

Aus dem Institut für Neuropathologie,
(Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, ZNP)

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Jochen Herms



*Aktivierung von LINE-1 Retrotransposons durch Hypomethylierung in humanem
Glioblastomgewebe*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kerrin Sylvie Zwerger

aus
Heide

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Erster Gutachter: *Prof. Dr. med. Armin Giese*

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Louisa von Baumgarten

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Nathalie Albert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: P.D. Dr. med. Theo Kraus

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Guderman

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2022

„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.“

Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	EINLEITUNG	8
2.1	EPIGENETIK	8
2.1.1	EPIGENETIK	8
2.1.2	DNS-METHYLIERUNG	8
2.1.3	HISTONMODIFIKATION	12
2.1.4	EPIGENETIK IN DER TUMORGENESE	13
2.2	TRANSPONIERBARE ELEMENTE	16
2.2.1	LINE-1	16
2.3	DAS GLIOBLASTOM	20
2.3.1	EPIDEMIOLOGIE	20
2.3.2	ÄTIOLOGIE	21
2.3.3	THERAPIE	21
2.3.4	MOLEKULARE, GENETISCHE UND EPIGENETISCHE ANSÄTZE ZUR DIFFERENZIERUNG DES GLIOBLASTOMS	22
2.4	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	25
3	METHODEN	27
3.1	AUSWAHL DER GEWEBEPROBEN	27
3.1.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	28
3.2	GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DES GLIOBLASTOMGEWEBES	28
3.3	DNS UND RNS EXTRAKTION	29
3.3.1	DNS EXTRAKTION	29
3.3.2	RNS EXTRAKTION	30
3.3.3	QUANTIFIZIERUNG DER NUKLEINSÄUREN	30
3.4	BISULFIT-KONVERTIERUNG UND PYROSEQUENZIERUNG	31
3.4.1	BISULFIT-KONVERTIERUNG	31
3.4.2	PCR	32
3.4.3	GELELEKTROPHORESE	33
3.4.4	PYROSEQUENZIERUNG	34
3.5	BESTIMMUNG DER KOPIENZAHLVARIATION MITTELS QUANTITATIVER PCR	37
3.5.1	REALTIME PCR	37
3.5.2	$\Delta\Delta$ CT-METHODE	39
3.6	REVERSE TRANSKRIPTION UND BESTIMMUNG DER EXPRESSION	40
3.6.1	REVERSE TRANSKRIPTION	40
3.6.2	REALTIME PCR	40
3.6.3	$\Delta\Delta$ CT-METHODE	42
3.7	ANALYSE DER DATEN	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	METHYLIERUNG VON LINE-1 IN GBM GEWEBE	44
4.2	RELATIVE EXPRESSION VON LINE-1	48
4.3	KOPIENZAHLVARIATION (COPY-NUMBER VARIATION; CNV) VON LINE-1 RETROTRANSPOSONS IN GBM	49
5	DISKUSSION	55

5.1	DISKUSSION DER METHODIK	55
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	55
5.2.1	METHYLIERUNGSGRAD VON LINE-1 IN GLIOBLASTOMGEWEBE	55
5.2.2	EXPRESSION UND KOPIENZAHLVARIATION VON LINE-1	56
5.2.3	ZUSAMMENHANG VON LINE-1 METHYLIERUNGSGRAD MIT ANDEREN MOLEKULAREN MARKERN	57
6	AUSBLICK	59
7	VERZEICHNISSE	60
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	64
7.4	MATERIALVERZEICHNIS	64
7.5	INTERNETQUELLEN	65
8	LITERATURVERZEICHNIS	66
9	ANHANG	72
9.1	DANKSAGUNG	72
9.2	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	73

1 Zusammenfassung

Etwa 50% aller Gene, welche für familiäre Formen maligner Erkrankungen verantwortlich sind, werden schon in der Keimbahn durch epigenetische Veränderungen, insbesondere durch Hypermethylierung in der Promotorregion stillgelegt. Auch die Expression von Retrotransposons, transponierbare Elemente retroviralen Ursprungs in unserer DNS wird durch Methylierung gehemmt.

Hierzu gehört auch das LINE-1 Retrotransposon (L1; long interspersed nuclear element-1), welches in seiner aktivierten Form in der Lage ist, sich zellulären Transkriptasen zu bedienen, um sich zu vervielfältigen und später wieder in das menschliche Genom einzubauen. Dies ist die heute bekannte Ursache zahlreicher Erkrankungen. Auch in verschiedenen Krebsentitäten konnte eine LINE-1 Hypomethylierung als Ursache ihrer Aktivierung und somit als mögliche Ursache der Karzinogenese oder der Karzinomprogression identifiziert werden. Ob eine LINE-1 Hypomethylierung und LINE-1 Aktivierung auch im Genom von Glioblastomgewebe, dem häufigsten malignen Hirntumor des erwachsenen Menschen, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe vorliegt, ist bis heute ungeklärt. Diese Arbeit untersucht den Methylierungsstatus von LINE-1 in humanem Glioblastomgewebe und vergleicht ihn mit den drei für die Klinik wichtigsten prognostischen und prädiktiven genetischen Markern in Gliomen. Dies sind der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors, das Vorliegen einer IDH1/2 Mutation sowie der Loss of Heterozygosity 1p/19q.

Ausgehend von der Fragestellung wurden aus der Brain-Tumor-Bank des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München insgesamt 102 Glioblastomproben histologisch, immunhistochemisch und molekularpathologisch identifiziert und mit 11 gesunden Kontrollproben verglichen. Ziel war es, den Methylierungsgrad von LINE-1 festzustellen und mit der Kopienzahlvariation von LINE-1 sowie der Expression von LINE-1 zu vergleichen. Zusätzlich wurden die jeweiligen Ergebnisse mit dem Status von IDH1/2, MGMT Promotormethylierung und LOH1p/19q verglichen.

Die DNS und RNS wurde aus allen Proben extrahiert und mittels UV/vis-Spektralphotometrie quantifiziert. Anschließend erfolgte die Bisulfitkonvertierung, eine Vervielfältigung mittels PCR zur Bestimmung der quantitativen Methylierung von LINE-1 mittels Pyrosequenzierung. Für die Bestimmung der Kopienzahlvariation wurde zunächst eine quantitative PCR der untersuchten Genloci durchgeführt und mit den verschiedenen Referenzgenen normalisiert. Die Ergebnisse wurden der $\Delta\Delta C_t$ Methode zugeführt. Zur relativen Expressionsbestimmung erfolgte zunächst eine reverse Transkription der RNS zu cDNS. Anschließend erfolgte wiederum eine quantitative PCR inklusive Normalisierung mit Referenzgenen und die Relativierung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Prism 5 Software. Verglichen wurden der Methylierungsgrad dreier CpG-Lokalisationen des LINE-1 Gens in Glioblastomgewebe mit dem Methylierungsgrad der gleichen Loci in gesundem Hirngewebe. Außerdem erfolgte der Vergleich der Methylierungsgrade der Glioblastomproben bezüglich ihres MGMT-Methylierungsstatus, ihres IDH1/2 Mutationstatus und ihres Status eines LOH1p/19q. Ebenfalls wurde Copy-Number-Variation und relative Expression von LINE-1 abhängig von Erkrankung, MGMT-Methylierungsstatus, IDH1/2 Mutationstatus und LOH1p/19q Status verglichen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen eine signifikante Hypomethylierung von LINE-1 in Glioblastomgewebe im Vergleich zu gesundem Hirncortexgewebe. Passend hierzu konnten auch ein signifikanter Anstieg der Kopienzahlvariation und der Expression von LINE-1 RNS in GBM Gewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede des Methylierungsgrades von LINE-1 abhängig von MGMT-Methylierungsstatus, IDH1/2 Mutationsstatus und Vorliegen eines LOH1p/19q festgestellt werden.

Die signifikante Hypomethylierung von LINE-1 in GBM Gewebe einhergehend mit erhöhter Kopienzahlvariation und erhöhter Expression bestätigt die Erwartung der Untersuchung. Es unterstützt die These, dass eine Hypomethylierung von LINE-1 zur vermehrten Aktivität des Retrotransposons führt. Dies tritt, wie nun auch in Glioblastomgewebe festgestellt, gehäuft in maligne entarteten Zellverbänden auf und lässt schlussfolgern, dass es Einfluss auf entweder Tumorentstehung oder Progression hat. Interessanterweise konnte kein Zusammenhang mit bis dato bekannten klinisch relevanten Markern für das Glioblastom festgestellt werden. Dies bestätigt wiederum die Komplexität der Genese des Glioblastoms. Für die Zukunft sollten auf diesem Feld weitere Untersuchungen folgen, insbesondere sollte der Einfluss von LINE-1 Hypomethylierung auf prognostische oder prädiktive Aussagekraft untersucht werden. Außerdem kann die quantitative Methylierung von LINE-1 möglicherweise bei der diagnostischen Differenzierung helfen und in Zukunft sogar neue Therapieoptionen aufweisen.

2 Einleitung

2.1 Epigenetik

2.1.1 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt Mechanismen und Moleküle, welche Einfluss auf die Genexpression haben, ohne die eigentliche DNS-Sequenz zu verändern.[1]

Jede Zelle im menschlichen Organismus mit Ausnahme der Keimzellen, verfügt über die gleiche genetische Information, in Form eines diploiden Satzes 22 verschiedener Chromosomen und zweier Geschlechtschromosomen. Chromosomen bestehen aus der Gensequenz, welche aus den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin, den Purinbasen Guanin und Adenin sowie deren Verbindungsmolekülen Desoxyribose und Phosphat besteht. Die vier Basen setzen sich gemeinsam mit den Verbindungsmolekülen in gegenüberliegenden Basenpaaren aneinandergereiht zu einer DNS-Doppelhelix zusammen, welche schließlich die Information trägt. Nur die Keimzellen (Eizelle, Spermium) besitzen durch die Meiose einen einfachen Satz Chromosomen; sie sind somit haploid. Nach der Befruchtung ergänzen sich die jeweils einzeln vorliegenden Chromosomensätze zu einer diploiden Zelle, der Zygote. Diese Zelle ist die Mutterzelle aller sich aus ihr entwickelnden Zellen. Während der Mitose teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, welche einen genetisch identischen diploiden Satz an Chromosomen trägt. Um sich nun zu Zellen verschiedener Gewebe zu differenzieren, welche in ihrer Funktion nur bestimmte Gene benötigen, bedienen die Zellen sich während der Embryogenese der epigenetischen Modifikation des Genoms.[2, 3] Um Gene oder auch ganze Chromosomen stillzulegen, d.h. ihre Expression zu verhindern, um DNS-Protein Interaktionen zu steuern oder Gene, welche erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung benötigt werden, stillzulegen, gibt es drei bekannte Mechanismen, welche miteinander agieren und sich gegenseitig stabilisieren. Zu diesen gehören RNSi vermittelte Mechanismen, die Veränderung des Heterochromatins durch Histonmodifikation und die Methylierung von Cytosinbasen im Genom. Um die zellulären Eigenschaften zu bewahren, werden diese regulatorischen epigenetischen Einflüsse während der späteren Zellteilung weitergegeben.[4] Eine temporäre Stilllegung eines Gen-kodierenden Abschnitts kann durch Histonmodifikation erfolgen, welche vor oder während der Zellteilung aufgehoben werden kann. Dauerhafte epigenetische Marker werden benötigt, um ein Allel eines bestimmten Gens (Imprinting), parasitäre DNS-Abschnitte, sogenannte Transposons oder mobile Elemente oder auch ganze Chromosomen (X-Chromosom Deaktivierung) stillzulegen. Dies geschieht vorwiegend per DNS-Methylierung.[5-7]

2.1.2 DNS-Methylierung

2.1.2.1 5mC

Die durch Methyltransferasen katalysierte Methylierung des 5. Kohlenstoffatoms des Cytosins im Genom ist der wohl wichtigste epigenetische regulatorische Mechanismus. Das Cytosin ist eine der vier Basen, aus welchen die DNS aufgebaut ist. Die anderen Basen sind die Purine Adenin und Guanin und das wie das Cytosin

den Pyrimidinen zugehörige Thymin. Verbunden werden diese Basen durch Desoxyribose und Phosphat. Durch das Anhängen einer Methylgruppe an die Cytosinbase entsteht 5-Methylcytosin (5mC). Diese Cytosinbasen werden insbesondere dort methyliert, wo sie zusammen mit Guanin als CG-Dinukleotide vorkommen. Regionen, welche länger als 500 bp sind und mehr als 55% aus CpGs (Cytosinphosphatidyl-Guanin) bestehen, nennt man CpG-Inseln. Um zwischen der CG-Bindung innerhalb desselben Stranges und der CG-Bindung zwischen den komplementären Strängen der DNS-Doppelhelix zu unterscheiden, wird das „p“ mit angegeben. Es steht für die Phosphodiesterbindung zwischen dem Cytosin und dem Guanin desselben Stranges. Sich auf der Doppelhelix gegenüberliegende CGs werden durch eine Wasserstoffbrückenbindung miteinander verbunden.

CpG-Inseln kommen in den 5' Promotor-Regionen von 40% der regulatorischen Gene im menschlichen Genom vor.[4] Obwohl bis zu 80% der CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom methyliert sind, sind Cytosine in den CpG-Inseln nur selten betroffen.[8, 9] Die Methylierung der CpG-Inseln in der Promoterregion eines Gens würde seine Transkription und somit die Expression dauerhaft verhindern.[8] CpG-Inseln kommen außerdem in repetitiven bzw. mobilen Elementen, in der Zentromerregion oder in Mikrosatellit-Sequenzen (auch: Short tandem repeats, STR) vor. Diese Regionen der DNS-Sequenz sind nicht-kodierende Abschnitte und nennen sich intragenische Regionen (auch: Introns). Die Methylierung ihrer CpG-Dinukleotide verhindert ihre Expression und dient so als Schutzfunktion.[10] Durch eine Konformationsänderung der DNS-Doppelhelix wird die Transkription verhindert. Aufgrund der sich umeinanderwindenden komplementären Stränge entsteht an den beiden Seiten jeweils eine Lücke, in welcher die Basen an der Oberfläche liegen. Die größere Furche exponiert Bindungsstellen für Proteine, bietet aber auch den Platz für die Cytosinmethylierung. Die Methylgruppe blockiert den Bereich für weitere Bindungsmoleküle und damit auch die Bindung des für die Transkription benötigten Transkriptionsapparates. Dies erreicht sie zusätzlich durch die Interaktion mit Methyl-bindenden Proteinen (MBP). MBP, wie das Methyl-CpG-binding-protein-2 (MeCP2) haben eine Methyl-CpG-bindende Domain (MBD), welche 5mC erkennt. Zusammen mit histonmodifizierenden Enzymen, wie den Histonmethyltransferasen (HMT) bewirken sie eine Verdichtung des Chromatins zu Heterochromatin, welches unzugänglich für die zur Transkription benötigten Enzyme ist.[11, 12] Die HMT wiederum rekrutieren DNS-Methyltransferasen (DNMTs) und haben so Einfluss auf eine weitere Cytosinmethylierung.

5mC kann auch innerhalb eines Gens auftreten. Methylierung innerhalb des Genkörpers tritt oft in stark exprimierten Genen auf. Es wird vermutet, dass die stark methylierten Regionen innerhalb eines Gens Einfluss auf die Elongation der RNS-Polymerase II haben und durch ihr verstärktes Auftreten an Exon-Intron Grenzen einen Regulator des RNS-Splicings darstellen.[13, 14]

Abbildung 1

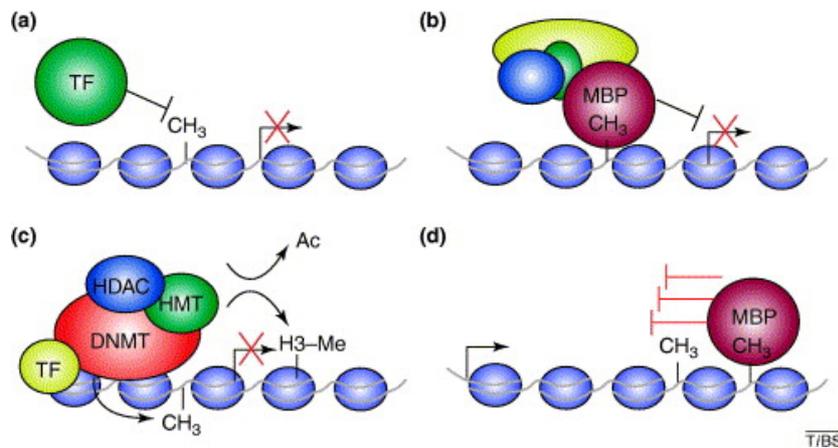


Abbildung 1: Mechanismus der durch die DNS-Methylierung initiierten Repression der Transkription (Abbildung von Klose und Bird (2008)) - (a) DNS Methylierung in der Promoterregion eines Gens verhindert die Bindung eines Transkriptionsfaktors (TF) (b) Methyl-CpG-bindende Proteine (MBPs) erkennen die methylierte DNS und rekrutieren Co-Repressoren, um die Transkription zu verhindern und das Heterochromatin zu modifizieren. (c) Zusätzlich zu ihrer DNS Methyltransferaseaktivität rekrutieren DNMTs Histondeacetylasen (HDAC) und Histonmethyltransferasen (HMT). So ist das Anfügen von Methylgruppen an die DNS eng an die Repression der Transkription und auch an die Chromatinmodifikation gebunden. (d) DNS Methylierung innerhalb eines Gens kann außerdem die Elongation während der Transkription inhibierend beeinflussen. Dies erreicht sie entweder direkt durch die Methylierung oder indirekt durch ihren Einfluss auf die Chromatinstruktur.

2.1.2.2 Enzyme des Auf- und Abbaus von 5mC

Für den Aufbau, Erhalt und Abbau von 5-mC innerhalb des Genoms sind spezielle Enzyme verantwortlich, die sogenannten DNS-Methyltransferasen (DNMTs). Nach der Befruchtung der Eizelle durch das Spermium entsteht die Zygote. Bevor die Zellkerne von Mutter und Vater verschmelzen, findet eine aktive Demethylierung des paternalen Chromosomensatzes statt. Das mütterliche Genom ist durch spezielle Heterochromatinstrukturen bzw. Histonvarianten von dieser aktiven Demethylierung geschützt. Auf ihrem Weg vom Eierstock zum Uterus durchläuft die Zygote Zellteilungen. Diese Mitosen sorgen für eine passive Demethylierung des mütterlichen Chromosomensatzes unter Ausschließung der erhaltenden DNS-Methyltransferase 1. Schließlich hat die Zygote das 32-Zellstadium erreicht und wird nun als Morula bezeichnet. Sie nistet sich in der Wand des Uterus ein und besitzt totipotente Zellen. Diese entwickeln sich zum Trophoblasten und zum Embryoblasten. Weiterhin werden in diesem Stadium neue Methylierungsmuster generiert. Hierfür sind die de-novo Methyltransferasen DNMT3a, DNMT3b und ihr Co-Enzym DNMT3L zuständig. Primordiale Keimzellen (PGCs, Primordial Germ Cells) entstehen als Resultat bestimmter Transkriptionsfaktoren, welche vom extraembryonalen Ektoderm und vom viszeralem Endoderm ausgesandt werden. Die PGCs durchlaufen mehrere Mitosen und erhalten ihr Methylierungsmuster durch die DNMT1 aufrecht. Diese liest das Muster des bei der Mitose entstandenen Matrizenstranges ab und kopiert das Methylierungsmuster auf den entstehenden Komplementärstrang. Auch in späteren somatischen Zellen ist DNMT1 für den Erhalt des Methylierungsmusters in der Tochterzelle zuständig.[3, 15]

Schließlich findet wieder eine aktive Demethylierung des Genoms der PGCs statt, bevor sie sich in die Keimleiste einnisten und sich zu Keimzellen entwickeln. Demethylierung geschieht entweder passiv durch Zellteilung oder aktiv, enzymatisch katalysiert. Aktive Demethylierung von 5mC wird von erst kürzlich entdeckten Enzymen katalysiert. Die Ten-Eleven-Translocation-Enzyme (TETs) 1, 2 und 3 oxidieren 5mC zu 5-Fluorcytosin (5fC) und schließlich zu 5-Carboxylcytosin (5caC). Hierfür benötigen die Enzyme ihren Co-Faktor α -Ketoglutarat. 5caC kann nun per Base-excision-repair (BER) und der Thymin-DNS-Glykosylase (TDG) ausgeschnitten und durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt werden.[16] Die aktive Demethylierung von 5mC wird vor allem während der Embryogenese, der Entwicklung von PGCs und zur Differenzierung der Zellen benötigt. Sie findet aber auch in Neuronen statt und spielt zusammen mit der BER durch die TDG eine wichtige Rolle in der DNS-Reparatur.[17]

Abbildung 2

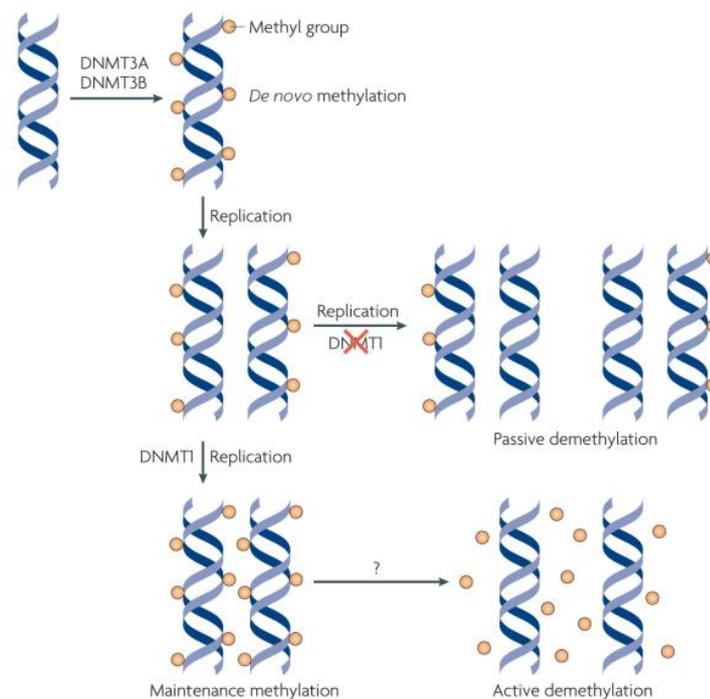


Abbildung 2: Mechanismus der passiven und aktiven Methylierung (Abbildung von Wu und Zhang (2010)) - De-novo Methylierung wird durch die Enzyme DNMT3a und DNMT3b katalysiert. So wird das Methylierungsmuster oder Epigenom generiert. Nach der Replikation (Mitose) der Zelle liegt das Genom der neuen Zelle nur teilmethyliert vor. DNMT1 liest das Methylierungsmuster des Matrizenstranges ab und kopiert es auf den neuen Komplementärstrang. Wird DNMT1 inaktiviert, resultiert dies in einer passiven Demethylierung des Genoms.

