

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

# RB1-Promotormethylierung bei Glioblastomen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Gerrit Breitfelder  
geboren am 09.03.1992 in Stuttgart

Tag der Promotion: 11.05.2021  
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger  
Berichterstatter: Prof. Dr. J. Oertel  
Prof. Dr. S. Stilgenbauer

für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Glioblastom .....	1
1.1.1 Klassifikation.....	3
1.1.2 Epidemiologie.....	3
1.1.3 Prognose .....	4
1.2 Epigenetik .....	4
1.3 Methylierung .....	5
1.4 MGMT .....	5
1.5 RB1 .....	6
1.5.1 Two-Hit-Hypothese nach Knudson.....	6
1.5.2 RB1-Signalweg.....	7
<b>2. Zielsetzung der Studie.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
3.1 Patienten .....	11
3.2 DNA-Isolation.....	11
3.3 Konzentrationsbestimmung der DNA.....	13
3.4 Bisulfit-Behandlung .....	13
3.4.1 Theorie .....	13
3.4.2 Praktischer Teil.....	14
3.5 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) .....	16
3.6 Agarose-Gelelektrophorese .....	18
3.7 IDH1-Immunhistochemie .....	19
3.8 Statistische Methoden .....	22
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
4.1 Deskriptiver Abschnitt .....	23
4.2 Ergebnisse der RB1-Methylierungsanalyse .....	24
4.3 Ergebnisse der MGMT- Methylierungsanalyse.....	27
4.4 Analyse des IDH1-Mutationsstatus .....	27
4.5 Auswertung der Überlebenszeitdaten .....	27
4.5.1 Alter .....	28
4.5.2 IDH1-Mutationsstatus.....	29
4.5.3 MGMT-Methylierungsstatus .....	30

4.5.4 Karnofsky-Index.....	31
4.6 Kasuistik .....	33
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>36</b>
5.1 Vergleichbarkeit unserer Kohorte mit der gängigen Literatur .....	36
5.2 Methodendiskussion.....	39
5.3 Ergebnisdiskussion .....	42
5.4 Zusammenfassung und Ausblick .....	47
Literaturverzeichnis.....	48
Abbildungsverzeichnis .....	59
Tabellenverzeichnis .....	60
Anhang .....	61
Danksagung .....	64
Curriculum Vitae .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
CCT	Craniale Computertomographie
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinukleotid-Triphosphat
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
EtOH	Ethanol
for	forward (vorwärts)
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IDH-1	Isocitratdehydrogenase 1
IDH-1 R132H	Punktmutation im Gen der Isocitratdehydrogenase 1
kb	Kilobasen
KPS	Karnofsky-performance-status
l	Liter
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
M oder m	Molar, methyliert oder männlich
mA	Milliampere
MDM2	Mouse double minute 2
mg	Milligramm
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MS-PCR	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
p53	(Tumorsuppressor-) Protein 53
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFS	Progression-free survival (Progressionsfreies Überleben)
RB1	Retinoblastoma 1

rev	reverse (rückwärts)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
sek	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tab.	Tabelle
TP53	Tumorsuppressorgen p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unmethyliert
UV	ultra-violett
V	Volt
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem
μl	Mikroliter

# Zusammenfassung

Glioblastome sind astrozytäre Tumore, gehören zu den aggressivsten Tumorerkrankungen des Menschen und sind mit einer infausten Prognose vergesellschaftet. Auf der Suche nach Faktoren, welche Einfluss auf die Entstehung oder Progression von Glioblastomen haben, geriet zunehmend die epigenetische Forschung in den Fokus.

Das RB1-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, welches bei der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle einnimmt. Es kann durch verschiedene Mechanismen ausgeschaltet werden, unter anderem durch die DNA-Methylierung seiner Promotorregion, wodurch die Expression des RB1-Gens unterdrückt wird.

Die vorliegende Studie analysierte den Methylierungsstatus des RB1-Promotors bei 85 primären Glioblastomen. Methodisch kam dabei eine methylierungsspezifische PCR mit anschließender Auswertung der PCR-Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese unter Verwendung von Ethidiumbromid zur Visualisierung der Banden im Gel zum Einsatz. Zielsetzung war, die Rolle der RB1-Promotormethylierung beim Glioblastom zu evaluieren.

Eine Methylierung des RB1-Promotors konnte bei einer von 85 untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden (1,2%). Eine Korrelation des RB1-Methylierungsstatus mit anderen erhobenen Parametern war entsprechend statistisch nicht sinnvoll. Das mittlere Gesamtüberleben der Patientenpopulation lag bei 15,7 Monaten, das mittlere progressionsfreie Überleben bei 9,0 Monaten. Bei 6,1% der Patienten konnte eine IDH1-Mutation nachgewiesen werden, wobei dies mit jüngerem Patientenalter bei Erstdiagnose vergesellschaftet war. Zudem war bei 48,2% der Patienten eine Methylierung des MGMT-Promotors vorhanden. Bei mittlerem Alter der Patientenpopulation von 60,67 Jahren zeigte sich eine signifikante Verkürzung von Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben mit zunehmendem Alter bei Erstdiagnose. Ebenso stellten wir fest, dass Patienten mit hohem Karnofsky-Score bei Erstdiagnose ein signifikant längeres Gesamtüberleben sowie progressionsfreies Überleben vorwiesen.

Insgesamt zeigte nur bei einem von 85 Patienten die Tumorprobe eine Methylierung des RB1-Promotors – dies ist umso überraschender, da sich in der Literatur diesbezüglich teils widersprüchliche Ergebnisse finden. Im Vergleich zu den vorliegenden, häufig kleineren Studien zu dieser Fragestellung konnten wir in dieser Studie mit der höchsten Fallzahl sowie als erste Studie unter Verwendung der aktuellen WHO-Klassifikation eine klare Aussage zu diesem Thema treffen.

Unsere Studienergebnisse zeigen, dass die RB1-Promotormethylierung kein relevantes Ereignis in der Entstehung und Progression des Glioblastoms darstellt.



## Abstract

Glioblastomas are astrocytic tumors, are among the most aggressive tumor diseases of man, and are associated with an unfavorable prognosis. In search of factors that have an influence on the development or progression of glioblastomas, the epigenetic research came into focus. The RB1 gene is a tumor suppressor gene which plays a key role in the development of various tumor diseases. It can be turned off by various mechanisms, among other things by DNA methylation of its promotor region.

This study analyzed the methylation status of the RB1 promotor of 85 primary glioblastomas. Methodically, a methylation-specific PCR with subsequent evaluation of results of the PCR products via gel electrophoresis using ethidium bromide to visualize the bands in the gel was used. The objective was to evaluate the role of the RB1 promotor methylation in glioblastomas. Methylation of the RB1 promotor could be found in one of the 85 analyzed tumor samples (1,2%). According to that, a correlation of the RB1 methylation status with other analyzed items didn't make sense statistically. The average overall survival of the patient population was 15,7 months, the average progression free survival was 9 months. In 6,1% of the patients, an IDH1 mutation could be detected, this was associated with a younger age of the patients at initial diagnosis. Additionally, in 48,2% of the patients, a methylation of the MGMT-promotor was present. With an average age of the patients' population of 60,67 years, there was a significant shortening of overall survival and progression free survival with increasing age at initial diagnosis. Likewise, we found out that patients with a high Karnofsky-Score at initial diagnosis had a significantly longer overall survival and progression free survival.

Overall, in only one of the 85 Patients, the tumor sample showed a methylation of the RB1-promotor – this is even more surprising as in the literature, there are partly contradictory results found concerning this matter. In comparison to the available, often smaller studies regarding this issue, we could in this study, with the highest case number as well as as the first study using the recent WHO-classification, make a clear statement on this subject.

Our study results indicate that the RB1 promotor methylation is not a relevant event in the development and progression of glioblastoma.

# 1. Einleitung

## 1.1. Glioblastom

Das Glioblastom ist ein primärer Tumor des zentralen Nervensystems und entspricht einem WHO-Grad IV-Astrozytom<sup>65</sup>.

Ätiologisch sind bislang nur wenige eindeutige Risikofaktoren mit dem Glioblastom in Verbindung gebracht worden. Das Glioblastom tritt in der Mehrheit der Fälle sporadisch auf. Prädisponierende Faktoren können ionisierende Strahlung oder genetisch vererbare Syndrome wie beispielsweise die Neurofibromatose Typ I und II oder die tuberöse Sklerose sein<sup>45,29</sup>. Als zusätzliche Risikofaktoren können Rauchen sowie die Exposition gegenüber Pestiziden und Vinylchlorid an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt sein<sup>76</sup>.

Die Entwicklung eines Glioblastoms ist oft Ergebnis einer Akkumulation genetischer Veränderungen und Fehlregulationen von Signalkaskaden, welche zur unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen führt. Ausgangspunkt der Diagnosefindung ist die Anamnese und klinische Untersuchung des Patienten. Die Klinik stellt sich beim Glioblastom sehr variabel dar. Typisch ist ein kurzer Krankheitsverlauf mit Entwicklung der Symptome innerhalb kürzester Zeit<sup>47</sup>. Häufig zu findende unspezifische Symptome sind Fatigue, epileptische Anfälle, kognitive Dysfunktion und thromboembolische Ereignisse sowie Kopfschmerzen, Schwindel, Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisverluste<sup>75</sup>.

Radiologisch bietet sich eine CT- oder MRT-Bildgebung zur Darstellung des Tumors an. Charakteristisch für das Glioblastom zeigt sich bei Kontrastmittelgabe oft ein ring- oder girlandenförmiges Kontrastmittelenhancement. Ebenso zeigt sich im MRT-Bild in der T2-Sequenz oft ein ausgeprägtes perifokales Ödem.

Die definitive Diagnose wird jedoch histopathologisch-molekulargenetisch gestellt. Dies gelingt durch Gewebeentnahme im Rahmen einer stereotaktischen Biopsie oder einer chirurgischen Resektion. Das Präparat zeigt mikroskopisch typischerweise ein pleomorphes Zellbild mit hoher Zelldichte, Kernatypien, Gefäßproliferationen und Nekrosen (siehe Abb.2).

Der Therapie des Glioblastoms ist multimodal und beinhaltet standardmäßig die chirurgische Resektion, auf die eine kombinierte Radiochemotherapie folgt<sup>64</sup>.

Eine der wichtigsten Säulen der Therapie und meist erste Therapiemodalität stellt die chirurgische Resektion des Tumors dar<sup>2</sup>. Ziele der Operation sind unter anderem die histologische Sicherung der Diagnose, eine Verbesserung der Symptomatik sowie eine Reduktion der Tumormasse in Vorbereitung einer adjuvanten Therapie bei Erhalt der neurologischen Funktion.

Die Patienteneignung für eine chirurgische Intervention muss sorgfältig geprüft werden.

Ein guter Parameter zur Einschätzung des Benefits einer Operation für den Patienten ist dabei der Karnofsky-Index. Dieser wurde 1949 von Karnofsky et al. zur Erfassung der Lebensqualität, der Einschränkung der Aktivität und des Bedarfs medizinischer Versorgung von Patienten mit malignen Tumorerkrankungen entwickelt. Er reicht in einer Skala von 100, was der Abwesenheit von Einschränkungen entspricht, bis 0, was den Tod des Patienten bedeutet, wobei 11 Kategorien abgefragt werden<sup>31</sup>.

In einer 2015 durchgeführten Studie von Chambless et al. verbesserte sich bei 57 % der Patienten deren KPS durch die Tumorresektion, während er sich bei 18 % verschlechterte und bei 25% der Patienten unverändert blieb<sup>11</sup>.

Als Standardtherapie für neu aufgetretene Glioblastomerkrankungen hat sich das Stupp-Protokoll etabliert. Dieses wurde von Stupp et al. 2005 im Rahmen der EORTC/NCIC-Studie erprobt und stellt einen Meilenstein der Glioblastomtherapie dar. Während davor eine alleinige Strahlentherapie als Therapiestandard galt, hat sich durch Einführung des Stupp-Schemas die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate verlängert<sup>64</sup>.

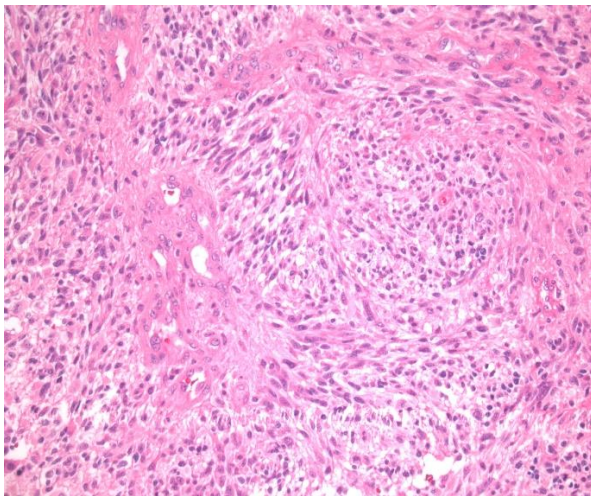


Abb. 1: GBM, HE, 200-fache Vergrößerung: zu sehen sind für das Glioblastom typische, glomeruläre Gefäßproliferationen

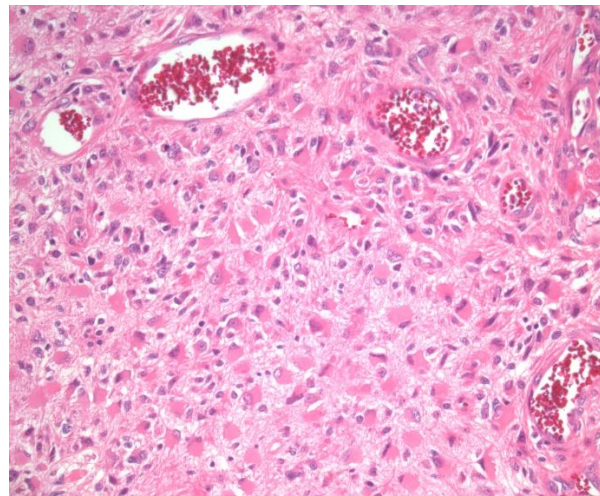


Abb. 2: GBM, HE, 200-fache Vergrößerung: Der astrozytäre Charakter der Tumorzellen ist gut erkennbar. Die Pleomorphie der Zellen zeigt sich durch die Unterschiede in Zellgröße, Form des Zellkerns sowie die Gestalt der Zellausläufer

### **1.1.1. Klassifikation**

Die Tumoren des zentralen Nervensystems werden nach der WHO-Klassifikation eingeteilt. Diese erlebte einen starken Wandel durch die Veröffentlichung der 5. Auflage der Klassifikation im Mai 2016, welche die vorangegangene Version vom Jahr 2007 ersetzt<sup>37</sup>.

Nachdem in Letzterer vor allem die histologischen Eigenschaften des Tumorgewebes zur Klassifikation des Tumors verwendet wurden, spielen nun auch molekulargenetische und immunhistochemische Parameter eine tragende Rolle bei der Einteilung der Tumorentitäten<sup>37</sup>. Bezüglich des GBM wurde mit Einführung der WHO-Klassifikation von 2016 eine komplette Neustrukturierung der Klassifikation erarbeitet.

Die vormalig gängige Bezeichnung eines Glioblastoms als primär oder sekundär ist nach neuer Klassifikation nicht mehr vorgesehen.

Es werden nun abhängig vom Mutationsstatus der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) drei verschiedene Typen von Glioblastomen unterschieden:

1. Das Glioblastom, IDH-Wildtyp ist mit ungefähr 90% der Fälle am häufigsten anzutreffen und entspricht meist dem klinisch definierten primären Glioblastom der vorherigen WHO-Klassifikation. Zum Glioblastom, IDH-Wildtyp zählen auch das neu eingeführte epitheloide Glioblastom, das Riesenzell-Glioblastom sowie das Gliosarkom<sup>37</sup>.
2. Das Glioblastom, IDH-mutiert entspricht ungefähr 10% der Fälle und ist eng mit dem ehemals sekundären Glioblastom, welches sich aus einem Gliom niedrigeren Grades entwickelt, verbunden. Es tritt häufig bei Patienten jüngerer Alters auf<sup>37</sup>.
3. Der dritte und letzte Untertyp der Glioblastome ist das Glioblastom, NOS (engl. not otherwise specified). Diese Bezeichnung ist Glioblastomen vorbehalten, bei denen keine oder nur eine unzureichende genetische Testung erfolgt ist<sup>37</sup>.

### **1.1.2. Epidemiologie**

Das Glioblastom ist mit einem Anteil von 47,1% aller malignen primären Hirntumoren der häufigste bösartige und mit 14,9% der häufigste aller primären Tumoren des zentralen Nervensystems des Menschen<sup>49</sup>. Die altersangepasste Inzidenz beläuft sich auf 3,2 pro 100.000 Einwohner<sup>49</sup>.

Das Glioblastom kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, tritt aber gewöhnlich im höheren Alter mit Inzidenzmaximum zwischen 75 und 84 Jahren auf, da das Glioblastom zwischen Geburt und 19. Lebensjahr nur 3% aller ZNS-Tumoren ausmacht<sup>49</sup>. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren<sup>49</sup>. Das Glioblastom tritt 1,58-mal häufiger bei Individuen männlichen Geschlechtes im Vergleich zu weiblichen auf<sup>49</sup>. Des Weiteren ist es häufiger bei Personen mit weißer Hautfarbe zu beobachten<sup>48</sup>. Es ist in den meisten Fällen supratentoriell

im Cortex, sehr selten im Kleinhirn<sup>1</sup> und nur in Ausnahmefällen im Hirnstamm oder Rückenmark lokalisiert<sup>35</sup>.

### **1.1.3. Prognose**

Maligne Tumoren des ZNS verursachen im Vergleich zu allen anderen malignen Neoplasien den größten Verlust an potentiellen Lebensjahren (years of potential life lost) und sind dementsprechend als eine der gefährlichsten und aggressivsten Krebserkrankungen des Menschen bekannt<sup>54</sup>.

Das Glioblastom ist der aggressivste primäre Hirntumor und besitzt aktuell unter kombinierter Radio-Chemotherapie aufgrund von unter anderem multiplen Resistenzbildungen nur ein medianes Überleben von ca. 15 Monaten<sup>64,7</sup>. Das relative Überleben ist mit einer Fünf-Jahres-Überlebensquote von 5,5% nach Diagnose gering, als positiver prognostischer Faktor gilt hier ein frühes Erkrankungsalter<sup>49</sup>.

Weitere positiv prognostische Faktoren sind das oben genannte Ausmaß der chirurgischen Resektion >98% sowie ein hoher Karnofsky-Index bei Diagnosestellung, ein gutes Abschneiden im Mini-Mental-State-Test sowie eine vorliegende MGMT-Promotor-Methylierung<sup>34,55,23,2</sup>.

Die Prognose ist außerdem bei Vorliegen einer IDH1-Mutation verbessert gegenüber einem IDH1-Wildtyp-Tumor. Dies liegt unter anderem daran, dass Patienten mit IDH1-Mutation meist bei Diagnosestellung jünger sind. Der IDH1-Mutationsstatus spielt bezüglich der Prognose eine wichtigere Rolle als die zugrunde liegende Histologie nach WHO-Klassifikation. Demzufolge hat beispielsweise ein anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit IDH1-Wildtyp eine schlechtere Prognose als ein Glioblastom WHO Grad IV mit IDH1-Mutation<sup>22</sup>.

## **1.2 Epigenetik**

Die Epigenetik wurde 1942 von Conrad Waddington als Veränderung des Phänotyps bei gleichbleibendem Genotyp definiert<sup>70</sup>.

Sie bezeichnet ein Regulationssystem, das die Expression von Genen kontrolliert und steuert. Epigenetische Mechanismen ermöglichen das An- und Ausschalten von Genen und somit die Möglichkeit, Zellen spezifischen Funktionen zuzuordnen oder auf äußere und innere Faktoren zu reagieren. So ist die Differenzierung einer Zelle zu einem bestimmten Zelltyp eines Gewebes ohne Veränderung ihrer DNA-Sequenz durch epigenetische Mechanismen möglich<sup>3</sup>.

Epigenetische Veränderungen sind grundsätzlich reversibel, können aber ebenso vererbt werden. Wichtige epigenetische Mechanismen sind die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation und die RNA-Interferenz mittels Micro-RNA.

### 1.3. Methylierung

Die Methylierung gilt als häufigster und einer der wichtigsten epigenetischen Mechanismen. Sie spielt eine essentielle Rolle unter anderem in Bezug auf Embryogenese, X-Inaktivierung, genomische Prägung, Regulation der Genexpression und Karzinogenese<sup>63</sup>.

