

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

**Die Rolle des DNA-Reparaturenzyms Alkylpurin-DNA-N-Glycosylase (APNG)
in Glioblastomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Charlott Elise Köhler

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Reifenger

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Esposito

Für Manfred Rosellen
(*Dezember 1958 - †Juli 2012)

Zusammenfassung

Das Glioblastom ist ein hochmaligner Hirntumor mit nur geringen Langzeitüberlebenschancen für die betroffenen Patienten. Neben der neurochirurgischen Tumorresektion und nachfolgender Strahlentherapie ist die systemische Chemotherapie mit dem DNA-alkylierenden Zytostatikum Temozolomid (TMZ) ein wichtiger Bestandteil in der Therapie des Glioblastoms. Allerdings sprechen einige Patienten nicht auf die Therapie mit TMZ an oder entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine Resistenz gegenüber dem Therapeutikum. Die vorliegende Arbeit adressiert die mögliche Rolle des DNA-Reparaturenzyms Alkylpurin-DNA-N-Glycosylase (APNG) in der Resistenz von Glioblastomen gegenüber Temozolomid und untersucht die prognostische Bedeutung der Expression von APNG auf mRNA- und Proteinebene in diesen Tumoren. Dazu wurden insgesamt 81 Glioblastome ohne Mutation der Isozitatdehydrogenase (IDH) Gene 1 und 2 (IDH-Wildtyp Glioblastome) sowie neun IDH-mutierte Glioblastome und 25 IDH-mutierte niedriggradigere Gliome mittels Echtzeit-Reverse Transkriptase-PCR auf die Expression von *APNG* mRNA in Relation zu nicht-neoplastischem Hirngewebe untersucht. In Tumoren mit erniedrigter relativer *APNG* mRNA-Expression wurde der Methylierungsstatus der Promotorregion des *APNG* Gens untersucht. Zusätzlich wurde die *APNG* mRNA-Expression in Temozolomid-resistenten Glioblastomzelllinien analysiert. Auf Proteinebene wurde die APNG-Expression immunhistologisch in 52 IDH-Wildtyp Glioblastomen untersucht und mit dem Überleben der Patienten korreliert.

In allen untersuchten Tumoren konnte auf mRNA-Ebene eine signifikant gesteigerte *APNG* Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Hirngewebe nachgewiesen werden. Während sich zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Tumoren keine Unterschiede in der *APNG* mRNA-Expression fanden, zeigten IDH-mutierte Astrozytome des WHO Grades II im Vergleich zu IDH-mutierten Glioblastomen des WHO Grades IV eine erhöhte *APNG* mRNA-Expression. Hinweise auf eine Promotormethylierung als möglicher epigenetischer Regulationsmechanismus der *APNG*-Genexpression in Gliomen waren in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar. In den untersuchten TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien fand sich eine nicht-signifikante Tendenz zu einer niedrigeren *APNG* mRNA-Expression. Immunhistologisch konnte bei 47% der untersuchten Tumoren eine erhöhte APNG-Proteinexpression nachgewiesen werden, allerdings fand sich keine signifikante Korrelation zwischen *APNG* mRNA-Expression und APNG-Proteinexpression. Eine erhöhte APNG-

Proteinexpression war in der untersuchten Kohorte von Glioblastompatienten mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert.

Die bislang vorliegenden Daten zur Rolle der APNG-Expression für die TMZ-Resistenz und deren prognostische Bedeutung beim Glioblastom sind widersprüchlich. So wurde berichtet, dass eine erhöhte APNG-Expression einerseits zu einer gesteigerten TMZ-Resistenz von Glioblastomen führt und andererseits aber mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte *APNG*-mRNA-Expression in IDH-Wildtyp Glioblastomen und IDH-mutierten Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied der APNG-Expression in Abhängigkeit von der TMZ-Resistenz fand sich in Glioblastomzelllinien dagegen nicht. Eine erhöhte APNG-Proteinexpression war in Patienten mit einem IDH-Wildtyp Glioblastom mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert. Ein Ergebnis der eigenen Arbeit, das weiter untersucht werden sollte, ist die beobachtete Assoziation der *APNG* mRNA-Expression mit der WHO-Gradierung in IDH-mutierten astrozytären Gliomen. Dieser Befund sollte durch weitere Untersuchungen einer größeren, unabhängigen Patientenkohorte überprüft werden.

Summary

Glioblastoma is a highly malignant brain tumor with short survival for the patient. In addition to neurosurgical tumor resection and subsequent radiation therapy, systemic chemotherapy with the DNA-alkylating cytostatic agent temozolomide (TMZ) is an important component in the therapy of glioblastoma. However, some patients do not respond to therapy with TMZ or develop resistance to the therapeutic agent as the disease progresses. The present work investigates the possible role of the DNA repair enzyme alkylpurine-DNA-N-glycosylase (APNG) in the resistance of glioblastomas to temozolomide and the prognostic significance of the expression of *APNG* at the mRNA and protein level in these tumors. For this purpose, a total of 81 glioblastomas without mutation of the isocitrate dehydrogenase (IDH) genes 1 and 2 (IDH wild-type glioblastomas) as well as nine IDH-mutated glioblastomas and 25 IDH-mutated lower-grade gliomas were analyzed using real-time reverse transcriptase PCR for the expression of *APNG* mRNA in relation studied on non-neoplastic brain tissue. The methylation status of the promoter region of *APNG* gene was investigated in tumors with reduced relative *APNG* mRNA expression. In addition, the *APNG* mRNA expression in temozolomide-resistant glioblastoma cell lines was analyzed. To determine the protein level, the APNG expression was examined immunohistologically in 52 IDH wild-type glioblastomas and correlated with the survival of the patients. In all examined tumors, a significantly increased APNG expression in tumor tissue compared to normal brain tissue could be demonstrated at the mRNA level. While there were no differences in *APNG* mRNA expression between IDH-mutated and IDH-wild-type tumors, IDH-mutated astrocytomas of WHO grade II showed increased *APNG* mRNA expression compared to IDH-mutated glioblastomas of WHO grade IV. Indications of promoter methylation as a possible epigenetic regulation mechanism of *APNG* gene expression in gliomas were not found. In the TMZ-resistant glioblastoma cell lines was a non-significant tendency towards lower *APNG* mRNA expression detected. An increased APNG protein expression could be demonstrated immunohistologically in 47% of the examined tumors, but no significant correlation was found between APNG mRNA expression and APNG protein expression. In the cohort of glioblastoma patients investigated, increased APNG protein expression was associated with longer overall survival. The data available to date on the role of APNG expression in TMZ resistance and its prognostic significance in glioblastoma are contradictory. It has been reported that increased APNG expression on the one hand leads to increased TMZ resistance of glioblastomas and on the other hand is associated with longer patient survival. In the present work, an increased *APNG*-mRNA expression in IDH wild-type glioblastomas and

IDH-mutated gliomas compared to non-neoplastic brain tissue could be demonstrated. In contrast, there was no significant difference in APNG expression depending on TMZ resistance in glioblastoma cell lines. Increased APNG protein expression was associated with longer overall survival in patients with IDH wild-type glioblastoma. One result that should be further investigated is the observed association of *APNG* mRNA expression with WHO grading in IDH-mutated astrocytic gliomas. This finding should be verified by further examinations of a larger, independent patient cohort.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastome.....	1
1.1.1	Allgemeine Grundlagen und Klassifikation.....	1
1.1.2	Klinik und Therapie	3
1.1.3	Molekulargenetik der Glioblastome	5
1.1.3.1	IDH-Mutationsstatus	5
1.1.3.1.1	IDH-Wildtyp Glioblastome.....	5
1.1.3.1.2	IDH-mutierte Glioblastome.....	7
1.1.3.2	<i>MGMT</i> Promotormethylierung als prädiktiver und prognostischer Marker	8
1.2	Das DNA-Reparaturenzym APNG.....	10
1.2.1	Allgemeine Aspekte	10
1.2.2	Die Rolle von <i>APNG</i> als prognostischer Marker	12
2	Ziele der Arbeit.....	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Untersuchte Patientenkohorten und Tumorgewebeprobe n	15
3.1.2	Verwendete Primer.....	19
3.1.3	Enzyme und Reagenzien für die Polymerasekettenreaktionen	20
3.1.4	Verwendete Puffer.....	21
3.1.5	Verwendete Kits	21
3.1.6	Verwendete Antikörper	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Polymerasekettenreaktion	23
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	24
3.2.3	Extraktion von Nukleinsäuren aus tiefgefrorenen Tumorgewebeprobe n.....	24
3.2.4	cDNA Synthese aus mRNA	25

3.2.5	Expressionsanalyse mittels Real Time-Reverser Transkriptase-PCR.....	26
3.2.6	Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit	28
3.2.7	DNA-Sequenzierung nach Sanger	28
3.2.8	Methylierungsspezifische PCR (MSP).....	29
3.2.9	Untersuchung der <i>APNG</i> mRNA-Expression in Gliomzellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A	30
3.2.10	Untersuchung der <i>APNG</i> mRNA-Expression in Temozolomid-resistenten versus -sensitiven Gliomzellen.....	32
3.2.11	Immunhistochemische Analyse der APNG-Expression in Glioblastomen.....	32
3.2.11.1	Auswertung der APNG-Proteinexpression	32
3.2.12	Statistische Analysen.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	<i>APNG</i> mRNA-Expression in Gliomen.....	34
4.2	<i>APNG</i> mRNA-Expression in parentalen versus Temozolomid-resistenten Gliomzellen	38
4.3	Methylierungsanalyse des <i>APNG</i> -Promotors in ausgewählten Gliomen	39
4.3.1	Bisulfit-Sequenzierung der <i>APNG</i> -assoziierten 5'-CpG-Insel	39
4.3.2	<i>APNG</i> mRNA-Expression in 5-AZA- oder TSA-behandelten Glioblastomzelllinien	41
4.3.3	Methylierungsspezifische PCR	43
4.4	APNG-Proteinexpression in Glioblastomen und Korrelation zur <i>APNG</i> mRNA-Expression	45
4.5	Prognostische Bedeutung der APNG mRNA- und Proteinexpression in Glioblastompatienten	49
5	Diskussion	51
5.1	<i>APNG</i> mRNA-Expression in Gliomen.....	51
5.2	Regulation der <i>APNG</i> mRNA-Expression durch Promotormethylierung.....	52
5.3	APNG-Proteinexpression in Gliomen und Korrelation mit der APNG mRNA-Expression	54

5.4 Prognostische Relevanz der APNG-Expression in Glioblastomen	56
Literaturverzeichnis.....	60
Anhang	67
Danksagung.....	71

1 Einleitung

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste primäre Hirntumor des Erwachsenenalters und trotz intensiver Behandlung bislang kurativ nicht zu therapieren (Weller et al. 2015a) (Reifenberger et al. 2017). Für die Betroffenen ist die Diagnose niederschmetternd, gerade auch in Hinblick auf die an die Operation anschließende kräftezehrende Therapie, die zwar lebensverlängernd wirkt, aber im Regelfall nicht zu einer dauerhaften Heilung führt (Weller et al. 2017). Daher besteht ein großes Forschungsinteresse, das Glioblastom in seiner Entstehung und seinem Verlauf besser zu verstehen, um bestehende Therapieoptionen nicht nur zu optimieren, sondern auch um individuellere, besser wirksame Therapieansätze neu zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit will einen wissenschaftlichen Beitrag zum besseren Verständnis molekularer Veränderungen in Glioblastomen leisten und legt dabei den Fokus auf die mögliche Rolle der veränderten Expression des DNA-Reparaturenzyms Alkylpurin-DNA-N-Glycosylase (APNG) für das Ansprechen von Glioblastomen auf eine DNA-alkylierende Chemotherapie und die Prognose von Glioblastompatienten. Die Arbeit baut dabei auf publizierte Ergebnisse einer andere Arbeitsgruppe auf, die berichtete, dass APNG mit einer Resistenz gegenüber der in der Behandlung von Glioblastomen üblichen Chemotherapie mit Temozolomid und ungünstiger Prognose assoziiert ist (Fosmark et al. 2017), was allerdings von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt wurde (Wiestler et al. 2013), (Agnihotri et al. 2012), so dass insgesamt eine widersprüchliche Literaturlage zur Bedeutung von APNG in Gliomen besteht.

1.1 Glioblastome

1.1.1 Allgemeine Grundlagen und Klassifikation

Das Glioblastom gehört zur Gruppe der Gliome, welche die häufigsten malignen Tumoren des zentralen Nervensystems (80%) darstellen, und ist insgesamt der häufigste maligne primäre Hirntumor im Erwachsenenalter (Ostrom et al. 2015). Gliome werden gemäß *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System (WHO-Klassifikation) 2016* basierend auf einer histologischen Typisierung und der Bestimmung molekulargenetischer Marker eingeteilt (Louis et al. 2016). Zusätzlich erfolgt eine Gradierung

von WHO-Grad I (benigne) bis WHO-Grad IV (hochmaligne) anhand von histologischen Merkmalen, wie z.B. der Mitoserate und dem Vorliegen von Tumornekrosen und pathologischen Gefäßproliferaten. Die WHO-Grad II–IV diffusen Gliome werden nach ihrem *Isocitratdehydrogenase 1-* oder *2-*Mutationsstatus (*IDH1/2*) in IDH-mutierte und IDH-Wildtyp Gliome eingeteilt. Anschließend erfolgt eine weitere Einteilung der Tumoren mittels zusätzlicher molekulargenetischer Marker. IDH-mutierte Gliome mit einer Kodeletion der Chromosomenarme 1p und 19q sowie Mutationen im (*Telomerase Reverse Transcriptase*) *TERT*-Promotor werden zur Gruppe der oligodendroglialen Tumore gezählt (Suzuki et al. 2015), während die astrozytären WHO-Grad II und III Tumoren zusätzlich zur IDH-Mutation Veränderungen im Tumorsuppressorgen *TP53* und im *ATRX*-Gen, welches für eine ATP-abhängige Helicase kodiert, aufweisen (Brat et al. 2015). WHO-Grad IV Glioblastome mit IDH-Mutation sind eher selten (<10% aller Glioblastome), treten häufiger bei jüngeren Erwachsenen auf und entwickeln sich meist aus einer vorbestehenden niedriggradigen Läsion (sekundäre Glioblastome). Glioblastome ohne IDH-Mutation machen 100% der IDH-Wildtyp Gliome aus. Sie entstehen meist *de novo* ohne Vorläuferläsion (primäre Glioblastome). Molekulargenetisch weisen sie häufig Mutationen im *TERT*-Promotor, eine Amplifikation des Gen für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*EGFR*) sowie Verluste von Chromosom 10 und Gewinne von Chromosom 7 auf (Brat et al. 2018). In seltenen Fällen können, z.B. aufgrund von nicht ausreichendem Gewebe, keine Aussagen zum molekularen Status des Glioms getroffen werden. Diese Tumore werden als „nicht weiter spezifiziert“ (*not otherwise specified* NOS) bezeichnet und anhand ihrer histologischen Eigenschaften klassifiziert (Louis et al. 2016).

Das Glioblastom weist ein destruierendes und infiltrierendes Wachstum im Gehirn auf. Das Hauptmanifestationsalter liegt im 6.-7. Lebensjahrzent und das mediane Patientenüberleben beträgt in populationsbasierten Studien ca. 12 Monate und in klinischen Studien ca. 14-17 Monate (Reifenberger et al. 2017). Dabei bestehen bezüglich des Manifestationsalters und der Aggressivität Unterschiede zwischen den Glioblastomen abhängig vom IDH-Status. Die häufig aus niedriggradigen diffusen Gliomen entstehenden IDH-mutierten Glioblastome treten häufiger in jüngeren Lebensjahren (mittleres Erkrankungsalter: ~ 45 Jahre) auf (Thakkar et al. 2014). Den Großteil der Glioblastome (ungefähr 90% aller Glioblastome) bilden allerdings *de novo* entstandene (primäre) IDH-Wildtyp Glioblastomen (mittleres Erkrankungsalter: ~ 62 Jahre).

Meistens ist das Glioblastom in den Großhirnhemisphären, vor allem im frontotemporalen Bereich, lokalisiert. Außer Exposition mit ionisierender Strahlung im Schädelbereich sind

bislang keine eindeutigen weiteren exogenen Noxen von relevanter Bedeutung für die Entstehung eines Glioblastoms bekannt (Schlegel et al. 2003).

Morphologisch führt das invasiv-destruierende Wachstum des Glioblastoms nicht selten im Bereich des Balkens zu einem kontralateralen Hemisphärenbefall, im Sinne eines Schmetterlingsglioms (Louis et al. 2016). Radiologisch imponiert das Glioblastom meist als eine Kontrastmittel-anreichernde Raumforderung mit zentraler, hypodenser Nekrose und einer zirkulären Zone vermehrter Kontrastmittelanreicherung (sogenannte Ringstruktur). Makroskopisch zeigt sich eine „bunte“ Schnittfläche eines grau-weißlichen Tumors mit gelblichen Nekrosen und rötlichen Einblutungen. Mikroskopisch finden sich flächenhafte Nekrosen mit pallisadenartig angeordneten Tumorzellen und vielen glomerulumartigen Gefäßproliferaten sowie Blutungsresiduen. Es befinden sich, dem schnellen Wachstum entsprechend, meist zahlreiche Mitose-Figuren. Im Gegensatz zu den niedriggradigen Astrozytomen ist das mikroskopische Bild insgesamt zellreicher und die Nekrosen sind die determinierende Komponente (Stoyanov und Dzhakov 2018). Als Ursprung der Tumorzellen werden neurogliale Stamm- oder Vorläuferzellen diskutiert (Weller et al. 2017; Westphal und Lamszus 2011)(Almeida Sassi et al. 2012).

1.1.2 Klinik und Therapie

Das mittlere Überleben nach Diagnosestellung liegt bei Glioblastompatienten trotz Therapie lediglich bei 12-14 Monaten (Weller et al. 2017). Dies ist unter anderem auf das rasche und destruierende Wachstum und dem damit verbundenen, rapide progredienten Krankheitsverlauf zurückzuführen. Typische allgemeine Symptome der Erkrankung sind Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, Zeichen eines steigenden Hirndrucks und Psychosen hirngenen Ursprungs. Bei größeren Tumorgefäßarrosionen kann es zu intratumoralen Blutungen mit apoplektischen Verläufen kommen. Je nach Lokalisation kommt es auch zu fokalen neurologischen Ausfallsymptomen, wie z.B. Lähmungen oder einer Aphasie.

Faktoren, die einen günstigen Einfluss auf die Prognose haben, sind ein jüngeres Patientenalter (< 60 Jahren), ein hoher Karnofsky-Index (> 90) vor Behandlung sowie eine radikale chirurgische Resektion des Tumors, gefolgt von einer kombinierten Radio- und Chemotherapie (Koch 2008). Die Behandlung des Glioblastoms setzt sich aus der neurochirurgischen Resektion gefolgt von einer Kombination aus Röntgenbestrahlung und einer Chemotherapie nach dem sog. Stupp-Schema zusammen (Stupp et al. 2005). Dabei gilt die oral verabreichte Substanz Temozolomid als Standard Therapeutikum (Stupp et al. 2009).

Eine vollständige operative Entfernung des Tumorgewebes ist bei mikroskopischer Infiltration in das umgebende gesunde Hirngewebe oft nicht möglich und so kommt es im Verlauf der Erkrankung meist zu Rezidivtumoren im Randgebiet der Resektionshöhle. In neueren Therapieansätzen wurden daher unmittelbar nach der Resektion sogenannte „Wafers“ in die ehemalige Tumorbett gelegt. Es handelt sich hierbei um biologisch abbaubare Polymere mit darin eingeschlossenen Chemotherapeutika. Die polymere Grundstruktur löst sich im Verlauf von Wochen auf und gibt die Chemotherapeutika an das umgebende ehemalige Tumorbett ab. Verwendet wird hier meist die alkylierende Substanz BCNU, ein Nitrosoharnstoff-Derivat. In einzelnen klinischen Studien konnte durch diese Methode eine kurzfristige Verlängerung der postoperativen Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden (Pallud et al. 2015), insgesamt hat sich mit diesem Ansatz aber kein wesentlicher Durchbruch in der Behandlung des Glioblastoms gezeigt, sodass er nicht in die Standardtherapie übernommen wurde (Weller et al. 2017). Ein neuerer Therapieansatz, der zusätzlich zur Radiochemotherapie verabreicht wird, besteht in der Applikation von Wechselstromfeldern, was in einer klinischen Studien einen Überlebensvorteil gezeigt in der Primärtherapie (Stupp et al. 2017), allerdings vielfach noch skeptisch gesehen (Lassman et al. 2020).

1.1.3 Molekulargenetik der Glioblastome

Im Folgenden werden unter Berücksichtigung der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (Louis et al. 2016) die Unterschiede zwischen IDH-Wildtyp und IDH1-mutierten Glioblastomen anhand entscheidender molekulargenetischer Marker erläutert.

1.1.3.1 IDH-Mutationsstatus

Als wichtiger Marker für die Unterscheidung der Gliomsubtypen hat sich der Isocitratdehydrogenase 1/2 (IDH)-Mutationsstatus gezeigt. Dabei wird zwischen IDH-Wildtyp Tumoren und IDH-mutierten Tumoren unterschieden (Reifenberger et al. 2017). Diffuse Gliome mit IDH-Mutation sind mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert (Noussmehr et al. 2010).

Bei mehr als 90% der IDH-mutierten Gliome findet sich die IDH-Mutation an der ersten oder zweiten Base des Codons 132 und führt zu einem Aminosäureaustausch, darunter am häufigsten zur Mutation IDH1-R132H (Hartmann et al. 2009). Diese Mutation kann immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen das mutierte Genprodukt im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Louis et al. 2016). Andere Mutationen sind seltener, darunter fallen R132C (ca. 4%), R132G (ca. 2%), R132S (ca. 1,5%) und R132L (ca. 2,5%). *IDH2*-Mutationen finden sich im Codon 172 und sind eher selten (Ohgaki und Kleihues 2013).

1.1.3.1.1 IDH-Wildtyp Glioblastome

IDH-Wildtyp Glioblastome, früher als primäre Glioblastome bezeichnet, finden sich meist bei Patienten, die älter als 50 Jahre sind, und entstehen spontan mit einer kurzen Vorgeschichte bis zur Diagnosestellung. Andere Gliomerkrankungen kommen in der Vorgeschichte dieser Patienten nicht vor. Die IDH-Wildtyp Glioblastome machen mehr als 90% aller Glioblastome aus und das mittlere Überleben der Patienten liegt trotz Operation, Chemo- und Strahlentherapie im Bereich von nur 12-16 Monaten (Louis et al. 2016).

Bei Patienten, die älter als 55 Jahre sind und Lokalisation des Glioblastoms außerhalb der zentralen Mittellinie, reicht zur Klassifikation eines IDH-Wildtyps die negative immunhistochemische Färbung gegen IDH1-R132H im Tumorgewebe aus. Bei jüngeren Patienten (< 55 Jahre) oder einer anamnestisch bekannten niedriggradigen Gliomerkrankung

sollte bei immunhistochemisch fehlendem Nachweis einer IDH1-R132H-Mutation eine zusätzliche Analyse des Tumorgewebes mittels DNA-Sequenzierung erfolgen, um andere IDH-Mutationen sicher ausschließen zu können (Reifenberger et al. 2017).

