

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Oertel

**Die intra-tumorale Heterogenität
spezifischer Gen-Promotor-Methylierungen
im Glioblastoma multiforme**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von:

Vanessa Justine Trenkpohl

geb. am: 23.07.1993 in Warendorf

Tag der Promotion: 11. November 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Oertel

PD Dr. med. Umut Yilmaz

Inhaltsverzeichnis

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
III TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
IV ZUSAMMENFASSUNG	VII
V ABSTRACT	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Epidemiologie und Prognose	1
1.1.2 Ätiopathogenese und Einteilung	1
1.1.3 Klinik und Diagnostik	1
1.1.4 Therapie	4
1.1.4.1 Chirurgische Tumoresektion	4
1.1.4.2 Chemotherapie und Radiatio sowie weitere adjuvante Therapien	4
1.1.5 Supportive Therapie	6
1.1.6 Prognostische Faktoren	6
1.1.7 Molekularbiologie	6
1.2 Epigenetik	7
1.2.1 DNA-Methylierung	7
1.2.2 MGMT	8
1.2.3 p16	8
1.2.4 p15	9
1.2.5 Heterogenität im Glioblastoma multiforme	9
1.3 Eigene Fragestellung	11
2 MATERIAL UND METHODIK.....	12
2.1 Patientenkollektiv	12
2.1.1 Studiendesign	12
2.1.2 Probengewinnung	18
2.1.3 Probenanalyse	19
2.2 Methylierungsanalysen.....	19
2.2.1 DNA-Isolation	19
2.2.2 Theorie zur Bisulfitkonversion und methylierungsspezifischen-PCR.....	21
2.2.3 Praktische Durchführung der Bisulfitkonversion	24
2.2.4 Praktische Durchführung der Methylierungsspezifischen-PCR	25
2.2.5 Gel-Elektrophorese und UV-Blotting	27
2.3 Statistische Methodik.....	29

3. ERGEBNISSE	30
3.1 Patientenkollektiv	30
3.2 Methylierungsanalysen	33
3.2.1 <i>MGMT</i>	33
3.2.2 <i>p15</i>	35
3.2.3 <i>p16</i>	37
3.3 Überlebensanalysen in Abhängigkeit der Heterogenität des Methylierungsstatus	40
3.3.1 <i>MGMT</i>	40
3.3.2 <i>p15</i>	42
3.3.3 <i>p16</i>	44
4. DISKUSSION	47
4.1 Diskussion der Methodik	47
4.1.1 Patientenkollektiv	47
4.1.2 MS-PCR	48
4.2 Diskussion der Ergebnisse	50
4.3 Ausblick	55
5. LITERATUR	56
6. PUBLIKATIONEN	64
7. DANKSAGUNG	65
8. LEBENSLAUF	66

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-HG	2-Hydroxyglutarat
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CDK	<i>cyclin-dependent kinases</i> (Cyclin-abhängige Kinasen)
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Mehtyltransferase
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphat)
E2F	<i>E2 transcription factor</i> (E2 Transkriptionsfaktor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GBM	Glioblastoma multiforme
GTR	<i>gross total resection</i> (gesamte Resektion)
IDH	Isozitatdehydrogenase
KM	Kontrastmittel
KPS	Karnofsky-Performance-Score
MGMT	O6-Methylguanine-Methyltransferase
miRNA	microRNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS-PCR	methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
OS	<i>overall survival</i> (Gesamtüberleben)
p15	Protein 15
p16	Protein 16
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFS	<i>progression-free survival</i> (progressionsfreie Überleben)
Ppi	Pyrophosphationen
pRb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SPECT	<i>single photon emission computer tomography</i> (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)
STR	<i>subtotal resection</i> (Subtotale Resektion)

Tab.	Tabelle
TMZ	Temozolomid
TTF	TumortheraPIefelder
UpM	Umdrehungen pro Minute
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 01:** Bildmorphologische Darstellung eines GBM
- Abb. 02:** Stupp Schema adaptiert nach Wang et al
- Abb. 03:** Studienschema modifiziert nach Sippl et al
- Abb. 04:** QIAamp DNA Micro Verfahren zur DNA-Isolation modifiziert nach DNA Mini Handbook Qiagen
- Abb. 05:** Chemische Reaktion der Bisulfit-vermittelten Umwandlung von Cytosin in Uracil modifiziert nach Tollefsbol
- Abb. 06:** Flussdiagramm der Bisulfitkonversion und Methylierungsspezifischen-PCR (MS-PCR)
- Abb. 07:** Vier Bandenmustervarianten der Gel-Elektrophorese
- Abb. 08:** Geschlechterverteilung
- Abb. 09:** Das durchschnittliche Erkrankungsalter der beiden Kollektive
- Abb. 10:** Resektionsausmaß innerhalb des Testkollektivs und Referenzkollektivs
- Abb. 11:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *MGMT* der Testgruppe
- Abb. 12:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *MGMT* der Referenzgruppe
- Abb. 13:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *p15* der Testgruppe
- Abb. 14:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *p15* der Referenzgruppe
- Abb. 15:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *p16* der Testgruppe
- Abb. 16:** Übersicht der Methylierungsanalysen von *p16* der Referenzgruppe
- Abb. 17:** PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *MGMT*
- Abb. 18:** OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *MGMT*
- Abb. 19:** PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p15*
- Abb. 20:** OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p15*
- Abb. 21:** PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p16*
- Abb. 22:** OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p16*

III TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 01: Alle eingeschlossenen Patienten (n=34) der Testgruppe

Tab. 02: Alle eingeschlossenen Patienten (n=120) der Referenzgruppe

Tab. 03: *MGMT*, *p15* und *p16* Primersequenzen für die MS-PCR

Tab. 04: Beispielhafter PCR-Ansatz für den Mastermix

Tab. 05: Spezifische Programmeinstellungen der verwendeten Primer

Tab. 06: Pipettierschema der Gelbelegung

Tab. 07: Ergebnisübersicht der Methylierungsanalysen

Tab. 08: Ergebnisübersicht PFS und OS

IV Zusammenfassung

Die intra-tumorale Heterogenität spezifischer Gen-Promotor-Methylierungen im Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom ist der häufigste und zugleich bösartigste hirneigene Tumor des Erwachsenen. Trotz multimodaler Therapieansätze ist die Prognose schlecht. Wie bereits der Name Glioblastoma multiforme erahnen lässt zeichnet sich der Tumor durch ein, auf vielen Ebenen, unterschiedliches Erscheinungsbild aus. Zunehmend rücken molekulare Tumorcharakteristika in den Fokus der pathologischen Diagnostik. Dies betrifft beim Glioblastom unter anderem auch epigenetische Tumormerkmale. Insbesondere sind hier Methylierungsvorgänge in der Promoter Region von DNA-Reparaturgenen oder Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise *MGMT*, *p15* und *p16* zu nennen, worauf sich auch die vorliegende Arbeit konzentriert. Das DNA-Reparaturgen *MGMT* ist von entscheidender Bedeutung, da sich der therapeutische Ansatz an der Methylierung des Promotors dieses Gens orientiert. Die Tumorsuppressorgene *p15* und *p16* haben einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus und können bei Malfunktion das Tumorwachstum begünstigen. In der klinischen Praxis erfolgt eine entsprechende Charakterisierung üblicherweise aus einer einzelnen Probe, deren Eigenschaften dann auf den gesamten Tumor generalisiert werden. Inwieweit dies der biologischen Realität entspricht oder ob eine intratumorale Heterogenität auf epigenetischer Ebene existiert ist von hohem klinischem Interesse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu beantworten, inwieweit eine intra-tumorale Heterogenität im Hinblick auf die Methylierungsloci *MGMT*, *p15* und *p16* vorliegt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob der Ausprägungsgrad der Heterogenität mit dem Überleben korreliert.

Hierfür wurden insgesamt 154 Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom in die Studie eingeschlossen. Davon dienten 120 Patienten als Referenzkollektiv, hier wurde pro Patienten eine Probe aus dem Tumor entnommen. Weitere 34 Patienten bildeten das Testkollektiv, hier wurden drei Proben aus unterschiedlichen Lokalisationen des Tumors, insgesamt also 102 Tumorproben, gewonnen. Die *MGMT*-, *p15*- und *p16*-Promotor-Methylierungen wurden in allen Tumorproben mittels methylierungsspezifischer PCR gemessen.

Im nächsten Schritt wurde aus dem Referenzkollektiv eine Referenzgruppe gebildet, indem zufällig drei Patienten zu einem Triplet, insgesamt also 40 Triplets, zusammengefasst wurden. Dem standen 34 Triples des Testkollektivs – nun Testgruppe- gegenüber. Dieses Studiendesi

erlaubt einen Vergleich der intra-tumoralen Heterogenität (Testgruppe) mit der inter-tumoralen Heterogenität (Referenzgruppe) als Baseline. Eine Homogenität der Methylierung wurde definiert, wenn alle drei Proben eines Triplets den gleichen Methylierungsstatus aufwiesen, entweder methyliert oder nicht-methyliert. Im Falle einer Abweichung innerhalb eines Triplets wurde eine Heterogenität angenommen.

Zusammenfassend konnte eine Heterogenität aller drei Methylierungsloci in der Testgruppe – also innerhalb eines Tumors – nachgewiesen werden. Das Auftreten einer Heterogenität innerhalb eines Tumors lag für *MGMT*, *p15* und *p16* bei jeweils 52,9%, 35,3% und 44,1%. Eine Heterogenität der *MGMT*-Methylierung war in der Testgruppe (intra-tumoral) signifikant geringer als in der Referenzgruppe (inter-tumoral). Kein signifikanter Unterschied bestand in der Heterogenität der *p15*- und *p16*-Methylierung zwischen der Test- und Referenzgruppe.

Ein signifikanter Einfluss der oben beschriebenen Heterogenität in Hinblick auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben konnte für keinen Methylierungslocus nachgewiesen werden.

Es kann festgehalten werden, dass eine intratumorale Heterogenität in Hinblick auf die Methylierung von *MGMT*, *p15* und *p16* existiert und gegebenenfalls sogar das Ausmaß der inter-tumoralen Heterogenität erreicht. Inwieweit auch ein Einfluss auf das Überleben besteht, kann aufgrund der vorliegenden Fallzahlen nicht abschließend beurteilt werden. Die molekulare epigenetische Charakterisierung anhand einer Probe scheint zumindest beim Glioblastom die biologische Realität nur eingeschränkt wiederzugeben.

V Abstract

Intratumoral Heterogeneity of Specific Gene Promoter Methylations in Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma is the most common and at the same time the most malignant brain tumor in adults. Despite multimodal therapeutic approaches, the prognosis remains poor. As the name Glioblastoma multiforme suggests, the tumor is characterized by a highly variable appearance on many levels. Molecular tumor characteristics are increasingly becoming the focus of pathological diagnostics. This includes epigenetic features of glioblastoma, among which methylation processes in the promoter region of repair genes or tumor suppressor genes such as *MGMT*, *p15*, and *p16* are particularly noteworthy, and are also the focus of this present work. The repair gene *MGMT* is of crucial importance, as the therapeutic approach is guided by its promoter DNA methylation. The tumor suppressor genes *p15* and *p16*, on the other hand, influence cell cycle regulation and can promote tumor growth when their function is disrupted. In clinical practice, such characterization typically comes from a single sample, whose properties are then generalized to the entire tumor. Whether this corresponds to biological reality or whether intra-tumoral heterogeneity also exists at an epigenetic level is of high clinical interest.

Therefore, the aim of this study was to determine the extent of intra-tumoral heterogeneity with respect to methylation loci *MGMT*, *p15*, and *p16*. Furthermore, the aim was to clarify whether the degree of heterogeneity possibly correlates with survival.

For this purpose, a total of 154 patients with newly diagnosed glioblastoma were included in the study. Of these, 120 patients served as a reference cohort; here one sample per patient was taken. An additional 34 patients formed the test cohort; from these patients three samples from different locations within the tumor were taken, resulting in a total of 102 tumor samples. The *MGMT*, *p15*, and *p16* promoter methylations were measured in all tumor samples using methylation-specific PCR.

In the next step, a reference group was formed from the reference cohort by randomly combining three patients into a triplet – resulting in a total of 40 triplets.

This was compared to 34 triplets from the test cohort – now called test group. This study design allows for comparison between intra-tumoral heterogeneity (test group) and inter-tumoral heterogeneity (reference group) as a baseline. Homogeneity in methylation was defined when

all three samples of a triplet showed the same methylation status, either methylated or unmethylated. If there was a deviation within a triplet, heterogeneity was assumed.

In summary, heterogeneity of all three methylation loci could be demonstrated within tumors in the test group. The occurrence of heterogeneity within a tumor for *MGMT*, *p15*, and *p16* was 52.9%, 35.3%, and 44.1%, respectively. Heterogeneity of *MGMT* methylation was significantly lower in the test group (intra-tumoral) than in the reference group (inter-tumoral). There was no significant difference in heterogeneity for *p15* and *p16* methylation between test and reference groups.

A significant influence of the described heterogeneity on progression-free survival or overall survival could not be demonstrated for any methylation locus.

It can be concluded that intra-tumoral heterogeneity regarding methylation of *MGMT*, *p15* and *p16* exists and may even reach the extent of inter-tumoral heterogeneity. Whether there is also an impact on survival cannot be conclusively assessed based on current case numbers. Molecular epigenetic characterization based on a single sample seems to reflect biological reality only to a limited extent in glioblastoma at least.

7 Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme

7.3.3 Epidemiologie und Prognose

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein Tumor, der von neuroepithelialen Gewebe ausgeht und als einer der häufigsten malignen hirneigenen Tumoren des Erwachsenen gilt. Das GBM tritt mit einer jährlichen Häufigkeit von 3,2 Fällen pro 100.000 Einwohnern auf mit einem Altersgipfel zwischen dem 45.-70. Lebensjahr. In seltenen Fällen tritt es auch im Kindesalter auf [15]. Männer entwickeln etwas häufiger ein GBM [55]. Die Prognose des Tumors ist infaust, etwa 81,5% der Patienten sterben innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung. Die Mortalität nach fünf Jahren beträgt 93,2% [77].

1.1.2 Ätiopathogenese und Einteilung

Als potenzielle Risikofaktoren für die Entstehung eines GBM wurden bereits diverse Faktoren diskutiert [41]. Prädisponierende Faktoren sind zum Beispiel (z.B.) eine vorangegangene Bestrahlung des Kopfes, hereditäre Syndrome wie beispielsweise das Li-Fraumeni Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) oder das Lynch Syndrom[23]. Ein Anstieg der Inzidenz im Vereinigten Königreich ist von 1995 bis 2015 zu verzeichnen der nicht allein durch demographische und diagnostische Faktoren erklärbar ist. Dies führt zur Hypothese, dass bestimmte Umwelteinflüsse die Entstehung eines GBM begünstigen könnten. Konkrete Risikofaktoren wurden noch nicht nachgewiesen [21]. Patienten mit allergischen Konditionen wie beispielsweise Asthma, Ekzemen oder auch Lebensmittelallergien weisen eine geringere Inzidenz auf [41].

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Die Symptomatik des Tumors ist abhängig von der Lokalisation. Klinische Verdachtssymptome sind epileptische Krampfanfälle, Funktionsstörungen wie Sprachbeeinträchtigung, Wesensveränderungen und allgemeine Zeichen eines erhöhten Hirndrucks wie z.B. Erbrechen, Übelkeit und Vigilanzminderung [77]. Im Verdachtsfall dient als Mittel der Wahl die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittelgabe. Bei der MRT-Untersuchung

sollten T1, T2, *fluid-attenuated Inversion recovery* (FLAIR)-Sequenzen und kontrastmittelgestützte Aufnahmen angefertigt werden. In T1-Sequenzen stellt sich das GBM hypointens dar. In T2-gewichteten FLAIR-Sequenzen hyperintens. Durch Zugabe des Kontrastmittelverstärker Gadolinium erscheint die typische, inhomogene, randständige Kontrastmittelanreicherung mit girlandenförmiger Konfiguration [1]. Dies geht häufig einher mit einem perifokalen Ödem, welches schwierig von den Tumoranteilen abzugrenzen ist. Zur genaueren diagnostischen Einordnung können weitere MRT-Sequenzen oder die MR-Spektroskopie hinzugezogen werden. Gegenstand aktueller Forschung sind weitere Verfahren wie z.B. die *single photon emission computer tomography* (SPECT) [77]. Die exakte Diagnosestellung basiert nach der Biopsieentnahme auf molekulargenetischen und histopathologischen Untersuchungen. Histopathologische Kriterien umfassen das hochinfiltrative Wachstum, eine ausgeprägte Gefäß- und Bindegewebsproliferation, eine hohe Mitoserate und eine intratumorale Nekrose [48]. Anhand histopathologischer Kriterien kann eine Diagnose gestellt werden, auch wenn nach aktueller WHO-Klassifikation von 2021 eine Diagnostik rein nach molekulargenetischen Kriterien möglich ist [45].

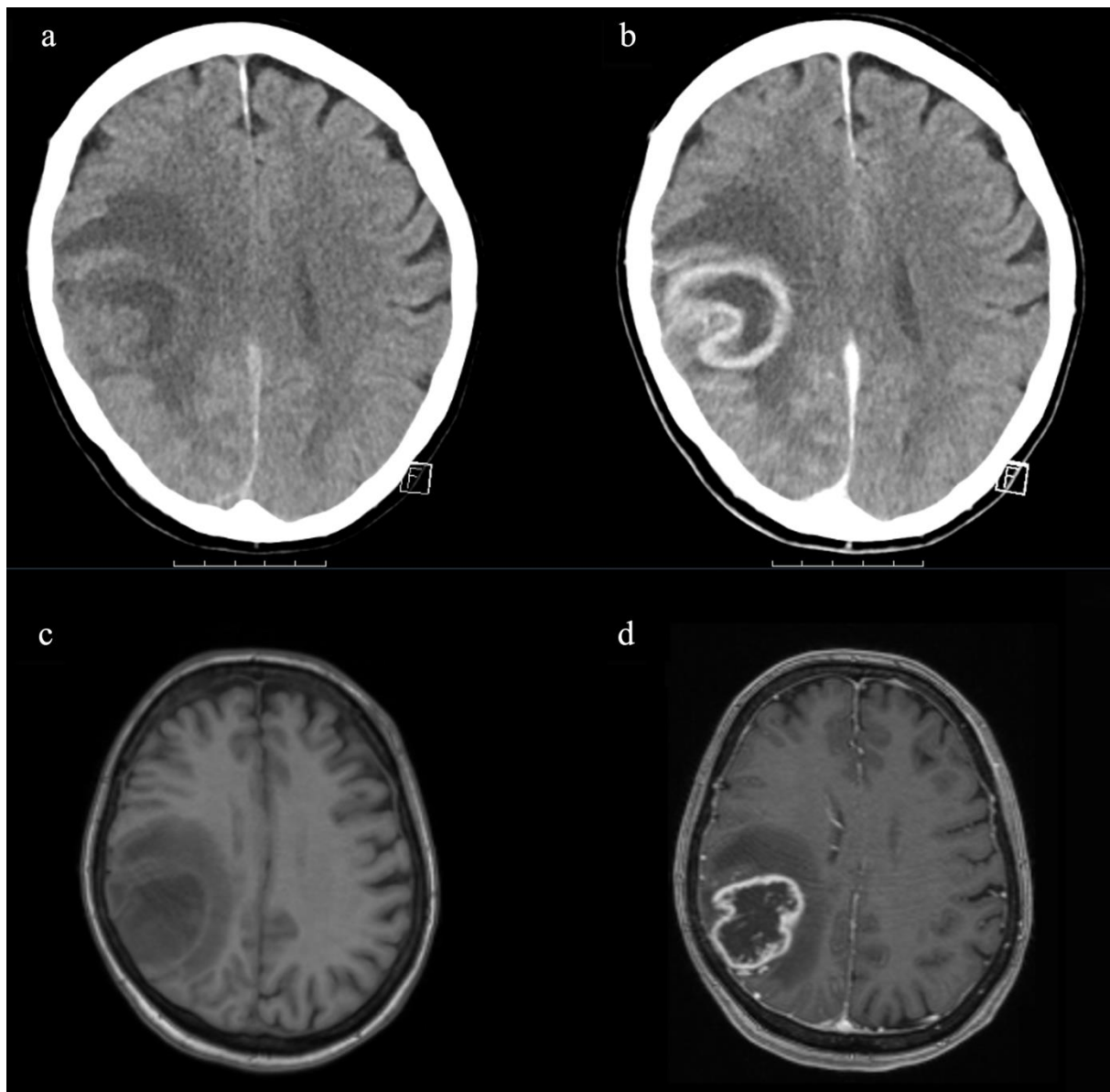


Abb. 1: Bildmorphologische Darstellung eines GBM

- a) Natives, kraniales CT im axialen Schnitt. Im Marklager der rechten Hemisphäre ist eine große heterogene Raumforderung zu sehen.
- b) Das kraniale CT nach Kontrastmittelgabe zeigt in der rechten Hemisphäre eine Anreicherung des Kontrastmittels.
- c) Das native T1-gewichtete kraniale MRT zeigt eine hypointense Signalveränderung.
- d) Nach Gabe von Gadolinium-basiertem Kontrastmittel T1-gewichtete kraniale MRT. Zu sehen ist ein heterogenes irreguläres peripheres Enhancement mit zentraler nicht raumfordernder (*engl. Non mass enhancements – NMC*) Region aus nekrotisierenden Anteilen. Um das Enhancement liegt ein perifokales Ödem vor. In Gesamtschau sind diese Befunde hinweisend für ein GBM.

