

Aus dem Bereich Neurochirurgie
Schwerpunkt: Neuroonkologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Molekularzytogenetische und epigenetische Untersuchungen zur Prognostizierung von
Patienten mit Glioblastom unter konkomitanter Radio-Chemotherapie mit zusätzlicher
lokaler Carmustin Behandlung**

Dissertation zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Jana Engelhardt geb. Müller

geb. am: 25.01.1985 in Pößneck

3. Material und Methoden	31
3.1 Patientendaten	31
3.2 Herstellung von Chromosomenpräparaten	32
3.3 DNA-Isolation	33
3.3.1 Isolation aus Tumorgewebe	33
3.3.3.1 Isolation mit QiAmp DNA Mini-Kit	35
3.3.2 Isolation der Referenz-DNA aus Spenderblut	35
3.4 photometrische Bestimmung der extrahierten DNA	35
3.5 Markierung der Proben	36
3.6 Dot Blot	37
3.7 vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	38
3.7.1 Vorbereitung der DNA	38
3.7.2 Vorbereitung der Chromosomenpräparate	39
3.7.3 Denaturierung der Objektträger	40
3.7.4 Hybridisierung	40
3.7.5 Stringenzwaschung	41
3.7.6 Detektion	41
3.7.7 Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop	43
3.8 Statistische Auswertung	43
3.9 Analyse epigenetischer Veränderungen	43
3.9.1 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA	43
3.9.2 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)	45
3.9.3 Agarose-Gelelektrophorese	48

4. Ergebnisse	49
4.1 Ergebnisse der Methylierungsanalysen von MGMT, p15 (CDKN2B) und p16 (CDKN2A)	49
4.1.1 Einfluss des Methylierungsstatus auf die Überlebenszeit	54
4.1.2 Methylierungsstatus der Langzeitüberlebenden	60
4.2 Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH)	61
4.2.1 Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen	61
4.2.2 Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Carmustin-Gruppe	62
4.2.3 Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Kontrollgruppe	67
4.2.4 Vergleich häufiger genetischer Veränderungen beider Gruppen	72
4.3 Einfluss genetischer Veränderungen auf Therapieansprechen und Überlebenszeit	73
4.3.1 Einfluss des Patientenalters und -geschlechts	73
4.3.2 Wahl des Therapieregimes	75
4.3.3 Einfluss genetischer Veränderungen auf die Überlebenszeit	76
4.3.3.1 Glioblastome mit Amplifikation von 4q12	76
4.3.3.2 Glioblastome mit Zugewinn von Chromosom 7	76
4.3.3.3 Glioblastome mit Amplifikation von 7p12	77
4.3.3.4 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 9p	78
4.3.3.5 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 10q	79
4.3.3.6 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 13q	81
4.3.4 weitere genetische Veränderungen der untersuchten Glioblastome	82
4.4 Korrelation des MGMT- und p15-Status	83

5. Diskussion	84
5.1 Studienauswahl und Patientenkollektiv	84
5.2 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) - Vor- und Nachteile	89
5.3 Methylierungsspezifische PCR - Vor- und Nachteile	90
5.4 Einfluss genetischer Faktoren auf die Prognose	91
5.4.1 Promotormethylierung von MGMT	91
5.4.2 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung von MGMT und Verlust auf Chromosomenarm 10q	93
5.4.3 Promotormethylierung von p15 und p16	95
5.4.4 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung von p15- und 9p-Verlust	96
5.4.5 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung von p16- und 9p-Verlust	98
5.4.6 Einfluss der Amplifikation auf Genlokus 4q12	98
5.4.7 Zugewinn von Chromosom 7 und Amplifikation auf Genlokus 7p12	101
5.4.8 Verlust auf Chromosomenarm 13q	103
5.4.9 weitere untersuchte chromosomale Veränderungen	104
5.5 Ausblick	104
6. Literaturverzeichnis	106
7. Anhang	118
8. Danksagung und Vorträge	120

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Übersicht über die häufigsten hirneigenen Tumorentitäten	7
Abb. 2: Therapieregime abhängig vom MGMT-Status	16
Abb. 3: Strukturformel von Carmustin	16
Abb. 4: ausgewählte Studien multimodaler Therapien	19
Abb. 5: Überblick über die häufigsten genetischen Veränderungen	21
Abb. 6: vereinfachtes Schema TP53-Regelkreis	23
Abb. 7: RB 1-Signalkaskade	25
Abb. 8: vereinfachtes Schema der DNA-Methylierung	28
Abb. 9: Gegenüberstellung der Therapieregime	31
Abb. 10: Beispiele durchgeführter Dot-Blots	37
Abb. 11: MS-PCR	44
Abb. 12: Bandenmuster Methylierungsanalyse MGMT	49
Abb. 13: Vergleich Methylierungsanalyse Carmustin/Kontrolle	54
Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurve MGMT, Vergleich Gliadel versus Kontrolle	55
Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve, MGMT	56
Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve, p15-Status	57
Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse p16	59
Abb. 18: CGH-Profil Fall 270/10	63
Abb. 19: CGH-Ideogramm der Carmustin-Fälle	63
Abb. 20: CGH-Profil Fall 1117/05	68
Abb. 21: Genetische Veränderungen der Kontroll-Gruppe	68
Abb. 22: Altersverteilung Gliadel®/Kontrolle	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 23:	Altersverteilung Männer/Frauen	74
Abb. 24:	Kaplan-Meier-Analyse, Vergleich Gliadel® versus Kontrollgruppe	75
Abb. 25:	Kaplan-Meier-Analyse 10q	80
Abb. 26:	Einfluss des Erkrankungsalters	85
Abb. 27:	Karnofsky-Skala Gliadel®/Kontrolle	86

Tabellenverzeichnis	Seite
Tab. 1: Sequenzen der verwendeten Primer	46
Tab. 2: Methylierungsstatus Gruppe A (Carmustin-Wafer)	50
Tab. 3: Methylierungsstatus Gruppe B (Kontrollen)	52
Tab. 4: Überlebenszeitanalyse MGMT	55
Tab. 5: univariate Cox-Regressionsanalyse MGMT	56
Tab. 6: univariate Cox-Regressionsanalyse p15	58
Tab. 7: Vergleich der Überlebenszeiten Gliadel versus Kontrolle nach p15-Status	58
Tab. 8: univariate Coxregressionsanalyse p16	59
Tab. 9: Vergleich der Überlebenszeiten Gliadel versus Kontrolle nach p16-Status	59
Tab. 10: Methylierungsergebnisse der Langzeitüberleber	60
Tab. 11: Vergleich der Aberrationen in primären und sekundären GBM	62
Tab. 12: genetische Veränderungen aller Carmustin-Fälle (CGH-Analyse)	64
Tab. 13: genetische Veränderungen aller Kontroll-Fälle (CGH-Analyse)	69
Tab. 14: Vergleich häufiger genetischer Veränderungen beider Gruppen	72
Tab. 15: univariate Cox-Regressionsanalyse Alter und Geschlecht	74
Tab. 16: univariate Cox-Regressionsanalyse Therapieregime	75
Tab. 17: univariate Cox-Regressionsanalyse amp4q12	76
Tab. 18: univariate Cox-Regressionsanalyse Chromosom 7	77
Tab. 19: univariate Cox-Regressionsanalyse amp7q12	77
Tab. 20: univariate Cox-Regressionsanalyse Chromosom 9	78
Tab. 21: univariate Cox-Regressionsanalyse 10q	80
Tab. 22: univariate Cox-Regressionsanalyse 13q	81
Tab. 23: weitere genetische Veränderungen	82
Tab. 24: Übersicht über Methylierungsstatus von MGMT und p15 in Korrelation	83

Abkürzungsverzeichnis

ACNU	1-[(4-Amino-2-methylpyrimidin-5-yl) methyl]-3-(2-chlorethyl)-3-nitrosoharnstoff = Nimustin
Abb	Abbildung
AKT	Gen für Proteinkinase B
Amp	Amplifikation
BCNU	1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff = Carmustin, Gliadel®
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCNU	1-(2-Chlorethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosoharnstoff = Lomustin
CDK	Cyklin-abhängige Kinase
CDKN2A/B	Cyclin.dependent kinase inhibitor-2A/B
CGH	Comparative genomic hybridization = Vergleichende genomische Hybridisierung
cm	Zentimeter
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylidol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Dinukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMA	europäische Arzneimittelagentur
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	forward (vorwärts)
GBM	Glioblastoma multiforme
GRD	Gesamtreferenzdosis
Gy	Gray (Einheit für ionisierende Strahlung)
Hyb-Mix	Hybridisierungs-Mix
kb	Kilobasen
KPS	Karnofsky-performance-status

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
LOH	Verlust der Heterozygotie
M oder m	Molar, methyliert oder männlich
mA	Milliampere
MDM2	Mouse double minute 2
mg	Milligramm
min	Minute
MGMGT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
ml	Milliliter
MS-PCR	Methyl-spezifische Polymerase-Kettenreaktion
MTIC	3-Methyl-Triazen-1-yl-Imidazol-4-Carboxamid
NaOH	Natriumhydroxid
mB	Megabase
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OT	Objektträger
p	kurzer Chromosomenarm
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
p15	Protein 15
p16	Protein 16
p53	(Tumorsuppressor-) Protein 53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	Procarbazin, CCNU, Vincristin
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pGBM	primäres Glioblastoma multiforme
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
q	langer Chromosomenarm
RB1	Retinoblastoma 1
rev	reverse (rückwärts)
rpm	revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

sek	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sGBM	sekundäres Glioblastoma multiforme
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
Tab	Tabelle
TMZ	Temozolomid, Temodal®
TP53	Tumorsuppressorgen p53
u	unmethyliert
ÜLZ	Überlebenszeit
UV	ultra-violett
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World-health-organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

- Für meine Familie -

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Das Glioblastom zählt zu den häufigsten, hirneigenen Tumoren des Erwachsenen und zeitgleich zu den aggressivsten. Die Prognose ist trotz intensiver Forschungen in den letzten Jahrzehnten weiterhin schlecht. Derzeitig anerkannte Behandlungsregime sehen vornehmlich eine möglichst vollständige chirurgische Resektion mit anschließender Radiochemotherapie vor. Mit Etablierung des Zytostatikums Temozolomid, als festen Bestandteil im Therapiekonzept durch Stupp und Kollegen 2005, erhöhte sich die mediane Überlebenszeit auf 14.6 Monate. Seit Markteinführung im Jahre 1999 wurden auch Gliadel-Wafer[®] (BCNU, Carmustin), ein gleichsam DNA-alkylierendes Agens, fest ins Therapiekonzept einbezogen. Vor allem Patienten mit Glioblastomrezidiv profitieren von einer intrakavitären Behandlung mit anschließender konkomitanter Radiochemotherapie.

Die Identifizierung tumorspezifischer genetischer Veränderungen führte in den letzten Jahrzehnten zum Umdenken im diagnostischen und therapeutischen Vorgehen. Effekte genetischer Aberrationen in Korrelation mit Überlebenszeit und progressionsfreiem Überleben konnten bereits für Temozolomid aufgezeigt werden. Patienten mit 10q-Verlust profitierten dabei besonders. Ein positiver Promotor-Methylierungsstatus von MGMT hatte einen hochsignifikanten Stellenwert für Therapie und Ansprechrate. Gleichsam bedeutend zeigte sich der Verlust von 9p, sowie Zugewinne auf Chromosom 7. Nicht minder einflussreich kristallisierte sich der Nachweis eines hypermethylierten Promotorregion p15 heraus, der sich negativ auf die Überlebenszeit auswirkte.

Ziel der vorliegenden Studie war daher die Lokalisierung eventuell neuer prognostischer Marker bzw. die Korrelation bekannter Aberrationen mit dem Chemotherapeutikum Carmustin. Untersucht wurden 72 Glioblastompatienten in zwei Gruppen á 36 Patienten.

Gruppe A wurde einer Therapie mit intrakavitären Carmustin-Wafern post resectionem mit anschließender Radiochemotherapie nach Stupp-Schema unterzogen, wohingegen Gruppe B nach chirurgischer Tumorresektion dem alleinigen konkomitanten Therapieregime zugeführt wurde.

Zusammenfassung

Mittels methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) erfolgte die Untersuchung der Promotorregionen p15, p16 und MGMT.

Zusätzlich fand die Aufarbeitung der kryokonservierten Tumorproben durch vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) statt und damit die Detektion chromosomaler Aberrationen.

Als statistisch signifikant konnten das Patientenalter, ein nachgewiesener Hypermethylierungsstatus von MGMT und p15, die Amplifikation auf 4q12, Aberrationen auf 10q und Verluste auf 13q herausgearbeitet werden.

Patienten mit höherem Erkrankungsalter wiesen eine signifikant schlechtere Prognose auf als jüngere Patienten ($p = 0.000061$). Aktuelle Studien demonstrierten ähnliche Effekte. Hier zeigte z.B. die Patientengruppe im Alter zwischen 0 und 19 Jahren eine overall survival von über 16 % nach 10 Jahren, wohingegen die Patientengruppe im Alter > 65 eine overall survival von 2 % nach bereits 2 Jahren aufwies (0,2 % nach 10 Jahren)(CBTRUS statistical report 2015).

Der MGMT-Status in der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls signifikante prognostische Unterschiede ($p = 0.041$). Hierbei wiesen Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor eine mediane Überlebenszeit von 8.03 Monaten auf, wohingegen diese bei Patienten ohne Methylierung nur bei 5.78 Monaten lag, unabhängig vom Therapieregime. Auch hier deckten sich die Ergebnisse mit bisher veröffentlichten Studien.

Als wichtiger prognostischer Marker konnte p15 detektiert werden. Die Applikation von Carmustin bei methylierten Promotorstatus ging mit einer deutlich reduzierten medianen Überlebenszeit einher (8.57 Monate versus 3.83 Monate). Dies zeigte sich im Log-Rank-Test als statistisch signifikant ($p = 0.0332$). Schlussfolgernd könnte diese Kombination zur Verkürzung der medianen Überlebenszeit führen, obgleich weitere Untersuchungen bei vergleichbar kleiner Fallzahl nötig sind.

Auch die Amplifikation von PDGFR auf Genlokus 4q12 erreichte in der univariaten Cox-Regressionsanalyse statistische Relevanz ($p = 0.0143$). Besonders im Log-Rank-Test zeichnete sich diese genetische Veränderung für die Carmustingruppe als hochsignifikant ab ($p = 0.00835$).

Zusammenfassung

Neue Erkenntnisse konnten im Bereich 10q gewonnen werden.

Wider Erwarten profitierten carmustinimplantierte Glioblastompatienten dann von der Therapie, wenn keine Deletion auf 10q vorlag ($p = 0.00219$). Dieses eher untypische Ergebnis deckt sich mit keiner bisher veröffentlichten Studie. Ein Einfluss bis dato unbekannter Genloki auf Chromosom 10 sollte daher in Erwägung gezogen werden, ebenso wie die Tatsache, dass es sich hierbei um eine retrospektive Studie mit vergleichsweise kleinerer Fallzahl handelt. Untersuchungen in größeren Kohorten sind daher anzustreben.

Abschließend zeigte sich auch eine genetische Veränderung des Chromosoms 13 als statistisch signifikant. Carmustinbehandelte Glioblastompatienten profitierten dann von der Therapie, wenn eine Deletion auf 13q vorlag ($p = 0.0364$). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in früheren Studien für Temozolomid veröffentlicht werden (Wemmert et al., 2006). Die Bedeutung als überlebenszeitverlängernden, prognostischen Marker ist beachtenswert und für weitere Untersuchungen relevant.

1.2 Englische Fassung

Glioblastoma multiforme is the most common malignant primary brain tumor in adults and the most aggressive diffuse glioma. The prognosis remains poor despite intensive research in recent decades. The current standard regimes of treatment intend maximal surgical resection, followed by radiation with adjuvant chemotherapy.

The establishment of temozolomide as an integral part in the therapeutic concept by Stupp and colleagues in 2005, the median survival increased up to 14.6 months.

Since market launch in 1996, carmustinewafers became the first new treatment to be FDA-approved for malignant glioma, specifically recurrent glioblastoma, placed in the tumor resection cavity.

The identification of specific molecular genetic markers in glioblastoma changed the diagnostic and therapeutic concepts. Effects of those genetic aberrations in correlation with survival time and progression free survival were already indicated for temozolomide. Besides, patients with losses of 9p profited particularly.

Patients with losses of 10q, a methylated MGMT and/or promotor-methylation of p15 were similarly significant to gains of chromosome 7.

The aim of the present study was to correlate already known genetic aberrations with the chemotherapeutic substance carmustine and to improve new prognostic marker. In this trial 72 patients with histological confirmed glioblastoma were included. Group A (n = 36) were treated according the EORTC-Study of Stupp et al. 2005 and receive additional local chemotherapy with carmustine. Group B (36 patients) were treated only according the EORTC-Study.

Promoter hypermethylation of the MGMT and p16 genes were determined by methylation specific-PCR as described in standard protocols. CGH (comparative genomic hybridisation) analysis will be performed with isolated, labelled DNA of each tumor.

In final results age at diagnosis, methylation status of MGMT and p15, amplification of 4q12, aberration of 10q and loss of 13q were worked out as significant prognostic marker.

Zusammenfassung

An important negative correlation was determined for elderly patients ($p = 0.000061$). This fact could be shown in further studies. Patients with an age between 0 and 19 had an overall survival of over 16 % after 10 years. On the other hand patients older than 65 years had an overall survival of about 2 % after 2 years (0.2 % after 10 years).

Similarly Patients with MGMT promoter methylation had a benefit of chemotherapy whether treated by TMZ or carmustine ($p = 0.041$). Glioblastoma patients with a positive MGMT-Promotormethylation had a longer overall survival as patients with an unmethylated status (8.03 months versus 5.78 months). In content with recent results MGMT still seems to be an important predictive marker in GBM patients.

Quite contrary to treatment by temozolomide epigenetic silencing of p15 is related to a shorter overall survival in patients treated with gliadel (8.57 months versus 3.83 months). This result was also confirmed in the log-rank test as statistically significant ($p = 0.0332$). In conclusion, this combination could lead to the shortening of the median survival time. However these results need to be confirmed in larger patient cohorts. But beyond doubt this study shows clear the important role of p15 as a negative prognostic factor.

Amplification of 4q12 were also identified and also statistically significant in univariate cox regression analyses ($p = 0.0143$). Especially in carmustine group this result seemed to be prognostic relevant ($p = 0.00835$).

New insights have been gained in the region 10q. Contrary to expectations patients with carmustine benefit from therapy if no deletion of 10q was present ($p = 0.00219$). This coincides to no other published results. An influence of still unknown genetic loci on chromosome 10 should therefore contemplated, as well as the fact that this is a retrospective study with a relatively small number of cases is. Studies in larger cohorts are advisable.

Finally, genetic modification of chromosome 13 was shown as statistically significant. Patients treated by carmustine after resection benefited from therapy if a deletion on 13q was present ($p = 0.0364$). Similar results have been published in previous studies of temozolomide (Wemmert et al., 2006). The importance as a predictive marker for prolonged survival need to be concerned in further studies.

2. Einleitung

2.1 Inzidenz intrakranieller Tumorentitäten

Jährlich erkranken in Deutschland rund 477.300 Menschen an Krebs (Robert-Koch-Institut, Krebsregister Deutschland 2013). Maligne Hirntumoren sind mit einer Häufigkeit von ca. 2 % pro Jahr gegenüber Lungen-, Brust- und Darmkrebs vergleichsweise selten. Sie imponieren jedoch typischerweise durch ihre ausgeprägte Aggressivität und meist infauste Prognose, insbesondere hochgradige bösartige Tumoren des zentralen Nervensystems (Robert-Koch-Institut, Krebsregister 2010/2011).

Die Inzidenz der primär an einem Hirntumor erkrankten Personen in Deutschland beläuft sich im Jahr 2012 auf ca. 7000 Neuerkrankte, wobei der Erkrankungsgipfel der weiblichen Patienten im Mittel bei 68 Jahren liegt und derer männlicher Betroffener bei 64 Jahren. (GLOBOCAN 2012; Ferlay et al, 2013). Über 130 verschiedene Tumorentitäten des ZNS sind registriert (WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren 2007), wobei Meningeome mit 35.8 % die häufigsten, Glioblastome mit 15.6 % die zweithäufigsten und Hypophysentumore mit 14.7 % die dritthäufigsten primären Hirntumore ausmachen (CBTRUS (2013): Statistical Report 2006–2010. S. ii12).

2.2. Gliome

Alle primären Hirntumore, die histologisch neuroglialen Ursprungs sind, werden zur Gruppe der Gliome zusammengefasst und nehmen mit ca. 50 % einen vergleichsweise großen Anteil ein (Zülch et al., 1986; Ohgaki und Kleihues 2005b). Die Inzidenz liegt bei 5-6/100.000 Einwohner pro Jahr. Ca. 10.000 Neuerkrankungen werden jährlich allein in den USA erfasst (Wen et al., 2008; Clarke et al., 2010). Männer erkranken im Schnitt 1.2-1.9 mal häufiger als Frauen (Russel et Rubinstein et al., 1989).

Der Begriff „Gliom“ wurde erstmals 1863 von Rudolf Virchow verwendet und schließlich 1920 von Cushing und Bailey mit Feststellung histopathologischer Ähnlichkeiten zum glialen Gewebe des ZNS geprägt.

Einleitung

Tumorentität		durschnittl. Erkrankungs- alter (Jahre)		WHO - Grad	Häufigkeit (% hirneigene TU)	Inzidenz pro 100.000/Jahr		
						2-Jahres- Überleben (%)	5-Jahres- Überleben (%)	
Gliome	Astrozytome	<i>Pilozytisch</i>	10	I	1.5	0.33	97	94
		<i>Diffus</i>	47	II	2.8	0.58	61	47
		<i>Anaplastisch</i>	50	III	1.7	0.36	42	26
		<i>Glioblastom</i>	62	IV	15.8	3.19	14	5
	Oligodendrogliom		41	II-III	1.3	0.27	abh. Vom WHO- Grad: II: 10-16 Jahre ÜLR	
	Oligoastrozytom		40		< 1		III: 2-10 Jahre ÜLR	
	Ependymom		<u>Zweigipfl.:</u> 5 35	I-III	ca. 10 % aller kindl. TU	0.2	schwankt stark, da abh. vom Resektionsausmaß	

Abb. 1.: Übersicht über die häufigsten hirneigenen Tumorentitäten, modifiziert nach Dolecek et al. 2012, Schlegel, Weller, und Westphal et al., 2003)

Abhängig vom Zelltyp der glialen Stützzellen ist es daher möglich, Gliome in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome und Mischgliome zu unterteilen (Cushing, Bailey et al., 1920).

Einleitung

Entscheidend für die Beurteilung der Malignität sind vor allem der Differenzierungsgrad, die Neigung zur Infiltration benachbarter Gewebsstrukturen, die Neovaskularisationsrate und die Variabilität des Tumorsubtyps (Kleihues und Cavenee et al., 2000; WHO-Klassifikation Hirntumoren). Abbildung 1. gibt einen Überblick über Dignität, Häufigkeit und Überlebensrate bekannter Gliomarten.

2.3 Glioblastoma multiforme (GBM)

Das sogenannte Highgrade-Astrozytom (Glioblastom, WHO-Grad IV) ist mit ca. 50 % der häufigste astrozytäre Tumor des Erwachsenen und Zentrum vieler molekularzytogenetischer und epigenetischer Forschungen. Der Altersgipfel liegt bei ca. 50-60 Jahren, wobei die Anzahl männlicher Patienten überwiegt (m:w = 1.7:1) (CBTRUS Statistical Report: 2004-2006). Jährlich kommen auf 100.000 Einwohner etwa 2.9-3.5 Neuerkrankungen in Europa und Nordamerika (Cavenee et al., 2000; Ohgaki und Kleihues et al., 2005).

Die mediane Überlebenszeit betrug in den 1960ern und 70ern noch etwa 6 Monate. Dank intensiver Forschung konnte diese bereits auf 14.6 Monate ausgeweitet werden. (Stupp et al, 2005) Und dennoch bleibt die Prognose für den Patienten nach wie vor schlecht und unbefriedigend.

Histologisch auffällig ist ein Nebeneinander von gräulich-rottem vitalen Tumorgewebe, gelblichen Nekrosen, Einblutungen und gelegentlich grünlichen Gallertzysten. Das variable und inhomogene Erscheinungsbild prägte schließlich diese astrozytäre Tumorart als Glioblastoma *multiforme* (multiform = vielgestaltig; Bailey, Cushing et al., 1926).

Die Tumorgenese unterscheidet zudem einen primären von einem sekundären Entstehungsmechanismus. Diese Tatsache erweist sich als signifikant, bezogen auf Altersverteilung, Pathogenese und klinischen Verlauf.

Einleitung

Das **primäre GBM** ist dadurch definiert, dass es sich de novo manifestiert (Louis et al., 2007). Das heißt, dass diagnostisch und auch klinisch keine Hinweise auf einen malignen Prozess als Vorstufe vorliegen. Ca. 90 % der Glioblastompatienten erkranken an dieser Form, wobei das Durchschnittsalter bei 62-65 Jahren liegt (von Deimling et al. 1995, Kleihues und Ohgaki 1999). Hauptlokalisation sind die Großhirnhemisphären, besonders das Marklager des Frontal- und Temporallappens, von denen aus sich das Glioblastom oft schmetterlingsförmig über das Corpus callosum hinweg ausbreitet. Anamnestisch beläuft sich die Entstehungsgeschichte häufig auf nur wenige Monate (68 % unter 3 Monaten, 84 % unter 6 Monaten, Ohgaki et al., 2004).

Nur etwa 15 % der Patienten weisen eine Krankheitsgeschichte auf, die einen Zeitraum von sechs Monaten übersteigt. Denn ein rasches, infiltrierendes Wachstum führen in der Regel schnell zu einer infausten Prognose.

Sekundäre GBM entwickeln sich hingegen über mehrere Jahre aus einem diffusen Astrozytom (WHO Grad II), wobei das anaplastische Astrozytom häufig eine Zwischenstufe dieses Entstehungsprozesses darstellt (Louis et al., 2007).

Dass die Prognose etwas günstiger ist als bei der primären Form, liegt vermutlich vor allem daran, dass die Patienten bei Diagnosestellung deutlich jünger sind (Durchschnittsalter 45 Jahre) und die Zeitspanne der Progression von einem niedrig zu einem höher gradigen Gliom stark variiert (vereinzelt bis zu 10 Jahre) (Ohgaki H et al., 2004). Ein morphologischer Unterschied besteht zudem in der geringeren Ausbreitung von Gewebnekrosen und in einem differenten genetischem Profil, verglichen mit dem primären GBM (siehe Kapitel 2.4.).

2.3.1 Etablierte Therapieregime für Glioblastome

Der enorme Zuwachs und Fortschritt neurobiologischer Forschungen in den vergangenen Jahren trägt im Wesentlichen dazu bei, dass vor allem im Bereich der Neuroonkologie ein signifikanter Wandel bezüglich Prognose und Therapie unterschiedlichster Tumorentitäten stattgefunden hat.

Einleitung

Obwohl kurative Ansätze für das Glioblastoma multiforme bisher nicht zum Durchbruch geführt haben, bedeutet die Ablehnung sämtlicher Therapiemaßnahmen zeitgleich eine rapide Verschlechterung der allgemeinen und vor allem zerebralen Symptomatik.

In der Regel liegt dann die mediane Überlebenszeit bei etwa 3 Monaten (Hofer et al., 1999, E. G. Shaw et al., 2003). Zu den etablierten Standardverfahren zählen die möglichst vollständige chirurgische Entfernung des Tumors, sowie die sich anschließende Radiochemotherapie.

Der prognostische Stellenwert der Operation ist unumstritten. In einer finnländischen randomisierten Studie wurden sowohl Patienten mit Glioblastom (Alter > 65 Jahre) als auch jene mit anaplastischen Astrozytomen untersucht.

Die mediane Überlebenszeit in der Resektionsgruppe betrug 171 Tage gegenüber 85 Tagen in der reinen Biopsiegruppe (Vuorinen et al. 2003; Leitlinie DGN 2014). Trotz kleiner Fallzahl (n = 30) konnte dieser Effekt in weiteren Studien bestätigt werden (Lacroix et al, 2001; Chang et al, 2004; Stummer et al, 2008).

Um ein maximal zytoreduktives Operationsergebnis erzielen zu können, hat sich die fluoreszenzgestützte Tumorsektion mit 5-ALA als durchaus rentabel erwiesen.

5-Aminolävulinsäure ist eine körpereigene Substanz, die dem Patienten präoperativ verabreicht wird. Durch einen Enzymdefekt in der Tumorzelle reichert sich 5-ALA selektiv im malignen Gewebe stärker an als im umgebenden Gesunden. Intraoperativ gelingt dann die Darstellung des Tumors durch Zuschaltung von blau-violettem Licht. Der Anteil jener Patienten mit progressionsfreiem Überleben von bis zu 6 Monaten erhöhte sich signifikant (Stummer et al, 2006, Senft et al. 2011), obgleich Rezidivtumoren nicht vollständig verhindert werden können (Stupp und Weber et al, 2005; Stummer et al, 2006).

In zahlreichen Studien konnte zudem belegt werden, dass die Prognose des Patienten u.a. von drei bereits etablierten Faktoren abhängt (beispielhaft: Walker et al., 1980; Shawl et al., 2003; Ohgaki et al. 2004):

- Alter (< 50 Jahren)
- Therapie (gute neurologische Funktion postoperativ)
- Karnofsky-Index bzw. karnofsky performance status scale (KPS, > 90)

Einleitung

Der Karnofsky-Index wurde 1949 u. a. von David A. Karnofsky (Karnofsky et al., 1949), einem amerikanischen Onkologen, entwickelt. Er kann als Skala zur Operationalisierung und Standardisierung der Lebensqualität betrachtet werden und dient dadurch als Hilfsmittel zur genaueren Prognosestellung und Therapiestratifizierung. Er vereinigt die objektive und subjektive symptombezogene Einschränkung der Aktivität, Selbstversorgung und Selbstbestimmung des Patienten. Erreicht der Betroffene 100 %, so äußern sich momentan keine Krankheitszeichen, wohingegen bei 50 % bereits Hilfe und medizinische Versorgung in Anspruch genommen werden müssen.

Diagnostisch wegweisend hat sich gleichsam die Magnetresonanztomographie (MRT) erwiesen. Die Untersuchung mit und ohne Kontrastmittel gilt als Methode der Wahl. Sie dient nicht nur der Beurteilung von Ausbreitungsmaß und Lokalisierung des Tumors, sondern wird auch zur Verlaufskontrolle herangezogen (Wen et al. 2010, Vogelbaum et al., 2012).

Da sich im MRT oder CT allerdings Gliome WHO-Grad III nicht von einem GBM differenzieren lassen, ist eine anschließende stereotaktische Serienbiopsie unabdingbar, an die sich eine histopathologische Bestätigung des Befundes fortsetzt.

Ein abwartendes oder palliatives Vorgehen ist nur dann indiziert, wenn die angestrebte Intervention den therapeutischen Nutzen übersteigt und der Informationsgewinn durch die feingewebliche Untersuchung keinen Benefit für den Patienten erbringt. (Leitlinien DGN 2013).

2.3.2 Strahlentherapie

Eine Radiotherapie ist besonders bei einer geringen Resttumormasse sinnvoll, da sie die Überlebenszeit und Lebensqualität des Patienten verbessert. Eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit um bis zu 6 Monate ist allein durch diese Therapiemaßnahme realisierbar (Laperriere et al. 2002).

Die fraktionierte Gammabestrahlung hat sich dabei besonders für hochmaligne Gliome durchsetzen können. Standard ist hierbei die lokale konformale Radiatio mit einer Gesamtdosis zwischen 54-60 Gy, fraktioniert auf 1.8–2 Gy Strahlendosen.

Einleitung

Maßgebliche Faktoren für Indikation und Realisierung der Radiotherapie sind das histologische Staging und die Einschätzung entscheidender Prognoseparameter wie Karnofsky-Score, Alter und das chirurgische Resektionsausmaß des Tumors. (McGirt et al. 2009, Ewelt et al. 2011). Anhand dieser Konstanten wird ein Behandlungsplan erstellt, der sich an prä- und postoperativen Schnittbildern (nativ und mit Kontrastmittel) orientiert und abhängig von anatomischen Tumorgrenzen einen Sicherheitsabstand von zusätzlich 0.5-2 cm zu berücksichtigen versucht. (Leitlinien DGN 2012).

Besonders bei Patienten > 70 Jahren oder prognostisch ungünstigen Tumoren sollte eine akzelerierte Radiotherapie erwogen werden (Roa et al. 2004, Malmstrom et al. 2012). Die Dosen der Einzelfraktionierungen werden hierbei auf bis zu 3 Gy erhöht, wobei gleichzeitig eine Reduktion der Gesamtdosis auf z.B. 42 Gy in kürzerer Zeit notwendig ist. Ziel ist die Minimierung der Gesamtbehandlungszeit bei dennoch nahezu gleicher Wirksamkeit der Therapie.

Obwohl mit Unverträglichkeiten und einem erhöhten Auftreten von Nebenwirkungen zu rechnen ist, konnte gezeigt werden, dass diese Patientengruppe von einer Hochdosis-Bestrahlung profitiert (Keime-Guibert et al. 2007).

2.3.3 Chemotherapie

In den letzten drei Jahrzehnten intensivte sich die Erforschung chemischer Agenzien mit dem Ziel, den Verlauf der Erkrankung hinauszuzögern, bestenfalls zu kurieren. Unzählige Studien befassten sich mit der Wirksamkeit unterschiedlichster Substanzen (Auszug: Walker et al., 1980; Kornblith et al., 1988; Friedmann et al., 2000; Weller et al., 2005; Stupp et al., 2005). Dabei wurden in der Regel adjuvante Konzepte nach chirurgischer Resektion des Glioblastoms und Radiatio getestet. Obgleich eine prognostische Verbesserung für Glioblastompatienten erzielt werden konnte, bleibt die Überlebenszeit nach wie vor begrenzt.

Entscheidende limitierende Faktoren sind vor allem Resistenzmechanismen, die eine Wirkungsreduktion der eingesetzten Chemotherapeutika mit sich bringen. Dazu zählt in erster Linie eine Gruppe von Enzymen, die unter anderem die sog. O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) mit einschließt.

Einleitung

Dieses Protein ist in der Lage alkylantieninduzierte DNA-Schäden aufzuheben und somit wirkungslos zu machen (ausführliche Informationen: Kapitel 2.3.3.1).