Die menschliche DNA ist aus den Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin aufgebaut. Die Methylierungsreaktion findet beim Menschen exklusiv an den Cytosin-Nukleotiden innerhalb von CpG-Inseln in Richtung 5'-CpG-3' statt. Die Katalyse der Methylierungsreaktion, in der aus Cytosin durch Anlagerung einer Methylgruppe an Position C5 ihres Pyrimidinringes 5-Methylcytosin entsteht, erfolgt durch DNA-Methyltransferasen.

Als Methylgruppendonator und Co-Faktor der Reaktion fungiert hierbei S-Adenosylmethionin (SAM)<sup>10</sup>. CpG-Dinukleotide sind besonders häufig in repetitiven DNA-Sequenzen oder in CpG-Inseln anzutreffen. Während genomweit ca. 70% aller CpG-Dinukleotide methyliert sind, stellen CpG-Inseln eine Ausnahme dar<sup>63</sup>. Letztere sind häufig Teil der Promotorregionen von Genen und in der Regel unmethyliert. Methylierungen der Promotorregionen sind mit Gen-Silencing assoziiert.<sup>10</sup> Dies ist im Speziellen interessant, wenn durch in diesem Falle transkriptionellem Gen-Silencing die Expression von Tumorsuppressorgenen verhindert wird und so ein Tumor entstehen kann<sup>63</sup>.

Wie bereits erwähnt, können beim Glioblastom IDH1-Mutationen vorliegen.

Sie sind wahrscheinlich frühe Ereignisse in der Tumorgenese und verursachen DNA-Methylierungen<sup>66</sup>. Eine Studie von Figueroa et al. an Leukämie-Patienten beschreibt das durch das veränderte IDH1-Protein gebildete 2-Hydroxyglutarat als Ursache für eine allgemein hypermethylierte DNA mit spezifischen Methylierungsmustern<sup>18</sup>.

Dadurch kommt eine hohe Assoziation von IDH-Mutationen mit CpG-Insel-Methylierungen zustande, sodass IDH-mutierte Glioblastome auch Glioma CpG Island Methylator Phenotype (G-CIMP) genannt werden<sup>66,44</sup>.

Neben der Hypermethylierung existiert auch die Hypomethylierung, also eine Verminderung der anzutreffenden 5-Methylcytosin-Reste in der DNA. Diese wurde erstmals 1983 in einer Studie von Feinberg und Vogelstein bei Tumoren des Menschen beschrieben<sup>16</sup>. Sie ist häufig bei Tumoren unterschiedlicher Entitäten anzutreffen, kann zur Aktivierung von Onkogenen führen und verursacht eine Instabilität des Genoms. Cadieux et al. beschrieben diese auch als eine häufige epigenetische Veränderung beim Glioblastom<sup>9</sup>.

### 1.4. MGMT

Die MGMT ist ein DNA-Reparatur-Protein, kodiert vom MGMT-Gen auf Chromosom 10q26, welches die DNA vor dem Angriff durch O6-alkylierende Substanzen schützt. Es verhindert die

Bildung von O6-Methylguanin aus Guanin, indem es die Alkylgruppe vom Sauerstoff der DNA auf den eigenen Cytosin-Rest im aktiven Zentrum überträgt. MGMT wird daher auch O6-Alkyl-Guanin-Transferase, kurz AGT, genannt.

Im Anschluss an diese Reaktion wird die nun inaktivierte MGMT ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut<sup>62,77</sup>. Durch diese Eigenschaft kann eine MGMT somit nur einen einzigen Alkylrest entfernen. Das Ausmaß des Schutzes der DNA vor alkylierenden Substanzen beruht somit auf der Verfügbarkeit von MGMT-Proteinen innerhalb der Zelle sowie ihrer Resyntheserate<sup>30</sup>.

Methylierung von CpG-Inseln des MGMT-Promotors führt zum Gen-Silencing von MGMT<sup>73</sup>. Ist die Aktivität der MGMT gestört, können die durch Alkylanzien verursachten DNA-Schäden nicht mehr repariert werden und es kommt zur Apoptose der Zelle.

Eine Vielzahl von beim Glioblastom eingesetzten Chemotherapeutika sind selbst Alkylanzien, wodurch die Aktivität von MGMT einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie hat. Ein Tumor mit hoher MGMT-Aktivität hat somit eine hohe Resistenz gegen selbige Medikamente, was zum Therapieversagen führen kann<sup>19,27</sup>. Als wichtigste Substanzen sind hier Temozolomid und Carmustin sowie Nimustin, Lomustin und Procarbazin zu nennen. In einer Studie von Hegi et al. aus dem Jahr 2005 an Glioblastompatienten mit methyliertem MGMT-Promotor zeigte sich bei Gabe von Temozolomid zusätzlich zur Radiotherapie eine signifikante Verlängerung des Überlebens gegenüber Patienten, die mit alleiniger Radiotherapie behandelt wurden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Glioblastom-Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor behandlungsunabhängig eine verbesserte Prognose gegenüber Patienten mit nicht methyliertem Promotor aufweisen<sup>23</sup>.

## **1.5 RB1**

### **1.5.1 Two-Hit-Hypothese nach Knudson**

Alfred Knudson beschrieb 1971 nach Untersuchung von Retinoblastom-Patienten eine Hypothese zur Tumorentstehung aufgrund aufeinander folgender Mutationen der DNA.

Maligne Entartung ist das Ergebnis mehrerer Genveränderungen, welche zu Störungen des Zellzyklus, der Apoptose und der Intaktheit des Genoms führen<sup>56</sup>.

Jedes Gen des Menschen liegt in zwei Kopien, den sogenannten Allelen, auf homologen Chromosomen vor. Je eines wurde geerbt von väterlicher und eines von mütterlicher Seite, so auch bei Tumorsuppressorgen. Wird eine der beiden Genkopien inaktiviert, so wird durch das verbleibende funktionelle Allel noch genug Tumorsuppressorprotein hergestellt, um eine Tumorentstehung zu verhindern.

Im Falle von RB1 müssen nun also für eine Tumorentstehung beide Allele inaktiviert werden, da sonst noch genug pRB produziert wird und kein Tumor entstehen kann. Im Falle einer

Mutation oder Deletion beider Allele des RB1-Gens können zuerst Retinoblastome, woher auch der Name rührt, im Verlauf aber auch andere Tumoren entstehen.

Es gibt dabei zwei Arten der Tumorgenese. Bei der familiären Form des Retinoblastoms wurde bereits ein mutiertes/inaktives Allel von einem Elternteil geerbt (*1. Hit*). Der Tumor entsteht, sobald es ebenso zum Verlust des normal aktiven Allels kommt (*2.Hit*). Bei der familiären Form kommt es somit früh zur Tumorentstehung, ebenso liegen im Verlauf oft bilaterale/multiple Tumoren vor<sup>32</sup>.

Die spontane Tumorgenese beschreibt die zweite Möglichkeit. Hier bestehen anfangs zwei Wildtyp-Allele. Zur Tumorgenese notwendig ist somit eine Alteration mit Funktionsverlust beider Allele. Die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung ist damit weitaus geringer, die Tumoren entstehen später und ohne familiäre Häufung<sup>32</sup>.

### **1.5.2. RB1-Signalweg**

Das RB1-Gen ist ein auf Chromosom 13q14.1-q14.2 befindliches Tumorsuppressorgen<sup>61</sup>.

Es besteht aus 200kb DNA inklusive 27 Exons und codiert für das RB-Protein, kurz pRB, ein nukleäres, aus 928 Aminosäureresten bestehendes Phosphoprotein. Letzteres ist beteiligt an der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Einleitung der Apoptose<sup>56</sup>.

Es ist zusammen mit dem Retinoblastoma-Like-Protein 1 (RBL1, p107) sowie dem Retinoblastoma-Like-Protein 2(RBL2, p130) Teil der Pocket-Protein-Familie, welche durch Vorhandensein einer Bindetasche (engl. *pocket*) zur Bindung anderer Moleküle charakterisiert sind. Die Funktion von RB1 liegt in der Unterbrechung des Zellzyklus am Übergang der G1- in die S-Phase<sup>60</sup>.

Die Regulation der Aktivität von pRB erfolgt über dessen Phosphorylierungsstatus:

Während pRB in der G0- und der frühen G1-Phase unphosphoryliert vorliegt, wird es mit der Annäherung des Zellzyklus an den G1-S-Übergang phosphoryliert. Es verbleibt dann in diesem Zustand, bis es in der späten M-Phase wieder dephosphoryliert wird<sup>8</sup>.

Die Phosphorylierung geschieht durch den CDK4/Cyclin D1-Komplex, dessen Aktivität durch den p16INK4a-Cyclin-Kinase-Inhibitor kontrolliert wird<sup>42</sup>. pRB ist im dephosphoryliertem Zustand aktiv und kann dann die Transkription von zellzyklusfördernden Genen unterdrücken. Dies geschieht durch mehrere Mechanismen, welche jeweils spezifisch für den jeweiligen Promotor sind<sup>38</sup>. Zum einen konkurriert pRB mit für die Transkription wichtigen Faktoren um die gleiche Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors E2F1 und kann bei Bindung an Letzteren die Wirkung dieser Faktoren verhindern<sup>59</sup>. Der Transkriptionsfaktor E2F1 leitet die S-Phase des Zellzyklus durch Initiierung der Transkription von Genen ein, welche für die DNA-Synthese von Bedeutung sind. Zum anderen bilden pRB und E2F einen Komplex, welcher mit dem RB-Pocket an die Promotorsequenz der von E2F1-kontrollierten Genen binden kann und deren Transkription unterdrückt<sup>57</sup>.



Abgesehen von E2F1 kann pRB die Transkription von Zellzyklusgenen auch über Bindung und Aktivierung von Histon-Deacetylasen verhindern. Dies gelingt durch Deacetylierung von Histonen am Promotor und der daraus folgenden Formationsänderung des Chromatins<sup>38</sup>.

Fehlregulierungen von RB1 sind mit einer Vielzahl von Tumoren assoziiert. Neben dem Retinoblastom spielt es eine wichtige Rolle unter anderem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei Osteosarkomen, dem Mammakarzinom sowie den glialen Tumoren<sup>59</sup>. Der RB1-Signalweg ist eng mit dem p53-Signalweg verknüpft. Das p14ARF-Protein, welches MDM2 hemmt und somit dessen Blockade von p53 aufhebt, so dass dieses die Apoptose der Zelle einleiten kann, wird in seiner Aktivität von E2F reguliert<sup>6</sup>. Somit kann auch eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors E2F trotz seiner sonst gegenteiligen Wirkung den Zelltod herbeiführen<sup>42</sup>.

Des Weiteren wird das Protein P14<sup>ARF</sup> wie p16 vom Tumorsuppressorgen CDK2NA codiert. Dieses stellt ein Bindeglied der beiden Pfade dar. p16 bindet und hemmt CDK4 und CDK6 und blockiert somit den G1-S-Übergang. Liu et al. beobachteten, dass eine CDK2NA-Überexpression über eine Cyclin-D1-Hemmung das Wachstum von Gliom-Zelllinien hemmt. Ebenso beschrieben sie eine Assoziation einer verringerten Expression von CDK2NA mit einem höheren Malignitätsgrad und einer schlechteren Prognose bei Gliomen<sup>36</sup>.

Henson et al. entdeckten 1994, dass 30% aller malignen Astrozytome einen Verlust der Heterozygotie (LOH) des RB1-Gens vorwiesen, während dies bei niedriggradigen Astrozytomen nicht zu beobachten war. Ein Funktionsverlust von RB1 trägt somit zum Upgrading von niedrigmalignen zu hochmalignen Astrozytomen bei<sup>24</sup>.

Eine Veränderung des CDKN2A- oder RB1-Gens durch Mutationen oder LOH ist bei Glioblastomen sehr häufig zu finden, in den meisten Fällen ist dabei nur eines der Gene betroffen<sup>69,28</sup>.

64% der 120 Glioblastomfälle einer Studie von Ichimura et al. wiesen Genveränderungen auf, welche eine Störung der Kontrolle des Zellzyklus am G1-S-Übergang bedingten. Weitere 30% wiesen den Verlust eines Allels des CDKN2A- oder RB1-Gens auf, in nur 6% der Fälle waren beide Gene unverändert. Veränderungen des CDKN2A-Gens waren mit 40% aller Glioblastome recht häufig anzutreffen, in 14% der Fälle war das RB1-Gen verändert<sup>28</sup>.

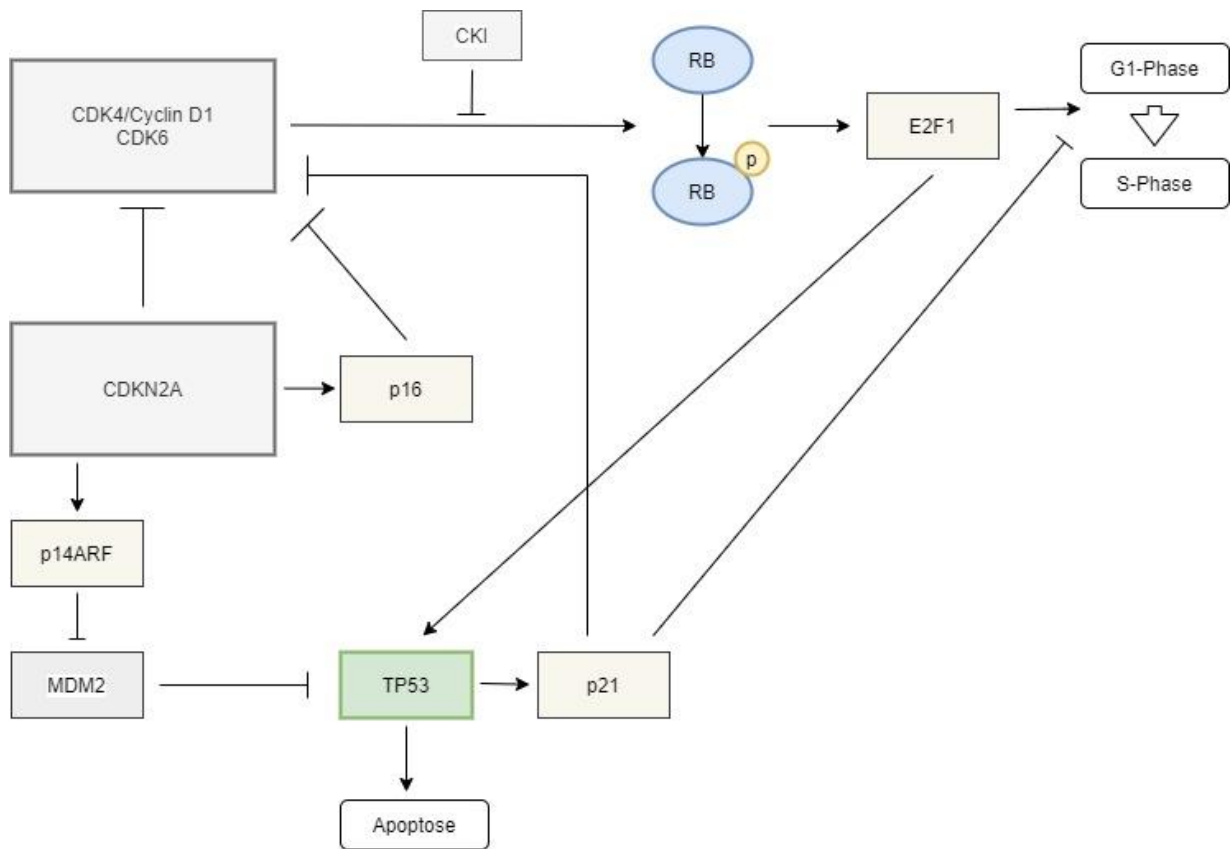


Abb. 3: RB1-Signalweg – gebräuchliches Schema

## **2. Zielsetzung der Studie**

Das Glioblastom ist eine der bösartigsten neoplastischen Erkrankungen, die beim Menschen bekannt sind. Trotz Fortschritten im Bereich der Diagnostik und Therapie gelang bislang kein entscheidender Durchbruch, welcher das Überleben in weitreichendem Maße verlängern konnte. Die Prognose des Glioblastoms ist nach wie vor sehr schlecht, eine Heilung unmöglich. Das RB1-Gen ist seit längerer Zeit bekannt und spielt eine wichtige Rolle bei einer ganzen Reihe von Tumorerkrankungen. Auch seine Rolle beim Glioblastom wurde bereits in einigen Studien untersucht. RB1 ist als Tumorsuppressorgen im Rahmen seines Signalweges mit einer Vielzahl von anderen Genen und Faktoren komplex verbunden, auch beim Glioblastom spielen Modifikationen des RB1-Signalweges eine wichtige Rolle.

Speziell die Rolle der Methylierung des RB1-Promotors beim Glioblastom ist bislang umstritten. In der Literatur finden sich hierzu teils gegensätzliche Aussagen. Es wurden mehrere kleinere, teilweise ältere Studien durchgeführt, welche unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Zudem lag jeweils die vorherige Version der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2007 zugrunde. Als erste Studie zu diesem Thema sollte die Klassifikation der eingeschlossenen Glioblastome gemäß der aktuellen Version von 2016 erfolgen. Unsere Intention war es, ein möglichst großes Kollektiv von Glioblastom-Patienten zu untersuchen und dieses bezüglich der Eigenschaften mit Patientenkollektiven publizierter Studien zum GBM zu vergleichen, um eine allgemeingültige Aussage bezüglich des GBM zu tätigen.

Ziel unserer Studie war es, unter Einschluss der bislang größten Fallzahl bei einem klar definierten Kollektiv von primären Glioblastomen und unter Verwendung der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016, eine klare Aussage über die Relevanz der RB1-Methylierung beim Glioblastom zu formulieren und etwaige Auswirkungen der Methylierung auf klinische Parameter zu evaluieren.

### **3. Material und Methoden**

Im folgenden Abschnitt werden Ihnen Material und Methodik ausführlich dargelegt. Nach kurzer Übersicht über die eingeschlossenen Patienten folgt eine Beschreibung des experimentellen Ablaufes, welcher mit der DNA-Isolation inklusive deren Konzentrationsbestimmung beginnt, auf welche die Bisulfit-Konvertierung folgt, an die sich die MS-PCR anschließt. Daraufhin erläutert werden die Agarose-Gelelektrophorese sowie die IDH1-Immunhistochemie. Das Kapitel schließt mit der Darlegung der statistischen Methoden.

#### **3.1 Patienten**

Untersucht wurden die Tumoren von 85 Patienten mit der Diagnose GBM (WHO Grad IV), die in der Zeit von 2003 bis 2013 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes operiert wurden. Die Tumorproben wurden direkt nach Entnahme des Tumors in Kryo-Tubes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Alle Patienten wurden nach dem Therapiekonzept von Stupp et al., dem sogenannten Stupp-Schema, behandelt.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes liegt vor (92/16).

#### **3.2 DNA-Isolation**

Das Tumorgewebe wurde in eine sterile Petrischale überführt und zerkleinert, wofür Pinzette und Schere verwendet wurden. Anschließend wurde 4,5 ml SE-Puffer (siehe Pufferverzeichnis) in die Petrischale pipettiert und somit das Tumorgewebe in der Flüssigkeit emulgiert. Dieses Gemisch konnte daraufhin unter Nutzung einer Pipette in ein 50 ml Falcon überführt werden. Es folgte die Zugabe von 0,5 ml 10% SDS (siehe Pufferverzeichnis) mit einem pH-Wert von 8,0. Zusätzlich wurde nun eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben. Das Falcon mit den Inhaltsstoffen wurde nun für 1-3 Tage ins Schüttelbad bei  $55^{\circ}\text{C}$  gestellt, wobei die Probe täglich kontrolliert wurde und jeweils eine weitere Spatelspitze Proteinase K hinzugefügt wurde. Die Probe wurde weiterverarbeitet, sobald eine klare Lösung entstanden war, welche keine makroskopisch sichtbaren Gewebereste mehr enthielt. Nach diesem Schritt folgte die Aufarbeitung der DNA.

Die Zentrifuge wurde auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt und es wurden zwei weitere 50 ml Falcons bereitgelegt. Nun wurde das Falcon mit der hergestellten Lösung aus dem Schüttelbad entnommen.

In dieses Falcon wurde nun vorsichtig unter langsamem Bewegen 2 ml 6-molare, warme NaCl-Lösung hinzugefügt. Daraufhin wurden 7 ml Chloroform hinzugegeben und das Gemisch über 1 Stunde überkopf schütteln gelassen. Sobald dieser Schritt abgeschlossen war, wurde das Falcon in die Zentrifuge gegeben und 1 Stunde bei 2500 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

Nach Abschluss der Zentrifugation hatten sich drei Phasen gebildet, von denen nur die oberste, wässrige Phase abpipettiert wurde und in ein neues Falcon überführt wurde. Kontakt mit der Interphase musste dabei vermieden werden, diese sowie die unterste Phase wurden verworfen. Der übernommene Überstand im neuen Falcon wurde nun mit 7 ml Chloroform versetzt und das Gemisch für eine Stunde überkopf geschüttelt. Daraufhin folgte ein weiterer Zentrifugationszyklus für 1 Stunde bei 4000 rpm und 4°C.

