

Aus der Abteilung Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Zytogenetische Grundlage der malignen Progression
anaplastischer Astrozytome: Chromosomale Aberrationen von
Primärtumoren, Rezidiven und ihr Einfluss auf das Überleben**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jörn Haupt

aus

Wolfenbüttel

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. med. A. Gutenberg

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. B. Zoll

Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumoren des zentralen Nervensystems.....	1
1.2	Astrozytäre Gliome.....	2
1.3	Histologie der malignen Astrozytome.....	2
1.4	Epidemiologie und Prognose der (malignen) Astrozytome	3
1.5	Molekularzytogenetische Grundlage der Progression der malignen Astrozytome.....	4
1.5.1	Molekularzytogenetische Veränderungen primärer Glioblastome.....	5
1.5.2	Molekularzytogenetische Veränderungen sekundärer Glioblastome.....	5
1.6	Diagnostik und aktuelles Therapiekonzept der malignen Astrozytome.....	7
1.6.1	Operative Therapie.....	9
1.6.2	Radio- und Chemotherapie.....	10
1.6.2.1	Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II).....	10
1.6.2.2	Anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III).....	10
1.6.2.3	Glioblastome (WHO-Grad IV).....	11
1.7	Komparative genomische Hybridisierung.....	12
1.8	Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Tumorproben.....	15
2.1.2	Zusammenstellung der klinischen Daten.....	15
2.2	Komparative genomische Hybridisierung (CGH).....	16
2.2.1	DNA-Isolierung aus Tumorproben.....	16
2.2.2	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts der Tumorproben.....	17
2.2.3	Gelelektrophorese.....	17
2.2.4	Nick-Translation.....	18
2.2.5	Hybridisierung.....	19
2.2.6	CGH-Auswertung.....	22
2.3	Geräte.....	24
2.4	Chemikalien.....	25
2.5	Lösungen und Puffer.....	25
2.6	Statistik.....	27

3	Ergebnisse	29
3.1	Deskriptive Statistiken zur Klinik	29
3.1.1	Geschlechter- und Altersverteilung	29
3.1.2	Rezidive	30
3.1.3	Therapie der primären anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III	31
3.1.3.1	Radiatio	31
3.1.3.2	Chemotherapie	31
3.1.4	Therapie der Rezidivtumoren	32
3.1.5	Überleben	32
3.2	CGH-Analyse	33
3.2.1	Anzahl der Nettoveränderungen	35
3.2.2	Anzahl der Nettoveränderungen in Primärtumoren und Rezidiven	36
3.2.3	Anzahl der Nettoveränderungen in Korrelation zum histologischen Grad	37
3.3	Chromosomale Aberrationen in primären anaplastischen Astrozytomen	38
3.4	Chromosomale Aberrationen in Tumorrezidiven aus anaplastischen Astrozytomen	40
3.5	Chromosomale Aberrationen in Bezug auf demographische Daten	45
3.6	Überlebenszeitanalysen in Bezug auf chromosomale Aberrationen	45
3.6.1	Überprüfung des Einflusses der Chromosomenaberrationen auf das Überleben	45
3.6.2	Einzelanalyse bei signifikantem Einfluss von Chromosomenaberrationen auf das Überleben	47
3.6.3	Einzelanalyse bei nicht-signifikantem Einfluss von Chromosomenaberrationen auf das Überleben	52
3.6.4	Darstellung der einflussnehmenden Aberrationen	57
3.7	Einfluss der Therapie auf die chromosomalen Veränderungen	60
4	Diskussion	61
4.1	Das Kollektiv	61
4.2	Malignisierung von anaplastischen Astrozytomen zu sekundären Glioblastomen und deren molekulargenetische Unterscheidung von primären Glioblastomen	61
4.3	Rezidivfreie Intervalle und Überlebenszeiten	62
4.4	Die genetischen Veränderungen	63
4.4.1	Anzahl der chromosomalen Aberrationen	64
4.4.2	Chromosomenbezogene Analyse der Aberrationen	65
4.4.2.1	Chromosom 1	65
4.4.2.2	Chromosom 2	66
4.4.2.3	Chromosom 3	66
4.4.2.4	Chromosom 4	67
4.4.2.5	Chromosom 5	67
4.4.2.6	Chromosom 6	67

4.4.2.7	Chromosom 7.....	68
4.4.2.8	Chromosom 8.....	70
4.4.2.9	Chromosom 9.....	70
4.4.2.10	Chromosom 10.....	71
4.4.2.11	Chromosom 11.....	73
4.4.2.12	Chromosom 12.....	73
4.4.2.13	Chromosom 13.....	73
4.4.2.14	Chromosom 14.....	74
4.4.2.15	Chromosom 15.....	75
4.4.2.16	Chromosom 16.....	75
4.4.2.17	Chromosom 17.....	76
4.4.2.18	Chromosom 18.....	77
4.4.2.19	Chromosom 19.....	77
4.4.2.20	Chromosom 20.....	77
4.4.2.21	Chromosom 21.....	78
4.4.2.22	Chromosom 22.....	78
4.5	Einordnung der chromosomalen Aberrationen (primär/sekundär/tertiär).....	80
4.5.1	Astrozytomtypische chromosomale Veränderungen (primäre chromosomale Aberrationen).....	80
4.5.2	Tumorprogressionstypische chromosomale Veränderungen (sekundäre chromosomale Aberrationen)	81
4.5.3	Zufällig akquirierte chromosomale Veränderungen (tertiäre chromosomale Aberrationen)	82
4.6	Das Tumorprogressionsmodell primärer anaplastischer Astrozytome und deren Rezidive	83
4.6.1	Stabilisierungseffekt chromosomaler Veränderungen rezidivierender anaplastischer Astrozytome	84
4.6.2	Chromosomale Veränderungen sekundärer Glioblastome (Maligner Progress)	85
4.7	Wechselseitiger Einfluss von Therapien und Molekulargenetik auf Überlebenszeiten bzw. Therapieansprechen	87
4.8	Kritische Beurteilung der Untersuchung.....	88
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
6	Anhang.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	94

Abkürzungsverzeichnis

AA	Anaplastisches Astrozytom
ACNU	Nimustin, 1-(4-Amino-2-Methyl-5-Pyrimidinyl)-Methyl-(2-Chloroethyl)-3-Nitrosoharnstoff
BCNU	Carmustin, Bis-Chlorethyl-Nitrosoharnstoff
BRCA1	BReast CAncer 1
CCNU	Lomustin, Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitrosoharnstoff
CDK	Cyclin-dependent kinase
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CT	Computerunterstützte Tomographie
DFMO	Oritine decarboxylase inhibitor
DNA	Desoxyribose nucleine acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMP3	Epithelial membrane proteine 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GBM	Glioblastom / Glioblastoma multiforme
IDH	Isocitratdehydrogenase
KLF6	Krüppel-like factor 6
MDM2	Murine double minute 2
MGMT	O6-methylguanine-DNA-methyltransferase
MLH3	MutL-homolog-3
MRT	Magnetresonanztomographie
NOA	Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft
PCV	Procarbazin, Lomustin (CCNU), Vincristin
PDGFR	Platelet-derived growth factor
PDSS2	Prenyl diphosphate synthase subunit 2
PTEN	Phosphatase and tensin
Rb	Retinoblastom
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SNP	Single-nucleotid polymorphisms
TIMP-3	tissue inhibitor of metalloproteinases-3
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1/1	S. 1	Tabelle 1.3/1	S. 2
Abb. 3.1.1/1	S. 30	Tabelle 1.5.2/1	S. 7
Abb. 3.1.2/1	S. 30	Tabelle 1.6/1	S. 8
Abb. 3.1.5/1	S. 33	Tabelle 2.3/1	S. 24
Abb. 3.2/1	S. 34	Tabelle 2.3/2	S. 24
Abb. 3.2/2	S. 35	Tabelle 2.4/1	S. 25
Abb. 3.2.1/1	S. 36	Tabelle 2.5/1	S. 25
Abb. 3.2.2/1	S. 37	Tabelle 2.5/2	S. 26
Abb. 3.2.3/1	S. 37	Tabelle 2.5/3	S. 26
Abb. 3.3/1	S. 39	Tabelle 2.5/4	S. 27
Abb. 3.4/1	S. 43	Tabelle 3.1.2/1	S. 31
Abb. 3.6.2/1	S. 49	Tabelle 3.1.4/1	S. 32
Abb. 3.6.2/2	S. 50	Tabelle 3.3/1	S. 38
Abb. 3.6.2/3	S. 51	Tabelle 3.4/1	S. 40
Abb. 3.6.2/4	S. 52	Tabelle 3.4/2	S. 44
Abb. 3.6.3/1	S. 53	Tabelle 3.6.1/1	S. 46
Abb. 3.6.3/2	S. 54	Tabelle 3.6.2/1	S. 48
Abb. 3.6.3/3	S. 55	Tabelle 3.6.2/2	S. 49
Abb. 3.6.3/4	S. 56	Tabelle 3.6.2/3	S. 50
Abb. 3.6.3/5	S. 56	Tabelle 3.6.3/1	S. 55
Abb. 3.6.3/6	S. 57	Tabelle 3.6.4/1	S. 57
Abb. 3.6.4/1	S. 59	Tabelle 3.6.4/2	S. 58
Abb. 4.5/1	S. 80	Tabelle 3.6.4/3	S. 59
Abb. 4.6/1	S. 83	Tabelle 6/1	S. 91
Abb. 4.6/2	S. 84	Tabelle 6/2	S. 92
Abb. 4.6.1/1	S. 85	Tabelle 6/3	S. 93
Abb. 4.6.2/1	S. 87	Tabelle 6/4	S. 93

1 Einleitung

1.1 Tumoren des zentralen Nervensystems

Die intrakraniellen Tumoren werden eingeteilt in hirneigene und metastasierte Tumoren. Die Krebserkrankungen des eigentlichen neuroepithelialen Gewebes lassen sich unterteilen in neuroblastische Tumoren, pineale parenchymale Tumoren, Embryontumoren, ependymale Tumoren, Tumoren, die vom Plexus choroideus ausgehen und Gliome. Diese letzte Gruppe lässt sich wiederum in Subgruppen astrozytischen und oligodendrogialen Ursprungs und ihre Mischformen unterteilen. Des Weiteren treten im Schädel Tumoren auf, die von den Hirnhäuten ausgehen (Meningeome) und primäre zerebrale Lymphome.

Die Abbildung 1.1/1 zeigt die relative Häufigkeit der einzelnen hirneigenen Tumorentitäten im Erwachsenenalter.

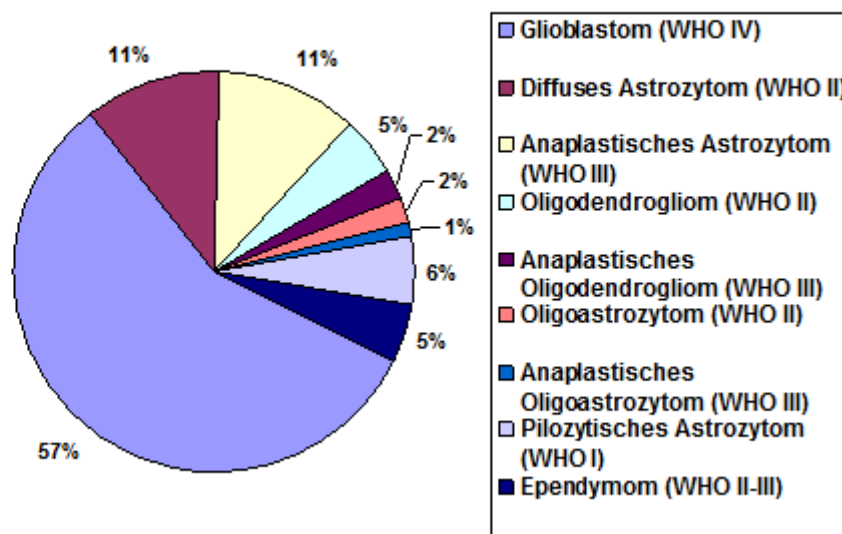


Abb. 1.1/1 Relative Häufigkeiten der Gliome und Ependymome (nach WHO)

Hirntumoren stellen für Patient und Angehörige psychisch und emotional eine extreme Belastung dar. Hierzu kommt, dass es immer noch keine zufriedenstellende Therapie gibt. Insbesondere die Gruppe der höhergradigen Astrozytome ist aufgrund des infiltrierenden Wachstums außerordentlich schwer zu therapieren. In der vorliegenden Arbeit beschränken wir uns daher auf diese besonders herausfordernde Tumorentität.

1.2 Astrozytäre Gliome

Die Inzidenz aller Gliome beträgt ca. 5-6 pro 100.000 Einwohner. Mit 60% stellen die Astrozytome epidemiologisch die häufigsten hirneigenen Tumoren dar (Kleihues und Cavenee 2000). Diese malignen Tumoren können überall im zentralen Nervensystem (ZNS) entstehen. Bevorzugt jedoch treten diese in den Großhirnhemisphären auf. Klinisch wie biologisch verhalten sich Astrozytome unvorhersagbar. Vor allem aufgrund ihres infiltrierenden Wachstums entziehen sich die malignen Astrozytome sowohl einer kompletten chirurgischen Resektion als auch einer gezielten Bestrahlung und Chemotherapie.

1.3 Histologie der malignen Astrozytome

Die histologische Einteilung der Astrozytome erfolgt nach der WHO-Klassifikation 2007 und unterteilt die Astrozytome in vier Malignitätsgrade. Grad I und II gehören zu den niedrigmalignen, Grad III und IV zu den hochmalignen Astrozytomen.

Tabelle 1.3/1

Klassifizierung und Gradierung der astrozytären Tumoren anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems

Tumorentität/Varianten	WHO-Grad	Histologie	Altersgipfel
Pilozytisches Astrozytom	I		10.-20. LJ
Diffuses Astrozytom		Kernatypien	30.-40. LJ
- fibrillär	II		
- gemistozytär	II		
Anaplastisches Astrozytom (AA)	III	Kernatypien + Mitosen	45.-69. LJ
Glioblastoma multiforme (GBM)	IV	Kernatypien + Mitosen + Endothelproliferation und/oder Nekrosen	45.-70. LJ

Das pilozytische Astrozytom (WHO I) und das pleomorphe Xanthoastrozytom (WHO II), d.h. gutartige Tumoren, die eher umschrieben wachsen.

Das Astrozytom WHO-Grad II ist das diffuse Astrozytom. Histologisch treten vermehrt Kernatypien (unterschiedlicher Chromatingehalt und Kernpleomorphie) auf. Es lassen sich dabei die Subtypen fibrilläres und gemistozytäres diffuses Astrozytom unterscheiden, wobei das letztgenannte eine schlechtere Prognose aufweist.

Das Astrozytom WHO-Grad III ist das anaplastische Astrozytom (AA). Es entsteht *de novo* oder kann sich in seltenen Fällen sekundär aus einem niedrigmalignen Astrozytom (WHO-Grad II) entwickeln. Histologisch treten neben den Kernatypien eine zunehmende Zelldichte und Mitosen in Erscheinung. Das anaplastische Astrozytom behält nur selten seinen histologischen Grad, wahrscheinlicher entwickelt es sich zum höchstmalignen Astrozytom WHO-Grad IV, dem Glioblastoma multiforme (GBM). Dieses ist histologisch zusätzlich durch Nekrosen und Endothelproliferationen gekennzeichnet. Nekrosen entstehen in diesem Zusammenhang nach heutiger Vorstellung durch ein auf die Tumormasse bezogen zu niedriges Blutangebot mit damit verbundener Sauerstoffunterversorgung und Mikrothrombosen. Durch kritische Mutationen in den Tumorzellen und Modifizierung durch lokalen Sauerstoffgehalt werden Transkriptionsprogramme aktiviert, die zu einer erhöhten Angiogenese führen (Furnari et al. 2007).

1.4 Epidemiologie und Prognose der (malignen) Astrozytome

Die Inzidenz bei diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) beträgt 1,4 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr. Hauptsächlich betroffen sind Erwachsene im Alter zwischen 30 und 40 Jahren (25% der Fälle). 60% liegen zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr. 30% treten nach dem 45. Lebensjahr auf. Das Durchschnittsalter liegt bei 34 Jahren. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,18:1) (Kleihues und Cavenee 2000).

Der maligne Progress ist aktuell weder klinisch noch biologisch vorhersehbar. Während es bei einigen Patienten in mehr als zehn Jahren zu keiner Progression kommt, tritt diese bei anderen Patienten rasch innerhalb von 1-2 Jahren auf. Der durchschnittliche Übergang eines diffusen Astrozytoms in ein höhergradiges beträgt 4-5 Jahre (Watanabe K et al. 1997, McCormack et al. 1992).

AA zeigen in Europa eine Inzidenz von etwa 0,3 pro 100.000 Einwohner und sind damit ein eher seltener Tumor. In der Hauptbetroffenengruppe (60%) zwischen 45 und 69 Jahren liegt die Inzidenz etwas höher (0,5 bis 0,7 pro 100.000 Einwohner). Die AA haben einen etwa 4%igen Anteil an allen malignen Tumoren des zentralen Nervensystems. Männer sind 1,4fach häufiger betroffen als Frauen (Stupp et al. 2007).

Die Prognose des AA ist sehr schlecht. Ein Jahr nach Diagnosestellung leben noch ca. 44%, nach 3 Jahren 22% und die 5-Jahresüberlebensrate beträgt lediglich 16% unabhängig vom Geschlecht. Der maligne Übergang vom anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) zum sekundären GBM (WHO-Grad IV) ist häufiger und geschieht im Mittel mit etwa 2 Jahren schneller (Watanabe K et al. 1997). Damit ist oftmals eine schlechtere Gesamtprognose verbunden.

Das GBM (WHO-Grad IV) ist mit 50-60% der häufigste astrozytische Tumor. Die Inzidenz liegt bei 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr mit einem Altersgipfel zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr. Männer sind auch bei WHO-Grad IV häufiger betroffen (1,5:1). Das GBM kann primär, also *de novo*, entstehen oder sich sekundär aus einem niedriggradigeren Astrozytom entwickeln. Das primäre GBM mit kürzerer klinischer Entwicklungszeit betrifft eher ältere (im Mittel 55 Jahre), das sekundäre GBM eher jüngere Patienten (<45 Jahre).

Die *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) definierte sechs prognoseentscheidende Klassen (I-III für anaplastische Astrozytome, IV-VI für Glioblastome), bei denen folgende Faktoren eine Rolle spielen: histologischer Grad (WHO-Grad III oder IV), Alter (< 50 Jahre), Symptombdauer (> 3 Monate), mentaler Status, Karnofsky-Score, Tumorsektion und Radiotherapie. Jüngere Patienten mit geringen Symptomen weisen dabei deutlich längere Überlebenszeiten auf als ältere Betroffene mit stärkerer Beeinträchtigung (Ohgaki und Kleihues 2005).

1.5 Molekularzytogenetische Grundlage der Progression maligner Astrozytome

In den letzten Jahren wird immer deutlicher, dass über das alleinige histologische Grading wenig über das biologische Verhalten jedes einzelnen Tumors ausgesagt werden kann. Immer mehr an Bedeutung gewinnen daher Techniken, die genetische Tumorprofile erstellen, z.B. Genexpressionsmusteranalysen, array-CGH, Methylierungsprofile und ausgedehnte Sequenzierungsmuster, die zur Aufdeckung

neuer Onko- und Tumorsuppressorgene führen sollen (Riemenschneider und Reifenberger 2009).

In der Entstehung und malignen Progression der astrozytären Gliome spielen verschiedene molekulare Mechanismen eine Rolle. Strittig ist derzeit noch, ob Gliome aus reifen Astrozyten durch Mutation hervorgehen oder ob die Tumoren aus glialen Vorläuferzellen bzw. neuralen Stammzellen entstehen. Untersuchungen haben gezeigt, dass primäre und sekundäre GBM (WHO-Grad IV) histologisch zwar identisch sind, jedoch molekular auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen, bei denen verschiedene chromosomale Aberrationen zum Tragen kommen (Furnari et al. 2007). Dieses unterschiedliche genetische Profil legt ein ebenso unterschiedliches therapeutisches Ansprechen der beiden Entitäten nahe.

1.5.1 Molekularzytogenetische Veränderungen primärer Glioblastome

In etwa einem Drittel der primären GBM und einigen AA finden sich Amplifikationen im *epidermal growth factor receptor* (EGFR), lokalisiert bei 7p12-14. Weitere charakteristische Veränderungen des primären Glioblastoms sind Verluste im PTEN-Gen (10q-Deletion) mit 70% und im CDKN2A-Gen (9p21) mit 31% (Ohgaki et al. 2004). In etwa 10% der primären GBM findet sich eine Amplifikation des MDM2-Gens (Reifenberger et al. 1993), was zu einer erhöhten Inaktivierung des in diesem Fall fast ausschließlich genetisch intakten p53 führt.

1.5.2 Molekularzytogenetische Veränderungen sekundärer Glioblastome

Das für p53 codierende Gen, lokalisiert bei 17p13.1, ist mit etwa 65% deutlich häufiger in sekundären GBM verändert (Ohgaki und Kleihues 2007). 28% primärer GBM zeigen diese Mutation, die zum Funktionsverlust des Proteins führt. Darüber hinaus ist die p53-Mutation bei sekundären GBM in über 90% der Fälle bereits bei der primären Biopsie vorhanden (Watanabe K et al. 1997). Allelverluste bei 17p bzw. p53-Inaktivierung finden sich in etwa einem Drittel aller Astrozytome WHO-Grad II – IV, im gemistozytären Subtyp WHO-Grad II sogar in über 80% der Fälle (Watanabe K et al. 1998). Es wird daher angenommen, dass die p53-Mutation als frühes Ereignis entscheidend zur malignen Progression der astroglialen Tumoren beiträgt (Watanabe K et al. 1998). Sowohl in niedrig- als auch höhergradigen Astrozytomen findet sich

eine Überexpression des *platelet-derived growth factor* (PDGFR), in hochgradigen Tumoren auch Amplifikationen als weitere Wegbereiter dieses malignen Progresses (Hermanson et al. 1996).

Wie erwartet treten genetische Veränderungen im Wachstumsfaktorbereich häufiger in höhermalignen als in niedrigmalignen Astrozytomen auf. Ein morphologisches Korrelat des daraus entstehenden aggressiveren, anaplastischen Wachstumsverhaltens durch Zellzyklusdysregulation ist beispielsweise die mitotische Aktivität der WHO-Grad-III-Astrozytome.

Das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) wird oft als Zwischenstufe bzgl. des aggressiv infiltrativen Wachstums zwischen dem diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) und dem hochmalignen GBM (WHO-Grad IV) angesehen. Während bei letzterer Entität weitgehendes Übereinstimmen bei der Diagnosestellung durch Histologie und molekulares Profil exprimierter Proteine besteht, ist dies in >30% der Fälle beim anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) strittig (Stupp et al. 2007). Insgesamt ist leider relativ wenig darüber bekannt, ob sich beispielsweise alle anaplastischen Astrozytome aus niedrigmaligneren Vorstufen entwickeln, was das hohe Vorkommen von p53-Mutationen (>70%) vermuten ließe (Watanabe K et al. 1997). Eine Übersicht über die bekanntesten Aberrationen und ihre Einordnung im malignen Progress gibt die Tabelle 1.5.2/1.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Telomerasereaktivierung im malignen Übergang von niedriggradigen in höhergradige Astrozytome eine wichtige Rolle spielt. Im Progress scheint dies ein besonders frühes Ereignis darzustellen (Sonoda et al. 2001).

In einer Arbeit von Phillips et al. (2006) wurden für hochgradige Astrozytome nach Genexpressionsmuster drei Subtypen (proneural, proliferativ und mesenchymal) mit unterschiedlichen Überlebensprognosen erstellt. Die Proneuralgruppe wurde als eher günstig und für die Mehrheit der anaplastischen Astrozytome zutreffend angesehen, während im Verlauf und im Rezidiv durch den malignen Progress sich die Verteilung eher in die mesenchymale Gruppe verschiebt. In diesen Subgruppen fanden sich auch häufiger Veränderungen am Chromosom 7p und 10q.

In Zukunft sollen molekulare Profile Erklärungen liefern, warum sich bestimmte Tumorsubtypen gegenüber spezifischer Chemotherapie Resistenzen zeigen. In den

Vordergrund treten dabei aktuell so genannte „Gliomstammzellen“ und deren Marker wie das Prominin-1 (CD133) (Murat et al. 2008). Große Anstrengungen werden derzeit unternommen, um Mittel zu finden, die die Subpopulationen mit hohem Malignitätspotential und erhöhter Resistenz gegenüber aktuellen Therapieschemata ausschalten können.

Tabelle 1.5.2/1 Übersicht über häufige Veränderungen im malignen Progress (nach Furnari et al. 2007, S. 2684)

Genetik	Überleben	Genetik	Überleben
Reifer Astrozyt, astrozytäre Vorläuferzelle und neurale Stammzelle			
-6q -9p21 (CDKN2A) -10 (PTEN) -11p15 -13q (RB) -19q13.3 -22q13.2	9-12 Monate	-10p -13q -17p (p53) -22q +7/7q +8q +12p	5-10 Jahre
Amplifikation : CDK4 EGFR MDM2 MDM4 PDGFR Bcl2L12		Diffuses Astrozytom	
Selten : -17p (p53)		-9p21 (CKDN2A) -11p15 -13q (RB) -19q Amplifikation: CDK4 EGFR MDM2	2-3 Jahre
		Anaplastisches Astrozytom	
		-10q PTEN Mutation	9-14 Monate
Primäres Glioblastom		Sekundäres Glioblastom	

1.6 Diagnostik und aktuelles Therapiekonzept der malignen Astrozytome

Die Klinik des einzelnen Patienten kann sehr variabel und vor allem unspezifisch sein. Vor allem richten sich die Symptome nach Tumorlokalisierung im Gehirn, wie in Tabelle 1.6/1 beschrieben, sowie nach der Wachstumsgeschwindigkeit, Größe und dem Umgebungsödem des Tumors.

Tabelle 1.6/1 Lokalisationsbezogene Symptome nach Gleixner et al. 2007

Lokalisation	Symptomatik
Frontalhirn	Wesensveränderungen Gedächtnisschwäche Intellektueller Abbau Anosmie Foster-Kennedy-Zeichen
Temporalhirn	Absencen Psychomotorische Anfälle Sprechstörungen Aphasien
Parietalhirn	Hemiparesen Fokale Anfälle Hemihypästhesien Hemiparästhesien
Okzipitalhirn	Hemianopsie Optische Halluzinationen Optische Agnosie Dyslexie
Zwischenhirn	Hemianopsie Hypophysenstörungen
Kleinhirn	Ataxie Nystagmus Schwindel, Übelkeit Gangunsicherheit Apraxie
Hirnstamm	Hirnnervenstörungen Vigilanzstörungen Atemdepression

Unabhängig von der Lokalisation, wohl aber auf Hirndruckerhöhung zurückzuführen, sind Symptome wie ungewohnte Kopfschmerzen, Schwindel und Erbrechen.

Die Bildgebungen mittels der computerunterstützten Tomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) sind der Goldstandard in der Diagnostik der Hirntumoren. Dabei lassen sich die einzelnen Tumorphistologien durch unterschiedliche mit dem Malignitätsgrad kumulierende Eigenschaften charakterisieren. Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II) zeigen zumeist keine Kontrastmittelanreicherung, keine Verkalkungen und kein Ödem, wie es für höhergradige Astrozytome typisch ist. Die Bildgebung des AA weist oftmals eine

Signalverstärkung nach Kontrastmittelgabe auf. Des Weiteren lässt sich im Gegensatz zum diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) häufig ein Perifokalödem in AA nachweisen. GBM zeigen oftmals einen ringförmigen, girlandenartigen Kontrastmittelsaum. Die Anreicherung kann sich sehr unregelmäßig darstellen. Regelmäßig finden sich zentrale Nekrosen und ein ausgeprägtes Hirnödem.

1.6.1 Operative Therapie

Die operative Therapie beim niedriggradigen Astrozytom und subjektiver Symptombefreiheit ist eher mit Zurückhaltung anzusehen und folgt derzeit dem „*Watch-and-wait*“-Prinzip. Bei Wachstumsprogress im konsekutiven Follow-up-MRT wird in jedem Fall operiert, dabei jedoch immer unter dem Vorsatz der Radikalität, ohne dabei den Patienten neurologisch zu verschlechtern (Lacroix et al. 2001).

In der Vergangenheit wurden die AA als eigene Entität weniger untersucht und eher aus Rückschlüssen der Ergebnisse bei GBM therapiert.

Neben der Diagnosesicherung durch Probengewinnung wird bei AA und GBM gleichermaßen durch eine Operation eine komplette Resektion des Tumors angestrebt. Radiologische postoperative Tumorfreiheit geht mit längeren Überlebenszeiten einher gegenüber MR-morphologisch inkompletten Resektionen (Lacroix et al. 2001). Lokalrezidive im Operationsgebiet sind aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstums und der damit nahezu unmöglichen vollständigen Tumorentfernung eher die Regel.

1.6.2 Radio- und Chemotherapie

1.6.2.1 Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II)

Verschiedene randomisiert-kontrollierte Studien haben gezeigt, dass die Radiotherapie bei diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II) zwar die lokale Tumorkontrolle positiv beeinflusst, nicht jedoch das Langzeitüberleben (Leitlinien der neuro-onkologischen Arbeitsgemeinschaft (NOA 2008)). Dem Bestrahlungsvolumen entsprechend werden derzeit Dosen von 45 Gy und 54 Gy appliziert. In der Primärtherapie des diffusen Astrozytoms ist die Chemotherapie nicht indiziert. Im Falle eines Tumorrezidivs nach *Radiatio*, besonders mit Verdacht auf malignen Progress, ist der Einsatz des PCV (Procarbazin, Lomustin (CCNU), Vincristin)-Schemas im Individualfall anzuraten, wozu kontrollierte Studien jedoch fehlen.

1.6.2.2 Anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III)

Für AA ist die Radiotherapie die postoperative Standardtherapie, für die eine Verbesserung der Überlebenszeiten schon seit Ende der 1970er Jahre gesichert ist (Walker et al. 1978). Standardmäßig erfolgt heute eine Bestrahlung der erweiterten Tumorregion mit 54 Gy, nach Möglichkeit 60 Gy in 1,8-2 Gy-Fraktionen (Leitlinien der NOA 2008).

Der Nutzen einer Chemotherapie gerade in der Primärtherapie ist umstritten und Gegenstand aktueller Studien. Sie wird besonders bei jüngeren Patienten mit günstigen begleitenden Prognosefaktoren, wie unter anderem einem hohen Karnofsky-Score, eingesetzt. Die NOA-04-Studie zeigte, dass eine primäre Chemotherapie der *Radiatio* nahezu gleichwertig ist (Leitlinien der NOA 2008). Über den optimalen Zeitpunkt des Therapieeinsatzes gibt es weiterhin Diskussionen. Unumstritten positiv anerkannt ist der Einsatz von Temozolomid als alkylierendes Agens. Besonders profitieren dabei Patienten, die eine Methylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens aufweisen (Hegi et al. 2005).

Darüber hinaus sollten insbesondere Patienten mit einem oligodendroglialen Anteil, molekular gesichert durch Veränderungen bei -1p und -19q, aufgrund erhöhter Radio- und Chemosensitivität von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren.

Solche prognostisch positiven chromosomalen Marker, die ein unterschiedliches Ansprechen auf Radiochemotherapie aufzeigen, sind aber derzeit in der reinen Astrozytomgruppe leider noch unzureichend bekannt.

Die aktuelle CATNON-Intergroup-Studie EORTC 26053-22054, an der nur Patienten mit anaplastischen Gliomen ohne 1p/19q-Deletion teilnehmen, stellt zwei Gruppen gegenüber, die entweder nur eine Radiotherapie oder gleichzeitig Temozolomid erhalten. Im Anschluss werden beide Studiengruppen zusätzlich entweder adjuvant mit Temozolomid weiterbehandelt oder nur beobachtet.