Ein weiterer zellulärer Mechanismus ist das p-Glykoprotein, welches in der Lage ist, chemotherapeutische Substanzen aktiv aus dem zentralen Nervensystem heraus zu transportieren und damit von ihrem Wirkort zu entfernen.

Nicht zuletzt spielt auch die Bluthirnschranke eine wichtige Rolle, da sie für hydrophile Medikamente nicht passierbar ist und damit das Angebot einsetzbarer Chemotherapeutika reduziert, obgleich diese Barriere bei Tumorpatienten nicht vollständig intakt ist.

Erreichen lipophile Substanzen das Hirnparenchym, so stellt die häufig schlechte Durchblutung des Tumorgewebes ein weiteres pharmakokinetisches Problem dar. Die Anreicherung der Wirksubstanzen ist folglich zusätzlich eingeschränkt (Warnke et al., 1989).

Letztlich ist auch das hohe Nebenwirkungsprofil ein limitierender Faktor, da es die Lebensqualität des Patienten deutlich minimiert und eine stetige Überwachung notwendig macht.

Etablierte Chemotherapeutika beschränkten sich im Wesentlichen auf die Gruppe der Nitrosoharnstoffe. Zu ihnen zählen Substanzen wie:

- Nimustin (ACNU)
- Carmustin (BCNU, **Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea**)
- Lomustin (CCNU)
- Procarbazon

Allen gemeinsam ist die Alkylierung der Erbsubstanz (DNA), die eine strukturelle Veränderung zur Folge hat und eine weitere Zellteilung bzw. Proteinbiosynthese verhindert. Dies führt folglich zur Apoptose proliferierender Zellen. Da dies jedoch auch körpereigene Zellen einschließt, ist das Nebenwirkungsprofil nicht unerheblich.

Nennenswert sind vor allem Blutbildveränderungen (Leuko- und Thrombozytopenien, Blutgerinnungsstörungen) und eine Reduktion der körpereigenen Immunabwehr.

Einleitung

Aus diesem Grund gilt die Indikation dieser Wirkstoffgruppe vor allem jüngeren Patienten bzw. Patienten mit einem KPS > 70 % (DeAngelis et al., 1998).

Der Einsatz von Kombinationspräparaten im sog. PCV-Schema (Kombination aus Procarbazin, dem Nitrosoharnstoff CCNU = Lomustin und dem Mitosespindelgift Vincristin) sollte eine Minimierung des Nebenwirkungsprofils durch Einsatz zellzyklusab- und -unabhängiger Zytostatika bewirken und zeitgleich die Anzahl sekundär resistenter Tumorzellen verringern. Diese Therapie führte bereits nachweislich zur Verlängerung des progressionsfreien Intervalls glioblastomkranker Patienten um 17.1 Wochen (Schmidt et al., 2006), wovon vor allem Patienten mit Rezidiv profitierten. Das progressionsfreie Überleben betrug nach 6 Monaten 38.4 %.

Vergleichbare Effekte konnten auch mit dem Einsatz von Temozolomid bei Temozolomid-naiven Patienten gezeigt werden, bei denen sich ein Glioblastomrezidiv ausbildete. Hier lag das mittlere progressionsfreie Intervall bei 11 Wochen. Die Überlebenszeit konnte mit 21 % nach 6 Monaten verlängert werden (Yung et al. 2000). Besonders anaplastische Oligodendrogliome zeigten ein gutes Ansprechen auf PCV-Therapie, wenn zeitgleich Allelverluste der Chromosomenarme 1p und 19q vorlagen (Cui et al, 2010; Cairncross et al. 2013; Van den Bent et al. 2013). Gleiches konnte für Oligodendrogliome WHO Grad II gezeigt werden.

In vergleichenden Studien zeigten sich jedoch beide Chemotherapeutika (PCV und TMZ) ähnlich wirksam, wobei die Toxizität bei PCV ausgeprägter war (Wick et al. 2009a).

Ein signifikanter Durchbruch in der Erforschung neuer Therapieregime gelang jedoch 2005, der die Bedeutung der Nitrosoharnstoffe allmählich reduzierte. In einer prospektiven, randomisierten und multizentrischen Phase III-Studie der „*European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*“ und der „*National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC)*“ (*EORTC/NCIC-Studie*) wurde die Entwicklung einer kombinierten Radiochemotherapie nach dem sog. Stupp-Schema (Stupp et al., 2005) postuliert. Die mediane Überlebenszeit konnte damit von bisher 12.1 Monaten (bei alleiniger Radiotherapie) auf 14.6 Monate gesteigert werden. Insbesondere Patienten mit nachgewiesener Hypermethylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase- Gens (MGMT) erzielten einen signifikanten Benefit mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von 46 % (Hegi et al. 2005, Dehdashti et al., 2006).

Aktuelle experimentelle Studien für die Primärtherapie des Glioblastoms stützen sich auf die Kombination von Temozolomid mit anderen Chemotherapeutika, z.B. Nitrosoharnstoffen wie BCNU/Carmustin (Gliadel®) (Kapitel 2.3.3.3).

2.3.3.1. Temozolomid

Temozolomid (TMZ, Temodal®) konnte als orales, alkylierendes Zytostatikum als wichtiges Chemotherapeutikum in der Behandlung maligner Gliome etabliert werden.

Als Prodrug unterliegt es bei physiologischen pH-Werten einer raschen Metabolisierung (Hydrolyse) in seine aktive Wirkform 3-Methyl-Triazen-1-yl-Imidazol-4-Carboxamid (MTIC). Die Toxizität dieses Stoffwechselproduktes beruht auf der Alkylierung der Aminosäure Guanin an Position 3 (N³-Methyladenin), 6 (O⁶-Methylguanin) und 7 (N⁷-Methylguanin).

Um Schädigungen der DNA zu vermeiden, greifen zelleigene Reparaturmechanismen, wie die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), die zur Eliminierung des fehlerhaften DNA-Produktes führen. Da sich das Enzym bei diesem Reparaturvorgang selbst konsumiert, wird es auch als „Suizid-Enzym“ bezeichnet.

Gelingt die Korrektur der DNA-Schädigung jedoch nicht, fehlt den DNA-Reparaturenzymen die komplementäre Base, so dass bei Replikation des DNA-Strangs der Einbau von Thymin an Stelle von Cytosin vollzogen wird.

Das Mismatch-Repair-System (MMR-System) der Zelle erkennt die Fehlpaarung, so dass es schließlich zu Strangbrüchen und zur Induktion apoptotischer Vorgänge kommt.

Im Jahre 2012 etablierten die Studien NOA-08 und *Nordic-Trial* den Methylierungsstatus des MGMT-Promotors als wichtigen prädiktiven Marker bei älteren Patienten mit Glioblastom (ab 65–70 Jahre). Seine Bestimmung mit Hilfe epigenetischer Methoden leitet das weitere therapeutische Vorgehen ein (Wick et al. 2012, Malmstroem et al. 2012; Weller et al. 2012a):

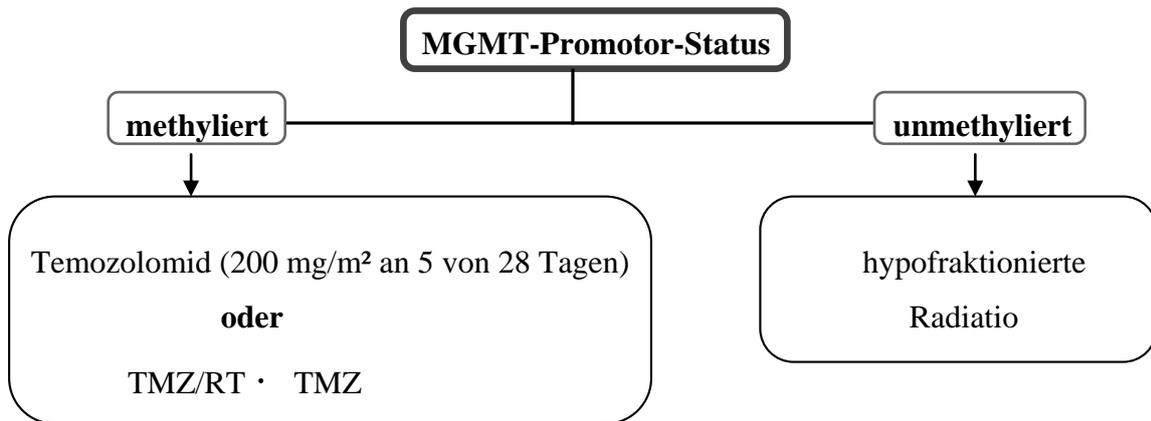


Abb. 2: Therapieregime abhängig vom MGMT-Status, modifiziert n. Wick et al., 2012; Malmstroem et al., 2012

2.3.3.2. Carmustin-Wafer

Simultan zum Wirkmechanismus von Temozolomid setzt auch das chlorethylierende Nitrosoharnstoff-Derivat Carmustin (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea, BCNU) an der O6-Position des Guanins an und führt daher gleichsam zur Bildung von O6-Methylguanin. Aus diesem Grund ist auch in diesem Prozess das Reparaturenzym MGMT ein wichtiger limitierender Faktor, da es die Wirkung des Chemotherapeutikums rückgängig machen kann.

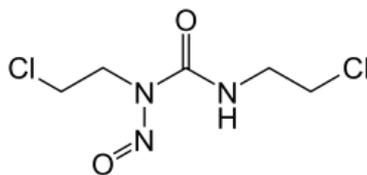


Abb. 3: Strukturformel von Carmustin

Einleitung

Ein großer Vorteil gegenüber systemisch wirksamen Therapeutika ist die direkte lokale, intraoperative Applikation der Carmustin Wafer in die Resektionshöhle. Dadurch ist die sofortige Freisetzung des Wirkstoffes gegeben, ohne zuvor eine Metabolisierung und Überbrückung der Blut-Hirn-Schranke nötig zu machen.

Im Anschluss an die chirurgische Resektion des Tumors können bis zu acht Carmustin-Wafer intrakavitär eingebracht werden. Die Resektionshöhle sollte möglichst vollständig ausgekleidet werden. Jedes Implantat enthält 7.7 mg Carmustin, die homogen in einer bioabbaubaren Copolymermatrix verteilt sind, so dass sich bei Einsatz von acht Wafern eine Gesamtdosis von 61.6 mg ergibt. Über Hydrolyse baut sich die Copolymermatrix ab und der Wirkstoff wird hochkonzentriert über zwei bis drei Wochen in das umgebende Gewebe freigesetzt. Da eine adjuvante Strahlentherapie üblicherweise erst nach Abschluss der Wundheilung indiziert ist, kann so die therapeutische Lücke überbrückt werden.

Besonders in der Behandlung von Glioblastomrezidiven sind Carmustin-Wafer bereits seit 1999 von der EMA (europäische Arzneimittelagentur) und FDA (Food and Drug Administration, amerikan. Lebensmittel- und Arzneimittelüberwachung) als einziges lokales Chemotherapeutikum anerkannt und zugelassen.

Sein breites Wirkspektrum bei zeitgleich geringerer Toxizität als bei vergleichbaren Substanzen dieser Wirkstoffklasse, sowie dessen Fähigkeit aufgrund des lipophilen Charakters die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, tragen wesentlich dazu bei, dass es bereits seit seiner Einführung im Jahr 1999 fester Bestandteil des Therapieregimes bei Glioblastomrezidiven der Neurochirurgischen Klinik am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg ist.

Ein signifikanter Überlebensvorteil konnte in mehreren Phase-III-Studien nachgewiesen werden (Brem et al., 1995b; Westphal et al., 2003). Brem und Mitarbeiter bestätigten an 222 untersuchten Glioblastompatienten mit Rezidiv, dass die mediane Überlebenszeit von 31 Wochen deutlich länger war als bei Patienten, die nur ein Placebo erhielten (23 Wochen). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Valtonen und Mitarbeiter 1997 (58.1 Wochen versus 39.9 Wochen).

Einleitung

Bereits 2003 untersuchten Westphal et al., den Einfluss von intrakavitär implantierten Carmustin-Wafern mit anschließender Radiatio auf die Überlebenszeit der Glioblastompatienten. Das mediane Überleben betrug dabei bereits 13.9 Monate gegenüber 11.6 Monaten in der Placebo-Gruppe (Westphal et al., 2003).

Eine vergleichbare Studie von 2006 erbrachte eine 1-Jahresüberlebensrate von 59.2 % bei Carmustin-implantierten Patienten gegenüber 49.2 % mit Placebo-Medikament (Westphal et al., 2006).

Aktuellste Studien untersuchten ebenfalls das Outcome der Patienten mit und ohne Implantation von Carmustin-Wafern (Xing et al., 2015). In dieser Meta-Analyse wurden alle Studien im Zeitraum von 1990 bis 2015, die eine interstitielle Chemotherapie für neu diagnostizierte Glioblastompatienten anwendeten, in die statistische Analyse eingeschlossen. In der Kohortenstudie konnte ein signifikanter Einfluss der Carmustin-Wafer-Therapie aufgezeigt werden ($p < 0.0001$). In randomisierten kontrollierten Studien wurde dieses Resultat jedoch nicht bestätigt ($p = 0.426$; Xing et al., 2015).

Es bedarf daher weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen, um den Effekt für neu diagnostizierte Glioblastome im Rahmen der Carmustin-Therapie zu benennen.

2.3.3.3 Multimodale Therapie mit Carmustin-Implantaten und Temozolomid

Bereits 1994 erkannte man ein synergistisches Potential beider Nitrosoharnstoffe im Maus-Modell (Plowman et al, 1994). Ebenso vielversprechend zeigten sich Forschungsergebnisse, die an menschlichen Glioblastomen von Herrlinger und Mitarbeitern 2006 erbracht werden konnten (Herrlinger et al, 2006). Eine kleine Gruppe neu diagnostizierter Glioblastompatienten wurde mit einer Kombination aus CCNU (1-(2-Chlorethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosenharnstoff, Lomustin) plus Temozolomid begleitend zur Radiotherapie behandelt. Dabei zeigte sich im Median eine Überlebenszeit von 22.6 Monaten.

Noch gravierender war jedoch der Benefit für Patienten mit methylierten MGMT-Promotorstatus. Hier konnte die 2-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 44.7 % (unmethyliert) auf 75 % (methyliert) erhöht werden.

Aufgrund der hohen systemischen Komplikationsrate wurden die Forschungen diesbezüglich allerdings nicht fortgeführt.

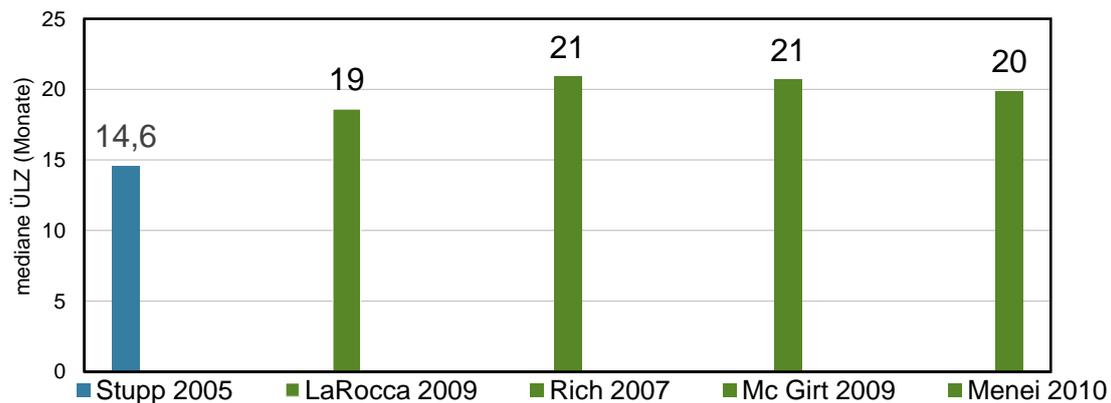


Abb. 4: ausgewählte Studien multimodaler Therapien
(blau = Temodal, grün = Carmustin + Temodal)

Im Gegensatz zu CCNU besteht der Vorteil einer multimodalen Therapie mit Carmustin-Wafern in dessen niedrigerer Nebenwirkungs- bzw. Komplikationsrate. Mögliche Nebenwirkungen, die unter Gabe von lokal appliziertem Carmustin auftreten können, sind vor allem epileptische Anfälle, intrakranielle Infektionen oder Hirnödeme (Sabel et al, 2008).

Auch ältere Patienten scheinen von einer kombinierten Carmustin-Therapie mit Bestrahlung zu profitieren. In einer retrospektiven Studie von Chaichana und Mitarbeitern 2011 wurden 45 Glioblastompatienten untersucht, deren Alter über 65 Jahren lag und die eine zusätzliche Therapie mit Carmustin-Wafern erhielten. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Überlebenszeit von median 8.7 Monaten zu 5.5 Monaten ohne Carmustin-Wafer (Chaichana et al, 2011).

Die interstitielle Chemotherapie mit simultaner Radiatio zeigte einen signifikanten Effekt für den primären Endpunkt (Zugewinn der medianen Überlebenszeit von 11.6 auf 13.9 Monate), allerdings unterschied sich das progressionsfreie Überleben beider Studiengruppen nicht voneinander (Hart et al. 2011).

In einer Phase-II-Studie von LaRocca und Mitarbeitern lag die mediane Überlebenszeit bei 18.5 Monaten für Glioblastompatienten, denen intrakavitär Carmustin-Wafer implantiert und postoperativ eine Behandlung nach Stupp-Schema appliziert wurde (LaRocca et al., 2006, 2009).

Aktuellere Studien schrieben der Kombination von Carmustin-Wafern mit anschließender konkomitanter Chemotherapie ebenfalls eine höhere Überlebenschance für Glioblastompatienten zu (Duntze et al., 2012).

2.4 Molekularzytogenetische Veränderungen des Glioblastoms (GBM)

Das Erscheinungsbild molekularzytogenetischer und zytogenetischer Veränderungen in Glioblastomen zeigte sich in zahlreichen Analysen als sehr mannigfaltig. Eine Reihe typischer Aberrationen konnte bereits nachgewiesen und ein kausaler Zusammenhang zwischen Entstehung und Verlauf primärer und sekundärer Tumorentitäten als signifikant identifiziert werden. Dabei sind im Wesentlichen Gene betroffen, die für Proliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung sowie interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind (Ohgaki und Kleihues et al, 2007; Abb. 5).

Primäre Glioblastome entwickeln sich per definitionem de novo, das heißt ohne Vorstufe aus einem anderem Tumor. Charakterisiert sind sie durch p53-Mutationen, die allerdings seltener nachweisbar sind als in sekundären GBM (> 37 %, Ichimura et al., 2000). Außerdem treten Amplifikationen von EGFR, CDK4 und MDM2 auf. Des Weiteren können Deletionen von p16 (CDKN2A, p14^{Arf}) und Verluste von Chromosom 10 als wegweisend detektiert werden.

Demgegenüber zeichnen sich sekundäre Glioblastome, deren genetischer Entstehungsweg über die Vorstufen niedriggradiger Astrozytome verläuft, vor allem durch TP53-Mutationen aus, die bereits in über 65 % der diffusen Astrozytome (WHO Grad II) zu finden sind. Ein weiterer Mechanismus ist der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 in über 50 % der WHO Grad II- Astrozytome, der das codierende Gen für p53 mit einschließt (von Deimling et al. 1992a, Collins 2004).

Einleitung

Kennzeichnend für die Progression zum anaplastischen Astrozytom sind außerdem der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 9, einschließlich p16 (CDKN2A), und der Verlust des langen Arms von Chromosom 19 (von Deimling et al. 1994 b). Den Übergang zum Glioblastom charakterisiert schließlich der Verlust von Chromosom 10, vornehmlich des langen Chromosomenarms, sowie Verlust von Chromosom 22. Auch Amplifikationen von PDGFRA kennzeichnen das sekundäre Glioblastom, wohingegen PTEN-Mutationen mit unter 10 % eher selten nachweisbar sind.

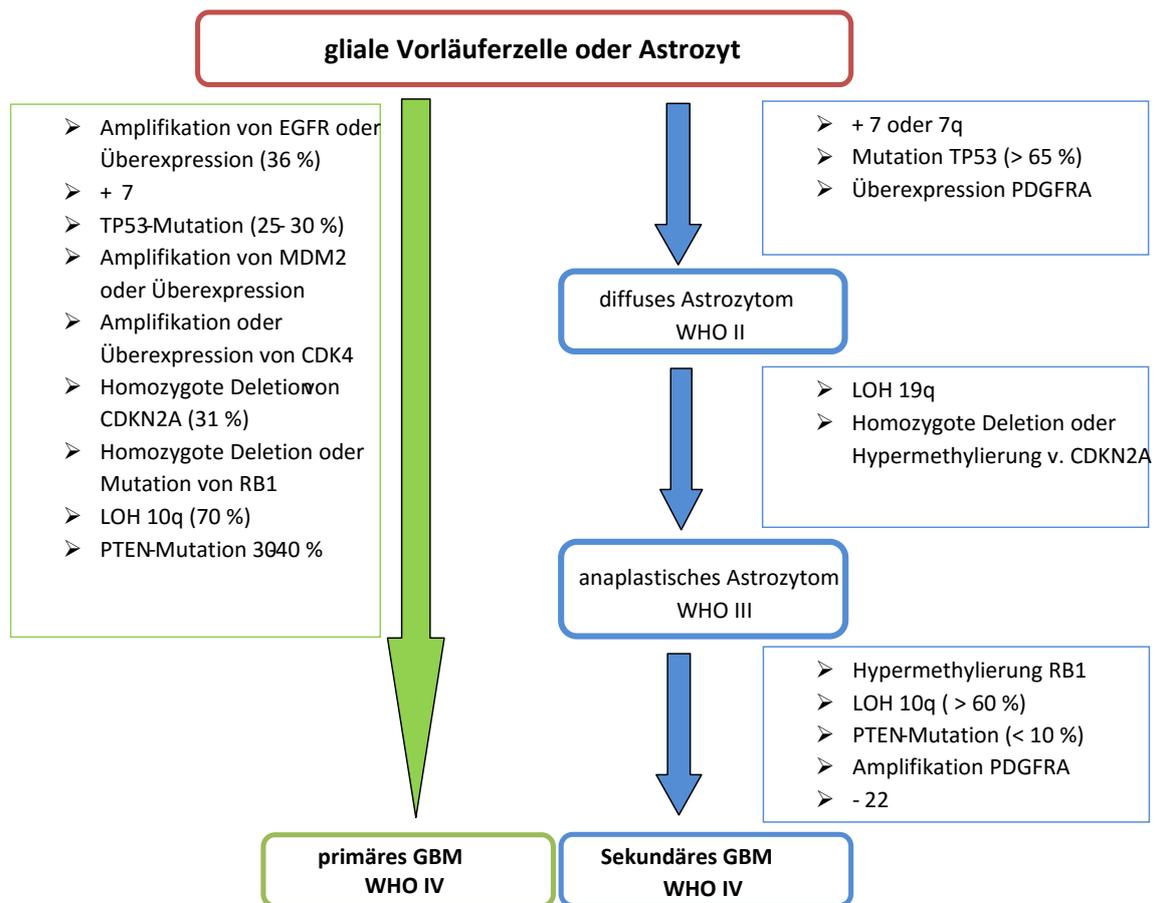


Abb. 5: Überblick über die häufigsten genetischen Veränderungen, modifiziert nach Ohgaki und Kleihues 2007, Kleihues und Cavenee, 2000

Einleitung

Ein sehr häufiges Ereignis, welches unabhängig vom Entstehungsmechanismus in beiden Glioblastomsubtypen gleich häufig auftritt, ist der Gewinn des langen Arms von Chromosom 7 (85–90 %; Ichimura et al., 2000; Schmidt et al., 1999). Ähnlich gehäuft tritt der Verlust des langen Arms von Chromosom 10 auf (50–82 %; Wiltshire et al., 2000; Koschny et al., 2002).

Vergleicht man beide Phänomene, so ist zu erkennen, dass Gewinne von Chromosom 7 bereits in niedriggradigen Astrozytomen auftreten, wohingegen Verluste von Chromosom 10 erst sehr spät nachweisbar sind (Hirose et al., 2003, Fujisawa et al., 2000).

In einem Drittel der bisher untersuchten Gliome fanden sich außerdem Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 (Thiel et al., 1992).

Auch Amplifikationen scheinen ein häufiges Ereignis in Glioblastomen zu sein. Nennenswert sind hier vor allem folgende Regionen: 7p12 (EGFR), 12q13q15 (MDM2, CDK4), 1q32 (Renin) und 4q12 (PDGFRA).

Einige genetische Veränderungen sind bereits als prognostische Marker etabliert. Zu diesen Markern zählt vor allem der Verlust des langen Arms von Chromosom 9 oder 10. Dieser korreliert mit einer verkürzten Überlebenszeit der Glioblastompatienten (Tada et al., 2001; Rasheed et al., 2002). Ähnliches gilt für die Ansprechrate bezüglich PCV-Therapie bei anaplastischen Oligodendrogliomen. Hier wirkt sich der Allelverlust der Chromosomenarme 1p und 19q positiv aus (Cui et al., 2010; Cairncross et al. 2013; Van den Bent et al. 2013).

Ein Überblick über die wichtigsten Signalwege soll in den folgenden Kapiteln gegeben werden.

2.4.1 p53-Signalweg

Das humane Tumorsuppressorprotein p53 wurde 1979 sowohl von Lane und Crawford et al. als auch Linzer und Levine et al. erstmalig beschrieben. Es fungiert als Transkriptionsfaktor und Suppressor des Zellwachstums und wird daher typischerweise als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

Einleitung

Es kontrolliert die genomische Plastizität und sorgt dafür, fehlerhafte Wachstumsprozesse zu regulieren oder die Apoptose der Zelle zu induzieren. Transformationsvorgänge, die die Entstehung maligner Zellen fördern würden, werden unter anderem dadurch gestoppt, dass die betroffenen Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren.

Zeitgleich bewirkt eine Inaktivierung des Tumorsuppressors eine genomische Instabilität (Hainaut und Hollstein, 2000) und führt zur Resistenz bzw. geringeren Sensitivität der betroffenen Zelle gegenüber Chemo- und Strahlentherapie.

Das auf der Chromosomregion 17p13 gelegene kodierende Gen TP53 zählt zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Gliomen. Mutationen treten bereits bei niedriggradigen Astrozytomen auf und spielen eine zentrale Rolle bei der Progression zu sekundären Glioblastomen (Kleihues & Cavanee, 2000).

In über 60 % der Fälle konnte eine TP53 – Mutation in anaplastischen Astrozytomen nachgewiesen werden (Collins et al., 2004).

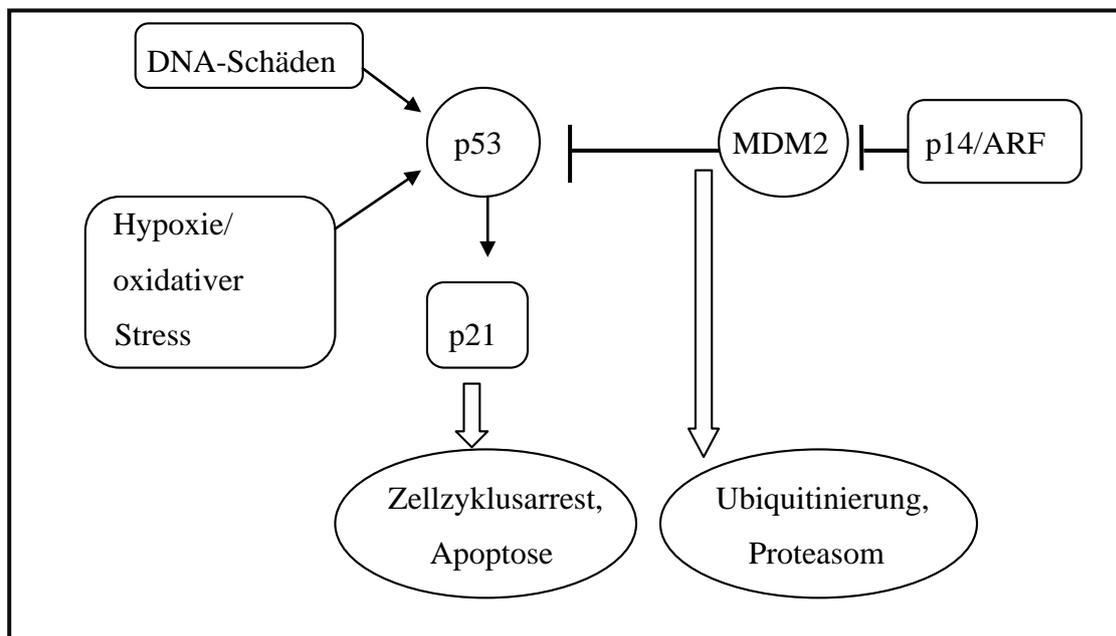


Abb. 6: vereinfachtes Schema TP53-Regelkreis
(modifiziert nach Ichimura et al., 2004)

Einleitung

Ein weiterer wichtiger Knotenpunkt im p53-Regelkreis ist das Protein MDM2 (mouse minute double 2, Chromosom 12q14.3q15). Es wird durch TP53 aktiviert und führt nach abgeschlossener DNA-Reparatur durch p53 zur Stilllegung des Proteins. MDM2 leitet dadurch dessen Inaktivierung ein. Dies geschieht einerseits durch direkten Block von p53 und andererseits über proteosomalen Abbau im Sinne einer Ubiquitinierung (Freedman et al., 2004). MDM2 besitzt folglich eine onkogene Wirkung. Eine Amplifikation konnte in etwa 10-15 % der Glioblastome nachgewiesen werden, eine Überexpression in > 50 % der Fälle (Biernat et al., 1997; Ichimura et al., 2000).

MDM2 wird wiederum durch p14^{arf} kontrolliert, dessen homozygoter Verlust durch Deletion der CDKN2A-Region (p16, 9p21.3) ein wichtiges Ereignis in Glioblastomen darstellt. Ist dieser Inhibitor amplifiziert oder überexprimiert, fehlt ein wichtiger Regulationsschritt im Abbau von MDM2, was folglich zu einem Überangebot dieses Proteins führt. Dies wiederum leitet einen überdurchschnittlich hohen Abbau von p53 ein und begünstigt somit maligne Zelltransformationen.

Ein weiterer entscheidender Bestandteil der p53-Signalkaskade ist der CDK-Inhibitor 1 (p21). Dieser befindet sich auf Chromosomenloкус 6p21.2. Er reguliert im Zusammenspiel mit allen anderen genannten Faktoren den Zellzyklus, in dem er durch Komplexbildung mit anderen Cyklinen die RB1-Phosphorylierung verhindert und somit den Übergang von G₁- in S-Phase blockt. Eine Überexpression von p21 führt folglich zum Wachstumsarrest der Zelle.

2.4.2. RB1-Signalkaskade

Veränderungen im Retinoblastom-Gen (RB-Gen, Genloкус: 13q14.1-q14.2) sind mit 25-35 % ebenfalls häufige Ereignisse in Glioblastomen (Nakamura et al., 2001; Ichimura et al., 2000). Auch dieses Tumorsuppressorgen greift in den Zellzyklus ein, in dem es den Übergang von G₁- in S-Phase überwacht. Dadurch wird vor allem die Replikation von DNA-Schäden verhindert.

Das RB-Gen bindet und inhibiert diverse Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der E2F-Proteine gehören. Dadurch fungiert es als Wachstumssupressor und induziert den Zellzyklusarrest. Die Aktivierung des Retinoblastom-Gens erfolgt durch Dephosphorylierung.

Einleitung

Eine Inaktivierung wird wiederum durch Phosphorylierung erzielt, die durch Cyclinabhängige Kinasen (Cyclin D/CDK4,6) initiiert wird. Ist dieser Schritt erfolgt, kann E2F freigesetzt werden und weitere Transkriptionsfaktoren aktivieren, die den Zellzyklus antreiben (Wu et al., 1995; Korenjak et al., 2005; Hashimoto et al., 2005).

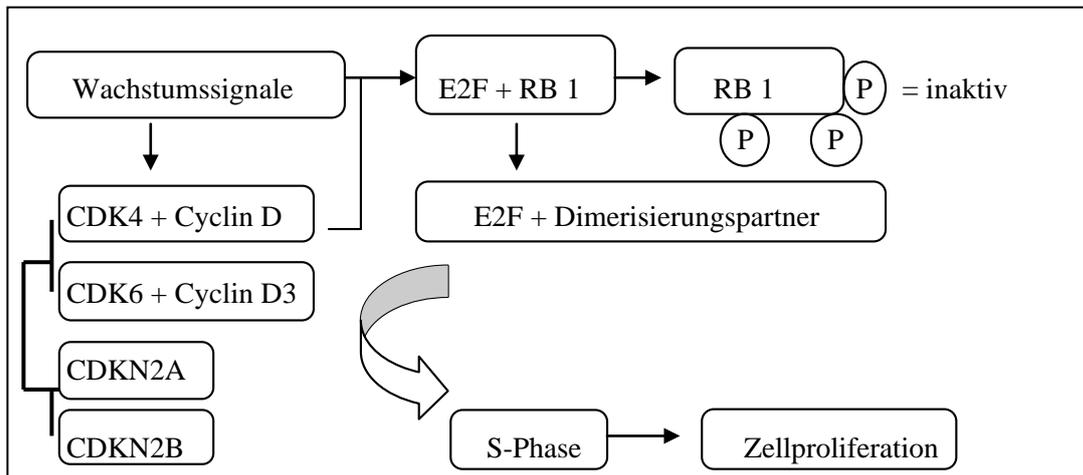


Abb. 7: RB 1- Signalkaskade

CDK4 (Chromosom 12q13q14) und CDK6 (7q21q22) bilden Komplexe mit Faktoren der Cyclin D-Familie. Diese wiederum werden durch p15 (CDKN2B) und p16 (CDKN2A) reguliert bzw. gehemmt. Dadurch ist die Fähigkeit zur Phosphorylierung des RB1-Gens ausgeschaltet, was dessen Aktivierung bedeutet.

Homozygote Deletionen oder Mutationen des RB1-Gens (35 % der Glioblastome, Henson et al., 1994), Amplifikationen von CDK4 und 6 (11 – 15 % der GBM, Ichimura et al., 2000), sowie homozygote Deletionen oder Hypermethylierungen von CDKN2A (40% in GBM, Ichimura et al., 2000) und CDKN2B (37 % in GBM, Ichimura et al., 2000) führen schließlich zum Verlust der Zellzykluskontrolle und zu einer erhöhten Teilungsaktivität glialer Vorläuferzellen.

2.4.3 EGFR- und PTEN-Signalkaskade

Der EGF-Rezeptor (epidermal-growth-factor-receptor) gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase. Als Transmembranrezeptor übernimmt er wichtige Aufgaben im Rahmen der Signaltransduktion, die für die Stimulation des Zellwachstums und die Inhibierung apoptotischer Vorgänge zuständig sind.

