

**Diplomarbeit**

**Integrative Analyse von Morphologie und  
Molekularpathologie von diffusen astrozytären und  
oligodendroglialen Tumoren  
Eine retrospektive Studie**

eingereicht von

**Karl Vittinghoff**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik & Forschungs- (D&F) Institut für Pathologie**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr.med. univ. Gerald Höfler**

**Univ. FA Dr.med. univ Martin Asslaber**

Graz, Datum 18.06.2024

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 18.06.2024*

*Karl Vittinghoff eh*

# 1. Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Betreuern Univ.-Prof. Dr.med. univ. Gerald Höfler Univ. FA Dr.med. univ Martin Asslaber für ihre tatkräftige Hilfe während der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meinen Freund\*innen und Wegbegleiter\*innen während der Studienzeit bedanken.

## 2. Zusammenfassung in Deutsch

**Einleitung:** Diffuse Gliome des Erwachsenenalters werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, Astrozytome, Glioblastome und Oligodendrogliome. Die Einteilung erfolgt vor allem anhand der histologischen Befunde und anhand von zwei genetischen Markern: IDH-Mutationen und 1p/19q Kodeletionen. Glioblastome sind weder IDH mutiert noch weisen sie eine 1p/19q Kodeletion auf. Astrozytome und Oligodendrogliome sind IDH mutiert, wobei Oligodendrogliome zusätzlich noch eine 1p/19q Kodeletion aufweisen müssen. Bei diesen Tumoren sind zusätzlich noch einige andere Gen-Mutationen und Copy Number Variations bekannt deren prognostische und diagnostische Bedeutung noch Großteiles unbekannt ist. Außerdem wirkt sich die Methylierung des MGMT-Promotors auf das Survival aus. Die Therapie ist von der Tumorentität abhängig, häufig wird eine Resektion mit einer Strahlentherapie und Chemotherapie kombiniert. Die Prognose ist bei den Tumoren höchst unterschiedlich, während das Overall Survival bei Glioblastomen in der Literatur mit eineinhalb Jahren angegeben wird, liegt das Progression Free Survival bei Oligodendrogliomen bei über 10 Jahren.

**Methoden:** Es wurden 314 Fälle analysiert, hierbei entfielen 220 auf Glioblastome, 60 auf Astrozytome und 34 auf Oligodendrogliome. Während für alle Fälle die histopathologische Diagnose vorhanden war, waren nur für einen Teil der Fälle Survival Daten bzw. molekulare Daten vorhanden. Es wurden univariate Survivalanalysen durchgeführt. Hierbei wurde für jede der drei Gruppen die Auswirkung von MGMT-Promotor Methylation, Copy Number Variations und eines Panels von Gen-Mutationen auf das Overall Survival ausgewertet.

**Ergebnisse:** Eine Methylierung des MGMT-Promotors war sowohl bei Glioblastomen als auch bei Astrozytomen mit einem besseren Survival assoziiert. Während bei den Astrozytomen und Oligodendrogliomen keine Copy Number Variations von ganzen Chromosomen gefunden werden konnten, welche sich signifikant auf das Survival auswirken, konnte bei den Glioblastomen für Loss 10 und Gain 5 eine negative Auswirkung auf das Survival nachgewiesen werden. Bei den Oligodendrogliomen konnte eine negative Auswirkung von einer SMO-Mutation auf das Survival nachgewiesen werden. In der Gruppe der Glioblastome waren PTCH1, SMO und JAK3 mit einem schlechteren Survival verbunden.

**Diskussion:**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige für das Survival bei diffusen glialen Tumoren, relevante Biomarker vorgestellt werden, welche auch mit der aktuellen Literatur verglichen wurden. Die Auswirkung der Mutationen und CNV auf das Survival muss allerdings noch in zusätzlichen Studien validiert werden.

### 3. Abstract in English

**Introduction:** The group of adult-type diffuse gliomas consists of three different entities. Astrocytoma, Glioblastoma und Oligodendroglioma. Tumor classification is largely dependent on histological and molecular features. IDH-mutation und 1p/19q codeletion are the most important diagnostic biomarkers. While IDH-mutation is mandatory in Astrocytomas and Oligodendrogliomas, Glioblastomas never exhibit IDH-Mutations. 1p/19q codeletion is the key feature of Oligodendrogliomas. In addition to the markers mentioned above, there are many more markers of unknown prognostic and diagnostic significance. MGMT-promotor methylation is another prognostic marker of high importance. Treatment of diffuse gliomas depends on the entity; in most cases it is a combination of tumor resection and radiochemotherapy. Survival varies greatly and depends mainly on the diagnosis. Whereas Overall Survival for Glioblastomas is very short, with an OS of mere 18 months, Progression Free Survival for Oligodendrogliomas is more than 10 years.

**Methods:** 314 cases were analyzed. Most of them were Glioblastomas (220) and to a lesser extent Astrocytomas (60) and Oligodendrogliomas (34). While histopathological assessment was available for all cases, survival data and molecular information was not available for some cases. Univariate survival analysis was performed on the three groups. We calculated the effect of MGMT-promotor methylation, Copy Number Variations, and gene-mutations on the Overall Survival.

**Results:** MGMT-promotor methylation is significantly associated with better Overall Survival in Glioblastoma and Astrocytoma. While Copy Number Variations of whole chromosomes are not associated with a significant effect on survival in Oligodendrogliomas and Astrocytomas, Loss 10 und Gain 5 lead to a significantly poor OS in Glioblastoma. PTCH1 and JAK3 have a detrimental effect on OS in Glioblastoma. Furthermore, SMO leads to a poor OS in Glioblastoma and Oligodendroglioma.

**Discussion:**

The effect of certain biomarkers on the Overall Survival in adult-type diffuse gliomas was evaluated in this thesis and compared to previously published results. However, the effect of those markers on the Overall Survival needs to be studied in further trials.

## **4. Angaben von bereits erfolgten Veröffentlichungen**

Es sind noch keine Publikationen erfolgt.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Danksagungen .....	3
2.	Zusammenfassung in Deutsch .....	4
3.	Abstract in Englisch .....	6
4.	Angaben von bereits erfolgten Veröffentlichungen .....	7
5.	Abkürzungen und deren Erklärung.....	3
6.	Abbildungsverzeichnis .....	5
7.	Einleitung .....	6
7.1.	WHO-Klassifikation 2021 .....	6
7.1.1.	Astrozytom, IDH-mutiert .....	6
7.1.2.	Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert .....	7
7.1.3.	Glioblastom, IDH-Wildtyp .....	7
7.2.	Therapie von diffusen Gliomen.....	8
7.2.1.	Prognose .....	9
7.3.	Molekulare Eigenschaften .....	9
7.3.1.	Chromosomale Aberrationen.....	10
7.3.2.	MGMT.....	11
7.3.3.	Gen Mutationen .....	12
7.3.3.1.	ATM .....	12
7.3.3.2.	ATRX .....	13
7.3.3.3.	CIC .....	13
7.3.3.4.	EGFR.....	13
7.3.3.5.	IDH.....	14
7.3.3.6.	MLH1 .....	15
7.3.3.7.	PIK3CA .....	15
7.3.3.8.	RB1.....	15
7.3.3.9.	TP53 .....	16
8.	Material und Methoden .....	17
8.1.	Pyrosequencing.....	17
8.1.1.	MGMT.....	18
8.2.	Next Generation Sequencing.....	18
8.2.1.	Genmutationen .....	19
8.2.2.	CNV.....	19

9.	Ergebnisse.....	20
9.1.	Deskriptive Analyse .....	20
9.1.1.	Häufigkeit der Diagnosen.....	20
9.1.2.	Alter der Patient*innen.....	21
9.1.3.	Überlebenszeiten .....	22
9.1.5.	Auswertung der Gen Mutationen .....	23
9.1.6.	Auswertung der Copy Number Variations (CNV).....	26
9.2.	Survival Analyse .....	28
9.2.1.	MGMT.....	28
9.2.2.	Chromosomale Aberrationen.....	28
9.2.3.	Auswertung der Gen Mutationen .....	31
10.	Diskussion .....	33
10.1.	Vergleichende Erläuterungen .....	33
10.1.1.	Alter und Survival .....	33
10.1.2.	MGMT.....	33
10.1.3.	CNV.....	34
10.1.4.	Gen Mutationen .....	35
10.2.	Kritische Reflexion.....	36
10.3.	Schlussfolgerungen.....	36
	Literaturverzeichnis .....	38

## 5. Abkürzungen und deren Erklärung

APC	adenomatöses Polyposis Coli Gen
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A/B	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CIC	Capicua transcriptional repressor
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
FUBP1	far upstream element binding protein 1
H3	Histon H3
IDH	Isocitratdehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
JAK3	Janus Kinas 3
KLLN	killin, p53 regulated DNA replication inhibitor
LZTR1	leucine zipper like post translational regulator 1
MGMT	O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1	mutL homolog 1
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NGS	Next Generation Sequencing
OS	Overall Survival
PCR	polymerase chain reaction
PFS	Progression Free Survival
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTCH1	Protein patched homolog 1
PTCH2	Protein patched homolog 2
PTPN	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
RB1	Retinoblastoma Protein

SMO ..... *Protein smoothed*  
TERT ..... *Telomerase reverse transcriptase*  
TP53 ..... *Tumor protein P53, Tumor Protein P53*  
TSC1 ..... *Hamartin*  
TSC2 ..... *Tuberin*  
VHL ..... *Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor*  
WHO ..... *World Health Organisation*

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Diagnosen.....	20
Abbildung 2: Alter zum Zeitpunkt der Diagnose .....	21
Abbildung 3 Survival innerhalb der Diagnosegruppen .....	22
Abbildung 4: Verteilung des MGMT Mean .....	23
Abbildung 5 Verteilung der Gen Mutationen.....	25
Abbildung 6 Verteilung der Copy Number Variations .....	27
Abbildung 7: MGMT GBM .....	28
Abbildung 8: MGMT Astrozytome .....	28
Abbildung 9 CNV Astrozytome .....	28
Abbildung 10 CNV Glioblastome .....	29
Abbildung 11 CNV Oligodendrogliome .....	29
Abbildung 12 NGS Glioblastome .....	31
Abbildung 13 NGS Astrozytome .....	31
Abbildung 14 NGS Oligodendrogliome.....	31

## 7. Einleitung

### 7.1. WHO-Klassifikation 2021

#### 7.1.1. Astrozytom, IDH-mutiert

Astrozytome sind diffuse Tumore, welche häufig eher jüngere und männliche Patient\*innen betreffen. Diese Tumore kommen vor allem im Bereich der Frontallappen vor, in selteneren Fällen auch an anderen Stellen des Gehirns. Astrozytome werden nach der WHO-Klassifikation eingeteilt, wobei der WHO-Grad 1 bei IDH-mutierten Tumoren nicht vorkommt.

