

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
des Unfallkrankenhauses Berlin ( ukb )

DISSERTATION

Der Einfluss der Promotormethylierung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-  
Methyltransferase auf die Überlebensdauer bei Patienten mit Glioblastoma  
multiforme und der Behandlung mit Carmustin - Wafern

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paweł Benedykt Gutowski

aus Elbląg

Datum der Promotion: 09.09.2016

*Für Iwona und Luisa*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Glioblastoma multiforme</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Allgemeine Informationen- Definition, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Histopathologie.	7
1.1.2 Therapie .....	10
<b>1.2 Nitroharnstoffe – Carmustin</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Carmustin –Wafer</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase- MGMT</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 MGMT Bestimmungsmethoden .....	15
<b>1.5 Einführung in die Dissertation</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Material und Methodik</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Allgemein</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Bestimmung der Methylierungsrate des O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Promoters</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Schneiden und Entparaffinierung: .....	21
2.2.2 Mikrodissektion und DNA Extraktion mit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland): .....	21
2.2.3 Bisulfitbehandlung mit EpiTect der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland).....	21
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	24
2.2.5 Pyrosequenzierung: .....	25
<b>2.3 Statistische Auswertung</b> .....	<b>27</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Allgemein</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Geschlechterverteilung.....	28
3.1.2 Alter.....	29
3.1.3 Karnofsky perfomance status scale.....	30
3.1.4 Tumorlokalisation.....	31
3.1.5 Rezidiveingriffe.....	32
3.1.6 Resektionsgrade .....	34
<b>3.2 Unerwünschte Ereignisse</b> .....	<b>35</b>

<b>3.3</b>	<b>Anzahl der implantierten Wafer .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>MGMT- Promotor- Methylierung .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Überlebensdauer .....</b>	<b>38</b>
3.5.1	Schwellenwert für die MGMT Promotor Methylierungsrate in Abhängigkeit zur Überlebensdauer.....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Methodik .....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Patientengut .....	50
4.2.2	Methode zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus.....	51
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Resümee .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Quellen.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>78</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

5 - ALA	5-Aminolävulinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCNU	Carmustin
cCT	Kranielle Computertomographie
cMRT	Kranielle Magentrezonanztomographie
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTIC	Dacarbazin
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
GBM	Glioblastoma multiforme
GKR	Gemeinsames Krebsregister Berlin
Gy	Grey
HE	Hämatoxylin-Eosin
kDa	Kilo-Dalton

KPS	Karnofsky performance score
MeCCNU	Semustin
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMS	Methylmethane sulfonate
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MSP	Metyhlierungsspezifische Polymerasenkettenreaktion
p53	Protein 53
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q-MSP	Quantitative Metyhlierungsspezifische Polymerasenkettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
SQ-MSP	Semiquantitative Metyhlierungsspezifische Polymerasenkettenreaktion
TMZ	Temzolomid
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization

## **Zusammenfassung**

Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV ist ein bösartiger hirneigener Tumor, der eine mediane Überlebensdauer von knapp 15 Monaten ermöglicht. Selbst diese erschreckende Zahl ist jedoch nur erreichbar, wenn ein multimodales Therapieregime verfolgt wird. Der aktuelle Therapiestandard umfasst die Gewebesicherung und bestenfalls die größtmögliche Tumorsektion, die adjuvante und konkomitante Radio- und Chemotherapie. In ausgewählten Fällen kann erwogen werden, ein lokales Chemotherapeutikum in die Resektionshöhle zu implantieren. Die molekulargenetischen Untersuchungen des Tumorgewebes ermöglichen es, gewisse prognostische und prädiktive Faktoren in die Therapieplanung einfließen zu lassen.

In der vorliegenden retrospektiven Untersuchung wird der Einfluss der MGMT-Promotormethylierung auf das Überleben von Patienten untersucht, die an einem Glioblastoma multiforme erkrankt waren. Patienten, denen lokale Chemotherapeutikaträger implantiert wurden, werden dabei einer Kontrollgruppe, die diese Implantate nicht erhalten hat, gegenüber gestellt.

Es wurden insgesamt 103 Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum von 2008 bis 2014 operiert wurden. Die MGMT Promotormethylierung wurde mit Hilfe der Pyrosequenzierung untersucht. Diese Methode erlaubt es, quantitative Angaben der Methylierung zu machen.

Die Ergebnisse zeigten keinen pauschalen Überlebensvorteil für die Patientengruppe, die Carmustin-Wafern implantiert bekommen haben. Es konnte jedoch auch kein Nachteil bezüglich unerwünschter Ereignisse für diese Patientengruppe nachgewiesen werden. Schaut man sich den Einfluss der MGMT Promotor Methylierung auf die Überlebensdauer an, so erhält man ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe, die eine Methylierung über neun Prozent hat und der Gruppe, bei der die Methylierungsrate unter neun Prozent liegt.

Jedoch zeigt sich in der Subgruppenanalyse, dass die Gliadelgruppe mit einer über neunprozentigen Methylierung einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Restkohorte besitzt.

Ein Sekundärziel dieser Arbeit war die Bestimmung eines Grenzwertes, ab welchem die MGMT-Promotor-Methylierung einen Einfluss auf die Überlebensdauer der mit Carmustin-Wafern therapierten Patienten hat. Ein solcher Grenzwert konnte nicht ermittelt werden. Dafür zeigten sich tendenzielle Überlebensvorteile für die Gruppen, die eine Methylierungsrate zwischen neun und fünfzig Prozent besitzen. Die Subgruppen mit den höchsten Methylierungen von über 50 % schnitten unerwartet schlechter ab.

## **Abstract**

Glioblastoma multiforme is the most common and most aggressive primary brain tumor (WHO grade IV). Despite all the care taken to treat the tumor the disease remains incurable. Less than 10 % of patients survive for 4-5 years. The goal of the treatment is to maintain the quality of life and to increase the survival time. The current standard of care includes surgery and an adjuvant and concomitant radio-chemotherapy. In addition, after proceeding a gross total resection, it exists the opportunity to implant Wafer containing the chemotherapeutic Carmustine (Gliadel®). The benefit of chemotherapy may depend on the repair enzyme activity- 06-methylguanine-methyltransferase (MGMT). It is associated with tumor resistance, because of the fact that MGMT reverse the impact of them. Inactivation of MGMT gene in the tumor tissue by methylation of the promotor region has been associated with good outcomes in clinical trials. Thus, the methylation of MGMT is a strong predictor for therapy success. Thus, a retrospective study was conducted to analyze the survival benefit to glioblastoma multiforme patients arm without carmustine wafer compared with carmustine wafer -treated patients in terms of MGMT-

promotor methylation status maintained by pyrosequencing. Therefore we included between 2008 and 2014 103 patients meeting the inclusion criteria. Our data reveal no survival benefit for the patient arm treated with Gliadel, but also no increased additional risk for this patients. Furthermore we could not detect a significant survival benefit for the patients with a MGMT promotor methylation above nine per cent. Nevertheless, our data reveal a significant survival benefit favoring the methylated Gliadel group. In addition, the extent of MGMT methylation indicates a predictive value in OS favoring the group with methylation rates between >9% and 50%.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Glioblastoma multiforme**