Belegt ist der Benefit einer Chemotherapie zudem im Rezidivfall. Auf etwa einem Level stehen dabei die Nitrosoharnstoffmonotherapie, die PCV-Chemotherapie (Levin et al. 1990), die Kombination aus ACNU und Teniposid (VM26) (Neurooncology Working Group 2003) und Temozolomid (Wong et al. 1999). Eine Kombination aus PCV mit einem *oritime decarboxylase inhibitor* (DFMO) erhöht die durchschnittliche Überlebenszeit im Vergleich zur alleinigen PCV-Chemotherapie (Levin et al. 2003). Gerade Temozolomid hat sich in den letzten zehn Jahren zur Behandlung des Rezidivs etabliert (Stupp et al. 2001) und wird derzeit in mehreren Studien (z.B. CATNON und Codeleted-Studie (NCCTG N0577)) weiter überprüft. Neben einer erhöhten Lebensqualität zeigte sich ein progressionsfreies Intervall von 5,4 Monaten bzw. eine mittlere Überlebenszeit von 12,3 Monaten (Yung et al. 1999). Diese positiven Effekte zeigten sich in dieser Studie bei alleiniger Temozolomidmedikation und auch bei Patienten, die zuvor andere Chemotherapeutika erhalten hatten. Weitere Untersuchungen ergaben ähnliche Ergebnisse mit einem Benefit gegenüber alleiniger Procarbazintherapie (Osoba et al. 2000). Aufgrund der oralen Applizierbarkeit und guten Verträglichkeit gegenüber anderen alkylierenden Substanzen wird Temozolomid immer häufiger angewandt. Bei gutem Ansprechen, also kompletter oder Teilremission bzw. Krankheitsstabilität, kann die Chemotherapie nach acht Zyklen mit Temozolomid leitliniengerecht unterbrochen werden.

1.6.2.3 Glioblastome (WHO-Grad IV)

Standardmäßig wird das GBM mit 54 – 60 Gy, wenn möglich mit 60 Gy zu 1,8-2-Gy-Fraktionen bestrahlt. Die mediane Überlebenszeit wird dadurch um etwa sechs

Monate gesteigert (Leitlinien der NOA 2008). In der palliativen Situation bei Patienten mit fortgeschrittenem Alter und schlechter Prognose kann auch eine akzelerierte Radiotherapie (z.B. 30-45 Gy in 3-Gy-Fraktionen) zur Behandlungszeitverkürzung zum Einsatz kommen. In der Primärtherapie wird unter Berücksichtigung der wichtigsten prognostischen Faktoren zusätzlich konkomitant chemotherapeutisch mit Temozolomid adjuvant behandelt. Die EORTC-Studie 26981-22981/NCIC CE.3 hat dafür eine Erhöhung der 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% gezeigt. Das mediane Überleben wurde von 12,1 auf 14,6 Monate gesteigert (Stupp et al. 2005). Bei kompletter oder Teilremission bzw. Krankheitsstabilität kann die Chemotherapie nach vier bis sechs Zyklen nitrosoharnstoffhaltiger Therapie bzw. acht bis zwölf Zyklen mit Temozolomid unterbrochen werden (Leitlinien der NOA 2008). Einige Zentren befürworten jedoch die kontinuierliche Fortführung bis zum Tumorprogress, soweit kein Abbruchkriterium erreicht wird (Leitlinien der NOA 2008).

Im Rezidivfall ist der Nutzen der Chemotherapie erwiesen. Wirksamkeitsunterschiede zwischen Temozolomid und nitrosoharnstoffhaltigem Therapieschema sind nicht belegt. Entsprechende Studien fehlen.

In den letzten Jahren finden auch immer mehr neue Therapieansätze ihre klinische Erprobung. Dazu gehören niedrig-molekulare Kinaseinhibitoren, Immunotoxine, sowie monoklonale Antikörper wie z.B. Imatinib (Leitlinien der NOA 2008). Diese sollen hemmend auf die Aktivität von für den Tumorprogress wichtigen Proteinkomplexen einwirken, im genannten Beispiel auf den PDGFR. Ziele anderer Antikörper sind auch der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR). Durchschlagende Erfolge ergeben sich derzeit jedoch nicht, da die einzelne Blockierung eines Signaltransduktionszieles durch die Komplexität des Zellzyklus häufig umgangen werden kann (Furnari et al. 2007).

1.7 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

In dieser Arbeit diente die komparative genomische Hybridisierung (CGH) als technischer Ansatz. Ein wichtiger Vorteil neben den verhältnismäßig geringen Kosten dieser Methode ist, dass die Untersuchungen auch an in Paraffin eingebetteten

Tumoren durchgeführt werden können, und somit Zugriff und Akquirierung von Proben vereinfacht wird.

Die CGH wurde erstmals 1992 beschrieben. Es handelt sich um eine molekularzytogenetische Methode auf Basis der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), anhand derer ein Überblick über chromosomale und subchromosomale Verluste und Zugewinne eines Tumors erreicht werden kann (Kallioniemi A et al. 1992). Dies dient der Hilfestellung bei der Identifizierung und Lokalisation von spezifischen Genen der Tumorentstehung und Malignisierung. Ebenso können tumorentitätsspezifische Veränderungsmuster aufgedeckt werden. Auswertbar sind dabei Veränderungen in einem Auflösungsvermögen um 10 Megabasen (Petersen et al. 1996). Bei Amplifikationen, also mehrfachen Zugewinnen, liegt die Auswertbarkeit bei bis zu 100 Kilobasen (Kallioniemi A et al. 1992). Tumor- und Referenz-DNA konkurrieren bei der Hybridisierung um die gleichen Bindungsstellen der Metaphase-Chromosomen. Befinden sich Zugewinne im Tumorgenom so überwiegt die Tumor-DNA gegenüber der Referenz und bindet statistisch häufiger an die Chromosomen. Die Referenz-DNA überwiegt, wenn Verluste innerhalb der Tumor-DNA aufgetreten sind. Quantitativ werden rote (Verluste) und grüne (Zugewinne) Fluoreszenzsignale über die Längsachse des gesamten Chromosoms gemessen. Aussagen lassen sich dabei auch über Amplifikationen in der Tumor-DNA machen.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Diffus infiltrierende Astrozytome sind die häufigsten Gehirntumoren bei Erwachsenen. Ihr infiltratives Wachstum macht eine vollständige Resektion und damit definitive Heilung unmöglich, so dass weiterführende Therapien wie Radiotherapie und Chemotherapie unerlässlich sind. Trotz aller Fortschritte der Therapiemöglichkeiten ist die mittlere Überlebensrate dieser Tumoren nach wie vor schlecht, vor allem, weil Astrozytome eine inhärente Tendenz zur malignen Progression zeigen und bereits nach wenigen Monaten rezidivieren. Nur wenige Astrozytome bleiben im Rezidiv histologisch im selben Malignitätsgrad. Ein signifikanter Anteil an Astrozytomen WHO-Grad II rezidiviert spontan oder aber auch nach Radio- und Chemotherapie als AA oder sogar sekundäres GBM. Einen weitaus größeren Anteil aber stellen die anaplastischen Astrozytome dar, die in ihrem Verlauf

als GBM erneut auftreten. Klinisch ist diese Malignisierung entscheidend, weil dies die Haupttodesursache der Patienten mit einem Astrozytom WHO-Grad II und WHO-Grad III darstellt. Die molekularzytogenetischen Mechanismen der malignen Progression oder der histologischen Stabilität innerhalb des Rezidivs sind nur unzureichend erklärt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen in astrozytären Gliomen und ihren Rezidiven darzustellen, um eine Einsicht in das typische chromosomale Profil während der malignen Progression der Astrozytome zu bekommen, bzw. die Veränderungen zu identifizieren, die mit einer guten oder kehrseitig besonders schlechten Prognose einhergehen. Hierbei galt besondere Konzentration den AA, weil diese gegenüber den niedriggradigen Astrozytomen eine höhere Wahrscheinlichkeit der malignen Progression aufweisen. Die dabei gefundenen chromosomalen Veränderungen könnten für die spontane oder sogar therapieinduzierte maligne Progression dieser Tumoren verantwortlich sein und deshalb möglicherweise neue Ansatzpunkte zur prospektiven Diagnostik und optimierten, pathogeneseorientierten Therapie liefern.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Tumorproben

Nach Bewilligung des Vorhabens durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Antragsnummer: 14/9/03) wurden aus den Befundarchiven der Institute Neuropathologie der Universitätskliniken Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. W. Brück), der Universitätsmedizin Berlin Charité (Direktor: Prof. Dr. med. Frank Heppner) und dem Evangelischen Krankenhaus Oldenburg (Direktor: aktuell Prof. Dr. med. Kretschmer, zuvor Dr. med. Blanckenberg) anhand der histologischen Befunde paraffin-asservierte Astrozytome und GBM aus dem Zeitraum 1987 bis 2004 zusammengestellt. Einschlusskriterien im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit waren die histologischen Diagnosen AA und deren Rezidive als WHO-Grad III sowie sekundäre GBM. Definitionsgemäß bestand ein zeitlicher Abstand von mindestens drei Monaten zwischen Primärtumor und Rezidiv. Ausschlusskriterium war eine für die komparative genomische Hybridisierung zu geringe Tumormenge ($< 5 \text{ mm}^3$).

2.1.2 Zusammenstellung der klinischen Daten

Die Zusammenstellung der klinischen Daten erfolgte nach Vorgaben der Ethikkommission und hatte die schriftliche Einwilligung des Patienten bzw. deren Angehörigen als Voraussetzung. Primär wurden die zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit relevanten klinischen Informationen anhand der vorliegenden Patientenakten gewonnen. Dazu gehörten Alter, Geschlecht, präoperativer Karnofskyscore, Operationsdatum und adjuvante Therapien. Für das Follow-up wurden mit Zustimmung der Patienten und deren Angehörigen die Hausärzte kontaktiert, die in Rücksprache mit ihren Patienten einen Fragebogen beantworteten. Bei Nichtauffinden der Patientenakten bzw. ausbleibender Rückmeldung durch Hausärzte konnte kein oder ein nur unvollständiges Follow-up erhoben werden.

2.2 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die während der CGH benötigten Geräte und Chemikalien befinden sich in den Abschnitten 2.3 bis 2.5 tabellarisch aufgeschlüsselt.

2.2.1 DNA-Isolierung aus Tumorproben

Zur Gewährleistung eines hohen Tumoranteils am zu isolierenden Gewebstück wurden auf den zugehörigen HE-Schnitten die Bereiche mit der höchsten Tumordichte markiert. Anschließend wurden die tumorzellfreien Bereiche der Paraffinblöcke mit einem Skalpell heraus getrennt, um einen 90% Tumoranteil im untersuchten Material zu erreichen (Mikrotom: Reichert-Jung, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland). Die Schnittdicke betrug etwa 10 µm. Das so gewonnene Tumormaterial aus 10 Schnitten wurde in Eppendorf-Cups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesammelt und bewahrt.

Es folgte die Entparaffinierung mittels Pipettieren von je 1 ml Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) in die mit den Gewebsschnitten gefüllten Eppendorf-Cups (E-Cups). Nach kurzem Vortexen (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) wurden die Proben zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei 10000 rpm wurde anschließend eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand verworfen. Der Ablauf wurde mit weiteren 1 ml Xylol erneut durchgeführt. Zur Entfernung des verbliebenen Xylols erfolgte die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in die E-Cups. Anschließend wurde wieder kurz gevortext und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Dieser Ablauf wurde ebenfalls ein zweites Mal durchgeführt.

Im Wärmeschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) wurden die Gewebestücke bei 60 °C eine Stunde lang getrocknet. Darauf wurden 240 µl DNA-Isolierungspuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.5/1) und 40 µl Proteinase K (50 U/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in die E-Cups gegeben und anschließend im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) bei 55 °C über Nacht und einer Schüttelfrequenz von 850 rpm inkubiert. Der DNA-Isolierungspuffer bewirkte eine Aufspaltung der Zellproteine und eine Freilegung der DNA.

Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte bei 95 °C über acht Minuten im Thermomixer am darauf folgenden Tag. Anschließend wurde zehn Minuten bei 13500 rpm zentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand in ein neues E-Cup überführt zur Minimierung der Kontamination durch Restparaffin und –gewebe. Unter Verwendung eines Qiagen-Kits (QIAamp (DNA Mini Kit (250); Qiagen; Hilden, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben die DNA weiter aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts der Tumorproben

In Einmalplastikküvetten (UVette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die einzelnen Proben auf Reinheit und Konzentration photometrisch (Photometer: Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überprüft. 5 µl der DNA-Probe wurden dabei mit 95 µl Ampuwa verdünnt und der Messung zugeführt. Als Referenz wurden 100 µl Ampuwa verwendet.

2.2.3 Gelelektrophorese

Mittels der 1,5%-Agarose-Gelelektrophorese wurden die Fragmentgrößen der extrahierten DNA bestimmt. Als vergleichender Längenstandard diente der Lambda-Marker (Fragmentlänge: 21-0,56 kb MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland), der im Gel parallel zur in die Geltaschen pipettierten DNA lief. Als DNA interkalierende Substanz wurde Ethidiumbromid (SIGMA; St. Louis, USA) verwendet, dessen fluoreszierende Eigenschaften im UV-Licht bei 312nm ein Sichtbarwerden der DNA ermöglichten.

Zur Vorbereitung der Proben wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte jeweils 5 µl der DNA-Lösungen pipettiert. Jedem Ansatz wurden 3 µl Loading Dye (MBI-

Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) zugefügt. Als Längenstandard wurden 1,5 µl Lambda-DNA (0,5 µg/µl), 3 µl Loading Dye und 5 µl Ampuwa zugesetzt. Das im Loading Dye enthaltene Bromphenolblau erlaubte eine optische Verfolgung der DNA während des Elektrophoreselaufes.

2.2.4 Nick-Translation

In die isolierte DNA wurde während der Nick-Translation als Marker Biotin für die Tumor-DNA und Digoxigenin für die Referenz-DNA eingesetzt. In der folgenden Detektion wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper an die Marker gekoppelt - ein grüner Antikörper bei Tumor-, ein roter bei der Referenz-DNA. Unter Verwendung von DNase I wurden Einzelstrangbrüche in die DNA geschnitten, so genannte „nicks“. DNA-Polymerase I füllte unter Einbau der oben genannten Marker die Brüche wieder auf.

Folgendes Pipettierschema kam bei der Nick-Translation in vorbereitete Eppendorf-Cups zum Einsatz:

- 3 µg Tumor-DNA / Referenz-DNA
- 10 µl DNA-Puffer (10x konzentriert)
 - MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
- 2µl dATP, dCTP, dGTP
 - Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
- 1µl dTTP
 - Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
- 1µl 60nmol Biotin-16-dUTP / 1 mM Digoxigenin-11-dUTP
 - Roche; Mannheim, Deutschland
- 2µl DNA-Polymerase I
 - MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
- 1µl DNase I – Verdünnung
 - Siehe Tabelle 2.5/2
- 100 µl Ampuwa.

Die in der DNA-Extraktion gewonnenen Konzentrationswerte dienen der Errechnung der benötigten 3 µg DNA pro Ansatz. Die bei -20 °C gelagerten Nukleotide wurden langsam auf Eis erwärmt.

Die Ansätze wurden nach kurzem Vortexen bei 15 °C für 50 Minuten (Tumor-DNA) bzw. 60 Minuten (Referenz-DNA) auf dem Thermomixer inkubiert.

Die einzelnen DNA-Fragmente sollten nach erfolgter Nick-Translation einer Länge von 500 – 1500 bp entsprechen. Eine Gelelektrophorese analog zu der während der DNA-Extraktion verwendeten (siehe Kap. 2.2.3) diente der Überprüfung. Abweichend wurde als Längenstandard pUC19 (Fragmentlängen: 501-26 bp; MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Lieferte das Ergebnis zu lange DNA-Fragmente, schloss sich eine zweite Inkubationszeit für 5 – 10 Minuten bei 15 °C auf dem Thermomixer an. Die Reaktion wurde mittels Einfrieren auf -20 °C unterbrochen.

2.2.5 Hybridisierung

Anschließend erfolgte die Hybridisierung von markierter Tumor- und Referenz-DNA auf vorgefertigte Objektträger (CGH Target Slides; Vysis Inc.; Downers, Grove, USA) mit Metaphasechromosomen. Die Objektträger wurden auf die Wärmeplatte der feuchten Kammer (Hybrite TM; Vysis; Stuttgart-Fasanenhof, Deutschland) bei 37 °C gelegt, um Kondenswasser zu entfernen.

Die DNase und Polymerase in der Nick-DNA-Lösung wurden durch Zugabe von 5 µl EDTA (Serva, Heidelberg, Deutschland) und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C und 1400 rpm im Thermomixer inaktiviert. In vorbereiteten Eppendorf-Cups wurden neben Tumor- und Referenz-DNA die repetitive Sequenzen enthaltende humane Cot-1-DNA (1 µg/µl, Boehringer, Mannheim, Deutschland) pipettiert und mit 12 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4,8 (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 570 µl Ethanol bei -80 °C nach kurzem Vortexen für 0,5 – 2 Stunden präzipitiert. Die im starken Überschuss vorliegende Cot-1-DNA (im Mengenvergleich zu Tumor- und Referenz-DNA) blockiert die repetitiven Sequenzen in Bereichen von hohem Heterochromatinanteil und um das Zentromer.

Zugehöriges Pipettierschema:

- 67 µl Nick-Tumor DNA
- 67 µl Nick-Referenz DNA
- 80 µl Cot-1 DNA
- 12 µl NaAc / 3 M / pH 4,8
- 570 µl 100% Ethanol (-20 °C).

Nach Fällung der DNA erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze bei 4 °C und 14000 rpm über 30 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zur Aufreinigung wurden auf das verbleibende DNA-Pellet 800 µl 70% Ethanol gegeben und bei 45 °C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Ansätze wurden daraufhin ein weiteres Mal bei 4 °C und 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet für 30 Minuten bei Raumtemperatur und dem Abzug getrocknet.

Resuspendiert wurde das Pellet daraufhin mit 6 µl deionisiertem Formamid (Fluka Biochemika; Buchs, CH) und im Thermomixer bei 37 °C und 1400 rpm für 60 Minuten inkubiert.

Die Objektträger wurden im Vorfeld einer proteolytischen Pepsin-Behandlung unterzogen. Dies diente dem Zweck der Entfernung von Proteinrückständen der Zellkerne, die sich negativ auf die Spezifität der Hybridisierung auswirken würden. Im Wasserbad wurde dafür eine Glasküvette mit 70 ml Aqua dest. auf 37 °C erwärmt. Nach Zugabe von 20 µl Pepsin (100 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA) und 700 µl 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Objektträger darin für 5 Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung folgte eine Glasküvette mit 2x SSC (siehe Tabelle 2.5/3) und die Dehydrierung in jeweils fünfminütigen Intervallen in aufsteigender Alkoholreihe mit 70%, 85% und 100% -20 °C kaltem Ethanol. Abschließend wurden die Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Um die Hybridisierung zu ermöglichen, musste die in den Chromosomen vorliegende DNA-Doppelhelix in Einzelstränge denaturiert werden. Die dafür verwendete Lösung (siehe Tabelle 2.5/3) wurde in einer im Wasserbad stehenden Glasküvette auf 69 °C erwärmt und mit jeweils zwei Objektträgern aus der feuchten Kammer (Hybrite) für

zwei Minuten bestückt. Es schloss sich eine Dehydrierung in Glasküvetten aufsteigender Alkoholreihe für jeweils fünf Minuten mit 70%, 85% und 100% -20 °C kaltem Ethanol an. Die Objektträger trockneten bei Raumtemperatur und wurden anschließend wieder bei 37 °C auf die Wärmeplatte der feuchten Kammer gebracht.

Zur DNA-Stabilisierung wurden 7 µl Master Mix (siehe Tabelle 2.5/3) den Ansätzen in den Eppendorf-Cups hinzupipettiert. Danach wurden die Proben bei 78 °C im Thermomixer über sechs Minuten denaturiert. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation, worauf 13 µl des Ansatzes auf die Objektträger zur Hybridisierung gegeben wurden. Luftblasenfrei wurden die Objektträger mit einem 15 x 15 mm Deckglas belegt und mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) verschlossen. Über einen Zeitraum von 72 Stunden verblieben sie so in der feuchten Kammer. Währenddessen lief die zur Hybridisierung führende Reaktion ab.

Nach Ablauf des Zeitintervalls und Entdeckelung wurde zur Rückstands Entfernung sowie von unspezifisch hybridisierter DNA ein dreimaliger Waschvorgang bei 42 °C in einer Küvette im Schüttelbad mit Waschlösung A (siehe Tabelle 2.5/4) durchgeführt. Gleicher dreimaliger Vorgang schloss sich mit Waschlösung B (siehe Tabelle 2.5/4) an.

Die Zugabe von 300 µl Blockinglösung (siehe Tabelle 2.5/4) verhinderte die Bildung unspezifischer Bindungen durch die Fluoreszenz-Antikörper. Anschließend inkubierten die Objektträger 30 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer und wurden dann gedeckelt.

Es folgte ein Waschvorgang mit 2 ml der Waschlösung C (siehe Tabelle 2.5/4). Daraufhin wurden 300 µl Detektionslösung (siehe Tabelle 2.5/4) auf die Objektträger pipettiert. Dies geschah unter Lichtschutz aufgrund der enthaltenen lichtempfindlichen fluoreszierenden Antikörper gegen Biotin und Digoxigenin. Die Objektträger inkubierten erneut bei 37 °C für 60 Minuten in der feuchten Kammer.

Zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit Waschlösung C über jeweils 5 Minuten bei 42 °C im Schüttelbad.

20 µl DAPI-Eindeckelungsmedium (siehe Tabelle 2.5/4) wurden zur Gegenfärbung der einzelnen Chromosomen auf die Objektträger gebracht und diese mit einem Deckglas belegt. Die Fluoreszenzaufnahmen sollten aufgrund des Ausbleichens der Fluorochrome binnen 14 Tagen durchgeführt sein. Lichtgeschützt wurden die Objektträger soweit bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.6 CGH-Auswertung

Die Metaphasen wurden nach Aufnahme monochromer Bilder mit dem Programm SmartCapture2 (Vysis, Downers Grove, USA) durch eine computergekoppelte CCD-Kamera (Sensys Photometrics SENSYS; München, Deutschland) bei 880facher Vergrößerung und 8bit-Farbtiefe (256 Graustufen) mittels der Software Quips Karyotyping/CGH (Vysis, Downers Grove, USA) ausgewertet. Beim verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein Axioskop 2 (ZEISS, Göttingen, Deutschland) mit 10er, 20er und 63er Objektiv (10x, 20x, 63x Ölimmersion, ZEISS, Göttingen, Deutschland). Eine Quecksilberdampflampe (HBO mit selbstjustierender Ausleuchtung; ZEISS, Göttingen, Deutschland) diente der Ausleuchtung mit dahinter positioniertem über Software gesteuertem Filterrad (Ludl Filterrad, Ludl, Hawthorne, USA), das mit einem anti-Digoxigenin-Rhodamin(FITC)-Filter, einem Fluoresceinisothiocyanat (TRITC)-Filter und einem DAPI-Filter bestückt war.

Die CGH-Software reduzierte unerwünschte Rauscheffekte durch Generierung eines Summeninterpreters aus durchschnittlich 15-20 CGH-Profilideogrammen. Die Festlegung der Schwellenwerte für Gewinne und Verluste erfolgte für jede Hybridisierung individuell. Die Schwelle für Gewinne lag zwischen 1,15 bis 1,20, die für Verluste bei 0,80 bis 0,85 und bei stark erhöhter Kopienzahl (Amplifikation) ab einem Schwellenwert von 1,5. Waren anhand des Interpreters deutliche Trendveränderungen zu erkennen, wurden in einzelnen Fällen die Schwellenwerte nach unten korrigiert, sofern diese auf dem 95% Konfidenzintervall als signifikant angezeigt wurden. Zur Beschreibung der Veränderungen wurde die Nomenklatur für humane Chromosomen für die in-situ-Hybridisierung (Mitelman 1995) herangezogen.

Aberrationen an bestimmten Chromosomenregionen sind kritisch zu bewerten und flossen nur in Einzelfällen (u.a. 1p32pter und 19) in die Auswertung ein. Veränderungen an diesen Stellen gelten als besonders artefaktanfällig und werden häufig falsch positiv als Verluste gewertet. Unter die darüber hinaus schwierig einzuordnenden Abschnitte fallen zudem die Heterochromationsbereiche an 1q12, 9q12, 16q11.2 und 15p sowie die Zentromer- und Telomerbereiche und p-Arme der akrozentischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) (Kallioniemi A et al. 1992, Kallioniemi OP et al. 1993). Insbesondere die Zentromer- und Telomerbereiche sind aufgrund der hohen Anzahl natürlicher repetitiver Sequenzen für die verwendete Methode ungeeignet (Kallioniemi OP et al. 1994).

2.3 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte mit Angabe der entsprechenden Hersteller sind in Tabelle 2.3/1, die verwendeten Verbrauchsmaterialien in Tabelle 2.3/2 zusammengefasst.

Tabelle 2.3/1 Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung des Geräts	Hersteller
Mikrotom	Reichert-Jung (Leica Microsystems AG), Wetzlar, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte	
Objekträger (CGH Target Slides)	Vysis Inc.; Downers, Grove, USA
Wärmeplatte der feuchten Kammer	Hybrite TM; Vysis; Stuttgart-Fasanenhof, Deutschland
Axioskop 2	ZEISS, Göttingen, Deutschland
Objektive: 10x, 20x, 63x Ölimmersion	ZEISS, Göttingen, Deutschland
Quecksilberdampf Lampe (HBO mit selbstjustierender Ausleuchtung)	ZEISS, Göttingen, Deutschland
Ludl Filtrerrad	Ludl, Hawthorne, USA
anti-Digoxigenin-Rhodamin(FITC)-Filter	
Fluoresceinisothiocyanat(TRITC)-Filter	
DAPI-Filter	

Tabelle 2.3/2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalplastikküvetten (UVette)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objekträger (CGH Target Slides)	Vysis Inc.; Downers, Grove, USA
Fixogum	Marabu, Tamm, Deutschland

2.4 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Angabe der entsprechenden Hersteller sind in Tabelle 2.4/1 zusammengefasst.

Tabelle 2.4/1 Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
QIAamp (DNA Mini Kit (250))	Qiagen; Hilden, Deutschland
Ampuwa	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lambda-Marker, Fragmentlänge: 21-0,56 kb	MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
Loading Dye	MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
pUC19, Fragmentlängen: 501-26 bp	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
humane Cot-1-DNA (1 µg/µl)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
deionisiertes Formamid	Fluka Biochemika; Buchs, CH
Pepsin (100 mg/ml)	Sigma, St. Louis, USA

2.5 Lösungen und Puffer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer mit Angabe der entsprechenden Hersteller sind in Tabelle 2.5/1 zusammengefasst.

Tabelle 2.5/1 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung	Hersteller
100% Ethanol		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	50 U/ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA-Isolierungspuffer	50 mM Tris-HCl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
	1 mM EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
	0,5% Tween20	Merck, Darmstadt, Deutschland
	pH 8,5	
Ethidiumbromid		SIGMA; St. Louis, USA
Natriumacetatlösung	pH 4,8	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	1 N	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.5/2 Spezielle Materialien – Nick-Translation

Name	Zusammensetzung / Hersteller
DNase I – Verdünnung (1:50 verdünnt)	98 µl TRIS-HCl, 100 mM, pH 7,5 2 µl Dnase (Boehringer, Mannheim, Deutschland)

Tabelle 2.5/3 Spezielle Materialien – Hybridisierung Teil1

Name	Zusammensetzung / Hersteller	
20xSSC (Strong Salt Concentration)	175,5 g 88,29 g ad pH 7,0	Natriumchlorid; (Merck; Darmstadt, Deutschland) Natriumcitratdihydrat; (Merck; Darmstadt, Deutschland) 1000 ml Aqua bidest.
Denaturierungslösung	5 ml 5 ml 5 ml 35 ml pH 7,0	20xSSC, pH 7,0 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7 (Merck; Darmstadt, Deutschland) Aqua bidest. Deionisiertes Formamid (Merck; Darmstadt, Deutschland)
Master Mix	30%	Dextransulfat (Merck; Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 2.5/4 Spezielle Materialien – Hybridisierung Teil 2

Name	Zusammensetzung	
Waschlösung A	70% 2x	Deionisiertes Formamid SSC
Waschlösung B	0,1% 2x	Tween 20 SSC
Waschlösung C	0,1% 2x	Tween 20 SSC
Blockinglösung	3% 0,1% 4x	Bovines Serumalbumin (BSA), (SIGMA; St. Louis, USA) Tween 20 SSC
Detektionspuffer	4x 1% 0,1%	SSC BSA Tween 20
Detektionslösung	300 µl 1,5 µl 5 µl	Detektionspuffer Fluoresceinisothiocyanat-Avidin (Vector; Burlingame, USA) Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche; Mannheim, Deutschland)
DAPI-Eindeckelungsmedium	1 ml 50 µl 1 µl	Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) Actinomycin (SIGMA; St. Louis, USA) Diamino-2-phenylindol (SIGMA; St. Louis, USA)

2.6 Statistik

Die gewonnenen chromosomalen Daten wurden binär in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Art der Veränderung (Verlust, Trendverlust, Trendzugewinn, Zugewinn, Amplifikation) wurde dabei numerisch kodiert. +1,5 für Gewinn, +1,2 für Trendzugewinn, 0,5 für Verlust, 0,8 für Trendverlust, 2,0 für Amplifikation. Die jeweils zugehörigen Patientendaten wurden ebenfalls teils binär, teils numerisch mit zugehöriger Codierung verschlüsselt.

Quantitative Größen wurden anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen beschreibend dargestellt und mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Aufgrund signifikanter Abweichungen von einer Normalverteilung erfolgte der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben mit dem U-Test, so wurde geprüft, inwieweit sich Primärtumoren und Rezidive hinsichtlich chromosomaler Zugewinne und Verluste unterschieden.

Zu ordinal und nominal skalierten Größen wie histologischer Diagnose (anaplastisches Astrozytom, sekundäres Glioblastom), Tumorentität (Primärtumor, Rezidiv) und den einzelnen Chromosomenaberrationen wurden absolute und prozentuale Häufigkeiten angegeben. Je zwei Größen dieser Skalierung wurden in Kontingenztafeln gegenübergestellt, so dass mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft werden konnte, ob eine Abhängigkeit bestand. Bei zu kleinen erwarteten Häufigkeiten wurde alternativ der exakte Test nach Fisher eingesetzt.

Weiterhin wurde eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt, Einflussfaktoren, insbesondere die Chromosomenveränderungen wurden mit dem Log-Rank-Test hinsichtlich Einflussnahme auf das Überleben geprüft.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt, die Ergebnisse wurden entsprechend vorsichtig interpretiert. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc. der IBM Company, Chicago, USA) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistiken zur Klinik

Es wurden insgesamt 70 Tumoren von 55 Patienten in dieser Arbeit untersucht und in die Auswertungen eingeschlossen. Darunter waren 41 primäre anaplastische Astrozytome und 29 Rezidive von 25 Patienten, darunter 15 bei gleichbleibendem Malignitätsgrad WHO-Grad III und 14 sekundäre GBM (WHO-Grad IV). 51,7% der in die Auswertung eingeflossenen Rezidive behielten ihren WHO-Grad III bei, während 48,3% der Tumoren als sekundäre GBM rezidierten. Das mediane Follow-up lag bei 4,3 Jahren (Range 0 – 12 Jahre). Der mediane präoperative Karnofsky-Score lag um $78,24\% \pm 17,8$ (Range 20 – 100%).

3.1.1 Geschlechter- und Altersverteilung

Das Kollektiv umfasst 32 (58,2%) männliche und 23 (41,8%) weibliche Patienten (Verhältnis m:w 1,39:1). Die gegenüber den 41 Primärtumoren erhöhte Anzahl von 55 Patienten ergibt sich dadurch, dass bei einigen Patienten nur die Rezidive und nicht die Primärtumoren als Probe vorlagen. Dies war bei acht Patienten mit sekundären GBM der Fall. Bei den rezidierten AA betraf es sieben Fälle. Bei einigen Patienten konnte kein vollständiges Follow-up erhoben werden. Detaillierten Aufschluss über das Zustandekommen dieser Diskrepanzen ergeben die Tabellen 6/1, 6/3 und 6/4 im Anhang dieser Arbeit.