Um die Diagnose Astrozytom, IDH-mutiert stellen zu dürfen, muss IDH mutiert sein und es darf keine 1p/19q Kodeletion vorkommen. Weiters treten in vielen Fällen bei Astrozytomen ATRX und TP53 Mutationen auf. (1)

Makroskopisch gesehen ist der Tumor schlecht von seiner Umgebung zu unterscheiden und es kommt zu einer Verdrängung von benachbarten Strukturen. Im Anschnitt wird der Tumor häufig als grau und „glasig“ beschrieben. In der Histologie unterscheidet man zwischen dem fibrillären und dem gemistozytischen Astrozytom. (2)

Die Einteilung in die WHO-Grade erfolgt anhand der Anzahl der Mitosen sowie dem Vorhandensein von Anaplasie, Nekrosen und/oder der Proliferation von Blutgefäßen. Eine biallelische CDKN2A/B Deletion führt automatisch zu einer Klassifikation als Astrozytom, IDH-mutiert WHO- Grad 4. (3)

Im MRT nehmen Astrozytome der WHO-Klasse 4 und 3 eher Kontrastmittel auf als WHO-Grad 2 Astrozytome. Ein für die Astrozytome typischer MRT-Befund ist der T2 – FLAIR Mismatch. Darunter versteht man in der Radiologie, dass bei diesen Tumoren im T2 Bild eine hyperintense Läsion auffällt, welche im FLAIR Bild allerdings hypointens ist. Diese Läsion ist oft von einem FLAIR-hyperintensen Ring umgeben. (4)

### **7.1.2. Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert**

Ähnlich wie bei Astrozytomen, IDH-mutiert muss ein Oligodendrogliom eine IDH-Mutation aufweisen, außerdem muss eine 1p/19q Kodeletion vorhanden sein. Man unterscheidet zwischen dem Oligodendrogliom WHO Grad 2 und 3, wobei Tumore mit WHO-Grad 2 ein besseres Survival haben. Andere häufige bei Oligodendrogliomen auftretende Gen Mutationen sind: CIC, TERT und FUBP1. Oligodendrogliome kommen am häufigsten im Frontallappen vor, und es sind etwas mehr Männer als Frauen von diesem Tumor betroffen. Patient\*innen mit einem WHO-Grad 3 Oligodendrogliom sind etwas älter als solche mit einem WHO-Grad 2 Tumor. (1)

In der Makroskopie stellt sich der Tumor häufig rötlich bis grau dar. Einblutungen und Kalk kommen in vielen Fällen vor. Bei histologischer Betrachtung hat der Tumor typischerweise ein honigwabenförmiges Aussehen. Auch der niedriggradige Tumor ist typischerweise zellreich, das Zytoplasma ist hell und die Zellen sind alle ähnlich aussehend. Die makroskopischen Verkalkungen sind auch in der Histologie zu sehen. (2)

Oligodendrogliome weisen in der Bildgebung häufig kalzifizierte Areale auf und sind unscharf begrenzt. Die Kontrastmittelaufnahme im MRT ist, ähnlich wie bei den Astrozytomen, bei höhergradigen Tumoren vermehrt zu beobachten. (4)

### **7.1.3. Glioblastom, IDH-Wildtyp**

Glioblastome gehören ebenfalls zur Gruppe der diffusen astrozytären Tumore. Aufgrund ihrer ausgesprochen schlechten Prognose haben Glioblastome immer den WHO-Grad 4. Die definierenden Eigenschaften eines Glioblastoms sind ein IDH und H3 Wildtyp. Darüber hinaus bestehen fünf weitere Merkmale, welche typisch für Glioblastome sind: Nekrosen, mikrovaskuläre Proliferation, TERT-Mutation, EGFR-Mutation, oder Copy Number Variations der DNA mit Gain Chromosomen 7 und/oder Loss Chromosom 10. Damit die Diagnose Glioblastom gestellt werden kann, muss also ein diffuser astrozytärer Tumor vorliegen, welcher nicht IDH mutiert, nicht H3 mutiert ist und zumindest eines der oben

genannten fünf Merkmale aufweist. Glioblastome kommen vor allem bei Personen im höheren Alter vor, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. (1)

Glioblastome können makroskopisch verschiedenartig aussehen, wobei häufig mehrere unterscheidbare Areale bestehen. Es wechseln sich nekrotische, eingeblutete und graue sowie weiße Tumoranteile ab. Der Tumor wächst infiltrativ und breitet sich auch auf beide Hirnhemisphären aus, dadurch entsteht ein Phänomen, das als Schmetterlingsgliom bezeichnet wird. (2)

In der Histologie ist der Tumor anisozytotisch, schlecht differenziert, zellreich und infiltriert umgebendes Neuropil. Typisch sind Nekrosen im Tumor, um welche sich die Tumorzellen wie Palisaden anordnen. Zudem kommt es bei Glioblastomen zur Neoangiogenese, also der Neubildung von allerdings unreifen Blutgefäßen, die als pathologische Gefäßproliferate imponieren, teils auch glomeruloid. (1)

In der Bildgebung können Glioblastome verschiedenartig aussehen. Dabei ist die Läsion meistens schlecht von ihrer Umgebung abzugrenzen. Typisch ist ein dicker Saum von Tumorgewebe, welcher eine zentrale Nekrose umgibt. Diese Nekrosezone nimmt im MRT kein Kontrastmittel auf, während der Saum häufig eine Kontrastmittelaufnahme zeigt. Im CT ist die Nekrose hypodens, der Saum hyper- oder isodens. Häufig wird der Tumor von einem stark ausgedehnten Hirnödem umgeben und es sind Einblutungen zu sehen. Das wahre Ausmaß des Tumors ist meistens größer als die Bildgebung vermuten lassen würde. (5)

## **7.2. Therapie von diffusen Gliomen**

Therapeutisch wird eine Totalresektion des Tumors angestrebt, sofern diese chirurgisch möglich ist, ansonsten erfolgt eine Teilresektion. Wenn überhaupt keine Resektion möglich ist, oder von Patient\*innen nicht gewünscht wird, kann eine stereotaktische Biopsie zur Sicherung der Diagnose erfolgen. (6)

Zusätzlich zu dem chirurgischen Eingriff erfolgt häufig eine kombinierte Radio-Chemotherapie. Laut der aktuellen DGN Leitlinie für Gliome kann bei Oligodendrogliomen WHO Grad 2 und Astrozytomen WHO Grad 2 unter Umständen nur eine Resektion ohne Radio-Chemotherapie erfolgen. Bei allen anderen diffusen glialen Tumoren sollte die

chirurgische Therapie mit Radio- und Chemotherapie kombiniert werden. Während bei Astrozytomen und Glioblastomen meistens Temozolomid verwendet wird, erfolgt die Therapie von Oligodendrogliomen in den meisten Fällen nach dem PCV-Schema (Procarbazin + CCNU + Vincristin). Bei der Strahlentherapie wird nicht die gesamte Dosis von 50-60 Gray in einer Sitzung appliziert, sondern es erfolgt eine Aufteilung auf ca. 2 Gray pro Behandlungstag, um die Nebenwirkungen für das gesunde Parenchym möglichst gering zu halten. (7)

Zusätzlich kann eine symptomorientierte Therapie notwendig sein, welche eine Schmerztherapie und die Behandlung eines eventuellen Hirnödems beinhaltet. Bei Hirntumoren kommt es gehäuft als Erstsymptom zu epileptischen Anfällen. Es sollte keine generelle Anfallsprophylaxe durchgeführt werden, sondern nur nach einem stattgehabten Anfallsereignis eine Therapie gestartet werden. Darüber hinaus ist die psychologische Betreuung der Patient\*innen von großer Bedeutung. Nach der primären Therapie wird eine Nachkontrolle mittels MRT alle 3-6 Monate empfohlen, um ein Rezidiv möglichst früh erkennen zu können. (6)

### **7.2.1. Prognose**

Die Prognose ist abhängig von der Tumorentität, dem WHO-Grad, sowie dem Alter und dem klinischen Zustand der Patient\*innen. Während bei niedriggradigen Astrozytomen und Oligodendrogliomen Progression Free Survivals (PFS) von über 10 Jahren möglich sind, ist die Lebenserwartung bei Patient\*innen mit Glioblastom ausgesprochen schlecht, wobei hier das mediane Overall Survival (OS) bei ca. eineinhalb Jahren liegt. (6)

Die Auswirkung von verschiedenen molekularen Markern auf das Survival bei diffusen astrozytären und oligodendroglialen Hirntumoren wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben und im Rahmen der eigenen Untersuchungen behandelt.

### **7.3. Molekulare Eigenschaften**

Die Klassifizierung der Tumore nicht nur nach ihren histologischen Eigenschaften, sondern auch nach ihren molekularen Eigenschaften ist von großer Bedeutung, weil die integrierten molekularen Befunde bei weitem besser mit dem Outcome korrelieren als der reine morphologische histologische Befund. (8)

Vor der WHO-Klassifikation 2016 wurden Hirntumore nur anhand der histologischen Kriterien klassifiziert. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass Patient\*innen mit Tumoren, welche IDH mutiert waren, oder eine 1p/19q Kodellektion aufweisen, ein bei weitem besseres Survival hatten als solche ohne die genannten Veränderungen. Seit der WHO-Klassifikation 2016 ist somit die molekulare Signatur des Tumors maßgeblich für die Diagnose. (9)

Mit der aktuellen WHO Klassifikation von 2021 kamen einige Veränderungen hinzu. Wie weiter unten beschrieben, führen Veränderungen gewisser Gene zur Diagnose eines hochgradigen Tumors, auch wenn dieser unter Umständen im Mikroskop niedriggradiger imponiert. Auch wenn bereits einige Veränderungen etabliert sind, existieren in diffusen Hirntumoren noch viele weitere Mutationen, bei welchen die Auswirkungen noch nicht bekannt sind, und welche zusätzlich Unterschiede im Survival der Patient\*innen erklären könnten. (10)

### **7.3.1. Chromosomale Aberrationen**

Bei Tumoren kann es zur Deletion oder Duplikation von ganzen Chromosomen, Armen von Chromosomen oder kleinerer Abschnitte von Chromosomen kommen. Außerdem kann es zu einem Austausch von Chromosomenbruchstücken kommen, den Translokationen. (11)

In der vorliegenden Arbeit werden nur Kopienzahlveränderungen von ganzen Chromosomen behandelt, die zumindest zweimal im untersuchten Kollektiv auftreten. Veränderungen nur von einzelnen Armen von Chromosomen oder Translokationen wurden nicht ausgewertet. Während bei manchen chromosomalen Aberrationen bereits Auswirkungen auf das Survival bekannt sind, und diese, so wie oben beschrieben, Eingang in die Diagnosekriterien gefunden haben, ist bei anderen kaum etwas bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem versucht, die Auswirkung von Kopienzahlveränderungen auf das Survival zu ergründen.

Für Glioblastome ist eine Verlängerung des Survivals bei einem zusätzlichen Chromosom 19 und 20 beschrieben. Eine neuere Untersuchung geht allerdings davon aus, dass ein Gain 19 unabhängig von einem zusätzlichen Chromosom 20 zu einem besseren Survival führt. (12)

Mit dem cIMPACT-NOW Update 3 wurde das molekulare Glioblastom etabliert, auch auf Basis von Gain Chromosom 7 und Loss Chromosom 10. (13)

Bereits vor 20 Jahren konnte auch für die Gruppe der Astrozytome WHO Grad 2 ein Nachteil für das Survival festgestellt werden, wenn diese einen Gain des Chromosoms 7 aufwiesen. Allerdings muss beachtet werden, dass die Diagnosen anhand der WHO-Kriterien von 1993 gestellt wurden. (14)

Im Gegensatz zu den Astrozytomen und Glioblastomen sind bei den Oligodendrogliomen auch aktuell keine Auswirkungen von Deletionen oder Duplikationen von ganzen Chromosomen bekannt. (15)

### **7.3.2. MGMT**

Das MGMT-Gen kodiert für die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase, einem Enzym, welches für die Entfernung von Methylgruppen von der DNA verantwortlich ist. Dem Gen ist ein Promotor vorgeschaltet, welcher im methylierten Zustand den Effekt hat, dass in weiterer Folge kein Enzym mehr produziert wird. (16)

Dies ist deswegen von Bedeutung, weil das häufig für die Therapie von Gliomen genutzte Medikament Temozolomid Guanin methyliert. Das methylierte Guanin (O6-MG) bewirkt Fehler in der Replikation der DNA, welche in weiterer Folge dazu führen, dass die Zelle in Apoptose geht. (17) Zellen mit intaktem MGMT können das methylierte Guanin entfernen, und sind dadurch gegen die Wirkung von Temozolomid geschützt. (16)

Die indirekte Bestimmung der MGMT-Aktivität kann mithilfe von verschiedenen Methoden erfolgen. Dazu zählen verschiedene PCR-Methoden und die Immunhistochemie, (18) wobei die Immunhistochemie deutlich schlechter dazu geeignet ist, die Wirkung von Temozolomid und damit das Survival der Patient\*innen vorherzusagen, als die PCR basierten Methoden Pyrosequencing und Methylation-spezifische PCR. (19)

In einer Studie mit 75 Patient\*innen mit Gliomen WHO Grad 2 konnte gezeigt werden, dass das Progression Free Survival und Overall Survival signifikant besser ist, wenn MGMT

methyliert ist. (20) Es konnte allerdings noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob dieser Effekt allein am MGMT-Status liegt, oder ob es noch andere Einflussfaktoren gibt. (21) Auch bei Glioblastomen konnte nachgewiesen werden, dass das Overall Survival mit methyliertem MGMT-Promotor länger ist. (22)

### **7.3.3. Gen Mutationen**

Im folgenden Abschnitt werden diejenigen Gene vorgestellt, welche in der anschließenden Analyse im Hinblick auf ihre Auswirkung auf das Survival ausgewertet werden. Während in einigen Fällen bereits viel zu dem jeweiligen Gen publiziert wurde, ist bei anderen Genen noch wenig bekannt. Bei vielen Genen sind die Auswirkungen auf das Survival der Patient\*innen bei diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen noch unbekannt. Gene, die im Kollektiv in zumindest zwei Fällen mutiert waren, wurden hinsichtlich Overall Survival analysiert, das sind APC, CDKN1A, JAK3, KLLN, LZTR1, MET, PTCH1, PTPN, SMO, TSC1, TSC2, VHL.