1.1.4 Therapie

Die Standardtherapie des GBM stellt sich aus einer Kombination einer mikrochirurgischen Tumorresektion, gefolgt von der konkomitanten Radiochemotherapie mit Temozolomid (TMZ) (Stupp-Protokoll nach EORTC 26981/22981) zusammen [66].

1.1.4.1 Chirurgische Tumorresektion

Die zwei primären Ziele der chirurgischen Therapie sind einerseits die Gewinnung eines feingeweblichen Befundes und andererseits eine Zytomassenreduktion. In Studien konnte insbesondere durch Letztgenanntes eine Verbesserung der Symptomlast der Patienten und eine allgemeine Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden [49]. Im Rahmen einer neuroonkologisch chirurgischen Therapie gilt dabei der Grundsatz, dass die postoperative neurologische Situation gegenüber der präoperativen nicht verschlechtert sein darf. Um dies zu erreichen stehen heute verschiedene Techniken zur Verfügung, unter anderem ein elektrophysiologisches Monitoring, eine präoperative Lokalisation eloquenter Areale (Mapping), das Fibertracking, sowie die neuronavigatorisch als auch mittels 5-ALA geführte fluoreszenzgestützte Tumorresektion [25,79]. Dabei muss aber beachtet werden, dass eine „in sano“ Resektion beim GBM aufgrund seines infiltrativen Wachstumsmusters nicht möglich ist. Eine rein chirurgische „Heilung“ des Patienten schließt sich somit aus [82]. Man unterscheidet in Abhängigkeit des Resektionsumfanges eine „*gross total resection*“ (GTR) mit nach makroskopischen Kriterien vollständiger Tumorentfernung von einer „*subtotal resection*“ (STR) mit verbliebenem Tumorrest. Durch die GTR konnte auch im Vergleich zur STR eine Reduktion der Mortalität verzeichnet werden [5].

1.1.4.2 Chemotherapie und Radiatio sowie weitere adjuvante Therapien

Die adjuvante Standardtherapie des GBM besteht aus einer kombinierten Radio-Chemotherapie. Insgesamt wird über einen Zeitraum von 6 Wochen eine Strahlendosis von 54 -60 Gy über 30-33 Sitzungen appliziert. Das Standardtherapeutikum ist TMZ, ein Alkylans. TMZ wird die ersten 6 Wochen kombiniert mit der Radiotherapie verabreicht. Hiernach folgen 6 Zyklen orale adjuvante Therapie für 5 Tage alle 4 Wochen [66]. Die Wirkung von TMZ beruht darauf, dass es zur Alkylierung der Base Guanin führt. Dies führt zur Steigerung der

Zytotoxizität und somit zur gewünschten nachfolgenden Apoptose der Tumorzelle. Insbesondere die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke stellt im Rahmen der Chemotherapie eine therapeutische Herausforderung dar. Patienten unter 70 Jahren werden mit einer Radiochemotherapie aus TMZ und 60 Gy behandelt [66]. Bei Patienten über 70 Jahren sollte TMZ und eine hypofraktionierte Radiotherapie (34 Gy verabreicht in Fraktionen von 3-4 Gy über einen Zeitraum von 2 Wochen) als Standardtherapie in Erwägung gezogen werden [46].

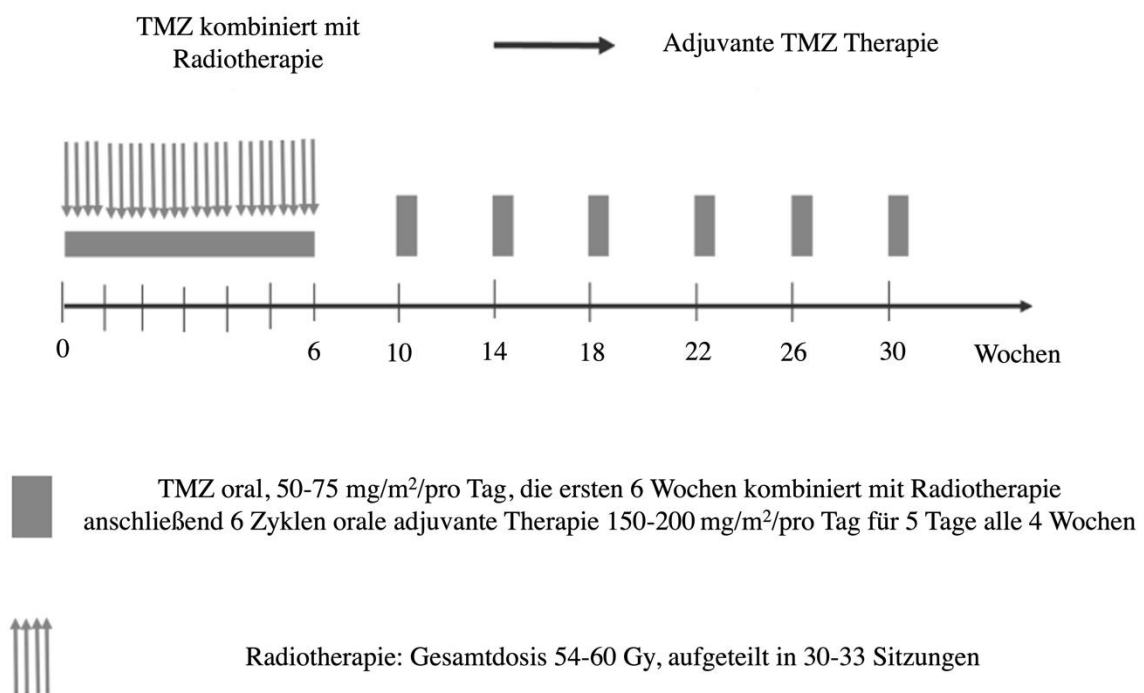


Abb. 2: Stupp Schema adaptiert nach Wang et al [75]

Zusätzliche Therapiemöglichkeiten stellen die nichtinvasiven Tumortheraiefelder (TTFields) dar. Bei dieser Therapie werden dem Patienten Transducer Arrays auf der Kopfhaut befestigt. Diese Transducer erzeugen ein elektrisches Wechselfeld von niedriger Intensität (1-3 V/cm) und intermediärer Frequenz (50-200 kHz) [11]. Der Wirkmechanismus beruht zum einen auf der Unterbindung der Zellproliferation und zum anderen auf der Zerstörung der Zellen während der Teilung[36]. Patienten die zusätzlich zur Standardtherapie mit TTFields behandelt wurden, hatten eine mediane Überlebenszeit von 20,9 Monaten, verglichen mit 16,0 Monaten bei Patienten, welche nur die Standardtherapie erhielten [67]

1.1.5 Supportive Therapie

Die supportive Therapie richtet sich nicht gegen den Tumor selbst, sondern gegen die Symptome, welche durch den Tumor entstehen. Zum anderen soll diese Therapieform die Nebenwirkungen der kombinierten Radiochemotherapie lindern. Durch Gabe von Dexamethason ist es möglich das perifokale Ödem zu verringern und somit zur Senkung des intrakraniellen Drucks beizutragen [32]. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Antikonvulsivum Levetiracetam bei GBM-Patienten, die bereits das Chemotherapeutikum Temozolomid bekamen, möglicherweise einen Überlebensvorteil mit sich bringen könnte [35]. Die meisten Krebspatienten leiden unter psychischen Belastungen und vor allem Depressionen [37]. Viele Tumorpatienten entwickeln mit der Zeit eine Depression, dies ist vor allem häufig bei Patienten mit GBM zu verzeichnen [50]. Eine weitere supportive psychoonkologische Begleittherapie ist empfehlenswert.

1.1.6 Prognostische Faktoren

Um den zu erwartenden individuellen Verlauf abschätzen zu können, dienen prognostische Faktoren. Vor allem das Alter spielt eine entscheidende Rolle, denn mit zunehmendem Alter verschlechtert sich die Prognose des Patienten [9]. Außerdem kann der Karnofsky Performance Score (KPS), welcher sich über den Allgemeinzustand und die Lebensqualität des Patienten definiert, hinzugezogen werden, um die Prognose abschätzen zu können. Ein hoher KPS-Score vor der Radiotherapie korreliert mit einer besseren Prognose [3]. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass die GTR und die Standardtherapie nach Stupp-Protokoll mit einem verlängerten progressionsfreien- und Gesamtüberleben einhergeht [38,42]. Weitere molekulare Marker wie die Isodehydrogenase (IDH), sowie die Tumorlokalisation haben einen prognostischen Wert [17,34].

1.1.7 Molekularbiologie

Circa 90% der GBM-Fälle weisen einen IDH-Wildtyp auf. IDH-Wildtyp Glioblastome weisen, verglichen mit IDH-mutierten Glioblastomen, eine schlechtere Prognose auf [51,54]. Das Enzym IDH ist ein Enzym des Citratzyklus [2]. IDH1 ist lokalisiert im Peroxisom und Zytosol, während IDH2 in den Mitochondrien lokalisiert ist [73]. Bei IDH1 Mutationen akkumuliert 2-Hydroxyglutarat (2-) in den Tumorzellen.

Das 2-HG ist ein kompetitiver Inhibitor von verschiedenen α -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen und ein kompetitiver Inhibitor der Histon Demethylierung [81]. Ihm wird letztlich der anti-onkogene Effekt zugeschrieben [10]. Weitere relevante molekulare Charakteristika des GBM werden weiter unten thematisiert.

1.2 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ wurde erstmals von C.H. Waddington im Jahre 1942 verwendet [13]. Unter Epigenetik versteht man prätranskriptionelle Modifikationen des DNA-Stranges. Dabei kommt es zu keiner Änderung der Basenabfolge, sondern lediglich zur biochemischen Veränderung der DNA. Epigenetische Prozesse sind dynamisch und weisen Potenzial zur Reversibilität auf [43]. Durch diese bemerkenswerten Mechanismen reagiert der Organismus auf veränderte Umwelteinflüsse, ohne langwierige mutative evolutionäre Prozesse abzuwarten. Allen kernhaltigen Körperzellen des Menschen liegen die gleichen Gene zugrunde, jedoch werden zellspezifisch unterschiedliche Gene aktiviert. Die Epigenetik beschäftigt sich damit, welche Gene an- und ausgeschaltet (Gen-Silencing) werden und welche Regulationsmechanismen zugrunde liegen. Die Gesamtheit der epigenetischen Prozesse eines Menschen werden als dessen Epigenom zusammengefasst. Das Epigenom unterliegt gewissen Umwelteinflüssen wie z.B. Stress, Krankheiten, der individuellen Ernährung, zirkadianen Rhythmen und Toxinen. Zu den internen epigenetischen Mechanismen zählen die Methylierung/Demethylierung der DNA-Basen, die Acetylierung/Deacetylierung der Histone sowie sogenannte non-coding Ribonukleinsäure (RNA), die microRNAs (miRNA), welche als epigenetische Informationsträger dienen [84]. Von besonderer Bedeutung scheinen epigenetische Prozesse auch in der Onkogenese zu sein [62].

1.2.1 DNA-Methylierung

Methylierungsvorgänge sind epigenetische Prozesse zum Stilllegen von Genen (Silencing Mechanismus). Bei der Methylierung kommt es durch das Enzym DNA-Methyltransferase (DNMT) zur Bindung einer Methylgruppe (CH_3) auf das fünfte Kohlenstoffatom (C_5 -Atom) der Base Cytosin. Sobald CH_3 an Cytosin gebunden ist, binden sich auch weitere Proteine. Durch die angehefteten Proteine verdichtet sich das Nukleosom. Durch diese Verdichtung ist es für die RNA-Polymerase nicht mehr möglich die

DNA abzulesen, somit kann die Transkription des jeweiligen Gens nicht stattfinden. Es kommt zum Silencing des Gens sowie des von ihm codierten Proteins. Je nach Methylierungsmuster können so bestimmte Gene an- oder abgeschaltet werden. Anzumerken ist, dass im Rahmen dieses Prozesses die Basenpaarung nicht verändert wird. Solche Methylierungsvorgänge sind prinzipiell reversibel. Diese Methylierungsvorgänge erfolgen allerdings nicht ubiquitär auf dem Genom. Sie sind primär in Promotorbereichen von Genen zu finden, insbesondere im Bereich sogenannter CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) – Inseln [12]. CpG-Inseln zeichnet eine erhöhte Dichte von CpG-Dinukleotiden, im Gegensatz zu anderen Bereichen des Genoms aus [20].

1.2.2 MGMT

Das *O*⁶-methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)-Gen, codiert für ein DNA-Reparaturprotein, welches irreguläre Alkylierungen and der O⁶ Position des Guanins entfernt und somit die Funktionstüchtigkeit der DNA wiederherstellt [53]. Das Gen *MGMT* umfasst >170 Kilo-Basenpaare (kbp) und ist auf Chromosomen 10 (10q26) lokalisiert [57,60]. Das dazugehörige MGMT-Protein besteht aus 207 Aminosäuren [57]. Die MGMT-Proteinexpression wird über die Promotor-Region des *MGMT*-Gens mittels Methylierung reguliert. Eine Methylierung im Promotorbereich führt zu einem Silencing der *MGMT*-Expression. Dieser Mechanismus ist insbesondere im Hinblick auf die GBM-Therapie mittels TMZ von Bedeutung. Wie bereits im Voraus beschrieben, werden durch TMZ Alkylreste an die Tumor-DNA angeheftet und deren Funktion gestört. Durch die Anwesenheit des MGMT-Proteins werden diese Alkylreste wieder entfernt und die Wirkung der Chemotherapie nivelliert. Im Falle einer *MGMT*-Methylierung konnten Studien entsprechend eine bessere Wirkung der TMZ Therapie nachweisen [28].

1.2.3 p16

Das Gen *p16* codiert für eine sogenannte Cyclin-abhängige Kinase P16. Das Gen ist auf Chromosom 9 (9p21.3) lokalisiert und 27,549 Basenpaare (bp) lang. Das dazugehörige funktionstüchtige Protein hat ein Molekulargewicht von 16 Kilodalton (kDa) und besteht aus 148 Aminosäuren [83]. In den Zellzyklusphasen befinden sich Kontrollpunkte, die dafür sorgen, dass kontrolliertes Zellwachstum stattfindet. Der erste Kontrollpunkt befindet sich beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Reguliert wird der Kontrollpunkt durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK's). Zu den Cyclinen, die für die Aktivierung der CDK's verantwortlich sind, gehören p15, p16 und das Retinoblastom Protein. P16^{INK4A} ist ein Inhibitor

der CDK4 und CDK6. Durch die Hemmung der CDK's ist es nicht möglich das Retinoblastom-Protein (pRb) zu phosphorylieren. Durch das pRb wird der Transkriptionsfaktor E2F inaktiviert und die Expression der Gene von der S-Phase bleibt aus [78]. Dadurch wird ein Stopp in der späten G1-Phase des Zellzyklus induziert und somit der Übergang zur S-Phase verhindert [59]. Kommt es jedoch zu einer homozygoten Deletion, Punktmutation oder einer Methylierung des Promotors ist p16^{INK4A} inaktiviert [16]. Dies würde im Umkehrschluss dazu führen, dass CDK's ungehindert pRb phosphorylieren. Das phosphorylierte pRb aktiviert dann wiederum Transkriptionsfaktor E2F und leitet die Expression der benötigten Gene der S-Phase ein. Dies hat zu Folge, dass es zur unkontrollierten Zellvermehrung und damit zum Tumorwachstum kommt [47]. Der Methylierungsstatus von *p16* hat sich auch im Hinblick auf die Onkogenese von Gliomen als wichtig erwiesen. Dadurch, dass *p16* als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt, könnte eine Methylierung das Fortschreiten und die Prognose von Gliomen negativ beeinflussen [71].

1.2.4 p15

Das Gen *p15* erstreckt sich über 6,402 bp auf dem Chromosomen 9 (9p21.3) [80]. P15 ist ein kleines Protein mit einer Molekularmasse von etwa 15 kDa, daher der Name p15 [26]. Beim GBM spielt eine Dysregulation des *p15* eine wichtige Rolle in der Onkogenese. P15 ist wie P16 ein Tumorsuppressor, dass genau wie P16 durch Inhibition der CDK's den Zellzyklus reguliert. Bei einer Mutation oder verminderten Expression, infolge von beispielweise einer Promotor-Methylierungen, kommt es zur gestörten Regulation und das Tumorwachstum ist begünstigt [63]. Einer Methylierungsanalyse von 27 GBM-Patienten konnte in 37% der Tumoren eine Methylierung von *p15* nachgewiesen werden. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass eine Methylierung von *p15* bei Patienten mit einem GBM mit einer schlechteren Prognose einhergeht [76].

1.2.5 Heterogenität im Glioblastoma multiforme

Bereits der Name der Erkrankung, *Glioblastoma multiforme*, lässt auf ein heterogenes Erscheinungsbild der Erkrankung schließen. Tatsächlich konnte der Pathologe Rudolf Virchow bereits 1864 eine entsprechende Heterogenität zwischen Patienten (*inter-tumoral*) und innerhalb des Tumors eines Patienten (*intra-tumoral*) auf makroskopischer Ebene feststellen.

Gleiches gilt für das mikroskopische Bild dieser Erkrankung [72]. Jung et al. Bestätigten das heterogene histomorphologische Bild des GBMs anhand von Mikrodissektionen der Tumoren. Sie wiesen nach, dass sich Mikrodissektionen eines Tumors histomorphologisch unterscheiden, beispielsweise hinsichtlich dicht gewachsener isomorpher oder pleomorpher Tumorzellnester, dem epithelialen Erscheinungsbild, gemistozytische Tumorzellen und Unterschiede der endothelialen Proliferation. Zudem erfolgte eine genomische Hybridisierung (CGH), um die einzelnen Gewebeschnitte auf eine intra-tumorale genetische Heterogenität zu überprüfen. Die untersuchten Tumore zeigten eine variable Kombination von chromosomalen Aberrationen. Darüber hinaus wurde eine Amplifikation auf Chromosom 7p als intra-tumoral heterogen in zwei Tumoren festgestellt [33]. Auf der zellulären Ebene besteht das GBM nicht nur aus neoplastischen Gliomzellen, sondern aus einem komplexen Zellnetzwerk. Dieses Netzwerk besteht aus Fibroblasten, Astrozyten, Endothelzellen, Perizyten, Stammzellen (stammzellähnlichen Gliomzellen) und Immunzellen wie Makrophagen, T-Zellen und natürliche Killerzellen [6]. Auf chromosomaler und genetischer Ebene zeigt sich ebenso ein heterogenes Bild. Loeper et al. Verglichen die mitotische Instabilität der Glioblastomzellen in vivo mit den in-vitro Karyotypen von Zellkulturen, welche aus dem Tumor etabliert wurden. Alle untersuchten Chromosomen zeigten eine mitotische Instabilität. Bei Chromosom 10 und 17 trat nur eine Monosomie auf, bei Chromosom 7 hingegen eine Trisomie/Polysomie in beiden Gruppen. Zudem zeigte sich, dass die Variabilität der numerischen Aberrationen in den Karyotypen der Tumorzellkulturen weniger ausgeprägt war [44].