### **1.1.1 Allgemeine Informationen- Definition, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Histopathologie**

Das Glioblastoma multiforme ist ein bösartiger primärer Tumor des zentralen Nervensystems. Harvey Cushing und sein Assistent Percival Bailey veröffentlichten im Jahre 1927 eine Klassifizierung der Gliome und prägten als erste den Begriff Glioblastoma multiforme auf Grund seines hochvariablen histologischen Bildes<sup>1</sup>. Seit 1956 werden Tumorentitäten des zentralen Nervensystems in Anbetracht ihrer Histologie und biologischen Verhaltens mit Hilfe der Klassifikation der WHO eingeteilt. Das Glioblastom ist als Grad-IV-Tumor eingestuft. Dies geht mit einem äußerst aggressiven Verlauf einher, jenseits von kurativen Therapiehoffnungen. Die Realität sieht mit einer medianen Überlebensdauer von knapp 15 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5 % trotz multimodaler Therapieformen erschreckend aus<sup>2,3,4</sup>. Hauptsächlich entsteht der Tumor De novo aus Gliazellen, kann sich aber auch als fortgeschrittener Nachkömmling aus einem niedriggradigen Astrozytom entdifferenzieren. Der durchschnittliche Patient erkrankt in der sechsten Lebensdekade und ist vom Geschlecht männlich. Die häufigsten Erstsymptome mit denen ein Patient ärztlich vorstellig wird, sind bedingt durch den erhöhten intrakraniellen Druck, eine lokal raumfordernde Wirkung, sowie topographiespezifische Tumorlokalisationen. Nicht selten sind psychische Alterationen, meist beobachtet durch die Angehörigen, ein Grund für den Arztbesuch<sup>5</sup>.

In den meisten Fällen wird zur Beseitigung der anamnestischen Unklarheiten eine weiterführende Diagnostik veranlasst. Dabei spielt die kraniale Computertomographie die wichtigste Rolle bei der Erstdiagnostik. Hierbei zeigt sich typischerweise eine Massenverschiebung, inhomogene Gewebedichte mit fingerförmigem Marklagerödem<sup>6</sup>. Der nächste Diagnostikschritt wäre die Veranlassung eines cMRT's mit Kontrastmittelgabe. Charakteristisch ist dabei in den T1-gewichteten Bildern ein girlandenartig Kontrast anreichernder Tumor mit einem deutlichen fingerförmigen Marklagerödem und einer zentralen Nekrose<sup>7</sup>. In der späteren Patientennachsorge stellt die bildmorphologische Kontrolle ein wichtiges Glied in der Gliomtherapie dar. Die Wirksamkeit der Therapie wird anhand der sogenannten Macdonald-Kriterien beurteilt, die das bildmorphologische Korrelat in vier Stadien einstufen:

- *Complete Response (CR)*: komplette Rückbildung der kontrastmittelaufnehmenden Tumorareale im cCT oder cMRT;
- *Partial Response (PR)*: Reduktion der kontrastmittelaufnehmenden Tumorareale um mindestens 50%;
- *Progressive Disease (PD)*: Zunahme des Tumolvolumens um mindestens 25% oder bei Nachweis einer neuen Läsion;
- *Stable Disease (SD)*: wenn weder die Kriterien für PR noch die für PD erfüllt sind<sup>8</sup>.

Nun beginnt gemeinsam mit dem Patienten die Planung des therapeutischen Vorgehens. Wird der Tumor als gut operabel mit einem geringen Risiko für bleibende neurologische Schäden eingeschätzt, sollte eine mikrochirurgische Totalresektion, also die vollständige Entfernung des kontrastmittelaufnehmenden Tumolvolumens in der T1-gewichteten MRT, angestrebt werden um die Rezidivfreiheit und somit die Überlebenszeit positiv zu beeinflussen<sup>9,10,11</sup>. Dabei gehört zur modernen operativen Strategie die Resektion mit Hilfe von fluoreszierender 5-Aminolävulinsäure (Gliolan), die dabei hilft Tumorgewebe vom angrenzenden gesunden Gewebe abzugrenzen<sup>10</sup>. Wenn klinisch eine Biopsie gegenüber einer Teilresektion vertretbar ist, ist dies zu favorisieren, da kein klinischer Vorteil hinsichtlich der Überlebenszeit für das Patientengut nach einer Teilresektion entsteht<sup>11</sup>. Interessanterweise hat die präoperative im Gegensatz zur postoperativen Tumorgröße keinen Einfluss auf die Überlebenszeit<sup>12</sup>. Die weitere Therapiestrategie beim Glioblastom impliziert eine onkologische und strahlentherapeutische Behandlung. Jedoch setzt dies die histologische und molekulargenetische Diagnosestellung voraus. Hierbei präsentiert sich im histologischen Erscheinungsbild eine hohe Zelldichte mit



zellulären und nukleären Polymorphien. Charakteristisch sind oftmals glomeruloide Endothelproliferate sowie Tumorgewebsnekrosen mit pallisadenartigen begrenzenden Tumorzellraum und eine ausgedehnte Thrombosierungsneigung der Tumorgefäße<sup>5</sup>. Auf Grund des histopathologischen Polymorphismus kann das Glioblastom subtypisiert werden. Die Subtypen weisen ebenfalls unterschiedliche prognostische Pendanten auf.

Das Riesenzellglioblastom ist durch Vorherrschen von Tumorriesenzenellen gekennzeichnet. Es bietet einen etwas günstigeren Verlauf und tritt eher im jüngeren Erwachsenenalter auf<sup>13</sup>.

Das Gliosarkom typisiert neben der astrozytären Komponente einen mesenchymalen Tumoranteil. Hinsichtlich des prognostischen Faktors besteht ein Überlebensnachteil<sup>14</sup>.

Zu erwähnen ist ebenso die Unterscheidung der De-novo-Glioblastome von entdifferenzierten Abkömmlingen der Astrozytome (WHO II), Oligoastrozytomen (WHO II) und Oligodendrogliomen (WHO II), die trotz Ihrer erreichten WHO-IV-Graduierung prognostisch dezent günstiger verlaufen.

Nun reicht die rein mikroskopische Beurteilung eines Tumorgewebes längst nicht mehr aus. Man behilft sich mit molekulargenetischen Untersuchungen, um dem Glioblastom einen genetischen Fingerabdruck zu verleihen. Leider beschränkt sich der Polymorphismus nicht nur auf die mikroskopische Ebene – auch auf molekulargenetischer Ebene ist von einer genetischen Heterogenität zu sprechen. Eine endgültige Subtypisierung gelang bis dato bei weiterhin neu hinzukommenden genetischen Variationen nicht. Allerdings ist man sich auf Grund der klinisch wichtigen Reflektion einig, das Glioblastom in zwei genetische Typen – Typ 1 und Typ 2 zu differenzieren.

Vom Typ-1-Glioblastom spricht man, wenn ein Allelverlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 korrespondierend mit p53-Genmutation nachzuweisen ist. Diese genetische Läsion ist ein Hinweis für die Entstehung des Glioblastoms durch Progression aus einem Astrozytom WHO Grad II oder III. Weitere progressionsfördernde Allelverluste, die auf dem Evolutionsweg einer stillen Vorläuferzelle bis zum ausgewachsenen Glioblastom aufzufinden sind, betreffen das Chromosom 10 und 19q.

Das Glioblastoma multiforme vom Typ 2 zeigt molekulargenetisch eine EGF-Rezeptor-Amplifikation in enger Gefolgschaft eines Allelverlustes von Chromosom 10 und wird als De-novo-Glioblastom bezeichnet.