Anschließend werden diejenigen Gene, bei welchen bereits etwas über die Auswirkung auf das Survival bekannt ist, in ihrer physiologischen Funktion vorgestellt und ihre Bedeutung bei Hirntumoren zusammengefasst.

#### **7.3.3.1. ATM**

Das ATM-Gen ist nach dem Ataxia teleangiectatica -Syndrom benannt, da es bei dieser Erkrankung zu einer Mutation im ATM-Gen kommt. Die Aufgaben des ATM-Gens liegen unter anderem in der Behebung von DNA-Doppelstrangbrüchen, wobei das Gen auf verschiedene zelluläre Pathways einwirkt. Doppelstrangbrüche der DNA entstehen unter anderem bei Einwirkung von ionisierenden Strahlen, weswegen ATM-Mutationen mit einer vermehrten Effektivität von Strahlentherapie in Verbindung gebracht werden. (23)

Allerdings ist die klinische Bedeutung von ATM bei Hirntumoren noch Großteils unklar. In einer Studie wurden 39 Patient\*innen mit einem Glioblastom, bei dem ATM mutiert war (Nachweis mittels NGS), untersucht. Bei den Studienpatient\*innen wurde eine teilweise Resektion des Tumors durch eine Radio- und Chemotherapie ergänzt. Es zeigte sich zwar eine Tumorkontrolle innerhalb des Bestrahlungsfeldes, allerdings konnte keine signifikante Auswirkung auf das Survival nachgewiesen werden. (24)

Eine andere Arbeit untersuchte mit immunhistochemischem Nachweis von p-ATM und p53 die Auswirkung auf das Survival bei Glioblastomen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Tumore mit einer niedrigen Expression von ATM ein besseres Survival hatten als solche mit hoher ATM-Expression. (25)

### **7.3.3.2. ATRX**

Mutationen des ATRX-Gens führen zum X-chromosomalen Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom. Bei diesem Syndrom treten faziale Auffälligkeiten, mentale Retardierung und Alpha Thalassämie auf, wobei nicht alle Symptome bei allen Patient\*innen vorhanden sein müssen. Das Syndrom wird X chromosomal vererbt. (26)

ATRX spielt eine wichtige Rolle in der Remodellierung von Chromatin und im Zellzyklus. (27) Bei Oligodendrogliomen und Astrozytomen, bei denen die Diagnose sowohl histologisch als auch molekular gestellt worden war, konnte keine unabhängige Auswirkung von ATRX auf das Survival nachgewiesen werden. (28) ATRX ist bei Oligodendrogliomen nur selten mutiert und kann somit die Unterscheidung zwischen Oligodendrogliomen und Astrozytomen erleichtern. Für Glioblastome konnte eine positive Auswirkung einer Mutation auf das Survival nachgewiesen werden. (27)

### **7.3.3.3. CIC**

Die genaue Rolle von CIC in der Entstehung und im Verlauf von Tumoren ist bisher noch unklar. CIC-Mutationen kommen in den meisten Fällen nur in Oligodendrogliomen WHO-Grad 2 oder 3 vor. Mutationen von CIC zeigen keine signifikante Auswirkung auf das PFS oder OS bei Oligodendrogliomen. (29)

### **7.3.3.4. EGFR**

Das EGFR-Gen codiert eine Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK), den Epidermal Growth Factor Receptor. Rezeptor Tyrosin Kinasen bestehen aus drei Teilen: einem extrazellulären, einem die Membran durchspannenden Anteil und einem im inneren der Zelle liegenden Anteil. Informationen, welche durch Liganden an der Außenseite der Zelle ankommen werden durch RTKs in die Zellen weitergeleitet und greifen dort in den Stoffwechsel der Zelle ein.

Dies führt unter anderem zu einer Hemmung der Apoptose sowie Zellwachstum und einer Neubildung von Blutgefäßen. (30)

In Gliomen kommt es häufig zu Veränderungen in der Signalkaskade, wie etwa einer vermehrten Expression von Rezeptoren oder einer verstärkten Reaktion der Zelle auf ein Signal von außen. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Zellproliferation bei gleichzeitig vermindertem Absterben von Zellen. An diesem Punkt setzen einige Medikamente zur Tumorthherapie an, welche den EGFR-Rezeptor hemmen. (31)

Für EGFR-Mutationen sind in der Literatur keine signifikanten Auswirkungen auf das Survival bei Glioblastomen beschrieben. (32) (33)

### **7.3.3.5. IDH**

Das Produkt des IDH 1 oder 2 Gens ist die Isocitratdehydrogenase. Die Aufgabe der Isocitratdehydrogenase ist es im Rahmen des Citratzyklus, Isocitrat in  $\alpha$ -Ketoglutarat umzuwandeln. Sie spielt daher eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zelle. (34)

Bei IDH-Mutationen funktioniert diese Umwandlung im Tumor nicht mehr und es sammelt sich D2-Hydroxyglutarat in den Zellen an. Dies führt in weiterer Folge zu Veränderungen im Zellstoffwechsel und der Gen Expression, wodurch Tumorentstehung und Wachstum gefördert werden.

Sowohl bei IDH1 als auch bei IDH2 gibt es zwei relevante Mutationen diese betreffen bei IDH1 die Aminosäurereste R132 und R100, bei IDH2 die Aminosäurereste R172 und R140. (35)

IDH-Mutationen können mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden. Einerseits können Veränderungen mittels Sanger Sequencing oder anderen PCR-Methoden durchgeführt werden. Andererseits kann direkt in formalinfixiertem Gewebe die Mutation mittels IHC nachgewiesen werden. Hierbei muss allerdings darauf geachtet werden, dass der häufig genutzte Antikörper nur an eine spezifische IDH-Mutation (R132H) bindet und somit andere IDH-Mutationen übersehen werden. Die R132H Mutation tritt in Gliomen am häufigsten auf, 90% der IDH mutierten Fälle weisen diese Mutation auf. (36)

Laut der aktuellen WHO-Klassifikation ist die IDH-Mutation gemeinsam mit der 1p/19q Kodeletion der zentrale Marker anhand dessen die Einteilung in die drei Tumorgruppen erfolgt, da sich gezeigt hat, dass IDH-Mutationen eine große Auswirkung auf das Survival von Patient\*innen mit diffusen Gliomen zeigten. Alle GBM sind als IDH Wildtyp definiert, während Oligodendrogliome und Astrozytome IDH mutiert sein müssen. IDH mutierte Glioblastome existieren nicht mehr und werden seit der WHO-Klassifikation 2021 als Astrozytome WHO Grad 4 bezeichnet. (4)

#### **7.3.3.6. MLH1**

MLH ist ein Bestandteil des DNA Mismatch Repair Systems. Dieses korrigiert im physiologischen Zustand Fehler in der DNA-Replikation. Bei vielen Tumorprädispositionssyndromen kommt es zu Fehlfunktionen dieses Systems, wodurch es im Laufe des Lebens zu einem massiv erhöhten Tumorrisiko kommt. (37)

Es wurde kein Zusammenhang zwischen immunohistochemischem Nachweis von MLH1 und dem Overall Survival bei Low grade Astrozytomen gefunden. (38) Auch in der Gruppe der Glioblastome konnte in einer anderen Studie kein Zusammenhang von MLH1 und dem Survival gefunden werden. (39)

#### **7.3.3.7. PIK3CA**

Das PIK3CA Gen codiert für einen Teil der Phosphatidylinositol 3-Kinase. Diese ist für die PI3K/Akt Signalkaskade von Bedeutung. Dadurch wirken sich Mutationen des PIK3CA Gens auf viele verschiedene Aspekte des Stoffwechsels der Zelle aus. (40)

Mutationen im PIK3CA Gen sind sowohl mit einem schlechteren OS als auch PFS bei Glioblastomen verbunden. (41)

#### **7.3.3.8. RB1**

Dieses Gen ist nach einem Tumor des Auges, dem Retinoblastom benannt, bei welchem es in den meisten Fällen mutiert ist.

Das RB-Protein spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung des Zellzyklus. Das RB-Protein bindet im nicht phosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F, welcher in weiterer Folge die S-Phase des Zellzyklus einleitet. Veränderungen im RB1 Protein wirken sich somit stark auf die Proliferation der Zellen aus. Mutationen im RB1 Gen kommen in vielen Tumoren vor. (34)

Bei Glioblastomen wurde eine Auswirkung von RB1 auf das Survival beschrieben. In einer Studie mit 282 Patient\*innen konnte nachgewiesen werden, dass Patient\*innen, bei denen RB1 mutiert war, ein signifikant längeres Überleben hatten als solche ohne RB1 Mutation. (42)

Für Astrozytome konnte eine negative Auswirkung auf das Progression Free Survival nicht aber auf das Overall Survival nachgewiesen werden. (43)

### **7.3.3.9. TP53**

In gesunden Zellen besteht die Aufgabe von TP53 darin, den Zellzyklus im Falle einer DNA-Schädigung anzuhalten oder die Apoptose einzuleiten. Dadurch wird verhindert, dass sich geschädigte Zellen weiter teilen können. Schäden im TP53 Gen verhindern diese Funktion und sind in Tumoren vieler Entitäten zu finden. (34)

Bei Glioblastomen könnte TP53 eine Rolle in der Entstehung von Metastasen spielen. Bei diesen Tumoren kommt es nur sehr selten zu einer Metastasierung in andere Organe, weniger als 2% der Tumore metastasieren laut Literatur. Für GBM mit TP53 Mutation wurde ein signifikant höheres Risiko für extrakranielle Metastasen beschrieben. (44)

Zum Einfluss von TP53 auf das Survival bei Low grade Gliomen gibt es widersprüchliche Aussagen. In einer Studie, welche das Survival unabhängig von der histologischen Diagnose bestimmte, konnte kein signifikanter Effekt auf das OS festgestellt werden. (45)

Eine zweite Studie stellte bei Oligodendrogliomen und Astrozytomen jeweils gegensätzliche Effekte fest, wobei TP53 mutierte Astrozytome ein besseres OS aufweisen. Dieser Effekt war nur in der univariaten Auswertung vorhanden. Eine spezielle Form der TP53 Mutation (das Codon 273), führt auch bei Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, IDH-Status und WHO-Grad zu einem signifikant höheren OS. Bei Oligodendrogliomen führt TP53 zu einem kürzeren OS in der univariaten Analyse. (46) Bei den Glioblastomen konnte in einer kleinen Studie mit 21 Patient\*innen keine signifikante Auswirkung auf das OS nachgewiesen werden. (25)

## 8. Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden 314 Fälle von Patient\*innen, bei denen ein Tumor aus der Gruppe der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumore pathologisch diagnostiziert wurde, ausgewertet. Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Med Uni Graz genehmigt. Als Grundlage diente eine Datenbank von Hirntumorfällen des D&F Institutes der Pathologie der MedUni Graz. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Fälle berücksichtigt, bei denen ein primäres Gliom aufgetreten war. Rezidive und Hirntumore anderer Entität wurden nicht berücksichtigt. Für alle Fälle lagen eine makroskopische sowie histologische Beschreibung und eine histologische Diagnose vor. Von der Universitätsklinik für Neurologie wurden Survivaldaten zu den jeweiligen Fällen bereitgestellt. Zusätzlich zu den histologischen und klinischen Informationen konnten in vielen Fällen auch Informationen zu MGMT, Copy Number Variations (CNV), und Gen Mutationen im Tumor ausgewertet werden. Es wurden die Glioblastome, Astrozytome und Oligodendrogliome jeweils separat analysiert. In jeder Diagnosegruppe wurden drei Modelle, jeweils für MGMT, CNV und Genmutationen, berechnet. Als Parameter für die Survivalanalyse wurden diejenigen Merkmale ausgewählt, welche in ihrer jeweiligen Gruppe mindestens zweimal vorkamen.