Der Überstand nach Abschluss der Zentrifugation wurde abermals in ein neues Falcon überführt.

Hier wurde nun -20°C kaltes Isopropanol in gleichem Volumen wie das Volumen im Falcon hinzugefügt und das Falcon vorsichtig hin- und herbewegt. Diese sollte nun zum Ausfällen der DNA in Form eines Knäuels führen.

Es wurde nun ein mit 1 ml 70 % -20°C EtOH befülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß bereitgestellt, in welches das Knäuel übertragen wurde und bei 4°C für mindestens 30 Minuten gewaschen wurde.

Das EtOH konnte nun dekantiert oder nach einer weiteren Zentrifugation mit 2000 rpm bei 4°C entfernt werden. Die DNA wurde nun für 30 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet und daraufhin volumenadaptiert mit, zwischen 50 µl und 500µl, Aqua destillata versetzt und über Nacht bei 4°C gelöst.

Nun konnte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration durchgeführt werden.

War es nicht zum Ausfallen eines Knäuels gekommen, wurde die Lösung für weitere 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und verworfen.

Es folgte die Zugabe von 400µl 1x TE-Puffer pH 7 und das Lösen des selbigen bei 65°C für 20 Minuten im Wasserbad. Daraufhin wurde 40 µl 3-molares Natriumacetat sowie 800 µl 100% EtOH hinzugegeben und die Inhaltsstoffe über Nacht bei -20°C gelöst. Hierunter fällt ein Knäuel aus, welches in ein mit 1ml 70% -20°C kaltem EtOH befülltem Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Auf ein einstündiges Waschen bei 4°C folgte eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 14000 rpm und ebenfalls 4°C. Sobald diese abgeschlossen war, wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und die sich am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche DNA für 30 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet. Wie im oben beschriebenen Fall wurde auch hier Aqua destillata je nach Größe des Pellets angepasst hinzugefügt, die DNA über Nacht bei 4°C gelöst und daraufhin eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

### **3.3 Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Messung der Konzentration der im vorigen Schritt isolierten DNA wurde mittels des NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometers des Herstellers Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Das Spektroskop stellt dabei den Wellenlängenbereich von 190-840 nm dar.

Hierbei wurde vor Messung der Probe ein Blank (Leerprobe) mit 1,5 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt. Nach jedem Blank wurde ein Re-Blank durchgeführt, welcher als Referenzwert für die anschließende Konzentrationsmessung verwendet wurde.

Für die Konzentrationsmessung wurden je 1,5 µl der isolierten DNA verwendet und das Ergebnis mithilfe der Nano-Drop-Software ausgewertet.

Zur Qualitätskontrolle der Proben und Ausschluss einer Kontamination wurde außerdem eine Bestimmung des A260/A280-Quotienten durchgeführt. Hierbei wird das Absorptionsspektrum bei 260 nm Wellenlänge mit dem bei 280 nm Wellenlänge verglichen. Eine ausreichende Qualität und Reinheit der Proben war bei Ergebnissen im Bereich von 1,9-2,1 gegeben.

Zusätzlich zur Berechnung des Quotienten wurde die graphische Darstellung des Spektrums im Diagramm zum Ausschluss von Verunreinigungen mit beispielsweise Proteinen herangezogen, wobei nur ein einziger Peak im Diagramm sichtbar sein sollte.

### **3.4 Bisulfit-Behandlung**

#### **3.4.1 Theorie**

Die Bisulfit-Behandlung ist ein von Frommer et al. entwickeltes Verfahren zur Detektion von methylierten Cytosin-Basen in der DNA. Die Behandlung mit Natriumbisulfit (=Natriumhydrogensulfit= $\text{NaHSO}_3$ ) führt zur Umwandlung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt<sup>20</sup>.

Im ersten Schritt wird dabei durch Erhitzung eine Denaturierung der DNA erreicht.

Es kommt nun unter sauren Bedingungen zur Anlagerung von Bisulfit an die 5-6-Doppelbindung des Cytosins, dessen C6-Atom dabei sulfoniert wird. Daraufhin folgt die hydrolytische Desaminierung am Kohlenstoffatom C4, sodass im letzten Schritt unter alkalischen Bedingungen durch Entfernung der Sulfonatgruppe schließlich Uracil entsteht.

5-Methylcytosin ist hingegen resistent gegen die Desaminierung und bleibt somit unverändert, was die spätere Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Genabschnitten ermöglicht.

Die Reaktion ist einzelstrangspezifisch, die Regulation erfolgt durch die Bisulfitkonzentration, die Temperatur sowie den pH-Wert.

In Folge der Reaktion ist die Komplementarität der beiden DNA-Einzelstränge zueinander nicht mehr gegeben, was die Verwendung unterschiedlicher Primer in der folgenden Amplifikation per Polymerasekettenreaktion notwendig macht<sup>12</sup>.

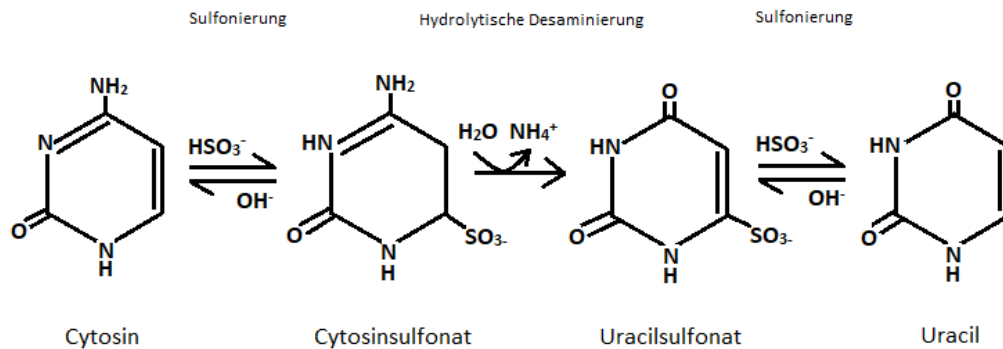


Abb. 4: Bisulfit-Konvertierung 1

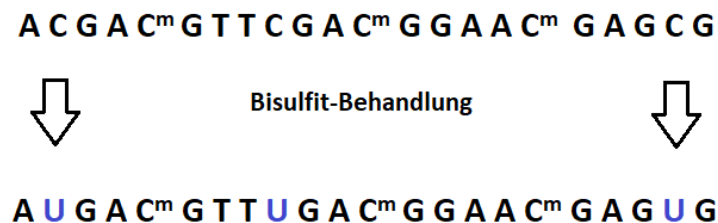


Abb. 5: Bisulfit-Konvertierung 2

### 3.4.2 Praktischer Teil

Die Bisulfit-Behandlung wurde mit dem EZ DNA Methylation Gold Kit des Herstellers Zymo Research durchgeführt.

Für die Verwendung des Kits musste zunächst noch die DNA-Probe auf eine Konzentration von 25 ng/ $\mu\text{l}$  gebracht werden.

Der erste Schritt der Bisulfit-Behandlung beinhaltete die Herstellung der CT-Conversion Reagent-Lösung:

Hierbei mischte man das CT-Conversion-Agent mit 900µl Aqua destillata, 300µl M-Dilution Buffer und 50µl M-Dissolving Buffer. Die Bestandteile wurden mit dem Vortexmischer gründlich durchmischt, bis alles komplett gelöst und die Lösung geklärt war.

Es folgte nun die Befüllung eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes mit 130µl des CT-Conversion Reagent sowie 20µl der jeweiligen DNA-Probe, daraufhin eine kurze Zentrifugation. Das Gefäß wurde nun in den PTC-100 Thermal Cycler der Firma MJ Research eingebracht und unter folgenden Temperaturen weiterverarbeitet:

*Tab. 1: Durchführung der Bisulfit-Konvertierung im Thermal Cycler*

Step 1	98°C	10 Minuten
Step 2	64°C	150 Minuten
Step 3	4°C	Lagerung (bis 20 Stunden)

Es wurde nun das im Kit befindliche, aus einem Filterteil und einem Auffanggefäß bestehende Filtergefäß verwendet und 600µl M-Binding Buffer hinzugefügt. Anschließend wurde die im vorherigen Schritt hergestellte Probe ebenfalls in das Filtergefäß pipettiert und dieses invertiert.

Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 Sekunden. Daraufhin wurde die unten im Gefäß angesammelte Flüssigkeit abgeschüttet. Es wurde nun 100µl M-Wash Buffer hinzugefügt und nochmals für 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 200µl M-Desulphonation Buffer. Das Gemisch wurde bei 20-30°C für 20 Minuten inkubiert, woraufhin eine 30-sekündige Zentrifugation bei 14000 rpm folgte und das Auffanggefäß abermals geleert wurde. Darauffolgend wurde 200µl M-Wash Buffer hinzugefügt und abermals für 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal ausgeführt. Der Filterteil des Filtergefäßes wurde nun vorsichtig von dem Auffanggefäß getrennt und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eingebracht. Das Auffanggefäß konnte abgeworfen werden. Man fügte nun 10µl M-Elution Buffer, alternativ auch Aqua destillata, hinzu und zentrifugierte ein letztes Mal für 30 Sekunden bei 14000 rpm.

Die behandelte DNA befand sich nun am Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes, der Filter konnte abgeworfen und die DNA bei -20°C eingefroren werden.



### 3.5 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Nachdem bei der im vorherigen Schritt durchgeführten Bisulfit-Behandlung je nach Methylierungsstatus unterschiedliche Produkte entstanden sind, wurde nun eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Diese ist ein Verfahren zur Analyse des DNA-Methylierungsstatus in CpG-Inseln.

Die Methode wurde 1996 von Herman et al. entwickelt<sup>25</sup>. Die MS-PCR ist ein enzymbasiertes Verfahren zur Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen. Verwendet werden neben der Taq-Polymerase und dNTPs zwei Paare von Primern. Primer sind Oligonukleotide, welche an ihrem 3'-OH-Ende eine Hydroxygruppe besitzen, die der Polymerase als Startpunkt für die Replikation dient. Die Besonderheit der MS-PCR liegt darin, dass hier, im Gegensatz zur klassischen PCR, zwei Paare von Primern statt einem eingesetzt werden.

Das erste Primerpaar ist zur Amplifikation der DNA-Sequenz eines methylierten RB1-Promotors vorgesehen. Es besteht aus einem Primer für den DNA-Leitstrang(forward) und einem Primer für den DNA-Folgestrang(reverse) und ist komplementär zu der jeweiligen Nukleotidsequenz, welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt des RB1-Promotors flankiert. Das zweite Primerpaar dient entsprechend hierzu zur Amplifikation des DNA-Abschnitts eines unmethylierten RB1-Promotors. Zur Analyse des Methylierungsstatus einer Tumorprobe ist es notwendig, jeweils zwei PCR-Ansätze mit Tumor-DNA anzulegen. In jeden Ansatz wird eines der beiden Primerpaare hinzugefügt, sodass sich je nach vorliegendem RB1-Promotormethylierungsstatus der Tumorprobe die jeweilig passenden Primer an die DNA anlagern können. Folglich kommt es zur Amplifikation der DNA in einem der beiden Ansätze.

Zusätzlich wurden drei Kontrollen durchgeführt, eine Positivkontrolle, welche methylierte DNA der Firma Zymo Research enthielt, sowie eine Negativkontrolle, hier wurde die unmethylierte DNA eines männlichen Spenders verwendet. Als letzte Kontrolle diente die Verwendung von destilliertem Wasser dem Test des Mastermix auf Verunreinigung.

Die Sequenzen der verwendeten Primer bei der MS-PCR des RB1-Gens entsprechen denen, welche von van Tilborg et al. 2006 in deren Studie genutzt wurden<sup>68</sup>:

Methylated (forward):	GGGAGTTTCGCGGACGTGAC
Methylated (reverse):	ACGTCGAAACACGCCCCG
Unmethylated (forward):	GGGAGTTTTGTGGATGTGAT
Unmethylated (reverse):	ACATCAAAACACACCCCA

Jeder PCR-Ansatz bestand aus je 23µl Mastermix und 2µl DNA in einem Eppendorf-PCR-Gefäß. Der Mastermix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 2: Bestandteile des PCR-Mastermix

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Destilliertes Wasser	17,8µl
taq-Puffer	2,5µl
Primer forward(m/u)	1µl
Primer reverse(m/u)	1µl
dNTP(10mM)	0,5µl
taq-Polymerase	0,2µl
	=23µl

Jeder PCR-Ansatz wurde invertiert, für 4 Sekunden zentrifugiert und anschließen in den Thermal Cycler eingebracht (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Folgende Schritte wurden durchgeführt:

Tab. 3: Zeitlicher Ablauf der MS-PCR

Schritt 1	95°C	15 min
Schritt 2	95°C	45 s
Schritt 3	55°C	45 s
Schritt 4	72°C	1 min
35 Zyklen der Schritte 2-4		
Schritt 5	72°C	10 min
Schritt 6	4°C	Lagerung; bis zu 48 h

Es wurde eine Hot-Start-PCR durchgeführt. Hierbei ist im ersten Schritt eine Erhitzung der Proben für 15 Minuten auf 95°C zur Aktivierung der Polymerase notwendig. Damit soll eine Amplifikation unspezifischer Produkte von Primern und DNA beziehungsweise anderen Primer verhindert werden.

Im zweiten Schritt kommt es jeweils durch Erhitzen auf eine Temperatur von 95°C zu einer Denaturierung der DNA. Dies bedeutet eine Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen.

Es folgt im dritten Schritt die sogenannte Primerhybridisierung. Sie bezeichnet die Anlagerung der Primer an die für sie komplementären DNA-Abschnitte.

Dies erfolgt bei einer Temperatur von 55°C.

Im vierten Schritt, der Elongation, wird durch die taq-Polymerase aus dem Einzelstrang mit angelagertem Primer wieder ein Doppelstrang hergestellt, beginnend am 3'-Ende des Primers

durch Anlagerung der dNTPs. Dies geschieht bei einer Temperatur von 72°C, was dem Temperaturoptimum der taq-Polymerase entspricht.

Es werden 35 Zyklen der Schritte zwei bis vier durchgeführt, um eine ausreichende Amplifikation der DNA zu ermöglichen.

Abschließend werden die Proben auf 4°C gekühlt und können nun gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Die Schritte sind in Abb. 6 nochmals schematisch dargestellt.

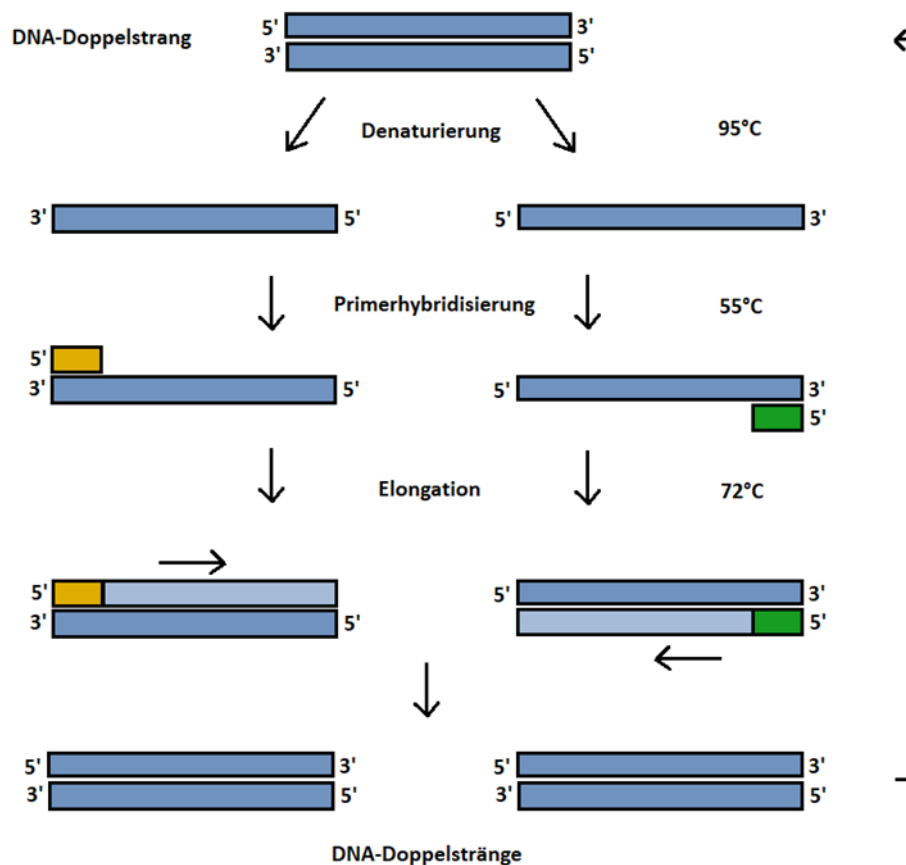


Abb. 6: Schematischer Ablauf der MS-PCR

### 3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe in einem Agarose-Gel unter Anlegung einer elektrischen Spannung.

Größere DNA-Stränge wandern hierbei weniger weit als kleine, wodurch die Länge durch Abschätzung unter Einsatz einer vorgegebenen DNA-Leiter bestimmt werden kann.

Der Polymerasekettenreaktion folgend konnte nun also bestimmt werden, ob die DNA-Stränge im Ansatz für das methylierte oder im Ansatz für das unmethylierte RB1-Gen amplifiziert wurden.

Es wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 2,5% gegossen.

Zunächst wurden 100ml TBE-Puffer (1x) in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 3,75g Agarose versetzt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollkommen im TBE-Puffer aufgelöst hatte. Dies war durch das Entstehen einer klaren Lösung erkennbar. Es wurde nun verdunstetes Aqua destillata ersetzt sowie weitere 50ml TBE-Puffer hinzugefügt. Anschließend kühlte das Gel auf eine Temperatur von 50°C ab. Im folgenden Schritt wurden 10µl Ethidiumbromid mit Hilfe einer Pipette dem Gel hinzugefügt.

Ethidiumbromid ist ein DNA-bindender Farbstoff, der unter UV-Licht mit Hilfe einer Kamera mit UV-Filter die im Gel gewanderten DNA-Stränge sichtbar machen kann.

Das Gel konnte nach abermaligem Schwenken nun in die Elektrophoresekammer eingefüllt werden. In diese war vorab ein Kamm zur Bildung der entsprechenden Geltaschen eingesetzt worden, etwaige Luftblasen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze aus dem Gel gestrichen. Letzteres kühlte nun 30 Minuten ab und wurde dabei fest, der Kamm konnte nun entfernt werden.

Es folgte die Herstellung einer DNA-Leiter zur Zuordnung der Banden. Die Leiter setzte sich hierbei folgendermaßen zusammen:

1,5µl 50 bp DNA-Ladder  
3µl Loading Dye (= Ladepuffer)  
12µl Aqua destillata

Das Agarosegel in der Elektrophoresekammer wurde nun mit 1x TBE-Puffer überdeckt, der Kamm herausgezogen und 4µl Ladepuffer jeder DNA-Probe hinzugefügt.

Die Proben konnten anschließend in die Geltaschen eingebracht werden.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde nun für zwei Stunden ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 135V und einer Stromstärke von 260 mA angelegt.

### **3.7 IDH1-Immunhistochemie**

Zur Bestimmung des IDH1-Mutationsstatus wurde die indirekte, zweistufige Antikörpermethode unter Verwendung eines IDH1 R132H-Primärantikörpers, welcher die häufigste IDH1-Mutation R132H nachweisen kann, verwendet. Im Falle der hier gewählten indirekten Methode bindet der primäre Antikörper das Antigen und wird dann wiederum vom sekundären Antikörper gebunden. Da mehrere sekundäre Antikörper einen primären Antikörper binden können, kommt es zur Signalverstärkung. Das hier verwendete Dako Real Envision-Nachweisreagenz besteht aus einem Dextran-Rückgrat, an das die sekundären Antikörper sowie mehrere Moleküle der Meerrettichperoxidase(HRP) gebunden sind. Letztere katalysieren die Reaktion bei Zugabe des DAB+ Chromogen-Wasserstoffperoxidpuffer-Gemisches, in welcher Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase umgesetzt und dabei

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB+) oxidiert wird. Dieses wird somit bei Vorliegen eines mutierten IDH1 durch eine Braunfärbung an der Nachweisstelle sichtbar.

Die abschließende Hämatoxylin-Gegenfärbung dient der Darstellung der Zellkerne durch Blaufärbung.

