

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Michael Synowitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Langzeit-Krankheitsverläufe von Patient/-innen mit WHO-Grad 3-Gliom
in Abhängigkeit von dem postoperativen Therapieprozedere**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Daniel Kiese
aus Kiel

Kiel (2024)

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Michael Synowitz

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Olav Jansen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2025

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 07.11.2024

gez.: Prof. Dr. Michael Synowitz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für Astrid

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Klinik und Diagnostik	1
1.1.3	Therapieoptionen	4
	1.1.3.1 Operative Verfahren	4
	1.1.3.2 Radiotherapie	4
	1.1.3.3 Medikamentöse zytostatische Therapie	5
	1.1.3.4 Radio-/Chemotherapie	5
1.2	Definition und Klassifikation	6
1.2.1	Histologische Klassifikation und WHO-Grading	6
1.2.2	Molekulargenetische Eigenschaften	7
	1.2.2.1 Die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)	7
	1.2.2.2 Die O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)	9
	1.2.2.3 Die 1p/19q-Codeletion	10
1.3	WHO-Grad III-Gliome	11
1.3.1	Das anaplastische Astrozytom	12
1.3.2	Das anaplastische Oligodendrogliom	12
1.3.3	Das anaplastische Oligoastrozytom	13
1.4	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Patientenkollektiv	14
2.1.2	Tumorgewebe	14
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Gebrauchsfertige Reagenzsysteme und Primer	15

2.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.6	Puffer und Lösungen	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	DNA-Präparation	20
2.2.1.1	DNA-Isolation	20
2.2.1.2	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	21
2.2.1.3	Bisulfit-Reaktion	22
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.3	Gel-Elektrophorese	25
2.2.4	Pyrosequenzierung	25
2.2.5	MLPA-Untersuchung	29
2.2.5.1	Denaturierung	29
2.2.5.2	Hybridisierung, Ligation und Amplifikation	30
2.2.5.3	Fragment-Separation mittels Kapillarelektrophorese	30
2.3	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Patientencharakteristika	32
3.2	Analyse der molekulargenetischen Marker	33
3.2.1	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)	33
3.2.2	Isocitrat Dehydrogenase 1/2 (IDH1/2)	33
3.2.3	1p/19q-Codeletion	33
3.3	Einteilung der Tumorentitäten	33
3.4	Überlebenszeitanalyse	35
3.4.1	Soziodemographische und klinische Einflussfaktoren	35
3.4.2	Molekulargenetische Untersuchungen	42
3.4.3	Tumorentitäten	45
3.4.4	Postoperatives Therapieschema	47

4	Diskussion	59
4.1	Molekulargenetische Untersuchungsmethoden	59
4.2	Soziodemographische und klinische Einflussfaktoren	60
4.3	Die Tumorgenetik und -entität	61
4.4	Das postoperative Therapieschema	62
4.5	Der Stellenwert der molekulargenetischen Diagnosekriterien	64
4.6	Die Bedeutung der Ergebnisse für die Fragestellung dieser Arbeit	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	68
7	Anlagen	75
7.1	Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

AA	Anaplastisches Astrozytom
AGT	O6-alkylguanin DNA-Alkyltransferase
AO	Anaplastisches Oligodendrogliom
ATRX	ATP-abhängige Helikase ATRX
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D2HG	D-2-Hydroxyglutarat
DNA	"Deoxyribonucleic acid" / Desoxyribonukleinsäure
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
HIF1 α	Hypoxie-induzierten Faktor 1 alpha
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KOF	Körperoberfläche
KPS	"Karnofsky-Performance-Scale"
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLPA	„multiplex ligation-dependent probe amplification“
MRT	Magnetresonanztomographie
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOS	„not otherwise specified“
PCR	"polymerase-chainreaction"
Rad	"radiation absorbed dose"
rpm	"revolutions per minute"
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
α KG	α -Ketoglutarat

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kraniales MRT eines Oligodendroglioms WHO Grad 3.	2
Abb. 2: Kraniales MRT eines Astrozytoms WHO Grad 3.	3
Abb. 3: IDH-Mutationen und ihre Häufigkeiten.	8
Abb. 4: Reaktionsprodukte der Wildtyp- und mutierten Isocitrat-Dehydrogenase	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der MGMT-vermittelten DNA-Reparatur.	10
Abb. 6: Vereinfachter diagnostischer Algorithmus zur Einteilung astrozytärer und oligodendriogliale Tumoren.	11
Abb. 7: Schematische Darstellung der DNA-Isolation. Abb. aus QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook [58] © QIAGEN, all rights reserved.	21
Abb. 8: Auswertung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (keine erhöhte Promotor-Methylierung).	27
Abb. 9: Auswertung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (erhöhte Promotor-Methylierung).	27
Abb. 10: Auswertung des IDH-Mutationsstatus (IDH-Wildtyp).	28
Abb. 11: Auswertung des IDH-Mutationsstatus (IDH-Mutation).	28
Abb. 12: Tabellarische Darstellung einer MLPA-Untersuchung in der Software „Coffalyser“.	31
Abb. 13: Grafische Darstellung einer MLPA-Untersuchung in der Software „Coffalyser“.	31
Abb. 14: Umverteilung der Tumorentitäten zwischen den WHO-Klassifikationen aus dem Jahre 2007 und 2016.	34
Abb. 15: Progressionsfreie Zeit (gesamt).	36
Abb. 16: Überlebenszeit (gesamt).	36
Abb. 17: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des Geschlechts.	37
Abb. 18: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Geschlechts.	37
Abb. 19: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des Alters.	38
Abb. 20: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Alters.	38
Abb. 21: Progressionsfreie Zeit bei multi-/unifokalem Auftreten.	39

Abb. 22: Überlebenszeit bei multi-/unifokalem Auftreten.	39
Abb. 23: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des präoperativen KPS.	40
Abb. 24: Überlebenszeit in Abhängigkeit des präoperativen KPS.	40
Abb. 25: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom Resektionsausmaß.	41
Abb. 26: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Resektionsausmaß.	41
Abb. 27: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.	42
Abb. 28: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus.	43
Abb. 29: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus.	43
Abb. 30: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus.	44
Abb. 31: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom 1p/19q-Deletionsstatus.	44
Abb. 32: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom 1p/19q-Deletionsstatus.	45
Abb. 33: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016).	46
Abb. 34: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016).	46
Abb. 35: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (alle Therapiegruppen).	48
Abb. 36: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie.	48
Abb. 37: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT methyliert).	51
Abb. 38: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei Methylierung des (MGMT nicht methyliert).	51
Abb. 39: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT-methyliert).	52
Abb. 40: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT nicht-methyliert).	52
Abb. 41: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation.	54
Abb. 42: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Wildtyp.	54
Abb. 43: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation.	55

Abb. 44: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Wildtyp.	55
Abb. 45: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von 60 Gy.	56
Abb. 46: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von 60 Gy.	57
Abb. 47: KPS im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie.	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vereinfachte Darstellung der Chemotherapie-Protokolle „Temozolomid“, „PCV“ und „BCNU“ bzw. „CCNU“.	5
Tab. 2: Chemikalien und deren Bezugsquellen.	15
Tab. 3: Gebrauchsfertige Reagenzsysteme.	15
Tab. 4: Primer.	17
Tab. 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien.	17
Tab. 6: Puffer und Lösungen.	19
Tab. 7: Komponenten für die Bisulfit-Reaktion.	22
Tab. 8: Programm der Bisulfit-Reaktion im Thermal Cycler.	23
Tab. 9: Zusammensetzung des PCR-Master-Mix für einen 25µl-Ansatz.	24
Tab. 10: PCR-Protokoll für die IDH-Analyse.	24
Tab. 11: PCR-Protokoll für die MGMT-Analyse nach Dunn.	25
Tab. 12: Zusammensetzung des Master-Mix zur DNA-Immobilisierung.	26
Tab. 13: Zusammensetzung des Primer-Mix für die Pyrosequenzierung.	26
Tab. 14: MLPA-Protokoll.	29
Tab. 15: KPS vor und nach Operation nach Resektionsausmaß.	32
Tab. 16: Einteilung nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2007 und 2016.	34
Tab. 17: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit nach soziodemographischen und klinischen Einflussfaktoren.	35
Tab. 18: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Molekularbiologie.	42
Tab. 19: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016).	45
Tab. 20: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (alle Therapiegruppen).	47
Tab. 21: Verteilung der Risikofaktoren in den Gruppen der Testvariable "postoperative Therapie".	49
Tab. 22: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie mit erhöhter und nicht-erhöhter MGMT- Promotor-Methylierung.	50

Tab. 23: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie mit vermehrter und nicht-vermehrter MGMT- Promotormethylierung.	50
Tab. 24: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation und IDH-Wildtyp.	53
Tab. 25: Überlebenszeit Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation und IDH-Wildtyp.	53
Tab. 26: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von mindestens 60 Gy.	56
Tab. 27: KPS im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie.	57

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

1.1.1 Epidemiologie

Mit etwa 8 % bilden anaplastische Astrozytome, anaplastische Oligodendrogliome und anaplastische Oligoastrozytome, dem Glioblastom folgend, die zweithäufigste Gruppe der bösartigen ZNS-Tumoren [1]. Diese sind in Deutschland mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate von 5,4 (Frauen) und 7,6 (Männer) pro 100.000 Personenjahre zwar selten [2], die relative 5-Jahres-Überlebensrate von 19-21 % zeigt jedoch, warum diese Erkrankungen nach wie vor eine große Bedeutung für betroffene Patient/-innen haben [1, 2]. In den Jahren 2007 bis 2008 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland 18 – 22 %. Maligne Hirntumoren treten häufig sporadisch auf, ätiologisch gelten die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung [3, 4], hereditäre Syndrome, wie die Neurofibromatose oder das Li-Fraumeni-Syndrom [5] und ein höheres Lebensalter [1] als Risikofaktoren, an einem bösartigen ZNS-Tumor zu erkranken [1]. Ein erhöhtes Risiko für die Krankheitsentstehung durch das Nutzen von Mobiltelefonen, stattgehabte Kopftraumata und Röntgenuntersuchungen des Kopfes sind jedoch bisher nicht ausreichend belegt und sind Gegenstand aktueller Forschung [6–11, 11]. Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Neuroonkologie lässt sich keine eindeutige Verbesserung der Prognose erkennen [12]. In den Vereinigten Staaten ist die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate mit 7,1 pro 100.000 Personenjahre genauso gering wie in Deutschland [1], die relative 5-Jahres-Überlebensrate mit 34,9 % jedoch ebenfalls schlecht. Weiterhin zählen maligne Tumoren des zentralen Nervensystems zu den fünf Krebserkrankungen mit den meisten Rentenzugängen durch Erwerbsminderung aufgrund von Krebserkrankungen. Daraus ergibt sich sowohl ein erheblicher Verlust von Lebensjahren und -qualität für Patient/-innen, als auch eine hohe sozioökonomische Belastung [13].

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Klinisch manifestieren sich intrakranielle und intraspinale Tumoren, abhängig von ihrer Lokalisation, unter anderem durch fokale neurologische Defizite wie Wesensveränderung, Gedächtnisstörungen, Aphasie, Paresen, Ataxie und Störungen der Sensibilität und Koordination, sowie

durch fokale oder generalisierte Krampfanfälle und Kopfschmerzen. Letztere entstehen in diesem Zusammenhang häufig durch einen erhöhten intrakraniellen Druck, ausgelöst durch raumfordernde Effekte des Tumors und das ihn umgebende Ödem [14]. Neben der klinischen Untersuchung sind bildgebende Verfahren ein unverzichtbares diagnostisches Mittel. Proliferationsrate und Malignität korrelieren mit dem Ausmaß von Neovaskularisation und Gefäßpermeabilität in malignen Hirntumoren, weshalb die kontrastmittel-gestützte T1-Sequenz, die T2-Sequenz, sowie FLAIR-Sequenz als Goldstandard der bildgebenden Verfahren zur Detektion von malignen Hirntumoren gelten [15]. Die kraniale MRT bietet eine hohe Sensitivität für pathologische Veränderungen im Hirngewebe, eine hohe Bildqualität und eine erste Möglichkeit zur Differenzierung zwischen Gewebetypen in intrakraniellen Läsionen [16]. Die Abb. 1 stellt ein Oligodendrogliom WHO-Grad 3 in axialer Schnittführung in einer T2-Sequenz und einer T1-Sequenz mit Kontrastmittelgabe dar. In der T2-Sequenz zeigt sich eine hyperintense (helle) Struktur als Ausdruck einer zystischen Formation sowie eine Kompression des Ventrikelsystems und eine Mittellinienverlagerung nach rechts, möglicherweise bedingt durch den raumfordernden Effekt eines bifrontal lokalisierten Oligodendroglioms (WHO-Grad 3). In der T1-Sequenz ist zusätzlich eine flau Kontrastmittelaufnahme links fronto-polar als Ausdruck einer Störung der Blut-Hirn-Schranke zu erkennen.

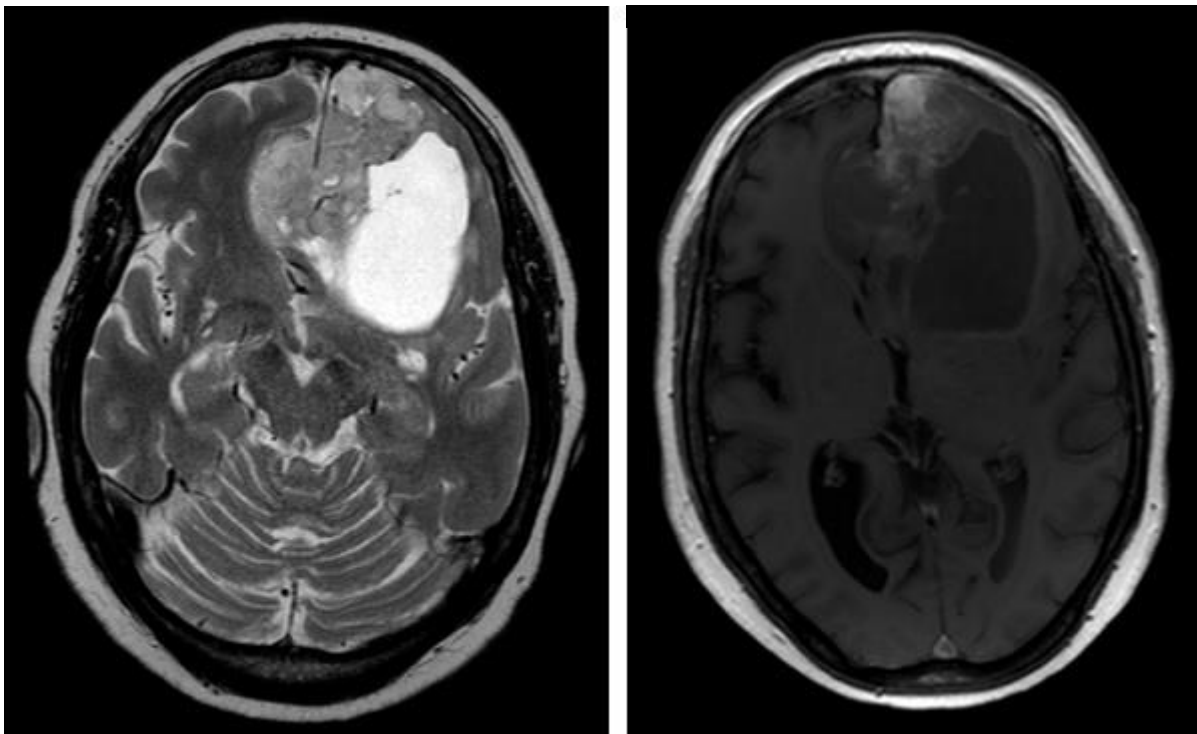


Abb. 1: Kraniales MRT eines Oligodendroglioms WHO Grad 3. Links: T2-Sequenz (axial) mit Liquoraufstau im Vorderhorn des linken Seitenventrikels (hyperintens/hell) und Mittellinienverlagerung nach recht. Rechts: T1-Sequenz (axial) mit Kontrastmittelgabe mit Anreicherung des Kontrastmittels links fronto-polar. Schnittebene leicht abweichend.

Die Abb. 2 zeigt ein Astrozytom (WHO-Grad 3) in T2- und FLAIR-Sequenzen in axialer bzw. sagittaler sowie in einer T1-Sequenz in axialer und frontaler Schnittführung. In der T2-Sequenz zeigt sich der Tumor und ein den Tumor umgebendes Ödem als hyperintense (helle) Struktur links fronto-temporal. In der T1-Sequenz erscheint der Tumor und das Ödem hypointens (dunkel).

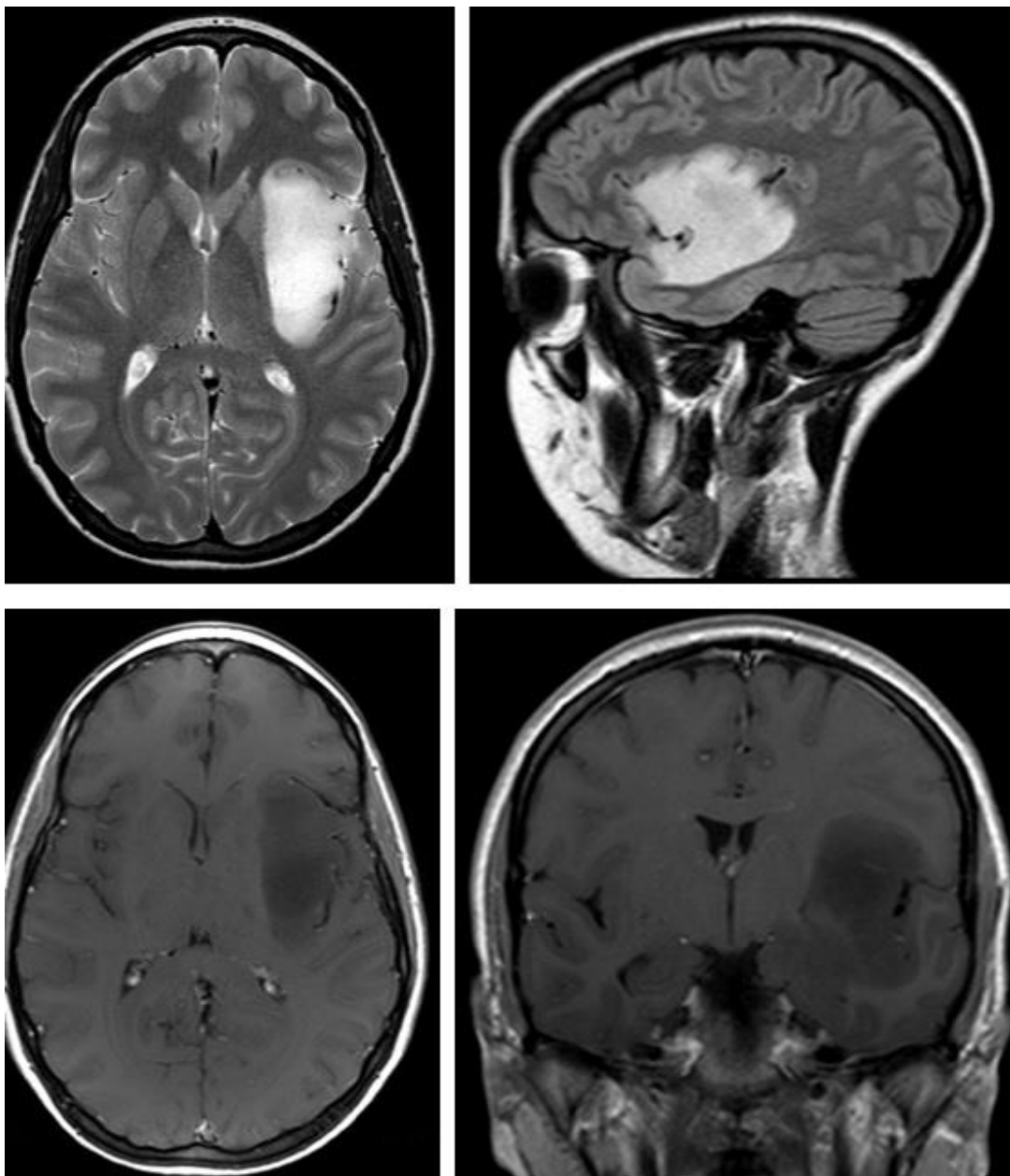


Abb. 2: Kraniales MRT eines Astrozytoms WHO Grad 3. Oben: T2-Sequenz axial (links) und FLAIR-Sequenz sagittal (rechts) mit peritumoralem Ödem (hyperintens/hell). Unten: T1-Sequenz mit Kontrastmittelgabe axial (links) und koronar (rechts) mit Läsion (hypointens/dunkel) ohne Kontrastmittelanreicherung.

1.1.3 Therapieoptionen

1.1.3.1 Operative Verfahren

Hoch-gradige Hirntumore (WHO-Grad 3 – 4; „high-grade-glioma“) zeichnen sich häufig durch eine diffus-infiltrative Wachstumsweise und die Ausbildung mikroskopischer Absiedlungen aus [14]. Diese kleinen, umliegenden Tumorzellverbände lassen sich in prä- und postoperativen MRT-Sequenzen häufig nicht darstellen. Bei der Untersuchung von Biopsien, entnommen außerhalb des sichtbaren Tumorgebiets, konnten histologisch Tumorzellen mehr als zwei Zentimeter außerhalb der in der MRT definierten Tumorgrenzen nachgewiesen werden [17]. Das stellt eine große Herausforderung für chirurgische Behandlung dar. Auf der einen Seite kann ein radikales Vorgehen mit großzügiger Resektion neue fokale neurologische Defizite zur Folge haben und die Funktionalität und damit die Lebensqualität des Patient/-innen erheblich einschränken [18], auf der anderen Seite ist ein Resektionsausmaß über 70 % und damit geringes Tumorresidualvolumen mit einer längeren progressionsfreien Zeit und Überlebenszeit assoziiert [19]. Das Anwenden von Techniken wie der fluoreszenzgestützten Resektion mit 5-Aminolävulinsäure, der intraoperativen Magnetresonanztomographie oder Neuronavigationssystemen kann das Risiko von peri-/intraoperativen Komplikationen reduzieren und ermöglicht ein besseres klinisches und bildmorphologisches Resektionsergebnis [20, 21]. Neben dem Effekt der Zytoreduktion ist ein wichtiges Ziel der Operation die mechanische Entlastung des umliegenden, gesunden Hirngewebes und insbesondere die Gewinnung von Tumorgewebe zu diagnostischen Zwecken. Deshalb steht die Operation meist am Beginn vieler Behandlungsschemata von malignen Hirntumoren [21].

1.1.3.2 Radiotherapie

Das für hochgradige Gliome typische invasive Wachstumsverhalten mit Bildung mikroskopischer Tumorabsiedlungen macht eine adjuvante Therapie notwendig. Die Radiotherapie ist in der Behandlung maligner Hirntumoren seit Jahrzehnten fest verankert [14]. Das in postoperativen T1-Sequenzen Kontrastmittel aufnehmende Gewebe und die Resektionshöhle bilden das „grobe Tumolvolumen“ („Gross Tumor Volume“ – GTV). Dieses Volumen, mit zusätzlichem Abstand von 1,5 – 2 cm, bildet den Bereich, in dem die meisten Rezidive entstehen. Mit Berücksichtigung umliegender anatomischer Strukturen ergibt sich das „klinische Zielvolumen“ („Clinical Target Volume“ – CTV). Um eventuelle Störfaktoren, wie Bewegungen während der Prozedur, auszugleichen, wird ein weiterer Randbereich von 0,3 – 0,5 cm berücksichtigt. So ergibt sich das zu bestrahlende Volumen („Planning Target Volume“ – PTV) ergibt [22, 23].

Walker et al. untersuchten 1979 den Einfluss einer postoperativen Radiotherapie bei histologisch gesicherten malignen Gliomen auf die Überlebenszeit sowie die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Überlebenszeit bei alleiniger Tumoresektion betrug im Mittel 18 Wochen, das längste mittlere Überlebenszeit bei Durchführung einer Radiotherapie betrug 42 Wochen und wurde mit der höchsten nominalen Dosis von 6000 Rad (umgerechnet 60 Gy) erzielt [24]. Empfohlen wird heutzutage eine fokale Behandlung mit einer Gesamtdosis von 50 – 60 Gy bei einer Tagesdosis von 1,8 – 2 Gy, in Abhängigkeit von Tumorentität und Prognose [22].

1.1.3.3 Medikamentöse zytostatische Therapie

Die dritte Säule der Therapie maligner Gliome bildet die Pharmakotherapie mittels Zytostatika. Besonders Wirkstoffe aus der Gruppe der alkylierenden Zytostatika kommen zum Einsatz, wobei die Penetration der Blut-Hirn-Schranke notwendig ist [22]. Dazu zählen Nitrosoharnstoffe wie Carmustin („BCNU“) und Lomustin („CCNU“), sowie monofunktionelle Alkylanzien wie Procarbazin und Temozolomid. Die PCV-Therapie setzt sich aus den Wirkstoffen Procarbazin, Vincristin und Lomustin zusammen [25]. Die Tab. 1 stellt drei Chemotherapie-Schemata dar.

Tab. 1: Vereinfachte Darstellung der Chemotherapie-Protokolle „Temozolomid“, „PCV“ und „BCNU“ bzw. „CCNU“. In Anlehnung an Weller, van den Bent (2017) [22].

Medikament	Einnahmeschema
Temozolomid	150-200 mg/m ² KOF oral an Tag 1 – 5 in einem 28-Tage-Zyklus (Stupp Schema)
PCV	Procarbazin 60 mg/m ² KOF oral an Tag 8-21 Lomustin: 110 mg/m ² KOF oral an Tag 1 Vincristin 1,4 (max. 2) mg/m ² KOF i.v. an Tag 8 u. 29 Zykluslänge 6-8 Wochen
BCNU/CCNU	Variable Schemata, z.B. 110 mg/m ² KOF alle 6 Wochen

1.1.3.4 Radio-/Chemotherapie

Aus einer im Jahre 2005 veröffentlichten Studie von Stupp et al. entwickelte sich die Standard-Therapie für Patient/-innen mit Glioblastom. Sie besteht aus einer möglichst vollständigen Tumoresektion, einer adjuvanten Radio-/Chemotherapie mit einer Gesamtdosis von 60 Gy und gleichzeitiger Temozolomid-Gabe (75 mg/m² KOF) zur Radiosensitivierung, sowie einer daran anschließenden Temozolimid-Therapie (100 – 200 mg/m² KOF) an den ersten fünf von 28

Tagen für insgesamt sechs bis acht Zyklen [26]. Die Therapie sollte frühestens drei Wochen nach stattgehabter Resektion begonnen werden [27].

1.2 Definition und Klassifikation

1.2.1 Histologische Klassifikation und WHO-Grading

Mit dem 1979 von Klaus-Joachim Zülch veröffentlichten Werk „Histological typing of tumours of the nervous system.“ setzte er den Grundstein für das bis heute fortgeführte internationale Klassifikationssystem für Tumoren des Nervensystems der Weltgesundheitsorganisation WHO [28]. Zülch entwickelte ein Grading-System zur Einschätzung des Malignitätsgrades von ZNS-eigenen Tumoren, den WHO-Grad. Es werden vier WHO-Grade unterschieden: WHO-Grad 1 beschreibt Läsionen mit benignem Wachstumsverhalten, diese lassen sich operativ kurieren. Grad 2-Tumoren zeigen ein infiltratives, wenn auch gering proliferatives Wachstumsverhalten und neigen häufig zu Rezidiven. Häufig wird eine Transformation zu einem höheren WHO-Grad beobachtet. Grad 3-Tumoren zeigen klare histologische Anzeichen für Malignität wie Kern-Atypien oder rege mitotische Aktivität. In Grad 4-Tumoren lassen sich zusätzlich atypische Blutgefäße und Nekrosen beobachten. Sie zeichnen sich durch ihre besonders hohe Malignität aus [29]. Die Kriterien für diese Einstufungen basieren also bis heute auf einer phänotypischen Beurteilung der Tumorzellen [28, 30]. Weiterhin wurden einzelne Tumorentitäten anhand ihres biologischen Verhaltens und histologisch-morphologischen Erscheinungsbildes definiert [28, 31, 32]. Dazu zählt auch die immunhistochemische Analyse der mitotischen Aktivität mit Hilfe des Ki-67 Proteins [14]. Ki-67 befindet sich während der aktiven Phasen des Zellzyklus auf der Oberfläche des Chromatins, nicht jedoch in der G0-Phase, in dem keine mitotische Aktivität herrscht. Ki-67 kann mit dem Antikörper MIB-1 markiert werden und ermöglicht somit eine numerische Aussage über das Proliferationsverhalten von Zellen [33]. Die Bestimmung des Proliferations-Index war lange Zeit das Standard-Verfahren zur Beurteilung einer Anaplasie in Gliomzellen [14]. Mit der Weiterentwicklung diagnostischer Methoden und fortschreitender Technik erhielten im Jahre 2016 erstmals auch molekulargenetische Eigenschaften der Tumorzellen als diagnostisches Kriterium Einzug in die WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems. Weiterhin wurde das Oligoastrozytom als eigenständige Tumorentität aus der WHO-Klassifikation entfernt [30].

1.2.2 Molekulargenetische Eigenschaften

Die regelmäßige Anwendung von Methoden, wie der FISH und PCR, in molekularpathologischen Laboren ermöglicht die routinemäßige Bestimmung von molekulargenetischen Markern in Tumorgeweben und damit eine spezifischere Diagnostik. Dadurch kann betroffenen Patient/-innen wiederum ein spezifischeres Therapiekonzept basierend auf der Kenntnis der Tumorgenetik ermöglicht werden. Prognostisch hat die molekulargenetische Konstellation, unter Berücksichtigung der Tumorentität, einen höheren Einfluss auf den Krankheitsverlauf als der konventionell bestimmte WHO-Grad oder die histologische Klassifizierung [34]. Mittlerweile lassen sich im klinischen Alltag eine Vielzahl von genetischen Markern bestimmen. Auf die drei Marker mit der höchsten klinischen Relevanz möchte ich im Folgenden näher eingehen.

1.2.2.1 Die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)

Die Isocitrat-Dehydrogenase 1 bzw. 2 katalysiert, NADP-abhängig, die Reaktion von Isocitrat zu α -Ketoglutarat unter Abspaltung von CO_2 . Diese Reaktionen finden zum einen im Zytoplasma (IDH1) und zum anderen mitochondrial (IDH2) im Citratzyklus statt. Die IDH3 kommt sowohl zytoplasmatisch als auch mitochondrial vor. α -Ketoglutarat ist das Substrat vieler Stoffwechselvorgängen der menschlichen Zelle [35]. Mit der vollständigen Genanalyse von Glioblastomzellen begann die Untersuchung der Rolle von IDH1/2-Mutationen in der Entstehung von Gliomen [36]. Dabei stellte sich heraus, dass eine Mutation im IDH1- bzw. IDH2-Gen häufig im Zusammenhang mit Tumoren astrozytären, oligodendrozytären oder gemischt oligoastrozytären Ursprungs steht. Eine IDH1/2-Mutation lässt sich in etwa 70 – 80 % der WHO-Grad II und III diffusen Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome nachweisen, nicht jedoch in WHO-Grad I-Gliomen, wie dem pilozytischen Astrozytom [34, 37, 38]. Die Abb. 3b zeigt die Häufigkeit von IDH1- bzw. IDH2-Mutation in verschiedenen Tumorentitäten. Die Gruppe der diffusen Gliome ist besonders häufig betroffen, wobei die Mutation des IDH1-Gens häufiger zu finden ist als die des IDH2-Gens [37]. Festgestellt wurden somatische, heterozygote Mutationen, wovon die Mehrzahl das Codon der Aminosäure Arginin auf Position 132 des IDH1-Gens und 172 des IDH2-Gens betreffen [37, 38]. Wie die Abb. 3a zeigt, ist bei einer Mutation des IDH1-Gens die häufigste Ursache eine Transition der Base Guanin zu Adenin des Arginin-Codons „CGT“, während bei einer IDH2-Mutation kein Nukleotid besonders häufig betroffen ist. Arginin ist zum Großteil an der Bindung von Isocitrat im aktiven Zentrum der IDH beteiligt. Mit der Mutation der IDH wird α -Ketoglutarat zum Substrat des veränderten Enzyms.