Einleitung

Liegt EGFR überexprimiert oder mutiert vor, führt dies letztlich zum unkontrollierten Tumorwachstum. Des Weiteren konnte eine geringere Sensitivität gegenüber Chemo- und Strahlentherapie nachgewiesen werden.

Amplifikationen auf Genlokus 7p12.1 (EGFR) treten mit ca. 36–40 % in Glioblastomen vergleichsweise häufig auf (Ohgaki & Kleihues, 2007; Hatanpaa et al., 2010).

Auch die Phosphatase PTEN (**P**hosphatase and **T**ensin homolog, Genlokus 10q23.3) hat großen Einfluss auf signaltransduktorische Prozesse. Sie ist Bestandteil des PI3K-AKT/PKB-Signalweges. Normalerweise wird die Aktivität von PTEN durch TGF- β (Wachstumsfaktor aus der Gruppe der Zytokine) inhibiert, um apoptotische Prozesse zu verhindern. Ununterdrückt fungiert PTEN als Tumorsuppressor.

Mutationen im PTEN-Gen sind in primären Glioblastomen mit 30-40 % häufige Ereignisse. In sekundären Glioblastomen scheinen sie dagegen eine untergeordnetere Rolle zu spielen. Hier können Veränderungen in weniger als 10 % der Fälle detektiert werden.

Es wird vermutet, dass eine Daueraktivierung des PI3K-AKT/PKB-Signalweges zum erhöhten Zellwachstum führt und somit eine Tumorentstehung begünstigt (Cantley & Neel, 1999). Außerdem zeigte sich, dass Mutationen im PTEN-Gen mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergehen (Xu et al., 2014).

2.4.4 PDGFR α

Der PDGFR α -Rezeptor (**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor **a**lpha) gehört ebenfalls zur Gruppe der Tyrosinkinase. Lokalisiert ist dieser auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Chromosom 4q12). PDGF spielt eine essentielle Rolle in der tumorassoziierten Angiogenese. Seine parakrine Wirkung auf benachbarte Endothelzellen führt wiederum zur Stimulation des Zellwachstums durch autokrine Signalisierung. Der genaue Mechanismus im Zusammenspiel von Vaskulogenese und Tumorangiogenese ist allerdings nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Auffällig ist jedoch, dass eine Überexpression von PDGF in zahlreichen Tumoren des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden konnte (Shih et al., 2006).

Zudem sind Amplifikationen dieses Proteins ein häufiges Ereignis in Glioblastomen, das mit einer raschen Tumorprogression korreliert (Varela et al., 2004). Besonders in sekundären Glioblastomen konnte ein zeitgleicher Verlust des p53-Tumorsuppressorgens aufgezeigt werden. Durch dieses Ereignis fördert die Gliomzelle ihre eigene Proliferation, sowie diese benachbarter Tumorzellen.

Studien, deren Schwerpunkt in der Etablierung antioangiogenetischer Therapiekonzepte lag, zeigten bisher nur ungenügende Erfolge. Versuche mit Imatinib, einem monoklonalen Antikörper, konnten in-vitro und niedrig-dosiert zwar zytostatische Effekte erzielen, allerdings ging eine höhere Dosierung mit einer deutlichen Zytotoxizität und weitreichenden Nebenwirkungen einher (Dong et al., 2011).

2.5 Epigenetische Veränderungen in Glioblastomen

Anfang des 21. Jahrhunderts etablierte sich der Forschungszweig der Epigenetik als wichtiger Schwerpunkt diagnostischer und therapeutischer Konzepte im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen. Geprägt wurde der Begriff "Epigenetik" allerdings bereits in den späten 30er Jahren durch Conrad Waddington. Die Epigenetik umschreibt Mechanismen und Konsequenzen vererbbarer Chromosomenmodifikationen, die nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz hervorgerufen wurden (Berger, Kouzarides et al. 2009). Im Wesentlichen umfasst sie Chromatinveränderungen (Histonmodifikationen), genetisches Imprinting und die nachträgliche Modifikation bestimmter DNA-Basen (DNA-Methylierungen).

Die am besten untersuchte epigenetische Veränderung ist die Methylierung von Cytidin-Basen der DNA (Jeltsch et al., 2002). Dabei sind jedoch nur jene Cytidine methylierungsfähig, die sich innerhalb von Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden befinden. Man nennt diese Bereiche auch CpG-Inseln (Cytosin phosphat Guanin-Insel). Diese treten gehäuft in Abschnitten auf, die für die Steuerung von Genen zuständig sind, sogenannte Promotoren. In über 60 % aller bekannten Gene finden sich CpG-Inseln in diesen Regionen (Bird et al., 2002).

Die Bindung von Methylgruppen (-CH₃) an die Cytidin-Basen wird durch 3 DNA-Methyltransferasen katalysiert: DNMT 1, 2 und 3.

Einleitung

Hierbei handelt es sich um kovalente Modifikationen, bei denen es zu einer Übertragung von S-Adenosylmethionin an das Kohlenstoffatom 5 des Cytosinrings kommt. Methylierte Cytidine (5'-Methylcytidin) werden durch Desaminasen in den DNA-Baustein Thymin umgewandelt. Die körpereigenen DNA-Reparaturenzyme erkennen dieses nicht als fehlerhaftes Element, was bei Modifikationen in Keimzellen schließlich zur Weitervererbung führt.

Unmethylierte, desaminierte Cytidine werden hingegen in Uracil umgewandelt, was einem fehlerhaften Einbau in die DNA-Sequenz entspricht, so dass hier das DNA-Reparatursystem greift und diesen Baustein eliminiert.

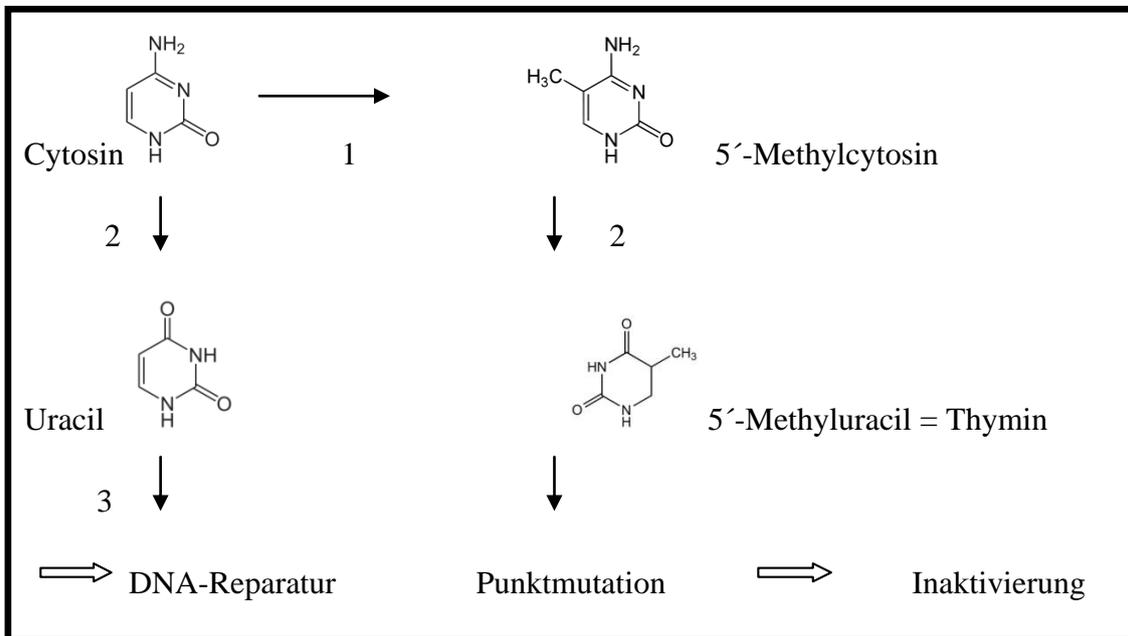


Abb. 8.: vereinfachtes Schema der DNA-Methylierung, 1 - DNA-Methyltransferase, 2 - Cytidin-Desaminase, 3 - Glykosidase, modifiziert nach Jeltsch et al., 2006

Die Konsequenz ist schließlich eine Inaktivierung des methylierten DNA-Abschnitts, was letztlich zur Stilllegung und damit zum Expressionsverlust des betroffenen Gens führt. Eine Hypermethylierung der Promotorregion verhindert folglich eine Aktivität des zu transkribierenden Gens (Seisenberger et al., 2013).

In Glioblastomen konnten mehrere Gene identifiziert werden, die eine Hypermethylierung der Promotorregion aufweisen.

Einleitung

Dazu zählen einerseits Gene, die Mechanismen der Zellzykluskontrolle regulieren, wie CDKN2A (p16), CDKN2B (p15), p14^{arf}, RB1 und TP53 und andererseits DNA-Reparaturgene, wie MGMT. Besonders die Identifizierung der Promotor-Hypermethylierung des auf dem langen Arm von Chromosom 10 lokalisierten MGMT erbrachte eine weitreichende Konsequenz für Ansprechraten- und -verhalten von Chemotherapeutika, insbesondere Nitrosoharnstoffe und Temozolomid (Hegi et al., 2005).

2.6 Eigene Fragestellung

Eine individuelle Therapie für Patienten mit Glioblastomen gestaltet sich durch eine ausgesprochene inter- und intratumorale Heterogenität nach wie vor schwierig.

Die Etablierung und Integration spezifischer genetischer Veränderungen in Diagnostik und Therapiekonzepte konnte bereits für die Promotorregion MGMT etabliert werden. Eine Hypermethylierung dieses Genabschnitts korreliert mit einer höheren Ansprechrate auf Chemotherapeutika, insbesondere jene aus der Gruppe der Alkylantien. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf Temozolomid, sowie dem Nitrosoharnstoff Carmustin.

Patienten, die eine kombinierte Radio-Chemotherapie erhielten, lebten mit methylierten MGMT-Promotor signifikant länger (Hegi et al., 2005). Auch Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 korrelieren mit einem besseren Therapieansprechen und damit einer höheren Überlebensrate. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf p15 gelegt werden. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Hypermethylierungen dieser DNA-Region mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen (Wemmert et al., 2009, Feng et al., 2012).

Ziel dieser Arbeit ist die molekularzytogenetische und epigenetische Untersuchung bekannter genetischer Veränderungen unter dem Gesichtspunkt des Ansprechverhaltens im Rahmen der Carmustin-Therapie. Hauptaugenmerk ist dabei der direkte Vergleich mit dem Stupp-Therapie regime im Sinne einer Matched-Pairs-Konstellation, wobei Vor- und Nachteile beider Therapiekonzepte herausgearbeitet und gegebenenfalls neue prognostische Marker für die Behandlung mit Carmustin-Wafern identifiziert werden sollen. Die Korrelation genetischer Veränderungen mit dem Ansprechverhalten auf Carmustin und dem Gesamtüberleben der Glioblastompatienten steht dabei im Mittelpunkt.

3. Material und Methoden

3.1 Patientendaten

Untersucht wurde ein Kollektiv von 72 Patienten mit der histologisch gesicherten Diagnose eines Astrozytoms (WHO Grad IV) bzw. Glioblastoms. Um eine bestmögliche statistische Vergleichbarkeit bezüglich Therapieform und Ansprechrate zu erhalten, wurde eine Matched-Pairs-Analyse durchgeführt:

- Die **Carmustin-Gruppe** (Gliadel®) erhielt nach Entfernung des Glioblastoms und Einlage von je 8 Carmustin-Wafern in die Resektionshöhle eine konkomitante Radiochemotherapie mit 60 Gy GRD und Temozolomid 75 mg/m²/KOF per os täglich an 7 Tagen die Woche über 42 Tage. Anschließend wurde die Dosis auf 150–200 mg/m²/KOF per os Tag 1–5 alle 28 Tage für 6 Zyklen über 6-8 Zyklen erhöht (EORTC 26981/22981, Stupp-Protokoll, Abb. 9).
- Die **Kontroll-Gruppe** umfasste Patienten (n = 36), die nach Resektion des Tumors entsprechend des oben beschriebenen Stupp-Protokolls ohne zusätzliche lokale Chemotherapie behandelt wurden.

Zur Beurteilung des postoperativen Resektionsausmaßes erfolgte in beiden Gruppen eine Magnetresonanztomographie (NMR = nuclear magnetic resonance = kernmagnetische Resonanz).

Gliadel-Gruppe



Konkomitante-Gruppe

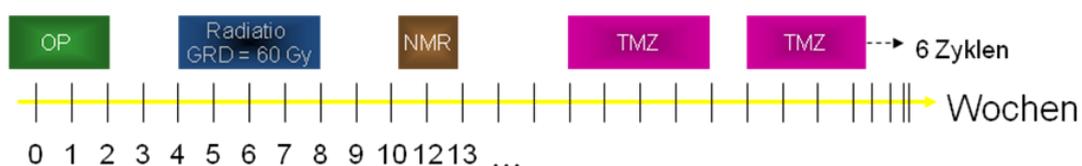


Abb. 9: Gegenüberstellung der Therapieregime

Material und Methoden

Weiterhin wurden folgende Einschlusskriterien berücksichtigt, die für die Gegenüberstellung der Matched-Pairs entscheidend waren. Übereinstimmung in:

- Karnofsky-Index
- Alter
- Resektionsausmaß

Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach Resektion und Patienteneinwilligung in der Neurochirurgischen Klinik, Homburg/Saar, konserviert und bei -80° C gelagert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung des Materials, wie im Folgenden beschrieben.

3.2 Herstellung von Chromosomenpräparaten

Für die Durchführung der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) wurden zunächst Metaphasepräparate angefertigt, die wiederum durch Lymphozytenkurzeitkulturen gewonnen werden konnten.

Hierbei wurden 0,8 ml Vollblut eines männlichen, gesunden Probanden unter möglichst sterilen Bedingungen in ein Heparinröhrchen entnommen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 8 ml Medium (PB Max supplementiert mit Phytohämagglutinin + 10 % FCS + L-Glutamin + 1 % Penicillin/Streptomycin). Nach Durchmischung des Ansatzes wurde dieser für 72 h bei 37° C und CO₂-Begasung inkubiert.

Um die Chromosomen in der Mitose zu verwahren, wurde nach 70 h 40 µl Colcemid zugegeben, welches als Spindelgift den Arrest der Karyogenese bewirkt. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass möglichst viele Metaphasen im Ansatz bestehen bleiben.

Nach weiterer 1,5 stündiger Inkubation bei 37° C erfolgte das Überführen des Medium-Blut-Gemisches in ein Zentrifugenröhrchen und die anschließende Zentrifugation bei 1000 U/min. für 10 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet in 0,52 %-iger 37° C warmer KCl-Lösung resuspendiert. Da dieser Behandlungsschritt abhängig von Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit ist, variierte die Reaktionszeit zwischen 4 - 10 min.

Material und Methoden

Daraufhin erfolgte die erneute Zentrifugation für 10 min. bei 1000 U/min., bei der, wie zuvor, der Überstand entfernt wurde.

Zur Fixierung der Suspension wurde eiskaltes Fixativ (Methanol:Eisessig = 3:1, gelagert bei -20° C) schrittweise zugegeben, erneut vorsichtig resuspendiert und für 1 h bei -20° C gelagert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min. bei 1000 U/ min zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in etwas Fixans resuspendiert. Dieser Schritt wurde mindestens dreimal wiederholt bis sich der Überstand völlig klar zeigte.

Zum Abschluss wurde die Zellsuspension auf ethanolgereinigte, fettfreie Objektträger getropft, langsam getrocknet und schließlich die Morphologie der Chromosomen unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Für die vergleichende genomische Hybridisierung ist es entscheidend, dass die Mitosen gut gespreitet sind und möglichst wenige Zellfragmente das Untersuchungsfeld beeinträchtigen.

Die Lagerung der Objektträger erfolgte in einem dafür vorgesehenen Behälter bei Raumtemperatur.

3.3 DNA-Isolation

3.3.1 Isolation aus Tumorgewebe

Die Tumorgewebeproben wurden in sterile Petrischalen überführt und mit Hilfe von Schere und Pinzette mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde jede Probe in ein 50 ml Falcon separiert. Die Zugabe von 4,5 ml SE-Puffer, 0,5 ml 10 % SDS (pH 8) und einer Spatelspitze Proteinase K leitete den Verdau des Gemisches ein. Die zugegebenen Lösungen bewirkten die Destruktion der Zellmembranen, sowie die Denaturierung vorhandener Proteine. Abhängig vom Reaktionsprozess variierte die Inkubationsdauer der Gewebeproben bei 55° C im Schüttelbad zwischen 1-3 Tagen. Nach vollständigem Aufklaren des Probengemisches und Fehlen sichtbarer Gewebereste folgte schließlich die vollständige Extraktion der DNA.

Dazu wurde die Fällung der Gewebeproben durch Zugabe von 2 ml 6 M NaCl eingeleitet und die Auftrennung in eine organische und eine wässrige Phase durch Hinzufügen von 7 ml Chloroform bewirkt, wobei typischerweise Proteinaggregate in der Interphase verblieben.

Material und Methoden

Nachdem das Gemisch 1 h über Kopf geschüttelt und schließlich für 30 min. bei 4° C und 2000 rpm zentrifugiert wurde, ließen sich die hydrophilen Bestandteile im Überstand abnehmen und in ein separates Falcon überführen. Die gesammelte organische Phase wurde verworfen. Erneut wurden nun 7 ml Chloroform zugegeben, 30 min. über Kopf geschüttelt und schließlich für 30 min. bei 4° C und 2000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde die wässrige Phase mitgenommen und nochmals 15 min. bei 4° C und 2000 rpm bearbeitet.

Im entscheidenden Schritt erfolgte nun die Zugabe von Isopropanol im gleichen Volumen wie das noch im Falcon befindliche DNA-Gemisch. Die erfolgreiche Fällung der DNA zeigte sich in einer Aggregatbildung der Nukleinsäuren, welche nun als Knäuel vorlagen und in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml 70 % -20° C EtOH überführt werden konnten, um darin für mindestens 30 min. bei 4° C gewaschen zu werden.

Abschließend wurde die DNA auf der Heizplatte bei 37° C für maximal 30 min. getrocknet und über Nacht in 300-500 µl Aqua destillata gelöst. Am nächsten Tag konnte die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgen.

In einigen wenigen Proben konnte allerdings durch Zugabe von Isopropanol keine knäuelartige DNA - Struktur erzielt werden.

In diesem Fall verblieb das DNA-Isopropanol-Gemisch im Falcon und wurde für 20 min. bei Raumtemperatur und 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 400 µl TE-Puffer (pH 7) hinzugegeben. Nach Inkubation für 20 min. im 65° C warmen Schüttelbad wurde das Gemisch in ein Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 40 µl 3M Natriumacetat, sowie 800 µl EtOH reinst (-20° C) über Nacht gewaschen. Am nächsten Tag konnte das Knäuel in ein neues Eppendorfgefäß mit 1 ml 70 % EtOH (-20° C) überführt, für 1 h bei 4° C gewaschen und nochmals für 25 min bei 4° C und 14.000 rpm zentrifugiert werden. Nach Trocknung auf der Heizplatte (37° C) und Anpassung des Aqua dest.-Volumens an die DNA Menge, wurden die extrahierten Nukleinsäuren nochmals über Nacht bei 4° C gereinigt, um anschließend photometrisch bestimmt zu werden.

3.3.1.1 Isolation mit QiAmp DNA Mini-Kit

In zwei Fällen reichte das vorliegende Gewebe nicht aus, um die konventionelle Methode anzuwenden. Daher wurden die Tumorproben mit dem QiAmp-DNA-Mini-Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die gewonnene Menge genügte dennoch, um verwertbare CGH-Ergebnisse zu gewinnen.

3.3.2 Isolation der Referenz-DNA aus Spenderblut

Als Kontrollprobe für die CGH wurde einem gesunden Spender 10 ml EDTA-Blut entnommen und mit 3 Volumen Erythrozyten-Lysispuffer versetzt. Anschließend wurde das hypotone Gemisch für 20 min. auf Eis inkubiert. Dieser osmotischer Vorgang löste die Zerstörung der Erythrozyten aus, so dass nach Ablauf der Zeit eine dunkle, aber klare Lösung sichtbar wurde. Schließlich wurde das Gemisch für 10 min. bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Lymphozytenpellet in 4,5 ml SE-Puffer sowie 0,5 ml 10 % SDS resuspendiert, eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben und über Nacht im Schüttelbad bei 55° C verdaut.

Die Aufarbeitung und Reinigung der DNA erfolgt simultan zur Isolation aus Gewebe.

3.4 photometrische Bestimmung der extrahierten DNA

Die Messung der isolierten DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 Version 3.7.1 Spektralphotometers durchgeführt, dessen Besonderheit vor allem darin liegt, Volumina im Bereich von nur 1 µl einsetzen zu können und dennoch genaue Ergebnisse zu erhalten. Hierbei wird die Absorption in einem Spektrum von 260 nm und 280 nm gemessen und gegen eine Negativkontrolle, in diesem Fall reinen Wassers, aufgetragen.

Aus diesen Werten ließ sich dann die Konzentration der eingesetzten Probe bestimmen. Mit Hilfe der NanoDrop Software wurden die Ergebnisse erfasst und übernommen.

3.5 Markierung der Proben

Für die Durchführung und Auswertung der CGH ist die Markierung der Tumor- und Referenz-DNA eines gesunden männlichen Spenders mit einem Fluoreszenzfarbstoff notwendig. Hierzu wurde der Biotin-Nick-Translations-Mix für die Tumor-DNA und der DIG-Nick-Translations-Mix für die Spender-DNA verwendet.

Ziel dieser Methode ist es durch Einsatz von DNase I in unmittelbarer Umgebung von Mg^{2+} an statistisch verteilten Stellen des DNA-Substrates Einzelstrangbrüche, sogenannte „nicks“, hervorzurufen. Die DNA-Polymerase I, welche aus einem E.coli Stamm extrahiert wurde, bedient sich nun dieser freien 3'-OH-Bruchstellen und nutzt sie als Primer für die 5'-3'-DNA-Synthese. Dabei entfernt die Exonuklease-Aktivität des Enzyms zeitgleich die abgebauten Nukleotide in Syntheserichtung und ersetzt sie schließlich durch die fluorchrommarkierten Nukleotide Biotin-16-dUTP bzw. DIG-11-dUTP.

Für die Biotin-Nick-Translation wurden 1500 ng Tumor-DNA und für die DIG-Nick-Translation 1000 ng Referenz-DNA eingesetzt. Hierfür wurde die benötigte Konzentration aus der zuvor photometrisch bestimmten Probe errechnet. Die eingesetzte Menge wurde nun in einem Endvolumen von 16 μ l gelöst und 4 μ l des jeweiligen Nick-Translations-Mixes hinzu pipettiert, so dass ein Gesamtvolumen von 20 μ l vorlag. Anschließend wurde die Probe kurz zentrifugiert und bei 15° C für 90 min. im Thermomixer inkubiert. Die Zugabe von 1 μ l 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8) führte zum Abstoppen der Reaktion. Schließlich wurden die DNA-Proben erneut für 10 min. bei 65° C inkubiert, daraufhin mit 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l 100% eiskaltem Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation bei 14.000 rpm 4° C für 25 min. Der Überstand wurde vorsichtig auf ein Papiertuch abgekippt und zum Pellet 200 μ l eiskalter 70 % Ethanol zugegeben. Nach wiederholtem Zentrifugieren für 15 min. wurden die Proben auf der Heizplatte bei 37° C für maximal 30 min. getrocknet und schließlich mit 10 μ l Aqua dest. über Nacht gelöst. Hierbei entspricht 1 μ l Lösungsvolumen einer DNA Konzentration von 100 μ g bzw. 150 μ g. Die Lagerung bis zur Hybridisierung erfolgte bei -20° C.

3.6 Dot Blot

Mit dieser Methode lässt sich die Effektivität der Nick-Translation nachweisen. Dazu wurden die markierten DNA-Fragmente in einer Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10.000 in je 6 x SSC auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Um die Interaktion zwischen Probe und Membran zu verstärken, wird diese in einer Petrischale für 30 min. bei 90° C gebacken. Das anschließend aufgetragene Blocking Reagenz (1 % Magermilchpulver in 6 x SSC) verhindert die Ausbildung unspezifischer Bindungen. Nach zweimaligem Waschen mit TN-Puffer erfolgte eine 20 minütige Inkubation mit substratspezifischen Enzymen, 3 µl Streptavidin-Alkalische-Phosphatase für den Biotin- und 3 µl Anti-Digoxigenin-Phosphatase für den Digoxin-Nachweis, welche an die zuvor entsprechend markierten Nukleotide banden und im Konjugat mit 3 ml TN-Puffer hinzugegeben wurden. Wiederholt wurden die Proben zweimalig mit TN-Puffer gewaschen und nachfolgend für 10 min. in Dot-Puffer inkubiert. Um eine optimale Interaktion zwischen Probenmembran und Lösung gewährleisten zu können, wurde die Petrischale auf einem Schüttler positioniert. Das typische blau-violette Präzipitat bildete sich nach Zugabe des chromogenen Substrates BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) heraus, welches eine Reaktion mit dem Farbverstärker NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) auslöste und zu dessen Reduktion führte. Hierfür wurden 33 µl NBT und 25 µl BCIP in 5,7 ml Dot-Puffer angesetzt und gut vermischt.

Die 30 minütige Inkubation der Membran erfolgt im abgedunkelten Gefäß und wurde abschließend mit 70 % vergälltem Ethanol abgestoppt und getrocknet. Für ein optimales CGH-Ergebnis sollten Dots bis zu 1 pg nachweisbar sein (Beispiel Abb. 10).

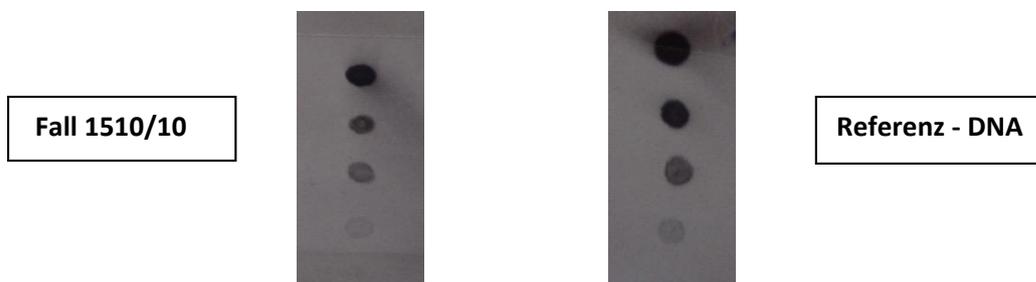


Abb. 10: Beispiele durchgeführter Dot-Blots

3.7 vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization) ist eine Methode, die 1992 von Kallioniemi und Mitarbeitern entwickelt wurde. Die Zugabe von markierter Tumor- und Referenz-DNA im Verhältnis 1:1 auf die zuvor präparierten Metaphasechromosomen des Lymphozytenspenders bewirkt die Konkurrenz der genomischen DNA an ihre homologen Sequenzen der Spenderchromosomen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass nach der Hybridisierung die Intensität der Fluoreszenzsignale an spezifischen Loci der Chromosomen mit der Stärke der eingesetzten an diesen Positionen kompetitiv bindenden Proben korreliert. Amplifizierte Sequenzen der Tumor-DNA führen letztlich zur alleinigen Hybridisierung dieser, wobei die Normal-DNA weniger bis gar nicht bindet. Im umgekehrten Fall führen fehlende Bereiche der Tumor-DNA (Deletionen) zur quantitativ höheren Bindungswahrscheinlichkeit der Kontroll-DNA.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale werden schließlich von einem sensitiven Kamerasystem erfasst, um danach ausgewertet zu werden. Dabei wurden in der Regel etwa 20-25 Metaphasen pro Fall erfasst.

3.7.1 Vorbereitung der DNA

24 h vor Beginn der Hybridisierung wurden die zuvor in der Nick-Translation markierten DNA-Proben in ein Eppendorfgefäß pipettiert, wobei je 9 µl Tumor- und 9 µl Normal-DNA eingesetzt wurden.

Die Zugabe von 60 µl humaner Cot-1-DNA dient der Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen repetitiver Sequenzen und verhindert somit das Auftreten überschießender Fluoreszenzsignale, vor allem in Zentromernähe. Dem Probengemisch werden 1/10 3 M Natriumacetat (pH 5,5) sowie das 2,5 fache 100 % Ethanol hinzugefügt, um anschließend über Nacht bei -20° C gefällt zu werden.

Anschließend wird das DNA-Gemisch für 30 min. bei 4° C und 14.000 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen und 200 µl 70 % Ethanol (-20° C) hinzupipettiert.

Material und Methoden

Nach erneuter Zentrifugation für weitere 10 min. und dem Entfernen des Überstandes, werden die Proben für maximal 30 min. auf der Heizplatte bei 37° C getrocknet.

Die weitere Behandlung erfolgte im Thermocycler, der die Proben nach Zugabe von 3,5 µl deionisiertem Formamid für 40 min. bei 20° C und 1400 rpm durchmischte. Formamid ist ein Doppelstrang-destabilisierendes Agens, welches zudem die Schmelztemperatur des DNA-Hybrids verringert. Dadurch ist es möglich mit niedrigeren Temperaturen zu arbeiten, was außerdem das Risiko von DNA-Verlusten senkt. Der vorherige Schritt im Thermocycler wurde nochmals wiederholt, wobei nun 3,5 µl 4xSSC / 20% Dextransulfat hinzugefügt wurden. Dextransulfat fungiert als Beschleuniger der Hybridisierungsrate, in dem es umliegendes Wasser bindet ohne dabei Makromoleküle aufzunehmen. Folglich wird die DNA konzentriert. Anschließend wurden die Proben bei 75° C im Wasserbad genau 7 min. gelagert. Dies führte zur Denaturierung der DNA, welche sich in einzelsträngige Bereiche aufgliederte und somit homologe Sequenzen für die Bindung der Trägermetaphasechromosomen freigab. Schließlich wird das DNA-Gemisch bei 37° C im Wasserbad zwischen 15-30 min. zwischengelagert. Die Behandlungszeit ist abhängig von den Bearbeitungsschritten der Objektträger, welche parallel durchgeführt und zeitgleich beendet wurden.

3.7.2 Vorbereitung der Chromosomenpräparate

Die Vorbehandlung der Metaphasechromosomen ist notwendig, um optimale Hybridisierungsergebnisse zu erreichen.

Zunächst wird der Objektträger einem RNase-Verdau ausgesetzt, nachdem er kurz in 2 x SSC gewaschen wurde.

Hierfür wird 1 µl RNase-Stammlösung (10 mg/ 1ml 2 x SSC) in 100 µl 2 x SSC angesetzt, auf ein Deckglas pipettiert, der Objektträger darüber gelegt und dieses für 15 min. bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Pro Träger werden 100 µl Lösung verwendet. Ziel dieses Prozesses ist es, unspezifische Hybridisierungen an RNA-Sequenzen zu verhindern. Anschließend wird das Deckglas durch vorsichtiges Abschlagen entfernt, die Chromosomenträger auf dem Schüttler je 3x5 min. gewaschen und schließlich dem Pepsinverdau ausgesetzt.

Material und Methoden

In diesem entscheidenden Schritt wird der Objektträger für exakt 1:45 min in eine 37° C warme Küvette mit einem Pepsin–HCl-Gemisch gestellt (100 ml 0,01 M HCl 37° C + 200 µl Pepsin - Stammlösung = 5 % Aqua dest.). Da das Enzym sein Wirkoptimum in diesem Gradbereich entfaltet, sollte es erst kurz vor Behandlungsbeginn hinzugefügt werden.

Dabei entfernt es überschüssige Proteine, sowie Gewebereste und macht die Chromosomen dadurch zugänglicher für die Hybridisierung.

Nach Behandlung des Objektträgers in einer Küvette mit PBS für 5 min. bei Raumtemperatur erfolgt die Postfixierung für exakt 10 min. in einer separaten eiskalten Küvette mit 4 % PFA/PBS bei ca. 4° C. Anschließend wird der Träger für 5 min. in PBS bei Raumtemperatur gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % - 80 % - 96 %) dehydriert und für mindestens 30 min staubgeschützt luftgetrocknet.

3.7.3 Denaturierung der Objektträger

Um die Bindungsfähigkeit der bereits einzelsträngig vorliegenden Proben zu erhöhen, werden im Schritt der Hitzedenaturierung auch die Metaphasechromosomen aus ihrer Doppelstrangbindung gelöst und somit homologe Sequenzen freigegeben. Hierfür werden 100 µl Prähyb-Mix (70 µl deionisiertes Formamid + 10 µl 20xSSC + 20 µl Aqua dest.) auf ein Deckglas pipettiert und dieses mit dem Objektträger aufgenommen. Anschließend erfolgt die Denaturierung bei 72° C auf der Heizplatte für exakt 90 sek. Nachdem das Deckglas abgeschlagen wurde, erfolgt die Dehydrierung in aufsteigender eiskalter Alkoholreihe (70 % - 80 % - 96 %, -20° C) und die abschließende staubgeschützte Trocknung der Träger für mindestens 30 min.

3.7.4 Hybridisierung

Durch die Vorbehandlung der DNA-Proben und der Objektträger liegen diese nun als komplementäre Einzelstränge vor. Im nachfolgenden Hybridisierungsschritt bindet nun die genomische DNA an homologe Bereiche der chromosomalen DNA.

Material und Methoden

Dabei konkurrieren die Sequenzen der genomischen DNA, welche im Überschuss vorhanden sind, um freie Sequenzen der chromosomalen DNA.

Der DNA-Formamid-Hyb-Mix wird auf die Träger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt, sowie Fixogum verschlossen und für 3 Tage bei 37° C in einer feuchten Kammer gelagert.

3.7.5 Stringenzwaschung

Während des Hybridisierungsvorgangs muss in Kauf genommen werden, dass nicht nur homologe Sequenzen gepaart werden, sondern auch jene, die nicht vollkommen übereinstimmend sind, so genannte mismatch-Paarungen. Für die spätere Detektion ist es hingegen entscheidend, dass nur jene Sequenzen der Proben-DNA nachgewiesen werden, die auch entsprechend homolog an Bereiche der Ziel-DNA gebunden haben.

Ziel der Stringenzwaschung ist es daher, jene Fehlpaarungen zu entfernen, so dass letztlich nur stabile Homologien verbleiben.