Die Bestimmung des IDH1-Status erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Verwendet wurden Leerschnitte aus Paraffinblöcken der jeweiligen Tumoren, welche im Archiv des Instituts für Neuropathologie gelagert werden. Diese mussten zunächst zur Anwendung der Immunhistochemie durch Entfernung des Einbettungsmediums entparaffiniert und anschließend rehydriert werden.

Dafür wurde zuerst Xylol sowie anschließend eine absteigende Alkoholreihe verwendet, in welche die Objektträger nacheinander eingebracht wurden. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

*Tab. 4: Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der Objektträger*

Xylol	3x5 Minuten
100% Ethanol	2x2 Minuten
90% Ethanol	2 Minuten
80% Ethanol	2 Minuten
70% Ethanol	2 Minuten
Aqua destillata	bis zur Weiterverarbeitung

Es folgte nun im nächsten Schritt die sogenannte Peroxidase-Blockierung mit Wasserstoffperoxid. Dieser Schritt ist notwendig zur Blockade der gewebeeigenen endogenen Peroxidase, welche sonst eine interferierende, unspezifische Hintergrundfärbung des Präparats verursachen kann. Die Objektträger wurden dafür für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer 3% Lösung aus 300ml Aqua destillata und 10 ml Wasserstoffperoxid inkubiert. Es folgte eine ausgiebige Spülung mit Aqua destillata.

Im Anschluss wurde die Antigen-Demaskierung der zu untersuchenden Schnitte durchgeführt. Die Epitope der Antigene in paraffiniertem Gewebe können beim Fixierungsprozess durch Strukturveränderungen und Vernetzungen der Proteine maskiert und somit nicht mehr vom zugehörigen Antikörper erkannt werden. Die Antigen-Demaskierung dient der Freilegung der Epitope und Wiederherstellung der Immunreaktivität des Gewebes, sodass darauffolgend die Applikation und Bindung der Antikörper erfolgen kann. Verwendet wurde hier die hitzebasierte Methode zur Antigen-Desmaskierung (Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)). Die dafür in einen leicht alkalischen (pH 9) TRIS-Puffer eingetauchten Objektträger wurden für 15 Minuten in einem Philips Dampfkochtopf gegart, anschließend ließ man sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen.

Daraufhin wurde 4 mal mit Aqua destillata sowie abschließend einmal mit TRIS-Puffer (10%) gespült. Die Objektträger wurden nun auf sogenannte Coverplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgebracht, sodass eine darauffolgende Verteilung des Antikörpers über den kleinen Spalt zwischen Coverplate und Objektträger optimal erfolgen kann und damit der gesamte Schnitt mit Antikörpern bedeckt ist. Das mögliche Auftreten von Luftblasen musste dabei verhindert werden. Vor Zugabe der Primärantikörper wurde eine Durchlauf-Kontrollspülung mit TRIS-Puffer durchgeführt. Die Primärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Hierzu mischte man pro Objektträger 100µl der Antikörperverdünnungslösung Dako Real® Antibody Diluent mit 2µl des Antikörpers mit der Bezeichnung Anti-Human IDH-1R132H.

In jedes Coverplate wurde nun 100µl der Lösung eingebracht und diese für 45 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt. Es folgte eine dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer.

Der nächste Schritt beinhaltete das Einbringen des sekundären Antikörpers, welcher an die dafür passende Bindungsstelle des Primärantikörpers bindet. Verwendet wurde der im Envision Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Nachweisreagenz vorliegende, in Ziegen gezüchtete Antikörper der Dako Deutschland GmbH. Hierbei wurden jeweils 100µl dieses Nachweisreagenz pro Coverplate verwendet, eine Verdünnung war hierbei nicht notwendig, da der Antikörper bereits in Pufferlösung gebrauchsfertig vorliegt. Anschließend wurden sämtliche Coverplates nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Darauffolgend wurde auch hier dreimal mit TRIS-Puffer nachgespült.

Man entfernte anschließend die Objektträger aus den Coverplates und platzierte sie in eine Feuchtkammer.

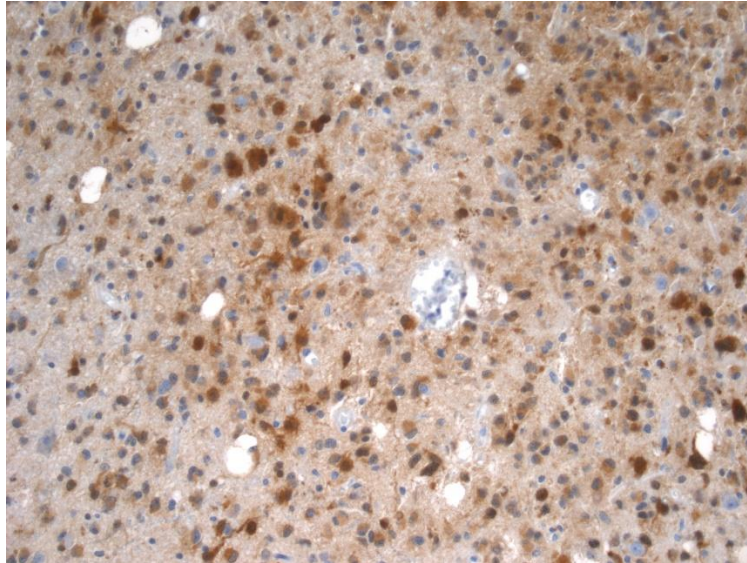
Es wurde nun mithilfe einer Pipette 200µl DAB-Substrat auf jeden Objektträger aufgebracht. Das DAB-Substrat besteht aus einer Lösung von 25µl Dako REAL™ DAB+ Chromogen(50x), einem 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in Lösungsmittel gelöst, 1:40 verdünnt in 1ml DAB-Substratpufferlösung (Dako REAL™ Substrate Buffer).

Nach 10 Minuten war unter Beobachtung der Farbtintensität ein Entnehmen der Objektträger aus der feuchten Kammer möglich.

Abschließend wurden diese noch mehrmals in der Küvette mit Aqua destillata gespült.

Zur Sichtbarmachung der Kerne erfolgte außerdem eine HE-Gegenfärbung, indem man die Objektträger für 20 Sekunden in Hämatoxylin tauchte, kurz mit Aqua destillata spülte und anschließend für 3 Minuten unter laufendem Leitungswasser bläuen lies. Darauf folgte je ein kurzes Eintauchen der Objektträger in die Küvetten einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%-80%-90%-100% und letztlich zwei aufeinanderfolgende zweiminütige Xylolbäder.

Abschließend wurde der gefärbte Schnitt mit Entellan eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Nach zehnminütigem Trocknen im Wärmeschrank bei 80°C konnte der Objektträger mikroskopiert und der IDH1-Status festgestellt werden.



*Abb. 7: Immunhistochemie, IDH1 R132H mutiertes  
Glioblastom,  
200-fache Vergrößerung*

Es wurde zur Kontrolle der Aussagekraft der Immunhistochemie außerdem eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der auf die IDH1-Mutation zu untersuchenden Schnitte angefertigt und mikroskopiert. Die wie bei der Immunhistochemie entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden dabei zur Kernfärbung für 8 Minuten in eine Küvette mit Mayers Hämalaunlösung eingestellt und anschließend mit Aqua destillata abgespült. Differenziert wurde über das dreimalige Schwenken der Objektträger in einer Lösung aus Salzsäure und Alkohol.

Die Schnitte wurden nun unter laufendem Leitungswasser für fünf Minuten gebläut und anschließend wieder mit Aqua destillata abgespült.

Es schloss sich die fünfminütige Gegenfärbung mit Eosin an. Nach nochmaligem Abspülen wurden die Schnitte zur Entwässerung einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt.

Die Präparate wurden nun noch zweimal für jeweils zwei Minuten in mit Xylol gefüllten Küvetten geklärt, ehe sie mit Entellan eingedeckt wurden. Nach mehrminütigem Trocknen im Wärmeschrank konnten die Schnitte mikroskopiert werden.

### **3.8 Statistische Methoden**

Die statistische Datenanalyse führten wir mit der R-Software durch ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Zur Überprüfung von Abhängigkeiten wurde die Analyse der Daten mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse sowie der Cox-Regressionsanalyse gewählt.

Das Konfidenzintervall legten wir auf 95% fest, das Signifikanzniveau auf  $\alpha < 0,05$ .

## **4. Ergebnisse**

Im folgenden Kapitel werden Ihnen die in der vorliegenden Arbeit erworbenen Ergebnisse detailliert dargestellt. Zunächst erfolgt dabei der deskriptive Abschnitt mit Präsentation der Ergebnisse der RB1-Methylierungsanalyse, woran sich eine Übersicht über die untersuchten Patienten anschließt. Daraufhin werden die Resultate der MGMT-Methylierungsanalyse und der Analyse des IDH1-Mutationsstatus präsentiert. Es folgt die Auswertung der Überlebenszeitdaten, welche spezifisch die Faktoren Alter, IDH1-Mutationsstatus, MGMT-Methylierungsstatus sowie Karnofsky-Index abhandelt. Der Ergebnisteil endet mit einer kasuistischen Darstellung des Patientenfalles mit RB1-Promotormethylierung.

### **4.1 Deskriptiver Abschnitt**

In dieser Studie erfolgte eine Methylierungsanalyse des RB1-Gens an den Glioblastomen von 85 Patienten. Die Einschlusskriterien der Studie umfassten Patienten mit de-novo-Glioblastom, die am Universitätsklinikum des Saarlandes operiert wurden und bei denen Tumormaterial vorlag.

Es wurde eine DNA-Isolation aus der kryokonservierten Tumorprobe durchgeführt, an welche sich eine Bisulfit-Konvertierung und anschließend eine methylierungsspezifische PCR angeschlossen haben. Ausgewertet wurden die Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese unter Verwendung eines 3%-Agarosegels, welches unter UV-Licht begutachtet wurde.

Von den 85 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung (12/2019) 84 Patienten an der Krankheit gestorben, während ein Patient (Patient 79) am Leben und tumorfrei war.



## 4.2 Ergebnisse der RB1-Methylierungsanalyse

Die Länge der PCR-Produkte für den methylierten und den unmethylierten Ansatz beträgt 172 Basenpaare. Die Banden im Gel sind somit zwischen der 150bp-Bande und der 200bp-Bande der DNA-Leiter zu erwarten.

Die RB1-Methylierungsanalyse ergab ein positives Resultat für eine Methylierung bei Patient 79. Eine RB1-Methylierung ist somit bei 1/85 Patienten gefunden worden, was 1,18% der Population entspricht. Dieser Patient ist zugleich der einzige Überlebende der Studie.

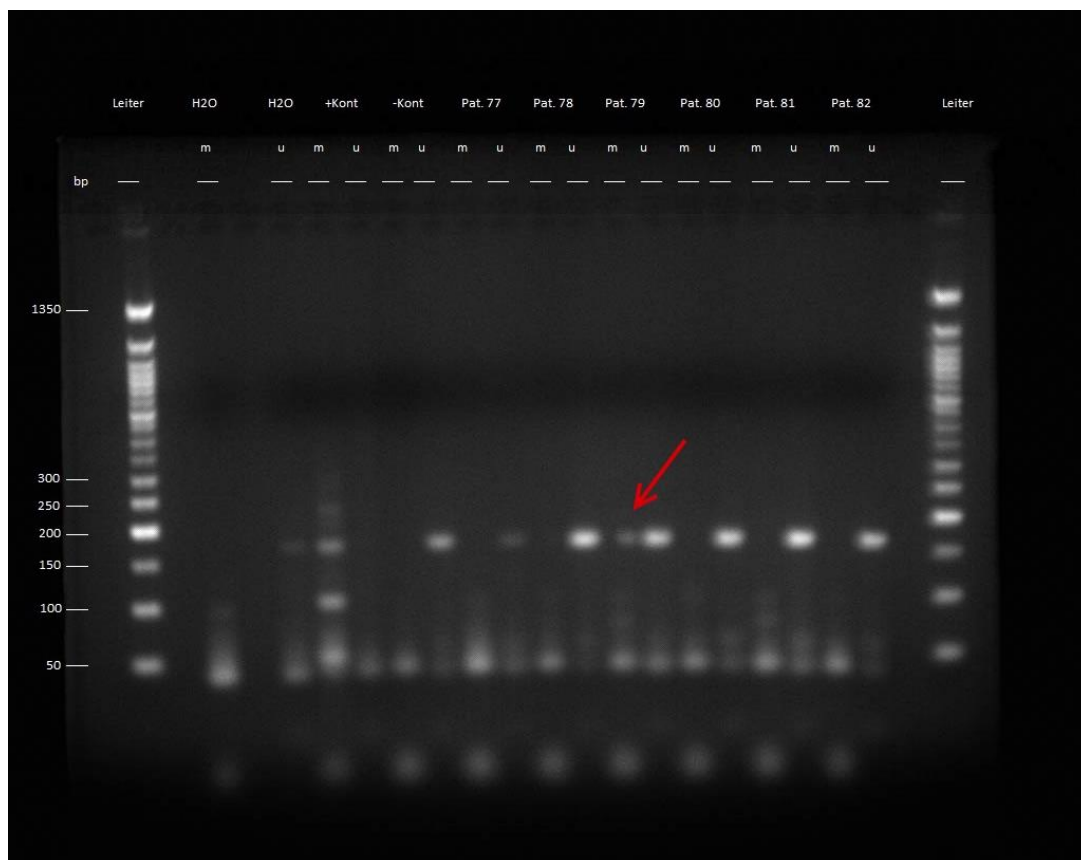


Abb. 8: Gelelektrophorese (Pfeil zeigt methyliertes Produkt)

Abb. 8 zeigt die Auswertung der Gelelektrophorese der Tumorproben der Patienten 77 bis 82. Im Folgenden bietet Tabelle 5 eine Übersicht über die untersuchten Patienten.

Tab. 5: Ergebnisse der Studie

Patient	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose [Jahre]	Gesamt- überleben [Monate]	Progressionsfreies Überleben [Monate]	IDH1- Mutations- status	MGMT- Methylierungs- status	RB1- Methylierungs- status
1	w	81,09	0,92	0,92	0	0	0
2	m	80,14	2,63	2,63	0	1	0
3	m	75,54	1,05	1,05	0	1	0
4	w	72,82	22,09	16,11	0	1	0
5	w	69,80	1,68	1,12	0	1	0
6	w	69,45	9,90	8,05	0	1	0
7	w	52,41	20,12	11,54	0	1	0
8	w	52,24	25,84	8,71	1	0	0
9	w	39,49	18,12	10,55	0	0	0
10	m	74,87	7,00	4,83	0	0	0
11	m	72,14	2,47	2,47	0	0	0
12	m	69,50	21,24	8,78	0	1	0
13	m	63,10	5,79	4,37	0	0	0
14	m	53,60	62,04	50,14	0	0	0
15	m	57,93	11,21	9,24	0	1	0
16	m	55,88	16,73	4,80	0	0	0
17	m	52,38	16,70	12,16	0	0	0
18	m	52,72	42,48	16,80	0	1	0
19	m	45,59	12,16	4,08	0	0	0
20	m	43,54	5,65	5,65	1	0	0
21	m	44,54	28,14	16,47	0	0	0
22	w	54,08	69,83	39,52	0	1	0
23	m	67,05	3,78	3,78	0	0	0
24	m	71,00	1,08	1,08	0	1	0
25	w	54,05	8,45	5,95	0	1	0
26	m	75,32	5,52	1,35	0	0	0
27	w	69,17	2,99	2,99	0	0	0
28	m	44,62	36,76	32,75	0	1	0
29	m	73,47	2,33	2,33	0	1	0
30	m	50,57	12,23	5,03	0	0	0
31	m	70,61	1,97	1,58	0	0	0
32	m	59,36	23,01	9,67	0	0	0
33	m	64,29	16,64	10,39	0	0	0
34	w	50,23	10,03	7,56	0	1	0
35	m	45,54	11,97	2,76	0	0	0
36	w	82,90	1,05	1,05	0	1	0
37	w	83,02	0,62	0,62	0	0	0
38	m	71,64	27,68	6,87	0	1	0
39	w	73,74	2,40	2,40	0	1	0
40	w	70,99	2,04	2,04	0	0	0
41	w	68,24	2,17	2,17	0	0	0
42	w	52,56	10,78	5,23	0	0	0
43	m	54,72	7,00	7,00	0	1	0

44	w	35,97	60,36	50,43	0	1	0
45	m	72,40	3,39	3,39	0	0	0
46	m	72,30	1,84	1,84	0	1	0
47	m	68,22	13,51	3,42	0	1	0
48	m	66,78	41,56	21,14	0	0	0
49	m	58,87	4,54	4,54	0	1	0
50	m	54,02	17,88	5,00	0	0	0
51	w	54,73	20,61	14,14	0	0	0
52	m	52,03	34,98	23,41	0	1	0
53	m	49,77	14,70	3,91	n.a.	0	0
54	m	44,46	21,67	17,69	0	1	0
55	m	50,00	8,42	2,96	n.a.	1	0
56	m	41,51	12,72	9,60	0	1	0
57	m	37,25	125,29	5,95	1	1	0
58	w	59,64	2,20	2,20	0	1	0
59	w	68,97	10,95	8,52	0	1	0
60	w	71,48	2,33	0,95	0	0	0
61	w	51,92	8,68	8,68	0	1	0
62	w	76,13	35,18	29,95	0	1	0
63	m	65,19	7,40	3,16	n.a.	1	0
64	w	46,74	42,21	30,67	0	1	0
65	w	69,15	11,41	6,71	0	0	0
66	m	50,24	9,83	3,88	0	1	0
67	m	72,79	14,14	14,14	1	1	0
68	m	56,76	9,47	8,22	0	0	0
69	w	65,80	6,67	6,67	0	0	0
70	m	56,14	3,12	2,83	0	0	0
71	m	42,29	20,81	4,96	0	0	0
72	w	63,01	3,29	2,66	0	0	0
73	w	55,46	12,99	8,28	0	0	0
74	m	48,40	28,57	13,32	0	0	0
75	m	75,39	16,90	10,62	0	0	0
76	w	57,38	11,47	11,47	0	1	0
77	w	63,87	2,53	2,53	0	1	0
78	m	56,19	23,93	10,98	1	1	0
79	m	54,89	lebt	kein Rezidiv	0	1	1
80	m	73,78	1,78	1,78	0	0	0
81	w	67,53	8,42	4,50	0	0	0
82	m	64,05	5,62	5,62	0	0	0
83	m	74,50	1,71	1,25	0	0	0
84	m	48,69	25,32	25,32	0	0	0
85	m	65,99	19,82	3,91	0	1	0

### **4.3 Ergebnisse der MGMT-Methylierungsanalyse**

In unserem Institut wurden alle 85 Tumorproben auf eine Methylierung im MGMT-Gen untersucht.

Ein positiver Methylierungsstatus fand sich bei 41/85 Tumorproben, dies entspricht 48,2% der Untersuchungsgruppe.

### **4.4 Analyse des IDH1-Mutationsstatus**

Die Bestimmung des IDH1-Status wurde bei allen Patienten mit Ausnahme von Patient 53, 55 sowie 63 durchgeführt. Bei den genannten Patienten war kein Material mehr vorhanden.

Eine R132H-Mutation der IDH1 konnte bei 5 Patienten nachgewiesen werden (Patient 8,20, 57, 67, 78). Somit lag bei insgesamt 6,1% der Patienten ein positiver IDH1-Mutationsnachweis vor.

### **4.5 Auswertung der Überlebenszeitdaten**

Wir führten die Kaplan-Meier-Analyse sowie die Cox-Regressionsanalyse zur Analyse der klinischen Parameter durch. Bei der Auswertung der Werte mittels Kaplan-Meier-Kurve verwendeten wir den Log-Rank-Test zur Bestimmung des p-Wertes.

Da Patient 79 zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung 12/2019 am Leben war, wählten wir einen Cut-Off von 130 Monaten bei den Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben sowie von 60 Monaten bei den Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben. Somit können die Daten aller Patienten in angemessener Weise dargestellt werden.

Wir werteten verschiedene Faktoren und deren Einfluss auf das Überleben der Patienten aus. Hierbei untersuchten wir sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben. Das mittlere Gesamtüberleben in der Studienpopulation lag bei 15,7 Monaten, das kürzeste Gesamtüberleben bot Patient 37 mit 0,62 Monaten, das mit Ausnahme des noch lebenden Patienten 79 längste Gesamtüberleben Patient 57 mit 125,29 Monaten. Das 95%-Konfidenzintervall beträgt  $15 \pm 3.83$  Monate (zwischen 11.2 und 18.8 Monaten). Die Standardabweichung beträgt 18,73 Monate. Das mittlere progressionsfreie Überleben beträgt 9,0 Monate, das kürzeste progressionsfreie Überleben bot Patient 37 mit 0,62 Monaten, das längste Patient 44 mit 50,43 Monaten.