Einzelne Zellen desselben GBM können unterschiedliche chromosomale Aberrationen und Mutationen aufweisen [74]. Es kann daher konstatiert werden, dass eine inter- und intratumorale Heterogenität beim GBM ubiquitär auf unterschiedlichen Ebenen vorhanden ist.

Im klinischen Alltag findet diese seit Jahrhunderten bekannte Tatsache allerdings nur wenig Beachtung. Die individuellen Tumorcharakteristika eines GBM werden in der Regel anhand einer Biopsie aus einer Tumorlokalisation gewonnen. Diese Informationen aus ebenjener singulären Lokalisation werden fortan auf die gesamte Entität des Tumors generalisiert. Dies betrifft unter anderem auch epigenetische Marker, wie auch die zuvor erwähnten Marker *MGMT*, *p15* und *p16*, die eine zunehmende Bedeutung in der klinischen Therapieentscheidung und Prognose der Erkrankung haben. Im Hinblick auf die Validität dieser epigenetischen Marker stellt sich die Frage, inwieweit sich solch eine Heterogenität im GBM auch auf epigenetischer Ebene nachweisen lässt.

1.3 Eigene Fragestellung

Bisher wird zur Charakterisierung des GBM die intra-tumorale Heterogenität nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wird aktuell nur eine einzelne Biopsie entnommen, von welcher angenommen wird, dass sie aussagekräftig genug sein könnte, um die Entität des Tumors zu generalisieren. Ferner ist bislang wenig darüber bekannt, ob auch eine intra-tumorale epigenetische Heterogenität besteht. Deshalb widmet sich die folgende Arbeit den Fragen:

1. Weisen Tumorproben eines Patienten aus unterschiedlichen Lokalisationen der Neoplasie unterschiedliche epigenetische Methylierungsmuster, also eine intra-tumorale Heterogenität, im Hinblick auf *MGMT*, *p15* und *p16* auf? Lässt sich das Ausmaß dieser Heterogenität quantifizieren?
2. Für den Fall, dass eine epigenetische Heterogenität festgestellt werden kann: Lässt die intra-tumorale Heterogenität anhand unterschiedlicher Methylierungsmuster von *MGMT*, *p15* und *p16* Rückschlüsse auf die Prognose der Patienten mit GBM zu?

2 Material und Methodik

2.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden 222 GBM-Tumorproben von insgesamt 154 Patienten untersucht. Alle Patienten wurden zwischen 2017 und 2022 an der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Homburg operiert und erhielten die Standardtherapie (Radiatio und Chemotherapie nach Stupp-Schema). Einschlusskriterien der Studie waren die neuropathologische Diagnose des primären GBMs anhand der WHO-Klassifikation 2016 und ausreichend Gewebemasse für weitere Untersuchungen. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten eingeholt (Nr. 93/16).

2.1.1 Studiendesign

Die Studienpopulation von 154 Patienten wurde in zwei Gruppen aufgeteilt: Das Testkollektiv bestehend aus 34 Patienten und das Referenzkollektiv mit 120 Patienten. Von jedem der 34 Patienten des Testkollektivs wurden während der Operation drei Tumorproben entnommen, um ein Triplet zu bilden, das den Tumor eines einzelnen Patienten repräsentiert (insgesamt 102 Proben). Die Biopsiestellen innerhalb des Tumors wurden so gewählt, dass sie möglichst weit voneinander entfernt waren, wobei die optische Neuronavigation zur Hilfe genommen wurde. Die resultierenden 34 Triplets bildeten die Testgruppe. Das Referenzkollektiv bestand aus 120 Patienten, von jedem Patienten wurde während der Operation nur eine Tumorprobe entnommen. Alle 120 Tumorproben wurden zufällig auf 40 Triplets verteilt, wobei jedes Triplet aus je einer Probe von drei verschiedenen Patienten bestand. Diese 40 Triplets bildeten die Referenzgruppe. Anhand dieses Studiendesigns war ein Vergleich zwischen intra-tumoraler (Testgruppe) und inter-tumoraler (Referenzgruppe) epigenetischer Heterogenität möglich.

Tab. 01: Alle eingeschlossenen Patienten (n=34) der Testgruppe

Nr.	Geschlecht	Alter bei ED	PFS (in Monaten)	OS (in Monaten)
1.	W	83 Jahre	0,92	0,92
2.	W	71 Jahre	2,53	2,53
3.	M	60 Jahre	12,68	12,68
4.	W	72 Jahre	2,69	3,69

5.	M	64 Jahre	0,95	24,64
6.	W	43 Jahre	2,33	19,46
7.	W	68 Jahre	3,19	15,93
8.	W	73 Jahre	3,48	3,48
9.	M	70 Jahre	1,61	25,1
10.	M	84 Jahre	3,35	13,35
11.	M	65 Jahre	13,08	13,4
12.	M	73 Jahre	2,53	9,53
13.	W	79 Jahre	1,81	8,81
14.	M	87 Jahre	0,95	1,95
15.	W	83 Jahre	6,28	6,28
16.	W	68 Jahre	0,66	3,98
17.	M	71 Jahre	9,69	11,73
18.	M	79 Jahre	2,14	2,14
19.	W	65 Jahre	9,4	10,41
20.	M	61 Jahre	5,06	10,35
21.	W	50 Jahre	19,68	21,68
22.	M	59 Jahre	15,21	21,75
23.	M	62 Jahre	8,05	18,66
24.	M	86 Jahre	10,58	12,58
25.	M	82 Jahre	12,35	12,35
26.	M	60 Jahre	7,49	19,49
27.	W	55 Jahre	13,63	18,3
28.	M	62 Jahre	7,82	12,91
29.	M	77 Jahre	4,67	4,67
30.	M	87 Jahre	0,79	6,79
31.	M	48 Jahre	3,94	5,94
32.	W	57 Jahre	13,17	16,59
33.	M	74 Jahre	0,59	12,59
34.	W	43 Jahre	5,68	15,68

Abkürzungen. Nr = Nummer. W = weiblich. M = männlich. ED = Erstdiagnose. PFS = Progressionsfreies Überleben. OS = Gesamtüberleben.

Tab. 02: Alle eingeschlossenen Patienten (n=120) der Referenzgruppe

Nr.	Geschlecht	Alter bei ED	PFS (in Monate)	OS (in Monate)
1.	M	75 Jahre	1,35	5,52
2.	M	72 Jahre	5,88	9,63
3.	M	63 Jahre	50,10	62,00
4.	M	78 Jahre	1,08	1,08
5.	W	62 Jahre	11,53	20,11
6.	W	66 Jahre	39,49	69,78
7.	W	73 Jahre	2,66	3,29
8.	W	60 Jahre	7,59	10,05
9.	M	60 Jahre	5,03	12,22
10.	M	54 Jahre	16,46	28,12
11.	W	60 Jahre	8,28	12,98
12.	M	54 Jahre	32,33	36,34
13.	M	59 Jahre	9,66	23,00
14.	M	58 Jahre	13,31	28,55
15.	M	67 Jahre	3,78	3,78
16.	M	75 Jahre	10,61	16,89
17.	W	57 Jahre	11,47	11,47
18.	M	73 Jahre	4,37	5,78
19.	W	63 Jahre	2,53	2,53
20.	M	56 Jahre	10,97	23,92
21.	W	52 Jahre	8,64	25,76
22.	M	54 Jahre	57,99	57,99
23.	M	73 Jahre	1,77	1,77
24.	W	69 Jahre	2,99	2,99
25.	W	67 Jahre	4,50	8,41
26.	M	45 Jahre	2,76	11,96
27.	W	39 Jahre	10,55	18,10
28.	M	80 Jahre	2,63	2,63
29.	M	74 Jahre	14,83	17,00
30.	M	55 Jahre	4,80	16,72

31.	W	72 Jahre	16,10	22,08
32.	M	71 Jahre	5,06	5,06
33.	M	73 Jahre	2,33	2,33
34.	M	64 Jahre	5,62	5,62
35.	M	74 Jahre	1,25	1,71
36.	M	48 Jahre	25,30	25,30
37.	M	75 Jahre	1,05	1,05
38.	M	64 Jahre	10,38	16,62
39.	M	57 Jahre	9,23	11,20
40.	W	69 Jahre	1,68	1,68
41.	M	43 Jahre	5,65	5,65
42.	W	54 Jahre	5,95	8,44
43.	M	65 Jahre	3,91	19,81
44.	W	75 Jahre	8,28	47,47
45.	W	77 Jahre	1,91	2,79
46.	M	58 Jahre	4,53	4,53
47.	M	74 Jahre	3,65	14,13
48.	W	52 Jahre	5,22	10,78
49.	W	59 Jahre	2,20	8,20
50.	M	70 Jahre	2,17	2,17
51.	M	56 Jahre	2,83	2,83
52.	M	50 Jahre	3,88	9,82
53.	M	37 Jahre	5,95	125,21
54.	M	62 Jahre	23,39	34,96
55.	W	51 Jahre	30,65	42,18
56.	M	56 Jahre	8,21	19,46
57.	M	55 Jahre	16,03	23,59
58.	W	68 Jahre	8,51	10,94
59.	M	72 Jahre	14,13	14,13
60.	W	57 Jahre	1,28	8,40
61.	M	66 Jahre	21,13	41,53
62.	W	66 Jahre	7,75	19,48
63.	M	56 Jahre	6,34	8,64

64.	M	54 Jahre	7,00	17,56
65.	M	60 Jahre	21,26	21,26
66.	M	77 Jahre	3,48	3,48
67.	M	76 Jahre	11,66	11,66
68.	M	71 Jahre	2,53	2,53
69.	M	42 Jahre	4,96	20,80
70.	W	35 Jahre	50,66	60,58
71.	W	83 Jahre	0,62	0,62
72.	M	72 Jahre	3,38	3,38
73.	W	64 Jahre	14,13	20,60
74.	W	73 Jahre	2,40	12,40
75.	M	83 Jahre	0,20	11,00
76.	W	79 Jahre	6,70	11,40
77.	M	73 Jahre	6,90	16,03
78.	M	79 Jahre	2,01	8,01
79.	M	48 Jahre	6,01	7,66
80.	M	81 Jahre	6,87	27,66
81.	W	65 Jahre	6,67	6,67
82.	M	54 Jahre	4,99	17,87
83.	W	77 Jahre	2,04	11,04
84.	M	57 Jahre	4,63	14,63
85.	W	59 Jahre	8,67	8,67
86.	M	55 Jahre	11,83	11,83
87.	M	83 Jahre	0,92	0,92
88.	W	71 Jahre	2,53	2,53
89.	M	60 Jahre	12,68	12,68
90.	W	72 Jahre	2,69	3,69
91.	M	71 Jahre	0,95	24,64
92.	M	43 Jahre	2,33	19,46
93.	M	68 Jahre	9,19	15,93
94.	M	75 Jahre	3,48	9,48
95.	M	74 Jahre	1,61	25,10
96.	W	82 Jahre	3,35	13,35

97.	W	38 Jahre	24,97	50,00
98.	M	60 Jahre	13,20	36,12
99.	W	68 Jahre	23,78	41,43
100.	W	35 Jahre	14,40	48,56
101.	M	82 Jahre	19,50	33,89
102.	M	81 Jahre	16,67	31,56
103.	W	78 Jahre	4,14	4,14
104.	M	77 Jahre	3,75	3,75
105.	M	66 Jahre	13,70	14,23
106.	M	57 Jahre	2,37	9,37
107.	M	74 Jahre	4,17	19,17
108.	M	82 Jahre	0,69	0,69
109.	W	59 Jahre	14,82	24,82
110.	M	55 Jahre	27,42	30,23
111.	M	44 Jahre	8,77	8,84
112.	W	79 Jahre	1,48	12,48
113.	M	57 Jahre	10,84	10,84
114.	M	69 Jahre	1,84	11,84
115.	W	69 Jahre	18,37	31,64
116.	W	74 Jahre	3,71	5,13
117.	M	78 Jahre	1,31	11,31
118.	M	83 Jahre	11,97	12,78
119.	M	59 Jahre	2,77	3,77
120.	M	67 Jahre	21,85	22,94

Anmerkungen. Nr = Nummer. W = weiblich. M = männlich. ED = Erstdiagnose. PFS = Progressionsfreies Überleben. OS = Gesamtüberleben.

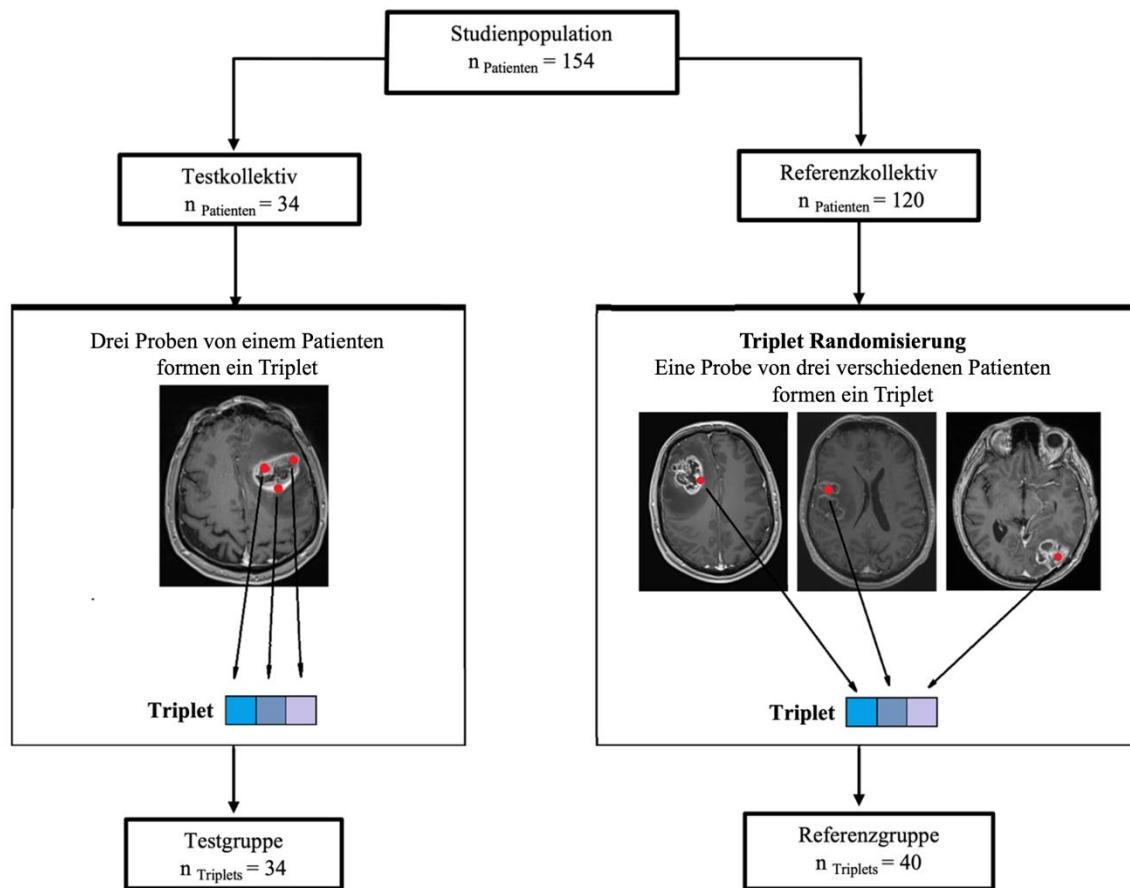


Abb. 3: Studienschema modifiziert nach Sippl et al [7]

2.1.2 Probengewinnung

Das während der Tumoresektion gewonnene Untersuchungsmaterial wurde von verschiedenen Neurochirurgen entnommen, ohne den Verlauf des operativen Eingriffs zu beeinflussen. Um die Lokalisation des GBM im Testkollektiv zu bestimmen, wurde die Neuronavigation hinzugezogen. Durch die Neuronavigation ist die intraoperative Visualisierung von Instrumenten und dreidimensionalen Bilddaten möglich, welche die räumliche Orientierung unterstützt [65]. Bei der Operation wurden drei Gewebeproben aus verschiedenen Bereichen des Tumors entnommen. Hierbei wurde vom Operateur darauf geachtet, dass der Abstand zwischen den einzelnen Proben möglichst weit voneinander entfernt ist. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -80°C tiefgefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurde jede einzelne Probe mit einem Skalpell in drei gleichgroße Teile geteilt und diese anhand von drei unterschiedlichen Gesichtspunkten analysiert. Ein Teil wurde für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Methylierungsanalysen herangezogen. Ein weiterer Teil diente der histologischen Auswertung. Ein dritter Teil wurde für weitere zukünftige Analysen asserviert.

2.1.3 Probenanalyse

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den entnommenen Proben um vitales Tumorgewebe handelte, wurde durch den Neuropathologen Prof. Dr. Kim das Tumorgewebe histologisch klassifiziert. Es wurden nur Proben in die Studie eingeschlossen, bei denen über 70% vitales Tumorgewebe vorlag, um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch Biopsien aus der Nekrose- oder Penumbra-Zone des Tumors auszuschließen.

2.2 Methylierungsanalysen

Methylierungsanalysen können auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden, wobei die gängigste Methode, die Bisulfit-Sequenzierung mit anschließender methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (eng. *Polymerase chain reaction* -PCR) (MS-PCR) ist. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.2.1 DNA-Isolation

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus einer Probe musste zunächst die Tumor-DNA isoliert werden. Hierfür wurde der tiefgefrorene Tumor in einer Petri-Schale mit einem Einweg-Skalpell in drei gleichschwere Stücke geteilt, wobei eine Probe ca. 10 mg wog. Die Isolation der DNA aus dem zur DNA-Isolation bestimmten Gewebe erfolgte mit dem kommerziellen Isolationskit (QIAamp DNA Mini-Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).

Die Tumorprobe wurde von der Petrischale in Reaktionsgefäße (Eppendorf Tubes™ 3810X) überführt und mit 180 µl ATL-Puffer versetzt. Anschließend wurde 20 µl Proteinase K zugegeben und die Mischung im Vortex (Minishaker MS1, IKA, Staufen, Deutschland) vermischt. Das Tumorgewebe wurde für ein bis drei Nächte bei +56 °C bis zur vollständigen Lyse in einem Schüttelbad inkubiert. Dabei wurde mehrmals geprüft, ob Tumorreste sichtbar waren. Sobald Tumorreste sichtbar waren, erfolgte eine weitere Hinzugabe von 5 µl Proteinkinase K. Dem Lysat wurde dann 200 µl AL-Puffer hinzugefügt. Die Mischung wurde erneut 15 Sekunden lang im Vortex (Minishaker MS1, IKA, Staufen, Deutschland) vermischt und für 10 Minuten bei +70 °C inkubiert (VWR®, DRY-Line®, DL 53). Dem Ansatz wurden dann 200 µl Ethanol (≥ 99,8%, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt und für 15 Sekunden im Vortex (Minishaker MS1, IKA, Staufen, Deutschland) gemischt, sodass eine homogene Lösung entstand.

Diese Lösung wurde auf eine QIAmp-Mini Spinsäule in einem sauberen Reagenzgefäß (2 ml collection Tube) überführt und bei 8.000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für eine Minute in einer Zentrifuge (Hyspin 16K, ANACHEM, Leicester) gefiltert. Das Filtrat, welches hauptsächlich aus Proteinen und Verunreinigungen bestand, wurde mit dem Reagenzgefäß entsorgt. Hiernach wurde in zwei Waschschritten ethanolhaltiger Puffer (AW1 und AW2) verwendet. Beim ersten Waschschriff wurden 500 µl AW1 Puffer verwendet und für eine Minute bei 8.000 UpM zentrifugiert. Beim zweiten Waschschriff wurde 500 µl AW2 Puffer verwendet und für drei Minuten bei voller Drehzahl 14.000 UpM zentrifugiert. Das Filtrat wurde nach jedem Waschschriff verworfen.

