet bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase, statt. Mit jedem Zyklus steigt der Gehalt an DNA exponentiell an (Mullis et al. 1986).

Für die PCR wurde das peqGOLD Taq-DNA-Polymerase ‚all inclusive‘ Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH) verwendet. Die PCR-Bedingungen und die Sequenz der für die PCR und Sequenzierung verwendeten Primer wurden von der Arbeitsgruppe Capper et al. 2010 übernommen. Die Sequenzen der Primer, welche von Eurofins MWG Operon synthetisiert und bezogen wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

| Verwendete Primer | Sequenz (5' → 3') |
|--------------------------|--------------------------|
| Extern Forward | ACCAAATGGCACCAT |
| Extern Reverse | TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT |
| Intern Forward | CGGTCTTCAGAGAAGCCATT |
| Intern Reverse | GCAAAATCACATTATTGCCAAC |

Tabelle 5: Verwendete Primer für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material (Capper et al. 2010)

Zunächst wurden PCR-Gefäße mit den jeweiligen Probennummern beschriftet und mit 1µl Template entsprechend einer DNA-Menge von ungefähr 50ng/µl befüllt. Bei abweichenden Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben wurden diese entsprechend mit HPLC-H₂O verdünnt. Zusätzlich zu den DNA-Proben lief bei jedem PCR-Durchgang eine Wasserkontrolle mit, um mögliche Kontaminationen der einzelnen Reaktionsbestandteile mit Fremd-DNA auszuschließen. Hierbei wurde anstelle des Templates 1µl HPLC-H₂O eingesetzt.

Anschließend wurde ein Master-Mix hergestellt. Tabelle 6 gibt den Ansatz für eine Probe wieder.

Ansatz für eine Probe:

| |
|--------------------------------------------------------------------------|
| 5µl Puffer |
| 1µl dNTP |
| 1µl Primer Extern Forward (1:10 mit HPLC-H₂O verdünnt) |
| 1µl Primer Extern Reverse (1:10 mit HPLC-H₂O verdünnt) |
| 0,3µl Taq-Polymerase |
| 40,7µl dH₂O |

Tabelle 6: Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material: Ansatz für eine Probe

Auf jede Probe wurden 49µl Master-Mix pipettiert, so dass jedes PCR-Gefäß ein Endvolumen von 50µl enthielt. Nach Mischen und Abzentrifugieren der Proben wurde die PCR in einem Thermocycler (peqSTAR 96 Universal, PEQLAB Biotechnologie GmbH) gestartet. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

PCR-Bedingungen**Je Zyklus:**

- | | |
|------------------------|-------|
| - 95°C für 30 Sekunden | } x35 |
| - 56°C für 40 Sekunden | |
| - 72°C für 50 Sekunden | |

Tabelle 7: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material

Nach 35 durchlaufenen Zyklen konnte das PCR-Produkt aus dem Thermocycler entnommen werden.

Agarose-Gel-Elektrophorese

Um zu kontrollieren, ob die durchgeführte PCR erfolgreich war, wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung eines Agarose-Gels werden das aus Seetang gewonnene Polysaccharid Agarose, Elektrophoresepuffer sowie Ethidiumbromid benötigt. Nach Aufkochen der Agarose in Elektrophoresepuffer polymerisiert diese bei Abkühlen unter Porenbildung aus. Da Agarose-Gel relativ großporig ist, eignet es sich besonders gut zur Auftrennung von DNA-Molekülen. Die erste Kammer des Agarose-Gels, welche in der mit Elektrophoresepuffer befüllten Elektrophoresekammer liegt, wird zunächst mit einem DNA-Leiter versehen. Dieser enthält verschiedene DNA-Stränge definierter Länge und dient der Größenbestimmung der eingesetzten DNA-Proben. In die weiteren Kammern des Gels werden die mit Ladepuffer versetzten PCR-Produkte aufgetragen. Unter Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Ladung zur Anode und werden durch die Poren ihrer Größe entsprechend aufgetrennt (Alberts et al. 2005). Die im Gel vorhandenen Ethidiumbromidmoleküle interkalieren in die DNA-Doppelhelix und verändern

dadurch ihr Absorptionsspektrum. Zusätzlich wird die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht verstärkt, wodurch DNA-Fragmente unter UV-Belichtung sichtbar gemacht und mittels CCD-Kamera fotografiert werden können (nach: Produktinformation Ethidium bromid solution: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e1510?lang=de®ion=DE>). Die Lichtintensität korreliert mit der Menge an DNA.

Für die Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels wurden 1g Agarose (Ambion® Agarose-LE, Invitrogen Life Technologies), 50ml TBE 1x (Herstellung siehe Anhang) und ein Tropfen EDTA (BDH Electran® Ethidium bromide solution, VWR International GmbH) verwendet. Zunächst wurde die Agarose mit TBE 1x versetzt und in einem Erlenmeyer-Kolben in der Mikrowelle (Typ: KOC 985TBA, DAEWOO) erhitzt bis die Agarose komplett gelöst war. Anschließend erfolgte eine Durchmischung mittels Magnetrührgerät (RET basic IKAMAG®, IKA® Labortechnik). Nachdem die Flüssigkeit etwas abgekühlt war, wurde diese mit einem Tropfen Ethidiumbromid versehen und konnte nach erneutem Mischen in die Gel-Form gegossen werden. Nach ungefähr 15 Minuten war das Gel vollständig ausgehärtet und konnte in die Elektrophorese-Kammer gelegt werden. Das PCR-Produkt wurde mit jeweils 10µl blauen DNA-Ladepuffer (Herstellung siehe Anhang) versehen, gemischt und abzentrifugiert. Anschließend wurde die erste Kammer des Gels mit 2µl DNA Leiter (123bp DNA Ladder, Invitrogen life technologies) und jede weitere Kammer mit jeweils 5µl PCR-Produkt versehen. Nach Verschließen der Kammer wurde eine Spannung von 70 Volt (Microcomputer Elektrophoresis Power Supply, Consort) angelegt. Das Gel wurde nach 60 Minuten entnommen und unter UV-Belichtung fotografiert (InGenius Manual gel documentation systems, Syngene Bio Imaging).

Bei schlechtem oder fehlendem Signal in der Agarose-Gel-Elektrophorese wurde die PCR der entsprechenden Proben mit den Primern Intern Forward und Intern Reverse wiederholt.

Aufreinigung des PCR-Produktes

Um überschüssige Primer, Nukleotide, Enzyme und weitere Unreinheiten aus den DNA-Proben zu entfernen, welche die Sequenzierreaktion stören würden, muss das PCR-Produkt aufgereinigt werden. Das Prinzip der Aufreinigung mit Hilfe der QIAGEN Säulen wurde bereits unter Punkt 3.3.2 beschrieben.

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte wiederum automatisiert im QIACube mittels MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH). Hierfür wurden jeweils 50µl PCR-Produkt in beschriftete 2ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Des Weiteren wurde für jede Probe erneut ein Rotor Adapter mit einem beschrifteten 1,5ml Eppendorfggefäß und einer MinElute Säule bestückt. Zusätzlich wurde der Automat mit PB Buffer, PE Buffer, EB Buffer sowie mit Pipettenspitzen befüllt. Abhängig vom Signal der einzelnen Proben in der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden unterschiedliche

Aufreinigungsprogramme verwendet. Bei einem starken Signal wurde das QIAquick PCR Cleanup Programm mit einem Elutionsvolumen von 30µl und bei einem eher schwachen Signal das MinElute Cleanup Programm mit einem Elutionsvolumen von 15µl ausgewählt. Auf diese Weise konnte eine möglichst hohe DNA-Konzentration im Eluat erzielt werden.

Die Schritte, die im QIAcube durchlaufen werden, können auch von Hand durchgeführt werden.

3.3.4 Cycle Sequencing Reaktion

Grundlage der Cycle Sequencing Reaktion stellt eine Kombination der bereits beschriebenen Sequenziermethode nach Sanger und der unter Punkt 3.3.3 beschriebenen modernen PCR-Technologie dar. Verwendet wurde hierfür das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®). Da die in diesem Kit verwendeten ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen für jede Base markiert sind, ist statt den ursprünglichen vier verschiedenen Ansätzen nur noch ein gemeinsamer Ansatz je Probe nötig. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-OH-Ende auf ein mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes ddNTP enden.

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Nukleotide.

| ddNTP | Fluoreszenzfarbstoff | Farbe im Elektropherogramm |
|-------|----------------------|----------------------------|
| ddATP | R6G | grün |
| ddTTP | TAMRA | rot |
| ddCTP | ROX | blau |
| ddGTP | R110 | schwarz |

Tabelle 8: Fluoreszenzmarkierung der für die Cycle Sequencing Reaktion verwendeten Nukleotide

Zunächst wurde ein Pipettierplan für die Aufteilung der MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®) erstellt. Jede Probe wurde dabei zweimal auf die Platte aufgetragen, da die Sequenzierung sowohl mit dem Primer Extern Forward als auch Intern Reverse in zwei voneinander getrennten Ansätzen durchgeführt wurde. Nach Erstellen des Planes wurden jeweils 1µl Template aus der Aufreinigung sowie 1µl des 1:20 mit HPLC-H₂O verdünnten Primers in jedes Well pipettiert. Zusätzlich wurde ein Master-Mix erstellt. Der Ansatz für eine Probe ist in Tabelle 9 dargestellt.

Ansatz für eine Probe:**2µl Ready Reaction Mix****1µl BigDye Buffer****15µl HPLC-H₂O**

Tabelle 9: Cycle Sequencing Reaktion: Ansatz für eine Probe

Es wurden jeweils 18µl Master-Mix in jedes Well pipettiert, sodass jedes Well ein Gesamtvolumen von 20µl beinhaltet. Die Platte wurde mit einer Abdeckfolie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems®) verschlossen, gemischt, kurz abzentrifugiert (Hermle Z326K Tischkühlzentrifuge, Axon Labortechnik) und mit einem Wärmeschutz in den Thermocycler gestellt. Initial wurde die Platte für eine Minute auf 96°C erhitzt. Daraufhin wurde der in Tabelle 10 dargestellte Zyklus 25 Mal durchlaufen.

Je Zyklus:**96°C für 10 Sekunden****50°C für 10 Sekunden****Erhöhen der Temperatur um 1°C/Sekunde bis eine Temperatur von 60°C erreicht wird****60°C für 2 Minuten**

Tabelle 10: PCR-Bedingungen für die Cycle Sequencing Reaktion

Nach Abschluss der 25 Zyklen konnte die Platte aus dem Thermocycler entnommen werden.

Aufreinigung des Cycle Sequencing Produktes

Um möglichst wenig unspezifisches Hintergrundsignal in der Sequenzanalyse zu erhalten, müssen alle überschüssigen ddNTPs sowie Enzyme und Puffer aus den Proben vor Durchführung der Kapillarelektrophorese entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte in dieser Arbeit wie nach Herstellerangaben empfohlen mittels Ethanol/EDTA Fällung. Nukleinsäuren sind in apolaren Lösungsmitteln wenig löslich und können mit in Wasser gelöstem Ethanol ausgefällt werden. Der Chelatbildner EDTA hilft dabei das Extensionsprodukt während der Fällung zu stabilisieren, indem es zweiwertige Ionen wie z.B. Mg²⁺ bindet, welches viele Enzyme als wichtige Kofaktoren benötigen (Zeeck et al. 2005). Durch Zentrifugieren setzt sich das ausgefällte Extensionsprodukt am Boden der Platte ab. Überschüssige ddNTPs, Enzyme und Puffer werden mit Entfernung des Überstandes verworfen.

Nach Zentrifugieren der 96-Well Platte wurden die Proben mit 5µl 125mM EDTA (AppliChem, Biochemica Chemica Synthesis Services) versehen. Um das EDTA auf den Boden der Platte abzusenken, wurde diese erneut zentrifugiert. Daraufhin wurden jeweils 60µl 100% EtOH auf die Platte pipettiert, diese mit einer Abdeckfolie verschlossen und viermal über Kopf gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Hierbei wurde die 96-Well Platte mit Alufolie abgedeckt, um die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente vor übermäßigem Lichteinfall zu schützen. Im Anschluss daran wurde die Platte 30 Minuten mit 4000rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Abdeckfolie wurde entfernt, die Platte umgedreht auf Papiertücher in die Zentrifuge gelegt und erneut mit 1100rpm für eine Minute bei 4°C zentrifugiert. Hierauf wurden 60µl 70% EtOH auf die Platte pipettiert und diese mit 3300rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Platte wurde erneut umgekehrt auf Papiertücher in die Zentrifuge gelegt und mit 1100rpm für 1 Minute bei 4°C zentrifugiert. Nach Abdecken der Platte mit Alufolie, um die fluoreszenzmarkierten Extensionsprodukte vor Lichteinfall zu schützen, wurde diese 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.5 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems®) durchgeführt.

Hierbei werden die aufgereinigten und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente kapillarelektrophoretisch aufgetrennt, die Farbstoffe mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt und die Wellenlänge des emittierten Lichtes detektiert und aufgezeichnet. Da jede Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann von der Wellenlänge des emittierten Lichtes auf die entsprechende Base geschlossen werden. Die Sequenz kann anschließend im Elektropherogramm abgelesen werden.

Bereits während der Phase der Aufreinigung wurde der 3500 Genetic Analyzer gestartet und auf 60°C vorgeheizt. Zusätzlich wurden bereits die Probennummern anhand des Pipettierschemas eingegeben sowie Füllungsstand und Haltbarkeit des Anoden- bzw. Kathodenpuffers (Anode Buffer Container 3500 Series, Cathode Buffer Container 3500 Series, Applied Biosystems®), des Polymers (Pop-7™, Applied Biosystems®) und der Kapillaren (Capillary Array 50cm-8cap, Applied Biosystems®) überprüft.

Vor Durchführung der Kapillarelektrophorese wurden die Proben mit jeweils 10µl HiDi (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems®), einem entionisierten Formamid, resuspendiert. Daraufhin wurde die Platte in die Halterung für den 3500 Genetic Analyzer eingebaut.

Nach Eingabe der Kassette in den Automaten wurde die Analyse gestartet. Die Ergebnisse konnten nach Beendigung der Sequenzanalyse mittels USB-Stick entnommen und mit Hilfe des Programms

Chromas Lite 2.1 (http://technelysium.com.au/?page_id=13) in Form eines Elektropherogrammes ausgewertet werden.

Für die in der Einleitung beschriebenen Punktmutationen im IDH-1 Gen wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Sequenzen erwartet.

| | Sequenz 3'→ 5' | |
|---------|----------------|-----|
| Wildtyp | C | G |
| R132H | C | G/A |
| R132G | C/G | G |
| R132C | C/T | G |
| R132S | C/A | G |
| R132L | C | G/T |

Tabelle 11: Erwartete Ergebnisse der Sequenzanalyse

Von diesen sind im Folgenden exemplarisch die Elektropherogramme des Wildtyps, der R132H sowie der R132G Mutation dargestellt (Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9).

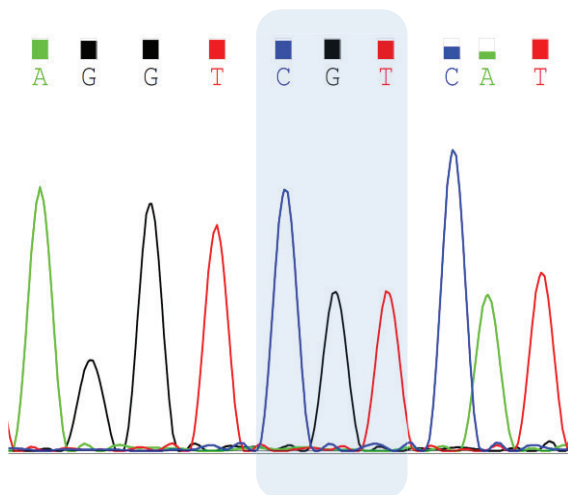


Abbildung 7: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm eines Wildtyps

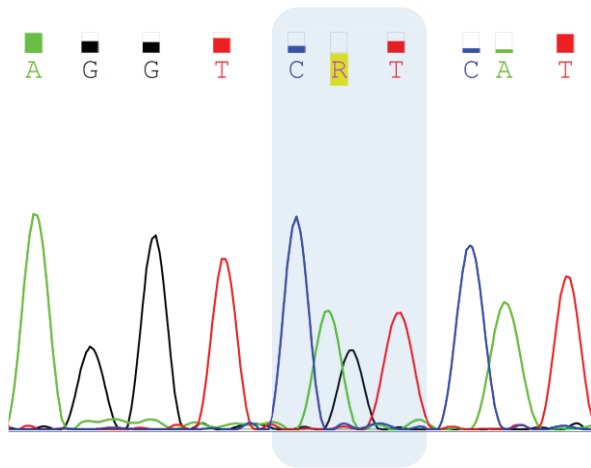


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm einer R132H Mutation

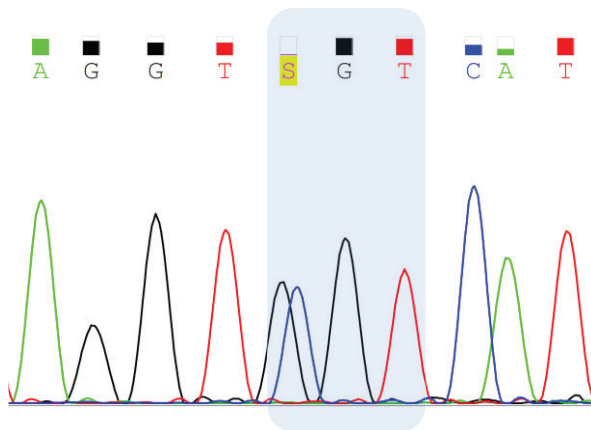


Abbildung 9: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm einer R132G Mutation

3.4 Bestimmung der IDH-1 R132H Mutation durch Fragmentanalyse

Für die Fragmentanalyse wurden die für die Sequenzierung isolierte und amplifizierte DNA aus FFPE Material sowie isolierte und amplifizierte DNA aus Patientenserum verwendet.

3.4.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Serum

Bereits frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei Tumorpatienten vermehrt zellfreie DNA-Fragmente im Serum zu finden sind (Vlassov et al. 2007; zitiert nach Lavon et al. 2010). Freigesetzt werden diese Fragmente, welche eine typische Größe von 180-200bp aufweisen, durch vermehrten Zelluntergang (Giacona et al. 1998). Zur Amplifikation dieser DNA Fragmente wurde eine PCR, wie

unter Punkt 3.3.3 beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurden der KAPA Blood PCR Mastermix B (peqlab) sowie die Primer Intern Forward und Intern Reverse aus der Sequenzierung (Sequenz siehe Tabelle 5) verwendet. Da es sich hierbei um frei zirkulierende DNA handelt war keine gesonderte DNA-Isolation notwendig.