Das 95%-Konfidenzintervall beträgt  $9 \pm 2.13$  Monate (zwischen 6.87 und 11.1 Monaten). Die Standardabweichung beträgt 10,12 Monate.

#### 4.5.1 Alter

Das mediane Alter der Patientenpopulation bei Erstdiagnose liegt bei 59,6 Jahren, die Altersverteilung erstreckt sich vom jüngsten Patienten mit 35 Jahren bis hin zum ältesten Patienten mit 82 Jahren.

Es zeigt sich bei der Kaplan-Meier-Analyse eine signifikante Verkürzung sowohl des Gesamtüberlebens als auch des progressionsfreien Überlebens bei Zunahme des Lebensalters bei Erstdiagnose (siehe Abb. 9 und Abb. 10).

Bei errechnetem medianen Alter von 59,6 Jahren bei Diagnosestellung wählten wir einen Cut-Off von 60 Jahren zum Vergleich des Überlebens der Patienten älter 60 Jahre mit denen mit einem Alter von jünger als 60 Jahren.

Sowohl in der Analyse des Gesamtüberlebens als auch des progressionsfreien Überlebens zeigte sich eine schlechtere Prognose in der Gruppe der Patienten über 60 Jahren. Diese Assoziation ist bei einem p-Wert  $< 0,0001$  hochsignifikant. Auch die durchgeführte Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass bei hohem Alter bei Erstdiagnose der Erkrankung eine schlechtere Prognose bezüglich progressionsfreiem- und Gesamtüberleben vorliegt. Dieser Zusammenhang ist statistisch ebenso hochsignifikant.

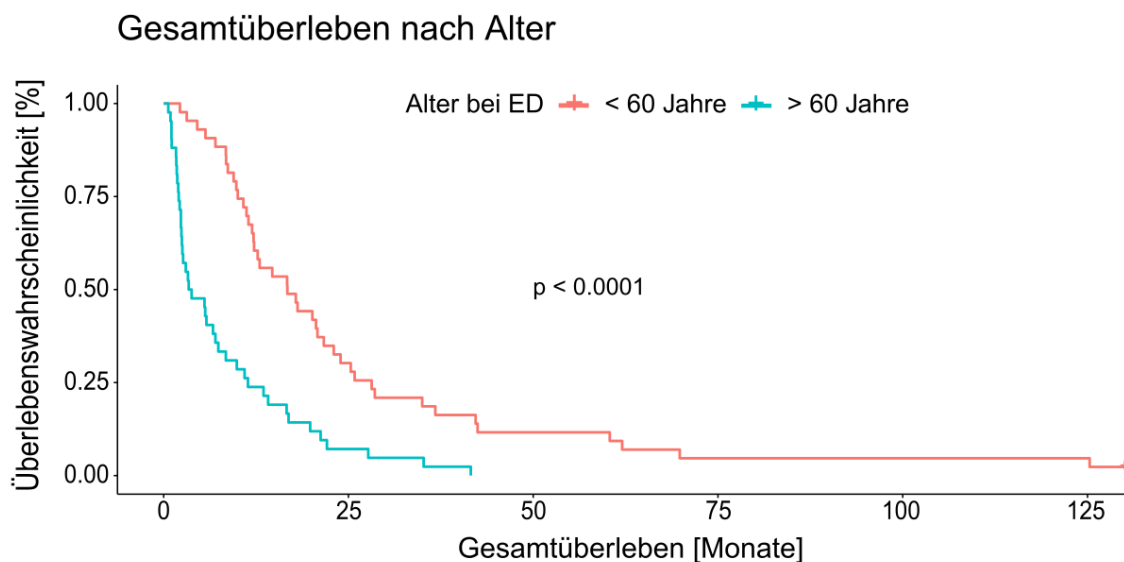


Abb. 9: Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach Alter, Vergleich Alter < 60 Jahre versus Alter > 60 Jahre

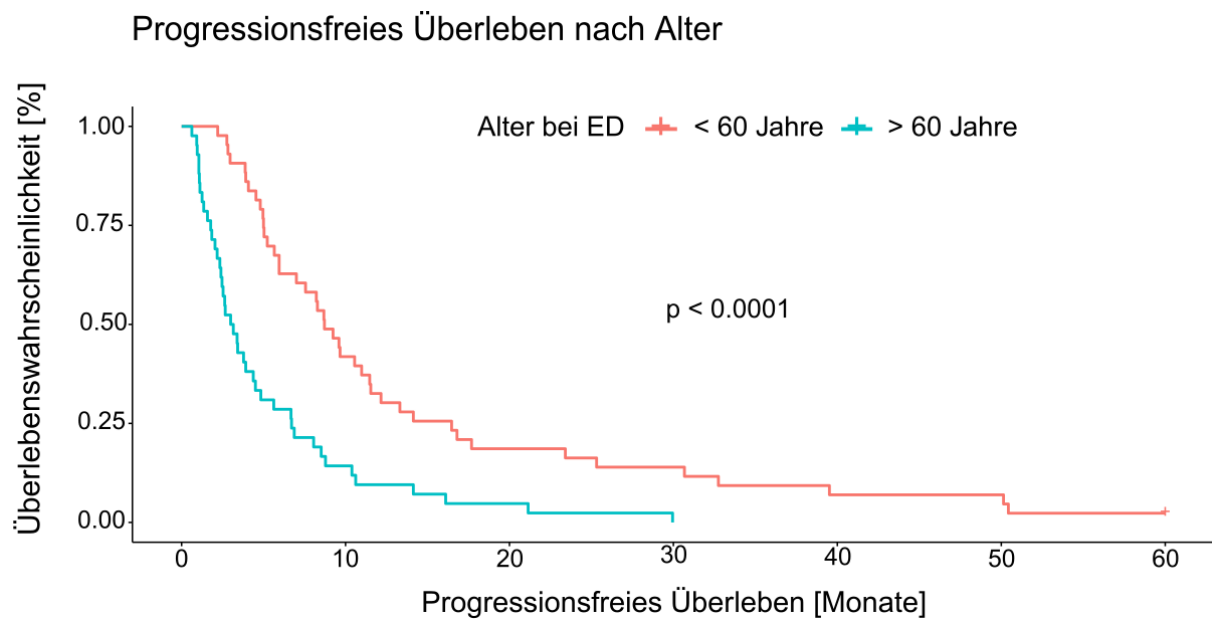


Abb. 10: Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach Alter, Vergleich Alter <60 Jahre versus Alter >60 Jahre

Tab. 6: univariate Cox-Regressionsanalyse Alter bei ED/Gesamtüberleben (OS)

Parameter	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter OS	1,05	1,03-1,07	<0,0001

Tab. 7: univariate Cox-Regressionsanalyse Alter bei ED/Progressionsfreies Überleben (PFS)

Parameter	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter PFS	1,05	1,03-1,07	<0,0001

#### 4.5.2 IDH1-Mutationsstatus

Wir führten eine Cox-Regressionsanalyse mit den Variablen Alter, IDH1-Status sowie Gesamtüberleben durch. Es zeigte sich abermals eine hohe Signifikanz ( $p < 0,001$ ) der Assoziation von niedrigem Erkrankungsalter und längerem Überleben (Abb.11) – für IDH1 konnte keine signifikante Assoziation festgestellt werden. Bei einer Fallzahl von  $n=5$  für Patienten mit nachgewiesener IDH1-Mutation war eine weitere statistische Auswertung hier nicht sinnvoll.

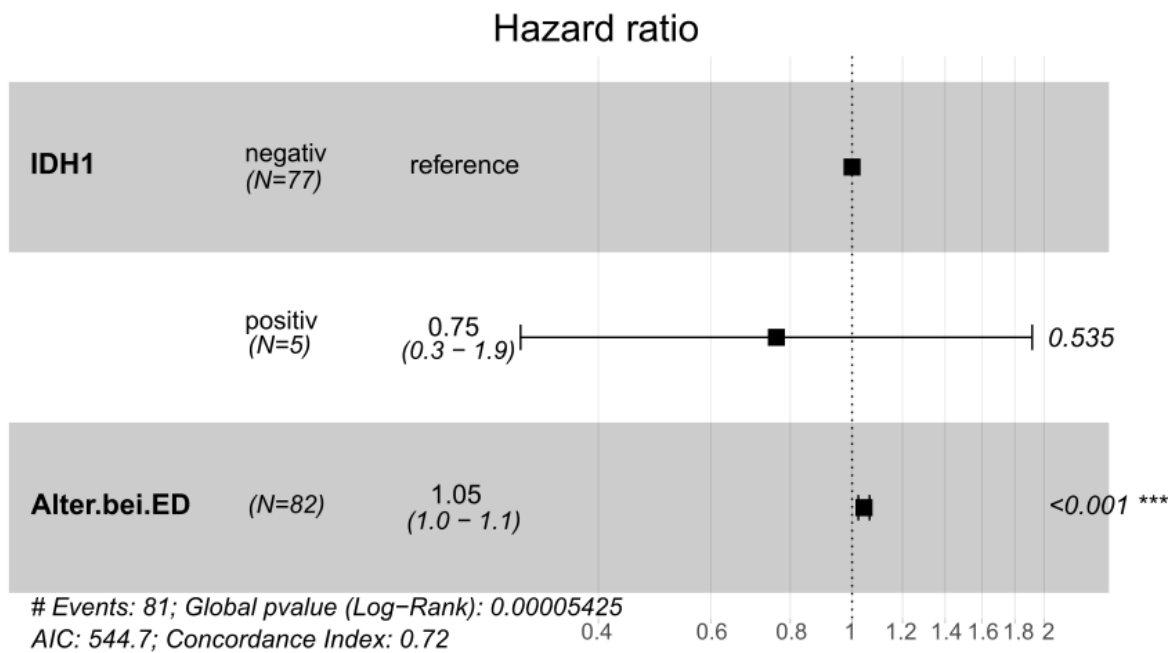


Abb. 11: Cox-Regressionsanalyse IDH1-Mutationsstatus

#### 4.5.3 MGMT-Methylierungsstatus

Wir analysierten die Auswirkung des MGMT-Methylierungsstatus der Patienten auf das Überleben. Wir führten hierzu eine Kaplan-Meier-Analyse durch (Abb. 12 und Abb. 13).

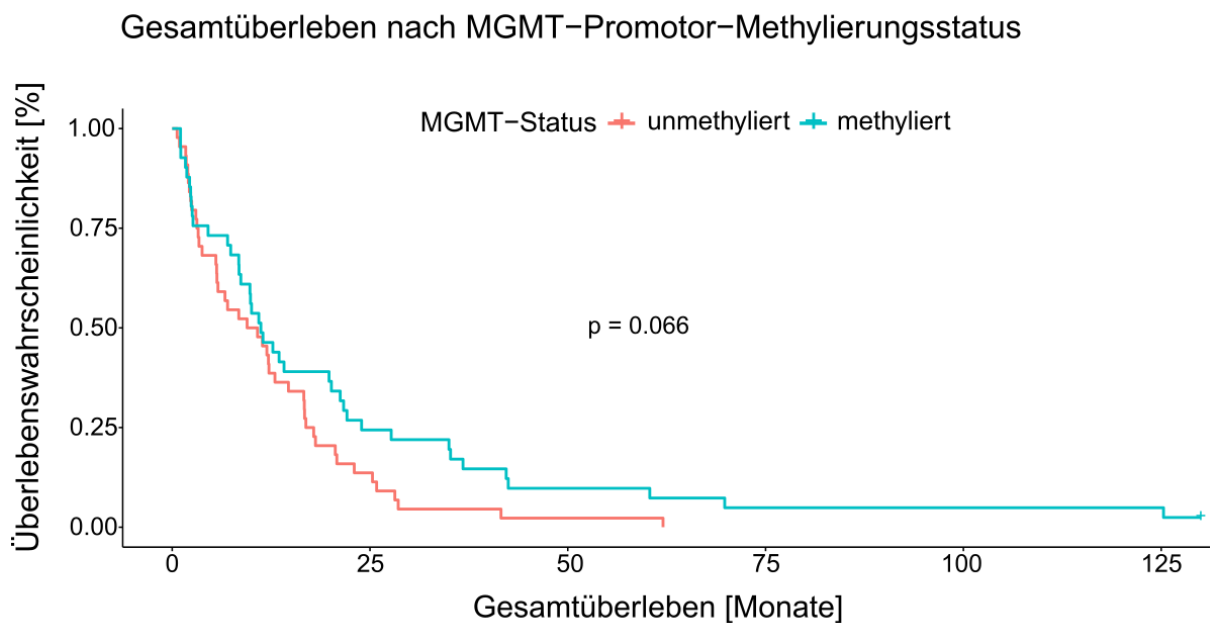


Abb. 12: Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach MGMT-Status, Vergleich methyliert versus unmethyliert

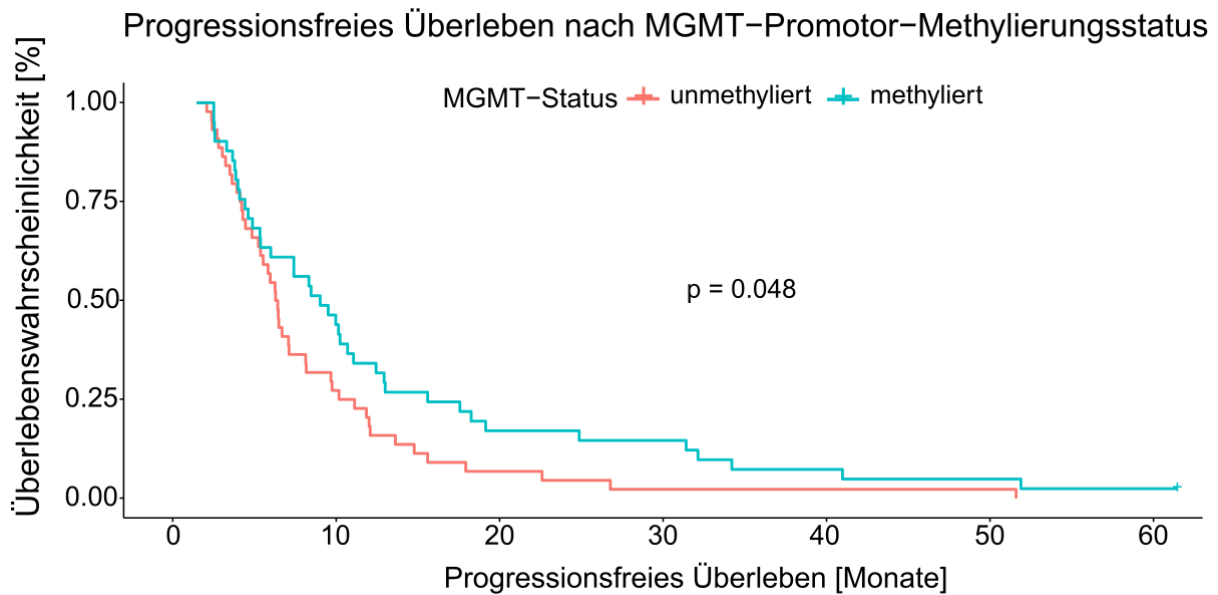


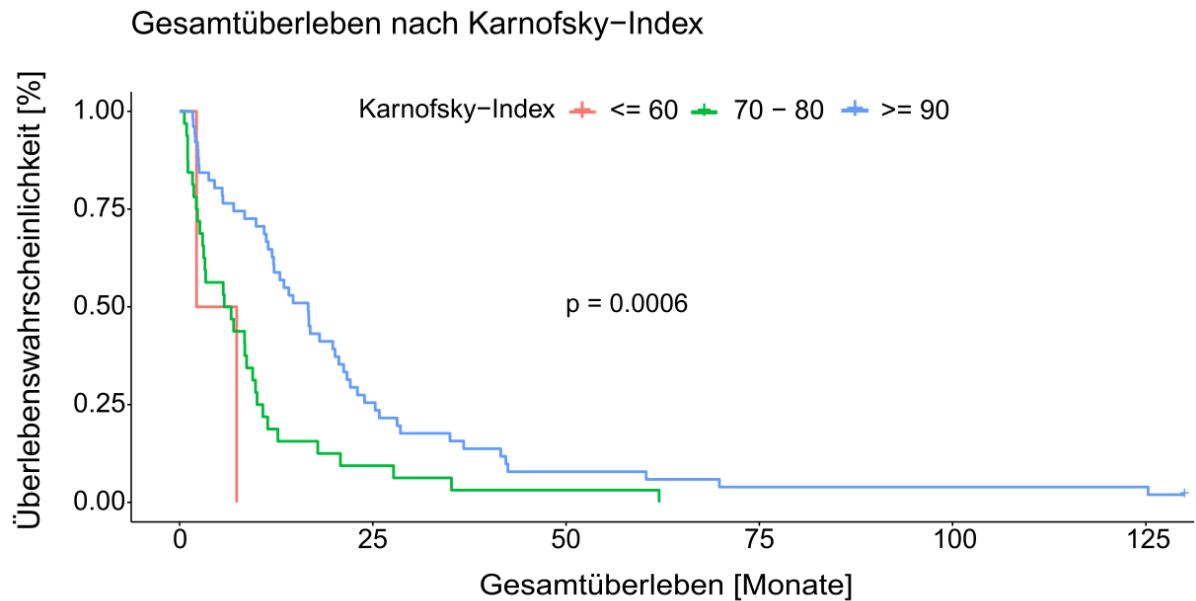
Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach MGMT-Status, Vergleich methyliert versus unmethyliert

Es zeigte sich, dass Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor ein längeres Überleben vorweisen. Dieser Zusammenhang ist bezogen auf das progressionsfreie Überleben ( $p=0,048$ ) statistisch signifikant (Abb. 13), bezogen auf das Gesamtüberleben ( $p= 0,066$ ) jedoch nicht (Abb. 12).

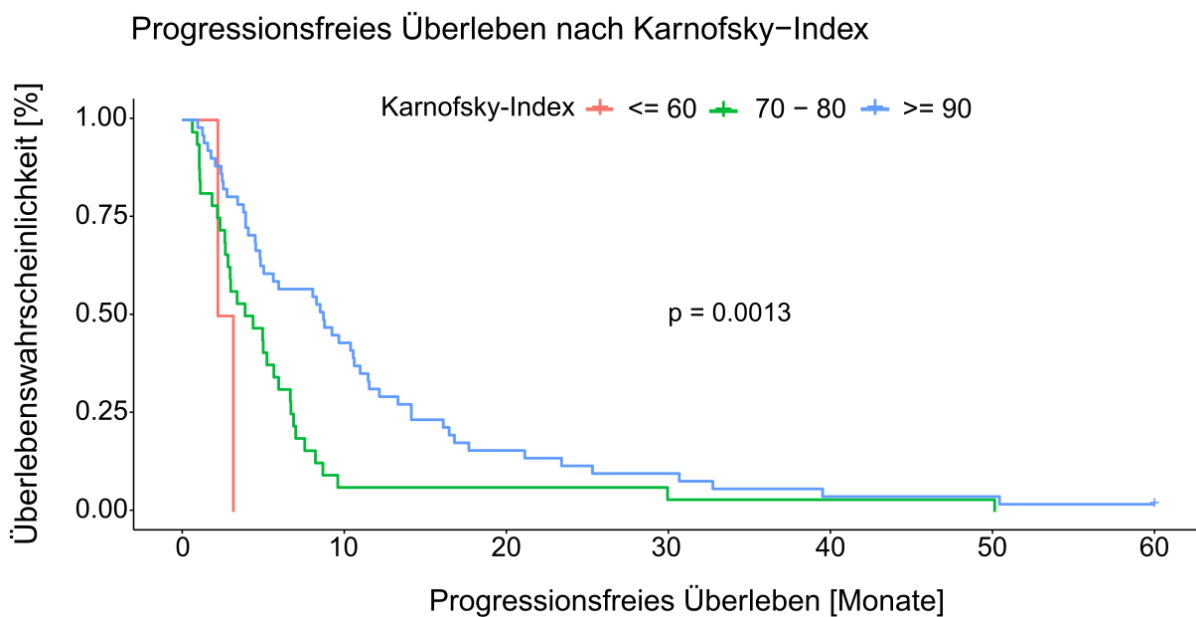
#### 4.5.4 Karnofsky-Index

Die Karnofsky-Indices zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, die für die Patienten während des stationären Aufenthalts erhoben worden, liegen mit Ausnahme von Patient 58 (Karnofsky-Score 30) bei allen Patienten im Bereich von 60 bis 100. Wir führten eine Kaplan-Meier-Analyse zur Untersuchung auf eine Assoziation zwischen Karnofsky-Score (KPS) und Überleben durch. Wir teilten die Patienten dabei wie Mrugala et al. in drei Gruppen ein: Patienten mit einem Karnofsky-Score bis 60, von 70 bis 80 sowie größer gleich 90<sup>39</sup>.