Abbildung 3

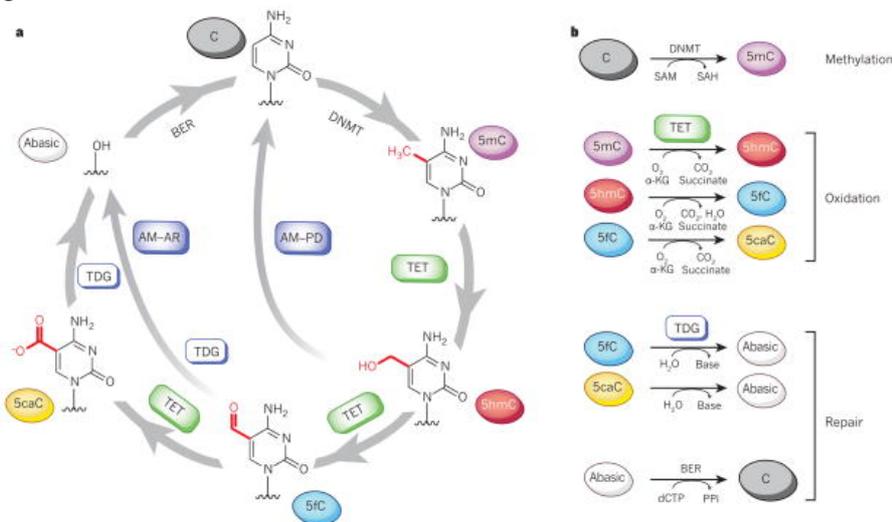


Abbildung 3: Kreislauf der Cytosin Modifikation (Abbildung von Kohli und Zhang (2013))

- (a) Die Dynamik des Auf- und Abbaus von 5mC: DNMTs fügen eine Methylgruppe an das Cytosin. TET oxidiert diese Gruppe schrittweise zu 5hmC, 5fC und 5caC. Im Kreislauf Aktive Modifikation/Passive Verdünnung (AM-PD) wird 5hmC durch Replikation verdünnt. Im Kreislauf Aktive Modifikation- Aktive Wiederherstellung (AM-AR) werden 5fC oder 5caC durch TDG aus der DNS ausgeschnitten, was zu einer abasischen Stelle in der DNS führt. Durch Vervollständigung dieses BER wird neues unmodifiziertes Cytosin generiert. (b) In dieser Abbildung werden die einzelnen Reaktionen des Kreislaufs dargestellt. (α -KG: α -Ketoglutarat; SAM: S-Adenosylmethionin; SAH: S-Adenosylhomocystein)

2.1.3 Histonmodifikation

Auch Histonmodifikationen haben Einfluss auf die Chromatinstruktur und hängen eng mit der CpG-Methylierung zusammen. Histone sind basische Proteine, um welche die DNS gewickelt ist, um sich räumlich geordnet und verpackt zu einem Chromosom zu formen. Es gibt fünf Histonmoleküle: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Je zwei Moleküle von H2A, H2B, H3 und H4 ordnen sich zu einem Oktamer zusammen, um welches sich 146 Basenpaare DNS wickeln.[18] Dies entspricht einer 1,65-fachen Umrundung. Gemeinsam bilden sie das Nukleosom. H1 unterstützt hierbei die Bindung der DNS an das Oktamer und sorgt für eine weitere Ordnung der Nukleosomen zu einer Chromatinfaser. Die Anordnung der DNS zu Nukleosomen nennt man auch Beads-on-a-string.[19]

Histone bestehen aus einem Molekülkern und einem Fortsatz aus zumeist basischen Aminosäuren. Dieser Fortsatz kann posttranslational modifiziert werden. Bekannt sind unter anderem Methylierungen, Acetylierung, Phosphorylierung, Deaminierung, ADP-Ribosylierung oder Ubiquitinierung. Diese Modifikationen haben Einfluss auf die Formation des Euchromatins zu Heterochromatin, oder umgekehrt. Heterochromatin ist stärker kondensiert und deshalb schwer zugänglich für Transkriptionsfaktoren und die RNS Polymerase. Soll ein bestimmter Bereich des Genoms abgelesen und zu RNS transkribiert werden, dekondensiert das Heterochromatin zu dem leichter zugänglicheren, offenen Euchromatin. [20, 21] In dem Zusammenhang mit der Transkriptionsregulierung ist die Methylierung des H3 besonders gut beschrieben. Trimethylierung des Lysins an vierter, 36. und 79. Stelle

(H3K4, H3K36, H3K79) resultieren in einem offenen Euchromatin. Eine Trimethylierung des H3 Lysins an neunter, 20. oder 27. Stelle (H3K9, H3K20, H3K27) markiert das transkriptionell inaktive Heterochromatin. Das trimethylierte H3K9 bindet das Heterochromatin Protein1 (HP1), welches die Heterochromatininformation initiiert. Gleichzeitig werden auch die DNMTs rekrutiert, welche in einer DNS-Methylierung und so in einer weiteren Repression der Transkription resultiert. Auch eine Acetylierung der Histone ist ein Marker für transkriptionsaktives Euchromatin. Hierfür verantwortliche Enzyme sind die Histon-Acetyl-Transferasen (HATs). Um die Acetylgruppen zu entfernen, werden wiederum Histon-Deacetylasen (HDACs) benötigt. Ihre Rekrutierung zusammen mit Histonmethyltransferasen wird unter anderem durch 5mC initiiert. Zusammen bilden sie einen Komplex, welcher das Chromatin kondensieren lässt und die Transkription unterdrückt.

Abbildung 4

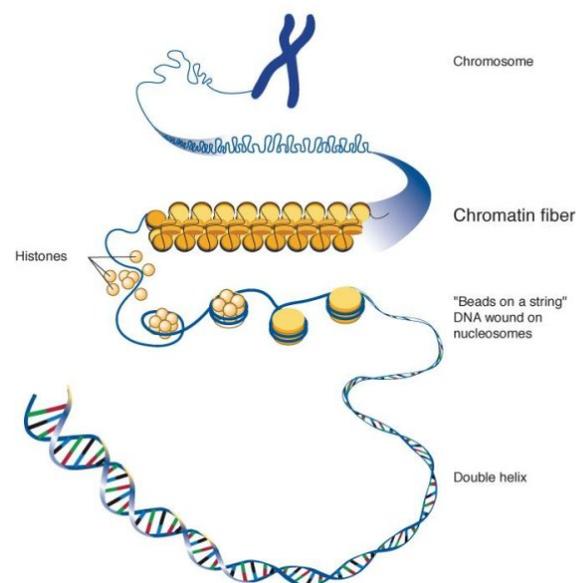


Abbildung 4: Die Strukturierung der DNS zu Nucleosomen, Chromatinfasern und schließlich zum Chromosom (Abbildung von unlockinglifescode.org) - Die DNS-Doppelhelix windet sich 1,65-mal um das Oktamer, bestehend aus Histonen. Dieses Gebilde, die sogenannten Nucleosomen legen sich zu Chromatinfasern zusammen. Diese wiederum winden und kondensieren sich schließlich zum Chromosom.

2.1.4 Epigenetik in der Tumorgenese

Obwohl 5mC in seiner Funktion die DNS vor Fehltranskription schützen soll, kann es auch die Ursache für Krankheiten und Fehlfunktion sein. Methylcytosin kann spontan mutieren. Eine Hydrolytische Desaminierung macht aus dem Cytosin ein Thymin (C → T Transition). Diese Punktmutation wird im Gegensatz zu dem aus Cytosin entstehenden Uracil durch die DNS Reparaturmechanismen nicht erkannt. Mutationen in CpG-Dinukleotiden bilden ein Drittel aller bekannten, für genetische Erkrankungen ursächlichen Punktmutationen. [22]

Ein Beispiel ist das *TP53* Gen (Tumorsuppressor 53 Gen), welches das Protein p53 kodiert. P53 ist ein Regulator des Zellzyklus und ein sehr wichtiges Tumorsuppressorprotein. 50% der inaktivierenden Mutationen von TP53 befinden sich in CpG

Dinukleotiden. Die Methylgruppe bei 5mC ändert das Absorptionsspektrum der Base für UV-Licht und begünstigt so CC → TT Mutationen in TP53, eine häufige Mutation in Hautkrebs. Auch sind Methylierte CpG-Dinukleotide die Zielregionen für G → T Transversionsmutationen, ausgelöst durch das in Tabakrauch enthaltene Karzinogen Benzo-(a)-pyrendiolepoxid. Im Gewebe von aerodigestiven Malignomen bei Rauchern findet man eine solche Mutation des *TP53* Gens sehr häufig. [23]

Aberrante Hyper- oder Hypomethylierungsmuster sind ein weiteres Merkmal maligner Erkrankungen. Etwa 50% aller Gene, welche für familiäre Formen maligner Erkrankungen verantwortlich sind, werden schon in der Keimbahn durch Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion stillgelegt. Hypermethylierung der Promotoren von Tumorsuppressorgenen spielt eine große Rolle in der Tumorgenese. Immer mehr Gene werden identifiziert, welche durch ihre Funktion enormen Einfluss auf die Tumorgenese haben, jedoch durch Promotorhypermethylierung stillgelegt sind. Beispiele hierfür sind die Gene für *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase), einem DNA-Reparatur Enzym, *CDKN2B* (Cyclin-dependent Kinaseinhibitor 2b), welches den Zellzyklusregulator p15 kodiert oder *RASSF1a*, ein Protein, welches das Produkt des Onkogens *RAS* binden und somit inaktivieren kann.[23] Besonders hohe DNS-Methylierung an CpG-Dinukleotiden einer größeren Anzahl von Promotoren kodierender Gene werden als CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) bezeichnet. CIMP begünstigt die Karzinogenese durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und durch die Erhöhung der Mikrosatelliteninstabilität. Es konnte beispielsweise in Brustkrebs, Kolonkarzinomen oder auch in Gliomen nachgewiesen werden.[24]

Des Weiteren fällt bei Malignomen eine über das gesamte Genom verteilte, besonders auf repetitive Sequenzen und auf die Zentromer- bzw. Perizentromerregion konzentrierte Hypomethylierung auf. Diese war die erste epigenetische Veränderung, welche in Malignomen detektiert wurde. [25] Bei einigen Krebsarten, wie z.B. bei Brust-, Ovarial oder Cervixkarzinomen, sowie bei Hirntumoren korrelierte der Anstieg der Hypomethylierung mit der Höhe des Malignitätsgrades des Tumors.[26] Die genomweite Hypomethylierung in Malignomen begünstigt die Transkription von Onkogenen und erhöht vor allem die genomische Instabilität. Zuvor stillgelegte genomische Elemente, wie parasitäre DNS oder Retrotransposons, werden durch die Hypomethylierung reaktiviert.[25, 26] Durch das Zusammenspiel von DNS-Methylierung und Histonmodifikation, haben Aberrationen des Methylierungsmusters auch Auswirkungen auf die Heterochromatinstruktur. Ein Rückgang der Methylierung hat auch hier die Konsequenz der genomischen Instabilität. Beispielsweise werden mobile Elemente, Retrotransposons mit ihrer Fähigkeit der Retrotransposition durch die Demethylierung der CpG-Dinukleotide ihrer Promotoren, aber auch durch die Demethylierung von H3K9me2/me3 reaktiviert. H3K9me3 als ein Marker des Heterochromatins und der Repression von Transkription ist auch ein Marker des Imprinting. Der Verlust von H3K9me3 führt zu der Aufhebung von Imprinting. Auch dies ist ein Beispiel, wie Modifikation von Heterochromatin zu Instabilität und Karzinogenese bzw. Karzinomprogression führen kann.[27] Insgesamt wurden bis heute mehr als 60 verschiedene Histonregionen identifiziert, welche Ziele von Modifikationen verschiedenster Auswirkungen sind. Eine Imbalance dieser Modifikationen kann empfindliche Auswirkungen auf die Chromatininformation und die Regulation der Transkription haben.[28] Häufig sind

auch Mutationen der Proteine, welche die Histonmodifikation oder die Cytosinmethylierung regulieren, in Malignomen zu beobachten. Beispiele hierfür sind die Histonacetylasen, Histonmethyltransferasen, DNS-Methyltransferasen, TET oder auch IDH1/2. Ein gutes Beispiel ist hierbei die Acetyltransferase hMOF (human orthologue of the *Drosophila melanogaster* males absent on the first gene). HMOF acetyliert spezifisch das 16. Lysin von Histon 4 zu H4K16ac. H4K16ac lässt Heterochromatin stärker kondensieren. Ist es aufgrund einer Mutation von hMOF herunterreguliert, stört dies den Zellzyklus und die genomische Stabilität wird geschwächt. Ein Verlust von H4K16ac durch die verringerte Expression von hMOF wird häufig in Brustkrebs und im Medulloblastom festgestellt.[29, 30] Es führt zu Tumorprogression und hat Einfluss auf die Sensitivität der Tumorzellen auf Chemotherapie.[31] Im Medulloblastom ist die verminderte Expression von hMOF ein prognostischer Marker.[30]

Auf den Mutationsstatus von IDH1/2 wird im Laufe dieser Arbeit noch näher eingegangen, da er in der Diagnostik von Glioblastomen einen prognostischen Wert besitzt und die Feststellung des IDH1/2 Status bereits in der klinischen Routine etabliert ist.

Abbildung 5

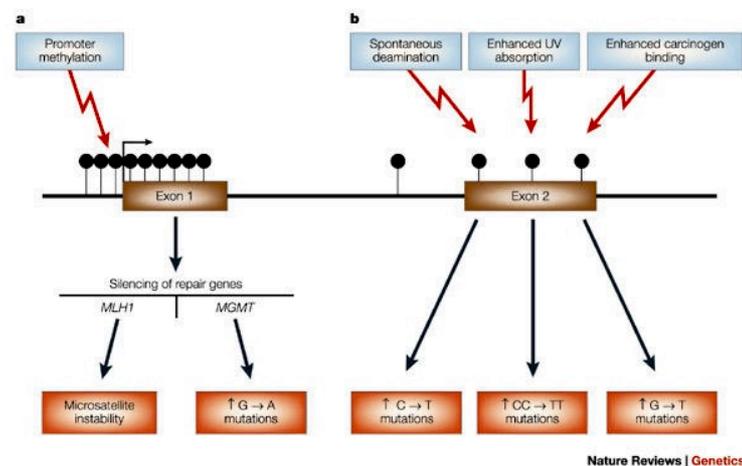


Abbildung 5: Potenzielle Auswirkungen von Hypermethylierung von Promotoren oder 5mC Mutationen (Abbildung von Jones und Baylin (2002)) - (a) Promotorhypermethylierung resultiert in der Suppression der Transkription ihrer assoziierten Gene. Geschieht dies in DNS-Reparaturgenen wie *MLH1* (mutL Homologue 1; Mutation im Kolonkarzinom, non-poli-posis Typ 2) oder *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) führt es zu Mikrosatelliteninstabilität und zu vermehrten G → A Mutationen. **(b)** Methylierte Cytosine in Exons regulierender Gene führen ebenfalls zu einer erhöhten Mutationsrate. Die Rate der spontanen hydrolytischen Desaminierung des Cytosins steigt durch die Methylierung und führt so zu C → T Punktmutationen. Die Methylierung des Cytosins ändert ebenfalls sein Absorptionsspektrum für Licht und begünstigt so UV (Ultraviolette Strahlen) -induzierte CC → TT Mutationen, wie sie in Hautkrebs häufig vorkommen. Methylierte CpG Regionen sind ebenfalls Zielregionen von Karzinogenen wie Benz(a)Pyren-Diol-Epoxid, welches in Tabakrauch enthalten ist. Hierdurch entstehende G → T Transversionsmutationen kommen häufig in Aero-digestiven Tumoren von Rauchern vor.

2.2 Transponierbare Elemente

Transponierbare Elemente (TEs) sind DNS-Sequenzen, welche über die Fähigkeit sich in einer anderen Stelle des Genoms durch den „copy-and-paste“ oder den „cut-and-paste“ Mechanismus einzubauen, verfügen. Sie stellen etwa 45% des menschlichen Genoms und wurden in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts von Barbara McClintock im Maisgenom entdeckt.[32, 33] Es gibt zwei große Gruppen von TEs. DNS-Transposons nutzen den „cut-and-paste“ Mechanismus, indem sie eine Transposase kodieren, welche an „inverted Repeats“ des Elements bindet, es herausschneidet und an einer anderen Region der DNS wieder einfügen kann. DNS-Transposons sind in der DNS von Säugetieren bis zu 3% vorhanden, zeigen jedoch keinerlei derzeitige Aktivität.[34]

Die andere Gruppe der TEs sind die RNS-Transposons oder Retrotransposons. Sie stammen von Retroviren ab und fügten sich vor bis zu 150 Millionen Jahren in das Säugetiergenom ein. Ihre Transposition erfolgt über eine reverse Transkription ihrer transkribierten RNS. Die Retroelemente verbleiben also an ihrem Ursprungsort der DNS, werden transkribiert und fügen sich als neues Retroelement an einer anderen Stelle des Genoms wieder ein. Sie nutzen also anders als die DNS-Transposons nicht den „cut-and-paste“-, sondern den „copy-and-paste“-Mechanismus. Retrotransposons können in Long-Terminal-Repeats (LTR) oder in non-LTR Retrotransposons eingeteilt werden. Diese können wiederum autonom oder nicht-autonom sein. Autonom bedeutet, dass sie für ihre Retrotransposition erforderlichen Proteine selbst kodieren und nicht auf Sequenzen anderer kodierender Elemente angewiesen sind.[33] Zu den wichtigsten Vertretern der autonomen LTR-Transposons gehören die Human endogeneous Retroviruses (HERVs). Aktuell besteht jedoch kein Anhalt auf Aktivität dieser Elemente im menschlichen Genom.[35]

Aktive Retroelemente gehören zu der Gruppe der non-LTR-Retrotransposons. Diese können in das Long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) und in die short interspersed nucleotide elements (SINEs) eingeteilt werden. Zu SINEs gehören Alu und SVA Elemente. Obwohl auch ihre Aktivität im Laufe von Millionen von Jahren drastisch abgenommen hat, stellen non-LTR-Retrotransposons ca. ein Drittel des menschlichen Genoms. Hierbei nutzen die nicht-autonomen Elemente Alu und SVA die Retrotranspositionsmaschinerie des Line-1 Elements. Die Anzahl ihrer Kopien steigt mit der steigenden Aktivität der L1 Retrotransposons. Alu mit seinen ca. 1.000.000 Kopien und Line-1 mit 500.000 Kopien im humanen Genom gehören mit Abstand zu den häufigsten transponierbaren Elementen.[35] Gemeinsam stehen sie im Fokus zahlreicher Untersuchungen bezüglich ihres Beitrages zur strukturelle Variation innerhalb des humanen Genoms, der Genese von genetischen Erkrankungen und Karzinomen aufgrund ihrer Aktivität.[36, 37]

2.2.1 LINE-1

Das menschliche Genom besteht zu 17% aus LINE-1 Retrotransposons (L1; long interspersed nuclear element-1), ein Non-LTR(long-terminal-repeats) Retrotransposon, welches in seiner aktivierten Form in der Lage ist, sich zellulärer Transkriptasen zu bedienen, um sich zu vervielfältigen und später wieder in das menschliche Genom einzubauen.

L1 besteht aus ca. 6 Kilobasen und beinhaltet eine 5' untranslated region (UTR) welche den Primer für die RNA-Polymerase II stellt. Weiterhin gibt es den ORF1, welcher ein RNS-bindendes Protein für den Transport und die Translation der L1-RNS kodiert, und den ORF2, welcher ein Protein mit Endonuklease- und Reverse-transkriptaseaktivität kodiert. Dieses Protein ist für das DNS-nicking und die Synthese der L1-cDNS zuständig. Es folgt die 3' UTR mit der Information zur Polyadenylierung und einem oligo dA-rich tail. Ausgestattet mit diesen Informationen ist L1 in der Lage, eine eigenständige Retrotransposition, eine sogenannte Target-primed reverse transcription (TPRT), durchzuführen. [38]

Abbildung 6

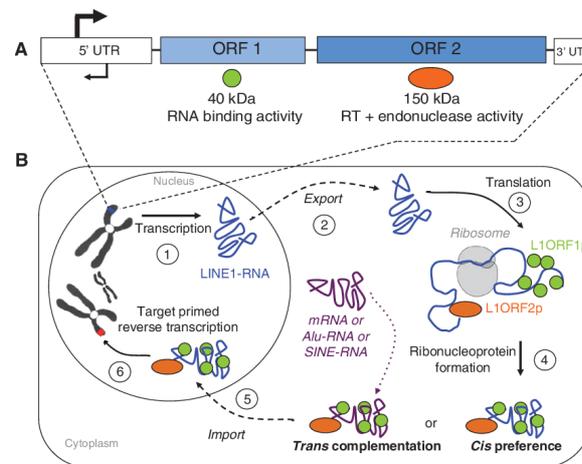


Abbildung 6: LINE-1 Retrotranspositionszyklus (Abbildung von Bodak et al. (2014)) - (A) LINE-1 Anatomie: LINE 1 setzt sich aus einer 5' UTR, zwei ORFs und einer 3' UTR zusammen. **(B)** LINE-1 Retrotranspositionszyklus: (1) Transkription der LINE-1 DNS in LINE-1 RNS (2) Export aus dem Zellkern (3) RNS Translation in ORF1 und ORF2 Proteine, welche die LINE-1 RNS binden, um Ribonucleoproteine zu bilden. (4) Die Verbindung mit LINE-1 RNS ist die Cis-Form. Verbindungen mit anderer RNS, wie zelluläre mRNS, Alu-RNS oder SINE-RNS, stellen die Trans-Form dar. (5) Die RNP wird wieder in den Zellkern transportiert. (6) Hier erfolgt die Target-primed reverse-Transkriptase zur Reintegration in das Genom.