Das durchschnittliche Patientenalter beim Typ 1 liegt bei ungefähr 40 Jahren und beim Typ 2 bei 56 Jahren. Prognostisch günstiger verläuft der Typ 1<sup>15,16</sup>.

### 1.1.2 Therapie

Nach endgültiger Einteilung der Tumorentität durch den Pathologen kann die entsprechende adjuvante Therapieform initiiert werden. Aktuell gilt das Stupp-Protokoll als Goldstandard in der Glioblastomtherapie nachdem in der durch die European Organisation for Research and Treatment of Cancer ( EORTC ) initiierten randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie ein klarer Überlebensvorteil der kombinierten Radio-Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie nachgewiesen werden konnte<sup>17</sup>. Das Stupp-Protokoll umfasst die Bestrahlung für fünf Tage die Woche von Montag bis Freitag über eine Periode von sechs Wochen mit jeweils einer Strahlendosis von zwei Grey bis zur einer Gesamtstrahlendosis von 60 Grey. Per Linearbeschleuniger wird das Bestrahlungsfeld bestehend aus dem gesamten Tumolvolumen und einem 2-3cm großen Tumorrund von verschiedenen Seiten zur Sicherung des bestmöglichen Erhalts von gesundem Gewebe bestrahlt. Konkomitant erfolgt, beginnend mit dem ersten Tag der Radiotherapie, die Gabe des Chemotherapeutikums Temozolomid mit einer Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup> pro Tag, sieben Tage die Woche bis zum letzten Tag der Strahlentherapie, jedoch nicht länger als 49 Tage. Nach einer vier wöchigen Unterbrechung wird die adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid fortgeführt. Die adjuvante Temozolomid-Therapie besteht aus bis zu sechs 28-tägigen Zyklen, in denen man fünf Tage die Woche Temozolomid in einer Dosis von 150-200 mg/m<sup>2</sup> einnimmt. Zeitlich- und dosiseinschränkend können Nebenwirkungen in Form von hämatologischer Toxizität wie Leukopenie und Thrombozytopenie sein. Dieses Therapieprotokoll ermöglicht eine Nebenwirkungsarme Therapie (7% des Patientenkollektivs waren von einem relevanten negativem Ereignis betroffen) mit einem Überlebensbenefit von 2,5 Monaten. Die mediane Überlebenszeit bei der kombinierten Therapie beträgt 14,6 Monate gegenüber 12,1 Monate in der Monotherapie<sup>17</sup>.

Nun sind die Zahlen eher ernüchternd als euphorisch. Jedoch vergleicht man die Ergebnisse der Therapieformen, die vor dem Stupp-Protokoll etabliert waren, kann man von einem moderaten Fortschritt sprechen. Historisch gesehen fand in den späten 70er Jahren ein Umbruch in der Therapie der malignen Gliome statt, als Walker et al.<sup>18</sup> der adjuvanten Ganzhirnbestrahlung einen deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapieform nachweisen konnte. Daraufhin galten die chirurgische Zytoreduktion sowie die anschließende Radiatio als Standardtherapieformen. Probatorisch folgte in einzelnen Fällen die systemische Chemotherapie mit Nitroharnstoffen, Procarbazin, Carboplatin und Temozolomid. 1980 untersuchte Walker et al.<sup>18</sup> vier Therapieregime hinsichtlich ihres Einflusses auf die Überlebenszeit. 467 Patienten, die primär chirurgisch versorgt wurden, unterteilte man in vier Gruppen, die jeweils Semustin (MeCCNU), Radiotherapie, Carmustin (BCNU) plus

Radiotherapie oder Semustin plus Radiotherapie erhielten. Es zeigte sich, dass die Radiotherapie als Monotherapie oder in Kombination mit einem Nitroharnstoff die Überlebenszeit verlängert, jedoch statistisch nicht signifikant<sup>18</sup>.

Einen Überlebensvorteil der Nitroharnstoffe in der adjuvanten Therapie der malignen Gliome konnte ebenfalls in weiteren Studien zugesprochen werden<sup>19</sup>. Den Grund dafür sieht man in der in vitro nachgewiesenen günstigeren Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität, sowie der guten Wirksamkeit auf Gliomzellen. Therapeutisch ungünstig sind jedoch die kurze Halbwertszeit von 20 Minuten und die geringe effektive Dosiskonzentration des systemisch applizierten Therapeutikums, der die Tumorzelle im Gehirn erreicht. Erwähnenswert ist zudem die durch die Nitroharnstoffe erhöhte Lungentoxizität<sup>20,21,22</sup>.

## 1.2 Nitroharnstoffe – Carmustin

Die Gruppe der Nitroharnstoffe setzt sich aus methylierenden und chlorethylierenden Substraten zusammen. Bei den methylierenden Substanzen wie Temozolomid entsteht das hoch zytotoxische O<sup>6</sup>-Methylguanin, welches sich letztendlich letal auf die Zelle auswirkt. Dies geschieht durch DNA- Basenfehlpaarung, da bei der Replikation die DNA Polymerase auf das O<sup>6</sup>-Methylguanin stößt und nicht zum Stillstand kommt sondern Desoxycytidin oder Thymidin synthetisiert. Es entsteht durch die inkorrekte Basenpaarung ein Substrat, welches das sogenannte Mismatch-Reparatursystem initiiert. Dabei kommt es zur Entfernung des mit Fehlpaarungen behafteten DNA-Stranges. Diese entstandene Lücke wird mit Basenpaaren zu füllen, endet jedoch erneut in einer Basenfehlpaarung mit konsekutiver Mismatch- Reparatur und dadurch persistierender Lückenbildung im DNA-Strang. Der entstandene Teufelskreis endet im nächsten Zellzyklus in der Synthesephase mit einem Doppelstrangbruch und der daraus folgernden Apoptose<sup>23</sup>.

Das Carmustin (1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-Nitrosroharnstoff, BCNU) gehört zur der Gruppe der Chlorethyl-Nitroharnstoffe und wirkt als Alkylanz zytostatisch. Es bewirkt die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA in kovalenter Bindung in 12 nukleophilen Orten, am häufigsten in die O<sup>6</sup>-Position des Guanins. Das entstandene O<sup>6</sup>-Chlorethylguanin verursacht eine für die Zelle letale DNA-DNA Vernetzung (DNA-cross-link) zwischen Guanin und Cytosin benachbarter DNA Stränge innerhalb von 10-12 Stunden. Diese stellt für die Replikation eine physische Barriere dar und endet durch die Doppelstrangbruchformation in der Apoptose<sup>24,25</sup>.

Nun werden diese genetisch ungünstigen Veränderungen vom zellulären Reparaturmechanismus erkannt. Dabei spielt das O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen die tragende Rolle.