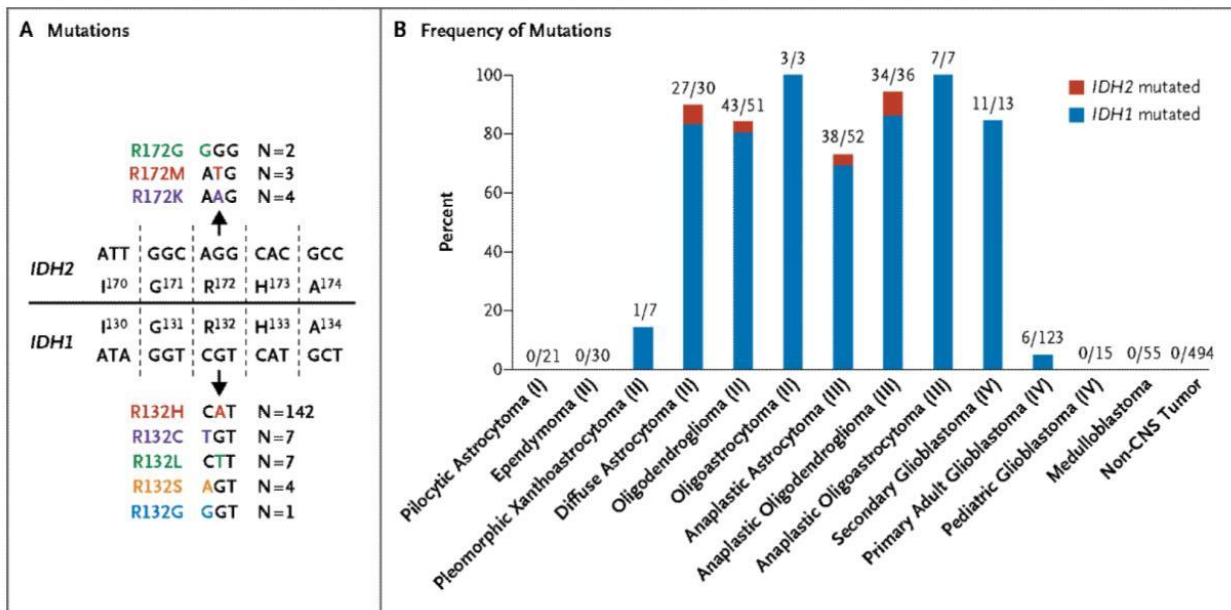


Abb. 3: IDH-Mutationen und ihre Häufigkeiten. a.) Betroffene Aminosäuren und deren Anzahl der Punktmutationen bei IDH1- und IDH2-Mutationen. b.) Anzahl an IDH1- und IDH2-Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten. Reproduziert mit Erlaubnis von Yan, Parsons et al [37], Copyright Massachusetts Medical Society.

Dabei reduziert die IDH das α -Ketoglutarat unter NADPH-Verbrauch zu D2HG. Somit werden zum Einen wichtige Zellstoffwechselvorgänge beeinflusst, zum Anderen besitzt D2HG eine strukturelle Ähnlichkeit zu α -Ketoglutarat und wirkt so als ein kompetitiver Hemmstoff [35]. Die Abb. 4 zeigt das Reaktionsschema der physiologischen und mutierten IDH 1/2 sowie deren Produkte. Der Einfluss von D2HG auf den Zellzyklus ist Gegenstand intensiver Forschung [39]. Im Zellkern hemmt D2HG die Funktion der 5-Methylcytosin-Hydroxylase und somit die Demethylierung von DNA-Abschnitten sowie die Funktion von Histon-Demethylasen und somit die Demethylierung von Histonen [40]. Außerhalb des Zellkerns wird der Einfluss auf den HIF1 α , einen durch Sauerstoffarmut induzierten Transkriptionsfaktor, untersucht [35]. D2HG ist ein schwacher kompetitiver Hemmstoff, dessen Effekte erst bei einem hohen Verhältnis zu α KG einen relevanten Einfluss haben. In IDH-mutierten Gliomen erreicht dieses Verhältnis im Mittel einen Wert von 373:1 [40]. Die IDH1/2-Mutation als therapeutischer Ansatz ist gegenwärtiger Forschungsgegenstand. Zur Diagnostik hat sich die IDH-Mutation als molekulargenetischer Marker jedoch heute schon etabliert. In der, zu Beginn gemeinsamen, Entwicklung zum Oligodendrogliom oder diffusen Astrozytom scheint diese Mutation früh aufzutreten und bestimmten anderen molekulargenetischen Veränderungen vorauszugehen [41]. Untersuchungen zum Einfluss von IDH-Mutationen auf den Krankheitsverlauf bei Gliomen verschiedenster Entitäten zeigten, dass eine Mutation im IDH-Gen, gegenüber einem IDH-Wildtyp, mit einer besseren Prognose einhergeht [37, 42].

Deshalb wurde mit der Fassung der WHO-Klassifikation für Tumoren des ZNS aus dem Jahr 2016 der IDH-Mutationsstatus als Kriterium für die Einteilung verschiedener Tumorarten aufgenommen [30].

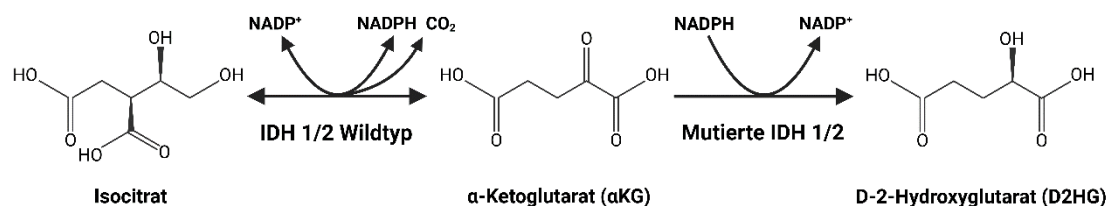


Abb. 4: Reaktionsprodukte der Wildtyp- und mutierten Isocitrat-Dehydrogenase 1/2. Die IDH1/2 Wildtyp katalysiert physiologisch unter NADP-Verbrauch und Abspaltung von CO₂ die Reaktion von Isocitrat zu α-Ketoglutarat (αKG). Dabei entsteht NADPH aus NADP⁺. Diese Reaktion ist auch umgekehrt möglich. Die mutierte IDH1/2 katalysiert unter NADPH-Verbrauch die einseitige Reaktion von αKG zu D-2-Hydroxyglutarat (D2HG). Beide Moleküle ähneln sich stark und unterscheiden sich nur durch eine Carbonyl-Gruppe (αKG) bzw. Carboxyl-Gruppe (D2HG) am C2-Atom. In Anlehnung an Waitkus, Diplas et al [35]

1.2.2.2 Die O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

DNA-Reparatur-Proteine, wie die MGMT spielen im Zellzyklus eine große Rolle. Ihre Aufgabe ist es, beschädigte Abschnitte im Erbgut zu erkennen und zu beheben. Die MGMT erkennt und repariert eigenständig DNA-Schäden, welche durch Alkylierung von O6 in Guanin, seltener O4 in Thymin, entstanden sind. Dabei wird, wie in der Abb. 5a dargestellt, die Alkyl-Gruppe von O6-Alkylguanin kovalent an die MGMT gebunden und damit inaktiviert [43]. Eine Methylierung der CpG-Insel des MGMT-Promotors verhindert die Transkription und führt so zu einer reduzierten Synthese der MGMT und somit zu einer verringerten DNA-Reparaturleistung. Wird die Alkylierung von Guanin in der DNA nicht repariert, kann das, wie in Abb. 5 dargestellt, zu einer Transversion zu einem Adenin/Thymin-Basenpaar oder einem DNA-Strangbruch führen [43, 44]. So können Fehlinformationen in DNA-Abschnitten, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, zu einer unkontrollierten Zellvermehrung und damit zu einer Neoplasie führen [43]. Dieser Mechanismus spielt in der Entstehung und Behandlung von Astrozytomen und Glioblastomen eine große Rolle [34]. Einerseits kann eine Methylierung des MGMT-Promotors die DNA-Reparaturleistung in gesunden Zellen reduzieren und zur Krebsentstehung beitragen, andererseits zeigen zytostatische Substanzen, deren Wirkung auf einer Alkylierung der Tumor-DNA beruhen, eine verbesserte Effektivität [43]. Temozolomid, eine in der medikamentösen Hirntumorthérapie häufig angewandte Substanz, zählt zu den alkylierenden Zytostatika. In Studien zum Einfluss des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus auf den Krankheitsverlauf bei einer Temozolomid-Therapie konnte gezeigt werden, dass die Patientengruppe mit einem vermehrt methylierten MGMT-Promotor im Tumorgewebe, im Vergleich zur Patientengruppe mit einem nicht vermehrt methyliertem MGMT-Promotor, eine längere

progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit aufweisen [45]. Weiterhin hat sich der MGMT-Pro-motor-Methylierungsstatus als ein guter prognostischer Faktor herausgestellt [44].

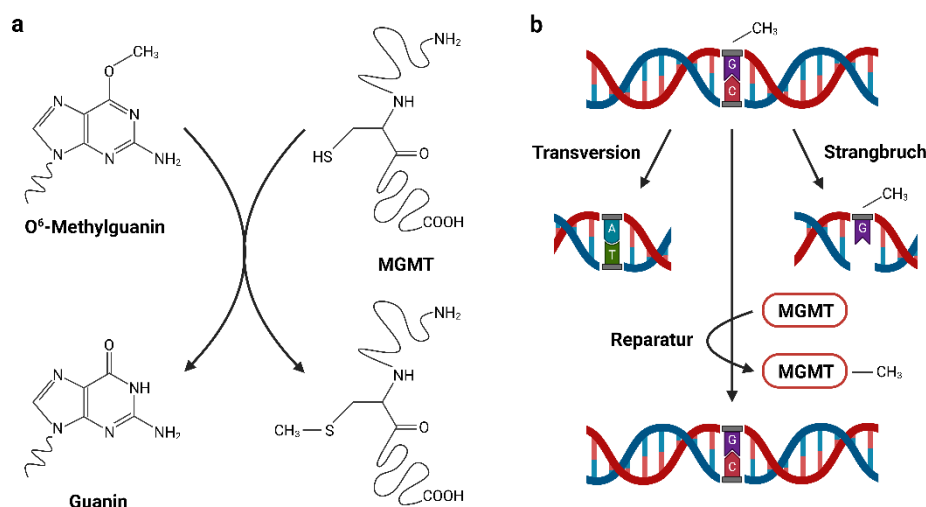


Abb. 5: Schematische Darstellung der MGMT-vermittelten DNA-Reparatur. Eine Alkyl-Gruppe wird von O⁶-Alkylguanin kovalent an die MGMT gebunden. b) Eine ausbleibende Reparatur von alkyliertem Guanin kann zur Transversion zum Adenosin/Thymin-Basenpaar oder einem Strangbruch führen. In Anlehnung an Gerson [43].

1.2.2.3 Die 1p/19q-Codeletion

Der kombinierte Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und des langen Arms von Chromosom 19 (19q) kann bei 60 – 80 % aller Oligodendrogliome beobachtet werden. In astrozytären Tumoren kommt diese Veränderung mit 1 – 10 % deutlich seltener vor [46]. Sie beruht auf einer unbalancierten Translokation mit der (1;19) (q10;p10) als Produkt [47] und ist mit einem „loss of heterozygosity“ (LOH) assoziiert [48]. Eine Mutation im IDH1/2-Gen scheint mit diesem Allelverlust in Zusammenhang zu stehen. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Tumoren mit einer nachgewiesenen 1p/19q-Codeletion auch den oben beschriebenen Veränderungen der IDH1/2 unterliegen [49, 50]. Die Tumorsuppressorgene CIC und FUBP1 sind die zwei am häufigsten durch diese Codeletion betroffenen Gene [47]. Wie genau sich der Verlust dieser Gene auf den Zellzyklus auswirkt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Dennoch hat die Bestimmung des 1p/19q-Codeletionsstatus heute höchste diagnostische und prognostische Relevanz. Für den Krankheitsverlauf wirkt sich eine 1p/19q-Codeletion günstig auf die Prognose aus, wenn betroffene Patient/-innen mittels Radio- und/oder Chemotherapie behandelt werden [49]. Diagnostisch bildet der 1p/19q-Codeletionsstatus die entscheidende Grundlage zur Unterscheidung zwischen oligodendroglialen und astrozytären Tumorentitäten und ist deshalb seit 2016 verpflichtend zur Diagnosestellung dieser Tumore zu bestimmen [30, 34].

1.3 WHO-Grad III-Gliome

Mit der Einbindung der Molekulargenetik in die diagnostische Routine fand auch eine Neueinteilung der Tumorentitäten statt. So wurden bis 2016 Tumoren allein nach zellulärem Ursprung gruppiert. Heute erfolgt die Gruppierung unter Berücksichtigung des molekulargenetischen Konstellation. Die Gruppe der diffusen Gliome umfasst astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren. Die Abb. 6 soll das diagnostische Vorgehen bei diffusen Gliomen unter Berücksichtigung histologischer und molekulargenetischer Kriterien veranschaulichen.

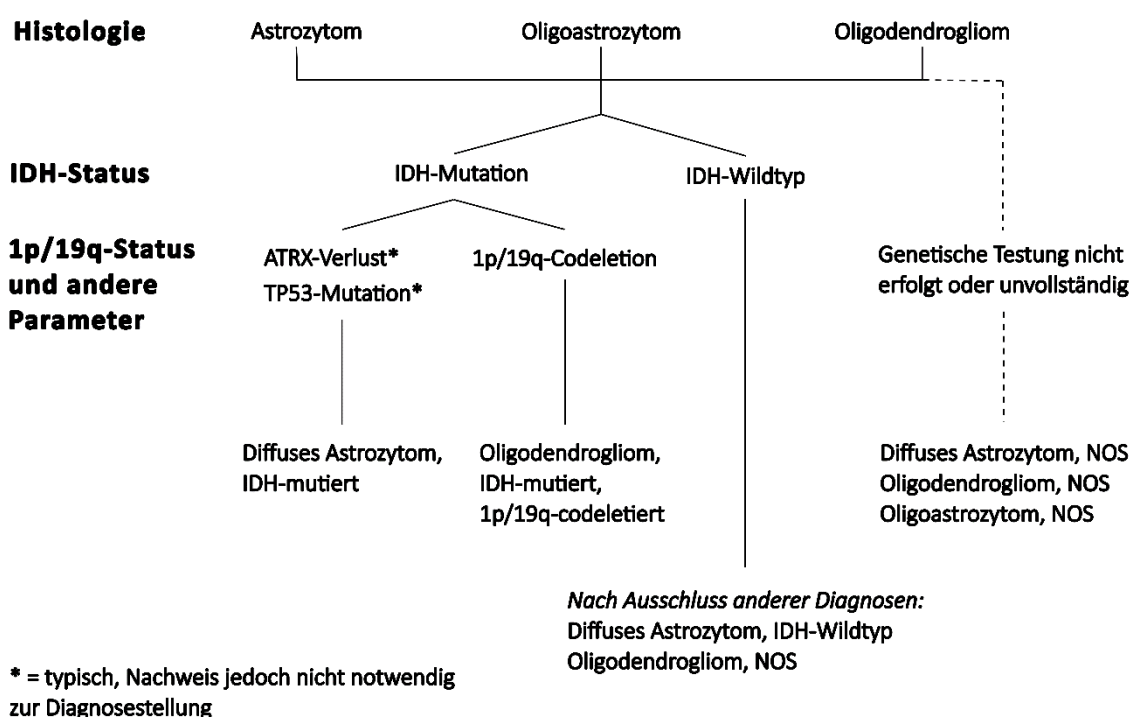


Abb. 6: Vereinfachter diagnostischer Algorithmus zur Einteilung astrozytärer und oligodendroglialer Tumoren. Neben der Tumorphistologie ist ebenfalls die Bestimmung bestimmter molekulargenetischer Marker von der WHO empfohlen. In Anlehnung an Louis, Perry et al [30].

Eine histologische und damit phänotypische Einteilung wird weiterhin durchgeführt. Zusammen ermöglichen beide Verfahren eine objektivere Klassifikation der Tumoren. Nach histologischen Kriterien gemischte Tumorentitäten, wie die vor dem Jahre 2016 bestehende Diagnose des Oligoastrozytoms, können dadurch klar in eine Kategorie, zum Beispiel als diffuses Astrozytom oder Oligodendrogliom, eingeteilt werden. Die alleinige genotypische Einteilung wird bisher jedoch noch nicht empfohlen [29].

1.3.1 Das anaplastische Astrozytom

Das anaplastische Astrozytom ist ein diffus infiltrierendes Astrozytom mit fokaler oder diffuser Anaplasie, erhöhter Proliferationsrate mit oder ohne Mutation im IDH1- oder IDH2-Gen [29]. Ungefähr 80 % der Tumoren weisen diese Mutation auf [37]. Liegt eine IDH-Mutation vor, lassen sich häufig auch Veränderungen von TP53 und ATRX nachweisen [51]. Dessen Nachweis ist jedoch keine Voraussetzung für die Diagnosestellung [30]. Die Schwere der Symptome, das Resektionsausmaß und der IDH1/2-Mutationsstatus sind gute prognostische Marker [29, 42]. Die mediane Überlebenszeit bei Vorliegen einer IDH-Mutation beträgt 5,4 – 9,3 Jahre [37, 52], das AA, IDH-Wildtyp weist mit 1,6 Jahren [37] eine deutlich geringere mediane Überlebenszeit auf [42]. Therapiert wird das IDH-mutierte anaplastische Astrozytom durch eine möglichst vollständige Resektion, gefolgt von einer Radiotherapie mit 60 Gy Gesamtdosis bei einer Tagesdosis von 1,8 – 2 Gy. Im Anschluss folgen sechs bis acht Zyklen Temozolomid-Monotherapie nach dem 23/5-Schema [22]. In einer großen multizentrischen Studie (CATNON-Studie) von van den Bent et al. wird untersucht, ob die Gabe von Temozolomid während der Radiotherapie die Prognose verbessert. In ersten Interimsergebnissen scheint diese keinen prognostischen Vorteil zu haben [53]. Trotzdem wird die kombinierte Radio-/Chemotherapie auf Grund des aggressiven Verhaltens des Tumors wegen fehlender Therapiealternativen zunächst weiterhin regelmäßig durchgeführt [22, 26]. Sowohl eine vermehrte MGMT-Promotor-Methylierung bei IDH-mutierten Gliomen [54], als auch eine IDH-Mutation an sich [55], scheinen die Wirkung einer Chemotherapie mittels Temozolomid zu verbessern.

1.3.2 Das anaplastische Oligodendrogliom

Das anaplastische Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-codeletiert, weist, fokal oder diffus, Zeichen der Anaplasie auf. Eine 1p/19q-Codeletion ist das entscheidende Kriterium für eine Einteilung in die Kategorie des Oligodendroglioms [29]. Der 1p/19q-Codeletionsstatus hat große Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf, so beträgt die mediane Überlebenszeit bei Durchführung einer adjuvanten Radiotherapie und anschließender PCV-Therapie bei 1p/19q-codeletierten Tumoren über 10 Jahre bzw. 14,7 Jahre, bei fehlender 1p/19q-Codeletion hingegen nur 2,08 Jahre bzw. 2,6 Jahre, und auch im Vergleich mit einer alleinigen Radiotherapie konnten längere Überlebenszeiten erreicht werden [56, 57]. Die adjuvante Radiotherapie mit anschließender PCV-Therapie ist daher die Therapie der Wahl [22]. Die Rolle einer Radiotherapie mit anschließender Temozolomid-Therapie gilt es zu erforschen [22].

1.3.3 Das anaplastische Oligoastrozytom

Die Diagnose des Oligoastrozytoms in seiner bisherigen Form besteht nicht mehr. Lediglich das (anaplastische) Oligoastrozytom, NOS, wird als Diagnose empfohlen, wenn histologisch ein gemischt astrozytär-oligodendroglialer Tumor vorliegt und keine Möglichkeit der molekulargenetischen Untersuchung besteht. Durch diese lassen sich auch histologisch eingeteilte Oligoastrozytome in den allermeisten Fällen als diffuses Astrozytom oder Oligodendrogliom klassifizieren. Das Oligoastrozytom bildet somit eine Ausschluss-Diagnose [29]. Sollte die Diagnose gestellt werden, besteht die Therapie, wie beim anaplastischen Oligodendrogliom, aus einer Tumoresektion mit adjuvanter Radiotherapie und anschließender PCV-Therapie [22].

1.4 Zielsetzung

Die Aufnahme der Molekulargenetik als Kriterium der Klassifikation glialer Tumoren durch die WHO im Jahre 2016 zeigt die hohe klinische Relevanz der individuellen Tumorgenetik im Krankheitsverlauf der betroffenen Patient/-innen und führt auch auf dem Gebiet der Neuroonkologie zu immer individuelleren Therapieentscheidungen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über den langfristigen Krankheitsverlauf von Patient/-innen mit einem WHO-Grad 3 Tumor zu erlangen. Primär wurde die Abhängigkeit dieser Verläufe von dem postoperativen therapeutischen Prozedere untersucht. Sekundärer Endpunkt war die Analyse der Langzeitverläufe in Abhängigkeit von der molekulargenetischen Konstellation des Tumorgewebes. Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Wie gestaltete sich der langfristige Krankheitsverlauf von den im UKSH Campus Kiel behandelten Patient/-innen mit einem WHO-Grad 3-Gliom in Abhängigkeit soziodemographischer und klinischer Parameter?
2. Welchen Einfluss hatten die molekulargenetischen Eigenschaften der Tumorzellen auf den Krankheitsverlauf?
3. Welchen Einfluss hatte das postoperative Therapieschema auf den Krankheitsverlauf?
4. Welchen Stellenwert hat die Aufnahme der molekulargenetischen Diagnosekriterien in die WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS?

2 Material und Methoden

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Einzelzentrumstudie, die den Krankheitsverlauf von Patient/-innen mit histologisch erstdiagnostizierten WHO Grad III-Gliomen untersuchte. Besonders der Einfluss des postoperativen Therapieschemas und der molekulargenetischen Konstellation der Tumorzellen auf den Langzeit-Krankheitsverlauf wurde untersucht. Dafür wurden soziodemografische und klinische Daten von Patient/-innen erhoben, deren Erstbehandlung in einem Zeitraum von Juli 1994 bis Oktober 2019 in der Klinik für Neurochirurgie des UKSH, Campus Kiel, erfolgte. Es wurde nachträglich Tumorgewebe mittels PCR, Pyrosequenzierung und Kapillarelektrophorese untersucht.

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Als Einschlusskriterien gelten die histopathologisch gesicherte Erstdiagnose eines WHO Grad III-Glioms, ein Patientenalter über 18 Jahren, die Erstbehandlung mit postoperativer ambulanter Betreuung in der Klinik für Neurochirurgie des UKSH, Campus Kiel, sowie eine erfolgte Nachbehandlung in Form einer Radiotherapie oder einer Radio-/Chemotherapie im UKSH Campus Kiel. Ein positives Ethikvotum zur molekulargenetischen Untersuchung der Gewebeproben und Durchführung dieser Arbeit liegt vor. Insgesamt wurden 167 Patient/-innen in die Studie eingeschlossen. Es erfolgte die Einteilung in drei Subgruppen nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2007 in: anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom und anaplastisches Oligoastrozytom

2.1.2 Tumorgewebe

Beim untersuchten Tumorgewebe handelt es sich um in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Blöcke (FFPE), die aus Operationspräparaten hergestellt wurden. Davon wurden Schnitte im Rahmen einer fachlich-pathologischen Eignungsfeststellung vor der DNA-Gewinnung mikroskopisch begutachtet. Weiterhin wurde aus dem diagnostischen Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH Campus Kiel Tumorgewebe als Referenzgewebe verwendet.

2.1.3 Chemikalien

In der Tab. 2 sind die verwendeten Chemikalien sowie deren Bezugsquellen angegeben.

Tab. 2: Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Xylol rein	BÜFA GmbH & Co. KG, Oldenburg
Ethanol (C ₂ H ₆ O), 99 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Xylol (reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (C ₂ H ₆ O), 70 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasser (H ₂ O), nukleasefrei	QIAGEN GmbH, Hilden
Wasser (ddH ₂ O), doppelt destilliert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH) pallets	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈), > 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure (CH ₃ COOH), 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenzsysteme und Primer

In der Tab. 3 sind die verwendeten gebrauchsfertigen Reagenzsysteme sowie deren Bezugsquellen angegeben.

Tab. 3: Gebrauchsfertige Reagenzsysteme.

Gebrauchsfertige Reagenzsysteme	Bezugsquelle
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
EpiTect® Bisulfite Kit	
• Bisulfite Mix (aliquots for 8 reactions) • DNA Protect Buffer • RNase-Free Water • EpiTect® Spin Columns • Collection Tubes (2 ml) • Buffer BL	QIAGEN GmbH, Hilden

- Buffer BW
- Buffer BD
- Buffer EB
- Carrier RNA
- Handbook

HotStarTaq® Plus DNA-Polymerase

- HotStarTaq® Plus DNA-Polymerase
 - PCR Buffer, 10 x
 - CoralLoad PCR Buffer, 10 x
 - Q-Solution, 5 x
 - MgCl₂, 25 mM
- QIAGEN GmbH, Hilden

QIAamp® DNA-Mini Kit 50

- QIAamp® Mini Spin Columns
 - Collection Tubes (2 ml)
 - Buffer AL
 - Buffer ATL
 - Buffer AW1 (concentrate)
 - Buffer AW2 (concentrate)
 - Buffer AE
 - Proteinase K
 - Selection Guide
- QIAGEN GmbH, Hilden

Pyromark® Binding Buffer 200 ml QIAGEN GmbH, Hilden

Pyromark® Wash Buffer, 10x 200 ml concentrate QIAGEN GmbH, Hilden

Pyromark® Annealing Buffer 250 ml QIAGEN GmbH, Hilden

Pyromark® Gold Q24 Reagents (5x25) QIAGEN GmbH, Hilden

Salsa® MLPA® Reagent kit

- SALSA® MLPA® Buffer
 - SALSA® Ligase-65
 - SALSA® Ligase Buffer A
 - SALSA® Ligase Buffre B
 - SALSA® PCR Primer Mix
 - SALSA® Polymerase
- MRC Holland, Amsterdam

SALSA® MLPA® Probe mix

- P088 Oligodendroglioma 1p-19q
- MRC Holland, Amsterdam

In der Tab. 4 sind die verwendeten Primer mit ihren Sequenzen und der Annealing-Temperatur angegeben.

Tab. 4: Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Annealing-Temperatur
IDH1-Pyro-for	GCTTGTGAGTGGATGGGTAAA	58 °C
IDH1-Pyro-rev	Biotin-TTGCCAACATGACTTACTTGATC	58 °C
IDH1-Pyro-seq	GGGTAAAACCTATCATCATA	58 °C
IDH2-Pyro-for	TCCGGGAGCCCATCATCT	58 °C
IDH2-Pyro-rev	Biotin-CCTGGCCTACCTGGTCGC	58 °C
IDH2-Pyro-seq	AGCCCATCACCATTG	58 °C
MGMT-Dunn-for	GGGATATGTTGGGATAGTT	58 °C
MGMT-Dunn-rev	Biotin-CCCAAACACTCACCAAAT	58 °C
MGMT-Dunn-seq	GGATATGTTGGGATAGT	58 °C

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In der Tab. 5 sind die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie deren Bezugsquellen angegeben.

Tab. 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Einwegskalpell Nr.15	Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Kühlschrank Froster-520	Phillip Kirsch GmbH, Willstätt-Sand
Kühlschrank MedLine	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Kühlschrank MRL150	Electrolux Professional GmbH, Herborn
PCR 8er-Deckelkette, flach	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR-Strip 0,2µl, Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR-Workstation, ultraviolett sterilisierend	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipette Eppendorf Reference 10	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Pipette Eppendorf Research 10	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 1000	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 2,5	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 20	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 200	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen 0,5-20 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 1250 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 2-100 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 2-200 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spektrometer Nanodrop 2000c	Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz
Thermal Cycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Vortex-Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifuge Heraeus PICO17	Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz
Zentrifuge Microzentrifuge SD	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Privileg Kühlschrank	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart
Netzteil PSU 400/200	Scie-Plas Ltd., Cambridge, Großbritannien
Waage BP610	Sartorius AG, Göttingen
Genetic Analyzer 3500	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Pyromark Q24	QIAGEN GmbH, Hilden
Pyromark Q24 Workstation	QIAGEN GmbH, Hilden
Pyromark Q24 Cartridge	QIAGEN GmbH, Hilden

Vakuumpumpe WELCH 2511	Gardner Denver Thomas GmbH, Furstenfeldbruck
Objektträger-Strecktisch OTS 30.3	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf
MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
DYNAL® Sample Mixer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Pyromark Q24 Plate	QIAGEN GmbH, Hilden
Flockeneisbereiter AF 103	Scotsman Ice Srl, Mailand
Minizentrifuge MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt
Molecular Imager® Gel Doc™ XR System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

2.1.6 Puffer und Lösungen

In der Tab. 6 sind die verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung angegeben.

Tab. 6: Puffer und Lösungen.

Lösungen	Zusammensetzung
TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer), 10 x	48,4 g TRIS
	20,0 ml EDTA 0,5 M
	11,4 ml Essigsäure
EDTA, 0,5 M	300 ml NaOH
	73,06 g EDTA
	NaOH pellets zu pH 8

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

Zur molekulargenetischen Untersuchung der DNA musste diese zunächst aus dem Tumorgewebe gewonnen werden. Diese Proben lagen als in Formalin-fixierte, in paraffineingebettete Gewebeschnitte auf Objektträgern vor. Im ersten Schritt wurden die Zellstrukturen denaturiert, um die DNA aus dem Zellkern freizusetzen. Dafür wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für jeweils 5 min in Xylol und Ethanol (99 %) inkubiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden 1,5 ml Reagiergefäße mit 180 µl ATL-Puffer gefüllt, das Gewebe mittels Skalpell vom Objektträger präpariert und in die Reagiergefäße überführt. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurde das Reaktionsgemisch für zwölf Stunden bei einer Temperatur von 56 °C und einer Geschwindigkeit von 550 rpm, danach für 20 min bei 95 °C ohne Schütteln, im Thermomixer inkubiert.