Von den insgesamt ca. 500.000 fragmentierten und zum kleinen Teil intakten L1 Kopien im menschlichen Genom sind nur ca. 100 in der Lage eine Retrotransposition durchzuführen und somit potenziell aktiv. [39] Die Loci dieser aktiven L1 Retrotransposons variieren von Person zu Person. [40]

Durch die Fähigkeit der Retrotransposition kann das aktive Retrotransposon enormen Einfluss auf das menschliche Genom haben, insbesondere wenn es Veränderungen in proteinkodierenden oder regulatorischen Bereichen des Genoms hervorruft. Es konnte nachgewiesen werden, dass Non-LTR-Retrotransposons für ca. 0,3% aller Mutationen durch de-novo Insertionen verantwortlich sind. Zu den insertionalen Mutationen kommen andere destruktive Effekte von LINE-1 hinzu. Durch die Expression ihres ORF-2-Proteins können DNS-Doppelstrangbrüche erzeugt werden. [35] Rekombinationen zwischen LINE-1 und Alu können zu Deletionen oder Duplizierung von DNS-Abschnitten führen sowie chromosomale Inversionen

verursachen.[41, 42] Durch ihrer Fähigkeit der Insertion können sie aber auch konstruktiv auf das Genom einwirken. Durch Endonuklease unabhängige LINE-1 Insertion können die Retrotransposons Doppelstrangbrüche in der DNS reparieren. Auch durch 3' bzw. 5' Transduktion können sie Lücken in der DNS-Sequenz füllen. Per Transduktion können regulatorische Bereiche mit der LINE-1 Sequenz in andere Bereiche des Genoms gebracht werden. Auch ist die durch template-switching der LINE-1 RNS zu anderen nukleären RNS-Sequenzen Bildung neuer chimärer Retrogene möglich.[43]

Abbildung 7

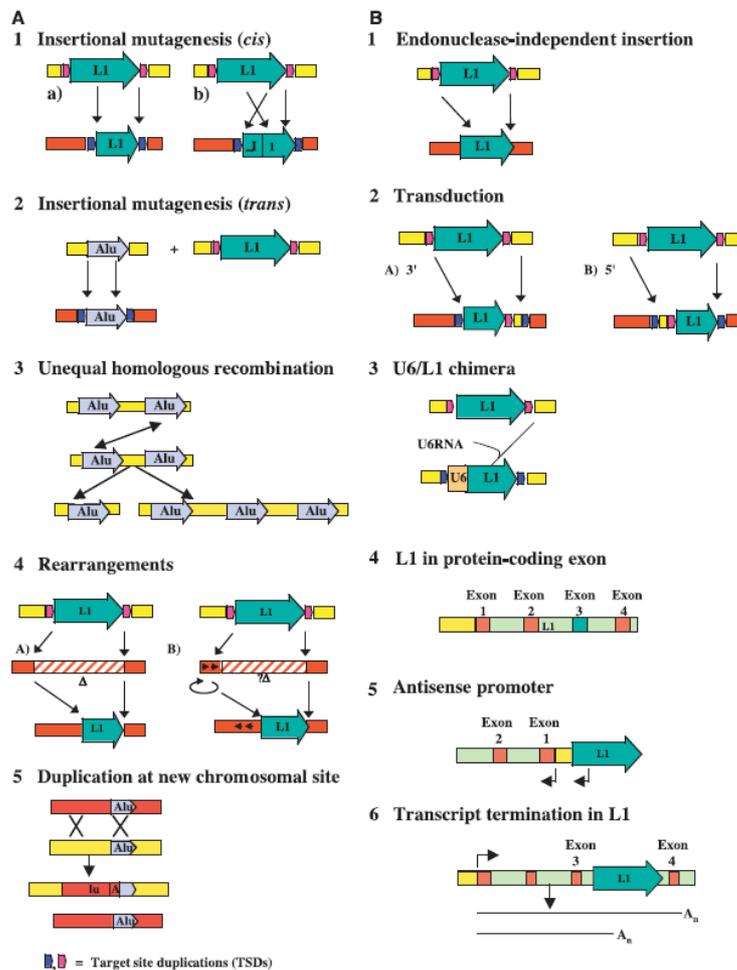


Abbildung 7: Auswirkungen von LINE-1 auf das Genom (Abbildung von Kazazian (2009))

- **(A)** Destruktive Mechanismen: (1) Insertion von LINE-1 Elementen, auch in invertierter Form möglich (cis), (2) Insertion anderer TEs (Alus und SVAs)(trans); (3) Deletion und Duplikation aufgrund unterschiedlicher Rekombination zwischen homologer Alus und LINE-1 unterschiedlicher Allelen; (4) Deletionen oder Inversionen bei LINE-1 Insertion; (5) Duplikation, die zu Deletionen und Duplikationen führen kann. **(B)** Konstruktive Mechanismen: (1) LINE-1 Insertionen können DNS-Doppelstrangbrüche reparieren; (2) 3'- oder 5' Transduktion; (3) Bildung von chimären Retrogenen; (4) Einsatz von LINE-1 oder Alu in kodierenden Genregionen; (5) Genexpression in 5' UTR; (6) Terminierung der Transkription bei starken Poly-A-Signalen in LINE-1

Krankheiten wie Hämophilie oder cystische Fibrose, aber auch Krebserkrankungen wie Brustkrebs oder Dickdarmkrebs können durch den Einfluss von Retrotransposons auf unser Genom entstehen. 1988 beschrieben Kazazian et al., dass Hämophilie A durch eine LINE-1 Insertion in das Exon 14 von Faktor VIII resultierte. [44] Daraufhin folgten zahlreiche weitere Erkrankungen, für welche die LINE-1 Retrotransposition verantwortlich gemacht wurde. Aktive L1 führen zu einer genomischen Instabilität. Im Laufe der Evolution haben somatische Zellen epigenetische Mechanismen entwickelt, um L1 zu inaktivieren. [38] Einer dieser Mechanismen ist die Methylierung der CpG-Promotorregion von L1. Durch die Methylierung initiiert Interaktionen zwischen 5mC und Methylbindenden Proteinen wird die Kondensation des Heterochromatins unterstützt und so die Transkription von L1 verhindert. Das Retrotransposon ist somit inaktiviert.

2.2.1.1 LINE-1 in der Karzinogenese

Es hat sich gezeigt, dass die L1 DNS in vielen Malignomen hypomethyliert ist. Eine Hypomethylierung führt zur verstärkten Transkription und Expression von L1. [45] Auch trägt es zur genomischen Instabilität bei. Die Expression von LINE-1 kann zu Insertionsmutationen, DNS-Doppelstrangbrüchen oder anderen Veränderungen der DNS führen und so zu einer Dysregulation der Transkription führen. [36] Eine Hypomethylierung des Gesamtgenoms in Krebszellen und eine mit ihr einhergehende Hypomethylierung des LINE-1 CpG-Promotors hat so Einfluss auf die Reaktivierung von Line-1 und seine verstärkte Expression. So könnte LINE-1 ein potenzieller Marker der Karzinogenese, aber auch der Karzinomprogression sein. [46] Das Ausmaß der Hypomethylierung von L1 und auch die Genloci dieser Hypomethylierung variieren hierbei in den Malignomen der verschiedenen Gewebe. Dies deutet auf eine Gewebs- bzw. Malignomspezifität hin, welche der Identifizierung von Krebsmarkern dienlich sein könnte. [47, 48] Auch wurden Unterschiede der Methylierungslevel innerhalb der unterschiedlichen Stadien einer Krebserkrankung festgestellt. [36] Suter et al. zeigten 2004, dass eine Hypomethylierung der Promotorregion von L1 in kanzerösem Gewebe, aber auch in gesunder Kolon-schleimhaut bei Patienten mit Colon-Ca vorlag. Andere Gewebe wie Muskeln, Blut oder Lymphgewebe waren nicht von der Hypomethylierung betroffen. Außerdem fiel auf, dass bei Gesunden weder in den Kontrollgeweben noch in der Dickdarm-mukosa eine L1 Hypomethylierung zu finden war. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass LINE-1 Hypomethylierung in der Tumorgenese, aber auch der Tumorprogression eine Rolle spielen könnte. [49] Neuere Studien ergaben, dass ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad von L1 und dem Gesamtüberleben von Patienten mit Kolon-Ca besteht. Der L1-Methylierungsgrad könnte somit als prognostischer Marker bei kolorektalem Karzinom verwendet werden. [50] Auch bei anderen malignen Erkrankungen ergaben sich Zusammenhänge mit dem LINE-1 Methylierungsstatus. Bei Brustkrebspatienten beispielsweise ergab sich ein Zusammenhang mit niedrigem L1-Methylierungsstatus und dem Gesamtüberleben sowie bei jüngeren Patientinnen mit einer Behandlungsresistenz. [51] Bei Patientinnen mit epithelalem Ovarial-Ca korreliert ein niedriger L1-Methylierungsstatus mit einer aggressiveren Histologie, einem niedrigeren progressionsfreien Überleben und niedrigeren Gesamtüberleben. [52] Auch beim Plattenepithel-

karzinom des Ösophagus und im hepatozellulären Karzinom bestehen Zusammenhänge des Gesamtüberlebens der Patienten und des Grades der L1 Methylierung. 2016 konnten Scott et al. ein ‚hot‘, d.h. ein aktives, demethyliertes L1 Element auf Chromosom 17 bei einem Patienten identifizieren, welches für eine de-novo Insertion in einem Exon des APC Gens verantwortlich ist. So konnten sie zeigen, dass eine L1 Insertion als Folge einer L1-Demethylierung ein Tumorsuppressorgen inaktiviert, welches in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms eine zentrale Rolle spielt.[53] Zusammen mit dem Methylierungsgrad sind auch die Bestimmung der Expression der L1 RNS und der Kopienzahl von L1 im Genom wichtig, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Transkription und aktive Retrotransposition zu treffen.

2.3 Das Glioblastom

Das Glioblastom (GBM) ist ein maligner Hirntumor und gehört zu den Gliomen. Er ist mit 15,8% der zweithäufigste primäre und häufigste maligne Gehirntumor des Erwachsenen.[54] Das Glioblastom wird von der WHO als Grade-IV Tumor eingestuft, d.h. er weist eine zumeist astrozytische Differenzierung mit gleichzeitiger Atypie der Zellen und Polymorphologie der Kerne, eine erhöhte Mitoserate sowie endotheliale Proliferation und Zellnekrosen auf.[55] Klinisch wird das GBM in eine primäre und eine sekundäre Form eingeteilt. Primäre GBM treten de-novo auf, wohingegen sekundäre GBM sich aus Astrozytomen niedrigeren Grades entwickeln. 90% der GBM treten spontan auf und sind primäre GBM. 95% der Tumore sind supratentoriell in den beiden zerebralen Hemisphären lokalisiert. Selten wird ein GBM im Hirnstamm, dem Zerebellum oder dem Rückenmark diagnostiziert.[56] Eine bessere Prognose für sekundäre Glioblastome lässt sich durch molekulargenetische Unterschiede erklären. Morphologisch und histologisch unterscheiden sich die beiden Formen nicht voneinander.

2.3.1 Epidemiologie

Mit einem Anteil von 54% ist das Glioblastom mit Abstand das am häufigsten auftretende Gliom aller Altersklassen.[54] Der Anteil primärer GBM beträgt 90%.[57] Zwischen 75 und 82 Jahren erkranken die meisten Patienten, wobei Männer 1,6 mal häufiger betroffen sind als Frauen. Die Inzidenz beim Erwachsenen liegt bei 3,19/100.000 Einwohner pro Jahr. Auch bei Kindern kann ein Glioblastom auftreten. Der Anteil an den primären Hirntumoren ist dabei aber deutlich niedriger und liegt bei 3% bei Patienten unter 20 Jahren. Die Inzidenz beträgt bei Kindern von 0-19 Jahren 0,14/100.000 Einwohner im Jahr. Auch ethnische Unterschiede bei der Inzidenz werden diskutiert. So erkrankten Menschen kaukasischen Ursprungs 2-3 mal häufiger als Patienten afrikanischen oder asiatischen Ursprungs. Eine Erklärung hierfür konnte bislang nicht gefunden werden.[54] Die Prognose ist trotz intensiver Behandlung sehr schlecht. Das 5-Jahres Überleben nach der Diagnose eines GBM beträgt gerade mal 5%, wobei die Wahrscheinlichkeit des Langzeitüberlebens, d.h. eines Überlebens von zwei Jahren von gewissen Faktoren abhängt. Ausschlaggebend sind die Größe und Lokalisation des Tumors, die Be-

handlung, das Alter des Patienten am Zeitpunkt der Diagnose und sein Allgemeinzustand, sowie der histologische und molekulargenetische Befund. Das mediane Überleben nach Diagnose beträgt 12-15 Monate.[58]

2.3.2 Ätiologie

Über die Ätiologie von Glioblastomen ist nicht viel bekannt. Die Wahrscheinlichkeit an einem GBM zu erkranken erhöht sich mit ansteigendem Lebensalter, dem männlichen Geschlecht und bei kaukasischer Abstammung. Eine Erklärung hierfür könnte der Einfluss von Hormonen, genetische Variationen, Unterschiede in der Diagnostik in verschiedenen Ländern und bzw. oder sozioökonomische Unterschiede sein. Bestätigt davon ist bislang keine Theorie.[59] Einer der wenigen bestätigten Risikofaktoren für die Entwicklung eines GBM ist eine vorangegangene Radiotherapie oder eine Exposition ionisierender Strahlung. Außerdem konnte eine Häufung von Glioblastomen bei Patienten festgestellt werden, welche wegen einer ALL therapiert wurden.[60] Familiäre Häufungen von GBM treten auf - jedoch wurde bisher noch kein hierfür verantwortliches Gen identifiziert.[59] Auch führen Neurofibromatose 1 und Tuberöse Sklerose, beides genetische Erkrankungen, zu einer erhöhten Inzidenz von GBM.[61] Naheliegende Umweltfaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, Handystrahlung, Ernährungsgewohnheiten, elektromagnetische Felder oder Kopfverletzungen konnten sich bislang nicht bestätigen lassen.[62] Im Gegensatz dazu haben Menschen mit Allergien, Atopiker und Menschen mit erhöhten IgE-Antikörpern im Serum ein um 40% erniedrigtes Risiko an einem GBM zu erkranken. Die Erklärung für diesen protektiven Effekt wird in einer erhöhten Aktivität oder Anregung des Immunsystems vermutet.[62]

2.3.3 Therapie

Bis heute gilt das Glioblastom als unheilbar und schwer therapierbar. Einige Therapieansätze erzielten eine deutliche Lebensverlängerung sowie die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Die Therapie des Glioblastoms setzt sich aus der chirurgischen Resektion des Tumors, einer adjuvanten Radiochemotherapie, der Behandlung und Kontrolle der neurologischen und psychischen Symptome der Krankheit und der Kontrolle von Nebenwirkungen der Therapie zusammen. Aktuell erfordert die Standardtherapie des Glioblastoms eine möglichst totale chirurgische Resektion mittels fluoreszenzgestützter Resektion des Tumors. Eine makroskopische Komplettresektion ist die Therapieform, welche den Patienten eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens ermöglicht.[63, 64] Aufgrund des schnellen Wachstums des Tumors und dem erwarteten Rezidiv nach Resektion wird bei jüngeren Patienten bzw. Patienten in einem guten Allgemeinzustand bei Erstdiagnose eine aggressive Therapie angestrebt. Bei jüngeren Patienten und Patienten älter als 70 Jahre und methyliertem MGMT-Promoterstatus sollte eine Chemotherapie mit Temozolamid und eine Radiotherapie der Resektion des Tumors folgen. Bei Patienten älter als 70 Jahren und einem hypomethylierten MGMT-Status wird eine alleinige, hypofraktionierte Radiotherapie empfohlen.[65] Neuere Phase-III Studien untersuchen derzeit die Wirkung des monoklonalen VEGF-Antikörpers Bevacizumab und seine hemmende Wirkung auf die Angiogenese. AVAglio und RTOG-0825 konnten beide bei einer der Radiochemotherapie

TMZ/RT→TMZ zusätzlichen Therapie mit Bevacizumab eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens feststellen. Allerdings wurde das Gesamtüberleben nicht verlängert und auch eine Gewährleistung der Lebensqualität konnte bei RTOG-0825 im Vergleich zu AVAglio nicht bestätigt werden.[66, 67]

2.3.4 Molekulare, genetische und epigenetische Ansätze zur Differenzierung des Glioblastoms

Derzeit wird das Glioblastom von der WHO nach histologischen, molekulargenetischen Merkmalen und klinisch nach der Ätiologie in primär und sekundär eingeteilt. Eine in vor allem in primären GBM auftretenden genetischen Veränderungen ist die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, epidermal growth factor receptor) und die Inaktivierung des PTEN (Phosphatase-und-Tensin-Homolog) -Gens. Die erhöhte Expression von EGFR resultiert in einer durch Übermittlung von mitotischen Signalen gesteigerten Zellproliferation. Das PTEN-Gen dient als Tumorsuppressorgen und hat Einflüsse auf die Regulation von Zellproliferation, Apoptose und Zellmigration.[68, 69]

Eine in vorwiegend sekundären GBM vorkommende genetische Veränderung ist die Mutation von TP53. TP53 spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, in der DNS-Reparation und in der Regulierung der Apoptose.[68, 70]

Diskutiert wird, ob diese Marker neben ihrem Wert für die Differenzierung einen prognostischen oder prädiktiven Einfluss haben können.

Abbildung 8

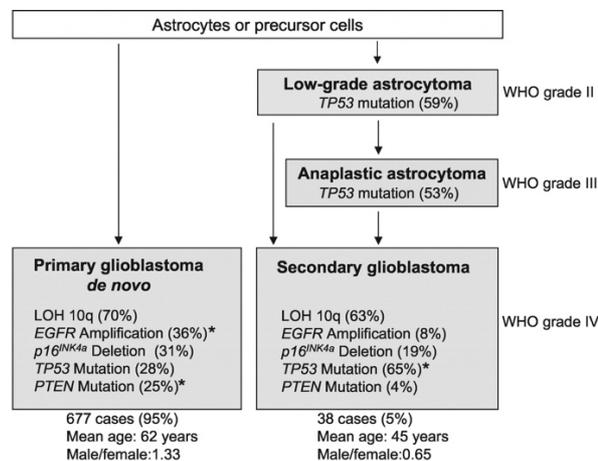


Abbildung 8: Zeitliches Auftreten und Häufigkeit von genetischen Veränderungen in der Entwicklung von GBM (Abbildung von Ohgaki et al. (2004)) - TP53 Mutationen in niedriggradigen Astrozytomen und anaplastischen Astrozytomen. LOH 10q ist eine häufige Veränderung in primären wie auch sekundären GBM. Mit einem * markierte Veränderungen treten signifikant häufiger in primären oder sekundären GBM auf.

Außerdem können Glioblastome seit 2010 laut des Cancer Genome Atlas (TCGA) bezüglich ihrer Expression dieser und weiterer genetischen Marker in vier potenziell klinisch relevante Subgruppen unterteilt werden: Proneural, Neural, Klassisch

und Mesenchymal. Proneurale GBM haben hierbei eine niedrigere Inzidenzrate und zeigen Expressionsmuster oligodendroglialer Zellen. Die IDH1- und PDGFRA-Gene weisen hohe Mutationsraten in proneuralen GBM auf. Sie treten häufiger bei jüngeren Patienten auf und sind mit sekundären GBM assoziiert. Neurale GBMs stammen von astrozytären und neuronalen Linien ab und weisen eine hohe Expression von EGFR auf. Hohe EGFR Level treten ebenso beim klassischen Typ auf, welcher der astrozytären Linie entspringt. Der mesenchymale Typ entspringt der Astrogliazelllinie und weist hohe Mutationsraten im NF1 (Neurofibromatose-1)-Gen auf. Die Mesenchymalen und Klassischen Subtypen zeigten signifikante Verzögerungen der Mortalität bei Behandlung mit Temozolamid und Bestrahlung, wohingegen der Proneurale Typ nicht reagierte. Die unterschiedlichen Expressionsmuster stellen außerdem Angriffspunkte für zukünftig entwickelte Therapien dar.[71]

Abbildung 9

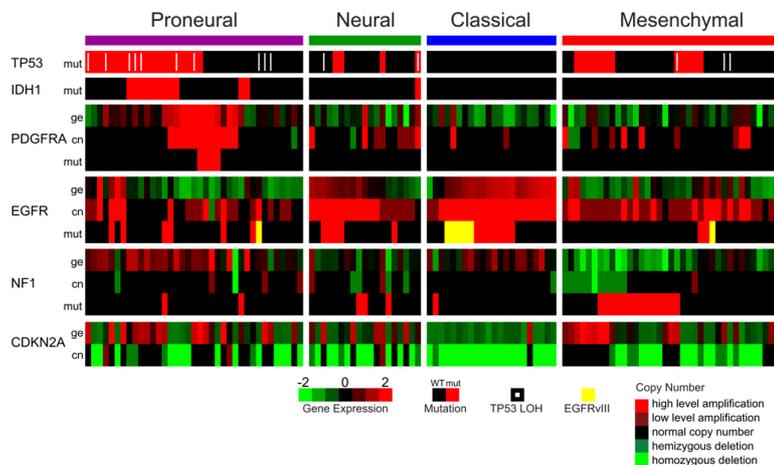


Abbildung 9: (Abbildung von Verhaak et al. (2010)) - Ansicht der spezifischen genomischen Expressionsmuster und genetischen Veränderungen (Ordinate), den vier verschiedenen GBM Gruppen (Abszisse) zugeordnet. Die Genomexpression von 116 verschiedenen GBM Proben wurde bestimmt und standardisiert (Mittelwert gleich 0 und Standardabweichung gleich 1) angegeben. Mutationen (mut) werden mit einem roten Balken angegeben, ein weißer Strich zeigt einen Loss of Heterozygosity (LOH). Mutation von EGFR (Epithelial-Growth-Factor) zu EGFRvIII (Epithelial-Growth-Factor variant III) wird durch einen gelben Balken symbolisiert. Copy Number Veränderungen (cn) werden durch neongrüne Balken für homozygote Deletionen, grüne Balken für hemizygoten Deletionen, schwarze Balken für eine neutrale Copy Number, rote Balken für erniedrigte Amplifikation und leuchtend rote Balken für erhöhte Amplifikation angezeigt.

Abbildung 10

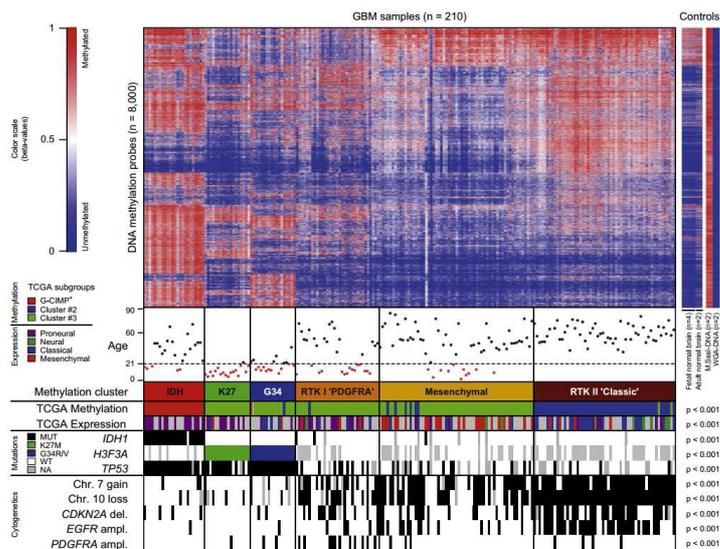


Abbildung 10: Definition von sechs epigenetischen GBM-Subtypen (Abbildung von Sturm et al. (2012)) - Heatmap der Methylierungslevel in sechs GBM-Subtypen, identifiziert durch K-Means-Clustering. Jede Reihe repräsentiert einen Loci und jede Spalte eine Probe. Das Level der DNS Methylierung ist farblich dargestellt, wobei Blau für unmethyliert und Rot für methyliert steht. Des Weiteren ist für jede Probe (n=210) das Alter des Patienten, die Subgruppenzuordnung, der Mutationsstatus und zytogenetische Aberrationen angegeben.

Drei, für die Diagnose bzw. für die Differenzierung der höhergradigen Gliome klinisch bereits genutzte prognostische oder prädiktive Marker, werden im Folgenden näher beschrieben.

2.3.4.1 MGMT

Prädiktiv günstig wirkt sich eine Hypermethylierung der Promoterregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens aus, welche die Expression des MGMT Proteins hemmt und somit die Fähigkeit zur DNS-Reparatur der Zelle herabsetzt. MGMT ist ein dealkylierendes Enzym, welches Alkylgruppen von der Position O6 der Guaninbase in der DNS entfernt. Eine herabgesetzte Funktionalität aufgrund von einer geringeren Expression dieses Enzyms unterstützt Chemotherapeutika, welche entgegengesetzt arbeiten, d.h. Alkylgruppen an die Position O6 anfügen und so zytotoxisch und Apoptose initiierend wirken.[72] Eine MGMT-Hypermethylierung tritt bei 45% der primären GBM auf.[73] Bei Patienten älter als 65 Jahren und MGMT-Hypermethylierung hat sich gezeigt, dass eine Therapie mit Temozolamid im Vergleich zu einer alleinigen Radiotherapie die Gesamtüberlebenszeit verlängert.[65] Auch die progressionsfreie Überlebenszeit verlängert sich durch eine Therapie mit Temozolamid mit oder ohne Radiotherapie bei Patienten mit methyliertem MGMT-Promotorstatus. Bei Patienten > 65 Jahren und einer MGMT-Hypomethylierung zeigte sich kein Vorteil mit einer Behandlung mit Temozolamid und Radiotherapie im Vergleich mit einer alleinigen Bestrahlung.[74] Somit wird der MGMT-Status klinisch dazu verwendet, eine Aussage über das Ansprechen der Temozolamidtherapie zu machen und trägt weiterhin zur Therapiefindung bei älteren Patienten bei.