Nach Befüllen der beschrifteten PCR-Gefäße mit jeweils 2,5µl Serum wurde ein Master-Mix erstellt. Von diesem wurden jeweils 22,5µl auf jede Probe pipettiert, sodass jedes PCR-Gefäß ein Endvolumen von 25µl enthielt. Der Ansatz für eine Probe ist in Tabelle 12 aufgeführt.

| Ansatz für eine Probe: | |
|-------------------------------------|--------|
| Primer Intern forward (1:10) | 1,25µl |
| Primer Intern reverse (1:10) | 1,25µl |
| KAPA Blood PCR Mastermix B | 12,5µl |
| PCR-H₂O | 7,5µl |

Tabelle 12: Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Serum: Ansatz für eine Probe

Anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler unter in Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen gestartet.

| PCR-Bedingungen | |
|------------------------|------|
| 95°C 5 min | |
| 95°C 30 sek | }x40 |
| 56°C 40 sek | |
| 72°C 30 sek | |
| 72°C 2 min | |
| 10°C ∞ | |

Tabelle 13: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Serum

Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis einer erfolgreichen DNA-Amplifikation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Da ein relativ kleines DNA-Fragment von 129 Basenpaaren amplifiziert wurde, wurde ein 2%iges Agarose-Gel hergestellt. Aufgrund der hohen Viskosität des PCR-Produktes wurde dieses zunächst durch Zugabe von 10µl PCR-H₂O verdünnt und anschließend mit 3µl DNA-Ladepuffer versehen. Auf das Gel wurden jeweils 7µl 100bp Marker sowie das komplette PCR-Produkt aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 100 Volt über eine

Stunde angelegt, die DNA-Banden mittels UV-Licht detektiert und die einzelnen Banden für die Aufreinigung ausgeschnitten.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes.

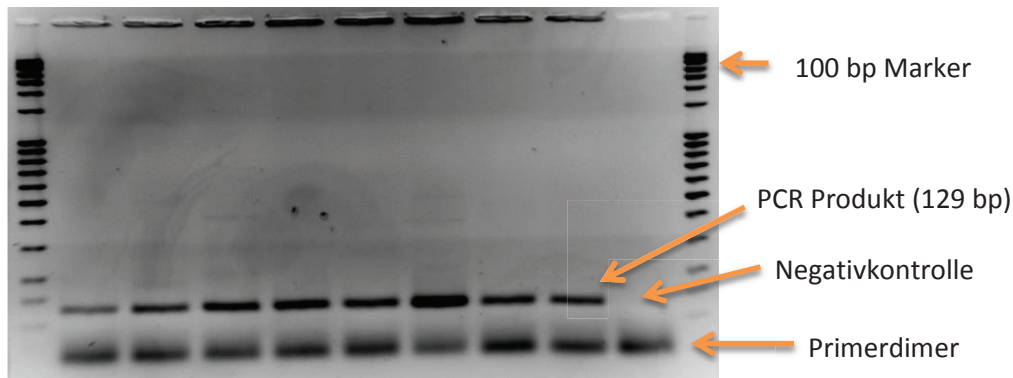


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts

DNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der DNA aus Agarosegel wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Auch dieses Verfahren macht sich die selektiven Bindungseigenschaften der in den QIAGEN Säulen befindlichen Silikamembran, wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben, zu Nutze. Bei hohen Konzentrationen chaotroper Salze und einem pH-Wert von <7,5 werden bis zu 10µg DNA in der Membran der Zentrifugensäulen gebunden. Bei zu hohem pH-Wert sinkt die Ausbeute an DNA entsprechend ab (QIAquick® Spin Handbook, http://mvz.berkeley.edu/egl/resources/product%20inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf). Durch verschiedene Waschschriffe werden alle Verunreinigungen aus den Proben entfernt. Die reine, gebundene DNA kann anschließend in PCR-H₂O eluiert werden.

Zunächst wurde das Gewicht der ausgeschnittenen DNA-Banden mittels Feinwaage ermittelt und die dreifache Menge an QG-Puffer hinzugegeben. Daraufhin wurde die Agarose in einem 10-minütigen Wasserbad bei 50°C gelöst. Nach Überprüfen des pH-Wertes mittels im Puffer enthaltenem Farbindikator und einer, falls notwendig, entsprechenden pH-Wert Korrektur mittels Zugabe einer kleinen Menge 3M Natriumacetat, wurde eine dem Gewicht entsprechende Menge an Isopropanol 100% hinzugegeben. Davon wurden jeweils 750µl auf die QIAGEN Säulen pipettiert und 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden jeweils 500µl QG-Puffer auf jede Säule pipettiert und 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 750µl PE-Puffer. Daraufhin wurden die Säulen eine Minute

trocken zentrifugiert. Zuletzt wurde die DNA in 30µl PCR-H₂O eluiert und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop gemessen (Prinzip siehe Punkt 3.3.2).

3.4.2 Snap Shot PCR

Für die Fragmentanalyse wurde das SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems®) verwendet. Die Fragmentanalyse basiert auf dem Prinzip der Single Base Extension. Im Unterschied zur Cycle Sequencing Reaktion wie unter Punkt 3.3.4 beschrieben stehen hierbei der DNA-Polymerase statt den üblichen dNTPs und den fluoreszenzmarkierten ddNTPs ausschließlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs für die DNA-Synthese zur Verfügung. Aus diesem Grund wird jeder Primer nur um ein Nukleotid am 3'-Ende verlängert bevor es zum Abbruch der DNA-Synthese kommt.

Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide.

| ddNTP | Fluoreszenz-Farbstoff | Farben der analysierten Daten |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|
| A | dR6G | grün |
| C | dTAMRA™ | schwarz |
| G | dR110 | blau |
| T (U) | dROX™ | rot |

Tabelle 14: Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide in der Snap Shot PCR (ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit, Protocol)

Der verwendete Primer wurde von Eurofins MWG Operon synthetisiert und bezogen. Da es sich bei der zu untersuchenden Mutation um eine Punktmutation handelt, wurde der für die Fragmentanalyse verwendete Primer so synthetisiert, dass dieser genau ein Nukleotid vor der zu untersuchenden Base endet. Auf diese Weise kann speziell diese Mutation nachgewiesen werden ohne das komplette DNA-Fragment zu sequenzieren. In Tabelle 15 ist die Sequenz des verwendeten Primers dargestellt.

| | | |
|------------------|--------------|--------------------------------------------|
| Primer 2C | 23 bp | 5'GG TAA AAC CTA TCA TCA TAG GTC 3' |
|------------------|--------------|--------------------------------------------|

Tabelle 15: Snap Shot PCR: Verwendeter Primer

Im Folgenden sind beispielhaft der Wildtyp und die R132H-Mutation der unter Punkt 3.4.1 amplifizierten DNA-Fragmente dargestellt.

grün = Primer Intern Forward und Intern Reverse aus der Serum-PCR

gelb = Primer 2C aus der Fragmentanalyse

rot = Codon 132

Wildtyp:

```
3' ACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAA
5' TGGTTTACCGTGGTATGCTTTATAAGACCCACCGTGCCAGAAGTCTCTTCGGTAATAGACGTTTTT
```

```
TATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAG
ATAGGGGGCCGAACACTCACCTACCCATTTTGGATAGTAGTATCCAGCAGTACGAATACCCCTAGTTC
```

```
TAAGTCATGTTGGCAATAATGTGATTTTGCA 5'
ATTCAGTACAACCGTTATTACACTAAAACGA 3'
```

R132H Mutation:

```
3' ACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAA
5' TGGTTTACCGTGGTATGCTTTATAAGACCCACCGTGCCAGAAGTCTCTTCGGTAATAGACGTTTTT
```

```
TATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGTAAAACCTATCATCATAGGTCATCATGCTTATGGGGATCAAG
ATAGGGGGCCGAACACTCACCTACCCATTTTGGATAGTAGTATCCAGTAGTACGAATACCCCTAGTTC
```

```
TAAGTCATGTTGGCAATAATGTGATTTTGCA 5'
ATTCAGTACAACCGTTATTACACTAAAACGA 3'
```

Zunächst wurden jeweils 3µl aufgereinigtes PCR-Produkt aus dem Serum bzw. 0,5µl aufgereinigtes PCR-Produkt aus FFPE-Material in jedes PCR-Gefäß pipettiert. Anschließend wurden eine 4µM Primer-Verdünnung sowie ein Master-Mix angefertigt.

Der Ansatz für eine Probe ist in Tabelle 16 dargestellt.

| Ansatz für eine Probe: | |
|----------------------------------------------|------------------------------------|
| SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix | 5µl |
| Primer (4µM) | 1µl |
| PCR-H₂O | 1µl (bzw. 3,5µl bei FFPE-Material) |

Tabelle 16: Snap Shot PCR: Ansatz für eine Probe (Serum)

Pro Ansatz wurden jeweils 7µl bzw. 9,5µl Master-Mix in jedes PCR-Tube pipettiert, sodass jedes PCR-Gefäß ein Endvolumen von 10µl und eine Primer-Endkonzentration von 0,4µM enthielt. Die PCR wurde unter in Tabelle 17 dargestellten Bedingungen in einem Thermocycler gestartet.

| PCR-Bedingungen | |
|------------------------|-------|
| 96 °C 10 sek | } x25 |
| 50 °C 5 sek | |
| 60 °C 30 sek | |
| 4 °C ∞ | |

Tabelle 17: Snap Shot PCR-Bedingungen

Aufreinigung des PCR-Produktes

Um möglichst wenig unspezifischen Hintergrund in der Fragmentanalyse zu erhalten wurden die SnapShot PCR-Produkte zum Abbau ungebundener Nukleotide mit 1Unit des Enzyms rAPid Alkaline Phosphatase, welches die Dephosphorylierung am 5'-Phosphatende von DNA, RNA, Nukleotiden und Proteinen katalysiert, versehen (<http://www.roche-applied-science.com/shop/products/rapid-alkaline-phosphatase#tab-0>). Hierfür wurde in jedes PCR-Tube 1µl rAPid Alkaline Phosphatase sowie 1µl Phosphatase Puffer pipettiert. Es folgte die einstündige Inkubation bei 37°C. Im Anschluss daran wurde das Enzym bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

3.4.3 Fragmentanalyse

Für die Fragmentanalyse wurden jeweils 0,5µl des PCR-Produktes mit 0,5µl 120 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems™) sowie mit 19µl HiDi (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems® GeneScan™) versehen und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Davon wurden jeweils 10µl auf die 96-Well Platten aufgetragen. Die Fragmentanalyse erfolgte wie bereits die Sequenzierung mittels

kapillarelektrophoretischer Auftrennung (Prinzip siehe unter Punkt 3.3.5) im 3500 Genetic Analyzer. Die anschließende Auswertung des Elektropherogrammes erfolgte mit der Gene Mapper 4.1 Software (Applied Biosystems).

Die zu erwartenden Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

| | Primer 2c |
|---------|-----------|
| Wildtyp | G |
| R132H | G/A |
| R132G | G |
| R132C | G |
| R132S | G |
| R132L | G/T |

Tabelle 18: Erwartete Ergebnisse der Fragmentanalyse

Von diesen sind im Folgenden (Abbildung 11) exemplarisch die Elektropherogramme, einer aus FFPE-Material gewonnenen Probe, ohne und mit detektierter IDH-1 R132H Mutation dargestellt.

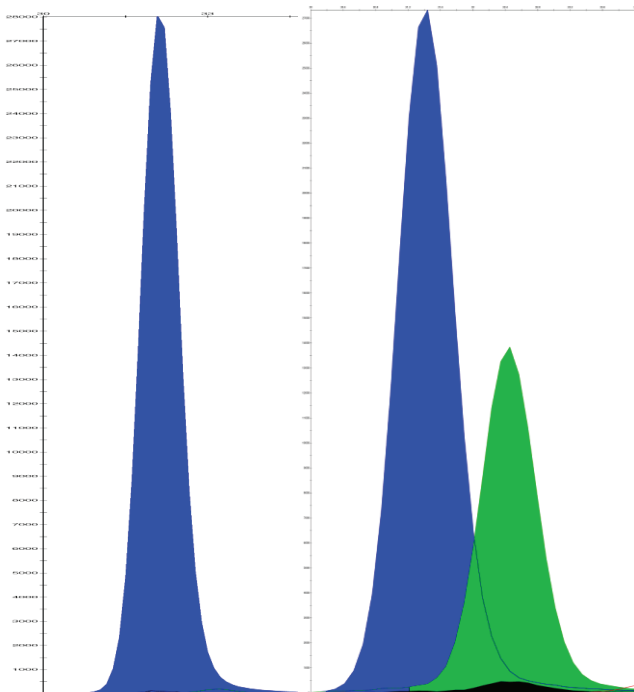


Abbildung 11: Exemplarisches Ergebnis der Fragmentanalyse. Links ohne und rechts mit Nachweis der IDH-1 R132H Mutation

4 Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS verwendet (IBM SPSS Statistics, Version 21). Qualitative Merkmale wurden grafisch anhand von Kreis- und Balkendiagrammen dargestellt. Zusätzlich wurden Lagemaße (Mittelwert, Median) und Streumaße (Standardabweichung) berechnet. Die Signifikanz für stetige Zielgrößen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test und für nominale oder diskrete Zielgrößen mit dem Chi-Quadrat-Test bestimmt. Zum Vergleich der einzelnen Nachweisverfahren der IDH-1 R132H-Mutation wurde, mit der Immunhistochemie als Standardverfahren, die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Methoden bestimmt. Für die Auswertung der Überlebenszeit wurden das Kaplan-Meier-Verfahren sowie eine grafische Darstellung der Überlebensfunktionen ausgewählt. Bei diesem Verfahren werden bei der Schätzung der kumulierten Überlebensraten auch die Fälle bei denen kein Todeszeitpunkt bekannt ist berücksichtigt und als sogenannte „zensierte“ Werte in die Analyse mit aufgenommen (Gräber et al. 2010). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-Rank-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf $\alpha = 0,05 = 5\%$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Daten

Insgesamt wurden 30 primäre Glioblastome und 13 sekundäre Glioblastome untersucht. Die Gruppe der Patienten, welche an primären Glioblastomen erkrankt waren, bestand aus 14 Frauen und 16 Männern, die der sekundären Glioblastome aus 2 Frauen und 11 Männern. Hieraus resultierte ein Verhältnis von erkrankten Frauen zu erkrankten Männern von 1:1,14 für primäre Glioblastome und ein Verhältnis von 1:5,5 für sekundäre Glioblastome.

Es konnte keine statistisch signifikante ($p=0,715$) Verbindung zwischen Tumortyp und Geschlecht im Chi-Quadrat-Test für primäre Glioblastome nachgewiesen werden. Für sekundäre Glioblastome hingegen zeigte sich mit einem p -Wert von 0,013 eine signifikante Korrelation.

In dem zu untersuchenden Patientenkollektiv stellte sich ein mittleres Erkrankungsalter von 50,9 Jahren (10-81 Jahre; SD 18,1) heraus. Als Erkrankungszeitpunkt wurde der Tag der histopathologischen Sicherung der Diagnose gewertet.

Diagramm 1 gibt einen Überblick über das Erkrankungsalter der Patienten an primären und sekundären Glioblastomen wieder.

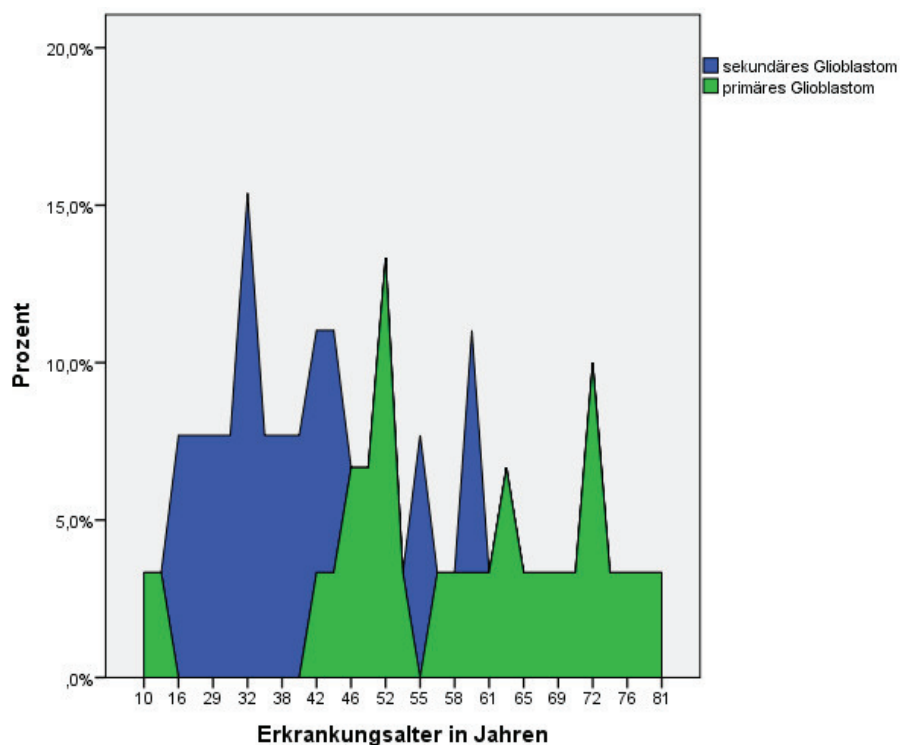


Diagramm 1: Erkrankungsalter primäre und sekundäre Glioblastome

Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit einem sekundären Glioblastom wesentlich früher erkrankten als Patienten mit einem primären Glioblastom. Das mittlere Erkrankungsalter bei primären Glioblastomen betrug 57,1 Jahre (10-81 Jahre; SD 16,8), das für sekundäre Glioblastome hingegen 36,6 Jahre (16-59 Jahre; SD 12,0). Mit einem p-Wert von $1,62 \cdot 10^{-4}$ im Mann-Whitney-U-Test war der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant.

Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung und Erkrankungszeitpunkt zeigte sich, dass Männer mit einem mittleren Alter von 53,5 Jahren (10-81 Jahre; SD 20,4) an primären Glioblastomen und mit einem mittleren Alter von 36,7 Jahren (16-59 Jahren; SD 13,1) an sekundären Glioblastomen erkrankten. Frauen hingegen sind mit einem mittleren Alter von 61,3 Jahren (42-76 Jahre; SD 10,5) später an primären Glioblastomen erkrankt als Männer. Das mittlere Alter bei Erkrankung an sekundären Glioblastomen betrug 36 Jahre (32-40 Jahre; SD 5,7). Der Unterschied zwischen Erkrankungsbeginn bei Männern und Frauen war sowohl für primäre Glioblastome (p-Wert 0,308) als auch für sekundäre Glioblastome (p-Wert 0,921) im Mann-Whitney-U-Test statistisch nicht signifikant.

5.2 Detektion der IDH-1 R132H Mutation

5.2.1 IDH-1 R132H Immunhistochemie

Insgesamt wurden 85 Gewebeproben immunhistochemisch auf die IDH-1 R132H Mutation untersucht.