Der Altersmittelwert bei Diagnosestellung (Operationszeitpunkt der Primärtumoren) lag bei Männern um $49,6 \pm 16,5$ Jahre (in einer Altersspanne von 22 bis maximal 78 Jahren) und bei Frauen um $43,4 \pm 13,9$ Jahre (in einem Intervall von 9,4 bis 72,2 Jahren). Vergleicht man die Mediane für das Alter beider Geschlechter ergibt sich für Frauen mit 42,5 Jahren gegenüber Männern mit 52 Jahren ein früheres Erkrankungsalter. (Abb. 3.1.1/1). Aufgrund der niedrigen Fallzahl war der Unterschied nur beschreibend anzugeben. Tests zur Signifikanzprüfung konnten nicht sinnvoll durchgeführt werden.

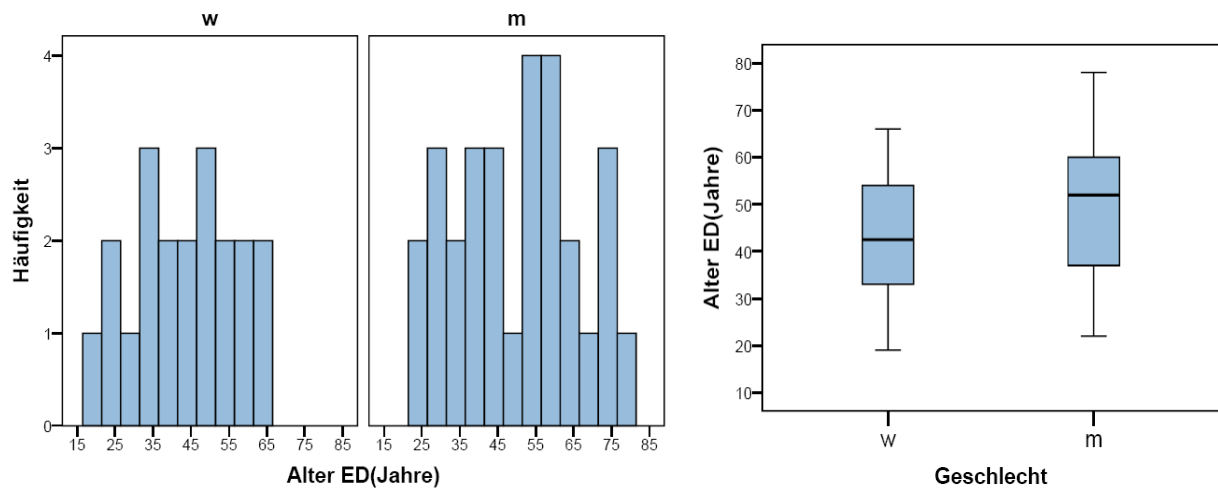


Abb. 3.1.1/1 Altersverteilung der weiblichen und männlichen Patienten mit einem Astrozytom WHO-Grad III bei der Erstdiagnose (ED), links in absoluter Häufigkeitsverteilung, rechts nach Median

3.1.2 Rezidive

Der Zeitabstand zwischen Primärtumor und Erstrezidiv betrug definitionsgemäß mindestens 3 Monate. Das mediane rezidivfreie Intervall lag bei $33 \pm 10,8$ Monaten (KI 11,8 – 54,2). Rezidive, die bei ihrem WHO-Grad III blieben, rezidierten innerhalb von $61 \pm 17,2$ Monaten (KI 27,2 – 94,8), während sich sekundäre GBM nach durchschnittlich 31 ± 20 Monaten (KI 0 – 71 Monate) manifestierten (Log-Rank-Test, $p = 0,170$). Aufgrund der niedrigen Fallzahl lässt sich eine Tendenz zu kürzeren rezidivfreien Intervallen bei den sekundären GBM vermuten.

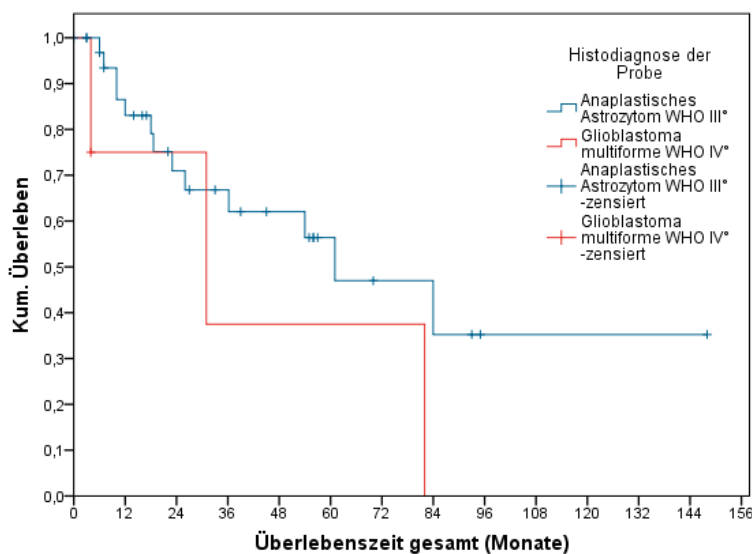


Abb. 3.1.2/1 Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit in Abhängigkeit von der histologischen Rezidivdiagnose (Log-Rank-Test, $p = 0,170$)

3.1.3 Therapie der primären anaplastischen Astrozytome WHO-Grad III

3.1.3.1 Radiatio

Primäre Astrozytome WHO-Grad III waren nicht vorbehandelt, sondern nach der bildgebenden Diagnostik direkt operiert.

Bei 32 Patienten ergaben sich aus den Akten Angaben bzgl. der durchgeführten Radiatio. Ein Primärtumorpatient erhielt eine Ganzhirnbestrahlung, alle weiteren eine Radiatio des Tumorbettes mit 2 cm Sicherheitsabstand. Für 23 Patienten waren keine Angaben zu eruieren. Nach therapeutischen Standards maligner Gliome ist jedoch von einer durchgeführten Radiatio auszugehen.

3.1.3.2 Chemotherapie

22 Patienten erhielten nach Aktenlage adjuvante Chemotherapie. PCV-Chemotherapie war mit 45,5% am häufigsten, gefolgt von konkomitant (mit Bestrahlung) verabreichtem Temozolomid mit 36,4%. Temozolomid wurde am häufigsten als zweites Chemotherapieregime im Verlauf eingesetzt (Tabelle 3.1.2/1). Einzelfälle erhielten Chemotherapie nach BCNU bzw. ACNU-Schema als Einzelmedikation.

Tabelle 3.1.2/1 Übersicht über die eingesetzte adjuvante Chemotherapie der Primärtumoren, links die zuerst applizierten Medikamente, rechts die im Verlauf zusätzlich angewandten

1. Chemotherapie-Regime	Häufigkeit	Prozent	2. Chemotherapie-Regime	Häufigkeit	Prozent
PCV	10	18,2 (45,5)	Temozolomid (Tag 1-5/28)	12	21,8 (92,3)
Temozolomid konkomitant	8	14,5 (36,4)	ACNU	1	1,8 (7,7)
ACNU	2	3,6 (9,1)			
BCNU	2	3,6 (9,1)			
Gesamt	22	40,0 (100)	Gesamt	13	23,6 (100,0)
Keine Angabe	33	60,0	Keine Angabe	42	76,4
Gesamtzahl	55	100,0	Gesamtzahl	55	100,0

3.1.4 Therapie der Rezidivtumoren

Die Therapie nach operiertem Rezidiv zeigte wiederkehrende Behandlungen mit Temozolomid und/oder Nitrosoharnstoffverbindungen.

Tabelle 3.1.4/1 Übersicht: Therapie nach Rezidivoperation

Patientenr.	Vortherapie	Radiatio	Chemotherapie nach 2. OP	Chemotherapie nach 3. OP
4	Keine Angabe	Ja	Temozolomid	
22	Radiatio	Nein	ACNU	Temozolomid
29	Radiatio	Stereotaktisch	CCNU, Temozolomid	
31	BCNU, Radiatio	Nein	BCNU	PCV
39	BCNU, keine Angabe zu Vorbestrahlung	Ja	Keine	
45	PCV, Temozolomid, Radiatio	Stereotaktisch		
51	Temozolomid, Radiatio	Nein	Temozolomid	Temozolomid
52	ACNU, Radiatio	Ja	Keine	Keine

3.1.5 Überleben

Bei 36 Patienten konnten zum Endzeitpunkt der Datenerhebung Angaben bzgl. des Überlebens gemacht werden (Abb. 3.1.5/1). 55,6% waren gestorben, 44,4% lebten zu diesem Zeitpunkt bzw. waren im Follow-up nicht länger zu verfolgen gewesen. Das mittlere Überleben lag bei $76,8 \pm 11,1$ Monaten (KI 55,0 – 98,6), das mediane Überleben bei $44 \pm 39,6$ Monaten (KI 0 – 121,6).

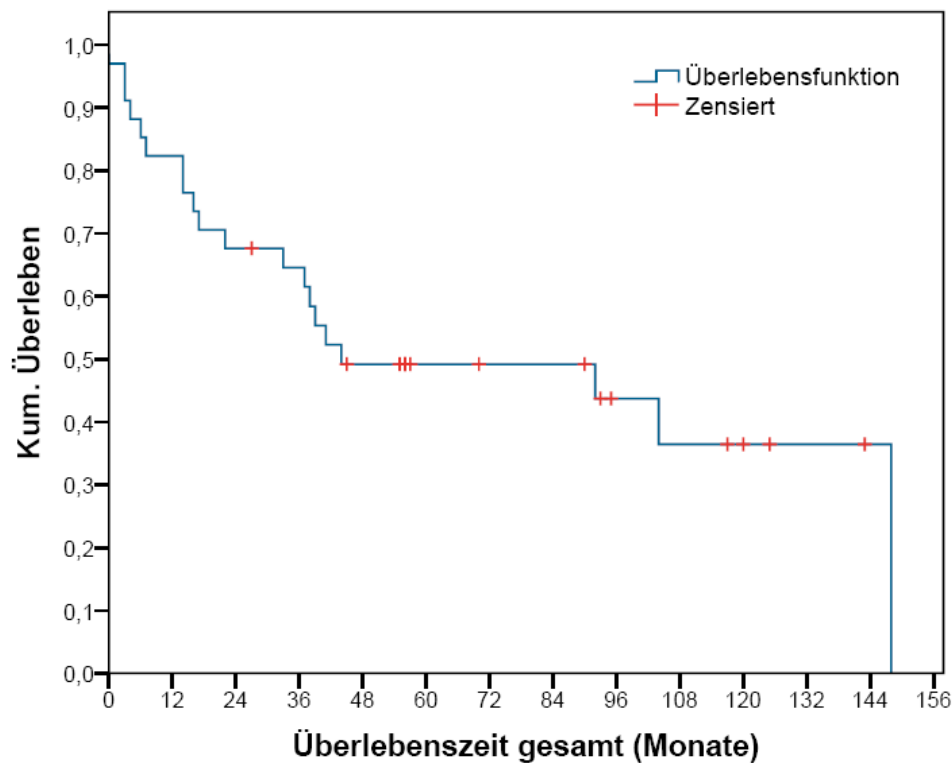


Abb. 3.1.5/1 Kaplan-Meier-Kurve für alle Patienten unabhängig vom histologischen Tumorgrad im Rezidiv.

3.2 CGH-Analyse

Insgesamt erfolgten 95 Untersuchungen durch komparative genomische Hybridsierung (CGH).

Dabei gelangen 92 von 95 Untersuchungen, was einer Erfolgsquote von 96,8% entspricht. Die fehlgeschlagenen Analysen ergaben sich durch mangelnde Fluoreszenz und/oder Fehler während der Hybridisierung. Bei Tumoren, bei denen in der Gelelektrophorese deutlich wurde, dass nicht genug DNA extrahiert werden konnte, wurden nicht in die fortlaufenden Untersuchungsschritte eingeführt. Bei 20 Tumoren wurden die CGH-Analysen mit neuem Probenmaterial wiederholt, um ein aussagekräftigeres Profil zu erhalten.

Beispielhaft demonstriert das nachfolgende Bild einen technisch gelungenen Fall (Abb.3.2/1). Man erkennt die weitestgehend einzeln liegenden Chromosomen, die sich kontrastreich vom schwarzen Hintergrund absetzen. Ebenso ist an den

Chromosomen selbst eine intensive Farbmarkierung durch die gebundenen Antikörper zu sehen.

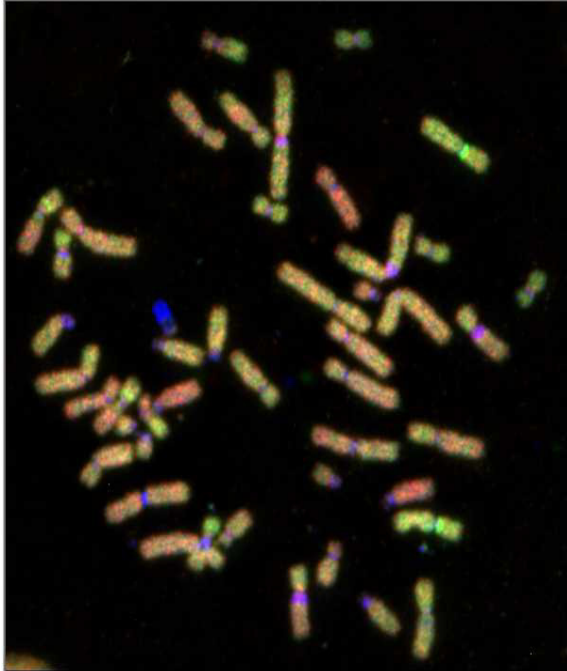


Abb. 3.2/1 Technisch gelungene CGH-Analyse

Die kontrastreiche Fluoreszenzmarkierung zeigt genetisch weitgehend unveränderte Chromosomen durch einen bräunlichen Farbton. Verluste stechen intensiv rot und Zugewinne grün hervor. Am Chromosom 7 (oben rechts) erkennt man am kurzen (p-) Arm besonders intensiv grün leuchtend eine Amplifikation.

Nach der Fluoreszenzintensität konnten Chromosomenzugewinne und –verluste eindeutig zugeordnet werden (Abb. 3.2/2)

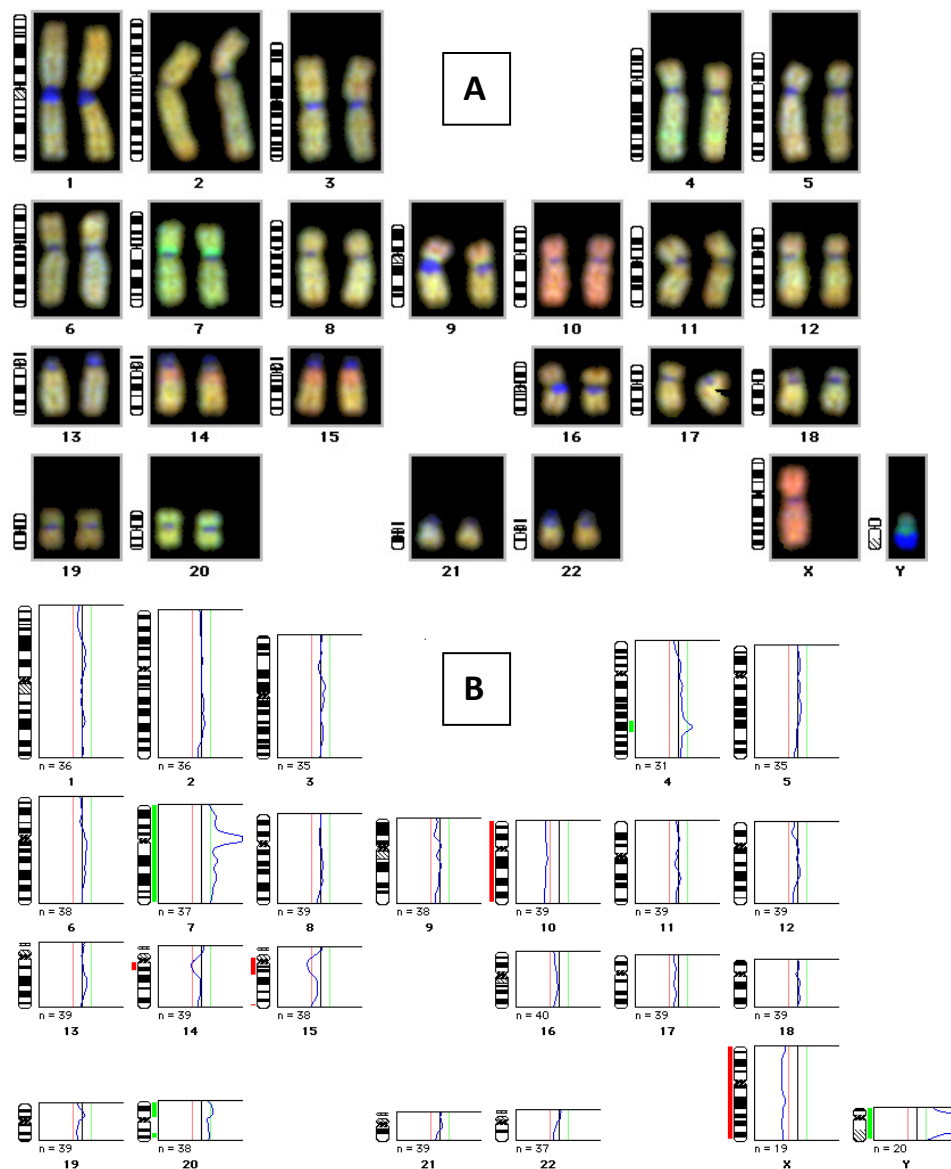


Abb. 3.2/2 Darstellung chromosomaler Veränderungen nach CGH

Nach der Fluoreszenzintensität (A) können Chromosomengewinne am Chromosom 7, 4 und 20 und Verluste an den Chromosomen 10, 14 und 15 diagnostiziert und in einem Ideogramm (B) dargestellt werden (Patient 20, Primärtumor). Die Verluste an X und Vermehrung an Y sind technisch bedingt.

3.2.1 Anzahl der Nettoveränderungen

Im Durchschnitt ergaben sich pro CGH-Analyse $6,6 \pm 5,7$ Nettoveränderungen pro Fall. Die mittlere Anzahl von Zugewinnen (im Mittel 3,0) entsprach ungefähr der mittleren Anzahl von Verlusten (3,31). Amplifikationen traten in etwa 20% der Proben auf.

Die Abb. 3.2.1/1 zeigt eine Übersicht über die relativen Häufigkeiten chromosomaler Veränderungen unabhängig von der Art der Aberration und dem histologischen Grad. Am häufigsten fanden sich Aberrationen an den Chromosomen 7p (38,6%), 7q (60%), 9p (34,2%), 10p (47,2%) und 10q (41,5%).

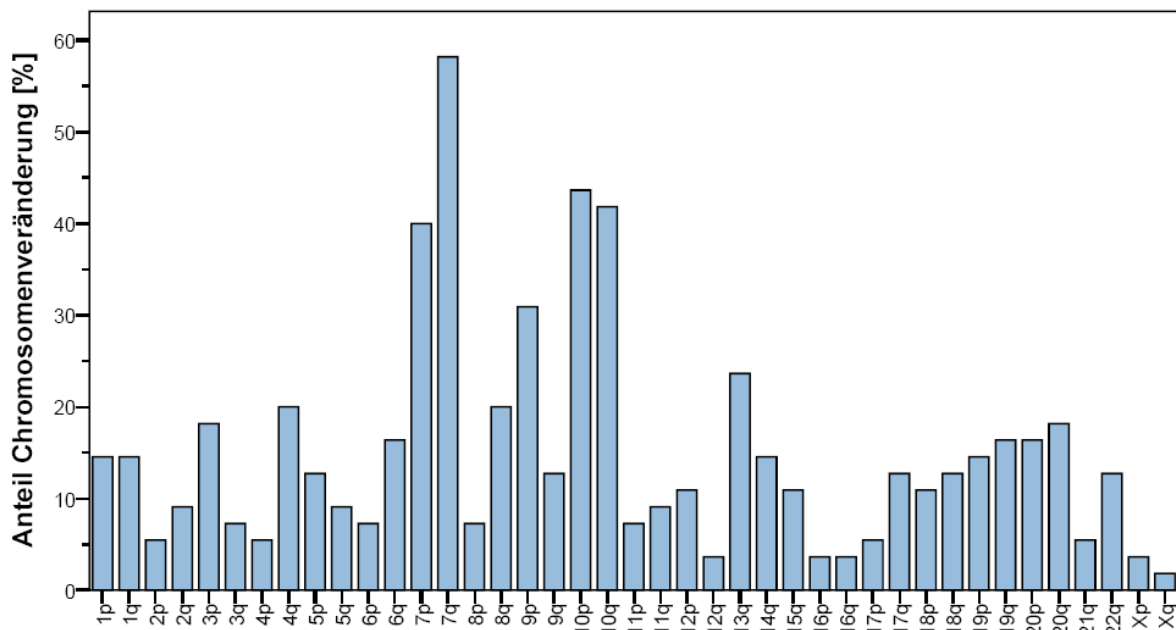


Abb. 3.2.1/1 Chromosomenarmbezogene relative Häufigkeiten des Auftretens genetischer Aberrationen in der CGH-Analyse bei AA und deren Rezidiven

3.2.2 Anzahl der Nettoveränderungen in Primärtumoren und Rezidiven

Untersucht man die genetischen Veränderungen getrennt für Primärtumor und Rezidiv, unabhängig von der histologischen Gradierung, so ergeben sich für beide Tumorgruppen keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-Test U-Test, $p = 0,9$): Die durchschnittliche Zahl von Zugewinnen lag bei Primärtumoren bei $3,32 \pm 3$, Verluste bei $3,56 \pm 2,9$. In den Rezidivtumoren traten im Durchschnitt $3,17 \pm 2,7$ Zugewinne und $3,45 \pm 2,8$ Verluste auf (Abb. 3.2.2/1).

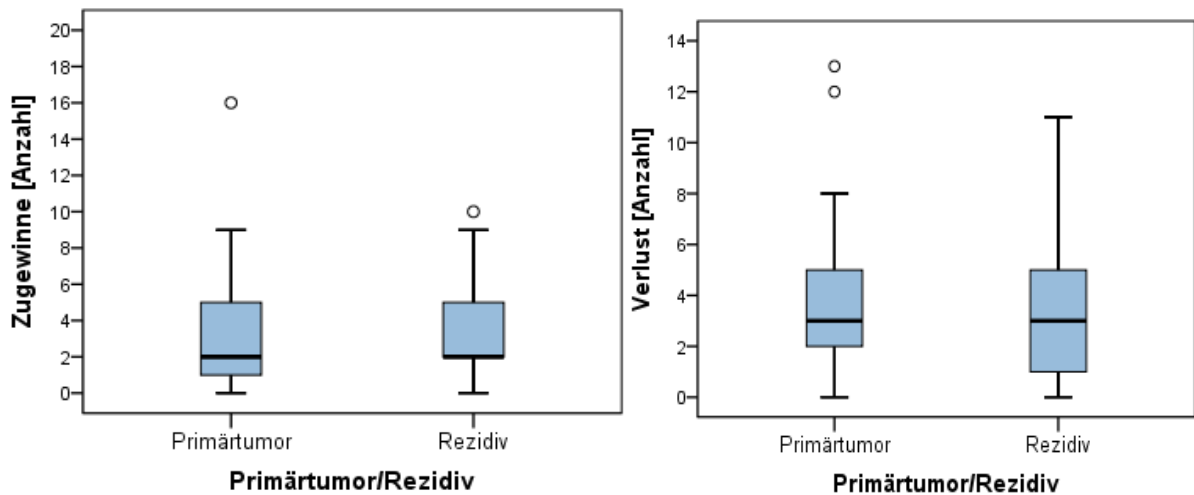


Abb. 3.2.2/1 Verteilung von Zugewinnen und Verlusten getrennt für Primärtumor und Rezidiv unabhängig von der histologischen Diagnose

3.2.3 Anzahl der Nettoveränderungen in Korrelation zum histologischen Grad

Es wurden darüber hinaus Berechnungen angestellt, wie sich Zugewinne und Verluste in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose, also entweder als AA oder als sekundäres Glioblastom deklarieren, verteilen. AA zeigten im Mittel $3,13 \pm 2,8$ Zugewinne und $3,31 \pm 2,9$ Verluste. Sekundäre GBM zeigten durchschnittlich $3,73 \pm 3,2$ Zugewinne und $4,27 \pm 2,4$ Verluste. Unterschiede im Mann-Whitney-Test erreichten keine Signifikanz. Tendenziell traten in sekundären GBM häufiger Verluste auf (U-Test, $p = 0,76$) (Abb. 3.2.3/1).

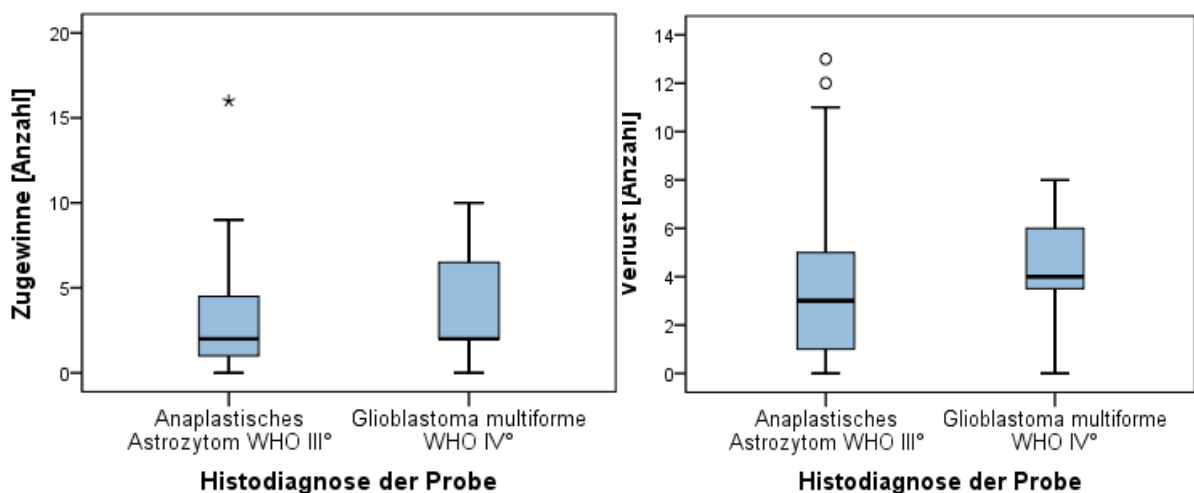


Abb. 3.2.3/1 Verteilung von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten in Abhängigkeit vom histologischen Malignitätsgrad unter Einfluss aller primärer und sekundärer Tumoren

3.3 Chromosomale Aberrationen in primären anaplastischen Astrozytomen

Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Chromosomenaberrationen bei den 41 untersuchten primären AA.

Tabelle 3.3/1 Häufigkeiten von Aberrationen bei untersuchten primären anaplastischen Astrozytomen

Chromosom	Keine Veränderung	Verlust	Trendverlust	Trendzugewinn	Zugewinn	Amplifikation
1p	34 (82,9%)	4 (9,8%)	2 (4,9%)	0	1 (2,4%)	0
1q	32 (78%)	4 (9,8%)	0	1 (2,4%)	3 (7,3%)	1 (2,4%)
2p	40 (97,6%)	0	0	0	1 (2,4%)	0
2q	37 (90,2%)	4 (9,8%)	0	0	0	0
3p	31 (75,5%)	6 (14,6%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)	3 (7,3%)	0
3q	38 (92,7%)	2 (4,9%)	1 (2,4%)		0	0
4p	38 (92,7%)	1 (2,4%)	0	0	2 (4,9%)	0
4q	33 (80,5%)	5 (12,2%)	1 (2,4%)	0	3 (7,3%)	0
5p	37 (90,2%)	1 (2,4%)	2 (4,9%)	0	1 (2,4%)	0
5q	37 (90,2%)	2 (4,9%)	1 (2,4%)	0	1 (2,4%)	0
6p	39 (95,1%)	0	1 (2,4%)	1 (2,4%)	0	0
6q	34 (82,9%)	5 (12,2%)	2 (4,9%)	0	0	0
7p	23 (56,1%)	0	0	0	16 (39,0%)	8 (19,5%)
7q	16 (39,0%)	0	0	1 (2,4%)	24 (58,3%)	1 (2,4%)
8p	38 (92,7%)	1 (2,4%)	0	0	2 (4,9%)	0
8q	33 (80,5%)	2 (4,9%)	0	0	7 (17,0%)	1 (2,4%)
9p	26 (63,4%)	10 (24,4%)	3 (7,3%)	0	2 (4,9%)	1 (2,4%)
9q	34 (82,9%)	1 (2,4%)	0	1 (2,4%)	5 (12,2%)	0
10p	22 (53,7%)	13 (31,7%)	1 (2,4%)	0	4 (9,8%)	0
10q	22 (53,7%)	18 (43,9%)	1 (2,4%)	0	0	0
11p	39 (95,1%)	2 (4,9%)	0	0	0	0
11q	38 (92,7%)	1 (2,4%)	0	0	2 (4,9%)	0
12p	37 (90,2%)	0	0	0	3 (7,3%)	1 (2,4%)
12q	39 (95,1%)	0	1 (2,4%)	0	1 (2,4%)	0
13q	33 (80,5%)	8 (19,5%)	0	0	0	0
14q	33 (80,5%)	7 (17,1%)	1 (2,4%)	0	0	0
15q	36 (87,8%)	4 (9,8%)	0	0	1 (2,4%)	0
16p	39 (95,1%)	0	0	0	2 (4,9%)	0
16q	39 (95,1%)	1 (2,4%)	0	0	1 (2,4%)	0
17p	39 (95,1%)	0	0	2 (4,9%)	0	0
17q	34 (82,9%)	0	0	1 (2,4%)	5 (12,2%)	1 (2,4%)
18p	37 (90,2%)	2 (4,9%)	1 (2,4%)	0	1 (2,4%)	0
18q	36 (87,8%)	2 (4,9%)	1 (2,4%)	0	1 (2,4%)	1 (2,4%)
19p	33 (80,5%)	0	0	0	8 (19,5%)	0
19q	33 (80,5%)	3 (7,3%)	1 (2,4%)	0	4 (9,8%)	0
20p	34 (82,9%)	0	0	1 (2,4%)	6 (14,6%)	0

20q	31 (75,5%)	0	1 (2,4%)	1 (2,4%)	8 (19,5%)	0
21q	38 (92,7%)	0	0	0	3 (7,3%)	0
22q	36 (87,8%)	4 (9,8%)	1 (2,4%)	0	0	0

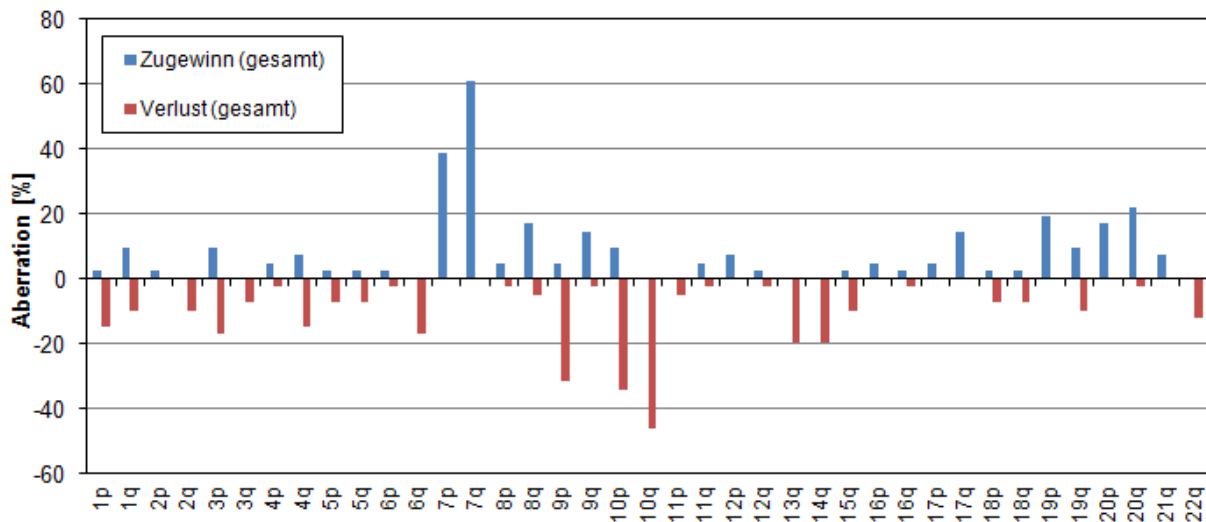


Abb. 3.3/1 Häufigkeitsverteilung chromosomenarmbezogener Aberrationen in primären anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III

Zugewinne (blau) und Verluste (rot) inkl. Trendveränderungen jeweils ohne Amplifikationen

Die häufigsten eindeutigen Zugewinne bei den primären AA lagen bei 7p (39,0%) und 7q (58,3%) sowie 19p und 20q (jeweils 19,5%). Zudem an 9q und 17q mit jeweils 12,2%. Vereinzelt waren auch Chromosom 4, 10p und 12 durch Zugewinne verändert. 19,5% wiesen Amplifikationen an Chromosom 7p11p12 auf. In Einzelfällen zeigten sich Amplifikationen bei 1q, 7q, 8q, 9p, 12p, 17q und 18q.