2.3.4.2 IDH 1/2

Ein weiteres Beispiel für einen Biomarker, welcher prognostischen, prädiktiven und diagnostischen Charakter besitzt, ist eine Mutation auf dem 132. Kodon des IDH1 Gens (Isozitatdehydrogenase 1) oder seltener auf dem 172. Codon des IDH2 Gens. Durch diese Mutation kommt es zu einer Hemmung der Produktion von Alpha-Ketoglutarat (α KG) im Zitratzyklus. Die Mutation führt stattdessen zu einer Überproduktion von D-2-Hydroxyglutarat (D-2HG), einem Onkometaboliten. Eine erhöhte Konzentration dieses Onkometaboliten führt zu einer Hemmung von α KG-abhängigen epigenetischen Prozessen, welche wiederum zu einem CpG island methylator phenotype (G-CIMP) führt. Über die Inhibition von verschiedenen Enzymen führt D-2HG zu einer Hypermethylierung zahlreicher CpG Regionen im Genom. Außerdem beeinflusst es die Modifikation von Histonen und somit auch die Genexpression. Ein zusätzlicher Aspekt liegt auch auf der, durch den Mangel an α KG hervorgerufener Hemmung der Prolylhydroxylase (PH), welche die Produktion von VEGF indirekt hemmend beeinflusst und so durch eine IDH1 Mutation die Angiogenese angeregt wird.[75, 76] Die eigentliche Untersuchung, ob bei einem Glioblastom ein IDH Wildtyp oder ein IDH-Mutant vorliegt, hilft bei der Differenzierung zwischen primärem und sekundärem Glioblastom. Bei primären Glioblastomen beträgt der Anteil einer IDH1-Mutation nur 5-10%, wohingegen dieser Anteil bei sekundären Glioblastomen, d.h. bei Glioblastomen, welche sich aus einem Gliom niedrigeren Grades entwickelt haben, deutlich zu bis zu 85% ansteigen kann. Diese Glioblastome haben eine bessere Prognose als Tumore desselben WHO-Grades. Die Unterscheidung zwischen IDH1 Wildtyp und IDH1 Mutant hilft eine prognostische Aussage zu treffen und ist hierbei effizienter als eine alleinige histologische Klassifizierung.[76]

2.3.4.3 LOH 1p/19q

Der dritte genetische Marker, Gliome zu differenzieren, ist LOH1p/19q (loss of heterozygosity of chromosome 1p and 19q), einem kombinierten Verlust der Allele auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 19, welcher aus einer unbalancierten Translokation ($t(1;19)(q10;p10)$) resultiert. Häufig ist diese Aberration in oligodendroglialen Tumoren zu finden und führt über noch unbekannte Mechanismen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie mit Alkylanzien. Diese prognostische Bedeutung gilt insbesondere für anaplastische oligodendrogliale Tumore. Beim Glioblastom kommt diese Mutation nach der aktuellen Einteilung der WHO nicht vor. Sie spricht für das Vorliegen einer oligodendroglialen Tumors.[77]

2.4 Hypothese und Zielsetzung

In der Vergangenheit stellte man den Zusammenhang zwischen der Hypomethylierung von LINE-1 Retrotransposons und der verstärkten genetischen Instabilität in Zellen fest. Bei zahlreichen malignen Krebserkrankungen konnte eine Hypomethylierung von LINE-1 im Vergleich zu den Methylierungsgraden von LINE-1 in gesunden Geweben detektiert werden.[78] LINE-1 Hypomethylierung kann in einigen Krebsarten zudem einen Anhalt auf die Progression bzw. auf den Grad der Malignität geben.[79] Ohka et al. konnten 2011 einen Zusammenhang zwischen LINE-

1 Hypomethylierung in Gliomen und ihrer Einteilung des WHO Grades feststellen. So waren LINE-1 Promotoren in Glioblastomen des WHO Grades IV stärker demethyliert als in niedriggradigeren Gliomen. Auch postulierten sie eine Korrelation der prognostisch günstigeren MGMT-Promotormethylierung mit LINE-1 Methylierung in Gliomen. Verglichen sie jedoch die Methylierung beider Marker nur in Glioblastomen, konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Zusätzlich ergab sich in der Studie ein Zusammenhang zwischen dem Grad der LINE-1 Methylierung und einem längeren Gesamtüberleben.

Das Ziel der Untersuchungen, welche in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, ist die Beantwortung folgender Fragestellungen:

Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Methylierungsgrad von LINE-1 in Glioblastomgewebe, verglichen mit dem in gesundem Hirngewebe?

Hat ein niedrigerer Methylierungsgrad von LINE-1 eine Auswirkung auf die Expression von LINE-1 RNS oder auf die Kopienzahlvariation von LINE-1 als Marker für die Aktivität der Retrotransposition?

Gibt es einen Anhalt auf Zusammenhänge des Methylierungsgrades von L1 im Glioblastomgewebe und anderen schon bekannten molekularen Markern dieses Hirntumors?

Kann der Zusammenhang zwischen MGMT-Promotormethylierung und LINE-1 Methylierung, wie von Ohka et al. postuliert, bestätigt werden, wenn man isoliertes Glioblastomgewebe einer größeren Probenanzahl mit gesundem Hirngewebe vergleicht?

3 Methoden

Bezüglich der verwendeten Materialien verweise ich auf das Materialverzeichnis ab Seite 63.

3.1 Auswahl der Gewebeproben

Die 102 Gewebeproben für diese Studie stammen aus der Brain Tumor Bank des Zentrums für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Zur Archivierung in der Brain Bank wurde der „informed Consent“ der Patienten vor der Gewebeentnahme eingeholt. Dies geschah nach den Richtlinien der Ethikkommission der LMU. Die präoperative Planung beinhaltete unter anderem Computertomographie, Magnetische Resonanz Tomographie, sowie FET-PET (o-(2- [(18) F] fluoroethyl) -1-tyrosin Positron Emission Tomographie). Die chirurgisch entnommenen Gewebeproben wurden zum Teil in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffinblöcke gegossen (formalinfixiert-paraffin-embedded-Gewebe; FFPE-Gewebe). Zu dieser Konservierung wurden die Präparate nach der Fixierung in Formalin in einer aufsteigenden Reihe Alkohol dehydriert. Der Alkohol wurde durch Xylol gelöst und das Präparat anschließend in geschmolzenes Paraffin eingebettet. Nach dem Abkühlen der FFPE Proben wurden im Rahmen der initialen Diagnostik die Tumorzellen nach den Richtlinien der WHO-Klassifikation immunhistochemisch und histologisch klassifiziert.[80] Aus dem Pool der Brain Tumor Bank der LMU wurden im Rahmen dieser Arbeit 102 anonymisierte GBM nach der WHO-Ordnung von 2007 zur Einteilung von GBM von Herrn Dr. Theo Kraus identifiziert. Anschließend fertigte ich jeweils 2 μm dicke Schnitte der Paraffinblöcke an. Anschließend führte ich eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung des angeschnittenen Areals durch. Diese wurden mikroskopisch durch einen erfahrenen Neuropathologen (Dr. Theo Kraus) untersucht. Das Ziel der histologischen, immunhistochemischen und mikroskopischen Untersuchungen war es, Tumorgewebe mit mindestens 90% Tumormasse ohne Nekrosen (Glioblastom, WHO Grad IV) zu identifizieren, um dieses für die DNS und RNS Extraktion zu verwenden. Die passenden Regionen markierte ich auf den Objektträgern. Jeweils 10x10 μm dicke Leerschnitte der FFPE-Proben wurden durch mich angefertigt, um von ihnen das Material für die spätere Mikrodissektion zu gewinnen. Das mittlere Alter der Patienten, von welchen die Proben stammen betrug 52 Jahre mit einem medianen Alter von 54 Jahren. Von den 102 Patienten waren 39 Patienten bzw. 38% weiblich und 63 Patienten bzw. 62% männlich.

Als Vergleichskontrollen verwendete ich Formalin-fixiertes, in Paraffinblöcke gegossenes humanes post-mortem Gewebe. Die 11 anonymisierten Proben von Autopsiefällen des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der LMU wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien der Ethikkommission der LMU für archiviertes anonymisiertes post-mortem Material nach bestimmten Merkmalen ausgewählt. So wählte ich Gewebe von Fällen, bei denen nachweislich keine neurologischen sowie psychiatrischen Erkrankungen vorlagen. Neuropathologisch ergaben sich ebenfalls keine erkennbaren Veränderungen der Gewebeproben. Das mittlere Alter der Patienten, von denen die Kontrollen stammen, betrug 64 Jahre mit einem medianen Alter von 68 Jahren. 3 der 11 Patienten bzw. 27% waren

weiblich und 8 der 11 Patienten bzw. 72% waren männlich. Als Kontrollgewebe dienten Proben des frontalen Kortex, da dieser im Vergleich zum Mark besonders zellreich ist.

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die per Mikrotom geschnittenen, 2 μ m dicken Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und in zwei Xylolbecken nacheinander jeweils 5 Minuten entparaffinisiert. Anschließend wurde das Xylol durch eine absteigende Reihe vergälltem Ethanol herausgewaschen und schließlich mit destilliertem H₂O gewässert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch 5-minütiges Inkubieren der Probe in Hämatoxylin. Danach wurde die Probe 12 Minuten in Wasser gewaschen und der Gewebefärbung durch 1%iges Eosin für 5 Minuten zugeführt. Die Probe wurde nochmals in Wasser gewaschen und für 1 Minute in unvergälltem, 80%igem Ethanol und anschließend 4 Minuten in vergälltem, 96%igem Ethanol sowie für 2 Minuten in Isopropanol entwässert. Durch 10 Minuten in Xylol wurde der Alkohol gelöst und die gefärbte Probe mit einem Deckglas eingedeckt.

3.2 genetische Charakterisierung des Glioblastomgewebes

Zur Klassifizierung der Tumore des zentralen Nervensystems wurden im Rahmen der Aufnahme des Gewebes in die Brain Tumor Bank durch Mitarbeiter des ZNP nach den Richtlinien der WHO-Ordnung von 2007 verschiedene immunhistochemische sowie molekulardiagnostische Verfahren verwendet. Es wurden verschiedene Färbungen und Versilberungen nach einheitlichem Protokoll angefertigt: HE (Haematoxylin-Eosin), EvG (Elastika van Gieson), PAS (Periodic acid-Schiff), Gomori Silber Färbung. Außerdem wurden folgende Immunhistochemische Verfahren verwendet: GFAP (Saures Gliafaserprotein), MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) und Ki67 (Proliferationsmarker).

Die verwendeten Tumorgewebe wurden zudem teilweise molekulardiagnostisch auf Mutationen der Isozitat-Dehydrogenase 1 und 2 sowie auf Methylierung des MGMT Promoters und auf den LOH 1p/19q- Status (loss of heterozygosity der Chromosome 1p und 19q) untersucht.

Mutationen der IDH1 und IDH2 wurden per Pyrosequenzierung identifiziert. Für IDH1 wurde eine 88bp lange DNS Region, welche die Mutationslokation auf Codon 32 beinhaltet, sequenziert. Das sequenzierte DNS Fragment für IDH2 ist 83bp lang und beinhaltet die Mutationslokation auf Codon 172.[81]

Um die MGMT-Promoter Methylierung festzustellen, wurde eine Sanger Sequenzierung einer 316 bp langen DNS Region durchgeführt, welche 25 CpG Regionen beinhaltet. Hierzu wurden die Primer 5'-ATGTTGGGATAGTTCGCGTTTTAGA-3' und 5'-CCAATCCACAATCACTACTTC-3' verwendet. Als methyliert wurde der MGMT Promoter betrachtet, wenn 50% der CPGs methyliert sind. Partiiell methyliert war MGMT, wenn mindestens 9 CpGs methyliert waren. Bei Methylierungen von weniger als 9 CpGs der untersuchten Region wurde MGMT als nicht-methyliert betrachtet.[81, 82]

Um LOH1p/19q festzustellen wurde eine PCR durchgeführt. Als Marker für den kurzen Arm von Chromosom 1 wurde D1S1608, D1S548, D1S1592, D1S118 verwendet, für den langen Arm des Chromosoms 19 wurden die Mikrosatellitenmarker

D19S433, D19S431, D19S718, D19S559 und D19S601 verwendet. Das PCR Produkt wurde mit hochauflösenden SYBR Gold Gelen per Gelelektrophorese interpretiert.[81, 83]

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchungen der Gewebeproben im Rahmen der jeweiligen Diagnostik und ihrer Aufnahme in die Brain Tumor Bank nutzte ich, um die jeweiligen Vergleiche zwischen dem quantitativen Methylierungsgrad von Line-1 der einzelnen Proben abhängig von den untersuchten Markern anzustellen.

3.3 DNS und RNS Extraktion

3.3.1 DNS Extraktion

Um die DNS und RNS zu extrahieren, verwendete ich die Technik der Mikrodissektion. Dazu löste ich die zuvor auf den Objektträgern als passend identifizierten und markierten Areale unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell ab und verarbeitete das Material anschließend weiter. Hierfür wurde für jede Probe Mikrodissektionsgewebe \hat{a} 10 μm Dicke von fünf Objektträgern verwendet. Das abgelöste FFPE-Gewebe wurde in 1 ml Xylol gelöst und zentrifugiert, um das Gewebe vom Paraffin zu lösen. Das Xylol wurde mit 100 % Ethanol ausgewaschen. Durch Vortexen, Abpipettieren des Ethanols und anschließendes Erwärmen auf 37°C wurde auch das Ethanol entfernt. Das verbleibende Pellet wurde in 180 μl ATL Puffer gelöst und einer Proteinlyse mit 2 μl Proteinase K und einer Inkubationszeit von 1 h bei 56°C und 1 h bei 90°C zugeführt. Um eine RNS-freie Lösung zu gewinnen, folgte ein RNase Schritt mit 2 μl RNase A. Die Probe wurde in 200 μl AL Puffer und 200 μl Ethanol gelöst. Dieses Lysat wurde durch die QIAamp MinElute Column (Qiagen, Hilden, Deutschland) in ein 2ml-Tube zentrifugiert und so die DNS in der Membran der Säule gebunden. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 μl AW1 Puffer und 500 μl AW2 Puffer, welche auf die Säule pipettiert wurden und nach dem jeweiligen Zentrifugieren bei 6000 x g verworfen wurden. Nach dem Trocknen der Membran durch Zentrifugieren bei 20,000 x g für drei Minuten wurde die Säule in ein 1,5 ml steriles und verschließbares Röhrchen gesetzt, 50 μl ATE Puffer hinzupipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 Minute bei 20,000 x g zentrifugiert, um die so gewonnene DNS aus der Membran zu lösen. Um die extrahierte Menge an DNS festzustellen, wurde sie durch das UV/vis- Spektralphotometer Nanodrop 2000 der Firma Thermofisher Scientific, Waltham, USA quantifiziert. Vor einer Weiterverarbeitung der DNS wurde diese bei -20°C zwischengelagert. Für die DNS-Extraktion verwendete ich das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und befolgte das Protokoll des Herstellers. Alle Reagenzien wurden nach der Empfehlung des Herstellers vorbereitet und gelagert. Die Haltbarkeitsdaten wurden strikt eingehalten. Dazu wurde darauf geachtet, dass ausreichend Gewebe für jede Probe verwendet wurde.

3.3.2 RNS Extraktion

Analog zum Vorgehen bei der DNS Extraktion erfolgte die Mikrodissektion des Gewebes für die RNS Extraktion. Die RNS extrahierte ich mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und befolgte das Protokoll des Herstellers, welches einen DNase Digestionsschritt beinhaltet. Die Reagenzien wurden nach Empfehlung des Herstellers vorbereitet und gelagert. Wieder wurde das Gewebe á 10 μm Dicke von jeweils fünf Objekträgern verwendet und die zuvor identifizierten und markierten Areale unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell abgelöst und in 1 ml Xylol gelöst. Nach der Deparaffinisierung und dem Zentrifugieren bei 20,000 x g für zwei Minuten wurde das Xylol abpipettiert und mit 100%igem Ethanol ausgewaschen. Das Ethanol wurde ebenfalls durch Zentrifugieren, Abpipettieren und Verdampfen der Flüssigkeit bei 37 °C von dem verbleibenden Gewebepellet entfernt. Anschließend wurde 150 μl PKD Puffer und 10 μl Proteinase K hinzugefügt. Die Digestion des Gewebes ist nach einer Inkubationszeit der Lösung bei 56°C für 15 Minuten und bei 80°C für 15 Minuten abgeschlossen. Anschließend folgte eine Inkubation auf Eis für 3 Minuten und eine Zentrifugierung bei 20,000 x g für 15 Minuten. Das sich am Boden des Röhrchens absetzende Pellet beinhaltet das verbleibende Gewebe inklusive DNS. Das sich darüber angesammelte Lysat wurde in ein neues Röhrchen pipettiert und ihm 16 μl DNase Booster Buffer und 10 μl DNase 1 Stock Solution beigefügt. Nach einem vorsichtigen Durchmischen durch Bewegung dieser Lösung wurde sie fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 320 μl RBC Puffer und 720 μl 100 %iges Ethanol beigefügt und dieses Lysat durch eine RNeasy MinElute Spin Column für 15 Sekunden bei mindestens 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit der gebundenen RNS zwei Waschschritten mit jeweils 500 μl RPE Puffer zugeführt. Nachdem der RPE Puffer mit mindestens 8000 x g für 2 Minuten durch die Membran zentrifugiert wurde, wurde die Säule in ein neues Röhrchen gesetzt und erneut bei 20000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um Restflüssigkeit zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die extrahierte und in der Membran gebundene RNS in 30 μl RNase freiem Wasser gelöst und in ein steriles Röhrchen bei 20000 x g für eine Minute zentrifugiert. Die so gewonnene RNA wurde wiederum mit dem UV/vis-Spektralphotometer Nanodrop 1000 der Firma Fisher Scientific, Waltham, USA quantifiziert und vor der Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.3 Quantifizierung der Nukleinsäuren

Nach der Extraktion wurden die RNS-/ DNS-Konzentrationen der einzelnen Proben mittels UV/vis-Spektralphotometer NanoDrop™ 1000 gemessen. Als Einstellung für die RNS Messung wurde RNA-40 genutzt und für die DNS Messung DNA-50. Die Messpulte wurden vor jeden Durchlauf mit Nuklease-freiem Wasser gereinigt und mit einem fusselfreiem Einmaltuch abgewischt. Da die DNS und RNS in Nuklease-freiem Wasser gelöst wurden, wurde das Gerät vor der eigentlichen Messung auf das Nuklease-freie Wasser geeicht. Anschließend folgte die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration. Hierzu wurde von der jeweiligen Probe 1,0 μl auf den unteren Messarm pipettiert und die Messarme zusammengeführt. Der Nanodrop misst bei verschiedenen Wellenlängen die Extinktion, d.h. die Abschwächung bzw. Absorption eines Lichtstrahls in einem Medium. Das Gerät misst das

Spektrum der Eichlösung, in diesem Fall Nuklease-freies Wasser. Das Absorptionsspektrum der anschließend gemessenen Proben wird verrechnet mit dem Spektrum der Eichflüssigkeit und es wird das Spektrum der DNS oder RNS abgebildet. Die Konzentration des gemessenen Stoffes wird mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes berechnet und in ng/µl angegeben. Um einen Anhalt auf die Reinheit der gemessenen Nucleinsäuren zu erhalten, wurde auf den Extinktionsquotienten von Nucleinsäuren und Proteinen geachtet.

DNS und RNS absorbieren das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsspektrum von Proteinen liegt bei 280nm. Durch den Quotienten E_{260}/E_{280} , dessen Ergebnis idealerweise bei 1,8-2,0 liegt, können Rückschlüsse auf Protein- oder Lösungsmittelkontaminationen gemacht werden. Bei einem idealen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 können diese ausgeschlossen werden. Bei der Interpretation ist jedoch darauf zu achten, dass pH-Wert der Lösung und Ionenstärke einen Einfluss auf das Ergebnis haben können.

$$\text{Extinktionsquotient: } 1,8 \leq \frac{E_{260}}{E_{280}} \leq 2$$

3.4 Bisulfit-Konvertierung und Pyrosequenzierung

3.4.1 Bisulfit-Konvertierung

Um den Methylierungsgrad der untersuchten DNS-Abschnitte zu analysieren, wurde eine Bisulfitkonvertierung der DNS durchgeführt. Hierfür verwendete ich das EpiTect Fast DNA bisulfit Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Durch die Bisulfitkonvertierung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, wohingegen Methylcytosin sich nicht verändert. Das Uracil wird bei einer Sequenzierung durch ein Thymin wiedergespiegelt.

Abbildung 11

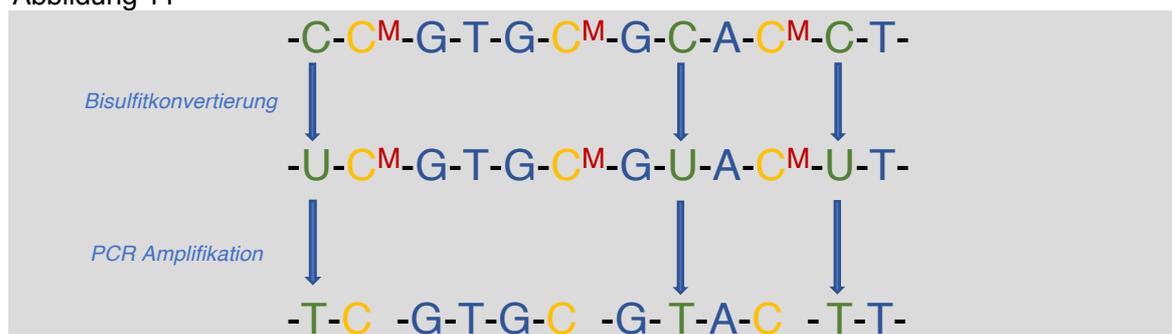


Abbildung 11: Erkennung von methylierten Cytosinen mit chemischer Bisulfit-Konversion - methylierte Cytosine bleiben unverändert bei der Bisulfitbehandlung. Unmethylierte Cytosine hingegen werden in Uracil umgewandelt und bei einer anschließenden PCR Amplifikation durch ein Thymin ersetzt.

Die Reagenzien für die Bisulfitkonvertierung wurden nach der Anleitung des Herstellers vorbereitet und entsprechend gelagert. Die Haltbarkeitsvorgaben für die verschiedenen Reagenzien wurde strikt eingehalten. Um die Konvertierung zu beginnen, wurden Komponenten der Reaktion in ein PCR Röhrchen pipettiert. Insgesamt betrug das Reaktionsvolumen 140µl. Diese beinhaltete 85µl Bisulfite Solution

und 20 μl eines Gemisches aus RNase freiem Wasser und DNS. Die Menge an Wasser ist hierbei variabel und dient nur als Ausgleich des Gesamtvolumens. Entscheidend ist die Menge an DNS. Als Zielmenge wurde 1 μg DNS pro Bisulfitreaktionsmix angesetzt. Das Volumen variierte und errechnete sich aus der Konzentration der extrahierten DNS. Wenn diese zu gering ausfiel, um mit 20 μl eine Gesamtmenge von 1 μg DNS zu erhalten, wurde das Volumen von RNase freiem Wasser und DNS auf 40 μl hochgesetzt. Die 20 μl Differenz wurde mit dem DNA Protect Puffer ausgeglichen, welcher dann nur noch ein Volumen von 15 μl hatte. Die dritte Komponente bestand aus 35 μl DNA Protect Puffer. Dieser war gleichzeitig auch Kontroll-Puffer und änderte die Farbe von Grün zu Blau als Indikator für einen geeigneten pH-Wert des Reaktionsgemisches.