2.2.1.1 DNA-Isolation

Die DNA wurde in diesem Schritt von den restlichen Zellbestandteilen isoliert. Dafür wurde das Gemisch nach der Inkubation für 30 s bei 15000 x g zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl AL-Puffer mit anschließendem Mischen für 15 s in einem Vortex-Gerät. Nach dem Mischen wurden die Proben für 10 min bei 70 °C ohne Schütteln im Thermomixer inkubiert, dann für 30 s bei 15000 x g zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Ethanol (absolut), das Mischen für 15 s im Vortex-Gerät und erneutes Zentrifugieren für 30 s bei 15000 x g. Nach diesem Schritt erfolgte das Überführen des Reaktionsgemisches, inklusive des Präzipitats, in ein *QIAamp Mini Spin-Column* in einem 2 ml-Sammelgefäß. Das Reaktionsgemisch wurde dann für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Nachdem das *QIAamp Mini Spin-Column* in ein frisches 2 ml-Sammelgefäß überführt und das alte Sammelgefäß inklusive des Filtrats verworfen wurde, erfolgte die Zugabe von 500 µl AW1-Puffer und die Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g. Anschließend wurde das Gemisch erneut in ein frisches Sammelgefäß überführt und das alte Sammelgefäß inklusive des Filtrats verworfen. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g, Überführen des Röhrchens in ein frisches Sammelgefäß und Zentrifugieren für 5 min bei 17000 x g, um mögliche Rückstände des AW2-Puffers zu entfernen. Danach wurde das *QIAamp Mini Spin-Column* in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und 50 µl AE-Puffer direkt auf die Silika-Membran pipettiert. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch 1 min bei 6000 x g

zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die isolierte DNA. Der Vorgang ist in der Abb. 7 schematisch dargestellt.

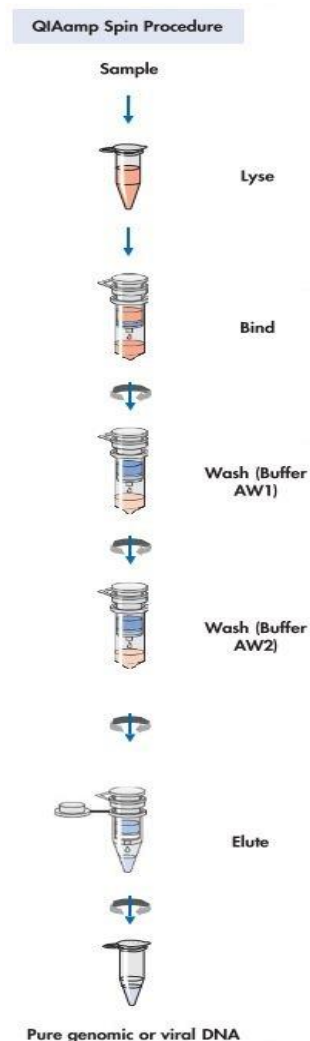


Abb. 7: Schematische Darstellung der DNA-Isolation. Abb. aus QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook [58] © QIAGEN, all rights reserved.

2.2.1.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Um Erkenntnisse über die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA zu erlangen, wurde eine photometrische Konzentrationsmessung durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf der Absorption von Licht durch Materie, in diesem Fall der DNA, bei einer definierten Wellenlänge. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Dazu wurden zunächst 2,5 µl der isolierten DNA in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden eine Kalibrierungsmessung mit 2 µl AE-Puffer und die Messung mit jeweils 2 µl der Probe durchgeführt. Um die Reinheit der gewonnenen DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Aus den Ergebnissen beider Messungen wurde dann der Quotient wie folgt gebildet.

$$\text{Absorbtion}_{260\text{nm}}/\text{Absorbtion}_{280\text{nm}}$$

Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 deutet auf eine saubere DNA-Isolierung hin, während Werte außerhalb auf Verunreinigungen durch Phenol, Proteine oder eine sehr niedrige DNA-Konzentration hinweisen können [59, 60]. Nach der DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die DNA unverändert zur Bisulfit-Behandlung verwendet oder die isolierte DNA in Nuklease-freies Wasser überführt und ein Reaktionsgemisch mit einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl, in einer Gesamtmenge von 50 µl, hergestellt, um eine PCR durchzuführen.

2.2.1.3 Bisulfit-Reaktion

Dieser Schritt diente der Vorbereitung der DNA zur Analyse des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. Durch die Behandlung der DNA mit Bisulfit wird nicht-methyliertes Cytosin in CpG-Dinucleotiden in Uracil umgewandelt, während das methylierte Cytosin unverändert bleibt. Da die Basenfolge der Genregion als Wildtyp bekannt ist, kann diese mit der Basenfolge der untersuchten DNA, nach erfolgter Pyrosequenzierung, verglichen werden und somit eine Aussage über das Ausmaß der MGMT-Promotor-Methylierung getroffen werden. Dafür wurden zunächst Aliquots des Bisulfit-Mix durch Zugabe von 800 µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Zudem wurden BW-Puffer (30 ml) und BD-Puffer (27 ml) mit Ethanol (99 %) versetzt und 310 µg Carrier RNA in 310 µl RNase-freies Wasser (1 µg/µl Lösung) gelöst. Aus der Carrier-RNA-Lösung und dem BL-Puffer wurde eine Lösung mit einer Carrier-RNA-Konzentration von 10 µg/ml hergestellt. Die Carrier RNA begünstigte hierbei die spätere Bindung der DNA an die Membran des *EpiTect Spin-Columns*. Danach wurde das Reaktionsgemisch in 200 µl-PCR-Röhrchen wie in der Tab. 7 dargestellt angemischt.

Tab. 7: Komponenten für die Bisulfit-Reaktion.

Komponenten	Volumen pro Reaktion
DNA-Lösung (1 ng – 2 µg)	Maximal 20 µl
RNase-freies Wasser	20 µl – Volumen der DNA-Lösung
Bisulfit Mix (gelöst)	85 µl
DNA Protect Buffer	35 µl
Gesamtvolumen	140 µl

Nach Zugabe des *DNA Protect Buffer* erfolgte ein Farbumschlag von grün zu blau, welcher ein korrektes Mischen und den richtigen pH-Wert für das weitere Procedere anzeigte. Im Anschluss erfolgte die DNA-Konvertierung im Thermal Cycler wie in der Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Programm der Bisulfit-Reaktion im Thermal Cycler.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Denaturierung	5 min	95 °C
2. Inkubation	25 min	60 °C
3. Denaturierung	5 min	95 °C
4. Inkubation	85 min	60 °C
5. Denaturierung	5 min	95 °C
6. Inkubation	175 min	60 °C
7. Verweilen	Pause	20 °C

Nachdem die nicht-methylierten Cytosine der CpG-Dinukleotide in dieser Reaktion zu Uracil konvertiert wurden, musste die behandelte DNA zur weiteren Verarbeitung durch eine PCR von den Bisulfit-Reagenzien getrennt werden. Dafür wurde das Reaktionsgemisch nach kurzer Zentrifugation in frische 1,5 ml-Reagiergefäße überführt und je 310 µl BL-Puffer (beinhaltet 10 µg/ml Carrier DNA) hinzugegeben, kurz gemischt und zentrifugiert. Nach Zugabe von je 250 µl Ethanol (99 %) und kurzem Mischen und Zentrifugieren wurde das Reaktionsgemisch in frische *EpiTect Spin-Columns* in einem 2 ml-Sammelgefäß überführt und für 1 min bei 17000 x g zentrifugiert. Danach wurden dem Gemisch 500 µl BW-Puffer zugegeben und dieses für 1 min bei 17000 x g zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl BD-Puffer und eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde das Gemisch für 1 min bei 17000 x g zentrifugiert und zweimal nacheinander 500 µl BW-Puffer hinzugegeben und bei 17000 x g zentrifugiert. Um eventuell verbleibende Flüssigkeit aus den *EpiTect Spin-Columns* zu entfernen, wurden diese in frische 1,5 ml-Reagiergefäße überführt und mit offenem Deckel in einem Thermomixer für 5 min bei 56 °C inkubiert. Danach wurden die *EpiTect Spin-Columns* in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und 20 µl EB-Puffer direkt auf die Silika-Membran pipettiert und 1 min bei 15000 x g zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die konvertierte DNA.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die isolierte und gegebenenfalls der Bisulfit-Reaktion unterzogene DNA musste vor der Sequenzierung zunächst mittels PCR vervielfältigt werden. Dafür wurde die DNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Es folgte der Ansatz eines PCR-Master-Mix. Dessen Zusammensetzung ist in der Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Zusammensetzung des PCR-Master-Mix für einen 25µl-Ansatz.

Reagenz	Volumen pro Ansatz
PCR Buffer, 10 x	2,5 µl
dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1 µl
RNase-freies Wasser	14 µl
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase	0,25 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Pro PCR-Ansatz wurden 20 µl des Master-Mix und jeweils 5 µl der DNA-Lösung in ein PCR-Röhrchen überführt. Für die Negativ-Kontrolle wurden die DNA-Lösung durch 5 µl RNase-freies Wasser ersetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch inklusive Negativkontrolle in einen Thermal-Cycler überführt und die PCR für die IDH-Analyse nach dem in der Tab. 10 dargestellten Schema durchgeführt.

Tab. 10: PCR-Protokoll für die IDH-Analyse.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Aktivierung	15 min	95 °C
2. Synthetisierung	39 Zyklen	
2.1 Denaturierung	30 s	95 °C
2.2 Hybridisierung	45 s	58 °C
2.3 Elongation	45 s	72 °C
3. Letzte Elongation	5 min	72 °C
4. Verweilen	Pause	12 °C

Im Rahmen der MGMT-Promotor-Analyse wurde das PCR-Protokoll im Anschluss an die Bisulfit-Reaktion, wie in der Tab. 11 dargestellt, nach Dunn et al. [61] angepasst.

Tab. 11: PCR-Protokoll für die MGMT-Analyse nach Dunn. [61].

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Aktivierung	15 min	95 °C
2. Synthetisierung	44 Zyklen	
2.1 Denaturierung	30 s	95 °C
2.2 Hybridisierung	30 s	54 °C
2.3 Elongation	30 s	72 °C
3. Letzte Elongation	5 min	72 °C
4. Verweilen	Pause	12 °C

2.2.3 Gel-Elektrophorese

Das Ergebnis wurde anschließend mittels Gel-Elektrophorese überprüft. Dafür wurden aus 80 ml einer zwei-prozentigen Agarose-Lösung (4 g Agarose, 200 ml TAE 1 x) unter Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid (1 %) Gelplatten gegossen. Die Gelplatte wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und mit 1 x TAE-Laufpuffer bedeckt. In die entstandenen Taschen wurden 5 µl des PCR-Produkts, sowie in eine separate Kammer 5 µl eines Vergleichsmarkers mit Fragmenten definierter Größe, pipettiert und eine Spannung von 150 V für 15 min angelegt. Es erfolgte die Kontrolle unter UV-Durchleuchtung, ob die Fragmente die erwartete Größe aufwiesen, bzw. ob die Negativ-Kontrolle frei von Fragmenten war.

2.2.4 Pyrosequenzierung

Die amplifizierte DNA wurde nach erfolgter Elektrophorese durch eine Pyrosequenzierung analysiert. Dafür wurden Sepharose-Beads für 5 min gemischt und unter Zugabe von Wasser und des *Binding Buffers* nach dem in der Tab. 12 dargestellten Schema ein Master-Mix, zur Immobilisierung der DNA, hergestellt.

Tab. 12: Zusammensetzung des Master-Mix zur DNA-Immobilisierung.

Reagenz	Volumen pro Ansatz
Binding Buffer	40 µl
H ₂ O	29 µl
Sepharose	1 µl
Gesamtvolumen	70 µl

Von dem Gemisch wurden jeweils 70 µl mit 10 µl des PCR-Produkts in ein PCR-Tube überführt und für 10 min bei 1400 rpm geschüttelt. Während dieser Zeit erfolgte die Herstellung des Primer-Mix nach dem in der Tab. 13 dargestellten Schema.

Tab. 13: Zusammensetzung des Primer-Mix für die Pyrosequenzierung.

Reagenz	Volumen pro Ansatz
Annealing Buffer	25 µl
Primer (10 µM)	0,8 µl
Gesamtvolumen	25,8 µl

Davon wurden je 25 µl in die Wells pipettiert. Daraufhin wurde die *Pyromark-Workstation* vorbereitet. Unmittelbar nach Beendigung des Schüttelvorgangs wurde das Gemisch aus Sepharose-Beads, der DNA und des Binding-Puffer für 30 s durch Ethanol, 30 s durch Natronlauge und 30 s durch einen Waschpuffer gespült und anschließend in die den Primer-Mix enthaltenden Wells überführt. Das Reaktionsgemisch wurde dann für 2 min bei 80 °C erhitzt und kühlte im Anschluss für 10 min auf Raumtemperatur ab. Nach dem Abkühlen der Proben und Befüllen der Sequenzierkassette mit den Basen, sowie Enzym und Substrat, erfolgte die Pyrosequenzierung. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Pyromark Q24 Version 2.0.6*.

Die Abb. 8 zeigt die Auswertung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. In allen zwölf analysierten Genabschnitten waren in dieser Probe mehr als 90 % der sequenzierten DNA unauffällig, sodass in Zusammenschau der Sequenzen und der Berechnung des Mittelwertes dieser keine erhöhte MGMT-Promotor-Methylierung vorlag.

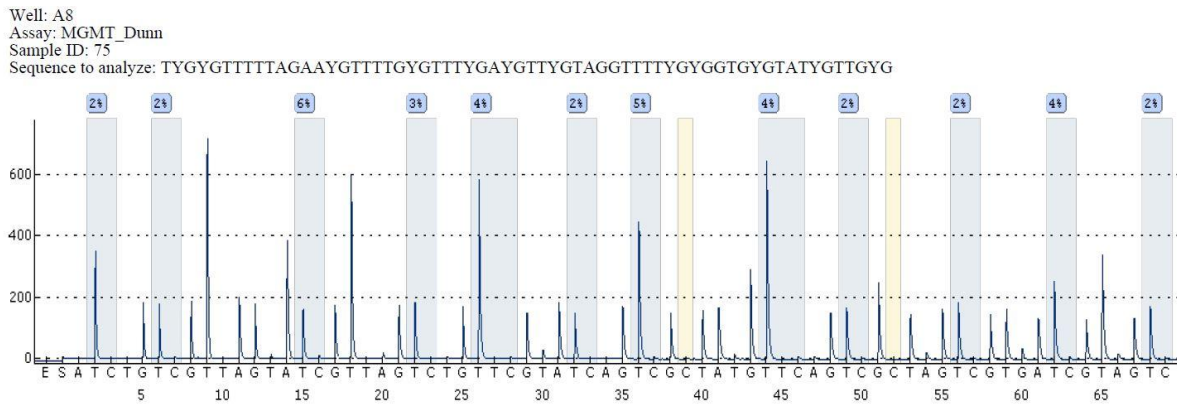


Abb. 8: Auswertung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (keine erhöhte Promotor-Methylierung). Hier liegt keine erhöhte Methylierung vor. Die ausgewerteten Nukleotide entsprachen allesamt > 90 % der erwarteten Base (Mittelwert = 3,17 %).

Die Abb. 9 dagegen stellt ein Beispiel für eine erhöhte MGMT-Promotor-Methylierung dar. Alle untersuchten Gensequenzen zeigten in über zehn Prozent der sequenzierten DNA Auffälligkeiten, sodass diese bei Berechnung des Mittelwertes eine erhöhte MGMT-Promotor-Methylierung ergaben.

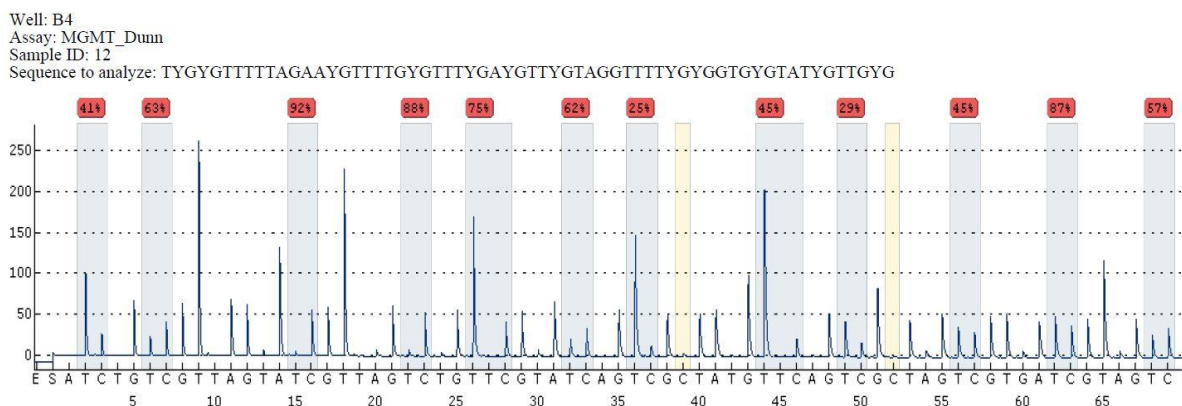


Abb. 9: Auswertung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (erhöhte Promotor-Methylierung). Hier liegt eine vermehrte Methylierung vor. Die ausgewerteten Nukleotide entsprachen allesamt > 90 % der erwarteten Base (Mittelwert = 54,3 %).

Die Auswertungsmethode des IDH-Mutationsstatus ist in der Abb. 10 und der Abb. 11 dargestellt. Als Mutationsnachweisgrenze galt eine Variantenallelsequenz von 10 %. Die Abb. 10 zeigt eine regelrechte CGT-Abfolge auf Position 132 der IDH1-Sequenz in 97 % der sequenzierten Allele, was somit als IDH 1-Wildtyp gewertet wurde.

Well: A2
Assay: IDH1
Sample ID: 69
Sequence to analyze: GGTNGTCATGCTTAT

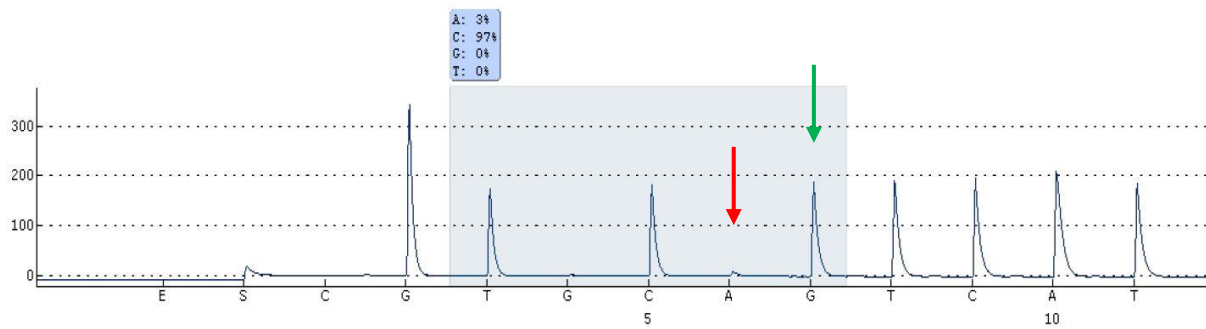


Abb. 10: Auswertung des IDH-Mutationsstatus (IDH-Wildtyp). Hier zeigt sich in 97% der Fälle die erwartete Nukleotid-Sequenz mit einem Guanosin-Nukleotid (grüner Pfeil), ein Adenosin-Nukleotid lediglich in 3 % der Fälle (roter Pfeil) .

In der Abb. 11 ist die Analyse einer Probe eines IDH-1 mutierten Tumors zu sehen. In 32 % der sequenzierten Allele lässt sich ein Adenosin-Nukleotid anstatt eines Guanosin-Nukleotids detektieren, sodass in diesem Fall von der typischen Punktmutation zu einem CAT-Triplett ausgegangen werden kann.

Well: A1
Assay: IDH1
Sample ID: 68
Sequence to analyze: GGTNGTCATGCTTAT

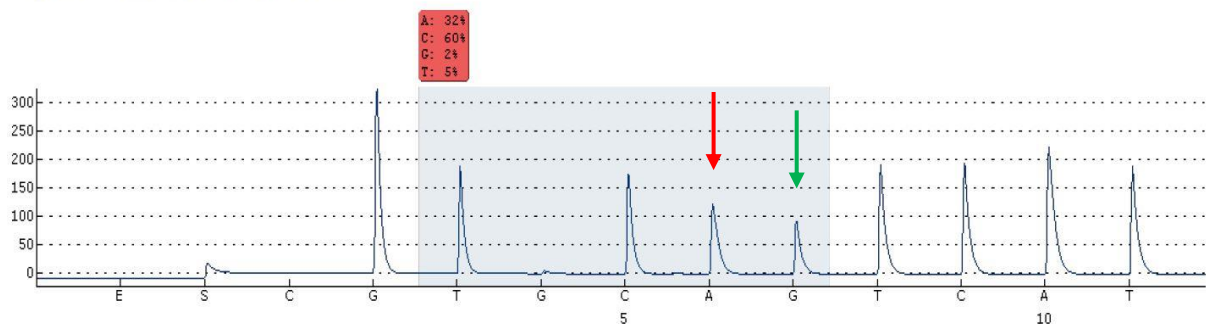


Abb. 11: Auswertung des IDH-Mutationsstatus (IDH-Mutation). Hier zeigt sich in 32% der sequenzierten DNA die häufigste Punktmutation im IDH-Gen mit der Mutationssequenz CAT statt CGT an Position 132 des IDH1-Gens.

2.2.5 MLPA-Untersuchung

Um bei den vorliegenden Proben retrospektiv eine aussagekräftige Untersuchung auf eine 1p/19q-Codeletion durchführen zu können, wurde eine MLPA durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglichte eine Untersuchung der 1p/19q-Konfiguration, auch ohne nicht-mutierte Patienten-DNA als Referenz [62]. Das genaue Programm für die MLPA-Reaktion ist in der Tab. 14 in Gänze dargestellt.

Tab. 14: MLPA-Protokoll. [62].

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Denaturierung	5 min	98 °C
	Pause	25 °C
2. Hybridisierung	1 min	95 °C
	16-20 h	60 °C
3. Ligation	Pause	54 °C
	15 min	54 °C
	5 min	98 °C
	Pause	20 °C
4. Amplifikation	35 Zyklen	
	30 s	95 °C
	30 s	60 °C
	60 s	72 °C
	20 min	72 °C
	Pause	15 °C

2.2.5.1 Denaturierung

Die zu analysierende DNA, sowie Referenz-DNA und DNA zur Positivkontrolle, wurde zunächst auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt. Je 5 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in eine PCR-Tube überführt und denaturiert. Nach dem Anmischen des Hybridisierungs-Master-Mix, bestehend aus jeweils 1,5 µl MLPA-Puffer und 1,5 µl MLPA-Sonden pro Reaktion, wurde je 3 µl des Master-Mix in das Reaktionsgemisch pipettiert und mit der Sonden-Hybridisierung fortgefahren.

2.2.5.2 Hybridisierung, Ligation und Amplifikation

Dieser Schritt dient der Hybridisierung der verschiedenen MLPA-Sonden an die jeweiligen Einzelstränge. Eine Sonde besteht dabei aus zwei Nukleotiden, die an benachbarten Sequenzen hybridisieren. Gelingt diese Hybridisierung, können die beiden, noch getrennten Sonden im nächsten Schritt miteinander ligiert werden. Dafür wurden dem sich weiterhin im Thermal Cycler befindenden Reaktionsgemisch je 32 µl eines Ligase-65-Master-Mix, bestehend aus 25 µl Ultra-Reinstwasser, 3 µl Ligase Puffer A, 3 µl Ligase Puffer B, 1 µl Ligase-65-Enzym, hinzugegeben und mit dem Ligase-Programm fortgefahren. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der verbundenen MLPA-Sonden durch eine PCR. Die Primer dafür waren mit einem speziellen Farbstoff gekennzeichnet, um eine spätere Auswertung in der Fragment-Separation zu ermöglichen.

2.2.5.3 Fragment-Separation mittels Kapillarelektrophorese

Zum Schluss erfolgte die Fragment-Separation mittels Kapillarelektrophorese. Diese fand in dem Gerät „ABI-3500“ statt. Dafür wurden je 0,7 µl Amplifikat mit 0,2 µl LIZ GS 500 Größenstandard und 9 µl HiDi-Formamid gemischt, in eine Injektionsplatte pipettiert und diese für 2 min auf 86 °C erhitzt und im Anschluss für 2 min bei 4 °C abkühlt. Im Anschluss erfolgte die Fragment-Separation mit Hilfe der Software *GeneMapper v4.1* bei einer Betriebsspannung von 15 kV und einer Laufzeit von 3000 s. Die Rohdaten der Kapillarelektrophorese wurden mit der Software *Coffalyzer* analysiert, ein Ausschnitt daraus ist in den Abb. 12 und 13 dargestellt.

2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse erfolgten Berechnungen deskriptiver statistischer Werte wie der Häufigkeit, des Medians, des Mittelwertes, der Standardabweichung, des Konfidenzintervalls und der Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meyer-Verfahren. Weiterhin erfolgte die Signifikanzprüfung der Daten mittels Log-Rank-Test, t-Test, Fisher-Freeman-Halton-Test und dem Test nach Kruskal-Wallis. Die statistische Analyse erfolgte mit der Software *IBM SPSS Statistics Version 27*. Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ galt als statistisch signifikant. Ein Wert $p < 0,01$ galt als sehr signifikant und $p < 0,001$ als hoch signifikant.

01p (n=19)	GNB1-3	01-001,746713	0.53	0.64	1.19
	TNFRSF14-8	01-002,479695	0.44	0.51	1.07
	TP73-1	01-003,558493	0.48	0.61	1.27
	PARK7-7	01-007,967679	0.48	0.47	1.11
	MFN2-10	01-011,984395	0.59	0.54	1.18
	WNT4-2	01-022,328835	0.54	0.62	1.22
	PTAFR-3	01-028,349939	0.56	0.62	1.21
	PRDX1-7	01-045,749340	1.17	1.31	1.06
	PRDX1-2	01-045,760287	0.48	0.47	1.21
	FAF1-4	01-051,026388	0.62	0.72	0.92
	CDKN2C-1	01-051,207960	0.55	0.67	1.17
	CDKN2C-3	01-051,212265	0.68	0.69	0.99
	PLPP3-2	01-056,775291	0.74	0.7	0.93
	MIR101-1-1	01-065,296660	0.74	0.68	1.03
	FUBP1-8	01-078,203391	0.7	0.66	0.97
	GTF2B-2	01-089,125546	0.53	0.64	1.02
	DPYD-1	01-098,159098	0.62	0.65	1.19
	NRAS-5	01-115,052670	0.63	0.62	0.9
	NOTCH2-5	01-120,331104	0.72	0.67	0.94
01q (n=3)		Chr. band: 01q22 - 01q32.1 Size: 452...	1.16	1.18	1.01
09p (n=5)		Chr. band: 09p21.3 Size: 37806 nt, 3...	0.98	1.07	1.1
19p (n=2)		Chr. band: 19p13.2 Size: 45580 nt, 4...	0.65	0.83	1.27
19q (n=11)	CCNE1-11	19-035,005212	0.66	0.67	1.17
	PDCD5-1	19-037,764006	0.61	0.64	1.29
	UPK1A-4	19-040,856158	0.38	0.42	1.19
	UPK1A-7	19-040,860909	0.65	0.7	1.12
	TGFB1-3	19-046,542497	0.53	0.53	1.03
	CIC-10	19-047,486622	0.48	0.51	1.18
	ZNF296-2	19-050,270824	0.45	0.46	1.4
	PPP1R15A-2	19-054,069622	0.56	0.73	1.39
	BAX-4	19-054,151278	1.1	1.24	0.93
	CHMP2A-4	19-063,755278	0.7	0.77	1.04
	CHMP2A-2	19-063,757281	0.63	0.76	1.25
02q (n=2)		Chr. band: 02q33.3 Size: 120 nt; 0 kb	16.86	21.96	0.37
15q (n=2)		Chr. band: 15q26.1 Size: 61 nt; 0 kb	0.46	0.53	0.62
References (n=14)		Number of chromosomes: 12 Number...	1.01	1.02	1.01

Abb. 12: Tabellarische Darstellung einer MLPA-Untersuchung in der Software „Coffalyser“. In zwei Spalten zeigen sich erniedrigte Werte (rot gefärbt) an verschiedenen Allelen des 1p- bzw. 19q-Arms (Nachweis einer 1p/19q-Codeletion). In der rechten Spalte (nicht gefärbt) zeigen sich Werte im Normbereich (unauffälliger 1p/19q-Deletionsstatus)

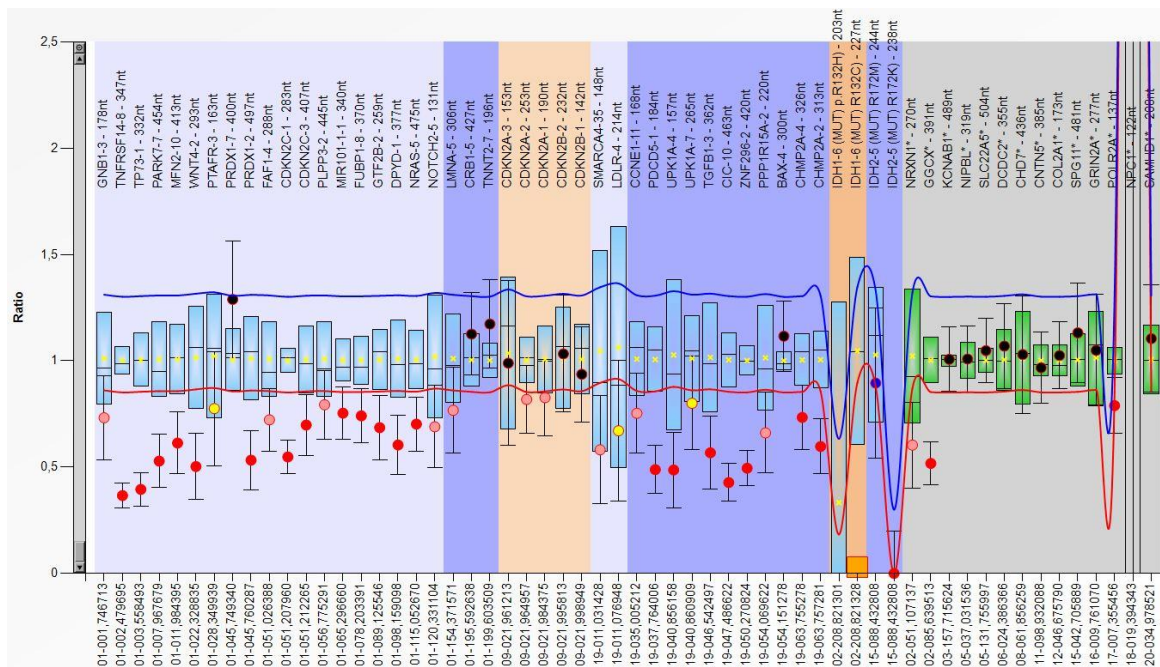


Abb. 13: Grafische Darstellung einer MLPA-Untersuchung in der Software „Coffalyser“. Die roten Punktmarkierungen zeigen das Untersuchungsergebnis an, die blaue bzw. rote Linie die oberen bzw. unteren Grenzwerte. Die Box-Whisker-Plots zeigen die zu erwartende Normverteilung der Messwerte an. Die Hintergrundeinfärbung kennzeichnet die verschiedenen Chromosomenarme. Der hell-violette Bereich kennzeichnet den 1p-Arm, der breite dunkel-violette Bereich kennzeichnet den 19q-Arm. In diesem Fall liegt eine 1p/19q-Codeletion vor.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

In dieser Arbeit wurden Daten von Patient/-innen mit Gliomen des WHO-Grades 3 mit der Erstdiagnose zwischen 1994 und 2019 analysiert. Insgesamt wurden Daten von 107 männlichen (64,1 %) und 60 weiblichen (35,9 %) Personen ($n = 167$) ausgewertet. Das mediane Alter betrug 47 (20 – 79) Jahre bei den Männern bzw. 48 (20 – 74) Jahre bei den Frauen. Am häufigsten traten die Tumoren im linken Frontallappen auf. Ein multifokales Auftreten bei Erstdiagnose konnte in 20 Fällen beobachtet werden. Klinisch äußerte sich die Erkrankung am häufigsten durch einen epileptischen Krampfanfall (54,8 %), Sprachstörungen (21,3 %) und Kopfschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen (21,3 %). Die ausführliche Häufigkeit verschiedener Symptome sind in den Anlagen dargestellt. Die Beeinträchtigung der Patient/-innen durch die Krankheit, beurteilt durch Erhebung des Karnofsky-Performance-Status, ergab im Median einen Wert von 90 (30-100). Im Rahmen der operativen Versorgung erfolgten 32 Biopsien (19,2 %), 73 subtotale Resektionen (43,7 %) und 61 totale Resektionen (36,5 %) – In einem Fall konnte das Resektionsausmaß nicht ermittelt werden (0,6 %). Der postoperativ erhobene KPS-Index betrug im Median ebenfalls 90 (20 – 100). Die Tab. 15 stellt den KPS-Index im Mittelwert prä- und postoperativ in Bezug zum jeweiligen Resektionsausmaß dar.