Das IDH-Wildtyp Glioblastom weist weitere charakteristische molekulargenetische Veränderungen auf. Dabei ist meistens eine Kombination aus Verlust von Chromosom 10 (> 60%), einer Trisomie von Chromosom 7 (> 60%) und einer homozygoten Deletion/Mutation oder Hypermethylierung des *CDKN2A*-Tumorsuppressorgens auch dem Chromosomenarm 9p nachweisbar (Brennan et al. 2013). Besonders häufig (ca. 80%) finden sich beim IDH-Wildtyp Glioblastom Mutationen im Promotorbereich des *TERT*-Gens, die zu einer vermehrten Transkription von *TERT* führen (Killela et al. 2013; Louis et al. 2016).

In 60% aller IDH-Wildtyp Glioblastome finden sich homozygote Deletionen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B*, deren Genprodukte wichtige Regulatoren des Retinoblastom- und des p53-Signalweges sind und deren Deletion zur Störung der Kontrolle von Zellzyklusprogression und Apoptose führt (Aldape et al. 2015). Auch Mutationen des *TP53*-Gens selbst (28-35%) spielen bei der Tumorentstehung eine Rolle (Schlegel et al. 2003).

Eine Amplifikation des *EGFR*-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (7p12), ist in ca 40% aller IDH-Wildtyp Glioblastome nachweisbar und führt zu einer Überexpression von EGFR auf mRNA und Proteinebene (Aldape et al. 2015). In ca 50% der *EGFR*-amplifizierten Glioblastome findet sich zusätzlich meist eine Deletion der *EGFR* Exone 2-7, entsprechend der EGFR Variante III (EGFRvIII), die konstitutive aktiv ist und über eine erhöhte Kinaseaktivität zu gesteigerter Zellproliferation führt (Aldape et al. 2015).

In 30-40% der IDH-Wildtyp Glioblastome ist eine Mutation oder Deletion des Tumorsuppressorgens *PTEN* vorhanden, das auf Chromosom 10 (10q23) lokalisiert ist und als Inhibitor des Proteinkinase B/AKT-Signalweges fungiert (Knobbe et al. 2002). Weitere genetische Veränderungen umfassen Mutationen im Neurofibromatose Typ 1 (NF1) Gen, Amplifikationen der Gene *CDK4*, *CDK6*, *PDGFRA*, *MDM2* oder *MDM4*, sowie zahlreiche weitere, seltenere Mutationen (Brennan et al. 2013; Ceccarelli et al. 2016).

1.1.3.1.2 IDH-mutierte Glioblastome

Eine IDH-Mutation findet sich in weniger als 10% aller Glioblastome, vor allem bei jüngeren Patienten (unter 50 Jahren) (Louis et al. 2016). Die IDH-Mutationen stellen ein frühes Ereignis in der Gliomentwicklung dar, da sie meist in allen Tumorzellen nachweisbar ist und bereits in diffusen Astrozytomen des WHO Grades II vorkommt. Eine IDH-Mutation verursacht eine Veränderung der normalen Enzymtätigkeit der Isocitratdehydrogenase, d.h., dass das mutierte Enzym nicht mehr zu einer Bildung von α -Ketoglutarat sondern zu einer Produktion des Onkometaboliten D-2-Hydroxyglutarat (D2HG) führt (Dang et al. 2009). D-2-Hydroxyglutarat inhibiert verschiedene α -Ketoglutarat-abhängige Deoxygenasen und es kommt zur verstärkten Methylierung der DNA und der Histone (Dang et al. 2009; Xu et al. 2011). Die Hypermethylierung der Promotorregion eines Gens, die häufig in den am 5'-Ende eines Gens gelegenen Cytosin-Guanin-Inseln (CpG-Inseln) stattfindet, kann zur Hemmung der Transkription eines Gens führen. Das Phänomen einer globalen CpG-Hypermethylierung der DNA in IDH-mutierten Gliomen wird als "Glioma-CpG-methylated phenotype" (G-CIMP) bezeichnet (Turcan et al. 2012; Nounmehr et al. 2010). IDH-mutierte und G-CIMP-positive Glioblastome werden als eigenständige molekulare Subgruppe mit im Vergleich zu IDH-Wildtyp Glioblastomen günstigere Prognose aufgefasst (Malta et al. 2018). Gemäß aktuellen Empfehlungen zur Klassifikation von Tumoren des Nervensystems sollen diese Tumoren nicht mehr als IDH-mutierte Glioblastome sondern als Astrozytome, IDH-mutiert, WHO-Grad 4 bezeichnet werden (Brat et al. 2020; Brat et al. 2019).

In Gliomen wurde auch eine Inhibition der Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges durch das mutierte IDH-Protein beobachtet (Birner et al. 2014). In IDH-mutierten Glioblastomen finden sich als weitere molekulargenetische Merkmale vor allem Mutationen in den Genen *TP53* (81%) und *ATRX* (71%). Mutationen von *ATRX* führen zu einer verminderten nukleären Expression des Proteins, die immunhistochemisch nachweisbar ist und als diagnostischer Marker verwendet wird (Louis et al. 2018). *ATRX* Mutationen können in einer Instabilität der DNA sowie verminderter DNA Reparatur führen und stellen einen alternativen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Telomeren dar (Koschmann et al. 2016) (Masui et al. 2018). Dabei sind Kombinationen von *ATRX*- und *TP53*-Mutationen charakteristisch für einen astrozytären Ursprung (Wiestler et al., 2013), im Gegensatz zu kombinierten Deletionen der Chromosomenarme 1p und 19q, die bei oligodendroglialen Gliomen zu finden sind (Riemenschneider et al., 2013).

1.1.3.2 *MGMT* Promotormethylierung als prädiktiver und prognostischer Marker

Ein wichtiger epigenetischer Mechanismus der Regulation der Genexpression, der zu einer veränderten Gentranskription von Genen in Tumoren führen kann, ist eine aberrante DNA Methylierung in regulatorischen Genbereichen, insbesondere im Promotorbereich. Jedem Gen ist eine Kontrollsequenz (Promotor) vor dem zu transkribierenden Genabschnitt vorgeschaltet, über welche die Transkription durch Bindung von Transkriptionsfaktoren gesteuert werden kann. In diesem Abschnitt können vermehrt 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'-Dinukleotide, sogenannte CpG-Dinukleotide, vorkommen, was dann als CpG-Insel bezeichnet wird. Durch verstärkte Methylierung der CpG-Inseln kann die Transkription eines Gens inhibiert werden. Das Gen wird dann nicht mehr exprimiert und das entsprechend fehlende Protein kann seine Funktion nicht mehr ausüben (vgl. Jones 2012).

Beim Glioblastom ist die Methylierung des *MGMT*-Gens die häufigste Promotormethylierung und ein wichtiger prädiktiver und prognostischer Marker (Wick et al. 2014). Das auf Chromosom 10 (10q26) lokalisierte Gen kodiert für das DNA-Reparaturenzym O6-Methylguanin-Methyltransferase, das am O6-Atom alkyliertes Guanin durch Transfer der Alkylgruppe auf eine enzymeigene Cysteinkette repariert, ohne das Guanin aus der DNA zu entfernen (Fahrer und Kaina 2013). Eine DNA-Alkylierung, z.B. am O6-Atom des Guanins, kann durch endogene Faktoren (körpereigene Stoffwechsel) oder exogene Faktoren (Umwelt, Nahrung, Chemotherapeutika) entstehen und ohne Reparatur zur Verhinderung der Replikation oder fehlerhafter Basenpaarung und damit zur Punktmutation führen. Schnelle und effiziente Reparaturmechanismen sind unverzichtbar, um einer Tumorentstehung entgegenzuwirken. Liegt eine Promotormethylierung von *MGMT* vor, führt dies zu einer verminderten *MGMT*-Expression und damit zur einer herabgesetzten Transferaseaktivität und zu vermehrten kanzerogenen DNA-Schäden und Ablesestopp (Hegi et al. 2005). Große klinische Bedeutung kommt der *MGMT*-abhängigen Reparatur der durch Chemotherapeutika alkylierten DNA-Basen in Tumorzellen zu. Die induzierten DNA-Schäden in den Tumorzellen werden durch *MGMT* repariert und es kann so zu einer Resistenz gegen alkylierende Chemotherapeutika mit verschlechterten Therapieansprechen und Prognose kommen (Abbildung 1).

Eine Promotorhypermethylierung des *MGMT*-Gens in Glioblastomzellen und damit eine verminderte Expression, ist mit einer verbesserten Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika (z.B. Temozolomid) verbunden (Weller et al. 2015b). Rund 40% der IDH-Wildtyp Glioblastome weisen aufgrund einer Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors

eine erniedrigte MGMT-Expression und damit ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie auf (Reifenberger et al. 2017). Besonders in IDH-Wildtyp Glioblastomen ist der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus prädiktiv bedeutsam im Hinblick auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Temozolomid und fungiert als prognostischer Marker für Glioblastompatienten, die mit Temozolomid behandelt werden (Wick et al. 2013). Bei IDH-mutierten und G-CIMP-Phänotyp Glioblastomen findet sich nahezu immer eine *MGMT*-Promotormethylierung verbunden mit besserem Ansprechen auf Temozolomid und längeren Überlebenszeiten (Reifenberger et al. 2017).

1.2 Das DNA-Reparaturenzym APNG

1.2.1 Allgemeine Aspekte

Neben MGMT gibt es weitere Reparaturmechanismen für alkylierte DNA-Basen, wie z.B. die Basenexzisionsreparatur (*base excision repair*, BER). Bei der BER können verschiedene Enzyme veränderte DNA-Basen erkennen, ausschneiden und im Anschluss werden die entstandenen DNA-Basenlücken durch die DNA-Polymerase wieder aufgefüllt. Die Alkylpurin-DNA-N-Glycosylase, kurz APNG oder auch MPG (N-Methylpurin-DNA Glycosylase) genannt, ist als DNA-Reparaturenzym an der Basenexzisionsreparatur von DNA-Schäden beteiligt, in dem sie die durch äußere Einflüsse oder chemische Substanzen alkylierte DNA-Basen N3-Methyladenin und N7-Methylguanin aus der DNA ausschneidet (Abbildung 1).

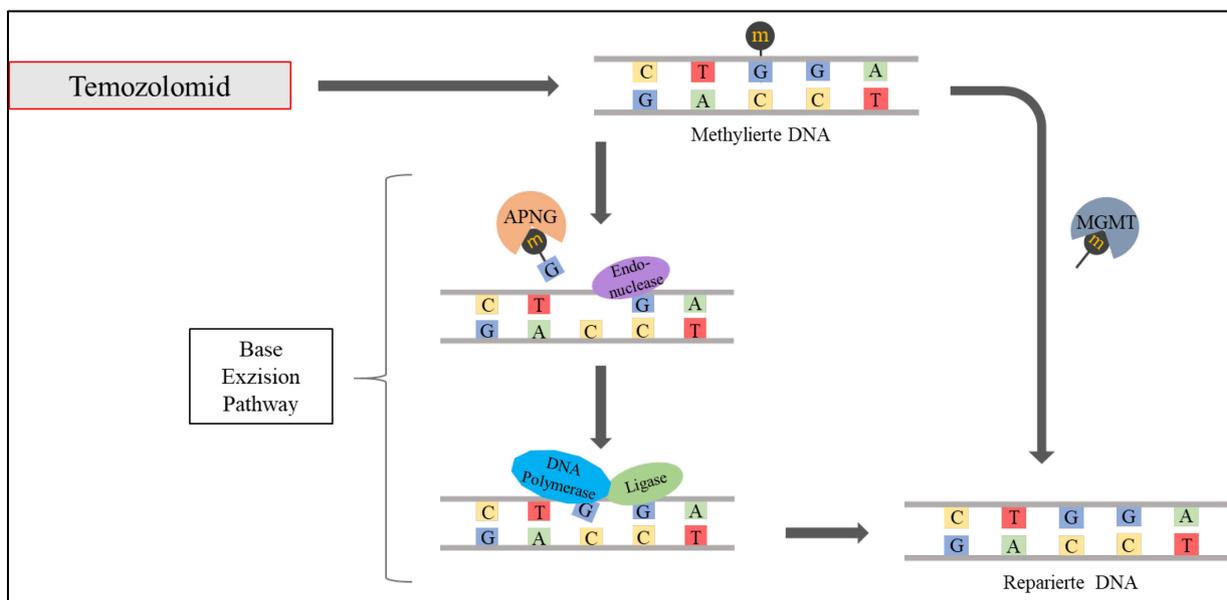


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweisen von APNG und MGMT. Nach Temozolomidwirkung kommt es zur Purinmethylierung (m), hier am Guanin (G). Die anderen Basen Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin (T) werden nicht verändert. APNG entfernt als Teil des Base Exzision Pathways das methylierte Guanin komplett, während die Endonuklease den DNA-Strang öffnet und die Desoxiribose entfernt. Anschließend wird durch die DNA Polymerase das Nucleosid erneuert und die Ligase verschließt den DNA-Strang. Ein alternativer Mechanismus ist die Entfernung der Methylierung durch MGMT, welches nur die Alkylgruppe an der Purinbase entfernt.

Das Chemotherapeutikum Temozolomid, welches in der aktuellen Behandlung von Glioblastomen eine wichtige Rolle spielt, wirkt über alkylierende Mechanismen an der DNA. So werden Guanin zu 60-80% an der N7- und zu ca. 10% an der O6-Position und Adenin zu 10-20% an der N3-Position methyliert (Zhang et al. 2012) (siehe Abbildung 2). Obwohl Temozolomid Guanin nur zu ca. 10% an der O6-Position alkyliert, ist dies die wichtigste

zytotoxische DNA-Läsion (Ochs und Kaina 2000), die über Doppelstrangbrüche letztendlich zur Apoptose der Zelle führt. Durch Entfernung der Alkylierung an der O6-Position des Guanins kommt dem DNA-Reparaturenzym MGMT eine wichtige Funktion in der Resistenzbildung gegen Temozolomid zu. Deshalb werden Glioblastome vieler Patienten noch vor Therapiebeginn molekularbiologisch auf den Promotormethylierungsstatus von *MGMT* untersucht, um das Ansprechen auf die Temozolomidbehandlung prognostizieren und gegebenenfalls individuell korrigieren zu können (Weller et al. 2015b). Da APNG die durch Temozolomid alkylierten Basen N7-Methylguanin und N3-Methyladenin entfernt, liegt es nahe, dass dieses Reparaturenzym in der Resistenz gegen Temozolomid ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

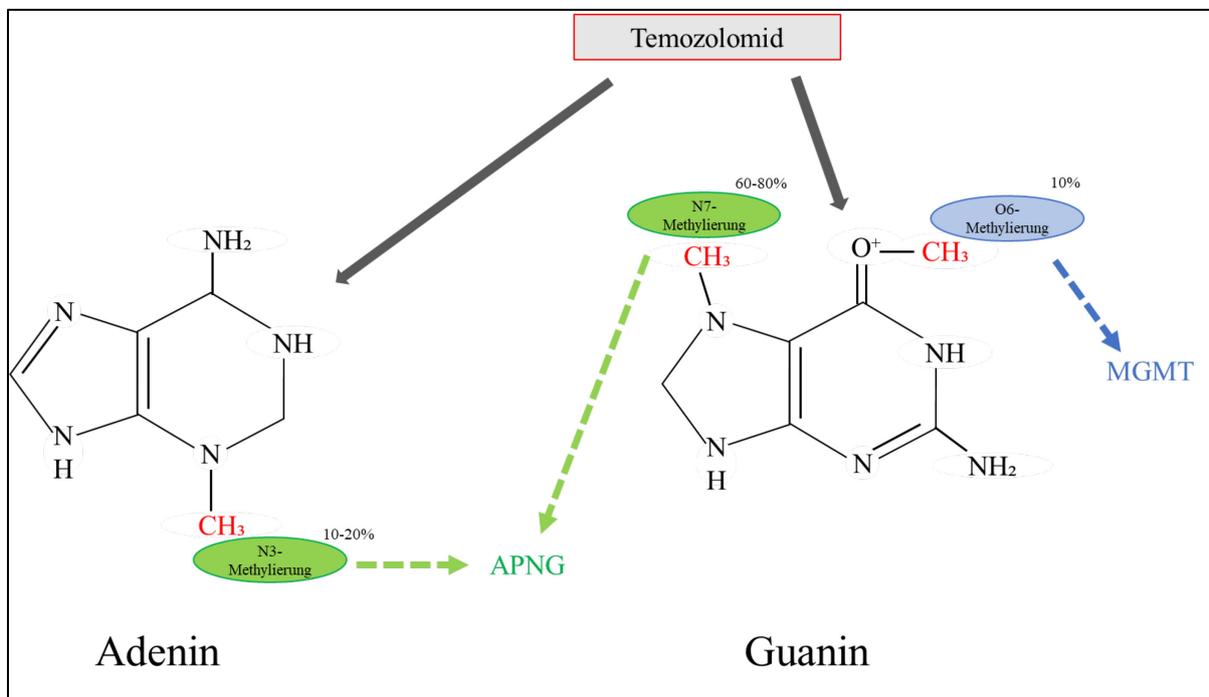


Abbildung 2: Wirkungsweise von Temozolomid an den Purinbasen Adenin und Guanin mit Darstellung des Wirkungsortes von APNG und MGMT. In dieser Übersicht lässt sich erkennen, an welchen Positionen der Purinbasen Adenin und Guanin Temozolomid eine Alkylierung hervorruft. Zusätzlich lässt sich erkennen, wo APNG (grün) und MGMT (blau) wiederum diese Alkylgruppen entfernen.

1.2.2 Die Rolle von *APNG* als prognostischer Marker

Anders als das DNA-Reparaturenzym *MGMT* ist die Rolle von *APNG* in seiner klinischen und prognostischen Bedeutung bisher wenig untersucht. Aufgrund der großen Bedeutung der *MGMT*-Promotormethylierung als prädiktiver Faktor im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Chemotherapie mit Temozolomid wurde der Blick auch auf *APNG* gerichtet, da beide Reparaturenzyme durch Temozolomid alkylierte Basen der DNA durch ihre unterschiedlichen Wirkungsweisen reparieren können (Abbildung 2).

In Temozolomid-resistenten Glioblastomzelllinien konnte ein erhöhtes mRNA-Expressionslevel und eine erhöhte Proteinexpression von *APNG* nachgewiesen werden (Agnihotri et al. 2012) (Liu et al. 2012a). In Xenograft-Mausmodellen fand sich ein schlechteres Ansprechen von Gliomen auf Temozolomid bei gesteigerter *APNG*-Proteinexpression (Agnihotri et al. 2012). Darüberhinaus wurde eine Hypermethylierung der Promotorregion von *APNG* – ähnlich wie die *MGMT*-Promotorhypermethylierung - als günstiger prognostischer Faktor für Patienten mit einem Glioblastom beschrieben (Agnihotri et al. 2012). Im Gegensatz dazu war die gleichzeitige Expression beider Gene mit einer erhöhten Temozolomid-Resistenz von Gliomzellen verbunden (Agnihotri et al. 2012). Immunhistochemisch fanden sich in Glioblastomgeweben eine erhöhte *APNG*-Proteinexpression (Liu et al. 2012a; Agnihotri et al. 2012; Fosmark et al. 2017). Die erhöhte *APNG*-Expression war in den ersten Studien mit kürzerem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert (Liu et al. 2012b) (Agnihotri et al. 2012). Allerdings konnte dieser Befund in einer neueren Untersuchung nicht bestätigt werden, d.h. eine erhöhte *APNG*-mRNA- und -Proteinexpression in dieser Studie mit einer günstigeren Prognose verbunden (Fosmark et al. 2017). Dies scheint vor allem bei *MGMT*-Promotor-methylierten Glioblastomen von Bedeutung zu sein (Fosmark et al. 2017). Es wird vermutet, dass die hohe *APNG* Expression inhibierend auf andere Komponenten der Basenexzisionsreparatur wirkt und diese dadurch funktionell blockiert (Fosmark et al. 2017). Auch bei anderen Tumoren (z.B. in Ovarialkarzinomzelllinien) konnten erhöhte *APNG* Expressionslevel nachgewiesen werden, welche zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika führten (Fishel et al. 2007).

Eine ältere Arbeit an *APNG-Knockout* Mäusen hatte bereits einen Anstieg der Methylierung an der N3-Position des Adenins und an der N7-Position des Guanins nach Gabe von alkylierenden Substanzen nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied im Überleben der *APNG*-Wildtyp Mäuse im Vergleich zu den *APNG-Knockout* Mäusen fand sich jedoch nicht (Rhoderick H. Elder et al. 1998). Eine Bindung des *APNG*-Proteins an den Tumorsuppressor

p53 und damit ein Einfluss auf den Zellzyklus wurde in einer Arbeit beschrieben (Song et al. 2012). Im Gegensatz zu der Arbeit von Agnihotri und Kollegen (Agnihotri et al. 2012), die sowohl *in vitro* eine epigenetische Regulation der *APNG*-Expression in Gliomzellen als auch *in vivo* eine Korrelation zwischen der *APNG*-Promotormethylierung und der mRNA-Expression in Glioblastomen nachweisen konnten, konnte in einer nachfolgenden Untersuchung keine Methylierung der *APNG* Promotorregion in Glioblastomen nachgewiesen werden und auch ein Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Temozolomid war fraglich (Wiestler et al. 2013).

2 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund der widersprüchlichen Ergebnisse der erwähnten Untersuchungen zur Rolle der *APNG*-Promotormethylierung und -Expression als prognostischem Marker für das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten liegt der Schwerpunkt vorliegender Arbeit in der Untersuchung einer möglichen epigenetischen Regulation der *APNG*-Expression in Glioblastomen und der eventuell prognostischen Bedeutung der *APNG*-mRNA- und -Proteinexpression für das postoperative Überleben von mit Temozolomid behandelten Glioblastompatienten. Dazu wurde an einer institutionellen retrospektiven Kohorte aus 42 Glioblastomen die Expression von *APNG* auf RNA-Ebene mittels Echtzeit-Reverser Transkriptase-PCR bestimmt und mit der Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe verglichen. Die *APNG*-Proteinexpression wurde immunhistochemisch an Gewebeschnitten von 74 Glioblastomen untersucht. In einer ausgewählten Serie von Glioblastomen mit niedrigerer *APNG*-mRNA-Expression wurde der Methylierungsstatus der *APNG*-Promotorregion durch eine Sanger-Sequenzierung von mit Natriumbisulfit behandelte Tumor-DNA untersucht. Zusätzlich wurde der mögliche Einfluss des epigenetischen Mechanismus der *APNG*-Promotormethylierung als Regulator der *APNG*-mRNA-Expression an *in vitro* kultivierten Glioblastomzelllinien mittels demethylierender Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A untersucht. Darüber hinaus wurde der mögliche Einfluss der *APNG*-Expression auf eine Resistenzentwicklung gegen Temozolomid an Wildtyp- und Temozolomid-resistenten Zelllinien nachgeprüft. Schließlich wurde die prognostische Bedeutung der *APNG*-mRNA- und -Proteinexpression auf das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten, die nach der Tumorresektion mit kombinierter Radiochemotherapie mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid behandelt wurden, untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchte Patientenkohorten und Tumorgewebeproben

Es wurden insgesamt drei Kohorten von glialen Tumoren untersucht. Die histopathologische Einteilung aller verwendeten Hirntumoren erfolgte durch Prof. Dr. G. Reifenberger nach der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems (Louis et al. 2016). Die Untersuchung der Gewebeproben erfolgte in pseudonymisierter Form. Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt (Studiennummer 3894). Für die erste und zweite Kohorte standen aus dem Tumorgewebe extrahierte RNA- und DNA-Proben bereits aus Voruntersuchungen zur Verfügung. Die extrahierten Nukleinsäuren stammten dabei ausschließlich aus Gewebeproben mit einem mikroskopisch geschätzten Tumorzellgehalt von über 80%. Das erste Kollektiv umfasste DNA und RNA aus 42 Glioblastomen, IDH-Wildtyp und diente zur orientierenden Untersuchung des Zielgens *APNG* auf RNA- und DNA-Ebene im Vergleich zu normalem Hirngewebe. Außerdem war der *MGMT*-Promotermethylierungsstatus der untersuchten Proben bekannt, sodass ein eventueller Zusammenhang zwischen der Expression des Zielgens *APNG* und der Promotormethylierung von *MGMT* untersucht werden konnte. Diese Tumorkohorte enthielt Tumoren von 15 weiblichen und 27 männlichen Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert worden waren. Zum Operationszeitpunkt betrug das mittlere Lebensalter 61 Jahre, wobei die Altersspanne von 26 Jahren bis zu 76 Jahren reichte (Tabelle 1).