Das Programm für die Bisulfit-Konversion im Thermo-Cycler lautete wie folgt:

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	
95°C	5min	Denaturierung
60°C	20min	Inkubation
95°C	5min	Denaturierung
60°C	20min	Inkubation
20°C	Pause	

Es folgte die Aufreinigung der konvertierten DNS. Hierzu wurde dem Konversionsprodukt 310 μl BL Puffer und 250 μl 100%iger Ethanol beigefügt, gemischt und anschließend auf eine MinElute DNA spin column über einem Sammelröhrchen pipettiert. Das Gemisch wurde bei 20.000 x g für 1 Minute durch die Filtersäule zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit 500 μl BW Puffer, ein Desulfonierungsschritt mit 500 μl BD Puffer mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf der Säule bei geschlossenem Röhrchen und zwei weiteren Waschschriften mit 500 μl BW Puffer. Nachdem 250 μl 100 % iges Ethanol durch die Säule zentrifugiert wurden und die verbleibende Flüssigkeit bei 60 °C für 5 Minuten verdunstet ist, wurde 15 μl Lösungspuffer (EB Puffer) auf die Säule pipettiert und 1 Minute dort belassen. Es folgte das Zentrifugieren bei 15.000 x g für 1 Minute um die konvertierte DNS aus der Säulenmembran zu lösen und in einem Röhrchen aufzufangen. Die gewonnene cDNS wurde mit dem Nanodrop UV/vis-Spektralphotometer Nanodrop 2000 der Firma Fisher Scientific, Waltham, USA quantifiziert und mit RNase freiem Wasser auf auf eine cDNS Konzentration von 10 ng/ μl verdünnt.

3.4.2 PCR

Vor der eigentlichen Sequenzierung wurde eine PCR der bisulfitkonvertierten DNS durchgeführt. Als Primer für LINE-1 wurden die Pyromark Q24 CpG LINE-1 Primer von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Tabelle 1: Primersequenzen für Line 1

Primer	Sequenz
Q24 CpG LINE-1 forward	5'- TGC GGA GAA ATA GGA ACA CTT TT-3'
Q24 CpG LINE-1 reverse	5'- TGA GGA ATC GCC ACA CTG ACT -3'

Der PCR Ansatz lautete:

Komponenten	Volumen [μ l]
PyroMark PCR Master Mix	12,5 μ l
CoralLoad Concentrate	2,5 μ l
Forward Primer	0,5 μ l
Reverse Primer	0,5 μ l
RNase-freies Wasser	7 μ l
Template DNS	2 μ l(20ng)
Gesamtvolumen	25 μ l

PCR Programm:

Temperatur	Dauer	Beschreibung
95°C	15min	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase im Master Mix
94°C	30sec	} Denaturierung Annealing Extension
50°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	10min	Finale Extension

45x

3.4.3 Gelelektrophorese

Anschließend wurde das PCR Produkt per Gelelektrophorese (Abbildung 12) kontrolliert. Hierfür wurde 1 g Agarose mit 50 ml 1 x TAE Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde 1 μ l SYBR-Gold der Gelmasse hinzugefügt. Dies ist ein Farbstoff, welcher an die DNS-Banden bindet und diese unter UV-Licht sichtbar macht. Je 1 μ l des PCR Produkts wurden mit 4 μ l Ladepuffer vermischt und in jeweils eine Tasche des abgekühlten 2% igen Agarosegels pipettiert. Pro Gel wurde eine NTC-Probe, d.h. eine DNS-freie Probe aufgetragen. Als Größenmarker wurde 1 μ l GelPilot 50 bp Plus Ladder verwendet. Diese wurde ebenfalls mit 4 μ l Ladepuffer verdünnt. Das Gel wurde bei 70 V für 1 h in TAE-Puffer laufen gelassen. Nach Durchlaufen des Gels wurden mit einem 3-UV Transilluminator von Uplande die Banden zunächst sichtbar gemacht und anschließend mit einer Canon Kamera fotografiert. Die DNS-Amplikongröße des PCR-Produkts liegt bei 150 bp.

Abbildung 12

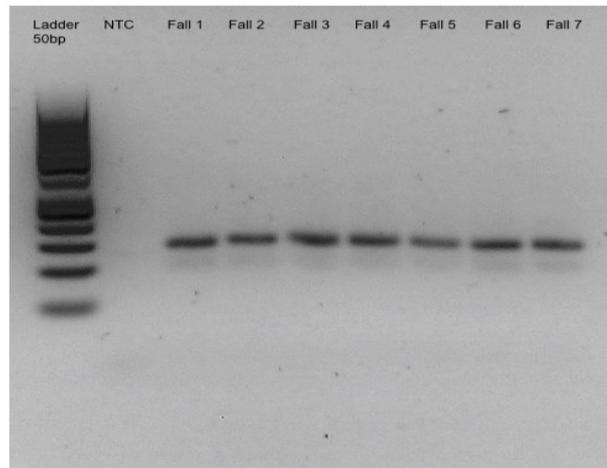


Abbildung 12: Schwarz-Weiß Negativ des Fotos einer Gelelektrophorese - in der ersten Geltasche läuft die 50 bp ladder. Die dritte Bande von unten spiegelt eine Größe von 150bp wieder. In der zweiten Tasche befindet sich die NTC. Es ist keine Bande zu sehen, da keine DNS vorhanden ist. In den folgenden sechs Taschen laufen die einzelnen Proben. Die Bande des PCR-Amplikons befindet sich auf Höhe von 150 bp.

3.4.4 Pyrosequenzierung

Die anschließende Pyrosequenzierung der DNS wurde mit dem Pyromark Q24 (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Zusätzlich wurden Pyromark Gold Q24 Reagenzien und der PyroMark Q24 CpG LINE-1 assay (beides von Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Technik der Pyrosequenzierung benutzt das Prinzip der Detektion von freigesetztem anorganischem Pyrophosphat (PPi) während des Einbaus eines komplementär passenden Nukleotids eines DNS-Stranges durch eine DNS-Polymerase.

Als Matrizenstrang dient das einzelsträngig vorliegende zu sequenzierende DNS-Amplikon. Einem Sequenzierungsprimer folgend, wird der Strang durch die DNA-Polymerase und die Zugabe jeweils einer der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat und Desoxythymidintriphosphat) verlängert.

Bei dem Einbau des komplementär zum Matrizenstrang passenden Nukleotids wird das freigesetzte PPi durch eine ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt, welches die Energie für die Oxidation von Luziferin durch eine Luziferase liefert. Dieses oxidierte Luziferin produziert Lichtblitze proportional zu der Menge an eingebauten Nukleotiden. Da detektiert wird, welches Nukleotid das Lichtsignal auslöst, ist die Identität des Nukleotids bekannt.[84]

Abbildung 13

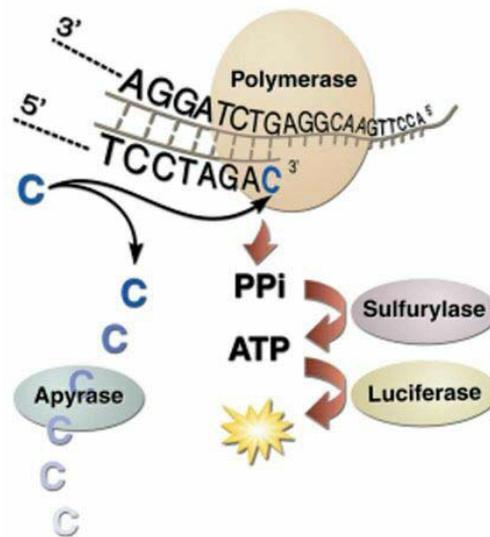


Abbildung 13: Das Prinzip der Pyrosequenzierung (docplayer.net) - bei dem Einbau des passenden dNTPs wird Pyrophosphat freigesetzt und von der Sulfurylase in ATP umgewandelt. Dieses ATP wiederum liefert die Energie für die Luziferase, welche Luziferin oxidiert, wodurch ein Lichtsignal entsteht.

Bei dem Pyromark Q24 wird die zu untersuchende DNS mit einem DNS-Adapterpuffer ligiert und zusammen mit dem Sequenzierungsprimer an sogenannte Beads gekoppelt. Die mit DNS beladenen Beads werden auf eine Platte mit Poren von der Größe eines Beads gegeben, bei der unter jeder Pore ein Lichtleiter zu einem Detektor führt. Um die DNS an Streptavidin Sepharose HP Beads zu binden und so zu immobilisieren, wurde das PCR Produkt zusammen mit dem Immobilisierungsgemisch auf eine PCR Platte gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten in einem Schüttler bei 14.000 rpm in Bewegung gehalten. Es wurden 20 μ l PCR Produkts für die Sequenzierung eingesetzt.

Immobilisationsansatz:

Komponente	Volumen [μ l]
Streptavidin Sepharose HP Beads	2 μ l
PyroMark Binding Puffer	40 μ l
RNase-freies Wasser	18 μ l
PCR Produkt	20 μ l
Gesamtvolumen	80 μ l

Anschließend wurde zu jeder Probe 25 μ l Sequencing Primer, welcher zuvor mit High-Purity Wasser und Annealing Puffer auf eine Konzentration von 0,3 μ M verdünnt wurde, hinzugegeben. Danach wurde die PCR Platte in die Pyromark Arbeitsstation in der richtigen Orientierung gestellt und der Vakuumsog aktiviert.

Durch diesen werden die Beads konstant an die Filtersonden gesogen und nach einer Inkubationszeit von 15 Sekunden mit den Sonden in 70 % iges Ethanol für 5 Sekunden gehalten. Es folgten 5 Sekunden in Denaturierungslösung und 10 Sekunden in Waschpuffer. Schließlich wurden die Beads durch Beenden des Vakuumsogs in die Wells der Pyromark Q24 Platte abgeschüttelt und für 2 min. auf 80°C erhitzt. Es folgte die Pyrosequenzierung mit dem zuvor vorbereiteten Pyromark Q24 von Qiagen und dem vorprogrammierten LINE-1 Sequenzierungsprogramm. Es wurden drei CpG-Lokalisationen in den Positionen 331 bis 318 von Line-1 untersucht.

Die Sequenz, welche die drei CpG-Regionen beinhaltet, lautete:

GCTCGTGTAGTCAGTCG

Abbildung 14

CpG Pyrogram Report Run: 140901_Line1
Well: A1
Assay: CpG_LINE1
Sample ID: -
Sequence to analyze: TTYGTGGTGYGTYGTTT

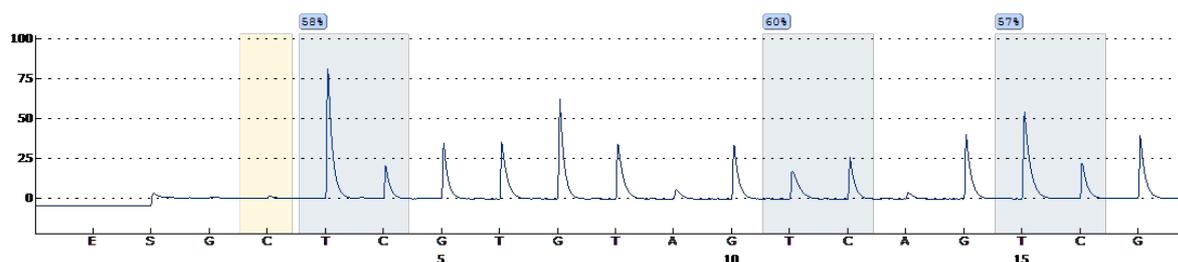
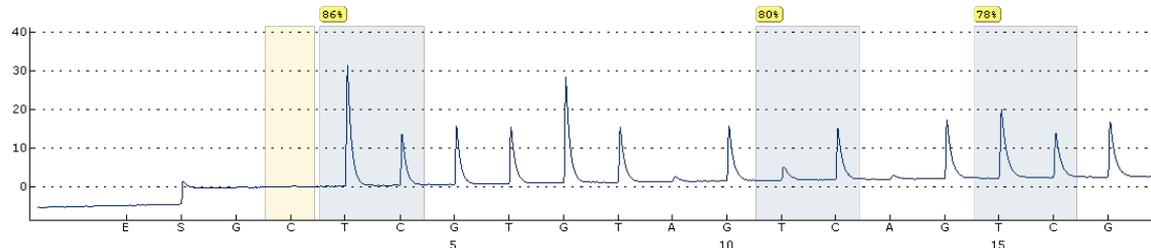


Abbildung 14: Beispiel der Pyrosequenzierung der drei zu untersuchenden CpG-Stellen der extrahierten DNS einer GBM-Probe - Die Ausschläge spiegeln ein Lichtsignal wieder, welches durch das passende, komplementär eingebaute dNTP ausgelöst wurde. Ein zweifach oder dreifach erhöhter Ausschlag bedeutet, dass zwei- bzw. dreimal so viele dNTPs eingebaut wurden. Die Prozentangaben über den CpG-Stellen geben den Methylierungsgrad an, d.h. wie viele Thymidine aus der Bisulfitkonvertierung der nicht-methylierten Cytidine und der anschließenden PCR hervorgegangen sind.

Abbildung 15

a)

Well: C4
 Assay: CpG_LINE1
 Sample ID: -
 Sequence to analyze: TTYGTGGTGYGTYGTTT



b)

Well: C7
 Assay: CpG_LINE1
 Sample ID: NTC
 Sequence to analyze: TTYGTGGTGYGTYGTTT

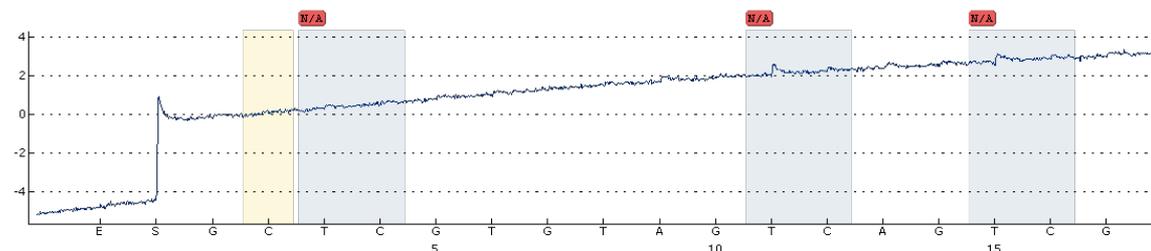


Abbildung 15: Beispiel der Pyrosequenzierung der drei zu untersuchenden CpG-Stellen der extrahierten DNS einer Kontroll-Probe (a) sowie der Negativkontrolle ohne Template (b) - Die Ausschläge spiegeln ein Lichtsignal wieder, welches durch das passende, komplementär eingebaute dNTP ausgelöst wurde. Ein zweifach oder dreifach erhöhter Ausschlag bedeutet, dass zwei- bzw. dreimal so viele dNTPs eingebaut wurden. Die Prozentangaben über den CpG-Stellen geben den Methylierungsgrad an, d.h. wie viele Thymidine aus der Bisulfitkonvertierung der nicht-methylierten Cytidine und der anschließenden PCR hervorgegangen sind. In Abbildung 17a sind die Prozentangaben der quantitativen Methylierung der drei CpG Regionen höher als bei Abbildung 16. Sie ist ein Beispiel für die Pyrosequenzierung der cDNS einer Kontrollprobe. Bei der Kontrolle ohne Template gibt es keine Ausschläge, da keine cDNS vorhanden ist.

3.5 Bestimmung der Kopienzahlvariation mittels quantitativer PCR

3.5.1 realtime PCR

Die Bestimmung der genomischen Kopienzahlvariation (CNV) von LINE-1 wurde per realtime PCR durchgeführt. Bei der realtime PCR handelt es sich um ein klassisches PCR Verfahren, welches die Quantifizierung der vervielfältigten DNS durch Echtzeit-Messung der Fluoreszenz vornehmen kann. Hierzu wird die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR Green am Ende der Elongation jedes Zyklus gemessen. SYBR Green ist ein Farbstoff, welcher sich in die DNS einlagert und dadurch seine Fluoreszenz verstärkt. So korrelieren die ansteigende Menge des PCR-Produkts mit der proportional ansteigenden Fluoreszenz.[85]

Hierzu wurde das Lightcycler 480 II System von Roche, Basel, Schweiz und der SensiFAST SYBR No-ROX Mastermix von Bioron, Luckenwalde, Deutschland

verwendet. Die extrahierte DNS wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 40 ng/ μ l verdünnt. Es wurden stets die gleichen Mengen an DNS verwendet. Als Referenzgene wurden SATA, 5SrDNA und HERV verwendet. Als Primer für die Referenzmarker und LINE- 1 nutzte ich die gleichen Primer wie Coufal et al. 2009.[86]

Tabelle 2: Primersequenzen für die realtime PCR

Primer	forward	reverse
LINE-1	5'- TGC GGA GAA ATA GGA ACA CTT TT-3'	5'TGA GGA ATC GCC ACA CTG ACT -3'
SATA	5'- GGT CAA TGG CAG AAA AGG AAA T-3'	5'- CGC AGT TTG TGG GAA TGA TTC -3'
5S rDNA	5'- CTC GTC TGA TCT CGG AAG CTA AG-3'	5'-GCG GTC TCC CAT CCA AGT AC -3'
HERV	5'- AAT GGC CCC ACC CCT ATC T -3'	5'- GCG GGC TGA GTC CGA AA-3'

PCR-Ansatz:

2x SYBR. Master Mix	5 μ l
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
DNS (40 ng/ μ l)	3 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

Das Programm für die q-PCR lautete:

Temperatur	Dauer	Messung	Temperaturerhöhung [°C/s]	Beschreibung
95°C	3min	-	4,4	Aktivierung der Polymerase
95°C	5sec	-	4,4	Denaturierung Annealing Elongation
55°C	10sec	-	2,2	
72°C	30sec	einzeln	4,4	
72°C	2min	-	4,4	finale Elongation
95°C	aufheizen	durchgehend	0,11	Schmelzkurve
40°C	Pause	-	2,2	Abkühlung

Pipettierschema der 96-Well Platte für die q-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
B	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
C	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
D	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
E	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
F	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
G	SATA	SATA	SATA	5srDNA	5srDNA	5srDNA	HERV	HERV	HERV	LINE1	LINE1	LINE1
H									SATA	5srDNA	HERV	LINE1

Pipettierschema der q-PCR zu Bestimmung der CNV: die Primer wurden in Triplets wie dargestellt aufgetragen; außerdem die DNS von 7 Proben (A1-A12; B1-B12; C1-C12; D1-D12; E1-E12; F1-F12; G1-G12), sowie eine Negativkontrolle ohne Template (H9-H12)

Anschließend wurde die CNV mit der komparativen C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) berechnet.[87]

3.5.2 $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Um die relative Kopienzahlvariation (CNV- Copy-Number Variation) von L1 zu berechnen, verwendete ich die komparative C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)[87, 88] Die errechneten CNV Level wurden mit den Leveln der Gene SATA, 5S rDNA und Herv normalisiert.[89] Der C_T -Wert (Cycle threshold) ist ein theoretischer Wert und benennt den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Zielgens erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Die Formel lautete:

$$2^{\Delta\Delta C_T} = 2^{(C_{TX}-C_{TR})_{control} - (C_{TX}-C_{TR})_{test}}$$

Als C_T -Werte wurden jeweils die Mittelwerte der Triplikate, die durch das Softwareprogramm errechnet wurden, eingesetzt. C_{TR} ist der Mittelwert der jeweiligen C_T -Werte von SATA, 5SrDNA und Herv, C_{TX} ist der Mittelwert der C_T -Werte von LINE-1 der jeweiligen Probe. $(C_{TX}-C_{TR})_{control}$ ist das ΔC_T der C_T Mittelwerte von Ziel- und Referenzgenen einer Kontrollprobe. $(C_{TX}-C_{TR})_{test}$ ist das ΔC_T der C_T Mittelwerte von Ziel- und Referenzgenen der einzelnen GBM- und Kontrollfälle.

3.6 Reverse Transkription und Bestimmung der Expression

3.6.1 Reverse Transkription

Um eine reverse Transkription der extrahierten RNS durchzuführen, um cDNS zu erhalten, wurde das Superscript Vilo cDNA Synthese Kit von Life Technologies, Darmstadt, Deutschland verwendet und bis zu 2,5 µg RNS eingesetzt.

Der Reaktionsansatz lautete:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
5X VILO™ Puffer	4 µl
10X SuperScript	2 µl
RNS	x µl (5 µl bei 500 ng/µl)
Nuklease-freies Wasser	x µl (9 µl bei 500 ng/µl RNS)
<hr/>	
Gesamt Volumen	20 µl

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler. Das Programm, mit welchem die reverse Transkription ablief, lautete:

<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
25°C	10min
42°C	90min
85°C	5min
4°C	Pause

3.6.2 realtime PCR

Die entstandene cDNS wurde 1:10 auf 100µl mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, mit dem NanoDrop™ Spektrometer vermessen und weiter auf 40 ng/µl verdünnt. Anschließend wurde eine realtime PCR mit dem LightCycler 480 II System von Roche, Basel, Schweiz und dem SensiFAST SYBR no-ROX Master Mix von Bioline, Luckenwalde, Deutschland durchgeführt. Als Primer für LINE-1 verwendete ich die gleichen Primer wie Coufal et al. für den L1 ORF2.[86]

Zwei weitere Gene, welche untersucht worden sind, waren TBP und IPO8. Diese dienten als Referenzgene für LINE-1. Kreth et al. stellten fest, dass IPO8 und TBP sehr gute Referenzgene für die Genexpression in Astrozytomen des WHO Grades II-IV darstellen, da ihre Expression im Vergleich von Tumorgewebe und Kontrollgewebe stabil bleibt.[89] Für alle drei Primerpaare wurde zudem die Effizienz berechnet. Hierfür wurde eine Standardreihe für jedes Primerpaar generiert und mit dem Softwareprogramm des LightCyclers 480 II Effizienz berechnet.

Tabelle 3: Primersequenzen für die q-PCR

Primer	forward	reverse
LINE-1	5'- TGC GGA GAA ATA GGA ACA CTT TT-3'	5'TGA GGA ATC GCC ACA CTG ACT -3'
TBP	5'- GAACATCATGGATCAGAACAACA-3'	5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3'
IPO8	5'-GATTTAGTGAGAGTGCAATTAACAATG-3'	5'-GTCTTCACCAGTTGATACAGG-3'

PCR Ansatz:

2x SYBR. Master Mix	5 µl
Forward Primer (10pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10pmol/µl)	1 µl
cDNS (40ng/µl)	3 µl

Gesamtvolumen 10 µl

Pipettierschema der 96-Well Platte für die q-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	TBP	TBP	TBP
B	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	IPO8	IPO8	IPO8
C	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1
D	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	TBP	TBP	TBP
E	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	IPO8	IPO8	IPO8
F	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1	LINE1
G	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1			
H	TBP	TBP	TBP	IPO8	IPO8	IPO8	LINE1	LINE1	LINE1	TBP	IPO8	LINE1

Pipettierschema für m-RNS-Expression: Die Primer wurden in Triplets wie dargestellt aufgetragen; außerdem die cDNS von 10 Proben (A1-A9; B1-B9; C1-C9; D1-D9; E1-E9; F1-F9; G1-G9; H1-H9; A10-12, B10-12, C10-12; D10-12, E10-12, F10-12) sowie eine Negativkontrolle ohne Template (H10-12)

Das Programm der q-PCR lautete:

Temperatur	Dauer	Messung	Temperaturerhöhung [°C/s]	Beschreibung	
95°C	3min	-	4,4	Aktivierung der Polymerase	
95°C	5sec	-	4,4	} Denaturierung Annealing Elongation	
55°C	10sec	-	2,2		40x
72°C	30sec	einzeln	4,4		
72°C	2min	-	4,4	finale Elongation	
95°C	aufheizen	durchgehend	0,11	Schmelzkurve	
40°C	Pause	-	2,2	Abkühlung	

3.6.3 $\Delta\Delta CT$ -Methode

Um die Genexpression von L1 zu berechnen, verwendeten wir die komparative CT-Methode ($\Delta\Delta CT$ -Methode).[87, 88] Die errechneten Expressionslevel wurden mit den Leveln von TBP (TATA-binding Protein) und IPO8 (Importin 8) normalisiert.[89]

Die Formel lautete:

$$2^{\Delta\Delta CT} = 2^{(CT_X - CTR)_{control} - (CT_X - CTR)_{test}}$$

Als C_T -Werte wurden jeweils die Mittelwerte der Triplikate, die durch das Softwareprogramm errechnet wurden, eingesetzt. C_{TR} ist der Mittelwert der jeweiligen C_T -Werte von IPO8 und TBP, C_{TX} ist der Mittelwert der C_T -Werte von LINE1 der jeweiligen Probe. $(C_{TX} - C_{TR})_{control}$ ist das ΔC_T der C_T Mittelwerte von Ziel- und Referenzgenen einer Kontrollprobe.