Tab. 15: KPS vor und nach Operation nach Resektionsausmaß. p : t -Test.

	Karnofsky präoperativ Mittelwert (Std.-Abweichung)	Karnofsky postoperativ Mittelwert (Std.-Abweichung)	p
Biopsie	80,31 (2,44)	80,63 (2,42)	0,786
Subtotal	84,11 (1,85)	80,96 (1,94)	0,068
Total	87,54 (1,88)	87,38 (1,60)	0,930
Insgesamt	84,64 (1,18)	83,25 (1,16)	0,184

48 Patient/-innen (28,7 %) erhielten als postoperative Therapie eine Radio-/Chemotherapie, 75 Patient/-innen (44,9 %) eine Radiotherapie, durchgeführt vor dem Jahre 2005, 33 Patient/-innen (19,8 %) eine Radiotherapie im Jahre 2005 oder später, 11 Patient/-innen (6,6 %) erhielten eine nicht vollständig durchgeführte Radio-/Chemotherapie. Als Beurteilung der Malignität des Tumors wurde der Ki-67-Index bewertet, dieser betrug im Mittel 20,55 (Std.-Abweichung $\pm 10,15$).

3.2 Analyse der molekulargenetischen Marker

Zur Einteilung in die neue WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2016 und weiteren Überlebenszeitanalyse erfolgte die Auswertung der molekulargenetischen Konstellationen der Tumoren.

3.2.1 O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Bei 136 (81,4 %) der insgesamt 167 Patient/-innen konnte der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus untersucht werden. Davon war bei 88 Patient/-innen (64,7 %) eine Methylierung des MGMT-Promotors von mehr als 10 %, bei 48 Patient/-innen (35,3 %) eine Methylierung von weniger als 10 % zu beobachten. Bei 31 Tumorproben (18,6 %) gelang die Analyse nicht.

3.2.2 Isocitrat Dehydrogenase 1/2 (IDH1/2)

Bei 143 (85,6 %) der insgesamt 167 Patient/-innen konnte der IDH-Mutationsstatus untersucht werden. Davon zeigte sich bei 85 Patient/-innen (59,4 %) eine IDH-Mutation (IDH-1 = 83 (58,2 %), IDH-2 = 2 (1,2 %)), bei 58 Patient/-innen (40,6 %) zeigte sich ein IDH-Wildtyp. Bei 24 Tumorproben (14,4 %) gelang die Analyse nicht.

3.2.3 1p/19q-Codeletion

Die Analyse des 1p/19q-Deletionsstatus gelang bei 104 (62,3 %) der insgesamt 167 Patient/-innen. Davon konnte bei 12 Patient/-innen (11,5 %) eine 1p/19q-Codeletion nachgewiesen werden, bei 92 Patient/-innen (88,5 %) zeigte sich keine 1p/19q-Codeletion. Bei 63 Tumorproben (37,7 %) gelang keine Analyse.

3.3 Einteilung der Tumorentitäten

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung lagen die Diagnosen zum größten Teil nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2007 oder älter vor. Durch die durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen konnte eine Einteilung in die aktualisierte WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2016 erfolgen. Die Tab. 16 stellt dies numerisch dar. Deutlich wird, dass die ehemals als

Oligoastrozytom klassifizierten Tumore nun entweder als Astrozytom oder als Oligodendrogliom klassifiziert werden konnten.

Tab. 16: Einteilung nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2007 und 2016.

		Gruppe nach WHO 2016					Gesamt
		Astrozytom			Oligodendrogliom,		
		IDH-mutiert	IDH-Wildtyp	NOS	1p19q-codeletiert	NOS	
Gruppe nach WHO 2007	Astrozytom	40	42	37	2	1	122
	Oligoastrozytom	13	6	4	4	0	27
	Oligodendrogliom	3	0	0	3	12	18
Gesamt		56	48	42	9	12	167

Die Abb. 14 stellt diese Umverteilung grafisch dar.

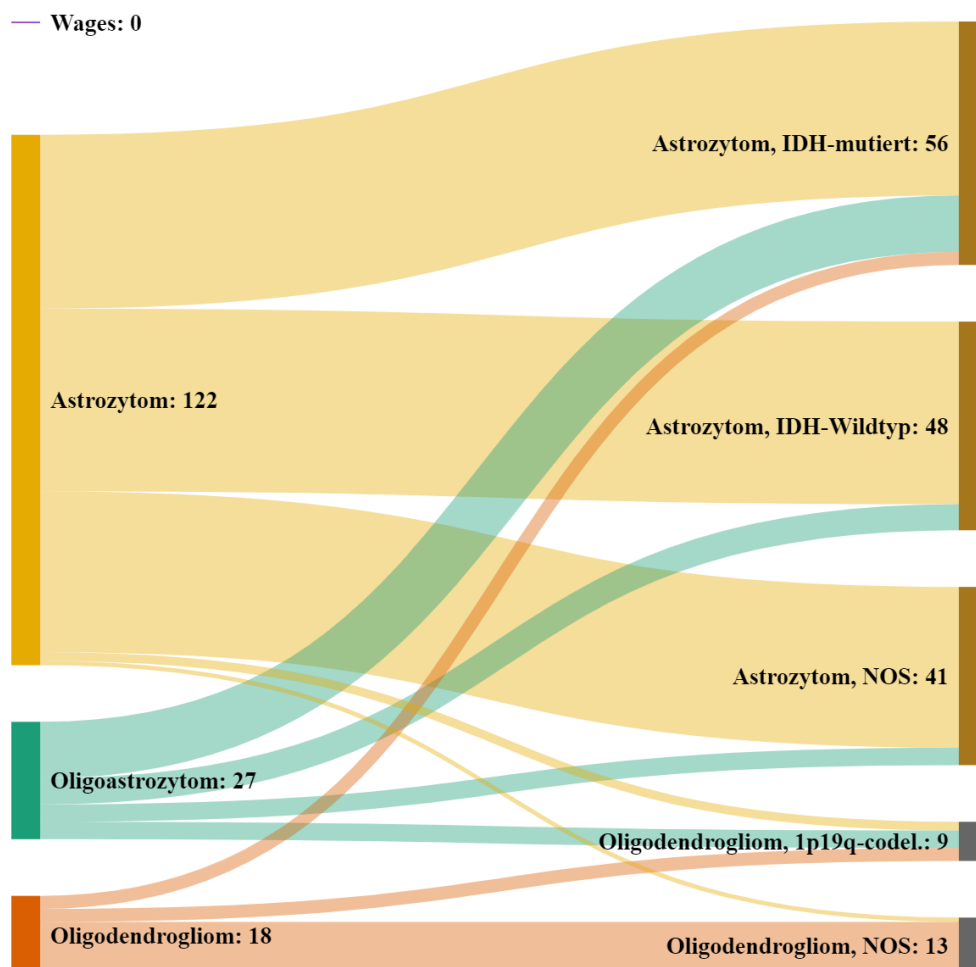


Abb. 14: Umverteilung der Tumorentitäten zwischen den WHO-Klassifikationen aus dem Jahre 2007 und 2016.

3.4 Überlebenszeitanalyse

3.4.1 Soziodemographische und klinische Einflussfaktoren

Es wurde die progressionsfreie Zeit und die Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs (Abb. 15 und 16, Tab. 17) sowie ausgewählte Einflussfaktoren auf diese Zeiten untersucht. Zwischen den Geschlechtern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 17 – 18, Tab. 17). Zwischen den Altersgruppen der unter und über 50-jährigen Patient/-innen (Abb. 19 und 20, Tab. 17) bestanden signifikante Unterschiede in der progressionsfreien Zeit ($p < 0,05$) und Überlebenszeit ($p < 0,001$). Zwischen uni- und multifokalem Auftreten bei Erstdiagnose (Abb. 21 und 22) bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Überlebenszeit. Zur Beurteilung des Einflusses des klinischen Zustands auf die Zielgrößen erfolgte die Auswertung des präoperativen Karnofsky-Performance-Status. Dafür wurden die Fälle in die Gruppe „KPS < 80“ und „KPS 80 – 100“ eingeteilt (Abb. 23 und 24, Tab. 17). Hier ergaben sich signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit ($p < 0,01$). Bezüglich des Resektionsausmaßes nach totaler und subtotaler Resektion sowie Biopsie (Abb. 25 und 26, Tab. 17) ergaben sich signifikante Unterschiede in der progressionsfreien Zeit ($p < 0,01$) und in der Überlebenszeit ($p < 0,001$).

Tab. 17: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit nach soziodemographischen und klinischen Einflussfaktoren. *p*: Log-Rank-Test. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. KPS: Karnofsky-Index. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

		Progressionsfreie Zeit (Jahre)			Überlebenszeit (Jahre)		
		5J (%)	Median (95 %-KI)	<i>p</i>	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	<i>p</i>
Gesamt		35,1	2,13 (1,44 – 2,81)		56,6	7,72 (3,39 – 12,05)	
Geschlecht	Frau	42,4	3,3 (1,12 – 5,47)	0,240	62,8	8,90 (0,30 – 17,50)	0,625
	Mann	31,0	1,82 (1,22 – 2,42)		53,2	5,97 (0,00 – 12,76)	
Alter (Jahre)	< 50	39,3	3,30 (2,19 – 4,40)	< 0,05	65,7	-	< 0,001
	>50	29,9	1,13 (0,31 – 1,95)		46,0	3,74 (0,33 – 7,14)	
Multifokal	Ja	23,3	1,82 (0,00 – 4,28)	0,665	40,0	2,03 (0,00 – 4,47)	< 0,05
	Nein	36,5	2,22 (1,52 – 2,93)		58,8	8,90 (1,34 – 16,47)	
KPS präop.	<80	41,5	2,63 (1,02 – 4,24)	0,166	41,5	2,49 (0,00 – 5,53)	< 0,01
	80 – 100	61,7	2,13 (1,17 – 3,08)		61,7	11,30 (3,84 – 18,75)	
Resektion	Biopsie	16,1	0,61 (0,08 – 1,13)	< 0,01	16,1	1,87 (0,18 – 3,56)	< 0,001
	Subtotal	24,5	2,03 (1,08 – 2,97)		24,5	5,10 (3,04 – 7,17)	
	Total	52,7	25,14 (1,37 – 8,90)		76,3	-	

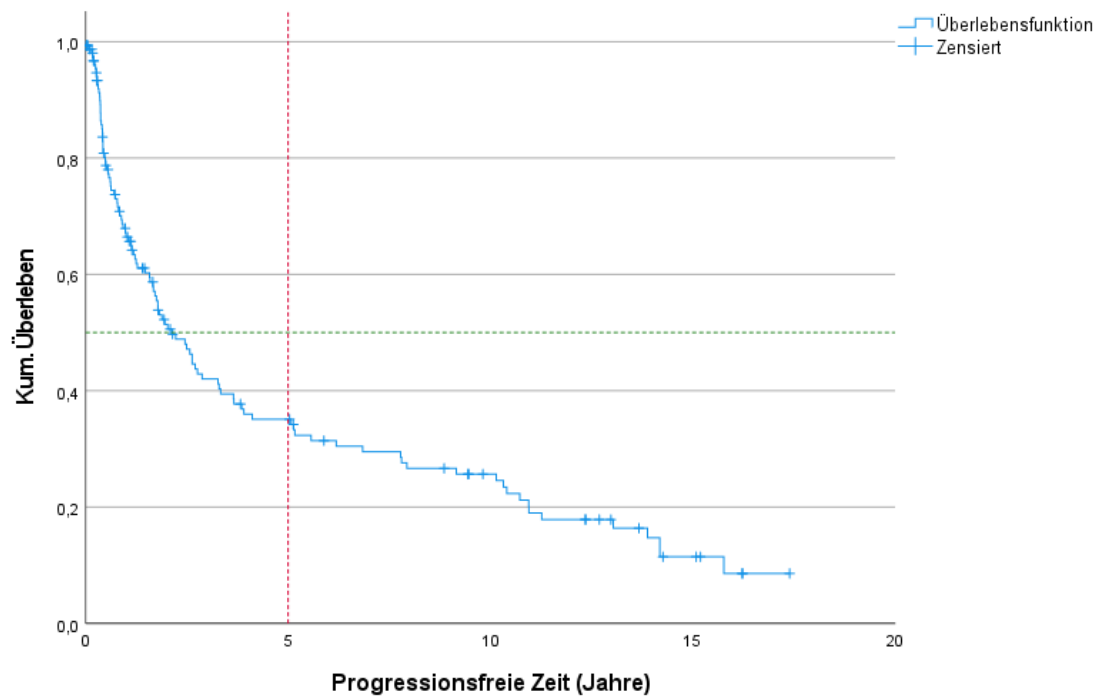


Abb. 15: Progressionsfreie Zeit (gesamt). 5J (%) = 35,1. Mediane progressionsfreie Zeit (95 %-KI) = 2,13 Jahre (1,44 – 2,81). 5J: Anteil nach fünf Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall.

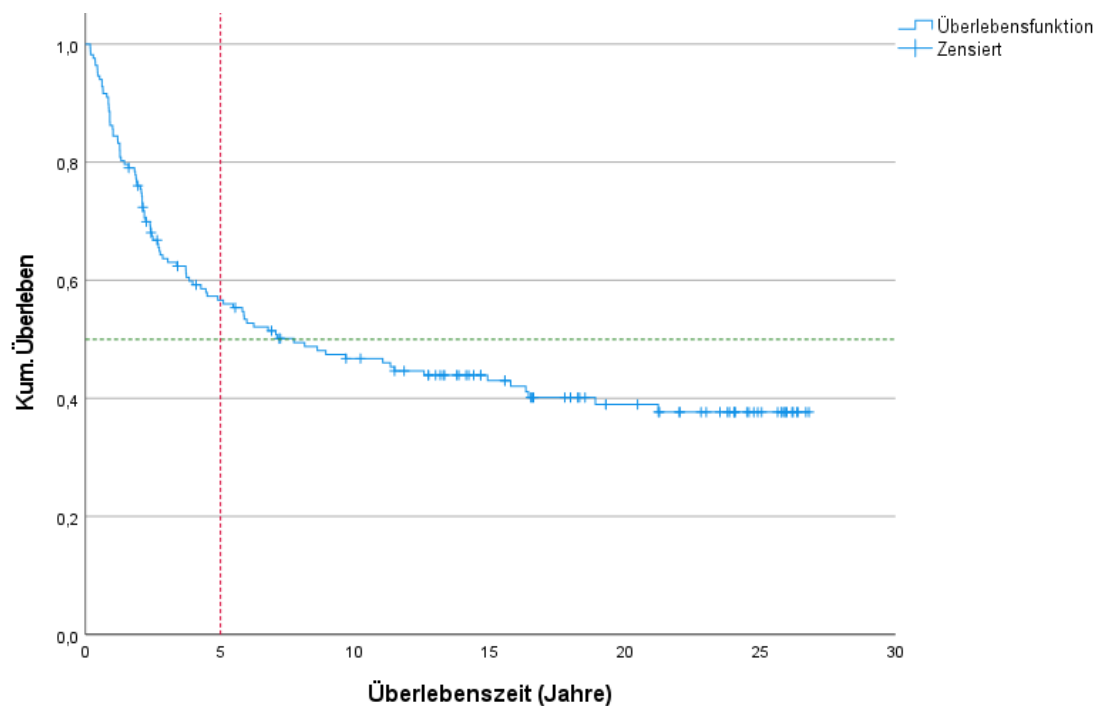


Abb. 16: Überlebenszeit (gesamt). 5JÜ (%) = 56,6. Mediane Überlebenszeit (95 %-KI) = 7,72 Jahre (3,39 – 12,05). 5JÜ: Anteil nach fünf Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall.

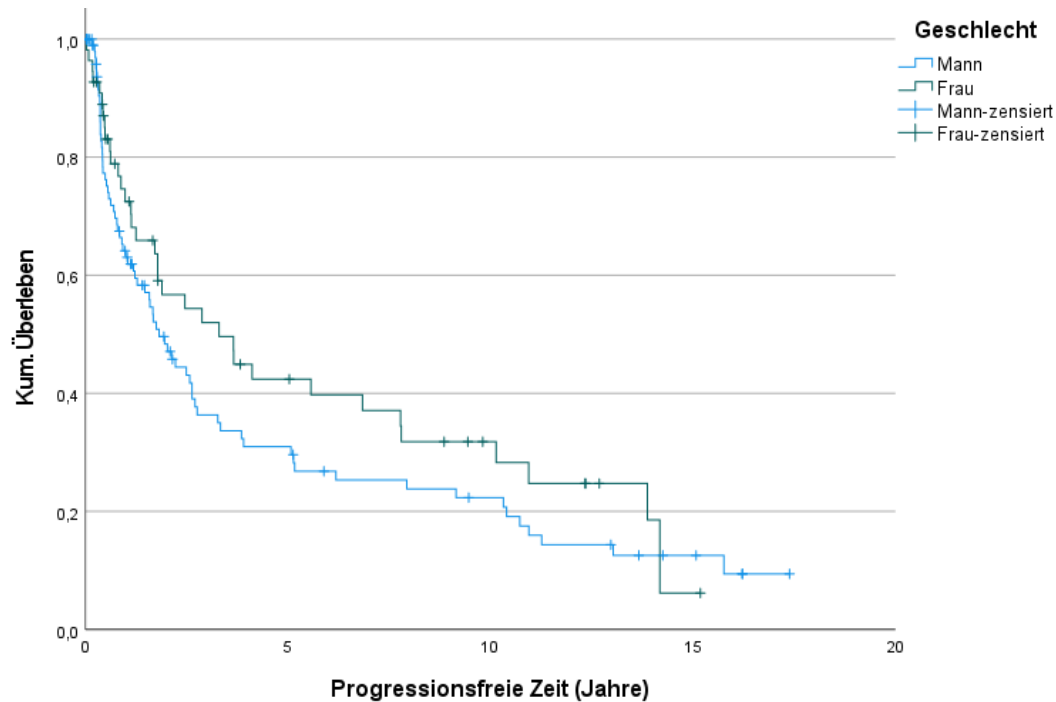


Abb. 17: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des Geschlechts. 5J (%): Frauen = 42,4, Männer = 31,0. Median in Jahren (95 %-KI): Frauen = 3,30 (1,12 – 5,47), Männer = 1,82 (1,22 – 2,42). $p = 0,240$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

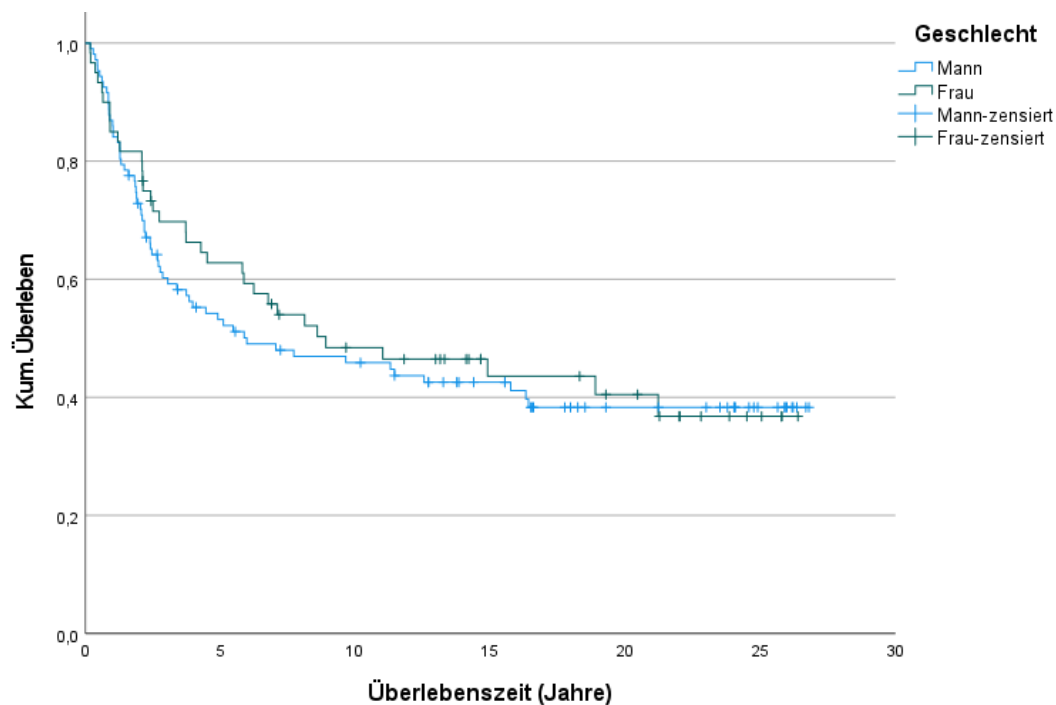


Abb. 18: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Geschlechts. 5JÜ (%): Frauen = 62,8, Männer = 53,2. Median in Jahren (95 %-KI): Frauen: 8,9 (0,30 – 17,59), Männer = 5,97 (0,00 – 12,76). $p = 0,625$. 5JÜ = Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

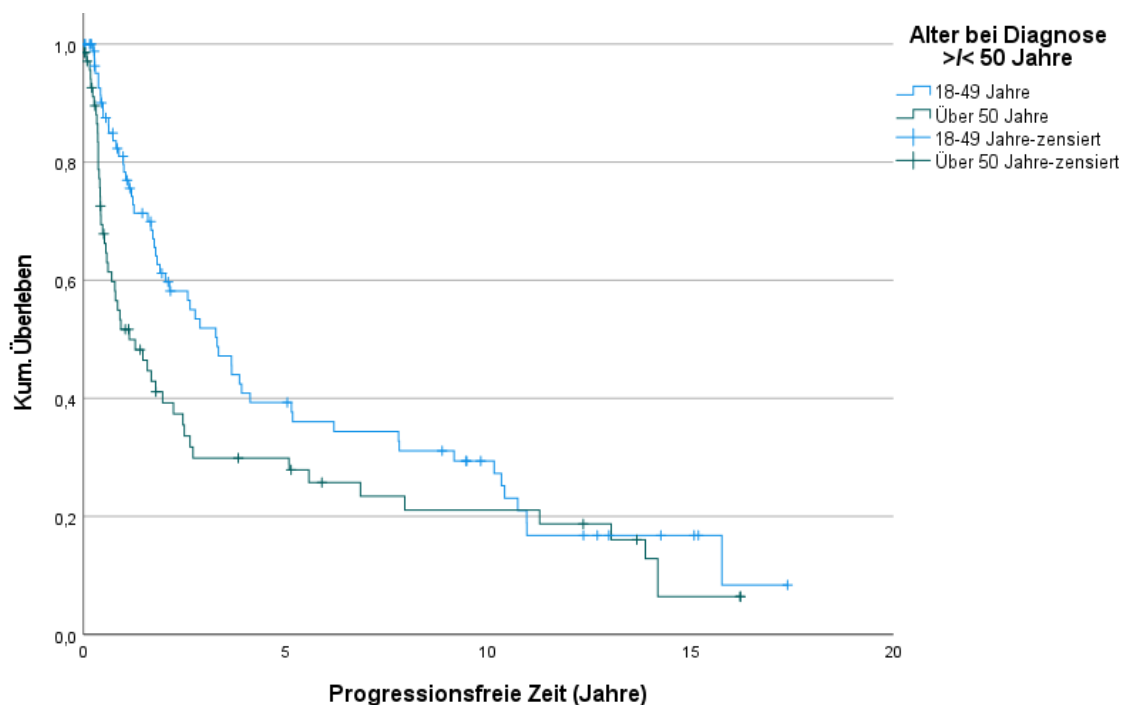


Abb. 19: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des Alters. 5J (%): 18-49 Jahre = 39,3, über 50 Jahre = 29,9. Median in Jahren (95 %-KI): 18-49 Jahre = 3,30 (2,19 – 4,40), über 50 Jahre = 1,13 (0,31 – 1,95). $p < 0,05$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

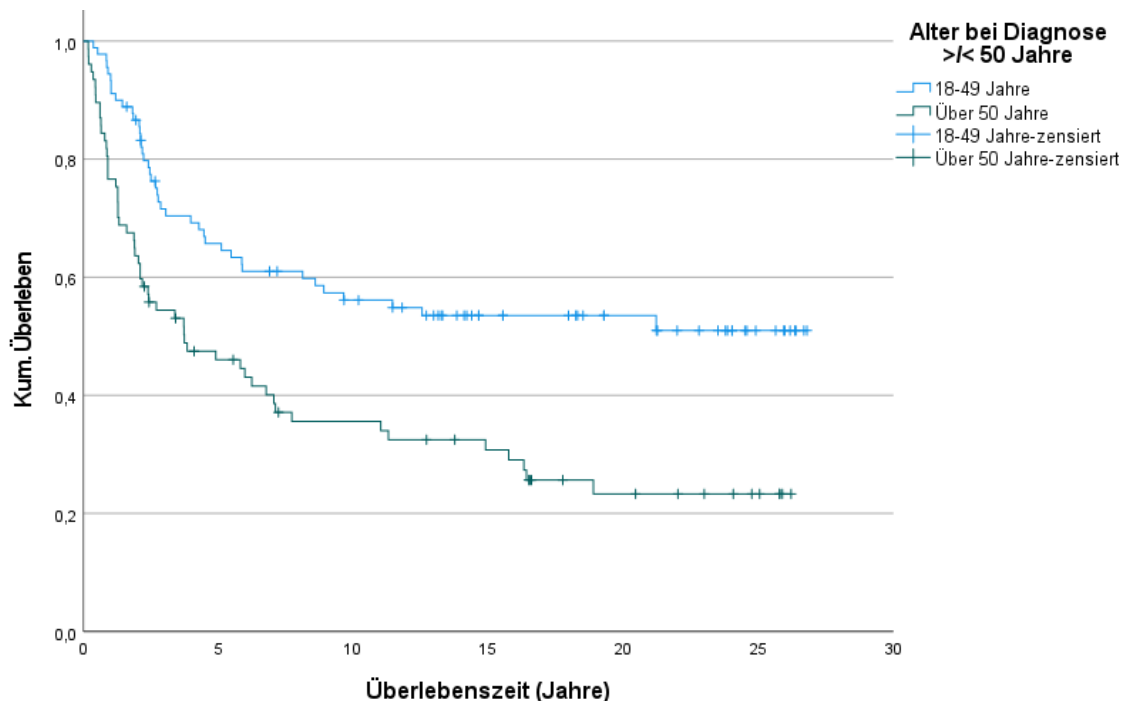


Abb. 20: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Alters. 5JÜ (%): 18-49 Jahre = 65,7, über 50 Jahre = 46,0. Median in Jahren (95 %-KI): 18-49 Jahre = k.A. (nach letztem Ereignis >51 %), über 50 Jahre = 3,74 (0,33 – 7,14). $p < 0,001$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test. k.A.: keine Angabe möglich.