Die zweite Kohorte umfasste unterschiedliche Typen IDH-mutierter diffuser Gliome, bestehend aus 8 Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, WHO-Grad II, 6 diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad II, 6 anaplastischen Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, WHO-Grad III, 5 anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad III sowie 9 (sekundären) Glioblastomen, IDH-mutiert, WHO-Grad IV. Auch diese Tumoren stammten von Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert worden waren (Tabelle 2).

Die dritte Kohorte bestand aus Tumorgewebeproben von 68 Patienten (23 weibliche und 45 männliche Patienten) mit einem Glioblastom, IDH-Wildtyp, WHO Grad IV, die nach der Tumorresektion entweder eine Radiochemotherapie mit Temozolomid gemäß des Stupp-

Protokolls (Stupp et al. 2005) oder eine alleinige Temozolomidtherapie erhalten haben und deren Überlebensdaten dokumentiert waren (Tabelle 10). Von diesen Tumoren war kryokonserviertes Tumorgewebe vorhanden, aus dem RNA und DNA extrahiert werden konnte. Zum Operationszeitpunkt betrug das mittlere Lebensalter der Patienten 60 Jahre, wobei die Altersspanne von 25-81 Jahren reichte. Als Referenz für die mRNA-Expressionsanalysen dienten 10 verschiedene, kommerziell erworbene RNA-Proben aus nicht-neoplastischem Hirngewebe (Tabelle 3).

Tabelle 1: Erste Tumorkohorte zur Analyse der *APNG* mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp

Tumor Nr.	Diagnose	WHO-Grad	IDH-Status	Alter des Patienten (Jahre)	Geschlecht	<i>MGMT</i> Promotormethylierung
GB967	Glioblastom	IV	Wildtyp	62	w	um
GB978	Glioblastom	IV	Wildtyp	51	m	um
GB980	Glioblastom	IV	Wildtyp	56	w	met
GB976	Glioblastom	IV	Wildtyp	64	m	um
GB968	Glioblastom	IV	Wildtyp	71	m	um
GB969	Glioblastom	IV	Wildtyp	63	m	um
GB970	Glioblastom	IV	Wildtyp	71	w	um
GB972	Glioblastom	IV	Wildtyp	47	m	met
GB977	Glioblastom	IV	Wildtyp	71	m	met
GB974	Glioblastom	IV	Wildtyp	54	m	met
GB956	Glioblastom	IV	Wildtyp	71	w	met
GB962	Glioblastom	IV	Wildtyp	43	m	um
GB963	Glioblastom	IV	Wildtyp	65	m	met
GB964	Glioblastom	IV	Wildtyp	68	w	met
GB914	Glioblastom	IV	Wildtyp	60	m	um
GB981	Glioblastom	IV	Wildtyp	58	m	met
GB961	Glioblastom	IV	Wildtyp	72	m	um
GB982	Glioblastom	IV	Wildtyp	36	m	um
GB955	Glioblastom	IV	Wildtyp	69	m	met
GB984	Glioblastom	IV	Wildtyp	69	m	um
GB966	Glioblastom	IV	Wildtyp	67	w	met
GB943	Glioblastom	IV	Wildtyp	49	w	met
GB944	Glioblastom	IV	Wildtyp	58	w	met
GB949	Glioblastom	IV	Wildtyp	60	m	met
GB825	Glioblastom	IV	Wildtyp	76	m	um
GB866	Glioblastom	IV	Wildtyp	70	w	um
GB883	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	um
GB686	Glioblastom	IV	Wildtyp	75	m	um
GB714	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met
GB717	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	um
GB718	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	met
GB737	Glioblastom	IV	Wildtyp	59	m	um
GB650	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met
GB666	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met
GB139	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met
GB112	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	um
GB113	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met

GB114	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	um
GB72	Gliosarkomblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	um
GB81	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	met
GB96	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	w	um
GB98	Glioblastom	IV	Wildtyp	n.d.	m	met

Abkürzungen: n.d., nicht dokumentiert; w, weiblich; m, männlich; met, methyliert; um, unmethyliert.

Tabelle 2: Zweites Tumorkohorte aus unterschiedlichen Typen IDH-mutierter Gliome verschiedener WHO-Grade

Tumor Nr.	Tumor-Nr.	Diagnose	WHO-Grad	IDH-Status	1p/19q-Status
O 18	O47	Oligodendrogliom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 20	O51	Oligodendrogliom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 21	O49	Oligodendrogliom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 23	O36	Oligodendrogliom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 64	O62	Oligodendrozytom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 65	O 65*	Oligodendrogliom	II	n.d.	kodeletiert
O 14	O41	Oligodendrogliom	II	IDH-mutiert	kodeletiert
O 92	O66	Oligodendrogliom	II	n.d.	kodeletiert
OA 31	A149	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
A 157	A160	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
A 151	A171	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
A 211	A 211*	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
A 121	A 212*	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
A 210	A219	Diffuses Astrozytom	II	IDH-mutiert	-
AO 19	AO28	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AO 21	AO32	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AO 25	AO33	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AO 23	AO34	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AO 37	AO50	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AO 39	AO59	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	IDH-mutiert	kodeletiert
AA 221		Anaplastisches Astrozytom	III	IDH-mutiert	-
AA 111	AA119	Anaplastisches Astrozytom	III	IDH-mutiert	-
AA 134	AA144	Anaplastisches Astrozytom	III	IDH-mutiert	-
AA 236	AA 236*	Anaplastisches Astrozytom	III	IDH-mutiert	-
AA 189	AA196	Anaplastisches Astrozytom	III	IDH-mutiert	-
GB 4	GB282	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB239	GB556	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB119	GB654	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB834	GB1047	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB927	GB1137	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-

GB629	GB803	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB181	GB728	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB876	GB1087	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-
GB975	GB1228	Glioblastom	IV	IDH-mutiert	-

Tabelle 3: Kommerziell erworbene RNA-Proben aus nicht-neoplastischem Hirngewebe, die als Referenz für die Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene dienen

Normalhirn RNA-Proben	Quelle (Firma)
Human brain total	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234035-50-BC
Human brain total	Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., USA; Katalog-Nr.: AM7962
Human adult brain	Stratagene, Agilent Technologies, USA; Katalog-Nr.: 540005
Human fetal brain	Takara Bio Europe/Clontech, France
Human brain Frontallappen	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234051-50-BC
Human brain Temporallappen	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234078-50-BC
Human brain Parietallappen	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234066-50-BC
Human brain Okzipitallappen	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234062-50-BC
Human brain Corpus callosum	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234045-10-BC
Human brain cerebraler Cortex	BioCat, Heidelberg; Katalog-Nr.: R1234042-10-BC

3.1.2 Verwendete Primer

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer sind mit ihren dazugehörigen Nukleotidsequenzen in den Tabellen 4, 5 und 6 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Primer für die reverse Transkriptase Echtzeit-PCR zur Analyse des relativen *APNG* mRNA-Expressionsniveaus.

Primername	Sequenz	Amplikongröße	Untersuchtes Gen
APNG-Taq-F	5'- ccc ata ccg cag cat cta tt -3'	177 bp	<i>APNG</i> (N-methylpurine DNA Glykosylase) NCBI GenBank
APNG-Taq-R	5' - gtg gag acc gag gca tac ct - 3'		
ARF1-F	5' - gac cac gat cct cta caa gc	111 bp	<i>ARF1</i> (ADP-Ribosylierungsfaktor-1); NCBI GenBank-Zugangsnr. M36340)
ARF1-R3	5' - tcc cac aca gtg aag ctg atg		

Tabelle 5: Verwendete Primer für die Bestimmung des Promotormethylierungsstatus von *APNG* mittels Sangersequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA

Primername	Sequenz	Amplikongröße
APNG-bisu-F/Not	5' - cgc cgg cgt ttg gtt tat gtt ttg gtt ttg tt -3'	365 bp
APNG-bisu-R2	5' - tcc acc tcc acr taa ccc - 3'	
APNG-bisu-F3	5' - ttt ggy ggt ttt aga gtt tat ttt att agt -3'	347 bp
APNG-bisu-R3	5' - aaa aaa aaa ata aaa act cta cta caa aaa caa -3'	
APNG-bisu-R4	5' - cta tga cct cca ctt cctaaa taa aaa ctc c - 3'	F3/R4 230 bp
APNG-bisu-F5	5' - gcg gcc gcg gyg ttt att ttt tgg ata agg at - 3'	F5/R5.1 274 bp
APNG-bisu-R5.1	5' - cta tga ccc ctc cca ata aac tat c - 3'	
APNG-bisu-R5.2	5' - cta tga cca aaa aaa aac acc taa aaa taa aac - 3'	F5/R5.2 324 bp

Tabelle 6: Verwendete Primer für die Bestimmung des Promotormethylierungsstatus von *APNG* mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP).

	Sequenz	Amplikongröße
APNG-MSP-M-F	5' - tcg ttg gta ttt tat cgg aaa ata c - 3'	101 bp
APNG-MSP-M-R	5' - gtc gta aac cta aat aaa tcc tcg a - 3'	
APNG-MSP-U-F	5' - ttg ttg gta ttt tat tgg aaa ata tgt - 3'	101 bp
APNG-MSP-U-R	5' - atc ata aac cta aat aaa tcc tca aa - 3'	

3.1.3 Enzyme und Reagenzien für die Polymerasekettenreaktionen

Die in den eigenen Experimenten für die PCR-Analysen verwendeten Enzyme und Reagenzien sowie deren Hersteller sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Enzyme und Reagenzien

Enzyme	Hersteller
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (#11733046)	Life Technologies, Darmstadt
Taq DNA Polymerase recombinant (#10342020)	Life Technologies, Darmstadt
HotStarTaq DNA Polymerase (#203203)	Qiagen, Hilden
Superscript II Reverse Transcriptase (#18064071)	Life Technologies, Darmstadt
100 Basenpaar DNA-Leiter (#85-2150)	BioBudget, Krefeld
Q-Solution (aus HotStarTaq DNA Polymerase Kit; #203203)	Qiagen, Hilden
Deoxynukleotid (dNTP)-(aus HotStarTaq DNA Polymerase Kit; #203203)	Qiagen, Hilden
10x-PCR-Puffer (aus HotStarTaq DNA Polymerase Kit; #203203)	Qiagen, Hilden
RNAsin (Ribonuklease Inhibitor) (#N2511)	Promega, Madison, WI, USA
Bovines Serum Albumin (BSA) (#15561020)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung (#D8418)	Sigma, Taufkirchen
Midori Green Advance (#617004)	Biozym, Hessisch Oldendorf

3.1.4 Verwendete Puffer

In Tabelle 8 folgt eine Auflistung der für die eigenen Untersuchungen verwendeten Puffer.

Tabelle 8: Verwendete Puffer.

Name	Zusammensetzung
1x TE-Puffer	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
10 x TAE-Puffer	400 mM Tris-Base 200 mM NaOAc 10 mM EDTA, pH 8,0
6 x Ladepuffer	0,25% Bromphenol-Blau 0,25 % Xylencyanol FF 30 % Glycerol in 1 x TE

3.1.5 Verwendete Kits

In Tabelle 9 findet sich eine Auflistung der verwendeten Kits und deren Anwendung sowie deren Hersteller.

Tabelle 9: Verwendete Kits mit Angaben zu den Herstellern und zur Anwendung

Name	Hersteller	Anwendung
AllPrep DNA/RNA Mini Kit, (#80204)	Qiagen, Hilden	RNA/DNA Isolierung
JETQUICK Tissue DNA Kit, (#A30704)	Genomed, Löhne	DNA Isolierung
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, (#56404)	Qiagen, Hilden	DNA Isolierung aus Paraffingewebe
miRNeasy Mini Kit, (#217084)	Qiagen, Hilden	RNA Isolierung
Jetquick PCR Purification Kit, (#410050)	Genomed, Löhne	PCR Aufreinigung
EZ DNA Methylation Gold Kit, (#D5005 / D5006)	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg	Bisulfitbehandlung von DNA

3.1.6 Verwendete Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung der Tumorproben wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen APNG (APNG(3D1):sc-101237, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Dieses Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung definierter Nukleinsäureabschnitte ist seit den 80er Jahren bekannt und eine Standardmethode in der molekulargenetischen Forschung. Folgendes Grundschema wurde bei den durchgeführten Reaktionen (HotStarTaq DNA-Polymerase Kit von Qiagen) angewendet:

Matrizen-Nukleinsäure (Template)	20-100 ng (1-5 µl)
10 x PCR Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
2 mM dNTP-Gemisch	2,5 µl
10 µM Vorwärts-Primer	0,5 µl/1 µl
10 µM Rückwärts-Primer	0,5 µl/1 µl
Hot Star Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,125 µl
Optional: DMSO/ 5 x Q-Solution	1,25 µl/ 5 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 25 µl</i>

Nach einer anfänglichen fünfminütigen Denaturierungsphase fand die Amplifizierung der Matrize in einem Thermocycler der Firma Biometra für 30-45 Zyklen nach folgendem Schema statt:

Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung der Primer („Annealing“)	48-58°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec

Durch eventuelle Zugabe von Q-Solution, DMSO oder Formamid, sowie Veränderung der Reaktionszyklenanzahl und Anlagerungstemperatur wurde jedes Primerpaar individuell optimiert.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung von DNA-Fragmenten. Dabei ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge u.a. abhängig von der Konzentration an Agarose im Gel. Die in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele hatten Konzentrationen zwischen 1,5% und 4 % Agarose. Zur Vorbereitung des Gels wurde die Agarose in gewünschter Menge abgewogen und mit 100 ml 1 x TAE Puffer kurz aufgekocht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 µl Midori Green Advance (Biozym, Hessisch Oldendorf). Das flüssige Gel wurde anschließend in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in eine mit 1 x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und die einzelnen Geltaschen mit 10-15 µl DNA-Proben, bestehend aus 7 µl Ladepuffer und 3-8 µl PCR Produkt-DNA gefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde eine 100-bp DNA-Leiter (BioBudget, Krefeld) aufgetragen. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 180 V Gleichstromspannung über 20-45 min je nach Konzentration des Gels. Dabei wandern die kleinsten, negativ geladenen DNA-Fragmente am schnellsten durch die Poren des Agarosenetzes im Gel in Richtung der positiven Anode. Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel in einer UV-Licht-Kammer untersucht und die einzelnen DNA-Banden photographisch dokumentiert. Hierbei dient der mitgeführte 100-bp DNA-Leiter als Maßstab zur Größeneinteilung der DNA-Fragmente.

3.2.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus tiefgefrorenen Tumorgewebeproben

Vorbereitend wurde zunächst das kryokonservierte Tumormaterial unter ständiger Kühlung auf Trockeneis unter RNase-freien Bedingungen zugeschnitten. Von dem zugeschnittenen Gewebe wurde ein Teil in Paraffin eingebettet und nach Hämatoxylin-Eosin Färbung mikroskopisch auf seinen Tumorgehalt untersucht.

Bei einem histologisch gesicherten Tumorgehalt von > 80 % erfolgte aus 20-30 mg kryokonserviertem Tumormaterial die RNA-Extraktion mit dem Qiagen AllPrep DNA/RNA

Mini-Kit nach Herstellerangaben und die DNA-Extraktion nach Versuchsprotokoll des JETQUICK Tissue DNA- Kits von Genomed.

Im Anschluss an die Extraktion wurde die gewonnene RNA bzw. DNA auf ihre Qualität überprüft. Hierzu erfolgte für die RNA-Quantifizierung und -Qualitätsbestimmung eine Probenkonzentrationsmessung mittels NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Darmstadt) und eine Gelelektrophorese mit 200-300 ng RNA/ μl + 4 μl Ladungspuffer auf einem 2% Agarosegel. Für die DNA-Quantifizierung und -Qualitätsbestimmung erfolgte ebenfalls eine DNA-Konzentrationsmessung mittels Nanodrop und eine Gelelektrophorese mit der isolierten DNA mit 3 μl + 7 μl Ladungspuffer auf einem 2% Agarosegel.

3.2.4 cDNA Synthese aus mRNA

Zur weiteren Analyse wurde die isolierten Tumor-RNA in komplementäre DNA (copy DNA; cDNA) umgeschrieben. Von der cDNA wurden dann per RT-PCR spezifische Sequenzabschnitte amplifiziert. Startpunkt der cDNA-Synthese sind „Hexamer-Primer“, sechs Basen-kurze Oligonukleotide zufälliger Sequenz, welche an komplementäre Sequenzen auf der mRNA binden. Die Reverse Transkriptase bindet an die freien 3'-OH-Gruppen dieser Hexamer-Primer und schreibt die RNA in einen komplementären cDNA-Strang um. Als Matrize dienten 3 μg RNA, welche in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem *Aqua dest.* zu einem Gesamtvolumen von 30,4 μl aufgefüllt wurde. Danach erfolgt eine Inkubation der RNA-Lösung bei 70°C für 5 min zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen. Anschließend werden 19,6 μl des folgenden Reaktionsgemisches hinzugegeben:

0,1 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe)	0,4 μl
RNAsin (40.000 U/ml)	1,0 μl
BSA (2,9 mg/ml)	1,7 μl
dNTP-Mix (25 μM je dNTP) (Bio-Budget, Krefeld)	2,5 μl
pd(N)6 (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	3,0 μl
5x H-RT-Puffer	10,0 μl
Reverse Transkriptase (200 U/ μl)	1,0 μl
<i>Gesamt</i>	<i>19,6 μl</i>

Es erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 42°C und die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch zehnmütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde durch PCR-Amplifikation des ubiquitär exprimierten *ARF1*-Gens (ADP-Ribosylierungsfaktor 1) überprüft. Aus den synthetisierten cDNAs wurden vor der weiteren Verwendung für Expressionsanalysen Gebrauchslösungen von 1:10 (für die Endpunkt Reverse Transkriptase PCR) und 1:50 (für die Real time-Reverse Transkriptase-PCR) in *Aqua dest.* hergestellt.

3.2.5 Expressionsanalyse mittels Real Time-Reverser Transkriptase-PCR

Die quantitative Real time-Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) ermöglicht eine kontinuierliche quantitative Messung des gebildeten PCR-Produktes. Dies ist durch die Messung eines Doppelstrang-DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR® Green) möglich. Jede untersuchte Gewebeprobe wurde in einem dreifachen Ansatz gemessen. Als Referenzgen diente *ARF1* (ADP-Ribosylierungsfaktor-1; NCBI GenBank-Zugangsnr. M36340). Als Referenz zur relativen mRNA-Expression in Tumorgewebe wurde aus tumorfreiem Hirngewebe isolierte RNA (Normalhirn-RNA) genutzt.

Zunächst wurde durch Kombination verschiedener Primerkonzentrationen das optimale Konzentrationsverhältnis von Vorwärts- und Rückwärtsprimer, bestimmt. Das endgültige Reaktionsgemisch, mit einem Primerverhältnis von 300 nM Vorwärts- zu 300 nM Rückwärtsprimer, setzte sich wie folgt zusammen:

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	12,5 µl
10 µM Vorwärts Primer	0,75 µl
10 µM Rückwärts Primer	0,75 µl
cDNA Template	5,0 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 25 µl</i>

Nach Aufbringen des Reaktionsgemisches in 96-Well-PCR-Platten erfolgte im StepOnePlus™ System (Thermo Fisher Scientific Inc.) die Real time RT-PCR nach folgendem Schema: Die Schritte 3 und 4 wurden 40 x durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	50°C	2 min	Aktivierung der Uracil-Glykosylase
2	95°C	10 min	Aktivierung der <i>Taq</i> DNA Polymerase
3	95°C	15 s	Denaturierung des DNA-Doppelstranges
4	60°C	1 min	Anlagerung der Primer und DNA-Synthese

Durch die kontinuierliche Messung des Doppelstrang-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes und die korrelierende Zunahme des gebundenen Farbstoffes zur Menge des DNA-PCR-Produktes, ist eine kontinuierliche graphische Darstellung der DNA-Vervielfältigung möglich. Im Gegensatz dazu kann bei herkömmlichen PCR-Methoden nur das Endprodukt der Reaktion dargestellt werden. Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt mit Hilfe einer Halogenlampe. Diese strahlt bläuliches Licht ab, welches vom DNA-gebundenen SYBR-Green Farbstoff resorbiert und als grünliche Emission ausgestrahlt und in dem PCR-Gerät detektiert wird. Auf Grund der geringen Basisemission des Fluoreszenzfarbstoffes muss zur weiteren Auswertung der PCR-Produkte zunächst ein Fluoreszenzschwellenwert („Threshold Cycle“ oder Ct-Wert) festgelegt werden. Dabei wird der Ct-Wert ermittelt, welcher den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Amplifikation ist auf Grund von idealen Bedingungen (Oligonukleotidmenge, optimale Enzymaktivität, keine Inhibierung der PCR durch hemmende Produkte) zu diesem Zeitpunkt exponentiell.

Die gemessenen Fluoreszenzdaten werden in einem Diagramm zusammengefasst, in welchem die relative Zunahme des PCR-Produkts logarithmisch gegen die Zyklenzahlen aufgetragen ist. Der Anwender legt den Schwellenwert fest und per Software wird für jede PCR-Probe der Ct-Wert ermittelt. Jede cDNA-Probe wurde pro Gen in einem dreifachen Ansatz amplifiziert, sodass bei der Auswertung für Ziel- und Kontrollgen zunächst der Mittelwert der dreifach bestimmten Ct-Werte berechnet werden muss. Anschließend wird die Differenz ($\Delta Ct = \text{Mittelwert Ct-Zielgen} - \text{Mittelwert Ct-Kontrollgen}$) der Mittelwerte von Ziel- und Kontrollgen berechnet. Anschließend wird der $\Delta\Delta Ct$ -Wert der Tumorproben bestimmt, welcher aus der Differenz der ΔCt -Werte der Tumorproben und der ΔCt -Werte der Normalkontrollproben stammt. Dadurch „nullt“ man die Normalkontrollen und kann die Tumorproben in Relation dazu setzen. Um die relative mRNA-Expression des Zielgens im

Tumor zu ermitteln, nimmt man im letzten Schritt die Entlogarithmierung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte vor ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

3.2.6 Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit

Diese Methode dient zur Detektion von methylierten CpG-Dinukleotiden in der DNA und besteht aus der Umwandlung nicht-methylierter Cytosinreste in Uracil, während 5-Methylcytosine unverändert bleiben. In der anschließenden PCR-Amplifizierung oder Sequenzierung der modifizierten DNA werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, dagegen werden methylierte Cytosine als Cytosin erkannt. Die Bisulfitbehandlung der untersuchten DNA-Proben erfolgte mit dem Protokoll des DNA Methylation Gold Kit nach Herstellerangaben.