Die häufigsten chromosomalen Verluste traten bei 10p (31,7%), 10q (43,9%) und 9p (24,4%) auf. Zählt man bei Chromosomen 9p die tendenziellen Verluste dazu, ergibt sich sogar ein Wert von 31,7%. Weitere Verluste zeigten sich bei 13q (19,5%), 14q (17,1%), 3p (14,6%), 4q und 6q mit jeweils 12,2%.

3.4 Chromosomale Aberrationen in Tumorrezidiven aus anaplastischen Astrozytomen

Die Tabelle 3.4/1 gibt die Häufigkeiten der einzelnen chromosomalen Aberrationen in den Rezidiven an, aufgeschlüsselt nach histologischer Diagnose rezidiviertes AA und sekundäres GBM.

Tabelle 3.4/1 Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen für die Gesamtzahl der Rezidive und einzeln als AA und sekundäres GBM, sowie exakter Fisher-Test zur Unterschiedsanalyse

Chromosom	Veränderung	Rezidive gesamt (%)	Rezidiviertes anaplastisches Astrozytom	Sekundäres Glioblastom	Fisher-Test Unterschiede p-Wert
1p	Nein	25 (86,2%)	12 (80,0%)	13 (92,9%)	0,598
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Trendverlust	2 (6,9%)	2 (13,3%)	0	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
1q	Nein	25 (86,2%)	13 (86,7%)	12 (85,7%)	1,000
	Verlust	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
	Trendzugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Trendverlust	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
2p	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
2q	Nein	26 (89,7%)	14 (93,3%)	12 (85,7%)	0,598
	Trendverlust	4 (9,8%)	1 (6,7%)	2 (14,3%)	
3p	Nein	24 (82,8%)	13 (86,7%)	11 (78,6%)	0,651
	Verlust	3 (10,3%)	1 (6,7%)	2 (14,3%)	
	Zugewinn	3 (10,3%)	2 (13,3%)	1 (7,1%)	
3q	Nein	27 (91,7%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
4p	Nein	28 (96,6%)	15 (100%)	13 (92,9%)	0,483
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
4q	Nein	24 (82,8%)	13 (86,7%)	11 (78,6%)	0,651
	Verlust	4 (9,8%)	1 (6,7%)	3 (21,4%)	
	Zugewinn	3 (10,3%)	1 (6,7%)	2 (14,3%)	
5p	Nein	24 (82,8%)	12 (80,0%)	12 (85,7%)	1,000
	Verlust	2 (6,9%)	2 (13,3%)	0	
	Trendverlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
5q	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Trendverlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
6p	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000

	Trendzugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
6q	Nein	25 (86,2%)	13 (86,7%)	12 (85,7%)	1,000
	Verlust	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
	Trendverlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
7p	Nein	20 (69,0%)	14 (93,3%)	6 (42,9%)	0,005
	Zugewinn	8 (27,6%)	1 (6,7%)	7 (50%)	
	Amplifikation	3 (10,3%)	0	3 (21,4%)	
7q	Nein	11 (37,4%)	7 (46,7%)	4 (28,6%)	0,450
	Trendzugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	17 (58,6%)	7 (46,7%)	10 (71,4%)	
	Amplifikation	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
8p	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
8q	Nein	20 (69,0%)	10 (66,7%)	10 (71,4%)	1,000
	Verlust	2 (6,9%)	0	2 (14,3%)	
	Zugewinn	7 (24,1%)	5 (33,3%)	2 (14,3%)	
9p	Nein	20 (69,0%)	10 (66,7%)	10 (71,4%)	1,000
	Verlust	7 (24,1%)	3 (20,0%)	4 (28,6%)	
	Trendverlust	2 (6,9%)	2 (13,3%)	0	
9q	Nein	24 (86,2%)	14 (93,3%)	11 (78,6%)	0,330
	Verlust	3 (10,3%)	1 (6,7%)	2 (14,3%)	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
10p	Nein	15 (51,7%)	10 (66,7%)	5 (35,7%)	0,143
	Verlust	8 (27,6%)	1 (6,7%)	7 (50,0%)	0,023
	Trendverlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	5 (17,2%)	4 (26,7%)	1 (7,1%)	0,023
10q	Nein	19 (65,5%)	14 (93,3%)	5 (35,7%)	0,002
	Verlust	9 (31,0%)	1 (6,7%)	8 (57,1%)	
	Trendverlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
11p	Nein	25 (86,2%)	13 (86,7%)	12 (85,7%)	1,000
	Verlust	3 (10,3%)	2 (13,3%)	1 (7,1%)	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
11q	Nein	25 (86,2%)	13 (86,7%)	12 (85,7%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	3 (10,3%)	2 (13,3%)	1 (7,1%)	
12p	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Zugewinn	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
12q	Nein	29 (100%)	15 (100%)	14 (100%)	-
13q	Nein	17 (58,6%)	9 (60%)	8 (57,1%)	1,000
	Verlust	10 (34,5%)	5 (33,3%)	5 (35,7%)	
	Trendverlust	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
14q	Nein	27 (93,1%)	15 (100%)	12 (85,7%)	0,224
	Trendverlust	2 (6,9%)	0	2 (14,3%)	
15q	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	

	Zugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
16p	Nein	27 (93,1%)	14 (93,3%)	13 (92,9%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
16q	Nein	28 (96,6%)	14 (93,3%)	14 (100%)	1,000
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
17p	Nein	28 (96,6%)	15 (100%)	13 (92,9%)	0,483
	Verlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
17q	Nein	25 (86,2%)	13 (86,7%)	12 (85,7%)	1,000
	Zugewinn	4 (13,8%)	2 (13,3%)	2 (14,3%)	
18p	Nein	27 (93,1%)	15 (100%)	12 (85,7%)	0,224
	Verlust	2 (6,9%)	0	2 (14,3%)	
18q	Nein	26 (89,7%)	14 (93,3%)	12 (85,7%)	0,598
	Verlust	3 (10,3%)	1 (6,7%)	2 (14,3%)	
19p	Nein	21 (72,45%)	12 (80,0%)	9 (64,3%)	0,427
	Trendzugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	7 (24,1%)	2 (13,3%)	5 (35,7%)	
19q	Nein	22 (75,9%)	12 (80,0%)	10 (71,4%)	0,682
	Verlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Trendverlust	2 (6,9%)	2 (13,3%)	0	
	Zugewinn	4 (13,8%)	0	4 (28,6%)	
20p	Nein	22 (75,9%)	13 (86,7%)	9 (64,3%)	0,215
	Trendverlust	1 (3,4%)	0	1 (7,1%)	
	Zugewinn	6 (20,7%)	2 (13,3%)	4 (28,6%)	
20q	Nein	24 (82,8%)	14 (93,3%)	10 (71,4%)	0,169
	Trendzugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Zugewinn	4 (13,8%)	0	4 (28,6%)	
21q	Nein	29 (100%)	15 (100%)	14 (100%)	-
22q	Nein	25 (86,2%)	12 (80,0%)	13 (92,9%)	0,598
	Verlust	2 (6,9%)	1 (6,7%)	1 (7,1%)	
	Trendverlust	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	
	Trendzugewinn	1 (3,4%)	1 (6,7%)	0	

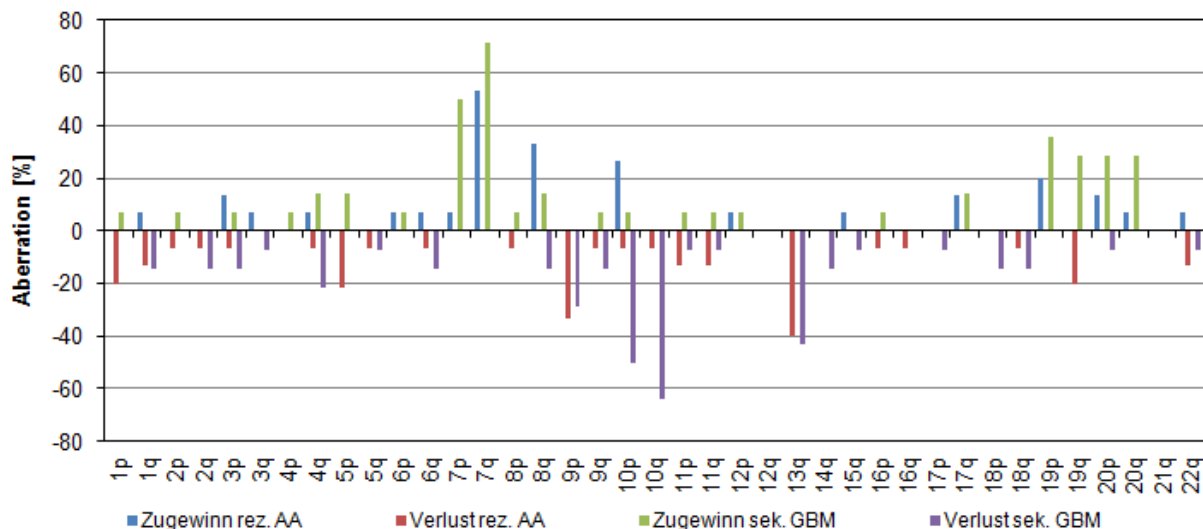


Abb. 3.4/1 Häufigkeitsverteilung chromosomenarmbezogener Aberrationen getrennt für rezidierte AA und sekundäre GBM, aufgeteilt in Zugewinne und Verluste inkl. Trendveränderungen, ohne Amplifikationen

Tumoren, die in gleichem histologischen Malignitätsgrad, also als AA, rezidierten, zeigten am häufigsten genetische Zugewinne bei Chromosom 7q (46,7%), 8q (33,3%) und 10p (26,7%). Weitere Chromosomen waren in Einzelfällen betroffen.

Interessanterweise traten bei keinem Rezidivtumor WHO-Grad III Amplifikationen auf. Bei den Tumoren, die als sekundäres GBM rezidierten, wurden die häufigsten Zugewinne bei 7p (50,0%), 7q (71,4%), 19p (35,7%), 19q, 20p und 20q (jeweils 28,6%) festgestellt.

Amplifikationen traten vornehmlich bei 7p11p12 (21,3%) auf. Einige weitere Chromosomen wiesen vereinzelt Amplifikationen auf.

Chromosomale Verluste zeigten sich bei den Rezidiven der anaplastischen Astrozytome am häufigsten am 13q (33,3%, mit Trendverlusten 40,0%) und 9p (20,0%). Addiert man zum letzteren auch die tendenziellen Verluste ergeben sich 33,3%. Bei weiteren Chromosomen ergaben sich nur in einzelnen Proben genetische Verluste. Für die Verluste bei sekundären GBM verhielt es sich so, dass an den Chromosomen 10p (50%) und 10q (57,1%) die häufigsten Aberrationen auftraten. Auch Chromosom 13q war mit 35,7% (mit Trendverlusten 42,8%) durch Verluste gekennzeichnet. 9p mit 28,6% und 4q mit 21,4% waren ebenfalls häufig.

Es wurde der exakte Fisher-Test zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Rezidivtypen durchgeführt. Bei sekundären GBM lagen

signifikant häufiger 10q-Verluste ($p = 0,002$) und 7p-Zugewinne ($p = 0,005$) vor. Weitere Unterschiede waren nur beschreibend, jedoch nicht signifikant. Zusätzlich wurde in diesem Kontext eine gesonderte Berechnung für Tumoren mit 10p-Veränderungen angestellt, die einen signifikanten Unterschied zwischen Zugewinnen und Verlusten aufdeckte (exakter Fisher-Test, $p = 0,023$). Folglich traten 10p-Zugewinne signifikant häufiger in rezidierten AA auf als in sekundären GBM. Umgekehrt 10p-Verluste signifikant häufiger in sekundären GBM gegenüber rezidierten AA.

Tabelle 3.4/2 Zusammenfassung der häufigsten Aberrationen primärer anaplastischer Astrozytome und deren Rezidive (fett gedruckt die signifikant häufigeren Veränderungen in sekundären GBM)

Veränderung	Primärtumoren	Rezidiertes anaplastisches Astrozytom	Sekundäres Glioblastom
Verluste	3p, 4q, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q	9p, 13q	9p, 10p (Fisher-Test, $p=0,023$) , 10q (Fisher-Test, $p=0,002$) , 13q
Zugewinne	7p, 7q, 9q, 17q, 19p, 20q	7q, 8q, 10p (Fisher-Test, $p=0,023$)	7p (Fisher-Test, $p=0,005$) , 7q, 19p, 19q, 20p, 20q
Amplifikationen	7p	-	7p

Es zeigte sich in der Untersuchung, dass gewisse Aberrationen bereits in den Primärtumoren regelmäßig aufgetreten waren und sich in den beiden Rezidivtypen nicht wesentlich unterschieden. Dazu gehörten unter anderem die Zugewinne an 7q sowie die Verluste an 9p und 13q. Ihr Einfluss auf das Überleben und ihre damit verbundene prognostische Bedeutung werden im folgenden Teil näher untersucht.

Veränderungen, die in rezidierten AA häufiger auftraten als in sekundären GBM, legen einen stabilisierenden, die Prognose günstig beeinflussenden Effekt nahe. Als potentielle Marker kommen beschreibend 8q- und 10p-Zugewinne in Frage. Das Auftreten letzterer gegenüber 10p-Verlusten in sekundären GBM war rechnerisch nach exaktem Fisher-Test signifikant erhöht, zudem ließ sich eine prognostisch günstige Tendenz aus der Kaplan-Meier-Grafik ableiten. Auch die Abwesenheit von 7p-Amplifikationen scheint einen stabilisierenden Effekt zu haben. Bekannte

prognostisch günstige 1p19q-Deletionen traten nur bei rezidierten AA auf, hingegen nicht bei sekundären GBM.

Zugewinne an Chromosom 19 und 20 traten in sekundären GBM tendenziell häufiger auf als in Rezidiven gleichgebliebenen Malignitätsgrades. Dahinter könnten sich ebenfalls Progressionsmarker verbergen.

3.5 Chromosomale Aberrationen in Bezug auf demographische Daten

Es stellten sich ebenfalls keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf die genetischen Veränderungen heraus.

3.6 Überlebenszeitanalysen in Bezug auf chromosomale Aberrationen

Zusätzlich wurden Berechnungen darüber angestellt, welchen Einfluss die chromosomalen Aberrationen auf die Überlebenszeiten haben. Zu diesem Zweck wurde eine Kaplan-Meier-Analyse inklusive Log-Rank-Test durchgeführt, bei der das Gesamtüberleben auf Patientenebene in Abhängigkeit von der Chromosomenstörung untersucht wurde. Zunächst geschah dies gruppiert mit der Frage, ob die genetischen Veränderungen überhaupt einen Einfluss auf das Überleben zeigen. Bei Signifikanz wurden die einzelnen Veränderungen detailliert analysiert.

3.6.1 Überprüfung des Einflusses der Chromosomenaberrationen auf das Überleben

In diesem Kapitel wird zuerst der Einfluss der Chromosomenaberration auf das Überleben in Unabhängigkeit von der Art der genetischen Veränderung untersucht (Tabelle 3.6.1/1).

Tabelle 3.6.1/1 Einfluss chromosomaler Aberrationen auf das Überleben unabhängig von der Art der Veränderung

Chromosom	Veränderung	Ereignisse N (%)	Zensurierung N (%)	Median in Monaten	95%-KI	Mittelwert in Monaten	95%-KI	Log-Rank-Test
	gesamt	20 (58,8%)	14 (41,2%)	44,0	[0; 121]	76,8	[55,0; 98,6]	
1p	nein	18 (60%)	12 (40%)	41,0	[0; 98]	70,3	[49,1; 91,5]	p=0,278
	ja	2 (50%)	2 (50%)	148,0	[-]	112,5	[27,3; 197,7]	
1q	nein	16 (57%)	12 (42,9%)	92,0	[26,5; 157,5]	79,4	[55,2; 103,7]	p=0,566
	ja	4 (66%)	2 (33,3%)	33,0	[2,9; 63,5]	55,3	[17,7; 92,9]	
2p	nein	18 (56%)	14 (43,8%)	44,0	[0; 121,1]	78,9	[55,8; 102,1]	p=0,542
	ja	2 (100%)	0	38,0	[-]	65,0	[12,1; 117,9]	
2q	nein	18 (58%)	13 (41,9%)	92,0	[29,4; 154,6]	77,6	[54,4; 100,8]	p=0,837
	ja	2 (66,6%)	1 (33,3%)	39,0	[35,8; 42,2]	40,3	[36,5; 44,2]	
3p	nein	19 (63%)	11 (36,7%)	39,0	[0; 93,8]	70,2	[47,2; 93,2]	p=0,163
	ja	1 (25%)	3 (75%)	-	[-]	104,8	[70,4; 139,1]	
3q	nein	19 (57,6%)	14 (42,4%)	44,0	[0; 109,]	77,6	[55,0; 100,1]	p=0,821
	ja	1 (100%)	0	92,0	[-]	92,0	[92,0]	
4p	nein	19 (57,6%)	14 (42,4%)	92,0	[30,1; 153,9]	78,9	[56,9; 101,0]	p=0,029
	ja	1 (100%)	0	6,0	[-]	6,0	[6,0]	
4q	nein	15 (53,6%)	13 (46,4%)	104,0	[56,8; 215,4]	83,8	[59,2; 108,5]	p=0,158
	ja	5 (83,3%)	1 (16,7%)	17,0	[14,1; 44,6]	43,5	[14,2; 72,8]	
5p	nein	18 (58,1%)	13 (41,9%)	92,0	[13,4; 170,6]	78,3	[55,5; 101,1]	p=0,571
	ja	2 (66,6%)	1 (33,3%)	37,0	[0; 91,4]	45,0	[2,0; 88,0]	
5q	nein	17 (54,8%)	14 (45,2%)	92,0	[35,7; 161,9]	82,6	[59,7; 105,5]	p=0,013
	ja	3 (100%)	0	14,0	[0; 31,6]	18,0	[0; 37,6]	
6p	nein	19 (59,4%)	13 (40,6%)	44,0	[0; 117,1]	75,3	[52,7; 97,9]	p=0,671
	ja	1 (50%)	1 (50%)	38,0	[-]	79,0	[22,2; 135,8]	
6q	nein	17 (60,7%)	11 (39,3%)	41,0	[0; 121,3]	73,8	[49,3; 98,3]	p=0,555
	ja	3 (50%)	3 (50%)	44,0	[-]	79,8	[47,6; 112,0]	
7p	nein	9 (47,4%)	10 (52,6%)	104,0	[77,3; 130,7]	95,4	[67,2; 123,6]	p=0,037
	ja	11 (73,3%)	4 (26,7%)	22,0	[0; 46,0]	44,7	[20,9; 68,5]	
7q	nein	6 (50%)	6 (50%)	148,0	[-]	93,1	[52,9; 133,2]	p=0,324
	ja	14 (63,6%)	8 (36,4%)	39,0	[0; 97,1]	66,7	[42,5; 90,8]	
8p	nein	19 (61,3%)	12 (38,7%)	41,0	[0; 98,7]	74,4	[51,5; 97,4]	p=0,454
	ja	1 (33,3%)	2 (66,7%)	92,0	[-]	92,5	[91,8; 93,2]	
8q	nein	19 (67,9%)	9 (32,1%)	38,0	[27,6; 48,4]	66,8	[43,3; 90,2]	p=0,058
	ja	1 (16,7%)	5 (83,3%)	-	[-]	130,3	[108,6; 151,9]	
9p	nein	13 (56,5%)	10 (43,5%)	44,0	[3,1; 84,9]	80,0	[52,2; 107,8]	p=0,955
	ja	7 (63,6%)	4 (36,4%)	92,0	[2,5; 181,5]	70,9	[41,6; 100,3]	
9q	nein	19 (59,4%)	13 (40,6%)	44,0	[0; 117,3]	76,3	[54,0; 98,5]	p=0,952
	ja	1 (50%)	1 (50%)	3,0	[-]	64,0	[0; 148,5]	
10p	nein	11 (57,9%)	8 (42,1%)	92,0	[16,4; 167,6]	83,8	[55,7; 111,9]	p=0,450
	ja	9 (60%)	6 (40%)	38,0	[3,9; 72,1]	57,6	[31,2; 84,0]	
10q	nein	9 (45%)	11 (55%)	104,0	[78,5; 129,5]	97,9	[70,4; 125,4]	p=0,010
	ja	11 (78,6%)	3 (21,4%)	17,0	[2,3; 31,7]	38,4	[16,3; 62,4]	
11p	nein	18 (58,1%)	13 (41,9%)	44,0	[0; 109,9]	76,8	[53,3; 100,2]	p=0,864

	ja	2 (66,6%)	1 (33,3%)	92,0	[10,4, 173,6]	75,3	[47,9, 102,8]	
11q	nein	17 (56,7%)	13 (43,3%)	41,0	[0, 119,7]	79,2	[55,5, 102,9]	p=0,571
	ja	3 (75%)	1 (25%)	44,0	[0, 104,1]	57,0	[11,0, 102,9]	
12p	nein	18 (60%)	12 (40%)	41,0	[0, 107,7]	74,6	[51,0, 98,4]	p=0,527
	ja	2 (50%)	2 (50%)	92,0	[-]	80,3	[56,9, 103,6]	
12q	nein	19 (59,4%)	13 (40,6%)	44,0	[0, 117,3]	76,3	[53,9, 98,8]	p=0,860
	ja	1 (50%)	1 (50%)	22,0	[-]	58,5	[7,90, 109,1]	
13q	nein	12 (50%)	12 (50%)	104,0	[0, 229,6]	86,5	[59,0, 114,0]	p=0,158
	ja	8 (80%)	2 (20%)	37,0	[12,2, 61,8]	53,9	[22,4, 85,4]	
14q	nein	15 (53,6%)	13 (46,4%)	92,0	[8,7, 175,3]	86,2	[62,6, 109,9]	p=0,014
	ja	5 (83,3%)	1 (16,7%)	14,0	[0, 29,6]	19,3	[5,1, 33,5]	
15q	nein	18 (60%)	12 (40%)	44,0	[0, 117,3]	76,6	[53,5, 99,6]	p=0,943
	ja	2 (50%)	2 (50%)	17,0	[-]	54,3	[16,3, 92,2]	
16p	nein	19 (57,6%)	14 (42,4%)	92,0	[29,3, 154,7]	77,9	[55,5, 100,3]	p=0,704
	ja	1 (100%)	0	44,0	[-]	44,0	[44,0]	
16q	nein	19 (59,4%)	14 (40,6%)	41,0	[0, 119,7]	76,1	[53,4, 98,7]	p=0,732
	ja	1 (50%)	1 (50%)	44,0	[-]	50,0	[41,7, 58,3]	
17p	nein	18 (58,1%)	13 (41,9%)	44,0	[0, 109,1]	77,8	[54,7, 100,9]	p=0,848
	ja	2 (66,7%)	1 (33,3%)	92,0	[0, 229,6]	64,3	[17,6, 111,0]	
17q	nein	17 (60,7%)	11 (39,3%)	38,0	[28,1, 47,9]	66,4	[43,6, 89,1]	p=0,119
	ja	3 (50%)	3 (50%)	104,0	[18,1, 189,9]	112,3	[69,1, 155,5]	
18p	nein	17 (56,7%)	13 (43,3%)	44,0	[0, 121,5]	79,5	[55,8, 103,1]	p=0,511
	ja	3 (75%)	1 (25%)	37,0	[0, 127,2]	55,5	[17,0, 94,0]	
18q	nein	17 (56,7%)	13 (43,3%)	44,0	[0, 121,5]	79,5	[55,8, 103,1]	p=0,511
	ja	3 (75%)	1 (25%)	37,0	[0, 127,2]	55,5	[17,0, 94,0]	
19p	nein	18 (58,1%)	13 (41,9%)	41,0	[0, 98,7]	76,4	[52,8, 99,9]	p=0,670
	ja	2 (66,7%)	1 (33,3%)	104,0	[8,0, 200,0]	89,3	[52,3, 126,4]	
19q	nein	18 (60%)	12 (40%)	39,0	[0, 97,3]	68,4	[46,9, 89,9]	p=0,155
	ja	2 (50%)	2 (50%)	148,0	[-]	122,0	[59,6, 184,4]	
20p	nein	15 (53,6%)	13 (46,4%)	104,0	[0, 212,0]	82,1	[57,0, 107,2]	p=0,367
	ja	5 (83,3%)	1 (16,7%)	38,0	[5,6, 70,4]	52,8	[20,5, 85,2]	
20q	nein	15 (55,6%)	12 (44,4%)	104,0	[18,0, 190,1]	80,1	[54,7, 105,6]	p=0,652
	ja	5 (71,4%)	2 (28,6%)	44,0	[15,8, 72,2]	61,7	[28,6, 94,8]	
21q	nein	19 (59,4%)	13 (40,6%)	44,0	[0, 117,3]	76,4	[54,1, 98,6]	p=0,999
	ja	1 (50%)	1 (50%)	-	[-]	58,5	[0, 139,6]	
22q	nein	15 (51,7%)	14 (48,3%)	104,0	[13,2, 195,0]	88,3	[65,1, 111,4]	p=0,000
	ja	5 (100%)	0	4,0	[1,9, 6,1]	11,0	[0, 24,3]	

3.6.2 Einzelanalyse bei signifikantem Einfluss von Chromosomenaberrationen auf das Überleben

Im Folgenden werden diejenigen chromosomalen Aberrationen, welche aus der vorherigen Berechnung als signifikant hervorgingen, auf das Überleben einzeln in der Art ihrer Veränderung (Zugewinn oder Verlust) analysiert. Es wurde dabei der

Einfluss der Chromosomenaberration unabhängig davon, ob es sich um eine Rezidiv- oder Primärtumorveränderung handelte, gemeinsam betrachtet.

4p:

Chromosom 4p-Veränderungen wurden mit $p = 0,029$ in der allgemeinen Analyse als signifikant berechnet. Bei der einzeln aufgetretenen Veränderung in Form eines Verlustes ist mit einer Überlebenszeit von nur 6 Monaten rein rechnerisch ein prognostischer Nachteil verbunden. Leider ließen sich Follow-up-Daten bei Patienten mit dieser Veränderung lediglich bei einem einzelnen Fall eruieren. Die Aussagekraft ist daher im Gesamtbezug schlecht einzuordnen.

5q:

Veränderungen an Chromosom 5q wurde mit $p = 0,013$ als signifikant berechnet. Bei den drei vermerkten Ereignissen handelte es sich um jeweils einen Verlust, einen Trendverlust und einen Zugewinn. In der Einzelanalyse ergab sich ein signifikanter p-Wert mit 0,003 nur für den Zugewinn mit einer Überlebenszeit von 6 Monaten. Rein rechnerisch ergibt sich wieder ein prognostischer Nachteil mit erneut fraglicher Aussagekraft wie im Falle von Chromosom 4p.

7p:

Die Aufarbeitung von Chromosom 7p, bei der sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss auf das Überleben errechnen ließ ($p = 0,037$), ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3.6.2/1 Einzelanalyse Chromosom 7p auf das Überleben

Chromosom 7p	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	Paarweiser Vergleich zu „Keine Veränderung“ p-Wert
Keine Veränderung	9 (47,4%)	10 (52,6%)	-
Zugewinn	6 (66,7%)	3 (33,3%)	0,167
Amplifikation	0	1 (100%)	0,373
Zugewinn und Amplifikation	5 (100%)	0	0,000

Rechnerisch hatten sich bei Veränderungen am Chromosom 7p im Median 22 Monate Überlebenszeit gegenüber 104 Monaten ohne Veränderung ergeben. Beschreibend, jedoch nicht signifikant, ist dies den Zugewinnen an 7p zuzuordnen.

Eine Tendenz zum negativen Einfluss auf das Überleben ist in der unten folgenden Kaplan-Meier-Grafik abgebildet. Die Kombination aus Zugewinn und Amplifikation ist als eindeutig prognostisch ungünstig anzusehen ($p < 0,001$).

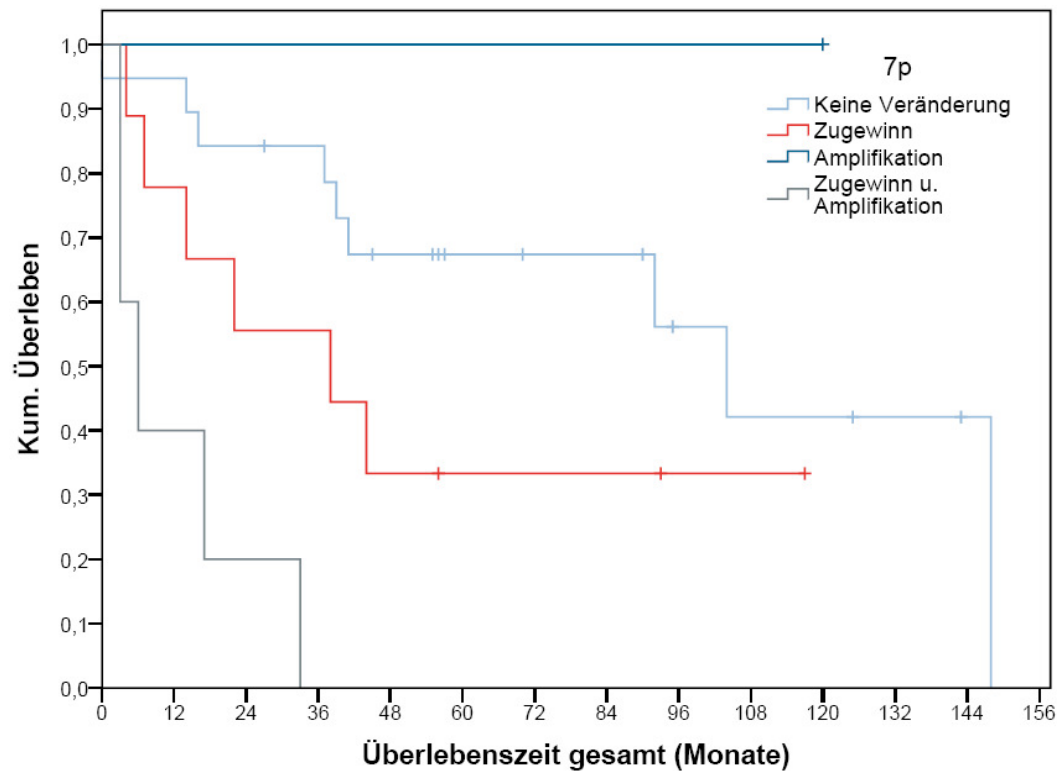


Abb. 3.6.2/1 Einfluss von 7p-Veränderungen auf das Überleben

10q:

Für das Chromosom 10q wurde $p = 0,010$ berechnet. Daraufhin schloss sich folgende Einzelanalyse an.

Tabelle 3.6.2/2 Einzelanalyse Chromosom 10q auf das Überleben

Chromosom 10q	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	Paarweiser Vergleich zu „Keine Veränderung“ p-Wert
Keine Veränderung	9 (45,0%)	11 (55,0%)	-
Verlust	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,018
Trendverlust	1 (100%)	0	0,003

Da der Trendverlust als einzelnes Ereignis auftritt und in der Bedeutung dem Verlust

ähnlich ist, wird dieser p-Wert vernachlässigt. Für den Verlust an Chromosom 10q ergibt sich eine mediane Überlebenszeit von $22 \pm 11,4$ Monaten (KI 0 - 44,3). Fließt die Probe mit Trendverlust in die Berechnung ein, ergeben sich mit einem Median von 17,0 Monaten (KI 2,3 - 31,7) noch etwas kürzere Überlebenszeiten. Patienten ohne Verluste an Chromosom 10q lebten mit 104,0 Monaten im Median (KI 78,5 - 129,5) deutlich länger ($p = 0,003$).