### 1.3 Carmustin –Wafer

In den 70er Jahren wurde das Chemotherapeutikum Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (BCNU, Carmustin) erstmalig in der Gliomtherapie eingesetzt, nachdem die bis dahin etablierte Therapieform so gut wie keine Resultate brachte. Nun konnten passable Ergebnisse mit einer Ansprechrate von ungefähr 50% erzielt werden, jedoch zum Preis einer erhöhten systemischen Toxizität<sup>25</sup>. Da erkannt wurde, dass es sich um rapide lokal rezidivierende Tumore handelt, die sich in 90% der Fälle in einem Radius von 2 cm um den Primärtumor wiederbilden, wurden verschiedene Versuche gestartet die Tumore lokal zu bekämpfen oder wenigstens in ihrem raschen Wachstum zu dämpfen<sup>26</sup>. Versucht wurde durch direkte oder intraarterielle Applikation von Chemotherapeutika, Toxine oder sogar virale Träger den Tumor am Ort des Geschehens anzugehen. Diese Ansätze konnten letztendlich die Therapie der höhergradigen Gliome nicht novellieren. Allerdings kam es zu einer Neubelebung des Konzepts der lokalen Chemotherapeutika-Darreichung in die Tumorsektionshöhle, als Langer und Folkman<sup>27</sup> 1976 demonstrierten, dass dies mit Hilfe von Polymeren stattfinden könne. Zunächst handelte es sich um biologisch nicht abbaubare Stoffe, die im Verlauf zu biologisch abbaubaren Polymeren weiterentwickelt wurden um schließlich in der lokalen Hirntumorthherapie interessant zu werden. Somit wurde ein neuer Weg in die rezente multimodale Tumorthherapie gebahnt. Die derzeit genutzten Medikamententräger sind Polyanhydride, die aus dem Copolymer Polifeprosan bestehen. Das Polifeprosan wird nach der Exposition im wässrigen Umfeld hydrolysiert und erlaubt dadurch die konsequente Freisetzung des Substrats und die Diffusion in das umliegende Hirngewebe. Man nutzt dabei als Substrat das Chemotherapeutikum Carmustin, welches sich auf Grund seiner nachgewiesenen Blut-Hirn-Schranke-Permeabilität besonders gut eignet. Im Jahre 1999 wurde der Trägerstoff Polifeprosan, der Carmustin freisetzt in Deutschland zugelassen. Dieser Carmustin-Wafer (Gliadel<sup>®</sup>, Arbor Pharmaceuticals, Atlanta, Vereinigte Staaten) trägt 7,7 mg des Substrats und erlaubt eine Freisetzung von über 2-3 Wochen. Das Polifeprosan besitzt zusätzlich die Eigenschaft, das Carmustin vor einer vorzeitigen Degradation zu schützen. In pharmakokinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass das BCNU bis zu 12 mm weit vom Implantat diffundiert und die Medikamentenkonzentration sich über sieben Tage im anliegendem Gewebe im therapeutischen Bereich halten kann<sup>28</sup>. Idealerweise werden nach der Tumorsektion maximal acht solcher Wafer in die Resektionshöhle implantiert, woraus sich eine Gesamtdosis von 61,6 mg ergibt. Angewendet werden diese Carmustin-Wafer bei malignen Gliomen als Zusatz zur chirurgischen und strahlentherapeutischen Behandlung. Des Weiteren ist es im Rezidivfall für histologisch nachgewiesene Glioblastoma multiforme zugelassen. Bei unklarer Tumordignität, Multilokularität oder einem Resektionsgrade weit unter 90 % sollte auf

die Implantation auf Grund des ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnis' verzichtet werden. Ein offenes Ventrikelsystem stellt nur bei intraoperativer Unverschließbarkeit eine Kontraindikation dar, da ansonsten das Auftreten eines Hydrocephalus occlusus bei einer Dislokation eines Wafers in das Ventrikelsystem droht. Nach der Implantation ist ein postoperatives, cerebrales MRT innerhalb von 48 Stunden ratsam. Zu den häufigsten auftretenden Komplikationen zählen mit einer Inzidenz von bis zu 5% postoperative Krampfanfälle in den ersten fünf postoperativen Tagen, Wundheilungsstörungen (Wunddehiszenz, verzögerte Wundheilung, Austritt von Liquor), intrakranielle Infektionen mit Hirnabszessen oder Meningitis sowie Hirnödeme. Jedoch sollte erwähnt werden, dass die lokale Anwendung des Chemotherapeutikums BCNU die ansonsten präsenste systemische Toxizität bei der konventionellen Applikation zu vermeiden erlaubt.

#### **1.4 O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase- MGMT**

Das O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen (MGMT) befindet sich auf dem Chromosom 10q26 und besteht aus einem nichtkodierenden und vier kodierenden Exons, welche ein aus 207 Aminosäuren zusammensetzendes 24 kDa schweres Protein kodieren<sup>29</sup>. Es gehört zu der Gruppe der Tumorsuppressorgene und schützt die Zellen vor der genotoxischen Wirkung der Alkylanzien, die Punktmutationen und chromosomale Deletionen hervorrufen und letztendlich Tumorwachstum initiieren können. Das MGMT-Protein entfernt die durch Methylierung und Chlorethylolation entstandenen Schäden an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins durch Rotation der betroffenen Nukleinbasen aus der DNA-Helix und anschließender Transferierung dieser in das aktive Zentrum des Enzyms zum Cystein. Das Resultat ist die Revidierung der für die Zelle potenziell tödliche DNA-DNA Vernetzung (Cross-link), die durch vorhergegangenes Wirken von Mutagenen und Kanzerogenen hervorgerufen wurde. Jedoch endet die tumorsuppressorische Wirkung des MGMT-Proteins bereits nach einem simplen Reaktionsdurchlauf, da das aktive Zentrum sich nicht regenerieren kann. Daher stammt die Einstufung des MGMT als Protein und nicht als Enzym. Es versteht sich, dass der Reparaturvorgang durch exzessive Saturierung der Zelle mit O<sup>6</sup>-Methylguanin die Konzentration an MGMT überschreiten kann. Das ist fatal, da MGMT der einzige Akteur in den Reparaturmechanismen zur Wiedergewinnung des Guanins, der keinen DNA-Strangbruch hervorruft.<sup>30</sup>

Nun wird die bivalente Funktion des MGMT-Proteins deutlich. Es spielt eine Schlüsselrolle in den Reparaturmechanismen der Schädigungen durch Karzinogene und es ist ein Marker für die

Zytostatikaresistenz. Das Epigenetic silencing des MGMT-Gens durch Methylierung der CpG-Inseln des Promoters, das in der fehlenden Expression des Proteins resultiert, führt in der gesunden Zelle zur Entstehung von Tumorzellen oder zur Malignisierung von bestehenden benignen Tumorzellen. Jedoch begünstigt das Fehlen des MGMT-Proteins in der Tumorzelle die Wirkung von Alkylanzien, da alkylierte DNA nicht repariert werden kann und somit der Zelltod initiiert wird. Untersuchungen haben gezeigt, dass die MGMT-Enzymaktivität im gesunden Hirngewebe von Gliompatienten deutlich niedriger ist als im Hirngewebe von gesunden Patienten. Dies suggeriert, dass eine erniedrigte MGMT-Aktivität einen Risikofaktor in der Gliomentstehung darstellen könnte<sup>31</sup>.

Neben dem Glioblastom, das in 45 % der Fälle von der epigenetischen Inaktivierung des MGMT betroffen ist, tritt dieses Phänomen bei anderen Subtypen von Gliomen (WHO I-III ) von 20 bis 90 Prozent, beim Colonkarzinom in 38 Prozent, beim Lungenkarzinom in 27 Prozent, Kopf- und Halskarzinomen in 28 Prozent und bei Lymphomen in 25 Prozent der Fälle auf<sup>32,33</sup>.