*Abb. 14: Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach Karnofsky-Index*



*Abb. 15: Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach Karnofsky-Index*

Wir stellten fest, dass Patienten mit hohem Karnofsky-Index zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen besseren Verlauf der Krankheit vorwiesen. Es zeigte sich dabei sowohl beim Gesamtüberleben als auch beim progressionsfreien Überleben eine deutliche Verlängerung. Der Zusammenhang ist in beiden Fällen statistisch hoch signifikant, beim Gesamtüberleben noch deutlicher ( $p=0,0006$ ) als beim progressionsfreien Überleben ( $p=0,0013$ ).

Auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich eine statistische Signifikanz bezüglich einer längeren Überlebenszeit bei höherem Karnofsky-Index bei Erstdiagnose. Dies wird in Tabelle 8 und 9 dargestellt.

Tab. 8: univariate Cox-Regressionsanalyse Karnofsky-Index/Gesamtüberleben (OS)

Parameter	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
KPS OS	0.965	0.947-0, 0.983	0,0003

Tab. 9: univariate Cox-Regressionsanalyse Karnofsky-Index/ Progressionsfreies Überleben (PFS)

Parameter	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
KPS PFS	0.967	0.949-0.986	0.0005

## 4.6 Kasuistik

Eine statistische Auswertung der RB1-Methylierungsanalyse war bei einer Fallzahl von n=1 nicht sinnvoll, daher wird Ihnen im Folgenden der Fall, bei dem eine Methylierung des RB1-Promotors nachgewiesen wurde, als Kasuistik dargelegt.

Patient 79 (H.H.) ist der einzige von uns untersuchte Patient, dessen Tumor eine RB1-Promotormethylierung aufwies.

Beim 1958 geborenen Herrn H. wurde im Dezember 2012 aufgrund progredienter rechtsseitiger Kopfschmerzen und gelegentlich auftretender Übelkeit und Lichtempfindlichkeit eine radiologische Bildgebung mittels Computertomografie durchgeführt. Es zeigte sich eine parieto-okzipital lokalisierte Raumforderung mit Verdacht auf Glioblastom.

Eine daraufhin durchgeführte Magnetresonanztomographie zeigte eine multizystische Raumforderung mit ausgedehntem, bis nach frontal und okzipital reichendem Perifokalödem. Die Raumforderung zeigte ein kräftiges, randständiges Enhancement nach Kontrastmittel-Applikation. Es zeigte sich außerdem eine Mittellinienverlagerung von ca. 7 mm nach links. Lokal waren die äußeren Liquorräume verstrichen.

In der Vorgeschichte waren keine Tumorerkrankungen bekannt. Ein Karnofsky-Score von 100 wurde festgestellt.

In der neurologischen Untersuchung zeigte sich die Pupille rechts geringfügig enger als links, beide waren indirekt und direkt lichtreagibel. Im Bereich des Gesichtsfeldes zeigte sich eine Hemianopsie linksseitig, der restliche Hirnnervenstatus war unauffällig.

Im Bereich der Extremitäten zeigten sich keine sensomotorischen Defizite. Die Muskeleigenreflexe waren seitengleich und unauffällig. Die Blasen-Mastdarm-Funktion war intakt.

Es wurde eine osteoklastische Kraniotomie rechts okzipital und Tumorresektion in mikrochirurgischer Technik unter neuronavigatorischer Führung inklusive einer Einlage von Carmustin-Wafern in die Tumorköhle durchgeführt. Der intraoperative Verlauf war komplikationslos.

Im Verlauf konnte der Verdacht auf ein Glioblastom histopathologisch bestätigt werden.

Die weitere pathologische Diagnostik ergab den Nachweis der Marker MAP2, PHH3 und GFAP. Der Ki67-Proliferationsindex betrug 60%. Es lag eine Methylierung des MGMT-Promotors vor. Der IDH-1-Mutationstatus war negativ.

Die postoperative CCT-Kontrolle zeigte eine gute Tumorresektion ohne Hinweis auf Nachblutung.

Herr H. erhielt eine bedarfsgerechte Analgesie und eine antithrombotische Prophylaxe.

Postoperativ zeigte sich der neurologische Status unverändert, es gab keinen Anhalt für neu aufgetretene neurologische Defizite.

Aufgrund der Carmustin-Wafer-Einlage in die Tumorköhle erhielt Herr H. eine antiödematöse Therapie mit Dexamethason 8 mg 4 x täglich, diese Therapie wurde für 4 Wochen fortgesetzt. Im Januar 2013 kam es zu einer Infektion des Knochendeckels, sodass dieser entfernt werden musste. Bei durch einen Duradefekt austretendem Liquor musste eine externe Ventrikeldrainage implantiert werden. In 04/2013 wurde daraufhin ein epiduraler Abszess festgestellt, sodass eine Abszessräumung durchgeführt werden musste.

Es erfolgte ab 02/2013 die Behandlung nach Stupp-Protokoll, welches im September 2013 nach Beendigung des 6. Zyklus der Temozolomid-Chemotherapie abgeschlossen wurde.

Die adjuvante Radiatio der Tumorregion rechts okzipital belief sich gemäß Protokoll auf eine Gesamtstrahlendosis von 60 Gy unter simultaner Chemotherapie mit Temozolomid (75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche).

Im Anschluss wurden geplant im 3-Monats-Rhythmus Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Einschließlich der letzten Beobachtung 12/2019 bestand seitdem ein stabiler klinischer Zustand, die zur radiologischen Kontrolle durchgeführten MRT-Untersuchungen zeigten ebenso einen stabilen Befund ohne Tumorrest oder Tumorrezidiv.

Abb. 18 zeigt eine Übersicht der magnetresonanztomographischen Bildgebung im Verlauf.

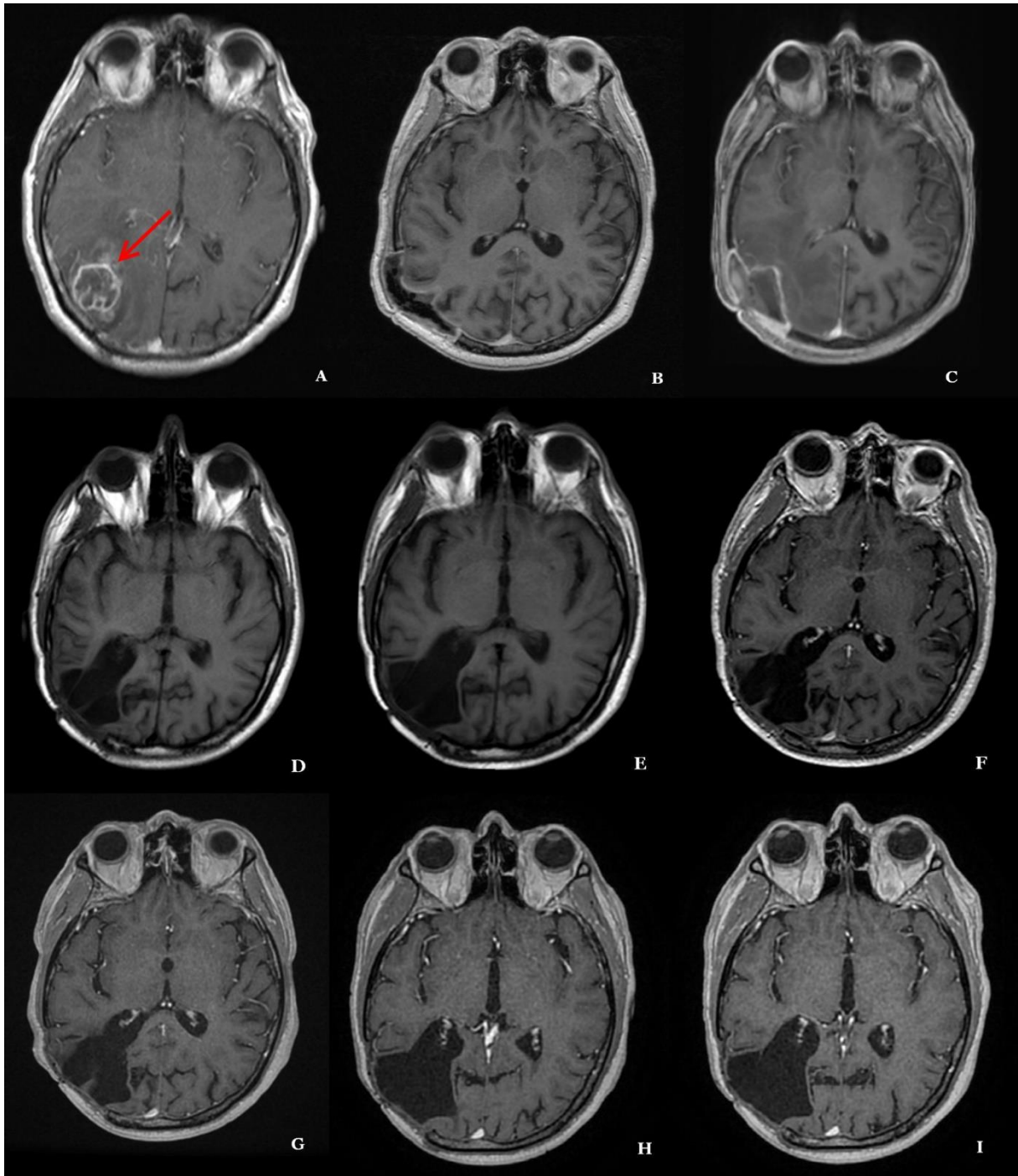


Abb. 16: cMRT-Verlauf bei Patient 79 (T1-Wichtung), A: roter Pfeil zeigt Glioblastom mit randständigem Kontrastmittel-Enhancement 12/2012. B: Postoperatives MRT 02/2013 bei Zustand nach Knochendeckeexplantation. C: Untersuchung 05/2013 nach epiduraler Abszessausräumung. D-I: jährliche Kontrolluntersuchungen 2015-2020

## 5. Diskussion

Das RB1- Tumorsuppressorgen ist an der Pathogenese einer Vielzahl von neoplastischen Erkrankungen beim Menschen beteiligt. Bezüglich der Rolle der RB1-Promotormethylierung beim Glioblastom liegen einige Studien vor, jedoch konnte bei teils widersprüchlichen Ergebnissen bislang keine abschließende Aussage getroffen werden.

Wir führten eine Methylierungsanalyse des RB1-Promotors mit Hilfe von Bisulfit-Konvertierung, MS-PCR und Gelelektrophorese durch.

Es handelt sich hierbei um eine retrospektive Studie an insgesamt 85 Glioblastompatienten, welche am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg operiert wurden.

Eine Methylierung des Promotors von RB1 zeigte sich dabei bei einem Patienten, was einer Methylierungsrate von 1,18% entspricht. Sämtliche Tumorproben wurden in der Zeit zwischen 2003 bis 2013 gewonnen. Durch die im Vergleich mit anderen Malignomen als niedrig zu bezeichnende Inzidenz des Glioblastoms ist die Fallzahl im statistischem Kontext eher gering. Im Vergleich mit publizierten Studien zu dieser Fragestellung hat unsere Studie allerdings die höchste Fallzahl.

### 5.1 Vergleichbarkeit unserer Kohorte mit der gängigen Literatur

Unsere Studie umfasste insgesamt 85 Patienten, davon 53 männliche und 32 weibliche.

Somit waren Männer mit einem Anteil von 1,65:1 häufiger vertreten als Frauen. Dies deckt sich mit den Angaben der Literatur. Die großangelegte CBTRUS-Studie beobachtete ein um den Faktor 1,58 häufigeres Auftreten von Glioblastomen bei Männern, sowie eine generell höhere Prävalenz von Astrozytomen beim männlichen Geschlecht<sup>49</sup>.

Das Alter bei Erstdiagnose der Erkrankung ist ein wichtiger prognostischer Marker, wobei ein jüngeres Alter mit verbesserter Prognose und längerem Überleben einhergeht<sup>49</sup>.

Das mittlere Alter bei Erstdiagnose betrug bei der hier untersuchten Patientenpopulation 60,76 Jahre, das mediane Alter 59,64 Jahre.

Der im Ergebnisteil angegebene Cut-Off bei 60 Jahren erscheint somit sinnvoll, Bezug nehmend auf eine Studie von Roa et al., die Glioblastom-Patienten über 60 Jahre als ältere Patienten klassifizierte<sup>53</sup>.

Da auch in unserer Patientenpopulation ein jüngeres Alter mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist, sind unsere Daten somit mit denen der Literatur kongruent.

Der Karnofsky-Index ist wie bereits zuvor erwähnt ebenfalls prognosebeeinflussend. Ein hoher Karnofsky-Index zum Zeitpunkt der Diagnosestellung prädestiniert für eine bessere Prognose<sup>55</sup>.

Mit Ausnahme von zwei Patienten hatten alle Patienten einen Karnofsky-Index von mindestens 70. Dies bedeutet, eine Selbstversorgung der Patienten ist möglich, wobei keine Arbeitsfähigkeit gegeben ist. Auch bei unserem Patientenkollektiv zeigte sich, dass ein hoher Karnofsky-Index mit einer verbesserten Prognose einhergeht.

Scott et al. studierten in einer großangelegten Studie an 689 Glioblastompatienten die Charakteristika der Langezeitüberlebenden, welche sie mit einer Überlebensrate von über 3 Jahren nach Diagnosestellung definierten. Neben einem jungen Erkrankungsalter waren auch das Ausmaß der Tumorresektion, ein hoher Karnofsky-Index bei Erstdiagnose sowie weniger Mitosen und ein niedriger Ki-67-Index für ein Langzeitüberleben ausschlaggebend<sup>55</sup>.

Wie bereits beschrieben, spielt die Kenntnis des IDH1-Mutationsstatus eine essentielle Rolle beim Glioblastom. Die von uns untersuchte R132H-Mutation inaktiviert die Fähigkeit der Isocitrat-Dehydrogenase 1, die Reaktion von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat zu katalysieren<sup>82</sup>.

Wir fanden einen positiven IDH1-Mutationsstatus bei 5 unserer Patienten. Abzüglich dreier Patienten, deren IDH1-Status aufgrund von mangelndem Material nicht bestimmt werden konnte, waren 5 von 82 Patienten für die R132H-Mutation positiv. Dies entspricht 6,1% der Kohorte. Wir untersuchten in unserer Studie ausschließlich die IDH1-R132H-Mutation, welche den Großteil der Mutationen des IDH1-Gens bei Hirntumoren ausmacht<sup>5</sup>.

Für Glioblastome wird ein je nach IDH1-Mutationsstatus unterschiedliches durchschnittliches Erkrankungsalter angegeben. So liegt dieses bei IDH1-Wildtyp-Glioblastomen bei  $60.9 \pm 13.3$  Jahren (mittleres Alter  $\pm$  Konfidenzintervall), im Vergleich dazu bei IDH1-mutierten Tumoren bei  $47.9 \pm 12.9$  Jahren<sup>43</sup>.

Auch in unserer Kohorte ergaben sich hingehend des Alters Assoziationen mit dem IDH1-Status: Das Durchschnittsalter betrug bei vorliegender IDH1-Mutation 52,4 Jahre und bei IDH1-Wildtyp 61,6 Jahre, womit auch hier ein positiver IDH1-Mutationsstatus mit jüngerem Patientenalter bei Erstdiagnose vergesellschaftet war.

Der IDH1-Status von Glioblastomen ist ein in zahlreichen Studien betrachteter Parameter. So fanden Nobusawa et al. in ihrer Studie mit 407 Glioblastompatienten in 8,8% der untersuchten Tumoren eine IDH1-Mutation – dabei war diese deutlich häufiger in sekundären Glioblastomen zu finden – 22 von 30 dieser Tumoren und damit 73% waren hier IDH1-mutiert im Vergleich zu 3,7% der primären Glioblastome<sup>43</sup>.

Yan et al. detektierten in 12,5% ihrer 136 Patienten umfassenden Studiengruppe eine IDH1-Mutation. Dabei war in 11 von 13 (85%) sekundären und 6 von 123 primären Glioblastomen (4,8%) eine IDH1-Mutation zu finden<sup>78</sup>.

Zu einem ähnlichen Ergebnis wie in der vorliegenden Studie kamen auch Combs et al. Sie wiesen in 3% ihrer 140 untersuchten Glioblastomproben eine IDH1-Mutation nach – verantwortlich war in allen Fällen die R132H-Mutation<sup>13</sup>.

Der MGMT-Methylierungsstatus ist bei Glioblastompatienten von essentieller Wichtigkeit, da er signifikante Auswirkungen auf das Ansprechen auf die Therapie mit alkylierenden Substanzen hat<sup>23</sup>. Diese sind in Form von Temozolomid Chemotherapeutikum der ersten Wahl in der Glioblastombehandlung<sup>64</sup>. MGMT entfernt Alkylgruppen und antagonisiert damit die Wirkung von Temozolomid<sup>30</sup>. Eine Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer reduzierten Expression des Gens und somit zu einem besseren Therapieansprechen<sup>23</sup>.

In unserem Patientenkollektiv lag in 40 von 85 Fällen eine Methylierung des MGMT-Promotors vor. Dies entspricht 47% der Patienten. Unsere Daten decken sich mit der Literatur, in welcher ähnliche Anteile gefunden werden können:

So fanden Ellingson et al. in 141 von 379 untersuchten Fällen einen methylierten MGMT-Promotor, dies entspricht 37,2% der untersuchten Tumoren<sup>15</sup>.

Zawlik et al, die mit 371 Patienten eine ähnlich große Kohorte aufweisen konnten, fanden in 44,5% einen methylierten MGMT-Promotor<sup>81</sup>.

Mit 44,8% methylierten MGMT-Promotoren bei einer Studiengruppe von 248 Patienten war der Anteil einer Studie von Weller et al. der von Zawlik et al. sehr ähnlich<sup>74</sup>.

Bei Reifenberger et al. waren es mit 57,5% Methylierung der insgesamt 233 untersuchten Tumoren etwas mehr als bei den zuvor genannten Studien<sup>52</sup>.

Im Vergleich befindet sich unser Patientenkollektiv somit in einem ähnlichen Bereich wie die Studien, die die MGMT-Promotor-Methylierung mit großen Fallzahlen nachgewiesen haben.

Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor haben unabhängig von weiteren Faktoren eine verbesserte Prognose und außerdem ein verlängertes Überleben gegenüber Patienten ohne diese Eigenschaft, sofern ihnen eine kombinierte Radiochemotherapie zuteilwird<sup>23</sup>.

Durch Etablierung des Stupp-Schemas als Standardtherapie ist dies normalerweise der Fall.

In unserem Patientenkollektiv konnte dies bestätigt werden. Die Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor verzeichneten ein längeres Gesamtüberleben sowie ein längeres progressionsfreies Überleben. Es lag ein durchschnittliches Gesamtüberleben von 19,87 Monaten bei methyliertem MGMT-Promotor versus 12,54 Monaten bei unmethyliertem MGMT-Promotor vor. Das durchschnittliche progressionsfreie Überleben betrug 7,36 Monate mit unmethyliertem und 10,79 Monate mit methyliertem MGMT-Promotor.

Der Vergleich der Eigenschaften unseres Patientenkollektivs mit denen publizierter Studien zum Glioblastom konnte zeigen, dass die Eigenschaften unseres Kollektivs im Wesentlichen denen der Literatur entsprechen beziehungsweise sich keine größeren Diskrepanzen im Hinblick auf die verglichenen Marker zeigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die von uns untersuchten Patienten als repräsentatives Kollektiv von Glioblastompatienten gelten können.

Dies macht eine Evaluation des RB1-Methylierungsstatus als Marker beim Glioblastom möglich.

## 5.2 Methodendiskussion

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus eines Genlocus stehen eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung. Wir verwendeten eine PCR-basierte Methode mit vorangehender Bisulfit-Konvertierung der zu untersuchenden DNA.

Zur Feststellung des Methylierungsstatus der zu untersuchenden DNA-Abschnitte ist eine Amplifikation selbiger notwendig. Die DNA-Polymerase, welche das dafür zuständige Enzym darstellt, kann nicht zwischen Cytosin und seiner methylierten Version, dem 5-Methylcytosin, unterscheiden. Folglich muss vor Beginn der PCR eine Modifikation der DNA stattfinden, welche eine spezifische Amplifikation und darauffolgende Bestimmung des Methylierungsstatus ermöglicht. Dafür stehen verschiedene Möglichkeiten bereit. Einsetzbare Verfahren sind neben der von uns verwendeten Bisulfit-Behandlung der DNA beispielsweise die Verwendung von methylierungsspezifischen Restriktionsendonukleasen (MSRE), Hydrazin oder Permanganat<sup>14</sup>. Die ersten beiden stellen dabei die gängigsten Verfahren dar.