Vorsichtig wurde daher das Fixogum gelöst und das Deckglas vom Objektträger entfernt. Anschließend erfolgten die Waschschrte bei einem nahezu konstanten pH von 7. Zunächst wurden die OT für dreimal 5 min. in 50 % Formamid/2 x SSC (45° C) getaucht, dann zweimal 5 min. in 2 x SSC (45° C) und einmal 5 min. in 0,1 x SSC gewaschen und schließlich bei Raumtemperatur einmal 5 min. in 4 x SSC/0,1 % Triton belassen.

3.7.6 Detektion

Die während der Nick-Translation biotin- und digoxigenin-markierten DNA-Proben werden jetzt mit spezifisch bindenden Molekülen inkubiert, die fluoreszenzmarkiert vorliegen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Streptavidin eine hohe Affinität zu Biotin ausbildet. Diese wird aus dem Bakterienstamm *Streptococcus avidinii* gewonnen.

Um ein Signal detektieren zu können, wird Streptavidin an ein Trägermolekül aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe gekoppelt. Das Emissionsmaximum von Fluorescein - Isothiocyanat (FITC) liegt bei 515 nm und zeigt sich daher grün.

Material und Methoden

Im Falle des Digoxigenin kommt ein polyklonaler Antikörper (Anti-Digoxigenin-Antikörper) zum Einsatz. Dieser ist wiederum mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin konjugiert, der Licht in einem Spektrum von 600 nm emittiert und daher rot erscheint.

Vor Aufbringen der Fluorochrome wurden die Objektträger für 20 min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 5 % BSA/4 x SSC gelagert. Dieser Schritt sorgte für eine höhere Bindungsfähigkeit der markierten Sequenzen, in dem unspezifische Bindungsloci blockiert wurden. Die folgenden Schritte wurden abgedunkelt durchgeführt.

Zunächst erfolgte die 45 minütige Inkubation (feuchte Kammer bei 37° C) mit Streptavidin-FITC, welches vorher in 5 % BSA/4 x SSC angesetzt wurde (Verhältnis Streptavidin - FITC:5 % BSA/4 x SSC = 1:80).

Um überschüssige Fluorochrome zu entfernen, wurden die OT dreimalig für 5 min. in 4 x SSC/0,1 % Triton (37° C) gewaschen.

Erneut erfolgt das Blocken mit 5 % BSA/4 x SSC (feuchte Kammer, RT, 20 min.) und schließlich die Inkubation mit Anti-DIG-Rhodamin (Anti-DIG-Rhodamin: 5 % BSA/4 x SSC = 1:20). Nach dreimaligen Waschen mit 4 x SSC/0,1 % Triton (37° C) wurden die OT in aufsteigender Ethanolreihe (70 % - 80 % - 100 %) bei Raumtemperatur dehydriert und für mindestens 30 min. staubfrei getrocknet.

Um später eine Identifizierung der Chromosomen zu ermöglichen, wird ein dritter Farbstoff benötigt. Diamidinphenylindol (DAPI) emittiert am kurzwelligen Ende des Spektrums sichtbaren Lichts und erscheint daher blau. Zudem interkaliert es in die DNA und bindet bevorzugt AT-reiche Sequenzen. Durch die unterschiedliche Kondensation der einzelnen Chromosomenabschnitte unterscheidet es sich in seiner Fluoreszenzintensität und führt zum typischen Bänderungsmuster der Chromosomen, vergleichbar mit einer GTG-Bänderung.

Um das Ausbleichen (fading) von DAPI zu verhindern, wird es in Verbindung mit Antifade auf die OT aufgetragen, so dass die Auswertungszeit am Mikroskop verlängert werden kann. Pro OT wurden 20 µl DAPI-Antifade auf die OT pipettiert, mit einem Deckglas fest verschlossen und bis zur Aufnahme am Mikroskop in einer lichtgeschützten, trockenen Mappe bei 4° C gelagert.

3.7.7 Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop

Zur Aufnahme der Metaphasechromosomen wurde ein automatisiertes Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop verwendet (Olympus AX 70). Die Auswertung erfolgte schließlich mit Hilfe des Softwareprogrammes ISIS. Pro Fall wurden im Mittel 20-25 Metaphasen aufgenommen und untersucht.

3.8 Statistische Auswertung

Die Überlebenszeitanalyse wurde von Dr. Kai Kammers, Fakultät Statistik der Technischen Universität Dortmund durchgeführt.

Dabei wurde untersucht, ob spezifische genetische Veränderungen der Glioblastome mit dem Ansprechverhalten bezüglich Therapie und Überlebenszeit korrelieren. Aus diesem Grund wurden typische Aberrationen herausgegriffen und in beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Effekte der gewählten Therapiemaßnahme wurden schließlich durch Cox-Regressionsanalyse (95 % -Konfidenzintervall) ermittelt.

Die grafische Darstellung spezifischer Überlebensraten erfolgte durch die Kaplan-Meier-Methode, deren Vorteil vor allem in der Beurteilung und Ablesbarkeit der Überlebenszeiten trotz unterschiedlicher Beobachtungszeiträume liegt.

3.9 Analyse epigenetischer Veränderungen

3.9.1 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA

Ein häufig angewendetes und effektives Verfahren, welches von Frommer und Mitarbeitern entwickelt und etabliert wurde (Frommer et al, 1992), ist die Behandlung genomischer DNA mit Natriumhydrogensulfit (Bisulfit, Abb. 11). Mittelpunkt dieser epigenetischen Methode ist vor allem die Betrachtung der Base Cytosin, da diese nahezu ausschließlich von enzymatischen Modifikationen der postreplikalen DNA betroffen ist. Ca. 4 % aller Cytosine im menschlichen Genom liegen methyliert als 5'-Methylcytosin vor.

Material und Methoden

Eine hohe Repräsentationsrate dieses Nukleotidbausteins findet sich in sogenannten CpG-Inseln (*cytosine preceding guanosine dinucleotides*), die vorwiegend im proximalen Promotorbereich von Genen auftreten (5'-Ende). In der Tumorgenese sind häufig diese Sequenzen betroffen. Man spricht von sogenannten Imprinting-Defekten. Die Hypermethylierung ist meist mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen assoziiert, die bereits auf Transkriptionsebene stattfindet. Durch Behandlung der genomischen DNA mit Bisulfit wird die hydrolytische Desaminierung der Base Cytosin in den RNA-Baustein Uracil bewirkt.

Allerdings sind nur unmethylierte Basen derart modifizierbar, wohingegen bereits methylierte Basen als 5-Methylcytosin modifikationsresistent und damit unkonvertiert bleiben (Hayatsu *et al.*, 1970; Wang *et al.*, 1980). Grund dafür ist die hohe Affinität des Natriumbisulfits zur 5,6-Doppelbindung des Cytosins. Zudem ist diese Reaktion streng einzelstrangspezifisch (Clark *et al.*, 1994). Eine vorhandene Methylgruppe hat in diesem Fall folglich einen schützenden Effekt.

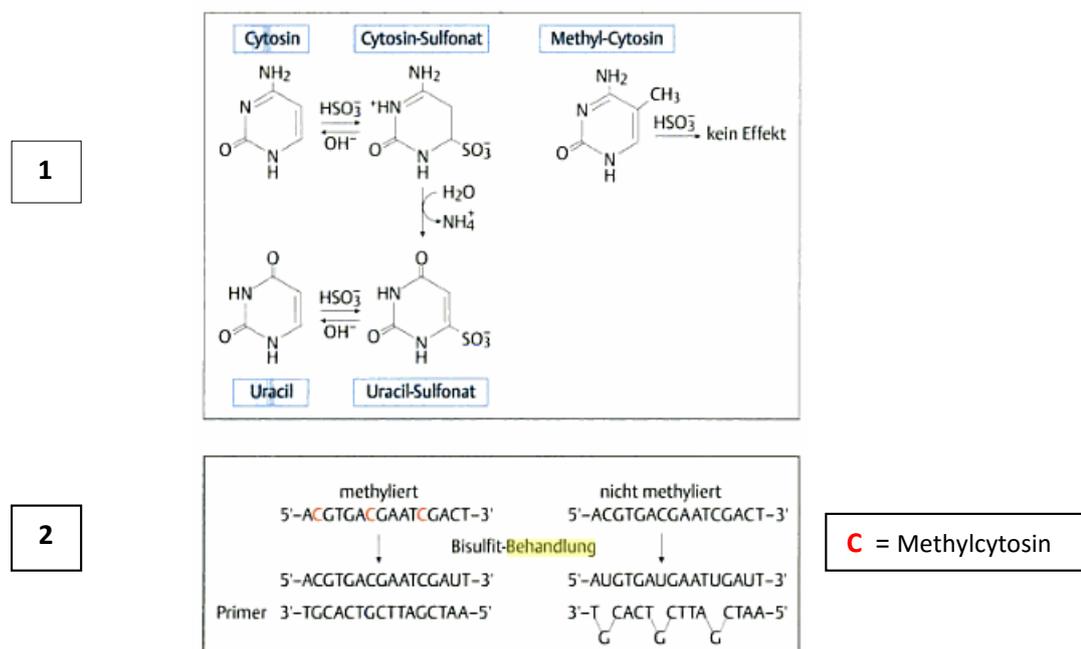


Abb. 11: MS-PCR

- 1) Natriumbisulfitbehandlung von Cytosin bewirkt die Umwandlung in Uracil; kein Effekt bei 5-Methylcytosin
- 2) MS-PCR: Spezifische Primer binden an komplementäre Basen und führen zur Differenzierung unmethylierter bzw. methylierter Bereiche (Quelle: Molek. Onkol.: Entstehung, Progression, klinische Aspekte, Wagener, C.; Müller, O.; Thieme Verlag, S. 49, 2010)

Material und Methoden

Nach Modifikation sind diese Stränge allerdings nicht mehr komplementär zueinander, so dass strangspezifische PCR-Primer für den sich anschließend Amplifikationsprozess nötig sind. Diese binden spezifisch sowohl an methylierte als auch an unmethylierte Sequenzen und bieten somit eine nachweisbare Differenzierung der veränderten Basen.

Für die Bisulfit-Behandlung wurde das EZ Methylation Kit verwendet und gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.9.2 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Ein sehr sensitives Verfahren zur Detektion von Hypermethylierungen ebrachten 1996 erstmalig Hermann und Mitarbeiter mit der Entwicklung der methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR, Hermann et al, 1996, Abb. 11).

Diese basiert auf der Verwendung zweier PCR-Primerpaare, die spezifisch an unmethylierte bzw. methylierte Bereiche der bisulfitbehandelten DNA-Stränge in 3'-sowie in 5'-Richtung binden und diese sichtbar machen.

Abhängig vom Methylierungsstatus der DNA entstehen nach der Bisulfit-Behandlung folglich unterschiedliche Produkte.

Nach Amplifikation der bisulfitbehandelten DNA wird anstelle des Uracils Thymin in die Amplikons eingebaut, wohingegen methylierte Cytosinbasen erhalten bleiben.

Material und Methoden

Tab. 1: Sequenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
MGMT u-for	5' - TGTGTTTTTAGAATGTTTTGTGTTTTGAT - 3'
MGMT m-for	5' - GTTTTTAGAACGTTTTGCGTTTCGAC - 3'
MGMT u-rev	5' - CTACCATCCCAAAAAAAAAACTCCA - 3'
MGMT m-rev	5' - CACCGTCCCGAAAAAAAAACTCCG - 3'
p15 u-for	5' - TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT - 3'
p15 m-for	5' - GCGTTCGTATTTTGC GGTT - 3'
p15 u-rev	5' - CTACCATCCCAAAAAAAAAACTCCA - 3'
p15 m-rev	5' - CACCGTCCCGAAAAAAAAACTCCG - 3'
p16 u-for	5' - TTATTAGAGGGTGGGGATTGT - 3'
p16 m-for	5' - TTATTAGAGGGTTTTGATCGC - 3'
p16 u-rev	5' - CAACCCCAAATACCCCAAATAA - 3'
p16 m-rev	5' - GACCCCGAACTACCCTAA - 3'

PCR - Ansatz MGMT, p15 und p16

verwendete Substanz	Konzentration in μ l	
H ₂ O	17,8	} \cong 23 μ l
Taq-Puffer 10x	2,5	
dNTP 2,5 mM	0,5	
M/U-Primer for	1,0	
M/U-Primer rev	1,0	
HotStartTaq (1U)	0,2	
Bisulfit-markierte DNA	2,0	
Aqua dest.	2,0	
	\cong Gesamtkonzentration 25 μ l	

Material und Methoden

Jede durchgeführte PCR beinhaltet eine Positiv- (M-DNA Standard Hiss), eine Negativ- (unmethylierte DNA eines männlichen Spenders), sowie eine Nullkontrolle (Aqua dest.).

Nach Pipettieren der Proben wurde diese in ein PCR-Gefäß überführt und nach folgendem Profil im Thermocycler bearbeitet:

- 15 min. 95° C
 - 45 sek. 95° C
 - 45 sek. 60° C
 - 1 min. 72° C
 - ∞ 4° C
- } **38 Zyklen für MGMT und p15**

Die PCR für p16 verlief nach einem anderen Temperatur- und Zyklenprofil:

- 15 min. 95° C
 - 1 min. 95° C
 - 1 min. 60° C für die unmethylierten Proben
 - 65° C für die methylierten Proben
 - 1 min. 72° C
 - ∞ 4° C
- } **37 Zyklen (unmeth)**
} **40 Zyklen (methyl)**

3.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

Diese molekularbiologische Methode ermöglicht die Auftrennung der amplifizierten Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe durch Anlage eines elektrischen Feldes.

Hierfür wurde ein Gel mit einer Agarose-Konzentration von 2,5 % in 1 x TBE-Puffer angesetzt, aufgeköcht und schließlich auf etwa 55° C abgekühlt. Das Gemisch wurde schließlich mit 8 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel versetzt und in einen Gelträger überführt.

Nach Auspolymerisierung des Gels wurden je 9 µl Probe mit 1 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen übertragen. Zur Beurteilung der PCR-Produkte wurde zudem ein Längenstandard in die zweite Geltasche eingebracht.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120V/240 mA für 1,5– 2 h.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Methylierungsanalysen von MGMT, p15 (CDKN2B) und p16 (CDKN2A)

Die Prüfung epigenetischer Veränderungen und deren Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten wurden anhand der Methylierungsanalyse spezifischer Promotor-Regionen untersucht und verglichen.

Nach Mikrodissektion und Aufarbeitung des -80°C kryokonservierten, nativen Tumorgewebes (Kapitel 3.3) erfolgte die Modifizierung der zuvor isolierten Proben durch Bisulfit-Behandlung und die sich anschließende Auswertung durch MS-PCR (Kapitel 3.9) und Agarose-Gelelektrophorese.

Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 72 Tumorgewebeproben, wobei diese in zwei Gruppen unterteilt wurden. *Gruppe A* ($n = 36$) wurde nach chirurgischer Tumoresektion mit Carmustin-Wafern behandelt und einer anschließenden Radiochemotherapie unterzogen, wobei *Gruppe B* ($n = 36$) alleinig nach Stupp-Protokoll behandelt wurde.

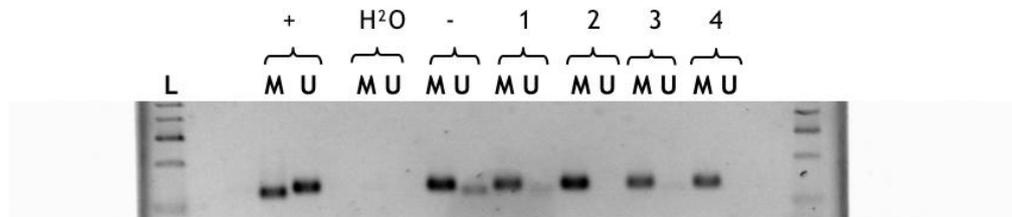


Abb. 12: Bandenmuster Methylierungsanalyse MGMT

Fälle: 1 - 1442/08 + = Positivprobe
 2 - 1510/10 - = Negativprobe
 3 - 1219/09 L = Leiter
 4 - 288/08

Tabellen 2 und 3 zeigen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der untersuchten Kandidatengene MGMT, p15 und p16. Dabei veranschaulicht Tabelle 2 die Carmustin-Fälle und Tabelle 3 die Kontroll-Fälle. Exemplarisch demonstriert Abb. 12 die Banden der Methylierungsanalyse von MGMT.

Ergebnisse

1219/09	pGBM	58/m	1.33	m	m	u
1809/11	pGBM	55/m	16.97	u	u	u
1362/07	pGBM	52/m	17.00	u	u	u
288/08	pGBM	52/m	43.07	m	u	u
1350/06	sGBM	46/m	5.83	u	m	u
1455/08	pGBM	46/m	6.80	u	u	u
768/09	pGBM	44/m	5.73	u	u	u
P.E.	pGBM	44/m	28.53	u	u	u
1741/08	pGBM	54/w	4.93	m	m	u
1701/07	pGBM	67/m	3.83	u	m	m
1935/08	pGBM	70/m	1.10	m	u	m
1618/09	pGBM	54/w	8.57	m	u	u
A.W.	pGBM	75/m	3.97	u	m	u
1934/11	pGBM	69/w	3.03	u	u	u
1381/06	pGBM	44/m	37.27	m	u	u
1080/10	pGBM	73/m	2.37	m	m	m
725/12	pGBM	50/m	12.40	u	u	u
778/10	pGBM	70/m	2.00	u	u	u
563/12	pGBM	60/m	9.80	u	u	u
904/11	pGBM	65/m	6.33	u	u	u
1346/06	pGBM	50/w	2.27	m	u	u
175/12	pGBM	45/m	0.78	u	u	u

Ergebnisse

Tab. 3: Methylierungsstatus Gruppe B (Kontrollen)

Fall	Histo	Alter/ Geschlecht	ÜLZ (Mon.)	Methylierungs- status MGMT	Methylierungs- status p15	Methylierungs- status p16
1553/07	pGBM	82/w	0.97	m	u	u
1042/12	pGBM	83/w	0.63	u	u	u
1117/05	pGBM	71/m	17.80	m	u	u
139/10	pGBM	73/w	2.43	m	u	u
1588/09	pGBM	70/w	2.07	u	u	u
1191/08	pGBM	68/w	2.27	u	u	u
1355/08	pGBM	52/w	10.93	u	u	u
922/12	pGBM	54/m	1.14	m	u	u
881/10	pGBM	40/w	9.57	m	u	u
1229/08	pGBM	72/m	3.43	u	u	u
375/10	pGBM	72/m	1.87	m	u	u
1988/09	pGBM	68/m	13.90	m	u	u
838/12	sGBM	70/m	1.10	u	u	u
926/09	pGBM	58/m	4.60	m	u	m
983/04	pGBM	54/m	13.07	u	u	u
837/12	pGBM	54/w	1.54	u	m	u
1078/09	pGBM	54/m	4.47	m	u	m
776/05	pGBM	50/m	9.63	u	u	u

Ergebnisse

1861/03	pGBM	43/m	39.20	m	u	u
1216/11	pGBM	50/m	8.63	m	m	m
1110/05	pGBM	41/m	12.90	m	u	u
1457/03	pGBM	37/m	10.17	m	m	u
378/12	pGBM	59/w	2.23	m	u	u
1583/08	pGBM	68/w	12.07	m	u	u
655/09	pGBM	71/w	2.77	u	u	u
291/09	pGBM	51/w	8.80	m	m	u
156/12	sGBM	76/w	1.66	m	u	u
1286/08	pGBM	65/m	7.50	m	u	u
1458/10	pGBM	49/w	11.20	m	u	u
1431/05	pGBM	69/w	11.77	u	u	u
T 6929	pGBM	50/m	1.82	m	u	u
338/12	pGBM	72/m	14.33	m	u	u
791/08	pGBM	56/m	9.60	u	u	u
663/12	pGBM	65/w	6.77	u	u	u
754/12	pGBM	56/m	3.17	u	u	u
2512/11	pGBM	42/m	16.03	u	m	u

Ergebnisse

Die Methylierungsanalyse der 3 Kandidatengene MGMT, p15 (CDKN2B) und p16 (CDKN2A) zeigte in beiden Gruppen ein ähnliches Profil. 58 % (21/36) der Tumoren in der Kontrollgruppe ergaben ein positives Methylierungsergebnis die Promotorregion der O-Methylguanin-DNA-Methyltransferase betreffend, 42 % (15/36) in der Gliadelgruppe.

In 25 % (9/36) der Carmustin-Fälle und 14 % der Kontrollen zeigte sich p15 methyliert. Je 8 % (3/36) der Glioblastome wiesen Modifikationen im Bereich p16 auf (Abb.: 13). Ergo handelt es sich bei epigenetischen Veränderungen des MGMT-Promotors im Sinne einer Methylierung um das häufigste detektierte Ereignis.

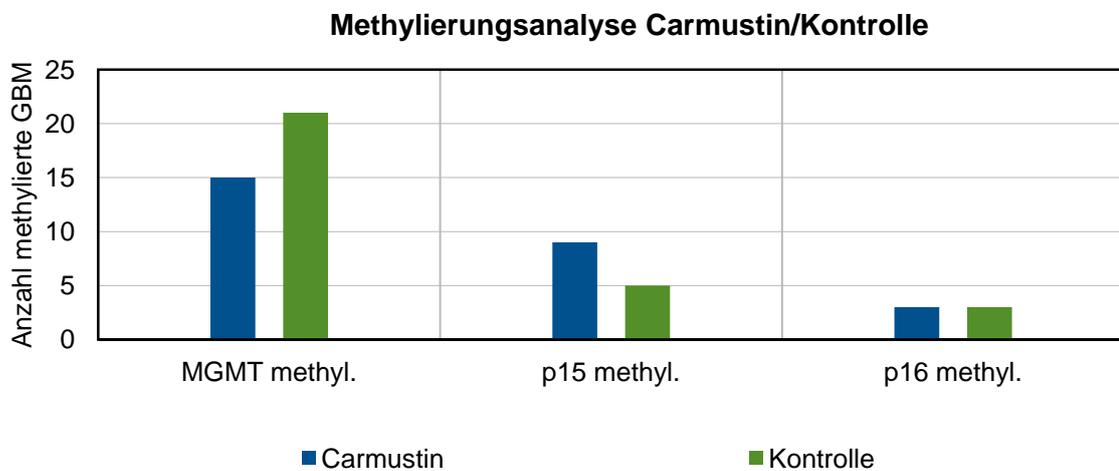


Abb. 13: Vergleich Methylierungsanalyse Carmustin/Kontrolle

4.1.1 Einfluss des Methylierungsstatus auf die Überlebenszeit

Für die Beurteilung der Überlebenszeit gemessen am Methylierungsstatus der untersuchten Promotorenregionen wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt. Tabelle 4 zeigt die mediane Überlebenszeit bei nachgewiesener Hypermethylierung von MGMT, p15 und p16.

Die mediane Überlebenszeit in der Carmustingruppe lag bei 4.93 Monaten bei methyliertem MGMT-Status (15/36) gegenüber 5.83 Monaten bei unmethyliertem Promotor (21/36). Im Log-Rank-Test zeigte sich kein signifikanter Einfluss des MGMT-Status ($p = 0.319$).

Ergebnisse

Diese Ergebnisse unterschieden sich von der Vergleichsgruppe. Hier lag die mediane Überlebenszeit bei methyliertem MGMT-Promotor bei 8.63 Monaten, wohingegen sie bei unmethyliertem Status nur 3.43 Monate betrug. Obgleich auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde, zeigte sich jedoch eine Tendenz ($p = 0.0635$).

Tab. 4: Überlebenszeitanalyse MGMT

	Gliadel (med. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>	Kontrolle (med. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>
MGMT	n = 15 (4.93)	n = 21 (5.83)	n = 21 (8.63)	n = 15 (3.43)

Kaplan–Meier Curves MGMT

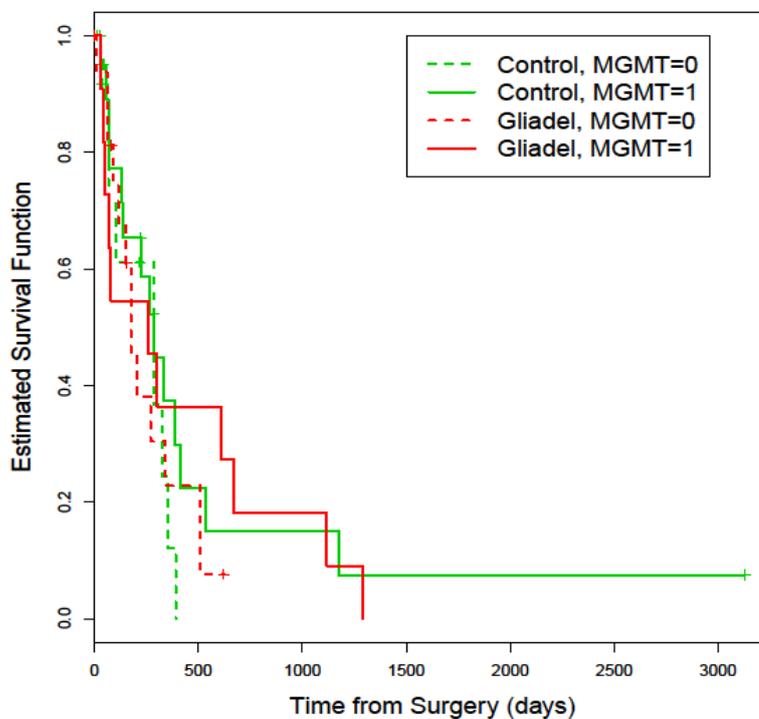


Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurve MGMT, Vergleich Gliadel versus Kontrolle,
0 = unmethyliert, 1 = methyliert

Ergebnisse

Ungeachtet dessen bestätigt die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 15, dass der Methylierungsstatus von MGMT als signifikanter prognostischer Marker bezüglich des Gesamtüberlebens der Glioblastompatienten wahrgenommen werden muss und zwar unabhängig vom Therapieregime.

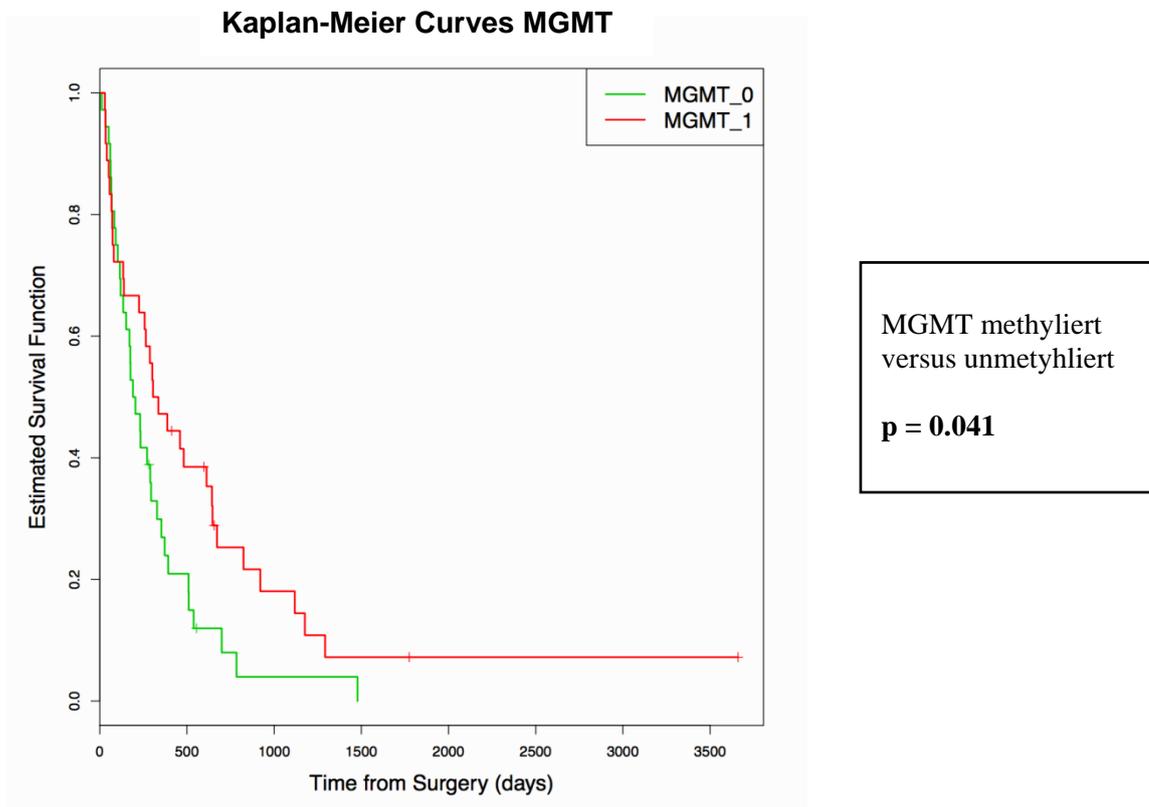


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve, MGMT, 0 = unmethyliert, 1 = methyliert

Auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich eine Signifikanz bezüglich der Überlebenszeit bei methyliertem MGMT-Status. In Tab. 5 wird dies anschaulich dargestellt.

Tab. 5: univariate Cox-Regressionsanalyse MGMT

Promotorregion	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
MGMT	0.593	0.359 - 0.979	0.041

Ergebnisse

Der Methylierungsstatus der Promotorregion p15 wirkte sich vor allem bei der Wahl des Therapieregimes signifikant aus. Dabei verkürzte sich die Überlebenszeit jener Glioblastompatienten mit methyliertem p15-Status besonders in der Carmustingruppe rapide. Obgleich im univariaten Coxregressionsmodell kein signifikanter Effekt für p15 bestätigt werden konnte (Tab. 6), so ist dieser umso eindrücklicher in der Kaplan-Meier-Analyse (Abb. 16, $p = 0.0332$).

War eine Promotormethylierung von p15 nachweisbar, lag die mediane Überlebenszeit der carmustinbehandelten Glioblastompatienten bei nur 3.83 Monaten gegenüber 8.75 Monaten bei unmethyliertem Status (Tab. 7).

In der Kontrollgruppe zeigte sich dies nicht. Hier lag die mediane Überlebenszeit bei methyliertem Promotor bei 8.8 Monaten versus 4.6. Monate bei unmethyliertem. Statistische Signifikanz erreichte diese Auswertung allerdings nicht.

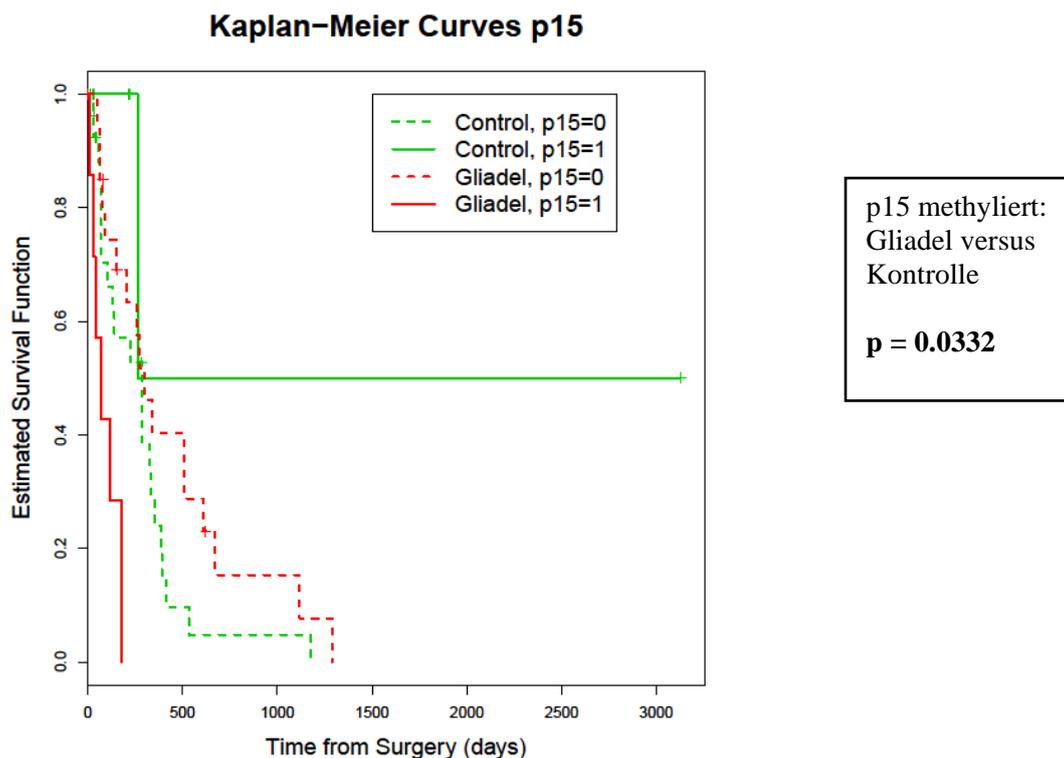


Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve, p15-Status, Vergleich Gliadel versus Kontrolle, 0 = unmethyliert, 1 = methyliert

Tab. 6: univariate Cox-Regressionsanalyse p15

Promotorregion	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
p15	0.788	0.407-1.529	0.482

**Tab. 7: Vergleich der Überlebenszeiten Gliadel versus Kontrolle
nach p15-Status**

	Carmustin-Wafer (med.. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>	Kontrolle (med.. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>
p15	n = 9 (3.83)	n = 27 (8.75)	n = 5 (8.8)	n = 31 (4.6)

Die Untersuchung des Methylierungsstatus von p16 zeigte in beiden Gruppen keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0.295$, Abb. 17, Tab. 8). Ohnehin war die Fallzahl jener Patienten mit Promotormethylierung von p16 mit 3 pro Gruppe eher gering.

Die mediane Überlebenszeit in der Carmustingruppe bei detektiertem methylierten Promotor lag bei 2.37 Monaten gegenüber 5.83 Monaten ohne Methylierung. Die Kontrollgruppe wies eine mediane Überlebenszeit bei Methylierung von 4.6 Monaten und ohne Methylierung von 7.5 Monaten auf (Tab 9).