3.2.7 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Nach Amplifizierung des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes wurde das PCR-Produkt mit einem Aufreinigungskit (Jetquick PCR Product Purification Spin Kit, Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur weiteren Überprüfung der eventuellen DNA-Methylierung wurden die aufgereinigten PCR-Produkte durch die Firma StarSEQ GmbH im Sequenzierungsverfahren nach Sanger analysiert. Hierbei wurden die vorhandenen Proben nach Vorgabe des StarSEQ Verfahrensprotokolls vorbereitet. An Hand der Sequenzierung ist es möglich, die exakte Basensequenz eines definierten DNA-Abschnittes zu bestimmen. Die Sequenzier-Reaktion ist heutzutage eine Abwandlung der Polymerase-Kettenreaktion. Dabei wird jedoch nur ein Primer (entweder Vorwärts- oder Rückwärtsprimer) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, sodass die Matrizen-DNA nur linear amplifiziert werden kann. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert, woraufhin Einzelstränge für das weitere Vorgehen zur Verfügung stehen. Nach Anlagerung des komplementären Oligonukleotids (Vorwärts- oder Rückwärts-Primer) am DNA-Zielstrang (am 3'-Ende) beginnt die komplementäre enzymatische Elongation mit Einbau von Desoxynukleotiden. Im Reaktionsgemisch finden sich fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP). Diese ‚Kettenabbruch‘-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Wenn sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut werden, ist keine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase mehr möglich, da keine Verknüpfung zwischen ‚fehlender‘ OH-Gruppe am 3'-C-Atom mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids stattfinden kann. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge.

Nach der Sequenzier-Reaktion werden die markierten Abbruchprodukte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Die verwendeten Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) besitzen je nach Base einen anderen Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung. So zeigt sich am Ende jedes DNA-Fragmentes Fluoreszenzen unterschiedlicher Farbe und diese können von einem Detektor erkannt werden. Das Elektropherogramm (die Reihenfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen) gibt direkt die Abfolge der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

3.2.8 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die methylierungsspezifische PCR (MSP) ist eine schnelle und sensitive Methode, um CpG-Methylierungen der DNA zu untersuchen. Die ausgewählten Primer amplifizieren dabei entweder nur methylierte oder nur unmethylierte Sequenzen nach Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit, sodass jede DNA-Probe doppelt untersucht werden muss, d.h. in einer PCR-Reaktion mit Primern für die methylierte Sequenz und einer zweiten PCR-Reaktion mit Primern für die unmethylierte Sequenz. Die PCR-Produkte werden anschließend auf Agarosegelen aufgetrennt und ausgewertet. Die MSP ist eine sensitive Methode und kann einen Anteil von 0,1% methylierter DNA in einem DNA-Gemisch detektieren. Der Nachteil der Methode liegt in der fehlenden quantitativen Information und darin, dass sich der Nachweis methylierter CpG-Dinukleotide auf kleine Bereiche, nämlich auf die Bindungsstellen der Primer beschränkt. So kann eine Probe sowohl detektierte methylierte Bereiche als auch detektierte unmethylierte Anteile aufweisen und in dem Agarosegel nach Elektrophorese zwei Banden aufweisen. Für die MSP-Analyse der 5'-CpG-Insel im Promotorbereich des *APNG*-Gens wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Bisulfit-behandelte Matrizen-Nukleinsäure (Template)	1 µl
10x PCR Puffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl
10 µM Vorwärts-Primer	0,5 µl
10 µM Rückwärts-Primer	0,5 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,125 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 25 µl</i>

Die MSP-PCR wurde nach folgendem Schema in 40 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung der Primer („Annealing“)	54°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec

Die Auswertung erfolgte per Gelelektrophorese und anschließender Photodokumentation der Nukleinsäurebanden unter UV-Licht. Der Nachweis einer eindeutigen Bande bei Verwendung der methylierungsspezifischen Primer wurde als „methyliert“ („+“) bewertet, eine schwache Bande mit einem „(+“ und die Abwesenheit eines methylierungsspezifischen PCR-Produktes mit einem „-“ gekennzeichnet. Als positive Kontrolle für die methylierungsspezifische PCR diente mit *SssI*-Methyltransferase behandelte DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe. Natriumbisulfitbehandelte, nicht-methylierte DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe wurde als Negativkontrolle in der methylierungsspezifischen MSP eingesetzt.

3.2.9 Untersuchung der *APNG* mRNA-Expression in Gliomzellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A

Wie eingangs bereits erwähnt, spielt die CpG-Methylierung in der Promotorregion eine wichtige Rolle in der Regulation der Gentranskription. Verschiedene Substanzen können zu

einer Demethylierung der DNA und somit zu einer veränderten Genexpression der Zellen führen. Einer dieser molekularen Stoffe ist 5-Aza-2'-Desoxycytidin, ein Cytidin-Analogon, bei dem die Carbongruppe an Position 5 des Pyrimidinrings durch eine Nitrogruppe ersetzt ist (Abbildung 3).

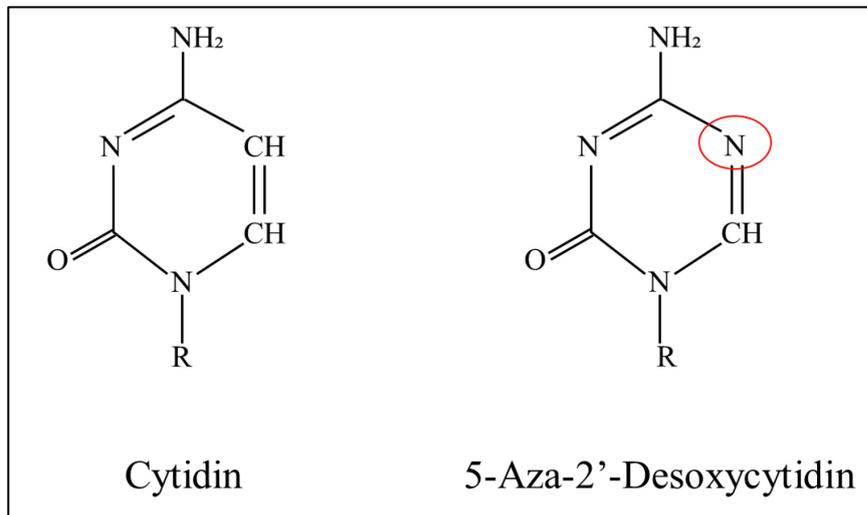


Abbildung 3: Strukturformel von Cytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin. Links im Bild ist die Strukturformel von Cytidin abgebildet. Rechts im Vergleich die Strukturformel von 5-Aza-2'-Desoxycytidin. Die verwendeten Buchstaben entsprechen den Elementen aus dem Periodensystem. Beide Strukturformeln sind ohne die anhängende Ribose bzw. Desoxyribose dargestellt, die Verbindung zum Zuckermolekül wird durch den Buchstaben ‚R‘ gekennzeichnet. Der Unterschied beider Basen wurde mit einem roten Kreis markiert.

5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza) wird in die DNA anstelle von Cytosin bei der Replikation eingebaut und hemmt durch eine kovalente Bindung das Enzym DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1/3). Die Funktion des Enzyms, den neu synthetisierten Strang nach Vorlage zu methylieren, geht verloren und der neu-synthetisierte Strang bleibt unmethyliert. Häufig wird 5-Aza-2'-Desoxycytidin mit Trichostatin A (TSA) kombiniert, welches die Aktivität von Histondeacetylasen hemmt und dadurch die Möglichkeit der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Promotorbereiche verbessert. Für die eigenen Experimente wurde freundlicherweise von Frau Dr. Marietta Wolter (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) cDNA von 5-AZA- oder TSA-behandelten Gliomzelllinien (A172, TP365MG und T98G) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien A172 und T98G waren von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA kommerziell erworben worden. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Prof. Dr. V. Peter Collins, Cambridge, UK zur Verfügung gestellt. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-AZA (250 nM, 500 nM, 1 µM und 2 µM) für 72 h mit Mediumwechsel und Zugabe von frischem 5-AZA alle 24 h bzw. mit 500

nM oder 1µM TSA für 24 h. Mittels qRT-PCR erfolgte die Analyse der *APNG* mRNA-Expression in den 5-Aza- oder TSA-behandelten Gliomzelllinien. Hierbei wurden Zelllinien verwendet, die mit unterschiedlichen 5-Aza- und TSA-Konzentrationen behandelt worden waren, analysiert und mit DMSO-behandelten Gliomzelllinien verglichen.

3.2.10 Untersuchung der *APNG* mRNA-Expression in Temozolomid-resistenten versus -sensitiven Gliomzellen

Um die Möglichkeit einer erworbenen Resistenz nach Temozolomid-Chemotherapie nachgehen zu können, wurden Zellpellets von parentalen und Temozolomid-resistenten Gliomzelllinienpaaren (Happold et al., 2012) nach RNA Extraktion auf ihr *APNG* mRNA-Expressionsniveau hin untersucht. Die parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien LN-18 und LN-229 Gliomzelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Caroline Hertler, geb. Happold (Zürich) zur Verfügung gestellt

3.2.11 Immunhistochemische Analyse der APNG-Expression in Glioblastomen

Zum Nachweis des APNG Proteins wurde eine immunhistochemische Färbung an Formalin-fixierten Paraffinschnitten von 68 Glioblastomen (Kohorte 3) vorgenommen. Dazu wurden die Paraffinblöckchen im Routinelabor des Instituts für Neuropathologie geschnitten und die ca 5 µm dicken Schnittpräparate auf Objektträger aufgezogen. Nach Standardprotokoll wurden die Schnitte entparaffiniert und in einer in Konzentration absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung mit dem spezifischen primären monoklonalen Antikörpers gegen APNG nach Herstellerangaben. Als Detektionssystem wurde ein kommerzielles System der Firma Dako auf einem Dako Immunostainer verwendet. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte über eine Peroxidasereaktion mit Diaminobenzidine als Substrat, das in einer braunen Färbung resultiert. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte einer konventionellen Hämatoxylin-Färbung unterzogen.

3.2.11.1 Auswertung der APNG-Proteinexpression

Die Auswertung der APNG-Proteinexpression erfolgte durch lichtmikroskopische Betrachtung der immunhistochemisch behandelten Schnitte, wobei die Prozentzahl der braun gefärbten Tumorzellkerne semiquantitativ geschätzt wurde. Dabei wurde zwischen

ungefärbten Tumorgewebe, <10% positiv angefärbte Zellkerne, 10-50% positiv angefärbte Zellkerne, 50-80 % positiv angefärbte Zellkerne und > 80% positiv angefärbte Zellkerne unterschieden. Die Farbintensität wurde bei der Auswertung auf Grund von verfahrensbedingten Schwankungen nicht berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der zugehörigen klinischen Daten oder molekularbiologisch gewonnen Untersuchungsergebnisse, um jegliche Beeinflussung zu vermeiden.

3.2.12 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der ermittelten Rohdaten erfolgte mit Hilfe des Graph Pad Prism 7 Programms. Hierbei wurden die ermittelten *APNG* mRNA Expressionsdaten per Students' T-Test, Oneway-ANOVA und Tukey-Test (Post hoc) ausgewertet. Die Analyse der Überlebenszeiten sowie deren graphische Darstellung erfolgten nach der Kaplan-Meier-Methode mit Verwendung des Log-rank-Tests. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Expression des DNA-Reparaturenzyms APNG auf mRNA- und Proteinebene in Gliomen untersucht. Zusätzlich wurde als möglicher Mechanismus der Expressionsregulation die Promotorregion und Exon 1 des *APNG*-Gens auf eine DNA-Methylierung hin analysiert.

4.1 *APNG* mRNA-Expression in Gliomen

Die *APNG* mRNA-Expression wurde insgesamt in 81 Glioblastomen, IDH-Wildtyp, WHO-Grad IV, 8 Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, WHO-Grad II, 6 anaplastischen Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, WHO-Grad III, 6 diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad II, 5 anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad III und 9 Glioblastomen, IDH-mutiert, WHO-Grad IV mittels semiquantitativer Real time Reverser Transskriptase-PCR (qRT-PCR) untersucht und mit der *APNG* mRNA-Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe verglichen.

Hierbei zeigte sich eine signifikant gesteigerte relative *APNG* mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp im Vergleich zu normalem Hirngewebe ($p=0,005$, Student's t-Test) (Abbildung 4). Dabei wiesen 64 der 81 untersuchten Tumoren eine erhöhte relative *APNG* mRNA-Expression im Vergleich zum Mittelwert der Referenzgruppe aus normalen Hirngewebeprobe auf.

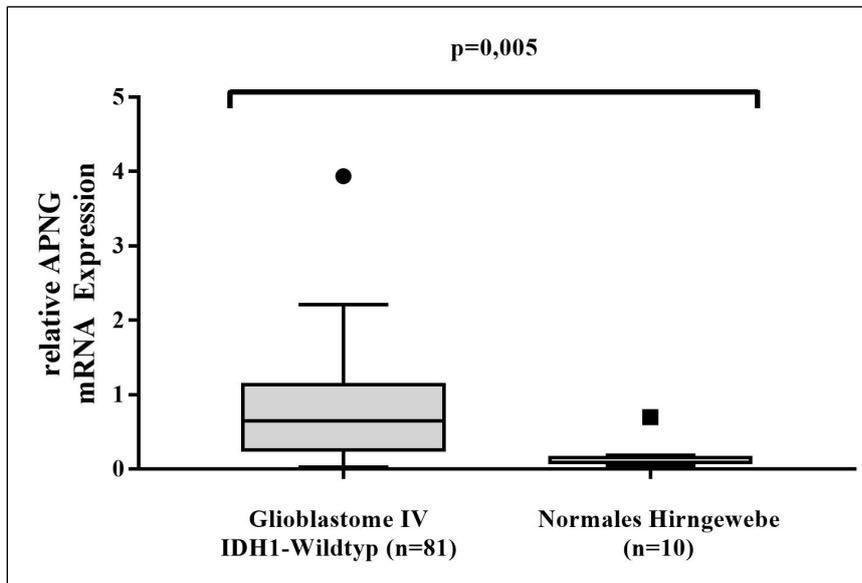


Abbildung 4: Relative APNG mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp im Vergleich zu normalem Hirngewebe. Das relative *APNG* mRNA-Expressionslevel wurde mittels Real time-RT-PCR bestimmt. Dabei diente *ARF1* als Referenzgen und Universal Human Reference RNA (Stratagene) als Referenzprobe. Die relativen normalisierten Expressionswerte werden als Box Plots nach der Tukey-Methode dargestellt. In der Gruppe der Glioblastome war eine statistisch signifikant erhöhte *APNG* mRNA-Expression ($p=0,005$) gegenüber normalem Hirngewebe nachweisbar.

Der Vergleich der *APNG* mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen *MGMT* Promotor-methylierten und *MGMT* Promotor-unmethylierten Tumoren ($p=0,67$, Student's t-Test) (Abbildung 5).

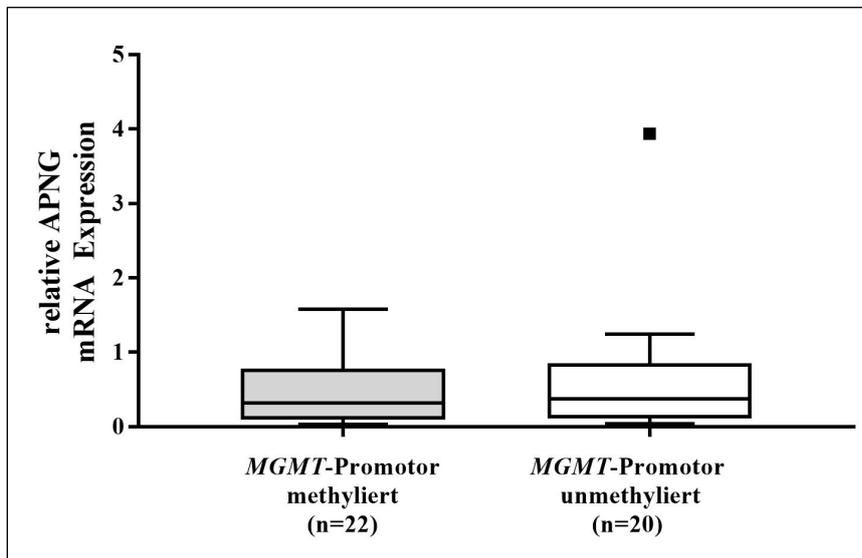


Abbildung 5: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-Wildtyp Glioblastomen mit und ohne MGMT-Promotormethylierung. Das relative *APNG* mRNA-Expressionslevel wurde mittels Real time-RT-PCR bestimmt. Dabei diente *ARF1* als Referenzgen und Universal Human Reference RNA (Stratagene) als Referenzprobe. Die relativen normalisierten Expressionswerte werden als Box Plots nach der Tukey-Methode dargestellt. Glioblastomen ohne *MGMT* Promotormethylierung ($n=22$) und Glioblastomen mit *MGMT* Promotormethylierung ($n=20$) zeigten im t-Test keinen signifikanten Unterschied in der *APNG* mRNA Expression.

In einer weiteren Analyse wurden IDH-mutierte und 1p/19q-kodeletierte Oligodendrogliome, IDH-mutierte Astrozytome und IDH-mutierte Glioblastome hinsichtlich ihrer *APNG* mRNA-Expression untersucht. Dabei wurden die Astrozytome verschiedener WHO-Grade untereinander und jeweils mit den IDH-mutierten Glioblastomen mittels ‚one-way ANOVA‘ verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der *APNG* mRNA-Expression zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen. Im anschließenden post-hoc Test mittels Tukey Methode konnte hier eine signifikant höhere *APNG* mRNA-Expression in den IDH-mutierten Astrozytomen, WHO-Grad II gegenüber den IDH-mutierten Glioblastomen, WHO-Grad IV nachgewiesen werden ($p=0,0165$).

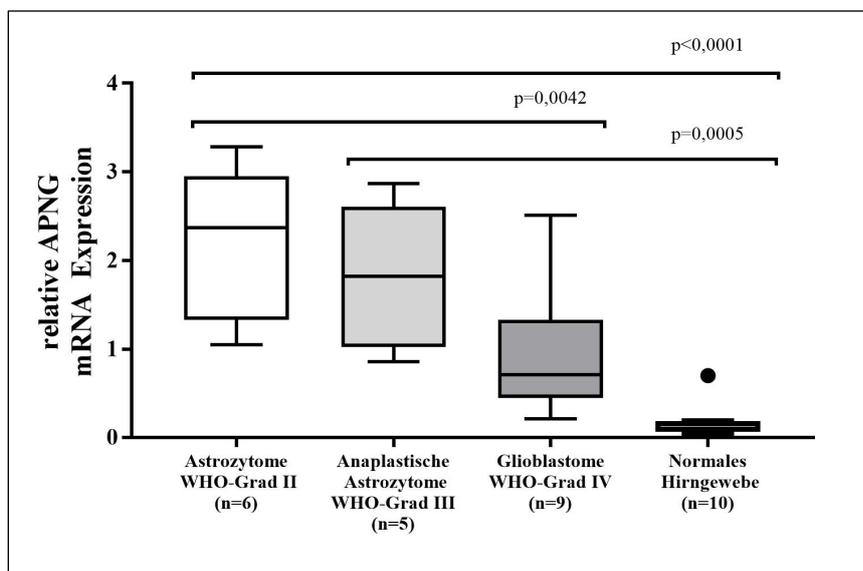


Abbildung 6: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-mutierten Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen. *Abzisse:* Unterscheidung zwischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad II, anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad III, und Glioblastomen, IDH-mutiert, WHO-Grad IV. *Ordinate:* Relative Expression von *APNG* mRNA; In der graphischen Darstellung kann eine verminderte *APNG* mRNA-Expression mit steigendem WHO-Grad dargestellt werden, welche sich signifikant zwischen den Astrozytomen, WHO-Grad II und den Glioblastomen, WHO-Grad IV unterscheidet ($p=0,0165$) sowie zwischen den Astrozytomen WHO-Grad II und normalem Hirngewebe ($p<0,0001$) und zwischen anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III und normalem Hirngewebe ($p=0,0005$).

Die Untersuchung der *APNG* mRNA-Expression in den oligodendroglialen Tumoren ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Oligodendrogliomen, WHO Grad II und den anaplastischen Oligodendrogliome, WHO-Grad III ($p=0,0405$, ANOVA), und ebenso zwischen den anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III und normalem Hirngewebe ($p=0,0003$) (Abbildung 7).

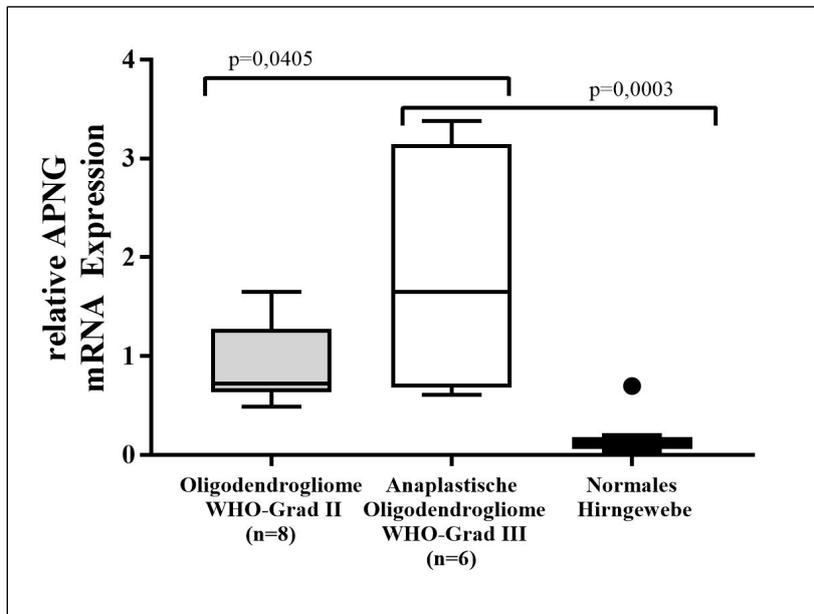


Abbildung 7: Relative APNG mRNA-Expression in Oligodendrogliomen, WHO-Grad II und anaplastischen Oligodendrogliomen, WHO-Grad III. *Abzisse:* Unterscheidung zwischen den Oligodendrogliomen nach dem WHO-Grad. *Ordinate:* Relative APNG mRNA-Expression; Graphisch ist eine relative APNG-Expression bei steigendem Malignitätsgrad ersichtlich, in der statistischen Analyse mittels ‚ANOVA‘ ließ sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0405$) in der Expression zwischen den Oligodendrogliomen unterschiedlichen Malignitätsgrades sowie ein signifikanter Unterschied ($p=0,0003$) in der APNG-Expression zwischen anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III und normalem Hirngewebe ermitteln.

Der Vergleich der APNG mRNA-Expression zwischen IDH-Wildtyp und IDH-mutierten Glioblastomen WHO-Grad IV ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 8).