Die Bisulfit-Konvertierung gilt als die mit der größten Sensitivität und Spezifität zur Detektion von Methylierungen an einzelnen Gen-Loci verbundene Methode<sup>33</sup>. Grundlage ist die Umwandlung unmethylierter Cytosine in CpG-Inseln in Uracil, während 5-Methylcytosin zum Großteil unverändert bleibt. Somit kann auch nach Durchführung der PCR eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA anhand ihrer Sequenzunterschiede erfolgen.

Vorteil dieser Methode ist ihre universelle Anwendbarkeit, jedes CpG-Dinukleotid einer ganzen Zellpopulation oder auch nur eines einzigen DNA-Moleküles kann auf eine Methylierung untersucht werden.

Eine Einschränkung der Methode ist ihre Neigung zu Artefakten. Das häufigste Artefakt entsteht durch die inkomplette Konversion von Cytosin zu Uracil, da Bisulfit nur mit DNA-Einzelsträngen reagiert und keine in Basenpaarungen vorliegenden Cytosin-Moleküle konvertieren kann. Diese liegen allerdings vor, wenn es im Vorfeld nur zu einer unvollständigen DNA-Denaturierung oder bereits zu einer Renaturierung gekommen ist<sup>14</sup>.

Der von uns favorisierte Lösungsansatz beinhaltet die Durchführung der Bisulfit-Konversion in einem Thermocycler, wobei es durch eine mehrere Temperaturstufen durchlaufende Erhitzung auf bis zu 95°C kommt, was zu einer vollständigen Denaturierung führt<sup>71</sup>.

Auch die Verwendung von Proteinase K bei der Durchführung der Isolation der später verwendeten DNA trägt dazu bei, dass weniger Artefakte entstehen<sup>71,14</sup>. Proteinase K ist Teil des von uns verwendeten Protokolls zu DNA-Isolation, sodass wir hier insgesamt zwei Mechanismen nutzten, um das Auftreten von Artefakten zu verhindern und somit zuverlässige Ergebnisse erhalten konnten.



Wird die Bisulfit-Behandlung unter geeigneten Bedingungen durchgeführt, so kann von einer Konversionsrate von unmethyliertem Cytosin zu Uracil von ungefähr 99% ausgegangen werden<sup>67</sup>.

Abgesehen davon bestehen noch andere mögliche Quellen, die zu einem weniger zuverlässigen Ergebnis der Bisulfit-Konvertierung führen können. So kann es zu einer spontanen zufälligen Konversion einiger 5-Methylcytosine zu Thymin während der Inkubation der Probe kommen. Eine lange Inkubationszeit kann außerdem zu ausgeprägten Schäden der DNA führen, was eine Amplifikation dieser erschwert<sup>51</sup>. Bei vollständig denaturiert vorliegender DNA reicht nach aktueller Studienlage eine vierstündige Inkubation, um eine ausreichende Konversion herbeizuführen<sup>51</sup>.

Ein weiterer Mechanismus, der zur DNA-Degradation führen kann, ist die säurekatalysierte Depurinierung der DNA während der Bisulfit-Behandlung<sup>14</sup>.

Ein komplexeres Problem kann vorliegen, wenn die Primerpaare für methylierte und unmethylierte DNA diese in unterschiedlicher Effizienz amplifizieren. Es sollten daher grundsätzlich Proben mit methylierter und unmethylierter DNA in festgelegten Mengen im Experiment verwendet werden, um den Fehler herauszurechnen<sup>72</sup>.

Ein zur Bisulfitbehandlung alternatives, ebenso populäres Verfahren ist der Verdau mit MSRE. Verwendet werden Isoschizomere bakterieller Endonukleasen, die sich in der Sensitivität für 5-Methylcytosin unterscheiden. Während eines der Enzyme die DNA auch bei Vorliegen von 5-Methylcytosin spalten kann, ist das dem anderen Enzym des Paares nicht möglich. Somit kann eine Unterscheidung anhand des Methylierungsstatus erfolgen.

Die Probleme der MSRE liegen in ihrer Aussagekraft. So können nur DNA-Abschnitte analysiert werden, welche eine für die Isoschizomere spezifische Nukleotidsequenz aufweisen. Es muss außerdem auf einen vollständigen Verdau der DNA geachtet werden, da bei einem unvollständigen Verdau falsch positive Ergebnisse in Bezug auf vorliegende Methylierungen resultieren können. Bei Vorliegen großer DNA-Mengen können die MSRE mit einem Southern Blot kombiniert werden, ansonsten wie die Bisulfit-Konvertierung mit einer PCR. Es schließt sich eine Elektrophorese, ein Blotting auf eine Nylon-Membran sowie eine Hybridisierung mit radioaktiven Markern an<sup>14</sup>.

Die Polymerasekettenreaktion beinhaltet die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Abschnitte mit Hilfe von speziell für den zu testenden Locus kreierten Primern. Nach Durchführung der Bisulfit-Behandlung liegen keine komplementären DNA-Stränge mehr vor. Beim Design der Primer muss entschieden werden, welche grundsätzliche Strategie verfolgt werden soll. Soll eine quantitative Auswertung der methylierten und unmethylierten DNA-Stränge erfolgen, so werden Primer erstellt, welche unabhängig vom Methylierungsstatus eine Amplifikation der DNA erreichen. Diese Methode wird methylierungs-unabhängige PCR (engl. Methylation-independent PCR (MIP)) genannt<sup>33</sup>. Sie hat den klaren Nachteil, dass hier eine PCR-bezogene Präferenz der Amplifikation von unmethylierter DNA vorliegt, was der

Verschiebung der Ergebnisse in Richtung eines verminderten Methylierungsgrades entspricht<sup>72</sup>. Versuche, dieses Phänomen durch Modifikation der Bedingungen der PCR wie beispielsweise der Temperatur bei Primerhybridisierung oder Denaturierung zu verhindern, scheiterten<sup>72</sup>. Zusätzlich muss die geringe analytische Sensitivität der MIP bei der Auswahl der präferierten Methode berücksichtigt werden<sup>33</sup>.

Soll eine qualitative Methode wie in unserer Studie angewendet werden, so ist eine hohe Sensitivität und Spezifität der Primer notwendig. Es werden hierfür zwei Paare von Primern verwendet. Essentiell ist hierbei die richtige Auswahl der Primer, welche zwischen methylierter und unmethylierter DNA differenzieren können. Möglich wird dies durch das Design eines Primers mit CpG-Insel am 3'-Ende. Ebenso ist eine Unterscheidung von durch die Bisulfit-Behandlung konvertierter und unkonvertierter DNA notwendig. Der Primer enthält dafür zwei nicht-CpG-Cytosine am 3'-Ende. Bei dieser von uns verwendeten Methode handelt es sich um die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR).

Zur Validierung der Ergebnisse sollten grundsätzlich bei jedem Durchgang der Bisulfit-Konvertierung und konsekutiven PCR Kontrollen durchgeführt werden. Nötig ist sowohl eine Positivkontrolle in Form von methylierter DNA, wir verwendeten hier methylierte DNA der Firma Zymo Research, eine Negativkontrolle mit sicher unmethylierter DNA, in unserer Studie in Form einer Duraprobe sowie eine Kontrolle mit destilliertem Wasser zum Test auf Verunreinigung des PCR-Mastermix mit DNA.

Als Negativkontrolle kann wie in unserer Studie DNA von normalem Hirngewebe verwendet werden. Die Positivkontrolle kann alternativ selbst hergestellt werden. Man verwendet dabei das Enzym CpG Methyltransferase (M.SssI), welches eine ausgewählte DNA-Probe komplett methyliert<sup>80</sup>. Gonzalez-Gomez et al. verwendeten hierfür beispielsweise normale DNA von Lymphozyten, welche sie mit M.Sssl behandelten, während Yu et al. aus Lebergewebe extrahierte DNA verwendeten<sup>21,80</sup>.

Ein großer Vorteil der MS-PCR ist ihre hohe Sensitivität. Schon kleinste DNA-Mengen reichen zur Durchführung, und schon ein Anteil von methylierten Molekülen von 0,1% der Gesamtpopulation reichen zur Detektion<sup>25</sup>.

Einfluss auf die analytische Sensitivität haben unter anderem das Design der Primer, die Temperatur bei Primerhybridisierung sowie die Zyklusanzahl der PCR<sup>33</sup>.

Die MS-PCR kann grundsätzlich als qualitative Methode zum Nachweis der Methylierung eines bestimmten Gens verwendet werden. Sollten quantitative Informationen benötigt oder mehr als nur ein kleiner DNA-Abschnitt auf Methylierung untersucht werden, ist ein Methodenwechsel oder eine Kombination mit einem anderen Verfahren notwendig<sup>14</sup>.

Die MS-PCR birgt die Gefahr der Generierung von falsch-positiven Ergebnissen<sup>58</sup>. Dies steht unter anderem mit der hohen Sensitivität der Methode in Zusammenhang, Ursache der falsch positiven Ergebnisse können die Anlagerung eines falschen Primers und folgende Amplifikation sein<sup>33</sup>.

Ein geeignetes Primerdesign sowie die Vorgabe einer hohen Temperatur zur Primerhybridisierung kann diesem Problem entgegenwirken. Essentiell in diesem Zusammenhang ist die Verwendung einer Negativprobe, ebenso sollte eine Kontamination der Probe selbstverständlich verhindert werden<sup>33</sup>.

Ein großer Vorteil der MS-PCR ist, dass zu ihrer Durchführung kein spezielles Equipment notwendig sind und sie somit in den meisten Laboren problemlos durchführbar ist.

Außerdem ist hervorzuheben, dass sie eine sowohl zeitlich als auch finanziell große Effizienz bietet<sup>33</sup>.

Ein Vergleich der Ergebnisse eines Southern Blots nach Durchführung eines MSRE-Verdaus mit den Ergebnissen einer MS-PCR an derselben Gewebeprobe kann die Resultate der jeweiligen anderen Methode bestätigen, sofern beide Methoden zum selben Ergebnis kommen. Zusätzlich können somit falsch positive bzw. negative Ergebnisse detektiert werden. Bei sorgfältig ausgewählten Positiv- und Negativkontrollen bzw. einer Wiederholung der Messung bei unklaren Ergebnissen ist dies allerdings nicht notwendig, da in diesem Fall bereits eine ausreichende Aussagekraft vorliegt<sup>80</sup>.

Die MS-PCR bietet somit eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber alternativen Verfahren zur Feststellung des Methylierungsstatus, sodass wir uns in Abwägung dieser mit den vorhandenen Nachteilen für die Verwendung dieser Methode entschieden haben.

Die Mehrheit der relevanten Publikationen zur Promotormethylierung des RB1-Gens verwendeten diese Methode, welche sich somit als Standardmethode zu Beantwortung dieser Fragestellung etablieren konnte<sup>41,21,79,80</sup>.

### **5.3 Ergebnisdiskussion**

Epigenetische Modifikationen des Erbguts sind Teil der Genese der meisten Tumoren und spielen auch beim Glioblastom eine wichtige Rolle.

RB1 ist zusammen mit E2F, p53, CDK4/6 und CDKN2A Teil eines Regelkreises, der Zellteilung, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose kontrolliert.

In unserer Studie beobachteten wir nur bei einem von 85 Patienten eine Methylierung des RB1-Promotors (1/85;1,18%). Dies ist ein solch geringer Wert, dass wir von einem zu vernachlässigenden Einfluss der RB1-Promotormethylierung beim Glioblastom ausgehen müssen. Die RB1-Promotormethylierung scheint kein relevantes Ereignis bei der Entwicklung und Progression des Glioblastoms darzustellen.

Vorausgehende Studien beschrieben hier teilweise abweichende Ergebnisse. Die zwei Studien mit den größten Fallzahlen, welche die RB1-Methylierung beim Glioblastom untersuchten,

sind eine Studie von Nakamura et al. aus dem Jahr 2001 mit 56 Fällen sowie eine Studie von Gonzalez-Gomez et al. aus dem Jahr 2003 mit 42 Fällen<sup>41,21</sup>.

Nakamura et al. untersuchten den Methylierungsstatus des RB1-Promotors bei 56 Patienten und fanden dabei bei insgesamt 14 Patienten einen methylierten Promotor, dies entspricht 25% der untersuchten Fälle und damit deutlich mehr als in unserer Studie. Sie unterteilten außerdem die Glioblastome nach alter WHO-Klassifikation in primär und sekundär und stellten fest, dass eine Promotormethylierung signifikant häufiger bei sekundären (43%) als primären (14%) Glioblastomen auftritt<sup>41</sup>.

Im Gegensatz dazu entsprechen die von uns untersuchten Tumoren alle primären Glioblastomen. Ein geringerer Anteil an nachgewiesenen RB1-Methylierungen ist insofern mit den Ergebnissen von Nakamura et al. vereinbar, wobei der Anteil in unserer Studie mit 1,18% nochmals deutlich vermindert war.

Hervorzuheben ist allerdings, dass wir in unserer Studie die aktuelle WHO-Klassifikation von 2016 verwendeten. Diese sieht keine Einteilung der Glioblastome nach primär und sekundär mehr vor, vielmehr wird eine Einteilung bezüglich des IDH1-Mutationsstatus vorgenommen. Sämtliche der von uns untersuchten Tumoren sind nach neuer WHO-Klassifikation als Glioblastome zu klassifizieren. Im Gegensatz dazu ist es somit möglich, dass in die Studie von Nakamura et al. durch Verwendung der alten WHO-Klassifikation Patienten eingeschlossen waren, deren Tumoren nach aktueller Klassifikation nicht mehr als Glioblastome bezeichnet werden können bei bereits initial geringerer Fallzahl.

Methodisch verwendeten Nakamura et al. die MS-PCR im Anschluss an die Bisulfitkonvertierung, welche mit Hilfe des CpGenome DNA Modification Kit des Herstellers Intergen durchgeführt wurde. Die verwendeten Primer entsprachen den von uns verwendeten. Auch die Gelelektrophorese wurde wie in unserer Studie mit einem 3%-Agarosegel unter Verwendung von Ethidiumbromid zur Visualisierung durchgeführt<sup>41</sup>.

Es kann zusammengefasst werden, dass bis auf einige Unterschiede bei der Durchführung im Allgemeinen dieselben Methoden wie in unserer Studie zur Anwendung kamen.

Nakamura et al. untersuchten außerdem den Zusammenhang von RB1-Promotormethylierung und dem Verlust der pRB-Expression, welchen sie mithilfe von Immunhistochemie nachwiesen. Sie stellten fest, dass in der großen Mehrheit der Fälle mit pRB-Expressionsverlust eine RB1-Promotormethylierung vorlag (11 von 13 Fälle, 85%). In 93% der Tumoren mit pRB-Expression war außerdem keine Methylierung nachweisbar<sup>41</sup>.

Wir hatten im Rahmen dieser Studie nicht die Möglichkeit, die Expression des pRB-Proteins zu untersuchen. Trotzdem ist in Anbetracht der Literaturdaten auch in unserer Studienpopulation von einer hohen Wahrscheinlichkeit eines pRB-Expressionsverlusts bei RB1-Promotormethylierung auszugehen.

Ein Verlust der Expression von RB1 wurde bereits als möglicher negativer prognostischer Faktor beschrieben. Hilton et al. beobachteten in ihrer Studie an 107 Glioblastom-Patienten ein schlechteres klinisches Outcome bei vorliegendem Verlust der Expression des Retinoblastom-Proteins<sup>26</sup>. Auch Nakamura et al. stellten 1996 eine Assoziation eines pRB-Expressionsverlustes mit einer Verkürzung des mittleren Überlebens fest. Während die Patienten mit Tumoren, welche eine pRB-Expression aufwiesen, durchschnittlich 11 Monate überlebten, waren es bei fehlender Expression nur 6 Monate<sup>40</sup>.

Bäcklund et al. berichteten außerdem von einem signifikant kürzeren medianen Überleben von Glioblastom-Patienten, bei denen Veränderungen von Genen mit Funktion innerhalb des RB1-Signalweges nachgewiesen wurden<sup>4</sup>.

Die zweite große Studie, welche sich mit der Methylierung des RB1-Promotors bei Glioblastomen beschäftigte, wurde von Gonzalez-Gomez et al. im Jahr 2003 im Universitätsklinikum La Paz in Madrid durchgeführt. Die Studie umfasste neben anderen Tumorentitäten des zentralen Nervensystems 42 Glioblastome. Es konnte ein Nachweis einer RB1-Promotormethylierung bei 9 der 42 Tumoren gefunden werden, dies entspricht einem Anteil von 21%. Wie schon von Nakamura et al. berichtet war auch hier eine höhere Methylierungsrate bei sekundären Glioblastomen im Vergleich zu primären beobachtet worden. Die Studie beinhaltete 32 primäre und 10 sekundäre Glioblastome, dabei waren 15% der primären (5 von 32 Tumoren) und 40% der sekundären Glioblastome (4 von 10 Tumoren) methyliert. Gonzalez-Gomez et al. formulierten als Schlussfolgerung die Annahme, dass die Hypermethylierung des RB1-Promotors ein häufiges epigenetisches Ereignis darstellt, welches mit der Entwicklung von Hirntumoren assoziiert ist<sup>21</sup>.

Dies widerspricht den Ergebnissen unserer Studie insofern, als dass wir eine RB1-Methylierung nur in 1,18% der Fälle nachweisen konnten. Es muss dabei nochmals erwähnt werden, dass in unserer Studie eine geringere Rate an RB1-methylierten Tumoren zu erwarten war, da wir ausschließlich primäre Glioblastome untersuchten, allerdings ist der Anteil mit 1,18% nochmals deutlich unter dem von Gonzalez-Gomez et al. mit 15%.

Wie schon bei der Studie von Nakamura et al. muss auch hier bedacht werden, dass es sich bei einigen in der Studie von Gonzalez-Gomez et al. eingeschlossenen Tumoren nach aktueller WHO-Klassifikation nicht mehr um Glioblastome handeln könnte bei wiederum initial deutlich geringerer Fallzahl.

Methodisch wurde auch hier eine DNA-Isolation, Bisulfit-Konvertierung und anschließende MS-PCR durchgeführt, auch hier wurden die gleichen Primer wie in unserer Studie verwendet. Wie in der Studie von Nakamura et al. und unserer Studie wurde zur Auswertung eine Gelelektrophorese in einem 3%-Agarosegel angeschlossen. Als Positiv- und Negativkontrolle verwendeten Gonzalez-Gomez et al. DNA von Lymphozyten gesunder Spender, welche für die Verwendung als Positivkontrolle vorher mit SSS1-Methyltransferase behandelt wurden<sup>21</sup>.

Yin et al. untersuchten in ihrer Studie die Gene p14, p15, p16 und RB1 bei Patienten mit Hirntumoren. Bei keinem der 30 untersuchten Glioblastome lag dabei eine RB1-Methylierung vor<sup>79</sup>.

Die Ergebnisse decken sich somit mit den unseren, wenn auch Yin et al. eine deutlich kleinere Fallzahl untersuchten. Durch den geringen Methylierungsgrad von RB1, aber auch p15 und p16 formulierten sie die Annahme, dass die Methylierung dieser Gene eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung von Hirntumoren im Allgemeinen spielen.<sup>79</sup>

Anhand unserer Ergebnisse der RB1-Methylierung an 85 Patienten können wir die Aussage zumindest teilweise bestätigen – die Methylierung des RB1-Gens scheint bei der Entwicklung des Glioblastoms keine große Rolle zu spielen.

Auch Yu et al. beschäftigten sich mit dem Methylierungsstatus von Genen, welche bei der Entwicklung von Astrozytomen eine Rolle spielen könnten. Unter anderem waren 12 Glioblastome Teil der ausgewerteten Tumoren. Neben p14<sup>ARF</sup> und p15<sup>INK4b</sup> war auch im RB1-Gen bei keinem Glioblastom eine Methylierung festzustellen. Wie auch in den vorigen Studien kamen hier dieselben Methoden wie in unserer Studie zur Anwendung<sup>80</sup>.

Eine weitere Studie, welche sich mit der Promotormethylierung von Genen der Zellzykluskontrolle beschäftigt, wurde von Ohta et al. an malignen Astrozytomen durchgeführt. In die Studiengruppe eingeschlossen waren 31 Glioblastome und 23 anaplastische Astrozytome. Untersucht wurden neben RB1 die Gene p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p73. Gefunden wurde eine Methylierung des RB1-Promotors in drei der Tumoren, was einem Anteil von 6% der untersuchten Tumoren entspricht – dabei wurde allerdings nicht zwischen Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen differenziert.