Mikroskopische, visuelle Auswertung

Die IDH-1 R132H Mutation konnte immunhistochemisch in 35 Fällen detektiert werden, davon in vier diffus infiltrierenden Astrozytomen (DA), in zwei diffus infiltrierenden Oligoastrozytomen (DOA), in fünf anaplastischen Astrozytomen (AA), in vier anaplastischen Oligodendrogliomen (AO), in zehn anaplastischen Oligoastrozytomen (AOA), in neun sekundären Glioblastomen (sGBM) und in einem primären Glioblastom (pGBM). Es stellte sich heraus, dass diese Mutation bei Gliomen von WHO-Grad II-IV in unterschiedlicher Häufigkeit vorhanden ist. Diagramm 2 zeigt den prozentualen Anteil der detektierten Mutationen von jedem Tumortyp.

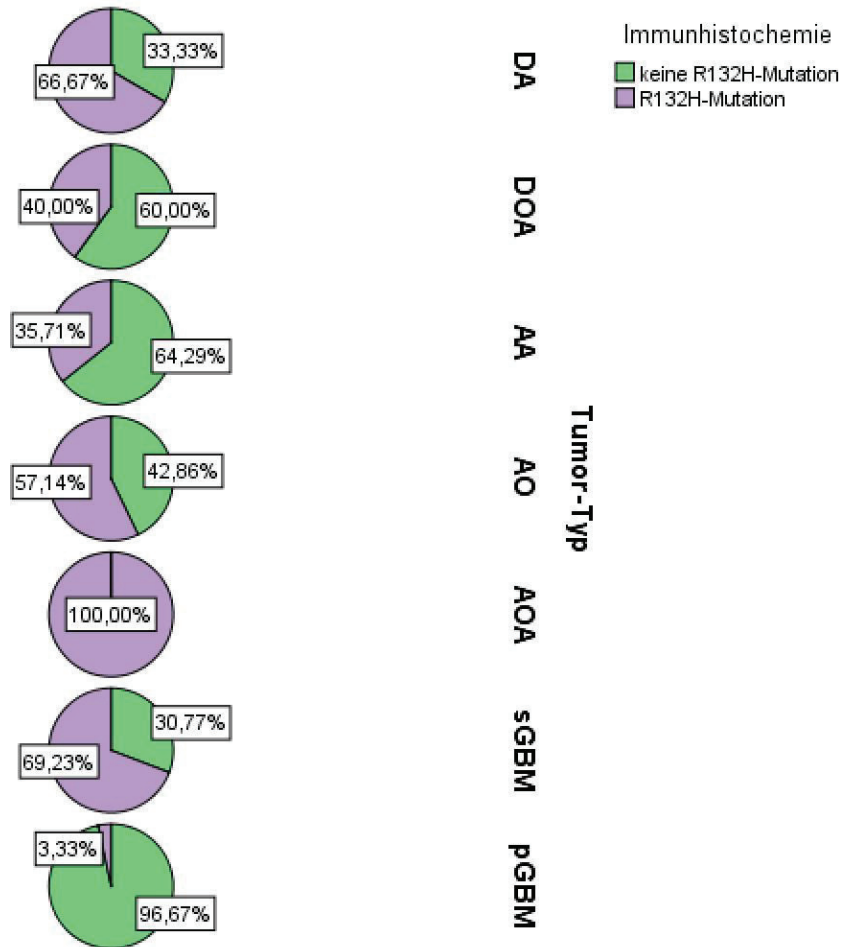


Diagramm 2: Prozentualer Anteil der IDH-1 R132H Mutation je Tumortyp

Zur Auswertung der einzelnen Färbungen wurde ein immunreaktiver Score (IRS) aus den prozentual angefärbten Tumorzellen und der Färbeintensität ermittelt.

Insgesamt waren in zwölf der Fälle mehr als 80% der Tumorzellen IDH-1 R132H positiv gefärbt. In dreizehn Fällen betrug der prozentual positiv gefärbte Tumoranteil zwischen 51% und 80%, in acht Fällen zwischen 11% und 50% und nur in zwei Fällen $\leq 10\%$. Die Färbeintensität immunhistochemisch positiv gefärbter Präparate reichte von schwach positiv zu stark positiv. Zusammenfassend waren neunzehn der Fälle stark positiv, elf mäßig und fünf schwach positiv gefärbt.

Diagramm 3 gibt einen Überblick über alle immunhistochemisch positiv gefärbten Präparate und ihrem prozentualen Anteil an IDH-1 R132H positiven Tumorzellen. Diagramm 4 stellt die Färbeintensität der gesamten IDH-1 R132H positiven Immunhistochemie dar.

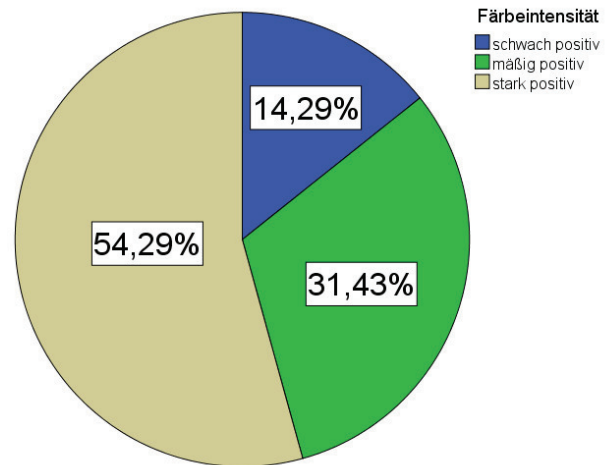
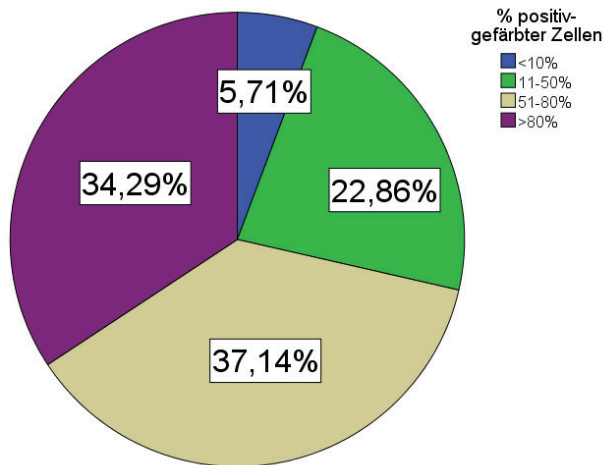


Diagramm 3: Verteilung der einzelnen IHC-Präparate nach ihrem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen

Diagramm 4: Färbeintensität IDH-1 R132H positiver IHC

Aus Diagramm 5 wird ersichtlich, dass die Mehrzahl der detektierten Fälle mit Punktwerten zwischen 3 und 12 mäßig bis stark positiv waren. Nur wenige Präparate waren leicht IDH-1 R132H positiv mit Punktwerten von 1 oder 2.

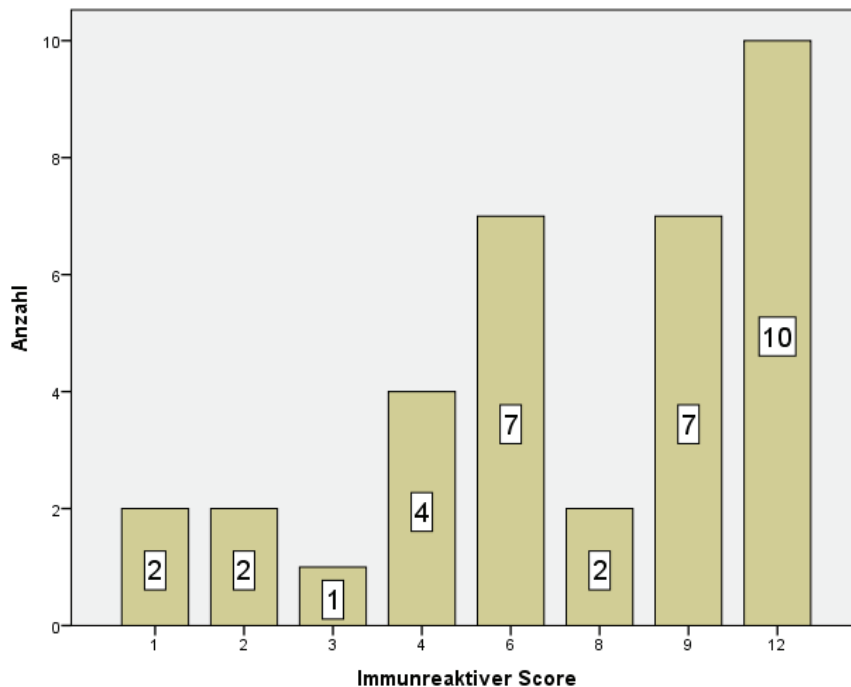


Diagramm 5: IRS IDH-1 R132H positiver Immunhistochemie

Tabelle 19 gibt einen Überblick über die Anzahl der vergebenen IRS je WHO-Grad. Ein Zusammenhang zwischen IRS und WHO-Grad war mit einem p-Wert von 0,51 im Chi-Quadrat Test nach Pearson nicht statistisch signifikant.

| | | WHO | | | Gesamt |
|--------|----|-----|----|----|--------|
| | | 2 | 3 | 4 | |
| Score | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 4 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| | 6 | 2 | 4 | 1 | 7 |
| | 8 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 9 | 2 | 2 | 3 | 7 |
| | 12 | 0 | 6 | 4 | 10 |
| Gesamt | | 6 | 19 | 10 | 35 |

Tabelle 19: Anzahl der vergebenen IRS je WHO-Grad

5.2.2 Sequenzierung

Die immunhistochemisch untersuchten Gewebeproben wurden ebenfalls mittels Sequenzierung untersucht. Durch Sequenzierung konnte in achtzehn Fällen eine IDH-1 R132H Mutation nachgewiesen werden. In zwei weiteren Fällen wurde eine IDH-1 R132G Mutation detektiert. Insgesamt wurde die IDH-1 R132H Mutation bei zwei diffus infiltrierenden Astrozytomen, zwei diffus infiltrierenden Oligoastrozytomen, drei anaplastischen Astrozytomen, fünf anaplastischen Oligoastrozytomen, fünf sekundären Glioblastomen und einem primären Glioblastom nachgewiesen. Die Mutation wurde bei keinem anaplastischen Oligodendrogliom detektiert. Die IDH-1 R132G Mutation fand sich bei einem diffus infiltrierendem Oligoastrozytom und einem sekundären Glioblastom.

Diagramm 6 zeigt den prozentualen Anteil der einzelnen Mutationen je Tumortyp.

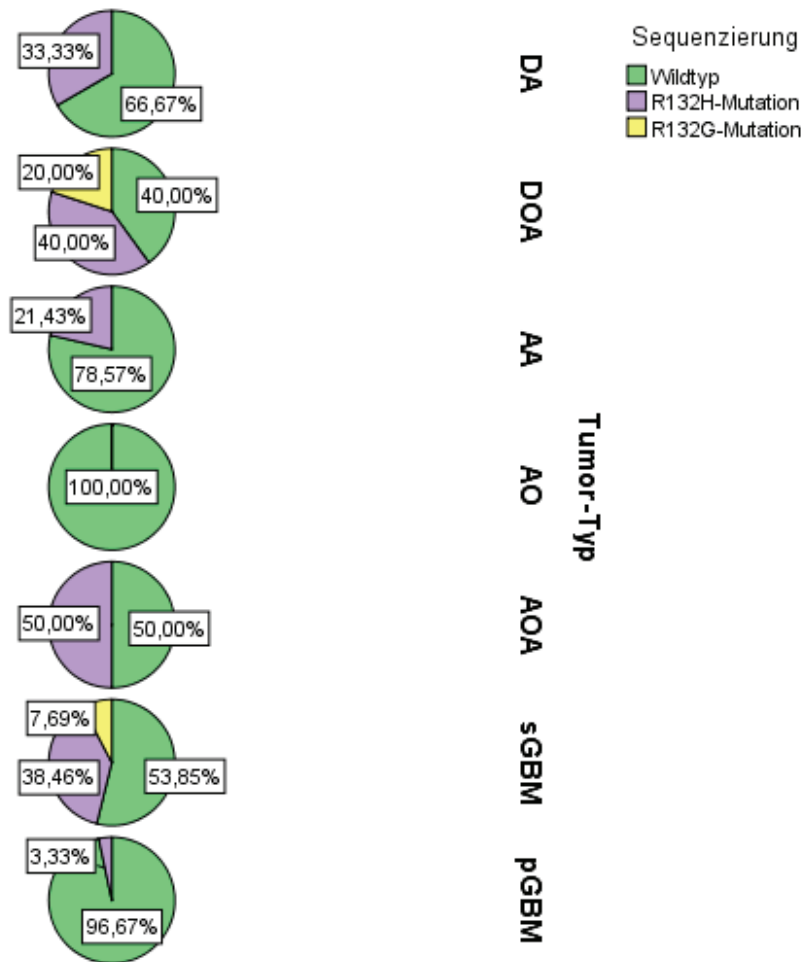


Diagramm 6: Prozentualer Anteil der IDH-1 Mutation an jedem Tumortyp

Siebzehn Fälle der immunhistochemisch detektierten IDH-1 R132H Mutationen konnten in der Sequenzierung nicht nachgewiesen werden.

5.2.3 Fragmentanalyse

Mittels Fragmentanalyse konnte in 24 Tumoren eine IDH-1 R132H Mutation detektiert werden. Insgesamt wurde die Mutation bei vier diffus infiltrierenden Astrozytomen, zwei diffus infiltrierenden Oligoastrozytomen, vier anaplastischen Astrozytomen, einem anaplastischen Oligodendrogliomen, sieben anaplastischen Oligoastrozytomen, fünf sekundären Glioblastomen und einem primären Glioblastom auffindig gemacht.

Diagramm 7 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil der detektierten Mutationen an jedem Tumortyp.

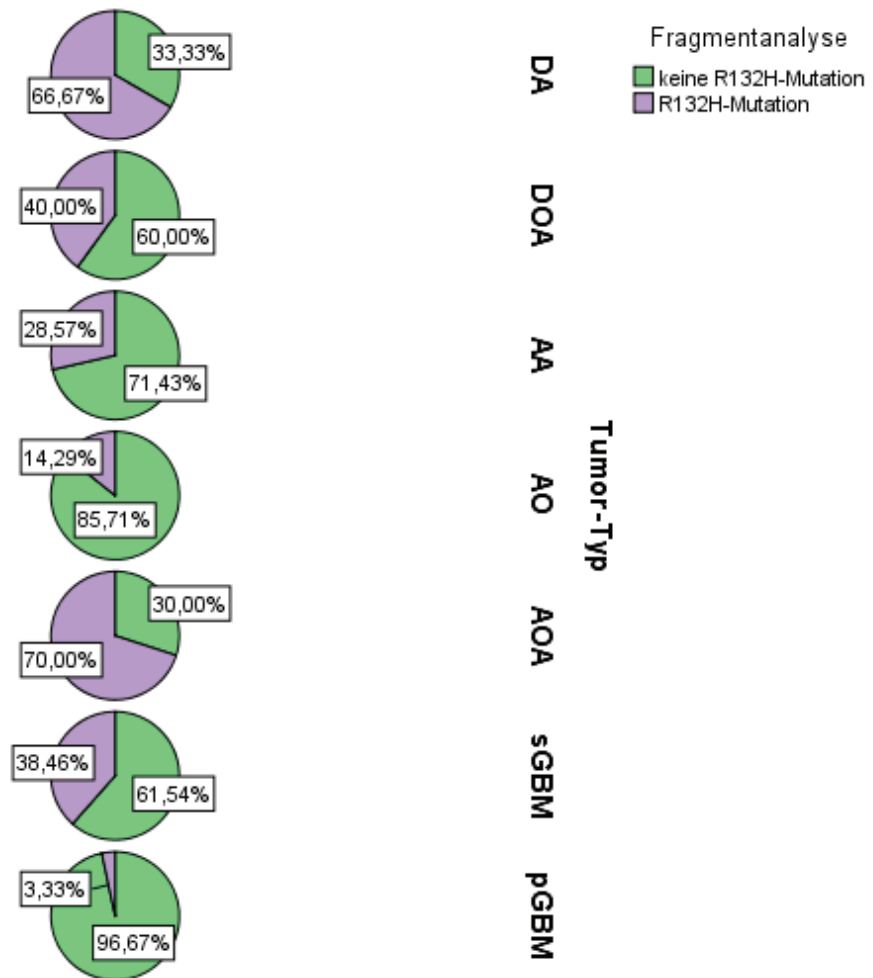


Diagramm 7: Prozentualer Anteil der IDH-1 R132H Mutation an jedem Tumortyp

In dreizehn Fällen konnte die immunhistochemisch detektierte IDH-1 R132H Mutation mittels Fragmentanalyse nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in zwei Fällen eine IDH-1 R132H Mutation detektiert, die weder immunhistochemisch noch mittels Sequenzierung nachgewiesen werden konnte.

5.2.4 Serumanalyse

Von 44 der 85 untersuchten Gewebeproben war Serum vorhanden, welches aus einer zeitnah zur Operation erfolgten Blutentnahme gewonnen wurde. Nach DNA-Isolierung aus dem Serum und nachfolgender DNA-Quantifizierung erfolgte exemplarisch die Sequenzierung von 10 Samples. Mittels herkömmlicher Sequenzierung konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Auch mittels Fragmentanalyse der 24 Serumproben der Patienten mit durch Immunhistochemie nachgewiesener IDH-1 R132H Mutation im Tumor gelang kein eindeutiger Nachweis dieser Mutation. Hierbei zeigte

sich neben dem zu erwartenden Mutations-Peak ein unspezifischer Peak in gleicher Signalhöhe, so dass die Ergebnisse nicht weiter verwertet werden konnten (Abbildung 12).