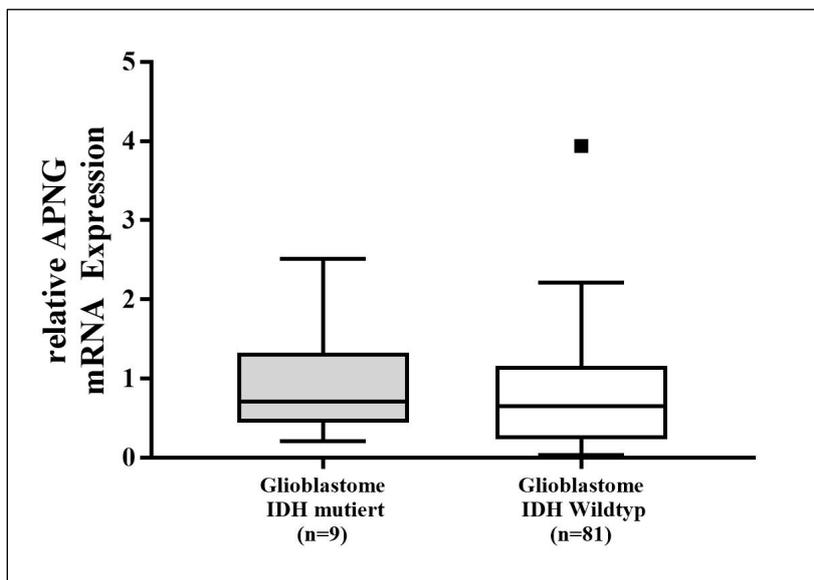


Abbildung 8: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-mutierten Glioblastomen im Vergleich zu IDH-Wildtyp Glioblastomen. *Abzisse:* Unterscheidung zwischen den Glioblastomen nach IDH-Status. *Ordinate:* Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse (‚Student’s t-test‘) ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,5876$) in der APNG mRNA-Expression zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Glioblastomen nachweisen.

4.2 *APNG* mRNA-Expression in parentalen versus Temozolomid-resistenten Gliomzellen

Zur Untersuchung einer möglichen veränderten *APNG* mRNA-Expression nach Temozolomid-Chemotherapie wurden freundlicherweise von Dr. Caroline Hertler, geb. Happold (Zürich) Zellpellets von parentalen und Temozolomid-resistenten Gliomzelllinienpaaren (Happold et al., 2012) zur Verfügung gestellt, aus denen die RNA extrahiert wurde. In den parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien LN18 und LN229 wurde dann das *APNG* mRNA-Expressionsniveau untersucht. Hierbei zeigte sich eine Tendenz einer niedrigeren *APNG* mRNA-Expression in den Temozolomid-resistenten Zelllinien im Vergleich zu den ursprünglichen, d.h. Temozolomid-sensitiven Zelllinien; die Unterschiede waren aber nicht signifikant (Abbildungen 9 und 10).

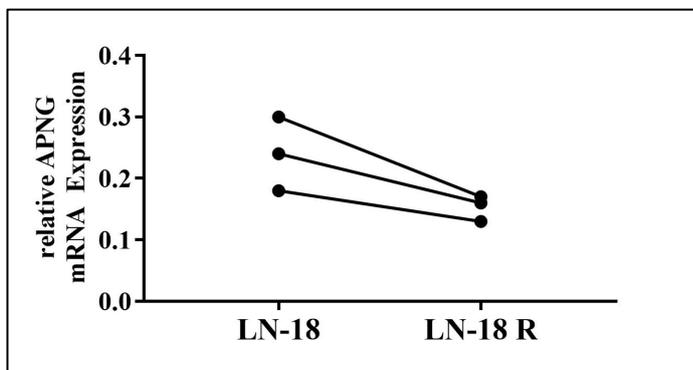


Abbildung 9: Relative *APNG* mRNA-Expression in LN18 Wildtyp vs. LN18 TMZ-resistenten Gliomzellen. *Abzisse:* Unterscheidung der Zelllinie nach Wildtyp (LN-18) und TMZ-resistenter Variante (LN-18 R). *Ordinate:* Relative *APNG* mRNA-Expression; In der statistischen Analyse mittels ‚Student’s t-test‘ konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,065$) in der *APNG* mRNA- Expression nachgewiesen werden.

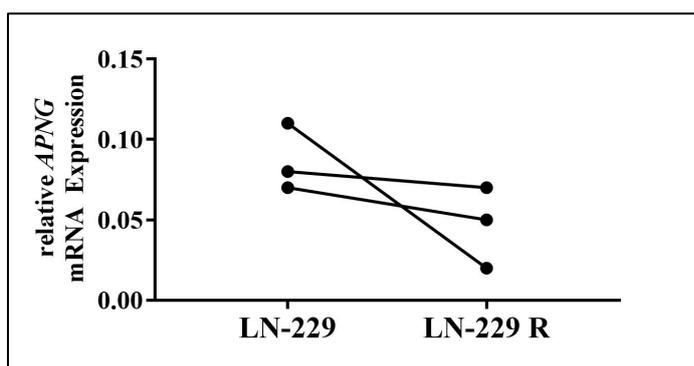


Abbildung 10: Relative *APNG* mRNA-Expression in LN-229 Wildtyp vs. LN-229 TMZ-resistenten Zellen. *Abzisse:* Unterscheidung der Zelllinie nach Wildtyp (LN-229) und TMZ-resistenter Variante (LN-229 R). *Ordinate:* Relative *APNG* mRNA-Expression; In der statistischen Analyse mittels ‚Student’s t-test‘ konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,259$) in der *APNG* mRNA-Expression nachgewiesen werden.

4.3 Methylierungsanalyse des *APNG*-Promotors in ausgewählten Gliomen

Der *APNG* Promotor-Methylierungsstatus wurde an 8 ausgewählten IDH-Wildtyp Glioblastomen, WHO-Grad IV und drei ausgewählten IDH-mutierten Glioblastomen, WHO-Grad IV durch Sanger-Sequenzierung von Bisulfit-behandelter Tumor-DNA bestimmt. Außerdem erfolgte eine *APNG* mRNA-Expressionsanalyse mittels Real time RT-PCR bei drei Gliomzelllinien, die mit 5-AZA und TSA behandelt worden waren im Vergleich zu den kontrollbehandelten Gliomzelllinien. Um die Methylierungsanalyse zu vervollständigen, wurde ebenfalls der Versuch einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) unternommen.

4.3.1 Bisulfit-Sequenzierung der *APNG*-assoziierten 5'-CpG-Insel

Die Abbildung 11 zeigt schematisch die 5'-genomische Region des *APNG* Gens, die in zwei Sequenzierungsanalysen nach vorheriger Natrium-Bisulfitbehandlung der DNA auf methylierte Cytosine in CpG-Dinukleotiden hin untersucht wurde. Eingezeichnet sind dabei die Primerbindungsstellen der für die Bisulfit-Sequenzierung verwendeten eigenen Primer und der von Agnihorti et al. (2012) verwendeten Primer.

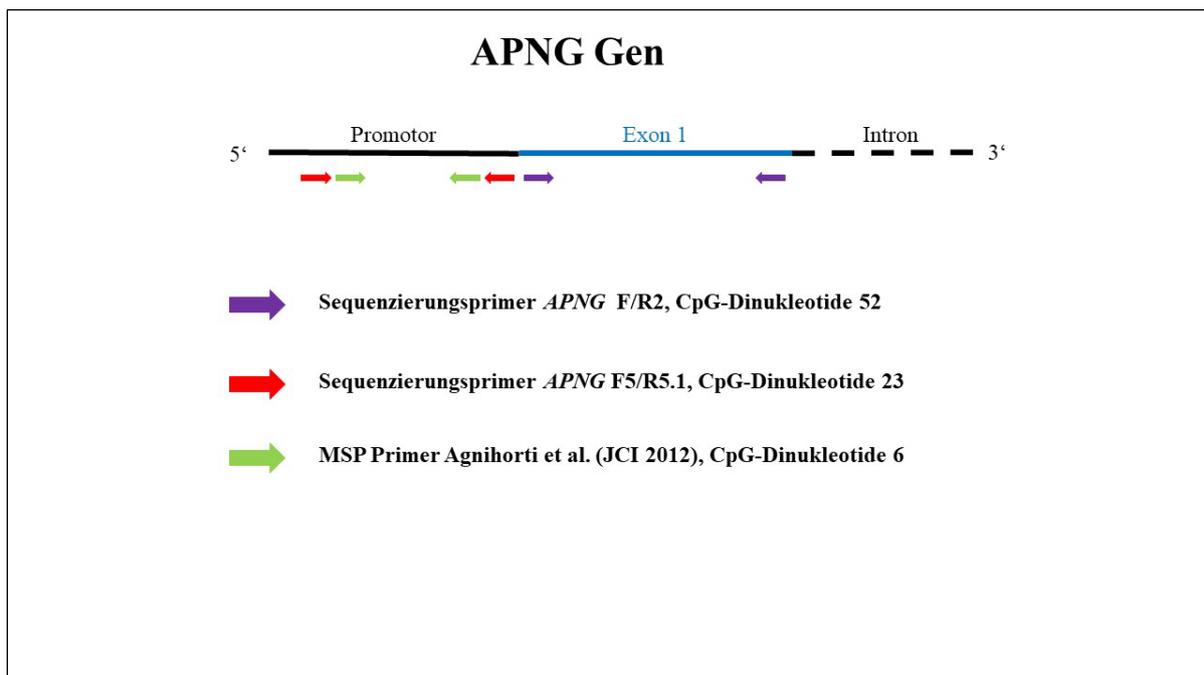


Abbildung 11: Übersicht über die verwendeten Primerbindungsstellen zur Methylierungsuntersuchung der 5-CpG-Insel des *APNG*-Gens. Die erste durch Sequenzierung analysierte Region im Bereich von Exon 1 ist blau markiert und durch die lila markierten Primerbindungsstellen (*APNG*-bisu-F/Not und *APNG*-bisu-R2, siehe Tabelle 7) begrenzt. Das untersuchte Amplikon ist 365 bp groß und umfasst 52 CpG Dinukleotide. Die zweite durch Sequenzierung untersuchte genomische Region ist hier als durchgehender schwarzer Balken dargestellt und befindet sich in der potentiellen Promotorregion von *APNG*. Die rot markierten Primerbindungsstellen umspannen ein 274 bp-großes Amplikon mit 23 CpG Dinukleotiden und analysieren den gleichen Genabschnitt, der von anderen Autoren untersucht wurde (Agnihotri et al. 2012). Die bei Agnihotri et al. (2012) beschriebenen MSP-Primer wurden ebenfalls zur Analyse genutzt; diese detektieren 6 CpG-Dinukleotide und sind grün dargestellt.

In der Methylierungsanalyse der 5'-CpG-Insel in der Promotorregion und Exon 1 des *APNG*-Gens fanden sich in den untersuchten IDH-Wildtyp und IDH-mutierten Glioblastomen, WHO Grad IV mittels DNA-Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA mit Ausnahme eines Falls keine methylierten CpG-Dinukleotide. Die als negative Kontrolle sequenzierte DNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe zeigte ebenfalls keine Methylierung. Die als positive Kontrolle untersuchte *in vitro*-methylierte DNA zeigte an allen detektierten CpG-Dinukleotiden methylierte Cytosine, so dass generell mit der verwendeten Methode methylierte CpGs nachgewiesen werden konnten (Abbildung 12). Eine geringe Methylierung fand sich in einem der untersuchten IDH-mutierten Glioblastome. Hier waren lediglich zwei von 23 untersuchten CpG-Dinukleotiden in der abgedeckten Region des *APNG*-Gens partiell methyliert (Abbildung 13). In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Glioblastome nach Analyse mit den Primern APNG-bisu-F5/R5.2 zusammengefasst.

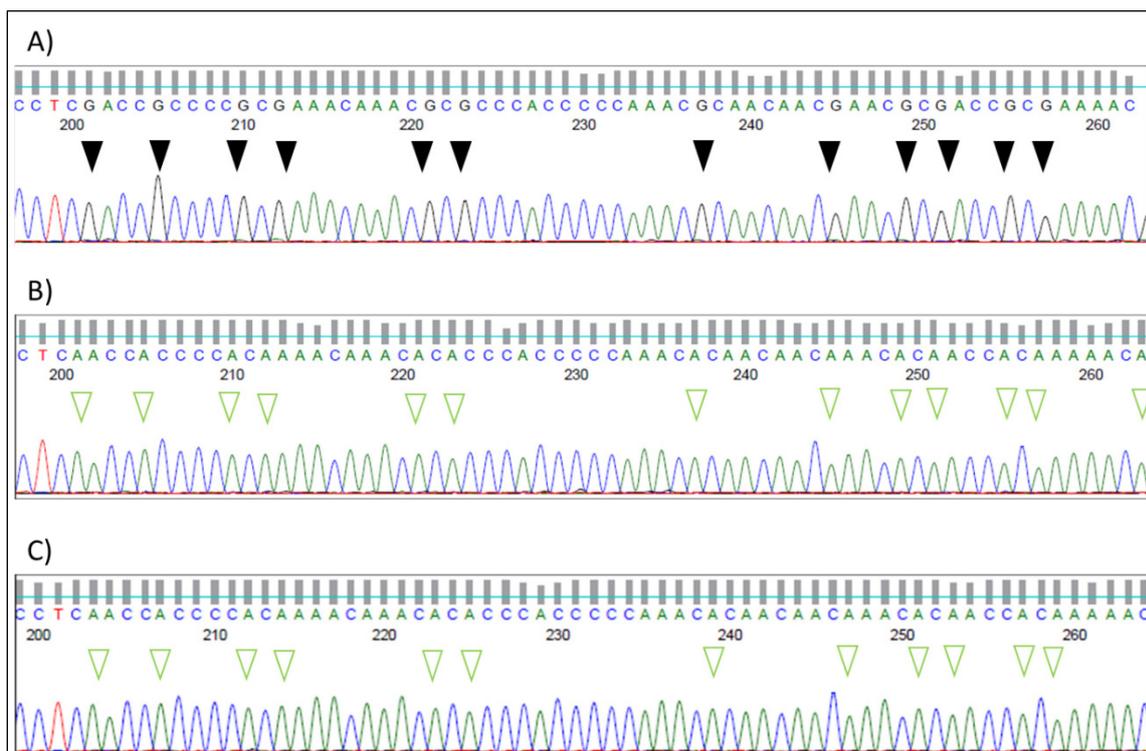


Abbildung 12: Ausschnitt des Methylierungsmusters in der APNG-assoziierten 5'CpG-Insel für *in vitro*-methylierte DNA (A), DNA aus normalem Hirngewebe (B) und DNA aus einer primären Glioblastomprobe (C). Dargestellt sind Ausschnitte der Elektropherogramme mit CpG-Dinukleotidstellen des untersuchten DNA-Abschnitts nach Sequenzierung des Gegenstranges. A, Die *in vitro*-methylierte DNA als positive Kontrolle zeigt vollständig methylierten CpG-Dinukleotide an den untersuchten Stellen. B, Die DNA aus normalem Hirngewebe weißt keine Methylierung aus. C, Die DNA aus dem exemplarisch ausgewählten primären Glioblastom, WHO-Grad IV zeigt ebenfalls keine Methylierung.

Untersuchte Probe	IDH Status	Detektiertes CpG-Dinukleotid (Primer F5/R5.1), MSP Primer Agnihotri et al.																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Glioblastom	IDH Wildtyp	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glioblastom	IDH Wildtyp	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glioblastom	IDH Wildtyp	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glioblastom	IDH mutiert	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	
Glioblastom	IDH mutiert	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glioblastom	IDH mutiert	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Met. DNA		nd	nd	nd	nd	nd	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Normales Hirngewebe		nd	nd	nd	nd	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Abbildung 13: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierungsanalyse der APNG-Promotorregion. Die untersuchten CpG-Dinukleotide wurden von 1-23 durchnummeriert. In der Auswertung der Ergebnisse konnten die ersten 5 CpG-Dinukleotide nicht sicher sequenziert werden und gelten als ‚nicht detektiert‘ (=nd). Die restlichen CpG-Dinukleotide wurden in ihrer Methylierungsausprägung in einer Skala von 0-3 erfasst, ‚0‘ steht für fehlende Methylierung, ‚1‘ für fragliche Methylierung, ‚2‘ für wahrscheinliche Methylierung und ‚3‘ für gesicherte Methylierung. Die positive Kontrolle entspricht in *vitro* methylierter DNA (Met. DNA) und als negative Kontrolle fungierte DNA aus normalem Hirngewebe. Zusätzlich wurden in Grün die Positionen der von Agnihotri et al (Agnihotri et al. 2012) mittels MSP detektierten CpG-Dinukleotide markiert.

4.3.2 APNG mRNA-Expression in 5-AZA- oder TSA-behandelten Glioblastomzelllinien

Eine weitere Methode, um DNA-Methylierung als potentiellen Regulationsmechanismus für die APNG-Transkription zu untersuchen, besteht in der APNG mRNA-Expressionsanalyse in Glioblastomzelllinien mit und ohne 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-AZA) oder Trichostatin A (TSA) Behandlung. Durch die Behandlung der Zellen mit 5-AZA kommt es zu einer Demethylierung der DNA durch Hemmung der DNA-Methyltransferase. Die Gabe von TSA führt zu einer Acetylierung der Histone durch Inhibierung der Histondeacetylase. Dadurch kann die Gentranskription epigenetisch regulierter Gene erhöht werden. Die relative APNG mRNA-Expression wurde in den Gliomzelllinien A172, TP365MG und T98G mit und ohne 5-AZA- oder TSA-Behandlung mittels Real-time RT-PCR bestimmt. Keine der drei untersuchten Zelllinien zeigte nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung eine signifikante Steigerung der APNG mRNA-Expression im Vergleich zu jeweils nur mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelten Kontrollzellen. Auch eine höhere Konzentration an 5-AZA (2 µM) oder TSA (1 µM), die über eine Einwirkzeit von 72 h behandelt wurden, brachten keine signifikante Änderung der APNG mRNA Expression. Die Kombination aus 5-AZA und TSA wurde hier nicht untersucht Die Ergebnisse in den einzelnen Zelllinien sind in den Abbildungen 14-16 zusammengefasst.

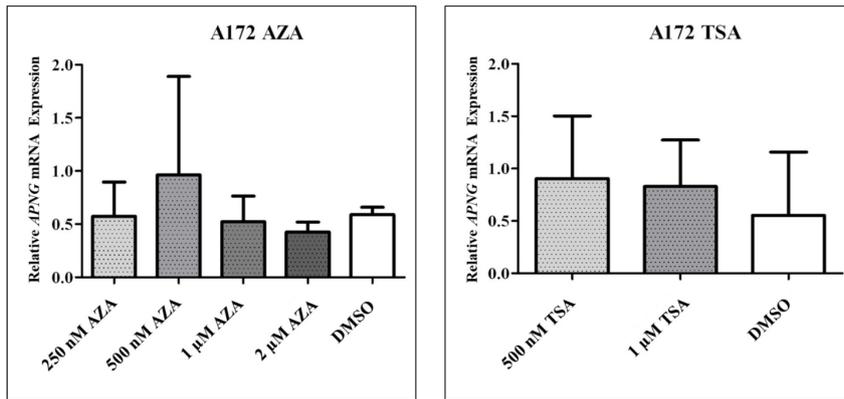


Abbildung 14: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie A172 nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative *APNG* mRNA-Expression in der Zelllinie A172 mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte *APNG* mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

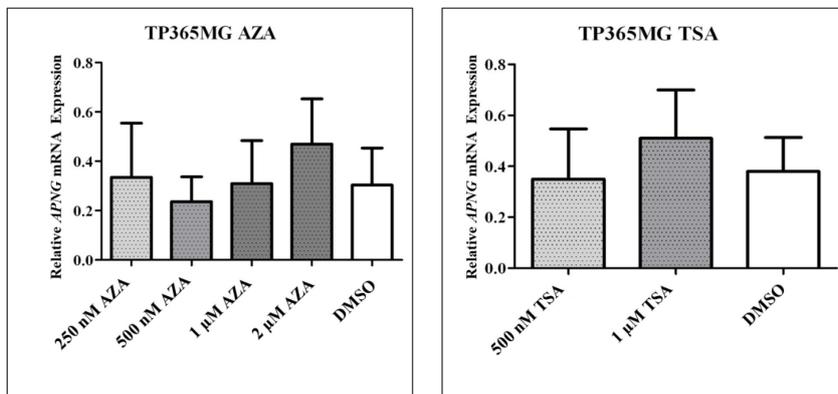


Abbildung 15: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie TP365MG nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative *APNG* mRNA-Expression in der Zelllinie TP365MG mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte *APNG* mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

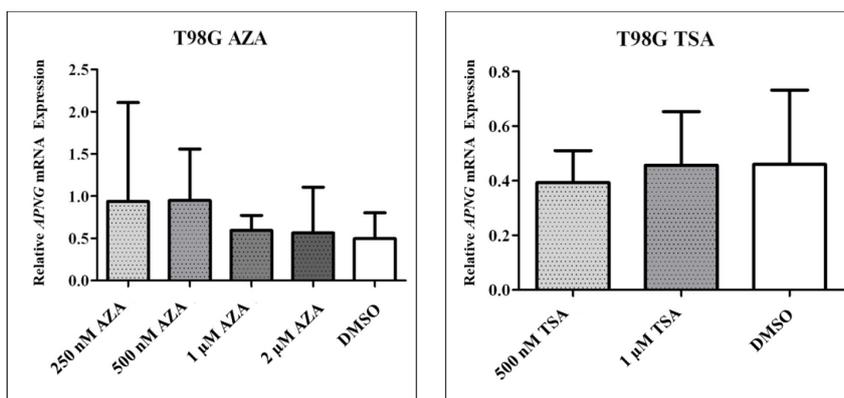


Abbildung 16: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie TP98G nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative *APNG* mRNA-Expression in der Zelllinie TP98G mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte *APNG* mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

4.3.3 Methylierungsspezifische PCR

Ein weiteres sensitives Verfahren zur Detektion einer DNA-Methylierung besteht in der methylierungsspezifischen PCR (MSP). Hierbei binden spezifische Primer an die zuvor mit Natriumbisulfit-behandelte DNA. Dabei binden die Primer zur Amplifizierung methylierter DNA mit unveränderten CpG-Dinukleotiden und die Primern zur Vervielfältigung unmethylierter DNA entsprechend nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die vorhandene Matritze und ermöglichen je nach erfolgter Bindung eine Amplifizierung. Das Ergebnis der PCR wird mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. In dieser Arbeit wurde eine Region im Promotorbereich des *APNG*-Gens mittels MSP untersucht. Die Primerbindungsstellen enthalten jeweils drei CpG-Dinukleotide. Die verwendeten Primer wurden bereits von Agnihotri et al. (2012) zur *APNG*-Methylierungsanalyse genutzt. Untersucht wurden zwei nicht-neoplastische Hirngewebsproben, die Zelllinie A172, welche im Promotorbereich nach Agnihotri et al. 2012 eine Methylierung aufweist, und die *in vitro*-methylierte DNA als positive Kontrolle (Abbildung 17). Auf Grund der nur sehr schwachen detektierten DNA-Banden und fehlender Reproduktion der Ergebnisse in mehrfachen unabhängigen Reaktionsansätzen wurde auf eine Ausweitung der Methode auf DNA aus Tumorgewebe verzichtet. Wie oben beschrieben wurde stattdessen die Bisulfit-Sequenzierungsanalyse durchgeführt, bei welcher die beschriebenen APNG-bisu F5/R5.1 Primer den gleichen Promotorbereich detektierten wie die verwendeten MSP-Primer (vgl. Abbildung 11).