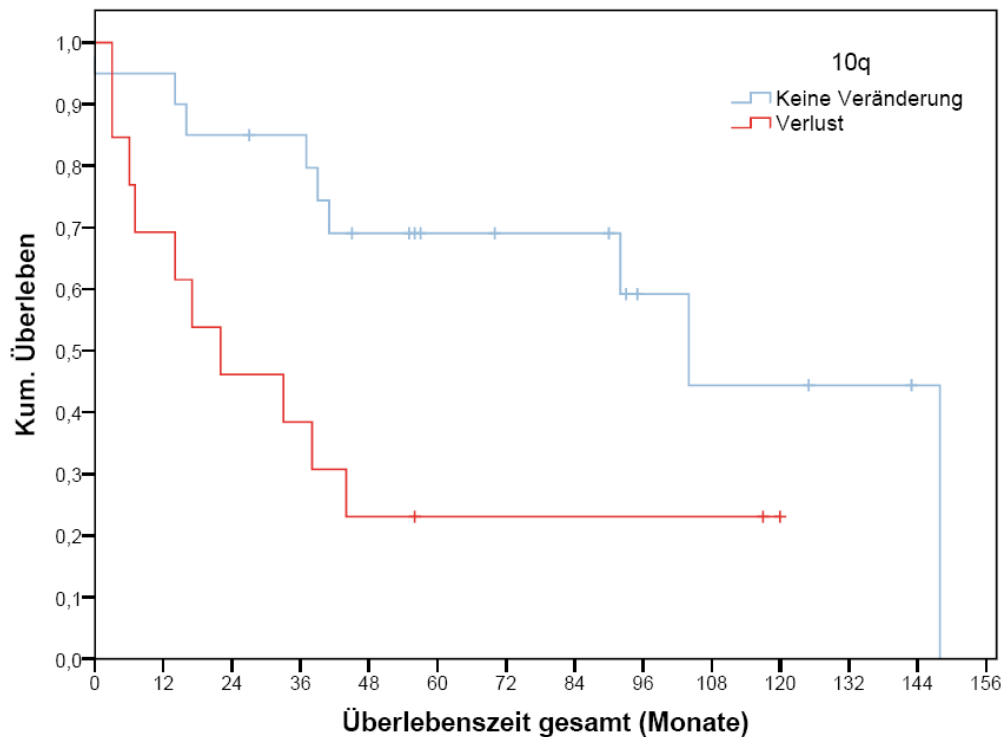


Abb. 3.6.2/2 Einfluss von 10q-Verlusten auf das Überleben

14q:

Ähnlich verhält es sich bei Veränderungen an Chromosom 14q ($p = 0,014$).

Tabelle 3.6.2/3 Einzelanalyse Chromosom 14q auf das Überleben

Chromosom 14q	Ereignisse N (%)	Zensierungen N (%)	Paarweiser Vergleich zu „Keine Veränderung“ p-Wert
Keine Veränderung	15 (54,6%)	13 (46,4%)	-
Verlust	4 (80,0%)	3 (20,0%)	0,050
Trendverlust	1 (100%)	0	0,005

Es zeigt sich, dass Verluste an 14q ebenfalls prognostisch ungünstig sind. Ohne Veränderungen ergibt sich eine mediane Überlebenszeit von 92 Monaten (KI 8,7 -

175,3 Monaten), während bei reinen Verlusten der Median bei 17 ± 3 Monaten errechnet wird (KI 10,6 - 23,4). Wird der einzelne Trendverlust dazugezählt, erniedrigt sich der Median auf 14 Monate (KI 0 - 29,6) ($p = 0,005$).

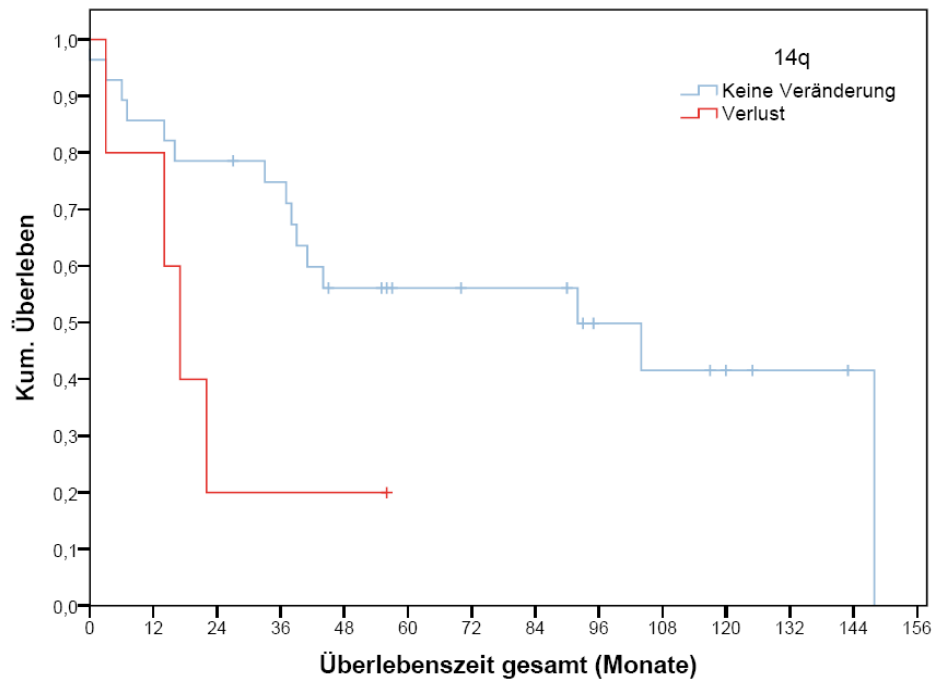


Abb. 3.6.2/3 Einfluss von 14q-Verlusten auf das Überleben

22q:

Ein weiterer signifikanter Unterschied lag bei Chromosom 22q ($p < 0,001$) vor. Die 5 beschriebenen Ereignisse ergaben in der Einzelanalyse, dass es sich ausschließlich um Verluste handelte. Die mediane Überlebenszeit lag bei 4 ± 1 Monaten (KI 1,9 - 6,1). Ohne Veränderungen an 22q zeigte sich ein prognostisch günstigeres Tumorverhalten mit 92 ± 32 Monaten medianer Überlebenszeit (KI 29,1 - 154,7)

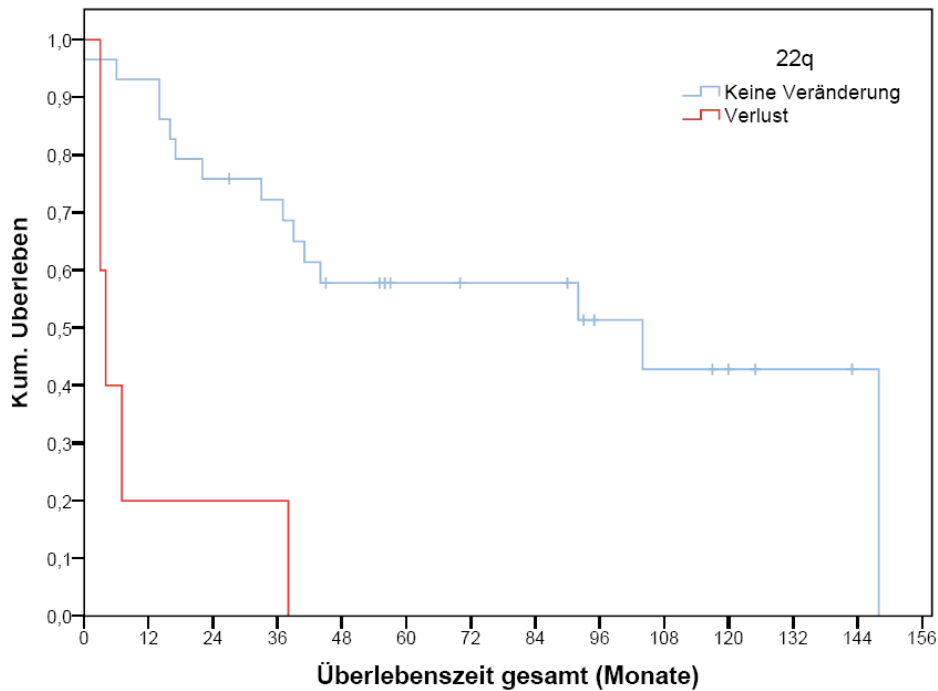


Abb. 3.6.2/4 Einfluss von 22q-Verlusten auf das Überleben

3.6.3 Einzelanalyse bei nicht-signifikantem Einfluss von Chromosomenaberrationen auf das Überleben

Bei den Chromosomen, die in der gruppierten Kaplan-Meier-Analyse keine signifikanten Ergebnisse lieferten, die medianen Überlebenszeiten aber in der Tabelle Hinweise auf tendenzielle Einflüsse zeigten, wurde eine Analyse der einzelnen chromosomalen Veränderungen angeschlossen, um zumindest eine Tendenz aufzeigen zu können.

3p:

Die Untersuchungen für Chromosom 3p ergaben aufgrund der Heterogenität der Veränderungen, der niedrigen Anzahl sowie der Zensierung der meisten Fälle keine verwertbaren Auffälligkeiten.

4q:

Bei 4q haben sich Zugewinne und Verluste ereignet. Die Einzelanalyse zeigte, dass nicht die Art der genetischen Veränderung, sondern eher das überhaupt eingetretene Ereignis zu einer schlechteren Prognose führt. Bei Veränderung reduzierte sich das

mediane Überleben auf 17 ± 14 Monate (KI 0 - 44,6) gegenüber $104 \pm 56,8$ Monaten (KI 0 - 215,4) bei intaktem Chromosom 4q ($p = 0,158$ für das Eintreten einer Veränderung gegenüber intaktem Chromosom).

7q:

Tendenziell ($p = 0,403$) ließen sich kürzere Überlebenszeiten bei 7q-Zugewinnen ablesen. Die mediane Überlebenszeit mit dieser Aberration lag bei $39 \pm 6,7$ Monaten (KI 25,9 – 52,1) gegenüber medianen 148 Monaten, bzw. in diesem Fall aussagekräftigerer mittleren Überlebenszeit von 93 Monaten (KI 52,9 – 133,2) bei intaktem Chromosom.

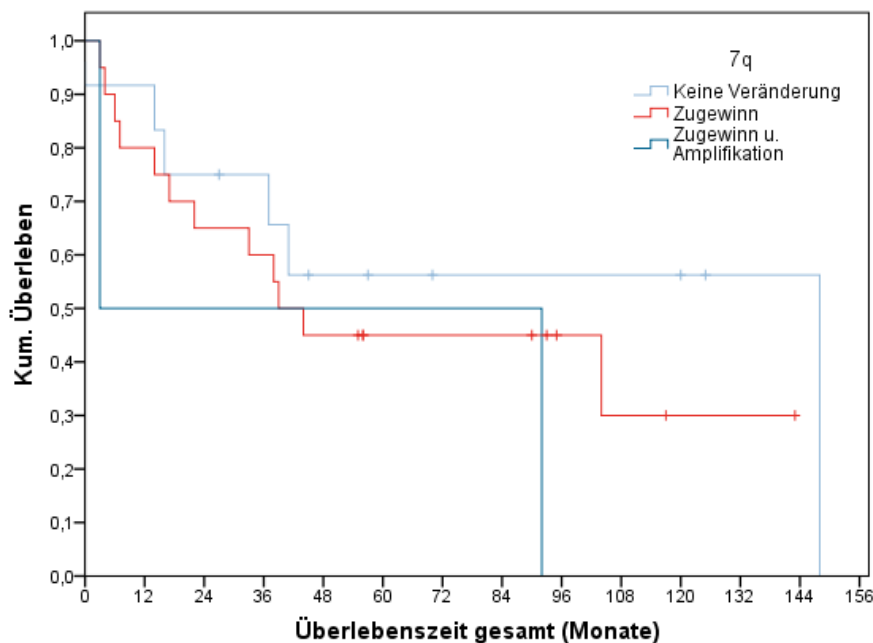


Abb. 3.6.3/1 Einfluss von 7q-Veränderungen

8q:

Die Einzelanalyse für 8q zeigte, dass es sich bei den beeinflussenden Veränderungen um Zugewinne und eine Amplifikation handelte. Diese scheinen prognostisch günstiger und dementsprechend mit einem längeren Überleben einherzugehen ($p = 0,108$). Eine Berechnung des Unterschiedes mit und ohne Veränderung ließ sich statistisch nicht sauber berechnen, da 75% der Fälle mit 8q-Zugewinn zensiert waren.

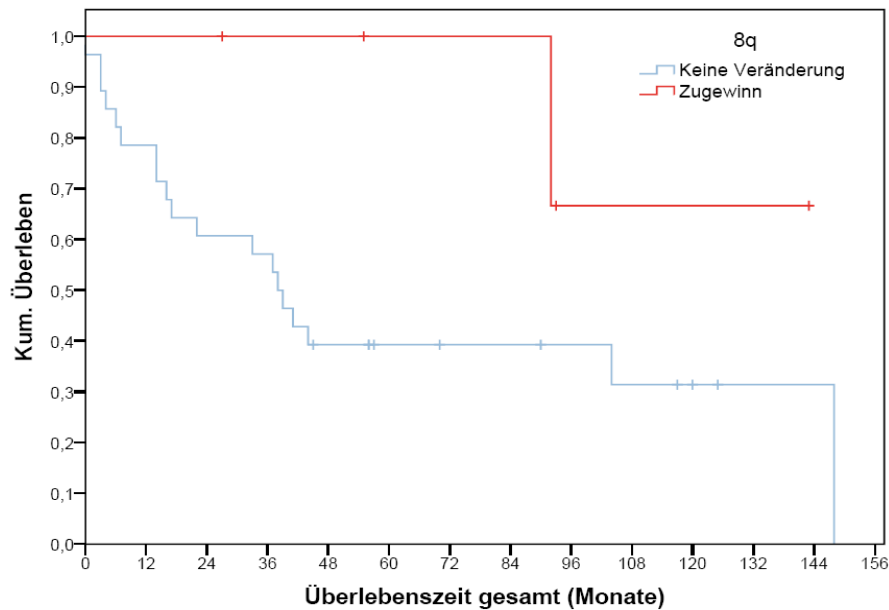


Abb. 3.6.3/2 Einfluss von 8q-Zugewinnen auf das Überleben

10p:

Die Einzelanalyse für 10p ergab keine signifikanten Einflüsse. Tendenziell lassen sich in der Kaplan-Meier-Grafik für 10p-Verluste ähnlich ungünstige Einflüsse wie bei 10q-Verlusten ablesen ($p = 0,18$). 10p-Zugewinne scheinen stabilisierend zu wirken ($p = 0,29$). Die Fallzahlen sind jedoch zu klein, als dass man einen (sinnvollen) statistischen Vergleich anstellen könnte. Insbesondere die Tatsache, dass es keine Daten zu Todesfällen im Follow-up-Zeitraum in der Gruppe der Zugewinne gibt, erschwert den Vergleich.

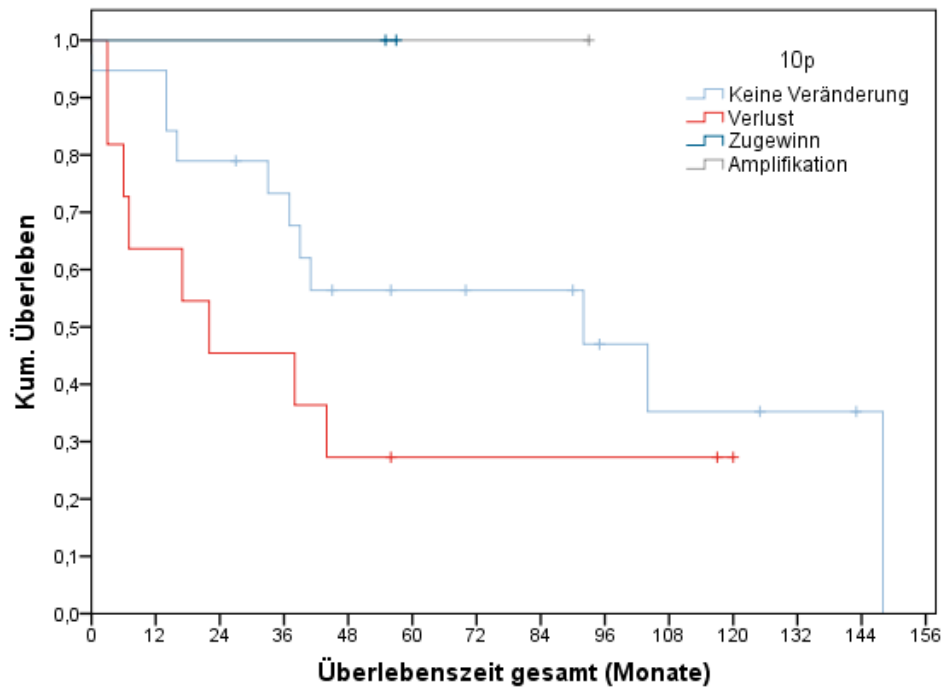


Abb. 3.6.3/3 Einfluss von 10p-Veränderungen auf das Überleben

13q:

Bei Chromosom 13q wurde ebenfalls eine Einzelanalyse angeschlossen. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die Veränderungen.

Tabelle 3.6.3/1 Einzelanalyse Chromosom 13q auf das Überleben

Chromosom 13q	Ereignisse N (%)	Zensurierungen N (%)	Paarweiser Vergleich zu „Keine Veränderung“ p-Wert
Keine Veränderung	12 (50,0%)	12 (50,0%)	-
Verlust	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0,204
Trendverlust	1 (100%)	0	0,385

Verluste an 13q sind als prognostisch ungünstig zu werten. Ohne Veränderungen ergibt sich eine mittlere Überlebenszeit von 86,5 Monaten (KI 59,0 - 114,0 Monaten), während bei reinen Verlusten eine mediane Überlebenszeit von 38 ± 23,8 Monaten errechnet wird (KI 0 - 84,5). Wird der einzelne Trendverlust dazugezählt, erniedrigt sich der Median geringfügig auf 37 Monate (KI 12,2 - 61,8) (p = 0,385).

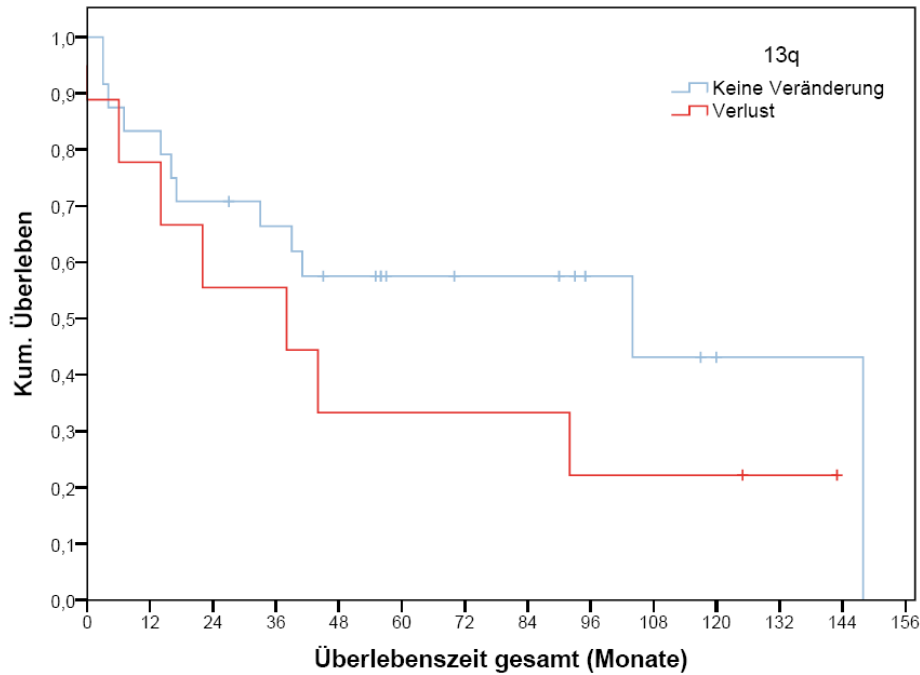


Abb. 3.6.3/4 Einfluss von 13q-Verlusten auf das Überleben

17q:

Eine Tendenz ist ebenfalls bei Chromosom 17q zu sehen. Zugewinne scheinen einen prognostisch günstigen Einfluss auf das Überleben zu haben. Die geringe Anzahl der Veränderungen im Kollektiv und die Zensierung der Überlebensdaten ermöglichten jedoch keine statistische Berechnung.

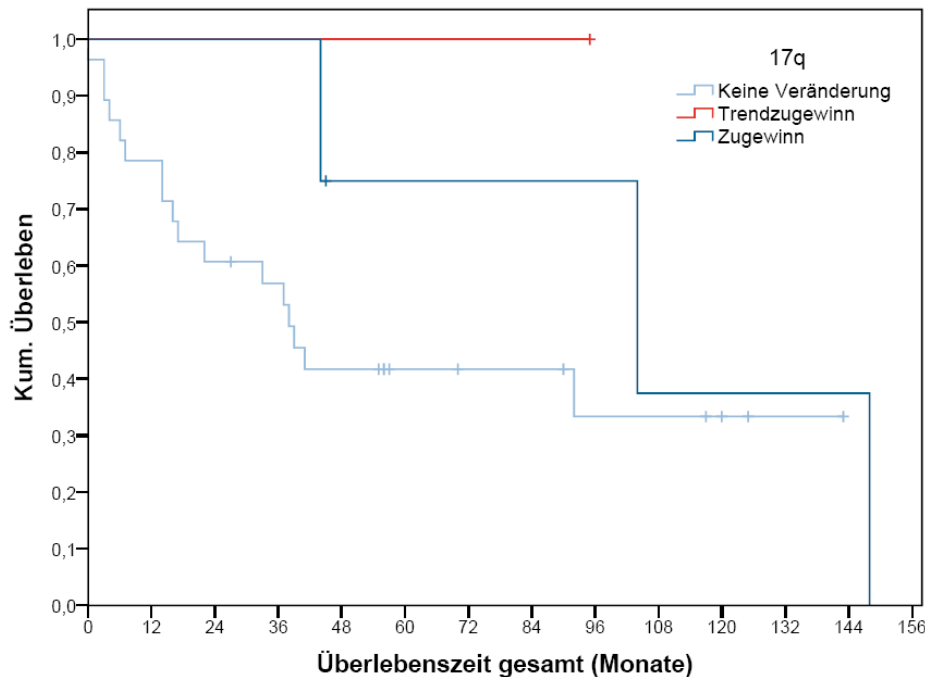


Abb. 3.6.3/5 Einfluss von 17q Zugewinnen auf das Überleben

19q:

Ähnlich verhält es sich für Chromosom 19q. Beschreibend haben Veränderungen an 19q prognostische Vorteile. Die Verluste scheinen sich dabei gegenüber Zugewinnen stärker positiv auszuwirken. Auch hier verhindert die kleine Anzahl an entsprechenden Ereignissen statistisch gut zu belegende Ergebnisse. Die Mediane in Tabelle 3.6.1/1 legen den Verdacht nahe, dass es sich bei 1p um ähnliche positive Effekte handelt. Die letzten beiden Veränderungen werden oft in Zusammenhang mit oligodendroglialem Tumoranteil genannt (siehe Diskussion).

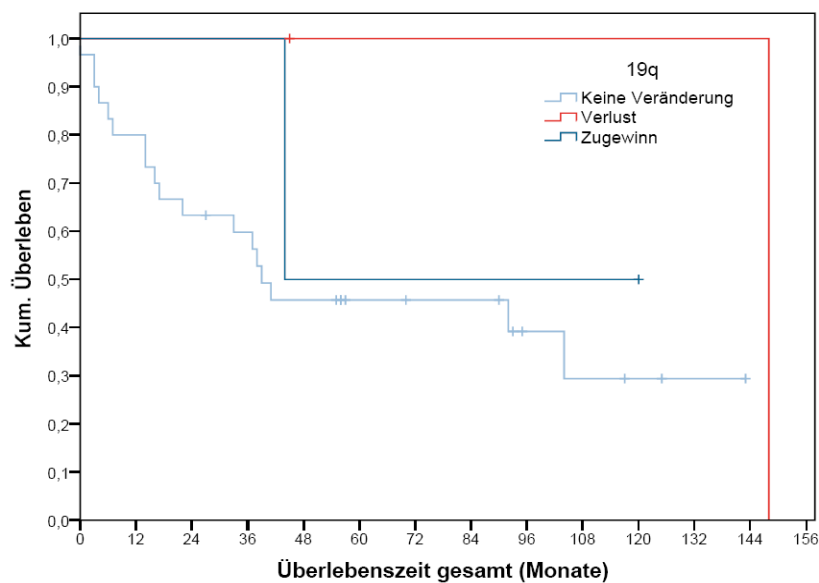


Abb. 3.6.3/6 Einfluss von 19q-Veränderungen auf das Überleben

3.6.4 Darstellung der einflussnehmenden Aberrationen

Tabelle 3.6.4/1 Signifikant prognostisch günstige/ungünstige Veränderungen, in Klammern die Veränderungen mit tendenziellem Einfluss

Prognostisch günstige Aberrationen	Prognostisch ungünstige Aberrationen
(-1p), (+8q), (+10p), (+17q), (-19q)	(-4p), (4q), +5q, +7p , (+7q), -10q , (-13q), -14q, -22q

Bei den fett gedruckten Veränderungen handelt es sich um die statistisch aussagekräftigsten Einflüsse auf das Überleben. Die folgende Tabelle ordnet die prognostischen Einflüsse in Abgleich mit den relativen Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen an Primärtumoren, rezidierten AA und sekundären GBM ihrem bevorzugten Auftreten zu.

Tabelle 3.6.4/2 Prognostisch wichtige Veränderungen in Zusammenhang mit Tumortyp (fett gedruckt die bei sek. GBM signifikant häufigeren Veränderungen, fett und kursiv die bei rez. AA signifikant häufigeren Veränderungen)

Prognose	Primärtumoren keine Präferenz	bzw. Rezidiertes anaplastisches Astrozytom	Sekundäres Glioblastom
Günstig	-1p, -19q	+8q, +10p <i>(Fisher-Test, p=0,029)</i>	
Ungünstig	-4p, 4q, +5q, +7q, -13q, -14q, -22q		+7p (Fisher-Test, p=0,005), -10q (Fisher-Test, p=0,002), -10p (Fisher-Test, p=0,029)

Es zeigte sich, dass 8q- und 10p-Zugewinne typische Veränderungen bei rezidierten AA waren. Diese gingen zudem mit einer tendenziell besseren Überlebenszeit einher. Zudem traten die 10p-Zugewinne signifikant häufiger bei rezidierten AA gegenüber sekundären GBM auf (Fisher-Test, $p = 0,029$).

Auch 1p19q-Deletionen zeigten ein tendenziell günstigeres Verhalten sowohl bzgl. der Überlebenszeiten als auch hinsichtlich der genetischen Stabilität. Diese Veränderungen traten bei sekundären GBM nicht auf, bei erhaltenem histologischen Grad im Rezidiv als AA jedoch schon.

Bei sekundären GBM traten 7p-Zugewinne und 10q-Verluste am häufigsten auf. Dies waren zudem die Veränderungen mit dem signifikant schlechtesten Outcome und gelten daher als eindeutige Progressionsmarker. Sie waren im exakten Fisher-Test gegenüber den rezidierten AA signifikant häufiger aufgetreten. Vergleichbares gilt für 10p-Verluste, die eine Signifikanz im Auftreten gegenüber rezidierten AA erreichten und einen prognostisch negativen Effekt haben.

Der 13q-Verlust zeigte eine prognostisch ungünstige Tendenz. Diese Veränderung trat durch alle untersuchten Tumorklassen ohne eindeutige Präferenz auf, und kann damit als ein frühes Ereignis maligner Progression betrachtet werden. Ähnliches gilt für den Zugewinn an 7q, der eine steigende prozentuale Häufung bis zu den sekundären GBM zeigt.

Diese Veränderungen führten zur Erstellung des nachfolgenden Tumorprogressionsmodelles, das im Diskussionsteil noch ausführlicher erläutert wird.

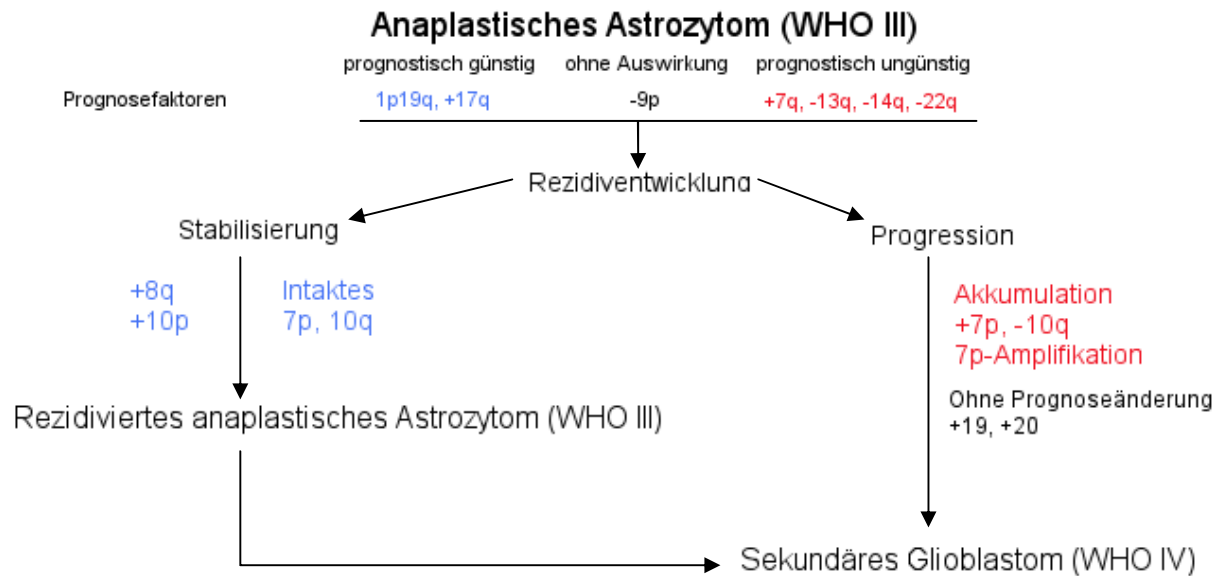


Abb. 3.6.4/1 Flussdiagramm zur Progression basierend auf den Untersuchungsergebnissen (in blau die prognostisch günstigen, in rot die ungünstigen Aberrationen)

Die Tabelle 3.6.4/3 zeigt eine Übersicht zu den in dieser Arbeit aufgestellten Stabilisierungs-, Progressions-, Prognose- und diagnostischen Markern. Jetzt müsste zur Ankündigung etwas geschrieben werden.

Tabelle 3.6.4/3 Übersicht über die mögliche prognostische Bedeutung genetischer Veränderungen dieser Arbeit

Veränderung	Diagnostischer Marker	Stabilisierungsmarker	Progressionsmarker	Prognosemarker
-1p, -19q		X		Positiv
+7p, 7p-Amplifikation			x	Negativ
+7q	x			Negativ
+8q		X		Positiv
-9p	x			
+10p		X		Positiv
-10p			x	Negativ
-10q			x	Negativ
-13q				Negativ
-14q				Negativ
+17q				Positiv
+19			x	
+20			x	
-22q				Negativ

3.7 Einfluss der Therapie auf die chromosomalen Veränderungen

Da alle Patienten, bei denen die klinischen Daten erhoben werden konnten, bis auf eine Ausnahme eine Radiatio erhielten, lassen sich Unterschiede auf die Genetik diesbezüglich nicht eruieren. Es wurden jedoch Berechnungen angestellt, ob bestimmte Aberrationen unter alleiniger Radiatio, PCV-Chemotherapie, PCV- und Temozolomidgabe, sowie alleiniger Temozolomid-Medikation in den Rezidiven vermehrt auftraten. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Proben in Zusammenhang mit komplettierten klinischen Informationen ließen sich keine signifikanten Auffälligkeiten errechnen.

4 Diskussion

4.1 Das Kollektiv

Das Kollektiv an Patienten innerhalb der vorliegenden Arbeit ist als repräsentativ anzusehen. Die Geschlechterverteilung der 32 männlichen und 23 weiblichen Patienten im Verhältnis 1,39:1 deckt sich exakt mit den epidemiologischen Daten aus der Literatur, in der ebenfalls angegeben wird, dass Männer etwas häufiger von dieser Tumorart betroffen sind (Verhältnis 1,4:1, Stupp et al. 2007).