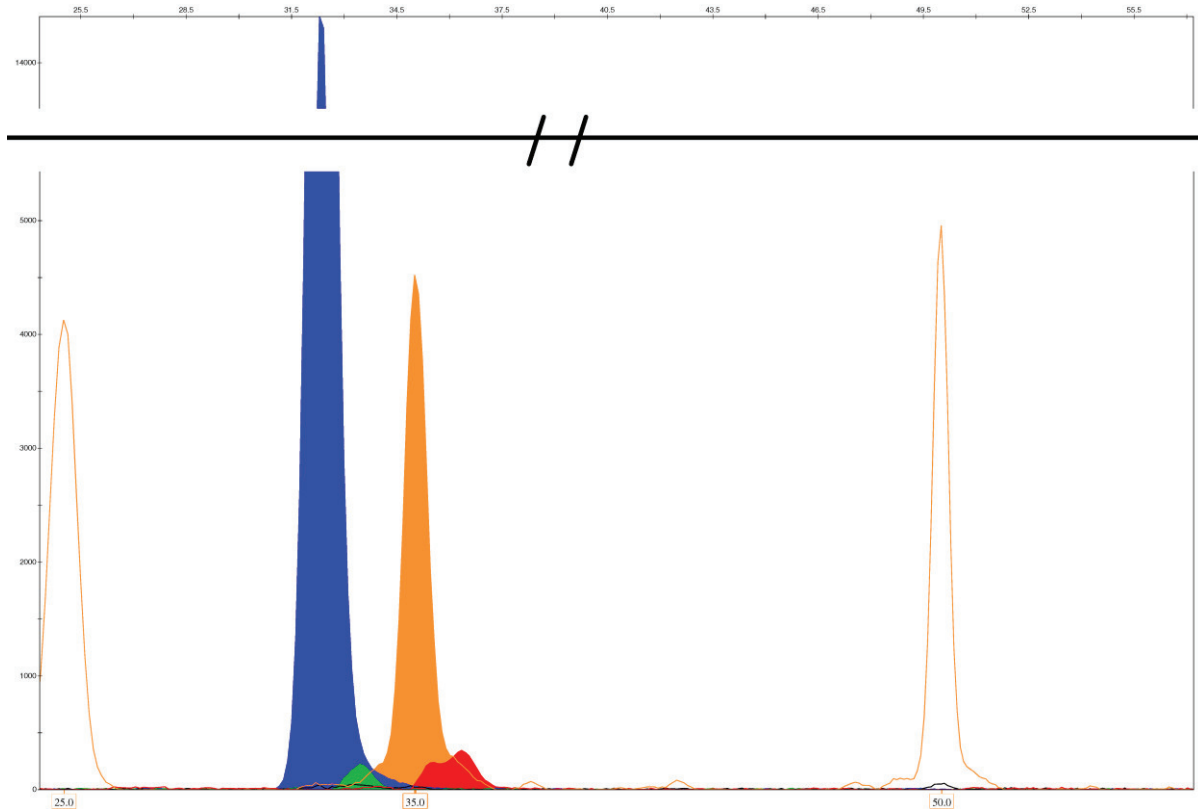


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung eines nicht gewerteten Ergebnisses der Fragmentanalyse

5.3 Vergleich der einzelnen Nachweisverfahren und Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 20 gibt einen Überblick über den zeitlichen Aufwand, die Nachweisgrenzen sowie die Durchführbarkeit der einzelnen Methoden. Tabelle 21 hingegen zeigt die Anzahl der detektierten IDH-1 Mutationen durch jedes Verfahren sowie deren Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die IDH-1 R132H Immunhistochemie als Referenzmethode auf.

| | Immunhistochemie | Sequenzierung | Fragmentanalyse |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Zeit | 2 Tage | 3 Tage | 3 Tage |
| Materialmenge | 1 Leerschnitt á 2µm Dicke | 4-5 Leerschnitte á 5µm Dicke | 4-5 Leerschnitte á 5µm Dicke |
| Nachweisgrenze | Nachweis einzelner mutierter Tumorzellen möglich | Tumor-DNA 25-30% | 0,01-0,4 pmol DNA |
| Interpretation | Einfach, jedoch nicht ganz objektiv | Einfach | Einfach |
| Detektion seltener Mutationen | Nein* | Ja | Nein** |
| Spezielle Geräte | Nein | Sequenzierer | Sequenzierer |

Tabelle 20: Vergleich der Methoden: IDH-1 R132H Immunhistochemie, Sequenzierung, Fragmentanalyse

* unter Verwendung weiterer spezifischer monoklonaler Antikörper möglich

** unter Verwendung entsprechend synthetisierter Primer möglich

| | Immunhistochemie | Sequenzierung | Fragmentanalyse |
|-----------------------|------------------|---------------|-----------------------------|
| IDH-1 R132H | 35 | 18 | 24 (davon zwei IHC negativ) |
| IDH-1 R132G | -* | 2 | -* |
| Sensitivität** | - | 51,4% | 62,9% |
| Spezifität** | - | 100% | 96,0% |

Tabelle 21: Ergebnisse der einzelnen Methoden im Vergleich

* IDH-1 R132G Mutationen erscheinen in der IHC mit R132H spezifischem Antikörper und mit diesem in der Fragmentanalyse verwendeten Primer per se als Wildtyp und können daher vom Verfahren her so nicht detektiert werden.

** Sensitivität und Spezifität wurden mit der IHC als Standard berechnet

Es konnte gezeigt werden, dass mit der herkömmlichen IDH-1 R132H Immunhistochemie mehr Mutationen bei einem geringeren Zeitaufwand und geringeren Kosten detektiert werden können. Mit der Immunhistochemie als Referenzmethode konnte für die Sequenzierung eine Sensitivität von 51,4% und eine Spezifität von 100% ermittelt werden. Die Sensitivität und Spezifität für die Fragmentanalyse betragen 62,9% bzw. 96,0%.

Betrachtet man die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und der Fragmentanalyse unter Berücksichtigung der durch die IDH-1 R132H Immunhistochemie ermittelten IRS so wird ersichtlich, dass selbst bei schwach IDH-1 R132H positiven Präparaten die Mutation durch die anderen Methoden bestätigt werden konnte.

Tabelle 22 gibt einen Überblick über die durch Sequenzierung und Fragmentanalyse ermittelten Ergebnisse in Abhängigkeit der durch die IDH-1 R132H Immunhistochemie vergebenen IRS.

| IRS | Sanger-Sequenzierung IDH-1 R132H positiv | Fragmentanalyse IDH-1 R132H positiv |
|---------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|
| Schwach positiv (1, 2, 3) | 2 | 3 |
| Moderat positiv (4, 6, 8) | 7 | 8 |
| Stark positiv (9, 12) | 9 | 11 |

Tabelle 22: Immunreaktiver Score der durch Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse detektierten IDH-1 R132H Mutationen

5.4 Überlebenszeitanalyse

Aus den klinischen Daten der 43 Glioblastom-Patienten und dem IDH-1 Mutationsstatus wurde für jedes der drei Nachweisverfahren für die IDH-1 R132H Mutation eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt und deren Signifikanz mit dem Log-Rank-Test überprüft. Die unterschiedlichen therapeutischen Verfahren, die jeder Patient erhalten hat, wurden dabei nicht berücksichtigt.

5.4.1 IDH-1 R132H Immunhistochemie

Aus Diagramm 8 wird ersichtlich, dass die Überlebensfunktionen für IDH-1 R132H mutierte und nicht mutierte Glioblastome unterschiedlich verlaufen. Die mittlere Überlebenszeit bei IDH-1 R132H mutierten Glioblastomen betrug 31,3 Monate (SD 28,5) Monate, bei nicht mutierten Glioblastomen hingegen nur 13,6 Monate (SD 14,0).

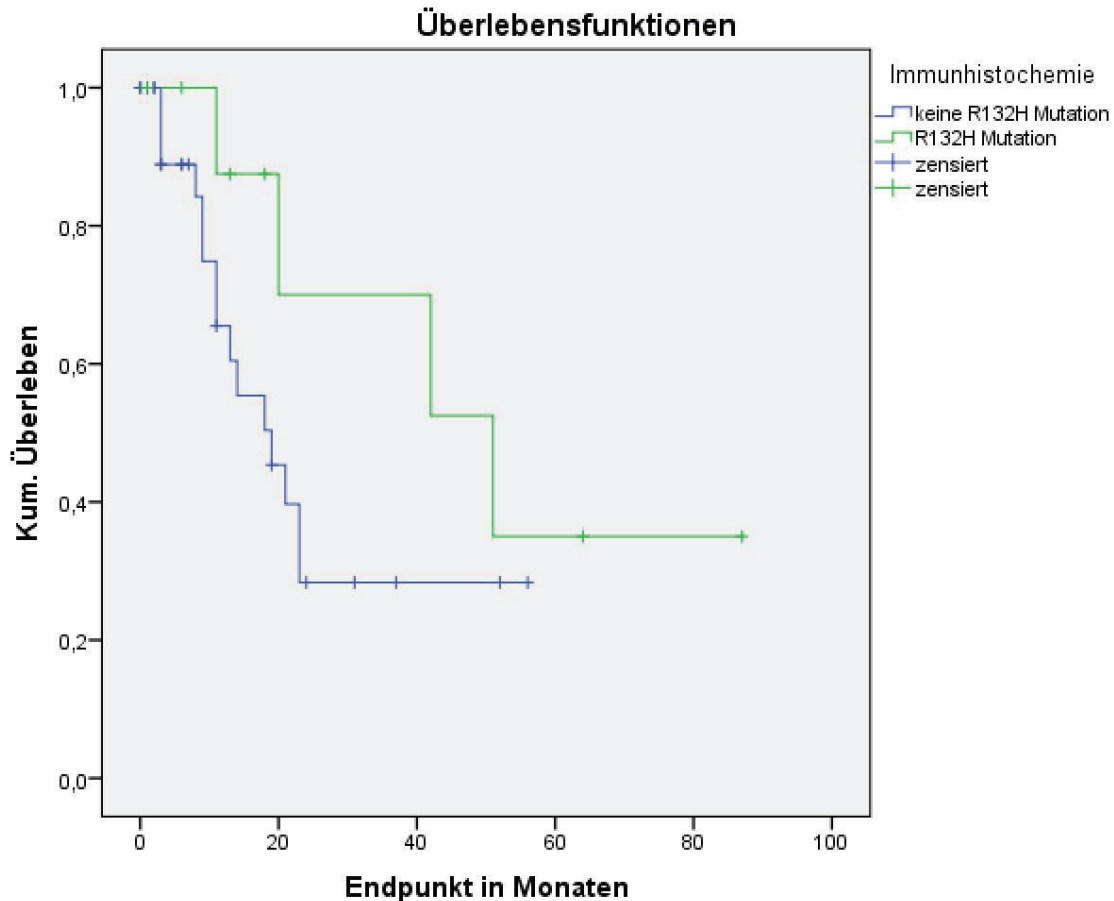


Diagramm 8: Überlebensfunktionen Immunhistochemie

Mit einem p-Wert von 0,17 war der Unterschied zwischen beiden Überlebensfunktionen statistisch nicht signifikant.

5.4.2 Sequenzierung

Die Überlebensfunktionen von in der Sequenzierung detektierten IDH-1 mutierten und IDH-1 Wildtyp Glioblastomen verlaufen unterschiedlich (siehe Diagramm 9). Die mittlere Überlebenszeit von IDH-1 mutierten Glioblastomen lag bei 39,8 Monaten (SD 32,6), die von IDH-1 Wildtyp Glioblastomen hingegen bei 14,2 Monaten (SD 14,4). Da es sich bei der aufgetretenen IDH-1 R132G Mutation um einen einzelnen Fall handelte, konnte hier keine mittlere Überlebenszeit angegeben werden. Im konkreten Einzelfall betrug die Überlebenszeit 11 Monate.

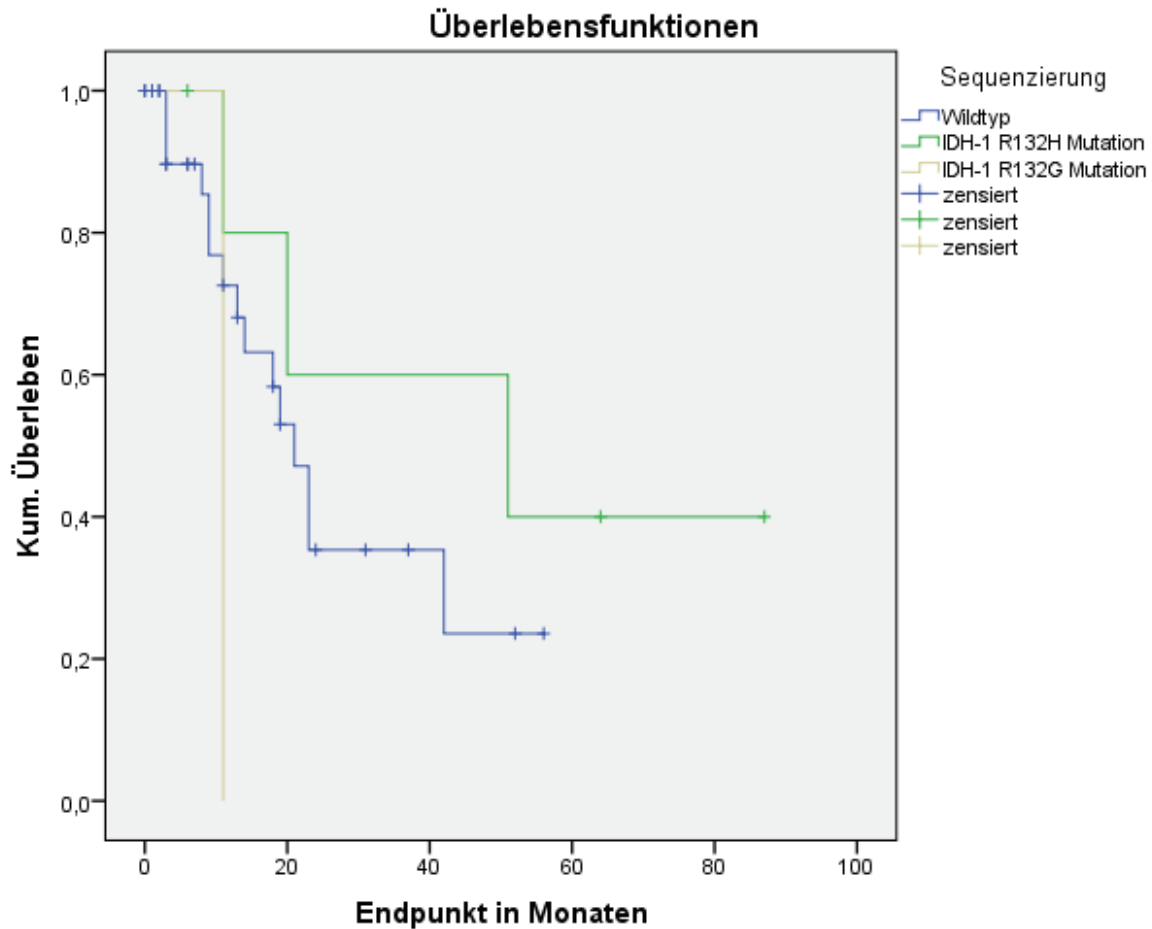


Diagramm 9: Überlebensfunktionen Sequenzierung

Mit einem p-Wert von 0,294 war der Unterschied zwischen beiden Überlebensfunktionen für IDH-1 Wildtyp und IDH-1 R132H Mutation statistisch nicht signifikant.

5.4.3 Fragmentanalyse

Die beiden Überlebensfunktionen für in der Fragmentanalyse detektierten IDH-1 R132H mutierten Glioblastomen und nicht an dieser Stelle mutierten Glioblastomen verlaufen ebenfalls unterschiedlich (siehe Diagramm 10). Die mittlere Überlebenszeit bei IDH-1 R132H Mutation beträgt 39,8 Monate (SD 32,6), bei nicht nachgewiesener Mutation hingegen 14,1 Monate (SD 14,2).

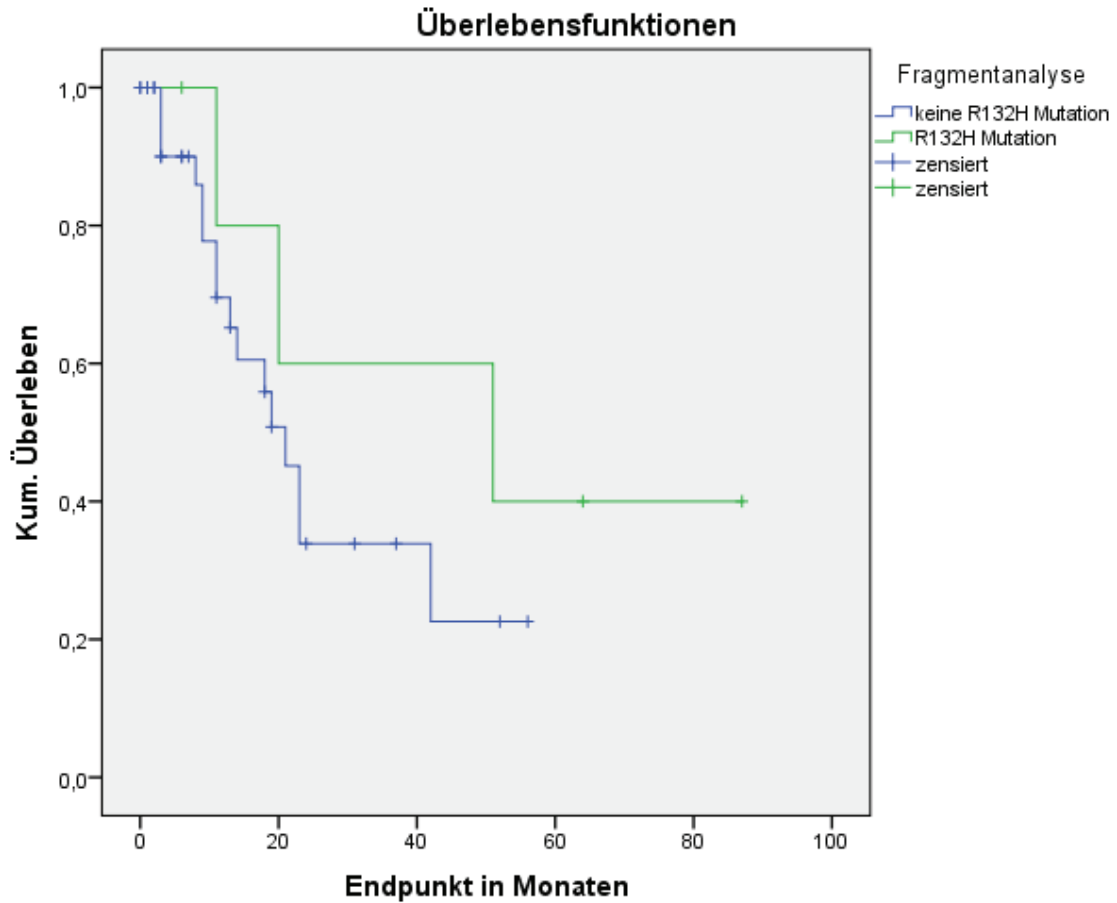


Diagramm 10: Überlebensfunktionen Fragmentanalyse

Mit einem p-Wert von 0,312 war der Unterschied zwischen beiden Überlebensfunktionen statistisch nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Detektion der IDH-1 R132H Mutation

6.1.1 IDH-1 R132H Immunhistochemie

Die in dieser Arbeit immunhistochemisch erhobenen Daten umfassen OP-Präparate von 85 Tumorpatienten, deren Tumoranteil im Hinblick auf die Sequenzierung und Fragmentanalyse mindestens 30% betrug. Insgesamt konnte in 35 der 85 untersuchten Gewebeproben (41,2%) die IDH-1 R132H Mutation mit dem monoklonalen Antikörper DIA-H09 nachgewiesen werden. Die IDH-1 R132H Mutation war in 66,7% der diffusen Astrozytome (4/6), 40% der diffusen Oligoastrozytomen (2/5), 35,7% der anaplastischen Astrozytome (5/14), 57,1% der anaplastischen Oligodendrogliome (4/7), in 100% der anaplastischen Oligoastrozytome (10/10), 69,2% der sekundären Glioblastome (9/13) und in 3,3% der primären Glioblastome (1/30) detektierbar.