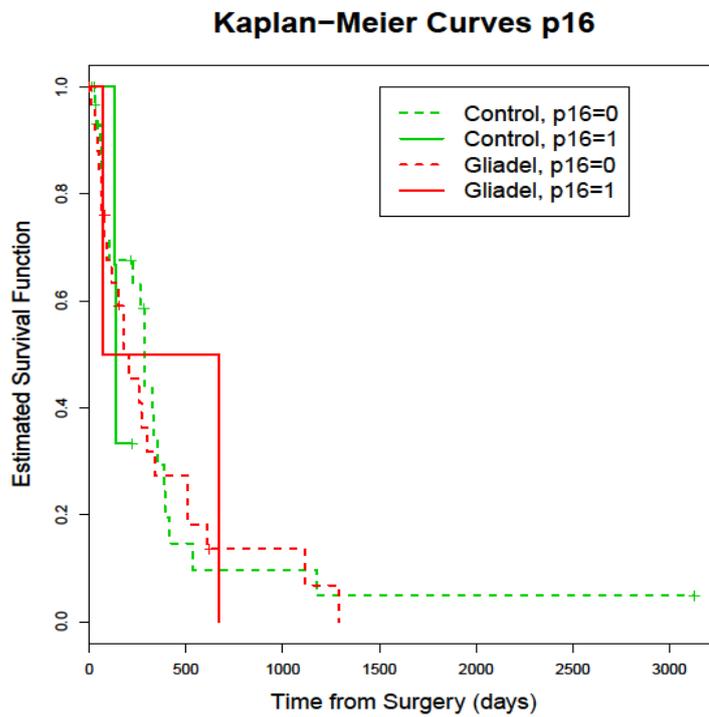


Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse p16, Vergleich Gliadel® versus Kontrolle,
0 = unmethyliert, 1 = methyliert

Tab. 8: univariate Coxregressionsanalyse p16

Promotorregion	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
p16	1.572	0.674-3.671	0.295

**Tab. 9: Vergleich der Überlebenszeiten Gliadel versus Kontrolle
nach p16-Status**

	Carmustin-Wafer (med.. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>	Kontrolle (med.. ÜLZ i. Mon.) <i>methyliert</i>	<i>unmethyliert</i>
p16	n = 3 (2.37)	n = 33 (5.83)	n = 3 (4.6)	n = 33 (7.5)

Ergebnisse

4.1.2 Methylierungsstatus der Langzeitüberlebenden

Die Therapiekonzepte für Glioblastompatienten sind weit gefächert. Obgleich die Behandlung nach dem Stupp-Schema einen signifikanten Anstieg der Gesamtüberlebenszeit mit sich brachte, leben nur ein Bruchteil der Patienten länger als 20 Monate. Dennoch werden vereinzelt Fälle beobachtet, deren Overall-Survival die 36 Monatsgrenze überschreitet. In der Carmustingruppe befanden sich zwei Patienten und in der Kontrollgruppe ein Patient, die länger als 36 Monate nach Diagnosestellung lebten. Tabelle 10 zeigt das Methylierungsmuster dieser Glioblastome.

Tab. 10: Methylierungsergebnisse der Langzeitüberleber

u = unmethyliert, m = methyliert bzw. männlich

Fall	Histologie	Alter/ Geschlecht	ÜLZ (Monate)	MGMT	p15	p16
288/08 Carmustin	pGBM	52/m	43.07	m	u	u
1381/06 Carmustin	pGBM	44/m	37.27	m	u	u
1861/03 Kontrolle	pGBM	43/m	39.20	m	u	u

Alle Langzeitüberleber waren primäre Glioblastome. Im Mittel lag die Gesamtüberlebenszeit bei 40 Monaten. Auffällig ist, dass alle 3 Fälle eine hypermethylierte MGMT-Promotorregion aufwiesen, wohingegen p15 und p16 unmethyliert waren. Zusätzlich lag das Erkrankungsalter deutlich unter dem Durchschnitt (mittleres Alter = 43 Jahre). Des Weiteren befanden sich nur männliche Patienten in dieser Gruppe.

4.2 Ergebnisse der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH)

Mithilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) konnten zahlreiche quantitative genetische Aberrationen der Tumorproben nachgewiesen werden. Die häufigsten Zugewinne zeigten sich vor allem auf Chromosom 7 (85 %; 61/72) und Chromosom 16 (33 %; 24/72). Ebenso wies der lange Arm des Chromosom 4 (22 %, 16/72), Chromosom 5 (21 %, 15/72), Chromosom 12 (19 %; 14/72) und Chromosom 20 (22 %; 16/72) Gewinne auf.

Demgegenüber zeigten sich zahlreiche Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (47 %; 34/72), dem kompletten Chromosom 10 (67 %; 48/72) und dem langen Arm von Chromosom 13 (47 %, 34/72). In ebenfalls 25 % der Glioblastome war der lange Arm von Chromosom 6 betroffen (18/72), sowie zu 22 % der lange Arm von Chromosom 22 (16/72), zu 19 % der lange Arm von Chromosom 4 (14/72) und zu 18 % der lange Arm von Chromosom 17 (13/72).

In 6 Tumoren lagen Amplifikationen der DNA-Sequenz 4q12 (15 %, 11/72), sowie in 7 Fällen Vervielfältigung des für den EGFR-Rezeptor kodierende Bereichs 7p12 (19 %; 14/72). 4 % der Glioblastome zeigten Amplifikationen auf 12q (3/72), sowie jeweils 1 % Vervielfältigung auf Region amp6q21 und amp8p23.1pter.

In allen untersuchten Tumorproben konnten im Mittel 11 Aberrationen pro Fall detektiert werden, wobei insgesamt 754 Veränderungen nachweisbar waren. Lediglich ein Fall zeigte keine genetischen Veränderungen (Fall 791/08, Kontrolle).

4.2.1 Veränderungen in primären und sekundären Glioblastomen

Die Anzahl der sekundären Glioblastome betrug nur 3 Fälle (Gliadel: 1350/06, Kontrollen: 838/12, 156/12), so dass eine repräsentative Aussage bezüglich genetischer Veränderungen nur eingeschränkt zu treffen ist. Dennoch ist eine Tendenz typischer Aberrationen erkennbar. Diese betreffen vor allem Gewinne auf dem langen Arm von Chromosom 4, Chromosom 7, sowie Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 10, 13 und 22.

Tab. 11: Vergleich der Aberrationen in primären und sekundären GBM

Genetische Veränderung	Primäres GBM	Sekundäres GBM
amp4q12	7% (5/69)	33% (1/3)
+7	85% (59/69)	66% (2/3)
amp7p12	10% (7/69)	0% (0/3)
-9p	46% (32/69)	33% (1/3)
+12q	20% (14/69)	0% (0/3)
amp12q	4% (3/69)	0% (0/3)
-10q	66% (48/69)	66% (2/3)
-10q26	54% (37/69)	66% (2/3)
-13q	46% (32/69)	33% (1/3)
-4q	18% (13/69)	33% (1/3)
-17p	13% (9/69)	0% (0/3)
-19q	13% (9/69)	33% (1/3)
+20q	22% (15/69)	33% (1/3)
-22q	20% (14/69)	66% (2/3)

4.2.2 Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Carmustin-Gruppe

In die Carmustin-Gruppe wurden 36 Patienten eingeschlossen und näher untersucht, die nach chirurgischer Resektion des Tumors und Implantation von durchschnittlich 8 Gliadel-Wafern eine fraktionierte Strahlentherapie (Gesamtdosis 60 Gy) sowie Chemotherapie mit Temozolomid erhielten (6–8 Zyklen, 75 mg/ m² Körperoberfläche).

In dieser Gruppe befanden sich 35 primäre und 1 sekundäres Glioblastom.

In Abb. 19 sind alle genetischen Aberrationen (Gewinne und Verluste) der Carmustin-Gruppe übersichtlich dargestellt. Des Weiteren findet sich in Tabelle 12 eine Übersicht aller detektierten chromosomalen Veränderungen. Beispielfhaft veranschaulicht Abb 18 das Ideogramm von Fall 270/10.

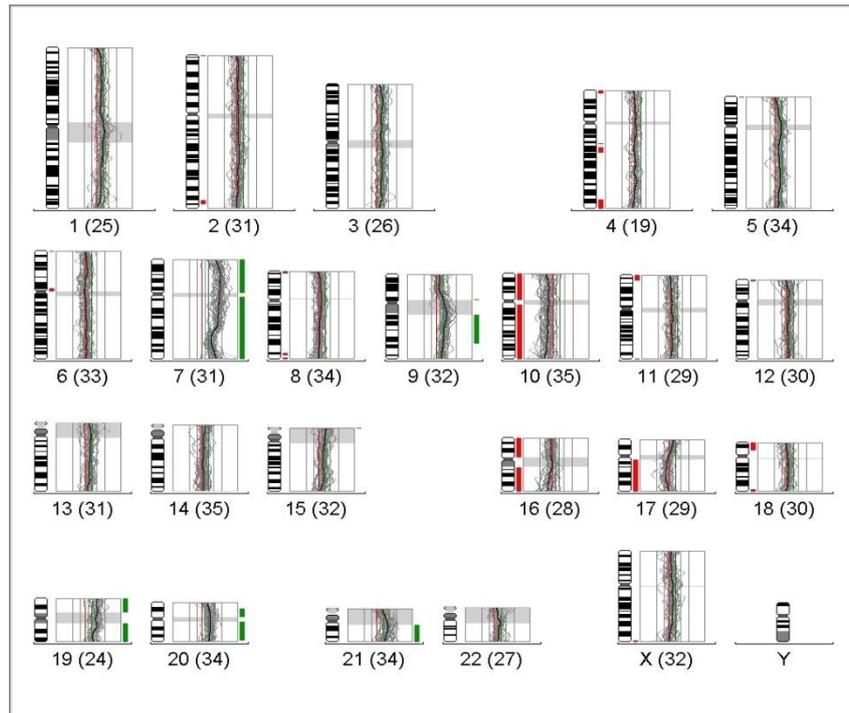


Abb. 18: CGH-Profil Fall 270/10

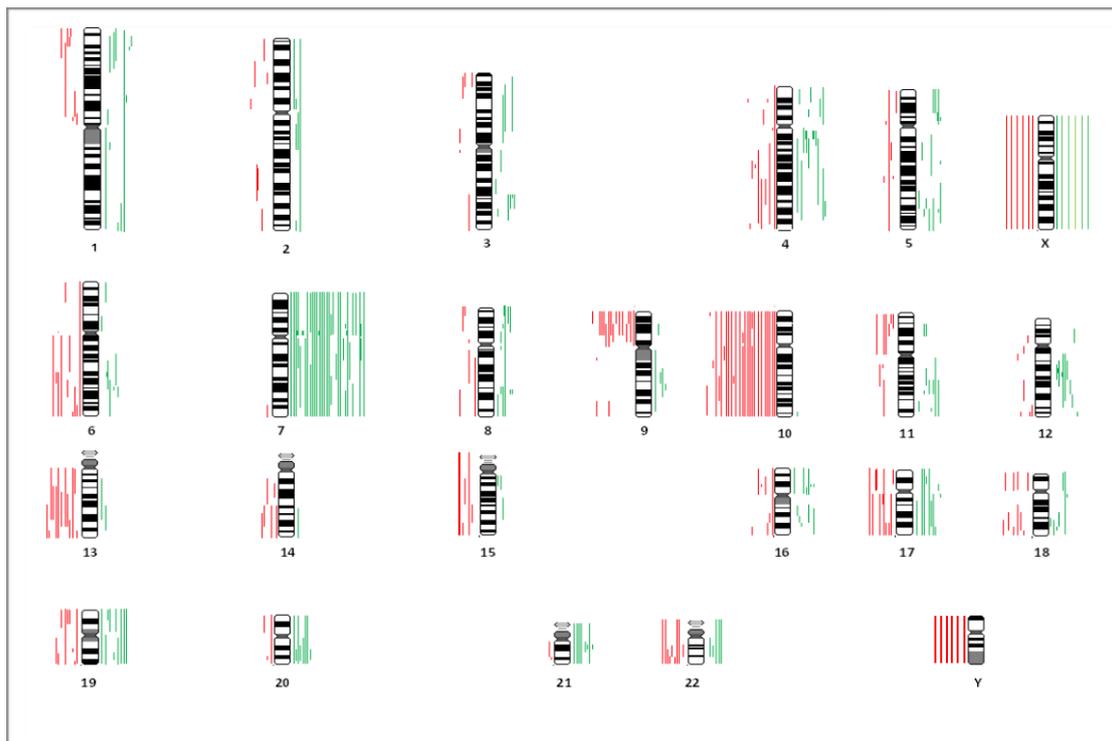


Abb. 19: CGH- Ideogramm der Carmustin-Fälle, █ = Gewinne, █ = Verluste

Ergebnisse

Tab. 12: genetische Veränderungen aller Carmustin-Fälle (CGH-Analyse)

Fall	Histologie	Alter/ Geschlecht	CGH - Ergebnisse
2065/08	pGBM	80/w	+7, -9p, -10, -14q24qter, -17p12pter, -22q11.2q13.2, +X,-Y
270/10	pGBM	80/m	-4,-6 +7,-8q21.1qter, +9q12q34.1, -10, -11p14pter, -16, -17q, -18p11.2pter, +19, +20, +21
1526/07	pGBM	75/m	+1p33pter, -1p11p22.1, amp4q12, +6p12p21.3, +7, -9p13pter, -10, +11q23.3q25, +15q11.2q14, +16p, +17p12pter, +20q12q13.2, -X
220/10	pGBM	72/w	-6q25.3qter, +7p, amp7p12, +7q11.1q31.1, -9p23pter, -10, -11p15.3pter, -13q33qter, +17, -18q22qter, +21,-22,+X
479/09	pGBM	69/w	+5q23.3q32, +7q21.1q36
740/10	pGBM	69/w	-2p16p21,-3p24.1pter,-3p12p13,-3q24qter,-4q13.3q33,+7q11.2,-9p21p23,-11p14p15.3,-15q21.3q25,-16q13q22,+17,-18q12.3q22
1442/08	pGBM	52/w	+4q13.1q32,+7q,-10,+12q13.3.q15,-19,-22
1578/10	pGBM	52/w	+1q, +4p15.3pter, +5q12q14, -6q23.1qter, +6p22.3pter, +7, -8p11.1p12, -8q12q21.3, -9p21.pter, -10, +11p14p15.3, -12q24.1qter, +15q11.1q15, +17p12p13, -17q25qter, +19p13.3pter, +19q, +20, +21, +22q11.1q13.1
1966/11	pGBM	40/w	+3q21q24,amp7p12,+7q22qter,-17q25qter,+22q12.1q13.1,(-X,+Y)
2404/11	pGBM	75/m	-2p23pter,-4p15.3p16,+7,+9p21p23,-10p13pter,-10q,+12q13.1q21.2 mit amp12q14,-12q24.3qter,-16p11.2p13.2,-19q13.3qter,-22q12.1q13.1

Ergebnisse

1210/09	pGBM	71/m	-4q28q32, -8p21.1pter, -9p21pter, -11p, -13, -15q12q21.3, -15q26.1qter, +16q11.2q21, -18p, -18q12.1qter, +19p, -20
1510/10	pGBM	69/m	+1p32.3p36.1,-3p24.1pter,+3q26.1q26.3,+4q24q34, -5p14pter,+5q31.1q32,+6q16.1q22.3,amp6q21,-6q27,+7,-9p22pter, -10,-11p,-11q14.1qter,+12q12q23,amp12q14q15,-13q23qter, -15q25qter,-16p12p13.1,+16q21q22,-18p, -18q23qter,+19q13.3,+20q11.2q12.3,+21,+22,(-x)
1370/07	pGBM	63/m	+1p11p22.1, +2p11.1q33, +7, amp 7p12, -3p21.3p25, -9p13p23, -9q31qter, -10,-17,-19p13.2pter, -20q13.1q13.2, -21q22.1q22.2, -22q13.1qter,
1663/07	pGBM	58/m	+1p34.1pter, -1p21p31.1, -2q24.1q32.3, -4p11p15.1, -4q11q28, -5q21q22, +5q32qter, -6q11q21, +7, +8q24.1qter, -9p21pter, -10, -12p11.2p12.3, -12q11q12, +12q15q22, -13q14.3q31, -14q12q21, +17, +20q, +22, -X
1219/09	pGBM	58/m	-1p13.1p13.2,-6q22.2q24,+7,amp7p12,+11q14.3q22.3, -12q24.3qter,+18q21.3q22,-19p13.2pter,+21p11.2p21
1809/11	pGBM	55/m	-1p26.1pter, +3p12p22, amp4q12, +5p14pter, +5q11.2q21, -6p22.3pter, +6q22.2qter, +7, +8p11.2p21.1, +8q11.2, +8q22.3q23, -9p, +9q21.3q22.3, -9q34.1qter, -10p11.1p12.3, -10q, +11p14p15.3, +11q13.2q14.3, +12q12q23, -13q11q32, -14q22qter, -15
1362/07	pGBM	52/m	-1p34.3pter, -5q12q14, +7, -9p11p22, -10, +18q21.3qter, +19p
288/08	pGBM	52/m	amp7p12, +7q31.3q35, +9q21.2q32, -10, -11q12q13.2, -13q12.3q31, -17q11.1q21.1
1350/06	sGBM	46/m	+1q12q23, amp4q12, +4q12q22, +8q23qter,-1p21p36.1, -4q28qter, -6q, -13q14.3q33, -18q12.3q23, -19q13.1q13.3, -22q12.3qter,
1455/08	pGBM	46/m	+4p14p15.1,amp4q12,+7p,+8p21.2p22,+11q14.1q22.3
768/09	pGBM	44/m	-6q25.1qter, +7q21.2q32, +12q13.2q21.1,-18p,-19

Ergebnisse

P.E.	pGBM	44/m	+1q43qter, +2p11.1p13, +2q13q22, +2q37.1qter, +3p13p33, +4p15.3pter, +5p14pter, +5q31.1qter, +6q23.1q22.3, +7, +9q22.3q31, -10q22.1q22.3, +11q23.3, +12q15q21.3, -13, +16q23q24, +17q12q24, +18q22, (-Xq)
1741/08	pGBM	54/w	-9p21pter, -10, -17q, +18q12.3q22
1701/07	pGBM	67/m	amp 4q12, +7, +17q, -4q21.3q34, -5, -10, -11q12q21, -13q14.1qter, -17p, -19p11pter,
1935/08	pGBM	70/m	amp4q12, +7q11q21.3, -9p21pter, -10, -18q22qter, -20p11.2pter
1618/09	pGBM	54/w	-2q24.1q34, -3p11.1p14.1, -3q11.1q13.1, -4q24q26, -5p11p12, -6p11p12, amp7p12, +7q34qter, -10q11.1q21.1, +10q26.2qter, -13q14.1q31, -14q12q22, +16p, +17q24qter, +19q, +22
A.W.	pGBM	75/m	+3q24q27, +4p, ish cgh enh (+5p), amp13.1p14, +5q32,ish cgh enh (+7), amp7p12, -9p21pter, -10, -12q12q13.1, -13q21.3q33, +14q23qter, +15q21.1q24, +17p11.2p12, +19, +20, +21q11.2q21
1934/11	pGBM	69/w	+3q24q26.1, +4q13.1q32, +6q15q22.3, +7q21.1q32, -9q13q21.1, +11q14.1q22.3, +12q21.3q24.1, -16p, -17p, -19q13.2qter, -22, +X
1381/06	pGBM	44/m	+1q32.2qter, -2p15p23, +2q11.1q21.3, -4q24q28, -6q21q22.3, +7p, +7q33qter, +8, amp 8p23.1pter, -10q22.1q25.1, -11p, +11q, -13q11q31, -14q22q31, -21q11.1q22.1, -22, -X,-Y
1080/10	pGBM	73/m	-1p34.1pter,+4p1.4p1.6,+6q23.1q24,+7p,+8p22pter,-9q34qter,-10,+12p11.2p13.1,+16p11.2p12,-16q24qter,-17q,+18p11.2pter,+X
725/12	pGBM	50/m	+1, +2, +3p13p25, +3q24, +4p, +4q26q34, +5p13.1p13.3, +5q14q15, +5q23.1q34, -6q, +7, +8p21.1pter, +8q23, -10q21.1q21.3, +11q14.1qter, -13q33qter, -14q24.2qter, +16p, +16q11.2q22, +18, +19, +20, +21, -X
778/10	pGBM	70/m	+1p36.1,-4q34qter,amp7p12,+7q11.1q22,-10p15pter,+12q24.3qter,-13q23.1qter,+17p11.1p11.2,+18p11.1p11.2,+19,+20q12q13.2

Ergebnisse

563/12	pGBM	60/m	-7q36qter
904/11	pGBM	65/m	+1p36.1p36.3,-4p16,-9p23pter,+16p12p13.1,-X
1346/06	pGBM	50/w	-5q21q23.1, -8q23qter, -10q23.2qter,-15,-17
175/12	pGBM	45/m	+1p31.1p32.3,- 2p11.2p13,+3q24q26.1,+4q31.3q34,+7,+8q23q24.1,+16q12.2qter, +16p12p13.2,-19q,+21q11.2q22.1,(-X)

4.2.3 Genetische Veränderungen der Glioblastome in der Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden 36 Patienten eingeschlossen und untersucht, deren Behandlung nach Stupp-Schema erfolgte. Nach chirurgischer Resektion wurde eine fraktionierte Strahlentherapie (Gesamtdosis 6 Gy) mit anschließender Chemotherapie unter Temozolomid (6–8 Zyklen, 75 mg/ m² Körperoberfläche) durchgeführt.

In dieser Gruppe befanden sich 34 primäre und 2 sekundäre Glioblastome. Ein Fall zeigte keine genetischen Veränderungen im CGH-Profil, so dass dieser nicht in die statistischen Untersuchungen eingeschlossen wurde.

Abbildung 20 zeigt exemplarisch ein CGH-Profil von Fall 1117/05. Eine Gesamtübersicht aller Aberrationen ist in Abbildung 21 zu sehen. Des Weiteren zeigt Tabelle 13 eine ausführliche Darstellung der detektierten chromosomalen Veränderungen dieser Gruppe, die mit der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) nachweisbar waren.

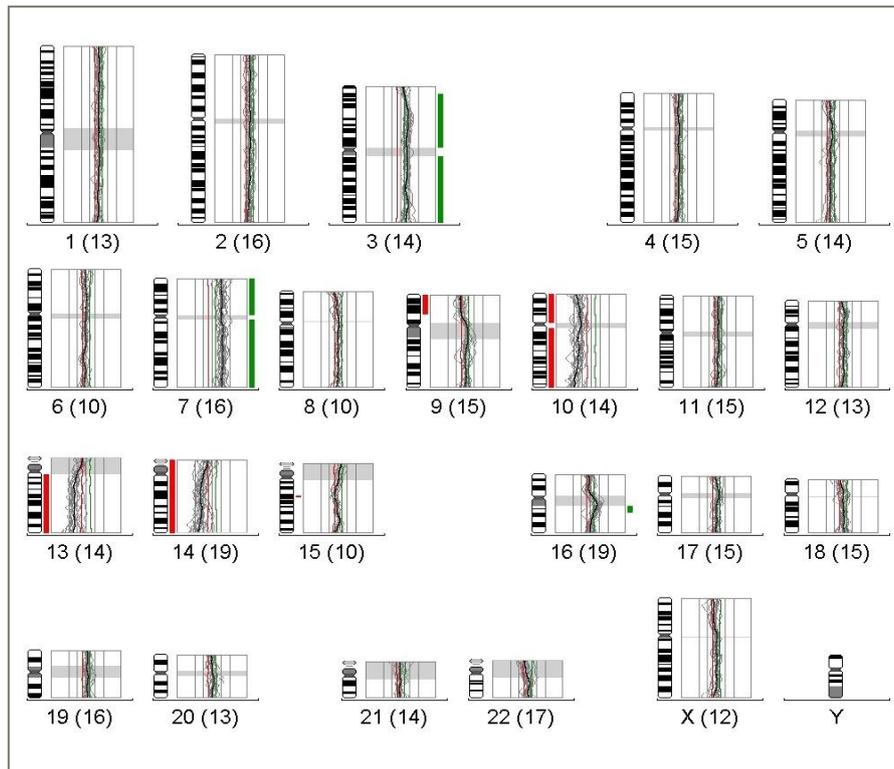


Abb. 20: CGH-Profil Fall 1117/05

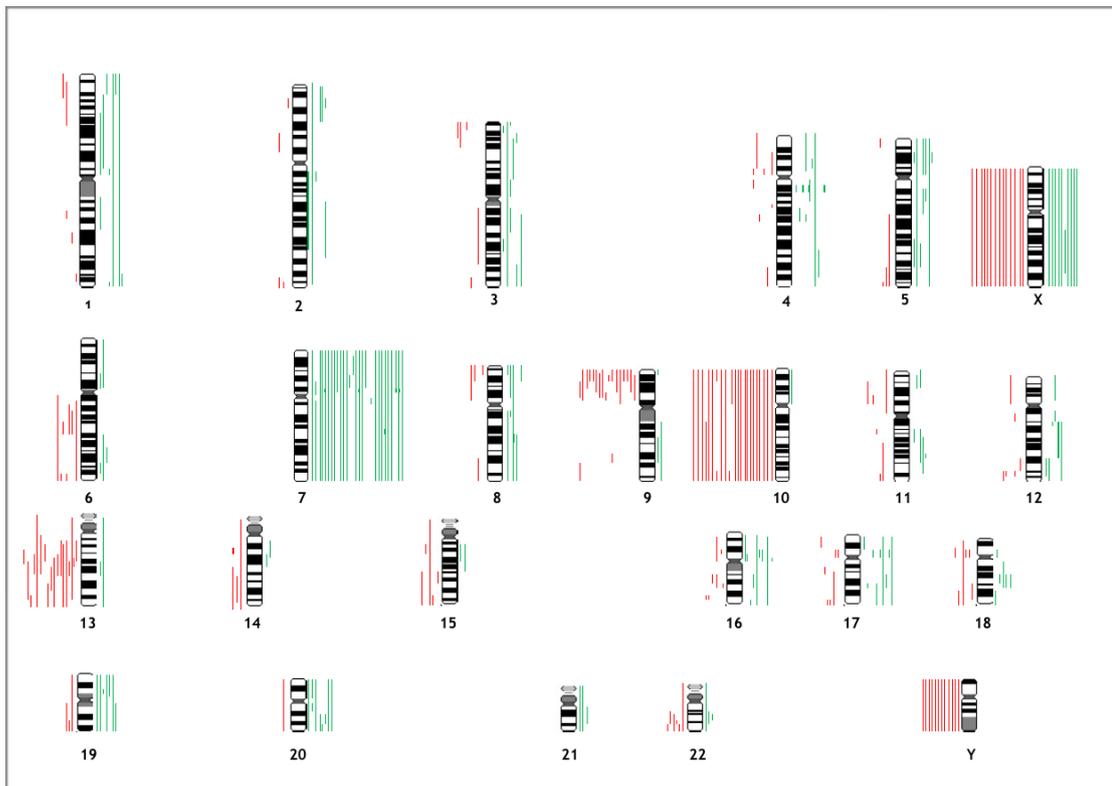


Abb. 21: Genetische Veränderungen der Kontroll - Gruppe,

— = Gewinne, — = Verluste

Tab. 13: genetische Veränderungen aller Kontroll-Fälle (CGH-Analyse)

Fall	Histologie	Alter/ Geschlecht	CGH-Ergebnisse
1553/07	pGBM	82/w	+2q12q33,+3p24.2p25,+3q22q24,amp4q12,+7,-9p13p24, -10,+11q13.2q14.1,-13q12.1q14.3, -15q21.3q23,+16p,+17p12pter,+18q23qter
1042/12	pGBM	83/w	-2p23p24,-4p12p15.1,-4q21.2q22,amp7p12,+7q,-10,-13q14.1q21.1, -16q13q21,-18q12.3q22
1117/05	pGBM	71/m	+3,+7,-9p21pter, -10, -13,-14,+16p11.2p13
139/10	pGBM	73/w	+1p13.1p33, +1q21.1q31, +2, +3p12p14.1, +3p25pter, +3q13.1q21, +4q22q24, +5p14, +7, +8p23.1pter, +8q11.2qter, +9p23pter, +9q22.1q33, -10, +13q14.1q21.3, +14q12q21, -16p12p13.1, +16q23qter, -17p11.1p11.2, -18p11.2p11.3, -19, -22
1588/09	pGBM	70/w	+1p21p36.1, +3p14.1p24.1, -3q11.1q26.1, +5q23.2q32, +7, amp 7p12, -9p22pter, -10, +12q21.3q24.3, -17p11.1p11.2, +17q21.3q22, -18p11.1p11.3, +19, +20, +X, -Y
1191/08	pGBM	68/w	+1p36.1pter,-1q42.2q43,amp4q12,+7,-10, -13q14.1q21.3,+16q11.2q21,-17q12qter,+18p11.1p11.2
1355/08	pGBM	52/w	-1q31, +6q24q26, +7, -8p21.1pter, -9p22pter, -10, +11p15.1p15.4, +12q21.3qter, -13q12.2qter, +15q11.1q15, +16, -18, -19q13.2qter, +20p, +20q11.1q12, +21, -22q13.2qter, -X, -Y
922/12	pGBM	54/m	+1p13.1p13.3,+1q43qter,+2q12q14.1, -2q37.1qter,+4p13pter,+4q24q25,+5,+7,+8p12pter,+8q12q13, -10,+11p15.1pter,+11q13.1q23.3, -13q12.1q21.3,+16p12p13.1,+17p11.1p12,+19q13.1q13.2,+22, (-X)
881/10	pGBM	40/w	+1,+2p21pter,-5q14qter,-6q14q21,-9p24pter,-9q31q33,-10,-11p, -12q12q13.1,-12q24.1q24.3, -13q14.1q21.2,+16p11.2p13.1,+17q21.1qter,+22q11.2q12.3
1229/08	pGBM	72/m	-1p31.2p36.1,-1q23q24,+3q26.1qter,amp4q12,+4q11q21.2, -4q33qter,-6q13q21,+7,-9p23p24,-10,-11q14.1qter,-13q14.1qter, -14q22q32.1,+16,+17p11.1p12,-22q13.1q13.2

Ergebnisse

375/10	pGBM	72/m	+1p36.1pter, +2p21pter, -4p11p12, +6p12p21.3, -9p13p21, -13q21.1q31, +15q13q21.3, +17, +20q12qter
1988/09	pGBM	68/m	amp7p12, -10p, +11q13.5q23.3, -12p, +20q31.1qter, +22q12.3q13.1
838/12	sGBM	70/m	+7,-9p,-10,+19
926/09	pGBM	58/m	-3q27qter, -6q26qter, +7, amp7p12, -8p23.1pter, -9p13pter, -10, -16p, +16q11.2q21, -18q21.3qter, +19, +20q12q13.2, -22q12.3qter
983/04	pGBM	54/m	-3p24.3pter,-4q23q25,-6q16.3q21,-8q24.1qter,-10,-11q23.3qter, -13q22qter,-17q25qter, (-X)
837/12	pGBM	54/w	+7, -8p22pter, -9p13p24, -10, +17q21.2q22, +18q12.1q12.3, +19p, (+X)
1078/09	pGBM	54/m	+1,-3p21.3pter, +3q13.2qter, -4p14pter, +4q28q34, +5p, +5q11.2q13.2, -5q33.1qter, +6p, +6q21qter, +7, +8, -9p23pter, +12p, +12q11q13.1, -13, -14q21qter, amp 14q11.2q12, +17,+19,-20,+21, (+Xp, +Xq11.1q21.3)
776/05	pGBM	50/m	+3p23p24.3, +5q23.3q31.1, +7p14p22
1861/03	pGBM	43/m	+2p23p24, +2q22q34, +6q22.3q24, +7, -8p, -9p23pter, -10, amp12q13.12q21.3, +13, -15q12q14, +18q12.1q21.2, -22q11.2q13.1
1216/11	pGBM	50/m	+7p11.1pter,amp7p12,-9p21pter, -10q21qter,+11q21q22.3,+12q13.1qter,-13q14.1q21.3,-22q13.3qter, (-X,-Y)
1110/05	pGBM	41/m	+7p
1457/03	pGBM	37/m	-5q34qter, +8q21.3qter, +10p11.2pter, -12q24.1q24.3, -13q33qter, +18q12.2q21.1
378/12	pGBM	59/w	+1q42.2qter,-4p11p13,-4q11q13.1,+5p14p15.2, -6q,+7,amp7p12,+8p22pter,-9p13pter,-10,-11p12p14, -13q14.3q33,+14q11.1q13,-16q23q24,-17p13pter, -18p11.1p11.3,+19q,+20,+21q11.1q22.1

Ergebnisse

1583/08	pGBM	68/w	-2p23p24, -5q21q31.1, +5q33.1qter, -6q12q14, +7, +8p23.1pter, -8p11.1p12, -9q22.3qter, -10, -13q33qter, +16p11.2p13.1, +17p11.1p12, +19p13.1p13.3, +20, +21q11.2q22.1, -22q11.2qter
655/09	pGBM	71/w	-6q12qter,+7,-9p21pter,-10,-12q21.3q23,-13q12.3qter,+20,(+X,-Y)
291/09	pGBM	51/w	+4p14, -6q26qter, +7p13pter, +18q11.1q21.1, +Xq21.2q27, (-Y)
156/12	sGBM	76/w	1p34.2pter,+5,+7,+9q13qter,-15q21.3qter,-16q11.2q13, -17q11.2q21.1,(+X,-Y)
1286/08	pGBM	65/m	+7, -10q25.1qter, +16p12, (-X, -Y)
1458/10	pGBM	49/w	+7q11.2, -13q12.3q14.1, -15q26.1qter, (-Y)
1431/05	pGBM	69/w	-2p12p15, -2q37.1qter, -3p24.1pter, amp4q12, -5p15.3pter, +7, -9p13p23, -9q33qter, -10, -11p12p15.3, -12q24.1qter, -13q13q21.1, -16q23q24, (-Y)
T 6929	pGBM	50/m	+1p21p31.2, +3q12q13.2, +3q25.3qter, -4p16pter, +6q12q13, +7, -9p21p23, -9q13q23.1, -10, -11q23.1q23.3, -12q22qter, -13q12.3qter, -17, -18p11.1p11.3, -20, +Xq13q23
338/12	pGBM	72/m	+7,-9p21pter,-11q12q13.2,+17p11.2p12,+20,(-X)
791/08	pGBM	56/m	Keine Veränderungen
663/12	pGBM	65/w	+4, +7, -10p14pter, -10q25.2qter, +12q13.1q13.3, -15, (+X, -Y)
754/12	pGBM	56/m	+5p, +5q11.2q14, +7, -10, -13q11q21.1, -17q24qter, -19q, (-X)
2512/11	pGBM	42/m	+4q,amp4q12,-5q13.3qter,-7p14pter,+7q,+8p,-9q34.1qter, -10q22.3qter,-11p,-11q24qter,-12p,-12q14q23,-13,-18p11.2pter, -18q22qter,-21,-Xp

4.2.4 Vergleich häufiger genetischer Veränderungen beider Gruppen

Die zu erwartenden genetischen Veränderungen konnten sowohl in der Carmustin- als auch der Kontrollgruppe gezeigt werden. Tabelle 14 veranschaulicht diese übersichtlich.