Diese suizidale Eigenschaft des MGMT-Enzyms/Proteins versucht man zu nutzen, um die Präsenz des MGMT im Tumor zu dezimieren und die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika zu steigern. Der erste Ansatz war die kombinierte Anwendung von methylierenden (Methylmethane sulfonate [MMS], N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [MNNG], Streptozotocin, Dacarbazin [DTIC]) und chlorethylierenden (Carmustin) Substraten. Die methylierenden Wirkstoffe sollten zunächst durch Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin durch das MGMT-Enzym dessen Präsenz durch Enzyminaktivierung reduzieren, um die Zytotoxizität durch BCNU-induziertes Cross-linking zu maximieren. Trotz nachgewiesener Reduzierung der MGMT-Aktivität in xenogenen Transplantationen von Nacktmäusen, konnte das Wirkungsausmaß des BCNU nicht gesteigert werden. Ungeachtet dessen initiierte man eine Phase-1-Studie mit Streptozotocin/Dacarbazin und BCNU mit einer anhand des hämatologischen Bildes angepassten Dosis. Auch hier konnte neben der stark erhöhten Toxizität der kombinierten Therapie keine signifikante Resistenzdezimierung des BCNU nachgewiesen werden<sup>34</sup>. Nun versuchte man durch direkte Inhibition die Resistenz umzugehen. Dazu nutzte man die hohe biomolekularische Reaktionspotenz von Benzylgruppen in Form von O<sup>6</sup>-Benzylguanin. Diese bewirkt durch den Transfer der Benzylgruppe zum MGMT-Enzym dessen Instabilität, verringert seine Affinität zur DNA und erhöht seine Sensitivität von Proteasen degradiert zu werden<sup>35</sup>. Nach erfolgreicher Anwendung in In-vitro- und Tierversuchen initiierte man eine Phase-1-Studie zur Klärung der benötigten Dosis des O<sup>6</sup>-Benzylguanins. Eine Dosis von 100mg/m<sup>2</sup> erlaubt die MGMT-Konzentration deutlich zu minimieren und bietet ein ausreichendes Zeitfenster von 18 Stunden für das Bilden von Cross-links durch BCNU<sup>36</sup>. In der darauffolgenden Phase-2-Studie

konnte jedoch keine erfolgreiche Tumorregression bei Nitroharnstoffresistenten Tumoren durch die kombinierte O<sup>6</sup>-Benzylguanin und BCNU Gabe erzielt werden. Auch die Substitution durch Temozolomid konnte keinen signifikanten Therapierfolg erbringen<sup>37</sup>.

In den letzten Jahren wurde das MGMT Protein in Zusammenhang mit dem Glioblastoma multiforme rege erforscht. Es wurde versucht, dem MGMT die Rolle eines Prädiktors sowie eines prognostischen Markers bei Gliompatienten, die chemotherapeutisch mit Alkylanzien therapiert wurden, zuzuschreiben. Esteller et al.<sup>32</sup> konnte als erste in ihrer Publikation im Jahre 2000 nachweisen, dass die Methylierungsrate des MGMT Promoters ein wichtiger Prädiktor für das Ansprechen auf Alkylanzien und die damit inkludierende Outcome- Optimierung ist. Weitere Studien mit größeren Kohorten konnten, wie die von Hegi et al.<sup>33,30</sup> 2005, 2009 nachweisen, dass der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters positiv prognostisch mit der Überlebensdauer korreliert. Beschrieben wird eine mediane Überlebensdauer von 21,7 Monaten und ein Zweijahresüberleben von 46% bei Patienten mit einem methylierten MGMT-Promoterstatus und einer anschließenden Chemo-sowie Radiotherapie<sup>33</sup>.

#### **1.4.1 MGMT Bestimmungsmethoden**

Nun gibt es mehrere Methoden die MGMT Expression zu bestimmen, die ebenfalls ins klinische Korrelat zu bringen sind. Es wird zwischen der immunhistochemischen Aktivitätsbestimmung, der biochemischen Aktivitätsbestimmung und der Bestimmung des Methylierungsstatus der CpG-Inseln des MGM- Promoters unterschieden.

##### ***1.4.1.1 Immunhistochemische Bestimmung***

Bei der immunhistochemischen Bestimmung der MGMT-Expression werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die eine quantitative Aussage hinsichtlich der MGMT-Molekularanzahl pro Zellkern möglich machen. Einige Studien konnten beweisen, dass eine geringe Enzympräsenz positiv mit der Überlebensdauer einhergeht<sup>38</sup>. Jedoch steht man bei dieser Methode vor dem Problem, dass diese relativ insensitiv ist, da nur ein bestimmter Bereich an Molekülen pro Zellkern detektiert werden kann. Außerdem steht der Bestimmungsablauf selbst vor vielen physischen Variablen, die ebenso untersucherspezifisch sind. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen von anderen Studien wider, die diese Problematik unter Beweis stellen und keine signifikante Assoziation mit dem Patienten-Outcome und der MGMT-Expression fanden. Somit bleibt die Immunhistochemie auf Grund der hohen Ergebnisheterogenität kein relevantes Werkzeug zur Bestimmung des MGMT<sup>39</sup>.

#### **1.4.1.2 Biochemische Bestimmung**

Die Methode zur Messung der biochemischen Aktivität nutzt den Reaktionsmechanismus, bei dem die Alkylgruppe irreversibel mit dem Protein gebunden wird. Der Vorteil gegenüber der immunhistochemischen Bestimmung ist die deutlich höhere Sensitivität hinsichtlich der Moleküldetektion im Zellkern, sowie der Wegfall der Untersucherspezifität. Jedoch findet diese Untersuchungsmethode keinen Einsatz in der routinemäßigen Bestimmung, da frisches Gewebe und radioaktives DNA-Substrat benötigt wird. Aus diesem Grund gibt es nur wenige Studien, die zeigen konnten, dass eine geringe Enzymaktivität ein Besseres Ansprechen auf Alkylanzen erlaubt<sup>40</sup>.

#### **1.4.1.3 Promotor-Methylierungs Bestimmung**

Die Methode mit den am ehesten überzeugenden Daten ist die Bestimmung der Methylierung der CpG-Inseln des MGMT-Promoters. Dies erfolgt entweder durch die methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP), Quantitative/Semiquantitative MSP (Q/SQ-MSP), oder die quantitative Pyrosequenzierung. Die CpG-Inseln sind Regionen im Genom, die eine erhöhte CpG-Dichte besitzen und sich aus Cytosin und Guanin zusammensetzen, welche durch eine Phosphodiesterbindung verbunden sind. Der MGMT-Promoter setzt sich aus 97 solcher CpGs zusammen, die verständlicherweise alle eine unterschiedliche Methylierungsrate aufweisen können. Um dessen Methylierungsgrad zu bestimmen, können theoretisch alle CpGs untersucht werden. Dies ist jedoch im klinischen Ablauf auf Grund des hohen Zeitaufwandes nicht möglich und somit konzentriert man sich auf bestimmte CpGs, die in Untersuchungen gezeigt haben, dass sie am besten mit dem klinischen Outcome korrelieren. Zur Bestimmung erfolgt eine Natriumbisulfid-getriggerte Desaminierung des Cytosins welche das Cytosin und nicht das 5-Methylcytosin zum Uracil umwandelt. Nun müssen die verschiedenen Methoden das Uracil vom 5-Methylcytosin unterscheiden können. In der MSP Methode werden 4 bis 12 solcher CpGs mit Hilfe von zwei Primern untersucht, welche jeweils ein Guanin als Basenpaar für 5-Methylcytosin und ein Adenin als Basenpaar für Uracil besitzen. Das Ergebnis sind verschieden große PCR-Produkte mit methylierten und unmethylierten Primern, welche Rückschlüsse auf die MGMT Expression geben. Bei der Q-MSP Methode werden 8 CpGs sowie ein unmethyliertes Referenzgen untersucht – am häufigsten Actin B. Quantifiziert wird dabei mithilfe von Fluoreszenz. Jedoch kann so nur eine Aussage über den methylierten Promoter getroffen werden, da der unmethylierte Promoter nicht berücksichtigt wird. Eine weitere Variante der Untersuchungsmethode ist die semiquantitative MSP, die sowohl den methylierten als auch den unmethylierten Promotor messen kann.