Vergleicht man diese Zahlen mit einer Arbeit von Preusser et al. 2011 die eine ähnliche Fallzahl von 95 Gliompatienten unter Durchführung mit demselben monoklonalen Antikörper ebenfalls unter Verwendung von FFPE-Material einschloss, konnten in diesem Fall 66 IDH-1 R132H Mutationen (69,5%) nachgewiesen werden (Preusser et al. 2011). Dies beinhaltete eine übereinstimmende Mutationsrate von 60% für diffuse Astrozytome (12/20) und 66,7% für sekundäre Glioblastome (6/9). Abweichende Ergebnisse bezüglich des IDH-1 R132H Mutationsstatus zeigten sich bei diffusen Oligoastrozytomen (85,7%; 6/7), anaplastischen Astrozytomen (63,6%; 7/11), anaplastischen Oligodendrogliomen (93,75%; 15/16), anaplastischen Oligoastrozytomen (87,5%; 7/8) sowie primären Glioblastomen (16,7%; 2/12) (Preusser et al. 2011). In einer weiteren Arbeit von Capper et al. 2010, welche eine höhere Fallzahl von 345 Gliompatienten einschloss, konnten die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse für anaplastische Oligodendrogliome sowie für primäre und sekundäre Glioblastome bestätigt werden. Capper et al. 2010 detektierten die IDH-1 R132H Mutation in 87,5% der anaplastischen Oligodendrogliome, in 71,4% der sekundären Glioblastomen sowie in 4% der primären Glioblastome (Capper et al. 2010).

In verschiedenen anderen Studien konnte vor allem durch Sequenzierung gezeigt werden, dass die IDH-1 R132H Mutationsrate Werte zwischen 50% und 80% für Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome beträgt, unabhängig davon, ob es sich dabei um WHO-Grad II oder III Tumoren oder um sekundäre Glioblastome handelt. Dagegen gilt eine IDH-1 Mutation in primären Glioblastomen als Rarität (von Deimling et al. 2011; Balss et al. 2008; Horbinski et al. 2009; Ichimura et al. 2009; Sonoda et al. 2009; Watanabe et al. 2009; Yan et al. 2009). Die Mutationsrate von primären Glioblastomen wird auf unter 10% angegeben (Hartmann et al. 2010; Nobusawa et al. 2009).

Somit liegen die immunhistochemisch detektierten Mutationsraten für diffuse Astrozytome, anaplastische Oligodendrogliome, anaplastische Oligoastrozytome, primäre und sekundäre Glioblastome im bisher bekannten Häufigkeitsbereich, wohingegen die Mutationsraten für diffuse Oligoastrozytome und anaplastische Astrozytome davon abweichen.

Dies ist im hier vorliegenden Fall der diffusen Oligoastrozytome mutmaßlich einerseits auf die niedrige Zahl von fünf Fällen zurückzuführen, andererseits wurde mittels Sequenzierung eine seltener vorkommenden IDH-1 R132G Mutation detektiert, die mit dem hier verwendeten monoklonalen Antikörper nicht detektiert werden kann, da dieser spezifisch die IDH-1 R132H Mutation nachweist. Würde man diese eine nicht detektierbare Mutation aus der Bilanz nehmen, ergäbe sich eine IDH-1 R132H Mutationsrate von 50% bei den diffusen Oligoastrozytomen.

Im Fall der anaplastischen Astrozytome könnte ein Grund für die niedrigere Detektionsrate der IDH-1 R132H Mutation sein, dass es sich bei 7 der 10 immunhistochemisch als IDH-1 R132H negativ erwiesenen Fälle um stereotaktische Biopsien und nur in 3 Fällen um chirurgische Tumorresektate handelte. Stereotaktische Biopsien werden nativ an das Labor der Neuropathologie versandt. Durch die verzögerte Fixierung der Biopsate in Formalin kann es, abhängig von der Liegedauer und der Umgebungstemperatur, zu einem Verlust der Antigenität kommen (Hilbig et al. 2004) und damit zum Verlust der Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper. Bei zwei immunhistochemisch R132H negativen stereotaktischen Biopsien eines diffusen und eines anaplastischen Astrozytoms konnte mittels Fragmentanalyse eine IDH-1 R132H Mutation nachgewiesen werden. Die zu untersuchenden Präparate beinhalteten einen Tumoranteil von 25% bzw. 60% im Schnittpräparat und wurden nativ an das Labor der Neuropathologie versandt.

6.1.2 Sequenzierung

Durch Sequenzierung konnte in 18 (21,2%) der 85 untersuchten Gewebeproben eine IDH-1 R132H Mutation nachgewiesen werden. In zwei weiteren Fällen wurde eine IDH-1 R132G Mutation detektiert. Insgesamt zeigte sich die IDH-1 R132H Mutation in 33,3% der diffusen Astrozytome (2/6), 40% der diffusen Oligoastrozytome (2/5), 21,4% der anaplastischen Astrozytome (3/14), in keinem anaplastischen Oligodendrogliom (0/7), in 50% der anaplastischen Oligoastrozytome (5/10), in 38,5% der sekundären Glioblastome (5/13) und in 3,3% der primären Glioblastome (1/30). Die IDH-1 R132G Mutation fand sich bei einem diffus infiltrierendem Oligoastrozytom (1/5) und einem sekundären Glioblastom (1/13).

Siebzehn der immunhistochemisch detektierten IDH-1 R132H Mutationen konnten mittels Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnten zwei IDH-1 R132G Mutationen, die

aufgrund des spezifischen Nachweises der IDH-1 R132H Mutation des monoklonalen Antikörpers nicht nachgewiesen werden konnten, detektiert werden. Vergleicht man auch diese Ergebnisse mit den Werten aus der Literatur so zeigt sich, dass Hartmann et al., welche 1010 WHO-Grad II und III Gliome mittels Sequenzierung untersuchten, höhere Mutationsraten detektierten (Hartmann et al. 2009). Es wurde eine Mutationsrate von 72,7% für diffuse Astrozytome, eine Mutationsrate von 64% für anaplastische Astrozytome, eine Mutationsrate von 82% für diffuse Oligodendrogliome, eine Mutationsrate von 69,5% für anaplastische Oligodendrogliome, eine Mutationsrate von 81,6% für diffuse Oligoastrozytome sowie eine Mutationsrate von 66,1% für anaplastische Oligoastrozytome beschrieben (Hartmann et al. 2009).

Die bisher beschriebene Häufigkeit der IDH-1 Mutation bei WHO-Grad II und III Gliomen sowie bei sekundären Glioblastomen von mindestens 50% konnte in dieser Arbeit mittels Sequenzierung lediglich für anaplastische Oligoastrozytome (50%) nachgewiesen werden. Auch die niedrige Mutationsrate von 3,3% bei primären Glioblastomen entspricht den bisher bekannten Häufigkeiten aus der Literatur (von Deimling et al. 2011; Balss et al. 2008; Horbinski et al. 2009; Ichimura et al. 2009; Sonoda et al. 2009; Watanabe et al. 2009; Yan et al. 2009).

Eine mögliche Ursache für die niedrigere Detektionsrate ist, dass es sich bei beschriebener Mutation um eine heterozygot vorkommende Punktmutation handelt. Nicht alle Tumorzellen weisen eine mutierte Isocitratdehydrogenase 1 auf. Wird der Anteil an mutierter DNA in der isolierten DNA, die neben der DNA von Tumorzellen auch DNA normalen Gewebes enthält, zu gering, so verschwindet der Mutationspeak der Sequenzierung im Hintergrund und wird nicht als solcher erkannt. Die Nachweisgrenze der Sanger-Sequenzierung liegt bei einem Tumorgehalt von 25-30% (Jancik et al. 2012; Pinto et al. 2011; Tsiatis et al. 2010). Da in dieser Arbeit angestrebt wurde verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu ermitteln, wurden Peaks, die sich nicht deutlich vom Hintergrund abgehoben haben, nicht als positiv gewertet.

Eine weitere Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse ist die Aufbereitung des Tumorgewebes. Bei über der Hälfte der immunhistochemisch positiv und in der Sequenzierung negativ bestimmten Ergebnisse wurde der komplette Leerschnitt für die DNA-Isolierung verwendet. Bei der Sanger-Sequenzierung wird von einer Nachweisgrenze der Mutation bei 25-30% ausgegangen. Liegt der Anteil an mutierter Tumor-DNA darunter, kann es sein, dass die Mutation nicht detektiert wird. Auch wenn der Tumoranteil dieser Gewebeproben im HE-Schnitt sehr groß (im Mittel 63%) war, handelt es sich dennoch um eine diffuse Neoplasie mit normalem Hirngewebe zwischen den Tumorzellen und einer reaktiven Gliose im Randbereich des Tumors, die nicht die Mutation tragen (Kleihues et al. 2007). Teilweise finden sich auch, abhängig vom Tumortyp, Nekrosen im Bereich des Tumors sowie Blut und Koagulationsnekrosen im Bereich der Resektionsränder, welche die Gewinnung von Tumor-

DNA weiter einschränken. Hierbei könnte man durch konsequente Mikrodissektion auch bei großem Tumoranteil im Gewebeschnitt künftig versuchen dieses Problem zu umgehen, um die Mutation einerseits überhaupt sehen zu können und diese andererseits möglichst tumorspezifisch nachzuweisen.

Auch in verschiedenen anderen Arbeiten war die Mutations-Detektionsrate durch die Sequenzierung geringer als durch die Immunhistochemie (Agarwal et al. 2013; Takano et al. 2011; Capper et al. 2010). In diesen Fällen konnte durch weiterführende genetische Testungen die Detektionsraten einander angeglichen werden (Takano et al. 2011; Capper et al. 2010), so dass auch in dieser Arbeit die Wiederholung einzelner Sequenzierungen zur Steigerung der Detektionsrate als nächster Schritt anstünden.

Auffallend war, dass die Mutation hauptsächlich in Tumoren mit oligodendroglialer Komponente schlechter detektierbar war. Ein Zusammenhang zwischen niedriger Detektionsrate und geringem IRS konnte nicht festgestellt werden.

6.1.3 Fragmentanalyse

Mit der Fragmentanalyse konnten in den 85 Gewebeproben 24 (28,2%) IDH-1 R132H Mutationen detektiert werden. Insgesamt wurde die Mutation in 66,7% der diffusen Astrozytome (4/6), in 40% der diffusen Oligoastrozytome (2/5), in 28,6% der anaplastischen Astrozytome (4/14), in 14,3% der anaplastischen Oligodendrogliome (1/7), in 70% der anaplastischen Oligoastrozytome (7/10), in 38,5% der sekundären Glioblastome (5/13) sowie in 3,3% der primären Glioblastome (1/30) nachgewiesen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in der Literatur angegebenen Werten zwischen 50% und 80% für WHO-Grad II und III Tumoren sowie für sekundäre Glioblastome, so zeigt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse für diffuse Astrozytome und anaplastische Oligoastrozytome (von Deimling et al. 2011; Balss et al. 2008; Horbinski et al. 2009; Ichimura et al. 2009; Sonoda et al. 2009; Watanabe et al. 2009; Yan et al. 2009). Die niedrige Mutationsrate von primären Glioblastomen stimmt ebenfalls mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Hartmann et al. 2010; Nobusawa et al. 2009) .

In dreizehn Fällen war es nicht möglich die immunhistochemisch detektierte IDH-1 R132H Mutation nachzuweisen. Ebenso konnten die in der Sequenzierung detektierten IDH-1 R132G Mutationen nicht nachgewiesen werden. Dies liegt daran, dass der für die Fragmentanalyse synthetisierte Primer auf Position eins des Basentriplets endet und speziell die Base auf Position zwei des Triplets nachweist. Somit können mit diesem Primer die Punktmutation IDH-1 R132H mit einem Nukleotidaustausch

G395A, die Punktmutation IDH-1 R132L mit einem Nukleotidaustausch G395T sowie die Punktmutation IDH-1 R132V mit einem Nukleotidaustausch G395T nachgewiesen werden (Balss et al. 2008). Die Punktmutation IDH-1 R132G mit einem Nukleotidaustausch C394G betrifft Position eins des Basentriplets (Balss et al. 2008) und kann somit mit diesem Primer nicht detektiert werden. Hierfür müsste ein weiterer Primer synthetisiert werden, der eine Base vor dem zu untersuchenden Nukleotid endet. Hiermit könnten dann auch die übrigen bekannten, aber selten auftretenden, IDH-1 Punktmutationen R132C, R132S sowie R132V detektiert werden.

Im Hinblick auf die Sequenzierung konnten mit der Fragmentanalyse, unter Verwendung derselben isolierten DNA, mehr IDH-1 Mutationen detektiert werden. Auch Perizzolo et al. verglichen in einer Untersuchung von 32 Gliomen die Detektion der IDH-1 und -2 Mutation mittels herkömmlicher Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse in FFPE-Tumormaterial. Hierbei konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 100% erreicht werden, jedoch wurde hier, anders als in dieser Arbeit, ein Tumoranteil von 50% eingesetzt (Perizzolo et al. 2012).

Die höhere Detektionsrate mit Hilfe der Fragmentanalyse ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass für die Durchführung der Fragmentanalyse viel geringere DNA-Konzentrationen benötigt werden. Um die Reaktion durchzuführen reichen hierfür 0,01-0,4 pmol DNA (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041203.pdf). Perizzolo et al. konnten in einem Titrationsversuch nachweisen, dass für die Fragmentanalyse im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung letztendlich ein Tumor-DNA Gehalt von 10% zum Nachweis der Mutation ausreichend waren (Perizzolo et al. 2012). Die Fragmentanalyse zeigte sich in dieser Arbeit bei stereotaktischen Biopsien diffuser Neoplasien mit wenig Tumorzellen der Sequenzierung überlegen.

In zwei Fällen konnte eine IDH-1 R132H Mutation eindeutig detektiert werden, die weder mittels Immunhistochemie noch mittels Sequenzierung nachweisbar waren. Hierbei handelte es sich um stereotaktische Biopsien eines diffusen und eines anaplastischen Astrozytoms. Im ersten Fall zeigte sich ein Tumoranteil von circa 25% im Schnittpräparat, im zweiten Fall betrug er circa 60%. Die fehlende Detektion der Mutation mittels Immunhistochemie könnte der Tatsache geschuldet sein, dass es sich bei beiden Gewebeproben um stereotaktische Biopsien handelt, die nativ an das Labor der Neuropathologie versandt wurden. Wie bereits oben diskutiert, kommt es durch die verzögerte Fixierung der Gewebeproben zu einem Verlust der Antigenität (Hilbig et al. 2004) und damit der Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper. Im Falle der Sequenzierung war für beide Proben ein Mutationspeak sichtbar, der sich jedoch nur schwach vom Hintergrundsignal abgehoben hat. Da in beiden Fällen die Ergebnisse nicht eindeutig genug waren, wurden diese in der Sequenzierung als IDH-1 R132H negativ gewertet.

6.1.4 Serumanalyse

Um eine neue Methode zur non-invasiven Detektion der IDH-1 R132H Mutation im Serum zu entwickeln, wurde DNA aus dem Serum isoliert und der zu untersuchende DNA-Abschnitt spezifisch amplifiziert. Hiermit konnte eine mittlere DNA-Konzentration von 7,1ng/μl (2,1-17,6ng/μl) erreicht werden. Boisselier et al., die das Plasma von Gliompatienten auf die IDH-1 R132H Mutation untersuchten, konnten eine mittlere DNA-Konzentration von 1,2ng/mL (0,1-50,3ng/mL) isolieren (Boisselier et al. 2012). Durch exemplarische Sequenzierung von 10 Samples war die Mutation in der Sanger-Sequenzierung nicht nachweisbar. Dies ist durch die hohe Kontamination der isolierten DNA mit nicht-neoplastischer DNA bedingt (zitiert nach Boisselier et al. 2012). Die erhöhte Konzentration frei-zirkulierender DNA im Blut ist auf einen vermehrten Zelluntergang zurückzuführen (Gormally et al. 2007; Jahr et al. 2001; Boisselier et al. 2012) und nicht tumorspezifisch. Denn auch im Rahmen von anderen Ursachen wie zum Beispiel einem Trauma oder einer Entzündung kommt es zum vermehrten Absterben von Zellen (Boisselier et al. 2012; Fleischhacker et al. 2011). Boisselier et al. konnten jedoch zeigen, dass Patienten mit einem high-grade Gliom eine höhere Konzentration frei-zirkulierender DNA-Fragmente im Plasma aufwiesen als Patienten mit low-grade Gliomen (Boisselier et al. 2012). Die in dieser Arbeit isolierte und amplifizierte Menge an Tumor-DNA war jedoch für die Sanger-Sequenzierung mit einer Mutations-Detektionsgrenze von 25-30% Tumor-DNA nicht ausreichend (Jancik et al. 2012; Pinto et al. 2011; Tsiatis et al. 2010).

Aus diesem Grund wurde die zuvor an FFPE-Material etablierte Methode der Fragmentanalyse angewandt, da hier die Nachweisgrenze mit 0,01-0,4 pmol DNA deutlich niedriger liegt als bei der Sanger-Sequenzierung (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041203.pdf). Auch auf diese Weise gelang es nicht die IDH-1 R132H Mutation nachzuweisen. Dies ist auch hier höchstwahrscheinlich auf den hohen Anteil nicht-neoplastischer DNA, die nicht die IDH-1 Mutation trägt, zurückzuführen. Somit konnte in jeder durchgeführten Untersuchung nur die Base des Wildtyps als hoher Peak sichtbar gemacht werden und das Signal der IDH-1 R132H Mutation ist im Hintergrund untergegangen.

Auch Boisselier et al. berichteten bei ihrer Isolierung von DNA aus dem Plasma über eine starke Kontamination der frei zirkulierenden DNA mit nicht-neoplastischer DNA, weswegen sie zur Amplifikation des DNA Fragments die COLD PCR mit der digitalen PCR kombinierten (Boisselier et al. 2012). Diese Formen der PCR eignen sich besonders gut zur spezifischen Amplifikation heterozygot auftretender Mutationen (Li et al. 2008; Vogelstein et al. 1999; Boisselier et al. 2012). Auf diese Weise gelang der Nachweis der IDH-1 R132H Mutation in 60% der Fälle in der aus dem Plasma isolierten DNA (Boisselier et al. 2012). Um die Mutation auch mit Fragmentanalyse im Serum nachweisen zu können, muss künftig weiterhin versucht werden den Anteil an Wildtyp-DNA zu

senken. Dieser Schritt könnte zum Beispiel mit geeigneten Restriktionsendonukleasen erfolgen, die die Wildtyp-DNA schneiden und somit eine gezielte Amplifikation der Mutation in der PCR ermöglichen.