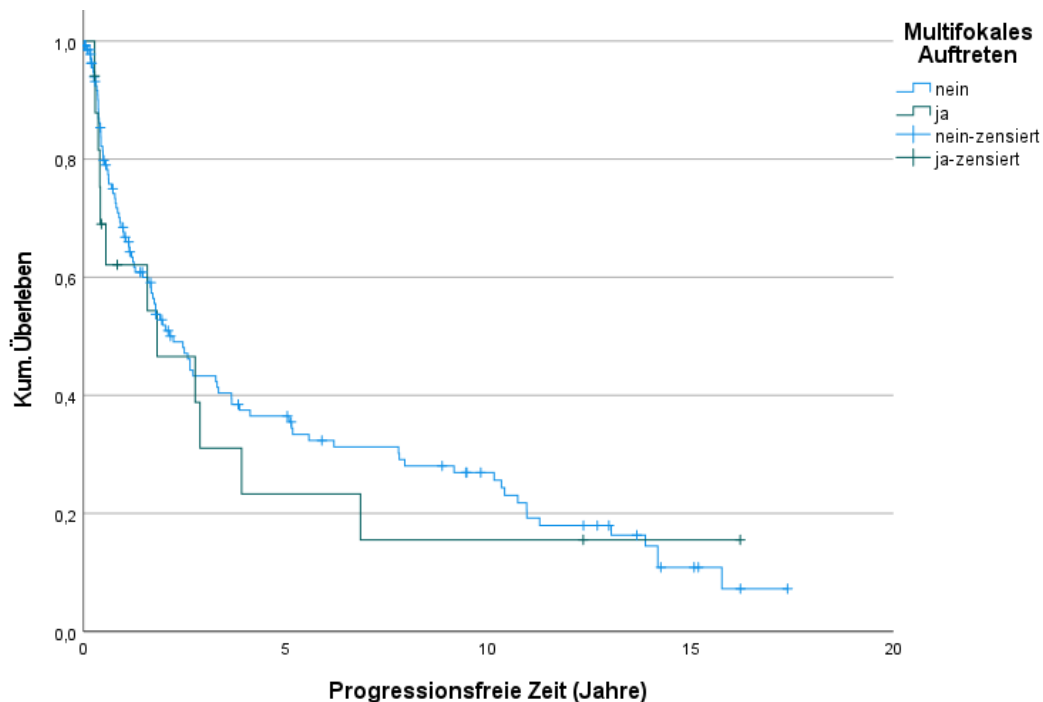


Abb. 21: Progressionsfreie Zeit bei multi-/unifokalem Auftreten. 5J (%): multifokal = 23,3, unifokal = 36,5. Median in Jahren (95 %-KI): multifokal = 1,82 (0,00 – 4,28), unifokal = 2,22 (1,52 – 2,93). $p = 0,665$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

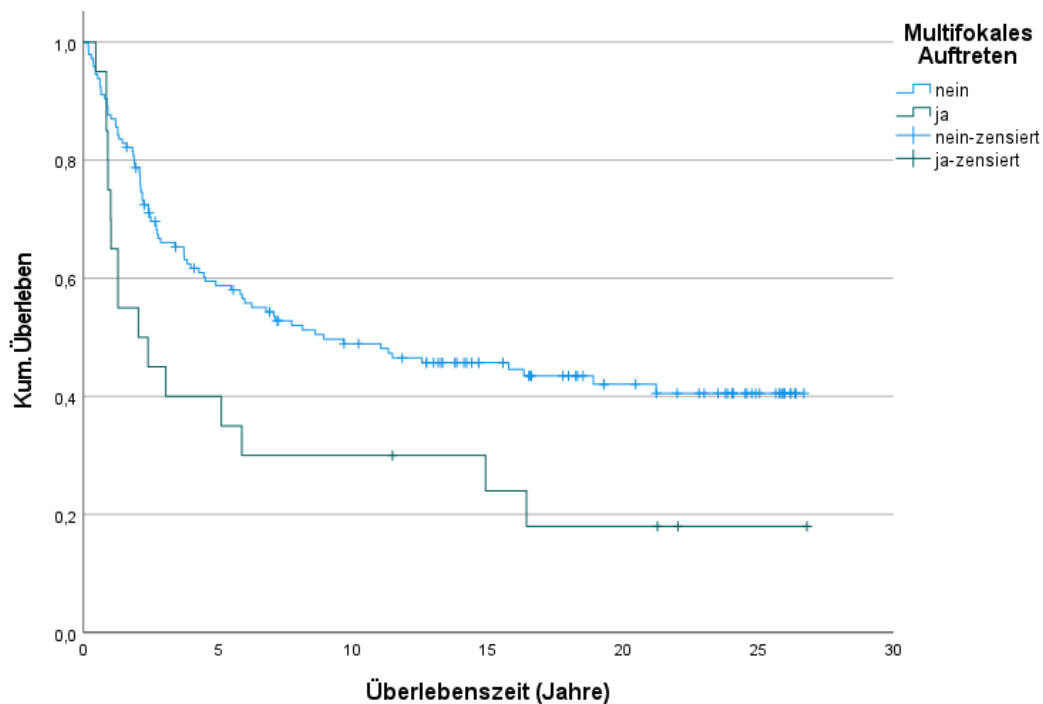


Abb. 22: Überlebenszeit bei multi-/unifokalem Auftreten. 5JÜ (%): multifokal = 40,0, unifokal = 58,8. Median in Jahren (95 %-KI): multifokal = 2,03 (0,00 – 4,47), unifokal = 8,90 (1,34 – 16,47). $p < 0,05$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

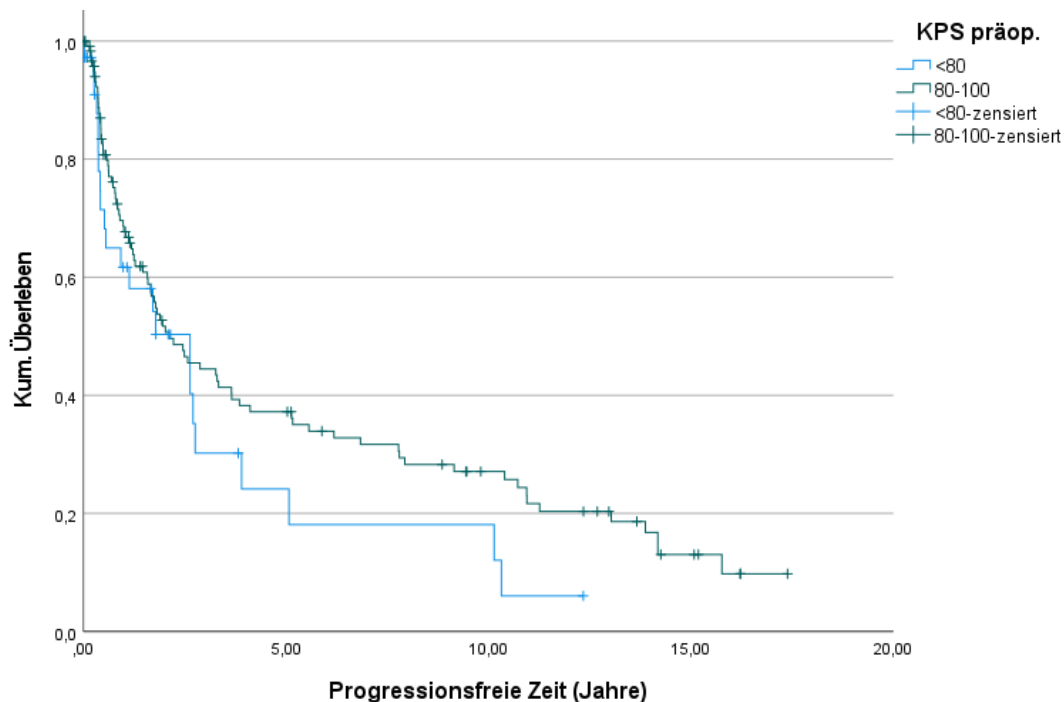


Abb. 23: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit des präoperativen KPS. 5J (%): KPS <80 = 24,2, KPS 80 – 100 = 37,2. Median in Jahren (95 %-KI): KPS <80 = 2,63 (1,02 – 4,24), KPS 80 – 100 = 2,13 (1,17 – 3,08). $p = 0,166$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

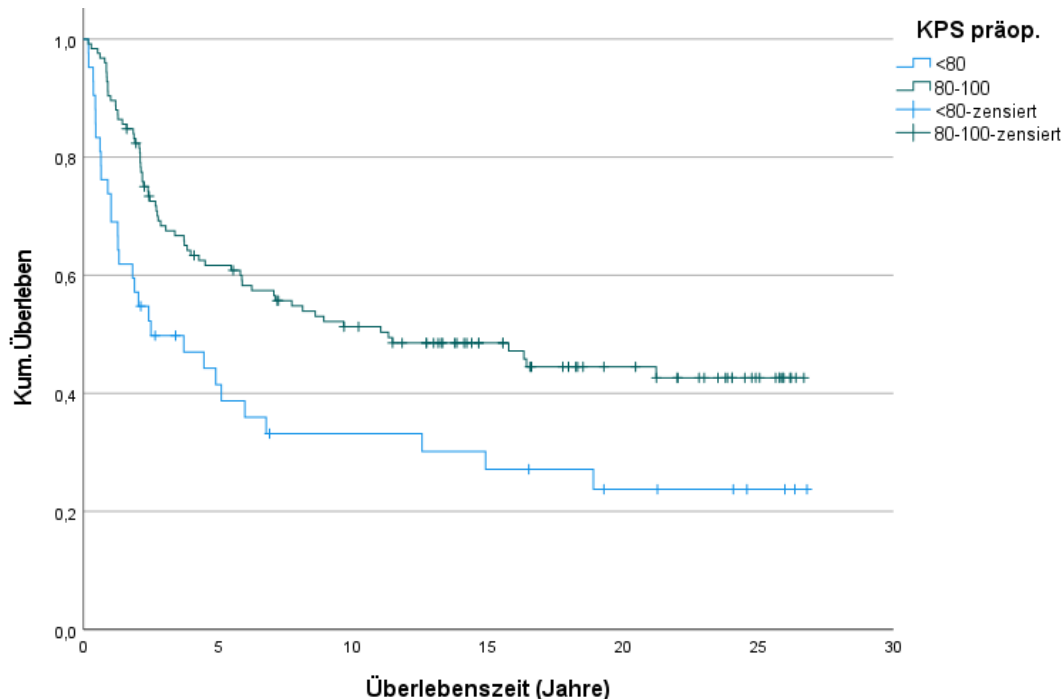


Abb. 24: Überlebenszeit in Abhängigkeit des präoperativen KPS. 5JÜ (%): KPS <80 = 41,5, KPS 80 – 100 = 61,7. Median in Jahren (95 %-KI): KPS <80 = 2,49 (0,00 – 5,53), KPS 80 – 100 = 11,30 (3,84 – 18,75). $p < 0,01$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

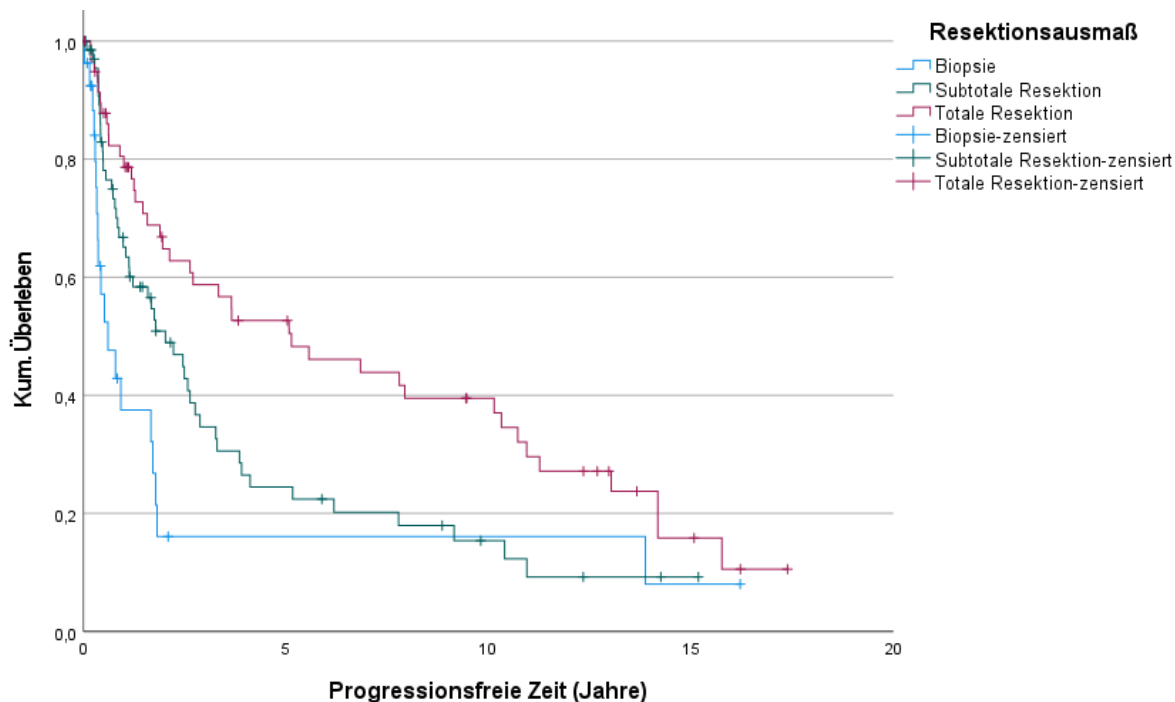


Abb. 25: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom Resektionsausmaß. 5J (%): Biopsie = 16,1, subtotal = 24,5, totale = 52,7. Median in Jahren (95 %-KI): Biopsie = 0,61 (0,08 – 1,13), subtotal = 2,03 (1,08 – 2,97), totale Resektion = 5,14 (1,37 – 8,90). $p < 0,01$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

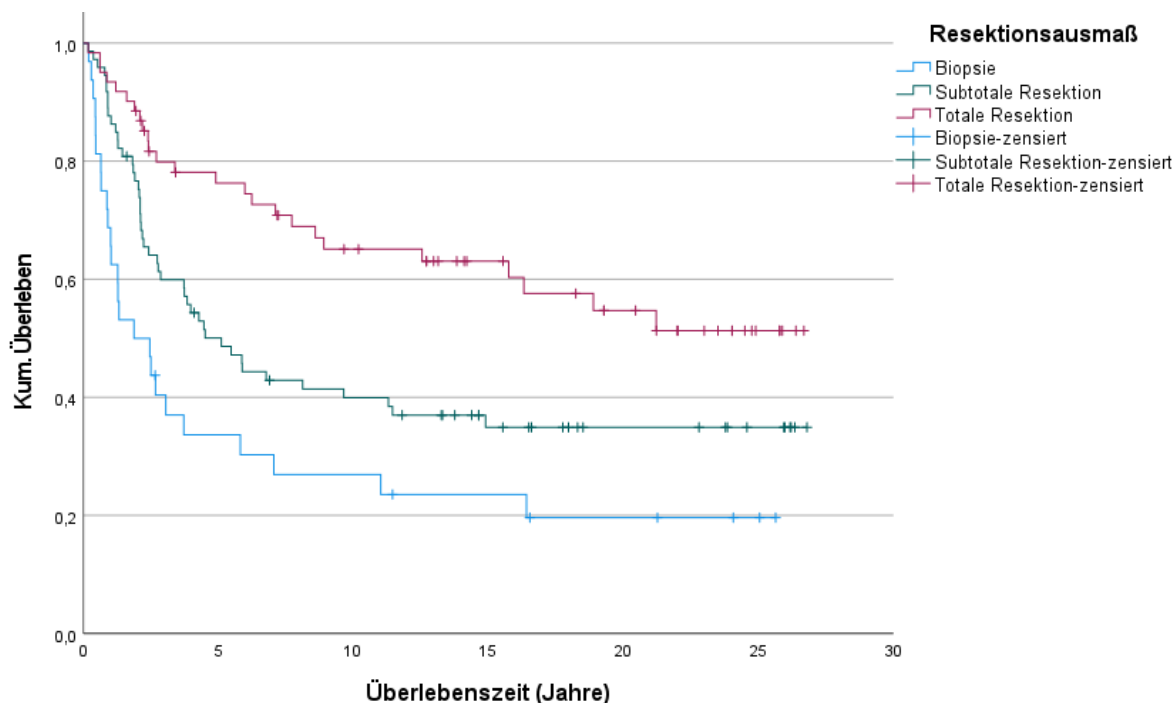


Abb. 26: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Resektionsausmaß. 5JÜ (%): Biopsie = 33,7, subtotal = 50,1, totale 76,3. Median in Jahren (95 %-KI): Biopsie = 1,87 (0,18 – 3,56), subtotal = 5,1 (3,04 – 7,17), total = k.A. (bei letztem Ereignis noch 51,3 % lebend). $p < 0,001$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test. k.A.: keine Angabe möglich.

3.4.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Es wurde der Einfluss des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus (Abb. 27 und Abb. 28, Tab. 18), des IDH-Mutationsstatus (Abb. 29 und Abb. 30, Tab. 18) und des 1p/19q-Deletionsstatus (Abb. 31 und Abb. 32, Tab. 18) auf die progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit untersucht.

Tab. 18: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Molekularbiologie. *p*: (log rank). 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

		Progressionsfreie Zeit (Jahre)			Überlebenszeit (Jahre)		
		5J (%)	Median (95 %-KI)	<i>p</i>	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	<i>p</i>
MGMT	Methyliert	45,7	3,85 (1,67 – 6,03)	< 0,001	64,3	8,90 (1,42 – 16,39)	< 0,05
	Nicht-methyliert	21,4	0,84 (0,47 – 1,22)		40,0	2,10 (0,95 – 3,25)	
IDH	Mutation	51,0	5,08 (2,42 – 7,74)	< 0,001	72,1	16,31 (5,67 – 26,96)	< 0,001
	Wildtyp	8,2	0,64 (0,34 – 0,90)		27,7	1,60 (0,59 – 2,61)	
1p/19q	Codeletion	61,1	5,17 (0,00 – 15,07)	< 0,05	66,7	11,30 (-)	0,350
	Nicht-codeletiert	33,4	2,45 (1,44 – 3,47)		52,3	5,88 (1,553 – 10,23)	

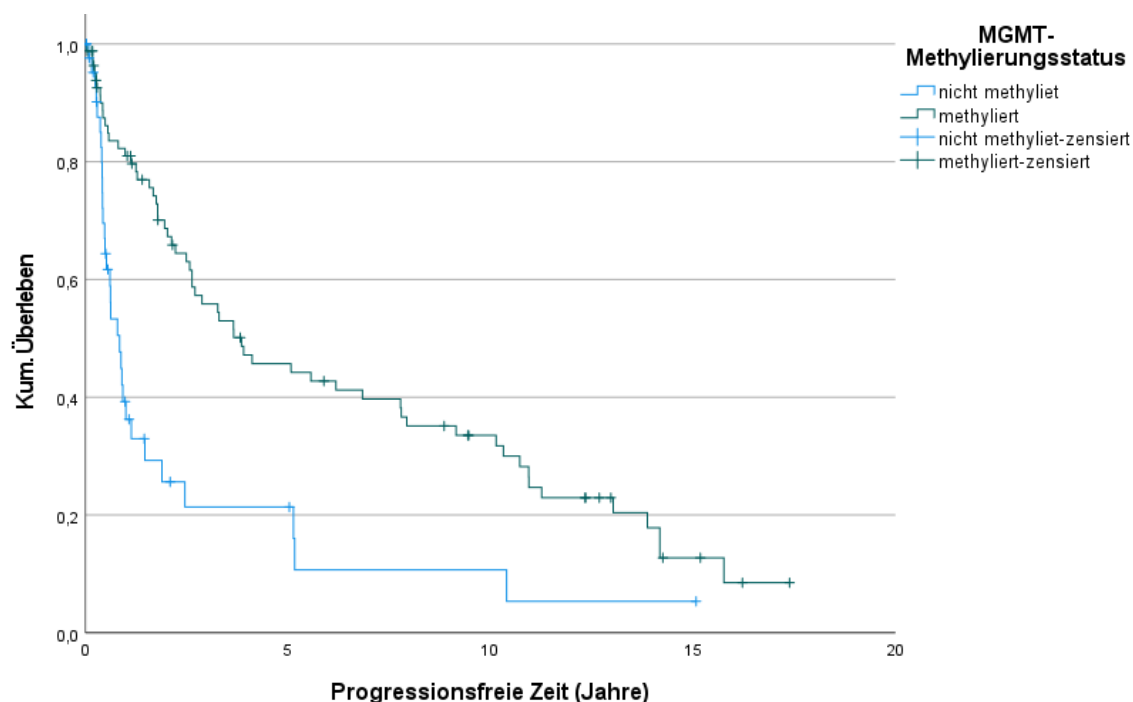


Abb. 27: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. 5J (%): methyliert = 45,7, nicht-methyliert = 21,4. Median in Jahren (95 %-KI): methyliert = 3,85 (1,67 – 6,03), nicht methyliert = 0,84 (0,47 – 1,22). *p* < 0,001. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. *p*: Log-Rank-Test.

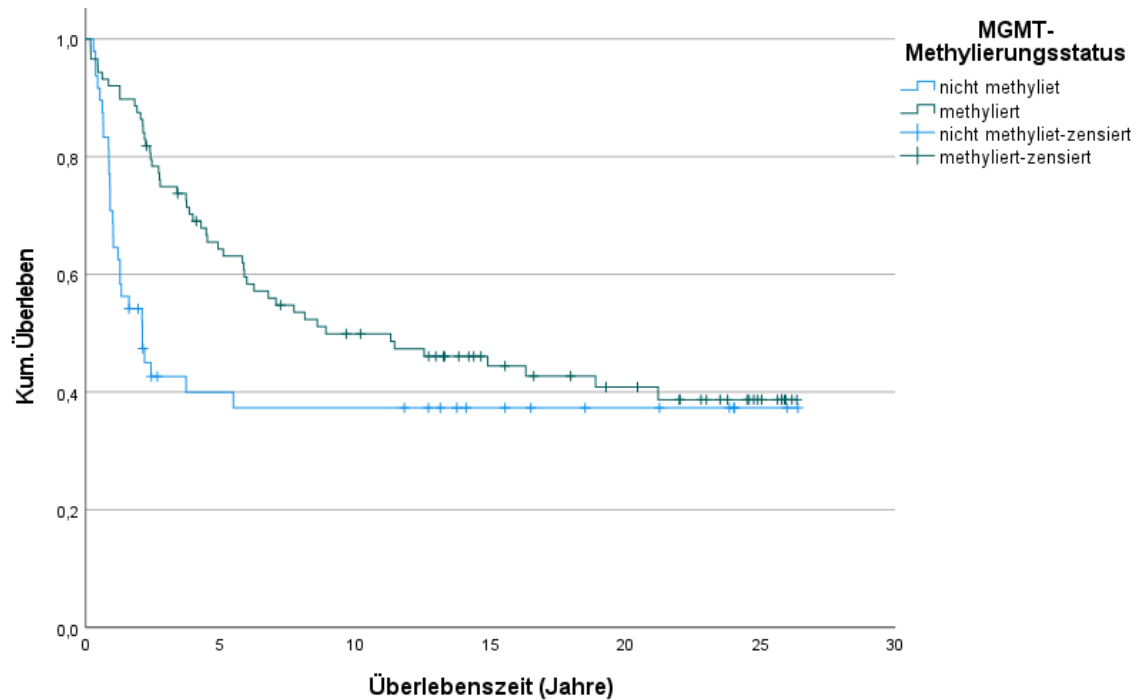


Abb. 28: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. 5JÜ (%): methyliert = 64,3, nicht-methyliert 40,0. Median in Jahren (95 %-KI): methyliert = 8,90 (1,42 – 16,39), nicht methyliert = 2,10 (0,95 – 3,25). $p < 0,05$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

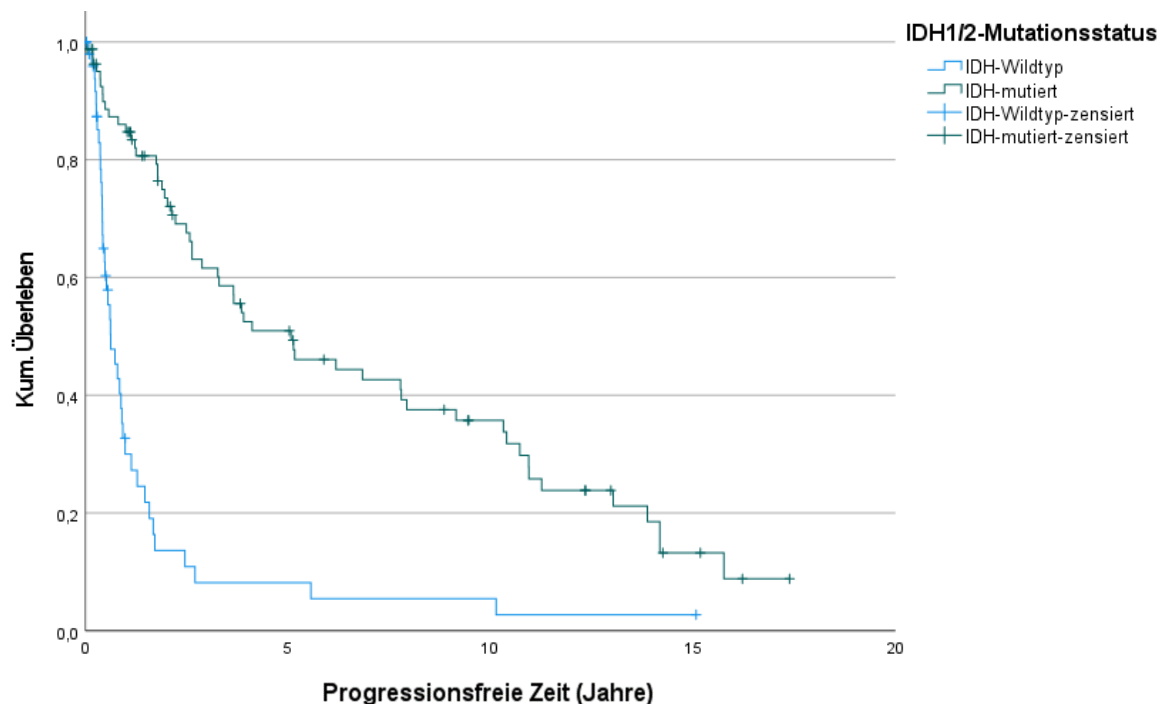


Abb. 29: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus. 5J (%) : IDH-mutiert = 51,0, IDH-Wildtyp = 8,2. Median in Jahren (95 %-KI): IDH-mutiert = 5,08 (2,42 – 7,74), IDH-Wildtyp 0,84 (0,47 – 1,22). $p < 0,001$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

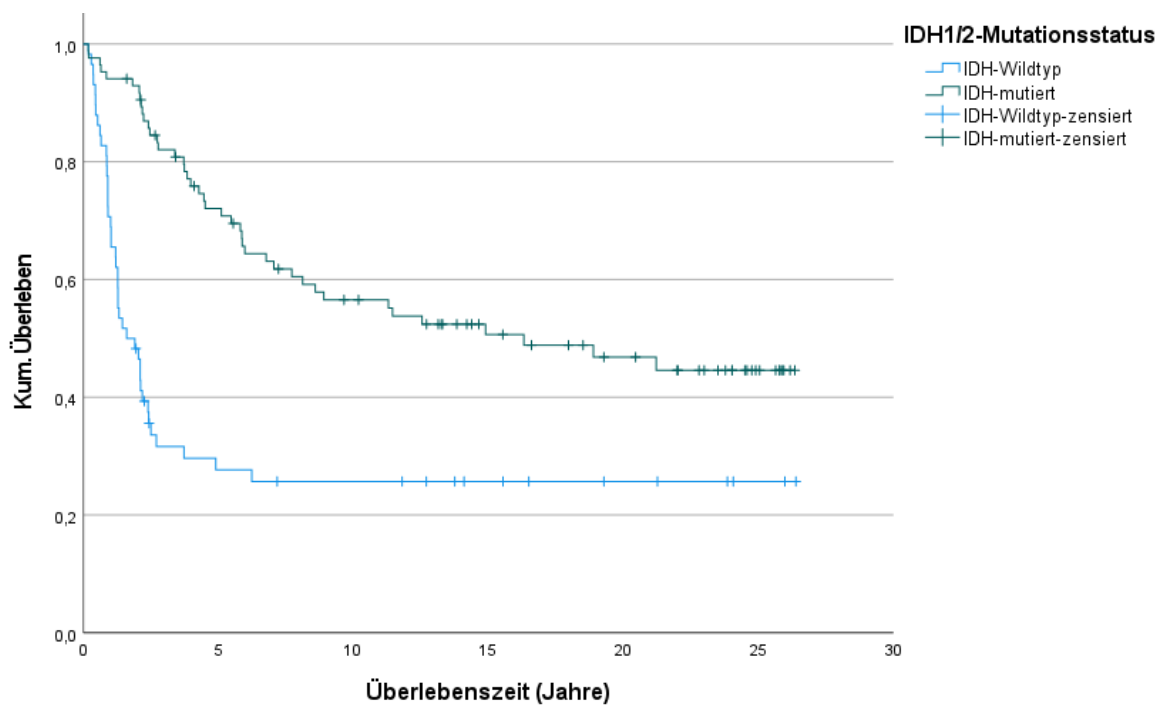


Abb. 30: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus. 5JÜ (%): IDH-mutiert = 72,1, IDH-Wildtyp = 27,7. Median in Jahren (95 %-KI): IDH-mutiert = 16,31 (5,67 – 26,96), IDH-Wildtyp = 1,60 (0,59 – 2,61). $p < 0,001$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

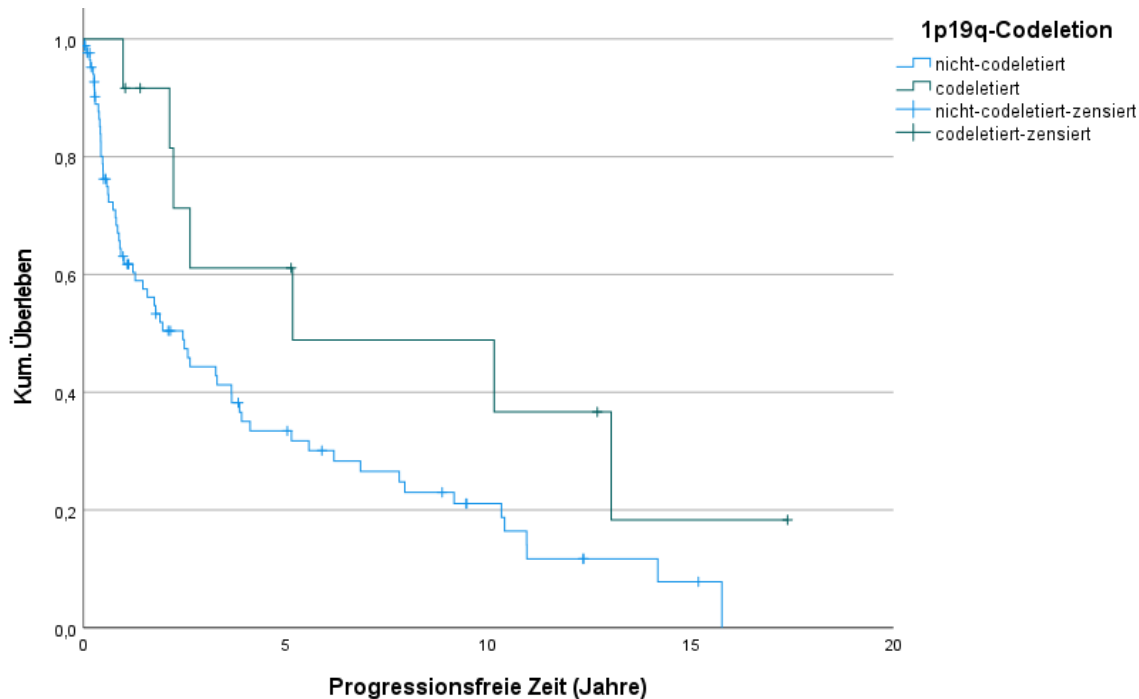


Abb. 31: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit vom 1p/19q-Deletionsstatus. 5J (%) : 1p19q-codeletiert = 61,1, 1p/19q nicht-codeletiert = 33,4. Median in Jahren (95 %-KI): codeletiert = 5,17 (0,00 – 15,07), nicht-codeletiert = 2,45 (1,44 – 3,47). $p < 0,05$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

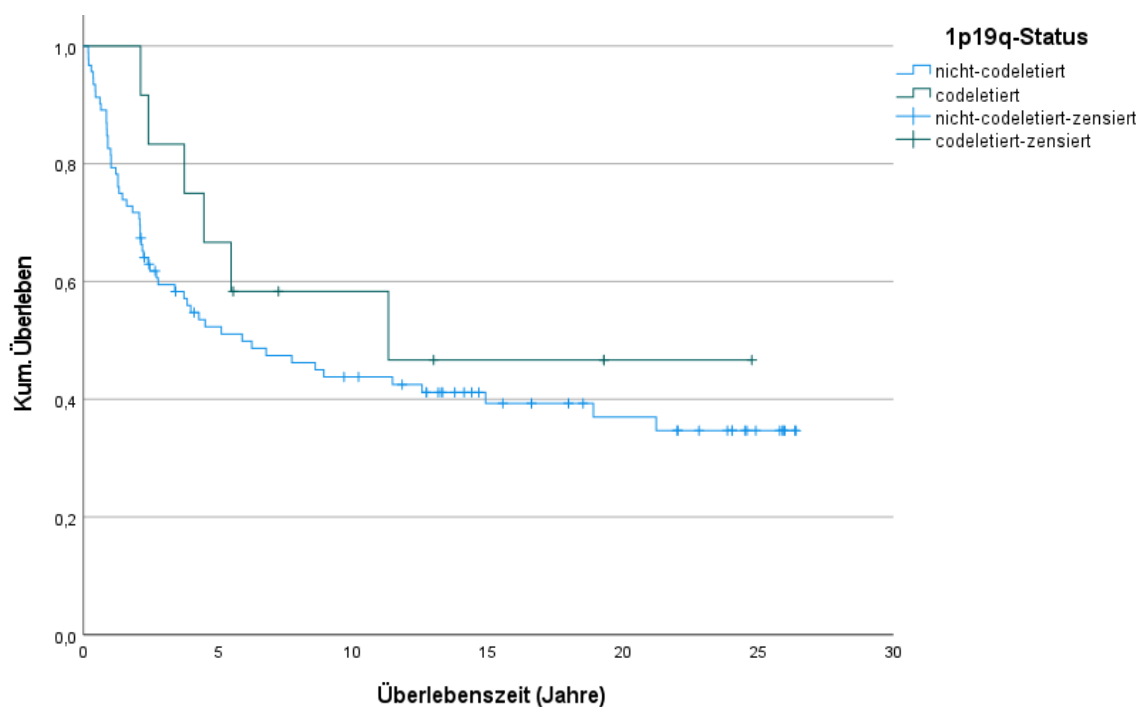


Abb. 32: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom 1p/19q-Deletionsstatus. 5JÜ (%): 1p/19q-codeletiert = 66,7, 1p/19q nicht-codeletiert = 52,3. Median in Jahren (95 %-KI): 1p/19q-codeletiert = 11,30 (k.A.), 1p/19q nicht-codeletiert = 5,88 (1,53 – 10,23). $p = 0,350$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. k.A.: keine Angabe möglich. p : Log-Rank-Test.