Die Auswirkung auf das Overall Survival wurde mittels einem univariaten Cox Regression Modell berechnet. Alle Berechnungen wurden mittels R durchgeführt. (47) Für die statistische Analyse und die Erstellung der Graphiken wurden folgende Pakete in R verwendet: readxl, tidyverse, WriteXLS, RColorBrewer, survival, forestmodel, survminer.

### 8.1. Pyrosequencing

Bei der Pyrosequenzierung wird zuerst die Stelle im Genom, welche von Interesse ist, in unserem Fall, das Exon 1 von MGMT mittels PCR amplifiziert. Danach wird eine Bisulfat Konvertierung durchgeführt, hierbei wird Natriumbisulfat genutzt, um Cytosin in Uracil umzuwandeln. Das methylierte Cytosin kann nicht umgewandelt werden. Dieser Unterschied wird zum Nachweis der Methylierung genutzt. (48)

Anschließend findet die Sequenzierung statt. Bei der Pyrosequenzierung findet die Analyse statt, während DNA synthetisiert wird. Hierfür werden die vorher synthetisierten DNA-Abschnitte in einer Kammer fixiert. Daraufhin werden die vier verschiedenen Nukleosidtriphosphate abwechselnd in die Kammer eingeleitet. Beim Binden eines

Nukleosidtriphosphats wird Pyrophosphat frei, welches über einen Zwischenschritt zu ATP umgewandelt wird. Dieses ATP dient dem Enzym Luciferase als Energielieferant um Luciferin zu Oxyluciferin umzusetzen. Dabei wird Licht frei. Das freigewordene Lichtsignal wird aufgezeichnet. Anhand des Lichtsignals kann anschließend die DNA-Sequenz rekonstruiert werden. (49)

### **8.1.1. MGMT**

Die Analyse erfolgte mittels Pyrosequenzierung mit dem MGMT Pyro Kit Methylierungsassay (QIAGEN®). Dieses Methylierungsassay misst quantitativ die Methylierung an vier verschiedenen Stellen im Exon 1 des MGMT-Gens. (50)

Von diesen vier Methylierungswerten wird der Durchschnitt ermittelt (MGMT-Mean).

Für die weitere Analyse wurden Fälle, welche eine MGMT Methylierung von größer oder gleich 5 Prozent aufwiesen als methyliert und Fälle mit einer Methylierung von unter 5 Prozent als unmethyliert klassifiziert. Dieser Methylierungsstatus wurde nachfolgend als dichotome Variable in der Survivalanalyse verwendet.

## **8.2. Next Generation Sequencing**

Beim Next Generation Sequencing kann im Vergleich zu älteren Methoden viel mehr DNA in kürzerer Zeit sequenziert werden. Dabei werden viele kleine Bruchstücke der zu sequenzierenden DNA gleichzeitig analysiert und aus den daraus gewonnenen Informationen wird dann die richtige Basensequenz rekonstruiert. NGS ist ein Überbegriff für mehrere verschiedene Sequenzierungsmethoden. In unserem Fall wurde Ion Torrent Sequencing verwendet. (51)

Bei dieser Methode erfolgt die Sequenzierung auf einem Chip, auf welchem die zu sequenzierenden DNA-Bruchstücke gebunden werden und DNA-Polymerase vorhanden ist. Anschließend wird abwechselnd eine der vier DNA-Basen eingebracht. Wenn eine Base durch die DNA-Polymerase ligiert wird, kommt es zu einer Freisetzung eines H-Ions. Dies führt zu einer Verschiebung des pH-Wertes im jeweiligen Bereich des Chips. Anhand der pH-Verschiebung kann festgestellt werden, ob die jeweilige Base gebunden hat oder nicht, und somit kann die Abfolge der Basen bestimmt werden. Anschließend werden die Sequenzen miteinander verglichen und die komplette Sequenz aus den vielen verschiedenen Bruchstücken rekonstruiert. (52)

### **8.2.1. Genmutationen**

Die Auswertung der Genmutationen erfolgte mittels des Ion AmpliSeq Neuro V4 Panels, welches von der Pathologie der MedUni Graz entwickelt wurde, um die diagnostisch relevanten bei ZNS-Tumoren mutierten Gene analysieren zu können. Die im Panel erhaltenen Gene sind in der Abbildung 4 ersichtlich. Die Sequenzierung erfolgte mit dem AmpliSeq System. Für die Survivalanalyse wurde der Mutationsstatus als dichotome Variable (mutiert/nicht mutiert) codiert.

### **8.2.2. CNV**

Für die Analyse der Copy Number Variations wurde ebenfalls ein AmpliSeq Panel verwendet. Mit diesem können sowohl Veränderungen von ganzen Chromosomen, Armen von Chromosomen und kleinere Veränderungen auf den Chromosomenarmen nachgewiesen werden.

Für die Auswertungen in der vorliegenden Arbeit wurden nur Veränderungen von ganzen Chromosomen berücksichtigt.

## 9. Ergebnisse

### 9.1. Deskriptive Analyse

#### 9.1.1. Häufigkeit der Diagnosen

Insgesamt beinhaltete das Patient\*innenkollektiv nach Ausschluss von Fällen, bei denen keine Daten vorhanden waren, oder welche die oben genannten Diagnosekriterien nicht erfüllten, 314 Patient\*innen. Davon entfielen 220 (70%) der Fälle auf die Diagnose Glioblastom, IDH-Wildtyp (GBM). 34 Fälle (11%) wurden als Oligodendrogliom klassifiziert, wobei hiervon 28 (9%) vom WHO-Grad 2 waren und 6 (2%) vom WHO-Grad 3. Bei den restlichen 60 (19 %) Fällen handelte es sich um Astrozytome, IDH-mutiert. Diese Gruppe besteht aus Tumoren vom WHO-Grad 2 - 4. Wobei WHO-Grad 2 Tumore 37-mal (12%), WHO-Grad 3 Tumore 19-mal (6%) und WHO-Grad 4 nur viermal (1%) vorkamen. Hier zeigt sich die Tendenz, dass bei IDH-mutierten Oligodendrogliomen und Astrozytomen höhergradige Tumore seltener vorkommen als niedriggradige. Der Großteil der im Beobachtungszeitraum diagnostizierten zerebralen Tumore, die im Rahmen der Studie untersucht wurden, waren Glioblastome.

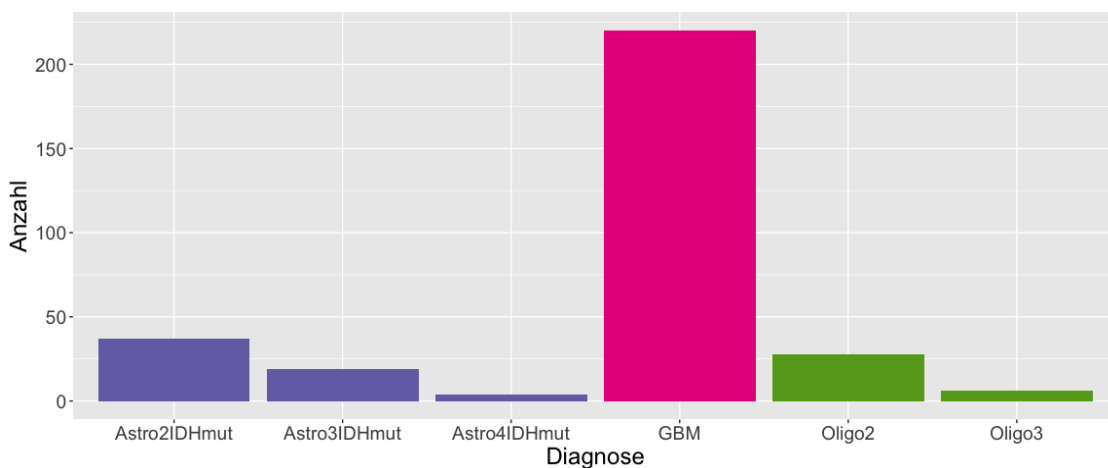


Abbildung 1: Verteilung der Diagnosen

### 9.1.2. Alter der Patient\*innen

Das Durchschnittsalter aller Patient\*innen in unserer Kohorte betrug zum Diagnosezeitpunkt 58.08 Jahre (95% CI 56.40-59.76). In der Gruppe der Glioblastome war das Durchschnittsalter 63.6 Jahre (95% CI 61.96- 65.16). Die Patient\*innen, bei denen ein Oligodendrogliomen oder Astrozytomen diagnostiziert wurde, waren bei der Diagnose jünger, mit einem Durchschnittsalter von 49.2 (95% CI 44.29- 54.06) bzw. 43.1 (95% CI 39.6- 46.5) Jahren.

Auch innerhalb der Diagnosegruppen variiert das Alter. Bei den Oligodendrogliomen beträgt das Durchschnittsalter beim WHO-Grad 2 46.6 Jahre (95% CI 41.72- 51.49) und beim WHO-Grad 3 61,2 Jahre (95% CI 45.25- 77.09). Der Altersdurchschnitt der Astrozytome WHO Grad 2 liegt bei 40.4 (95% CI 36.09- 44.72), der Astrozytome WHO Grad 3 bei 48.5 (95% CI 41.64- 55.31) und der Astrozytome WHO Grad 4 bei 41,8 (95% CI 37 - 46.50). Allerdings ist anzumerken, dass Oligodendrogliome WHO Grad 3 und speziell Astrozytome WHO 4 seltener vorkommen.

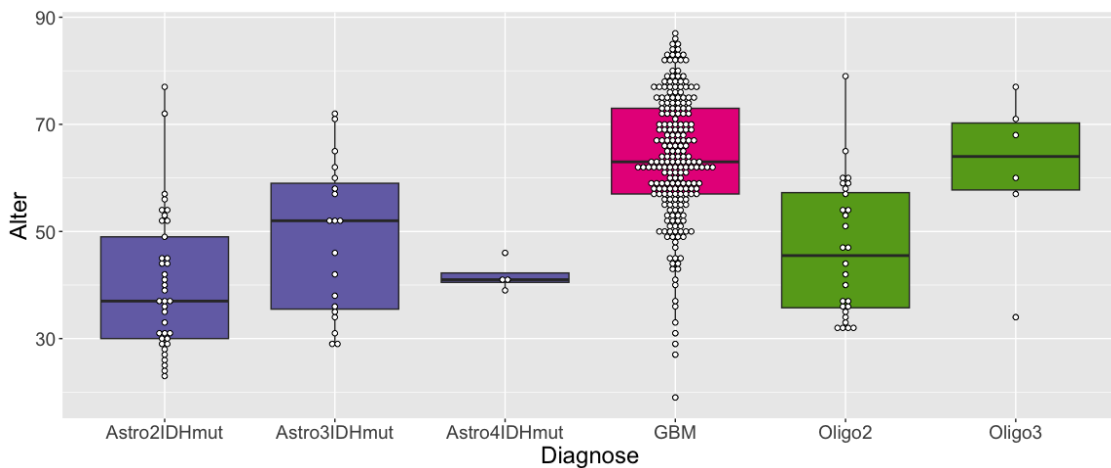


Abbildung 2: Alter zum Zeitpunkt der Diagnose

### 9.1.3. Überlebenszeiten

Die Überlebenszeiten unterscheiden sich stark zwischen den drei Diagnosegruppen. Während das mediane Überleben in der Gruppe der Glioblastome mit 11 Monaten am kürzesten ist, ist das Survival bei den Astrozytomen mit 9 Jahren und 6 Monaten bedeutend länger. Das Survival von Patient\*innen mit Oligodendrogliom ist im Vergleich mit den beiden vorher genannten Gruppen um einiges besser.