Abschließend wurde die QIAmp-Mini Spinsäule in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes™ 3810X) gestellt. Anschließend wurde 200 µl Elutionspuffer (AE) vorsichtig auf die Mitte der Silikonmembran mit einer Pipette aufgetragen. Letztendlich wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 8.000 UpM für eine Minute zentrifugiert. Die DNA wurde somit aus der Säule ausgewaschen und in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

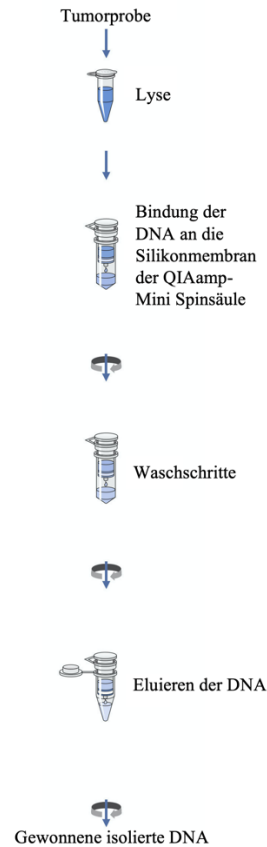


Abb. 4: QIAamp DNA Micro Verfahren zur DNA-Isolation modifiziert nach DNA Mini Handbook Qiagen

2.2.2 Theorie zur Bisulfitkonversion und methylierungsspezifischen-PCR

Bisulfitkonversion ist die meistgenutzte Technik, um spezifische Methylierungsmuster einer DNA zu identifizieren. Durch Hinzugabe von Bisulfit wird das unmethylierte Cytosin in die Base Uracil umgewandelt. Methylierte Cytosine (5-Methylcytosin) bleiben dabei unverändert. Die Bisulfitreaktion beruht auf der Selektivität von Bisulfit. Das unmethylierte Cytosin wird schnell von dem Bisulfit angegriffen, wohingegen das 5-Methylcytosin langsam angegriffen wird [8].

Die Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil erfolgt in drei Schritten. Als Erstes wird HSO_3 reversibel hinzugefügt. Im Anschluss folgt die hydrolytische Desaminierung von NH_3 , wodurch H_2O und NH_4^+ freigesetzt wird. Durch die Freisetzung von HSO_3 , entsteht eine 5,6 Doppelbindung, wodurch die Base Uracil entsteht [27].

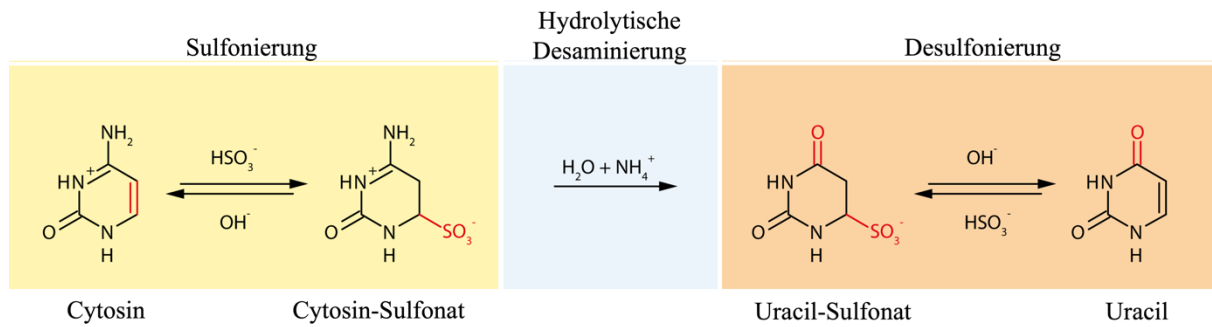


Abb. 5: Chemische Reaktion der Bisulfit-vermittelten Umwandlung von Cytosin in Uracil modifiziert nach Tollefsbol [70]

Nach der Bisulfitkonversion wird die DNA mittels PCR amplifiziert. Bei der MS-PCR werden spezifische Primer verwendet, die entweder an die methylierte oder nicht methylierte Base Cytosin binden. Die Primer sind so konzipiert, dass sie an Cytosine binden, die nach der Bisulfitkonversion unverändert geblieben sind, weil sie methyliert waren. Primer für die nicht-methylierte Sequenz sind hingegen so konzipiert, dass sie an die Thyminbasen binden, die aus dem umgewandelten Uracil resultieren. Durch die Verwendung der spezifischen Primer ist es möglich methylierte und unmethylierte Sequenzen zu unterscheiden und so ein genaueres Bild des Methylierungsstatus der Probe zu gewinnen. Es sind also pro Probe jeweils zwei PCR-Ansätze notwendig, um eine Methylierung nachzuweisen [29].

Die PCR ist eine Methode, um DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Hierfür werden zwei Primer (*reverse* oder *forward* und methyliert oder unmethyliert), Taq-Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) und DNA-Polymerase im Thermocycler inkubiert und zusätzlich werden drei Schritte der PCR durchlaufen. Der erste Schritt ist die Denaturierung bei der die DNA auf etwa $+95\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und sich in Einzelstränge auftrennt. Danach wird die Temperatur auf etwa $+50\text{--}65\text{ }^\circ\text{C}$ gesenkt, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Zuletzt wird die Temperatur auf $+72\text{ }^\circ\text{C}$ erhöht, sodass die DNA-Polymerase an den Primern aktiviert wird und neue DNA-Stränge synthetisiert werden. Um die Menge der DNA zu steigern, werden diese drei Schritte mehrmals wiederholt [24].

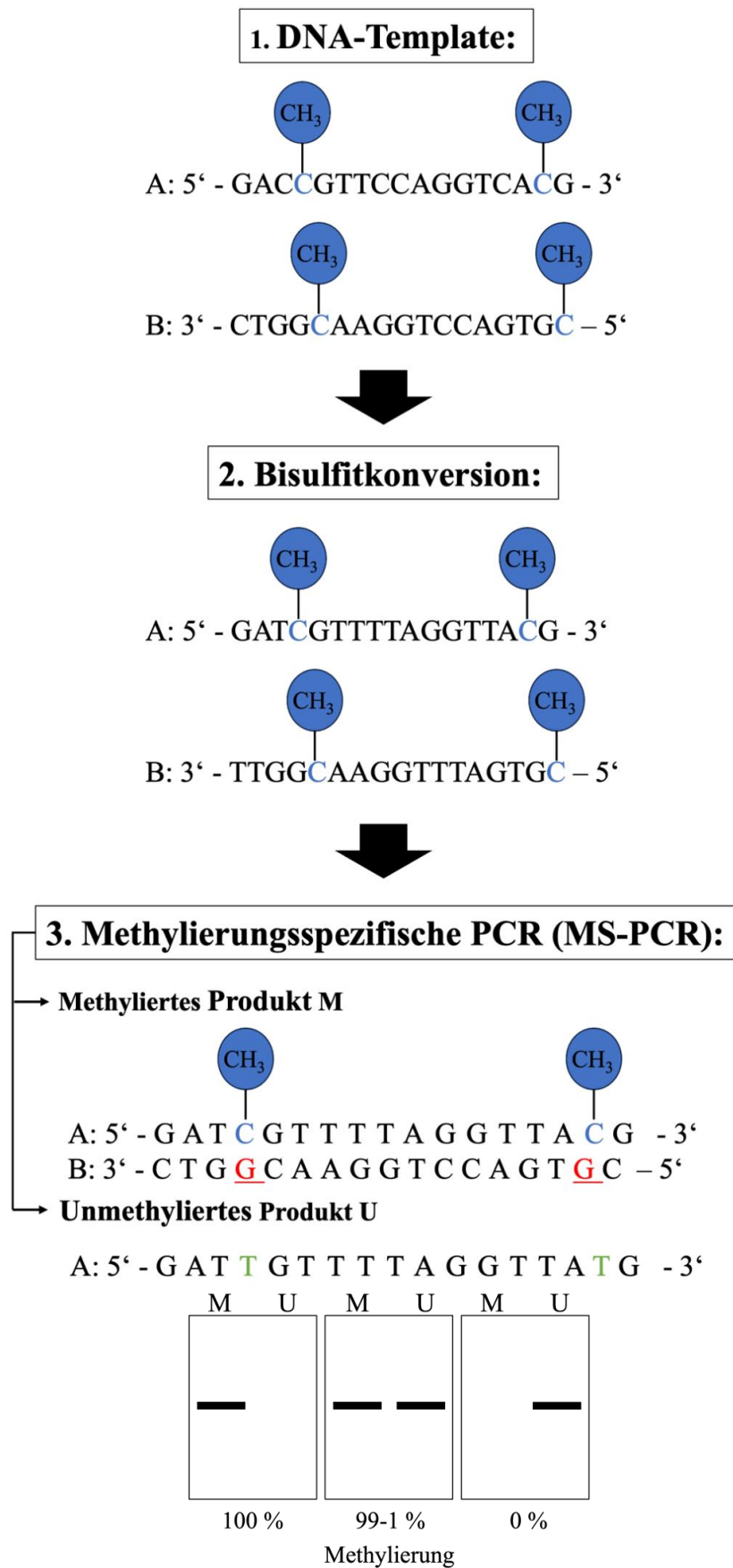


Abb. 6: Flussdiagramm der Bisulfitkonversion und Methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR)

Um den Methylierungsstatus von *MGMT*, *p15* und *p16* zu ermitteln, wurden spezifische Primer mit unterschiedlicher Sequenz, Größe und Annealing Temperaturen benutzt.

Primer	Sequenz	Größe	Annealing-Temperatur
MGMT	M forward: 5'-GTTTTTAGAACGTTTTCGTTTCGAC-3' reverse: 5'-CACCGTCCCGAAAAAACTCCG-3'	122 bp	54°C
	U forward: 5'-TGTGTTTTTAGAATGTTTGTGTTTGAT-3' reverse: 5'-CTACCACCATCCCAAAAAAACTCCA-3'	129 bp	56°C
p15	M forward: 5'-GCGTTCGTATTTGCGGTT-3' reverse: 5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'	148 bp	60°C
	U forward: 5'-TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT-3' reverse: 5'-CCATACAATAACCAACAACCAA-3'	154 bp	60°C
p16	M forward: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' reverse: 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	150 bp	65°C
	U forward: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' reverse: 5'-CAACCCCAACCAACAACCATAA-3'	151 bp	65°C

Tab. 03: MGMT, p15 und p16 Primersequenzen für die MS-PCR

2.2.3 Praktische Durchführung der Bisulfitkonversion

Für die Bisulfitkonversion wurde das EZ-DNA Methylation Gold TM Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) verwendet. Vorab wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und DNA-Konzentrationen zwischen 200-500 ng wurden für optimale Ergebnisse angestrebt. Anschließend wurde ein CT-Conversion-Reagenz mit 900 µl Aqua dest., 300 µl M-Dilution Puffer und 50 µl M-Dissolving Puffer für 10 Ansätze erstellt. Für die Weiterverarbeitung wurden 130 µl vom CT-Conversion-Reagenz mit 20 µl mit der auf 25 ng/µl verdünnten DNA-Konzentration in ein PCR-Gefäß (0,2 ml Gefäß, Eppendorf, Hamburg) im Thermocycler (PTC-200, MJ-Research, Quebec, Kanada) platziert. Im Thermocycler wurden die PCR-Gefäße für 10 Minuten bei +98°C inkubiert, anschließend wurde für 2,5 Stunden die Temperatur auf +64°C gesenkt und danach auf +4°C runtergekühlt. Hiernach wurden 600 µl vom M-Bindung Puffer in eine Zymo-Spin-Filtersäule pipettiert und mit einem Auffanggefäß bei maximaler Geschwindigkeit (>10.000 UpM) für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, bevor 100 µl M-Wash Puffer wieder in die Zymo-Spin-Filtersäule pipettiert wurden und wieder auf maximaler Geschwindigkeit (>10.000 UpM) für 30 Sekunden zentrifugiert wurde. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, wurden 200 µl M-Desulphation

Puffer hinzugegeben, um die Bisulfitgruppen zu entfernen und die DNA für die nachfolgende PCR zu stabilisieren. Die Lösung wurde dann bei Raumtemperatur (20-30 °C) für 15 bis 20 Minuten inkubiert und anschließend für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (>10.000 UpM) ein weiteres Mal zentrifugiert. Hiernach folgten zwei Reinigungsschritte der DNA, welche durch Hinzugabe von 200 µl M-Wash Puffer und weiterem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (>10.000 UpM) für 30 Sekunden durchgeführt wurden. Der gereinigten DNA im Filter wurden 10 µl M-Elution Puffer auf die Matrix pipettiert und nach einer Minute Einwirkzeit für 30 Sekunden Zentrifugation bei >10.000 UpM in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.4 Praktische Durchführung der Methylierungsspezifischen-PCR

Für die MS-PCR wurde zunächst ein PCR-Mastermix aus je 1,0 µl forward und 1,0 µl reverse Primer (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland), 17,8 µl H₂O PCR-Grade (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Austin in Texas, USA), 2,5 µl PCR-Puffer (QUIAGEN, Hilden, Deutschland), 0,5 µl dNTP-Mix (PeqLab, Erlangen, Deutschland) und 0,2 µl Taq-Polymerase (Hot-Star-Taq, QUIAGEN, Hilden, Deutschland) für die methylierten und unmethylierten Bereiche zusammengestellt.

	Volumina
M/U Primer forward	1,0 µl
M/U Primer reverse	1,0 µl
H₂O PCR-Grade	17,8 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
	23,0 µl

Tab. 04: Beispielhafter PCR-Ansatz für den Mastermix

23 µl des Mastermix wurden dann für jede Probe benötigt. Zudem wurden je nach Funktion der Probe unterschiedliche Substanzen hinzugefügt. Wichtig ist zu erwähnen, dass für die Auswertung eine Postivkontrolle und No-Template (Negativ)-Kontrolle Voraussetzung sind. Für die Positivkontrolle wurde 0,5 µl an Bisulfit-DNA (ausschließlich industriell methylierte bisulfitmarkierte DNA, Zymo Research, Freiburg, Deutschland) und 1,5 µl H₂O (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Austin in Texas, USA) hinzugefügt, womit insgesamt 25 µl im

Reagenzgefäß enthalten sind. Die Positivkontrolle bestätigt somit die korrekte Ausführung des PCR-Ansatzes. Für die Negativkontrolle hingegen wird anstatt der Bisulfit-DNA 2,0 µl H₂O (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Austin in Texas, USA) hinzugefügt. Die Funktion der Negativkontrolle dient dem Ausschluss möglicher Kontaminationen oder anderer Fehler. Für die zu untersuchenden Tumorproben, welche durch die Bisulfitkonversion und MS-PCR gewonnen worden sind, wurde 2 µl zu den 23 µl vom Mastermix in ein PCR-Reaktionsgefäß hinzugefügt. Abschließend wurden die Proben anhand von ihrem primer-spezifischen Programm im Thermocycler inkubiert. Somit variieren die Programme des jeweiligen Primers im Hinblick auf die Dauer und Temperatur wie den unten abgebildeten Tabellen zu entnehmen ist.

MGMT unmethyliert

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1.	15 min.	95°C
2.	30 sek.	95°C
3.	30 sek.	56°C
4.	1 min.	72°C
5.	38 Zyklen vom Schritt 2-4	
6.	10 min.	72°C
7.	unendlich	4°C

MGMT methyliert

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1.	15 min.	95°C
2.	30 sek.	95°C
3.	30 sek.	54°C
4.	1 min.	72°C
5.	36 Zyklen vom Schritt 2-4	
6.	10 min.	72°C
7.	unendlich	4°C

p16 unmethyliert

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1.	15 min.	95°C
2.	1 min.	95°C
3.	1 min.	60°C
4.	1 min.	72°C
5.	36 Zyklen vom Schritt 2-4	
6.	10 min.	72°C
7.	unendlich	4°C

p16 methyliert

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1.	15 min.	95°C
2.	1 min.	95°C
3.	1 min.	65°C
4.	1 min.	72°C
5.	39 Zyklen vom Schritt 2-4	
6.	10 min.	72°C
7.	unendlich	4°C

p15 unmethyliert und methyliert

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	15 min.	95°C
2.	45 sek.	95°C
3.	45 sek.	60°C
4.	1 min.	72°C
5.	37 Zyklen vom Schritt 2-4	
6.	10 min.	72°C
7.	unendlich	4°C

Tab. 05: spezifische Programmeinstellungen der verwendeten Primer**2.2.5 Gel-Elektrophorese und UV-Blotting**

Durch die Gel-Elektrophorese ist es möglich Moleküle anhand ihrer Größe zu trennen, indem sie sich unterschiedlich in einem elektrischen Feld bewegen. Für die Elektrophorese wurde ein Agarosegel aus TBE-Puffer und Agarose hergestellt. Zuerst wurde ein Liter des TBE-Puffers zubereitet bestehend aus 27,5 g Borsäure (Carl Roth GmbH), 54,0 g TRIS-Base (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), 1,086 g EDTA (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) und Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland). Der TBE-Puffer wurde in einem Erlenmeyerkolben mit Rührfisch auf einer magnetischen Heizplatte (VWR, Darmstadt, Deutschland) vermischt. Für ein einzelnes Agarosegel wurde zuerst 170 ml vom TBE-Puffer und 3,5 g Agarose (peq-GOLD Universal-Agarose, PeqLab) in ein Erlenmeyerkolben gegeben und in einer Mikrowelle (KOENIC, Ingolstadt, Deutschland) erhitzt, sodass eine klare Lösung resultierte. Um die DNA nach Durchlaufen der Gel-Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 12 µl Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und die komplette Lösung wurde dann in die Gelelektrophoresekammer (OwlTM Buffer Puffer B3, ThermoFisher) mit bereits eingebautem Kamm überführt. Nach Auspolymerisierung des Gels nach etwa 30 Minuten wurde der Kamm entfernt und 16 Geltaschen für die Proben resultierten. Hiernach wurde das Gel in die Kammer überführt und mit TBE-Puffer aufgefüllt, sodass die Oberfläche des Gels mit Flüssigkeit bedeckt war. Bei der Befüllung der Tasche ist darauf zu achten, dass sich die Pipettenspitze (PipetmanTM GilsonTM, Berlin, Deutschland) in der Tasche befindet, sodass die Lösung nicht in der freien Flüssigkeit schwimmt. Zuerst wurden für den Komigrationsstandard beide äußeren Taschen mit jeweils 10 µl Aqua dest., 2,5 µl Blue loading dye und 2,5 µl 50 bp Leiter (50bp

DNA Ladder, New England BioLabs, Frankfurt a.M, Deutschland) befüllt. Hiernach folgten die einzelnen Proben, welche jeweils aus 25 μl der jeweiligen Probe der MS-PCR und 4 μl Loading Dye bestanden. Von den 29 μl an Gesamtmenge wurden dann 15 μl in eine Tasche pipettiert. Um die Applikation der Tasche besser nachvollziehen zu können wurde davor ein Pipettierschema angefertigt, welches auch für eine fehlerfreie Auswertung des Gels nach Bestrahlung mit UV-Licht notwendig ist (Tabelle 06). Die Laufzeit betrug eineinhalb Stunden bei einer konstanten Spannung von 130 Volt (V). Für die Auswertung wurde das Gel in einem Transilluminator (Gelstick IMAGER, Intas, Göttingen, Deutschland) mit UV-Licht bestrahlt, um somit die einzelnen Banden sichtbar zu machen. Bei der Auswertung des Gels können vier verschiedene Bandenmuster auftreten. Für die No-Template (Negativ)-Kontrolle sollte keine Bande sichtbar sein und bei der Positivkontrolle sollte nur der methylierte Ansatz eine Bande anzeigen. Bei den einzelnen Tumorproben wurde eine unmethylierte Bande als unmethylierte Probe und eine methylierte und unmethylierte Bande als methylierte Probe gewertet.



Abb. 7: Vier Bandenmustervarianten der Gel-Elektrophorese.