$(C_{TX} - C_{TR})_{test}$ ist das ΔC_T der C_T Mittelwerte von Ziel- und Referenzgenen der einzelnen GBM- und Kontrollfälle.

3.7 Analyse der Daten

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit der Prism 5 Software durchgeführt. Als statistische Tests wurden der Zweistichproben t-Test (auch ungepaarter t-Test) und der einseitige ANOVA Test mit Newman-Keuls post-hoc Test angewendet. Der einseitige ANOVA (Analyse of Variance) vergleicht die Mittelwerte eines Faktors von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Dieser Test wurde für den Vergleich der einzelnen Mittelwerte der Methylierung der drei CpG-Regionen in den GBM- und Kontrollfällen verwendet. Der Zweistichproben t-Test vergleicht die Mittelwerte zwei unabhängiger Stichproben. Dieser Test wurde für die Analyse der Mittelwerte der Methylierung von GBM und Kontrollfällen verwendet. Außerdem wurde er auf den Vergleich der Mittelwerte der relativen Expression von GBM- und Kontrollfällen und auch den Vergleich der Mittelwerte der relativen Kopienanzahl von GBM- und Kontrollfällen angewendet.

Zusätzlich wurden die Mittelwerte der Methylierung, der relativen Expression und der relativen Kopienanzahl anhand der Zuteilung der GBM-Fälle zu den Gruppen MGMT-methyliert oder MGMT-nicht methyliert IDH1-mutiert oder IDH1 Wildtyp; sowie LOH 1p/19q positiv oder LOH 1p/19q negativ mit dem Zweistichproben t-Test verglichen. Es wurden die Fälle der Brainbank verwendet, für welche die jeweilige Information vorlag.

4 Ergebnisse

4.1 Methylierung von LINE-1 in GBM Gewebe

Um die Methylierung von L1 im GBM und Kontrollgewebe zu analysieren und so die Voraussetzung einer Aktivierung von LINE-1 festzustellen, wurde eine Pyrosequenzierung von drei funktionell relevanten CpG Bereichen des LINE-1 Genoms durchgeführt. Die Pyrosequenzierung ermöglicht die Bestimmung der quantitativen Methylierung einer Sequenz. Selbst kleine Unterschiede können wiederholt aufgedeckt werden. So ergaben sich bei der Sequenzierung der drei CpGs signifikante Unterschiede der Methylierung zwischen den GBM Proben und den Kontrollen. Alle drei CpG-Regionen im GBM Gewebe wiesen eine signifikante Hypomethylierung auf. (Abbildung 16)

CpG1 im GBM zeigte einen mittleren Methylierungsgrad von 67,90% ($p < 0,0001$, ungepaarter t-Test) im Vergleich zu einem mittleren Methylierungsgrad von CpG1 in den Kontrollen von 77,45%. (Abbildung 17a)

Der mittlere Methylierungsgrad von CpG2 im GBM Gewebe lag bei 63,98% ($p=0,0014$, ungepaarter T-test) verglichen mit einer mittleren Methylierung von CpG2 in den Kontrollen, welche bei 70,27% lag. (Abbildung 17b) CpG 3 im GBM war im Mittel zu 63,99% methyliert, verglichen mit einer mittleren Methylierung von CpG3 in den Kontrollen, welche bei 69,91% lag. ($p=0,0027$, ungepaarter t-Test, Abbildung 17c)

Der zusammengefasste Vergleich der quantitativen Methylierung zwischen GBM Gewebe und Kontrollen ergab einen mittleren Methylierungsgrad von 65,29% in GBM Gewebe und 72,55% in den Kontrollen. Das Ergebnis war signifikant mit einem P-Wert von 0,0002 (Abbildung 16, Tabelle 4).

Abbildung 16

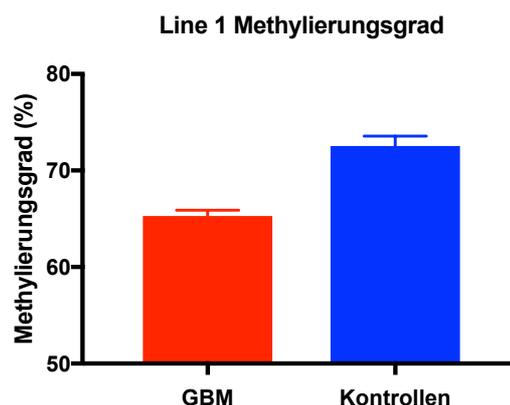


Abbildung 16: Vergleich des Methylierungsgrades von LINE-1 in GBM Gewebe und Kontrollgewebe - GBM (n=102; Mittelwert: 65,29 %; Standardfehler des Mittelwertes: 0,6076) und Kontrollgewebe (n=11; Mittelwert: 72,55%; Standardfehler des Mittelwertes: 1,015), ungepaarter t-Test, p-Wert=0,0002, der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwertes an.

Tabelle 4: GBM vs Kontrollen Vergleich quantitativer Methylierung

GBM vs. Kontrollen				
CpG-Stelle	Unterschied	t	P-Wert	Signifikanz
CpG1	-9,553	4,266	<0,0001	****
CpG2	-6,292	3,278	0,0014	**
CpG3	-5,919	3,071	0,0027	**
All	-7,255	3,848	0,0002	***

Abbildung 17 a-c

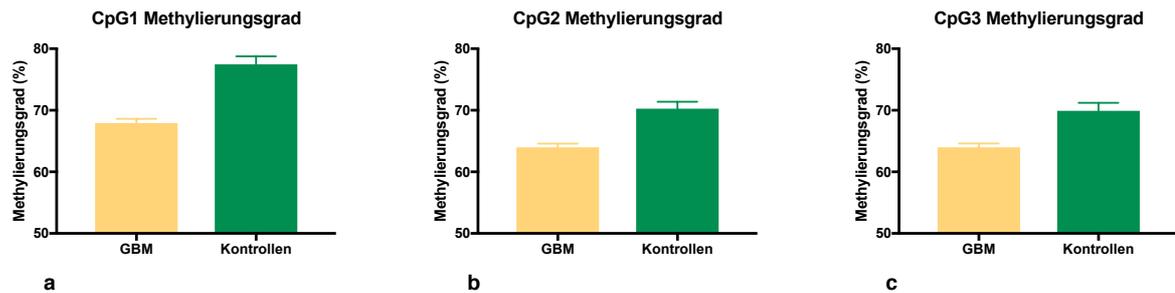


Abbildung 17 a-c: quantitativer Methylierungsgrad dargestellt in Prozent der drei untersuchten CpGs von L1 in GBM Gewebe und Kontrollgewebe - Abbildung 17a: CpG1 im GBM zeigte einen mittleren Methylierungsgrad von 67,90 % (n=102, $p < 0,0001$, Standardfehler des Mittelwertes : 0,7198, ungepaarter t-Test) im Vergleich zu einem mittlerem Methylierungsgrad von CpG1 in den Kontrollen von 77,45 % (n=11, Standardfehler des Mittelwertes: 1,31). Abbildung 17b: Der mittlere Methylierungsgrad von CpG2 im GBM Gewebe lag bei 63,98 % (n=102, $p=0,0014$, Standardfehlers des Mittelwertes: 0,6172, ungepaarter t-Test) im Vergleich zu einem mittlerem Methylierungsgrad von CpG2 in den Kontrollen von 70,27 % (n=11, Standardfehler des Mittelwertes: 1,121) Abbildung 17c: CpG 3 im GBM war im Mittel zu 63,90 % methyliert (n=102, $p < 0,0027$, Standardfehler des Mittelwertes : 0,6158, ungepaarter t-Test) verglichen mit einer mittleren Methylierung von CpG3 in den Kontrollen, welche bei 69,91 % lag. (n=11, Standardfehler des Mittelwertes: 1,304, ungepaarter t-Test) Der Fehlerbalken zeigt jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

Zusätzlich zu dem Vergleich der GBM mit den Kontrollen wurde der Methylierungsstatus der drei CpG Regionen aus dem GBM Gewebe mit drei für die GBM-Diagnose relevanten genetischen und epigenetischen Markern verglichen. Der MGMT Promotor Methylierungsstatus spielt vor allem bei älteren GBM Patienten eine Rolle. Durch die Hypermethylierung der Promotorregion und somit dem epigenetischen Silencing der MGMT kodierenden DNS Sequenz wird verhindert, dass das MGMT Protein exprimiert wird. Dieses Protein dient der DNS-Reparatur. Wird es nicht exprimiert, wird die Zelle sensibler für eine Chemotherapie mit alkylierenden Therapeutika wie Temozolamid. Eine Hypermethylierung des MGMT Promotors tritt bei ca. 45 % der Patienten mit einem primären GBM auf.[73] In unserer Studie wurden 60 GBM Fälle auf den MGMT Methylierungsstatus untersucht. Hiervon waren 37 Fälle methyliert. Dies entspricht 61,67 %. Der Vergleich des LINE-1 Methylierungsstatus von methylierten MGMT Fällen und nicht methylierten MGMT Fällen zeigte keine signifikanten Unterschiede im Methylierungsstatus von LINE-1. ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test, Abbildung 18 a-c)

Der zweite Marker, mit welchem der LINE-1 Methylierungsstatus verglichen wurde, ist der IDH1 Status. Die IDH1 bildet α -Ketoglutarat im Zitratcyklus. Bei einer Gain-

of-function-Mutation von IDH1 bildet diese 2-Hydroxyglutarat, einen Onkometaboliten. Eine IDH1 Mutation steht mit G-CIMP des Patienten eng im Zusammenhang und kommt vor allem bei jüngeren Patienten, welche ein sekundäres GBM aufweisen, vor.[76] Untersucht wurden 53 GBM Fälle auf ihren IDH1 Mutationsstatus. Hiervon zeigten 14 Fälle (26,4 %) einen IDH1 positiven Mutationsstatus und 39 entsprachen dem Wildtyp. Bei einer Analyse des Methylierungsstatus der drei CpG Regionen und einem Vergleich von IDH1 Mutanten und GBM vom Wildtyp konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test, Abbildung 19a-c)

Ein letzter Vergleich wurde von LOH1p/19q negativen und LOH1p/19q positiven GBM Fällen durchgeführt. Der molekulare Marker LOH1p/19q tritt bei oligodendroglialen Tumoren auf und differenziert diese von GBM.[77] Studien sehen Zusammenhänge mit dem proneuralen Subtyp und der Überexpression proneuraler Gene wie dem OLIG2 Gen.[90] Aktuell werden Tumore mit oligodendroglialer Komponente von Glioblastomen differenziert.[77] Allerdings steht fest, dass Tumoren mit einer 1p/19q Co-Deletion eine höhere Sensitivität auf alkylierende Chemotherapeutika und Radiotherapie aufweisen als LOH1p/19q negative höhergradige Gliome.[74, 90] Bestimmt wurde der LOH1p/19q Status von 37 Tumor Proben. Hier von zeigten 16 Fälle (43,2 %) eine Teildeletion von entweder 1p, 19 q oder eine Co-Deletion. Eine Analyse des LOH1p/9q Status der Proben zeigte keinen von ihm abhängigen signifikanten Unterschied in der Methylierung von LINE-1 ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test; Abbildung 20a-c).

Abbildung 18 a-c

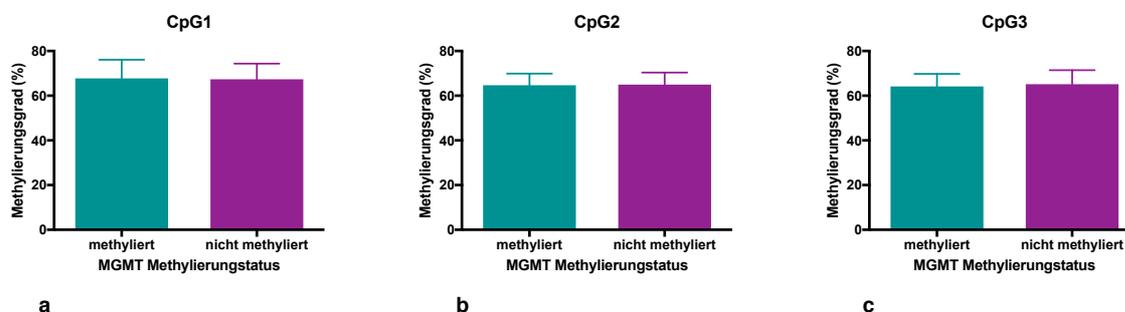


Abbildung 18 a-c: quantitativer Methylierungsgrad von CpG1, CpG2 und CpG2 in GBM Gewebe dargestellt in Prozent abhängig von ihrem MGMT Methylierungsstatus - Zu insgesamt 60 der 102 untersuchten Fälle lag die Information über den MGMT-Methylierungsstatus vor. Einen methylierten Status wiesen 37 der 60 Fälle auf ($n = 37$), 23 der 60 untersuchten Fälle wiesen einen nicht methylierten Status auf ($n=23$). CpG1 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad von 67,78% bei methyliertem MGMT Status verglichen mit einem mittleren Methylierungsgrad von CpG1 bei nicht methyliertem MGMT Status von 67,35%. ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test) CpG2 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad von 64,73% bei methyliertem MGMT Status und einen Methylierungsgrad von 64,96% bei nicht methyliertem MGMT Status. ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test) CpG3 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad von 64,19% bei methyliertem MGMT Status und einen Methylierungsgrad von 64,17% bei nicht methyliertem MGMT Status. ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test) Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwertes an.

Abbildung 19 a-c

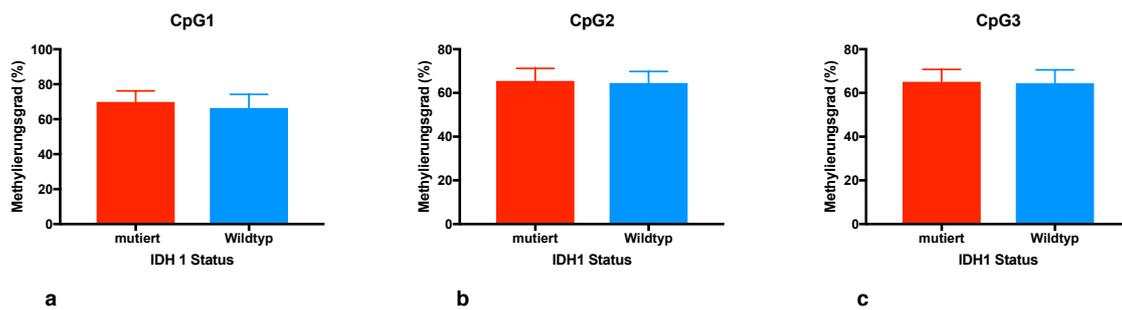


Abbildung 19 a-c: Vergleich des quantitativen Methylierungsgrades in Prozent von CpG1-3 abhängig ihres IDH1 Mutationsstatus - Von den 102 GBM Fällen lag der IDH 1 Mutationsstatus bei 53 Fällen vor. 14 Fälle zeigten einen mutierten IDH1 Status auf (n=14), 39 Fälle zeigten stellen den Wildtyp dar (n=39). CpG1 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad bei IDH 1 mutiertem Status von 69,86% verglichen mit einem Methylierungsgrad von 66,38% bei IDH1 Wildtyp. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes mutiert: 1,693, Standardfehler des Mittelwertes Wildtyp: 1,237) CpG2 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad bei IDH 1 mutiertem Status von 65,5% verglichen mit einem Methylierungsgrad von 64,49% bei IDH1 Wildtyp. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes mutiert: 1,525, Standardfehler des Mittelwertes Wildtyp: 0,8544) CpG3 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad bei IDH 1 mutiertem Status von 65,07% verglichen mit einem Methylierungsgrad von 64,41% bei IDH1 Wildtyp. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes mutiert: 1,528, Standardfehler des Mittelwertes Wildtyp: 0,989) Der Fehlerbalken zeigt jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

Abbildung 20 a-c

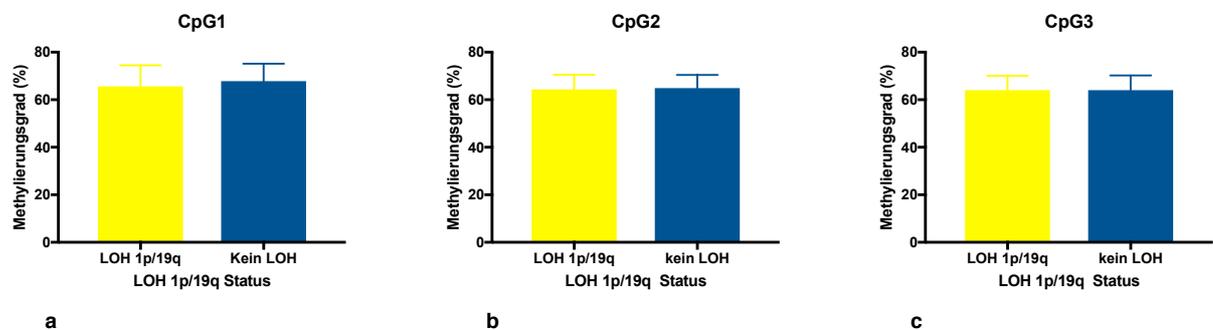


Abbildung 20 a-c: Vergleich des quantitativen Methylierungsgrades in Prozent von CpG1-3 abhängig des Vorliegens eines LOH1p/19q - Die Information über den LOH1p/19q Status lag bei 37 Fällen vor. 16 Fälle wiesen eine Teil- oder Codeletion auf. (LOH 1p/19q n=16) 21 Fälle wiesen keinen LOH 1p/19q auf (kein LOH n=21) Der mittlere Methylierungsgrad von CpG1 bei positivem LOH1p/19q Status lag bei 65,64% im Vergleich zu 67,81% ohne Vorliegen eines LOH1p/19q. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes LOH1p/19q: 2,677, Standardfehler des Mittelwertes kein LOH: 1,6) CpG2 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad bei positivem LOH1p/19q von 64,36% verglichen mit einem Methylierungsgrad von 64,9% bei negativen LOH1p/19q. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes LOH 1p/19q: 1,845, Standardfehler des Mittelwertes kein LOH: 1,213) CpG3 zeigte einen mittleren Methylierungsgrad bei positivem LOH1p/19q von 64% verglichen mit einem Methylierungsgrad von ebenfalls 64 % bei negativen LOH1p/19q. ($p>0,05$, ungepaarter t-Test, Standardfehler des Mittelwertes LOH1p/19q: 1,849, Standardfehler des Mittelwertes kein LOH: 1,366). Der Fehlerbalken zeigt jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

4.2 Relative Expression von LINE-1

Nach der Bestimmung des Methylierungsstatus von LINE-1 in GBM und Kontrollgewebe wurde die Genexpression von LINE-1 bestimmt, um festzustellen, ob eine Hypomethylierung von LINE-1 in einer Überexpression des Gens resultiert. Hierzu wurde die LINE-1 RNS in cDNS reverse transkribiert und diese cDNS in einer real-time PCR amplifiziert. Die CT-Werte der einzelnen Proben wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode relativiert und die Ergebnisse von GBM und Kontrollfällen anschließend mittels des ungepaarten t-Tests verglichen. Tatsächlich ergab die Analyse 5-fach höhere Expressionslevel von LINE-1 Retrotransposons in GBM Gewebe als in gesundem Kontrollgewebe. ($p < 0,0001$; ungepaarter t-Test; Abbildung 21)

Abbildung 21

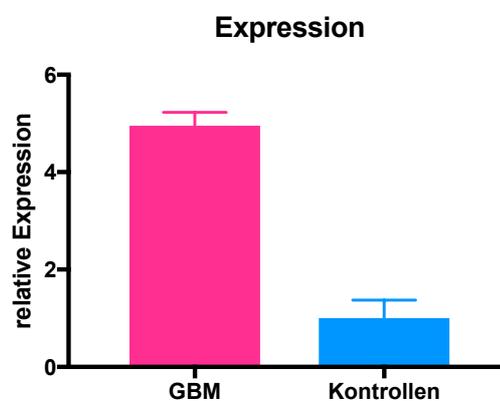


Abbildung 21: Vergleich der relativen Expression von LINE-1 in GBM und gesundem Hirngewebe - Ungepaarter t-Test, p-Wert $< 0,0001$, mittlere relative Expression in GBM Gewebe 4,953 ($n=102$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,2765) verglichen mit der relativierten Expression von LINE-1 der Kontrollen ($n=11$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,3729) Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwertes an.

Zusätzlich ergab die Analyse der relativen Expressionslevel von LINE-1 in GBM in Abhängigkeit des MGMT-Methylierungsstatus, des IDH1 Mutationsstatus oder des LOH 1p/19q Status keine signifikanten Unterschiede. ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test; Abbildung 22a-c) Demnach konnte kein Rückschluss auf den Einfluss dieser drei genetischen und epigenetischen Marker auf das Expressionslevel von LINE-1 Retrotransposons gemacht werden.

Abbildung 22 a-c

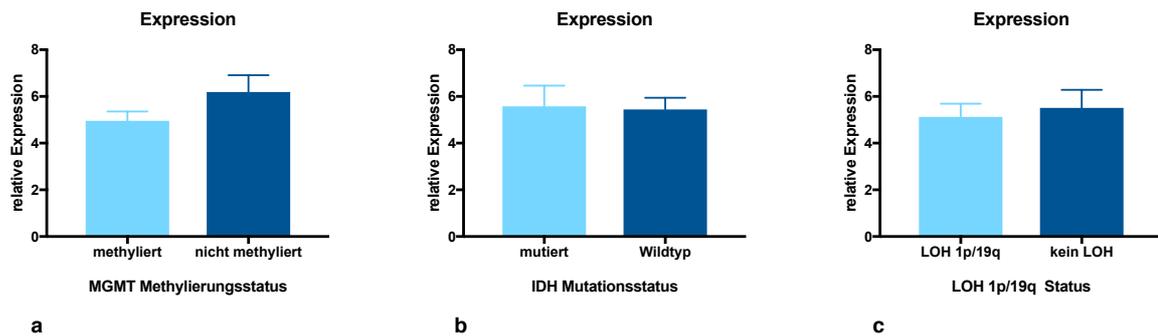


Abbildung 22 a-c: relative Expression von LINE-1 in GBM (Ordinate) in Abhängigkeit des MGMT-Methylierungsstatus, des IDH-Mutationsstatus und des LOH1p/19q Status (Abszisse) - die relative Expression von LINE-1 der Fälle mit MGMT-methyliertem Status lag bei 4,958 ($n=37$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,3965) gegenüber einer relativen Expression von LINE-1 von 6,193 bei nicht methyliertem MGMT Status ($n=23$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,7203). (Abbildung 22a; $p>0,05$; ungepaarter t-Test) Bei IDH1 Mutation lag die relative Expression von LINE-1 bei 5,579 ($n=14$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,8822); bei IDH1 Wildtyp lag die relative LINE-1 Expression bei 5,442 ($n=39$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,504). (Abbildung 22b; $p>0,05$; ungepaarter t-Test) Bei Vorliegen eines LOH1p/19q lag die relative LINE-1 Expression bei 5,123 ($n=16$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,5672) verglichen mit einer relativen Expression von LINE-1 von 5,507 ohne Vorliegen eines LOH1p/19q ($n=21$, Standardfehler des Mittelwertes: 0,7739). (Abbildung 22c; $p>0,05$; ungepaarter t-Test) Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

4.3 Kopienzahlvariation (Copy-Number Variation; CNV) von LINE-1 Retrotransposons in GBM

Um festzustellen, ob mit einer geringeren Methylierung von L1 Retrotransposons und einer erhöhten Genexpression von L1 auch eine erhöhte Retrotranspositionsaktivität von L1 und somit einer erhöhten Kopienzahlvariation des Gens einhergeht, wurde per Q-PCR eine Bestimmung der CNV von L1 im Genom von GBM und Kontrollen durchgeführt. Diese relative Quantifizierung der genomischen Kopien von L1 ergab eine Verdopplung der Kopienzahlvariation von L1 in GBM verglichen mit den Kontrollen. ($p<0,0001$; ungepaarter t-Test; Abbildung 23)

Abbildung 23

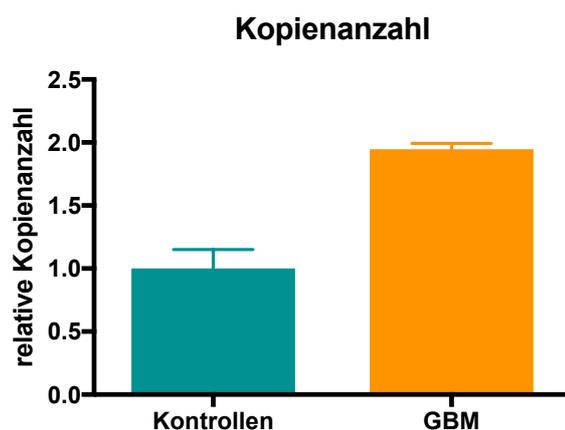


Abbildung 23: Kopienzahlvariation von LINE-1 in GBM und Kontrollen - Kopienzahlvariation von LINE-1 in GBM: 1,19 (n=102; Standardfehler des Mittelwertes: 0,02708) Kopienzahlvariation von LINE-1 in Kontrollen: 0,5747(n=11; Standardfehler des Mittelwertes: 0,08697) (Ungepaarter t-Test; p-Wert< 0,0001). Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

Zusätzlich konnte kein signifikanter Unterschied bei der Analyse der Genkopienzahlvariation von LINE-1 in Abhängigkeit vom MGMT Methylierungsstatus, dem IDH1 Mutationsstatus oder dem LOH1p/19q Status festgestellt werden ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test, Abbildung 24a-c).