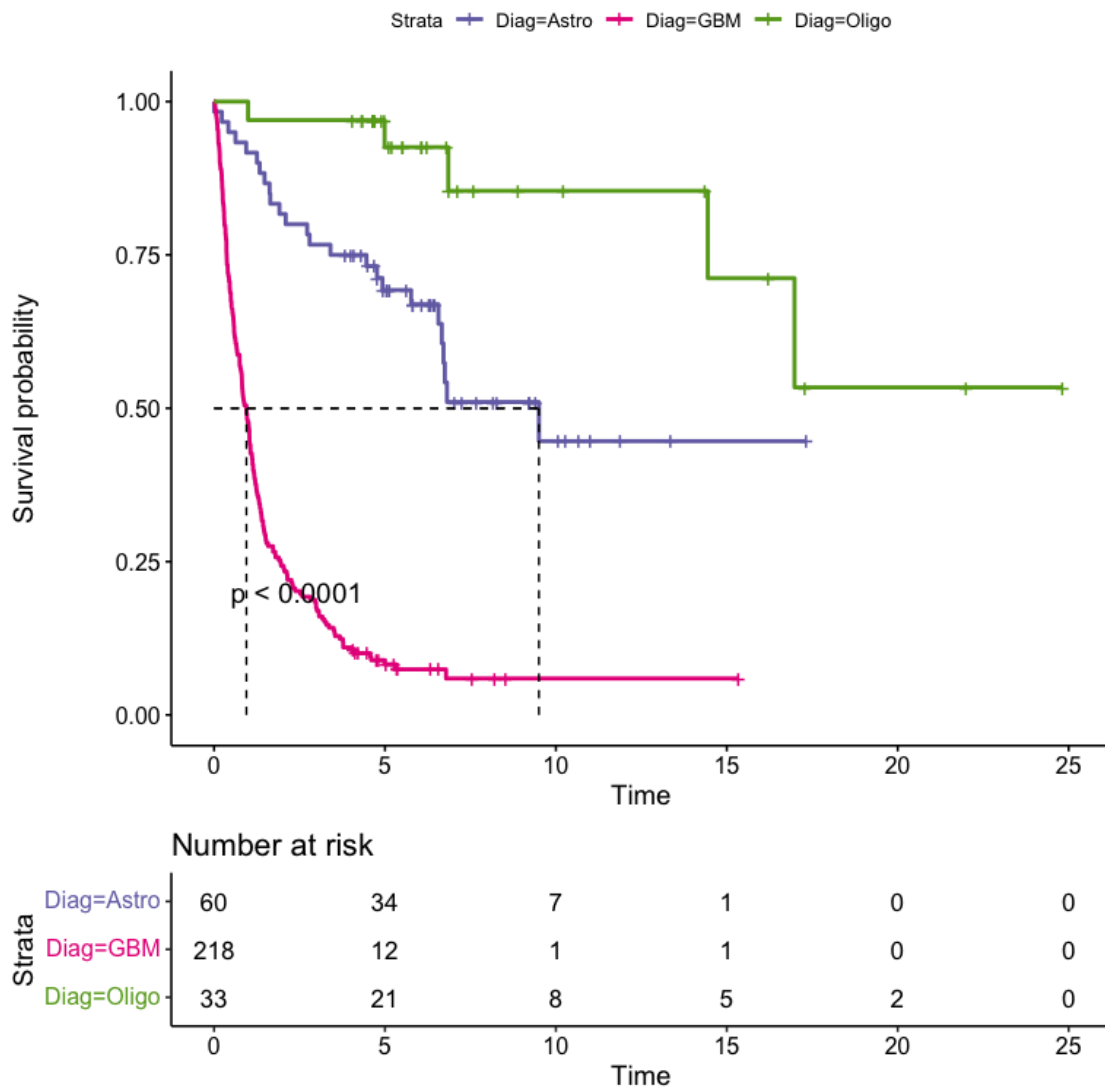


Abbildung 3 Survival innerhalb der Diagnosegruppen

### 9.1.4. MGMT

Es war für 99% der Glioblastome, 94% der Oligodendrogliome und 92% der Astrozytome ein MGMT-Wert vorhanden. Der durchschnittliche MGMT-Wert war zwischen den verschiedenen Gruppen sehr heterogen. Bei den GBM betrug der durchschnittliche MGMT-Wert 14,2 % (95% CI 11.9- 16.5). Bei näherer Betrachtung der MGMT-Werte in der Gruppe der Glioblastome zeigt sich, dass mehr als die Hälfte der GBMs MGMT unmethyliert sind, es aber auch viele Fälle mit hoher und sehr hoher MGMT-Methylierung gibt.

Der durchschnittliche MGMT-Wert der Oligodendrogliome betrug 28.4 % (95% CI 22.4 34.3). Wobei Oligodendrogliome vom WHO-Grad 2 einen MGMT-Wert von 23.8 (95% CI 18.9-28.7) hatten und dieser bei Oligodendrogliomen vom WHO-Grad 3 48,2 (95% CI 28.02 - 68.32) betrug und damit deutlich höher war.

Bei den Astrozytomen betrug der Mittelwert 16.5 (95% CI 13.2 - 19.9). Astrozytome WHO 2 hatten einen Wert von 15.2 (95% CI 11.2-19.1), Astrozytome WHO 3 von 17.8 (95% CI 10.7- 25) und die vier Astrozytome WHO 4 von 21.2 (95% CI 3.12- 39.26).

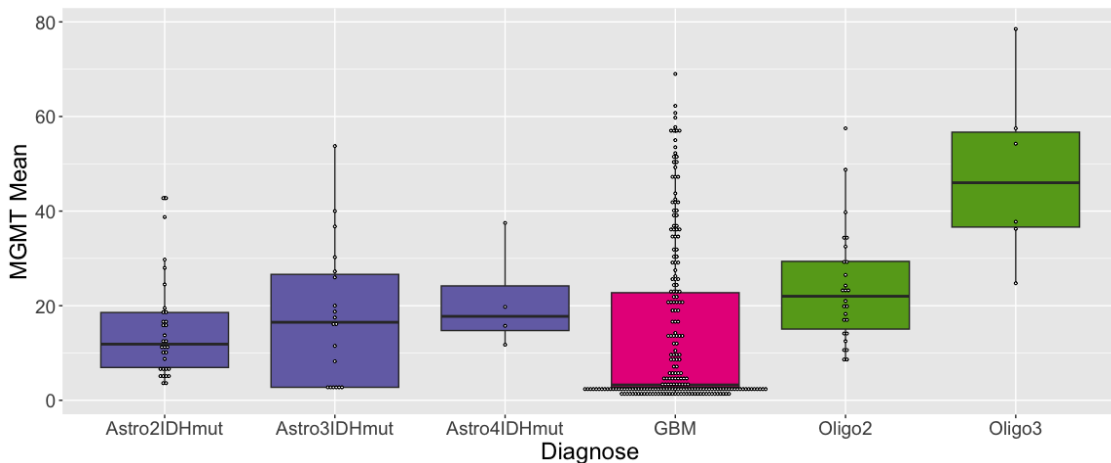


Abbildung 4: Verteilung des MGMT Mean

### 9.1.5. Auswertung der Gen Mutationen

Für 75% der Glioblastome, 100% der Oligodendrogliome und 95% der Astrozytome waren Daten zu den Genmutationen vorhanden.

Abgesehen von den für die Diagnose wichtigen IDH1/2 Mutationen kamen in den verschiedenen Tumorgruppen noch andere Mutationen in unterschiedlicher Häufigkeit vor.

Im Durchschnitt war bei den Glioblastomen ein (95% CI 0.86- 1.21) Gen aus dem Panel mutiert und bei den Oligodendrogliomen und Astrozytomen jeweils 1.62 (95% CI 1.23- 2) bzw. 1.5 (95% CI 1.32 -1.75) Gene.

Bei den Glioblastomen kam eine große Bandbreite an mutierten Genen vor, wobei ein Viertel der Fälle keine Mutationen in den untersuchten Genen aufwies. Die in über 10% der Fälle auftretenden häufigen Mutationen waren TP53, PTEN, EGFR und RB1. Definitionsgemäß gab es keine IDH1/2 Mutationen in dieser Gruppe.

Die Astrozytome waren knapp zur Hälfte TP53 mutiert, andere Mutationen kamen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vor.

Bei den Oligodendrogliomen kam mit 21 % eine CIC-Mutation häufig vor. Während die meisten Astrozytome IDH 1 mutiert waren, war bei knapp einem Fünftel der Oligodendrogliome eine IDH2 Mutation zu finden. Andere Mutationen kamen kaum vor.

## Verteilung der Gen-Mutationen

Gen	Alle	%Alle	GBM	%GBM	IDHmut	%IDHmut	Oligo	%Oligo
IDH1	83	32	0	0	55	96	28	82
TP53	75	29	48	29	26	46	1	3
PTEN	44	17	43	26	1	2	0	0
nomut	42	16	42	25	0	0	0	0
EGFR	25	10	24	15	0	0	1	3
Rb1	18	7	18	11	0	0	0	0
PIK3CA	13	5	10	6	1	2	2	6
TSC2	13	5	12	7	0	0	1	3
MET	11	4	9	5	1	2	1	3
LZTR1	9	4	8	5	1	2	0	0
IDH2	8	3	0	0	2	4	6	18
PTCH1	8	3	6	4	0	0	2	6
PTCH2	8	3	8	5	0	0	0	0
CIC	7	3	0	0	0	0	7	21
SMO	6	2	2	1	2	4	2	6
APC	4	2	4	2	0	0	0	0
KLLN	3	1	3	2	0	0	0	0
TSC1	3	1	2	1	0	0	1	3
VHL	3	1	3	2	0	0	0	0
MLH1	3	1	2	1	1	2	0	0
CDKN1A	2	1	2	1	0	0	0	0
JAK3	2	1	2	1	0	0	0	0
RET	2	1	1	1	1	2	0	0
ATRX	2	1	2	1	0	0	0	0
FGFR1	2	1	1	1	0	0	1	3
SMARCA4	2	1	1	1	0	0	1	3
SUFU	2	1	1	1	0	0	1	3
PTPN	2	1	2	1	0	0	0	0
ATM	2	1	2	1	0	0	0	0
AKT1	1	0	1	1	0	0	0	0
NOTCH1	1	0	1	1	0	0	0	0
CDKN2A	1	0	1	1	0	0	0	0
KRAS	1	0	1	1	0	0	0	0
NRAS	1	0	1	1	0	0	0	0
KIT	1	0	1	1	0	0	0	0
PDGFRA	1	0	0	0	1	2	0	0
NA	1	0	1	1	0	0	0	0
BRAF	1	0	1	1	0	0	0	0
TRAF7	1	0	1	1	0	0	0	0
GNA11	1	0	1	1	0	0	0	0
MAX	1	0	1	1	0	0	0	0
ACVR1	1	0	1	1	0	0	0	0
DDX3X	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 5 Verteilung der Gen Mutationen

### **9.1.6. Auswertung der Copy Number Variations (CNV)**

Für 26% der Glioblastome, 97% der Oligodendrogliome und 73% der Astrozytome waren Daten zu den Copy Number Variations vorhanden.

Die Anzahl der Copy Number Variations ganze Chromosomen betreffend war im Durchschnitt in der Gruppe der Glioblastome mit 3.6 am höchsten. (95% CI 3.04- 4.15). Die Oligodendrogliome und Astrozytome hatten eine Anzahl von 0,94 (95% CI 0.31- 1.57). bzw. 0,48 (95% CI 0.18-0.77). Während fast alle GBM CNVs aufwiesen, hatten 70% der Astrozytome und 64 % der Oligodendrogliome keine Kopienzahlveränderungen von ganzen Chromosomen.