3.4.3 Tumorentitäten

In Bezug auf die verschiedenen Tumorentitäten ergaben sich in der progressionsfreien Zeit (Abb. 33, Tab. 19, $p < 0,001$) und der Überlebenszeit signifikante Unterschiede (Abb. 34, Tab. 19, $p < 0,001$).

Tab. 19: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016). 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test.

	5J (%)	Progressionsfreie Zeit (Jahre)		Überlebenszeit (Jahre)		
		Median (95 %-KI)	p	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p
Astrozytom, IDH-mutiert	47,2	3,91 (2,09 – 5,72)		68,8	14,89 (2,77 – 27,02)	
Astrozytom, IDH-Wildtyp	-	0,52 (0,35 – 0,69)		27,0	1,28 (0,33 – 2,22)	
Astrozytom, NOS	42,4	2,76 (0,90 – 4,63)	$< 0,001$	75,0	16,41 (-)	$< 0,001$
Oligodendrogliom, 1p/19q-codeletiert	57,1	5,17 (0,00 – 10,37)		66,7	11,30 (0,00 – 22,85)	
Oligodendrogliom, NOS	36,4	1,47 (0,57 – 2,36)		46,2	2,18 (0,00 – 6,53)	

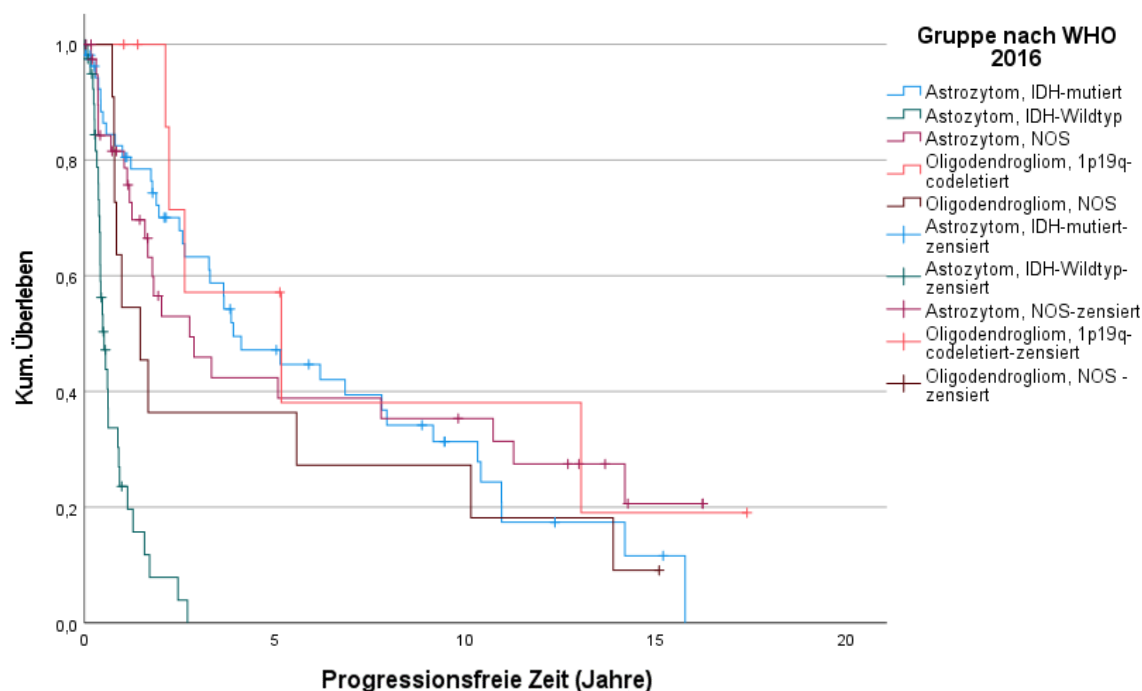


Abb. 33: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016). 5J (%) : Astrozytom, IDH-mutiert = 47,2, Astrozytom, IDH-Wildtyp = k.A., Astrozytom, NOS = 42,4, Oligodendrogliom, 1p/19q-codeletiert = 57,1, Oligodendrogliom, NOS = 36,4. Median in Jahren (95 %-KI): Astrozytom, IDH-mutiert = 3,91 (2,09 – 5,72), Astrozytom, IDH-Wildtyp = 0,52 (0,35 – 0,69), Astrozytom, NOS = 2,76 (0,90w 4,63), Oligodendrogliom, 1p/19q-codeletiert = 5,17 (0,00 – 10,37), Oligodendrogliom, NOS = 1,47 (0,57 – 2,36). $p < 0,001$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test.

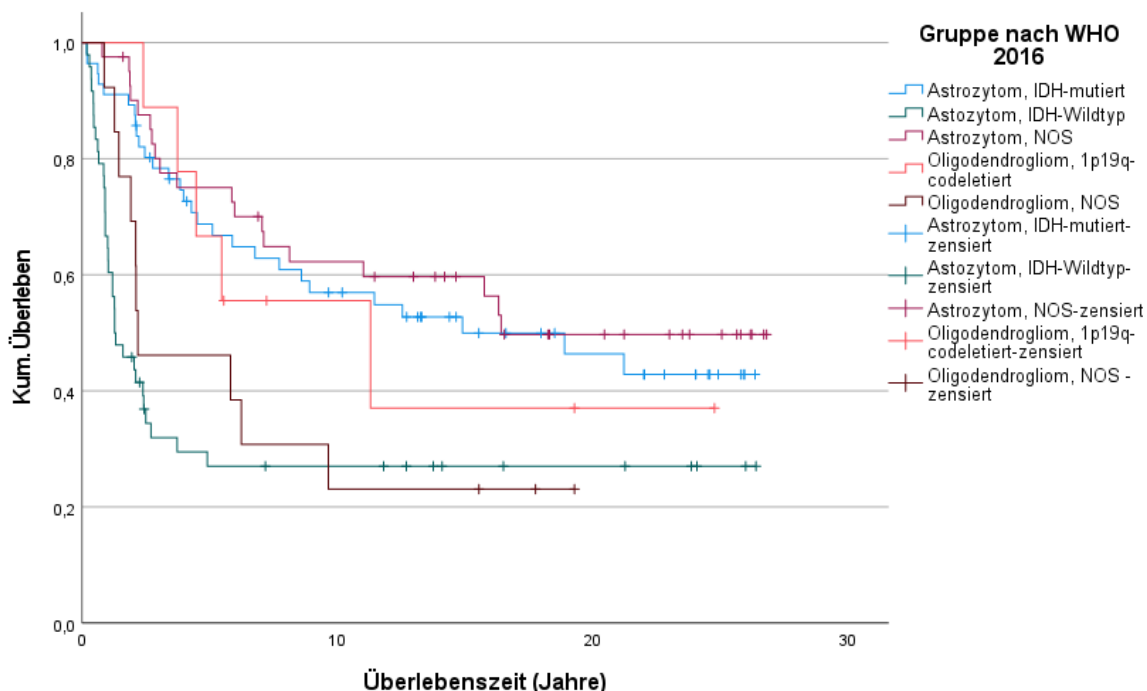


Abb. 34: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Tumorentität (WHO 2016). 5JÜ (%) : Astrozytom, IDH-mutiert = 68,8, Astrozytom, IDH-Wildtyp = 27,0, Astrozytom, NOS = 75,0, Oligodendrogliom, 1p/19q-codeletiert = 66,7, Oligodendrogliom, NOS = 46,2. Median in Jahren (95 %-KI): Astrozytom, IDH-mutiert = 14,89 (2,77 – 27,02), Astrozytom, IDH-Wildtyp = 1,28 (0,33 – 2,22) Astrozytom, NOS = 16,41 (k.A.), Oligodendrogliom, 1p/19q-codeletiert = 11,30 (0,00 – 22,85), Oligodendrogliom, NOS = 2,18 (0,00 – 6,53). $p < 0,001$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. k.A.: keine Angabe möglich. p: Log-Rank-Test.

3.4.4 Postoperatives Therapieschema

Die Tab. 20 stellt die progressionsfreie Zeit und die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie dar. Hier ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen bei der progressionsfreien Zeit ($p^* < 0,05$) und der medianen Überlebenszeit ($p^* < 0,001$). Die längste mediane progressionsfreie Zeit ergab sich in der Gruppe „Radiotherapie vor 2005“ mit 3,34 Jahren, in der Gruppe überlebten mehr als 50 % der nicht durch Zensur entfallenen Patient/-innen, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt hier 72 %. Weiterhin wurden die Therapiegruppe „Radio-/Chemotherapie ab 2005“ und „Radiotherapie ab 2005“ separat analysiert, um die Langzeitverläufe seit Einführung des Radio-/Chemotherapie-Regimes durch Stupp et al. im Jahre 2005 zu analysieren. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der medianen progressionsfreien Zeit ($p^{**} = 0,603$), jedoch signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit ($p^{**} < 0,05$). Die Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie erfolgte unter Berücksichtigung aller Tumorentitäten, für eine Auswertung der Überlebenszeit der einzelnen Entitäten war die Fallzahl in dieser Studie zu gering.

Tab. 20: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (alle Therapiegruppen). p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	Progressionsfreie Zeit (Jahre)				Überlebenszeit (Jahre)			
	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	25,2	1,96 (0,89 – 3,02)			48,1	4,90 (2,14 – 7,66)		
RT (vor 2005)	44,8	3,34 (1,08 – 5,59)	$< 0,05$	0,603	72,0	-	$< 0,001$	$< 0,05$
RT (ab 2005)	26,0	1,22 (0,00 – 2,50)			30,3	1,60 (0,43 – 2,78)		

In der Abb. 35 und der Abb. 36 ist die Überlebenszeitanalyse, in Abhängigkeit vom postoperativen Therapieschema, als Kaplan-Meier-Diagramm dargestellt. Durch die Gruppeneinteilung ergab sich ein längerer Beobachtungszeitraum für die Gruppe „Radiotherapie vor 2005“.

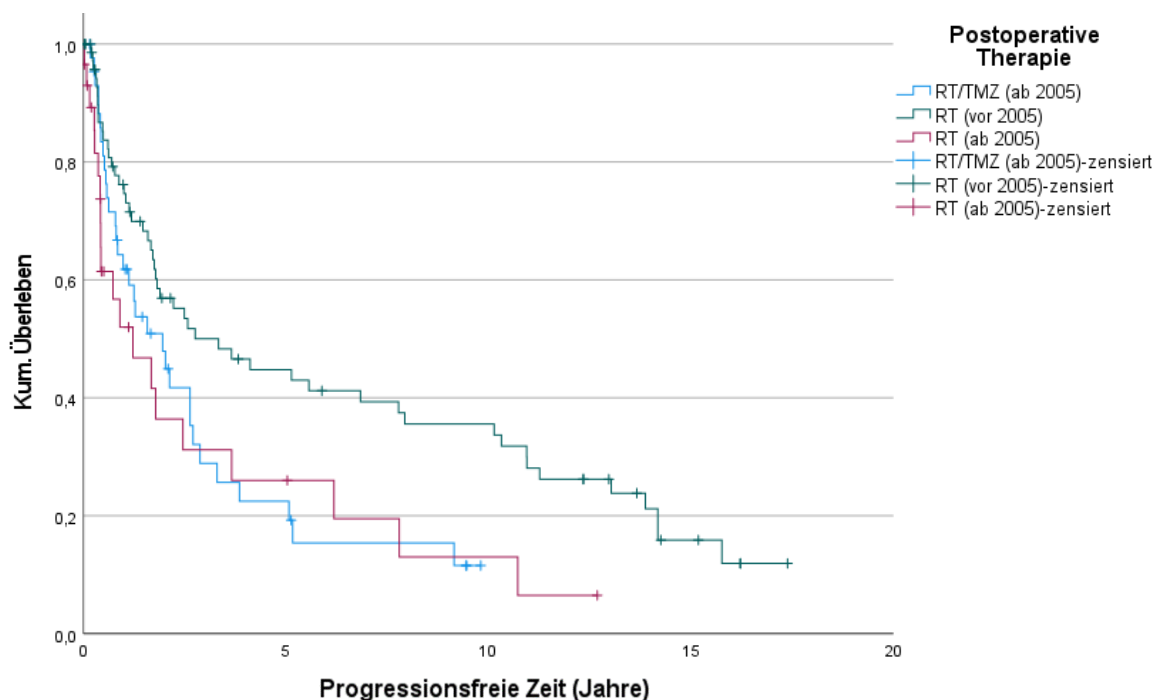


Abb. 35: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (alle Therapiegruppen). 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 25,2, RT (vor 2005) = 44,8, RT (ab 2005) = 26,0. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 1,96 (0,89 – 3,02), RT (vor 2005) = 3,34 (1,08 – 5,59, RT (ab 2005) = 1,22 (0,00 – 2,50). $p^* < 0,05$. $p^{**} = 0,603$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

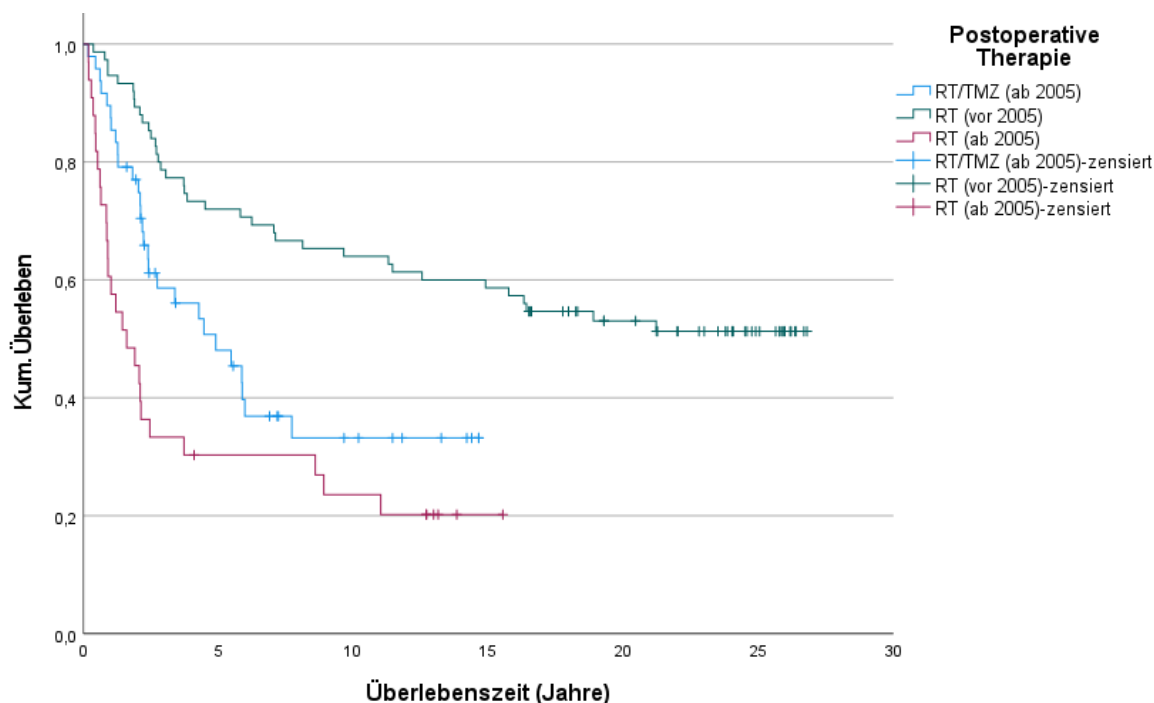


Abb. 36: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie. 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 48,1, RT (vor 2005) = 72,0, RT (ab 2005) = 30,3. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 4,90 (2,14 – 7,66), RT (vor 2005) = k.A. (nach letztem Ereignis >51,3 %), RT (ab 2005) = 1,60 (0,43 – 2,78). $p^* < 0,001$. $p^{**} < 0,05$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. k.A.: keine Angabe möglich. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

Die Einflussgrößen wurden, wie in Tab. 21 dargestellt, mittels Test nach Fisher-Freeman-Halton bzw. nach Kruskal-Wallis auf ihre Verteilung innerhalb der Gruppen untersucht.

Tab. 21: Verteilung der Risikofaktoren in den Gruppen der Testvariable "postoperative Therapie". *p*: Fisher Freeman-Halton-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test. KPS präop.: präoperativer Karnofsky-Index.

		Anzahl (%)			<i>p</i>
		RT/TMZ (ab 2005) n = 48	RT (vor 2005) n = 75	RT (ab 2005) n = 33	
Geschlecht	Mann	33 (33,3)	48 (48,5)	18 (18,2)	,424
	Frau	15 (26,3)	27 (47,4)	15 (26,3)	
Alter, Jahre	Median [Min.-Max.]	45 [21-78]	48 [20-69]	50 [23-79]	,145
	> 50	19 (26,5)	36 (50,0)	17 (23,6)	,515
	< 50	29 (34,5)	39 (46,4)	16 (19,0)	
Multifokal	Ja	7 (41,2)	6 (35,3)	4 (23,5)	,471
	Nein	40 (29,0)	69 (50,0)	29 (21,0)	
KPS präop.	< 80	14 (35,9)	16 (41,0)	9 (23,1)	,579
	80-100	34 (29,1)	59 (50,4)	24 (20,5)	
Resektionsausmaß	Biopsie	7 (23,3)	15 (50,0)	8 (26,7)	,828
	Teilresektion	22 (33,3)	30 (45,5)	14 (21,2)	
	Totalresektion	18 (30,5)	30 (50,8)	11 (18,6)	
Dosis (Gy)	Mittelwert (Std.-Abw.)	59,28 (1,84)	59,21 (2,86)	58,27 (3,14)	,031
Ki-67-Index	Median [Min.-Max.]	20 (4-50)	15 (5-40)	15 (5-50)	,319
MGMT	methyliert	29 (34,5)	41 (48,8)	14 (16,7)	,040
	nicht-methyliert	13 (31,7)	13 (31,7)	15 (36,6)	
IDH 1/2	mutiert	27 (33,8)	40 (50,0)	13 (16,3)	,028
	Wildtyp	18 (34,6)	16 (30,8)	18 (34,6)	
1p/19q	Codeletion	6 (50,0)	5 (41,7)	1 (8,3)	,261
	nicht-codeletiert	26 (31,7)	32 (39)	24 (29,3)	
Entität WHO 2016	Astrozytom IDH-mutiert	16 (31,4)	23 (45,1)	12 (23,5)	,254
	Astrozytom, IDH-Wildtyp	14 (32,6)	13 (30,2)	16 (37,2)	
	Astrozytom NOS	9 (22,0)	29 (70,7)	3 (7,3)	
	Oligodendrogliom, 1p/19q-cod.	5 (55,6)	4 (44,4)	0 (-)	
	Oligodendrogliom, NOS	4 (33,3)	6 (50,0)	2 (16,5)	

Anschließend wurde eine stratifizierte Risikoanalyse für die Einflussgrößen „MGMT-Promotor-Methylierungsstatus“, „IDH-Mutationsstatus“ und der „verabreichten Gesamtdosis“ durchgeführt. Hier ergaben sich bei erhöhter MGMT-Promotor-Methylierung signifikante Unterschiede in der progressionsfreien Zeit zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,001$), nicht jedoch zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,467$). Bei nicht erhöhter MGMT-Promotor-Methylierung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p = 0,543$) und zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,313$). Die Ergebnisse sind in der Tab. 22 und den Abb. 37 – 38 dargestellt.

Tab. 22: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie mit erhöhter und nicht-erhöhter MGMT- Promotor-Methylierung. p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI = 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	MGMT-Promotor methyliert (>10 %)				MGMT-Promotor nicht methyliert (< 10%)			
	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	17,0	2,03 (1,17 – 2,89)			33,3	0,62 (0,16 – 1,08)		
RT (vor 2005)	68,6	10,32 (6,35 – 14,29)	< 0,001	0,467	11,0	1,00 (0,67 – 1,32)	0,543	0,313
RT (ab 2005)	38,1	1,78 (0,00 – 4,84)			13,8	0,42 (0,34 – 0,50)		

Bezüglich der Überlebenszeit ergaben sich bei erhöhter MGMT-Promotor-Methylierung signifikante Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,001$), nicht jedoch zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,864$). Bei nicht erhöhter MGMT-Promotor-Methylierung ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,05$) und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,056$). Die Ergebnisse sind in der Tab. 23 und den Abb. 39 – 40 dargestellt.

Tab. 23: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie mit vermehrter und nicht-vermehrter MGMT- Promotormethylierung. p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI = 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	MGMT-Promotor methyliert (>10 %)				MGMT-Promotor nicht methyliert (< 10%)			
	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	42,8	4,46 (1,82 – 7,11)			51,3	5,47 (0,99 – 9,94)		
RT (vor 2005)	82,9	-	< 0,001	0,864	53,8	-	< 0,05	0,056
RT (ab 2005)	50,0	2,45 (0,00 – 13,39)			13,3	0,90 (0,43 – 1,38)		

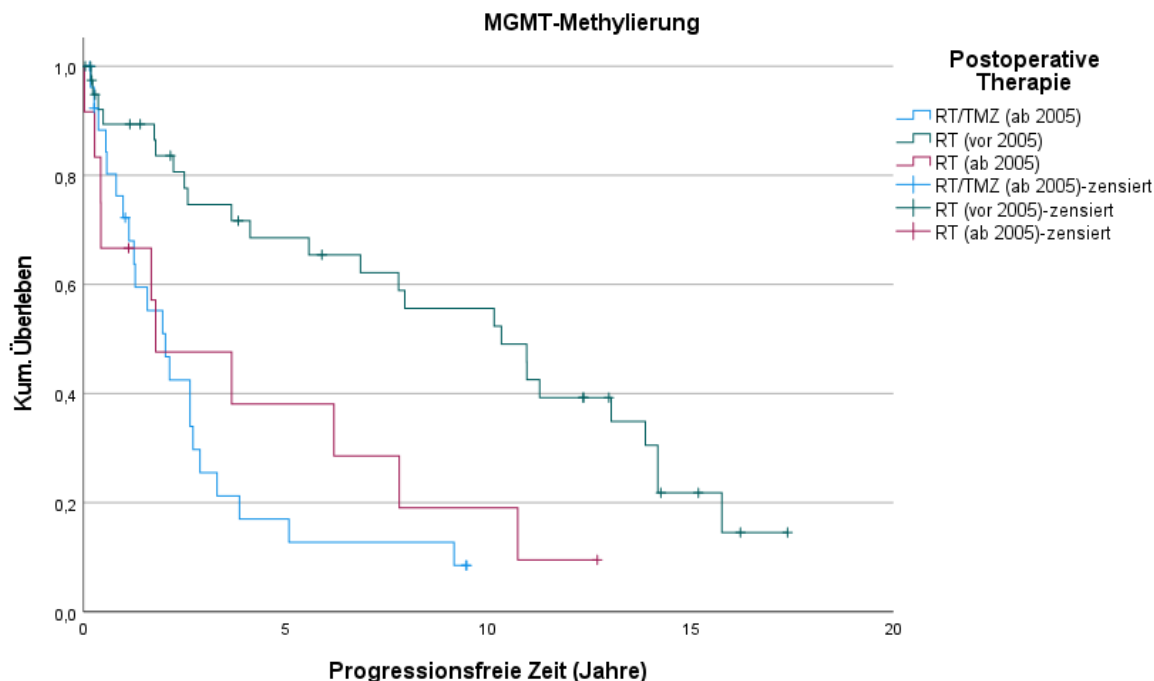


Abb. 37: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT methyliert). 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 17,0, RT (vor 2005) = 68,6, RT (ab 2005) = 38,1. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 2,03 (1,17 – 2,89), RT (vor 2005) = 10,32 (6,35 – 14,29), RT (ab 2005) = 1,78 (0,00 – 4,84). $p^* < 0,001$. $p^{**} = 0,467$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

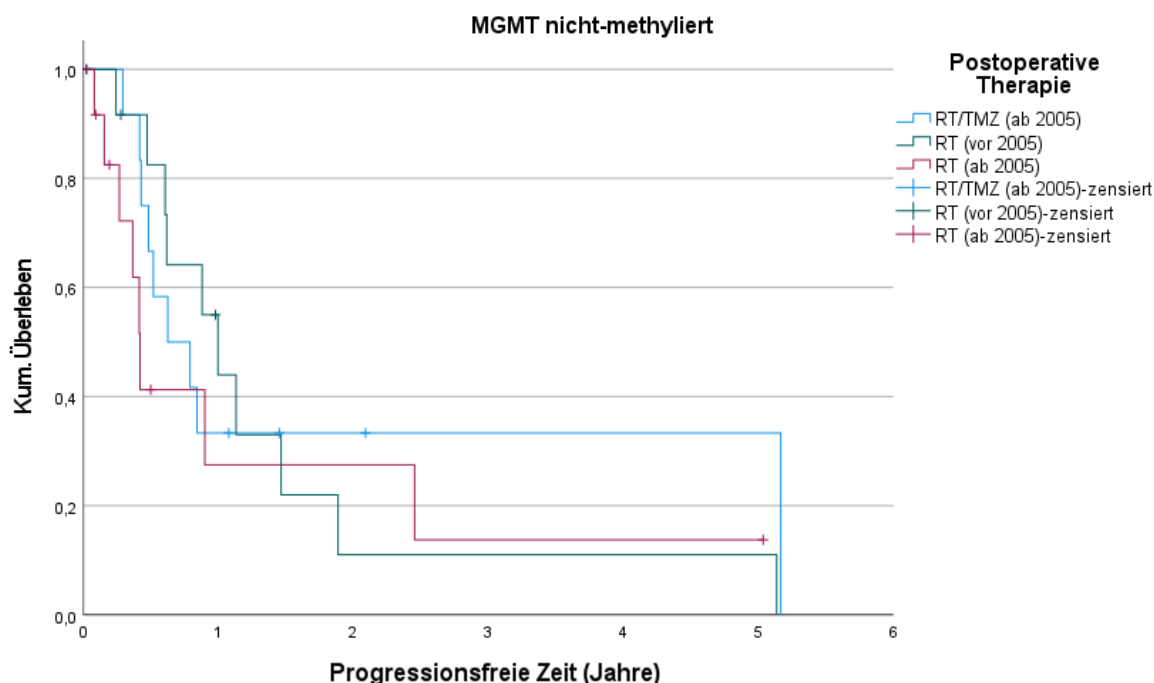


Abb. 38: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei Methylierung des (MGMT nicht methyliert). 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 33,3, RT (vor 2005) = 11,0, RT (ab 2005) = 13,8. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 0,62 (0,16 – 1,08), RT (vor 2005) = 1,00 (0,67 – 1,32), RT (ab 2005) = 0,42 (0,34 – 0,50). $p^* = 0,543$. $p^{**} = 0,313$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

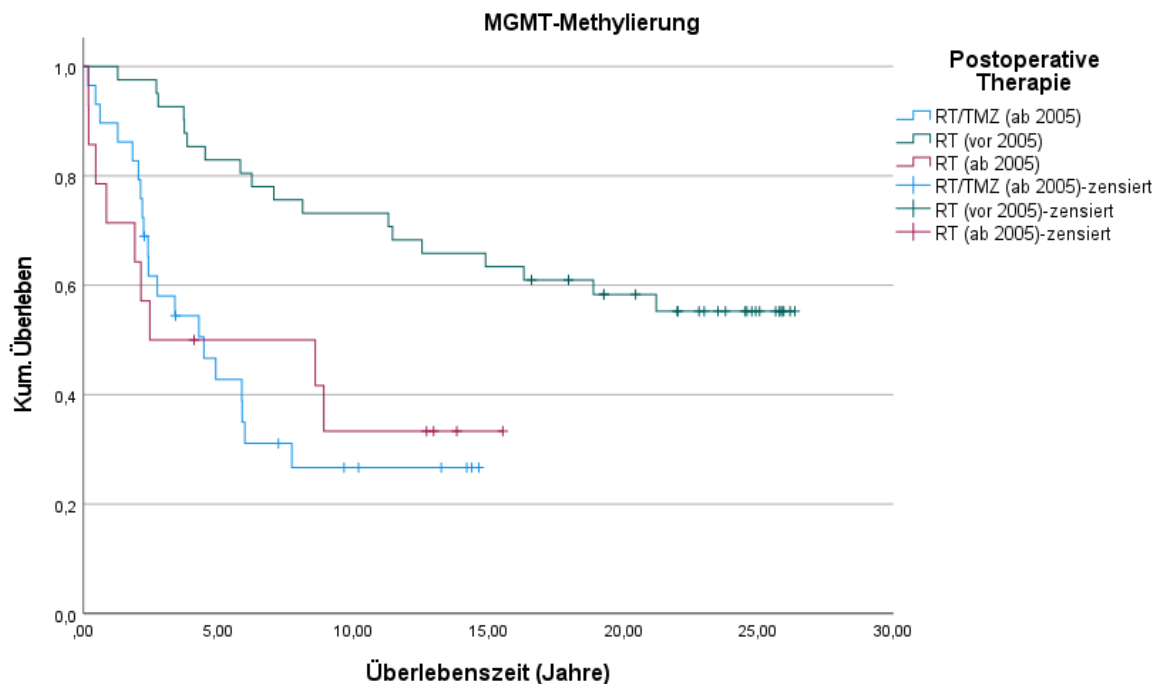


Abb. 39: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT-methyliert). 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 42,8, RT (vor 2005) = 82,9, RT (ab 2005) = 50,0. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 4,46 (1,82 – 7,11), RT (vor 2005) = k.A. (nach letztem Ereignis 55,3 %), RT (ab 2005) = 2,45 (0,00 – 13,39). $p^* < 0,001$. $p^{**} = 0,864$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. k.A.: keine Angabe möglich. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

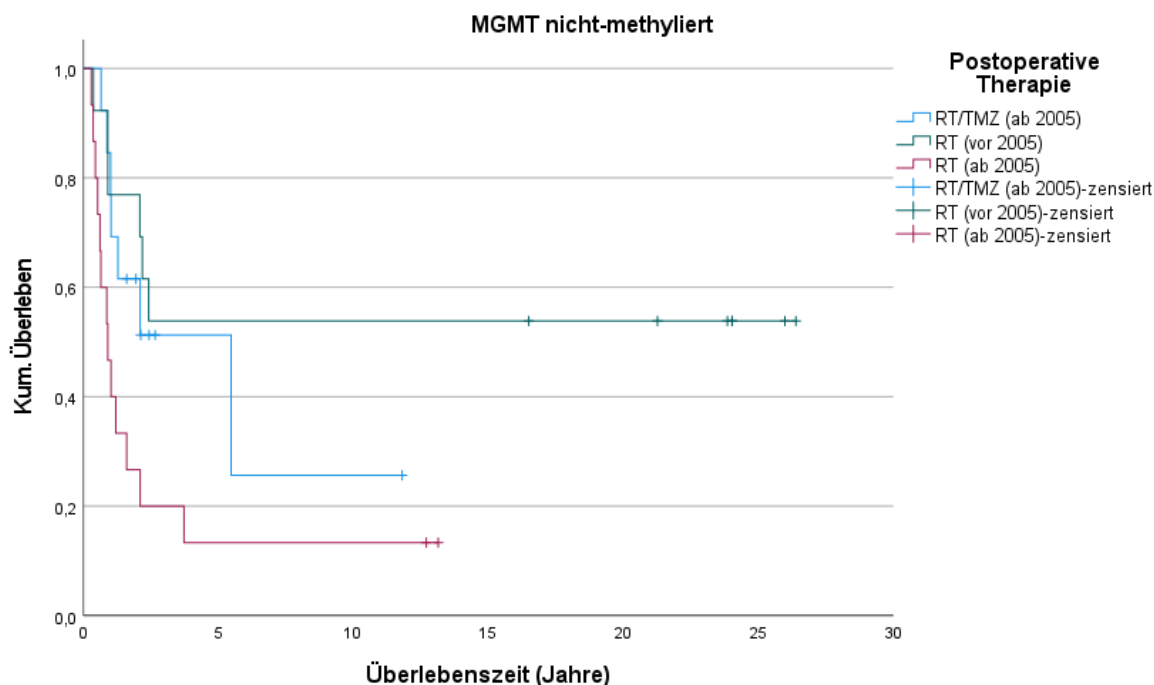


Abb. 40: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie (MGMT nicht-methyliert). 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 51,3, RT (vor 2005) = 53,8, RT (ab 2005) = 13,3. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 5,47 (0,99 – 9,94), RT (vor 2005) = k.A. (nach letztem Ereignis 53,8 %), RT (ab 2005) = 0,90 (0,43 – 1,38). $p^* < 0,05$. $p^{**} = 0,056$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. k.A.: keine Angabe möglich. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

Bezüglich der progressionsfreien Zeit ergaben sich bei IDH-Mutation signifikante Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,01$), nicht jedoch zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,792$). Bei IDH-Wildtyp-Tumoren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p = 0,284$) und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,903$). Die Ergebnisse sind in der Tab. 24 und den Abb. 41 – 42 dargestellt.