Während 50% der Tumoren ein abnormes Promotor-Methylierungsmuster mindestens eines untersuchten Gens aufwiesen, waren in keinem der Tumoren drei oder mehr Gene betroffen. Interessanterweise fand sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Methylierungsstatus der Gene mit klinisch-pathologischen Parametern. Der Methylierungsstatus der Gene hatte weder einzeln noch in Kombination Einfluss auf das progressionsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben. Ohta et al. schlussfolgerten somit, dass die Promotormethylierung nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die Entwicklung maligner Hirntumoren spielen kann<sup>46</sup>.

Dies stimmt in Bezug auf RB1 mit unseren Ergebnissen überein.

Auf Gene des RB1-Signalweges und deren Expression in Astrozytomen spezialisierte sich eine 2015 von Ferreira et al. durchgeführte Studie. Analysiert wurden 58 Proben, von denen es sich bei 23 Fällen um Glioblastome handelte. Eine Methylierung des RB1-Promotors konnte in keiner der Proben festgestellt werden. Neben der Methylierung wurde außerdem die Expression unter anderem von RB1 in den in die Studie eingeschlossenen Tumoren

untersucht. Hier wurde deutlich, dass RB1 in Glioblastomen seltener exprimiert wird als in Astrozytomen niedrigerer Grade, und zwar 1,6-fach seltener als in diffusen Astrozytomen und 1,4-fach seltener als in anaplastischen Astrozytomen. Die Expression stellt sich somit stadienabhängig dar mit verminderter Expression in höheren Tumorstadien. Ferreira et al. schlussfolgerten somit, dass die Unterexpression von RB1 sowie CDKN2A und CDKN2B mit der Aggressivität des Tumors assoziiert sein kann<sup>17</sup>.

Methodisch wurde hier im Vergleich zu unserer Studie bzw. den anderen bereits genannten Studien anders gearbeitet. Ferreira et al. entschieden sich zur Verwendung der Bisulfit-Sequenzierung, einer der Bisulfit-Konversion folgenden DNA-Sequenzierung (BSP). Sie begründeten das mit der Vermutung, die BSP liefere genauere Ergebnisse als die MSP.

In der Polymerasekettenreaktion wurde eine Primerhybridisierung bei 52°C durchgeführt, dies ist 3°C kälter als in unserer Studie. Die amplifizierte DNA-Sequenz hatte eine Länge von 280 Basenpaaren. Trotz unterschiedlicher Methode konnte somit ein Ergebnis erzielt werden, das sich mit unseren Erkenntnissen deckt<sup>17</sup>.

Wie bereits erwähnt, wies in unserer Studie nur einer von 85 Patienten eine Methylierung des RB1-Promotors auf. Interessanterweise ist eben dieser Patienten der einzige Langzeitüberlebende unserer Studie und zugleich der einzige Patient, welcher aktuell noch am Leben ist. Dies kann aber selbstverständlich nicht statistisch ausgewertet werden.

## 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Glioblastom ist nach wie vor eine der aggressivsten Krankheiten und weist eine außerordentlich schlechte Prognose vor. Trotz vieler wissenschaftlicher Bemühungen konnte bislang kein großer Fortschritt bezüglich der Überlebenszeit der Patienten erzielt werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Methylierung des RB1-Promotors kein relevantes Ereignis in der Entstehung und Progression des Glioblastoms ist. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass sie ein sehr seltenes Geschehen bei Glioblastom-Patienten darstellt.

RB1 kann zwar eine Rolle beim Glioblastom spielen – allerdings nicht die epigenetische Regulation mittels Promotor-Methylierung.

Allerdings, der einzige Langzeitüberlebende unserer Studie wies eine RB1-Promotormethylierung auf. Inwieweit hier eventuell ein Zusammenhang mit komplexeren Methylierungsmustern besteht, bleibt offen.

Die Evaluation weiterer epigenetischer Marker wird zu verbesserten Erkenntnissen im Hinblick auf die Entstehung und Pathogenese der Erkrankung führen.

Am Beispiel von MGMT konnte bereits deren Relevanz bezüglich Prognose und Therapieentscheidung beim Glioblastom gezeigt werden.

Ziel muss sein, möglichst viele pathogenetische Mechanismen der Krankheitsentstehung zu entschlüsseln, um dahingehend zielgebundene Therapien etablieren zu können.



## Literaturverzeichnis

1. Adams H, Chaichana KL, Avedaño J, Liu B, Raza SM, Quiñones-Hinojosa A (2013)  
Adult Cerebellar Glioblastoma: Understanding Survival and Prognostic Factors Using  
a Population-Based Database from 1973 to 2009  
World Neurosurg. 80(6):e237-43
2. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD (2009)  
Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going.  
Expert Opin Investig Drugs 18(8):1061-1083
3. Allis CD, Jenuwein T. (2016)  
The molecular hallmarks of epigenetic control.  
Nat Rev Genet. 17(8):487-500
4. Bäcklund LM<sup>1</sup>, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, Ichimura K,  
Collins VP. (2003)  
Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1  
pathway in combination with no wild-type PTEN.  
Clin Cancer Res. 9(11):4151-4158
5. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. (2008)  
Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors.  
Acta Neuropathol. 116(6):597-602
6. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH. (1998)  
p14ARF links the tumour suppressors RB and p53.  
Nature. 395(6698):124-5 1992;171(96):563-571
7. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. (2012)  
Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma.  
J Neurooncol. 108(1):11-27
8. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. (1989)  
The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle.  
Cell. 58(6):1097-1105

9. Cadieux B, Ching TT, VandenBerg SR, Costello JF. (2006)  
Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation.  
Cancer Res. 66(17):8469-8476
10. Carén H, Pollard SM, Beck S. (2013)  
The good, the bad and the ugly: Epigenetic mechanisms in glioblastoma.  
Mol Aspects Med. 34(4):849-862
11. Chambless LB et al. (2015)  
The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme.  
J Neurooncol. 121(2):359-364
12. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994)  
High sensitivity mapping of methylated cytosines.  
Nucleic Acids Res. 22(15):2990-7
13. Combs SE<sup>1</sup>, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, Hartmann C. (2011)  
Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma : One step forward , and one step back ?  
Radiat Oncol. 6(1):115
14. Dahl C, Guldberg P. (2003)  
DNA methylation analysis techniques.  
Biogerontology. 4(4):233-250
15. Ellingson BM, Cloughesy TF, Pope WB, et al. (2012)  
Anatomic localization of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylated and unmethylated tumors: A radiographic study in 358 de novo human glioblastomas.  
Neuroimage. 59(2):908-916

16. Feinberg AP, Vogelstein B. (1983)  
Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.  
*Nature* 301(5895):89-92
17. Ferreira WAS et al. (2015)  
Expression Analysis of Genes Involved in the RB/E2F Pathway in Astrocytic Tumors.  
*PLoS ONE* 10(8): e0137259
18. Figueroa ME et al. (2010)  
Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation.  
*Cancer Cell*. 18(6):553-56
19. Friedman HS et al. (1998)  
DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma.  
*J Clin Oncol*. 16(12):3851-3857
20. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992)  
A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.  
*Proc Natl Acad Sci USA*. 89(5):1827-31
21. Gonzalez-Gomez P1, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, Isla A, Rey JA. (2003)  
CpG island methylation status and mutation analysis of the RBI gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours.  
*Br J Cancer*. 88(1):109-114
22. Hartmann C 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 Neuropathol*. 120(6):707-718

23. Hegi ME et al. (2005)  
MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.  
N Engl J Med. 352(10):997-1003
  
24. Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, et al. The Retinoblastoma Gene Is Involved in  
Mahgnant Progression of Astrocytomas. 1994.
  
25. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996)  
Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands  
Proc Natl Acad Sci U S A. 93(18): 9821–9826
  
26. Hilton DA, Penney M, Pobereskin L, Sanders H, Love S (2004)  
Histological indicators of prognosis in glioblastomas : retinoblastoma protein  
expression and oligodendroglial differentiation indicate improved survival.  
Histopathology. 44(6):555-60
  
27. Hotta T, Saito Y, Fujita H, Mikami T, Kurisu K, Kiya K, Uozumi T, Isowa G, Ishizaki K,  
Ikenaga M (1994)  
O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity of human malignant glioma and its  
clinical implications.  
J Neurooncol. 21(2):135-140
  
28. Ichimura K1, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP (1996)  
Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and  
CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene.  
Oncogene. 13(5):1065-72
  
29. Johnson DR, Fogh SE, Giannini C, Kaufmann TJ, Raghunathan A,  
Theodosopoulos PV, Clarke JL (2015)  
Case-based review: Newly diagnosed glioblastoma.  
Neuro-Oncology Pract. 2(3):106-121
  
30. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP (2007)  
MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis  
induced by alkylating agents.  
DNA Repair (Amst). 6(8):1079-1099

31. Karnofsky DA, Burchenal JH. (1949)  
The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer.  
In: MacLeod CM (Ed), Evaluation of Chemotherapeutic Agents. Columbia  
Univ Press, 196
32. Knudson AG. (1971)  
Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 68(4):820-3
33. Kristensen LS, Hansen LL. (2009)  
PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer  
diagnostics, prognostics, and response to treatment.  
Clin Chem. 55(8):1471-1483
34. Lacroix M et al. (2001)  
A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis,  
extent of resection, and survival.  
J Neurosurg. 95(2):190-198
35. Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Auvinen A (2007)  
Incidence of gliomas by anatomic location  
Neuro Oncol. 9(3): 319–325
36. Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B. (2011)  
Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in  
malignant gliomas.  
J Exp Clin Cancer Res. 30:76
37. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee  
WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. (2017)  
The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous  
System: a summary.  
Acta Neuropathol. 26(3):283-288
38. Luo RX, Postigo AA, Dean DC (1998)  
Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription.  
Cell. 92(4):463-73

39. Mrugala MM et al. (2014)  
Clinical practice experience with NovoTTF-100A™ system for glioblastoma: The Patient Registry Dataset (PRiDe)  
Semin Oncol. 41 Suppl 6:S4-S13
40. Nakamura M, Konishi N, Hiasa Y, Tsunoda S, Fukushima Y, Tsuzuki T, Takemura K, Aoki H, Kobitsu K, Sakaki T. (1996)  
Immunohistochemical detection of CDKN2, retinoblastoma and p53 gene products in primary astrocytic tumors.  
Int J Oncol. 8(5):889-893
41. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. (2001)  
Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas.  
Lab Invest. 81(1):77-82
42. N Nevins JR. (2001)  
The Rb/E2F pathway and cancer.  
Hum Mol Genet. 10(7):699-703
43. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. (2009)  
IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas.  
Clin Cancer Res. 15(19):6002-6007
44. Noushmehr H et al. (2010)  
Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma.  
Cancer Cell. 17(5):510-522
45. Ohgaki H1, Kleihues P. (2005)  
Epidemiology and etiology of gliomas.  
Acta Neuropathol. 109(1):93-108

46. Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ogino A, Komine C, Fukushima T. (2006)  
Aberrant promoter hypermethylation profile of cell cycle regulatory genes in malignant astrocytomas  
Oncol Rep. 16(5):957-963
47. Omuro A, DeAngelis LM (2013)  
Glioblastoma and Other Malignant Gliomas.  
Jama. 310(17):1842-50
48. Ostrom QT, Cote DJ, Ascha M, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2018)  
Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014  
JAMA Oncol. 4(9):1254-1262
49. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2016)  
CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013  
Neuro Oncol. 18(suppl\_5):v1-v75
50. Pearson A, Greenblatt J. (1997)  
Modular organization of the E2F1 activation domain and its interaction with general transcription factors TBP and TFIIH.  
Oncogene. 15(22):2643-2658
51. Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. (1995)  
A Bisulfite Method of 5-Methylcytosine Mapping That Minimizes Template Degradation.  
Anal Biochem. 226(1):161-6
52. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, et al.(2012)  
Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly.  
Int J Cancer. 131(6):1342-1350

53. Roa W et al. (2004)  
Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme : A Prospective Randomized Clinical Trial.  
J Clin Oncol. 22(9):1583-8
54. Rouse C, Gittleman H, Ostrom QT, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2016)  
Years of potential life lost for brain and CNS tumors relative to other cancers in adults in the United States, 2010.  
Neuro Oncol. 18(1):70-77
55. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P (1999)  
Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study.  
Ann Neurol. 46(2):183-188
56. Sellers WR, Kaelin WG (1997)  
Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer.  
J Clin Oncol. 15(11):3301-3312
57. Sellers WR, Rodgers JW, Kaelin WG (1995)  
A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites.  
Proc Natl Acad Sci U S A 92(25):11544-11548
58. Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T (2006)  
Methylation enrichment pyrosequencing: Combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing.  
Nucleic Acids Res. 34(11):e78
59. Sherr CJ (1996)  
Cancer cell cycles.  
Science 274(5293):1672-7
60. Sherr CJ, Roberts JM (1999)  
CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression.  
Genes Dev. 13(12):1501-1512



61. Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ BW (1983)  
Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D.  
Science. 219(4587):971-3
62. Srivenugopal KS, Yuan X-H, Friedman HS, Ali-Osman F. (1996)  
Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea  
Biochemistry 35(4):1328-1334
63. Strichman-Almashanu LZ et al. (2002)  
A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes.  
Genome Res. 12(4):543-554
64. Stupp R et al. (2005)  
Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.  
N Engl J Med. 352(10):987-996
65. Sturm D et al. (2012)  
Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma.  
Cancer Cell. 22(4):425-437
66. Suzuki H et al. (2015)  
Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas.  
Nat Genet. 47(5):458-468
67. Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, Guo J, Duff DJ, Xu D, Caldwell CW, Shi H (2007)  
Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing.  
Cancer Res. 67(18):8511-8518

68. van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, Kros JM, Zwarthoff EC (2006)  
Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss.  
J Pathol. 208(4):564-573
69. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN (1996)  
CDKN2/p16 or RB Alterations Occur in the Majority of Glioblastomas and Are Inversely Correlated.  
Cancer Res. 56(1):150-3
70. Waddington CH. (2012)  
The epigenotype. 1942.  
Int J Epidemiol. 41(1):10-13
71. Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. (2002)  
Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing.  
Methods. 27(2):101-7
72. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ (1997)  
Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA.  
Nucleic Acids Res. 25(21):4422-4426
73. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW (1997)  
Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene.  
Mol Cell Biol. 17(9):5612-5619
74. 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.  
J Clin Oncol. 27(34):5743-50
75. Wen PY, Kesari S. (2008)  
Malignant Gliomas in Adults.  
N Engl J Med. 359(5):492-507

76. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS (2001)  
Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature.  
Neuro Oncol. 4(4):278-299
77. Xu-Welliver M, Pegg AE. (2002)  
Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O6-alkylguanine-DNA  
alkyltransferase.  
Carcinogenesis 23(5):823-830
78. Yan H et al. (2009)  
IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas  
N Engl J Med. 360(8):765-73
79. Yin D, Xie D, Hofmann W, Miller CW, Black KL, Koeffler HP (2002)  
Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in  
human brain tumors.  
Oncogene 21(54):8372-8
80. Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J (2004)  
Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation  
behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma.  
BMC Cancer 4:65
81. Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H.  
Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: A  
population-based study.  
Neuroepidemiology. 32(1):21-9
82. Zhao S et al. (2009)  
Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and  
Induce HIF-1a.  
Science. 324(5924):261-5

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	GBM, HE, 200-fache Vergrößerung
Abb. 2	GBM, HE, 200-fache Vergrößerung
Abb. 3	RB1-Signalweg – gebräuchliches Schema
Abb. 4	Bisulfit-Konvertierung 1
Abb. 5	Bisulfit-Konvertierung 2
Abb. 6	Schematischer Ablauf der MS-PCR
Abb. 7	Immunhistochemie, IDH1 R132H mutiertes Glioblastom, 200-fache Vergrößerung
Abb. 8	Gelelektrophorese
Abb. 9	Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach Alter
Abb. 10	Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach Alter
Abb. 11	Cox-Regressionsanalyse IDH1-Mutationsstatus
Abb. 12	Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach MGMT-Status
Abb. 13	Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach MGMT-Status
Abb. 14	Kaplan-Meier-Analyse Gesamtüberleben nach Karnofsky-Index
Abb. 15	Kaplan-Meier-Analyse Progressionsfreies Überleben nach Karnofsky-Index
Abb. 16	cMRT-Verlauf bei Patient 79 (T1-Wichtung)

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Durchführung der Bisulfit-Konvertierung im Thermal Cycler
Tab. 2	Bestandteile des PCR-Mastermix
Tab. 3	Zeitlicher Ablauf der MS-PCR
Tab. 4	Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der Objektträger
Tab. 5	Ergebnisse der Studie
Tab. 6	univariate Cox-Regressionsanalyse Alter bei ED/ Gesamtüberleben (OS)
Tab. 7	univariate Cox-Regressionsanalyse Alter bei ED/Progressionsfreies Überleben (PFS)
Tab. 8	univariate Cox-Regressionsanalyse Karnofsky-Index/ Gesamtüberleben (OS)
Tab. 9	univariate Cox-Regressionsanalyse Karnofsky-Index/ Progressionsfreies Überleben (PFS)

# Anhang

## Pufferverzeichnis

### TBE-Puffer 5x

54 g Tris-Base  
27,5 g Borsäure  
1,86 g EDTA

Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen und pH 8 einstellen.

### SE-Puffer

75 mM Natriumchlorid (4,38g)  
25 mM EDTA (8,9g)

Mit Aqua dest. Auf 1 Liter auffüllen und pH 8 einstellen.

### TE-Puffer 1x

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)  
1 mM EDTA (pH 8)

### SDS (10%)

10 g Natriumdodecylsulfat  
80 ml Aqua dest.

Bei 68°C erhitzen, anschließend auffüllen mit Aqua dest. auf 100ml und pH 7,2 einstellen

### Proteinase K Stammlösung

20mg Proteinase K in 1ml Aqua dest. lösen.

### Tris-Puffer (10%)

900 ml Aqua dest.  
100 ml Dako Wash Buffer(10x)

## Chemikalienverzeichnis

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
Hot Star taq-Polymerase	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Isopropanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt
EZ DNA Methylation Gold Kit	Zymo Research, Irvine, USA
PCR Positivkontrolle methylierte DNA	Zymo Research, Irvine, USA
50bp DNA Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
6x Blue Loading Dye(=Ladepuffer)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
EDTA	Sigma, Osterode am Harz
Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
PCR-Puffer	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Primer	Eurofins Genomics, Ebersberg
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, Osterode am Harz
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol (Isomerengemisch bestehend aus Ethylbenzol, m-Xylol, c-Xylol und p-Xylol)	Otto Fischar GmbH & CoKG, Saarbrücken
Wasserstoff-Peroxid-Lösung 30%	Otto Fischar GmbH & CoKG, Saarbrücken
Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (10x)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Dako Wash Buffer 10x	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Anti-IDH1 R132H	Dianova GmbH, Hamburg
EnVisionP FLEX+ MOUSE LINKER	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Dako REALP Antibody Diluent	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Kupfer-(II)-Sulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Shandon Instant Hematoxylin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Bluing Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck KGaA, Darmstadt

## Geräteverzeichnis

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Kühlzentrifuge Zentrifuge	Sigma 3-16 PK, Osterode am Harz Anachem Hyspin 16K, Leicester, UK
Zentrifuge	VWR Galaxy MiniSpin, Radnor, USA
Vortex/Minishaker	IKA MS1, Staufen i. Br.
Überkopfschüttler	GFL, Großburgwedel
Schüttelwasserbad	GFL 1080, Großburgwedel
Heizplatte	Medite OTS40, Burgdorf
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermal Cycler	MJ-Research Inc. PTC-100, St. Bruno, CAN
Waage	Sartorius H110, Göttingen
Elektrophoresekammer	OWL-System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektrophorese-Stromzuführung	EPS 301 Powersupply, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wärmeschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon™ Plastic Coverplates	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dampfgarer Philips Pure Essentials	Philips, Amsterdam, NL



## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Joachim Oertel, für die Möglichkeit zur Erstellung einer Dissertation an der Klinik für Neurochirurgie sowie für die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Großer Dank gebührt auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für ihre Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie ihr stets offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Christoph Sippl danke ich sehr für die zahlreichen Anregungen sowie die engagierte Unterstützung bei der experimentellen Arbeit im Labor. Auch für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schulz-Schaeffer und Herrn Dr. med. Arne Wrede vom Institut für Neuropathologie für die Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gebührt ebenso Frau Sigrid Welsch sowie dem gesamten Laborteam, deren Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Malte Simon danke ich für seinen Rat sowie für seine Hilfe beim Gegenlesen der Arbeit.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, die mich in außerordentlichem Maß während der Arbeit unterstützt haben.

## **Curriculum Vitae**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.