6.2 Vergleich der einzelnen Nachweisverfahren

Vergleicht man die einzelnen Methoden untereinander, so erweist sich die IDH-1 R132H Immunhistochemie als eine schnell durchführbare und kostengünstige Methode. Da für die Immunhistochemie keine speziellen und teuren Geräte notwendig sind, ist sie in nahezu jedem Standardlabor praktikabel und sowohl per Hand als auch im Färbeautomaten durchführbar. Es wird nur wenig Tumormaterial in Form eines 2µm dicken Leerschnittes benötigt, was sich wiederum bei kleinen stereotaktischen Biopsien und Resektaten von geringer Größe positiv auswirkt. Durch die Immunhistochemie können selbst einzelne mutierte Tumorzellen nachgewiesen werden.

Stellt man der Immunhistochemie die Sequenzierung und die Fragmentanalyse gegenüber so wird ersichtlich, dass deren Durchführung nur unter höherem Zeitaufwand und unter Verwendung entsprechender Geräte, die neben der Standardlaborausstattung auch einen Sequenzierer beinhaltet, möglich ist. Für beide Methoden wird mehr Tumormaterial als für die Immunhistochemie benötigt. Dies belief sich, in Abhängigkeit von der Tumorgröße im Schnittpräparat, auf 4-5 Leerschnitte á 5µm Dicke für die Sequenzierung, da hierfür ein Mindestgehalt von 25-30% TumordNA zur Mutationsdetektion notwendig war. Was vor allem bei Tumorbiopsien den limitierenden Faktor für die Sequenzierung darstellte. Für die Fragmentanalyse fand keine gesonderte DNA-Isolierung statt. Zur Mutationsdetektion waren 0,01-0,4 pmol DNA ausreichend.

Für eine gesonderte tabellarische Gegenüberstellung der einzelnen Methoden wird auf Tabelle 20 verwiesen.

Die Auswertung der Ergebnisse für die einzelnen Methoden gestaltet sich einfach. Jedoch muss man bei der Immunhistochemie anführen, dass deren Auswertung nicht ganz objektiv ist. In der Literatur werden verschiedene Methoden, die IDH-1 R132H Immunhistochemie auszuwerten, beschrieben. Diese unterschiedlichen Auswertemethoden der IDH-1 R132H Immunhistochemie sind mitunter ursächlich für die verschiedenen Häufigkeiten der detektierten Mutation je nach Studie.

Takano et al. zum Beispiel werteten alle Präparate mit $\geq 10\%$ positiv gefärbten Tumorzellen als positiv. Fälle, die unter 10% oder keine positiv gefärbten Tumorzellen aufwiesen, wurden als negativ gewertet (Takano et al. 2011). Preusser et al. hingegen beurteilten die Präparate in Abhängigkeit davon, ob alle Tumorzellen positiv gefärbt waren oder nur ein Teil des Tumorgewebes IDH-1 R132H

positive Zellen aufwiesen (Preusser et al. 2011). Diese Methode wurde auch von Argawal et al. so weitergeführt, indem ähnlich wie bei Preusser die immunhistochemisch positiven Präparate in „komplett positiv, teil-positiv und diffus positiv“ unterteilt wurden (Agarwal et al. 2013). Wohingegen Capper et al. nur Präparate mit starker zytoplasmatischer Färbung als positiv werteten. Eine schwache diffuse Färbung wurde als IDH-1 R132H negativ eingestuft (Capper et al. 2010).

Um die Immunhistochemie differenzierter bezüglich ihrer Färbeintensität und dem Anteil gefärbter Tumorzellen zu betrachten, hat man sich in dieser Arbeit für eine Auswertung in Anlehnung an den IRS nach Remmele entschieden (Remmele et al. 1987). Hiermit wurde nicht nur die Entscheidung über eine positive Immunhistochemie anhand der Fläche gefärbter Tumorzellen gestellt, sondern das einzelne Präparat ganzheitlich betrachtet. Selbst einzelne positiv gefärbte Tumorzellen gingen in diesen Score mit ein und wurden als IDH-1 R132H positiv bestimmt. Vergleicht man die Ergebnisse der herkömmlichen Sanger-Sequenzierung und der Fragmentanalyse abhängig vom vergebenen immunreaktiven Score (siehe Tabelle 22) so wird ersichtlich, dass selbst bei schwach IDH-1 R132H positiv gefärbten Präparaten die Mutation durch die anderen beiden Methoden nachgewiesen werden konnten. Unter Verwendung anderer Auswerte-Schemata wären diese Präparate womöglich als IDH-1 R132H negativ eingestuft worden, so dass man künftig die Überlegung treffen sollte, diese ganzheitliche Betrachtung der Präparate mittels immunreaktivem Score weiter fortzuführen.

Nachteil der immunhistochemischen Detektion ist, dass mit dem hier verwendeten monoklonalen Antikörper nur spezifisch die IDH-1 R132H Mutation nachweisbar ist. Somit kann bei Durchführung der immunhistochemischen Färbung lediglich die Aussage gemacht werden, ob es sich um die IDH-1 R132H Mutation handelt oder nicht. Eine Aussage darüber, ob es sich um den Wildtyp oder eine weitere IDH-1 Mutation handelt, kann nicht getroffen werden. Hierzu müssten weitere immunhistochemische Färbungen zur Detektion der weiteren IDH-1 Mutationen durchgeführt werden. Bislang gibt es Antikörper zur Detektion der IDH-1 R132H Mutation, der IDH-1 R132S Mutation sowie der IDH-1 R132G Mutation, die auch schon in verschiedenen Arbeiten getestet wurden (Kato et al. 2009; Kato et al. 2013; Capper et al. 2010; Kaneko et al. 2011; Preusser et al. 2011).

Genau wie bei der Immunhistochemie können mit dem in der Fragmentanalyse verwendeten Primer nicht alle Mutationen der IDH-1 detektiert werden, sondern lediglich die Mutationen, die sich auf der zweiten Base des Codons 132 befinden. Zur Detektion weiterer Mutationen müsste die Synthese weiterer Primer in unterschiedlicher Länge erfolgen, die auch die erste Base des Codons abdecken. So wäre eine Detektion aller Mutationen in nur einem Ansatz möglich.

Lediglich mit der Sequenzierung sind alle Mutationen mit nur einem Primer gleichzeitig detektierbar, jedoch mit dem Nachteil der geringeren Sensitivität.

Betrachtet man die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der 85 Gewebeproben mit den drei verschiedenen Methoden ermittelt worden sind (siehe Tabelle 21), so zeigt sich, dass mit der Immunhistochemie die meisten IDH-1 R132H Mutationen detektiert werden konnten. Lediglich zwei Mutationen konnten durch die Immunhistochemie nicht, sondern nur mit der Fragmentanalyse detektiert werden. Ebenso konnten 2 IDH-1 R132G Mutationen aufgrund der Methodik nur mittels Sequenzierung nachgewiesen werden. Durch Erweiterung der Untersuchungen mit anderen monoklonalen Antikörpern, die spezifisch andere Mutationen nachweisen können, und durch entsprechende Synthese von Primern, die ein anderes Basenpaar im Codon 132 detektieren, wäre dies jedoch möglich.

Zieht man die Immunhistochemie als Standardmethode zur Detektion der IDH-1 Mutation heran, so errechnet sich eine Sensitivität von 51,4% für die Sequenzierung und von 62,9% für die Fragmentanalyse. Vor allem in Screening-Untersuchungen ist es wichtig eine hohe Sensitivität zu erreichen, um möglichst viele Mutationsträger zu identifizieren. Diese zeigt sich hier in beiden Fällen eher gering, wobei sich die Fragmentanalyse der Sequenzierung etwas überlegen zeigt. Auch Perizzolo et al. konnten eine höhere Sensitivität der Fragmentanalyse im Vergleich zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung nachweisen (Perizzolo et al. 2012).

Ein Bestätigungs-Test zeichnet sich besonders durch eine hohe Spezifität aus. Diese besagt, dass Patienten, die keine Mutation tragen auch wirklich als negativ erkannt werden. Betrachtet man die Spezifität der beiden Untersuchungen, so ergeben sich ein Wert von 100% für die Sequenzierung und ein Wert von 96,0% für die Fragmentanalyse. Der Wert für die Fragmentanalyse begründet sich darin, dass durch diese Methode zwei Fälle identifiziert werden konnten, bei denen die Immunhistochemie negativ waren und somit als falsch positiv in die Berechnung eingingen. Anhand der Spezifität eignen sich beide Verfahren als Bestätigungs-Tests.

Unter Vorbehalt der Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendeten Präparate nach bereits genannten Kriterien vorselektiert waren, konnte gezeigt werden, dass sich die Immunhistochemie aufgrund der einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit sowie den hohen Detektionsraten am besten als Screening-Test für die Detektion der IDH-1 R132H Mutation im klinischen Alltag eignet. Da alle drei Methoden ihre Lücken aufweisen, empfiehlt es sich den Screening-Test, bei negativ ausgefallenem Ergebnis, durch einen Bestätigungstest zu ergänzen. Hierbei eignet sich aufgrund der höheren Sensitivität und der hohen Spezifität die Fragmentanalyse. Besonders bei stereotaktischen Biopsien und Gewebeproben mit weniger Tumorzellen zeigte sich die Fragmentanalyse der

Sequenzierung überlegen. Jedoch müsste diese Methode künftig um einen geeigneten Primer erweitert werden, um auch die übrigen Mutationen zuverlässig bestimmen zu können.

6.3 Überlebenszeitanalyse

Aus den Überlebenszeitanalysen für die Immunhistochemie, die Sequenzierung und die Fragmentanalyse wird ersichtlich, dass alle Kaplan-Meyer-Kurven für IDH-1 R132H mutierte und nicht IDH-1 R132H mutierte Glioblastome deutlich unterschiedlich verlaufen und es somit einen Unterschied im Überleben von Patienten mit und ohne IDH-1 R132H Mutation gibt.

Hierbei zeigten sich für die immunhistochemisch ermittelten Werte eine mittlere Überlebenszeit von 31,3 Monaten für IDH-1 R132H positive und eine mittlere Überlebenszeit von 13,6 Monaten für IDH-1 R132H negative Glioblastompatienten.

Die aus der Sequenzierung resultierenden Ergebnisse beschreiben eine mittlere Überlebenszeit von 39,8 Monaten für IDH-1 R132H positive und eine mittlere Überlebenszeit von 14,2 Monaten für Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Wildtyp. Für den einen IDH-1 R132G positiven Glioblastom-Patienten konnte eine Überlebenszeit von 11 Monaten festgestellt werden.

In der Fragmentanalyse konnte eine mittlere Überlebenszeit von 39,8 Monaten für IDH-1 R132H positive und eine mittlere Überlebenszeit von 14,1 Monaten für IDH-1 R132H negative Glioblastom-Patienten nachgewiesen werden.

Der Unterschied zwischen den Überlebenszeiten war unabhängig vom Detektionsverfahren statistisch nicht signifikant. Bei den Auswertungen wurden Unterschiede in der Therapie bei den einzelnen Patienten nicht berücksichtigt.

Vergleicht man diese Werte dennoch mit Werten aus der Literatur, so konnten Yan et al. bei einer Untersuchung von 129 Glioblastompatienten eine mediane Überlebenszeit von 31 Monaten für Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Mutation und eine mediane Überlebenszeit von 15 Monaten für Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Wildtyp feststellen (Yan et al. 2009). Auch Nobusawa et al. berichteten über ein signifikant längeres Überleben von Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Mutation, die mit einer Kombination aus Operation und Radiotherapie behandelt wurden. Hierbei zeigte sich mittleres Überleben von 27,1 Monaten bei Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Mutation sowie ein mittleres Überleben von 11,3 Monaten bei Glioblastom-Patienten mit IDH-1 Wildtyp (Nobusawa et al. 2009).

Auch Hartmann et al. konnten in ihren Untersuchungen von anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen einen signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf abhängig von dem

Vorhandensein der IDH-1 Mutation feststellen (Hartmann et al. 2010). Dies geht sogar so weit, dass der IDH-1 Mutationsstatus einen stärkeren prognostischen Marker als die gerade verwendete WHO-Klassifikation und das Grading von high-grade Gliomen darstellte und vorgeschlagen wird, diesen mit in die WHO-Klassifikation zu integrieren (Hartmann et al. 2010).

Auch wenn keine der drei, in dieser Arbeit durchgeführten, Untersuchungen einen statistisch signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf der Glioblastom-Patienten in Abhängigkeit des Vorhandenseins der IDH-1 Mutation lieferten, so wird dennoch aus dem Verlauf der einzelnen Kurven dieselbe Tendenz wie in der Literatur ersichtlich. Die fehlende Signifikanz ist vor allem auf die geringen Fallzahlen und die hohe drop-out-Rate der Patienten zurückzuführen, so dass eine Signifikanz des Ergebnisses durch Vergrößerung der Fallzahlen und durch konsequente klinische Follow-Ups der Patienten verbessert werden könnte. Betrachtet man die einzelnen Kurven so wird ersichtlich, dass die beste Vorhersage über den klinischen Verlauf mit der IDH-1 R132H Immunhistochemie getroffen werden konnte.

6.4 Ausblick

Um den IDH-1 Mutationsstatus zu detektieren stehen bereits verschiedene Methoden zur Verfügung. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Immunhistochemie hinsichtlich ihres Ergebnisses und der einfachen sowie kostengünstigen Durchführung am besten als Screening-Methode im klinischen Alltag eignet. Da jede Methode dennoch ihre Lücken aufweist, sollte diese, bei einem negativen Ergebnis, auch im Hinblick auf weitere Mutationen durch einen Bestätigungstest ergänzt werden. Für diesen eignet sich die Fragmentanalyse. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich diese der Sequenzierung vor allem bei diffusen Neoplasien mit geringem Tumoranteil überlegen zeigt. Der IDH-1 Mutationsstatus ist mittlerweile als, vom WHO-Grad unabhängiger, prognostischer Marker anerkannt (Sanson et al. 2009) und gibt einen Hinweis auf das therapeutische Ansprechen (Houillier et al. 2010). Somit zeigen Tumoren mit einer IDH-1 Mutation eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Temozolomid-Chemotherapie (SongTao et al. 2012). Die Patienten profitieren von einem längeren progressfreien Überleben (SongTao et al. 2012), jedoch nur, wenn die Therapie sofort nach der OP begonnen wird (Hartmann et al. 2011). In prospektiven Studien wurde bereits ein signifikant längeres Überleben (Sanson et al. 2009; Combs et al. 2011; Yan et al. 2009) beziehungsweise ein signifikant längeres progressfreies Überleben (Weller et al. 2009) bei Vorliegen der IDH-1 Mutation nachgewiesen. Bislang fand die IDH-1 Mutation jedoch noch keinen Einzug in die Leitlinien der Gliomtherapie. Jedoch wird dort explizit darauf hingewiesen, dass die IDH-1 Mutation zur Verbesserung der Trennschärfe zwischen oligodendroglialer und astrozytärer Tumoren der WHO-Grade II und III Tumoren sowie anderer Tumorentitäten und einer

reaktiven Gliose herangezogen werden sollen (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome__2015-06.pdf). Die IDH-1 Mutation ist nach wie vor Thema aktueller Forschung. Es gibt verschiedene Ansätze einen therapeutischen Nutzen aus der IDH-1 Mutation zu ziehen. So stellt die IDH-1 R132H Mutation ein potentiell Target in der Immuntherapie dar. „Da es sich hierbei um ein tumorspezifisches Neo-Antigen mit starker Uniformität und hoher Penetranz in der Expression handelt sowie ein immunogenes Epitop enthält, eignet es sich zum Beispiel für eine mutations-spezifische Impfung zur Therapie IDH-1 R132H mutierter Tumoren“ (Schumacher et al. 2014; Capper et al. 2010; Watanabe et al. 2009). Trotz bereits umfassenden Untersuchungen zur Rolle der IDH-1 Mutation in der Gliomgenese konnte diese noch nicht vollständig geklärt sowie die diagnostischen Möglichkeiten und die therapeutischen Ansätze, die IDH-1 Mutation betreffend, noch nicht vollständig ausgeschöpft werden. Weitere Studien, vor allem zur Nutzung der IDH-1 Mutation als Target in der Therapie, können sich zukünftig als sehr erfolgsversprechend erweisen.