## Verteilung der Copy Number Variations

Gen	Alle	%Alle	GBM	%GBM	IDHmut	%IDHmut	Oligo	%Oligo
nocnv	56	42	4	7	31	70	21	64
Gain7	42	31	36	63	3	7	3	9
Loss10	41	31	41	72	0	0	0	0
Loss13	18	13	14	25	3	7	1	3
Gain19	18	13	18	32	0	0	0	0
Loss14	15	11	11	19	1	2	3	9
Gain20	11	8	10	18	1	2	0	0
Loss 15	10	7	6	11	3	7	1	3
Loss22	9	7	8	14	1	2	0	0
Loss 4	8	6	2	4	1	2	5	15
Loss18	8	6	3	5	0	0	5	15
Loss6	7	5	6	11	1	2	0	0
Gain9	6	4	4	7	2	5	0	0
Gain17	5	4	3	5	1	2	1	3
Loss5	4	3	0	0	1	2	3	9
Gain2	4	3	4	7	0	0	0	0
Gain8	4	3	2	4	1	2	1	3
Gain 21	4	3	4	7	0	0	0	0
Loss8	3	2	3	5	0	0	0	0
Loss9	3	2	2	4	0	0	1	3
Loss16	3	2	3	5	0	0	0	0
Loss17	3	2	3	5	0	0	0	0
Loss19	3	2	2	4	1	2	0	0
Loss21	3	2	0	0	1	2	2	6
Gain1	3	2	3	5	0	0	0	0
Gain3	3	2	3	5	0	0	0	0
Gain16	3	2	3	5	0	0	0	0
Loss3	2	1	1	2	0	0	1	3
Loss12	2	1	1	2	0	0	1	3
Gain5	2	1	2	4	0	0	0	0
Gain11	2	1	0	0	0	0	2	6
Gain18	2	1	2	4	0	0	0	0
Loss7	1	1	0	0	0	0	1	3
Loss11	1	1	1	2	0	0	0	0
Gain4	1	1	1	2	0	0	0	0
Gain6	1	1	1	2	0	0	0	0
Gain22	1	1	1	2	0	0	0	0
Gain X	1	1	1	2	0	0	0	0

Abbildung 6 Verteilung der Copy Number Variations

## 9.2. Survival Analyse

### 9.2.1. MGMT

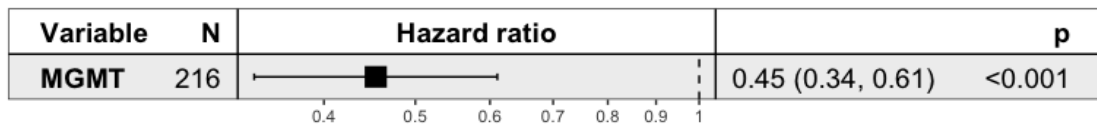


Abbildung 7: MGMT GBM

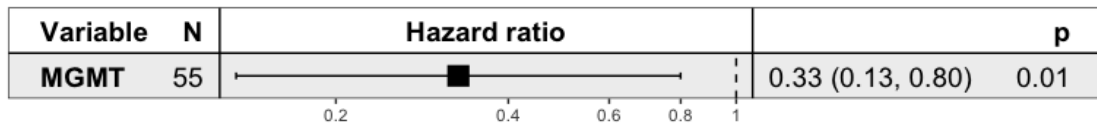


Abbildung 8: MGMT Astrozytome

Patient\*innen, mit einem Tumor, bei welchem der MGMT mean Wert über 5 war, hatten eine signifikant niedrigere Hazard ratio als solche mit niedrigerem MGMT-Wert. Dies gilt für die Gruppe der Astrozytome und der Glioblastome. Die Hazard ratio für MGMT  $\geq 5$  betrug 0.45 (95 CI 0,34-0,61) bei den Glioblastomen und 0.33 (95 CI 0,13-0,81) bei den Astrozytomen. Bei den Oligodendrogliomen kamen keine MGMT-Werte von unter 5 vor, damit waren alle Oligodendrogliome MGMT methyliert, und somit konnte keine Auswirkung quantifiziert werden.

### 9.2.2. Chromosomale Aberrationen

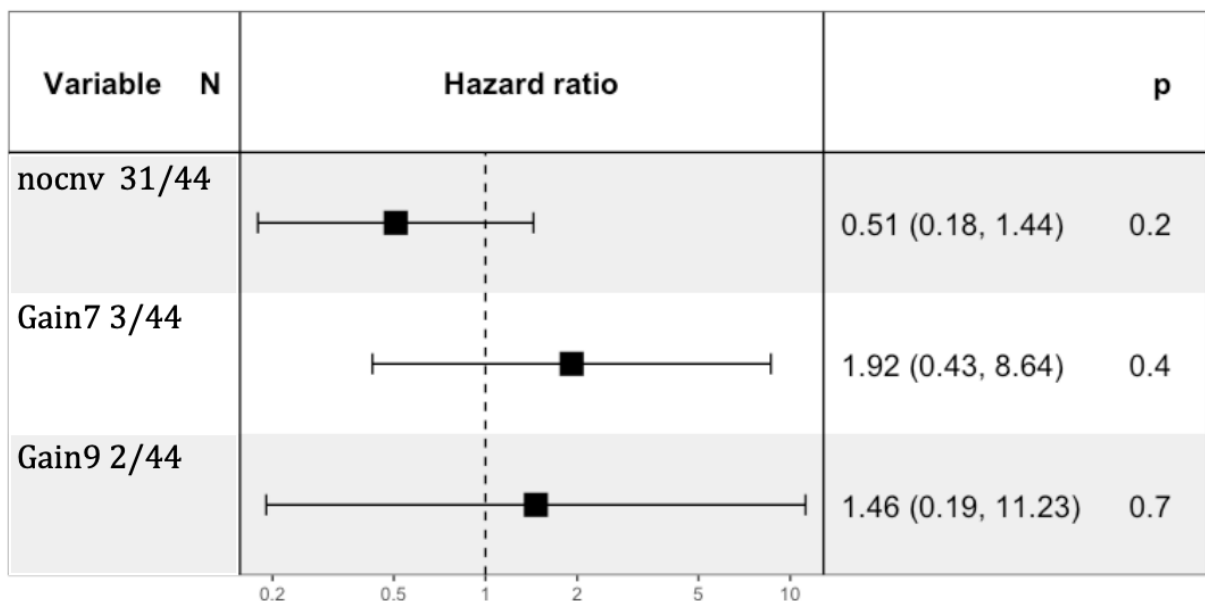


Abbildung 9 CNV Astrozytome

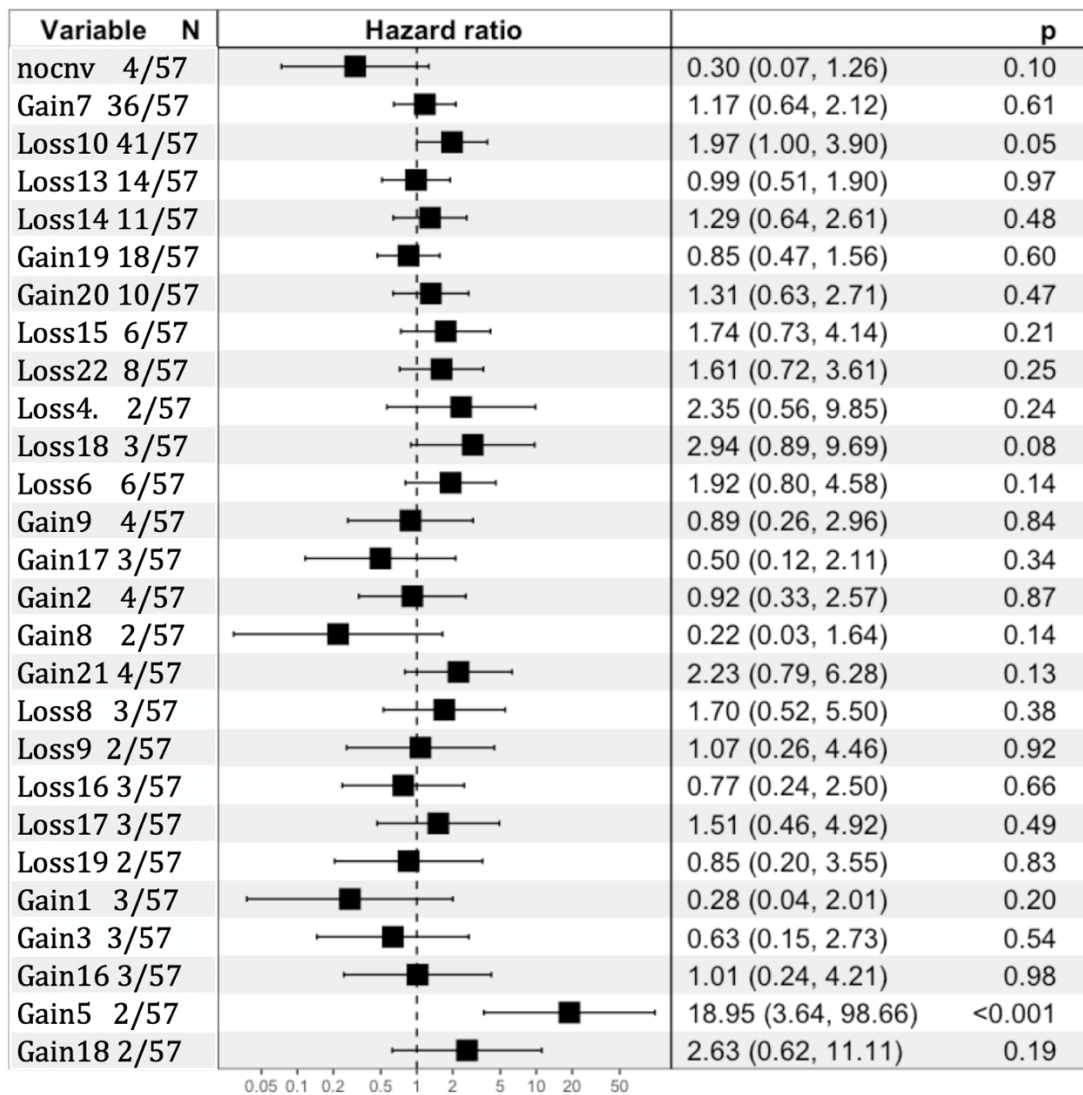


Abbildung 10 CNV Glioblastome

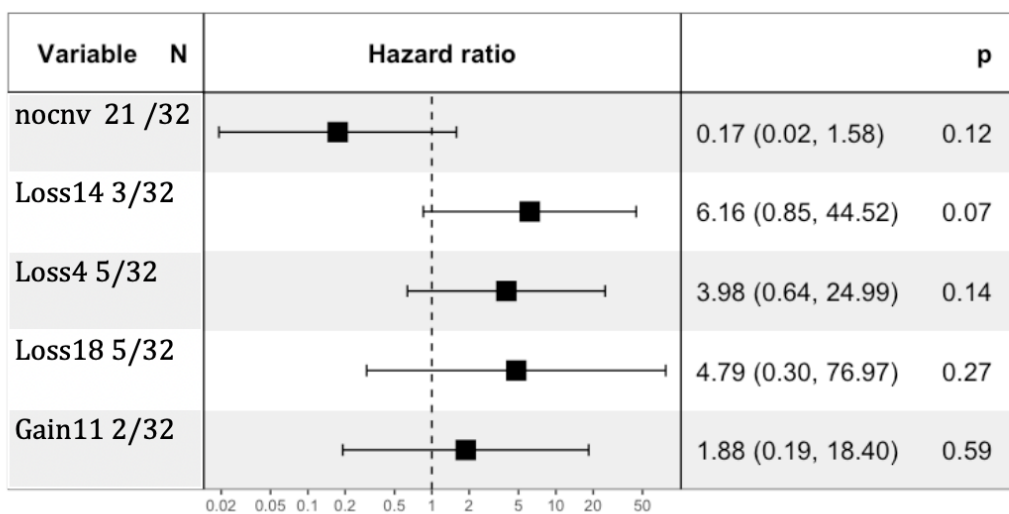


Abbildung 11 CNV Oligodendrogliome

In der Gruppe der Astrozytome und Oligodendrogliome war kein Parameter signifikant mit einem besseren oder schlechteren Survival verbunden.

Bei den Glioblastomen sind in der univariaten Cox- Regression Loss 10 und Gain 5 signifikant mit einer schlechteren Hazard ratio verbunden. Die Hazard Ratio für Loss10 beträgt 1,97 (95 % CI 1.00- 3.90) p 0.05, und für Gain5 18.95 (95% CI 3.64-98.66) p <0.001. Variablen mit einem p-Wert von mehr als 0,99 wurden nicht grafisch dargestellt. Dies betraf bei den Astrozytomen Loss 13 und Loss 15, bei den Oligodendrogliomen Gain 7, Loss 5 und Loss 21.