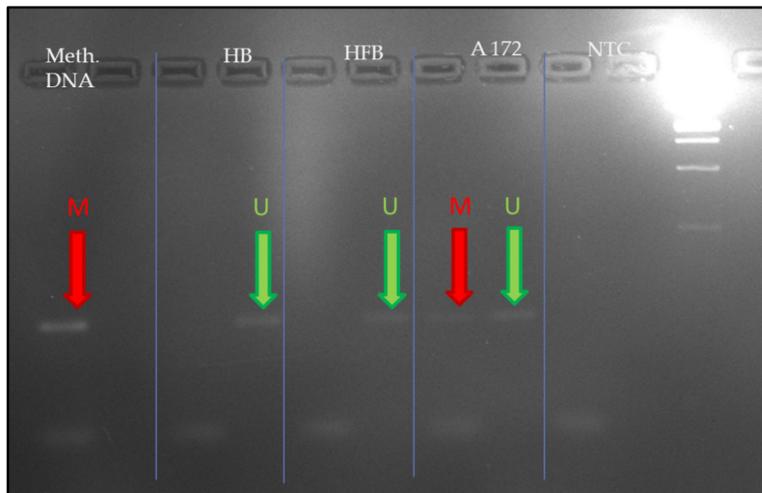


Abbildung 17: Ergebnis MSP-Analyse des APNG-Promotors. Links im Bild ist die positive Kontrolle der *in vitro* methylierten DNA (Meth. DNA) aufgetragen, dann folgend die beiden negativen Kontrollen Human Brain (HB) und Human fetal Brain (HFB), gefolgt von der Zelllinie A172. Ganz rechts die leere Kontrolle (NTC) und der Größenmarker. Die roten Pfeile zeigen PCR-Produktbanden für die methylierte (M) und die grünen Pfeile zeigen PCR-Produktbanden für die unmethylierte (U) Sequen, jeweils mit einer Größe von 101 bp, an. Die Zelllinie A172 weist eine schwache methylierte Bande und eine unmethylierte Bande auf, als Hinweis für eine geringe APNG-Promotormethylierung.

4.4 APNG-Proteinexpression in Glioblastomen und Korrelation zur *APNG* mRNA-Expression

Mittels immunhistochemischer Färbung wurde die Expression des APNG-Proteins im Tumorgewebe von Glioblastomen, IDH-Wildtyp, WHO-Grad IV bestimmt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mikroskopisch beurteilt und semiquantitative ausgewertet. Die immunhistochemischen Daten wurden mit den *APNG* mRNA-Expressionswerten in den selben Tumoren (n=32) verglichen und mit den Überlebensdaten der Patienten korreliert. Die APNG-Proteinexpression in Tumorgewebe wurde in Gewebeschnitten von 52 Glioblastomen mit einem *APNG*-spezifischen Antikörper bestimmt. Als Positivkontrolle wurde nicht neoplastisches Kortexgewebe verwendet, welches eine nukleäre und zytoplasmatische APNG-Expression aufweist. Immunhistologisch fand sich im Tumorgewebe überwiegend eine nukleäre Expression und nur in Einzelfällen konnte eine schwache zytoplasmatische Expression (n=4) nachgewiesen werden. Dabei fand sich eine ausgeprägte intra- und intertumorale Heterogenität der APNG-Expression, mit Markierungsraten zwischen 0% und maximal >80% positiver Tumorzellen. Die Auswertung der APNG-Proteinexpression wurde von zwei Untersuchern (einem erfahrenen Neuropathologen und der Autorin der vorliegenden Arbeit) unabhängig voneinander durchgeführt. Bei unterschiedlichen Auswertungsergebnissen wurden die entsprechenden Fälle simultan mikroskopisch nachuntersucht und ein abgestimmter Wert ermittelt. Eine Expression von APNG in 10% oder mehr der Tumorzellen wurde APNG-positiv gewertet. Insgesamt zeigten 49 % der Tumoren (n=26) eine APNG-Proteinexpression in 10% oder mehr der Tumorzellen (10-50% n=9; >50-80% n=6; >80% n=11). Von den untersuchten Tumoren wiesen 51% (n=26) keine APNG Färbung bzw. eine Färbung in < 10% der Tumorzellen auf. Repräsentative Bilder der APNG-Proteinexpression in unterschiedlichen Tumoren finden sich in Abbildung 18. Die *APNG* mRNA-Expression korrelierte in den untersuchten Tumoren nicht mit der APNG Proteinexpression (Abbildung 19).

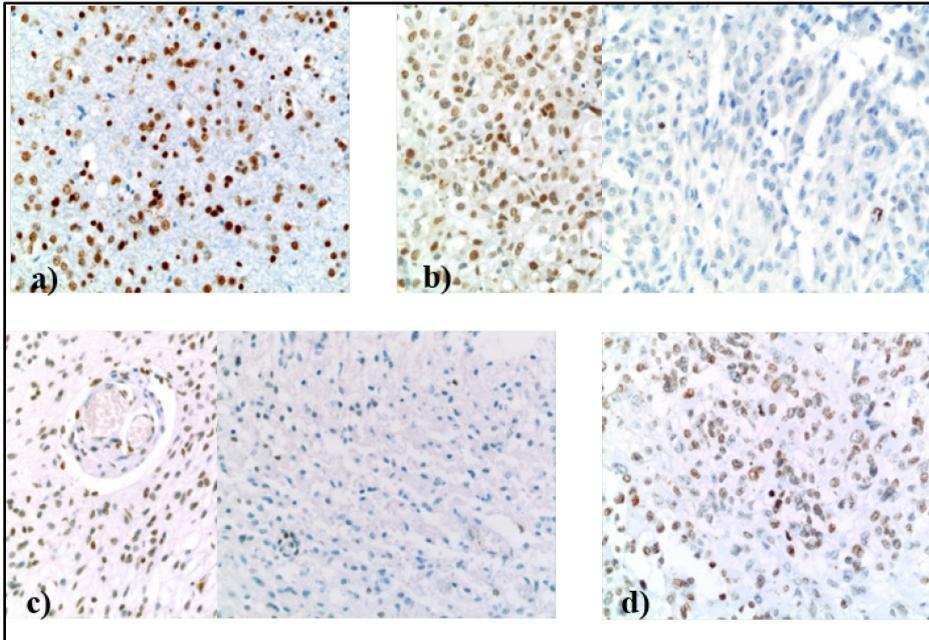


Abbildung 18: APNG Expression in Tumorgewebe. Unter a) Darstellung einer positiven APNG Expression in Tumorgewebe mit starker positiver Nuclei Färbung. Unter b) ein ebenfalls als positiv gewerteter Tumor, welcher ebenfalls Anteile ohne APNG Nuclei Färbung zeigt, als Beispiel für das eher heterogene Färbeergebnis in einzelnen Tumoren. Unter c) eine schwache Anfärbung der Nuclei mit ebenfalls großen Anteilen von nicht angefärbten Nuclei. Unter d) ebenfalls eine schwach positive Anfärbung weniger Nuclei in einem der untersuchten Tumoren.

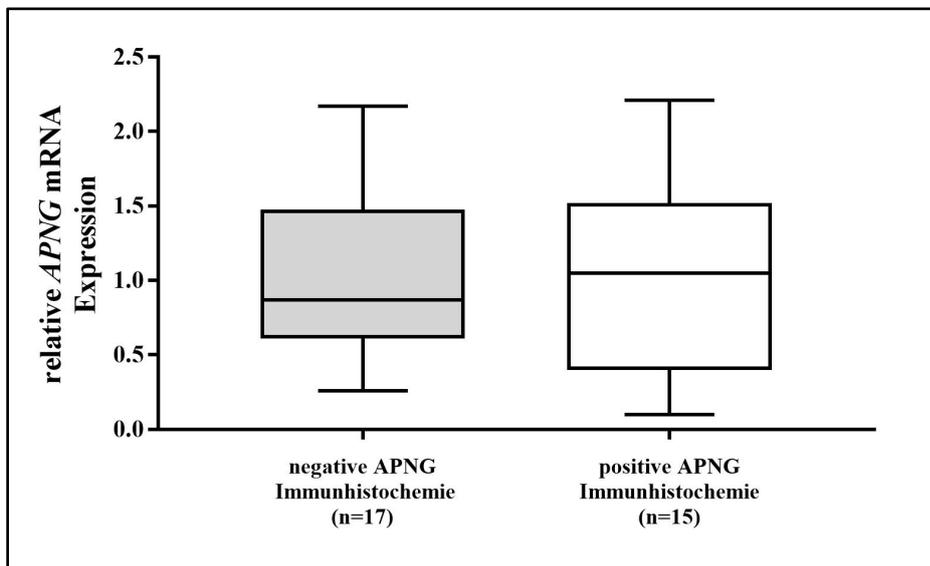


Abbildung 19: Relative APNG mRNA-Expression in immunohistochemisch als ‚negativ‘ gewertete Glioblastome Vergleich zu immunohistochemisch als ‚positiv‘ gewertete Glioblastome. *Abzisse:* Unterscheidung zwischen den Glioblastomen nach Immunohistochemie. *Ordinate:* Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse (‚Student’s t-test‘) ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,7663$) in der APNG mRNA-Expression zwischen immunohistochemisch ‚negativen‘ und ‚positiven‘ Tumoren nachweisen.

Tumor-Nr.	Diagnose	WHO Grad	Alter	Geschlecht	Operiert	Temozolomid	mRNA Expressionslevel	Immunhistochemie		OS in Tagen
GB2076	Glioblastom	IV	75	w	NC HHU	Stupp	0,26	(-)	1	274
GB2127	Glioblastom	IV	58	w	NC HHU	Stupp	0,53	(-)	1	1137
GB1862	Glioblastom	IV	54	m	NC HHU	Stupp	0,77	(-)	0	384
GB1804	Glioblastom	IV	60	w	NC HHU	Stupp	0,82	(-)	0	256
GB1559	Glioblastom	IV	56	m	NC HHU	stupp	1,46	(-)	1	1446
GB1999	Glioblastom	IV	67	w	NC HHU	Stupp	0,46	<10%	0	157
GB2214	Glioblastom	IV	39	m	NC HHU	Stupp	0,47	<10%	1	1166
GB1768	Glioblastom	IV	40	w	NC HHU	Stupp	0,69	<10%	0	473
GB2138	Glioblastom	IV	44	m	NC Bochum	Stupp	0,78	<10%	1	716
GB2250	Glioblastom	IV	45	m	NC HHU	Stupp	0,87	<10%	1	559
GB1566	Glioblastom	IV	48	w	NC HHU	Stupp	0,93	<10%	1	2006
GB2010	Glioblastom	IV	69	m	NC HHU	Stupp	1	<10%	1	544
GB2249	Glioblastom	IV	59	m	NC HHU	Stupp	1,35	<10%	0	480
GB2074	Glioblastom	IV	32	m	NC HHU	EORTC	1,49	<10%	1	447
GB2176	Glioblastom	IV	77	w	NC HHU	Stupp	1,8	<10%	1	143
GB2038	Glioblastom	IV	69	m	NC HHU	Stupp	2,06	<10%	1	588
GB2057	Glioblastom	IV	66	w	NC HHU	TMZ	2,17	<10%	1	324
GB1655	Glioblastom	IV	57	m	NC HHU	TMZ	(-)	<10%	0	3760
GB1721	Glioblastom	IV	52	w	NC HHU	TMZ	(-)	<10%	1	1008
GB1763	Glioblastom	IV	45	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	3364
GB1914	Glioblastom	IV	79	w	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	56
GB1936	Glioblastom	IV	76	w	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	1	984
GB1990	Glioblastom	IV	41	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	1047
GB1852	Glioblastom	IV	67	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	431
GB2124	Glioblastom	IV	57	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	1	206
GB2163	Glioblastom	IV	73	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	1	390
GB2238	Glioblastom	IV	54	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	852
GB2268	Glioblastom	IV	47	w	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	0	187
GB2339	Glioblastom	IV	74	w	NC HHU	TMZ	(-)	<10%	1	453
GB2279	Glioblastom	IV	56	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	1	448
GB2290	Glioblastom	IV	38	m	NC HHU	Stupp	(-)	<10%	1	531
GB2277	Glioblastom	IV	71	m	NC HHU	TMZ	0,2	>80%	1	1075

GB1697	Glioblastom	IV	55	m	NC HHU	TMZ	0,31	>80%	1	1182
GB2292	Glioblastom	IV	63	w	NC HHU	Stupp	0,4	>80%	0	14
GB2019	Glioblastom	IV	61	m	NC HHU	TMZ	0,43	>80%	0	660
GB1915	Glioblastom	IV	42	w	NC HHU	TMZ	1,01	>80%	0	x
GB1932	Glioblastom	IV	81	w	NC HHU	Stupp	1,05	>80%	0	237
GB2144	Glioblastom	IV	51	m	NC HHU	TMZ	1,08	>80%	1	1788
GB2175	Glioblastom	IV	76	w	NC HHU	TMZ	1,25	>80%	0	692
GB1788	Glioblastom	IV	60	m	NC HHU	Stupp	(-)	>80%	0	2000
GB2158	Glioblastom	IV	72	w	NC HHU	Stupp	(-)	>80%	1	407
GB2246	Glioblastom	IV	68	w	NC HHU	Stupp	(-)	>80%	0	244
GB2188	Glioblastom	IV	80	w	NC HHU	Stupp	0,1	10-50%	0	1783
GB2005	Glioblastom	IV	50	m	NC HHU	TMZ	0,84	10-50%	0	671
GB2260	Glioblastom	IV	47	m	NC HHU	Stupp	1,52	10-50%	1	394
GB2295	Glioblastom	IV	45	m	NC HHU	TMZ	1,54	10-50%	0	488
GB2022	Glioblastom	IV	53	m	NC HHU	Stupp	2,21	10-50%	1	1121
GB1658	Glioblastom	IV	38	m	NC HHU	Stupp	(-)	10-50%	0	2893
GB1730	Glioblastom	IV	57	m	NC HHU	Stupp	(-)	10-50%	1	760
GB1851	Glioblastom	IV	66	m	NC HHU	Stupp	(-)	10-50%	0	3104
GB2297	Glioblastom	IV	75	w	NC HHU	Stupp	(-)	10-50%	0	125
GB2337	Glioblastom	IV	39	m	NC HHU	Stupp	1,05	50-80%	0	1098
GB2234	Glioblastom	IV	72	m	NC HHU	Stupp	1,86	50-80%	0	1684
GB2110	Glioblastom	IV	57	m	NC HHU	Stupp	(-)	50-80%	1	236
GB2187	Glioblastom	IV	71	w	NC HHU	Stupp	(-)	50-80%	0	407
GB2218	Glioblastom	IV	54	m	NC HHU	Stupp	(-)	50-80%	1	724
GB2243	Glioblastom	IV	62	m	NC HHU	Stupp	(-)	50-80%	1	915

4.5 Prognostische Bedeutung der APNG mRNA- und Proteinexpression in Glioblastompatienten

Die Analyse der Überlebensdaten der untersuchten Patienten mit IDH-Wildtyp Glioblastomen in Abhängigkeit von der *APNG* mRNA-Expression ergab keine statistisch signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Abbildung 20). Hierbei wurde die untersuchte Patientenkohorte anhand des medianen *APNG* mRNA-Expressionslevels in Tumoren mit niedriger *APNG* mRNA-Expression und Tumoren mit hoher *APNG* mRNA-Expression unterteilt (Abbildung 20).

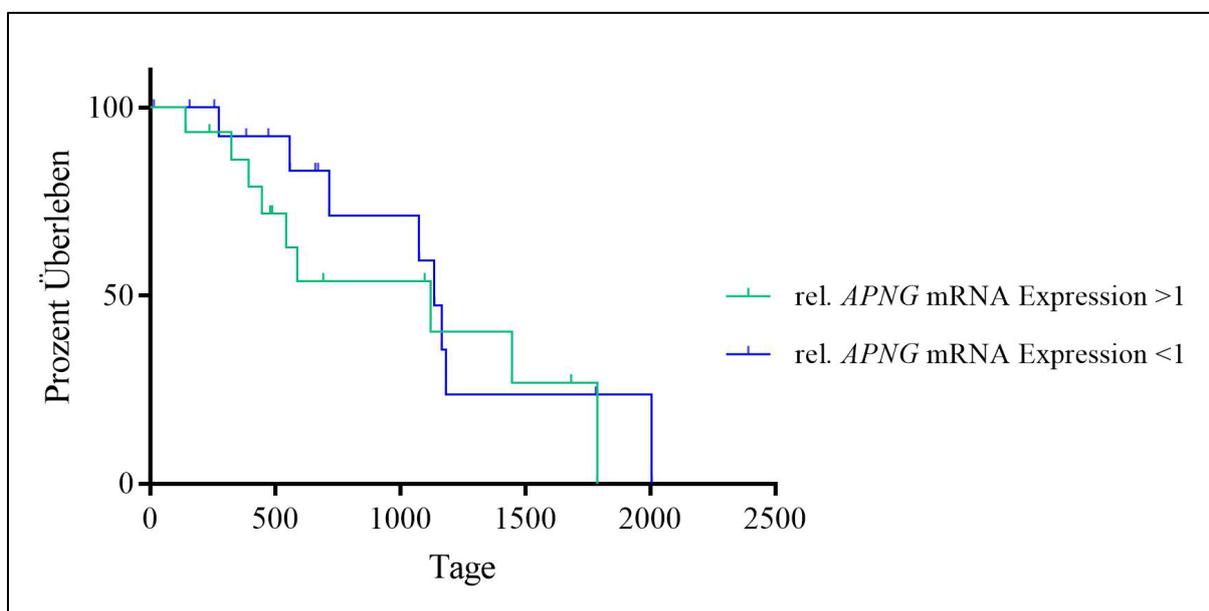


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Darstellung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der relativen APNG mRNA-Expression. *Abzisse:* Gesamtüberleben der Patienten in Prozent. *Ordinate:* Zeit in Tagen; In der statistischen Analyse mittels Log-rank-Test ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,466$) zwischen den beiden Patientengruppen mit unterschiedlicher *APNG* mRNA-Expression nachweisen.

In die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden die Ergebnisse für 52 Patienten mit IDH-Wildtyp Glioblastomen, WHO-Grad IV aufgenommen, darunter 26 Patienten mit einer APNG-Expression in $< 10\%$ der Tumorzellen und 26 Patienten mit einer APNG-Expression in $\geq 10\%$ der Tumorzellen. Hier konnte im Vergleich der beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit nachgewiesen werden ($p=0,0354$), bei einem medianen Gesamtüberleben von 588 Tagen in der Patientengruppe mit niedriger APNG-Proteinexpression und 1182 Tagen in der Patientengruppe mit hoher APNG-Proteinexpression (Abbildung 21).

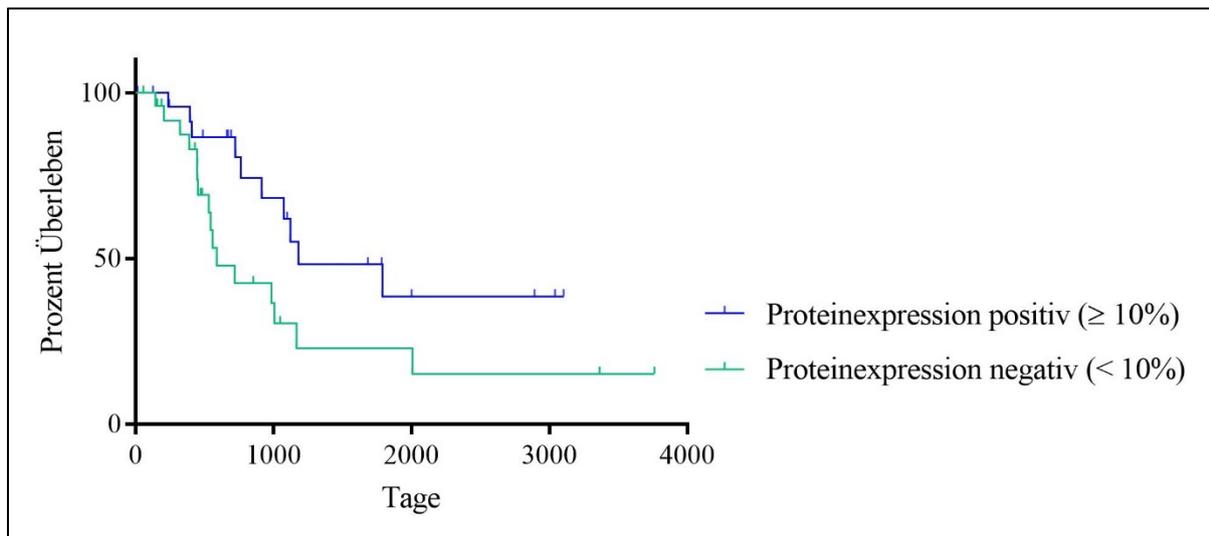


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurven zur Darstellung des prozentualen Gesamtüberlebens von Glioblastompatienten in Abhängigkeit von der APNG-Proteinexpression. *Abszisse:* Gesamtüberleben der Patienten in Prozent. *Ordinate:* Zeit in Tagen; In der statistischen Analyse mittels Log-rank-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0354$) des Gesamtüberlebens im Vergleich der Gruppen mit niedriger APNG-Proteinexpression (<10%) versus hoher APNG-Proteinexpression ($\geq 10\%$).

5 Diskussion

APNG kodiert für ein DNA-Reparaturenzym des „*Base Exzision Pathways*“ und spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von alkylierten Basen in der DNA, wie sie zum Beispiel durch das Chemotherapeutikum Temozolomid verursacht werden können (Agnihotri et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *APNG* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Tumorkohorten untersucht. Insgesamt flossen dabei Analysen an 108 IDH-Wildtyp Glioblastomen und 34 IDH-mutierten Gliomen ein. Zusätzlich wurden ausgewählte Tumoren bezüglich einer möglichen epigenetischen Regulation der *APNG* Expression hin untersucht. Schließlich wurden zur Frage einer möglichen prognostischen Bedeutung die Ergebnisse der *APNG*-Expression auf mRNA- und Proteinebene mit dem postoperativen Überleben von Patienten mit IDH-Wildtyp Glioblastomen korreliert.

5.1 *APNG* mRNA-Expression in Gliomen

In den untersuchten IDH-Wildtyp Glioblastomen konnte eine signifikant gesteigerte *APNG* mRNA-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu normalen Hirngewebe nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Untersuchungen (Fosmark et al. 2017) (Kim et al. 2003), die ebenfalls über eine erhöhte *APNG* mRNA-Expression in Gliomen anhand einer Datenanalyse der The Cancer Genome Atlas (TCGA) Datenbank (www.cancer.gov/tcga) berichteten. Eine erhöhte Expression dieses DNA-Reparaturenzyms konnte auch in Tumorgewebe verschiedener anderer Tumoren beobachtet werden, darunter Mammakarzinome (Cerdea et al. 1998), Ovarialkarzinome (Fishel et al. 2007) und Ösophaguskarzinome (Zair et al. 2013).