Tab. 14: Vergleich häufiger genetischer Veränderungen beider Gruppen

Veränderung	Carmustingruppe (Häufigkeit in %)	Kontrollgruppe (Häufigkeit in %)
Amplifikation 4q12	6/36 (17 %)	5/36 (14 %)
Zugewinn von Chromosom 7	30/36 (83 %)	31/36 (86 %)
Amplifikation 7p12	8/36 (22 %)	6/36 (17 %)
Verlust auf 9p	16/36 (44 %)	18/36 (50 %)
Verlust auf 10q	23/36 (64 %)	25/36 (69 %)
Gewinn auf 12q	9/36 (25 %)	6/36 (17 %)
Verlust von Chromosom 13	13/36 (36 %)	21/36 (58 %)
Gewinn von Chromosom 20	8/36 (22 %)	9/36 (25 %)
Verlust von Chromosom 22	8/36 (22 %)	7/36 (19 %)

Die Häufigkeiten der beobachteten Veränderungen hielten sich in beiden Gruppen nahezu die Waage. Lediglich der Verlust von Chromosom 13 konnte in der Kontrollgruppe stärker nachgewiesen werden als in der Carmustingruppe (36 % zu 58 %). Die mit Abstand häufigsten tumorspezifischen Modifikationen betrafen Gewinne von Chromosom 7 (83 % zu 86 %), sowie Verluste des langen Arms von Chromosom 10 (64 % zu 69 %) und Verluste des kurzen Arms von Chromosom 9 (44 % zu 50 %).

4.3 Einfluss genetischer Veränderungen auf Therapieansprechen und Überlebenszeit

Die Bedeutung genetischer Veränderungen und deren Einfluss auf die mediane Überlebenszeit der Glioblastompatienten wurde mit Hilfe zweier Methoden überprüft, der Kaplan-Meier-Analyse und der univariaten Cox-Regressionsanalyse. Das verwendete Konfidenzintervall lag bei 95 %, das alpha-Signifikanzniveau < 0.05 .

4.3.1 Einfluss des Patientenalters und Patientengeschlechts

Die Altersverteilung der untersuchten 72 Glioblastompatienten zeigte in beiden Gruppen (Carmustin und Kontrolle) ein ähnliches Verteilungsmuster. Zur besseren Veranschaulichung sind diese in Abb. 22 dargestellt. Das mittlere Erkrankungsalter lag in beiden Gruppen bei ca. 60 Jahren (Gliadel®: 60.22 Jahre; Kontrollen: 60.14 Jahre). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war der jüngste Patient 37 Jahre (Fall 1457/03, Kontrolle), der älteste 83 Jahre alt (Fall 1042/12, Kontrolle). Männer waren im Verhältnis 1:1.6 mal häufiger betroffen als Frauen.

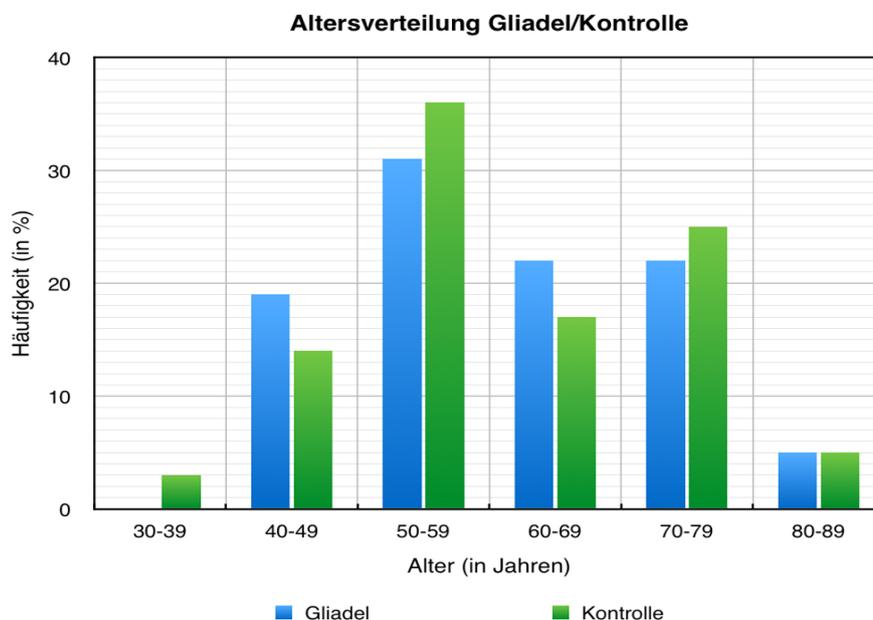


Abb. 22: Altersverteilung Gliadel®/Kontrolle

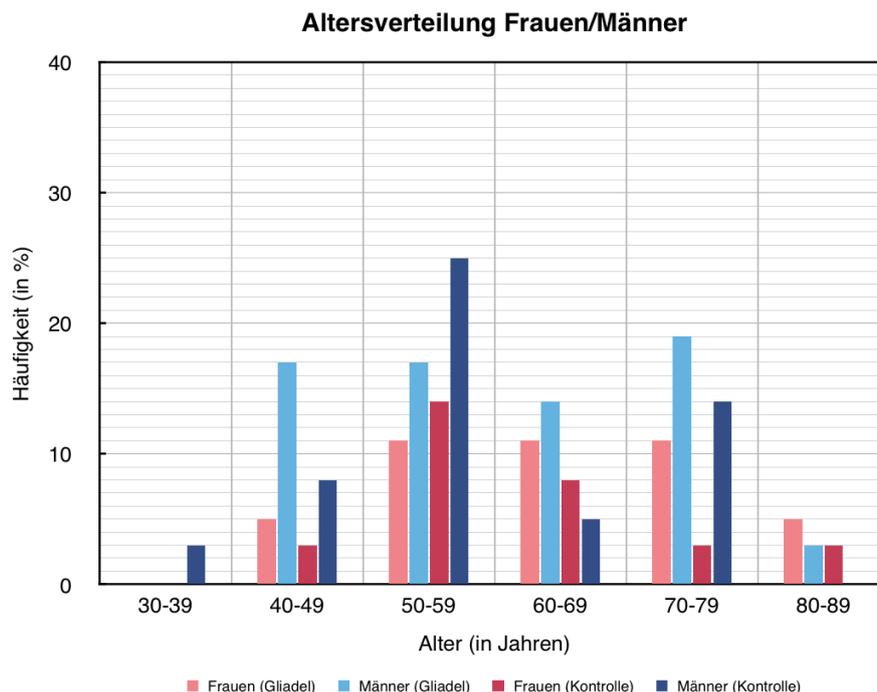


Abb. 23: Altersverteilung Männer/Frauen

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse konnte die Verkürzung der mittleren Überlebenszeit mit zunehmendem Lebensalter als hoch signifikant nachgewiesen werden ($p = 0.000061$; Abb. 23, Tab. 15). Je höher das Erkrankungsalter bei Diagnosestellung war, desto ungünstiger die Prognose für den Patienten. Glioblastompatienten, die das 60. Lebensjahr bereits überschritten hatten, lebten im Schnitt in der Carmustingruppe 3.9 Monate versus 2.77 Monate in der Kontrolle. Patienten unter 60 Jahre wiederum wiesen eine mediane Überlebenszeit von 8.8 Monaten in der Carmustin- gegenüber 9.57 Monaten in der Vergleichsgruppe auf.

Das Geschlecht spielte jedoch im untersuchten Kollektiv keine Rolle ($p = 0.504$).

Tab. 15: univariate Cox-Regressionsanalyse Alter und Geschlecht

Variable	Hazard Ratio	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
Alter	1.047	1.024-1.072	0.000061
Geschlecht	1.188	0.715-1.197	0.504

4.3.2 Wahl des Therapieregimes

Zu Prüfen war weiterhin, ob eine Überlegenheit des Chemotherapeutikums Carmustin gegenüber Temozolomid nachweisbar ist.

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse konnte jedoch kein Effekt auf die mediane Überlebenszeit der Glioblastompatienten aufgezeigt werden ($p = 0.562$, Tab. 16). Dies wiederum bedeutet, dass keine Überlegenheit der geprüften Therapieregime gegenüber dem anderen vorlag (Abb. 24).

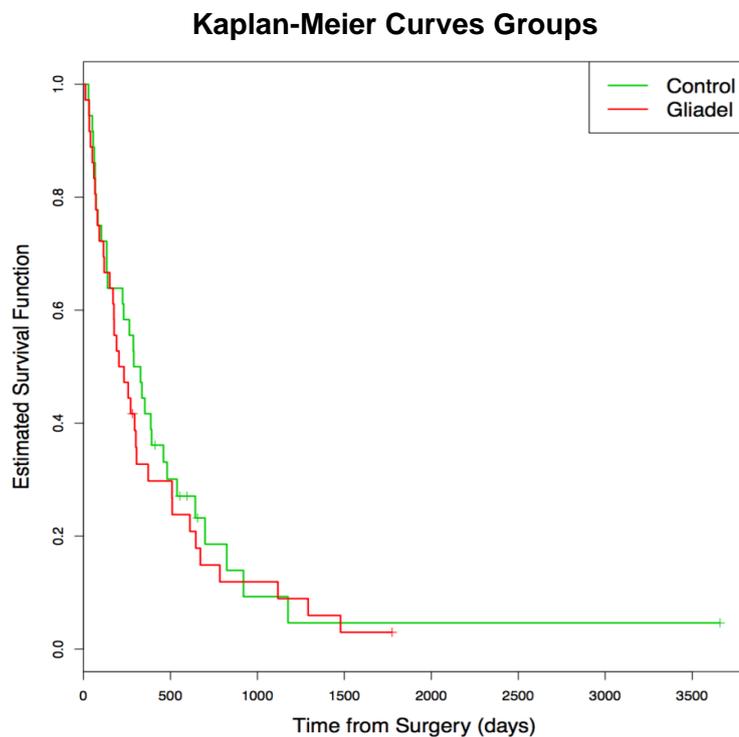


Abb. 24: Kaplan-Meier-Analyse, Vergleich Gliadel® versus Kontrollgruppe

Tab. 16: Univariate Cox-Regressionsanalyse Therapieregime

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
Carmustin	0.707 - 0.865	1.156	0.562

4.3.3 Einfluss genetischer Veränderungen auf die Überlebenszeit

4.3.3.1 Glioblastome mit Amplifikation von 4q12

17 % der Glioblastompatienten aus der Carmustingruppe (6/36) sowie 14 % aus der Kontrollgruppe (5/36) zeigten in der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) Amplifikationen der Chromosomenregion 4q12.

Die mediane Überlebenszeit der Patienten lag in der Carmustingruppe bei 4.83 Monaten und in der Kontrollgruppe bei 3.43 Monaten. Das Vorhandensein einer Amplifikation zeigte sich für die Carmustingruppe sowohl in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ($p = 0.0143$, Tab.: 17) als auch der Kaplan-Meier-Analyse ($p = 0.00835$) als hochsignifikant.

Tab. 17: univariate Cox-Regressionsanalyse amp4q12

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
amp4q12	1.181 - 4.496	2.305	0.0143

4.3.3.2 Glioblastome mit Zugewinn von Chromosom 7

Als das häufigste detektierte Ereignis der komparativen vergleichenden Hybridisierung (CGH) zeigte sich in beiden Gruppen der Zugewinn von Chromosom 7 (Carmustingruppe: 83 %, Kontrollgruppe: 86 %).

Die mediane Überlebenszeit betrug in der Carmustingruppe bei Chromosom 7-Gewinn 5.8 Monate und in der Kontrollgruppe 4.6 Monate. Demgegenüber verkürzte sich die mediane Überlebenszeit bei Patienten ohne Zugewinn von 7p in der Carmustingruppe minimal auf 5.48 Monate.

Ergebnisse

Lediglich in der Kontrollgruppe verlängerte sich die mittlere Überlebenszeit auf 9.6 Monate.

Patienten ohne Chromosom 7-Gewinn waren in der Carmustingruppe im Schnitt 58 Jahre und in der Kontrolle 52 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter bei Patienten mit Zugewinn lag in beiden Gruppe bei 61 Jahren.

Ein statistisch signifikanter Effekt zeigte sich bei der Wahl des Chemotherapeutikums weder in der Kaplan-Meier- noch in der Cox-Regressionsanalyse

($p = 0.81$ und $p = 0,227$, Tab.: 18).

Tab. 18 univariate Cox-Regressionsanalyse Chromosom 7

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
Zugewinn Chromosom 7	0.759 - 3.197	1.558	0.227

4.3.3.3 Glioblastome mit Amplifikation von 7p12

In der Carmustingruppe konnten 22 % (8/36) Tumoren mit EGFR-Amplifikation (7p12) detektiert werden, sowie 17 % (6/36) der Tumoren in der Kontrolle.

Patienten, bei denen diese chromosomale Veränderung auftrat, hatten in der Carmustingruppe eine mediane Überlebenszeit von 4.92 Monaten. In der Kontrollgruppe lag diese nur bei 3.42 Monaten. Bei allen 14 Fällen mit amplifizierten EGFR-Rezeptor handelte es sich um primäre Glioblastome.

Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug in der Carmustingruppe 60.5 Jahre und in der Vergleichsgruppe 63.5 Jahre.

Tab. 19: univariate Cox-Regressionsanalyse amp7q12

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
amp7p12	0.813 - 2.681	1.476	0.200

Ergebnisse

Ein signifikanter Einfluss der 7p12-Amplifikation konnte trotz einer verlängerten Überlebenszeit der carmustinbehandelten Patienten gegenüber der Kontrolle weder in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ($p = 0.200$, Tab.: 19) noch in der Kaplan-Meier-Analyse nachgewiesen werden ($p = 0.719$).

4.3.3.4 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 9p

Ein sehr häufiges Ereignis der untersuchten Tumoren war der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 9. 44 % (16/36) der Glioblastome in der Carmustingruppe wiesen diese chromosomale Veränderung auf, sowie jeder zweite Tumor der Kontrollgruppe (50 %, 18/36)

Patienten mit 9p-Verlust hatten unter Carmustin-Wafertherapie eine mediane Überlebenszeit von 5.87 Monaten gegenüber 3.95 Monaten jener Patienten, die nach Stupp-Protokoll behandelt wurden.

Demgegenüber lag die mediane Überlebenszeit der Patienten, die keine Veränderung des kurzen Armes von Chromosom 9 aufwiesen, in der Carmustingruppe bei 5.73 Monaten und 9.2 Monate in der Kontrollgruppe.

Die Verlängerung der medianen Überlebenszeit in der Carmustingruppe zeigte jedoch weder in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ($p = 0.753$, Tab. 20) noch im Kaplan-Meier-Modell einen signifikanten Effekt ($p = 0.82$). Auch bei unverändertem Chromosomenarm 9p hatte die Wahl des Chemotherapeutikums keinen Einfluss ($p = 0.245$).

Tab. 20: univariate Cox-Regressionsanalyse Chromosom 9

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
9p-Verlust	0.663 - 1.76	1.081	0.753

Ergebnisse

Die Patienten der Carmustingruppe mit 9p-Verlust waren im Durchschnitt 4 Jahre älter als jene der Kontrollgruppe (Carmustingruppe: 66 Jahre; Kontrollgruppe: 62 Jahre). Das Alter der Glioblastompatienten ohne Veränderung von 9p lag hingegen im Mittel bei 55 Jahren in der carmustinbehandelten Gruppe gegenüber 59 Jahren in der Kontrollgruppe.

4.3.3.5 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 10q

Zweithäufigstes Ereignis in der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) war mit 64 % (23/36) der Tumoren in der Carmustingruppe und 69 % (25/36) der Tumoren in der Vergleichsgruppe der Verlust des langen Armes auf Chromosom 10.

Die mediane Überlebenszeit lag bei Patienten mit 10q-Verlust in der Carmustingruppe bei 8.57 Monaten gegenüber 3.43 Monaten in der Kontrollgruppe.

Patienten ohne chromosomale Veränderung lebten im Mittel 5.13 Monate in der Carmustingruppe und 9.63 Monate in der Kontrollgruppe.

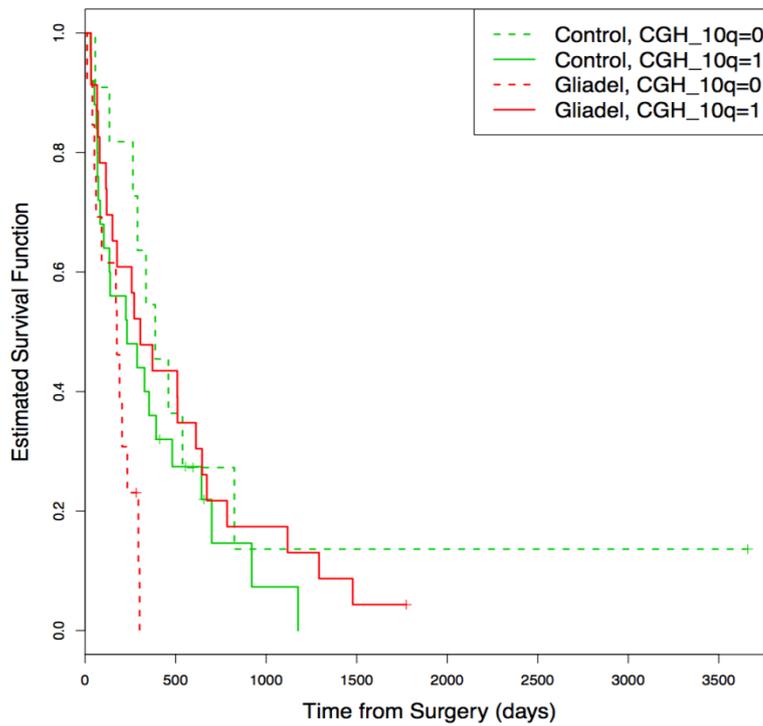
Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug bei carmustinbehandelten Patienten mit 10q-Verlust 58 Jahre, in der Kontrolle 65 Jahre.

Glioblastompatienten ohne chromosomale Veränderung wiesen hingegen ein mittleres Erkrankungsalter von 60 Jahren in der Carmustin- und 54 Jahre in der Kontrollgruppe auf.

Der Verlust des langen Armes von Chromosom 10 zeigte vor allem in der Gruppe carmustinbehandelter Patienten in der Kaplan-Meier-Analyse ($p = 0.0123$) einen signifikanten Effekt gegenüber der Kontrolle. Hier zeichnete sich jedoch das Fehlen genetischer Aberrationen des 10er Chromosoms in Kombination mit Carmustin als Überlebenszeit verkürzend ab. Unter genannten Therapieregime minimierte sich diese um mehr als 67 % (mit 10q-Verlust: 8.57 Monate versus ohne 10q-Verlust: 5.13 Monate).

Die Wahl des Chemotherapeutikums zeigte bei carmustinbehandelten Patienten dieser Studie und unverändertem 10q-Status in der Kaplan-Meier-Analyse gegenüber der Therapie nach Stupp-Protokoll einen hochsignifikanten Effekt ($p = 0.00219$, Abb. 25).

Kaplan-Meier Curves CGH 10q



Gliadel®
ohne 10q-Verlust:
p = 0.00219

Abb. 25: Kaplan-Meier-Analyse 10q, Vergleich Gliadel® versus Kontrolle, 0 = keine Deletion, 1 = Deletion 10q

Dieser konnte allerdings in der univariaten Cox-Regressionsanalyse nicht aufgezeigt werden (p = 0.507, Tab.: 21)

Tab. 21: univariate Cox-Regressionsanalyse 10q

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
10q-Verlust	0.494 - 1.416	0.836	0.507

4.3.3.6 Glioblastome mit Verlust auf Chromosomenarm 13q

36 % (13/36) der carmustinbehandelten und 58 % (21/36) der nach Stupp-Protokoll therapierten Patienten wiesen einen Verlust des langen Arms von Chromosom 13 auf.

Konnte ein 13q-Verlust detektiert werden, lag die mediane Überlebenszeit der Carmustingruppe bei 9.03 Monaten, die der Kontrollgruppe bei 4.47 Monaten.

Blieb eine chromosomale Veränderung des 13er Chromosoms aus, so reduzierte sich die mediane Überlebenszeit in der Carmustingruppe auf 4.93 Monate. In der Vergleichsgruppe erhöhte sie sich hingegen auf 7.5 Monate.

Auch in der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich ein 13q-Verlust in der Gruppe carmustinbehandelter Patienten als überlebenszeitverlängernd und statistisch signifikant ($p = 0.0364$). Ein vergleichbarer Effekt konnte für die Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden ($p = 0.841$), obwohl durchaus Differenzen zwischen den Überlebenszeiten nachweisbar waren.

Entsprechendes gilt für die univariate Cox Regressionsanalyse. Hier konnte kein bedeutender Einfluss des 13q-Status aufgezeigt werden ($p = 0.136$, Tab.: 22).

Tab. 22: univariate Cox-Regressionsanalyse 13q

Variable	95 % Konfidenzintervall	Hazard Ratio	p - Wert
13q-Verlust	0.416 - 1.126	0.685	0.136

Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung variierte in beiden Gruppe sowohl mit 13q-Verlust (Carmustin: 60 Jahre, Kontrolle: 60 Jahre) als auch ohne 13q-Verlust (Carmustin: 61 Jahre, Kontrolle: 61 Jahre) kaum.

4.3.4 Weitere genetische Veränderungen der untersuchten Glioblastome

Obgleich weitere typische genetische Veränderungen der Glioblastome beider Gruppe detektiert werden konnten, zeigten diese keine signifikanten Unterschiede der Überlebenszeiten.

Ein vergleichsweise häufiges Ereignis war der Verlust von Chromosom 17. In 31 % (11/36) der Carmustinbehandelten Glioblastome und 22 % (8/36) der nach Stupp-Protokoll therapierten Tumoren konnte diese chromosomale Veränderung nachgewiesen werden. Ein prognostisch bedeutsamer Einfluss bestätigte sich in beiden Gruppen weder in der Kaplan-Meier- ($p = 0.734$) noch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ($p = 0.977$).

Ähnliches gilt für Aberrationen der Chromosomen 12, 20 und 22. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschieden der Überlebenszeiten zwischen beiden Gruppen beobachtet werden.

Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse genetischer Veränderungen in Tab. 23 zusammengefasst.

Tab. 23: weitere genetische Veränderungen (Kaplan-Meier-Analyse, univariate Cox-Regressionsanalyse)

Aberration	Gruppe	Log Rank Test (Diff Carmustin/Kontrolle)	univariate Cox-Regression
12q- Gewinn	Carmustin (n = 9) Kontrolle (n = 6)	$p = 0.717$	$p = 0.973$
Verlust Chromsoms 17	Carmustin (n = 11) Kontrolle (n = 8)	$p = 0.734$	$p = 0.977$
Gewinn Chromosom 20	Carmustin (n = 8) Kontrolle (n = 9)	$p = 0.864$	$p = 0.178$
Verlust Chromsoms 22	Carmustin (n = 8) Kontrolle (n = 7)	$p = 0.774$	$p = 0.851$

4.4 Korrelation des MGMT- und p15-Status

Inaktivierungen der Genexpression erfolgt nicht nur durch Hypermethylierung des entsprechenden Promotors, sondern auch durch Deletion des jeweiligen Genlokus. Tabelle 24 veranschaulicht daher Zusammenhänge zwischen Methylierungsstatus und Deletion in Korrelation zur medianen Überlebenszeit.

Auffällig ist, dass Patienten eine durchschnittliche Lebenszeitverlängerung von etwa 80 % erfahren, wenn p15 unmethyliert und keine 9p21-Deletion nachweisbar ist

(p15 methyliert, 9p21 deletiert: 3.97 Monate versus p15 unmethyliert, ohne Deletion: 7.15 Monate). Dieses Ergebnis verdeutlicht erneut die enorme Bedeutung des p15-Status. 42 % der Glioblastompatienten wiesen einen unmethylierten Promotor mit fehlender 9p21-Deletion auf. 10 % der Tumoren besaß hingegen sowohl die Promotormethylierung als auch eine Deletion des Genlokus.

Am höchsten war jedoch die mediane Lebenserwartung, wenn eine Promotormethylierung von MGMT vorlag, ohne dass der jeweilige Genlokus verändert war. 17 % der Patienten zeigten diese genetische Veränderung und lebten im Median 9.42 Monate.

Bei unmethyliertem MGMT-Status, aber deletierten Genlokus, lebte das untersuchte Patientenkollektiv im Median lediglich 5.45 Monate.

Tab. 24: Übersicht über Methylierungsstatus von MGMT und p15 in Korrelation zu detektierten Deletionen

	p15				MGMT			
	Methyliert		Unmethyliert		Methyliert		Unmethyliert	
	del 9p21	ohne Deletion	del 9p21	ohne Deletion	del 10q26	ohne Deletion	del 10q26	ohne Deletion
Anzahl Fälle (n)	7/72 (10 %)	7/72 (10 %)	28/72 (39 %)	30/72 (42 %)	26/72 (36 %)	12/72 (17 %)	24/72 (33 %)	12/72 (17 %)
mediane ÜLZ [Monate]	3.97	5.83	5.73	7.15	6.21	9.42	5.45	5.78

5. Diskussion

5.1 Studienauswahl und Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit umfasst die Ergebnisse einer retrospektiven Studie, in die Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastom eingeschlossen wurden. Diese Patienten wurden in der Universitätsklinik für Neurochirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg untersucht und therapiert.

Anschließend erfolgte die Trennung bzw. Zuordnung der gewonnenen Patientendaten mit Hilfe der Matched-Pairs-Analyse. Diese bewährte Studientechnik ermöglicht die Untersuchung zweier Gruppen mit unterschiedlichen Therapiekonzepten, die sich jedoch in festgelegten Merkmalen gleichen. Dabei spielt das Jahr der Diagnosestellung nur eine untergeordnete Rolle. Anhand dessen kann eine zuverlässige Aussage über die angewandten Therapiestrategien getroffen werden.

Voraussetzung für den erfolgten Paarvergleich war eine Übereinstimmung in:

- Alter
- Karnofsky-Score und
- Resektionsausmaß

Als nachteilig ist sicherlich zu erwähnen, dass eine exakte Gegenüberstellung nicht immer gelingt. Patienten, die den Diagnosekriterien zwar entsprachen, aber keinem Match zugeordnet werden konnten, wurden daher ausgeschlossen.

Fallzahlen:

Der Beobachtungszeitraum dieser Studie erstreckte sich von 2003 bis 2014. Insgesamt konnten 72 Patienten rekrutiert werden. Je 36 Patienten erhielten ein identisches Therapieschema. Nichts desto trotz unterliegt die Interpretation der Ergebnisse gewissen Einschränkungen.

Bedingt durch die niedrigere Inzidenz von Glioblastomen gegenüber anderen malignen Tumoren ist die untersuchte Fallzahl vergleichsweise gering. Die statistische Aussagekraft ist dadurch reglementierter.

Diskussion

Unabhängig davon zeigten sich in ähnlichen retrospektiven Studien mit geringer Patientenzahl jedoch vergleichbare Ergebnisse (Noel et al, 2012; Wemmert et al., Dong et al, 2006).

Alter:

Als einer der wichtigsten prognostisch limitierenden Faktoren etablierte sich bereits in frühen Studien das Lebensalter der Patienten bei Diagnosestellung (Salcman 1980, Walker 1980, Lutterbach 2005). Demgegenüber bestätigten zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, dass ein jüngeres Erkrankungsalter die mittlere Überlebenszeit der Glioblastompatienten verbessert (Salford 1988, Salcman 1993).

Folglich wird jüngeren Patienten mit hohen Karnofsky-Index bei Erstdiagnose und vollständiger Resektion des Tumors die beste Langzeitprognose zugeschrieben (z.B.: Chandler et al., 1993; Pollak et al., 1997; Scott et al., 1998).

Die vorliegende retrospektive Studie führte zu vergleichbaren Ergebnissen. In der Carmustingruppe befanden sich 16 Patienten, die jünger als 55 Jahre bei Erstdiagnose waren, in der Kontrollgruppe 15 Glioblastompatienten. Die mediane Überlebenszeit betrug 10.48 Monate bei den carmustinbehandelten Patienten und 9.63 Monate in der Vergleichsgruppe. Demgegenüber verkürzte sich die mediane Überlebenszeit um mehr als 60 % bei einem Erkrankungsalter über 55 Jahre. In der Carmustingruppe traf dies auf 20 Patienten (mediane ÜLZ: 3.9 Monate) zu, in der Vergleichsgruppe auf 21 Patienten (mediane ÜLZ: 3.17 Monate). Die nachfolgende Grafik veranschaulicht die Ergebnisse (Abb. 26).

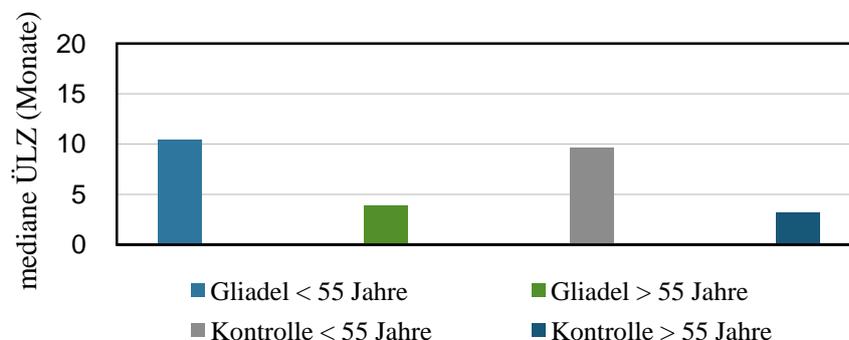


Abb. 26: Einfluss des Erkrankungsalters

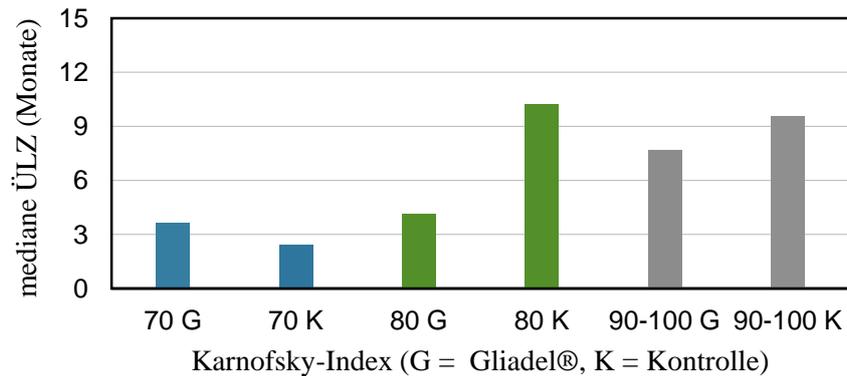


Abb. 27: Karnofsky-Skala Gliadel®/Kontrolle

Karnofsky-Performance-Skala (KPS):

Identisch zum Erkrankungsalter der Glioblastompatienten bei Diagnosestellung minimiert auch ein niedriger Karnofsky-Skala das Outcome der Betroffenen (Scott et al, 1999; Krex et al, 2007).

In diese Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, deren Karnofsky-Status über 70 % betrug. Über den Beobachtungszeitraum von 11 Jahren gelang jedoch besonders in der Carmustingruppe die Erfassung des exakten Scores nicht immer. Bei 6 Patienten aus dieser Gruppe fehlt der KPS (Karnofsky Performance Scale). Simultan dazu mussten 2 Patienten aus der Carmustingruppe und 5 Patienten aus der Kontrollgruppe zensuriert werden, da sie entweder noch lebten oder nicht mehr zur Nachkontrolle erschienen. Eine statistische Auswertung bei reduzierter Fallzahl wurde daher nicht durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung zeigt jedoch eine Tendenz an (Abb. 27).

Komorbidität:

Begleiterkrankungen treten mit zunehmenden Alter gehäuft auf. Obgleich das Patientenalter und der Karnofsky-Status mittlerweile anerkannte prognostische Faktoren sind, spielen Komorbiditäten eine nicht unwesentliche Rolle (Brandis und Monfardini et al., 2003). Besonders bei älteren Patienten erschweren diese die Wahl und Höhe der Chemotherapie und führen häufiger zu Nebenwirkungen und intensiverer Überwachung.

Physiologische und pharmakokinetische Veränderungen mit zunehmendem Alter sind genauso entscheidend wie die körperliche Leistungsfähigkeit zu Therapiebeginn. Zudem scheint die Rate von Arzneimittelinteraktionen durchaus höher als bei jüngeren Patienten (Bokemeyer et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Komorbiditäten nicht als Ausschlusskriterium betrachtet, müssen allerdings bei der Patientengegenüberstellung und -auswertung bedacht werden.

Resektionsausmaß:

Dank intensiver Forschungsbemühungen und multimodaler Therapiekonzepte gelang es in den letzten Jahrzehnten die mediane Überlebenszeit von Glioblastompatienten auf ca. 15 Monate zu verbessern (Stupp et al, 2005; Derek et al, 2011). Ein weiterer wesentlicher etablierter Prognosefaktor ist dabei das Resektionsausmaß der tumorösen Erkrankung im Rahmen des operativen Vorgehens (Lacroix et al, 2001; Chang et al, 2004; Stummer et al, 2008).

Für ein optimales Resektionsergebnis wurde die chirurgische Intervention daher durch unterstützende diagnostische Maßnahmen wie 5-ALA (nähere Erläuterungen: Kapitel: 2.3.1.) ergänzt.

Nichts desto trotz ist die vollständige Resektion des Glioblastoms nicht immer möglich. Das diffuse, invasive Wachstum limitiert häufig die Therapieoptionen und kann trotz maximalem Ausreizen der Therapiemöglichkeiten nicht zu Verlängerung der Überlebenszeit führen.

Heterogenität des Tumormaterials:

Die ausgeprägte Mannigfaltigkeit des Glioblastoms im histologischen Explantat reflektiert zugleich die genetische Heterogenität dieser glialen Tumorart. Nicht nur stark variierende Zelltypen werden beobachtet, sondern auch makroskopische Parenchymunregelmäßigkeiten (Liss et al., 1962).

Als problematisch deutet sich vor allem an, dass sich bereits intratumoral unterschiedlich differenzierte Zellen und maligne Anteile finden lassen.

Bis zu 50 % der Gliome enthalten sowohl oligodendrogliale als auch astrozytäre Anteile, 80 % unterschiedliche Malignitätsstufen und 60 % sowohl niedrig-gradige als auch maligne Komponenten. Je kleiner die untersuchte Gewebeprobe ist, desto größer ist folglich das Risiko niedrig-maligne Anteile zu erfassen.

Vor allem dann, wenn die Infiltrationszone des Glioblastoms erreicht wird, in der sich zumeist Parenchymanteile befinden, die einem Gliom Grad II entsprechen können (Mooskopp und Wassmann: Neurochirurgie, 2014).