### 9.2.3. Auswertung der Gen Mutationen

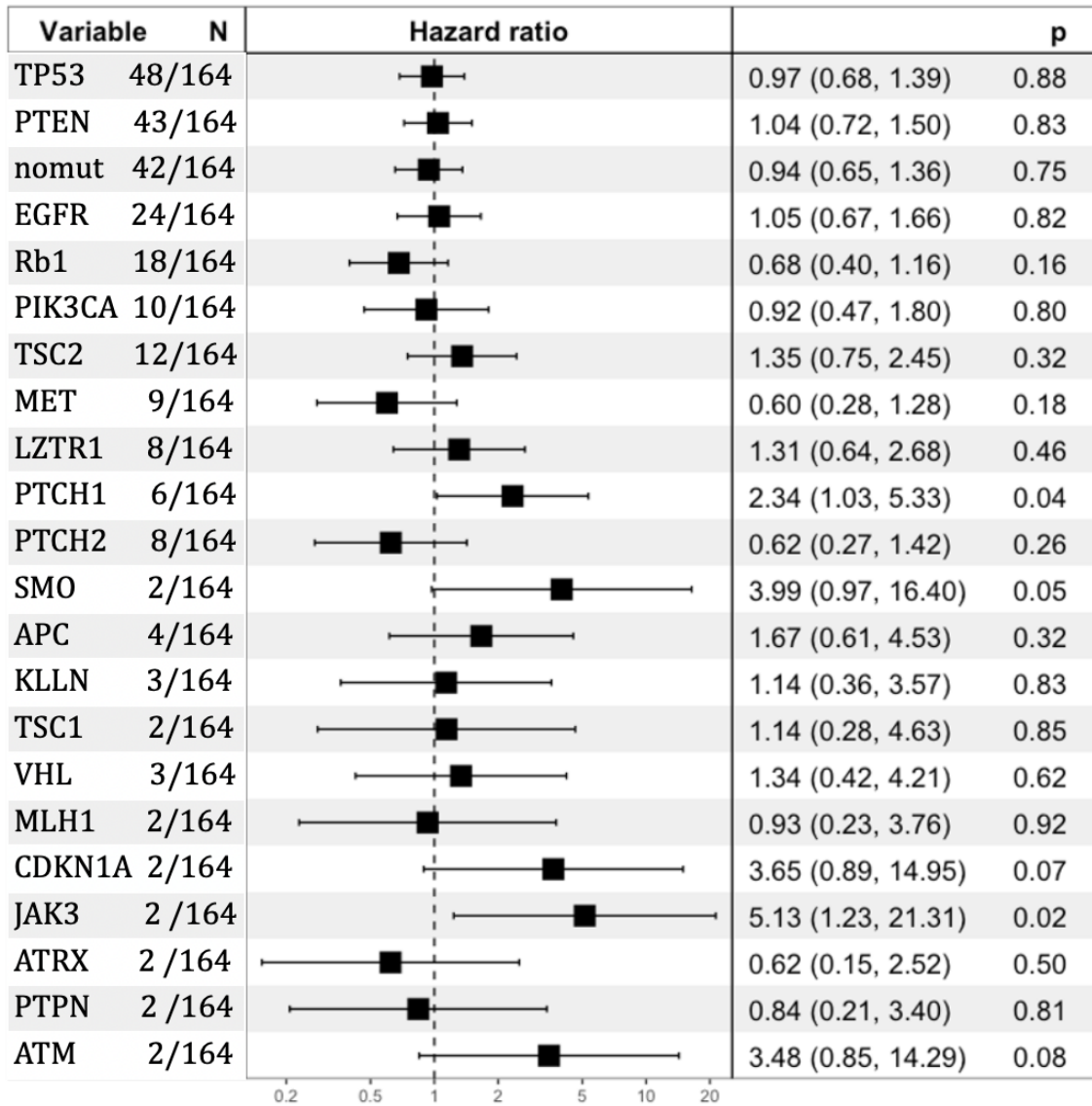


Abbildung 12 NGS Glioblastome

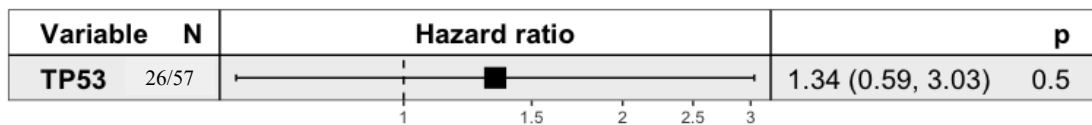


Abbildung 13 NGS Astrozytome

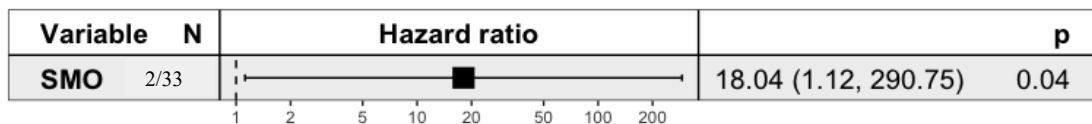


Abbildung 14 NGS Oligodendrogliome

PTCH1 und JAK3 Mutationen waren in der Gruppe der Glioblastome signifikant. Eine vorhandene PTCH1 Mutation erhöht bei den GBM die Hazard ratio auf 2.34 (95% CI 1.03-5.33)  $p=0.04$  und eine JAK3 Mutation auf 5.13 (95 % CI 1.23-21.31)  $p=0.02$ . Außerdem zeigte sich die SMO-Mutation signifikant, mit einer Hazard Ratio von 3,99 (95 % CI 0,97-16,40)  $p=0.05$ . ATM und CDKN1A Mutationen waren knapp nicht signifikant.

Es konnten keine für Astrozytome relevanten Mutationen gefunden werden.

Bei den Oligodendrogliomen ist die SMO-Mutation mit einem signifikant schlechteren Outcome assoziiert mit einer Hazard Ratio von 18.04 (95% CI 1.12-290.75)  $p=0.04$ .

Variablen, bei denen ein p-Wert von mehr als 0,99 berechnet wurde, wurden nicht grafisch dargestellt. Dies betraf bei den Astrozytomen SMO und bei den Oligodendrogliomen PIK3CA, PTCH1 und CIC.

## **10. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen verschiedener molekularpathologischer Biomarker auf das Survival bei diffusen glialen Hirntumoren zu untersuchen. Während die Bedeutung einiger Marker bereits etabliert ist, konnten einige weitere potenzielle prognostische Marker identifiziert werden.

### **10.1. Vergleichende Erläuterungen**

#### **10.1.1. Alter und Survival**

Während das mediane Überleben in der Gruppe der Glioblastome am kürzesten ist, ist das Survival bei den Astrozytomen und Oligodendrogliomen bedeutend länger.

Das mediane Survival bei den Astrozytomen ist mit dem in der Literatur beschrieben vergleichbar und beträgt 9 Jahre und 6 Monate. Bei den Glioblastomen ist das Overall Survival in unserer Kohorte, mit einer medianen Überlebenszeit von 11 Monaten, etwas kürzer als das in der Literatur mit eineinhalb Jahren angegebene Survival. Bei den Oligodendrogliomen sind in unserer Kohorte nach 25 Jahren noch mehr als die Hälfte der Patienten am Leben oder gingen für das Follow Up verloren, wodurch keine mediane Survival Zeit angegeben werden kann.(6)

#### **10.1.2. MGMT**

Der Marker MGMT methyliert / nicht methyliert war in dieser Kohorte sowohl bei den Astrozytomen als auch bei den Glioblastomen signifikant. Dies deckt sich mit den publizierten Beobachtungen, dass eine MGMT Methylierung sich positiv auf das Survival auswirkt. (20)(22)

Auffällig ist der Trend in der Gruppe der Astrozytome und besonders in jener der Oligodendrogliome, dass mit höherem WHO-Grad auch eine höhere MGMT Methylierung einhergeht. Bei den Glioblastomen fallen einige Tumore mit sehr hohem MGMT-Methylierungsgrad auf.

### 10.1.3. CNV

Wie in der Literatur bereits beschrieben(15), konnten bei den Oligodendrogliomen keine signifikanten Auswirkungen von Kopienzahlveränderungen ganzer Chromosomen auf das Survival gezeigt werden.

Die negative Auswirkung von Loss Chromosom 18 war in unserer Untersuchung bei den Glioblastomen nur grenzwertig nicht signifikant und könnte einen Marker für weitere Untersuchung darstellen. Bei den Glioblastomen war in unserer Gruppe anders als in anderen Studien (12) kein signifikanter Effekt von Veränderungen am Chromosom 19 oder 20 nachzuweisen.

Der in unserer Kohorte nachgewiesene negative Effekt von einem Gain 5, könnte auf das Gen SKP2, welches auf dem Chromosom 5 liegt, zurückzuführen sein. In einer kleinen japanischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass vor allem junge Patient\*innen welche an einem Glioblastom erkrankt waren, welches eine erhöhte Expression von SKP2 hatte, ein schlechteres Survival hatten. (53) Allerdings wurde hier die Expression von SKP2 direkt mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

In der vorliegenden Kohorte wirkte sich ein Loss 10 negativ auf das Survival aus. Allerdings hatte Gain 7 keine signifikanten Auswirkungen auf das Survival. Loss10/Gain7 ist einer jener Marker, welche die molekulare Diagnose eines Glioblastoms ermöglichen. Hierdurch stellt sich die Frage, ob ein alleiniger Loss10 als diagnostischer und prädiktiver Marker bei den Glioblastomen verwendet werden könnte. (1)

Bei den Astrozytomen scheinen Gain 7 und Gain 9 keine relevante Auswirkung auf das Overall Survival zu haben. Allerdings zeigt sich auch hier eine leichte Tendenz zu einem besseren Survival bei Fällen ohne Copy Number Variations. Dies könnte der Ausgangspunkt für weitere prospektive Studien sein.

Außerdem fallen in unserer Kohorte 4 Glioblastome auf welche keine Kopienzahlveränderungen ganzer Chromosomen aufweisen. Diese zeigen ebenfalls eine Tendenz zu einem besseren Survival.

#### **10.1.4. Gen Mutationen**

Obwohl statistisch nicht signifikant, zeigt sich in unserer Kohorte eine Tendenz für ein schlechteres Survival bei Patienten mit ATM mutiertem Glioblastom. Im Vergleich dazu wurde bei Glioblastomen mit einer immunhistochemisch nachgewiesenen niedrigen Expression von ATM ein besseres Survival berichtet. (25)

Während in der Arbeit von Pekmeczi et. al. sowohl Immunhistochemie als auch genetische Sequenzierung zum Nachweis von Veränderungen von ATRX genutzt wurden, wurde von uns ausschließlich NGS zur Feststellung des ATRX- Status verwendet. Pekmeczi et. al konnten einen signifikant positiven Effekt von ATRX Mutationen auf das Survival von Patient\*innen mit Glioblastom nachweisen. Dies lässt sich in unserer Kohorte nicht nachvollziehen, allerdings ist anzumerken, dass nur 2 Patient\*innen unserer Kohorte eine ATRX Mutation aufweisen (28)

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Auswirkungen von CIC auf das Survival bei Oligodendrogliomen gefunden werden, dies deckt sich auch mit den andernorts publizierten Beobachtungen. (29)

Die Mutation des RB1 Gens war in einer anderen Studie mit einem positiven Effekt auf das Survival von Glioblastomen vergesellschaftet (42) In unserer Kohorte ist ein positiver Trend zu erkennen. RB1 kam in unserer Kohorte bei den Astrozytomen nicht vor.

TP53-Mutationen war in unserer Kohorte in keiner Diagnosegruppe mit einem signifikanten Effekt auf das Survival verknüpft. Im Vergleich dazu wurde in anderen Studien von einem positiven Effekt im Fall von Astrozytomen bzw. einem negativen Effekt für die Gruppe der Oligodendrogliome berichtet. (46)

Wie bereits von anderen Autoren beschrieben (33)(32) zeigten EGFR-Mutationen keine signifikanten Auswirkungen auf das Survival.