Auch in IDH-mutierten Gliomen fand sich eine im Vergleich zu normalem Hirngewebe eine erhöhte *APNG* mRNA-Expression. Ein Vergleich der *APNG* mRNA-Expression zwischen den IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen, WHO-Grad II und III ergab keinen signifikanten Unterschied. Auch eine Analyse der *APNG* mRNA-Expression in IDH-mutierten Glioblastomen zeigte keinen Unterschied gegenüber IDH-Wildtyp Glioblastomen. Lediglich in der Gruppe der IDH-mutierten astrozytären Gliome konnte ein signifikanter Unterschied in der *APNG* mRNA-Expression zwischen diffusen Astrozytomen, WHO-Grad II und Glioblastomen, WHO-Grad IV nachgewiesen werden, mit niedrigerem Expressionsniveau in den Glioblastomen. Die *APNG* mRNA-Expression in IDH-mutierten anaplastischen Astrozytomen, WHO-Grad III unterschied sich nicht signifikant zu der in

IDH-mutierten diffuse Astrozytomen, WHO-Grad II oder in IDH-mutierten Glioblastomen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Fosmark et al. (2017), die eine Zunahme der relativen *APNG* mRNA-Expression in Glioblastomen, WHO-Grad IV gegenüber niedriggradigeren Gliomen der WHO-Grade II und III in der TCGA-Kohorte berichteten. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnten in den unterschiedlichen Methoden der Genexpressionsanalyse, d.h. Mikroarray- und RNA-Sequenzierung-basierte Expressionsdaten in der TCGA-Kohorte und semiquantitative Realtime-PCR-basierte Expressionsdaten in der eigenen institutionellen Kohorte, liegen. Darüber hinaus erfolgte in der eigenen Arbeit im Gegensatz zu Fosmark *et al.* (Fosmark et al. 2017) eine Einteilung der Gliome nach dem IDH-Status gemäß den aktuellen Kriterien der WHO-Klassifikation 2016 (Louis et al. 2016). Schließlich könnten die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der *APNG* mRNA-Expression in den niedriggradigen Gliomen auch in der in dieser Arbeit untersuchten im Vergleich deutlichen kleineren Fallzahl begründet sein.

Ein weiterer Vergleich der *APNG* mRNA-Expression in IDH-mutierten Astrozytomen WHO-Grad II und III und den IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen WHO-Grad II und III mit der Expression des Gens in IDH-Wildtyp Glioblastomen WHO-Grad IV scheint auf Grund der unterschiedlichen Biologie dieser Tumoren nicht sinnvoll. Daher wurde in dieser Arbeit nur die *APNG* mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen der WHO-Grade II und III mit der Expression in IDH-mutierten Glioblastomen, WHO-Grad IV verglichen, bzw. die *APNG* mRNA-Expression zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Glioblastomen, WHO-Grad IV untersucht.

5.2 Regulation der *APNG* mRNA-Expression durch Promotormethylierung

Agnihotri et al. (Agnihotri et al. 2012) beschrieben in ihrer Arbeit eine aberrante Promotormethylierung als wesentlichen Regulationsmechanismus für die *APNG* mRNA-Expression und verglichen die Relevanz dieser Ergebnisse mit dem prognostischen Wert der *MGMT*-Promotormethylierung in Glioblastomen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Methylierungsstatus von Teilbereichen der *APNG*-Promotorregion mittels Sanger-Sequenzierung von Bisulfit-modifizierter Tumor-DNA in ausgewählten Gliomen untersucht. Um eine mögliche Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der Regulation der *APNG* mRNA-Expression nachzuweisen, erfolgte zusätzlich die Analyse der *APNG* mRNA-

Expression in mit demethylierenden Agentien und Histondeacetylase-Inhibitoren behandelten Gliomzellen.

In den hier untersuchten mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-AZA) und Trichostatin A (TSA) behandelten A172, T98G und TP365MG Gliomzellen konnte allerdings ein Expressionsanstieg von *APNG* im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen nicht nachgewiesen werden, ein Ergebnis, das im Gegensatz zu den Ergebnissen von Agnihotri et al. (2012) steht, die einen signifikanten Anstieg der *APNG* mRNA-Expression in der A172 Zelllinie nach Behandlung mit 5-AZA und TSA beobachteten. Dabei ist auffällig, dass eine *APNG* mRNA-Expression in unbehandelten A172 Zellen mittels qRT-PCR in der Arbeit von Agnihotri et al. (Agnihotri et al. 2012) nicht nachweisbar war, während die in dieser Arbeit verwendeten A172 Zellen eine nachweisbare *APNG* mRNA-Expression zeigten. Über die Ursachen dieser Diskrepanz lässt sich nur spekulieren, es scheint jedoch wenig wahrscheinlich, dass in den A172 Zellen der durch *APNG* vermittelte Mechanismus der DNA-Reparatur bereits auf Ebene der mRNA Expression vollständig ausgeschaltet vorliegt. In den anschließenden Bisufit-Sequenzierungsanalysen wurden ausgewählte IDH-mutierte und IDH-Wildtyp Glioblastome mit erniedrigtem und erhöhtem *APNG* mRNA-Expressionsniveau untersucht. Hierbei fand sich nur in einem Fall eine geringe Methylierung (zwei von 18 untersuchten CpG-Stellen). Diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Widerspruch zu denen von Agnihotri et al. (2012), die in 11 Glioblastomen mit niedriger *APNG* mRNA-Expression eine 70-80% Methylierung in den untersuchten CpG-Dinukleotiden im *APNG*-Promotor nachweisen konnte. In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen fanden Wiestler et al. ((Wiestler et al. 2013) mittels einer MassARRAY Analyse und einer Illumina 450k Array Analyse des *APNG* Promotors/Intron 1 in insgesamt 183 Glioblastomen lediglich eine sehr geringe Methylierung in der *APNG*-Promotorregion. Dabei wurden 22 Proben mit beiden Verfahren untersucht, um einen Verfahrensfehler ausschließen zu können. Insgesamt scheint somit eine epigenetische transkriptionelle Inaktivierung des *APNG*-Gens in Glioblastomen wenn überhaupt nur sehr selten vorzuliegen. Hierzu passt auch der Befund, dass die Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastome im Vergleich zu normalem Hirngewebe eine erhöhte *APNG* mRNA-Expression aufwiesen, was auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden konnte (Kim et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen somit eindeutig darauf hin, dass der *APNG*-Promotormethylierung und verminderten *APNG*-Expression in Glioblastomen keine wesentliche Bedeutung zukommt.

5.3 APNG-Proteinexpression in Gliomen und Korrelation mit der APNG mRNA-Expression

Die immunhistochemische Analyse der Proteinexpression von APNG in 52 IDH-Wildtyp Glioblastomen zeigte eine deutliche intratumorale und intertumorale Heterogenität. Insgesamt zeigten 73% der untersuchten IDH-Wildtyp Glioblastome eine nukleäre APNG-Expression in weniger als 50% der ausgezählten Tumorzellen. Trotz der Verwendung des gleichen Antikörpers, der auch von Agnihotri et al. (Brat et al. 2015; Agnihotri et al. 2012) benutzt wurde, konnte in dieser Arbeit in über der Hälfte der Tumoren eine geringe Anfärbung der Zellkerne beobachtet werden und es wurde eine Subklassifizierung vorgenommen. Die eigenen Ergebnisse stehen im Kontrast zu den als ‚positiv‘ und ‚negativ‘ gewerteten Tumoren von Agnihotri et al. (2012). Dabei beschrieben diese Autoren ebenfalls eine nukleäre Färbung der Tumorzellen und unterschieden zwischen positiver Färbung (64%; n=157) und fehlender (‚negativer‘) Färbung (29%). Jeder Tumor, der eine Kernfärbung aufwies, wurde als positiv gewertet und die Autoren beschrieben eine hohe Anzahl positiver Kernfärbungen. Als Grundlage für die Untersuchung wurden Gewebeanteile der Tumoren in Form von *Tissue Micro Arrays* (TMA) gefärbt. Auf eine intratumorale Heterogenität der Färbung wurde hierbei nicht eingegangen. TMAs sind für Proteinexpressionsanalysen in Glioblastomen, die für ihre heterogenes Expressionsmuster bekannt sind, nicht immer eine geeignete Methode und können im Vergleich zur konventionellen Färbung von ganzen Schnitten zu verfälschten Ergebnissen führen (Chiesa-Vottero et al. 2003). Dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit verglichen mit der Agnihotri et al. (2012) trotz der Verwendung des gleichen Antikörpers sein.

Liu und Kollegen (Liu et al. 2012a) führten an 58 Glioblastomen eine immunhistochemische Färbungen für APNG durch und werteten alle untersuchten Glioblastome als positiv. Der verwendete Antikörper zeigte eine Anfärbung der Tumorzellkerne und die anschließende Klassifizierung der Färbung erfolgte, wie in der eigenen Arbeit, nach dem Prozentsatz der positiv gefärbten Kerne in Subgruppen (<5%; 6-25%; 26-50%; 51-75%; >75%). Zusätzlich wurde die Färbeintensität ausgewertet und gescored. In der abschließenden Auswertung wurden bei Liu et al. (2012a) beide Parameter miteinander multipliziert. Die Färbeintensität der Präparate nach immunhistochemischer Markierung mit dem APNG-Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, was gegebenenfalls eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte. Auch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper könnte zu den diskrepanten Ergebnissen beigetragen haben.

In der Publikation von Fosmark et al. (2017) erfolgte eine immunhistochemische Färbung von insgesamt 186 Glioblastomen, allerdings ohne Angaben zum IDH-Status. Diese Autoren verwendeten einen Antikörper gegen das APNG-Protein, dessen Bindung über Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurde. Sie fanden bevorzugt eine nahe oder im Zellkern gelegene punktförmige Färbungen der glialen Tumorzellen und normaler Zellen. Die normalen Zellen wurden mittels eines weiteren ‚Antikörpercocktails‘ (CD31, CD45, Iba1) identifiziert und waren nicht Bestandteil der anschließenden automatisierten Bildauswertung. Diese Auswertung erfolgte nach Aufnahme von digitalen Bildausschnitten mit Hilfe eines automatisierten Bildanalyseprogramms (Aperio GENIE) und nach vorheriger Kalibrierung. Fosmark et al. (2017) setzten die gemessenen Punkte („dots“) in Relation zu den insgesamt gemessenen Tumorzellen. Nach weiterer explorativer Optimierung mittels eines nicht weiter definierten *Cut-Off Points* wurden die untersuchten Tumoren zu 25% in eine Gruppe mit geringer APNG-Expression und zu 75% in eine Gruppe mit hoher APNG-Expression unterteilt.

Eine Korrelation zwischen der *APNG* mRNA-Expression und der mittels Immunhistochemie bestimmten APNG-Proteinexpression konnte in der eigenen Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dabei war weder zwischen den einzelnen klassifizierten Subgruppen (<10% positive Nuclei; 10-50% positive Nuclei; 50-80% positive Nuclei; >80% positive Nuclei), noch zwischen APNG ‚positiven‘ (> 10% angefärbter Nuclei) und APNG negativen (< 10% angefärbter Nuclei) Tumoren eine Korrelation zwischen mRNA und Proteinexpression detektierbar. Keine der anderen Arbeiten untersuchte bisher die Korrelation zwischen *APNG* mRNA-Expression und immunhistochemisch nachgewiesener Proteinexpression. Lediglich Liu et al. (Liu et al. 2012a) verglichen in 20 Gliomen die *APNG* mRNA-Expressionslevel mit der mittels Western-Blot bestimmten APNG-Proteinexpression und konnten dabei eine signifikante Korrelation nachweisen. Sie unterschieden dabei jedoch nicht zwischen Gliomen unterschiedlicher WHO-Grade, was bei der kleinen Anzahl von n=20 vermutlich auch nicht sinnvoll gewesen wäre.

5.4 Prognostische Relevanz der APNG-Expression in Glioblastomen

Um die Rolle von APNG in Bezug auf seine prognostische Bedeutung weiter abzuklären, wurde in dieser Arbeit die mRNA- und Protein-Expression mit dem Gesamtüberleben von Glioblastompatienten korreliert. Es konnte in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen der *APNG* mRNA-Expression und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Auch Fosmark et al. (2017) fanden nach Analyse des TCGA-Datensatzes keine signifikante Korrelation zwischen *APNG* mRNA-Expression und Gesamtüberleben.

In der vorliegenden Arbeit war jedoch ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben bei APNG-Proteinexpression in $\geq 10\%$ der Tumorzellen im Vergleich zu $<10\%$ der Tumorzellen nachzuweisen. Dabei wies die Gruppe der Patienten mit hoher APNG-Expression ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in der vorliegenden Arbeit ein relativ kleines Kollektiv von 52 Glioblastompatienten untersucht wurde und mögliche weitere Prognoseparameter, wie Alter und klinischer Zustand der Patienten, Ausmaß der Resektion, MGMT-Promotormethylierungsstatus und Therapie nicht in einer multivariaten Analyse berücksichtigt wurde. Daher lässt sich der in der univariaten statistischen Auswertung erkennbare signifikante Unterschied der Überlebenszeiten allenfalls als Hinweis auf eine mögliche prognostische Bedeutung der APNG-Proteinexpression werten, der in einer unabhängigen Patientenkohorte validiert werden muss.

Im Gegensatz zu den eigenen Befunden stehen die Ergebnisse von Liu *et al.*, welche zeigten, dass eine erhöhte APNG-Proteinexpression mit einer schlechteren Prognose von Gliompatienten korreliert (Liu et al. 2012a). Dabei hatten diese Autoren aber nicht zwischen den verschiedenen WHO-Graden unterschieden und es wurden insgesamt auch nur 58 Patienten mit einem Glioblastom ohne Angaben zum IDH-Status untersucht. Zusätzlich bleibt wie bereits oben beschrieben, das unterschiedliche Scoring der Immunhistochemie unter Berücksichtigung der Färbeintensität. Zu einem ähnlichen Ergebnis wie Liu et al. (2012) kamen auch Agnihotri et al. (2012), die ebenfalls eine schlechtere Prognose für Glioblastompatienten mit erhöhter APNG-Proteinexpression berichteten (Agnihotri et al. 2012). Dabei wurde ein Teil der untersuchten Patienten postoperativ mit Radiotherapie und Temozolomid nach Stupp-Schema behandelt. Ein anderer Teil erhielt nur eine operative Therapie mit anschließender Radiotherapie und hier konnte keine Korrelation zwischen dem Überleben und dem APNG-Proteinlevel nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die APNG-Proteinexpression nur bei gleichzeitiger Temozolomid-Therapie einen

Einfluss auf die Prognose der Glioblastompatienten hat. Zudem analysierten sie auch einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Überleben von Glioblastompatienten und der APNG-Proteinexpression in Abhängigkeit vom *MGMT*-Promotormethylierungsstatus. Dabei fanden sie bei Patienten, deren Tumor einen *MGMT*-unmethylierten Promotor aufwies, einen signifikanten Unterschied im Überleben in Abhängigkeit von der APNG-Proteinexpression. Zusammenfassen schreiben die Ergebnisse von Agnihotri et al. (2012) einer gesteigerten APNG-Proteinexpression einen negativen prognostischen Einfluss für das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten bei postoperativer Temozolomidtherapie zu.

Ähnlich zu den eigenen Ergebnissen und im Kontrast fanden Fosmark et al. (2017) ein verlängertes Gesamtüberleben für Glioblastompatienten unter postoperativer Temozolomidtherapie bei gesteigerter APNG Proteinexpression im Tumorgewebe (Fosmark et al. 2017). Diese Korrelation fand sich jedoch nur bei der quantitativen immunhistochemischen Proteinexpressionsanalyse und ließ sich dagegen in denselben Tumoren in einer Immunfluoreszenzanalyse nicht nachweisen. Auch diese Autoren untersuchten zusätzlich die APNG-Proteinexpression im Zusammenhang mit dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und beobachteten, dass vor allem bei Patienten, deren Tumor eine *MGMT*-Promotormethylierung zeigte, die gesteigerte APNG-Expression einen positiven signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. Diese Ergebnisse stehen somit wiederum im Kontrast zu den Befunden von Agnihotri et al. (2012), die nur bei unmethyliertem *MGMT* Promotor eine prognostische Rolle für eine erniedrigte APNG-Expression nachweisen konnten. Wie bereits oben beschreiben, wendeten Fosmark et al. (2017) ein automatisiertes Bildanalyseprogramm an und nutzten keine konventionelle immunhistochemische Färbung und Auswertung, weshalb die APNG-Expression nur nach ‚erniedrigt‘ und ‚erhöht‘ eingeteilt wurde und ein Vergleich mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit und vorangegangener Publikationen schwierig ist. Auch die Wahl des Cutoff-Punktes zwischen hoher und niedriger Expression wurde durch eine explorative Optimierungsanalyse ermittelt. Zudem wird der IDH-Status in der Analyse der Überlebensdaten in dieser Publikation nicht weiter berücksichtigt.

Grundsätzlich zeigen sich in den bisherigen Veröffentlichungen zur Rolle von APNG in Gliomen deutliche Unterschiede bezüglich der Expression von APNG und deren prognostische Bedeutung. Dabei untersuchten Liu et al. (2012a) (n=58 Patienten) und Agnihotri et al. (2012) (n=37 Patienten) letztendlich eher kleinere Patientenkohorten, während Fosmark et al. (2017) eine größere Kohorte untersuchte (n=186 Patienten). Auch in der

eigenen Arbeit wurde eine eher kleine Anzahl von Patienten immunhistochemisch untersucht (n=52 Patienten), was gegebenenfalls ursächlich für die abweichenden Ergebnisse sein könnte. Eine Übersicht aller publizierten Ergebnisse im Vergleich zu den eigenen Resultaten ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit und der publizierten Ergebnisse anderer Autoren. zur *APNG*-Expression und Promotormethylierung, Assoziation mit dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und der Prognose von Patienten mit einem Glioblastom.

Publikation zu APNG	Vorliegende Arbeit	Fosmark <i>et al.</i> 2017	Wiestler <i>et al.</i> 2013	Agnihotri <i>et al.</i> 2012	Liu <i>et al.</i> 2012
<i>APNG</i> mRNA-Expression*	↑	↑	n.u.	n.u.	↑
Promotormethylierung	↓	n.u.	↓	↑	n.u.
Korrelation der <i>APNG</i> - Expression mit dem <i>MGMT</i> Promotormethylierungsstatus	nein	ja	nein	ja	n.u.
Assoziation der <i>ANPG</i> - Expression mit dem Überleben der Patienten	ja (<i>APNG</i> ↑)	ja (<i>APNG</i> ↑)	n.u.	ja (<i>APNG</i> ↓)	ja (<i>APNG</i> ↓)
Immunistochemische Positivität für <i>APNG</i> in Gliomen	49%	75%	n.u.	64%	100%

Die einzelnen Untersuchungsergebnisse sind vereinfacht unter dem jeweiligen Unterpunkt dargestellt. ↑= gesteigert; ↓=vermindert; + = positiv; - = negativ; n.u. = nicht untersucht.

*Auf die Differenzierung in Gliomen vs. Glioblastomen bzw. den IDH Status wird in dieser Übersicht der mRNA-Expression nicht eingegangen.

Abschließend ist es weiterhin möglich, dass *APNG* auf Grund seiner Funktion und seiner Bedeutung für den Base Exzision Pathway als DNA-Reparaturenzym für alkylierte DNA-Basen an der Resistenz von Gliomen gegenüber einer alkylierenden Chemotherapie beteiligt ist. Die eindeutig in allen Arbeiten nachgewiesene erhöhte *APNG* mRNA-Expression in Gliomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe scheint hierfür ein wichtiger Hinweis zu sein. Unklar bleibt dagegen die prognostische Bedeutung der *APNG*-Expression in Gliomen und der ursprünglich postulierte Mechanismus einer epigenetischen Inaktivierung durch

Hypermethylierung des APNG-Promotors (Agnihotri et al. 2012) scheint in Gliomen insgesamt keine Rolle zu spielen. Die Frage, ob eine Entfernung der durch Temozolomid methylierten DNA-Basen durch APNG letztendlich zu einer Destabilisierung der Tumorzell-DNA mit nachvollgender Apoptose und verbesserter Prognose oder eher zu einer DNA-Reparatur mit Entwicklung einer Therapieresistenz und ggf. ungünstiger Prognose führt, muss in weitergehenden Untersuchungen noch tiefergehend bearbeitet und geklärt werden.

Literaturverzeichnis

Agnihotri, Sameer; Gajadhar, Aaron S.; Ternamian, Christian; Gorlia, Thierry; Diefes, Kristin L.; Mischel, Paul S. et al. (2012): Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (1), S. 253–266. DOI: 10.1172/JCI59334.

Aldape, Kenneth; Zadeh, Gelareh; Mansouri, Sheila; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von (2015): Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. In: *Acta neuropathologica* 129 (6), S. 829–848. DOI: 10.1007/s00401-015-1432-1.

Almeida Sassi, Felipe de; Lunardi Brunetto, Algemir; Schwartsmann, Gilberto; Roesler, Rafael; Abujamra, Ana Lucia (2012): Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche. In: *Journal of oncology* 2012, S. 537861. DOI: 10.1155/2012/537861.

Birner, Peter; Pusch, Stefan; Christov, Christo; Mihaylova, Stiliana; Toumangelova-Uzeir, Kalina; Natchev, Sevdalin et al. (2014): Mutant IDH1 inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma. In: *Cancer* 120 (16), S. 2440–2447. DOI: 10.1002/cncr.28732.

Brat, D. J.; Aldape, K.; Colman, H.; Holland, E. C.; Louis, D. N.; Jenkins, R. B. et al. (2018): cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". In: *Acta neuropathologica* 136 (5). DOI: 10.1007/s00401-018-1913-0.

Brat, Daniel J.; Aldape, Kenneth; Colman, Howard; Figarella-Branger, Dominique; Fuller, Gregory N.; Giannini, Caterina et al. (2020): cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. In: *Acta neuropathologica* 139 (3), S. 603–608. DOI: 10.1007/s00401-020-02127-9.

Brat, Daniel J.; Verhaak, Roel G. W.; Aldape, Kenneth D.; Yung, W. K. Alfred; Salama, Sofie R.; Cooper, Lee A. D. et al. (2015): Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. In: *The New England journal of medicine* 372 (26), S. 2481–2498. DOI: 10.1056/NEJMoa1402121.

Brennan, Cameron W.; Verhaak, Roel G. W.; McKenna, Aaron; Campos, Benito; Noushmehr, Houtan; Salama, Sofie R. et al. (2013): The somatic genomic landscape of glioblastoma. In: *Cell* 155 (2), S. 462–477. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034.

Ceccarelli, Michele; Barthel, Floris P.; Malta, Tathiane M.; Sabedot, Thais S.; Salama, Sofie R.; Murray, Bradley A. et al. (2016): Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. In: *Cell* 164 (3), S. 550–563. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.028.

Cerda, S. R.; Turk, P. W.; Thor, A. D.; Weitzman, S. A. (1998): Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in breast cancer. In: *FEBS letters* 431 (1), S. 12–18.

Chiesa-Vottero, Andres G.; Rybicki, Lisa A.; Prayson, Richard A. (2003): Comparison of proliferation indices in glioblastoma multiforme by whole tissue section vs tissue microarray. In: *American journal of clinical pathology* 120 (6), S. 902–908. DOI: 10.1309/8UAU-KFK3-NBDM-VTNU.

Dang, Lenny; White, David W.; Gross, Stefan; Bennett, Bryson D.; Bittinger, Mark A.; Driggers, Edward M. et al. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. In: *Nature* 462 (7274), S. 739–744. DOI: 10.1038/nature08617.

Fahrer, Jörg; Kaina, Bernd (2013): O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. In: *Carcinogenesis* 34 (11), S. 2435–2442. DOI: 10.1093/carcin/bgt275.

Fishel, Melissa L.; He, Ying; Smith, Martin L.; Kelley, Mark R. (2007): Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (1), S. 260–267. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1920.

Fosmark, Sigurd; Hellwege, Sofie; Dahlrot, Rikke H.; Jensen, Kristian L.; Derand, Helene; Lohse, Jesper et al. (2017): APNG as a prognostic marker in patients with glioblastoma. In: *PloS one* 12 (6), e0178693. DOI: 10.1371/journal.pone.0178693.