Da es sich in dieser Arbeit um kryokonservierte Tumorproben handelt, die nur ein Teilstück des eigentlichen Resektates ausmachen, kann es zur Diskrepanz zwischen histologisch gesicherter Diagnose und untersuchtem Bereich kommen. Auch die Erfassung von Normalgewebe kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, da dies makroskopisch häufig kaum ersichtlich und durch invasives Tumorwachstum nicht vermieden werden kann.

Die Extraktion der isolierten DNA erfolgte somit aus einem Gemisch differenter Zelltypen mit unterschiedlichen genetischen Varianten.

Um das Risiko einer fehlerhaften genetischen Untersuchung zu minimieren, hätte die Durchführung einer histologischen Begutachtung erwogen werden müssen. Da das Tumormaterial für die DNA-Isolation allerdings nur gering sein muss, wäre eine pathologische Untersuchung mit aussagekräftigem Ergebnis nicht realisierbar bzw. sinnvoll.

5.2 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

- Vor- und Nachteile

Diese auf dem Prinzip der In-Situ-Hybridisierung beruhende Methode findet bereits seit 1992 Anwendung in der molekularzytogenetischen Diagnostik (Kallioniemi et al., 1992a; Kallioniemi et al., 1992b; du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1994). Sie dient als Screening verschiedener genetischer Aberrationen, wie dem Nachweis numerischer Unterschiede, Deletionen und Amplifikationen einzelner Chromosomenabschnitte oder kompletter Chromosomen. Auf diese Weise lassen sich quantitative Veränderungen des kompletten Tumorgenoms ermitteln.

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt vor allem in der Möglichkeit, durch einmalige Durchführung der Analyse eine komplette Übersicht über genomische Veränderungen eines Tumors zu erhalten, ohne vorherige Kenntnisse chromosomaler Aberrationen. Damit ist die CGH den konventionellen molekulargenetischen Methoden deutlich überlegen.

Demgegenüber steht jedoch eine vergleichbar geringe Sensitivität. Das heißt, dass mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung nur relative Veränderungen der Kopienzahl betrachtet werden können.

Vollständige Gewinne oder Verluste ganzer Chromosomensätze sind nicht detektierbar, so dass z.B. Polyploidien nicht erkannt werden. Ebenso wenig sind balancierte Translokationen, Inversionen oder Insertionen nachweisbar (Kallioniemi et al., 1994).

Eine weitere Voraussetzung ist das Erreichen der untersten Auflösungsgrenze, um aussagekräftige CGH-Ergebnisse zu erzielen. Diese liegt bei 5-10 mB (Cher et al., 1994; Bentz et al., 1995 und 1998). Folglich können besonders kleine genetische Veränderungen oder Punktmutationen nicht oder nur eingeschränkt dargestellt werden.

Ein zusätzlicher limitierender Faktor ist die Präparation einheitlicher Metaphase-Chromosomen. Diese wiederum ist jedoch von Bedingungen abhängig, die jede für sich einen Störfaktor bilden. Dazu zählt unter anderem eine optimale Raumtemperatur, die Luftfeuchtigkeit und das Spreitungsverhalten der Chromosomen.

Zusätzlich entscheidet die Aufnahme und Detektion repräsentativer Chromosomen am Lichtmikroskop über den diagnostischen Erfolg. Defekte, überlagerte oder völlig destruierte Metaphase-Chromosomen verhindern eine adäquate Auswertung.

Um die Fehlerquote auf ein Minimum zu reduzieren, wurden in dieser Arbeit pro Tumorprobe mindestens 15, tendenziell 20 Metaphasen detektiert. Die Auswertung erfolgte gewissenhaft und in Zusammenarbeit mit erfahrenen Wissenschaftlerinnen.

5.3 Methylierungsspezifische PCR - Vor- und Nachteile

Die Untersuchung der DNA-Methylierung erfolgte nach dem Prinzip der von Clark und Frommer entwickelten Bisulfitmodifikation (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994). Auch geringe Mengen extrahierter DNA ermöglichen ein aussagekräftiges Ergebnis. Die Nachweisgrenze methylierter Proben liegt bei 0,1 %, was diese Methode als äußerst sensitives Verfahren ausweist (Herman et al., 1996). Vorteile, die der Bisulfitmodifikation zu zuschreiben sind, liegen vor allem in der Bestimmung des Methylierungszustandes jedes CpG-Dinukleotids. Das heißt, dass ein Nachweis nicht nur für die gesamte Population, sondern auch individuelle Zellen möglich ist (Dahl, Guldborg et al., 2003).

Erfolgsentscheidend ist allerdings die vollständige Denaturierung der DNA unter Vermeidung von vorzeitigen Renaturierungsprozessen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Doppelsträngige DNA entgeht der Bisulfitmodifikation, ebenso wie übermäßige Depurinierungsprozesse bei verstärktem DNA-Abbau (Huang et al., 2010).

Zusätzlich kann nur ein begrenzter Teil bestimmter im Interesse stehender Genloki bestimmt werden, für die spezielle Primerpaare eingesetzt werden. Diese unterscheiden schließlich zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA.

Die Durchführung erfolgte streng nach Protokoll und stets mit mindestens einer Positiv- und Negativkontrolle. Nicht eindeutige Ergebnisse wurden aus der Bewertung ausgeschlossen.

5.4 Einfluss genetischer Faktoren auf die Prognose

5.4.1 Promotormethylierung von MGMT

Der derzeit stärkste molekulare Marker, den Benefit einer Chemotherapie, allen voran Temozolomid, zu prognostizieren, ist der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors. Die Bedeutung dieses DNA-Reparaturenzyms zeichnete sich erstmalig 2005 als therapieentscheidend ab.

Im Rahmen der internationalen Studie der European Organisation for Research and Treatment for Cancer (EORTC) konnte bestätigt werden, dass eine adjuvante Strahlentherapie in Verbindung mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid das Überleben von Glioblastompatienten erhöht (Stupp et al, 2005; Hegi et al, 2005). Die konkomitante Radiochemotherapie brachte Patienten einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil (Stupp-Schema: 14.6 Monate versus 12.1 Monate bei alleiniger Strahlentherapie). Temozolomid erhöhte die 2-Jahres-Überlebensrate von 10 % auf 26 % (Stupp et al., 2005). Bei methyliertem MGMT-Promotor lag diese sogar bei 46 %. Etwa 45 % der untersuchten Patienten in der EORTC/NCIC-Studie wiesen eine Promotor-Hypermethylierung auf.

Nachfolgende Studien in zahlreichen Subgruppenanalysen bestätigten diesen Effekt mit einer vergleichbaren Methylierungsrate (Wemmert et al, 2006; Weller et al, 2009; Karayan-Tapon et al., 2010).

Neuere Untersuchungen, wie die NOA-08-Studie und Nordic Trial etablieren MGMT als Biomarker in der Therapie älterer Patienten (ab 65-70 Jahre) mit Glioblastom.

Dieser sollte als Stütze im Prozess der Entscheidungsfindung des primären Behandlungskonzeptes (primäre alleinige Radiatio versus Temozolomid plus Radiatio) herangezogen werden (Wick et al. 2012, Malmstroem et al. 2012). Dies führte letztlich zur Erkenntnis, dass eine alleinige, bevorzugt hypofraktionierte Strahlentherapie bei Patienten mit unbekanntem bzw. unmethyliertem MGMT-Promotor standardisiert wurde. Wohingegen Patienten mit nachgewiesener Promotor-Methylierung am ehesten von einer Chemotherapie mit Temozolomid, wahlweise in Kombination mit Strahlentherapie profitieren (Wick et al., 2012; Malmstroem et al., 2012).

Diskussion

Bestätigt werden konnte zudem, dass die kombinierte Radiochemotherapie mit anschließender alleiniger Chemotherapie (TMZ) von den untersuchten Patienten gut toleriert wurde (Taphoorn et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wiesen 50 % (36/72) der untersuchten Glioblastompatienten einen methylierten MGMT-Status auf. Die mediane Überlebenszeit betrug dabei 8.03 Monate. Demgegenüber lebten Patienten ohne methylierten Promotor median 5.78 Monate.

Unabhängig von der Therapiewahl erwies sich der MGMT-Status als guter prognostischer Faktor ($p = 0.041$). Diese Ergebnisse decken sich mit den bisher veröffentlichten Studien.

Betrachtet man jedoch den Einfluss des methylierten MGMT-Promotors in den untersuchten Gruppen separat, kann kein signifikanter Vorteil von Carmustin gegenüber Temozolomid aufgezeigt werden ($p = 0.714$). Obgleich im Log Rank-Test ein aussagekräftiger Effekt fehlt, lag die mediane Überlebenszeit jener Patienten mit MGMT-Methylierung und Behandlung nach Stupp-Schema bei 8.63 Monaten versus 3.43 Monaten ohne methylierten Promotor. Eine Verkürzung der Überlebenszeit um ca. 60 % war die Folge.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich widersprüchlicherweise in der Carmustingruppe nicht (unmethyliert: 5.83 Monate mediane Überlebenszeit; methyliert: 4.93 Monate). Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors spielte in der untersuchten Carmustin-Patientenpopulation keine Rolle ($p = 0.319$). Ähnliche Ergebnisse lieferten 2004 Blanc und Mitarbeiter. Ein signifikanter Effekt für carmustinbehandelte Patienten mit methylierten Promotorstatus konnte nicht nachgewiesen werden (Blanc et al., 2004).

Nichts desto trotz divergieren die Meinungen bezüglich Stilllegung des MGMT-Enzyms und Ansprechen auf Carmustin. Paz und Mitarbeiter erkannten in ihrer Studie von 2004 einen deutlichen Überlebensvorteil.

Studien, in denen Carmustin-Wafer nach operativer Entfernung des Tumors in die Resektionshöhle eingelegt wurden, profitierten von einer anschließenden Therapie nach Stupp-Schema.

Die Kombination des intraoperativ verabreichten Chemotherapeutikums Carmustin und die konkomitanten Radiochemotherapie erhöhte die mediane Überlebenszeit der Patienten auf 20.7 Monate gegenüber alleiniger Radiotherapie und Carmustingabe (Matthew et al., 2009). Allerdings handelte es sich in diesem Fall um Glioblastom-Rezidive. Eine Aussage über Verwendung des Therapieregimes bei Primärtumor ist daher nicht zu treffen.

Abschließend erwähnenswert ist jedoch, dass alle Langzeitüberlebenden (Median: 39.2 Monate) einen methylierten MGMT-Promotor aufwiesen. Das Erkrankungsalter lag im Median bei 44 Jahren. Krex und Mitarbeiter kamen 2007 zu einem vergleichbaren Ergebnis. Junge Patienten mit hohem Karnofsky Score und nachgewiesenem MGMT-Methylierungsstatus fielen häufiger in die Gruppe der Langzeitüberleber als andere (Krex et al., 2007). Dies unterstreicht nochmals die enorme Stellung dieser Faktoren als prognostische Marker.

5.4.2 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung von MGMT und Verlust auf Chromosomenarm 10q

Genveränderungen auf Chromosom 10 sind mit 60-90 % die häufigsten Aberrationen in Glioblastomen (Karlbohm et al., 1993; Kimmelman et al., 1996). Entscheidend für die Progression des Tumors scheint die resultierende Inaktivierung diverser Tumorsuppressorgene zu sein.

Das für die Expression des Enzyms O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) notwendige Gen befindet sich auf Lokus 10q21. Typischerweise liegt in der Mehrheit der Glioblastome eine Monosomie des Chromosoms 10 (LOH 10q) vor. In zahlreichen Studien wurde eine Korrelation zwischen Deletion des langen Arms auf Chromosom 10 und schlechter Prognose herausgearbeitet (Ohgaki et al., 2004 und 2005).

Wemmert und Kollegen zeigten 2005 auf, dass Patienten vor allem dann von einer Chemotherapie mit Temodal® profitierten, wenn eine Deletion auf Genlokus 10q vorlag (Wemmert et al., 2005).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit weichen die statistischen Ergebnisse jedoch deutlich von bisherigen Veröffentlichungen ab. Lag keine genetische Veränderung des langen Arms von Chromosom 10 vor, lebten die Patienten im Median in der Carmustingruppe 5.13 Monate gegenüber 9.63 Monaten in der Kontrollgruppe.

Bei Nachweis einer Deletion auf 10q hingegen verlängerte sich die mediane Überlebenszeit in der Carmustingruppe auf 8.57 Monate versus 3.43 Monate in der Kontrolle. Ergo konnte der Effekt eines positiven Einflusses von Temozolomid bei 10q Deletion in dieser Studie nicht belegt werden. Wohl aber, dass ein Verlust des langen Arms auf Chromosom 10 mit einer schlechteren Prognose einhergeht.

Widersprüchlicherweise profitieren die Patienten in der Carmustingruppe hingegen von jener Chromosomendeletion. Dieser Effekt zeigte sich im Log-Rank-Test als statistisch hoch signifikant (Unterschied 10q deletiert oder normal in der Carmustingruppe

p = 0.0123 und Einfluss des 10q-Status zwischen Carmustin und Kontrolle

p = 0.00219).

Sicherlich muss bedacht werden, dass es sich hier um eine retrospektive Studie handelt. Des Weiteren ist nach wie vor nicht endgültig geklärt, inwiefern weitere unbekannte Genloki auf Chromosom 10q Einfluss auf Prognose und Therapieansprechen haben.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen 10q-Deletion und methylierten MGMT-Promotor fällt auf, dass die mediane Überlebenszeit in Carmustin 6.75 Monate versus 6.05 Monate in der Kontrollgruppe beträgt, wenn beide Faktoren vorliegen. Sobald eine Promotormethylierung jedoch fehlt, verkürzt sich die mediane Überlebenszeit in der Kontrolle rapide (3.17 Monate). Der Einfluss des MGMT-Promotors scheint hier, wie bereits in zahlreichen weiteren Studien belegt, maßgeblich zu sein.

Für die Carmustingruppe konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden. Lag eine Deletion bei unmethyliertem MGMT-Promotor vor, lebten die Patienten im Median 9.03 Monate und damit etwa drei mal so lang wie die Kontrolle.

Dies verdeutlicht wiederum die hohe Komplexität und Inhomogenität des Glioblastoms. Obgleich bereits genetische Marker etabliert sind, divergieren diese bezüglich Ansprechrate und Progress.

5.4.3 Promotormethylierung von p15 und p16

Die auf Genlokus 9p21 gelegenen Tumorsuppressorgene p15 (CDKN2B) und p16 (CDKN2A) gehören zur Gruppe der cyklinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Sie verhindern den Übergang der Zelle von der G1- in die Replikationsphase (S-Phase) und führen folglich zur transkriptionellen Stilllegung. Ein weiterer Mechanismus scheint die Promotormethylierung dieser Gene zu sein, die zu ähnlichen Effekten führt (Herman et al., 1996).

Etwa ein Viertel der anaplastischen Astrozytome zeigen Veränderungen der zellzyklusregulierenden Gene p15 (CDKN2B), p16 (CDKN2A), Rb1 oder CDK4 (Ichimura et al., 2000).

Auch in oligodendroglialen Tumoren (WHO Grad II-III), sowie in niedrig-gradigen Oligoastrozytomen treten Hypermethylierungen, insbesondere von p15 vergleichsweise häufig auf (Uhlmann et al., 2003).

Demgegenüber sind Studien über das Vorliegen dieses Ereignisses in Glioblastomen eher rar oder konnten bis dato nicht nachgewiesen werden (Yu et al., 2004).

In einer retrospektiven Analyse von 2009 konnte jedoch der Einfluss des p15-Methylierungsstatus auf das Outcome der Glioblastompatienten unter Temozolomid beobachtet werden.

Patienten, bei denen eine p15-Methylierung mit Hilfe der methylierungsspezifischen PCR

(MS-PCR) detektiert werden konnte, hatten eine mediane Überlebenszeit von 16.9 Monaten gegenüber 23.8 Monaten ohne Methylierung (Wemmert et al., 2009).

Unter Anwendung der methylierungsspezifischen PCR gelang es in dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Erstaunlicherweise sank die mittlere Überlebensrate der Patienten rapide, wenn eine p15-Promotormethylierung vorlag und Carmustin als Chemotherapeutikum appliziert wurde. 25 % (9/36) der carmustinbehandelten Glioblastompatienten und 14 % (5/36) der Kontrollgruppe wiesen diese epigenetische Veränderung auf. Dabei verschlechterte sich das Outcome in der Carmustingruppe eindrucklich von median 8.57 Monaten ohne p15-Methylierung auf 3.83 Monate mit Promotor-Methylierung.

Diskussion

Dieses Ergebnis zeigte sich im Log Rank-Test als statistisch signifikant ($p = 0.0332$) und verdeutlicht, dass Patienten mit positivem p15-Status von einer Gliadel-Therapie womöglich nicht profitieren.

Interessanterweise konnte dieser Einfluss in der Kontrollgruppe nicht bewiesen werden. Hier lag die mediane Überlebenszeit ohne p15-Methylierung bei 4.6 Monaten und mit bei 8.8 Monaten.

Einen statistisch signifikanten Aussagewert ergab dieses Ergebnis jedoch nicht. Zu bedenken ist, dass nur 5 der 36 Patienten in der Kontrollgruppe eine Promotormethylierung von p15 aufwiesen. Diese vergleichsweise kleine Fallzahl liegt 44 % unter der Fallzahl der Carmustingruppe (9/36).

Zusätzlich ist zu vermerken, dass sich unter den Beobachteten der Kontrollgruppe ein zensierter Patient (Fall 837/12) befand, so dass sich die Zahl der untersuchten Fälle erneut verringert. Ob ein therapeutischer Nutzen für die Wahl des Chemotherapeutikums durch Bestimmung des Methylierungsstatus von p15 besteht, muss definitiv für beide Gruppen weiter geprüft werden.

Eine Korrelation zwischen Überlebenszeit und Promotormethylierung von p16 konnte in beiden Gruppen nicht gezeigt werden. Ohnehin war dieses Ereignis in den untersuchten Glioblastomen mit 8 % (6/72) eher selten und statistisch nicht relevant.

5.4.4 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung p15- und 9p-Verlust

Homozygote Deletionen von p15 und p16 konnten in 20-50 % der bisher untersuchten Gliome beobachtet werden (Hegi et al., 1997, Ruas et al., 1998, Rao et al., 2009).

Zu prüfen war, ob Promotormethylierungen und der Verlust des langen Arms von Chromosom 9 mit einem schlechteren Outcome der Patienten korrelieren.

In einer multivariaten Analyse von 2012 zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Deletionen des Genlokus 9p21.3, der für die Proteine 15 und 16 codiert und einer geringeren Expression von p15. Konnten beide Ereignisse nachgewiesen werden, korrelierte dies stets mit einer schlechteren Prognose ($p = 0.041$) und minimierte zudem die progressionsfreie Überlebenszeit (Feng et al., 2012).

Diskussion

Trotz kleiner Fallzahlen der untersuchten methylierten DNA-Proben, zeigten die Ergebnisse eine deutliche Tendenz (12 Fälle für p15, 12 Fälle für p16).

Auch in der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen methylierten p15-Status und einem Verlust des Genlokus 9p21 besteht.

Auffällig war, dass Patienten mit besagten genetischen Veränderungen eine deutlich verkürzte Überlebenszeit aufwiesen, gegenüber jenen mit methyliertem p15-Status ohne gleichzeitige Deletion (mediane Überlebenszeit: 3.97 Monate versus 5.83 Monate).

Patienten, bei denen eine Deletion des Genlokus 9p21 nachweisbar war, aber keine Promotormethylierung vorlag, wiesen ebenfalls eine längere Überlebenszeit auf als jene mit vollständiger 9p-Veränderung und Methylierung (mediane Überlebenszeit: 5.73 Monate versus 3.97 Monate). Dabei zeigte sich eindrücklich, dass der p15-Status besonders in der Carmustingruppe eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

War lediglich eine p15-Methylierung bei normalen 9p-Genlokus nachweisbar, lag die mediane Überlebenszeit bei 2.84 Monaten gegenüber 9.53 Monaten ohne p15-Methylierung, aber Lokus-Deletion. In der Kontrollgruppe zeigte sich dieser Effekt nicht.

Dass ein Einfluss beider genetischer Veränderungen für Glioblastompatienten bestehen muss, bestätigt die Tatsache, dass Patienten ohne diese Aberrationen die höchste mediane Überlebenszeit aufweisen (beide Gruppen: 7.15 Monate). Wobei widersprüchlicherweise die Carmustingruppe ohne Deletion von 9p21 und fehlender Methylierung schlechter abschneidet als jene mit Deletion und fehlender Methylierung (6.8 Monate versus 9.53 Monate).

Unabhängig davon zeigte sich in beiden Gruppen, wie bereits aufgeführt, dass die geringste mediane Überlebenszeit mit 3.97 Monaten bei Genlokus-Deletion von 9p21 und Promotormethylierung von p15 bestand.

Begründet könnte dies in einer Potenzierung der fehlenden p15-Expression sein, die durch Hypermethylierung einerseits und Deletion andererseits hervorgerufen wird und damit biallelisch vorliegt.

Allerdings erfordern diese Ergebnisse weiterer Überprüfung, da die Fallzahlen sehr gering und damit lediglich eine eingeschränkte Beurteilung möglich war. Die Durchführung einer statistischen Analyse konnte deshalb nicht erbracht werden.

Abschließend sollte jedoch erwähnt werden, dass ein methylierter Promotor von p15 durchaus als signifikanter Marker wahrgenommen werden muss und mit einer schlechteren Prognose für Glioblastompatienten, insbesondere jenen mit applizierten Carmustin-Wafern, einhergeht.

5.4.5 Zusammenhang zwischen Promotormethylierung von p16- und 9p-Verlust

Kamiro und Kollegen untersuchten 2002 ein Kollektiv von Glioblastompatienten und beobachteten eine signifikante Prognoseverschlechterung bei homozygoter Deletion des kurzen Arms von Chromosom 9 und methylierten p16 (CDKN2A)- Promotor (Kamiro et al., 2002).

Die Erkenntnisse zu Bedeutung besagter genetischer Variation als prädiktiven Faktor sind allerdings durchaus kontrovers. Vor allem im Bezug auf das Erkrankungsalter bei Diagnosestellung divergierten die Aussagen (Labuhn et al. 2001; Shih et al. 2005).

In uni- und multivariaten Analysen von Ohgaki und Kollegen zeigte sich wiederum kein prognostisch relevanter Einfluss (Ohgaki et al., 2004). Nachfolgende Arbeiten veröffentlichten vergleichbare Ergebnisse (Wemmert et al., 2009).

Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Patientenpopulation. Promotormethylierungen von p16 waren selten.

In beiden Gruppen traten je nur 3 Fälle auf, so dass Korrelationen zwischen 9p-Verlust und p16-Methylierung keine statistische Aussagekraft hatten.

Untersuchungen in größeren populationsbasierenden Studien sind daher notwendig, um eine relevante Vorhersage für das progressionsfreie Überleben bzw. die Gesamtüberlebenszeit treffen zu können.

5.4.6 Einfluss der Amplifikation auf Genlokus 4q12

In den frühen 80er Jahren entdeckte man wachstumsstimulierende Faktoren, die durch autokrine Wirkung zur Proliferation von Tumorzellen führten (Sporn et al., 1980). Zu diesen genetischen Varianten zählten auch Veränderungen des Tyrosinkinase-Rezeptors PDGFR- α (Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptor alpha).

Diskussion

Zu vergleichbaren Ergebnissen führte eine Studie von Níster und Kollegen 1984, in der humane gliomale Zelllinien wachstumsfördernde Faktoren exprimierten, die in den Signalweg des PDGFR eingriffen (Níster et al., 1982 und 1984).

In einem geringen Prozentsatz (unter 10 %) der bis dato untersuchten Glioblastome konnte eine Amplifikation der Genregion 4q12 nachgewiesen werden (Collins et al., 1995; Alentorn et al., 2012). Etwa 94 % der Oligodendrogliome exprimieren den Rezeptor für PDGFR- α und den Liganden PDGF-A (Westermann et al., 1995; Di Rocco et al., 1998). Demgegenüber konnte eine Amplifikation des entsprechenden Genes bisher nur in wenigen anaplastischen Oligodendrogliomen (nach WHO Grad III), sowie Glioblastomen detektiert werden (Fleming et al., 1992; Hermanson et al., 1996; Clark und Dierks et al., 2003). Nachfolgende Studien beschrieben PDGFR- α -Amplifikationen als Progressionsmarker in Oligoastrozytomen (Reifenberger und Louis et al., 2003, Verhaak et al., 2010).

Alentorn und Kollegen postulierten wiederum, dass Amplifikationen des Rezeptors nur Glioblastome und kaum niedrig-gradige Gliome betraf (Alentorn et al., 2012).

Jackson und Kollegen erkannten 2006 im Mausmodell ebenfalls, dass gliale Vorläuferzellen durch fehlerhafte Expression des PDGFR- α gliomähnliche Läsionen ausbilden (Jackson et al., 2006).

Die Ergebnisse bisheriger Studien zum prognostischen Einfluss eines amplifizierten PDGFR- α -Rezeptors sind allerdings äußerst widersprüchlich. Joensuu und Kollegen erkannten keine Korrelation zwischen genetischer Veränderung und Überlebenszeit der Patientenpopulation (Joensuu et al., 2005).

Dies deckt sich mit ähnlichen Studien (Nobusawa et al., 2011; Alentorn et al., 2012). Puputti et al. zeigten wiederum gegenteiliges (Puputti et al., 2006).

Imatinib, ein Tyrosinkinaseinhibitor, ist bei der chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) bereits fest ins Behandlungsregime integriert. Studien, in denen der Signaltransduktionsweg durch kompetitive Inhibierung der Proteinkinase unterbrochen wurde, zeigten in Glioblastomrezidiven marginale Erfolge. Ansprechraten von über 40 % bei temozolomidrefraktären Glioblastompatienten schienen realisierbar. Patienten waren sogar bis zu einem Jahr remissionsfrei (Dresemann et al., 2010).

Diskussion

Eine ähnliche Studie bestätigte jedoch das ausgeprägte zytotoxische Potential, das vor allem bei hoher Dosierung zu weitreichenden Nebenwirkungen führte (Dong et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wiesen 15 % (11/72) der untersuchten Glioblastompatienten eine Amplifikation des Genlokus 4q12 auf.

Dabei handelte es sich vornehmlich um primäre Glioblastome (10/72) und ein sekundäres Glioblastom (Fall 1350/06). Die Carmustingruppe schnitt mit einer medianen Überlebenszeit von 4.83 Monaten besser ab als die Kontrolle (3.43 Monate). Lag hingegen keine Amplifikation vor, profitierten beide Gruppen (mediane ÜLZ Carmustin: 5.8 Monate versus 7.58 Monate in der Kontrolle). Der Einfluss dieser Amplifikation zeigte sich auch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse als statistisch signifikant ($p = 0.0143$).

Die Überlebenszeit des sekundären Glioblastoms betrug 5.83 Monate. Es handelte sich mit 46 Jahren um einen vergleichsweise jungen, männlichen Patienten.

Neuere molekulare Klassifikationen, z.B. im Rahmen des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) - Zusammenschlusses (TCGA, 2008), erkannten vier genetische Subgruppen des Glioblastoms, die sich in Prognose und Erkrankungsalter unterscheiden (klassisch, mesenchymal, neural und proneural; Verhaak et al., 2010). Vor allem im sog. proneuralen Typus, der vornehmlich sekundäre Glioblastome betrifft, scheinen Amplifikationen des PDGFRA ein häufiges Ereignis zu sein und mit einer schlechten Prognose einher zu gehen.

Nichts desto trotz sind Studien zu genannter genetischer Variation selten und verdeutlichen lediglich die komplexe Dignität des Tumors.

Zu bedenken ist zudem, dass es sich selten um eine alleinige genetische Amplifikation von Lokus 4q12 als Auslöser für eine Progression der Erkrankung handelt, sondern multiple Faktoren der Signalkaskaden betroffen sind (Ozawa et al., 2010). Welchen Einfluss zum Beispiel die Kombination von Amplifikationen des EGF- und PDGFA-Rezeptors haben, konnte in dieser Arbeit aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch ausgewertet werden.

Nichts desto trotz zeigt die vorliegende Studie einen signifikanten Einfluss des Amplifikationsstatus von 4q12 im Bezug auf das Gesamtüberleben der carmustinbehandelten Glioblastompatienten ($p = 0.00835$) und ist damit durchaus als möglicher prognostischer Marker wahrzunehmen.

5.4.7 Zugewinn von Chromosom 7 und Amplifikation auf Genlokus 7p12

Numerische chromosomale Aberrationen sind häufige Ereignisse in primären und sekundären Glioblastomen. Neben Verlusten auf Chromosom 9 und 10 stehen vor allem Gewinne auf Chromosom 7 im Vordergrund. Das Hauptaugenmerk liegt auch hier auf einem Genlokus, der für einen Transmembranrezeptor kodiert, den sog. Epidermal Growth Factor (EGF) - Rezeptor. Dieser befindet sich auf Region 7p12 und zeigt mit 36-40 % eine hohe Amplifikationsrate (Ohgaki und Kleihues et al., 2007; Hatanpaa et al., 2010). Die Aktivierung signaltransduktorischer Prozesse durch Bindung des Rezeptorliganden EGF leitet die Zellteilung und -proliferation ein. In mutierter oder amplifizierter Form führt er zur unkontrollierten Stimulation und damit zum Tumorwachstum (Ekstrand et al., 1991). Aus diesem Grund steht die Ausschaltung onkogener Signale durch diverser Chemotherapeutika im Mittelpunkt aktueller Forschungen.

Die Komplexität dieses Signalweges und die Entwicklung potentiell wirksamer Therapeutika gestaltet sich allerdings nach wie vor schwierig (Azuaje et al., 2015).

Positive Effekte konnten jedoch besonders dann nachgewiesen werden, wenn eine hohe Amplifikationsrate des EGFR detektiert wurde. In diesem Fall profitierten Patienten deutlich von einer Behandlung mit Temozolomid ($p = 0.01$; Hobbs et al., 2012). Vergleichbare Studien zur Carmustin sind rar.

Zu bedenken ist zudem, dass in bisher publizierten Arbeiten unterschiedliche Therapieansätze der Chemotherapie mit Temozolomid gegenüber gestellt wurden. Eine direkte Vergleichbarkeit dieser Studien ist dadurch kaum möglich. Hinzu kommt, dass diese Ergebnisse durch immunhistochemische Methoden oder Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung erhoben wurden, wohingegen sich diese Arbeit der vergleichenden genomischen Hybridisierung als Untersuchungsmethode chromosomaler Imbalancen bediente.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wiesen 85 % (61/72) der untersuchten Glioblastompatienten Zugewinne auf Chromosom 7 auf (83 % in der Carmustingruppe, 86 % in der Kontrollgruppe). Amplifikationen des EGF-Rezeptors wurde in 19 % (14/72) der Fälle detektiert (22 % in der Carmustingruppe; 17 % in der Kontrollgruppe).

Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich medianer Gesamtüberlebenszeit zeigten sich für beide Gruppen weder in der univariaten Cox-Regressionsanalyse ($p = 0.200$, Carmustin versus Kontrolle) noch im Log-Rank-Test ($p = 0.719$, Carmustin versus Kontrolle).

Ein Vorteil von Carmustin gegenüber dem Therapieregime der Kontrolle konnte folglich nicht herausgearbeitet werden.

Zu bedenken ist jedoch, dass mittlerweile verschiedene Subtypen und Mutationen des EGF-Rezeptors bekannt und erforscht sind. Die bedeutendste Mutation ist sicherlich jene des EGFRvIII. Eine derartige Mutation kann, ebenso wie Amplifikationen, zur Aktivierung des EGFR-Signalweges und damit zur Überstimulation führen. Dies ermöglicht dem Tumor eine nahezu vollständige Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Die Folge ist eine Verkürzung der Überlebenszeit des Patienten. Interessant wäre daher, inwieweit das Auftreten jener Mutante Einfluss auf die Therapie mit Carmustin hat bzw., ob das Voranschreiten der Erkrankung durch EGFR-Inhibitoren gebremst werden kann. Jener positive Effekt konnte bereits für andere Tumorentitäten, wie das kleinzellige Lungenkarzinom etabliert werden (Lynch et al., 2004).

Ähnliche Studien zeigten, dass Patienten durchaus von Inhibitoren des EGFR-Signalweges profitieren könnten, vor allem dann, wenn eine weitere Determinante des Signalweges (PTEN) verändert vorlag (Mellinghoff et al., 2005).

Dies konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der kleinen Fallzahl nicht berücksichtigt werden, verdeutlicht aber die enorme Bedeutung genetischer Variationen in Glioblastomen.

5.4.8 Verlust von auf Chromosomenarm 13

Das Gen für das Retinoblastom-Protein (RB1-Gen), das sich auf Genlokus 13q14 befindet, fungiert als Tumorsuppressorgen und kann durch Deletionen, Mutationen oder durch Methylierung inaktiviert werden.

Dabei ist das betroffene Chromosom in der Regel homozygot deletiert oder im verbliebenen Allel mutiert (Ichimura et al., 1996).

Eine solche Ausschaltung des Gens ist auch in anderen Tumoren bekannt (Retinoblastom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Osteosarkom) und korreliert, ähnlich wie p15 und p16 mit einer kürzeren Überlebenszeit in Glioblastomen.

Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass eine alleinige Ausschaltung des Gens bzw. der Signalkaskade noch nicht zur Aufhebung der Zellzykluskontrolle führen muss (Furnari et al. 2007). Folglich müssen, ähnlich wie bei den oben beschriebenen chromosomalen Veränderungen, weitere Regulationsmechanismen betroffen sein.

Nichts desto trotz zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass eine Deletion auf Chromosom 13 mit einer ungünstigen Prognose einhergeht.

Die mediane Überlebenszeit der Kontrollgruppe stieg von 4.47 Monaten (bei 13q-Deletion) auf 7.5 Monate (ohne Deletion). Einen Benefit durch das Chemotherapeutikum Temodal®, wie es zum Beispiel Wemmert und Kollegen 2006 aufzeigten, ließ sich in der vorgelegten Studie nicht nachweisen, obgleich das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

Interessanterweise kehrte sich jedoch dieses Resultat für die Carmustingruppe um. Hier konnte eine beinahe Verdoppelung der Überlebenszeit aufgezeigt werden, wenn eine Deletion von 13q vorlag (9.03 Monate mit Deletion und 4.93 Monate ohne Deletion). Dieser positive überlebenszeitverlängernde Effekt bestätigte sich auch in der Kaplan-Meier-Analyse als statistisch signifikant ($p = 0.0364$). Möglicherweise profitieren Carmustin-behandelte Patienten gerade dann von einer Therapie, wenn 13q deletiert vorliegt.