Tab. 24: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation und IDH-Wildtyp. p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	IDH-Mutation				IDH-Wildtyp			
	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	32,2	2,63 (1,61 – 3,65)			-	0,55 (0,37 – 0,73)		
RT (vor 2005)	65,6	10,32 (6,17 – 14,47)	$< 0,01$	0,792	18,9	0,88 (0,72 – 1,69)	0,284	0,903
RT (ab 2005)	38,1	1,78 (0,00 – 5,54)			-	0,73 (0,28 – 1,18)		

Bei vorliegender IDH-Mutation ergaben sich signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,01$), nicht jedoch zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,870$). Bei vorliegendem IDH-Wildtyp ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,01$) und zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p < 0,05$). Die Ergebnisse sind in der Tab. 25 und den Abb. 43 – 44 dargestellt.

Tab. 25: Überlebenszeit Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation und IDH-Wildtyp. p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	IDH-Mutation				IDH-Wildtyp			
	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	59,0	5,86 (3,85 – 7,87)			19,8	2,03 (0,47 – 3,60)		
RT (vor 2005)	85,0	-	$< 0,01$	0,870	50,0	2,70 (0,00 – 10,03)	$< 0,01$	$< 0,05$
RT (ab 2005)	53,8	8,59 (0,00 – 19,33)			5,60	0,90 (0,81 – 1,00)		

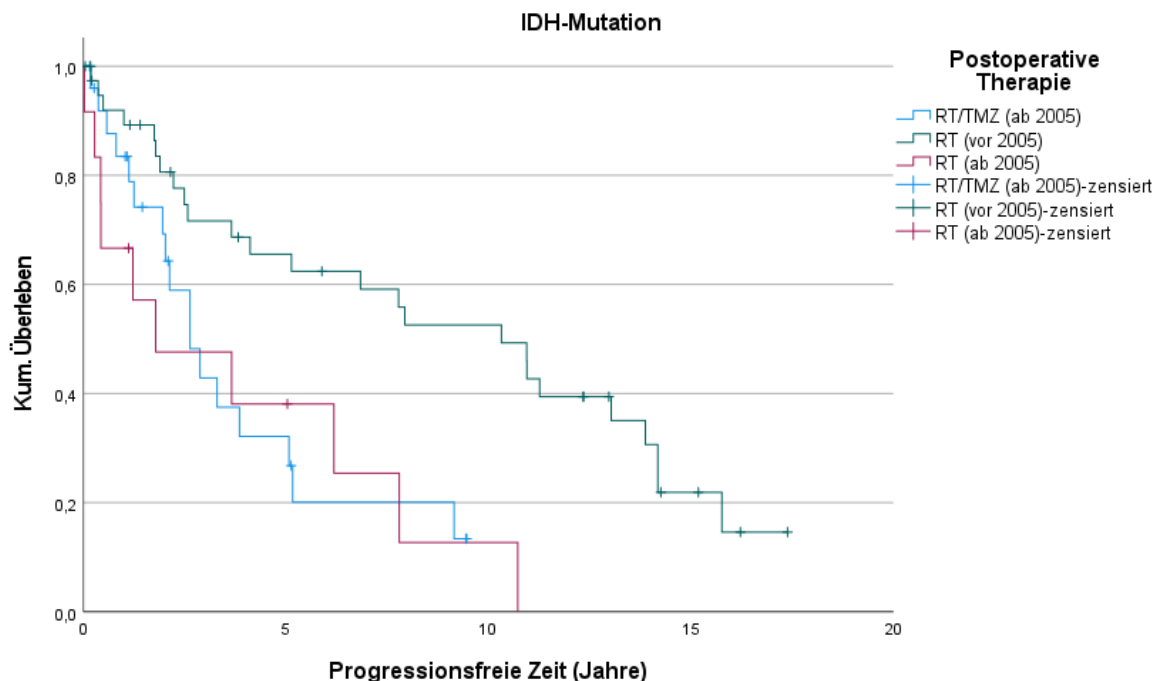


Abb. 41: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation. 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 32,2, RT (vor 2005) = 65,6, RT (ab 2005) = 38,1. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 2,63 (1,61 – 3,65), RT (vor 2005) = 10,32 (6,17 – 14,47), RT (ab 2005) = 1,78 (0,00 – 5,54). $p^* < 0,01$. $p^{**} = 0,792$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

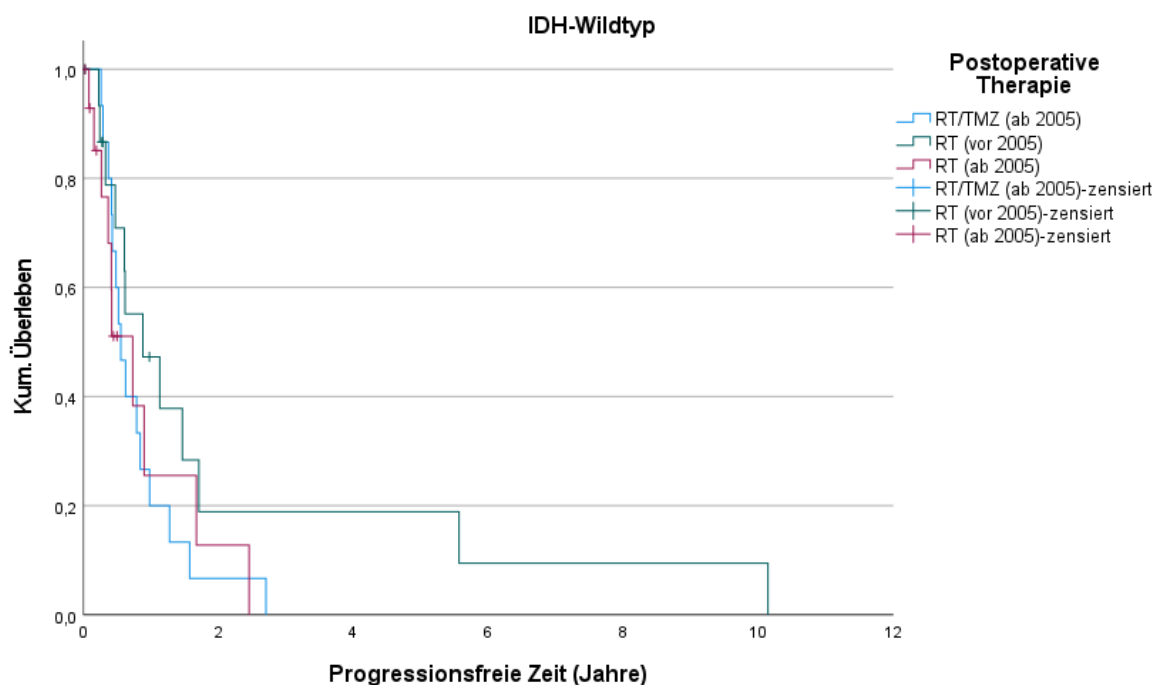


Abb. 42: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Wildtyp. 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 0,00, RT (vor 2005) = 18,9, RT (ab 2005) = 0,00. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 0,55 (0,37 – 0,73), RT (vor 2005) = 0,88 (0,72 – 1,69), RT (ab 2005) = 0,73 (0,28 – 1,18). $p^* = 0,284$. $p^{**} = 0,903$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

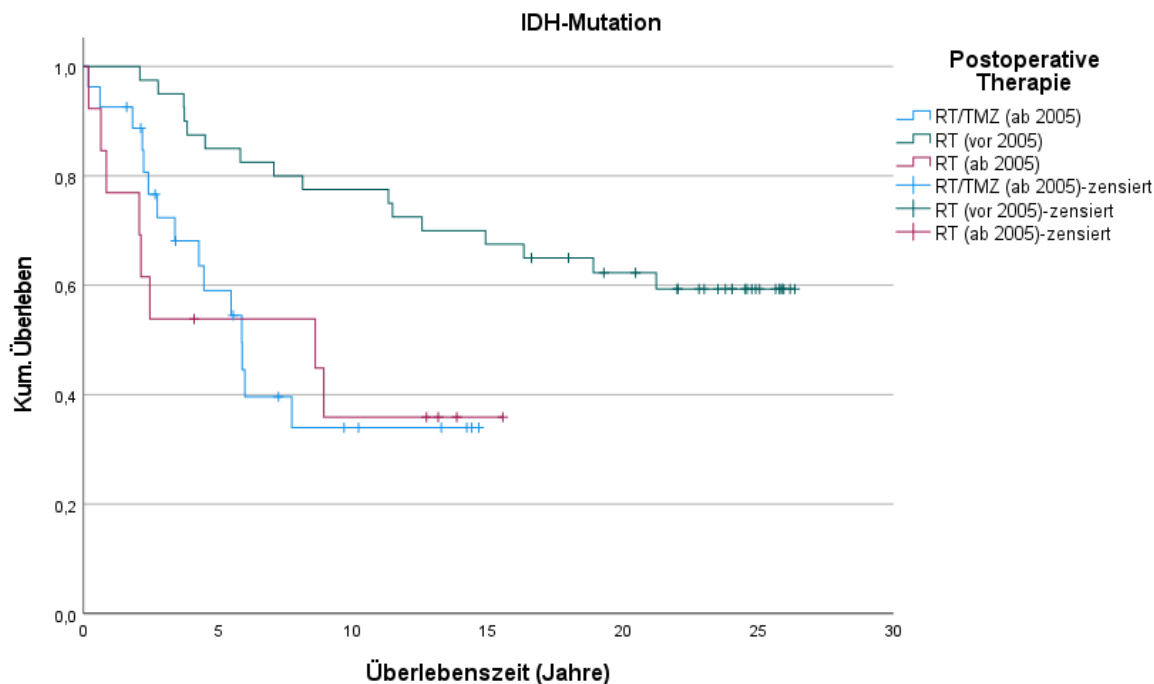


Abb. 43: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Mutation. 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 59,0, RT (vor 2005) = 85,0, RT (ab 2005) = 53,8. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 5,86 (3,85 – 7,87), RT (vor 2005) = k.A. (nach letztem Ereignis 59,3 %), RT (ab 2005) = 8,59 (0,00 – 19,33). $p^* < 0,01$. $p^{**} = 0,850$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

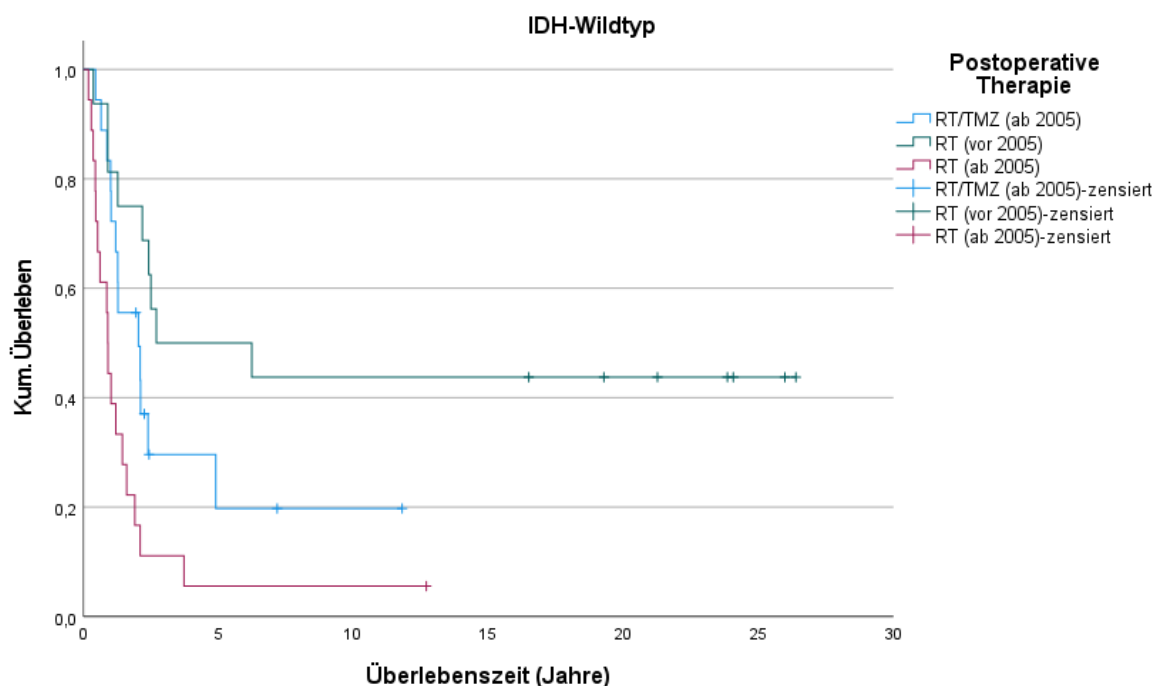


Abb. 44: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei IDH-Wildtyp. 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 19,8, RT (vor 2005) = 50, RT (ab 2005) = 5,60. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 2,03 (0,47 – 3,60), RT (vor 2005) = 2,70 (0,00 – 10,03), RT (ab 2005) = 0,90 (0,81 – 1,00). $p^* < 0,01$. $p^{**} < 0,05$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

Um den Einfluss der Strahlendosis auf die therapieabhängige Überlebenszeitanalyse zu untersuchen, erfolgte eine Überlebenszeitanalyse der Patient/-innen, die eine Strahlendosis von mindestens 60 Gy erhalten haben. Hier zeigte sich bezüglich der Überlebenszeit signifikante Unterschiede sowohl zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,001$), als auch zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p < 0,05$).

Bei Betrachtung der progressionsfreien Zeit ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen ($p < 0,01$), jedoch nicht zwischen den Therapiegruppen „Radio-/Chemotherapie (ab 2005)“ und „Radiotherapie (ab 2005)“ ($p = 0,226$). Die Ergebnisse sind in der Tab. 26 und den Abb. 44 – 45 dargestellt.

Tab. 26: Progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von mindestens 60 Gy. *p*: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)). 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. 5J / 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren.

	Progressionsfreie Zeit (Jahre)				Überlebenszeit (Jahre)			
	5J (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}	5JÜ (%)	Median (95 %-KI)	p^*	p^{**}
RT/TMZ (ab 2005)	28,4	1,57 (0,42 – 2,73)			56,4	5,86 (2,14 – 9,59)		
RT (vor 2005)	43,3	2,57 (0,58 – 4,57)	$< 0,01$	0,226	71,9	-	$< 0,001$	$< 0,05$
RT (ab 2005)	18,3	1,82 (1,10 – 2,54)			26,3	2,07 (1,36 – 2,77)		

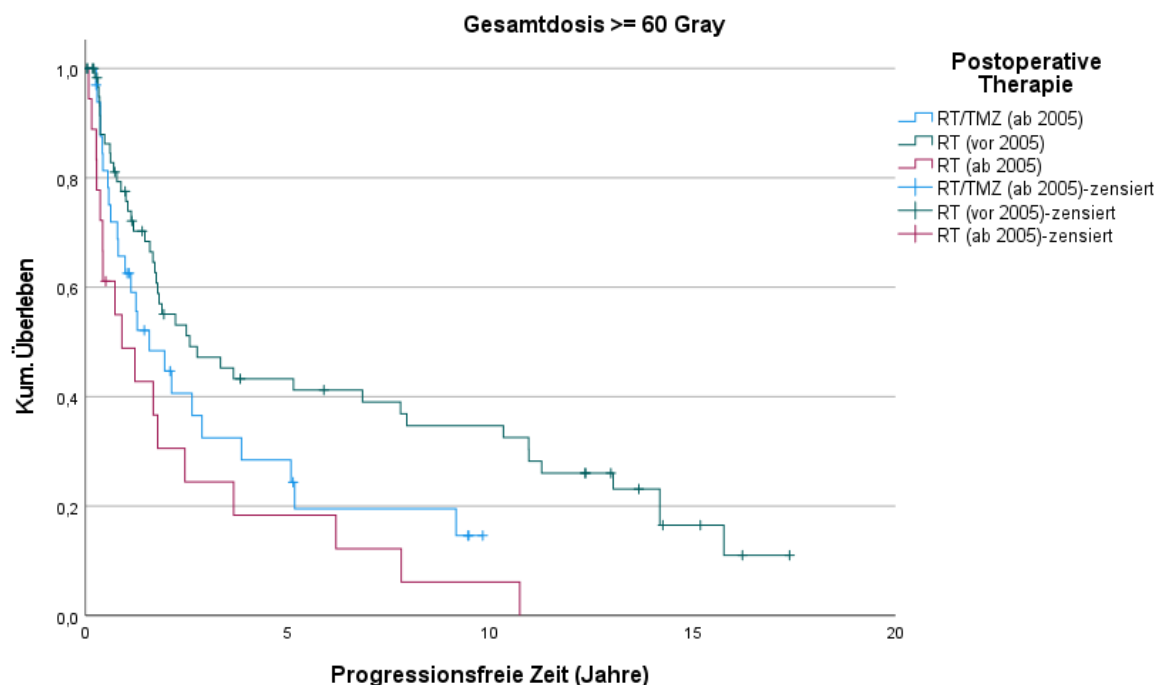


Abb. 45: Progressionsfreie Zeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von 60 Gy. 5J (%): RT/TMZ (ab 2005) = 28,4, RT (vor 2005) = 41,1 RT (ab 2005) = 19,4. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 1,57 (0,42 – 2,73), RT (vor 2005) = 2,57 (0,78 – 4,37), RT (ab 2005) = 1,22 (0,39 – 2,40). $p^* < 0,01$. $p^{**} = 0,226$. 5J: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. *p*: Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

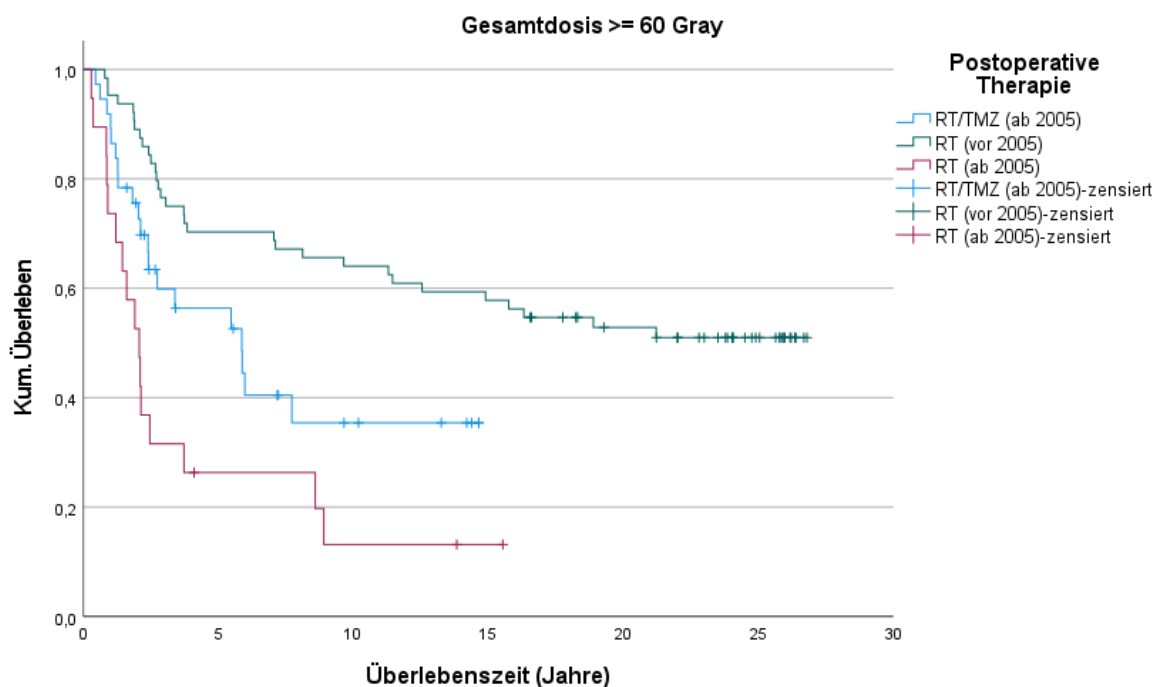


Abb. 46: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie bei einer Gesamt-Bestrahlungsdosis von 60 Gy. 5JÜ (%): RT/TMZ (ab 2005) = 56,4, RT (vor 2005) = 69,8, RT (ab 2005) = 27,8. Median in Jahren (95 %-KI): RT/TMZ (ab 2005) = 5,86 (2,14 – 9,59), RT (vor 2005) = k.A. (nach letztem Ereignis lebten noch 50,3 %), RT (ab 2005) = 2,07 (1,66 – 2,47). $p^* < 0,001$. $p^{**} < 0,05$. 5JÜ: Anteil nach 5 Jahren. 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall. p : Log-Rank-Test (*: alle Therapiegruppen. **: RT/TMZ (ab 2005) vs. RT (ab 2005)).

Um den Einfluss der durchgeführten Therapie auf die symptombezogene Aktivitätseinschränkung im Alltag der Patient/-innen zu beurteilen, erfolgte die Analyse der KPS präoperativ, während des postoperativen Aufenthaltes und im weiteren Verlauf nach drei und sechs Monaten, als auch nach einem, zwei, drei, fünf und zehn Jahren postoperativ in Abhängigkeit der postoperativen Behandlung. In der Tab. 27 und der Abb. 47 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 27: KPS im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie. p : Kruskal-Wallis-Test.

	Mittelwert (Standardabweichung)			p
	RT/TMZ (ab 2005)	RT (vor 2005)	RT (ab 2005)	
Präoperativ	81,46 (15,71)	87,73 (12,79)	83,33 (16,14)	0,066
Postoperativ	82,50 (14,22)	84,80 (16,39)	81,21 (12,44)	0,098
3 Monate	82,68 (14,84)	85,85 (12,92)	77,00 (19,76)	0,145
6 Monate	84,86 (14,46)	87,27 (11,28)	80,00 (19,36)	0,482
1 Jahr	82,26 (14,54)	89,49 (9,99)	81,33 (22,00)	0,069
2 Jahre	80,83 (15,01)	87,14 (13,63)	75,56 (26,98)	0,168
3 Jahre	80,00 (18,13)	87,14 (14,36)	83,75 (19,23)	0,384
5 Jahre	78,57 (18,75)	91,36 (11,25)	86,00 (11,40)	0,064
10 Jahre	75,00 (25,17)	89,38 (10,63)	95,00 (7,07)	0,284

In der Abb. 47 nehmen die Werte des Diagramms der Gruppe „Radio-/Chemotherapie ab 2005“ im Verlauf und im Vergleich zu den beiden anderen Therapiegruppen, leicht ab. Insgesamt bestand für keinen der genannten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied.

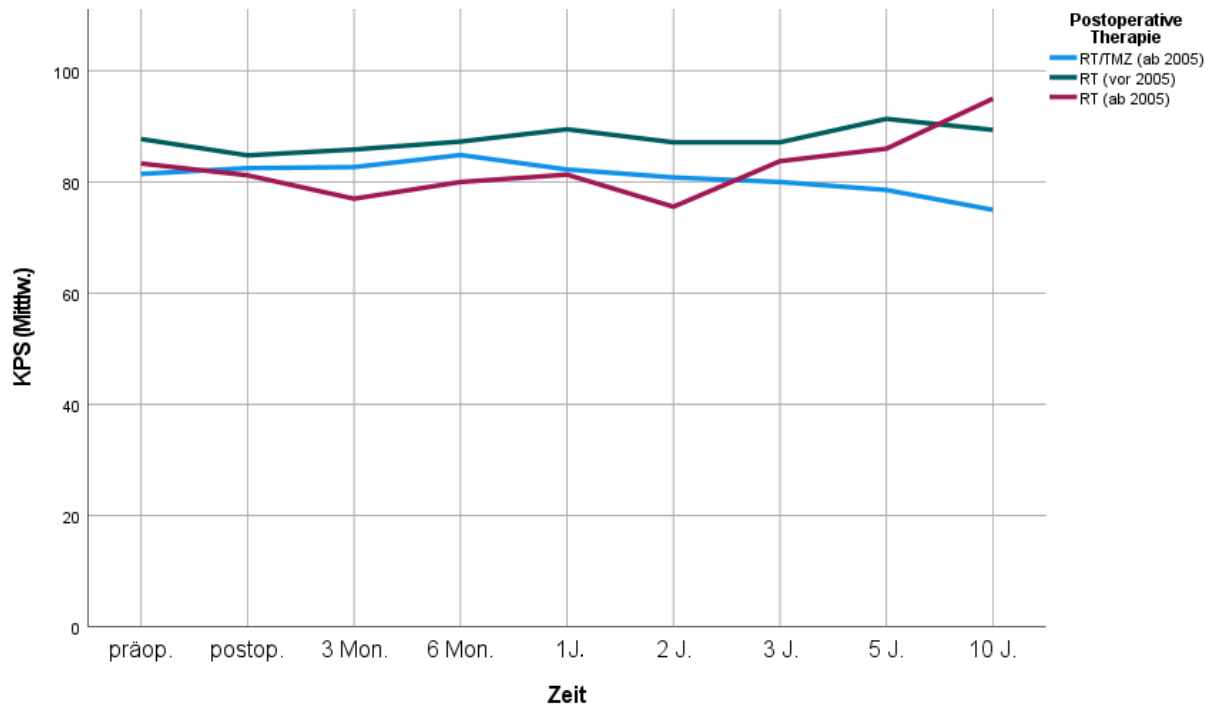


Abb. 47: KPS im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie. Zeitpunkte: Krankenhausaufenthalt im Rahmen der Operation präoperativ und postoperativ, im postoperativen Verlauf nach drei und sechs Monaten, nach einem, zwei, drei, fünf und zehn Jahren.

4 Diskussion

4.1 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

Um den Einfluss molekulargenetischer Veränderungen auf die Prognose von Patient/-innen mit WHO Grad 3-Gliom zu untersuchen, wurde im Rahmen der Tumorresektion gewonnenes, in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe mikroskopisch untersucht und geeignete Areale der weiteren molekulargenetischen Untersuchung zugeführt. Aufgrund der teilweise sehr alten, tiefgekühlt gelagerten Gewebestücke, war die DNA-Qualität in vielen Fällen nicht ausreichend für die weitere Analyse. Die Untersuchung des MGMT-Promotor-Methylierungs- und IDH-Mutationsstatus erfolgte durch etablierte Verfahren mittels DNA-Isolierung, PCR und Pyrosequenzierung. Die Bestimmung des 1p/19q-Deletionsstatus erfolgte mittels MLPA-Verfahren, da dafür keine zusätzlich DNA-Probe aus Referenzgewebe benötigt wurde. Da diese Methode neu etabliert werden musste, erfolgte die Analyse von bekannten 1p/19q-codeletierten Tumoren als Positiv-Kontrolle. Weiterhin wurde nicht 1p/19q-codeletiertes Referenzgewebe analysiert. Aufgrund mangelnder DNA-Qualität war die Untersuchung bei 104 von insgesamt 167 Patient/-innen möglich. Die Pyrosequenzierung zum Nachweis einer vermehrten MGMT-Promotor-Methylierung ist gut reproduzierbar, schnell und kosteneffizient durchführbar [61, 63]. Preusser et al. untersuchten die MGMT-Expression von Glioblastomzellen mittels Immunhistochemie. Hier zeigte sich eine schlechtere Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung der Ergebnisse mit auf Genanalyse basierenden Verfahren [64]. Zur Analyse des IDH-Mutationsstatus eignet sich die Pyrosequenzierung ebenfalls sehr gut [65, 66]. Das MLPA-Verfahren ist eine gut erprobte Methode zu alternativen Untersuchungsmethoden wie der FISH und bietet eine gute Reproduzierbarkeit [67–69]. Aus allen FFPE-Blöcken wurden Schnitte gefertigt und diese fachlich-pathologisch auf ihre Eignung begutachtet. Damit wurde ein ausreichender Tumor-Gewebeanteil sichergestellt und so ein erstes Kriterium für die anschließende Untersuchung geschaffen. Der Anteil an fehlenden Ergebnissen erklärt sich zum einen durch unzureichendes Tumorgewebe, zum anderen durch die lange Lagerungszeit und damit lange Kühlzeit der FFPE-Blöcke, bei gleichzeitig geringer Gewebemenge der jeweiligen Probe. Die Verwendung des MLPA-Verfahrens und dessen labortechnische Etablierung erweitern das diagnostische Spektrum auch im Hinblick auf andere Erkrankungen.

4.2 Soziodemographische und klinische Einflussfaktoren

Als allgemeine Einflussfaktoren auf die progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit ergab sich für das Geschlecht kein signifikanter Unterschied und für ein unifokales Auftreten nur ein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebenszeit. Bezüglich des Alters bei Diagnose, des präoperativen Karnofsky-Index und des Resektionsausmaßes zeigten sich signifikante Unterschiede. Um den prognostischen Einfluss des Resektionsausmaßes weiter zu untersuchen, wäre eine exakte radiologische Messung des Resektionsvolumens und des Tumor-Residualvolumens notwendig. Wie in der Tab. 15 in Kapitel 3.1 dargestellt, war der KPS in der Gruppe der total resezierten Tumoren höher als in der Gruppe der subtotal resezierten Tumoren und in dieser Gruppe wieder höher als in der Gruppe der nur biopsierten Tumoren, sodass möglicherweise auch der KPS als eine Störvariable in dieser Analyse eine Rolle gespielt haben könnte. Weiterhin hängt dieser Faktor auch von der individuellen Erfahrung des Operators ab und ist deshalb schwer zu objektivieren. Das Alter bei Diagnose und der präoperative Karnofsky-Index gelten allgemein als prognosebestimmende Faktoren [70, 71]. Ob eine höheres Resektionsausmaß einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat, ist jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen, da nur wenige randomisierte klinische Studien existieren, welche diesen Einflussfaktor untersuchten [72]. Studien mit Patient/-innen mit Glioblastom deuten jedoch darauf hin, dass ein höheres Resektionsausmaß [19], beziehungsweise ein geringes Tumor-Residualvolumen, mit einer besseren Überlebensprognose einhergeht [73, 74]. Insgesamt haben junge Patient/-innen mit einem hohen Performance-Score eine bessere Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf. Obwohl der Einfluss des Resektionsausmaßes auf die Prognose noch weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen bedarf, benötigt es insbesondere bei Tumoren mit raumforderndem Effekt ein adäquates Operationsausmaß. Hier gilt es, das Komplikationsrisiko mittels optimaler präoperativer Diagnostik abzuwiegen und durch optimale Operationsbedingungen zu minimieren. Trotz allem ist das Resektionsausmaß von den oben genannten Faktoren der einzige beeinflussbare Faktor und damit, im Hinblick auf die stetigen technischen Entwicklungen, auch in Zukunft weiter zu untersuchen, wenn auch eine Operation nur im Sinne eine loko-regionären Therapie verstanden werden muss.