Die Pyrosequenzierung konnte sich zur Bestimmung der Methylierungsrate nach Vergleichsstudien der einzelnen Methoden mehrheitlich durchsetzen<sup>41</sup>. Die Methode basiert auf einer Echtzeitmessung der DNA-Polymeraseaktion beim Einbau von Nukleotiden, die durch Lichtblitze die korrekte komplementäre Nukleotidauswahl im Detektor sichtbar macht. Beim Nukleotideinbau wird Pyrophosphat freigesetzt, welches nach vorheriger enzymatischer Reaktion als ATP-Energieträger Luziferin in Oxyluziferin umwandelt. Das Ergebnis ist ein Lichtblitz, dessen Lichtstärke vom verbrauchten ATP proportional abhängt. Da die angehängten Nukleotide bekannt sind, kann man daraus die Sequenz der zu untersuchenden Matrize (Quell- DNA) ableiten<sup>42</sup>. Der Vorteil zu den vorherigen Methoden ist, dass alle CpGs untersucht werden können. Nun werden verständlicherweise im klinischen Alltag nur bestimmte CpGs untersucht, für die man zuvor in Studien eine gute Korrelation zur Klinik nachgewiesen hat. Da es sich um eine quantitative Methode handelt, die prozentuale Ergebnisse liefert, musste ein Cut-Off definiert werden, der es erlaubt, Patienten im Sinne eines methylierten oder unmethylierten Status' zu dichotomisieren. Dieser wurde nach Analysen aller 97 CpGs korrelierend zum Patienten-Outcome mit 9 % beziffert<sup>43</sup>. Dieser Schwellenwert wird derzeit lediglich als anzunehmender Parameter empfohlen.

## **1.5 Einführung in die Dissertation**

Nunmehr soll in dieser Dissertation anhand einer retrospektiven Analyse aus dem klinikeigenen Patientengut untersucht werden, inwieweit der Einsatz von Gliadel in Abhängigkeit des MGMT-Methylierungsstatus einen therapeutischen Benefit bewirkt und ob unerwünschte Ereignisse in nennenswerten Anzahl in Erscheinung treten. Des Weiteren soll der Resektionsausmaß ins Korrelation mit dem Überlebensvorteil gebracht werden. Insbesondere soll dabei auf die Bestimmungsmethode eingegangen werden, da in den vorherigen genannten Publikationen, die sich mit dem Thema Gliadel und MGMT-Methylierungsstatus auseinandersetzen, andere Methoden als die Pyrosequenzierung genutzt wurden. Dazu wurden die Sterbedaten der Patienten eingeholt, unerwünschte Ereignisse anhand der Krankenunterlagen protokolliert und der MGMT- Methylierungsstatus aus den magazinierten Präparat-Blöcken nachbestimmt. Letztendlich soll Anhand der Ergebnisse diskutiert werden, ob der Einsatz von Gliadel in Anbetracht der möglichen unerwünschten Ereignisse sinnvoll ist und ob der Methylierungsstatus einen guten Prädiktor für den Erfolg der Therapie darstellt. Dazu wurden Patientendaten aus den

Jahren 2008 bis 2014 auf die oben genannten Kriterien hin untersucht. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um unter Kenntnis der durchschnittlichen Überlebenszeit bei Glioblastom-Patienten, die Sterbedaten ermitteln zu können. Ferner war das Stupp-Protokoll in diesem Zeitraum in den kooperierenden onkologischen Einrichtungen bereits fest mit einem gewissen Erfahrungsschatz etabliert.

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Allgemein**

In die retrospektive Wissenschaftliche Untersuchung wurden Patienten mit histologisch gesichertem Glioblastoma multiforme eingeschlossen, die von 2008 bis einschließlich 2014 in der Klinik für Neurochirurgie im Unfallkrankenhaus Berlin operiert wurden.

Als Operationstechniken standen in Abhängigkeit von der Operabilität entweder die stereotaktische Biopsie oder die mikrochirurgische Resektion zur Verfügung. Die Entscheidung hierzu wurde anhand der Lokalisation des Tumors in etwaigen eloquenten Regionen, des Allgemeinzustandes des Patienten und der bildmorphologisch erscheinenden Uni- oder Multilokularität getroffen.

Die stereotaktische Biopsie erfolgte, nach vorheriger Trajektorienplanung mit der iPlan® Software, mit Hilfe der Neuronavigation des nicht rahmengeführten Verfahrens mit VarioGuide™ von BrainLab (Heimstetten, Deutschland).

Im Falle der mikrochirurgischen Resektion wurde die Neuronavigation von BrainLab zur Zugangsplanung verwendet. Präoperativ erhielten die Patienten 5-ALA um intraoperativ die Tumorgrenzen unter Blaulicht im Operationsmikroskop besser differenzieren zu können. In einigen Fällen entschied man sich aufgrund klinischer Kriterien zur Implantation von Carmustin-Wafern in die Resektionshöhle. In Abhängigkeit von der Größe der Resektionshöhle wurden bis zu acht Carmustin-Wafer implantiert. Die Voraussetzungen zur Qualifizierung eines Patienten zur lokalen BCNU-Therapie wurden klinikintern wie folgt definiert.

#### **Indikationsvoraussetzung:**

*Präoperativ:*

- Bildmorphologische Verdachtsdiagnosestellung eines hochgradigen Glioms durch den Neuroradiologen
- Unilokularität
- Mikrochirurgische Operationstechnik mit angestrebter Totalresektion
- Karnofsky performance score von > 60%
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

*Intraoperativ:*

- Bestätigung der Tumordignität eines hochgradigen Glioms in der histopathologischen Schnellschnittuntersuchung durch den Neuropathologen
- Totalresektion im Sinne der „gross total resection“ (>90%)
- Kontinuität des Ventrikelsystems

Patienten wurden nicht zur Carmustin-Wafer-Implantation qualifiziert wenn mindestens eines der folgenden Ausschlusskriterien zutraf.

**Kontraindikation:**

*Präoperativ*

- Unklare Tumordignität in der Schnittbildgebung
- Biopsie ( stereotaktisch / offen )
- Multilokularität des Tumors
- Karnofsky performance score von < 60%
- Fehlende schriftliche Einverständniserklärung

*Intraoperativ*

- Unklare oder andere Tumordignität in der histopathologischen Schnellschnittbestimmung durch den Neuropathologen
- Keine Totalresektion
- Nicht verschließbare Verbindung der Resektionshöhle zum Ventrikelsystem

Postoperativ wurden alle Patienten routinemäßig für mindestens 24 Stunden intensivmedizinisch

überwacht. Innerhalb von 48 Stunden nach der Operation erhielten die Patienten eine native cCT-Kontrolle um Komplikationen auszuschließen. Bei Patienten, die Carmustin-Wafer implantiert bekommen haben, wurde eine postoperative Verlaufsbildkontrolle via cMRT ohne und mit Kontrastmittel durchgeführt. Nach dem stationären Aufenthalt in der neurochirurgischen Klinik wurden die Patienten zur adjuvanten Therapie entweder in die ambulante oder stationäre Weiterbehandlung überwiesen.