Abbildung 24 a-c

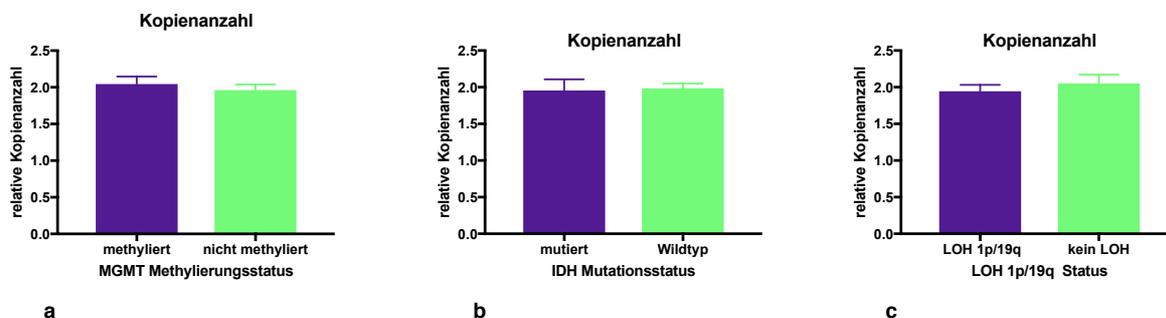


Abbildung 24 a-c: Kopienzahlvariation von LINE-1 in GBM in Abhängigkeit vom MGMT-Methylierungsstatus, des IDH-Mutationsstatus und des Status des LOH1p/19q - Die CNV von LINE-1 der Fälle mit MGMT-methyliertem Status lag bei 2,046 (n=37, Standardfehler des Mittelwertes: 0,1002) gegenüber einer CNV von LINE-1 von 1,961 bei nicht methyliertem MGMT Status(n=23, Standardfehler des Mittelwertes: 0,07797)(Abbildung 24a; $p > 0,05$; ungepaarter t-Test) Bei IDH1 Mutation lag die CNV von LINE-1 bei 1,954 (n= 14, Standardfehler des Mittelwertes: 0,1526) bei IDH1 Wildtyp lag die CNV von LINE-1 bei 1,985 (n=39, Standardfehler des Mittelwertes: 0,06457)(Abbildung 24b; $p > 0,05$; ungepaarter t-Test) Bei Vorliegen eines LOH1p/19q lag die LINE-1 CNV bei 1,945 (n=16, Standardfehler des Mittelwertes: 0,08737) verglichen mit einer CNV von LINE-1 von 2,051 ohne Vorliegen eines LOH1p/19q (n=21, Standardfehler des Mittelwertes: 0,1217) (Abbildung 24c; $p > 0,05$; ungepaarter t-Test) Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwertes an.

Tabelle 5: Eigenschaften der Kontrollfälle

Case	Hirn- region (Hirn- hälfte)	Methyla- tion CpG1 (%)	Methyla- tion CpG2 (%)	Methyla- tion CpG3 (%)	Relative Expres- sion	Copy number variation
1	Frontal- kortex (links)	81	69	65	0,48	1,44
2	Frontal- kortex (rechts)	77	71	69	0,06	2,16
3	Frontal- kortex (links)	82	69	78	0,63	0,50
4	Frontal- kortex (rechts)	68	66	62	0,54	0,89
5	Frontal- kortex (rechts)	73	70	69	0,24	0,68
6	Frontal- kortex (rechts)	77	70	70	2,60	1,20
7	Frontal- kortex (rechts)	82	75	71	4,07	0,78
8	Frontal- kortex (rechts)	78	63	67	0,95	0,35
9	Frontal- kortex (rechts)	80	73	72	0,95	0,80
10	Frontal- kortex (rechts)	80	76	73	0,02	0,97
11	Frontal- kortex (rechts)	74	71	73	0,46	1,24

Tabelle 6: Eigenschaften der GBM Fälle

Case	Diagnose	Methylation CpG1 (%)	Methylation CpG2 (%)	Methylation CpG3(%)	Relative Expression	Copy Number Variation
1	GBM	61	59	59	4,336247722	1,739985138
2	GBM	78	64	63	10,0429684	3,76147162
3	GBM	76	69	66	4,396779485	2,175424889
4	GBM	75	69	73	6,671974821	2,122466304
5	GBM	70	69	71	1,045925802	1,62596613
6	GBM	73	67	65	5,875780535	1,945560838
7	GBM	78	72	75	5,174599398	2,083595149
8	GBM	77	74	73	3,903533122	1,66269025
9	GBM	61	68	64	5,388114507	2,77912464
10	GBM	78	71	72	3,718653978	1,834951142
11	GBM	67	64	64	2,075003607	1,678127999
12	GBM	72	71	68	5,992316578	1,997179318
13	GBM	73	74	75	3,917085207	1,447455934
14	GBM	66	67	70	6,749499434	1,345333518
15	GBM	73	72	70	5,616924889	1,746698421
16	GBM	60	61	64	3,328288541	2,004884919
17	GBM	65	66	67	3,876569449	2,406360451
18	GBM	67	67	64	4,551831578	2,091634162
19	GBM	75	68	66	1,983589982	2,266060053
20	GBM	76	68	67	3,244764659	1,898198068
21	GBM	81	72	74	3,722952418	2,653623829
22	GBM	62	65	60	8,08238184	2,506617129
23	GBM	57	58	57	8,553098637	2,423098011
24	GBM	63	63	58	16,89019225	2,292390402
25	GBM	58	63	63	4,36640871	2,364110067
26	GBM	72	68	66	4,805812995	1,758847669
27	GBM	61	62	65	4,36640871	2,751438524
28	GBM	54	60	55	2,900792656	2,299463353
29	GBM	61	59	60	5,419327537	2,099704192
30	GBM	57	59	61	5,701917549	1,553736278
31	GBM	60	58	57	5,216614573	1,641062902
32	GBM	68	59	61	7,816090531	2,165395482
33	GBM	72	66	68	13,29778308	2,122466304
34	GBM	68	64	62	4,336247722	1,157728693
35	GBM	57	61	60	5,103359159	2,119199528
36	GBM	57	55	54	14,90902331	2,320813413
37	GBM	59	55	55	10,23032811	1,860566105
38	GBM	51	57	54	4,130874349	1,864869896
39	GBM	74	63	65	6,656577081	1,923214166
40	GBM	71	66	70	5,675629879	1,799958785
41	GBM	62	60	55	10,0429684	1,764274425
42	GBM	68	60	63	4,396779485	2,449365915
43	GBM	65	63	67	6,671974821	1,864869896
44	GBM	71	65	69	1,045925802	2,428703029
45	GBM	60	60	63	5,875780535	1,798573056
46	GBM	58	55	57	5,174599398	3,709686329
47	GBM	53	56	58	3,903533122	2,419368521
48	GBM	71	67	58	5,388114507	1,77244597

49	GBM	71	68	67	3,718653978	1,969683561
50	GBM	60	61	58	2,075003607	1,301509727
51	GBM	77	74	74	5,992316578	1,672966222
52	GBM	75	70	70	3,917085207	1,693709084
53	GBM	80	73	74	6,749499434	1,481288613
54	GBM	67	70	67	5,616924889	1,291524475
55	GBM	74	68	66	3,328288541	2,069202706
56	GBM	82	69	72	3,876569449	2,310113719
57	GBM	65	61	62	4,551831578	1,592504231
58	GBM	70	65	66	1,983589982	1,524106663
59	GBM	76	69	68	3,244764659	2,297693072
60	GBM	76	63	66	3,457622849	1,893817362
61	GBM	66	63	62	2,980622865	2,411926752
62	GBM	78	66	69	3,328288541	2,093245683
63	GBM	67	63	64	1,423833356	2,119199528
64	GBM	76	68	66	4,341260047	1,718675533
65	GBM	68	61	62	3,832043251	1,318662149
66	GBM	68	62	59	7,317988648	1,756140554
67	GBM	57	59	58	3,059113944	1,356779328
68	GBM	59	59	60	6,572522509	1,933610491
69	GBM	66	62	62	2,168123861	1,56816241
70	GBM	66	63	61	2,646245989	2,587030756
71	GBM	69	82	74	3,22607619	1,735969559
72	GBM	78	72	73	2,011279866	1,606052916
73	GBM	77	76	76	2,831265764	1,592504231
74	GBM	72	74	72	3,156036399	1,627218872
75	GBM	83	81	80	2,091851605	1,531165829
76	GBM	78	72	72	6,792521268	2,062838017
77	GBM	58	60	57	5,616924889	1,48357204
78	GBM	78	64	68	3,259793353	2,093245683
79	GBM	71	66	65	3,410020733	1,646126245
80	GBM	71	62	65	5,841938529	2,550432025
81	GBM	67	65	65	2,611322262	1,840612708
82	GBM	70	66	66	6,125300026	1,739985138
83	GBM	73	66	64	13,20592859	1,947059815
84	GBM	67	63	62	4,306295071	1,360965541
85	GBM	66	57	58	3,509941968	1,639799502
86	GBM	65	60	58	2,150661558	1,376779199
87	GBM	75	66	65	4,952351942	1,941070827
88	GBM	62	55	57	4,301323117	1,203180225
89	GBM	74	64	66	5,301671119	1,529987035
90	GBM	66	57	57	3,863157537	1,360965541
91	GBM	61	56	57	4,266679798	2,58304895
92	GBM	62	53	55	3,735877573	1,335012047
93	GBM	67	55	58	4,468468676	1,026663836
94	GBM	75	69	71	2,367088825	1,215287124
95	GBM	63	53	54	7,57605696	2,064427351
96	GBM	62	57	57	9,916152859	1,921733547
97	GBM	61	54	55	3,608619868	2,137229225
98	GBM	59	51	52	7,9711093	2,345972488
99	GBM	67	66	65	2,27986307	2,9172935
100	GBM	67	58	61	1,933811505	2,069202706
101	GBM	63	52	51	2,274601548	2,061249906

102	GBM	63	57	58	3,343704089	2,514351056
------------	-----	----	----	----	-------------	-------------

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Die Auswahl der Glioblastomgewebeproben erfolgte mittels histologischen, immunhistochemischen und mikroskopischen Untersuchungen. Zur Auswahl standen Gewebeproben der Brain Tumor Bank des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ziel war es Glioblastomgewebe WHO Grad IV mit ausreichenden Proliferationsraten und ohne Nekrosen zu identifizieren. Nach neuer WHO Ordnung von 2016 ist ein Oligodendrogliom durch ein LOH 1p/19q definiert. Nach WHO Ordnung von 2016 sind in solchen Tumorgeweben Nekrosen und Gefäßendothelproliferate kompatibel mit der Diagnose eines anaplastischen Oligodendroglioms. Einige, der hier in den Untersuchungen einbezogenen Proben sind somit nach neuer WHO Ordnung keine Glioblastome.[77] Dies betrifft 16 der insgesamt 102 untersuchten Fälle.

Um humane DNS und RNS gesunden Hirngewebes sowie Glioblastomgewebes zu gewinnen wurde in dieser Studie FFPE-Gewebe verwendet. Das Ziel war es eine große Anzahl an Proben zu gewinnen. Die Verwendung von FFPE-Gewebe erzielte die Probenanzahl von 102 GBM Proben, sowie elf Kontrollproben. Kokkat et al. konnten 2013 aufzeigen, dass auch noch nach Jahren qualitativ und quantitativ äquivalente Ergebnisse bei DNS und RNS Extraktion aus FFPE-Gewebe erzielt werden können.[91] Es zeigte sich außerdem, dass eine starke Korrelation der Ergebnisse von DNS und RNS Extraktionen von FFPE-Gewebe und FF (fresh frozen)-Gewebe besteht, sodass die Verwendung von FFPE-Gewebe mit dem Vorteil der Möglichkeit auf eine große Anzahl von Proben zuzugreifen, verglichen mit dem Goldstandard der Verwendung von FF-Gewebe, solide Ergebnisse liefert.[92]

Um die Quantität und Qualität der gewonnenen DNS und RNS zu überprüfen, wurde jede Probe der Messung per UV/vis-Spektralphotometer zugeführt.

Die Extraktion von RNS und DNS wurde nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Kits durchgeführt.

Zur Qualitätssicherung der PCR nach Bisulfitkonvertierung der DNS erfolgte die Durchführung einer Gelelektrophorese für jede Probe.

Zur Durchführung der qPCR wurden alle Primer mit Hilfe der jeweiligen Schmelzkurven auf ihre Spezifität überprüft.

Zu jedem Master-Mix Ansatz wurden Negativkontrollen ohne cDNS durchgeführt, um eine Verunreinigung des Master-Mix auszuschließen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Methylierungsgrad von LINE-1 in Glioblastomgewebe

5.2.1.1 Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Methylierungsgrad von L1 in Glioblastomgewebe verglichen mit dem in gesundem Hirngewebe?

Die Untersuchungen des LINE-1 Methylierungsgrades in Glioblastomgewebe ergab signifikant niedrigere Methylierungsgrade der drei untersuchten CpG Islands

verglichen mit gesundem Hirngewebe. Es bestätigt das Ergebnis der Studie von Ohka et al., welche ebenfalls einen signifikant erniedrigten Methylierungsgrad von LINE-1 in GBM Gewebe verglichen mit LGG und gesundem Hirngewebe festgestellt hatten.[93] Eine Demethylierung von LINE-1 suggeriert eine potentielle Reaktivierung des Retrotranspositionsmechanismus und somit eine erhöhte genomische Instabilität.[36, 45] Verringerte Methylierungsgrade von LINE-1 wurden bereits bei zahlreichen anderen Malignomkrankungen festgestellt. Die genaue Identifizierung der durch Retrotransposition veränderten Exons und Introns mit potenzieller Tumorentstehung oder Progression sollte das Ziel aktueller und zukünftiger Studien sein. In anderen Tumorgeweben konnten bereits einige Mutationen, welche durch aktivierte Retrotransposition ausgelöst wurden, identifiziert werden. 1992 konnten bereits Miki et al. eine LINE-1 Insertion identifizieren, welche eine Mutation und Dysfunktion im APC Tumorsuppressorgen auslöste.[94]

Ein anderes Beispiel stellt die durch Shukla et al. 2013 postulierte Mutation durch LINE-1 Retrotransposition des Gensuppressors des ST 18 Gens dar, welche die Hochregulierung dieses Gens induziert, einem potenziellen Onkogen des hepatozellulären Karzinoms. Auch Shukla et al. konnten einen signifikant erniedrigten Methylierungsgrad von LINE-1 CpG Islands nachweisen.[95]

Auch eine 2012 durchgeführte Studie von Lee et al. bestätigte eine Promotorhypomethylierung in Zusammenhang mit erhöhter LINE-1 Aktivität in verschiedenen Tumorgeweben, verglichen mit gesunden Kontrollproben.[96]

Eine Identifizierung einer tumorinitiierenden oder tumorbegünstigenden Mutation eines Gens durch LINE-1 konnte in GBM Gewebe noch nicht identifiziert werden. Jedoch haben auch Laffaire et al. schon aufzeigen können, dass das GBM-Genom signifikant hypomethyliert ist im Vergleich mit gesundem oder sogar mit LGG Genomen.[97] Ob eine LINE-1 Hypomethylierung die genomweite Hypomethylierung von Glioblastomen repräsentiert, Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen auslöst, oder sogar selbst als Onkogen fungiert ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Auch ist unklar zu welchem Zeitpunkt eine Hypomethylierung von LINE-1 auftritt. Es stellt sich die Frage, ob eine Hypomethylierung von LINE-1 in Glioblastomen eine Tumorgenese begünstigt oder verursacht, oder ob sie mit dieser einhergeht.

5.2.2 Expression und Kopienzahlvariation von LINE-1

5.2.2.1 Hat ein geringerer Methylierungsgrad von L1 eine Auswirkung auf die Expression von LINE-1 RNA oder auf die Kopienzahl von LINE-1 als Anhalt auf die Aktivität der Retrotransposition?

Diese Untersuchung ergab eine signifikante, ca. 5-fache Erhöhung der Expression von LINE-1 RNS in GBM Gewebe verglichen mit gesundem Hirngewebe. Dies bestätigt die Hypothese, dass eine Demethylierung des LINE-1 Promotors eine Voraussetzung für die Transkription dieses DNS-Abschnittes ist. Die Transkription von LINE-1 DNS ist wiederum die Voraussetzung für die TPRT und somit für die eigentliche Retrotransposition. Eine erhöhte Expression erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Retrotransposition und so die genomische Instabilität und die Wahrscheinlichkeit einer tumorinitiierenden Mutation. Für eine erhöhte LINE-1 Ret-

rotranspositionsaktivität spricht auch die erhöhte Kopienzahl von LINE-1. Die relative Quantifizierung von LINE-1 Sequenzen im GBM Gewebe verglichen mit Kontrollgewebe ergab eine Verdopplung der LINE-1 Kopien in GBM Gewebe.

Eine genaue Identifizierung von retrotranspositions betroffenen Genen und ihre Auswirkung auf eine potenzielle Krankheitsentwicklung oder -progression ist das Ziel zahlreicher aktueller Studien. Helman et al. untersuchten 2014 Gewebe unterschiedlichster maligner Differenzierung auf LINE-1 Repositionen. GBM Gewebe zeigte hier wenige bis keine Repositionsaktivität verglichen mit epithelialen Tumoren. Hierbei waren außerdem interindividuelle Differenzen in der Anzahl der LINE-1 Insertionen auffällig.[98]

Eine ähnliche Studie führte Lee et al. 2015 durch. Sie stellten eine verstärkte DNS Transduktion durch LINE-1 in malignen Tumorgeweben fest. Obwohl im neuronalen Gewebe eine verstärkte Retrotranspositionsaktivität im Vergleich zu anderen somatischen Geweben nachgewiesen werden konnte und in dieser Studie eine weitere Hypomethylierung und verstärkte Expression von LINE-1 festgestellt werden konnte, gibt es bis jetzt keinen Nachweis einer durch LINE-1 initiierten Mutation, welche die Tumorgenese im Hirngewebe auslöst oder beeinflusst.

2016 konnten Carreira et al. hingegen ein endonukleaseunabhängige LINE-1 Insertion, zwei LINE-1 assoziierte Re-arrangements und eine LINE-1 abhängige Alu-Alu Rekombination in GBM-Gewebe identifizieren. Zwei dieser Mutationen traten im MeCP2 Gen und EGFR Gen auf. Der Einfluss der LINE-1 abhängigen ALU-ALU Rekombination auf das MeCP2 Gen verursachte eine Minderexpression der mRNA dieses Gens und somit eine Hypomethylierung des betroffenen GBM Genoms. Eine weitere LINE-1 Mutation trat bei einem Patienten im ersten Intron des EGFR Gens auf, einem Onkogen, welches in GBM verstärkt exprimiert wird und so zu einer erhöhten Zellproliferation führt. Obwohl beide Mutationen keine TPRT-abhängigen LINE-1 Insertionen darstellten, sind sie jedoch die ersten nachgewiesenen und PCR-validierte Mutationen in Onkogenen im Glioblastomgewebe.[99]

Das Ziel weiterer Studien sollte die Differenzierung des zeitlichen Ablaufs der LINE-1 Aktivität in Hirntumorgewebe sein und auch die Auswirkung von Radio- und Chemotherapie auf die LINE-1 Aktivität. Außerdem sind genauere Untersuchungen bezüglich der verschiedenen Differenzierungen in der Gruppe der Gliome wichtig, um so die spezifischen Merkmale ihrer Genese, der epigenetischen Zusammenhänge und deren Auswirkungen auf das Genom bestimmen zu können.

5.2.3 Zusammenhang von Line-1 Methylierungsgrad mit anderen molekularen Markern

5.2.3.1 Gibt es einen Anhalt auf Zusammenhänge des Methylierungsgrades von LINE-1 im Glioblastomgewebe und anderen schon bekannten molekularen Markern dieses Hirntumors?

In dieser Studie wurde ein Vergleich des LINE-1 Methylierungs-, Expressions- und CNV-Status von GBM Gewebe und dem Status dreier bekannter, gesicherter und klinisch relevanter molekularer Marker für Hirntumorgewebe angestellt. Ohka et al. führten 2011 bereits eine ähnliche Studie durch und verglichen den Methylierungsgrad von LINE-1 in GBM Gewebe sowie im Gewebe von niedriggradigen Gliomen mit dem in gesundem Gewebe. Außerdem verglichen sie die quantitative

Methylierung der einzelnen Gewebe mit dem Methylierungsstatus des MGMT Promotors sowie mit dem Mutationstatus von IDH1/2 in den Geweben. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen positiven IDH1/2 Mutationen und methyliertem MGMT Promotor fest. In GBM Geweben zeigten sich diese zwei Eigenschaften vor allem in sekundären GBMs, welche ein LGG ähnliches, hypermethyliertes Profil aufzeigten. Sie kamen zu dem Schluss, dass der Methylierungsgrad von LINE-1 direkt mit dem Methylierungsgrad des MGMT Promotors korreliert im Vergleich von Gliomgewebe mit gesundem Gewebe.[93]

Im Gegensatz zu Ohka et al. konzentrierte sich diese Studie auf den Vergleich zwischen Glioblastom- und gesundem Hirngewebe. Wir verdoppelten außerdem die Fallzahl der untersuchten Fälle. Wie bei Ohka et al. stellte ich im Vergleich von GBM und gesundem Gewebe keinen signifikanten Zusammenhang zwischen MGMT-Promotor Methylierung und LINE-1 Methylierung fest. Auch Ohka et al. konnten im Vergleich von GBM mit Kontrollen keine signifikante Korrelation bezüglich des MGMT Promotor Methylierungsgrades und des LINE-1 Methylierungsgrades aufzeigen. Daraus lässt sich schließen dass beide Marker unabhängig voneinander der Demethylierung im Genom von GBM Gewebe unterlagen. Der LINE-1 Methylierungsstatus ist hierbei jedoch isoliert für GBM Proben primärer und sekundärer Genese und getrennt von LGG zu betrachten. Außerdem konnte ich keine signifikanten Ergebnisse in Bezug auf eine Korrelation mit IDH1/2 Mutationenstatus oder 1p/19q Deletion und einer Hypomethylierung von LINE-1 in GBM feststellen. Da IDH 1/2 mutierte Tumore zumeist einen G-CIMP aufweisen wäre eine Hypermethylierung von LINE-1 in diesen GBM Tumoren zu erwarten gewesen. Interessanterweise konnten Ohka et al. hier ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge feststellen. Bei der Beobachtung von 3 LGG während der Transformation zu GBM beobachteten sie sogar einen Anstieg der globalen Methylierung, jedoch einen Abfall des LINE-1 Methylierungsgrades.[93]

Auch bei der Betrachtung des LINE-1 Methylierungsgrades abhängig von dem Vorliegen eines LOH 1p/19q lag keine signifikante Korrelation vor. Dies ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass der LINE-1 Methylierungsgrad als isolierter Marker für GBM primärer sowie auch sekundärer Genese zu werten ist.