- 1) Methylierte Probe
- 2) Unmethylierte Probe
- 3) No-Template (Negativ)-Kontrolle
- 4) methylierte Bande sichtbar bei der Positivkontrolle und bei den Tumorproben als fehlerhafte Versuchsdurchführung zu werten

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Befüllung	50bp Leiter	H ₂ O M	H ₂ O U	Pos. M	Pos. U	1 M	1 U	2 M	2 U	3 M	3 U	4 M	4 U	5 M	5 U	6 M	6 U	7 M	7 U	50bp Leiter

Tab. 06: Pipettierschema der Gelbelegung. Tasche 1 und 16 dienen als Leiter, Tasche 2-3 dienen als No-Template (Negativ)-Kontrolle, Tasche 4-5 stellen die Positivkontrolle dar und die Tasche 6-15 wurden mit DNA-Proben versehen, M=methyliert, U=unmethyliert. Die Tumorprobe in den Taschen 16 und 17 zeigt ein Methylierungsereignis.

2.3 Statistische Methodik

Um intervallskalierte Daten zwischen der Test- und Referenzgruppe zu vergleichen, wurde der Student's T-Test verwendet. Um nominal und ordinal skalierte Daten zwischen den o.g. Gruppen zu vergleichen wurde der Chi²-Test benutzt. Dieser Test erfolgte insbesondere auch um das Auftreten von Methylierungen in Proben beider Gruppen, sowie zusätzlich das Auftreten von Heterogenitätsereignissen zwischen der Test- und Referenzgruppe zu vergleichen. Es kann dabei festgehalten werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben dem Nachweis einer intra-tumoralen Heterogenität auch eine mögliche Quantifizierung ebendieser erfolgen soll. Bisher existiert aber kein einheitliches Maß, um eben diese Heterogenität in ihrem Ausmaß zu quantifizieren. Das verwendete statistische Modell basiert dabei darauf, dass die inter-tumorale Heterogenität als „Baseline“ und somit als Referenz zur Quantifizierung der intra-tumorale Heterogenität herangezogen wird.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. *P-Werte* von $< 0,10$ wurden als Trend betrachtet. Als Progress wurde eine erneute KM-Anreicherung im MRT, Tod oder einem Punkteverlust von 30 im KPS gewertet. Die Standardabweichung wurde durch $\pm$ gekennzeichnet. Für die statistische Auswertung wurde zudem die ANOVA-Analyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Datenverarbeitung und -auswertung erfolgte mit der Software SPSS. Die Erstellung der Diagramme wurde mit der SPSS-Version 23 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden insgesamt 154 Patienten mit diagnostiziertem GBM untersucht, wobei 34 Patienten als Testkollektiv und 102 Patienten als Referenzkollektiv dienten. Das durchschnittliche Erkrankungsalter von Patienten des Testkollektivs betrug $68,7 \pm 12,4$ Jahre und bei Individuen des Referenzkollektivs betrug das durchschnittliche Erkrankungsalter $65,1 \pm 11,4$ Jahre. Es zeigte sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen beiden Kollektiven ($p=0,61$). Das Testkollektiv bestand aus 21 (61,8%) Männern und zwölf (38,2%) Frauen. Das Referenzkollektiv bestand aus 69 (57,5%) Männern und 51 (42,5%) Frauen. Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied ($p=0,32$). Der durchschnittliche KPS betrug im Testkollektiv 80 und im Referenzkollektiv 90. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,21$). Beim Ausmaß der Tumorresektion wurde im Testkollektiv neun-mal (26,5%) die GTR und 25-mal (73,5%) die STR erreicht. Im Referenzkollektiv wurde 31-mal (25,8%) die GTR, 84-mal (70,0%) die STR erreicht. Bei fünf (4,2%) Patienten des Referenzkollektivs war postoperativ kein Resektionsumfang bestimmbar, da die hierfür notwendige MRT-Untersuchung postoperativ nicht durchgeführt worden ist. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,34$). Im Testkollektiv wurde ein medianes Gesamtüberleben (*engl. Overall survival* – OS) von $15,7 \pm 7,1$ Monaten im Vergleich zum Referenzkollektiv von $17,2 \pm 14,8$ Monaten erhoben. Das progressionsfreie Überleben (PFS) vom Testkollektiv betrug $8,5 \pm 4,6$ wohingegen es vom Referenzkollektiv $9,4 \pm 11,7$ ($p=0,17$) betrug. Im Testkollektiv waren zum Zeitpunkt der Erfassung der klinischen Daten 24 (70,6%) Patienten und im Referenzkollektiv 117 (97,5%) Patienten verstorben. In der Testgruppe lebten bei Datenschluss der Studie signifikant mehr Patienten ($p=0,01$)

Geschlechterverteilung innerhalb des Testkollektivs und Referenzkollektivs

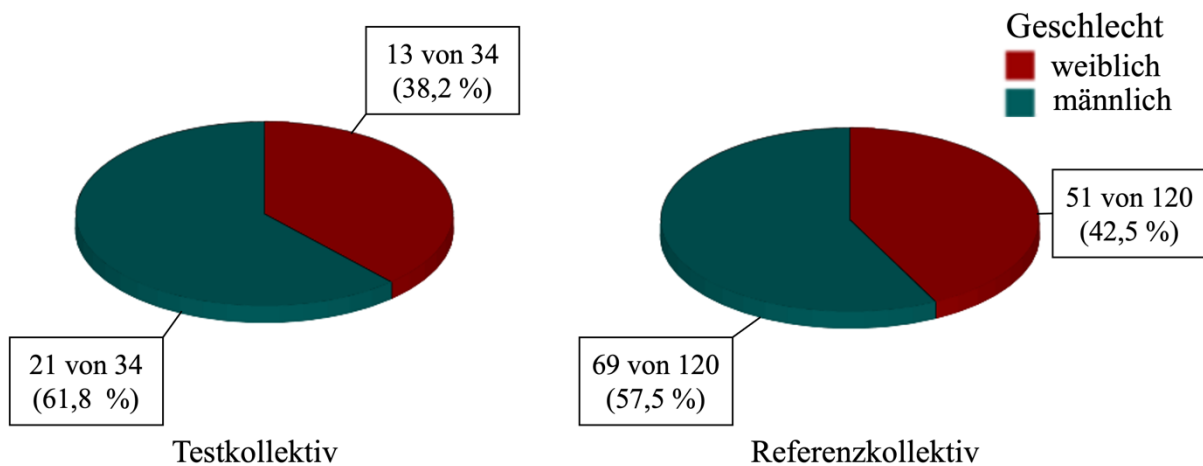


Abb.8: Geschlechterverteilung. Die Geschlechterverteilung innerhalb des Testkollektivs (n=34) zeigte, dass 21 von 34 (61,8%) Patienten männlich und zwölf von 34 (38,2%) weiblich waren. Die Geschlechterverteilung innerhalb des Referenzkollektivs (n=102) zeigte, dass 69 von 120 (57,5%) Patienten männlich und 51 von 120 (42,5%) weiblich waren.

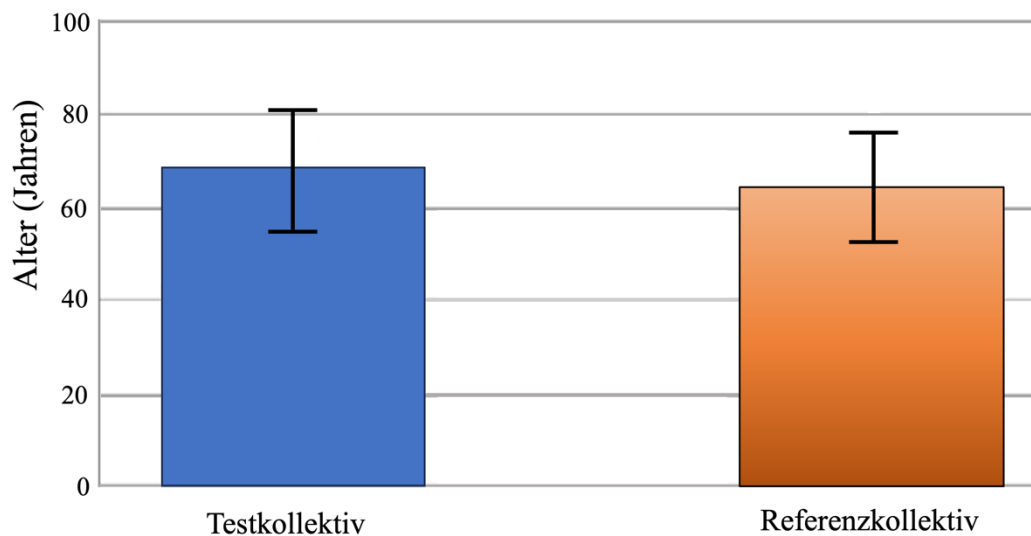


Abb. 8: Das durchschnittliche Erkrankungsalter der beiden Kollektive. Das durchschnittliche Erkrankungsalter des Testkollektivs wurde als blaue Säule abgebildet und betrug 68,7±12,4 Jahre. Das durchschnittliche Erkrankungsalter des Referenzkollektiv wurde als orangene Säule dargestellt und betrug 65,1±11,4 Jahre.

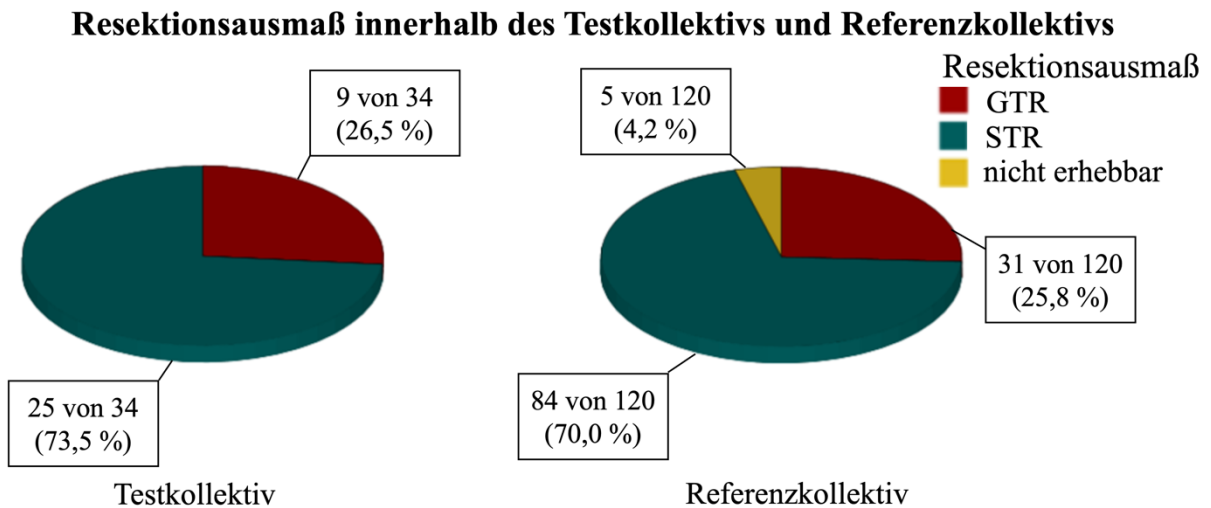


Abb. 10: Resektionsausmaß innerhalb des Testkollektivs und Referenzkollektivs. Auf der linken Seite ist das Testkollektiv (n=34) dargestellt. Die STR wurde 25-mal (73,5%) und die GTR wurde 9-mal (26,5%) erreicht. Auf der rechten Seite ist das Referenzkollektiv (n=120) dargestellt. In diesem Kollektiv wurde 84-mal (70,0%) die STR und 31-mal (25,8%) die GTR erreicht. Bei 5 von 120 (5,2%) Patienten konnte das Tumorresektionsausmaß nicht erhoben werden. GTR – gross total resection (gesamte Resektion), STR – subtotal resection (Subtotale Resektion)

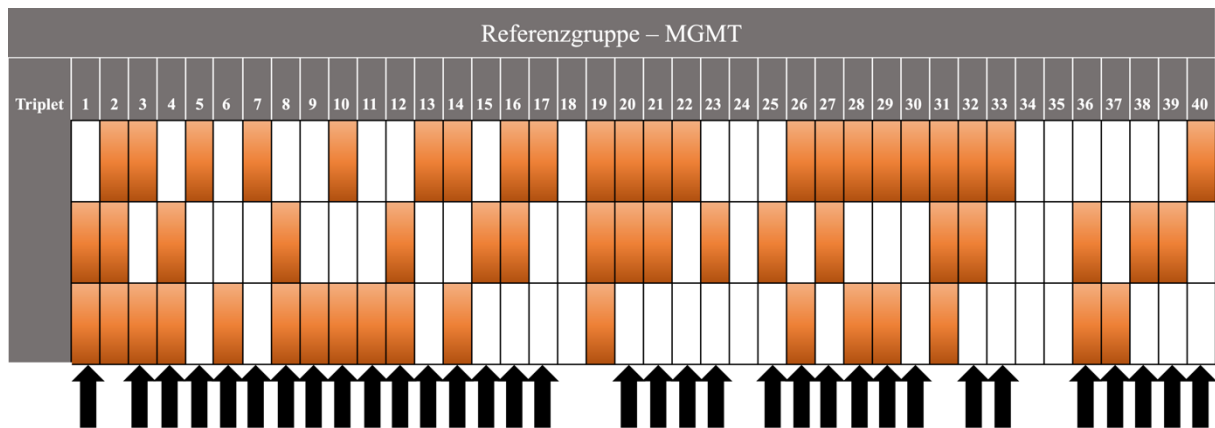


Abb. 12: Übersicht der Methylierungsanalysen von *MGMT* der Referenzgruppe (n=40 Triplets). Die weißen Kästchen repräsentieren unmethylierte Proben, orangene Kästchen repräsentieren methylierte Proben, die schwarzen Pfeile unter der Abbildung verweisen auf die inter-tumorale Heterogenität in einem Triplet. Eine heterogene Methylierung zeigte sich in 33 von 40 Triplets in der Referenzgruppe.

3.2.2 *p15*

Die Promotormethylierungen von *p15* im Testkollektiv traten in 17 von 102 (16,7%) Proben auf. Wohingegen sich Methylierungen von *p15* im Referenzkollektiv in 15 von 120 (12,5%) Proben zeigten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Testkollektiv und dem Referenzkollektiv ($p=0,19$) im Hinblick auf das Auftreten einer Methylierung.

Im Hinblick auf die intra-tumorale Heterogenität von *p15* der Triplets zeigte sich in der Testgruppe eine heterogene Methylierung in zwölf von 34 Triplets (35,3%). Eine homogene Non-Methylierung (alle drei Triplets nicht methyliert) zeigte sich in 21 von 34 Patienten (61,8%) in der Testgruppe. Eine homogene Methylierung (alle drei Triplets methyliert) zeigte sich in einem von 34 Patienten (2,9%) in der Testgruppe.

In der Referenzgruppe war die heterogene Methylierung in zehn von 40 (25%) Triplets präsent. Eine homogene Non-Methylierung zeigte sich in 29 von 40 (72,5%) Triplets. Eine homogene Methylierung war in einem von 40 Triplets (2,5%) präsent. Hinsichtlich der intra-tumoralen Heterogenität in der Testgruppe und Referenzgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,33$).

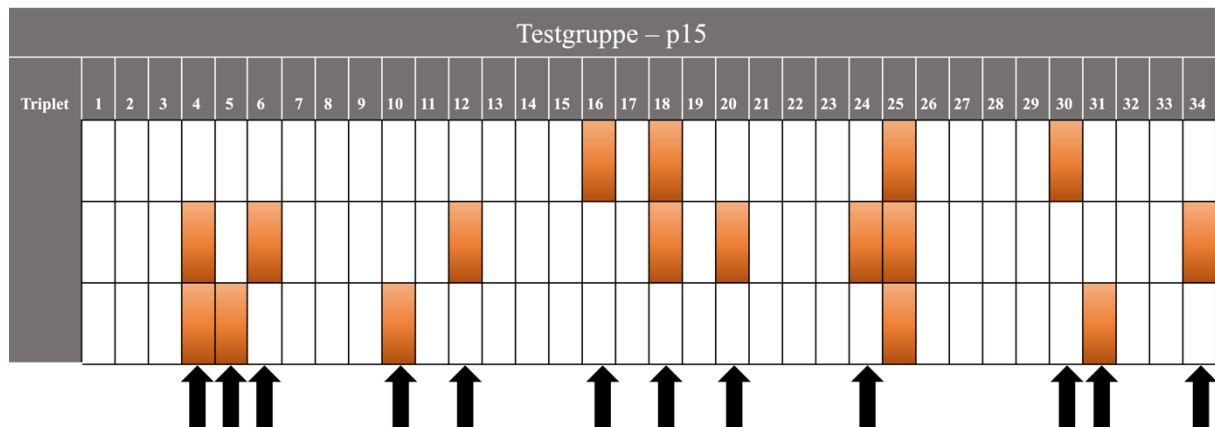


Abb. 13: Übersicht der Methylierungsanalysen von *p15* der Testgruppe (n=34 Triplets).

Die weißen Kästchen repräsentieren unmethylierte Proben, orangene Kästchen repräsentieren methylierte Proben, die schwarzen Pfeile unter der Abbildung verweisen auf die intra-tumorale Heterogenität in einem Triplet. Eine heterogene Methylierung zeigte sich in zwölf von 34 Triplets in der Testgruppe.

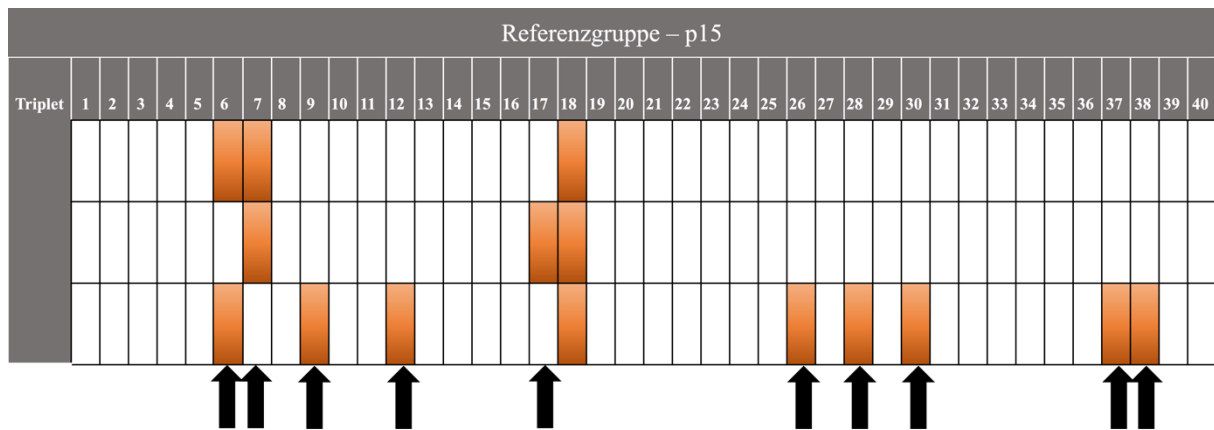


Abb. 14: Übersicht der Methylierungsanalysen von *p15* der Referenzgruppe (n=40 Triplets). Die weißen Kästchen repräsentieren unmethylierte Proben, orangene Kästchen repräsentieren methylierte Proben, die schwarzen Pfeile unter der Abbildung verweisen auf die inter-tumorale Heterogenität in einem Triplet. Eine heterogene Methylierung erwies sich in zehn von 40 Triplets.

3.2.3 *p16*

Bei 25 von 102 Proben (24,5%) im Testkollektiv wurde eine *p16*-Promotormethylierung festgestellt. Im Referenzkollektiv wiesen 12 von 120 Proben (10%) eine Methylierung von *p16* auf. Zwischen den beiden Kollektiven zeigte sich ein statisch signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Methylierung ($p=0,02$).

Die Heterogenität der *p16*-Methylierung trat in 15 von 34 (44,1%) Triplets der Testgruppe auf. Eine homogene Non-Methylierung (alle drei Triplets nicht methyliert) zeigte sich in 16 von 34 Patienten (47,0%) in der Testgruppe. Eine homogene Methylierung (alle drei Triplets methyliert) zeigte sich in drei von 34 Patienten (8,8%) in der Testgruppe.