7 Literaturverzeichnis

1. Agarwal S, Sharma MC, Jha P, et al. (2013) Comparative Study of IDH1 Mutations in Gliomas by Immunohistochemistry and DNA Sequencing. *Neuro-Oncology* 15: 718–726
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. (2005) Die Manipulation von Genen Und Zellen. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. 3rd ed. Pp. 350, 353. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
3. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, et al. (2014) Development of a Robust and Sensitive Pyrosequencing Assay for the Detection of IDH1/2 Mutations in Gliomas. *Brain Tumor Pathology* 32: 22-30
4. Balss J, Meyer J, Mueller W, et al. (2008) Analysis of the IDH1 Codon 132 Mutation in Brain Tumors. *Acta Neuropathologica* 116: 597–602
5. Barulli D, Stern Y (2013) Efficiency, Capacity, Compensation, Maintenance, Plasticity: Emerging Concepts in Cognitive Reserve. *Trends In Cognitive Sciences* 17: 502–509
6. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, et al. (2010) The Prognostic IDH1(R132) Mutation Is Associated with Reduced NADP+-Dependent IDH Activity in Glioblastoma. *Acta Neuropathologica* 119: 487–494
7. Boisselier B, Gállego Pérez-Larraya J, Rossetto M, et al. (2012) Detection of IDH1 Mutation in the Plasma of Patients with Glioma. *Neurology* 79: 1693–1698
8. Capper D, Weissert S, Balss J, et al. (2010) Characterization of R132H Mutation-Specific IDH1 Antibody Binding in Brain Tumors. *Brain Pathology* 20: 245–254
9. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, Von Deimling A (2009) Monoclonal Antibody Specific for IDH1 R132H Mutation. *Acta Neuropathologica* 118: 599–601
10. Catteau A, Girardi H, Monville F, et al. (2014) A New Sensitive PCR Assay for One-Step Detection of 12 IDH1/2 Mutations in Glioma. *Acta Neuropathologica Communications* 2: 58–58
11. Cohen AL, Holmen SL, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Current Neurology And Neuroscience Reports* 13: 345–345

12. Combs SE, Rieken S, Wick W, et al. (2011) Prognostic Significance of IDH-1 and MGMT in Patients with Glioblastoma: One Step Forward, and One Step Back? *Radiation Oncology* 6: 115–115
13. Dang L, White DW, Gross S, et al. (2009) Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739–744
14. Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C (2011) The next Generation of Glioma Biomarkers: MGMT Methylation, BRAF Fusions and IDH1 Mutations. *Brain Pathology* 21: 74–87
15. Elkhalel A, Jalbert LE, Phillips JJ, et al. (2012) Magnetic Resonance of 2-Hydroxyglutarate in IDH1-Mutated Low-Grade Gliomas. *Science Translational Medicine* 4: 116ra5–116ra5
16. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, et al. (2011) Methods for Isolation of Cell-Free Plasma DNA Strongly Affect DNA Yield. *Clinica Chimica Acta; International Journal Of Clinical Chemistry* 412: 2085–2088
17. Geisbrecht BV, Gould SJ (1999) The Human PICD Gene Encodes a Cytoplasmic and Peroxisomal NADP(+)-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. *The Journal Of Biological Chemistry* 274: 30527–30533
18. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. (1998) Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. *Pancreas* 17: 89–97
19. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007) Circulating Free DNA in Plasma or Serum as Biomarker of Carcinogenesis: Practical Aspects and Biological Significance. *Mutation Research* 635: 105–117
20. Gräber S, Burkholder I, Ong FM, Orth V, Weiffenbach J (2010) *Epidemiologie, Medizinische Biometrie Und Medizinische Informatik*: 70-72
21. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, et al. (2011) Molecular Markers in Low-Grade Gliomas: Predictive or Prognostic? *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 17: 4588–4599
22. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. (2010) Patients with IDH1 Wild Type Anaplastic Astrocytomas Exhibit Worse Prognosis than IDH1-Mutated Glioblastomas, and IDH1 Mutation Status Accounts for the Unfavorable Prognostic Effect of Higher Age: Implications for Classification of Gliomas. *Acta Neuropathologica* 120: 707–718

23. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. (2009) Type and Frequency of IDH1 and IDH2 Mutations Are Related to Astrocytic and Oligodendroglial Differentiation and Age: A Study of 1,010 Diffuse Gliomas. *Acta Neuropathologica* 118: 469–474
24. Hilbig H, Bidmon H-J, Oppermann OT, Remmerbach T (2004) Influence of Post-Mortem Delay and Storage Temperature on the Immunohistochemical Detection of Antigens in the CNS of Mice. *Experimental And Toxicologic Pathology: Official Journal Of The Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie* 56: 159–171
25. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2006) Die durch Gentechnologie gewonnene DNA kann analysiert und als Matrize für die Produktion spezifischer Genprodukte benutzt werden. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 6th ed. Pp. 345–347. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
26. Horbinski C, Kofler J, Kelly LM, Murdoch GH, Nikiforova MN (2009) Diagnostic Use of IDH1/2 Mutation Analysis in Routine Clinical Testing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Glioma Tissues. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology* 68: 1319–1325
27. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al. (2010) IDH1 or IDH2 Mutations Predict Longer Survival and Response to Temozolomide in Low-Grade Gliomas. *Neurology* 75: 1560–1566
28. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, et al. (2009) IDH1 Mutations Are Present in the Majority of Common Adult Gliomas but Rare in Primary Glioblastomas. *Neuro-Oncology* 11: 341–347
29. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. (2001) DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research* 61: 1659–1665
30. Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, et al. (2012) A Comparison of Direct Sequencing, Pyrosequencing, High Resolution Melting Analysis, TheraScreen DxS, and the K-Ras StripAssay for Detecting KRAS Mutations in Non Small Cell Lung Carcinomas. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 31: 79–79
31. Kaneko MK, Tian W, Takano S, et al. (2011) Establishment of a Novel Monoclonal Antibody SMab-1 Specific for IDH1-R132S Mutation. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 406: 608–613
32. Karp G (2005) *Molekulare Zellbiologie*. 1st edition. Springer.

33. Kato Yi, Jin G, Kuan C-T, et al. (2009) A Monoclonal Antibody IMab-1 Specifically Recognizes IDH1R132H, the Most Common Glioma-Derived Mutation. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 390: 547–551
34. Kato Y, Natsume A, Kaneko MK (2013) A Novel Monoclonal Antibody GMab-m1 Specifically Recognizes IDH1-R132G Mutation. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 432: 564–567
35. Key M (2003) Antigendemaskierung (Epitop-Retrieval). *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*. 3rd edition. Thomas Boenisch, ed. Pp. 30–33. DakoCytomation
36. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, et al. (2010) Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. *The American Journal Of Pathology* 177: 2708–2714
37. Kleihues P, Burger PC, Aldape KD et al. (2007) Glioblastoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th edition. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK eds, World Health Organization, Pp. 33–49
38. Koehler A, Van Noorden CJF (2003) Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and the Higher Incidence of Pollution-Induced Liver Cancer in Female Flounder. *Environmental Toxicology And Chemistry / SETAC* 22: 2703–2710
39. Koh H-J, Lee S-M, Son B-G, et al. (2004) Cytosolic NADP+-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Plays a Key Role in Lipid Metabolism. *The Journal Of Biological Chemistry* 279: 39968–39974
40. Lavon I, Refael M, Zelikovitch B, Shalom E, Siegal T (2010) Serum DNA Can Define Tumor-Specific Genetic and Epigenetic Markers in Gliomas of Various Grades. *Neuro-Oncology* 12: 173–180
41. Lee S M, Koh H-J, Park D-C, et al. (2002) Cytosolic NADP(+)-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Status Modulates Oxidative Damage to Cells. *Free Radical Biology & Medicine* 32: 1185–1196
42. Li J, Wang L, Mamon H, et al. (2008) Replacing PCR with COLD-PCR Enriches Variant DNA Sequences and Redefines the Sensitivity of Genetic Testing. *Nature Medicine* 14: 579–584
43. Margittai E, Bánhegyi G (2008) Isocitrate Dehydrogenase: A NADPH-Generating Enzyme in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 471: 184–190

44. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, et al. (2011) IDH1 and IDH2 Mutations, Immunohistochemistry and Associations in a Series of Brain Tumors. *Journal Of Neuro-Oncology* 105: 345–357
45. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction(51): 263–273
46. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 15: 6002–6007
47. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. (2004) Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Research* 64: 6892–6899
48. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology* 64: 479–489
49. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal Of Pathology* 170: 1445–1453
50. Pang B, Durso MB, Hamilton RL, Nikiforova MN (2013) A Novel COLD-PCR/FMCA Assay Enhances the Detection of Low-Abundance IDH1 Mutations in Gliomas. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal Of Surgical Pathology, Part B* 22: 28–34
51. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. (2008) An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 321: 1807–1812
52. Patay Z, Mills JC, Löbel U, et al. (2012) Cerebral Neoplasms in L-2 Hydroxyglutaric Aciduria: 3 New Cases and Meta-Analysis of Literature Data. *AJNR. American Journal Of Neuroradiology* 33: 940–943
53. Perizzolo M, Winkfein B, Hui S, et al. (2012) IDH Mutation Detection in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Gliomas Using Multiplex PCR and Single-Base Extension. *Brain Pathology* 22: 619–624
54. Pinto P, Rocha P, Veiga I, et al. (2011) Comparison of Methodologies for KRAS Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Genetics* 204: 439–446

55. Preusser M, Wöhrer A, Stary S, et al. (2011) Value and Limitations of Immunohistochemistry and Gene Sequencing for Detection of the IDH1-R132H Mutation in Diffuse Glioma Biopsy Specimens. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology* 70: 715–723
56. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for Uniform Definition of an Immunoreactive Score (IRS) for Immunohistochemical Estrogen Receptor Detection (ER-ICA) in Breast Cancer Tissue. *Der Pathologe* 8: 138–140
57. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 74: 5463–5467
58. Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. (2009) Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology* 27: 4150–4154
59. Scherer HJ (1940) A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. *Journal Of Neurology And Psychiatry* 3: 147–177
60. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, et al. (2014) A Vaccine Targeting Mutant IDH1 Induces Antitumour Immunity. *Nature* 512: 324–327
61. SongTao Q, Lei Y, Si G, et al. (2012) IDH Mutations Predict Longer Survival and Response to Temozolomide in Secondary Glioblastoma. *Cancer Science* 103: 269–273
62. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, et al. (2009) Analysis of IDH1 and IDH2 Mutations in Japanese Glioma Patients. *Cancer Science* 100: 1996–1998
63. Stewart LA (2002) Chemotherapy in Adult High-Grade Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data from 12 Randomised Trials. *Lancet* 359: 1011–1018
64. Takano S, Tian W, Matsuda M, et al. (2011) Detection of IDH1 Mutation in Human Gliomas: Comparison of Immunohistochemistry and Sequencing. *Brain Tumor Pathology* 28: 115–123
65. Tsiatis A C, Norris-Kirby A, Rich RG, et al. (2010) Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations: Diagnostic and Clinical Implications. *The Journal Of Molecular Diagnostics: JMD* 12: 425–432
66. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY (2007) Extracellular Nucleic Acids. *Bioessays: News And Reviews In Molecular, Cellular And Developmental Biology* 29: 654–667

67. Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96: 9236–9241
68. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *The American Journal Of Pathology* 174: 1149–1153
69. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. (2009) Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology* 27: 5743–5750
70. Xu X, Zhao J, Xu Z, et al. (2004) Structures of Human Cytosolic NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-Regulatory Mechanism of Activity. *The Journal Of Biological Chemistry* 279: 33946–33957
71. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. (2009) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal Of Medicine* 360: 765–773
72. Zeeck A, Grond S, Papastavrou I, Zeeck SC (2005) Chelatkomplexe. *Chemie Für Mediziner*. 6th edition Pp. 148–149. Elsevier, Urban & Fischer, München
73. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. (2009) Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . *Science* 324: 261–265

Handbücher und Produktinformationen:

| Adresse | Zuletzt aufgerufen am: |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| http://www.dako.com.cn/download.pdf?objectid=104958005 | 17.03.2016 |
| http://www.histologietechnik.ch/downloads/einfuehrung_immunhistochemie.pdf | 17.03.2016 |
| http://www.thermoscientific.com/en/product/shandon-bluing-reagent.html | 29.10.2015 |
| http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6556?lang=de&region=DE | 29.10.2015 |
| https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=63a84dc7-d904-418e-b71a-1521cf318e82&lang=en | 26.03.2016 |
| http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf | 26.03.2016 |
| http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e1510?lang=de&region=DE | 26.03.2016 |
| http://technelysium.com.au/?page_id=13 | 29.10.2015 |
| http://mvz.berkeley.edu/egl/resources/product%20inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf | 29.10.2015 |
| https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041203.pdf | 29.10.2015 |
| http://www.roche-applied-science.com/shop/products/rapid-alkaline-phosphatase#tab-0 | 29.10.2015 |
| http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome__2015-06.pdf | 29.10.2015 |

8 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: | Häufigkeit und zeitliches Auftreten genetischer Veränderungen in der Glioblastomentstehung (Ohgaki et al. 2004; Kleihues et al. 2007) | 13 |
| Abbildung 2: | Aus Isocitrat wird unter Abspaltung von CO ₂ alpha-Ketoglutarat gebildet..... | 14 |
| Abbildung 3: | Durch Mutation der IDH-1 unterbleibt die Bildung von alpha-Ketoglutarat. | 15 |
| Abbildung 4: | Durch Mutation der IDH-1 erfolgt die vermehrte Bildung von 2-Hydroxyglutarat.15 | |
| Abbildung 5: | Prozentsatz positiv gefärbter Tumorzellen (400-fache Vergrößerung): a < 10%, b 11-50%, c 51-80%, d > 80% | 23 |
| Abbildung 6: | Färbeintensität (400-fache Vergrößerung): a negativ, b schwach positiv, c mäßig positiv, d stark positiv | 23 |
| Abbildung 7: | Ausschnitt aus dem Elektropherogramm eines Wildtyps | 33 |
| Abbildung 8: | Ausschnitt aus dem Elektropherogramm einer R132H Mutation | 34 |
| Abbildung 9: | Ausschnitt aus dem Elektropherogramm einer R132G Mutation | 34 |
| Abbildung 10: | Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts | 36 |
| Abbildung 11: | Exemplarisches Ergebnis der Fragmentanalyse. Links ohne und rechts mit Nachweis der IDH-1 R132H Mutation | 40 |
| Abbildung 12: | Exemplarische Darstellung eines nicht gewerteten Ergebnisses der Fragmentanalyse | 49 |

9 Diagrammverzeichnis

| | | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Diagramm 1: | Erkrankungsalter primäre und sekundäre Glioblastome | 42 |
| Diagramm 2: | Prozentualer Anteil der IDH-1 R132H Mutation je Tumortyp | 44 |
| Diagramm 3: | Verteilung der einzelnen IHC-Präparate nach ihrem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen..... | 45 |
| Diagramm 4: | Färbeintensität IDH-1 R132H positiver IHC | 45 |
| Diagramm 5: | IRS IDH-1 R132H positiver Immunhistochemie | 45 |
| Diagramm 6: | Prozentualer Anteil der IDH-1 Mutation an jedem Tumortyp | 47 |
| Diagramm 7: | Prozentualer Anteil der IDH-1 R132H Mutation an jedem Tumortyp..... | 48 |
| Diagramm 8: | Überlebensfunktionen Immunhistochemie | 52 |
| Diagramm 9: | Überlebensfunktionen Sequenzierung..... | 53 |
| Diagramm 10: | Überlebensfunktionen Fragmentanalyse | 54 |

10 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: | Klinische Patientendaten..... | 18 |
| Tabelle 2: | Beurteilung des Prozentsatzes an positiv gefärbten Zellen | 22 |
| Tabelle 3: | Beurteilung der Färbintensität | 22 |
| Tabelle 4: | Aufreinigung isolierter DNA..... | 26 |
| Tabelle 5: | Verwendete Primer für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material (Capper et al. 2010) | 27 |
| Tabelle 6: | Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material: Ansatz für eine Probe.... | 28 |
| Tabelle 7: | PCR-Bedingungen für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus FFPE-Material . | 28 |
| Tabelle 8: | Fluoreszenzmarkierung der für die Cycle Sequencing Reaktion verwendeten Nukleotide | 30 |
| Tabelle 9: | Cycle Sequencing Reaktion: Ansatz für eine Probe | 31 |
| Tabelle 10: | PCR-Bedingungen für die Cycle Sequencing Reaktion..... | 31 |
| Tabelle 11: | Erwartete Ergebnisse der Sequenzanalyse..... | 33 |
| Tabelle 12: | Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Serum: Ansatz für eine Probe..... | 35 |
| Tabelle 13: | PCR-Bedingungen für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem Serum ... | 35 |
| Tabelle 14: | Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide in der Snap Shot PCR (ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit, Protocol) | 37 |
| Tabelle 15: | Snap Shot PCR: Verwendeter Primer | 37 |
| Tabelle 16: | Snap Shot PCR: Ansatz für eine Probe (Serum) | 39 |
| Tabelle 17: | Snap Shot PCR-Bedingungen | 39 |
| Tabelle 18: | Erwartete Ergebnisse der Fragmentanalyse..... | 40 |
| Tabelle 19: | Anzahl der vergebenen IRS je WHO-Grad | 46 |
| Tabelle 20: | Vergleich der Methoden: IDH-1 R132H Immunhistochemie, Sequenzierung, Fragmentanalyse | 50 |
| Tabelle 21: | Ergebnisse der einzelnen Methoden im Vergleich..... | 50 |
| Tabelle 22: | Immunreaktiver Score der durch Sanger-Sequenzierung und Fragmentanalyse detektierten IDH-1 R132H Mutationen | 51 |

11 Anhang

11.1 Material- und Geräte-Liste

11.1.1 Immunhistochemie, HE-Färbung

| Material | Firma | Lot-Nr. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|
| Xylol (Isomerenmischung bestehend aus Ethylbenzol, m-Xylol, c-Xylol und p-Xylol) | Otto Fischar GmbH & CoKG, D-66133 Saarbrücken | |
| Ethanol min. 99,9% Vol. (Ethylalkohol) | Berkel pfälzische Spritfabrik, D-67065 Ludwigshafen | |
| Methanol | Apotheke Uniklinikum Homburg | |
| Wasserstoff-Peroxid-Lösung 30% | Otto Fischar GmbH & CoKG, D-66133 Saarbrücken | |
| Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (10x) | Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg | 00056576 |
| Dako Wash Buffer 10x | Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg | 00068140 |
| IDH-1 R132H unconj. | Dianova GmbH, D-20354 Hamburg | 1096 |
| EnVision™ FLEX+ MOUSE LINKER | Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg | 00072535 |
| Dako REAL™ Antibody Diluent | Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg | 00069260 |
| Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Bestehend aus: | Dako Deutschland GmbH, D-22769 Hamburg | |
| Dako REAL™ Substrate Buffer | | 00069263 |
| Dako REAL™ EnVision™ | | 00069263 |
| Dako REAL™ DAB+ CHROMOGEN (x50) | | 00069263 |
| Kupfer-(II)-Sulfat-Pentahydrat | Merck KGaA, D-64271 Darmstadt | A483787448 |
| Shandon Instant Hematoxylin | Thermo Scientific, D-63303 Dreieich | 220658 |
| Shandon Bluing Reagent | Thermo Scientific, D-63303 Dreieich | 195356 |
| Eosin G-Lösung 0,5% wässrig | Merck KGaA, D-64271 | HX246788 |
| Microscopy Entellan | Merck KGaA, D-64271 Darmstadt | HX088232 |

| Geräte | Firma |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Mikrotom 2300 Biocut | Ehem. Reichert-Jung Jetzt: Leica-Microsystems AG D-64646 Heppenheim |
| Wärmeschrank - Heraeus Instruments Function Line | Thermo Scientific, D-63303 Dreieich |
| MultiGourmet FS 10 Typ 3216 | Braun GmbH, D-61476 Kronberg/Taunus |
| Shandon Coverplate™ Disposable Immunostaining Chamber | Thermo Scientific, D-63303 Dreieich |