Das mediane Erkrankungsalter (Frauen: 42,5 Jahre, Männer 52 Jahre) ist ebenfalls vergleichbar mit den Literaturangaben. In der Untersuchung von Wiltshire und Kollegen (Wiltshire et al. 2004) ergab sich geschlechtsunabhängig ein medianes Alter von 43 Jahren. Bei o.g. Arbeit von Stupp werden 60% der Erkrankten in einem Altersspektrum von 45 – 69 Jahren angegeben. Bei Ohgaki und Kleihues (2007) liegt das mediane Alter von Patienten mit sekundären GBM ebenfalls bei 45 Jahren.

4.2 Malignisierung von anaplastischen Astrozytomen zu sekundären Glioblastomen und deren molekulargenetische Unterscheidung von primären Glioblastomen

Histologisch zeigen sich bei AA bereits deutliche Zeichen von Malignität. Neben Kernatypien kommen auch Mitosefiguren zur Darstellung. Der Progress zum sekundären GBM präsentiert zusätzlich das Auftreten von Endothelproliferationen als Zeichen einer gesteigerten Angiogenese sowie Nekrosen als Zeichen eines schnell proliferierenden Gewebes mit tumormassebezogen nicht mehr ausreichender Sauer- und Nährstoffversorgung sowie Mikrothrombosen (siehe auch 1.3). Im Rezidivfall behielten in unserer Untersuchung etwa die Hälfte der Tumoren ihren Malignitätsgrad WHO III bei, wohingegen die andere Hälfte einen histologischen Progress zum sekundären GBM zeigte.

Prognostisch spiegeln sich die zunehmenden histologischen Auffälligkeiten in kürzeren Überlebenszeiten bei Tumoren höchsten Malignitätsgrades wider. Während

Patienten mit Tumoren WHO-Grad III durchaus mehrere Jahre progressionsfrei leben, sind die Chancen bei Glioblastompatienten deutlich schlechter. Dies gilt sowohl für die Gruppe der von uns untersuchten sekundären GBM, die sich aus niedriggradigeren Astrozytomen heraus entwickeln und eher für jüngere Patienten typisch sind, als auch für die primären, also de-novo-GBM ohne Vorläufertumor, die eher älteren Patienten zugeschrieben werden (Chamberlain et al. 2008). Der molekulargenetische Entstehungsweg beider WHO-IV-Tumoren unterscheidet sich deutlich. Während sekundäre GBM die typischen Veränderungen ihrer Vorläufertumoren (wie z.B. p53-Mutationen, PDGF-Hochregulationen, 19q-Deletionen) aufweisen, zeigen sich bei primären GBM eher EGFR-Amplifikationen, MDM2-Überexpression und gegenüber sekundären GBM in der prozentualen Häufigkeit gesteigert PTEN-Mutationen (Chamberlain et al. 2008).

Eine der Hauptaufgaben der aktuellen Forschung besteht darin, molekularzytogenetische Charakteristika der Tumoren aufzudecken, die die histologische Progression zu höherer Malignität vorherzusagen vermögen.

4.3 Rezidivfreie Intervalle und Überlebenszeiten

Entgegen der Vermutung, dass sekundäre GBM frühzeitiger zum Rezidiv führen, ergaben sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Auftreten der Rezidive unterschiedlichen WHO-Grades. Tendenziell waren die medianen progressionsfreien Überlebenszeiten mit 31 Monaten bei sekundären GBM gegenüber 61 Monaten bei gleichgebliebenem Malignitätsgrad zwar kürzer, aufgrund der geringen Fallzahl dieser Untersuchung wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht. In der Literatur wurden Progressionszeiten vom anaplastischen Astrozytom zum sekundären GBM mit 16 Monaten (Ohgaki und Kleihues 2007) bzw. 25 Monaten (Watanabe K et al. 1996) zum Teil deutlich kürzer als an dieser Untersuchung angegeben. Auch die Zeiträume zum Erstrezidiv wurden mit einem Median von 15 Monaten als vergleichsweise kurz beschrieben (Yung et al. 1999). Weitere Untersuchungen ergaben noch kürzere allgemeine progressionsfreie Intervalle um 4 (Wong et al. 1999, Chang et al. 2004) bis 7 Monate (Brandes et al. 2001). Eine ältere Studie (Prados et al. 1992) beschreibt ein rezidivfreies Intervall für AA mit 31 Monaten, vergleichbar mit den Ergebnissen unserer Studie. Die medianen

Überlebenszeiten bei AA unterscheiden sich der Literatur nach ebenfalls je nach Studie. Zumeist werden sie mit 18 (Ohgaki und Kleihues 2005) bis 20 (Wiltshire et al. 2004) bzw. 28 Monaten nach RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) angegeben. Die o.g. Arbeit von Prados und Kollegen zeigte erneut mit unseren Ergebnissen übereinstimmende Daten mit einer medianen Gesamtüberlebenszeit von 107,9 Wochen (entsprechend ca. 42,7 Monaten). Auch bei Furnari und Kollegen (Furnari et al. 2007) ergaben sich etwas höhere Gesamtüberlebenszeiten von 24 – 36 Monaten. Die erst genannten Untersuchungen unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei der die mediane Überlebenszeit bei $44 \pm 39,6$ Monaten liegt.

Ursachen könnten teilweise durch das Studiendesign bedingt sein, da einige der oben genannten Untersuchungen die Zeit zur Progression nach Strahlen- bzw. Chemotherapieende zählten, also das progressionsfreie Überleben benannten, während in unserer Arbeit das Gesamtüberleben angegeben wurde.

4.4 Die genetischen Veränderungen

Krebsentstehung ist ein komplexer Prozess, bei dem erst die Akkumulation mehrerer genetischer Mutationen zur eigentlichen Entartung führt. Die tumorspezifischen chromosomalen Veränderungen, die zuerst auftreten, werden als primäre Aberrationen bezeichnet. Darauf folgen sekundäre Aberrationen, die im Rahmen des Malignisierungsprozesses entstehen. Äußere Einflüsse, z.B. Radiatio oder bei völlig undifferenzierten Tumoren zufällig akquirierte Veränderungen, führen zu tertiären Aberrationen.

Beteiligt bei allen drei Typen von Aberrationen sind oftmals Gene, die den Zellzyklus regulieren; seien es proliferative oder apoptotische Regelkreise oder Differenzierungsmechanismen. Generell sind dabei zwei Arten von Genen zu unterscheiden: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene regen bei Überexpression durch Funktionszugewinn das Wachstum der Zelle über die Norm an, Tumorsuppressorgene können bei Depletion durch einen Funktionsverlust nicht mehr hemmend auf das Zellwachstum einwirken. Darüber hinaus spielen auch Veränderungen in den zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle. Ein für

hochmaligne Astrozytome wichtiges Beispiel stellt die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) dar, ein Zellkernprotein, dessen genetische Inaktivierung sich negativ auf die Reparatur alkylierter DNA auswirkt und somit zur Tumorentstehung führt. Epigenetische Veränderungen, die MGMT betreffen, wie z.B. Hypermethylierung am MGMT-Promotor, haben zum Teil therapeutische Vorteile, da sie ein besseres Ansprechen auf alkylierende Chemotherapie zeigen (Hegi et al. 2005) (s.u.).

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit in primären AA und deren Rezidiven zeigen komplexe Veränderungen auf chromosomaler Ebene, die zur Dysregulation des Zellzyklus' geführt haben können und Wegbereiter des malignen Progresses darstellen. Bisher ist das Verhalten anaplastischer Astrozytome in Bezug auf den histologischen Progress zum sekundären GBM nicht vorhersagbar. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Tumorprogressionsmodell soll diese Problematik durch neue Erkenntnisse auf chromosomaler Ebene beantworten.

Im Folgenden werden die chromosomalen Veränderungen therapieunabhängig und in Bezug auf ihre Wertigkeit hinsichtlich der Prognose für das Gesamtüberleben diskutiert.

Im Anschluss erfolgt die Einordnung der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Marker in das Progressionsmodell.

4.4.1 Anzahl der chromosomalen Aberrationen

In der Anzahl chromosomaler Aberrationen zeigte sich bei den sekundären GBM allenfalls eine diskrete Tendenz zu einer vermehrten Anzahl von genetischen Verlusten gegenüber den Primärtumoren und Rezidiven erhaltenen Malignitätsgrades. Ursächlich für die wenigen numerischen Unterschiede könnte erneut die geringe Fallzahl sein. Jedoch zeigten andere Studien ebenfalls kaum Abweichungen zwischen beiden Malignitätsgraden (Durchschnittliche Anzahl an Aberrationen WHO III: 7, WHO IV: 9, Wiltshire et al. 2004). Bei höhergradigen Tumoren kann sich im Einzelfall die Anzahl der Aberrationen durchaus stark unterscheiden. Dies liegt an der genetischen Instabilität bzw. der ausgeprägten Malignität mit u.a. ausgeschalteten Reparaturmechanismen, so dass z.B. die

Entstehung tertiärer als zufällig akquirierter Aberrationen begünstigt wird. Dies muss sich nicht zwangsläufig auf Histologie oder Prognose auswirken, wenn keine entscheidenden Gene davon betroffen sind, jedoch kann die Gesamtzahl der Veränderungen dadurch zunehmen.

4.4.2 Chromosomenbezogene Analyse der Aberrationen

4.4.2.1 Chromosom 1

Unstrittig ist die Einteilung anaplastischer Astrozytome in die Gruppen mit bzw. ohne 1p-/19q-Deletionen (z.B. Louis et al. 2007). Daher werden diese beiden Chromosomen hier gemeinsam abgehandelt. Sind diese Veränderungen vorhanden, besteht eine günstigere Prognose durch ein besseres Ansprechen auf alkylierende Chemotherapie als bei unveränderten Chromosomen 1p und 19q. Besonders typisch sind diese Veränderungen bei Tumoren mit oligodendroglialen Anteilen (Louis et al. 2007). Verluste an 1p/19q mit gleichzeitigen Zugewinnen an Chromosom 7 sind exklusiv für AA (Bigner et al. 1999) auch ohne oligodendrogliale Komponente beschrieben. Auch in unserem Kollektiv konnte diese Kombination an chromosomalen Aberrationen bei zwei Primärtumoren gesehen werden. Ein primäres AA zeigte 1p19q-Deletionen ohne Zugewinne an Chromosom 7. Entscheidend in unserer Arbeit ist, dass bei keinem der sekundären GBM und nur bei zwei rezidierten AA 1p-/19q-Deletionen, ebenfalls ohne Zugewinn an Chromosom 7, auftraten. Wir schließen daraus einen stabilisierenden Effekt im malignen Progress dieser Tumoren.

Zudem zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass 1p-Verluste tendenziell zu einem verlängerten Überleben führten, denn die mediane Überlebenszeit bei -1p war mit 148 Monaten gegenüber 41 Monaten ohne Verlust von 1p deutlich erhöht. 19q-Verluste trugen nach unseren Ergebnissen nur unwesentlich zum prognostischen Benefit bei.

Es wird derzeit spekuliert, ob nicht die 1p/19q-Deletionen, sondern vielmehr die gleichzeitige Abwesenheit von prognostisch ungünstigen Aberrationen wie z.B. Zugewinnen an Chromosom 7 und Verlusten an Chromosom 10 zu weniger malignem Verhalten führen (Trost et al. 2007), obwohl das für 19q13.3 identifizierte *epithelial membrane proteine 3 (EMP3)*-Gen, welches aktiv am Zellzyklus teilnimmt

und beim Zell-Zellkontakt die Rolle eines Tumorsuppressor-Membranproteins übernimmt (Alaminos et al. 2005), in Gliomen gehäuft epigenetisch via Hypermethylierung funktionslos wird. Diese Inaktivierung ist eher selten durch direkte Deletionen, vor allem nicht auf chromosomaler Ebene, bedingt (Kunitz et al. 2007).

In Zusammenhang mit den 1p/19q-Kodeletionen werden auch Mutationen der beiden Isoformen der zytosolischen Isocitratdehydrogenase 1 (IDH1) bzw. mitochondrialen IDH2 als mittlerweile einer der wichtigsten prognostischen Marker für Astrozytome angegeben (Labussiere et al. 2010). Mutationen der IDH1 oder IDH2 legen ein besseres Ansprechen auf Temozolomid nahe, zumindest bei den niedriggradigeren Astrozytomen (Houillier et al. 2010).

4.4.2.2 Chromosom 2

9,8% der primären anaplastischen Astrozytome zeigten in der Untersuchung Verluste an 2q, darüber hinaus gab es keine Veränderungen an Chromosom 2. Verluste an 2q zeigten keinen Einfluss auf das Überleben. Bei kindlichen hochgradigen Astrozytomen kommen 2q-Zugewinne bis zu 38% der Fälle vor (Warr et al. 2001). Diese spielten bei den von uns untersuchten adulten AA jedoch in Anzahl und Prognose keine Rolle, so dass diese im Gegensatz zu den kindlichen Tumoren wohl eher zufällige (= tertiäre) Aberrationen darstellen.

4.4.2.3 Chromosom 3

Primäre AA und deren Rezidive zeigten in einigen Fällen sowohl Zugewinne als auch Verluste an Chromosom 3p. Das auf diesem Chromosomenarm lokalisierte von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen wird im Zusammenhang mit der Tumorgenese niedriggradiger Gliome diskutiert, auch bei Patienten ohne von-Hippel-Lindau-Erkrankung (Kanno et al. 1997). Die typischerweise bei dieser Erkrankung betroffenen Tumoren sind klarzellige Nierenzellkarzinome und Hämangioblastome, die ebenfalls durch Verluste an 3p gekennzeichnet sind (Kim und Kaelin 2004). Bei den hier untersuchten hochmalignen Astrozytomen spielt dieses Gen nach aktuellem Stand der Literatur aber wohl keine relevante Rolle, welches in Kongruenz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht.

4.4.2.4 Chromosom 4

Die primären anaplastischen Astrozytome zeigten in 12,2% Verluste und in 7,3% Zugewinne an Chromosom 4q. Sekundäre GBM wiesen in 21,4% Verluste und in 14,3% Zugewinne an 4q auf, WHO-Grad-III-Rezidive jedoch zeigten nur vereinzelte Aberrationen an Chromosom 4. An 4q12 ist das PDGFR-Gen lokalisiert. Amplifikationen und Überexpression dieses Onkogens führen zu einem konsekutiven Wachstumsvorteil und sind in der Literatur für AA und sekundäre GBM bereits beschrieben (Reifenberger und Collins 2004). Eine Akzeleration dieses Wachstumsvorteils ergibt sich häufig durch auto- bzw. parakrine Sekretion seines Liganden (Hermanson et al. 1992). Für ältere Patienten ist bekannt, dass 4q-Verluste von prognostischem Nachteil für das Gesamtüberleben sind (Kunwar et al. 2001). Der Zugewinn an 4q, einhergehend mit einer möglichen Überexpression von PDGFR kann also als sekundäre, den Malignisierungsprozess unterstützende Aberration angesehen werden.

4.4.2.5 Chromosom 5

Die Untersuchungsergebnisse lieferten nur in Einzelfällen Veränderungen an Chromosom 5. Erstaunlicherweise werden 5q-Zugewinne in 31% pädiatrischer höhergradiger Astrozytome gefunden (Warr et al. 2001). Eine Erklärung zur Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Arbeit findet sich nicht, denn auch in der Literatur sind bislang keine Kandidatengene mit onkogener Funktion identifiziert. Veränderungen an Chromosom 5 scheinen in adulten malignen Astrozytomen demnach wohl eher zufällig zu entstehen.

4.4.2.6 Chromosom 6

12,2% der primären anaplastischen Astrozytome wiesen Verluste an Chromosom 6q auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Rezidive sowohl gleichen WHO-Grades als auch sekundäre GBM nur vereinzelt Veränderungen in diesem Chromosomenabschnitt. In keinem Falle beeinflussten Veränderungen an Chromosom 6 das Überleben. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass 6q-Verluste eher mit kürzeren Überlebenszeiten einhergehen, insbesondere bei Patienten mit *de novo* GBM (Weber et al. 1996,

Burton et al. 2002). Verluste an 6q sind zudem auch für maligne Melanome (Fung et al. 2009), Mamma- und Zervixkarzinome bekannt, was das Vorhandensein wichtiger Tumorsuppressorgene an 6q vermuten lässt. Ein Kandidat hierfür ist der *prenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2)*, dessen Genlocus sich an 6q21 befindet. Eine Herunterregulation dieses Tumorsuppressorgens zeigt sich bei 67,8% maligner Melanome (Fung et al. 2009). Eine vermehrte Expression hingegen führt zu einem geringeren Zellwachstum (Fung et al. 2009). Entsprechende Untersuchungen zu Astrozytomen fehlen derzeit noch, so dass eine dementsprechende Einordnung, ob Verluste an 6q zufällig oder im Rahmen des Malignisierungsprozesses stattfinden, nicht erfolgen kann. Da aber nur wenige Rezidivtumoren diese Veränderung aufzeigten, werten wir den Verlust an 6q als zufällig.

4.4.2.7 Chromosom 7

Die häufigsten Zugewinne, in Astrozytomen aller histologischen Malignitätsgrade finden sich an Chromosom 7, insbesondere sind 7p12 (Koschny et al. 2002) und 7q32-q36 betroffen (Holland et al. 2010). Bei anderen Hirntumorsubtypen treten diese Aberrationen seltener auf (Kleihues und Cavenee 2000), so dass Zugewinne an Chromosom 7 als astrozytomtypische, primäre Veränderungen bezeichnet werden. Dies bestätigte sich auch in unseren Untersuchungen. 58,3% (mit Trendzugewinn 60,7%) der primären anaplastischen Astrozytome in unserer Studie und 46,7% (mit Trendzugewinn 53,4%) der Rezidive des WHO-Grades III bzw. 71,4% der sekundären GBM wiesen Zugewinne an 7q auf. Für 7p-Zugewinne fielen die Werte nicht so ausgeprägt aus. Immerhin waren aber 39% der primären anaplastischen Astrozytome davon betroffen. Auffällig ist, dass nur ein einziges der WHO-Grad-III-Rezidive diese Veränderung aufwies, jedoch 50% der sekundären GBM ($p = 0,05$). Daraus ist abzuleiten, dass Zugewinne an 7p und ebenso an 7q sowohl für die Tumorentstehung wichtig als auch wegweisend für den malignen Progress in Astrozytomen sein können, was auch in der neuesten Metaanalyse bestätigt werden konnte (Holland et al. 2010).

Amplifikationen im Bereich 7p12-14, am Locus des EGFR, zeigten sich in 19,5% der primären anaplastischen Astrozytome und in 21,5% der sekundären GBM, nicht aber in Rezidiven mit dem WHO-Grad III. Die Amplifikation an 7p12-14 scheint daher entscheidend für eine Malignisierung zu sein, im Umkehrschluss dann die

Abwesenheit dieser Amplifikationen stabilisierend auf den histologischen Grad zu wirken. Aus der Literatur ist dies bereits bekannt, denn Amplifikationen an 7p12 entstehen in rasch malignisierenden Vorläufertumoren (Ohgaki und Kleihues 2007). Die Hochregulierung des Wachstumsfaktors PDGF wird zumeist erst in GBM beobachtet, was dessen Rolle eher in der Progression als in der Tumorinitiation nahelegt (Louis et al. 2007). Eine vermehrte EGFR-Expression geht nach Studienlage auch mit einer erhöhten Radiochemotherapieresistenz einher (Nagane et al. 1998). Im allgemeinen werden EGFR-Amplifikationen eher älteren Patienten ohne Vorläuferläsion, also *de novo* Läsionen zugeschrieben (Kunwar et al. 2001, Ohgaki und Kleihues 2007), was unsere Studienergebnisse widerlegen. Amplifikationen an 7p12 in älteren Glioblastompatienten lassen also nach unserer Auffassung den Rückschluss auf einen initialen anaplastischen Vorläufertumor zu. Auffällig dabei ist zudem, dass EGFR-Amplifikationen fast nie mit p53-Mutationen bzw. 17p-Verlusten vergesellschaftet sind (Watanabe K et al. 1996). Im untersuchten Kollektiv konnten wir dies bestätigen, nur in einem Fall eines sekundären GBM zeigte sich eine konkomitante Amplifikation an 7p und ein Verlust an 17p.

Veränderungen an 7p und 7q sind der Literatur nach mit kürzerer Überlebenszeit assoziiert (Kunwar et al. 2001). Prognostische Bedeutsamkeit ließ sich in dieser Arbeit allerdings nur für Aberrationen bei 7p ($p = 0,037$) erheben. Der reine Zugewinn ist als prognostisch ungünstig zu beschreiben mit einer medianen Überlebenszeit von 22 Monaten gegenüber 104 Monaten ohne diese Veränderung. Signifikant eindeutig ungünstig war die Prognose, wenn zusätzlich eine Amplifikation auftrat. Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Untersuchung in der die Amplifikation an 7p nicht zwingend mit kürzerem Überleben assoziiert war (Burton et al. 2002). Dies steht in Diskrepanz zur o.g. Studie von Nagane und Kollegen (Nagane et al. 1998), nach der die genannte Amplifikation Therapieresistenzen nach sich ziehen könnte. Mögliche Unterschiede könnten durch unterschiedliche Therapieschemata und begleitende genetische Veränderungen mit Überlebenszeitbeeinflussung bedingt sein, ließen sich aber nicht eindeutig klären. Die sich negativ auswirkenden Zugewinne an Chromosom 7 legen das Vorhandensein multipler Onkogene an diesen Lokalisationen nahe, die das klinische Verhalten des Tumors beeinflussen.

4.4.2.8 Chromosom 8

Primäre AA waren mit 17,0% relativ häufig durch Zugewinne an 8q gekennzeichnet. Ein Fall zeigte sogar eine Amplifikation. 33,3% der gleichgradigen Rezidive zeigten diese Veränderung, während bei den sekundären GBM nur bei 14,3% Zugewinne an 8q auftraten. In gleicher Häufigkeit zeigten letztere Tumoren auch Verluste an 8q. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen, die bei gleichgradigen Rezidiven typischerweise 8q-Zugewinne fanden (Kunwar et al. 2001) und somit eine histologisch ersichtliche Stabilisierung hervorrufen. Es wurden darüber hinaus Assoziationen gefunden, dass bei Vorliegen von 8q-Zugewinnen deutlich seltener die für den malignen Progress hochcharakteristischen +7p (insbesondere keine Amplifikationen) und -10q Veränderungen auftreten (Nishizaki et al. 1998). Die Überlebenszeitanalyse für 8q offenbarte, dass Zugewinne einen nicht-signifikanten, jedoch erkennbaren prognostisch günstigen Effekt haben und dementsprechend mit einem längeren Überleben einhergehen. Die Mittelwerte mit Verlust an 8q lagen bei 130,3 Monaten Gesamtüberleben gegenüber 66,8 Monaten ohne 8q-Aberration. Die Kunwar-Studie zeigte kontrovers, wenn auch ebenfalls nicht-signifikant ein eher kürzeres Überleben bei jüngeren Patienten mit 8q-Zugewinnen (Kunwar et al. 2001). Daher liegt die Vermutung nahe, dass an 8q sowohl Tumorsuppressorgene als auch Onkogene vorhanden sein müssen, deren Mutation je nach exaktem Genlocus und entsprechend betroffenem Protein sich also sowohl prognostisch günstig als auch ungünstig auswirken kann. Nach dem aktuellen Stand der Literatur sind aber solche Gene an 8q noch nicht identifiziert. Diese sekundären Aberrationen wirken sich also histologisch stabilisierend und je nach Ausprägung prognostisch günstig bzw. ungünstig aus.

4.4.2.9 Chromosom 9

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich 9p-Deletionen bei 24,4% (31,7% inkl. Trendverlust) der primären anaplastischen Astrozytome. Auch 20,0% (bzw. 33,3% mit Trendverlusten) der gleichgradigen Rezidive und 28,6% der sekundären GBM waren hiervon betroffen. Der Literatur nach handelt es sich bei 9p-Verlusten vor allem um Mutationen im CDKN2A-Gen (9p21), das eher eine typische Veränderung primärer GBM darstellt (Koschny et al. 2002, Ohgaki et al. 2004), aber auch bei AA

beschrieben wurde (Kunwar et al. 2001, Chamberlain et al. 2008). Das Genprodukt p16 ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Inaktivierung den zyklinabhängigen Kinasekomplex enthemmt, der das Retinoblastom-Gen reguliert. 9p-Verluste gelten tendenziell als prognostisch ungünstig (Burton et al. 2002), insbesondere bei GBM. Auswirkungen auf das Überleben ließen sich in dieser Arbeit jedoch nicht nachweisen. Da die Häufigkeit dieser Veränderung in unserer Arbeit sowohl bei Primären, rezidivierten AA als auch sekundären GBM sehr ähnlich ist, schließen wir daraus eher eine für höhergradige Astrozytome charakteristische, jedoch die Prognose und den Progress nicht entscheidend beeinflussende, sekundäre chromosomale Aberration.

4.4.2.10 Chromosom 10

Veränderungen am Chromosom 10, insbesondere Verluste, sind die am häufigsten beschriebenen Veränderungen in Astrozytomen (Koschny et al. 2002, Holland et al. 2010). Sie gelten als tumorspezifische primäre Aberrationen. Das entspricht den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen Rezidiven erhaltenen Malignitätsgrades (sehr selten Verluste an Chromosom 10) und den sekundären GBM, die einen Verlust von 10p in 50% und einen Verlust an 10q sogar in 57,1% der Fälle demonstrierten. 60-85% von GBM weisen der Literatur nach Verluste an Chromosom 10 auf, ca. 25% PTEN-Mutationen (Li et al. 1997). Während 10p-Deletionen in der Tumorigenese früh auftreten, verbergen sich hinter den 10q-Verlusten dabei oftmals die o.g. Veränderungen am *phosphatase and tensin* (PTEN) - Gen, einem Tumorsuppressorgen, dessen Inaktivierung zu einer verstärkten Angiogenese führen kann und damit ebenfalls einen Marker für maligne Progression darstellt (Xiao et al. 2002). Verluste an 10q zogen in dieser Arbeit eine signifikant deutlich verkürzte mittlere Überlebenszeit nach sich. Für den Verlust an Chromosom 10q ergab sich eine mediane Überlebenszeit von 22 (mit Trendverlusten 17) Monaten gegenüber 104 Monaten bei intaktem Chromosom 10q. Diese negative Auswirkung auf das Überleben wurde in anderen Arbeiten auch als altersunabhängig verifiziert (Wiltshire et al. 2004). Die Abwesenheit dieser Veränderung wirkte zudem stabilisierend auf den Erhalt des histologischen Malignitätsgrades, da nur ein Einzelfall der rezidivierten AA davon betroffen war, jedoch 57,1% (bzw. 64,2% mit Trendverlust) der sekundären GBM.

Bereits in niedriggradigeren Tumoren ist das bei 10q26 liegende MGMT (*O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*)-Gen von einer epigenetischen Veränderung im Sinne einer Hypermethylierung der Promotorregion betroffen (Watanabe T et al. 2007), die aber durch die CGH nicht erfasst werden kann. Dabei handelt es sich um ein DNA-Reparaturprotein, das alkylierende Gruppen aus bestimmten Positionen entfernt. Ist dieses Protein durch Hypermethylierung des Promotors inaktiviert, ergibt sich ein besseres Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika (Hegi et al. 2005).

10p-Zugewinne waren in unserer Arbeit bei rezidierten AA (Fisher-Test, $p = 0,023$) typisch. Rezidive gleichen Malignitätsgrades wiesen mit 26,7% häufig Zugewinne an 10p auf. Dies steht im Gegensatz zu den sekundären GBM, bei denen lediglich ein Fall betroffen war, der sich aus einem bereits als sekundäres AA rezidierten Tumor entwickelt hatte. Der Unterschied zwischen beiden Histologietypen erreichte Signifikanzniveau (exakter Fisher-Test, $p = 0,023$). Daher ist +10p-Veränderungen ein stabilisierender Effekt zuzuschreiben. Tendenziell wird in der Literatur von einem prognostisch günstigen Verhalten bei 10p-Zugewinnen gesprochen (Kunwar et al. 2001). In dieser Arbeit lagen leider lediglich zu zwei Fällen mit dieser Veränderung klinische Daten vor. Die Einzelanalyse ergab, dass diese Patienten aber ebenfalls länger lebten. Verluste an 10p wiederum erwiesen sich in der Einzelanalyse deutlicher als prognostisch ungünstig. Alle Fälle, die im Rezidiv einen Zugewinn an Chromosom 10p aufwiesen, hatten diese Veränderung (soweit entsprechender Tumor zur Analyse vorhanden) bereits im Primarius. Gleiches gilt für die Verluste an 10p und 10q, die ebenfalls im Primärtumor bereits vorlagen.

Als Kandidat auf Proteinebene kommt unter anderem das *Krüppel-like factor 6* (*KLF6*)-Gen, dessen Locus bei 10p15 liegt, in Frage. Es handelt sich dabei um ein Tumorsuppressorgen, das bei zunehmendem Malignitätsgrad bei Astrozytomen häufiger durch Funktionsverlust gekennzeichnet ist (WHO II: 5,5%, WHO III: 7,1%, WHO IV 11,8%, Jeng und Hsu 2003). Dieser Transkriptionsfaktor sorgt p53-unabhängig für ein geringeres Zellwachstum über die Hochregulierung des *cyklinedependent kinase inhibitor p21/WAF/CIP*-Signaltransduktionsweges. Der Funktionsverlust führt somit zu einer gesteigerten mitotischen Aktivität. Funktionszugewinne hemmen diesen und würden sich prognostisch günstig

auswirken (s.o.). Eine andere Untersuchung (Köhler et al. 2004) konnte in 41 GBM jedoch keine *KLF6*-Mutation finden. Die Wertigkeit dieses Locus steht somit noch in Frage. Etwas vielversprechender dagegen sind die Studien von Ichimura und Kollegen (Ichimura et al. 1998), die bei 10p15.3 und 10p15.1-p14 zwei häufig (bis 66% der anaplastischen Astrozytome) deletierte Loci detektierten. Genauere Genprodukte und deren exakte Auswirkung sind derzeit noch nicht ausreichend erforscht.

4.4.2.11 Chromosom 11

Die Untersuchungsergebnisse lieferten keine nennenswerten Aberrationen und Einflüsse auf das Überleben. Deletionen an 11p werden in der Literatur eher jüngeren Patienten zugeschrieben und sollen signifikant häufiger bei AA gegenüber primären (*de novo*) GBM auftreten (Kunwar et al. 2001). Veränderungen an Chromosom 11 sind also als eher zufällige (= tertiäre) Aberrationen zu betrachten.

4.4.2.12 Chromosom 12

Auch an Chromosom 12 lieferte unsere Arbeit keine nennenswerten Aberrationen und Einflüsse auf das Überleben. In der Literatur jedoch sind Amplifikationen an 12q13-14, dem Locus des *CDK4*-Genes, beschrieben. Diese Veränderung führt zu einer funktionellen Inaktivierung des *Rb* (Retinoblastom)-Gens (siehe 4.4.2.13). Amplifikationen in diesem Bereich kommen gehäuft bei Tumoren vor, bei denen das *p53* intakt ist (Reifenberger et al. 1993). Zudem treten die Veränderungen meistens nur dann auf, wenn keine Mutationen am *CDKN2A*-Gen (9p21) vorliegen. Da diese Deletionen an 9p im untersuchten Kollektiv gehäuft auftraten (siehe 4.4.2.9), könnte darin eine Erklärung für die Abwesenheit von 12q-Veränderungen liegen. Wir werten daher in diesem Zusammenhang auftretende Aberrationen an Chromosom 12 als zufällig akquiriert.

4.4.2.13 Chromosom 13

Verluste an 13q, auf dem unter anderem das Retinoblastom (*Rb*) – Gen (13q14) lokalisiert ist, begünstigen einen malignen Progress von niedriggradigen zu

anaplastischen Astrozytomen (Henson et al. 1994). Ungefähr ein Drittel höhergradiger Astrozytome weist diese Veränderungen auf (Louis et al. 2007). Im untersuchten Kollektiv fanden sich entsprechende Aberrationen bei 19,5% der Primärtumore, 33,3% (bzw. 40% mit Trendverlust) der Rezidive WHO-Grad III und 35,7% (bzw. 42,8%) der sekundären GBM.