In der Referenzgruppe war die heterogene Methylierung in elf von 40 (27,5%) Triplets präsent. Eine homogene Non-Methylierung zeigte sich in 29 von 40 (72,5%) Triplets. Die homogene Methylierung zeigte sich nicht in den Triplets (0%). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der intra-tumoralen Heterogenität zwischen den beiden Gruppen ($p=0,14$).

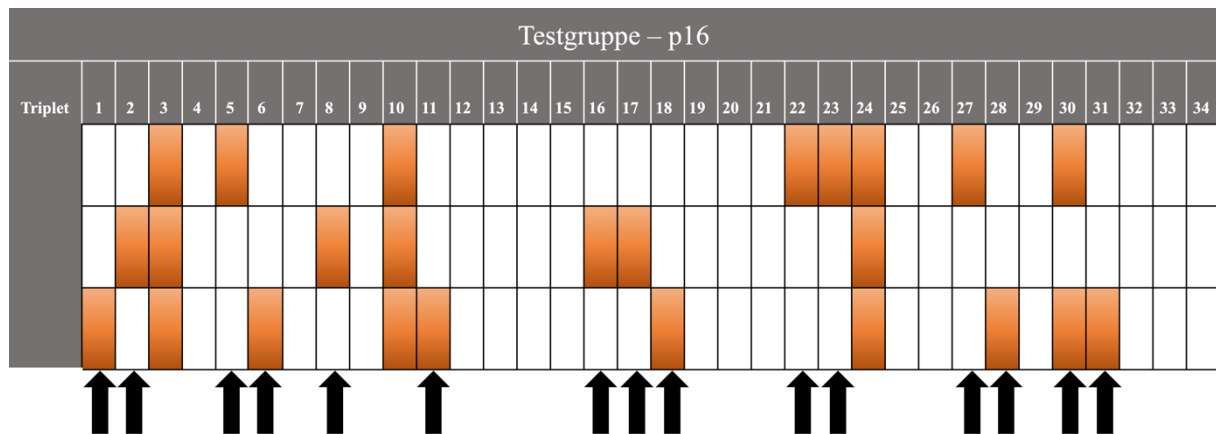


Abb. 15: Übersicht der Methylierungsanalysen von *p16* der Testgruppe (n=34 Triplets).

Die weißen Kästchen repräsentieren unmethylierte Proben, orangene Kästchen repräsentieren methylierte Proben, die schwarzen Pfeile unter der Abbildung verweisen auf die intra-tumorale Heterogenität in einem Triplet. Eine heterogene Methylierung wurde in 15 von 34 Triplets der Testgruppe bewiesen.

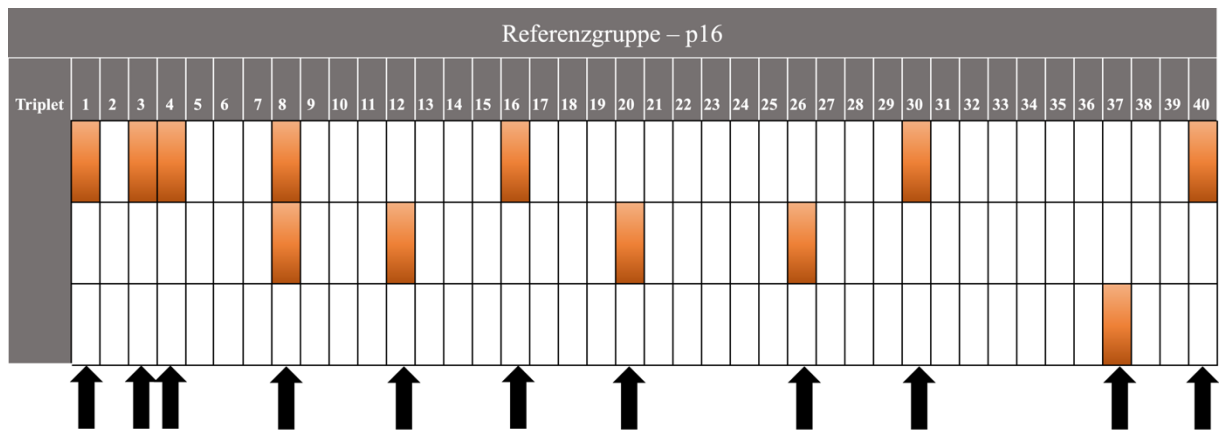


Abb. 16: Übersicht der Methylierungsanalysen von *p16* der Referenzgruppe (n=40 Triplets). Die weißen Kästchen repräsentieren unmethylierte Proben, orangene Kästchen repräsentieren methylierte Proben, die schwarzen Pfeile unter der Abbildung verweisen auf die inter-tumorale Heterogenität in einem Triplet. In der Referenzgruppe war die heterogene Methylierung in elf von 40 Triplets präsent.

Tab. 07: Übersicht der Ergebnisse der Methylierungsanalysen

<i>MGMT</i>		
Methylierungs-status	Testgruppe (=Intratumorale Heterogenität)	Referenzgruppe (=Intertumorale Heterogenität)
Homogene Non-Methylierung	acht von 34 Patienten (23,5%)	vier von 40 Triplets (10,0%)
Heterogene Methylierung	18 von 34 Patienten (52,9%)	33 von 40 Triplets (82,5%)
Homogene Methylierung	acht von 34 Patienten (23,5%)	drei von 40 Triplets (7,5%)
<i>p15</i>		
Methylierungs-status	Testgruppe (=Intratumorale Heterogenität)	Referenzgruppe (=Intertumorale Heterogenität)
Homogene Non-Methylierung	21 von 34 Patienten (61,8%)	29 von 40 Triplets (72,5%)
Heterogene Methylierung	zwölf von 34 Patienten (35,3%)	10 von 40 Triplets (25%)
Homogene Methylierung	einem von 34 Patienten (2,9%)	einem von 40 Triplets (2,5%)
<i>p16</i>		
Methylierungs-status	Testgruppe (=Intratumorale Heterogenität)	Referenzgruppe (=Intertumorale Heterogenität)
Homogene Non-Methylierung	16 von 34 Patienten (47,0%)	29 von 40 Triplets (72,5%)
Heterogene Methylierung	15 von 34 Patienten (44,1%)	elf von 40 Triplets (27,5%)
Homogene Methylierung	drei von 34 Patienten (8,8%)	0 von 40 Triplets (0%)

3.3 Überlebensanalysen in Abhängigkeit der Heterogenität des Methylierungsstatus

3.3.1 *MGMT*

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung von *MGMT* (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein PFS von 5,4 Monaten $\pm$ 3,8 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein PFS von 7,8 Monaten $\pm$ 5,7 Monaten. Individuen mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wiesen ein PFS von 3,0 Monaten $\pm$ 3,1 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das PFS ($p=0,076$).

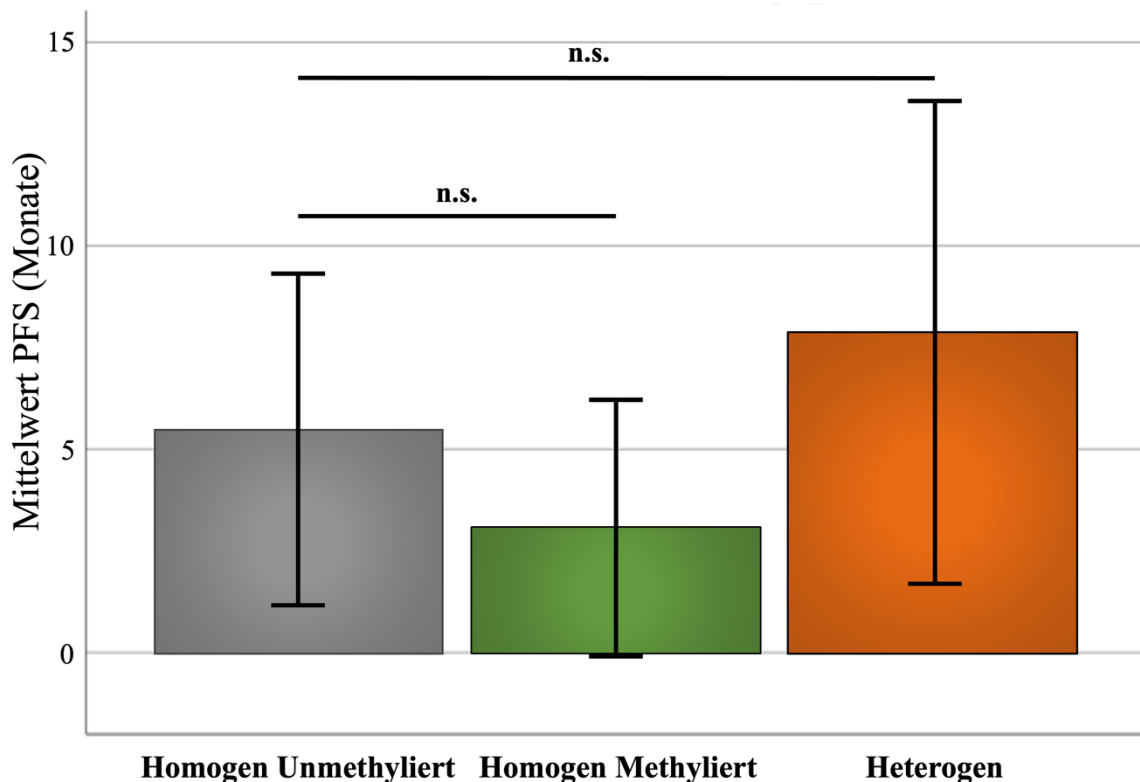


Abb. 17: PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *MGMT*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *MGMT* der Testgruppe (x-Achse) in Hinblick auf den Mittelwert vom PFS in Monaten (Y-Achse). PFS – progression-free survival (progressionsfreie Überleben), n.s. – nicht signifikant

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein OS von 9,6 Monaten $\pm$ 4,4 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein OS von 12,8 Monaten $\pm$ 6,6 Monaten. Individuen mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wiesen ein OS von 11,5 Monaten $\pm$ 9,2 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das PFS ($p=0,56$) zwischen den Gruppen.

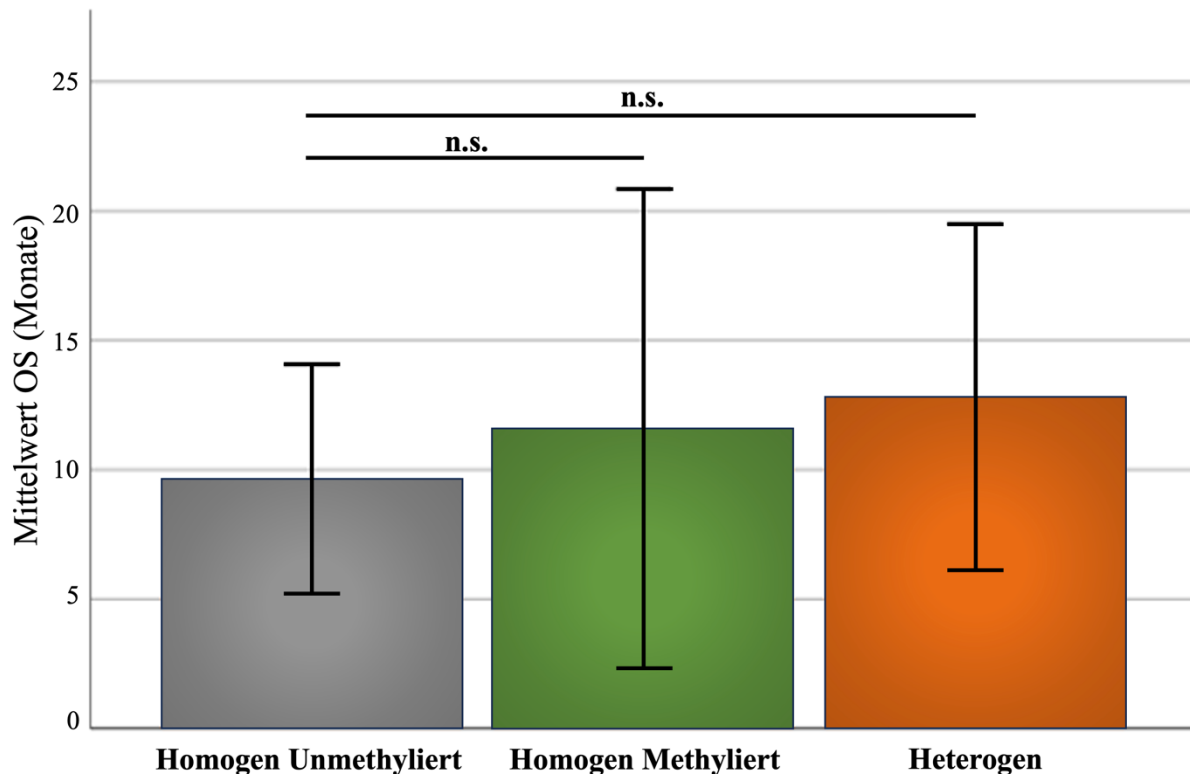


Abb. 18: OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *MGMT*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *MGMT* der Testgruppe (x-Achse) im Hinblick auf den Mittelwert vom OS in Monaten (Y-Achse). OS – overall survival (Gesamtüberleben), n.s. – nicht signifikant

3.3.2 *p15*

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung von *p15* (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein PFS von 6,2 Monaten $\pm$ 5,4 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein PFS von 6,4 Monaten $\pm$ 4,7 Monaten. Das Individuum mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wies ein PFS von 0,9 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das PFS ($p=0,59$).

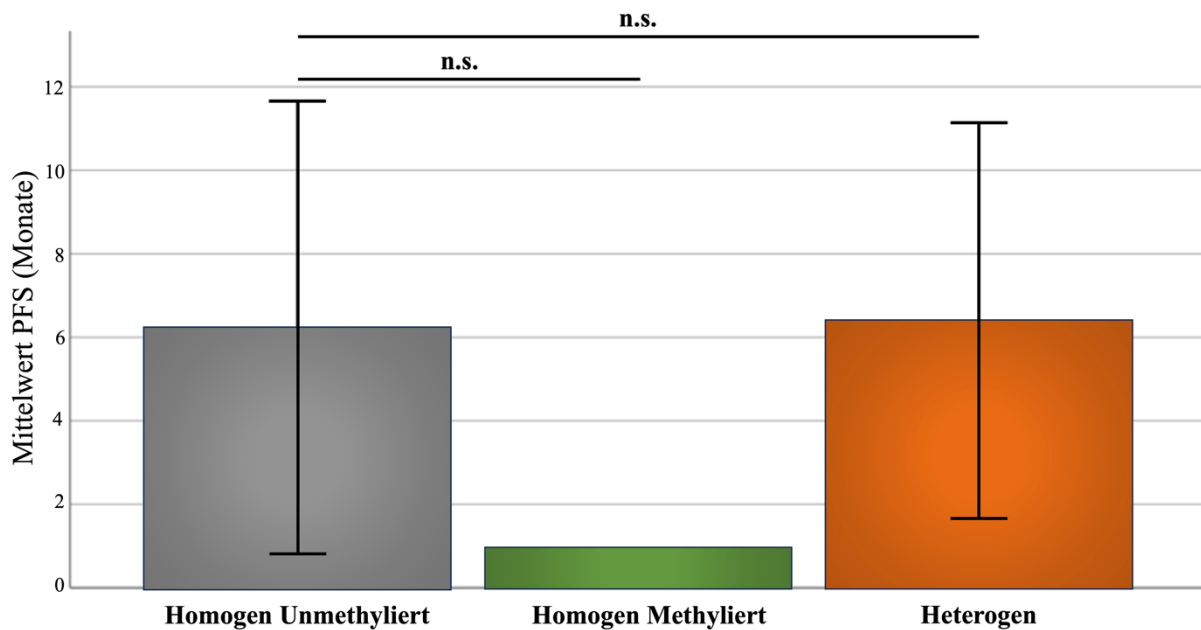


Abb.19: PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p15*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *p15* der Testgruppe (x-Achse) im Hinblick auf den Mittelwert vom PFS in Monaten (Y-Achse). PFS – progression-free survival (progressionsfreie Überleben), n.s. – nicht signifikant

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung von *p15* (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein OS von 12,6 Monaten $\pm$ 6,7 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein OS von 9,1 Monaten $\pm$ 5,8 Monaten. Das Individuum mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wies ein OS von 24,6 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das PFS ($p=0,054$).

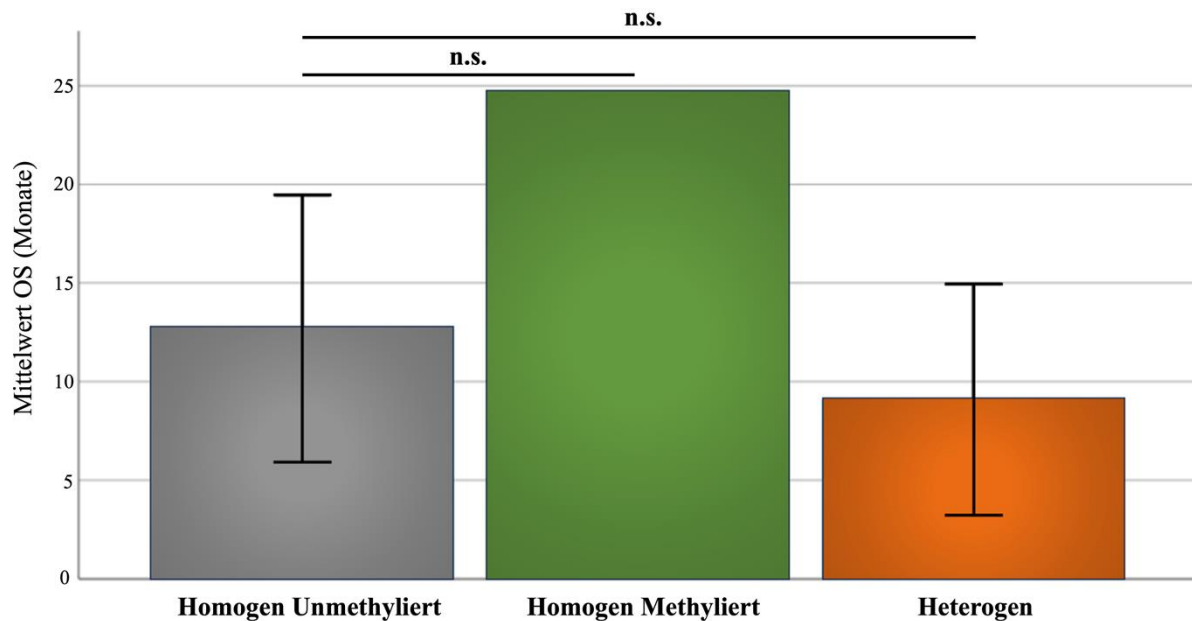


Abb. 20: OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p15*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *p15* der Testgruppe (x-Achse) im Hinblick auf den Mittelwert vom OS in Monaten (Y-Achse). OS – overall survival (Gesamtüberleben), n.s. – nicht signifikant

3.3.3 *p16*

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung von *p16* (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein PFS von 6,0 Monaten $\pm$ 5,3 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein PFS von 5,9 Monaten $\pm$ 5,2 Monaten. Individuen mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wiesen ein PFS von 7,8 Monaten $\pm$ 4,6 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das PFS ($p=0,84$).