11.1.2 Sequenzierung und Fragmentanalyse

| Material | Firma | LOT-Nr. |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------|
| QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50) | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden | 142340457 |
| Bestehend aus: | | |
| Buffer ATL Tissue lysis Buffer | | 142333968 |
| Buffer AL Lysis Buffer | | 142336842 |
| Buffer AW1 Wash Buffer 1 (19ml concentrate) | | 142336437 |
| Buffer AW2 Wash Buffer 2 (13ml concentrate) | | 142338731 |
| Proteinase K Buffer ATE | | 142338141 |
| Collection Tubes (2ml) | | 142336329 |
| QIAamp MinElute™ Columns | | 142337884 |
| Xylol Pharm. Helv. VI (Isomerenmischung) | Aug. Hedinger GmbH & Co., D-70327 Stuttgart | 077054B |
| SIGMA-ALDRICH® Ethanol | Chemie GmbH, D-89555 Steinheim | SZBA263AV |
| BD Microlance 3™ Kanülen | Beckton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg | 110625 |
| Biosphere® Safe Seal Tube 1,5ml | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., D-51588 Nümbrecht | 2081501 |
| SafeSeal Reagiergef. 2ml, PP | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., D-51588 Nümbrecht | 0000/2101001 |
| Rotor Adapters (24) | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden | CH_1106940 |
| Filter-Tips, 1000µl (4x32) | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden | 00943540101 |
| Filter-Tips, 200µl (4x32) | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden | 00942540047 |
| LiChrosolv® | MERCK KGaA, | |

| | | |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Wasser für Chromatographie | D-64293 Darmstadt | |
| KIMTECH Science | Kimberly-Clark GmbH, D-56070 Koblenz-Rheinhafen | 05511 |
| MinElute® PCR Purification Kit (50) | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden | 142336898 |
| Bestehend aus: | | |
| Buffer PB Binding Buffer | | 142331446 |
| Buffer EB Elution Buffer | | 142332227 |
| 2x Buffer PE Wash Buffer (6ml concentrate) | | 142327325 |
| Loading Dye 5x GelPilot Loading Dye, 5x | | 142324491 |
| pH Indikator I | | 142327743 |
| MinElute™ Spin Columns (50) | | 142328433 |
| Multiply®-µStripPro Biosphere® St./pcs. 50 | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., D-51588 Nümbrecht | 1565401 |
| Multiply®-Pro 0,5ml Biosphere® | Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., D-51588 Nümbrecht | 1053401 |
| peqGOLD Taq-DNA-Polymerase 'all inclusive' | PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen | 052912 |
| Bestehend aus: | | |
| Taq-DNA- Polymerase | | 091411-5 |
| 10x Reaktionspuffer Y | | 032712 |
| 10x Reaktionspuffer S | | 112111 |
| 5x Enhancer Solution P | | 060412 |
| Verdünnungspuffer | | 060412 |
| 25 mM Magnesiumchlorid | | 061912 |
| dNTP Mix 10 mM je Nukleotid | | 041012 |
| Primer (5' → 3') | Eurofins MWG Operon D-85560 Ebersberg | 2772406 (Auftragsnummer) |
| Extern Forward ACCAAATGGCACCAT | | |
| Extern Reverse TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT | | |
| Intern Forward CGGTCTTCAGAGAAGCCATT | | |
| Intern Reverse | | |

| | | |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| GCAAAATCACATTATTGCCAAC | | |
| Ambion® Agarose-LE | Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA 92008 | 1104023 |
| 1xTBE Zusammensetzung 5xTBE: | Eigenherstellung | |
| 54g Trisbase | AppliChem BioChemica Chemica Synthesis Services, D-64291 Darmstadt | 8J007602 |
| 27,5g BORIC acid | | 9R002436 |
| 20ml 0,5M EDTA | | 6T009068 |
| Ad 1000ml dH ₂ O | | |
| BDH Electran® Ethidium bromide solution | VWR International GmbH, D-64295 Darmstadt | 561202 |
| DNA LB (Ladepuffer) | Eigenherstellung | |
| Zusammensetzung: | | |
| 30% Glycerin in dH ₂ O | AppliChem BioChemica Chemica Synthesis Services, D-64291 Darmstadt | 6N005708 |
| Xylene cyanol for electrophoresis | MERCK KGaA D-64291 Darmstadt | K28476990633 |
| 123 bp DNA Ladder | Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA 92008 | 867329 |
| Softasept N | Braun GmbH, D-61476 Kronberg/Taunus | Art-Nr 3887138 |
| MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | I13H2QA315 |
| MicroAmp™ Optical Adhesive Film | Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 | 201104091 |
| EDTA für die Molekularbiologie | AppliChem Biochemica Chemica Synthesis Services, D-64291 Darmstadt | 6T009068 |
| BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems™ Austin, TX 78744 | 1204233 |
| Bestehend aus: | | |
| ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix | | 1202065 |
| pGEM®-3Zf(+) Control Template | | 1202144 |
| 21 M13 Control Primer (forward) | | 1203204 |
| Hi-Di™ Formamide | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 1204034 |
| Anode Buffer Container | Applied Biosystems® by life | 1207091 |

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 3500 Series | technologies™ Foster City, CA 94404 | |
| Cathode Buffer Container 3500 Series | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 1206106 |
| Capillary Array 50cm-8cap | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 36 |
| Polymer: Pop-7™ | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 1204042 |
| KAPA Blood PCR-Mastermix B Für 500 Reaktionen á 25µl | peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen | Bestell-Nr: 07-KK7003-01 |
| GeneScan™ Installation Kit DS-33 with LIZ® Size Standard v2.0 6-FAM™, VIC®, NED™, PET®dyes | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 1210028 |
| Multi-Capillary DS-33 (Dye Set G5) Matrix Std Kit [6-FAM™, VIC®, NED™, PET®dyes] | Applied Biosystems® by life technologies™ Foster City, CA 94404 | 1301092L |
| QIAquick® Gel Extraction Kit (50) | QIAGEN | 145029961 |
| SNaPshot® Multiplex Kit 100 Reactions | Applied Biosystems® by life technologies™ 7 Kingsland Grange, Woolsten Warrington WA1 4SR, UK | 1302201 |
| Primer 2C (5' → 3') GGTAAAACCTATCATCATAGGTC (23) | Eurofins MWG Operon Anzingerstraße 7a D-85560 Ebersberg | Auftragsnummer: 3101628 |

| Geräte | Firma |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Mikrotom Rotary 3003 | Pfm medical ag, D-50996 Köln |
| Tissue-TEK® Cryo Console | MilesCo Scientific, Princeton, MN 55371 |
| Schüttelmaschine VIBROFIX VF1 | IKA® Labortechnik, D-79219 Staufen |
| Hochgeschwindigkeits-Mikroliterzentrifuge Model: CT15E/CT15RE | VWR International GmbH, D-64295 Darmstadt |
| Thermomixer comfort 1,5ml | Eppendorf AG, D-22339 Hamburg |
| Thriller | PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen |
| NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 | PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen |
| QIACUBE | QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden |
| Kühltruhe Premium NoFrost | Liebherr-Hausgeräte GmbH, D-88416 Ochsenhausen |
| Kühlschrank PremiumBioFresh | Liebherr-Hausgeräte GmbH, D-88416 Ochsenhausen |

| | |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| peqSTAR 96 Universal | PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen |
| MyCycler™ thermal cycler | Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80931 München |
| Präzisionswaage Typ: ISO 9001 | Sartorius Weighing Technology GmbH, D-37075 Göttingen |
| Mikrowelle Typ: KOC 985TBA | DEAWOO Electronics Corp., Seoul 100-031, Korea |
| RET basic IKAMAG® | IKA® Labortechnik, D-79219 Staufen |
| Elektrophoresekammer | Von Keutz Labortechnik, D-35447 Reiskirchen |
| Microcomputer Electrophoresis Power Supply Typ: E443 | Consort nv, B-2300 Turnhout |
| InGenius Manual gel documentation systems | Syngene Bio Imaging, CB41TF, UK |
| Hermle Z326K Tischkühlzentrifuge | Axon Labortechnik, D-67659 Kaiserslautern |
| Vortex Genius 3 | IKA® Labortechnik, D-79219 Staufen |
| 3500 Genetic Analyzer8ch RUO Model: 622-0010 | Applied Biosystems® by life technologies™, Foster City, CA 94404 |

12 Publikationen

DGNN 2015 in Berlin:

Heubeck E., Ludwig N., Ebert E., Kim Y.-J.: Comparison of fragment analysis and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of R132H and non-R132H IDH-1 mutations in gliomas (Poster-Präsentation)

<http://www.egms.de/static/de/meetings/dggn2015/15dggn75.shtml>

Comparison of fragment analysis and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of R132H and non-R132H IDH1 mutations in gliomas

Heubeck E. ^(1,2), Ludwig N. ⁽³⁾, Ebert E. ⁽¹⁾, Kim Y.-J. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Saarland University Medical Center, Institute of Pathology, 66121 Homburg/Saar, Germany
⁽²⁾ Klinikum Ingolstadt GmbH, Clinic of Neurology, 85048 Ingolstadt, Germany
⁽³⁾ Saarland University, Institute of Human Genetics, 66123 Homburg/Saar, Germany

UKS
Saarland University
Medical Center
Institute of Pathology

Introduction

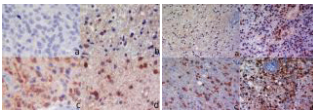
Primary and secondary glioblastomas are primary brain tumours with a very poor prognosis. The median survival after diagnosis is less than 3 months in over 50% of cases [1]. Recent studies already showed that both entities differ in their IDH-1 mutational status. It is a somatic point mutation affecting the isocitrate dehydrogenase 1 gene in codon 132 which leads to an amino acid exchange [2]. Due to a different metabolic product this may lead to a longer survival of patients [3]. This mutation is an early event in the genesis of glioma and is an independent prognostic parameter [4]. The aim of this study was to compare different detection methods of this mutation in terms of sensitivity, specificity, and practicability in daily routine.

Materials & Methods

For the detection of IDH1 R132H mutation in formalin fixed and paraffin-embedded tumor tissue of 43 glioblastomas and 42 WHO grade II and III tumors, immunohistochemistry, direct sequencing and fragment analysis were used. There were 6 diffuse astrocytomas, 8 diffuse oligo-astrocytomas, 14 anaplastic astrocytomas, 7 anaplastic oligodendrogliomas, 10 anaplastic oligo-astrocytomas, 13 secondary glioblastomas, and 30 primary glioblastomas.

IDH1 R132H Immunohistochemistry:

IHC was done with a monoclonal mouse antibody (DIAH09, Dianova GmbH) according to manufacturer's instructions. The different samples were analysed respecting the percentage of IDH1 R132H positive tumor cells and staining intensity. The expression was assessed as immunoreactive score IRS [5].



Staining intensity: a) negative, b) weakly positive, c) moderately positive, d) strongly positive. Percentage of positive stained tumor cells: a) 0%, b) 11-40%, c) 61-80%, d) >80%

Sanger sequencing:

For the isolation of DNA from FFPE tumor tissue QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN GmbH) was used. Polymerase chain reaction was done with two primers based on Capper et al. 2009 [6].

Primer exten forward: 5' ACCAATCGCCACAT 3'
Primer exten reverse: 5' TTCAACTCTGCTTAAGGGGTG 3'

PCR conditions (35 cycles):
Denaturation 95°C for 30 seconds
Annealing 56°C 40 seconds
Extension 72°C 30 seconds

In cases of a missing signal in agarose gel electrophoresis PCR was repeated with two other primers [6]:
Primer intern forward: 5' CGGTCTCAGAGAAGCCATT 3'
Primer intern reverse: 5' GCAAATCACTATTGCCAAC 3'

For Cycle sequencing BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) and Primer exten forward and intern reverse were used according to manufacturer's instructions. PCR product was analysed in 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

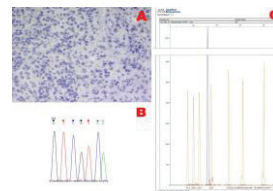
Fragment Analysis:

Isolated and amplified DNA from Sanger sequencing was used. In cases of too less material DNA was amplified again with primer intern forward and intern reverse from Sanger sequencing. Initial denaturation was performed at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 56°C for 40 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. Agarose gel-electrophoresis was done. The DNA bands of each sample were cut out of the gel. DNA was isolated with QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH).

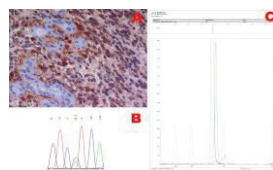
Snapshot PCR was done with SNaShot® Multiplex Kit (Applied Biosystems®) and following primer:

5' GG TAA AAC CTATCA TCA TAG GTC 3'

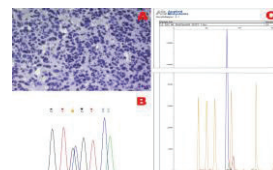
25 cycles of PCR were done. Denaturation was performed at 96°C for 10 seconds, annealing at 50°C for 5 seconds, and extension at 60°C for 30 seconds. PCR product was analysed in 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).



Primary Glioblastoma IDH-1 wildtype
a) Immunohistochemistry b) Sanger sequencing c) fragment analysis



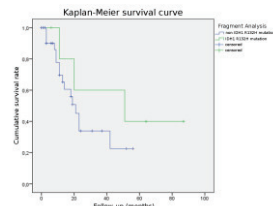
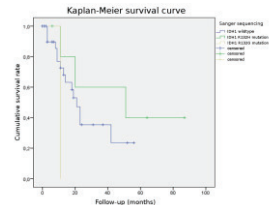
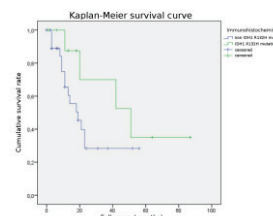
Secondary Glioblastoma IDH1 R132H mutation
a) Immunohistochemistry b) Sanger sequencing c) fragment analysis



Secondary Glioblastoma IDH1 R132G mutation
a) Immunohistochemistry b) Sanger sequencing c) fragment analysis

Survival analysis:

Furthermore, the clinical data of 43 glioblastoma patients were analysed and in response to the mutational status, detected by the different methods. Lifetime analysis was performed using Kaplan-Meier estimator and log-rank test.



Results

Immunohistochemistry detected IDH1 R132H mutation in 35 out of 85 samples. Only 24 were found to harbor IDH1 R132H mutation by fragment analysis and only 18 by Sanger sequencing. In two cases IDH1 R132G mutation could be detected by Sanger sequencing.

Table 1 gives an overview of the number of detected mutations per tumor type.

Table 1. Tumor type and number of detected IDH1 mutations

| | Total number of samples | Immunohistochemistry | Sanger sequencing | Fragment analysis |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Diffuse astrocytomas | 6 | 2 non IDH1 R132H 4 IDH1 R132H | 4 non IDH1 R132H 2 IDH1 R132H | 2 non IDH1 R132H 4 IDH1 R132H |
| Diffuse oligo-astrocytomas | 8 | 1 non IDH1 R132H 7 IDH1 R132H | 2 IDH1 R132H 6 non IDH1 R132H | 1 non IDH1 R132H 7 IDH1 R132H |
| Anaplastic astrocytomas | 14 | 9 non IDH1 R132H 5 IDH1 R132H | 11 non IDH1 R132H 3 IDH1 R132H | 10 non IDH1 R132H 4 IDH1 R132H |
| Anaplastic oligodendrogliomas | 7 | 1 non IDH1 R132H 6 IDH1 R132H | 7 IDH1 R132H | 6 non IDH1 R132H 1 IDH1 R132H |
| Anaplastic oligo-astrocytomas | 10 | 10 IDH1 R132H | 5 IDH1 R132H 5 non IDH1 R132H | 8 non IDH1 R132H 2 IDH1 R132H |
| Secondary glioblastomas | 13 | 3 non IDH1 R132H 10 IDH1 R132H | 7 IDH1 R132H 6 non IDH1 R132H | 8 non IDH1 R132H 5 IDH1 R132H |
| Primary glioblastomas | 30 | 29 non IDH1 R132H 1 IDH1 R132H | 29 non IDH1 R132H 1 IDH1 R132H | 29 non IDH1 R132H 1 IDH1 R132H |

With immunohistochemistry as reference method a specificity of 100% and a sensitivity of 51.4% was revealed for Sanger sequencing and a specificity of 96.0% and a sensitivity of 62.9% for fragment analysis. Different to the other methods, immunohistochemistry enables the detection of single IDH1 R132H positive tumor cells in very diffuse infiltrating areas or in small biopsy samples. The fragment analysis was superior to Sanger sequencing especially in small biopsies and diffuse neoplasia due to the lower demand of tumor DNA for the analysis.

Survival analysis revealed an increased overall survival for patients with IDH1 R132H mutation compared to those without. The prognosis was best predicted by the IDH1 R132H status detected by immunohistochemistry. The mean survival was 31.3 ± 28.5 months for IDH-1 R132H and 13.6 ± 14.0 months for non IDH-1 R132H (log rank p=0.17). The prognostic value of direct sequencing (log rank p=0.2394) was superior to fragment analysis (log rank p=0.312), though the effect was not statistically significant.

Conclusions

The obtained data in this work shows that IDH1 R132H immunohistochemistry is the most suitable method to use in daily routine in terms of feasibility, detection rate as well as the predictive value to estimate the patient's prognosis.

References and Sources

[1] Ellison P, Wang PC, Allgeier KR, et al. 2007. Glioblastoma. In WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th edition. D.N. Louis, H. Ohgaki, G.D. Weller, and W.K. Cavenee, eds. Pp. 131-40

[2] Parsons D, Wang W, Sidra J, et al. 2008. An Integrated Genetic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. Science (New York, N.Y.) 321(5897): 1897-1912.

[3] Wang Q, Yu L, Gu H, et al. 2012. IDH1 Mutation: Double-Edged Sword and Prognosis in Astrocytoma in Secondary Glioblastoma. Cancer Science 103(2): 220-225.

[4] Saman M, Yonek M, Sapiro P, et al. 2009. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Independent Prognostic Biomarker in Gliomas. Journal of Clinical Oncology - Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 27(27): 4600-4614.

[5] Horowitz W, Schickler KH. 1993. Immunohistochemical Determination of Estrogen and Progesterone Receptor Content in Human Breast Cancer: Computer-Assisted Image Analysis (QC Score vs. Subjective Grading). Pathology, Research and Practice 190(4):582-586.

[6] Capper D, Zampieri HC, Hader J, et al. 2009. Monoclonal Antibody Specific for IDH1 R132H Mutation. Acta Neuropathologica 118(3):391-401.

13 Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle, der mir die hervorragende Möglichkeit bot meine Arbeit in seinem Institut weiter fortzuführen.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Y.-J. Kim für die Übernahme meiner Betreuung als Doktorvater, die Organisation der Zusammenarbeit mit anderen Instituten, die konstruktive Kritik sowie Motivation und moralische Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. E. Ebert, die mich während meiner Zeit in der Pathologie betreut hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Meese der mir die Möglichkeit bot Versuche in seinem Institut durchzuführen.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. N. Ludwig für die überaus gute Betreuung meiner Versuche im Institut für experimentelle Humangenetik, die vielen Vorschläge zu neuen Versuchsansätzen, das Korrekturlesen, die konstruktive Kritik sowie die moralische Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. S. Wagenpfeil für die Bereitsstellung des Statistikprogramms.

Danken möchte ich auch allen weiteren Mitarbeitern der Neuropathologie, der Pathologie sowie der Genetik die mich während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben.

Dank gilt meinen Freunden, insbesondere meiner Freundin Miriam, für die vielen Gespräche, das Korrekturlesen sowie die konstruktive Kritik.

Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann Florian für die vielen Stunden in denen er mich motiviert und mir Mut zugesprochen hat. Ohne dich hätte ich es niemals soweit geschafft.