Das korrelierende pRb-Protein ist entscheidend am Zellzyklusarrest am Übergang in der G1-S-Phase beteiligt. Entsprechender Funktionsverlust bei glialen Tumoren entfernt eine Proliferationshemmung im Zusammenspiel mit anderen Regulatoren wie CDK4 (Chamberlain et al. 2008). Diese Veränderungen treten in der Literatur auch bei primären GBM auf. Mehrere Untersuchungsmodelle zeigten, dass eine alleinige Ausschaltung der Rb-Signaltransduktionskaskade die Zellzykluskontrolle aber noch nicht komplett aufzuheben vermag, so dass weitere Regulationsmechanismen betroffen sein müssen (Furnari et al. 2007). Verluste an 13q sind auch in dieser Arbeit als prognostisch ungünstig zu werten. Ohne Veränderungen ergibt sich beschreibend eine mittlere Überlebenszeit von 86,5 Monaten, während bei reinen Verlusten ein Median von 38 Monaten errechnet wird. Aus unseren Ergebnissen und den Erkenntnissen aus der Literatur kann der Verlust an 13q als sekundäre, den Malignisierungsprozess von WHO-Grad-II- zu WHO-Grad-III-Astrozytomen begünstigende Aberration gewertet werden, welche aber nicht entscheidend zu einem weiteren Schritt der Malignisierung zum WHO-Grad-IV-Tumor beiträgt, und damit zu einer ungünstigen Prognose beitragen würde.

4.4.2.14 Chromosom 14

17,1% der primären Astrozytome WHO-Grad III zeigten Verluste bei 14q. Bei Rezidiven WHO-Grad III traten hier keine Veränderungen auf. 14,3% der sekundären GBM waren durch tendenzielle genetische Verluste an diesem Chromosomenarm gekennzeichnet. Verluste an 14q können aus unseren Ergebnissen also eher als tertiäre Aberrationen gesehen werden.

Dennoch zeigte sich in der Überlebenszeitanalyse, dass Verluste an 14q signifikant prognostisch ungünstig sind. Ohne Veränderungen ergibt sich eine mediane Überlebenszeit von 92 Monaten, während bei Verlusten ein Median von 17 (mit Trendverlusten 14) Monaten errechnet wird. Auf 14q24.3 befindet sich der Locus

des *MutL-homolog-3* (*MLH3*)-Gens, dessen Produkt ein DNA-Mismatch-Repairprotein darstellt. Funktionsverluste ließen sich bereits bei Endometrium- (Taylor et al. 2006) und hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinomen (Korhonen et al. 2007) finden. Auch für Astrozytome sind 14q-Verluste bereits beschrieben (Dichamp et al. 2004). In dieser Studie wurden zwei engere Verlustregionen (14q21.2-14q24.3 und 14q31.3-14q32.1) identifiziert, welche jedoch keine Einflüsse auf die Überlebenszeiten zeigen (Dichamp et al. 2004). Dennoch wurde in der oben genannten Arbeit postuliert, dass es sich bei -14q wahrscheinlich um eine frühe Alteration im malignen Progress handelt, die bei bis zu 20% maligner, insbesondere höhergradiger Gliome auftritt (Dichamp et al. 2004). Diese Veränderung wird vor allem gemeinsam mit 9p- und 10q-Verlusten beobachtet (Debiec-Rychter et al. 1995).

4.4.2.15 Chromosom 15

Die Untersuchungsergebnisse lieferten keine nennenswerten Aberrationen und Einflüsse auf das Überleben. Auch in den CGH-Analysen anderer Studien fanden sich keine Auffälligkeiten. In der neueren high-resolution CGH, die in der Auflösung die ebenfalls verfügbare array-CGH noch nicht erreicht, konnten bereits Verluste auf 15q bei höhergradigen Astrozytomen nachgewiesen werden, die in der herkömmlichen CGH nicht zu detektieren waren (Vranova et al. 2007), so dass zu erwarten ist, dass in der Zukunft auch für dieses Chromosom auf feinmolekularer Ebene Progressionsmarker entdeckt werden können.

4.4.2.16 Chromosom 16

Die Untersuchungsergebnisse lieferten weder eine nennenswerte Anzahl an Aberrationen an Chromosom 16, noch Einflüsse auf das Überleben. Verluste für 16q sind jedoch als typisch für Medulloblastome beschrieben (Michiels et al. 2002). Tumorsuppressorkandidaten an diesem Chromosom wurden bisher nicht identifiziert.

4.4.2.17 Chromosom 17

Überraschenderweise wies nur ein einziger untersuchter Tumor in unserem Kollektiv Verluste bei 17p auf. Diese Aberration ist in der Literatur jedoch vielfach beschrieben (Wessels et al. 2003; Lang et al. 1994), insbesondere als frühes Ereignis im Rahmen der malignen Progression (Louis 1994). Dabei ist oftmals das p53-Gen von der Deletion betroffen, lokalisiert an 17p13.1. Es codiert für ein Protein, das in den Zellzyklus, Reaktion auf DNA-Schädigung, Zelltod und –differenzierung und Gefäßentwicklung involviert ist (Bogler et al. 1995). Allelverluste von 17p und p53-Mutationen finden sich in bis zu zwei Drittel aller Astrozytome WHO-Grad II bis WHO-Grad IV (Louis 1994). Die p53-Inaktivierung spielt daher wohl eine für die Tumorentstehung entscheidende Rolle (Watanabe K et al. 1996). Es wird zudem diskutiert, ob diese Veränderung vielmehr mit einer erhöhten Rezidivhäufigkeit einhergeht als mit einer Transformation zu einem höheren Malignitätsgrad (Watanabe K et al. 1997), zumal sich die p53-Deletion im Gegensatz zur EGFR-Amplifikation eher in jüngeren Patienten findet (Fujisawa et al. 1999). Eine Erklärung, warum in der vorliegenden Arbeit keine 17p-Verluste detektiert wurden, ist vor allem in der angewandten Methode der CGH zu sehen. p53-Mutationen werden alleinig auf feinem, subchromosomalem Level festgestellt, da nur einzelne Exons des entsprechenden Gens betroffen sein können, und das Auflösungsvermögen der CGH nicht fein genug ist. Die Studien, die p53-Veränderungen aufdecken wollten, wählten verschiedene Nachweismethoden, z.B. durch direkte Sequenzierung, oder auch indirekt durch immunhistochemische Darstellung der Proteinexpression (Van Meyel et al. 1994). Ergänzend zu unseren CGH-Analysen hätten hierfür nach aktueller Standardmethode *single-nucleotid polymorphisms (SNP) array* Untersuchungen erfolgen müssen.

In 12,2% der primären anaplastischen Astrozytome fanden wir Zugewinne an 17q, deren Rezidive in ähnlicher Häufigkeit betroffen waren. Die Überlebenszeitanalyse zeigt eine tendenziell günstige Prognose für Zugewinne an 17q. Auf 17q11.2 befindet sich das Neurofibromin-Gen, ein Tumorsuppressor, der typischerweise bei der Neurofibromatose Typ I mutiert ist und negativ auf die *Ras*-Signaltransduktionskaskade einwirkt (Tong et al. 2002). Eine Funktionssteigerung durch genetischen Zugewinn könnte sich daher potentiell positiv auf die Prognose auswirken. Bei 17q21 liegt das in familiär gehäuft vorkommenden Ovarial- und

Mammakarzinom bekannte *BRCA1*-Gen, dessen Produkt ebenfalls ein Tumorsuppressorgen darstellt und sich bei Überexpression ebenfalls prognostisch günstig auswirken könnte (Pal et al. 2005). Entsprechende Einflüsse sind in der Literatur aber bisher nicht beschrieben. In Astrozytomen scheint der Zugewinn an 17q aber eine eher zufällig, weil selten, auftretende tertiäre Aberration zu sein.

4.4.2.18 Chromosom 18

Die Untersuchungsergebnisse lieferten keine nennenswerten Aberrationen und Einflüsse auf das Überleben. Auch die Literaturrecherche ergab kein gehäuftes Auftreten von Aberrationen an Chromosom 18 in AA und deren Rezidiven.

4.4.2.19 Chromosom 19

Bei den primären AA waren 19,5% durch Zugewinne an 19p, 9,8% durch Zugewinne an 19q gekennzeichnet. 35,7% der sekundären GBM offenbarten Zugewinne an 19p, 28,6% an 19q. Bei gleichgradigen Rezidiven traten diese Veränderungen dagegen nur vereinzelt auf. Aus diesem Grund könnten Zugewinne an Chromosomen 19 als Progressionsmarker zum sekundären GBM angesehen werden. Andere Untersuchungen stützen diese These, da Veränderungen an 19p in Form von Zugewinnen bei sekundären GBM signifikant häufiger vorkommen als bei Rezidiven erhaltenen Malignitätsgrades (Kunwar et al. 2001). 19q-Zugewinne scheinen sich zudem prognostisch negativ auswirken zu können (Burton et al. 2002, Kunitz et al. 2007), insbesondere wenn zugleich an 6q oder 10q Verluste auftreten. Auch 19p-Zugewinnen wird ein eher kürzeres Überleben zugeschrieben (Burton et al. 2002). Eine Kombination aus Zugewinnen an 19p und 7 soll eine erhöhte Resistenz gegenüber Radiotherapie zeigen (Huhn et al. 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten dies jedoch nicht bestätigen.

Für 19q-Deletionen siehe 4.4.3

4.4.2.20 Chromosom 20

Bei 20p liegen nach Koschny und Kollegen (Koschny et al. 2002) häufige Zugewinne in Astrozytomen aller WHO-Grade. In dieser Untersuchung bestätigte sich das bei

14,6% der primären anaplastischen Astrozytome, bei 13,3% der Rezidive WHO-Grad III und bei 28,6 % der sekundären GBM. In der durchgeführten Analyse ergaben sich auch Zugewinne an 20q bei 19,5% der Primärtumoren, insbesondere jedoch bei den sekundären GBM mit 28,6%; Rezidivtumoren WHO-Grad III zeigten diese Veränderung jedoch nicht. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der 20q-Zugewinne als sekundäre Aberration und Progressionsmarker behandelt werden (Weber et al. 1996, Burton et al. 2002). Die Kaplan-Meier-Analysen dieser Arbeit lassen allerdings allenfalls eine Tendenz zu kürzeren Überlebenszeiten bei 20q-Zugewinnen erahnen. An 20q13 findet sich das *STK15/BTAK*-Gen, das u.a. bei Urothel- und weiteren Karzinomen verändert ist und für eine Kinase aus der Aurora-Gruppe kodiert (Fraizer et al. 2004). Eine vermehrte Aktivierung dieses Genproduktes führt zu einer verstärkten mitotischen Aktivität und somit zu einem stärkeren Tumorwachstum (Fraizer et al. 2004).

4.4.2.21 Chromosom 21

Unsere Ergebnisse lieferten weder eine nennenswerte Anzahl an Aberrationen an Chromosom 21, noch einen Einfluss auf das Überleben. In der Literatur werden Veränderungen an Chromosom 21 eher im Zusammenhang mit pädiatrischen hochmalignen Astrozytomen (ohne spezifische Onkogen- oder Tumorsuppressorkandidaten) genannt (Rickert et al. 2001), nicht jedoch in der von uns untersuchten adulten Tumorgruppe.

4.4.2.22 Chromosom 22

9,8% der primären anaplastischen Astrozytome (mit Trendverlusten 12,2%) wiesen Verluste an 22q auf, wohingegen nur zwei Rezidivfälle mit WHO-Grad III und nur ein sekundäres GBM diese Aberration aufwiesen. Es ergab sich in der Arbeit jedoch ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben. Über alle Tumoren hinweg lag das mediane Überleben bei Vorhandensein von 22q-Verlusten bei nur 4 Monaten, dagegen bei 92 Monaten ohne Veränderungen an 22q. Verluste an 22q treten typischerweise bei diffusen Astrozytomen WHO-Grad II und im malignen Progress auch bei AA auf (Reifenberger und Collins 2004). Mikrodeletionen werden auch für 22q13.3, den Locus des *tissue inhibitor of metalloproteinases-3* (TIMP-3) berichtet

(Ohgaki und Kleihues 2007). Auch die Inaktivierung durch Promotormethylierung an TIMP-3 ist dort beschrieben. Bei TIMP-3 handelt es sich funktionell um einen Tumorsuppressor, der hemmend beim Übergang von G0 in die S-Phase einwirkt (Wick et al. 1995). Trotz der geringen Anzahl des Auftretens an -22q in unserem Tumorkollektiv muss dieser Veränderung ein nicht-zufälliges Auftreten im Malignisierungsprozess als sekundäre Aberration zugestanden werden.

4.5 Einordnung der chromosomalen Aberrationen (primär/sekundär/tertiär)

In der Entstehung der von uns untersuchten Tumoren spielen der Zeitpunkt und die Art der genetischen Veränderung eine wichtige Rolle. Die durchgeführte Untersuchung zeigte, dass bestimmte Aberrationen zur charakteristischen „Grundausstattung“ der anaplastischen Astrozytome gehören, sogenannte primäre Aberrationen. Die im weiteren Verlauf akquirierten Veränderungen spielen in der malignen Progression eine Rolle (sekundäre Aberrationen), während andere, nicht unbedingt astrozytomtypische, also eher selten auftretende Veränderungen, zufällig entstehen (tertiäre Aberrationen). Diese üben aber unter Umständen ebenfalls ihren Einfluss auf Histologie und Prognose aus. Die sich dahinter möglicherweise verbergenden einzelnen Veränderungen auf Proteinebene wurden im Detail in Kapitel 4.4 dargestellt.

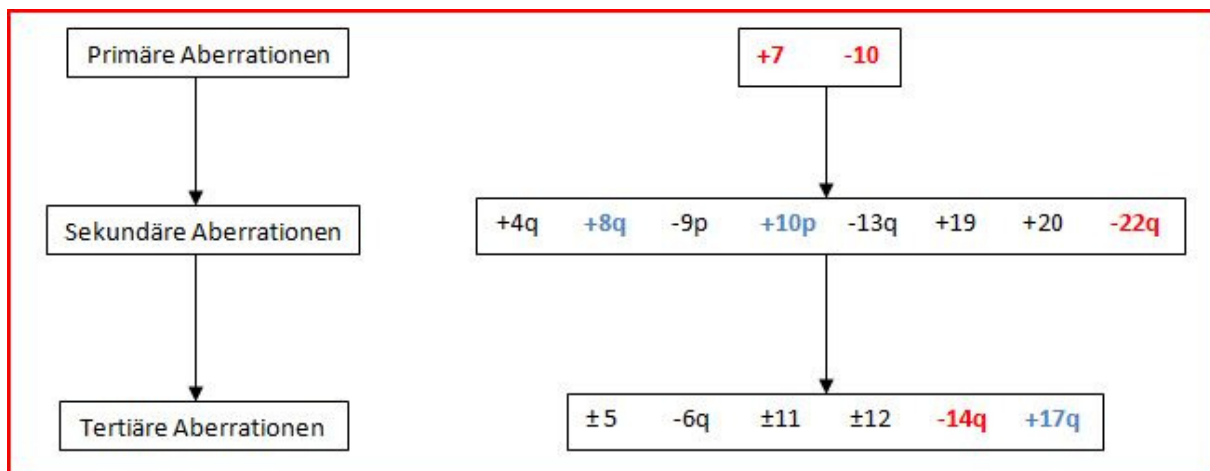


Abb. 4.5/1 Vorschlag zum Auftreten von Primär-, Sekundär- und Tertiäraberrationen in AA und deren Rezidiven. In Rot mit prognostisch ungünstigem und in Blau mit prognostisch günstigem Einfluss auf das Überleben

4.5.1 Astrozytomtypische chromosomale Veränderungen (primäre chromosomale Aberrationen)

Primäre AA weisen häufig bereits eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen auf, ohne dass diese einen Hinweis für das folgende Progressionsverhalten darstellen. Sie gelten daher als frühe Wegbereiter der Tumorgenese von AA. Diese entstehen somit entweder *de novo* oder aus niedriggradigeren Vorläuferläsionen. Dazu zählen

typischerweise Zugewinne an Chromosom 7. Besonders ausgeprägt finden sich 7q-Zugewinne. Darüber hinaus sind Verluste an Chromosom 10 als primäre Aberration zu betrachten. Dort finden sich die häufigsten Gesamtchromosomverluste bei AA.

Der Definition nach sind primäre Aberrationen nicht für den malignen Progress verantwortlich, sondern eng mit der eigentlichen Tumorentstehung vergesellschaftet. Die Abwesenheit dieser für die untersuchte Tumorgruppe typischen Veränderungen in den einzelnen Fällen wies in der vorliegenden Arbeit prognostisch günstige Effekte bezüglich Histologie und Überleben auf. Im Gegensatz dazu neigten insbesondere Tumoren mit +7p- und -10q-Veränderungen im Rezidivfall histologisch eher zum Auftreten als sekundäres GBM.

4.5.2 Tumorprogressionstypische chromosomale Veränderungen (sekundäre chromosomale Aberrationen)

Im Wachstumsverlauf akquirieren die primären anaplastischen Astrozytome weitere tumorspezifische Veränderungen. Diese sekundären Aberrationen können unterschiedliche Einflüsse auf das histologische Verhalten und die Prognose ausüben. Es konnte gezeigt werden, dass 4q-Zugewinne mit möglicher PDGFR-Überexpression eine Rolle in der histologischen Malignisierung spielen. Unsere Untersuchungen ergaben zudem, dass 8q-Zugewinne im Verlauf häufig auftraten und sich histologisch eher stabilisierend und in dieser Arbeit prognostisch günstig auswirken.

Verluste an 9p, eine der häufigsten Veränderungen bei AA, sind als sekundäre Aberration anzusehen. Das Tumorsuppressorgen p16, dessen Locus bei 9p21 liegt, wirkt bei Funktionsverlust enthemmend auf den Rb-Signalweg ein. Da sich das Auftreten bei rezidierten AA und sekundären GBM nicht unterschied, handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um einen frühen Progressionsmarker bzw. spielt es eher eine Rolle in der Tumorgenese ohne Einfluss auf histologischen Progress und Prognose.

Zugewinne an 10p, konträr zu genetischen Verlusten an diesem Chromosom, gelten als sekundäre Aberration mit histologisch stabilisierendem Einfluss und gehen mit längeren Überlebenszeiten einher.

Verluste an 13q und die damit über die Rb-Inaktivierung ausgeschaltete Proliferationshemmung sind Wegbereiter der Progression aus niedriggradigeren Vorstufen. Der weiterführende Schritt zum WHO-IV-Tumor wird dieser sekundären Aberration in unseren Untersuchungen jedoch nicht zugeschrieben. Allerdings ergeben sich -13q assoziiert kürzere Überlebenszeiten.

Im Verlauf und histologischem Progress durchaus häufiger zu finden waren zudem Zugewinne an Chromosom 19 und 20 ohne die Überlebenszeiten signifikant zu verändern. Diese sekundären Aberrationen sind jedoch für die zunehmende Malignisierung typisch.

Vergleichbares gilt für das nicht-zufällige Auftreten von 22q-Verlusten, wo unter anderem der *tissue inhibitor of metalloproteinases-3* (TIMP-3) involviert ist. Hier zeigen sich jedoch prognostische Nachteile.

4.5.3 Zufällig akquirierte chromosomale Veränderungen (tertiäre chromosomale Aberrationen)

Veränderungen, die im Verlauf zufällig und nicht gehäuft, also nicht zwangsläufig astrozytomtypisch, auftreten, gelten als tertiäre Aberrationen. Diese können sich ebenfalls prognostisch und histologisch unterschiedlich auswirken. Ohne prädiktive Aussagekraft waren folgende Veränderungen an Chromosom 2q, 4q, 5, 6q, 11 und 12 aufgetreten. Prognostisch günstig wirkten sich 17q-Zugewinne aus. Entsprechend umgekehrt verhält es sich bei 14q-Verlusten, hinter denen sich DNA-Mismatch-Repairproteine-defekte (z.B. MLH3) verbergen können und so die Entdifferenzierung begünstigen. 14q-Verluste waren mit kürzeren Überlebenszeiten verbunden.

4.6 Das Tumorprogressionsmodell primärer anaplastischer Astrozytome und deren Rezidive

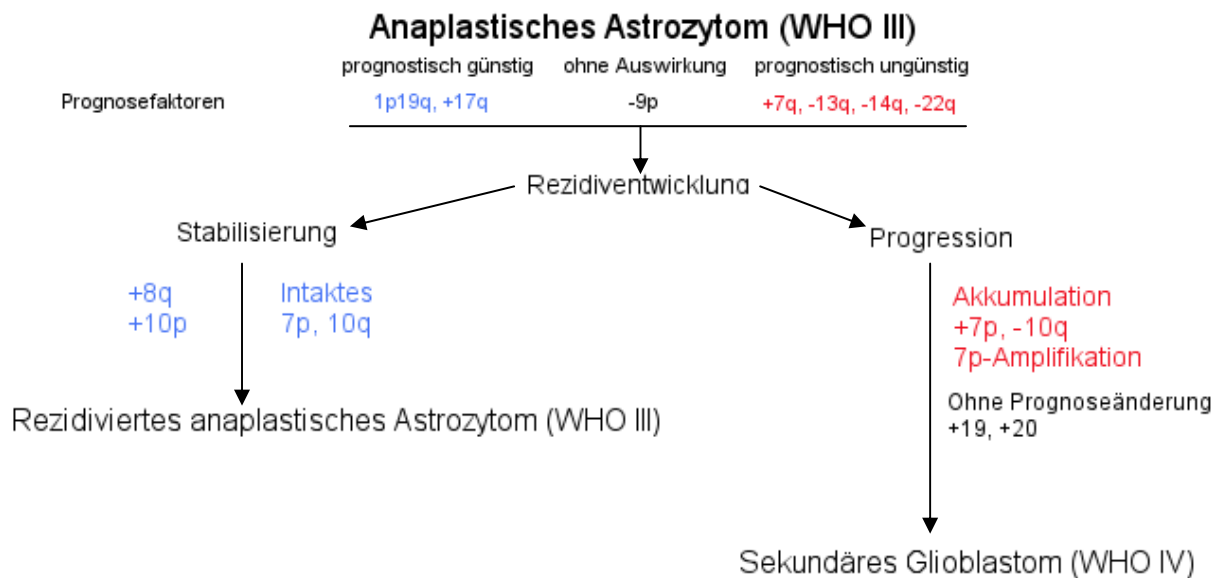


Abb. 4.6/1 Tumorprogressionsmodell auf Basis der Untersuchungsergebnisse (In Rot Veränderungen mit prognostisch negativem, in Blau mit prognostisch günstigem Einfluss auf das Überleben)

Die Untersuchungsergebnisse führten zur Entwicklung des oben dargestellten Tumorprogressionsmodells. Es gibt Veränderungen, die Einfluss auf die Histologie in Form einer Stabilisierung des WHO-Grades geben, und andere, die eine histologische Progression zum sekundären GBM nach sich ziehen. Zudem sind bestimmte Aberrationen mit längeren bzw. kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. Zwischen sich histologisch auswirkenden chromosomalen Veränderungen und Einflüssen auf die Überlebenszeit bestehen häufig Überlappungen. Die prognostische Bedeutung hinsichtlich des Überlebens wurde detailliert im Kapitel 4.4 diskutiert. Es folgt die Erläuterung der chromosomalen Aberrationen in Bezug auf ihre Einflussnahme im Hinblick auf das histologische Erscheinungsbild im Rezidivfall.

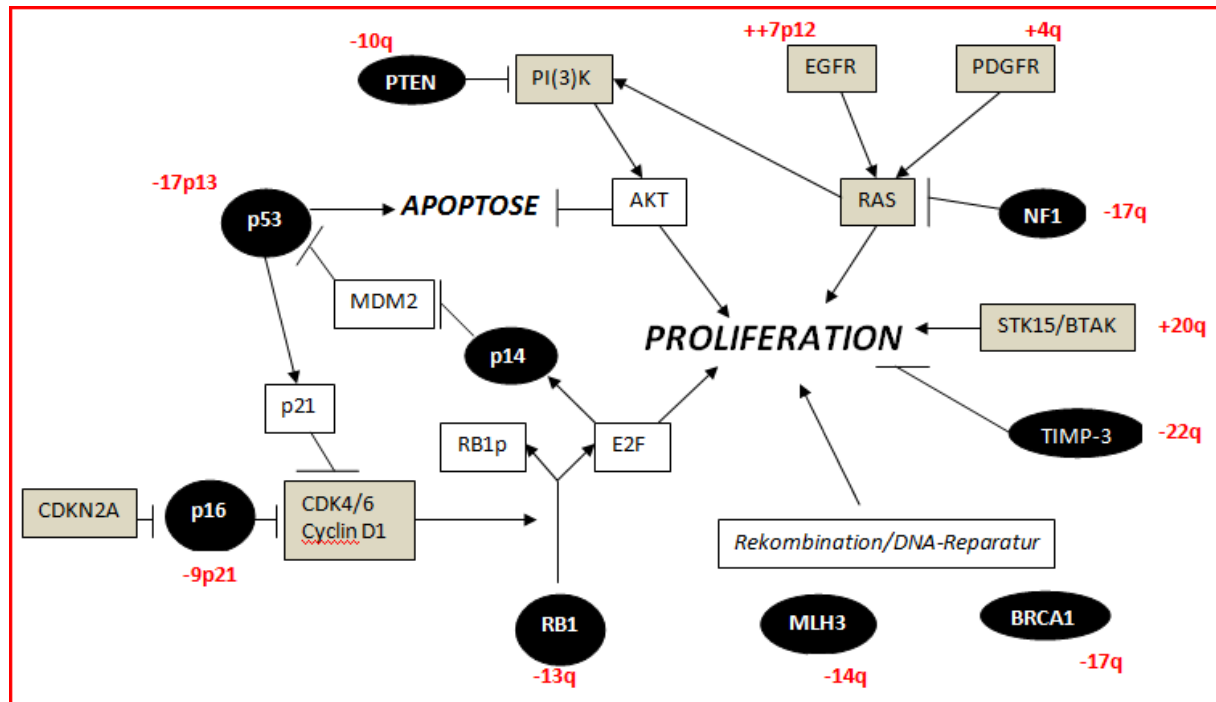


Abb. 4.6/2 Vereinfachte Darstellung der wichtigsten veränderten Signaltransduktionswege höhergradiger Astrozytome; Schwarze Ellipsen stellen Tumorsuppressorgene da, graue Kästen Onkogene bzw. Genprodukte mit proliferationsförderndem Einfluss; in Rot die korrelierenden potentiell negativen Chromosomenaberrationen (verändert nach Kanu et al. 2009)

4.6.1 Stabilisierungseffekt chromosomaler Veränderungen rezidivierender anaplastischer Astrozytome

Interessanterweise treten bei rezidivierten AA bestimmte genetische Aberrationen vermehrt auf, die einen stabilisierenden Einfluss auf die Histologie ausüben. An erster Stelle sind Zugewinne an 10p zu nennen, die im malignen Progress zu sekundären GBM signifikant seltener auftreten. Es ist also zu vermuten, dass durch den Zugewinn bestimmte Faktoren überexprimiert werden, die einen hemmenden Einfluss auf die fortschreitende Malignisierung ausüben. Genaue Genprodukte zweier Kandidatenloci für Tumorsuppressorgene (10p15.3 und 10p15.1-p14) sind bisher nicht zu erfassen gewesen (Ichimura et al. 1998). Die Bedeutung des KLF6 als Tumorsuppressorgen bei Gliomen ist zum aktuellen Kenntnisstand als fragwürdig einzustufen (Köhler et al. 2004).

Entscheidend jedoch ist zu erkennen, dass Primärtumoren, die ein intaktes 7p und 10q aufweisen, ihren histologischen Grad im Rezidiv häufiger beibehalten. Die Abwesenheit von Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen an diesen Chromosomenarmen führt in der Folge also zu einem stabileren histologischen Verhalten.

Auch 8q-Zugewinne wirken sich stabilisierend auf die Histologie im Rezidiv aus. Ein molekularer Nachweis korrelierender Proteine, die am Zellzyklus beteiligt sind, ist bisher nicht gelungen.

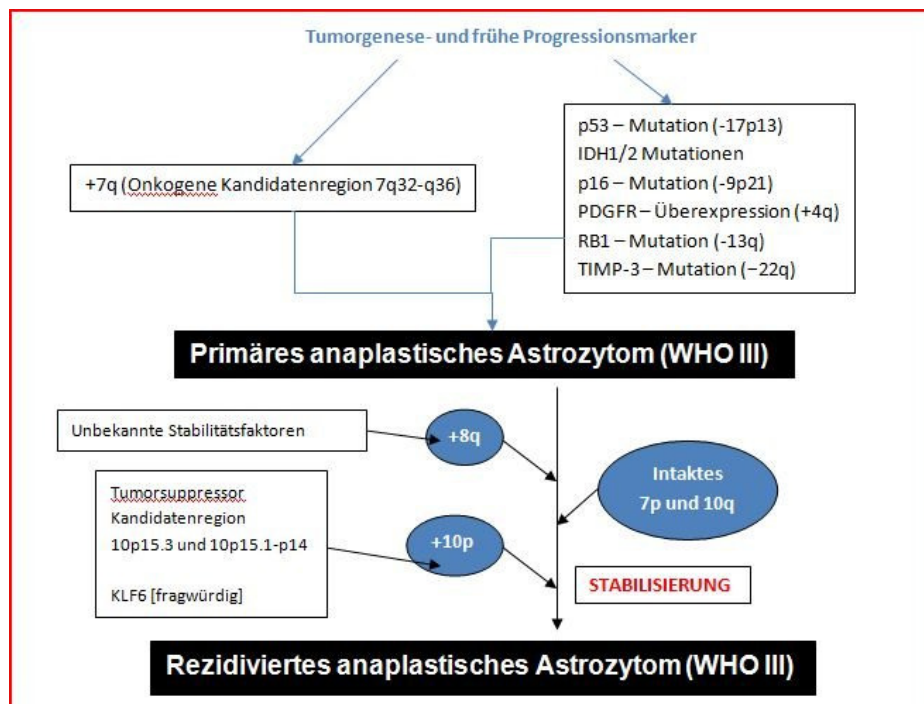


Abb. 4.6.1/1 Stabilisierung im Rezidivfall anaplastischer Astrozytome mit den beteiligten Chromosomen und Genen

4.6.2 Chromosomale Veränderungen sekundärer Glioblastome (Maligner Progress)

Sekundäre GBM sind Tumoren von höchster Malignität und sind mit einer der schlechtesten Prognosen menschlicher Tumoren überhaupt verbunden. Zudem stellen sie sowohl histologisch als auch molekulargenetisch den Endpunkt malignen Progresses astrozytärer Neoplasien dar. Auf dem Weg vom niedriggradigen

Astrozytom zum sekundären GBM kommt es zur Akkumulation bestimmter Aberrationen.

Von immenser Bedeutung sind 10q-Verluste und 7p-Zugewinne. Der bekannteste Vertreter auf Proteinbasis für 10q-Verluste ist das Tumorsuppressorgenprodukt des PTEN-Gens, dessen Inaktivierung eine verstärkte Angiogenese zur Folge hat und sich so deutlich auf die Invasivität des Tumors auswirkt. Da dieses Gen jedoch nur in 25% der Fälle von GBM verändert ist, jedoch gut 60% der Tumoren 10q-Verluste aufweisen, ist davon auszugehen, dass weitere Tumorsuppressorgene auf dem langen Arm von Chromosom 10 kodiert werden.

Da bei 7p-Zugewinnen häufig der gesamte Arm des Chromosoms verändert ist, spricht dies für das Vorhandensein zahlreicher Onkogene in diesem Bereich, die Einfluss auf den malignen Progress nehmen. Bekannt ist der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR, der bei sekundären GBM häufig, in dieser Untersuchung in 21,5% der Fälle, amplifiziert ist. Die Hochregulierung dieses Wachstumsfaktors gilt als spätes Progressionszeichen bzw. als hochmaligne.

Primärtumoren, die bereits Zugewinne an Chromosom 19 und/oder 20 aufweisen, haben ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines sekundären GBM im Rezidiv. Zugewinne an 19p und 19q legen daher nahe, dass sich auf diesem Chromosom eine Reihe von Onkogenen befinden muss. Korrelate auf Proteinebene sind noch nicht identifiziert. Gestützt wird dies durch die länger bekannte günstige Prognose von 19q-Deletionen durch Inaktivierung eben jener potentieller Onkogene. Als möglicherweise beteiligt an 20q-Zugewinnen gilt das *STK15/BTAK*-Gen, dessen Überexpression zu einer vermehrten Kinaseaktivität führt, die die Mitose anregt.