4.3 Die Tumorgenetik und -entität

Die erhöhte Methylierung des MGMT-Promotors ergab signifikante Vorteile für die Überlebenszeit (Median (Jahre) = 8,90 vs. 2,10; $p < 0,05$) und die progressionsfreie Zeit (Median (Jahre) 3,85 vs. 0,84; $p < 0,001$) gegenüber einer nicht-erhöhten Methylierung. Eine Mutation des IDH1- oder IDH2-Gens hat gegenüber eines IDH-Wildtyps ebenfalls einen signifikanten Vorteil bezogen auf die Überlebenszeit (Median (Jahre) = 16,31 vs. 1,60; $p < 0,001$) und die progressionsfreie Zeit (Median (Jahre) = 5,08 vs. 0,64; $p < 0,001$). Eine 1p/19q-Codeletion ergab in dieser Arbeit nur einen signifikanten Vorteil bezogen auf die progressionsfreie Zeit (Median (Jahre) = 5,17 vs. 2,45; $p < 0,05$), nicht jedoch auf die Überlebenszeit (Median (Jahre) = 11,30 vs. 5,88; $p = 0,350$). Diese Ergebnisse spiegeln sich in der Entitäts-bezogenen Überlebenszeitanalyse wider. Astrozytome, IDH mutiert und Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-codeletiert hatten die längste Überlebens- und progressionsfreie Zeit. Die in Kapitel 4.1 genannten Einschränkungen bei der Bestimmung des 1p/19q-Deletionsstatus, gemeinsam mit der insgesamt geringen Inzidenz der Oligodendrogliome, erschwerten die Auswertung dieses Einflussfaktors mittels Überlebenszeitanalyse erheblich. Von 104 durchgeführten Analysen, zeigte sich bei 12 Patient/-innen eine 1p/19q-Codeletion. Die Methylierung des MGMT-Promotors gilt seit langem als prognostischer Faktor. Eine Arbeit von Hegi et al. zeigte bei Glioblastom-Patient/-innen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber einem unmethylierten MGMT-Promotor [45]. Auch die IDH-Mutation zeigte gegenüber eines IDH-Wildtyps, bei Patient/-innen mit anaplastischen Astrozytom, in einer Studie von Yan et al. einen signifikanten Überlebensvorteil bei IDH-Mutation gegenüber eines IDH-Wildtyps. Die mediane Überlebenszeit (Monate) betrug 65 vs. 20 ($p < 0,001$) [37]. Hartmann et al. legten ähnliche Ergebnisse dar [42]. In beiden Studien konnte der selbe Effekt auch bei Glioblastomen festgestellt werden [37, 42]. Der prognostische Wert des IDH-Mutationsstatus ist so groß, dass dieser mit der aktualisierten WHO-Klassifikation von 2016 maßgeblich zur Unterscheidung verschiedener Tumorentitäten dient [30]. Auch die 1p/19q-Codeletion gilt als eigenständiger, statistisch signifikanter, positiver Prädiktor der Überlebenszeit [48, 75]. Weller et al. stellten einen positiven Einfluss dieser Deletion auf die Prognose nur in Abhängigkeit der postoperativen Therapie dar [76]. Labussière et. al. untersuchten in ihrer Arbeit den IDH-Mutationsstatus bei 1p/19q-codeletierten Tumoren – hier wurde bei 100 % der untersuchten Tumoren eine IDH1- oder IDH2-Mutation nachgewiesen. Mittlerweile bildet diese Codeletion eines der wichtigsten Kriterien zur Diagnose des Oligodendroglioms. Der prognostische Wert der molekulargenetischen Veränderung zeigt sich darin, dass diese einen Entitäts-bestimmenden Faktor darstellen. Die

Ergebnisse dieser Arbeit über den prognostischen Wert der drei untersuchten molekulargenetischen Marker untermauern die Ergebnisse der Vielzahl an Studien, die sich dieser Thematik widmeten. Spätestens mit der Aktualisierung der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS von 2016 erhielten diese Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene auch offiziell Einzug in die diagnostischen Kriterien. Der Trend, molekulargenetische Eigenschaften als Diagnostik-kriterien und zur Therapiefindung zu berücksichtigen, hat mittlerweile breiten Einzug in der Neuroonkologie erhalten. Diese und viele weitere Arbeiten belegen den prognostischen Einfluss. Mittlerweile ist der molekulargenetische Status als Entitäts-definierender Faktor wegweisend zur Klassifikation der Tumorentität. Es bleibt jedoch weiter abzusehen, ob in Zukunft darüber hinaus neue Therapiemethoden mit diesen Veränderungen als Zielgröße entwickelt werden können.

4.4 Das postoperative Therapieschema

In der Untersuchung des Gesamtkollektivs zeigten sich zwischen den Therapiegruppen signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit ($p < 0,001$) und der progressionsfreien Zeit ($p < 0,05$). Eine vor dem Jahre 2005 durchgeführte Radiotherapie ergab mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 72 % (der verbleibende Überlebensanteil nach Studienende bzw. nach 26,8 Jahren beträgt 51,3 %) und einer medianen progressionsfreien Zeit von 3,34 Jahren die beste Prognose. Bei einer postoperativen Therapie nach dem Jahr 2005 ergaben sich für die Radio-/Chemotherapie, gegenüber einer Radiotherapie, signifikante Vorteile in der Überlebenszeit (Median Jahre = 4,90 vs. 1,60; $p < 0,05$), bezogen auf die progressionsfreie Zeit ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Median Jahre = 1,96 vs. 1,22 Jahre). Da alle Therapiegruppen eine Radiotherapie erhielten, wurden Fälle mit einer Gesamtdosis von 60 Gy bzw. 60,4 Gy untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Vorteil der Gruppe „Radiotherapie vor 2005“ gegenüber den anderen Therapiegruppe in Betrachtung der Überlebens- und progressionsfreien Zeit, sowie ein signifikanter Vorteil der Gruppe „Radiochemotherapie ab 2005“ gegenüber der Gruppe „Radiotherapie ab 2005“ in Betrachtung der Überlebenszeit. Auch in der stratifizierten Risikoanalyse zeigte sich unter Einbezug des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, außer bei der Betrachtung der progressionsfreien Zeit ohne erhöhte MGMT-Promotor-Methylierung, ein signifikanter Vorteil in der Gruppe „Radiotherapie vor 2005“ sowohl in der Überlebenszeit, als auch in der progressionsfreien Zeit. Zwischen den Gruppen „Radiochemotherapie“ und „Radiotherapie ab 2005“ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigte sich ebenso unter

Einbezug des IDH-Mutationsstatus. Die retrospektive Beobachtung, die nicht-randomisierten Einteilung in die Therapiegruppen, sowie die teilweise geringe Fallzahl der jeweiligen Tumorentitäten schränkt eine genauere Analyse der Überlebensdaten in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie der einzelnen Tumorentitäten ein. Der teilweise lange Beobachtungszeitraum in Kombination mit der nachträglichen molekularpathologischen Untersuchung der Tumoren ermöglichen jedoch einen Einblick in die langfristigen Krankheitsverläufe unter aktuellen Betrachtungspunkten. Sowohl IDH-mutierte „Astrozytome (WHO-Grad 3)“ und „Astrozytome, NOS (WHO-Grad 3)“, also auch „IDH-mutierte, 1p/19q-codeletierte Oligodendrogliome (WHO 3)“ und „Oligodendrogliome, NOS (WHO-Grad 3)“ sollen laut aktuellem Forschungsstand mittels Radiotherapie und adjuvanter Chemotherapie behandelt werden, da diese Therapieform der alleinigen Radio- oder Chemotherapie überlegen scheint [56, 57, 72]. So zeigte sich zum Beispiel in der Studie von van den Bent et al. eine mediane Überlebenszeit bei RT/PCV von 42,3 Monaten gegenüber 30,6 Monate bei alleiniger RT [57, 72]. Der chemotherapeutische Wirkstoff der Wahl bei Astrozytomen (WHO-Grad 3) ist Temozolomid, während PCV den bevorzugten Wirkstoff bei Oligodendrogliomen (WHO-Grad 3) darstellt [72]. Der Vergleich beider Wirkstoffe als adjuvante Chemotherapie, vor- oder nach Radiotherapie, ist Gegenstand einer groß angelegten, internationalen, randomisiert-kontrollierten Studie [77]. Erste Interimsstudien weisen weiterhin darauf hin, dass eine gleichzeitige Gabe von Temozolomid zur Radiosensitivierung keinen signifikante Einfluss auf die Überlebenszeit hat [53]. Ob die Radiochemotherapie mittels Temozolomid den besten Therapiealgorithmus darstellt, ist weiterhin Teil intensiver Forschungsarbeit. Während diese Therapieform seit Jahren als Goldstandard in der Behandlung von Glioblastomen gilt, hält sie erst in der jüngeren Zeit international Einzug in die Behandlung von WHO-Grad 3 Tumoren. Dieser sich abzeichnende Trend bestätigt sich in dieser Arbeit. Ob die adjuvante Radiotherapie mit adjuvanter Chemotherapie mittels Temozolomid auch Einzug in die Behandlung von Oligodendrogliomen (WHO 3) hält, ist eine der letzten großen offenen Fragen bezüglich der Behandlung von anaplastischen Gliomen in Hinsicht auf die Verwendung der zum heutigen Stand regelmäßig verwendeten Medikamente. Insgesamt ergaben sich seit der Arbeit von Roger Stupp im Jahre 2005 keine neuen wegweisenden, medikamentösen Therapieansätze. Sowohl die Zugänglichkeit für eine adäquate onkologische Pharmakotherapie und Plastizität des zentralen Nervensystems als auch die Heterogenität der malignen Gliome stellen die Forschung im Bereich der Neuroonkologie weiterhin vor große Herausforderungen. In einem Zeitalter der rasanten medizinischen und technischen Entwicklung gilt es, umso mehr den Blick auf neue Therapieansätze zu richten, um betroffenen Patient/-innen in Zukunft eine bessere Behandlung zukommen zu lassen.

4.5 Der Stellenwert der molekulargenetischen Diagnosekriterien

Der in dieser Arbeit dargestellte, teils fulminante Vorteil der vor 2005 durchgeführten Radiotherapie, wirft umso größere Fragen auf, die auch nach stratifizierter Risikoanalyse in diesem retrospektiven Rahmen nicht geklärt werden konnten. Eine mögliche Antwort darauf könnte eine Studie von Paulus et al. aus dem Jahre 1989 liefern [78]. In dieser Studie wurde die intratumorale histologische Heterogenität in Gliomen untersucht. Dabei wurden 1000 Proben von 50 supratentoriellen Gliomen auf Grundlage der damals geltenden WHO-Klassifikation und sechs histopathologischen Eigenschaften (Zelldichte, nukleärer Polymorphismus, Nekrose, Zellarchitektur, Blutgefäßen und Mitosen) von zwei unabhängig voneinander arbeitenden Beobachtern untersucht. In 22,2 % der untersuchten Proben wurden unterschiedliche WHO-Grade diagnostiziert, die meisten davon (21,7%) unterschieden sich um ein WHO-Grad voneinander. Weiterhin wurden in 10,3 % der Proben unterschiedliche Tumorentitäten diagnostiziert. Nach einer erneuten gemeinsamen Durchsicht wurde ein Großteil dieser Diskrepanzen auf das tatsächliche Vorhandensein von gemischten Tumorentitäten und -graden zurückgeführt. In 48% der Proben waren unterschiedliche Tumorentitäten und in 82 % der Proben unterschiedliche Tumorggrade vorhanden. Insbesondere waren in 62 % der Proben maligne (WHO-Grad 3 und 4) und benigne (WHO-Grad 2) Anteile zu finden [78]. Diese Erkenntnis hat großen Einfluss auf den klinischen Alltag im Bereich der Neuroonkologie. Die endgültige Diagnose inklusive der Art des Tumors und der Einstufung der Malignität auf Basis histopathologischer Kriterien stellen keine Absolute dar. Die meisten Gliome verhalten sich nicht homogen, innerhalb eines Tumors können gutartige und bösartige Anteile gleichzeitig vorliegen, trotzdem ist eine endgültige Einteilung für den weiteren praktischen Umgang mit der Krankheit entscheidend. Für diese Arbeit wurden die Krankheitsverläufe von Patient/-innen mit der Diagnose eines WHO-Grad 3-Glioms untersucht. Die vorliegenden Diagnosen basieren zu einem großen Teil auf der histopathologischen Diagnose eines Neuropathologen. So könnte die oben genannte intratumorale Heterogenität Einfluss auf die hier dargestellten Ergebnisse, insbesondere der Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie haben, zum Beispiel könnte in der oben genannten Gruppe der postoperativen Therapie mittels alleiniger Radiotherapie vor dem Jahre 2005 eine höhere Anzahl an Tumoren mit WHO-Grad 2-Anteilen vorliegen. Mit der Aktualisierung der WHO-Klassifikation zur Einteilung von Tumoren des ZNS im Jahre 2016 wurden mit den molekulargenetischen Untersuchungen, zusätzlich zur den histologischen (und damit teils Untersucher-abhängigen) Methoden, letztlich mehrere objektivierbare Diagnosekriterien eingeführt. Diese könnten nicht nur neue therapeutische Ziele darstellen, sondern durch

eine spezifischere Diagnose auch einen großen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf im Sinne einer zielgerichteten Therapie haben. Der Einbezug der oben genannten Kriterien in die Einteilung in bestimmte Tumorgade könnte ein nächster wichtiger Schritt sein.

4.6 Die Bedeutung der Ergebnisse für die Fragestellung dieser Arbeit

In diesem Abschnitt sollen die in Kapitel 1.4 aufgestellten Fragen zusammengefasst beantwortet werden.

1. Wie gestaltete sich der langfristige Krankheitsverlauf von den im UKSH Campus Kiel behandelten Patient-/innen mit einem WHO-Grad 3-Gliom in Abhängigkeit soziodemographischer und klinischer Parameter?

- Ein junges Alter bei Erkrankungsbeginn und eine möglichst vollständige Tumorresektion wirkten sich signifikant positiv auf die progressionsfreie Zeit und die Überlebenszeit aus. Eine geringe initiale Beeinträchtigung durch die Erkrankung und ein singuläres Tumorkommen wirkten sich signifikant positiv auf die Überlebenszeit aus. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die Prognose.

2. Welchen Einfluss hatten die molekulargenetischen Eigenschaften der Tumorzellen und auf den Krankheitsverlauf?

- Eine IDH1/2-Mutation, eine vermehrte MGMT-Promotormethylierung (> 10%) und eine 1p/19q-Codeletion hatten eine signifikant längere progressionsfreie Zeit zur Folge. Auf die Überlebenszeit wirkten sich in dieser Arbeit nur IDH1/2-Mutation und die MGMT-Promotormethylierung signifikant positiv aus.

3. Welchen Einfluss hatte das postoperative Therapieschema auf den Krankheitsverlauf?

- Insgesamt hatte die Radiotherapie vor 2005 einen signifikanten Vorteil bezüglich der progressionsfreien Zeit und der Überlebenszeit im Vergleich zur Radiotherapie nach 2005 und der Radio-/Chemotherapie nach 2005. Bezüglich der Therapie nach 2005 ergab sich eine signifikant längere Überlebenszeit bei Durchführung einer Radio-

/Chemotherapie. In den verschiedenen Therapiegruppen gab es signifikante Unterschiede in den Einflussfaktoren „IDH-Mutationsstatus, MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und der Gesamtdosis in Gray. In den risikostratifizierten Überlebenszeitanalysen blieb der Vorteil der Radiotherapie vor 2005 weiter bestehen.

4. Welchen Stellenwert hat die Aufnahme der molekulargenetischen Diagnosekriterien in die WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS?

- Gliome lassen sich histologisch nicht eindeutig einem bestimmten Subtyp oder Tumorgrad zuteilen und bestehen somit aus bösartigeren und weniger bösartigen Anteilen. Es besteht eine hohe intratumorale Heterogenität. Ein als WHO-Grad 2 erscheinender Teil des Tumors wurde in der abschließenden Diagnose „Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III“ bisher nicht widerspielt. Die Aufnahme der molekulargenetischen Diagnosekriterien bietet eine bessere Objektivierbarkeit der Tumordiagnosen. Ein Beispiel dafür ist die IDH-Mutation in der Gruppe der Astrozytome. Hier unterscheidet sich die mediane Überlebenszeit zwischen Patient/-innen mit IDH-mutierten-Tumoren und IDH-Wildtyp-Tumoren um etwa 13,6 Jahre.

5 Zusammenfassung

Maligne Gliome stellen für betroffene Patient/-innen und deren Angehörige eine hohe Belastung dar. Zum größten Teil treten die Tumoren sporadisch auf. Klinisch äußern sich diese in vielfältiger Weise, am häufigsten führt jedoch ein Krampfereignis zur weiterführenden Diagnostik mittels radiologischer Verfahren. Trotz konsequenter Weiterentwicklung von Operationstechniken und operationstechnischer Systeme, Radio- und Chemotherapie-Konzepten und intensiver Forschung auf dem Gebiet der Neuroonkologie, gab es in den vergangenen 20 Jahren nur wenige Erkenntnisse in Hinsicht auf neue Therapieverfahren. Eine möglichst vollständige Tumoresektion gefolgt von einer adjuvanten Radio- und/oder Chemotherapie ist seit Jahren das Therapiekonzept der Wahl. Große Fortschritte ergaben sich jedoch mit der Einführung molekulargenetischer Diagnosekriterien in die WHO-Klassifikation zur Einteilung von Tumoren des ZNS im Jahre 2016. Ziel dieser Arbeit war es, Langzeitverläufe von Patient/-innen mit WHO Grad 3-Gliomen in Abhängigkeit von der Therapie und der molekulargenetischen Konstellation auszuwerten und damit Erkenntnisse über die Überlebens- und progressionsfreie Zeit zu erlangen. Dafür wurden klinische Daten von 167 Patient/-innen im Alter von 20 bis 79 Jahren mit der Erstdiagnose eines WHO Grad 3-Tumors in den Jahren 1994 bis 2019 erhoben, deren Tumorgewebe aufgearbeitet und der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus, der IDH-Mutationsstatus und der 1p/19q-Deletionsstatus untersucht. Anschließend wurde eine Überlebenszeitanalyse nach dem Kaplan-Meyer-Verfahren durchgeführt. Ein junges Alter bei Diagnose, ein singuläres Tumorkommen, ein guter klinischer Zustand bei Diagnose und ein hohes Resektionsausmaß zeigten Vorteile bezogen auf die progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit. Eine vermehrte Methylierung des MGMT-Promotors und eine IDH-Mutation wirkten sich signifikant positiv auf die Überlebenszeit und die progressionsfreie Zeit aus, eine 1p/19q-Codeletion zeigte signifikante Vorteile bezüglich des progressionsfreien Überlebens. Als postoperative Therapie ergaben sich in dieser Arbeit für die Radiotherapie, wie sie in der Zeit vor dem Jahr 2005 durchgeführt wurde, die besten Langzeitergebnisse. Für den Zeitraum nach dem Jahr 2005 zeigte die Radiochemotherapie einen signifikanten Vorteil im Gesamtüberleben im Vergleich zur Radiotherapie allein. Dies zeigte sich auch in der risikostratifizierten Überlebenszeitanalyse. Weiterhin wurde der neurologische Zustand der Patient/-innen im Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der postoperativen Therapie ausgewertet. Hier ergaben sich zwischen den Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede in einem Zeitraum bis zu zehn Jahren nach Erstdiagnose.

6 Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* 2017;19:v1-v88. doi:10.1093/neuonc/nox158.
2. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland | 2015/2016*. 12th ed.; 17.08.2020.
3. Ron E, Modan B, Boice JD, Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med.* 1988;319:1033–9. doi:10.1056/NEJM198810203191601.
4. Preston DL, Ron E, Yonehara S, Kobuke T, Fujii H, Kishikawa M, et al. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1555–63.
5. Melean G, Sestini R, Ammannati F, Papi L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;129C:74–84. doi:10.1002/ajmg.c.30022.
6. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer.* 2008;113:1953–68. doi:10.1002/cncr.23741.
7. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16:896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087.
8. Little MP, Rajaraman P, Curtis RE, Devesa SS, Inskip PD, Check DP, Linet MS. Mobile phone use and glioma risk: Comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. *BMJ.* 2012;344:e1147. doi:10.1136/bmj.e1147.
9. Koeman T, van den Brandt PA, Slottje P, Schouten LJ, Goldbohm RA, Kromhout H, Vermeulen R. Occupational extremely low-frequency magnetic field exposure and selected cancer outcomes in a prospective Dutch cohort. *Cancer Causes Control.* 2014;25:203–14. doi:10.1007/s10552-013-0322-x.
10. Schüz J, Böhler E, Berg G, Schlehofer B, Hettinger I, Schläefer K, et al. Cellular phones, cordless phones, and the risks of glioma and meningioma (Interphone Study Group, Germany). *Am J Epidemiol.* 2006;163:512–20. doi:10.1093/aje/kwj068.
11. Wrensch M, Miike R, Lee M, Neuhaus J. Are prior head injuries or diagnostic X-rays associated with glioma in adults? The effects of control selection bias. *Neuroepidemiology.* 2000;19:234–44. doi:10.1159/000026261.

12. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8th ed. Berlin; 2012.
13. Barnes B, editor. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert Koch-Institut; November 2016.
14. Black PM, Loeffler JS. Cancer of the nervous system. 2nd ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
15. Ellingson BM, Wen PY, Cloughesy TF. Modified Criteria for Radiographic Response Assessment in Glioblastoma Clinical Trials. *Neurotherapeutics*. 2017;14:307–20. doi:10.1007/s13311-016-0507-6.
16. Atlas SW, editor. Magnetic resonance imaging of the brain and spine. 3rd ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
17. Pallud J, Varlet P, Devaux B, Geha S, Badoual M, Deroulers C, et al. Diffuse low-grade oligodendrogliomas extend beyond MRI-defined abnormalities. *Neurology*. 2010;74:1724–31. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e04264.
18. Gulati S, Jakola AS, Nerland US, Weber C, Solheim O. The risk of getting worse: Surgically acquired deficits, perioperative complications, and functional outcomes after primary resection of glioblastoma. *World Neurosurg*. 2011;76:572–9. doi:10.1016/j.wneu.2011.06.014.
19. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2014;16:113–22. doi:10.1093/neuonc/not137.
20. Hervey-Jumper SL, Berger MS. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2016;130:269–82. doi:10.1007/s11060-016-2110-4.
21. D'Amico RS, Englander ZK, Canoll P, Bruce JN. Extent of Resection in Glioma-A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurg*. 2017;103:538–49. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.041.
22. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology*. 2017;18:e315–e329. doi:10.1016/S1470-2045(17)30194-8.
23. Niyazi M, Brada M, Chalmers AJ, Combs SE, Erridge SC, Fiorentino A, et al. ESTRO-ACROP guideline "target delineation of glioblastomas". *Radiother Oncol*. 2016;118:35–42. doi:10.1016/j.radonc.2015.12.003.
24. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1979;5:1725–31.
25. Ruff MW, Uhm J. Anaplastic Glioma: Treatment Approaches in the Era of Molecular Diagnostics. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19:61. doi:10.1007/s11864-018-0579-0.

26. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330.
27. Press RH, Shafer SL, Jiang R, Buchwald ZS, Abugideiri M, Tian S, et al. Optimal timing of chemoradiotherapy after surgical resection of glioblastoma: Stratification by validated prognostic classification. *Cancer*. 2020;126:3255–64. doi:10.1002/cncr.32797.
28. Zülch KJ. Histological typing of tumours of the central nervous system. Geneva: World Health Organization; 1979.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
30. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131:803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
31. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological typing of tumours of the central nervous system. 2nd ed. Berlin: Springer; 1993.
32. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
33. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311–22. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
34. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J*. 2014;20:66–72. doi:10.1097/PPO.000000000000020.
35. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016;18:16–26. doi:10.1093/neuonc/nov136.
36. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321:1807–12. doi:10.1126/science.1164382.
37. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360:765–73. doi:10.1056/NEJMoa0808710.
38. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009;118:469–74. doi:10.1007/s00401-009-0561-9.

39. Jin G, Reitman ZJ, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Yang J, Schmidt-Kittler O, et al. 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS ONE*. 2011;6:e16812. doi:10.1371/journal.pone.0016812.
40. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19:17–30. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014.
41. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 2009;174:1149–53. doi:10.2353/ajpath.2009.080958.
42. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2010;120:707–18. doi:10.1007/s00401-010-0781-z.
43. Gerson SL. MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:296–307. doi:10.1038/nrc1319.
44. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343:1350–4. doi:10.1056/NEJM200011093431901.
45. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997–1003. doi:10.1056/NEJMoA043331.
46. Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ. Clarifying the diffuse gliomas: An update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:755–68. doi:10.1309/6JNX-4PA6-0TQ5-U5VG.
47. Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science*. 2011;333:1453–5. doi:10.1126/science.1210557.
48. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006;66:9852–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.
49. Labussière M, Idhahbi A, Wang X-W, Marie Y, Boisselier B, Falet C, et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*. 2010;74:1886–90. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e1cf3a.
50. Mur P, Mollejo M, Ruano Y, Lope ÁR de, Fiaño C, García JF, et al. Codeletion of 1p and 19q determines distinct gene methylation and expression profiles in IDH-mutated oligodendroglial tumors. *Acta Neuropathol*. 2013;126:277–89. doi:10.1007/s00401-013-1130-9.

51. Killela PJ, Pirozzi CJ, Reitman ZJ, Jones S, Rasheed BA, Lipp E, et al. The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. *Oncotarget*. 2014;5:1452–7. doi:10.18632/oncotarget.1505.
52. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: A grading problem for WHO. *Acta Neuropathol*. 2015;129:867–73. doi:10.1007/s00401-015-1438-8.
53. van den Bent MJ, Baumert B, Erridge SC, Vogelbaum MA, Nowak AK, Sanson M, et al. Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: A phase 3, randomised, open-label intergroup study. *The Lancet*. 2017;390:1645–53. doi:10.1016/S0140-6736(17)31442-3.
54. Wick W, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology*. 2013;81:1515–22. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a95680.
55. Lu Y, Kwintkiewicz J, Liu Y, Tech K, Frady LN, Su Y-T, et al. Chemosensitivity of IDH1-Mutated Gliomas Due to an Impairment in PARP1-Mediated DNA Repair. *Cancer Res*. 2017;77:1709–18. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2773.
56. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: Long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 2013;31:337–43. doi:10.1200/JCO.2012.43.2674.
57. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: Long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013;31:344–50. doi:10.1200/JCO.2012.43.2229.
58. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook: For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only). May 2016.
59. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 1997;22:474–81. doi:10.2144/97223st01.
60. Thermo Scientific. T042-Technical Bulletin Assessment of Nucleic-Acid-Purity.
61. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009;101:124–31. doi:10.1038/sj.bjc.6605127.
62. MLPA® General Protocol: MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences. 01 March 2019.

63. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hübner A, Ehrentraut D, Schramm J, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn.* 2007;9:368–81. doi:10.2353/jmoldx.2007.060167.
64. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou M-F, Diserens A-C, et al. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: Observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol.* 2008;18:520–32. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00153.x.
65. Lee D, Suh Y-L, Kang SY, Park T-I, Jeong JY, Kim S-H. IDH1 mutations in oligodendroglial tumors: Comparative analysis of direct sequencing, pyrosequencing, immunohistochemistry, nested PCR and PNA-mediated clamping PCR. *Brain Pathol.* 2013;23:285–93. doi:10.1111/bpa.12000.
66. Loussouarn D, Le Loupp A-G, Frenel J-S, Leclair F, Deimling A von, Aumont M, et al. Comparison of immunohistochemistry, DNA sequencing and allele-specific PCR for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *Int J Oncol.* 2012;40:2058–62. doi:10.3892/ijo.2012.1404.
67. Bieńkowski M, Wöhrer A, Moser P, Kitzwögerer M, Ricken G, Ströbel T, Hainfellner JA. Molecular diagnostic testing of diffuse gliomas in the real-life setting: A practical approach. *Clin Neuropathol.* 2018;37:166–77. doi:10.5414/NP301110.
68. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijsen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: A diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn.* 2006;8:433–43. doi:10.2353/jmoldx.2006.060012.
69. Natté R, van Eijk R, Eilers P, Cleton-Jansen A-M, Oosting J, Kouwenhove M, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of 1p and 19q chromosomal loss in oligodendroglial tumors. *Brain Pathol.* 2005;15:192–7. doi:10.1111/j.1750-3639.2005.tb00520.x.
70. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* 2019;21:v1–v100. doi:10.1093/neuonc/noz150.
71. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009;27:5874–80. doi:10.1200/JCO.2009.23.6497.
72. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18:170–86. doi:10.1038/s41571-020-00447-z.
73. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. 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.* 2020;6:495–503. doi:10.1001/jamaoncol.2019.6143.
74. Grabowski MM, Recinos PF, Nowacki AS, Schroeder JL, Angelov L, Barnett GH, Vogelbaum MA. Residual tumor volume versus extent of resection: Predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J Neurosurg.* 2014;121:1115–23. doi:10.3171/2014.7.JNS132449.
 75. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol.* 2000;18:636–45. doi:10.1200/JCO.2000.18.3.636.
 76. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: Predictive or prognostic biomarker? *Clin Cancer Res.* 2007;13:6933–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0573.
 77. Alliance for Clinical Trials in Oncology. Radiation Therapy With Concomitant and Adjuvant Temozolomide Versus Radiation Therapy With Phase III Intergroup Study of Radiotherapy With Concomitant and Adjuvant Temozolomide Versus Radiotherapy With Adjuvant PCV Chemotherapy in Patients With 1p/19q Co-deleted Anaplastic Glioma or Low Grade Glioma.

7 Anlagen

7.1 Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. Michael Synowitz für die Überlassung dieses spannenden und interessanten Themas und die finanzielle Unterstützung bedanken, wodurch diese Arbeit in ihrem vollen Umfang ermöglicht wurde.

Für die enge Betreuung, die vielen Denkanstöße in vielen Fachgesprächen und Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Dr. Hajrullah Ahmeti.

Ein weiterer großer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken danke ich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes im molekulopathologischen Labor und die fachliche Begutachtung der Gewebepräparate. Herrn Dr. Jochen Haag gilt besonderer Dank für die fachliche Betreuung im Labor und die methodische Expertise, auf die ich jederzeit zurückgreifen konnte. Weiterhin danke ich allen medizinisch-technischen Assistent/-innen, die mir bei Fragen zur Seite standen und die mikroskopischen Schnitte anfertigten.

Für die äußerst hilfreiche Beratung zur statischen Auswertung meiner Daten danke ich Frau PD Dr. Amke Caliebe.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die andauernde Unterstützung und Motivation auf meinem Weg bedanken.