Anders als in der Literatur beschrieben waren in unserer Kohorte weder PTEN (54) noch PIK3CA (41) mit einer signifikanten Auswirkung auf das Survival verbunden.

MLH-Mutationen führen bei Glioblastomen weder in unsere Kohorte noch in der Literatur zu einem signifikant längerem Survival. (39)

Interessant ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Kohorte PTCH1 zu einem signifikant schlechterem Survival führt, während PTCH2 eine Tendenz zu einem bessern Survival zeigt.

## **10.2. Kritische Reflexion**

Bezüglich der Aussagekraft der Ergebnisse gibt es teilweise Einschränkungen. Die Fallzahlen waren in den einzelnen Subgruppen, teilweise klein. Es kommen Entitäten wie das Astrozytom, IDH-mutiert, WHO CNS Grad 4 selten vor, auch Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p19q-kodeltiert, WHO CNS Grad 3 sind seltener. Manche Kopienzahlveränderungen oder Genmutationen sind häufig, andere waren nur in zwei oder drei Fällen in der Kohorte nachzuweisen. Ferner waren in der retrospektiven Datenerhebung nicht für alle Fälle jeweils die drei Untersuchungsmethoden (MGMT, CNV, und NGS-Mutationspanel) vorhanden. Aus diesem Grund konnte auch keine sinnvolle multivariate Untersuchung durchgeführt werden.

## **10.3. Schlussfolgerungen**

Abgesehen von den bereits etablierten molekularen Diagnosekriterien fanden wir einige Marker, welche für die WHO-Graduierung in den drei Diagnosegruppen und deren Prognose dienen könnten. Allerdings sind hierfür noch weitere Untersuchungen von größeren Patientenkollektiven und vergleichende Untersuchungen mit anderen Kollektiven notwendig.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit einige potenzielle Marker vorgestellt werden konnten, müssen diese in weiteren größer angelegten Studien validiert werden.

Allerdings ist nicht nur Forschung im Hinblick auf die Klassifizierung der Tumore notwendig, sondern auch im Bezug auf Therapiemethoden, vor allem für Glioblastome sind die aktuellen Therapiemethoden wenig effektiv.

## Literaturverzeichnis

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board . Central nervous system tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. ((WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6)).
2. Agaimy A, Amann K, Baba H, Baretton GB, Glatzel M, Sauter G. Pathologie: das Lehrbuch. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Höfler G, Kreipe HH, Moch H, Herausgeber. München: Elsevier; 2019. 1071 S.
3. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, u. a. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* März 2020;139(3):603–8.
4. McNamara C, Mankad K, Thust S, Dixon L, Limback-Stanic C, D’Arco F, u. a. 2021 WHO classification of tumours of the central nervous system: a review for the neuroradiologist. *Neuroradiology.* Oktober 2022;64(10):1919–50.
5. Osborn AG, Linscott LL, Salzman KL. Osborn’s brain: imaging, pathology, and anatomy. 3. Aufl. Salt Lake City: Elsevier; 2023.
6. Hufschmidt A, Rauer S, Glocker FX, Amtage F, Bär M, Behrens P, u. a., Herausgeber. *Neurologie compact: für Klinik und Praxis.* 9., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2022. 1201 S.
7. Wick W. et al. Gliome, S2k-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
8. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 25. Juni 2015;372(26):2481–98. 1
9. Satgunaseelan L, Sy J, Shivalingam B, Sim HW, Alexander KL, Buckland ME. Prognostic and predictive biomarkers in central nervous system tumours: the molecular state of play. *Pathology.* März 2024;56(2):158–69.
10. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, u. a. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology.* 2. August 2021;23(8):1231–51.
11. Baker TM, Waise S, Tarabichi M, Van Loo P. Aneuploidy and complex genomic rearrangements in cancer evolution. *Nat Cancer.* 29. Jänner 2024;5(2):228–39.
12. Nuechterlein N, Shelbourn A, Cimino PJ. Whole gain of chromosome 19, not co-gain of chromosomes 19 and 20, characterizes a class of glioblastomas with more favorable outcomes. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 14. November 2023;nlad092.
13. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, u. a. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for „Diffuse astrocytic glioma, IDH-

- wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV“. *Acta Neuropathol.* November 2018;136(5):805–10.
14. Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AGH, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MIJ, u. a. Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes & Cancer.* März 2002;33(3):279–84.
  15. Richardson TE, Williams M, Galbraith K, Mirchia K, Kumar A, Xing C, u. a. Total copy number variation, somatic mutation burden, and histologic grade correlate with clinical outcome in oligodendroglioma. *NP.* 1. September 2020;39(09):238–42.
  16. R DM, M C, M B, D C, Ra F, M DBDC, u. a. MGMT and Whole-Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 27. Juni 2022 [zitiert 6. Februar 2023];23(13). Verfügbar unter: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5wx04de.han.medunigraz.at/35806153/>
  17. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* Juli 2000;6(7):2585–97.
  18. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, u. a. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology.* 14. Februar 2019;21(2):167–78.
  19. Brandner S, McAleenan A, Kelly C, Spiga F, Cheng HY, Dawson S, u. a. MGMT promoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: a comprehensive meta-analysis based on a Cochrane Systematic Review. *Neuro-Oncology.* 1. September 2021;23(9):1457–69.
  20. Bell EH, Zhang P, Fisher BJ, Macdonald DR, McElroy JP, Lesser GJ, u. a. Association of MGMT Promoter Methylation Status With Survival Outcomes in Patients With High-Risk Glioma Treated With Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis From the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *JAMA Oncology.* 1. Oktober 2018;4(10):1405–9.
  21. Karschnia P, Weller J, Blobner J, Stoecklein VM, Dorostkar MM, Rejeski K, u. a. Subventricular zone involvement is associated with worse outcome in glioma WHO grade 2 depending on molecular markers. *Sci Rep.* 8. Oktober 2021;11(1):20045.
  22. Zhao H, Wang S, Song C, Zha Y, Li L. The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 12. Oktober 2016;14(1):261.
  23. Choi M, Kipps T, Kurzrock R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics.* 1. August 2016;15(8):1781–91.
  24. Kim N, Kim SH, Kang SG, Moon JH, Cho J, Suh CO, u. a. ATM mutations improve radio-sensitivity in wild-type isocitrate dehydrogenase-associated high-grade glioma:

- retrospective analysis using next-generation sequencing data. *Radiat Oncol.* Dezember 2020;15(1):184.
25. Romano FJ, Guadagno E, Solari D, Borrelli G, Pignatiello S, Cappabianca P, u. a. ATM and p53 combined analysis predicts survival in glioblastoma multiforme patients: A clinicopathologic study. *J of Cellular Biochemistry.* Juni 2018;119(6):4867–77.
  26. Orphanet: Alpha thalassemia X linked intellectual disability syndrome [Internet]. [zitiert 8. Februar 2024]. Verfügbar unter: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=847&lng=EN](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=847&lng=EN)
  27. Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front Oncol.* 29. September 2017;7:236.
  28. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Hansen H, u. a. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol.* Juni 2017;133(6):1001–16.
  29. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, Chittaranjan S, Blough MD, An J, u. a. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol.* Jänner 2012;226(1):7–16.
  30. Kwapiszewski R, Pawlak SD, Adamkiewicz K. Anti-EGFR Agents: Current Status, Forecasts and Future Directions. *Targ Oncol.* Dezember 2016;11(6):739–52.
  31. Rodriguez SMB, Kamel A, Ciubotaru GV, Onose G, Sevastre AS, Sfredel V, u. a. An Overview of EGFR Mechanisms and Their Implications in Targeted Therapies for Glioblastoma. *IJMS.* 5. Juli 2023;24(13):11110.
  32. Schaff LR, Yan D, Thyparambil S, Tian Y, Cecchi F, Rosenblum M, u. a. Characterization of MGMT and EGFR protein expression in glioblastoma and association with survival. *J Neurooncol.* Jänner 2020;146(1):163–70.
  33. González-Tablas M, Arandia D, Jara-Acevedo M, Otero Á, Vital AL, Prieto C, u. a. Heterogeneous EGFR, CDK4, MDM4, and PDGFRA Gene Expression Profiles in Primary GBM: No Association with Patient Survival. *Cancers.* 17. Jänner 2020;12(1):231.
  34. Horn F, Herausgeber. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium* [Internet]. 8. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2021 [zitiert 24. Februar 2022]. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b0000000082>
  35. Solomou G, Finch A, Asghar A, Bardella C. Mutant IDH in Gliomas: Role in Cancer and Treatment Options. *Cancers.* 23. Mai 2023;15(11):2883.
  36. Picca A, Di Stefano AL, Sanson M. Current and future tools for determination and monitoring of isocitrate dehydrogenase status in gliomas. *Current Opinion in Neurology.* Dezember 2018;31(6):727–32.

37. Kim B, Tabori U, Hawkins C. An update on the CNS manifestations of brain tumor polyposis syndromes. *Acta Neuropathol.* April 2020;139(4):703–15.
38. Yang RR, Li KKW, Zhang ZY, Chan AKY, Wang WW, Chan DTM, u. a. Mismatch repair proteins PMS2 and MLH1 can further refine molecular stratification of IDH-mutant lower grade astrocytomas. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* September 2021;208:106882.
39. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Hedderich J, Hattermann K, Maximilian Mehdorn H, u. a. Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurological Research.* Februar 2015;37(2):95–105.
40. Lai K, Killingsworth MC, Lee CS. Gene of the month: *PIK3CA*. *J Clin Pathol.* April 2015;68(4):253–7.
41. Tanaka S, Batchelor TT, Iafrate AJ, Dias-Santagata D, Borger DR, Ellisen LW, u. a. PIK3CA activating mutations are associated with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. *acta neuropathol commun.* Dezember 2019;7(1):66.
42. Dono A, Ramesh AV, Wang E, Shah M, Tandon N, Ballester LY, u. a. The role of *RBI* alteration and 4q12 amplification in IDH-WT glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances.* 1. Jänner 2021;3(1):vdab050.
43. Richardson TE, Walker JM. The Prognostic Significance of RB and PI3K Pathway Alterations in IDH-Mutant Grade II/III Astrocytomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 1. September 2020;79(9):1019–23.
44. Zhang X, Katsakhyan L, LiVolsi VA, Roth JJ, Rassekh CH, Bagley SJ, u. a. TP53 Mutation and Extraneural Metastasis of Glioblastoma: Insights From an Institutional Experience and Comprehensive Literature Review. *American Journal of Surgical Pathology.* November 2021;45(11):1516–26.
45. Gillet E, Alentorn A, Doukouré B, Mundwiller E, van Thuij H, Reijneveld JC, u. a. TP53 and p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *J Neurooncol* [Internet]. 4. März 2014 [zitiert 12. April 2023]; Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s11060-014-1407-4>
46. Noor H, Briggs NE, McDonald KL, Holst J, Vittorio O. TP53 Mutation Is a Prognostic Factor in Lower Grade Glioma and May Influence Chemotherapy Efficacy. *Cancers.* Jänner 2021;13(21):5362.
47. R version 4.3.2 (2023-10-31) -- „Eye Holes“ Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: aarch64-apple-darwin20 (64-bit).
48. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. In: Shaw AC, Herausgeber. *Immunosenescence* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [zitiert 27. Jänner 2024]. S. 249–64. (Methods in Molecular Biology; Bd. 1343). Verfügbar unter: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2963-4\\_19](https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2963-4_19)

49. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1. September 2013;137(9):1296–303.
50. QIAGEN®. MGMT Pyro Handbook.
51. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. November 2021;82(11):801–11.
52. Merriman B, R&D Team IT, Rothberg JM. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*. Dezember 2012;33(23):3397–417.
53. Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, u. a. Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Science*. Oktober 2005;96(10):676–83.
54. Brito C, Azevedo A, Esteves S, Marques AR, Martins C, Costa I, u. a. Clinical insights gained by refining the 2016 WHO classification of diffuse gliomas with: EGFR amplification, TERT mutations, PTEN deletion and MGMT methylation. *BMC Cancer*. Dezember 2019;19(1):968.