Eine Untersuchung mit größerer Fallzahl wäre daher erstrebenswert, da bereits kleine Abweichungen bei geringer Patientenzahl zu größeren statistischen Divergenzen führen können.

5.4.9 weitere untersuchte chromosomale Veränderungen

In der vergleichenden genomischen Hybridisierung konnten auch genetische Veränderungen der Chromosomen 12, 17, 20 und 22 detektiert werden. Allerdings zeigten diese keine statistische Relevanz und wirkten sich auch sonst nicht prägnant auf Prognose bzw. mediane Überlebenszeit aus. Ebenso fehlt eine statistische Vergleichbarkeit genetischer Aberrationen auf 1q und deren Zusammenhang mit Verlusten auf 19q, der vor allem in Oligodendrogliomen relevant zu sein scheint. Grund dafür war, dass keine der untersuchten Tumorproben in der Carmustingruppe Deletionen auf 1q aufwiesen.

5.5 Ausblick

Der Wunsch einer personalisierten Medizin für Glioblastompatienten ist nach wie vor ungebrochen. Obgleich intensive Forschungen vor allem auf molekulargenetischer Ebene bereits große Fortschritte und Erkenntnisse erbrachten, geht diese Tumorerkrankung weiterhin mit einer ungünstigen Prognose einher. Allerdings verdeutlicht sowohl diese als auch zahlreiche weitere Studien die enorme Relevanz genetischer Aberrationen und deren Stellenwert im diagnostischen und therapeutischen Vorgehen.

Als interessanter Aspekt der vorliegenden Studie ist sicherlich der Einfluss des p15-Methylierungsstatus zu sehen, der durchaus als unabhängiger, negativ prognostischer Marker zu interpretieren ist. Die Etablierung in den diagnostischen präoperativen Ablauf könnte daher einen Benefit für den Patienten erbringen. Zusätzlich sollte in größeren Studiendesigns geprüft werden, inwiefern sich die p15-Hypermethylierung bei carmustinbehandelten Patienten auswirkt gegenüber jenen, die keine Chemotherapie erhielten.

Gleichsam bestätigt sich die Bedeutsamkeit des MGMT-Status, wie bereits in vielen Studien publiziert, auch wenn in dieser Arbeit die Wahl des Therapieregimes keine Rolle spielte.

Diskussion

Die Etablierung und Integrierung epigenetischer Nachweisverfahren, wie z.B. der Bisulfit-Modifikation mit anschließender methylierungsspezifischer PCR stellt ein praktikables, vergleichsweise wenig kosten- und zeitintensives Verfahren dar. Besonders die Überprüfung des p15- und MGMT-Status vor Aufstellung eines Chemotherapieregimes ist durchaus als Teil des diagnostischen Prozesses vorstellbar

6. Literaturverzeichnis

Alentorn, Agustí; Marie, Yannick; Carpentier, Catherine; Boisselier, Blandine; Giry, Marine; Labussière, Marianne et al. (2012): Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas. In: *Neuro-oncology* 14 (11), S. 1393–1403. DOI: 10.1093/neuonc/nos217.

Azuaje, Francisco; Tiemann, Katja; Niclou, Simone P. (2015): Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. In: *Cell communication and signaling : CCS* 13, S. 23. DOI: 10.1186/s12964-015-0098-6.

Bailey, Percival., Cushing, H.W.: *A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1926. Reprinted, New York, 1970

Biernat, W.; Kleihues, P.; Yonekawa, Y.; Ohgaki, H. (1997): Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56 (2), S. 180–185.

Bokemeyer C, Lipp HP, Mayer F, Kanz L (1998): Supportive Maßnahmen bei der Chemotherapie älterer Patienten, *Arzneimitteltherapie* 16(5): 140-146

Bota, Daniela A.; Desjardins, Annick; Quinn, Jennifer A.; Affronti, Mary L.; Friedman, Henry S. (2007): Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. In: *Therapeutics and clinical risk management* 3 (5), S. 707–715.

Brem, H.; Piantadosi, S.; Burger, P. C.; Walker, M.; Selker, R.; Vick, N. A. et al. (1995): Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. In: *Lancet (London, England)* 345 (8956), S. 1008–1012.

Cairncross, J. G.; Ueki, K.; Zlatescu, M. C.; Lisle, D. K.; Finkelstein, D. M.; Hammond, R. R. et al. (1998): Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. In: *Journal of the National Cancer Institute* 90 (19), S. 1473–1479.

Cantley, L. C.; Neel, B. G. (1999): New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4240–4245.

Cavenee, W. K. (2000): High-grade gliomas with chromosome 1p loss. In: *Journal of neurosurgery* 92 (6), S. 1080–1081.

CBTRUS (2013): Statistical Report 2006-2010., S. ii 12

Chaichana, Kaisorn L.; Chaichana, Khan K.; Olivi, Alessandro; Weingart, Jon D.; Bennett, Richard; Brem, Henry; Quiñones-Hinojosa, Alfredo (2011): Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. Clinical article. In: *Journal of neurosurgery* 114 (3), S. 587–594. DOI: 10.3171/2010.8.JNS1081.

Chaichana, Kaisorn L.; Zaidi, Hasan; Pendleton, Courtney; McGirt, Matthew J.; Grossman, Rachel; Weingart, Jon D. et al. (2011): The efficacy of carmustine wafers for older patients with glioblastoma multiforme: prolonging survival. In: *Neurological research* 33 (7), S. 759–764. DOI: 10.1179/1743132811Y.0000000006.

Chandler, K. L.; Prados, M. D.; Malec, M.; Wilson, C. B. (1993): Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. In: *Neurosurgery* 32 (5), S. 716-20; discussion 720.

Clarke, Jennifer; Butowski, Nicholas; Chang, Susan (2010): Recent advances in therapy for glioblastoma. In: *Archives of neurology* 67 (3), S. 279–283. DOI: 10.1001/archneurol.2010.5.

Collins, V. P. (2004): Brain tumours: classification and genes. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 75 Suppl 2, S. ii2-11.

Cui, Xiang-li; Zhao, Zhi-gang; Ren, Xiao-hui; Sui, Da-li; Chu, Jun-sheng; Tang, Kai et al. (2010): [Characteristics of combining loss of heterozygosity of 1p/19q in glioma]. In: *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]* 48 (11), S. 852–855.

Das, Swadesh K.; Hashimoto, Takashi; Shimizu, Kazuo; Yoshida, Tatsushi; Sakai, Toshiyuki; Sowa, Yoshihiro et al. (2005): Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. In: *Biochimica et biophysica acta* 1726 (3), S. 328–335. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.09.007.

DeAngelis, L. M.; Burger, P. C.; Green, S. B.; Cairncross, J. G. (1998): Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? In: *Annals of neurology* 44 (4), S. 691–695. DOI: 10.1002/ana.410440418.

Dehdashti, Amir R.; Hegi, Monika E.; Regli, Luca; Pica, Alessia; Stupp, Roger (2006): New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide chemotherapy. In: *Neurosurgical focus* 20 (4), S. E6. DOI: 10.3171/foc.2006.20.4.3.

Dehghani, F.; Schachenmayr, W.; Laun, A.; Korf, H. W. (1998): Prognostic implication of histopathological, immunohistochemical and clinical features of oligodendrogliomas: a study of 89 cases. In: *Acta neuropathologica* 95 (5), S. 493–504.

Deimling, A. von; Eibl, R. H.; Ohgaki, H.; Louis, D. N.; Ammon, K. von; Petersen, I. et al. (1992): p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. In: *Cancer research* 52 (10), S. 2987–2990.

Deimling, A. von; Louis, D. N.; Ammon, K. von; Petersen, I.; Hoell, T.; Chung, R. Y. et al. (1992): Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. In: *Journal of neurosurgery* 77 (2), S. 295–301. DOI: 10.3171/jns.1992.77.2.0295.

Deimling, A. von; Louis, D. N.; Wiestler, O. D. (1995): Molecular pathways in the formation of gliomas. In: *Glia* 15 (3), S. 328–338. DOI: 10.1002/glia.440150312.

Dolecek, Therese A.; Propp, Jennifer M.; Stroup, Nancy E.; Kruchko, Carol (2012): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. In: *Neuro-oncology* 14 Suppl 5, S. v1-49. DOI: 10.1093/neuonc/nos218.

Dong, Yucui; Jia, Limin; Wang, Xiaohua; Tan, Xiaoqing; Xu, Jiankai; Deng, Zhenling et al. (2011): Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. In: *International journal of oncology* 38 (2), S. 555–569. DOI: 10.3892/ijo.2010.861.

Dresemann, Gregor; Weller, Michael; Rosenthal, Mark A.; Wedding, Ulrich; Wagner, Wolfgang; Engel, Erik et al. (2010): Imatinib in combination with hydroxyurea versus hydroxyurea alone as oral therapy in patients with progressive pretreated glioblastoma resistant to standard dose temozolomide. In: *Journal of neuro-oncology* 96 (3), S. 393–402. DOI: 10.1007/s11060-009-9976-3.

Duntze, Julien; Litré, Claude-Fabien; Eap, Christophe; Théret, Etienne; Debreuve, Adeline; Jovenin, Nicolas et al. (2013): Implanted carmustine wafers followed by concomitant radiochemotherapy to treat newly diagnosed malignant gliomas: prospective, observational, multicenter study on 92 cases. In: *Annals of surgical oncology* 20 (6), S. 2065–2072. DOI: 10.1245/s10434-012-2764-x.

Ekstrand, A. J.; James, C. D.; Cavenee, W. K.; Seliger, B.; Pettersson, R. F.; Collins, V. P. (1991): Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. In: *Cancer research* 51 (8), S. 2164–2172.

Ewelt, Christian; Goepfert, Mathias; Rapp, Marion; Steiger, Hans-Jakob; Stummer, Walter; Sabel, Michael (2011): Glioblastoma multiforme of the elderly: the prognostic effect of resection on survival. In: *Journal of neuro-oncology* 103 (3), S. 611–618. DOI: 10.1007/s11060-010-0429-9.

Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Dikshit, Rajesh; Eser, Sultan; Mathers, Colin; Rebelo, Marise et al. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 136 (5), S. E359-86. DOI: 10.1002/ijc.29210.

Freedman, D. A.; Wu, L.; Levine, A. J. (1999): Functions of the MDM2 oncoprotein. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55 (1), S. 96–107.

Friedman, H. S.; Kerby, T.; Calvert, H. (2000): Temozolomide and treatment of malignant glioma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6 (7), S. 2585–2597.

Frommer, M.; McDonald, L. E.; Millar, D. S.; Collis, C. M.; Watt, F.; Grigg, G. W. et al. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5), S. 1827–1831.

Fujisawa, H.; Reis, R. M.; Nakamura, M.; Colella, S.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. (2000): Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (1), S. 65–72.

Furnari, Frank B.; Fenton, Tim; Bachoo, Robert M.; Mukasa, Akitake; Stommel, Jayne M.; Stegh, Alexander et al. (2007): Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. In: *Genes & development* 21 (21), S. 2683–2710. DOI: 10.1101/gad.1596707.

Hainaut, P.; Hollstein, M. (2000): p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. In: *Advances in cancer research* 77, S. 81–137.

Hatanpaa, Kimmo J.; Burma, Sandeep; Zhao, Dawen; Habib, Aryn A. (2010): Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 12 (9), S. 675–684.

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

Herrlinger, Ulrich; Rieger, Johannes; Koch, Dorothee; Loeser, Simon; Blaschke, Britta; Kortmann, Rolf-Dieter et al. (2006): Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (27), S. 4412–4417. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.9104.

Hirose, Yuichi; Aldape, Kenneth D.; Chang, Susan; Lamborn, Kathleen; Berger, Mitchel S.; Feuerstein, Burt G. (2003): Grade II astrocytomas are subgrouped by chromosome aberrations. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 142 (1), S. 1–7.

Hobbs, Jonathan; Nikiforova, Marina N.; Fardo, David W.; Bortoluzzi, Stephanie; Cieply, Kathleen; Hamilton, Ronald L.; Horbinski, Craig (2012): Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. In: *The American journal of surgical pathology* 36 (8), S. 1186–1193. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182518e12.

Hofer S, Roelcke U, Herrmann R. Neue Aspekte der interdisziplinären Therapie maligner Gliome des Erwachsenenalters. Schweiz Med Wochenschr 1999;129:1332–41.

Huang, Yun; Pastor, William A.; Shen, Yinghua; Tahiliani, Mamta; Liu, David R.; Rao, Anjana (2010): The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. In: *PloS one* 5 (1), S. e8888. DOI: 10.1371/journal.pone.0008888.

Ichimura, K.; Bolin, M. B.; Goike, H. M.; Schmidt, E. E.; Moshref, A.; Collins, V. P. (2000): Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. In: *Cancer research* 60 (2), S. 417–424.

Jackson, Erica L.; Garcia-Verdugo, Jose Manuel; Gil-Perotin, Sara; Roy, Monica; Quinones-Hinojosa, Alfredo; VandenBerg, Scott; Alvarez-Buylla, Arturo (2006): PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. In: *Neuron* 51 (2), S. 187–199. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.06.012.

Joensuu, Heikki; Puputti, Marjut; Sihto, Harri; Tynninen, Olli; Nupponen, Nina N. (2005): Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. In: *The Journal of pathology* 207 (2), S. 224–231. DOI: 10.1002/path.1823.

Johnson, Derek R.; O'Neill, Brian Patrick (2012): Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. In: *Journal of neuro-oncology* 107 (2), S. 359–364. DOI: 10.1007/s11060-011-0749-4.

Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J. W.; Waldman, F.; Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5083), S. 818–821.

Kaloshi, G.; Benouaich-Amiel, A.; Diakite, F.; Taillibert, S.; Lejeune, J.; Laigle-Donadey, F. et al. (2007): Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome. In: *Neurology* 68 (21), S. 1831–1836. DOI: 10.1212/01.wnl.0000262034.26310.a2.

Karayan-Tapon, Lucie; Quillien, Véronique; Guilhot, Joëlle; Wager, Michel; Fromont, Gaëlle; Saikali, Stephan et al. (2010): Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. In: *Journal of neuro-oncology* 97 (3), S. 311–322. DOI: 10.1007/s11060-009-0031-1.

Karlbom, A. E.; James, C. D.; Boethius, J.; Cavenee, W. K.; Collins, V. P.; Nordenskjöld, M.; Larsson, C. (1993): Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. In: *Human genetics* 92 (2), S. 169–174.

Karnofsky DA, Burchenal JH. *The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer.* In: MacLeod CM (Ed), *Evaluation of Chemotherapeutic Agents.* Columbia Univ Press, 1949:196.

Keime-Guibert, Florence; Chinot, Olivier; Taillandier, Luc; Cartalat-Carel, Stéphanie; Frenay, Marc; Kantor, Guy et al. (2007): Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. In: *The New England journal of medicine* 356 (15), S. 1527–1535. DOI: 10.1056/NEJMoa065901.

Kim, D. H.; Mohapatra, G.; Bollen, A.; Waldman, F. M.; Feuerstein, B. G. (1995): Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 60 (6), S. 812–819.

Kimmelman, A. C.; Ross, D. A.; Liang, B. C. (1996): Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. In: *Genomics* 34 (2), S. 250–254. DOI: 10.1006/geno.1996.0277.

Kleihues, Paul; Burger P.C.; Scheithauer P.W.: *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*, Springer Verlag Berlin 1993, ISBN: 978-3-540-56971-8

Kleihues, Paul, Cavenee WK (2000) *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous Systems. WHO Classifications*. IARC Press, Lyon

Kleihues, Paul; Louis, David N.; Scheithauer, Bernd W.; Rorke, Lucy B.; Reifenberger, Guido; Burger, Peter C.; Cavenee, Webster K. (2002): The WHO classification of tumors of the nervous system. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (3), S. 215-25; discussion 226-9.

Korenjak, Michael; Brehm, Alexander (2005): E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. In: *Current opinion in genetics & development* 15 (5), S. 520–527. DOI: 10.1016/j.gde.2005.07.001.

Kornblith, P. L.; Walker, M. (1988): Chemotherapy for malignant gliomas. In: *Journal of neurosurgery* 68 (1), S. 1–17. DOI: 10.3171/jns.1988.68.1.0001.

Koschny, Ronald; Koschny, Thomas; Froster, Ursula G.; Krupp, Wolfgang; Zuber, Margit A. (2002): Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 135 (2), S. 147–159.

Krex, Dietmar; Klink, Barbara; Hartmann, Christian; Deimling, Andreas von; Pietsch, Torsten; Simon, Matthias et al. (2007): Long-term survival with glioblastoma multiforme. In: *Brain : a journal of neurology* 130 (Pt 10), S. 2596–2606. DOI: 10.1093/brain/awm204.

Laperriere, Normand; Zuraw, Lisa; Cairncross, Gregory (2002): Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 64 (3), S. 259–273.

Lynch, Thomas J.; Bell, Daphne W.; Sordella, Raffaella; Gurubhagavatula, Sarada; Okimoto, Ross A.; Brannigan, Brian W. et al. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. In: *The New England journal of medicine* 350 (21), S. 2129–2139. DOI: 10.1056/NEJMoa040938.

Malmström, Annika; Grønberg, Bjørn Henning; Marosi, Christine; Stupp, Roger; Frappaz, Didier; Schultz, Henrik et al. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 13 (9), S. 916–926. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.

McGirt, Matthew J.; Chaichana, Kaisorn L.; Gathinji, Muraya; Attenello, Frank J.; Than, Khoi; Olivi, Alessandro et al. (2009): Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. In: *Journal of neurosurgery* 110 (1), S. 156–162. DOI: 10.3171/2008.4.17536.

McGirt, Matthew J.; Than, Khoi D.; Weingart, Jon D.; Chaichana, Kaisorn L.; Attenello, Frank J.; Olivi, Alessandro et al. (2009): Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. In: *Journal of neurosurgery* 110 (3), S. 583–588. DOI: 10.3171/2008.5.17557.

Mellinghoff, Ingo K.; Wang, Maria Y.; Vivanco, Igor; Haas-Kogan, Daphne A.; Zhu, Shaojun; Dia, Ederlyn Q. et al. (2005): Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. In: *The New England journal of medicine* 353 (19), S. 2012–2024. DOI: 10.1056/NEJMoa051918.

Nakamura, M.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. (2001): Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (1), S. 77–82.

Nistér, M.; Heldin, C. H.; Wasteson, A.; Westermark, B. (1982): A platelet-derived growth factor analog produced by a human clonal glioma cell line. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 397, S. 25–33.

Nistér, M.; Heldin, C. H.; Wasteson, A.; Westermark, B. (1984): A glioma-derived analog to platelet-derived growth factor: demonstration of receptor competing activity and immunological crossreactivity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (3), S. 926–930.

Nobusawa, Sumihito; Stawski, Robert; Kim, Young-Ho; Nakazato, Yoichi; Ohgaki, Hiroko (2011): Amplification of the PDGFRA, KIT and KDR genes in glioblastoma: a population-based study. In: *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 31 (6), S. 583–588. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01204.x.

Ohgaki, Hiroko; Dessen, Pierre; Jourde, Benjamin; Horstmann, Sonja; Nishikawa, Tomofumi; Di Patre, Pier-Luigi et al. (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. In: *Cancer research* 64 (19), S. 6892–6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2005): Epidemiology and etiology of gliomas. In: *Acta neuropathologica* 109 (1), S. 93–108. DOI: 10.1007/s00401-005-0991-y.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2005): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64 (6), S. 479–489.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. In: *The American journal of pathology* 170 (5), S. 1445–1453. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011.

Ostman, Arne (2004): PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. In: *Cytokine & growth factor reviews* 15 (4), S. 275–286. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.002.

Ozawa, Tatsuya; Brennan, Cameron W.; Wang, Lu; Squatrito, Massimo; Sasayama, Takashi; Nakada, Mitsutoshi et al. (2010): PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. In: *Genes & development* 24 (19), S. 2205–2218. DOI: 10.1101/gad.1972310.

Phillips, Heidi S.; Kharbanda, Samir; Chen, Ruihuan; Forrest, William F.; Soriano, Robert H.; Wu, Thomas D. et al. (2006): Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. In: *Cancer cell* 9 (3), S. 157–173. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.

Pietras, Kristian; Sjöblom, Tobias; Rubin, Kristofer; Heldin, Carl-Henrik; Ostman, Arne (2003): PDGF receptors as cancer drug targets. In: *Cancer cell* 3 (5), S. 439–443.

Plowman, J.; Waud, W. R.; Koutsoukos, A. D.; Rubinstein, L. V.; Moore, T. D.; Grever, M. R. (1994): Preclinical antitumor activity of temozolomide in mice: efficacy against human brain tumor xenografts and synergism with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. In: *Cancer research* 54 (14), S. 3793–3799.

Pollak, L.; Gur, R.; Walach, N.; Reif, R.; Tamir, L.; Schiffer, J. (1997): Clinical determinants of long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. In: *Tumori* 83 (2), S. 613–617.

Puputti, Marjut; Tynninen, Olli; Sihto, Harri; Blom, Tea; Mäenpää, Hanna; Isola, Jorma et al. (2006): Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. In: *Molecular cancer research : MCR* 4 (12), S. 927–934. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0085.

Rao, Shailaja K.; Edwards, Jennifer; Joshi, Avadhut D.; Siu, I-Mei; Riggins, Gregory J. (2010): A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. In: *Journal of neuro-oncology* 96 (2), S. 169–179. DOI: 10.1007/s11060-009-9959-4.

Reifenberger, Guido; Louis, David N. (2003): Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62 (2), S. 111–126.

- Ryu**, Samuel; Buatti, John M.; Morris, Ann; Kalkanis, Steven N.; Ryken, Timothy Charles; Olson, Jeffrey J. (2014): The role of radiotherapy in the management of progressive glioblastoma. A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. In: *Journal of neuro-oncology* 118 (3), S. 489–499. DOI: 10.1007/s11060-013-1337-6.
- Sabel**, Michael; Giese, Alf (2008): Safety profile of carmustine wafers in malignant glioma: a review of controlled trials and a decade of clinical experience. In: *Current medical research and opinion* 24 (11), S. 3239–3257. DOI: 10.1185/03007990802508180.
- Scherer**, H. J. (1940): A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. In: *Journal of neurology and psychiatry* 3 (2), S. 147–177.
- Schmidt**, Matthias C.; Antweiler, Sven; Urban, Nina; Mueller, Wolf; Kuklik, A.; Meyer-Puttlitz, Birgit et al. (2002): Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (4), S. 321–328.
- Schmidt**, F.; Fischer, J.; Herrlinger, U.; Dietz, K.; Dichgans, J.; Weller, M. (2006): PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. In: *Neurology* 66 (4), S. 587–589. DOI: 10.1212/01.wnl.0000197792.73656.c2.
- Scott**, J. N.; Rewcastle, N. B.; Brasher, P. M.; Fulton, D.; Hagen, N. A.; MacKinnon, J. A. et al. (1998): Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. In: *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 25 (3), S. 197–201.
- Scott**, J. N.; Rewcastle, N. B.; Brasher, P. M.; Fulton, D.; MacKinnon, J. A.; Hamilton, M. et al. (1999): Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. In: *Annals of neurology* 46 (2), S. 183–188.
- Shaw** E.G., Seiferheld W., Scott C., et al: Reexamining the Radiation Therapy Oncology Group recursive partitioning analysis for glioblastoma multiforme patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:S135–136, 2003 (suppl 2)
- Shih**, Alan H.; Holland, Eric C. (2006): Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. In: *Cancer letters* 232 (2), S. 139–147. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.02.002.
- Sporn**, M. B.; Todaro, G. J. (1980): Autocrine secretion and malignant transformation of cells. In: *The New England journal of medicine* 303 (15), S. 878–880. DOI: 10.1056/NEJM198010093031511.
- Stupp**, Roger; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J; Weller, Michael; Fisher, Barbara; Taphoorn, Martin J. B. et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.

- Tabatabai**, Ghazaleh; Stupp, Roger; Wick, Wolfgang; Weller, Michael (2013): Malignant astrocytoma in elderly patients: where do we stand? In: *Current opinion in neurology* 26 (6), S. 693–700. DOI: 10.1097/WCO.000000000000037.
- Tada**, K.; Shiraishi, S.; Kamiryo, T.; Nakamura, H.; Hirano, H.; Kuratsu, J. et al. (2001): Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. In: *Journal of neurosurgery* 95 (4), S. 651–659. DOI: 10.3171/jns.2001.95.4.0651.
- Taphoorn**, Martin J. B.; Stupp, Roger; Coens, Corneel; Osoba, David; Kortmann, Rolf; van den Bent, Martin J et al. (2005): Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial. In: *The Lancet. Oncology* 6 (12), S. 937–944. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70432-0.
- Thiel**, G.; Losanowa, T.; Kintzel, D.; Nisch, G.; Martin, H.; Vorpahl, K.; Witkowski, R. (1992): Karyotypes in 90 human gliomas. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 58 (2), S. 109–120.
- Tortosa**, Avelina; Viñolas, Núria; Villà, Salvador; Verger, Eugènia; Gil, Juan M.; Brell, Marta et al. (2003): Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. In: *Cancer* 97 (4), S. 1063–1071. DOI: 10.1002/cncr.11120.
- Valtonen**, S.; Timonen, U.; Toivanen, P.; Kalimo, H.; Kivipelto, L.; Heiskanen, O. et al. (1997): Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. In: *Neurosurgery* 41 (1), S. 44-8; discussion 48-9.
- van den Bent**, Martin J; Brandes, Alba A.; Taphoorn, Martin J. B.; Kros, Johan M.; Kouwenhoven, Mathilde C. M.; Delattre, Jean-Yves et al. (2013): Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (3), S. 344–350. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.2229.
- Varela**, Mirta; Ranuncolo, Stella Maris; Morand, Ana; Lastiri, José; De Kier Joffé, Elisa Bal; Puricelli, Lydia Inés; Pallotta, María Guadalupe (2004): EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. In: *Journal of surgical oncology* 86 (1), S. 34–40. DOI: 10.1002/jso.20036.
- Verhaak**, Roel G. W.; Hoadley, Katherine A.; Purdom, Elizabeth; Wang, Victoria; Qi, Yuan; Wilkerson, Matthew D. et al. (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. In: *Cancer cell* 17 (1), S. 98–110. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Virchow**, Rudolf: Die krankhaften Geschwülste, 30 Vorlesungen, geh. während d. Wintersemesters 1862 - 1863 an d. Univ. zu Berlin, Band 2, Hirschwald Verlag 1865

Vogelbaum, Michael A.; Jost, Sarah; Aghi, Manish K.; Heimberger, Amy B.; Sampson, John H.; Wen, Patrick Y. et al. (2012): Application of novel response/progression measures for surgically delivered therapies for gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group. In: *Neurosurgery* 70 (1), S. 234-43; discussion 243-4. DOI: 10.1227/NEU.0b013e318223f5a7.

Wagner, Christoph; Müller, Oliver: Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte; 95 Tabellen, Thieme Verlag (2010)

Warnke, P.C.; Hans, F.; Lingner, C.; Kleihues, P.; Lüdecke, B.; Ostertag, C.B.: Correlation of simultaneous measurement of capillary permeability and regional blood flow in brain tumors with therapeutic results. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1989; 9 (1): 226.

Weller, Michael; Felsberg, Jörg; Hartmann, Christian; Berger, Hilmar; Steinbach, Joachim P.; Schramm, Johannes et al. (2009): Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (34), S. 5743–5750. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.0805.

Wemmert, Silke; Bettscheider, Marc; Alt, Simone; Ketter, Ralf; Kammers, Kai; Feiden, Wolfgang et al. (2009): p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients. In: *International journal of oncology* 34 (6), S. 1743–1748.

Wemmert, Silke; Ketter, Ralf; Rahnenführer, Jörg; Beerenwinkel, Niko; Strowitzki, Martin; Feiden, Wolfgang et al. (2005): Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7 (10), S. 883–893.

Wemmert, Silke (2006): Molekularzytogenetische Untersuchungen zur Abhängigkeit des Therapieerfolgs maligner menschlicher Gliome mit Temozomolid-Chemotherapie von der Art der vorliegenden genetischen Veränderungen. Dissertation

Wen, Patrick Y.; Kesari, Santosh (2008): Malignant gliomas in adults. In: *The New England journal of medicine* 359 (5), S. 492–507. DOI: 10.1056/NEJMra0708126.

Wen, Patrick Y.; Macdonald, David R.; Reardon, David A.; Cloughesy, Timothy F.; Sorensen, A. Gregory; Galanis, Evanthia et al. (2010): Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (11), S. 1963–1972. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.3541.

Westermarck, B.; Heldin, C. H.; Nistér, M. (1995): Platelet-derived growth factor in human glioma. In: *Glia* 15 (3), S. 257–263. DOI: 10.1002/glia.440150307.

Literaturverzeichnis

Wick, Antje; Dörner, Nils; Schäfer, Navina; Hofer, Silvia; Heiland, Sabine; Schemmer, Daniela et al. (2011): Bevacizumab does not increase the risk of remote relapse in malignant glioma. In: *Annals of neurology* 69 (3), S. 586–592. DOI: 10.1002/ana.22336.

Wick, Wolfgang; Platten, Michael; Meisner, Christoph; Felsberg, Jörg; Tabatabai, Ghazaleh; Simon, Matthias et al. (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 13 (7), S. 707–715. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.

Wilson, Taylor A.; Karajannis, Matthias A.; Harter, David H. (2014): Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. In: *Surgical neurology international* 5, S. 64. DOI: 10.4103/2152-7806.132138.

Wiltshire, R. N.; Rasheed, B. K.; Friedman, H. S.; Friedman, A. H.; Bigner, S. H. (2000): Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. In: *Neuro-oncology* 2 (3), S. 164–173.

Wu, C. L.; Zukerberg, L. R.; Ngwu, C.; Harlow, E.; Lees, J. A. (1995): In vivo association of E2F and DP family proteins. In: *Molecular and cellular biology* 15 (5), S. 2536–2546.

Xing, Wei-kang; Shao, Chuan; Qi, Zhen-yu; Yang, Chao; Wang, Zhong (2015): The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. In: *Drug design, development and therapy* 9, S. 3341–3348. DOI: 10.2147/DDDT.S85943.

Xu, Jie; Li, Zhaoli; Wang, Jilin; Chen, Haoyan; Fang, Jing-Yuan (2014): Combined PTEN Mutation and Protein Expression Associate with Overall and Disease-Free Survival of Glioblastoma Patients. In: *Translational oncology* 7 (2), S. 196-205.e1. DOI: 10.1016/j.tranon.2014.02.004.

Yung, W. K.; Albright, R. E.; Olson, J.; Fredericks, R.; Fink, K.; Prados, M. D. et al. (2000): A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. In: *British journal of cancer* 83 (5), S. 588–593. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1316.

Zülch, Klaus-J.; Brain tumors : their biology and pathology , 706 Seiten; Springer; Auflage: 3rd, compl. rev. ed. (5. Mai 1986)

Zülch, Klaus-J.: Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System, World Health Organisation; Verlag Genf, 1979

7. Anhang

Lösungen

Erythrozyten-Lysis-Puffer

- 155 mM NH_4Cl
- 10 mM KHCO_3
- 0,1 mM NaEDTA pH 7,4

Ladepuffer

- 0,1M Na_2EDTA
- 40 % Saccharose
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau auf 10 ml

Proteinase K Stammlösung

- 20 mg Proteinase K/mg Reaktionspuffer

SE-Puffer

- 75 mM NaCl
- 25 mM EDTA pH 8,0

5x TBE-Puffer

- 1x TBE =
 - 0,24 M Tris-Base
 - 0,22 M Borsäure
 - 1mM EDTA pH 8,0

20x SSC

- 3M NaCl
- 0,3 M NaCitrat (pH 7,0)

Anhang

PBS-Puffer

- 150mM NaCl
- 8mM Na₂HPO₄
- 2mM KCl
- 2mM KH₂PO₄ (pH7,0)

Herstellernachweis

BCIP Mannheim	(Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) Roche Diagnostics,
Biotin-Nick- Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Cot1-DNA, human (1 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI USA	(Vectashield® with DAPI) Vector Laboratories, Burlingame,
DNA-Leiter	Quantitas DNA Marker 25bp-500bp

Geräte

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotina 46, Hettich, Tuttlingen Minispin, Eppendorf, Hamburg
Programmable Thermal Controller	MJ Research, PTC-100, Hessisch Oldendorf
Wasserbäder	GFL, Manfred-rink-GmbH
Kühlzentrifuge	Sigma 3-16 PK
Tischkühlzentrifuge	Z233 MK, Hermle
Elektrophorese	amersham pharmacia biotech, EPS 301, Erlangen
Werkbank, Laminair	Heraeus instruments, HB 2448 K
Nanodrop NC-1000 USA	Thermo Fisher Scientific, Wirmington DE,

8. Danksagung und Vorträge

An dieser Stelle möchte ich mich rechtherzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, mich unterstützt und motiviert haben, sowie Erfolge und Misserfolge mit mir teilten.

Prof. Dr. med. Joachim Oertel danke ich für die Möglichkeit der Promotion im Fach Neurochirurgie/-onkologie, sowie für die Bereitstellung des Tumormaterials und die regelmäßigen Erfahrungswerte im Rahmen der wöchentlichen Seminare.

Besonderer Dank gilt vor allem **Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat** und **PD Dr. med. Ralf Ketter** für die Betreuung, die Unterstützung, das Feedback, die Ratschläge und Auswertungen der gewonnenen Ergebnisse. Danke auch für die kompetente und familiäre Atmosphäre im Labor und den Besprechungen, sowie für die Möglichkeit meine Versuche an den gewonnenen Materialien durchführen zu dürfen. In diesem Sinne bedanke ich mich auch beim kompletten **neurochirurgischen Ärzteteam der Universitätsklinik Homburg** für die Bereitstellung der Tumorproben.

Weiterhin danke ich dem gesamten **Laborteam** für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft, für die zahlreichen Gespräche, die Hilfsbereitschaft, den Rückhalt und die entstandenen Freundschaften. Im Speziellen danke ich: Silke Wemmert, Cornelia Lerner, Sonja Hoffmann, Ulrike Bechtel, Dennis Kraemer.

Für die statistische Auswertung der gewonnen Versuchsergebnisse danke ich zudem **Dr. Kai Kammers** der Fakultät für Statistik an der Technischen Universität Dortmund.

Nicht zuletzt gilt ein herausragendes Dankeschön **meiner gesamten Familie**, insbesondere meinem Mann, meinen Eltern und meinem Bruder für die Ermöglichung meines Studiums der Humanmedizin, für den Rückhalt, die Geduld und den festen Glauben an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit.

Vorträge:

"Importance of biomarkers in glioblastoma patients receiving local BCNU wafer chemotherapy"

Engelhardt, J; Ketter, R; Oertel, J; Tschan, C; Kammers, K; Urbschat, S

66. Jahrestagung der DGNC 2015