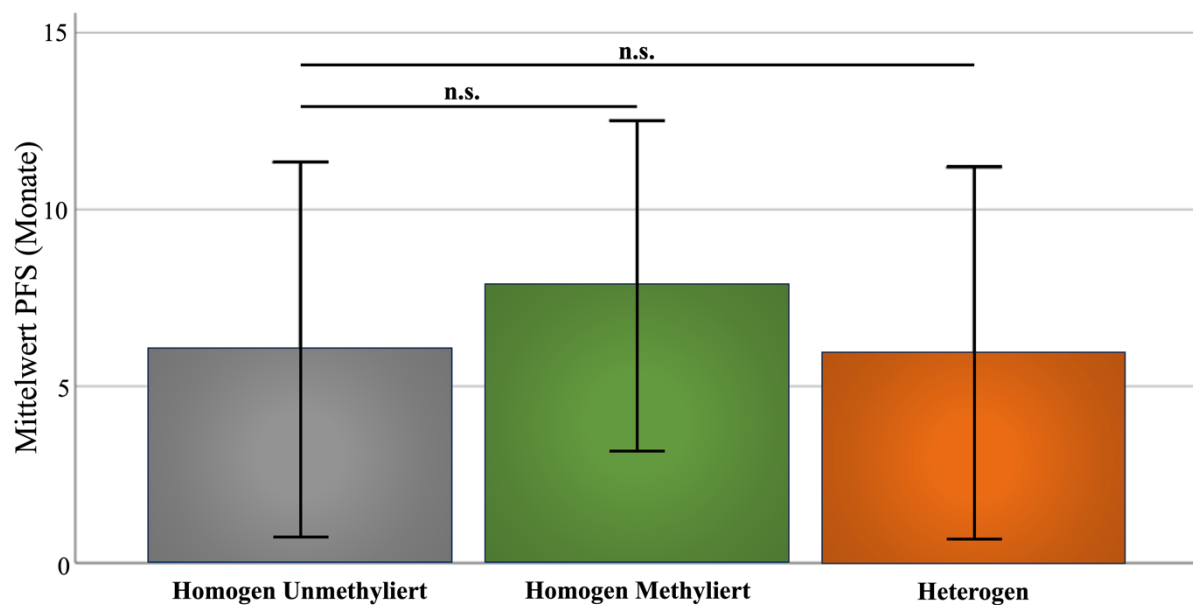


Abb. 21: PFS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p16*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *p16* der Testgruppe (x-Achse) im Hinblick auf den Mittelwert vom PFS in Monaten (Y-Achse). PFS – progression-free survival (progressionsfreie Überleben), n.s. – nicht signifikant

Patienten der Testgruppe mit einer homogenen Non-Methylierung von *p16* (alle drei Triplets nicht methyliert) hatten ein OS von 12,5 Monaten $\pm$ 6,7 Monaten. Patienten mit einer heterogenen Methylierung zeigten ein OS von 10,2 Monaten $\pm$ 7,4 Monaten. Individuen mit einer homogenen Methylierung (alle drei Triplets methyliert) wiesen ein OS von 15,1 Monaten $\pm$ 3,7 Monaten auf. Es zeigte sich in der ANOVA Analyse kein signifikanter Überlebensunterschied im Hinblick auf das OS ($p=0,44$).

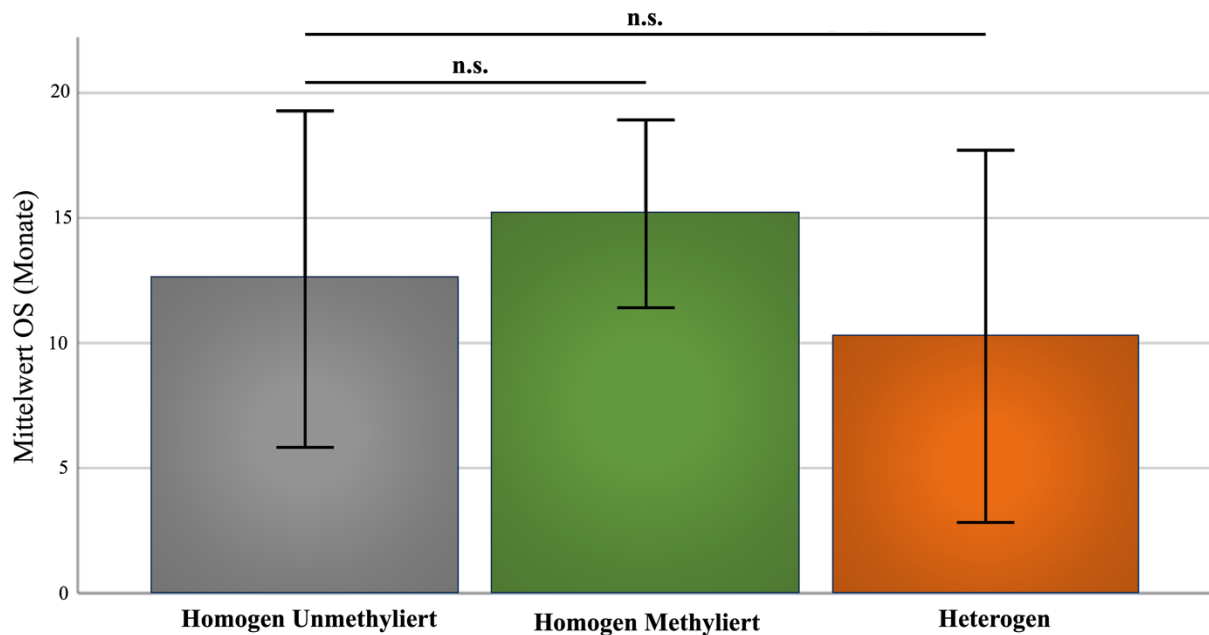


Abb. 22: OS in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *p16*. Das Säulendiagramm repräsentiert den Methylierungsstatus anhand von *p16* der Testgruppe (x-Achse) im Hinblick auf den Mittelwert vom OS in Monaten (Y-Achse). OS – overall survival (Gesamtüberleben), n.s. – nicht signifikant.

Tab. 08: Übersicht der Ergebnisse OS und PFS

MGMT	Methylierungsstatus	PFS	OS
	Homogene Non-Methylierung	5,4 Monate $\pm$ 3,8 Monate	9,6 Monate $\pm$ 4,4 Monate
	Heterogene Methylierung	7,8 Monate $\pm$ 5,7 Monate	12,8 Monate $\pm$ 6,6 Monate
	Homogene Methylierung	3 Monate $\pm$ 3,1 Monate	11,5 Monate $\pm$ 9,2 Monate
p15	Methylierungsstatus	PFS	OS
	Homogene Non-Methylierung	6,2 Monate $\pm$ 5,4 Monate	12,6 Monate $\pm$ 6,7 Monate
	Heterogene Methylierung	6,4 Monate $\pm$ 4,7 Monate	9,1 Monate $\pm$ 5,8Monate
	Homogene Methylierung	0,9 Monate	24,6 Monate
p16	Methylierungsstatus	PFS	OS
	Homogene Non-Methylierung	6 Monate $\pm$ 5,3 Monate	12,5 Monate $\pm$ 6,7 Monate
	Heterogene Methylierung	5,9 Monate $\pm$ 5,2 Monate	10,2 Monate $\pm$ 7,4 Monate
	Homogene Methylierung	7,8 Monate $\pm$ 4,6 Monate	15,1 Monate $\pm$ 3,7 Monate

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, inwieweit eine epigenetische Heterogenität spezifischer molekularer Marker beim Glioblastom auftritt und inwieweit eine solche Heterogenität mit dem Überleben vergesellschaftet ist. Um diese Fragestellung valide beantworten zu können müssen verschiedene Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Hierzu gehört zunächst, dass die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten an einem repräsentativen Patientenkollektiv erhoben wurden und somit eine zumindest prinzipielle Möglichkeit der Verallgemeinerung der vorliegenden Ergebnisse besteht. Hierbei kann festgehalten werden, dass das Test- und Referenzkollektiv der vorliegenden Studie repräsentativ ist. Eine entsprechende Repräsentativität kann angenommen werden, wenn sich das in der vorliegenden Studie eingeschlossene Patientengut im Hinblick auf seine Charakteristika wie Alter, Geschlecht, KPS, Resektionsausmaß, PFS und OS den in der Literatur publizierten Daten entspricht. Ostrom et al. Zeigten in ihrer letzten Übersichtsarbeit von 2015 bis 2019, dass GBM häufiger bei Erwachsenen auftritt als bei Kindern [55]. Das Geschlechterverhältnis ist bei etwa 1:1,6 zugunsten der Männer und das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 64,0 Jahren [55,68]. In anderen Studien wurde die Mehrheit des männlichen Geschlechts bestätigt [18,85]. Dies entspricht auch in etwa den Daten der eingeschlossenen Patienten. Hier lag das Geschlechterverhältnis im Testkollektiv bei 1:1,6 zugunsten der Männer und im Referenzkollektiv lag es bei 1:1,35 zugunsten der Männer, das Erkrankungsalter lag im Testkollektiv bei 68,7 Jahren und im Referenzkollektiv bei 65,1 Jahren. Lamborn et al. Zeigten in einer weiteren Studie mit 676 eingeschlossenen diagnostizierten GBM-Patienten, dass die Mehrheit der Patienten einen KPS zwischen 80-90 Punkten aufweist [39]. Dies spiegelte sich auch in der vorliegenden Arbeit wider, da der mediane KPS bei Diagnosestellung im Testkollektiv 80 Punkte und im Referenzkollektiv 90 Punkte betrug. Seyve et al. Zeigten in ihrer Arbeit, dass von 229 eingeschlossenen Patienten, bei 27% der Patienten eine GTR und bei 58% der Patienten eine STR erreicht werden konnte [61]. Die erhobenen Daten der Arbeit zeigte auch eine Mehrheit der erreichten STR bei den Patienten in beiden Kollektiven. Daher sind unsere Kollektive auch in dieser Hinsicht als repräsentativ anzusehen.

4.1.2 MS-PCR

Eine weitere entscheidende Grundvoraussetzung zur Validierung der dargestellten Ergebnisse ist die zuverlässige Bestimmung des Methylierungsstatus. Die hier verwendete MS-PCR kann dies sicherstellen. Die MS-PCR stellt eine der ältesten und damit auch etabliertesten Methodiken dar, um spezifische Promotor-Loci zu bestimmen. Bereits Herman et al. Entwickelten im Jahre 1996 die Methodik der Analyse der DNA-Methylierung mittels MS-PCR, wobei es zu einer selektiven Amplifikation von methylierten und unmethylierten Allelen kommt [29,30]. Die MS-PCR ermöglicht eine Methylierungsanalyse aller CpG-Stellen und nicht nur die, die durch die methylierungsspezifischen Restriktionsenzyme erkannt werden können. Herman et al. Bestätigte die hohe Sensitivität der MS-PCR, da bereits bei 0,1% (50 pg einer methylierten DNA von insgesamt 50 ng DNA) methylierten Allelen die Probe als methyliert erkannt wird [14,19,29]. Tierling et al. Wiederum zeigten in Ihrer Studie, dass die MSP-Primer der Hersteller Esteller- und Felsberg sich in verschiedenen Methylierungsdomänen gruppierten, sodass es einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Methylierungshäufigkeit gab. Dies zeigte sich anhand von Methylierungsanalysen von 22 Tumoren, welche durch Verwendung unterschiedlicher Primer-Hersteller zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Unter Verwendung des Esteller-Primerpaares wurden 13 von 22 Proben als methyliert detektiert. Demgegenüber detektierte eine Verwendung des Felsburg-Primerpaares nur in neun von 22 Proben eine Methylierung. [69].

Alternativ besteht die Möglichkeit die Methylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung durchzuführen [31]. Die Methodik wurde von Nyrén et al. Entwickelt und basiert auf dem Prinzip der „Sequenzierung bei Synthesis“ (engl. *Sequencing-by-synthesis*), wodurch es möglich ist den komplementären Strang anhand der Nukleotidabfolge nacheinander zu detektieren [52]. Hierfür werden vier unterschiedliche dNTP's, je nach zu untersuchenden Nukleotiden verwendet. Wenn eines der dNTP's komplementär zum Strang ist, wird es durch die Polymerase eingebaut und Pyrophosphationen (Ppi) werden abgespalten, wodurch eine Kaskade ausgelöst wird und messbare Lichtblitze entstehen. Jedoch ist die Methodik wesentlich arbeitsintensiver und mit höheren Kosten verbunden [64]. Als weitere Möglichkeit der Methylierungsanalysen dienen die Methylierungsarrays, wobei DNA-Chips in der Lage sind, tausende von Genen gleichzeitig zu bestimmen und somit genomweit den Methylierungsstatus erheben können [4]. Durch die Anwendung der MS-PCR ist es möglich Methylierungsvorgänge einzelner Promotorbereiche von bestimmten Genen, welche sich insbesondere im Bereich der CpG-Inseln befinden, zu detektieren. Zudem ist es

durch die MS-PCR möglich mit einer geringen Menge an DNA den Methylierungsstatus zu erheben [12]. Da die in dieser Studie zu untersuchenden Methylierungsloci allesamt bekannt waren und kein Profiling des gesamten Genoms notwendig war, war die MS-PCR auch im Hinblick auf ökonomische Abwägungen die ideale zu verwendende Methodik.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Frage zu beantworten inwieweit eine intra-tumorale Heterogenität im Hinblick auf die Methylierungsloci *MGMT*, *p15* und *p16* beim GBM vorliegt.

Bevor zu dem Thema Heterogenität Stellung genommen werden kann, müssen bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zu diesen Grundvoraussetzungen zählen, dass alle Proben histologisch über 70% vitales Tumorgewebe aufweisen, sodass sichergestellt werden kann, dass keine Anteile von Nekrose oder Penumbra entnommen wurden. Anderweitig wäre keine valide Beurteilung der Ergebnisse möglich. Eine weitere Grundvoraussetzung der Arbeit ist die Beachtung der Methylierungshäufigkeiten in den einzelnen Proben der Kollektive und der Gruppen. Eine grundsätzliche Hypermethylierung führt logischerweise automatisch zu einer größeren Anzahl an homogen methylierten Fällen aufgrund der statistischen Wahrscheinlichkeit. Ähnliches gilt für ein Kollektiv in dem kaum Methylierungen vorliegen. Hier wäre eher eine homogene Non-Methylierung nachzuweisen. In beiden Fällen wäre die Wahrscheinlichkeit für eine Heterogenität innerhalb eines Triplets aber vermindert. Somit spielt die Methylierungshäufigkeit in den einzelnen Proben einen entscheidenden Faktor in Bezug auf den Nachweis der Heterogenität. Aus unseren erhobenen Daten der Methylierungsanalyse vom Testkollektiv, zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Methylierungshäufigkeiten in Bezug auf die unterschiedlichen Gene. In der Testgruppe wurde bei fast der Hälfte der Proben eine *MGMT*-Promotormethylierung festgestellt, wohingegen Promotormethylierungen von *p15* und *p16* weniger präsent waren. Urbschat et al. Zeigten in weiteren Methylierungsanalysen bereits, dass die Häufigkeit der Methylierungsereignisse zwischen den verschiedenen Genen variiert. In deren Methylierungsanalyse zeigte sich auch eine vermehrte Methylierung von *MGMT* verglichen zu *p15* und *p16* [71]. Hegi et al. Untersuchten *MGMT*-Promotor Methylierungen bei 206 GBM-Proben und stellten bei fast der Hälfte der Proben eine Methylierung fest [28]. Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Methylierungshäufigkeiten in der vorliegenden Studie in etwa denen in der Literatur entsprechen.

Durch die Datenerhebung der Triplets der Testgruppe konnte gezeigt werden, dass eine intra-tumorale Heterogenität vorliegt. Dies betrifft die Loci *MGMT*, *p15* und *p16* gleichermaßen. Bereits Liesche-Starnecker et al. Bestätigten eine intra-tumorale Heterogenität ihrer immunhistochemischen Analyse von 38 GBM-Patienten.

Die immunhistochemischen Analysen beinhaltet Expressionen von ALDH1A3, EGFR, GFAP, Iba1, Olig2, p53 und Mib1 wodurch die einzelnen Tumore durch Cluster-Methoden in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt wurden [40]. Parker et al. Bestätigten in ihrer Methylierungsanalyse von 14 GBM-Proben, dass eine intra-tumorale Heterogenität von *MGMT*-Promotor Methylierungen vorliegt. Hierbei zeigte sich in zwei von 14 Fällen (14%) eine intra-tumorale Heterogenität von *MGMT* in den einzelnen Proben [56]. Im Gegenzug dazu zeigt die vorliegende Arbeit eine Heterogenitätsrate bei *MGMT* von 52,9%. Im Hinblick auf *p15* betrug die Heterogenitätsrate 35,3% und bei *p16* zeigte sich eine Heterogenitätsrate von 44,1%. Die Hypothese, dass es eine intra-tumorale Heterogenität gibt, wird durch unsere, größere Studie in der 52,9% der Heterogenitätsrate bei *MGMT* vorlag sowie in 35,3% bei *p15* und in 44,1% bei *p16* gestützt. Interessanterweise scheint eine Heterogenität in einem Methylierungslocus nicht zwingenderweise mit einer Methylierung in einem anderen Methylierungslocus vergesellschaftet zu sein.

Um die inter-tumorale Heterogenität quantifizieren zu können, wurde die Referenzgruppe im nächsten Schritt als Maßstab und somit als Baseline für die intra-tumorale Heterogenität herangezogen. Anhand der Referenzgruppe und somit der inter-tumoralen Heterogenität lässt sich die intra-tumorale Heterogenität quantifizieren. Dieses statistische Modell wurde für die vorliegende Arbeit entwickelt und ist neu.

Um diesen Vergleich machen zu können ist wieder eine in etwa gleiche Auftretenswahrscheinlichkeit für Methylierungen innerhalb der Test- und Referenzkollektiv notwendig, aus oben dargelegten Gründen. Durch die erhobenen Daten zeigt sich, dass die Methylierungshäufigkeit von *MGMT*-Promotor und *p15*-Promotor einzelner Proben zwischen dem Testkollektiv und dem Referenzkollektiv vergleichbar sind. Dadurch, dass die Promotor Methylierungen hinsichtlich *p16* zwischen den Kollektiven variiert, muss allerdings bei diesem Locus die Schlussfolgerung im Hinblick auf die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Heterogenität zwischen beiden Gruppen kritisch hinterfragt werden.

4.2.1 Ergebnisse *MGMT*

In den erhobenen Daten der Methylierungsanalysen zeigte sich vor allem in der Referenzgruppe von *MGMT* eine signifikant vermehrte Heterogenität im Vergleich zur Testgruppe. Die Heterogenität von *MGMT* betrug in der Testgruppe 52,9% und in der Referenzgruppe 82,5%. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die inter-tumorale Heterogenität von *MGMT* ausgeprägter

ist als die intra-tumorale. Gempt et al. Bestätigten in Ihrer Arbeit, dass eine intratumorale Heterogenität vorhanden ist, jedoch war diese nur in neun von 56 Patienten nachzuweisen. In deren Arbeit variierte die Anzahl der Biopsien von zwei bis neun pro Patient, sodass das Ausmaß der intratumoralen Heterogenität bei nur zwei untersuchten Proben unterschätzt werden könnte [21].

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Frage zu beantworten, inwieweit der Ausprägungsgrad der Heterogenität im Hinblick auf die Methylierung von *MGMT* mit dem Überleben korreliert. Wir konnten in Hinblick auf die Methylierungsloci *MGMT* keinen Nachweis erbringen, dass eine wie auch immer geartete Heterogenität mit dem Überleben vergesellschaftet war. Hegi et al. Zeigten bereits, dass eine Methylierung des *MGMT*-Promotors mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht, da eine Methylierung des *MGMT*-Promotors mit einem besseren Ansprechen von TMZ vergesellschaftet ist [28]. In der genannten Studie wurde anhand einer Tumorprobe der Methylierungsstatus erhoben. Dementsprechend gab es nur methylierte Tumorproben oder nicht methylierte Tumorproben. Die intra-tumorale Heterogenität wurde in der Studie nicht berücksichtigt. Die Erkenntnis, dass eine Methylierung des *MGMT*-Promotors mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht, steht in scheinbarem Widerspruch zu den vorliegenden Daten dieser Dissertation, in der dieser Effekt nicht nachgewiesen werden konnte. Ein Grund dieser Diskrepanz könnte sein, dass in der Studie von Hegi et al. Die intra-tumorale Heterogenität nicht berücksichtigt wurde. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Fallzahl in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die *MGMT* homogene Methylierung und homogene Non-Methylierung vs. Heterogene Methylierung zu klein ist.