Im Rahmen der Dissertation wurden die Sterbedaten der Patienten bei den zuständigen Einwohnerämtern und im GKR (Gemeinsames Krebsregister Berlin) eingeholt. Die klinischen Daten (Tumordignität, Tumorlokalisation, KPS, Resektionsgrad, unerwünschte Ereignisse) wurden aus den Arztbriefen, Operationsberichten, Radiologie- und Pathologiebefunden entnommen. Da die Bestimmung des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters durch die Pathologen im Hause in den Jahren 2008 bis 2011 nicht routinemäßig erfolgte, musste bei 58 Patienten dieser in Rahmen der Dissertation anhand der paraffinierten Gewebsblöcken nachbestimmt werden.

Die Einschlusskriterien wurden wie folgend definiert:

- Glioblastoma multiforme WHO Grad IV - histopathologisch bestätigt
- GBM im Erwachsenenalter ( $\geq 18$  Jahre)
- Operativer Eingriff ( Biopsie / Resektion)
- Tumorresektionen mit und ohne Carmustin-Wafer-Implantation

Zum Ausschluss kam es wenn mindestens ein Kriterium zutreffend war:

- Andere Tumordignität als Glioblastoma multiforme WHO Grad IV
- GBM im Kindesalter ( $\leq 18$  Jahre)
- Unbekannter MGMT-Promotormethylierungsstatus (aus technischen Gründen nicht durchführbare Nachbestimmung)
- Unbekanntes Todesdatum (im GKR oder in den jeweiligen Einwohnermeldeämtern nicht gemeldet)

## **2.2 Bestimmung der Methylierungsrate des O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Promoters**

### **2.2.1 Schneiden und Entparaffinierung:**

Zunächst werden Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Tumorproben angefertigt, jeweils ein 1µm dicker sowie mindestens zwei 4µm dicke Schnitte. Nach einer 15- minütigen Bebrütung im Brutschrank bei 80°C werden die Leerschnitte zunächst 2 x 10 Minuten in Xylol und 2 x 10 Minuten in Alkohol entparaffiniert. Daraufhin erfolgt die Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin (HE), um den Tumorbereich im Gewebe abzugrenzen. Die hohe Anzahl von Zellkernen im Tumorgewebe bewirkt eine dunklere, blau-violett Färbung.

### **2.2.2 Mikrodissektion und DNA Extraktion mit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland):**

Nach vorheriger Markierung der Mikrodissektion auf den HE-Schnitten erfolgt die Übertragung der markierten Bereiche auf die Leerschnitte und mittels sterilem Einweg-Skalpell wird ausschließlich Tumorgewebe dissektiert. Die Gewebsprobe wird in einen Isolierungsansatz, bestehend aus ATL Buffer und Proteinase K, überführt und anschließend eine Stunde lang bei 56°C und eine Stunde lang bei 90°C im Thermomixer mit 450 rpm inkubiert. Nach dem Lösen von Protein- und Fibrinogenstrukturen liegt die DNA in der Lösung vor und wird über Zentrifugation von den restlichen Bestandteilen getrennt. Dazu verwendet man Zentrifugengefäße mit einem Filtereinsatz, die „spin columns“ genannt werden. Dabei bleibt die DNA im Filter und die überflüssigen Zellbestandteile werden mit Hilfe von Waschpuffern (AL Buffer, 96% Ethanol, AW1, AW2) herausgewaschen. Nach erfolgreicher DNA-Extraktion werden die Gefäße mit der isolierten DNA nach vorherigem Herauslösen aus dem Filter mit dem Elutionspuffer ATE bei 4°C eingelagert.

### **2.2.3 Bisulfitbehandlung mit EpiTect der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland)**

Nun erfolgt ein circa sechsständiger Vorgang der Demethylierung. Zunächst müssen zur Erstbenutzung des Kits die Reagenzien vorbereitet werden. Der Buffer BW und Buffer BD werden jeweils mit 96% Ethanol aufbereitet. RNase-freies Wasser wird zur Carrier-RNA hinzugegeben und die gelöste Carrier-RNA zum Buffer BL gegeben. Schließlich erfolgt die Lösung des Bisulfit-Mix mit Hilfe von RNase-freiem Wasser.

Nun werden die Reagenzien für die Bisulfidbehandlung in PCR-Tubes pipettiert. Nach der Zugabe von DNA-Protect-Buffer und des DNA- Bisulfit-Mix wechselt die Farbe von grün zu blau, welches ein Indikator für gutes Mischen und korrekten pH-Wert ist.

Das benötigte Volumen der jeweiligen Substrate ist aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Zusammenstellung der Komponenten zur Bisulfidbehandlung**

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen:</b>
DNA (Extraktion pkt. 2)	Variabel (max 20µl)
RNasefreies Wasser	Variabel (anzupassen an das DNA Volumen, jedoch muss das Gesamtvolumen DNA + RNasefreies Wasser= 20µl betragen)
Bisulfit Mix (gelöst mit RNasefreien Wasser)	85µl
DNA Protect Buffer	35µl
<b>Gesamt Volumen</b>	<b>140µl</b>

Die PCR-Tubes werden in den Thermocycler (Thermal Cyler C1000 der Firma Biorad) gestellt und folgendes Programm (siehe Tabelle 2) wird gestartet:

**Tabelle 2: Zyklusprotokoll**

Denaturierung	5 min.	95°C
Inkubation	25 min.	60°C
Denaturierung	5 min.	95°C
Inkubation	85 min.	60°C
Denaturierung	5 min.	95°C
Inkubation	175 min.	60°C
<b>Ende</b>		<b>20°C</b>

Danach erfolgt das „Waschen“ der bisulfidbehandelten DNA. Dazu muss die entsprechende Menge an dem zuvor vorbereiteten Buffer BL mit Carrier-RNA angesetzt werden (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Vorbereitung des Buffer BL – carrier RNA Gemisch**

Probenanzahl	1	4	8	16	24	48
--------------	---	---	---	----	----	----

Volumen Buffer BL	620µl	2,5ml	5ml	10ml	15ml	31ml
Volumen carrier RNA	6,2µl	25µl	50µl	100µl	150µl	310µl

Nun wird 310µl des Buffer BL mit der Carrier-RNA zu jedem bisulfidbehandelten DNA-Template hinzugegeben und anschließend mit 99% Ethanol behandelt. Jetzt erfolgt das eigentliche Waschen der DNA mit Hilfe von Buffer BW (Wash Buffer), Buffer BD (Desulfonation Buffer) und EpiTect-Spin-Säulen, sowie das anschließende eluieren mittels Buffer EB.