Hartmann, Christian; Meyer, Jochen; Balss, Jörg; Capper, David; Mueller, Wolf; Christians, Arne et al. (2009): Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. In: *Acta neuropathologica* 118 (4), S. 469–474. DOI: 10.1007/s00401-009-0561-9.

Hegi, Monika E.; Diserens, Annie-Claire; Gorlia, Thierry; Hamou, Marie-France; Tribolet, Nicolas de; Weller, Michael et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 997–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.

- Jones, Peter A. (2012): Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (7), S. 484–492. DOI: 10.1038/nrg3230.
- Killela, Patrick J.; Reitman, Zachary J.; Jiao, Yuchen; Bettegowda, Chetan; Agrawal, Nishant; Diaz, Luis A. et al. (2013): TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15), S. 6021–6026. DOI: 10.1073/pnas.1303607110.
- Kim, Nam Keun; Ahn, Jung Yong; Song, Jihwan; Kim, Jin Kyeoung; Han, Jin Hee; An, Hee Jung et al. (2003): Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors. In: *Anticancer research* 23 (2B), S. 1417–1423.
- Knobbe, Christiane B.; Merlo, Adrian; Reifenberger, Guido (2002): Pten signaling in gliomas. In: *Neuro-oncology* 4 (3), S. 196–211.
- Koch, H. J. (2008): Alter, Geschlecht und Karnofsky-Index als Prognosefaktoren bei malignen Hirntumoren Grad III und IV WHO. In: *EUROPEAN JOURNAL OF GERIATRICS* 10 (02), S. 69–73.
- Koschmann, Carl; Lowenstein, Pedro R.; Castro, Maria G. (2016): ATRX mutations and glioblastoma: Impaired DNA damage repair, alternative lengthening of telomeres, and genetic instability. In: *Molecular & cellular oncology* 3 (3), e1167158. DOI: 10.1080/23723556.2016.1167158.
- Lassman, Andrew B.; Joanta-Gomez, Adela E.; Pan, Peter C.; Wick, Wolfgang (2020): Current usage of tumor treating fields for glioblastoma. In: *Neuro-oncology advances* 2 (1), vdaa069. DOI: 10.1093/noajnl/vdaa069.
- Liu, Ce; Tu, Yanyang; Yuan, Jun; Mao, Xinggang; He, Shiming; Wang, Liang et al. (2012a): Aberrant expression of N-methylpurine-DNA glycosylase influences patient survival in malignant gliomas. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, S. 760679. DOI: 10.1155/2012/760679.
- Liu, Ce; Tu, Yanyang; Yuan, Jun; Mao, Xinggang; He, Shiming; Wang, Liang et al. (2012b): Aberrant Expression of N-Methylpurine-DNA Glycosylase Influences Patient Survival in Malignant Gliomas. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (11), S. 1–8. DOI: 10.1155/2012/760679.
- Louis, David N.; Giannini, Caterina; Capper, David; Paulus, Werner; Figarella-Branger, Dominique; Lopes, M. Beatriz et al. (2018): cIMPACT-NOW update 2: diagnostic

clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. In: *Acta neuropathologica* 135 (4), S. 639–642. DOI: 10.1007/s00401-018-1826-y.

Louis, David N.; Perry, Arie; Reifenberger, Guido; Deimling, Andreas von; Figarella-Branger, Dominique; Cavenee, Webster K. et al. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Acta neuropathologica* 131 (6), S. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.

Malta, Tathiane M.; Souza, Camila F. de; Sabedot, Thais S.; Silva, Tiago C.; Mosella, Maritza S.; Kalkanis, Steven N. et al. (2018): Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. In: *Neuro-oncology* 20 (5), S. 608–620. DOI: 10.1093/neuonc/nox183.

Masui, Kenta; Komori, Takashi; Kato, Yukinari; Masutomi, Kenkichi; Ichimura, Koichi; Ogasawara, Satoshi et al. (2018): Elevated TERT Expression in TERT-Wildtype Adult Diffuse Gliomas: Histological Evaluation with a Novel TERT-Specific Antibody. In: *BioMed Research International* 2018. DOI: 10.1155/2018/7945845.

Noushmehr, Houtan; Weisenberger, Daniel J.; Diefes, Kristin; Phillips, Heidi S.; Pujara, Kanan; Berman, Benjamin P. et al. (2010): Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. In: *Cancer cell* 17 (5), S. 510–522. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.03.017.

Ochs, K.; Kaina, B. (2000): Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. In: *Cancer research* 60 (20), S. 5815–5824.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (4), S. 764–772. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Ostrom, Quinn T.; Gittleman, Haley; Fulop, Jordonna; Liu, Max; Blanda, Rachel; Kromer, Courtney et al. (2015): CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. In: *Neuro-oncology* 17 Suppl 4, iv1-iv62. DOI: 10.1093/neuonc/nov189.

Pallud, Johan; Audureau, Etienne; Noel, Georges; Corns, Robert; Lechapt-Zalcman, Emmanuèle; Duntze, Julien et al. (2015): Long-term results of carmustine wafer implantation

for newly diagnosed glioblastomas. A controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. In: *Neuro Oncol* 17 (12), S. 1609–1619. DOI: 10.1093/neuonc/nov126.

Reifenberger, Guido; Wirsching, Hans-Georg; Knobbe-Thomsen, Christiane B.; Weller, Michael (2017): Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 14 (7), S. 434–452. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.204.

Rhoderick H. Elder et al. (1998): Alkylpurine–DNA–N-Glycosylase Knockout Mice Show Increased Susceptibility to Induction of Mutations by Methyl Methanesulfonate. 10. Aufl. Vol.18. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY: American Society for Microbiology.

Schlegel, Uwe; Weller, Michael; Westphal, Manfred (2003): Neuroonkologie. 2., erweiterte Auflage. s.l.: Thieme.

Song, Shanshan; Xing, Guichun; Yuan, Lin; Wang, Jian; Wang, Shan; Yin, Yuxin et al. (2012): N-methylpurine DNA glycosylase inhibits p53-mediated cell cycle arrest and coordinates with p53 to determine sensitivity to alkylating agents. In: *Cell research* 22 (8), S. 1285–1303. DOI: 10.1038/cr.2012.107.

Stoyanov, George St; Dzhankov, Deyan L. (2018): On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. In: *Folia medica* 60 (1), S. 48–66. DOI: 10.1515/folmed-2017-0069.

Stupp, Roger; Hegi, Monika E.; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Taphoorn, Martin J. B.; Janzer, Robert C. et al. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. In: *The Lancet Oncology* 10 (5), S. 459–466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

Stupp, Roger; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Weller, Michael; Fisher, Barbara; Taphoorn, Martin J. B. et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.

Stupp, Roger; Taillibert, Sophie; Kanner, Andrew; Read, William; Steinberg, David; Lhermitte, Benoit et al. (2017): Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 318 (23), S. 2306–2316. DOI: 10.1001/jama.2017.18718.

Suzuki, Hiromichi; Aoki, Kosuke; Chiba, Kenichi; Sato, Yusuke; Shiozawa, Yusuke; Shiraishi, Yuichi et al. (2015): Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. In: *Nature genetics* 47 (5), S. 458–468. DOI: 10.1038/ng.3273.

Thakkar, Jigisha P.; Dolecek, Therese A.; Horbinski, Craig; Ostrom, Quinn T.; Lightner, Donita D.; Barnholtz-Sloan, Jill S.; Villano, John L. (2014): Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10), S. 1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.

Turcan, Sevin; Rohle, Daniel; Goenka, Anuj; Walsh, Logan A.; Fang, Fang; Yilmaz, Emrullah et al. (2012): IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. In: *Nature* 483 (7390), S. 479–483. DOI: 10.1038/nature10866.

Weller, M.; Wick, W.; Aldape, K.; Brada, M.; Berger, M.; Pfister, S. M. et al. (2015a): Glioma. In: *Nature reviews. Disease primers* 1. DOI: 10.1038/nrdp.2015.17.

Weller, Michael; Tabatabai, Ghazaleh; Kastner, Barbel; Felsberg, Jorg; Steinbach, Joachim P.; Wick, Antje et al. (2015b): MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (9), S. 2057–2064. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2737.

Weller, Michael; van den Bent, Martin; Tonn, Jörg C.; Stupp, Roger; Preusser, Matthias; Cohen-Jonathan-Moyal, Elizabeth et al. (2017): European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. In: *The Lancet Oncology* 18 (6), e315-e329. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8.

Westphal, M.; Lamszus, K. (2011): The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. In: *Nature reviews. Neuroscience* 12 (9). DOI: 10.1038/nrn3060.

Wick, Wolfgang; Meisner, Christoph; Hentschel, Bettina; Platten, Michael; Schilling, Alissa; Wiestler, Benedikt et al. (2013): Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. In: *Neurology* 81 (17), S. 1515–1522. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a95680.

Wick, Wolfgang; Weller, Michael; van den Bent, Martin; Sanson, Marc; Weiler, Markus; Deimling, Andreas von et al. (2014): MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. In: *Nature reviews. Neurology* 10 (7), S. 372–385. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.100.

Wiestler, Benedikt; Claus, Rainer; Hartlieb, Sabine A.; Schliesser, Maximilian G.; Weiss, Elisa K.; Hielscher, Thomas et al. (2013): Malignant astrocytomas of elderly patients lack favorable molecular markers: an analysis of the NOA-08 study collective. In: *Neuro-oncology* 15 (8), S. 1017–1026. DOI: 10.1093/neuonc/not043.

Xu, Wei; Yang, Hui; Liu, Ying; Yang, Ying; Wang, Ping; Kim, Se-Hee et al. (2011): Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. In: *Cancer cell* 19 (1), S. 17–30. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.

Zair, Z. M.; Johnson, G. E.; Griffiths, A. P.; Jenkins, G. J. (2013): Diagnostic correlation between the expression of the DNA repair enzyme N-methylpurine DNA glycosylase and esophageal adenocarcinoma onset: a retrospective pilot study. In: *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* 26 (6), S. 644–650. DOI: 10.1111/dote.12003.

Zhang, Jihong; F.G. Stevens, Malcolm; D. Bradshaw, Tracey (2012): Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. In: *CMP* 5 (1), S. 102–114. DOI: 10.2174/1874467211205010102.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweisen von APNG und MGMT. Nach Temozolomidwirkung kommt es zur Purinmethylierung (m), hier am Guanin (G). Die anderen Basen Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin (T) werden nicht verändert. APNG entfernt als Teil des Base Excision Pathways das methylierte Guanin komplett, während die Endonuklease den DNA-Strang öffnet und die Desoxyribose entfernt. Anschließend wird durch die DNA Polymerase das Nukleosid erneuert und die Ligase verschließt den DNA-Strang. Ein alternativer Mechanismus ist die Entfernung der Methylierung durch MGMT, welches nur die Alkylgruppe an der Purinbase entfernt. 10
- Abbildung 2: Wirkungsweise von Temozolomid an den Purinbasen Adenin und Guanin mit Darstellung des Wirkungsortes von APNG und MGMT. In dieser Übersicht lässt sich erkennen, an welchen Positionen der Purinbasen Adenin und Guanin Temozolomid eine Alkylierung hervorruft. Zusätzlich lässt sich erkennen, wo APNG (grün) und MGMT (blau) wiederum diese Alkylgruppen entfernen. 11
- Abbildung 3: Strukturformel von Cytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin. Links im Bild ist die Strukturformel von Cytidin abgebildet. Rechts im Vergleich die Strukturformel von 5-Aza-2'-Desoxycytidin. Die verwendeten Buchstaben entsprechen den Elementen aus dem Periodensystem. Beide Strukturformeln sind ohne die anhängende Ribose bzw. Desoxyribose dargestellt, die Verbindung zum Zuckermolekül wird durch den Buchstaben ‚R‘ gekennzeichnet. Der Unterschied beider Basen wurde mit einem roten Kreis markiert. 31
- Abbildung 4: Relative APNG mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp im Vergleich zu normalem Hirngewebe. Das relative *APNG* mRNA-Expressionslevel wurde mittels Real time-RT-PCR bestimmt. Dabei diente *ARF1* als Referenzgen und Universal Human Reference RNA (Stratagene) als Referenzprobe. Die relativen normalisierten Expressionswerte werden als Box Plots nach der Tukey-Methode dargestellt. In der Gruppe der Glioblastome war eine statistisch signifikant erhöhte *APNG* mRNA-Expression ($p=0,005$) gegenüber normalem Hirngewebe nachweisbar. 35
- Abbildung 5: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-Wildtyp Glioblastomen mit und ohne MGMT-Promotormethylierung. Das relative *APNG* mRNA-Expressionslevel wurde mittels Real time-RT-PCR bestimmt. Dabei diente *ARF1* als Referenzgen und Universal Human Reference RNA (Stratagene) als Referenzprobe. Die relativen normalisierten Expressionswerte werden als Box Plots nach der Tukey-Methode dargestellt. Glioblastomen ohne *MGMT* Promotormethylierung ($n=22$) und Glioblastomen mit *MGMT* Promotormethylierung ($n=20$) zeigten im t-Test keinen signifikanten Unterschied in der *APNG* mRNA Expression. 35
- Abbildung 6: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-mutierten Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen. *Abzisse*: Unterscheidung zwischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad II, anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert, WHO-Grad III, und Glioblastomen, IDH-mutiert, WHO-Grad IV. *Ordinate*: Relative Expression von *APNG* mRNA; In der graphischen Darstellung kann eine verminderte *APNG* mRNA-Expression mit steigendem WHO-Grad dargestellt werden, welche sich signifikant zwischen den Astrozytomen, WHO-Grad II und den Glioblastomen, WHO-Grad IV unterscheidet ($p=0,0165$) sowie zwischen den Astrozytomen WHO-Grad II und normalem Hirngewebe

($p < 0,0001$) und zwischen anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III und normalem Hirngewebe ($p = 0,0005$).

36

Abbildung 7: Relative APNG mRNA-Expression in Oligodendrogliomen, WHO-Grad II und anaplastischen Oligodendrogliomen, WHO-Grad III. *Abzisse*: Unterscheidung zwischen den Oligodendrogliomen nach dem WHO-Grad. *Ordinate*: Relative APNG mRNA-Expression; Graphisch ist eine relative APNG-Expression bei steigendem Malignitätsgrad ersichtlich, in der statistischen Analyse mittels ‚ANOVA‘ ließ sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0405$) in der Expression zwischen den Oligodendrogliomen unterschiedlichen Malignitätsgrades sowie ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$) in der APNG-Expression zwischen anaplastischen Oligodendrogliomen WHO-Grad III und normalem Hirngewebe ermitteln.

37

Abbildung 8: Relative APNG mRNA-Expression in IDH-mutierten Glioblastomen im Vergleich zu IDH-Wildtyp Glioblastomen. *Abzisse*: Unterscheidung zwischen den Glioblastomen nach IDH-Status. *Ordinate*: Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse (‚Student’s t-test‘) ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,5876$) in der APNG mRNA-Expression zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Glioblastomen nachweisen.

37

Abbildung 9: Relative APNG mRNA-Expression in LN18 Wildtyp vs. LN18 TMZ-resistenten Gliomzellen. *Abzisse*: Unterscheidung der Zelllinie nach Wildtyp (LN-18) und TMZ-resistenter Variante (LN-18 R). *Ordinate*: Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse mittels ‚Student’s t-test‘ konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,065$) in der APNG mRNA-Expression nachgewiesen werden.

38

Abbildung 10: Relative APNG mRNA-Expression in LN-229 Wildtyp vs. LN-229 TMZ-resistenten Zellen. *Abzisse*: Unterscheidung der Zelllinie nach Wildtyp (LN-229) und TMZ-resistenter Variante (LN-229 R). *Ordinate*: Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse mittels ‚Student’s t-test‘ konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,259$) in der APNG mRNA-Expression nachgewiesen werden.

38

Abbildung 11: Übersicht über die verwendeten Primerbindungsstellen zur Methylierungsuntersuchung der 5-CpG-Insel des APNG-Gens. Die erste durch Sequenzierung analysierte Region im Bereich von Exon 1 ist blau markiert und durch die lila markierten Primerbindungsstellen (APNG-bisu-F/Not und APNG-bisu-R2, siehe Tabelle 7) begrenzt. Das untersuchte Amplikon ist 365 bp groß und umfasst 52 CpG Dinukleotide. Die zweite durch Sequenzierung untersuchte genomische Region ist hier als durchgehender schwarzer Balken dargestellt und befindet sich in der potentiellen Promotorregion von APNG. Die rot markierten Primerbindungsstellen umspannen ein 274 bp-großes Amplikon mit 23 CpG Dinukleotiden und analysieren den gleichen Genabschnitt, der von anderen Autoren untersucht wurde (Agnihotri et al. 2012). Die bei Agnihotri et al. (2012) beschriebenen MSP-Primer wurden ebenfalls zur Analyse genutzt; diese detektieren 6 CpG-Dinukleotide und sind grün dargestellt.

39

Abbildung 12: Ausschnitt des Methylierungsmusters in der APNG-assozierten 5'CpG-Insel für in vitro-methylierte DNA (A), DNA aus normalem Hirngewebe (B) und DNA aus einer primären Glioblastomprobe (C). Dargestellt sind Ausschnitte der Elektropherogramme mit CpG-Dinukleotidstellen des untersuchten DNA-Abschnitts nach Sequenzierung des Gegenstranges. A, Die *in vitro*-methylierte DNA als positive Kontrolle zeigt vollständig methylierten CpG-Dinukleotide an den untersuchten Stellen. B, Die DNA aus normalem Hirngewebe weißt keine Methylierung aus. C, Die DNA aus dem exemplarisch ausgewählten primären Glioblastom, WHO-Grad IV zeigt ebenfalls keine Methylierung.

40

Abbildung 13: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierungsanalyse der APNG-Promotorregion.

Die untersuchten CpG-Dinukleotide wurden von 1-23 durchnummeriert. In der Auswertung der Ergebnisse konnten die ersten 5 CpG-Dinukleotide nicht sicher sequenziert werden und gelten als ‚nicht detektiert‘ (=nd). Die restlichen CpG-Dinukleotide wurden in ihrer Methylierungsausprägung in einer Skala von 0-3 erfasst, ‚0‘ steht für fehlende Methylierung, ‚1‘ für fragliche Methylierung, ‚2‘ für wahrscheinliche Methylierung und ‚3‘ für gesicherte Methylierung. Die positive Kontrolle entspricht in *in vitro* methylierter DNA (Met. DNA) und als negative Kontrolle fungierte DNA aus normalem Hirngewebe. Zusätzlich wurden in Grün die Positionen der von Agnihotri et al (Agnihotri et al. 2012) mittels MSP detektierten CpG-Dinukleotide markiert.

41

Abbildung 14: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie A172 nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative APNG mRNA-Expression in der Zelllinie A172 mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte APNG mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

42

Abbildung 15: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie TP365MG nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative APNG mRNA-Expression in der Zelllinie TP365MG mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte APNG mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

42

Abbildung 16: APNG mRNA-Expression in der Gliomzelllinie TP98G nach 5-AZA- oder TSA-Behandlung. Die Abbildungen zeigen die relative APNG mRNA-Expression in der Zelllinie T98G mit steigenden Konzentrationen von 5-AZA (linkes Bild) und TSA (rechtes Bild) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen. Man erkennt keine signifikant erhöhte APNG mRNA-Expression in den behandelten Zellen.

42

Abbildung 17: Ergebnis MSP-Analyse des APNG-Promotors. Links im Bild ist die positive Kontrolle der *in vitro* methylierten DNA (Meth. DNA) aufgetragen, dann folgend die beiden negativen Kontrollen Human Brain (HB) und Human fetal Brain (HFB), gefolgt von der Zelllinie A172. Ganz rechts die leere Kontrolle (NTC) und der Größenmarker. Die roten Pfeile zeigen PCR-Produktbanden für die methylierte (M) und die grünen Pfeile zeigen PCR-Produktbanden für die unmethylierte (U) Sequen, jeweils mit einer Größe von 101 bp, an. Die Zelllinie A172 weist eine schwache methylierte Bande und eine unmethylierte Bande auf, als Hinweis für eine geringe APNG-Promotormethylierung.

44

Abbildung 18: APNG Expression in Tumorgewebe. Unter a) Darstellung einer positiven APNG Expression in Tumorgewebe mit starker positiver Nuclei Färbung. Unter b) ein ebenfalls als positiv gewerteter Tumor, welcher ebenfalls Anteile ohne APNG Nuclei Färbung zeigt, als Beispiel für das eher heterogene Färbeergebnis in einzelnen Tumoren. Unter c) eine schwache Anfärbung der Nuclei mit ebenfalls großen Anteilen von nicht angefärbten Nuclei. Unter d) ebenfalls eine schwach positive Anfärbung weniger Nuclei in einem der untersuchten Tumoren.

46

Abbildung 19: Relative APNG mRNA-Expression in immunhistochemisch als ‚negativ‘ gewertete Glioblastome Vergleich zu immunhistochemisch als ‚positiv‘ gewertete Glioblastome. *Abzisse*: Unterscheidung zwischen den Glioblastomen nach Immunhistochemie. *Ordinate*: Relative APNG mRNA-Expression; In der statistischen Analyse („Student’s t-test“) ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,7663$) in der

<i>APNG</i> mRNA-Expression zwischen immunhistochemisch ‚negativen‘ und ‚positiven‘ Tumoren nachweisen.	46
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erste Tumorkohorte zur Analyse der <i>APNG</i> mRNA-Expression in Glioblastomen, IDH-Wildtyp	16
Tabelle 2: Zweites Tumorkohorte aus unterschiedlichen Typen IDH-mutierter Gliome verschiedener WHO-Grade	17
Tabelle 3: Kommerziell erworbene RNA-Proben aus nicht-neoplastischem Hirngewebe, die als Referenz für die Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene dienten	18
Tabelle 4: Verwendete Primer für die reverse Transkriptase Echtzeit-PCR zur Analyse des relativen <i>APNG</i> mRNA-Expressionsniveaus.	19
Tabelle 5: Verwendete Primer für die Bestimmung des Promotormethylierungsstatus von <i>APNG</i> mittels Sangersequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA	19
Tabelle 6: Verwendete Primer für die Bestimmung des Promotormethylierungsstatus von <i>APNG</i> mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP).	20
Tabelle 7: Verwendete Enzyme und Reagenzien	20
Tabelle 8: Verwendete Puffer.	21
Tabelle 9: Verwendete Kits mit Angaben zu den Herstellern und zur Anwendung	21
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit und der publizierten Ergebnisse anderer Autoren. zur <i>APNG</i> -Expression und Promotormethylierung, Assoziation mit dem <i>MGMT</i> -Promotormethylierungsstatus und der Prognose von Patienten mit einem Glioblastom.	58

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger, Direktor des Instituts für Neuropathologie an der Heinrich-Heine-Universität, für die Überlassung des Themas und die regelmäßige Hilfestellung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Marietta Wolter für Ihre unermüdliche Geduld, hervorragende Betreuung und regelmäßige Anregungen, die diese Arbeit ermöglichten.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Jörg Felsberg und Herrn Dr. Bastian Malzkorn möchte ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung und hilfreiche Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des neuropathologischen Labors für die Unterstützung in meinen experimentellen Arbeiten.

Außerdem möchte ich auch meiner Familie meine Dankbarkeit aussprechen, allen voran Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfram Müller, der maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat und meiner Großmutter Dr. Helga Erika Köhler, die mir immer motivierend zur Seite stand.