4.2.2 Ergebnisse *p15*

Anhand der erhobenen Daten bezüglich der Heterogenität von *p15* war die Heterogenität in der Test- und Referenzgruppe nicht signifikant ausgeprägt. Es lässt sich somit kein statistischer Unterschied in der Heterogenität zwischen Triplets der Test- und Referenzgruppe nachweisen. Somit scheint es bei *p15* keinen Unterschied für die Heterogenität intra- und inter-tumoral zu geben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Hinblick auf *p15* eine Unterscheidung dreier Proben desselben Patienten von drei Proben von unterschiedlichen Patienten nicht möglich ist. Durch die vorliegende Arbeit zeigt sich, dass eine intra-tumorale Heterogenität vorhanden ist und durch diese Methode auch quantifizierbar ist. Außerdem zeigte sich, dass das Ausmaß der

intra-tumoralen Heterogenität mit dem Ausmaß der inter-tumoralen Heterogenität vergleichbar ist.

4.2.3 Ergebnisse *p16*

Im Hinblick auf *p16* könnte dies zunächst auch festgehalten werden, jedoch muss hier noch einmal kritisch darauf hingewiesen werden, dass die Auftrittswahrscheinlichkeit einer Methylierung zwischen dem Referenz- und Testkollektiv signifikant unterschiedlich ausgeprägt war. Hung et al. Zeigten in ihrer Arbeit, dass eine *p16*-Expression zu einer Reduktion des Tumorwachstums und zur Reduktion der Koloniebildung in vitro führte. Zudem wurde eine immunhistochemische Färbung von der Vektorkontrolle (pCL-Virus) und *p16*-Retrovirus in situ Tumoren untersucht. Hierfür wurden die PCNA-Antikörper, die gegen das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) gerichtet sind hinzugezogen. Der PCNA-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und -Replikation, sodass PCNA-Antikörper verwendet werden, um die Proliferationsrate von Zellen in Gewebeproben zu bestimmen. Der mit *p16* injizierte Tumor zeigte sich negativ für die PCNA-Färbung. Darüber hinaus wurde eine ausgeprägte Tumornekrose in den mit *p16* injizierten Tumoren festgestellt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass eine homogene Methylierung vs. Eine homogene Non-Methylierung keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des PFS und OS darstellte. Auch eine heterogene Methylierung zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Divergenz der Studie von Hung et al. Und der vorliegenden Arbeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Mechanismus der Tumorgenese komplex ist und dass das Tumorsuppressorgen *p16* nicht allein ausschlaggebend ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Hinblick auf *p15* und *p16* eine Unterscheidung dreier Proben desselben Patienten von drei Proben von unterschiedlichen Patienten nicht möglich ist. Durch die vorliegende Arbeit zeigt sich, dass eine intra-tumorale Heterogenität vorhanden ist und durch diese Methode auch quantifizierbar ist. Außerdem zeigte sich, dass das Ausmaß der intra-tumorale Heterogenität mit dem Ausmaß der inter-tumoralen Heterogenität vergleichbar ist.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit für die Methylierungsloci *p15* und *p16* mit heterogenem Erscheinungsbild kein signifikanter Einfluss auf das Überleben gezeigt werden.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis für eine epigenetische intra-tumorale Heterogenität betreffend spezifischer Methylierungsloci erbracht werden. Dies steht in gewissem Widerspruch zur gängigen klinischen Praxis die molekularen Charakteristika des GBM anhand einer Probe aus dem Tumor zu bestimmen und anschließend auf die Gesamtheit ebendiesen zu generalisieren.

Auch wenn am ehesten aufgrund der Fallzahl der vorliegenden Kohorte, ein direkter Nachweis des Einflusses dieser Heterogenität auf das Überleben der Patienten nicht erbracht werden konnte, ist allein der Nachweis der Existenz dieser Heterogenität von Relevanz.

Prinzipiell sollte für die Zukunft diskutiert werden, ob mehrfache Biopsien aus unterschiedlichen Tumorbereichen nicht ein realistischeres Faksimile des Tumors liefern als dies bei singulären Proben der Fall ist. Epigenetische Charakteristika und prinzipiell auch weitere molekulare Eigenschaften könnten so deutlich treffsicherer erfasst werden. Ein solches Vorgehen ist jedoch mit einem deutlich höheren analytischen Aufwand pro Patienten vergesellschaftet, da mit mehrfachen Proben auch der Arbeitsaufwand linear ansteigt.

Es bleibt zu hoffen, dass eine exaktere molekulare Charakterisierung und damit optimierte Therapiestratifizierung sich in einer zukünftigen Prognosebesserung dieser aggressiven Erkrankung niederschlägt.

5. Literatur

1. Abd-Elghany AA, Naji AA, Alonazi B, Aldosary H, Alsufayan MA, Alnasser M, Mohammad EA, Mahmoud MZ (2019) Radiological characteristics of glioblastoma multiforme using CT and MRI examination. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 12:289–293
2. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116:597–602
3. Barker FG, Chang SM, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB, Prados MD (2001) Age and radiation response in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 49:1288–1297; discussion 1297-1298
4. Bibikova M, Fan J-B (2010) Genome-wide DNA methylation profiling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:210–223
5. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya R, Glantz M (2016) Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2:1460–1469
6. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* 59:1169–1180
7. Christoph S, Alicia S, Fritz T, Vanessa T, Ralf K, Jin KY, Stefan L, Joachim O (2023) The intra-tumoral heterogeneity in glioblastoma - a limitation for prognostic value of epigenetic markers? *Acta Neurochir (Wien)* 165:1635–1644
8. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990–2997
9. Colopi A, Fuda S, Santi S, Onorato A, Cesarini V, Salvati M, Balistreri CR, Dolci S, Guida E (2023) Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. *Mech Ageing Dev* 211:111801
10. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462:739–744
11. Davies AM, Weinberg U, Palti Y (2013) Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1291:86–95
12. Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy.

Cell 150:12–27

13. Deans C, Maggert KA (2015) What do you mean, „epigenetic“? *Genetics* 199:887–896
14. Derks S, Lentjes MHFM, Hellebrekers DMEI, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M (2004) Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol* 26:291–299
15. Diener H-C, Deuschl G, Hopf HC, Reichmann H, Bode U, Broich K, Engenhart-Cabilic R, Fleischhack G, Hütter B-O, Jacobs A, Kristof RA, Penkert G, Reifenberger G, Schackert G, Schlegel U, Schramm J, Sepehrnia A, Solymosi L, Sturm V, Tonn J-C, Urbach H, Voges J, Voltz R, Weller M, Westphal M, Wiestler OD, Winking M, Winkler D (2003) *Neuroonkologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
16. Ding Y, Le X-P, Zhang Q-X, Du P (2003) Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 9:423–426
17. DOBRAN M, NASI D, CHIRIATTI S, GLADI M, di SOMMA L, IACOANGELI M, SCERRATI M (2018) Prognostic Factors in Glioblastoma: Is There a Role for Epilepsy? *Neurol Med Chir (Tokyo)* 58:110–115
18. Dobran M, Nasi D, Della Costanza M, Gladi M, Iacoangeli M, Rotim K, Splavski B (2019) Characteristics of treatment and outcome in elderly patients with brain glioblastoma: a retrospective analysis of case series. *Acta Clin Croat* 58:221–228
19. Feng H, Shao W, Du L, Qing X, Zhang Z, Liang C, Liu D (2020) Detection of SHOX2 DNA methylation by methylation-specific PCR in non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res* 9:6070–6077
20. Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261–282
21. Gempt J, Withake F, Aftahy AK, Meyer HS, Barz M, Delbridge C, Liesche-Starnecker F, Prokop G, Pfarr N, Schlegel J, Meyer B, Zimmer C, Menze BH, Wiestler B (2022) Methylation subgroup and molecular heterogeneity is a hallmark of glioblastoma: implications for biopsy targeting, classification and therapy. *ESMO Open* 7:100566
22. Gempt J, Withake F, Aftahy AK, Meyer HS, Barz M, Delbridge C, Liesche-Starnecker F, Prokop G, Pfarr N, Schlegel J, Meyer B, Zimmer C, Menze BH, Wiestler B (2022) Methylation subgroup and molecular heterogeneity is a hallmark of glioblastoma: implications for biopsy targeting, classification and therapy. *ESMO Open* 7:100566
23. Goodenberger ML, Jenkins RB (2012) Genetics of adult glioma. *Cancer Genet* 205:613–621
24. Green MR, Sambrook J (2018) The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold*

Spring Harb Protoc 2018:

25. Hadjipanayis CG, Stummer W (2019) 5-ALA and FDA Approval for Glioma Surgery. *J Neurooncol* 141:479–486
26. Hanada T, Sato T, Arioka M, Uramoto M, Yamasaki M (1996) Purification and characterization of a 15 kDa protein (p15) produced by *Helicosporium* that exhibits distinct effects on neurite outgrowth from cortical neurons and PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 228:209–215
27. Hayatsu H (2008) Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84:321–330
28. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997–1003
29. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821–9826
30. Hernández HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA (2013) Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *Biotechniques* 55:181–197
31. Higashimoto K, Hara S, Soejima H (2023) DNA Methylation Analysis Using Bisulfite Pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2577:3–20
32. Iorgulescu JB, Gokhale PC, Speranza MC, Eschle BK, Poitras MJ, Wilkens MK, Soroko KM, Chhoeu C, Knott A, Gao Y, Lim-Fat MJ, Baker GJ, Bonal DM, Nguyen Q-D, Grant GRL, Ligon KL, Sorger PK, Chiocca EA, Anderson AC, Kirschmeier PT, Sharpe AH, Freeman GJ, Reardon DA (2021) Concurrent Dexamethasone Limits the Clinical Benefit of Immune Checkpoint Blockade in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 27:276–287
33. Jung V, Romeike BF, Henn W, Feiden W, Moringlane JR, Zang KD, Urbchat S (1999) Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:993–999
34. Khan I, Waqas M, Shamim MS (2017) Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *J Pak Med Assoc* 67:816–817
35. Kim Y-H, Kim T, Joo J-D, Han JH, Kim YJ, Kim IA, Yun C-H, Kim C-Y (2015) Survival benefit of levetiracetam in patients treated with concomitant chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide for glioblastoma multiforme. *Cancer* 121:2926–

2932

36. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y (2004) Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res* 64:3288–3295
37. Krebber AMH, Buffart LM, Kleijn G, Riepma IC, de Bree R, Leemans CR, Becker A, Brug J, van Straten A, Cuijpers P, Verdonck-de Leeuw IM (2014) Prevalence of depression in cancer patients: a meta-analysis of diagnostic interviews and self-report instruments. *Psychooncology* 23:121–130
38. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95:190–198
39. Lamborn KR, Yung WKA, Chang SM, Wen PY, Cloughesy TF, DeAngelis LM, Robins HI, Lieberman FS, Fine HA, Fink KL, Junck L, Abrey L, Gilbert MR, Mehta M, Kuhn JG, Aldape KD, Hibberts J, Peterson PM, Prados MD, North American Brain Tumor Consortium (2008) Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 10:162–170
40. Liesche-Starnecker F, Mayer K, Kofler F, Baur S, Schmidt-Graf F, Kempter J, Prokop G, Pfarr N, Wei W, Gempt J, Combs SE, Zimmer C, Meyer B, Wiestler B, Schlegel J (2020) Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 12:2964
41. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D (2007) Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 99:1544–1550
42. Liu J, Li C, Wang Y, Ji P, Guo S, Zhai Y, Wang N, Lou M, Xu M, Chao M, Jiao Y, Zhao W, Feng F, Qu Y, Ge S, Wang L (2022) Prognostic and Predictive Factors in Elderly Patients With Glioblastoma: A Single-Center Retrospective Study. *Front Aging Neurosci* 13:777962
43. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO (2008) Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol* 10:25–36
44. Loeper S, Romeike BF, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschat S (2001) Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogeneous glioblastomas. *Cytogenet Cell Genet* 94:1–8
45. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW (2021) The

2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23:1231–1251

46. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R, Nordic Clinical Brain Tumour Study Group (NCBTSG) (2012) Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:916–926
47. Masselli A, Wang JYJ (2006) Phosphorylation site mutated RB exerts contrasting effects on apoptotic response to different stimuli. *Oncogene* 25:1290–1298
48. Mikkelsen VE, Solheim O, Salvesen Ø, Torp SH (2021) The histological representativeness of glioblastoma tissue samples. *Acta Neurochir (Wien)* 163:1911–1920
49. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, Zhang Y, Phillips JJ, Shai A, Lafontaine M, Crane J, Chandra A, Flanigan P, Jahangiri A, Cioffi G, Ostrom Q, Anderson JE, Badve C, Barnholtz-Sloan J, Sloan AE, Erickson BJ, Decker PA, Kosel ML, LaChance D, Eckel-Passow J, Jenkins R, Villanueva-Meyer J, Rice T, Wrensch M, Wiencke JK, Oberheim Bush NA, Taylor J, Butowski N, Prados M, Clarke J, Chang S, Chang E, Aghi M, Theodosopoulos P, McDermott M, Berger MS (2020) Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol* 6:495–503
50. Mugge L, Mansour TR, Crippen M, Alam Y, Schroeder J (2020) Depression and glioblastoma, complicated concomitant diseases: a systemic review of published literature. *Neurosurg Rev* 43:497–511
51. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* 15:6002–6007
52. Nyrén P, Pettersson B, Uhlén M (1993) Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* 208:171–175
53. Ochs K, Kaina B (2000) Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 60:5815–5824
54. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764–772
55. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2017) CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central

- nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol* 19:v1–v88
56. Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, Zhu Y, Cheng ZJ, Vafaee F, Chen J, Wheeler HR, Howell VM (2016) Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep* 6:22477
57. Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA (2007) Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)* 6:1071–1078
58. Philips A, Henshaw DL, Lamburn G, O’Carroll MJ (2018) Brain Tumours: Rise in Glioblastoma Multiforme Incidence in England 1995-2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. *J Environ Public Health* 2018:7910754
59. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES (2012) Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* 130:1715–1725
60. Richard S, Tachon G, Milin S, Wager M, Karayan-Tapon L (2020) Dual MGMT inactivation by promoter hypermethylation and loss of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma. *Cancer Med* 9:6344–6353
61. Seyve A, Lozano-Sanchez F, Thomas A, Mathon B, Tran S, Mokhtari K, Giry M, Marie Y, Capelle L, Peyre M, Carpentier A, Feuvret L, Sanson M, Hoang-Xuan K, Honnorat J, Delattre J-Y, Ducray F, Idhah A (2020) Initial surgical resection and long time to occurrence from initial diagnosis are independent prognostic factors in resected recurrent IDH wild-type glioblastoma. *Clin Neurol Neurosurg* 196:106006
62. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27–36
63. Simon M, Köster G, Ludwig M, Mahlberg R, Rho S, Watzka M, Schramm J (2001) Alternative splicing of the p15 cdk inhibitor in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 102:167–174
64. Siqueira JF, Fouad AF, Rôças IN (2012) Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol* 4:
65. Stieglitz LH (2016) [How Reliable is Neuronavigation?]. *Praxis (Bern 1994)* 105:213–220
66. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
67. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idhah

- A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, Zhu J-J, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim C-Y, Paek S-H, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z (2017) Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318:2306–2316
68. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:1985–1996
69. Tierling S, Jürgens-Wemheuer WM, Leismann A, Becker-Kettern J, Scherer M, Wrede A, Breuskin D, Urbschat S, Sippl C, Oertel J, Schulz-Schaeffer WJ, Walter J (2022) Bisulfite profiling of the MGMT promoter and comparison with routine testing in glioblastoma diagnostics. *Clin Epigenetics* 14:26
70. Tollefsbol T (2011) *Handbook of Epigenetics The New Molecular and Medical Genetics*. 1st Edition edition. Academic Press, London
71. Urbschat S, Sippl C, Engelhardt J, Kammers K, Oertel J, Ketter R (2017) Importance of biomarkers in glioblastomas patients receiving local BCNU wafer chemotherapy. *Mol Cytogenet* 10:16
72. Virchow R (1966) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Hildesheim. Georg Olms
73. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H (2018) Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell* 34:186–195
74. Wang J, Ma Y, Cooper MK (2013) Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. *Transl Cancer Res* 2:429–441
75. Wang Y, Zhang J, Li W, Jiang T, Qi S, Chen Z, Kang J, Huo L, Wang Y, Zhuge Q, Gao G, Wu Y, Feng H, Zhao G, Yang X, Zhao H, Wang Y, Yang H, Kang D, Su J, Li L, Jiang C, Li G, Qiu Y, Wang W, Wang H, Xu Z, Zhang L, Wang R (2021) Guideline conformity to the Stupp regimen in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme in China. *Future Oncol* 17:4571–4582
76. Wemmert S, Bettscheider M, Alt S, Ketter R, Kammers K, Feiden W, Steudel W-I, Rahnenführer J, Urbschat S (2009) p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients. *Int J Oncol* 34:1743–1748
77. Wick W, Bendszus M, Goldbrunner R, Hattingen E, Hau P, Herrlinger U, Kessler T, Platten M, Pukrop T, Reifenberger G, Sahm F, Schaaf S, Schlegel U, Steinbach J, Stockhammer G, Stummer W, Tabatabai G, Tonn JC, Weller M (2021) Gliome – Leitlinien

- für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie
78. Witkiewicz AK, Kumarasamy V, Sanidas I, Knudsen ES (2022) Cancer cell cycle dystopia: heterogeneity, plasticity, and therapy. *Trends Cancer* 8:711–725
79. Witulla B, Goerig N, Putz F, Frey B, Engelhorn T, Dörfler A, Uder M, Fietkau R, Bert C, Laun FB (2020) On PTV definition for glioblastoma based on fiber tracking of diffusion tensor imaging data. *PLoS One* 15:e0227146
80. Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Sethi S, Benninger MS (2006) Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:409–415
81. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao M-T, Liu L, Jiang W, Liu J, Zhang J, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu Y, Lei Q, Guan K-L, Zhao S, Xiong Y (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19:17–30
82. Youngblood MW, Stupp R, Sonabend AM (2021) Role of Resection in Glioblastoma Management. *Neurosurg Clin N Am* 32:9–22
83. Yuile A, Satgunaseelan L, Wei JQ, Rodriguez M, Back M, Pavlakis N, Hudson A, Kastelan M, Wheeler HR, Lee A (2023) CDKN2A/B Homozygous Deletions in Astrocytomas: A Literature Review. *Curr Issues Mol Biol* 45:5276–5292
84. Zhang L, Lu Q, Chang C (2020) Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol* 1253:3–55
85. Zhu P, Du XL, Lu G, Zhu J-J (2017) Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget* 8:44015–44031

6. Publikationen

Sippl C, Saenz A, Teping F, Trenkpohl V, Ketter R, Kim Y, Linsler S, Oertel J

The intra-tumoral heterogeneity in glioblastoma – a limitation for prognostic value of epigenetic markers?

Acta Neurochir (Wien). 2023 Jun;165(6):1635-1644.doi: 10.1007/s00701-023-05594-7. Epub 2023 Apr 21.

Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) Kongress 2022 in Köln, Deutschland

The intra-tumoral heterogeneity in glioblastoma – a limitation for prognostic value of epigenetic markers?

Sippl C, Saenz A, Teping F, Trenkpohl V, Ketter R, Kim JY, Oertel J, Urbschat S

7. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Univ. -Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Möglichkeit die Dissertation an der Klinik für Neurochirurgie zu erstellen und der Überlassung von diesem spannenden Thema.

Außerdem möchte ich mich bei der Leiterin des neurochirurgischen Forschungslabors Frau Prof. Dr. rer. Nat. Steffi Urbschat für die Unterstützung bedanken. Zudem bedanke ich mich bei Frau Sigrid Welsch für die Hilfestellungen während der Durchführung der Experimente im Labor.

Vor allem aber gebührt meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Sippl besonderer Dank für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Er hat sich immer Zeit für die Dissertation genommen und weitere Hilfestellungen gegeben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken. Meinem Partner Felix danke ich vom Herzen für seinen Glauben an mich, etlichen Hilfestellungen und seinen enormen Rückhalt. Meiner Schwester Stephanie, welche nicht nur Schwester, sondern auch zugleich beste Freundin ist und mich in jeder Situation unterstützt. Meinen Eltern, Monika und Helmut, welche mir dieses Studium ermöglicht haben und mir zeigen wie wichtig der Rückhalt und die Liebe einer Familie ist. Danke, für alles, was ihr für mich getan habt.

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