6 Ausblick

Der MGMT Promotor Methylierungsstatus ist ein prädiktiver Faktor hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie mit Temozolamid. Ein weiteres Ziel zukünftiger Untersuchungen wäre es herauszufinden, ob auch LINE-1 prognostischen oder prädiktiven Wert für glioblastomerkranke Patienten hat. Auch sollte man weitere Studien zu der unterschiedlichen Genese von primären und sekundären Glioblastomen anstellen, um so ihre genetischen und epigenetischen Merkmale weiter zu differenzieren. Weiterhin wäre es insbesondere hinsichtlich der begrenzten Therapieoptionen für das Glioblastom von großer Wichtigkeit neue Ansatzpunkte für Therapeutika zu entwickeln. Hier könnte die Aktivierung von LINE-1 durch Hypomethylierung einen Ansatzpunkt darstellen. In Prostatakarzinomgewebe und Melanomgewebe konnte eine Hemmung der Reversen Transkription (RT) durch die RT Inhibitoren Efavirenz und Nevirapin und eine Downregulierung der Expression von LINE-1 durch RNS Interferenz(RNAi) erreicht werden. Dies resultierte in einer Reduktion der Zellproliferation, induzierte Zelldifferenzierung und veränderte die Genexpression.[100] Außerdem konnte bereits gezeigt werden das MicroRNS, insbesondere MicroRNA-128(miR-128) sich an der RNS des ORF1 von LINE-1 binden kann und es so inhibiert. Außerdem hemmt es den Nuclear Import Factor Transportin 1 (TNPO1) und hemmt so den Transport des RNS-Proteinkomplexes von LINE-1 in den Nukleus.[101, 102] MiR-128 hemmt ebenso die Zellproliferation in Hirngewebe durch Hemmung von E2F3a, einem Transkriptionsfaktor. Es konnte gezeigt werden das in Gliomzellen miR-128 erniedrigt ist.[103] Jedoch ist auch das Gegenteil möglich. Guler et al. konnten 2017 zeigen, dass in Zellreihen von Non-small-cell Lung Cancer(NSCLC) eine Hypermethylierung der Histone H3 Lysine 9 und H3 Lysin zu Heterochromatinbildung insbesondere über den genetischen Abschnitt von LINE-1 führt und so die Transkription von LINE-1 hemmt. Hierdurch sind die betroffenen Zellen besonders resistent gegenüber dem EGFR Kinase Inhibitor Erlotinib. Sie konnten außerdem zeigen, dass die Zellen therapiesensibel reagierten nachdem das Heterochromatin aufgelöst wurde und die LINE-1 Gensequenz freigelegt wurde.[104] Dies suggeriert, dass auch das Genom von Krebszellen durch LINE-1 Aktivität destabilisiert werden kann. Insgesamt ist die Rolle und genaue Interaktion von LINE 1 Hypomethylierung, Aktivierung von Retrotransposition und Auswirkung in verschiedenen Geweben noch unklar. Jedoch könnten therapeutische Ansätze den „copy-und paste“ Mechanismus zu unterdrücken oder sogar in malignen Zellen zu fördern, um so Instabilität zu erzeugen einen möglichen Durchbruch in der Glioblastomtherapie bedeuten.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-mC	5-Methylcytosin
5-caC	5-Carboxylcytosin
5-fC	5-Fluorocytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Adenomatous-poliposis-coli-Protein
AVAglio	The Avastin in Glioblastoma Study
BER	Base-excision-repair
BLIMP	B-lymphocyte induces maturation protein 1
Bp	Basenpaare
Bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
CDKN2A	Cyclin dependant kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin dependent kinase Inhibitor 2B
cDNS	copy DNS
CIMP	CpG Island methylator Phenotype
CNV	Copy-Number Variation
CpG	Cytosin prior Guanin
CT	Cycle Threshold
D-2HG	D-2 Hydroxyglutarat
d.h.	das heißt
DNMT	DNS Methyltransferase
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EvG	Elastica von Gieson
ExE	Extraembryonales Ektoderm
FET-PET	¹⁸ F-Fluorethyltyrosin-Positronenemissionstomographie
FF	Fresh frozen
FFPE	Formalin Fixed Paraffin embedded
G-CIMP	Glioma CpG island methylator phenotype
GBM	Glioblastom
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
SSGSEA	Single Sample Gene Set Enrichment Analysis
HAT	Histon-acetyl-Transferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERV	Humanes endogens Retrovirus
hMOF	Human orthologue of the Drosophila melanogaster males absent on the first gene
HMT	Histon-methyl-Transferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
ICM	Inner cell mass
IDH	Isozitatdehydrogenase
IPO 8	Importin 8
K27	Histonprotein H3K27me3
Ki67	Kiel 67 Protein
L1	Long interspersed nuclear Element 1
LINE-1	Long interspersed nuclear Element 1
LGG	Low grade glioma

LK	Leerkontrolle
LMU	Ludwig-Maximilians Universität
LOH	Loss of Heterozygosity
LTR	Long terminal repeats
MAP2	Microtubuli assoziiertes Protein 2
MBP	Methyl binding Protein
MeCp2	Methyl-CpG(Cytosin-Guanin) -bindendes Protein 2
miR-128	Micro-RNS-128
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MLH1	MutL-homologes Gen 1
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
N/A	Not available/ not applicable
NF1	Neurofibromatosis 1
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung-Cancer
NTC	Non-template control
ORF	Open reading frame
PAS	Periodic-acid-Schiff
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor A
PDRM1 /PDRM 14	PR domain zinc finger protein 1/ PR domain zinc finger protein 14
PGC	Primordial germ cell
PPi	Anorganisches Pyrophosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin homologue
RAS	Rat sarcoma proto-Onkogen
RASSF1a	Ras association domain family 1 isoform A
RNAi	Interferenz RNS
RNP	Ribonukleoprotein
RNS	Ribonucleinsäure
RTK I, II	Receptor tyrosine Kinase I, II
RTOG-0825	Radiation therapy oncology group-0825 (klinische Studie)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SATA	Spatial average, temporal average Gene
SINE	Short.interspersed-nuclear-element
STR	Short tandem repeats
SVA	Sine-VNTR-Alu Element
TBP	TATA-Box binding Protein
TCGA	The cancer genome Atlas
TDG	Thymin DNS Glycosylase
TE	Trophectoderm; transponierbare Elemente
TET	Ten-eleven-translocation Enzyme
TMZ/RT	Temazolamid/Radiatio
TNPO1	Nuclear Importin Factor Transportin 1
TP53	Tumorsupressorgen P53
TPRT	Target-primed-reverse-transcriptase
TSD	Target site duplication
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolette Strahlen
VE	Viszerales Endoderm
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health Organization
WT	Wildtyp
α-KG	α-Getoglutarat

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Klose und Bird (2008)
Abbildung 2	Wu und Zhang (2010)
Abbildung 3	Kohli und Zhang (2013)
Abbildung 4	unlockinglifescode.org/media/details/420 (16.02.2020)
Abbildung 5	Jones und Baylin (2002)
Abbildung 6	Bodak et al. (2014)
Abbildung 7	Kazazian (2009)
Abbildung 8	Ohgaki et al. (2004)
Abbildung 9	Verhaak et al. (2010)
Abbildung 10	Sturm et al. (2012)
Abbildung 11	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 12	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 13	docplayer.net/55060859-Nostic-pyrosequencing-a-service-provided-by-varionostic-strenghts-and-applications-bioanalytical-services-the-strengths-of-pyrosequencing.html (12.02.2020)
Abbildung 14	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 15	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 16	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 17	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 18a-c	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 19a-c	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 20a-c	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
Abbildung 21	Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger

- Abbildung 22a-c Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
- Abbildung 23 Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger
- Abbildung 24a-c Zentrum für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Zwerger

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Primersequenzen für LINE-1
Tabelle 2	Primersequenzen für die realtime PCR
Tabelle 3	Primersequenzen für die q-PCR
Tabelle 4	GBM vs Kontrollen Vergleich quantitativer Methylierung
Tabelle 5	Eigenschaften der Kontrollfälle
Tabelle 6	Eigenschaften der GBM Fälle

7.4 Materialverzeichnis

Verbrauchsmaterial

Skalpellklingen	Hartenstein
Objektträger Superfrost	Roth
Deckgläser	Roth
Filterspritzen 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l	ART
Filterspritzen 10 μ l	Peqlab
Eppendorf Reaktionsgefäße: 1,5ml, 2ml	Eppendorf
PCR-Stripes 0,2ml	Hartenstein
qPCR Adhesive Seal	4titude
FrameStar. 480/96 for Roche LC 480	4titude

Reagenzien

Hämatoxilin	Ventana
Eosin	Ventana
Nuclease-free water	Qiagen
SensiFAST™ SYBR® No- ROX	Bioline
SYBR Gold	Thermo Fisher Scientific
99,9% Ethanol	Merck
Gel Loading Buffer	Merck
Agarose	Sigma
Xylol	Serva
Isopropanol	Merck
GelPilot 50 bp Ladder plus TAE Puffer:	Qiagen
Essigsäure Merk	Merk
Trizma. Base	Sigma
NaEDTA	Sigma
Pyromark Q24 CpG LINE-1 Primer	Qiagen
Pyromark gold Q24	Qiagen
Pyromark Q24 CpG LINE 1 assay	Qiagen
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen

Kits

RNeasy Kit	Qiagen
EpiTect. Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen
Superscript Vilo cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen
SensiFAST™ SYBR. No-ROX Kit	Bioline
SuperScript.VILO™ Master Mix Kit	Fisher Scientific

Geräte

Mikrotom SM 2000R	Leica
Einbettautomat Hypercenter XP	Shandon
Zentrifugen:	
5804 R	Eppendorf
5414 R	Eppendorf
Pipetten:	
0,5-10µl Research Plus	Eppendorf
10-100µl Research Plus	Eppendorf
20-200µl Research Plus	Eppendorf
100-1000µl Research Plus	Eppendorf
Thermocycler: Mastercycler gradient	Eppendorf
LightCycler: Lightcycler 480 II System	Roche
Vortexer: Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.
Sequencer: Pyromark Q24	Qiagen
3-UV Transilluminator	Fisher Scientific
Spektrometer: NanoDrop™ ND 1000	Thermo Scientific

7.5 Internetquellen

<https://unlockinglifescode.org/media/details/420> (12.02.2020)

docplayer.net/55060859-Nostic-pyrosequencing-a-service-provided-by-varionostic-strenghts-and-applications-bioanalytical-services-the-strengths-of-pyrosequencing.html (12.02.2020)

8 Literaturverzeichnis

1. Cavalli, G. and E. Heard, *Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease*. Nature, 2019. **571**(7766): p. 489-499.
2. Sasaki, H. and Y. Matsui, *Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 129-40.
3. Wu, S.C. and Y. Zhang, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 607-20.
4. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
5. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
6. Walsh, C.P., J.R. Chaillet, and T.H. Bestor, *Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 116-7.
7. Heard, E., P. Clerc, and P. Avner, *X-chromosome inactivation in mammals*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 571-610.
8. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
9. Laird, P.W. and R. Jaenisch, *The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics*. Annu Rev Genet, 1996. **30**: p. 441-64.
10. Weber, M. and D. Schubeler, *Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(3): p. 273-80.
11. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
12. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, *DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function*. Chromosoma, 2009. **118**(5): p. 549-65.
13. Laurent, L., et al., *Dynamic changes in the human methylome during differentiation*. Genome Res, 2010. **20**(3): p. 320-31.
14. Gelfman, S., et al., *DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure*. Genome Res, 2013. **23**(5): p. 789-99.
15. Wu, H. and Y. Zhang, *Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions*. Cell, 2014. **156**(0): p. 45-68.
16. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 472-9.
17. Wu, X. and Y. Zhang, *TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(9): p. 517-534.
18. Farooq, Z., et al., *The many faces of histone H3K79 methylation*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2016. **768**: p. 46-52.
19. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
20. Bártová, E., et al., *Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review*. J Histochem Cytochem, 2008. **56**(8): p. 711-21.
21. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 838-49.
22. Rideout, W.M., 3rd, et al., *5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human*

- LDL receptor and p53 genes*. Science, 1990. **249**(4974): p. 1288-90.
23. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
 24. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
 25. Ehrlich, M., *DNA hypomethylation in cancer cells*. Epigenomics, 2009. **1**(2): p. 239-59.
 26. Costello, J.F. and C. Plass, *Methylation matters*. J Med Genet, 2001. **38**(5): p. 285-303.
 27. Fullgrabe, J., E. Kavanagh, and B. Joseph, *Histone onco-modifications*. Oncogene, 2011. **30**(31): p. 3391-403.
 28. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
 29. Taipale, M., et al., *hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6798-810.
 30. Pfister, S., et al., *The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma*. Int J Cancer, 2008. **122**(6): p. 1207-13.
 31. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
 32. Mc, C.B., *The origin and behavior of mutable loci in maize*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1950. **36**(6): p. 344-55.
 33. Hedges, D.J. and V.P. Belancio, *Restless Genomes: Humans as a Model Organism for Understanding Host-Retrotransposable Element Dynamics*. Adv Genet, 2011. **73**: p. 219-62.
 34. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
 35. Belancio, V.P., *All y'all need to know 'bout retroelements in cancer*. 2010. **20**(4): p. 200-10.
 36. Schulz, W.A., *L1 retrotransposons in human cancers*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(1): p. 83672.
 37. Xing, J., et al., *Mobile elements create structural variation: Analysis of a complete human genome*. Genome Res, 2009. **19**(9): p. 1516-26.
 38. Cordaux, R. and M.A. Batzer, *The impact of retrotransposons on human genome evolution*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 691-703.
 39. Babushok, D.V. and H.H. Kazazian, *Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1*. Human Mutation, 2007. **28**(6): p. 527-539.
 40. Ardeljan, D., et al., *The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia*. Clin Chem, 2017. **63**(4): p. 816-822.
 41. Gasior, S.L., et al., *The Human LINE-1 Retrotransposon Creates DNA Double-strand Breaks*. J Mol Biol, 2006. **357**(5): p. 1383-93.
 42. Kazazian, H.H., Jr. and J.L. Goodier, *LINE drive. retrotransposition and genome instability*. Cell, 2002. **110**(3): p. 277-80.
 43. Kazazian, H.H., Jr., *Mobile elements: drivers of genome evolution*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1626-32.
 44. Kazazian, H.H., Jr., et al., *Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man*. Nature, 1988.

- 332**(6160): p. 164-6.
45. Kemp, J.R. and M.S. Longworth, *Crossing the LINE Toward Genomic Instability: LINE-1 Retrotransposition in Cancer*. Front Chem, 2015. **3**.
 46. Piskareva, O., et al., *The human L1 element: a potential biomarker in cancer prognosis, current status and future directions*. Curr Mol Med, 2011. **11**(4): p. 286-303.
 47. Phokaew, C., et al., *LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(17): p. 5704-12.
 48. Estécio, M.R.H., et al., *LINE-1 Hypomethylation in Cancer Is Highly Variable and Inversely Correlated with Microsatellite Instability*. PLoS One, 2007. **2**(5).
 49. Suter, C.M., D.I. Martin, and R.L. Ward, *Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue*. International Journal of Colorectal Disease, 2004. **19**(2): p. 95-101.
 50. Ye, D., et al., *The role of LINE-1 methylation in predicting survival among colorectal cancer patients: a meta-analysis*. Int J Clin Oncol, 2017.
 51. van Hoesel, A.Q., et al., *Hypomethylation of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: a retrospective cohort study*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **134**(3): p. 1103-14.
 52. Pattamadilok, J., et al., *LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(4): p. 711-7.
 53. Scott, E.C., et al., *A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer*. Genome Res, 2016. **26**(6): p. 745-55.
 54. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009*. Neuro Oncol, 2012. **14**(Suppl 5): p. v1-v49.
 55. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
 56. Nakada, M., et al., *Aberrant Signaling Pathways in Glioma*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3242-78.
 57. Urbanska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview*. Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
 58. Walid, M.S., *Prognostic Factors for Long-Term Survival after Glioblastoma*. Perm J, 2008. **12**(4): p. 45-8.
 59. Bondy, M.L., et al., *Brain Tumor Epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium (BTEC)*. Cancer, 2008. **113**(7 Suppl): p. 1953-68.
 60. Salvati, M., et al., *Radiation-induced gliomas*. Surgical Neurology, 2003. **60**(1): p. 60-67.
 61. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathologica, 2005. **109**(1): p. 93-108.
 62. Hanif, F., et al., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(1): p. 3-9.
 63. Stummer, W., et al., *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias*. Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-76; discussion 564-76.

64. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(5): p. 392-401.
65. Malmström, A., et al., *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. *The Lancet Oncology*, 2012. **13**(9): p. 916-926.
66. Chinot, O.L., et al., *AVAGlio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme*. *Adv Ther*, 2011. **28**(4): p. 334-40.
67. Weller, M. and W.K.A. Yung, *Angiogenesis inhibition for glioblastoma at the edge: beyond AVAGlio and RTOG 0825*. *Neuro Oncol*, 2013. **15**(8): p. 971.
68. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
69. Dahia, P.L., *PTEN, a unique tumor suppressor gene*. *Endocrine-Related Cancer*, 2000. **7**(2): p. 115-29.
70. Zupanska, A. and B. Kaminska, *The diversity of p53 mutations among human brain tumors and their functional consequences*. *Neurochem Int*, 2002. **40**(7): p. 637-45.
71. Verhaak, R.G.W., et al., *An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 98.
72. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(19): p. 1350-1354.
73. Hegi, M.E., et al., *MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
74. Weller, M., et al., *Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon*. *The Lancet Oncology*, 2013. **14**(9): p. e370-e379.
75. Ichimura, K., *Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas*. *Brain Tumor Pathol*, 2012. **29**(3): p. 131-9.
76. Noushmehr, H., et al., *Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 510-22.
77. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
78. Chalitchagorn, K., et al., *Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(54): p. 8841-6.
79. Roman-Gomez, J., et al., *Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia*. *Oncogene*, 2005. **24**(48): p. 7213-23.
80. Feiden, S. and W. Feiden, *[WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing and grading of common-type diffuse gliomas]*. *Pathologie*, 2008. **29**(6): p. 411-21.
81. Kraus, T.F.J., et al., *Genetic Characterization of Ten-Eleven-Translocation Methylcytosine Dioxygenase Alterations in Human Glioma*. *J Cancer*, 2015. **6**(9): p. 832-42.
82. Thon, N., et al., *Predominant influence of MGMT methylation in non-resectable*

- glioblastoma after radiotherapy plus temozolomide.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011. **82**(4): p. 441-6.
83. Thon, N., et al., *Novel molecular stereotactic biopsy procedures reveal intratumoral homogeneity of loss of heterozygosity of 1p/19q and TP53 mutations in World Health Organization grade II gliomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(11): p. 1219-28.
 84. Ronaghi, M., *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.* Genome Res, 2001. **11**(1): p. 3-11.
 85. Guenin, S., et al., *Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references.* J Exp Bot, 2009. **60**(2): p. 487-93.
 86. Coufal, N.G., et al., *L1 retrotransposition in human neural progenitor cells.* Nature, 2009. **460**(7259): p. 1127-31.
 87. Abdel Nour, A.M., et al., *Five years MIQE guidelines: the case of the Arabian countries.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88266.
 88. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.* Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
 89. Kreth, S., et al., *Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma.* Neuro Oncol, 2010. **12**(6): p. 570-9.
 90. Mizoguchi, M., et al., *Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion.* Brain Tumor Pathology, 2012. **29**(3): p. 148-153.
 91. Kokkat, T.J., et al., *Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein.* Biopreserv Biobank, 2013. **11**(2): p. 101-6.
 92. Hedegaard, J., et al., *Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98187.
 93. Ohka, F., *The Global DNA Methylation Surrogate LINE-1 Methylation Is Correlated with MGMT Promoter Methylation and Is a Better Prognostic Factor for Glioma.* 2011. **6**(8).
 94. Miki, Y., et al., *Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer.* Cancer Res, 1992. **52**(3): p. 643-5.
 95. Shukla, R., et al., *Endogenous Retrotransposition Activates Oncogenic Pathways in Hepatocellular Carcinoma.* Cell, 2013. **153**(1): p. 101-11.
 96. Lee, E., et al., *Landscape of Somatic Retrotransposition in Human Cancers.* Science, 2012. **337**(6097): p. 967-71.
 97. Laffaire, J., et al., *Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis.* Neuro Oncol, 2011. **13**(1): p. 84-98.
 98. Helman, E., et al., *Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing.* Genome Res, 2014. **24**(7): p. 1053-63.
 99. Carreira, P.E., et al., *Evidence for L1-associated DNA rearrangements and negligible L1 retrotransposition in glioblastoma multiforme.* Mob DNA, 2016. **7**.
 100. Sciamanna, I., et al., *Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth.* Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3923-31.
 101. Idica, A., et al., *MicroRNA miR-128 represses LINE-1 (L1) retrotransposition by down-regulating the nuclear import factor TNPO1.* J Biol Chem, 2017. **292**(50): p. 20494-

20508.

102. Hamdorf, M., et al., *miR-128 represses L1 retrotransposition by binding directly to L1 RNA*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(10): p. 824-31.
103. Zhang, Y., et al., *MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(1): p. 43-51.
104. Guler, G.D., et al., *Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure*. Cancer Cell, 2017. **32**(2): p. 221-237.e13.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Zu allererst möchte ich der Georg und Traud Gravenhorst Stiftung und dem German Cancer Konsortium (DKTK) für die Förderung dieses Projektes danken. Außerdem möchte ich mich bei meinen Betreuern und wissenschaftlichen Mentoren Herrn P.D. Dr. med. T. Kraus und Herrn Prof. Dr. med. A. Giese für die hervorragende fachliche Betreuung bei der Erstellung meiner Dissertation und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Ihre konstruktiven Diskussionen und positiven Verbesserungsvorschläge halfen mir während des gesamten Erstellungsprozesses.

Für große Unterstützung in der praktischen Umsetzung während der Arbeit im Labor danke ich zudem vielmals Virginie Guibourt und Janina Mielke.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern Gabriele und Josef Zwerger, bedanken. Sie haben mich während meines Studiums immer in allen Belangen unterstützt und motiviert.

9.2 Eidesstattliche Versicherung

Zwerger, Kerrin Sylvie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

*„Aktivierung von LINE-1 Retrotransposons durch Hypomethylierung in humanem
Glioblastomgewebe“*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleiche oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, den 29.04.2021

Kerrin Sylvie Zwerger, Verfasserin