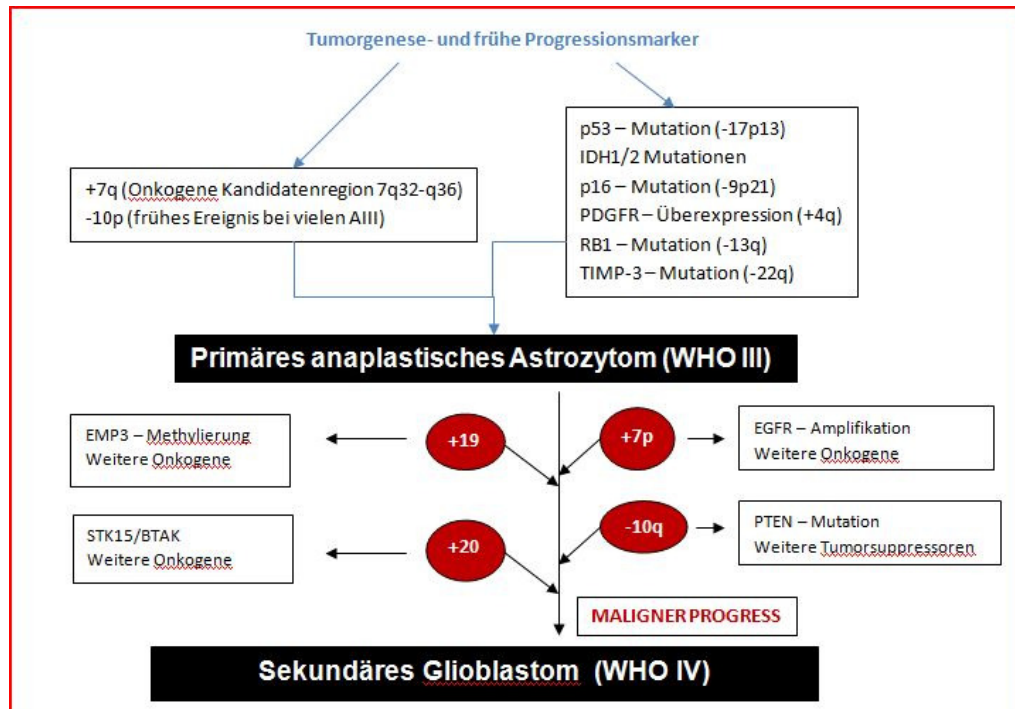


Abb. 4.6.2/1 Übersicht: Maligne Progression von AA zum sekundären GBM

4.7 Wechselseitiger Einfluss von Therapien und Molekulargenetik auf Überlebenszeiten bzw. Therapieansprechen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Berechnungen therapeutischen Einflusses auf die Genetik bei Rezidivtumoren ergaben aufgrund der niedrigen Anzahl kompletierter klinischer Daten pro Rezidiv keine aussagekräftigen Hinweise auf eine prognostische Bedeutsamkeit.

In der Literatur länger bekannt und anerkannt ist ein positiver Einfluss bei heruntergesetzter Funktion des MGMT-Gens. Durch Promotormethylierung dieses DNA-Reparaturenzyms wird seine Expression in der Tumorzelle herabgesetzt und die Effektivität der Chemotherapie, besonders unter Alkylanzien wie Temozolomid, konsekutiv verstärkt (Esteller et al. 2000, Hegi et al. 2005). Die Hypermethylierung selbst gilt schon als positiver Marker längeren Überlebens (Krex et al. 2007). Eine Studie postuliert einen prädiktiven Wert auf Chemosensitivität durch Messung der MGMT-Promotormethylierung im Serum des Patienten (Balana et al. 2003).

4.8 Kritische Beurteilung der Untersuchung

Die in dieser Studie genutzte CGH ist bereits seit Anfang der 90er Jahre nach Einführung durch Kallioniemi (Kallioniemi A et al. 1992) in klinischem Gebrauch. Es handelt sich um eine Methode, die genetische Zugewinne und Verluste auf Chromosomenebene darzustellen vermag. Das Auflösungsvermögen ist daher beschränkt und dient lediglich zur globalen Exploration molekulargenetischer Aberrationen. Um sich einen Überblick über chromosomale Veränderungen der einzelnen Tumoren zu verschaffen, wie in dieser Arbeit angestrebt, ist die CGH jedoch gut geeignet. Das aktuelle Verfahren der Wahl zur Aufdeckung subchromosomaler Veränderungen, die der CGH entgehen, bis hin zu Mutationsnachweisen in sehr kleinen Basenfolgen, ist die hochauflösende Microarray-Methode. Dieses Messverfahren ist jedoch deutlich teurer als die CGH.

Es ergeben sich in dieser Arbeit Probleme in der Aussagekraft bezüglich des malignen Progresses, da bei sieben rezidierten AA und sechs sekundären GBM die Primärtumoren nicht analysiert werden konnten. Ursachen lagen einerseits im technischen Misslingen der durchgeführten CGH, andererseits war zum Teil kein ausreichendes Tumormaterial an der paraffineingebetteten Probe vorhanden. Insbesondere die Bewertung von im Progress hinzugekommenen Veränderungen zieht dadurch Schwierigkeiten nach sich.

Darüber hinaus erschwerend in der Interpretation der chromosomalen Aberrationen im Rezidivfalle sind die nicht einzuschätzenden Einflüsse der adjuvanten Therapie, vor allem der Bestrahlung, auf die genomischen Veränderungen innerhalb des Tumors. Da AA standardmäßig eine Radiatio erhalten, können formell neuropathologisch gesehen die Rezidivtumoren keinen WHO-Grad zugesprochen bekommen. Veränderungen, insbesondere Nekrosen, können eine alleinige Folge der Bestrahlung sein und somit histologisch nicht als Grad-IV-Kriterium herangezogen werden. Anders hingegen sieht es bei Endothelproliferaten aus. Diese sind auch nach Bestrahlung typisch für GBM, denn unter Radiatio tritt histologisch eine Adventitia-Proliferation (und Sklerosierung) auf. Kritisch muss also die histologische Diagnosestellung gewertet werden, auf deren neuropathologische Korrektheit wir uns verließen.

Die insgesamt verhältnismäßig geringe Tumoranzahl erlaubt häufig nur beschreibende Aussagen zu tätigen. Darin liegt wahrscheinlich einer der größten Schwachpunkte der vorliegenden Arbeit. Da es sich um eine universitätsinterne Studie handelte, zu der zusätzlich lediglich zwei kleine externe Tumorarchive in Oldenburg und Berlin rekrutiert werden konnten, und histologisch gesicherte Rezidive anaplastischer Astrozytome eher selten sind, ergibt sich gegenüber anderen Kollektiven häufiger auftretender Tumoren eine vergleichsweise niedrige Fallzahl. Wie viele andere Studien dieser Art muss man sich klarmachen, dass es sich lediglich um eine retrospektive Analyse handelt, die auf insgesamt recht kleinen Kohorten der insgesamt nur drei klinischen Institute basiert.

Darüber hinaus konnte durch fehlende Rückantwort der beteiligten Hausärzte und Patienten nur ein inkomplettes Follow-up gewonnen werden. Die fehlenden klinischen Angaben erschwerten die Auswertungen der Überlebenszeiten, so dass man sich diesbezüglich auf ein noch kleineres Kollektiv beschränken musste und somit die einzelnen Problem relativ gesehen stärker ins Gewicht fielen. Auch die zum Teil sehr heterogenen Ergebnisse in den genetischen Untersuchungen erklären sich dadurch in gewisser Weise. Ursächlich ist auch hier das retrospektive Design der Untersuchung. Bei einer prospektiven Studie hätten die benötigten Daten im Verlauf kontinuierlich erfasst werden können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die durchgeführte Untersuchungsreihe demonstrierte anschaulich den Nutzen der CGH, wiederkehrende genetische Veränderungen an AA und ihren Rezidiven zu ermitteln, die Loci potentieller und bereits bekannter Tumorsuppressorgene und Onkogene darstellen. Diese wiederum halfen, das in dieser Arbeit entwickelte Tumorprogressionsmodell zu erarbeiten.

Es konnte in Einklang mit zuvor durchgeführten Studien gezeigt werden, dass Zugewinne an Chromosom 7 und Verluste an Chromosom 10 typische Primäraberrationen anaplastischer Astrozytome darstellen und mit eher kurzen Überlebenszeiten einhergehen.

Verluste an 9p waren häufige Sekundäraberrationen, ohne sich auf Histologie oder Überlebenszeit auszuwirken. Wiederum Zugewinne an Chromosom 19 und 20 konnten als Sekundäraberrationen mit Tendenz zur histologischen Progression ermittelt werden, während 10p- und 8q-Zugewinne eher eine histologische Stabilisierung nach sich zogen.

Sekundäraberrationen wie 22q- und 13q-Verluste waren mit kürzerem Überleben assoziiert.

Die in dieser wie in anderen Arbeiten aufgedeckten diagnostischen und prognostischen Marker haben bisher keinen oder nur geringen Eingang in Routinediagnostik und klinische Protokolle gefunden. Weitere Analysen genetischer und epigenetischer Pathologien sowie die Identifizierung molekulargenetischer Subtypen werden helfen, in der Zukunft noch bessere Aussagen bezüglich Diagnose, Gradierung und Klassifikation zu treffen. Vor allem jedoch bleibt zu hoffen, dadurch angemessene spezifische Behandlungsmethoden für Tumoren unterschiedlicher genetischer Profile der astrozytären Zelllinie entwickeln zu können.

6 Anhang

Die folgende Tabelle gibt Übersicht über die gesammelten klinischen Daten. Bei leeren Zellen waren keine Angaben zu ermitteln.

Tabelle 6/1 Übersicht klinische Daten

Patientennr	Geschlecht	Alter bei ED (in Jahren)	Gestorben zum letzten follow-up-Zeitpunkt	Überlebenszeit in Monaten	Präop. Karnofskyscore in Prozent	Radiatio	Chemotherapie1	Chemotherapie2
1	M	78	Ja	3	90	Ja		
2	M	76	Ja	3	80	Ja		
3	M	72	Ja	0	20			
4	M	75	Ja	4	80			
5	M	66	Ja	7	80	Ja	PCV	
6	M	67	Nein	56	80	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
7	W	60	Ja	44	90	Ja	PCV	
8	W	49	Ja	148	90	Ja		
9	M	60	Ja	22	80	Ja	PCV	
10	W	60	Nein	120	90	Ja		
11	M	59	Nein	117		Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
12	W	65	Ja	16	50	Ja		
13	M	65	Nein	45	60	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
14	M	58						
15	W	56	Ja	6	70	Ja		
16	M	53						
17	M	55						
18	W	52	Nein	93	90	Ja	PCV	Temozolomid (Tag 1-5/28)
19	M	52	Nein	70	80	Ja	PCV	
20	M	48	Ja	17	30	Ja	PCV	Temozolomid (Tag 1-5/28)
21	W	50	Ja	14	80	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
22	M	37	Ja	104	90	Ja		
23	W	47	Ja	33	60	Ja	PCV	Temozolomid (Tag 1-5/28)
24	M	43	Ja	39	90	Ja		
25	W	43	Nein	56	90	Ja		
26	M	43						
27	M	42	Ja	14	80	Ja	Temozolomid konkomitant	
28	M	36	Nein					
29	M	29	Ja	97	100	Ja		
30	M	38						
31	M	24	Nein	97		Ja	BCNU	
32	M	37						
33	W	34	Nein	90	90	Ja		
34	W	36	Nein	55	90	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
35	M	28						
36	W	29	Nein	95	90	Ja	PCV	
37	M	33						
38	W	32						
39	W	19	Nein	125	90		BCNU	
40	M	22	Nein	57	80			
41	W	25	Nein	27	90	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
42	W	66						
43	W							
44	M							
45	M	58	Ja	38	60	Ja	PCV	Temozolomid (Tag 1-5/28)
46	M	56						
47	W	42	Ja	92	90	Ja	ACNU	
48	W	39						
49	M							
50	M	29	Ja	37	60	Ja	PCV	Temozolomid (Tag 1-5/28)
51	W	23	Ja	41	80	Ja	Temozolomid konkomitant	Temozolomid (Tag 1-5/28)
52	W	41	Nein	143	90	Ja	ACNU	ACNU
53	M							
54	W							
55	W							

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die CGH-Veränderungen bei den Primärtumoren anaplastischer Astrozytome

Tabelle 6/2 Übersicht CGH bei Primärtumoren ([+] Zugewinn, [-] Verlust, [++] Amplifikation)

Patienten nnr.	Gesamtzahl Aberrationen	Zugewinne	Verluste	Amplifikationen	Detailveränderungen
1	7	2	4	1	+7p, +7q, -10p, -10q, -14q, -22q, ++7p
2	11	5	4	2	+5p, +5q, +7p, +7q, +9q, -9p, -10p, -10q, -22q, ++7p, ++7q
3	5	2	3	0	+11q, +21q, -13q, -18p, -18q
4	6	2	4	0	+7p, +7q, -10p, -10q, -14q, -22q
5	5	2	3	0	+7p, +7q, -10p, -10q, -22q
6	11	4	7	0	+1q, +7p, +7q, +11q, -6q, -9p, -10p, -10q, -14q, -15q, -16q
7	15	9	6	0	+7p, +7q, +16p, +16q, +17q, +19p, +19q, +20p, +20q, -3p, -6q, -10p, -10q, -11q, -13q
8	3	1	2	0	+17q, -1p, -19q
9	7	3	4	0	+7p, +7q, +12q, -10p, -10q, -13q, -14q
10	11	4	6	1	+19p, +19q, +20p, +20q, -1q, -6p, -6q, -9p, -10p, -10q, ++7p
11	6	3	3	0	+7p, +7q, +21q, -9p, -10p, -10q
12	0	0	0	0	keine
13	4	1	3	0	+17q, -1p, -2q, -19q
14	28	16	12	0	+1q, +2p, +3p, +4p, +4q, +7p, +7q, +8q, +9p, +9q, +10p, +16p, +18q, +19p, +20q, +21q, -1p, -2q, -3q, -4q, -5p, -5q, -8p, -8q, -9p, -10q, -14q, -19q
15	14	7	6	1	+1p, +1q, +7p, +7q, +17p, +20p, +20q, -4p, -4q, -9p, -10p, -10q, -13q, ++7p
16	13	7	6	0	+7p, +7q, +9q, +19p, +19q, +20p, +20q, -6q, -9p, -10p, -10q, -13q, -15q
17	1	1	0	0	+8q
18	12	6	2	4	+7p, +7q, +8p, +8q, +15q, +18p, -3p, -11p, ++10p, ++12p, ++17q, ++18q
19	1	0	1	0	-6q
20	10	5	4	1	+4q, +7p, +7q, +20p, +20q, -10p, -10q, -14q, -15q, ++7p
21	4	0	3	1	-4q, -5q, -13q, ++9p
22	5	3	2	0	+7q, +17q, +19p, -9p, -Xp
23	7	3	2	2	+7p, +7q, +20q, -9p, -10q, ++1q, ++7p
24	5	2	3	0	+7q, +12p, -1q, -2q, -9p
25	1	1	0	0	+7q
26	7	2	5	0	+7q, +9q, -1p, -3p, -3q, -4q, -19q
27	6	3	3	0	+1q, +7p, +7q, -10q, -14q, -15q
28	5	2	3	0	+7q, +17q, -8q, -9p, -10q
29	4	1	3	0	+19p, -6q, -9p, -13q
30	13	6	6	1	+3p, +7p, +7q, +19p, +20p, +20q, -2q, -9q, -10p, -10q, -18p, -18q, ++7p
31	4	3	1	0	+7q, +8q, +10p, -1q
32	13	6	7	0	+3p, +4p, +4q, +6p, +9q, -3q, -5p, -5q, -6q, -10q, -18p, -18q
33	1	1	0	0	+7q
34	3	3	0	0	+7q, +8q, +10p
35	4	0	4	0	-1p, -3p, -4q, -22q
36	15	6	8	1	+3p, +7q, +8q, +12p, +17p, +17q, -1p, -3p, -4q, -5p, -12q, -20q, -Xp, -Xq, ++8q
37	4	1	3	0	+12p, -3p, -11p, -14q
38	4	2	2	0	+9p, +9q, -3p, -13q
39	1	1	0	0	+10p
40	2	2	0	0	+8p, +8q
41	10	4	5	1	+19p, +19q, +20p, +20q, -1q, -9p, -10p, -10q, ++7p

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die CGH-Veränderungen bei rezidierten AA und sekundären GBM.

Tabelle 6/3 Übersicht CGH bei rezidierten AA

Patientennr.	Rezidivnr	Gesamtzahl Aberrationen	Zugewinne	Verluste	Amplifikationen	Detailveränderungen
17	1	3	2	1	0	+3p, +8q, -9p
22	1	4	3	1	0	+7q, +17q, +19p, -9p
22	2	4	3	1	0	+7q, +17q, +19p, -13q
29	1	4	1	3	0	+20p, -6q, -13q, -19q
31	1	9	4	5	0	+3p, +7q, +8q, +10p, -1p, -1q, -3p, -5p, -13q
31	2	7	5	2	0	+4p, +7q, +8q, +10p, +20q, -9p, -13q
33	1	16	5	11	0	+1q, +7q, +8q, +11q, +19p, -1q, -2q, -5q, -8p, -9p, -9q, -11p, -16p, -16q, -18q, -Xp
35	1	5	2	3	0	+4q, +10p, -1p, -19q, -22q
Kein Primarius:						
44	1	3	2	1	0	+7q +11q, -5p
45	1	10	5	5	0	+6p, +6q, +7p, +7q, +20p, -2p, -10p, -10q, -13q, -22q
49	1	9	4	5	0	+10p, +12p, +15q, +22q, -1p, -4q, -5p, -9p, -19q
51	1	1	0	1	0	-11p
52	1	3	2	1	0	+7q, +8q, -13q
54	1	0	0	0	0	Keine
55	1	0	0	0	0	Keine

Tabelle 6/4 Übersicht CGH bei sekundären GBM

Patientennr.	Rezidivnr	Gesamtzahl Aberrationen	Zugewinne	Verluste	Amplifikationen	Detailveränderungen
7	1	8	2	6	0	+7p, +7q, -10p, -10q, -14q, -22q, -Xp, -Xq
7	2	16	10	5	1	+1p, +7p, +7q, +11p, +16p, +17q, +19p, +19q, +20p, +20q, -3p, -10p, -10q, -11q, -13q, ++7p
16	1	13	7	6	0	+7p, +7q, +9q, +19p, +19q, +20p, +20q, -6q, -9p, -10p, -10q, -13q, -15q
28	1	9	2	7	0	+7q, +17q, -1q, -8q, -9p, -9q, -10q, -14q, -Xq
30	1	12	7	4	1	+3p, +7p, +7q, +19p, +19q, +20p, +20q, -2q, -9q, -10p, -10q, ++7p
31	3	10	6	4	0	+4p, +5p, +7q, +8q, +10p, +19p, -1q, -3p, -4q, -13q
Kein Primarius:						
37	1	8	4	4	0	+7p, +7q, +19p, +19q, -9p, -10p, -10q, -20p
42	1	5	1	4	0	+6p, -10p, -10q, -13p, -13q
44	1	5	2	3	0	+7p, +7q, -8q, -10p, -10q
46	1	0	0	0	0	Keine
47	1	18	9	8	1	+2p, +4q, +7q, +8p, +8q, +11q, +12p, +20p, +20q, -3q, -4q, -9p, -11p, -13q, -17p, -18p, -18q, ++7q
48	1	3	0	2	1	-10p, -10q, ++7p
50	1	9	2	7	0	+4q, +5p, -2q, -4q, -5q, -6q, -13q, -18p, -18q
53	1	2	2	0	0	+7p, +7q

7 Literaturverzeichnis

Alaminos M, Davalos V, Ropero S, Setien F, Paz MF, Herranz M, Frage MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL et al. (2005):

EMP3, a Myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* 65, 2565-2571.

Balana C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, Sarries C, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R (2003):

O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1:3-bis (2-chloro-ethyl)-1-nitrosourea but not to temozolomide plus cisplatin in glioblastome multiforme. *Clin Cancer Res* 9, 1461-1468.

Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD (1999):

Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155, 375-386.

Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995):

The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15, 308-327.

Brandes AA, Ermani M, Basso U, Amista P, Berti F, Scienza R, Rotilio A, Pinna G, Gardiman M, Monfardini S (2001):

Temozolomide as a second-line systemic regimen in recurrent high-grade glioma: A phase II study. *Ann Oncol* 12, 255-257.

Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, Prados M, Scott J, Forsyth P, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD (2002):

Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* 62, 6205-6210.

Chamberlain MC, Chowdhary SA, Glantz MJ (2008):

Anaplastic astrocytoma: a review of biology and treatment. *Expert Rev Neurother* 8(4), 575-586.

Chang SM, Theodosopoulos P, Lamborn K, Malec M, Rabbitt J, Page M, Prados MD (2004): Temozolomide in the Treatment of Recurrent Malignant Glioma.

Cancer 100(3), 605-611.

Debiec-Rychter M, Alwasiak J, Liberski PP, Nedoszytko B, Babinska M, Mrozek K, Imielinski B, Borowska-Lehman J, Limon J (1995):

Accumulation of chromosomal changes in human glioma progression. A cytogenetic study of 50 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 85(1), 61-67.

Dichamp C, Taillibert S, Aquirre-Cruz L, Lejeune J, Marie Y, Kujas M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M (2004):

Loss of 14q chromosome in oligodendroglial and astrocytic tumors. *J Neurooncol* 67(3), 281-285.

Esteller M, Garcia-Fontillas J, Andion E (2000):

Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343, 1350-1354.

Fraizer GC, Diaz MF, Lee IL, Grossman HB, Sen S (2004):

Aurora-A/STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells. *Int J Oncol* 25(6), 1631-1639.

Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM (1999):

Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 155, 387-394.

Fung JM, Smith R, Brown MA, Lau SH, Xie D, Lau GK, Guan XY (2009):

Identification and characterization of a novel melanoma tumor suppressor gene on human chromosome 6q21. *Clin Cancer Res* 15(3), 797-803.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, et al. (2007):

Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.

Gleixner C, Müller M, Wirth S:

Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis, 5. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach 2007

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason WP, Mariani L, et al. (2005):

MGMT gene silencing and response to temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997–1003.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN (1994):

The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 36, 714-721.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Helden CH, Westermark B, Nister M (1992):

Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52, 3213-3219.

Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M (1996):

Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res* 56, 164-171.

Holland H, Koschny T, Ahnert P, Meixensberger J, Koschny R (2010):

WHO grade-specific comparative genomic hybridization pattern of astrocytoma – a meta-analysis. *Pathol Res Pract* 206(10), 663-668.

Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillevin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbaih A, Laigle-Donadey F, et al. (2010):

IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 75(17), 1560-1566.

Huhn SL, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn KR, Prados MD, Feuerstein BG (1999): Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome. *Clin Cancer Res* 5, 1435-1443.

Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP (1998):

Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 9–15.

Jeng YM und Hsu HC (2003):

KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 105, 625-629.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992):

Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993):

Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Cancer Biol* 4, 41-46.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994):

Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10(4), 231-43.

Kanno H, Shuin T, Kondo K, Yamamoto I, Ito S, Shinonaga M, Yoshida M, Yao M (1997):

Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and loss of heterozygosity on chromosome 3p in human glial tumors. *Cancer Res* 57(6), 1035-1038.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C (2009):

Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clin Med Oncol* 3, 39-52.

Kim WY, Kaelin WG (2004):

Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22(24), 4991-5004.

Kleihues P, Cavenee WK:

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon, Frankreich 2000.

Köhler B, Wolter M, Blaschke B, Reifenberger G (2004):

Absence of mutations in the putative tumor suppressor gene KLF6 in glioblastomas and meningiomas. *Int J Cancer* 111(4), 644-645.

Korhonen MK, Raevaara TE, Lohi H, Nyström M (2007):

Conditional nuclear localization of hMLH3 suggests a minor activity in mismatch repair and supports its role as a low-risk gene in HNPCC. *Oncol Rep* 17(2), 351-354.

Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA (2002):

Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 135, 147-159.

Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, et al. (2007):

Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 2596-2606.

Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, Felsberg J, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel M, Lichter P, Reifenberger G, et al. (2007):

DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in human gliomas. *Brain Pathol* 17, 363-370.

Kunwar S, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn KR, Prados M, Feuerstein BG (2001):

Genetic subgroups of anaplastic astrocytoma correlate with patient age and survival. *Cancer Res* 61, 7683–7688.

Labussiere M, Wang XW, Idbaih A, Ducray F, Sanson M (2010):

Prognostic markers in gliomas. *Future Oncol* 6(5), 733-739.

Lacroix M, Abi-Said D, Fournay D, Gokaslan Z, Shi W, DeMonte F, Lang F,

McCutcheon I, Hassenbusch S, Holland E, et al. (2001):

A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95, 190-198.

Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW (1994):

Pathways leading to glioblastoma: A molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81(3), 427-36.

Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PN, Davis RL, Wilson CB (1990):

Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18, 321–324.

Levin VA, Hess KR, Choucair A, Flynn PJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Yung WK,

Prados MD, Bruner JM, Ictech S, et al. (2003):

Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination alphasdifluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 9, 981–90.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, et al. (1997):

PTEN, a putative protein tyrosin phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.

Louis DN (1994):

The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 11-21.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Schleithauer BW, Kleihues P:

The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. IARC Press, Lyon, Frankreich 2007.

McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J (1992):

Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults 1977-1988. *Neurosurgery* 31, 636-642.

Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voûte PA, Baas F, Hermesen MA (2002):

Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* 24(3), 205-210.

Mitelman F:

ICSN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature. Karger, Basel, Schweiz, 1995.

Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, et al. (2008):

Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 26, 3015-3024.

Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ (1998):

Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulations of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci* 95, 5724-5729.

Neuro-Oncology Working Group (NOA) of the German Cancer Society (2003):

Neuro-Oncology Working Group (NOA)-01 trial of ACNU/VM26 versus ACNU/Ara-C chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol* 21, 3276–3284.

Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K (1998):

Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21(4), 340-346.

NOA (Neuro-Onkologische Arbeitsgemeinschaft) in der Deutschen Krebsgesellschaft:

Leitlinie Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters.
www.neuroonkologie.de, Zuckschwerdt, München 2008.

Ohgaki H, Kleihues P (2005):

Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6), 479-89.

Ohgaki H, Kleihues P (2007):

Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, et al. (2004):

Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19), 6892-6899.

Osoba D, Brada M, Yung WK, Prados M (2000):

Health-related quality of life in patients treated with temozolomide versus procarbazine for recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 18, 1481–91.

Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, et al. (2005):

BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 104(12), 2807-2816.

Petersen I, Schwendel A, Bockmühl U, Dietel M (1996):

Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis. *Pathologe* 17(5), 333-341.

Prados MD, Gutin PH, Phillips TL, Wara WM, Larson DA, Davis RL, Ahn DK, Lamborn K, Wilson CB (1992):

Highly anaplastic astrocytoma: A review of 357 patients between 1977 and 1989. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23(1), 3-8.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. (2006):

Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157-173.

Reifenberger G, Collins VP (2004):

Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82, 656-670.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993):

Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736-2739.

Rickert CH, Sträter R, Kaatsch P, Wassmann H, Jürgens H, Dockhorn-Dworniczak B, Paulus W (2001):

Pediatric high-grade astrocytomas show chromosomal imbalances distinct from adult cases. *Am J Pathol* 158(4), 1525-1532.

Riemenschneider MJ, Reifenberger G (2009):

Molecular Neuropathology of Gliomas. *Int J Mol Sci* 10, 184-212

Sonoda Y, Ozawa T, Hirose Y, Aldape KD, McMahon M, Berger MS, Pieper RO (2001):

Formation of intracranial tumors by genetically modified human astrocytes defines four pathways critical in the development of human anaplastic astrocytoma. *Cancer Res* 61, 4956-4960.

Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E (2001):

Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol* 2, 552–560.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Cairncross JG, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Eisenhauer E, Mirimanoff RO on behalf of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Brain Tumor and Radiotherapy Groups and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) (2005):

Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987–996.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C (2007):

Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 63(1), 72-80.

Taylor NP, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, Huettner PC, Thibodeau SN, Mutch DG, Goodfellow PJ (2006):

MLH3 mutation in endometrial cancer. *Cancer Res* 66(15), 7502–7508.

Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernard A, Zhong Y (2002):

Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat Neurosci* 5, 95-96.

Trost D, Ehrler M, Fimmers R, Felsberg J, Sabel MC, Kirsch L, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G, Weber RG (2007):

Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 120, 2638-2376.

Van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, Keeney M, Chambers AF, Cairncross JG (1994):

p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst* 86(13), 1011-1017.

Vranova V, Necesalova E, Kuglik P, Cejpek P, Pesakova M, Budinska E, Relichova J, Veselska R (2007):

Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 17(2), 457-464.

Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, et al. (1978):

Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49, 333-43.

Warr T, Ward S, Burrows J, Harding B, Wilkins P, Harkness W, Hayward R, Darling J, Thomas D (2001):

Identification of extensive genomic loss and gain by comparative genomic hybridization in malignant astrocytoma in children and young adults. *Genes Chromosomes Cancer* 31(1), 15-22.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996):

Overexpression of the EGF receptor and p53 are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol* 6, 217-223.

Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997):

Incidence and timing of p53 mutations during astrocytomas progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 3, 523-530.

Watanabe K, Peraud A, Gratas C, Wakai S, Kleihues P, Ohgaki H (1998):

p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 95, 559-564.

Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ohta T, Ogino A, Komine C, Fukushima T (2007):

Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. *Brain Pathol* 17, 5-10.

Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiesling M, Cremer T (1996):

Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13, 983-994.

Wessels PH, Weber WE, Raven G, Ramaekers FC, Hopman AH, Twijnstra A (2003):

Supratentorial grade II astrocytoma: biological features and clinical course. *Lancet Neurol* 7, 395-403.

Wick M, Härönen R, Mumberg D, Bürger C, Olsen BR, Budarf ML, Apte SS, Müller R (1995):

Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *Biochem J* 311(2), 549-554.

Wiltshire RN, Herndon JE, Lloyd A, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2004):

Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas, prognostic and diagnostic implications. *J Mol Diagn* 6(3), 166-179.

Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, Levin VA, Yung WK (1999):

Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 17, 2572–2578.

Xiao A, Wu H, Pandolfi PP, Louis DN, Van Dyke T (2002):

Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation. *Cancer Cell* 1, 157-168.

Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, et al. (1999):

Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol* 17, 2762–2771.

Lebenslauf

Ich wurde am 14.02.1982 als erster von zwei Söhnen des Studiendirektors Dieter Haupt und der Medizinisch-technischen Assistentin Jutta Haupt geb. Öhlmann in Wolfenbüttel geboren. Ab 1988 besuchte ich die Grundschule am Geitelplatz und wechselte 1992 in die Orientierungsstufe Wallstraße. Meine schulische Laufbahn setzte ich ab August 1994 am Theodor-Heuss-Gymnasium in Wolfenbüttel fort, an dem ich 2001 die Allgemeine Hochschulreife (Abitur) erlangte.

Im Anschluss leistete ich von Oktober 2001 bis Juli 2002 meinen Zivildienst beim Rettungsdienst des Deutschen-Roten-Kreuzes Wolfenbüttel ab. In diesem Rahmen schloss ich eine Ausbildung zum Rettungssanitäter ab.

Das Studium der Humanmedizin nahm ich an der Georg-August-Universität zu Göttingen ab dem Wintersemester 2002 auf. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Herbst 2004. Daran schloss sich direkt der klinische Studienteil an. Das Praktische Jahr leistete ich zu zwei Tertialen in Südamerika (Argentinien und Uruguay) ab. Es handelte sich dabei um die beiden Pflichttertiale Chirurgie und Innere Medizin. Das dritte Tertial Pädiatrie absolvierte ich am Elisabeth-Kinderkrankenhaus in Oldenburg. Ich schloss mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Herbst 2008 mit dem Staatsexamen erfolgreich ab.

Vom 1. Januar 2009 bis 30. April 2009 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Kinderklinik am Kreiskrankenhaus Leer. Seit dem 01. Mai 2009 bin ich als Weiterbildungsassistent am Elisabeth-Kinderkrankenhaus in Oldenburg tätig.