### 2.2.3.1 Polymerasenkettenreaktion:

Mit Hilfe der PCR können wir die zu untersuchenden Bereiche in der DNA vervielfältigen. Das geschieht in drei Abläufen. Zunächst wird die DNA denaturiert um im zweiten Schritt bei niedrigeren Temperaturen-„Annealing“ den Primer an die denaturierte DNA anzulagern. Die Sequenz des Primers ist komplementär zu den 5' bzw. 3' Bereichen des zu vervielfältigen DNA Abschnittes. Zum Schluss erfolgt die Elongation, also die Amplifikation des Abschnittes durch die Taq-DNA-Polymerase beginnend vom 3' Ende hinter dem Primer.

Beim Ansetzen der PCR muss penibel auf das Vermeiden von DNA Kontamination geachtet werden um keine Fehlergebnisse zu erhalten. Dazu werden zwei PCR-Workstations benutzt, die zuvor für 30 Minuten mit UV-Licht und DNA-Exitus dekontaminiert werden. Zunächst wird in der PCR-Workstation Nr 1 der MasterMix (siehe Tabelle 4) angesetzt, der aus PCR-Wasser, CoralLoad PCR Buffer (Qiagen,Hilden,Deutschland), HotStarTaq (Qiagen,Hilden,Deutschland)), den vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und PCR Primer Mix MGMT(Qiagen,Hilden,Deutschland) besteht. In der PCR-Workstation Nr 2 wird die zuvor behandelte DNA (pkt.2 u.3) zu dem MasterMix gegeben. Ebenfalls müssen immer eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt werden.

Tabelle 4: *MasterMix für PCR*

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen für 1x Ansatz:</b>
PCR-Wasser	4 µl
PCR Primer Mix MGMT	1 µl
CoralLoad	2,5 µl

Hot Star Taq	12,5 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>20 µl</b>
dNTP mix	0,5 µl
Proben-DNA	5 µl

Die fertigen Tubes werden in den Thermocycler gegeben und das vorprogrammierte MGMT – Programm, wie in der Tabelle 5 aufgeführt, gewählt.

**Tabelle 5: Zyklusprotokoll**

1.	Hitzeaktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase	15 min.	95°C
2.	Denaturierung	20 sec.	95°C
3.	Annealing	20 sec.	53°C
4.	Elongation	20 sec.	72°C
	<i>Schritt 2-4 umfasst 42 Zyklen</i>		
5.	Finale Elongation	5 min.	72°C

#### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt es uns, anhand des Laufverhaltens der Banden und der Intensität die Ergebnisse der PCR zu kontrollieren.

Das Gel wird mit 5,2 g Agarose, 260ml 0,5 x TBE-Buffer, 26 µl GelGreen™ (Biotium, Hayward, Vereinigte Staaten) angesetzt. Nach Auspolymerisierung des Gels erfolgt das Auftragen von 5 µl vom PCR Produkt, 5 µl 50bp-DNA-Marker und 13 µl Ethidiumbromidersatz. Nun wird die Elektrophorese mit einer Laufzeit von ca. 45 min bis zu 1 h gestartet bis die Farbbanden bis 2/3 gelaufen sind. Danach erfolgen das Abfotografieren des Gels und die Auswertung. Hier kann bereits entschieden werden ob die Menge an DNA ausreichend ist um ein aussagekräftiges Ergebnis in den folgenden Arbeitsschritten zu erlangen. Im Falle einer negativen PCR erscheinen lediglich die Primer, die sich mit einer kleineren Anzahl von Basenpaaren und einer geringeren Intensität erkenntlich machen.



### 2.2.5 Pyrosequenzierung:

Im Falle einer positiven PCR kann mit der Pyrosequenzierung begonnen werden. Mit dem verwendeten „therascreen MGMT Pyro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)“ werden an vier CpG-Orten in Exon 1 des humanen MGMT-Gens (genomische Sequenz auf Chromosom 10 von 131 265 519 bis 131 265 537: **CGACGCCGCAGGTCCTCG**) eine Methylierung quantitativ nachgewiesen.

Zunächst erfolgt die Immobilisierung der zuvor vervielfältigten DNA auf Streptavidin Sepharose High performance Beads vor der eigentlichen Analyse. Dazu wird ein MasterMix mit den Beads, PyroMark Bindungspuffer und Wasser erstellt und in die Kavitäten der OCR-Platte gegeben (siehe Tabelle 6). Anschließend werden die mit dem MasterMix gefüllten Kavitäten jeweils mit dem PCR-Produkt aufgefüllt und bei 1400 U/min knapp zehn minutenlang geschüttelt.

Tabelle 6: *MasterMix zur DNA-Immobilisierung*

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen für 1x Ansatz:</b>
Streptavidin Sepharose High performance Beads	1 µl
PyroMark Bindungspuffer	40 µl
Wasser	29 µl
PCR Produkt (DNA)	10 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>80 µl</b>

Nun erfolgt noch vor der Pyrosequenzierungsanalyse die Vorbereitung einsträngiger DNA und zum Annealing des Sequenzierungs-Primers. Dazu wird der Primer in PyroMark Annealing-Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) verdünnt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: *Verdünnung des Sequenzierungs-Primer*

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen für 1 Reaktion:</b>
Sequenzierungs-Primer MGMT	0,8 µl
PyroMark Annealing-Buffer	24,2 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>25 µl</b>

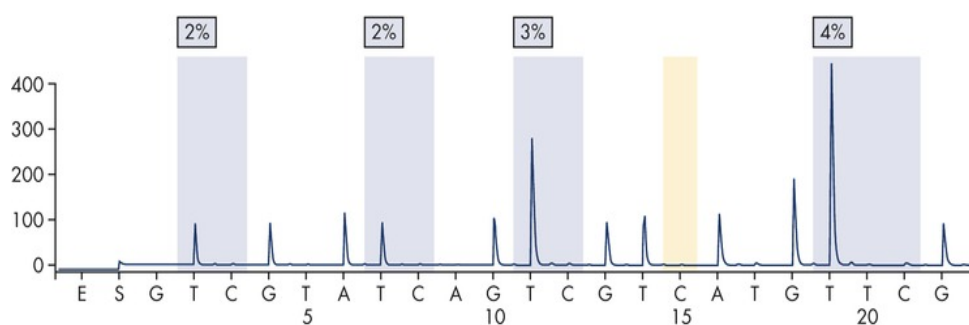
Danach werden 25 µl des verdünnten Sequenzierungs-Primers in jede Kavität der Primerplatte pipettiert. Nun werden mit Hilfe einer Vakuumpumpe in der PCR- Platte die Beads mit dem

immobilisierten Template angesaugt. Daraufhin wird der Vakuum-Saugkopf mit seinem Inhalt in 70%igem Ethanol fünf sekundenlang gespült um danach in das Reservoir mit der Denaturierungslösung überführt zu werden, ebenfalls fünf sekundenlang. Hierbei wird das DNA-Template chemisch denaturiert. Um die Überreste der Denaturierungslösung zu lösen, wird schließlich der Saugkopf zehn Sekunden lang in das Reservoir mit dem Waschpuffer getaucht. Das Produkt dieser Anwendung ist eine einsträngige DNA, die nun auf die Platte mit dem Sequenzierungsprimer übertragen werden muss. Dies geschieht durch die Unterbrechung des Vakuums und das Lösen der DNA durch vorsichtiges Schütteln. Anschließend wird die DNA nochmals denaturiert mit Hilfe einer zweiminütigen Wärmeinkubation bei 80°C. Darauffolgend sorgt das Abkühlen auf Raumtemperatur für die Anlagerung der Sequenzierungsprimer an die einsträngige DNA, also das Annealing.

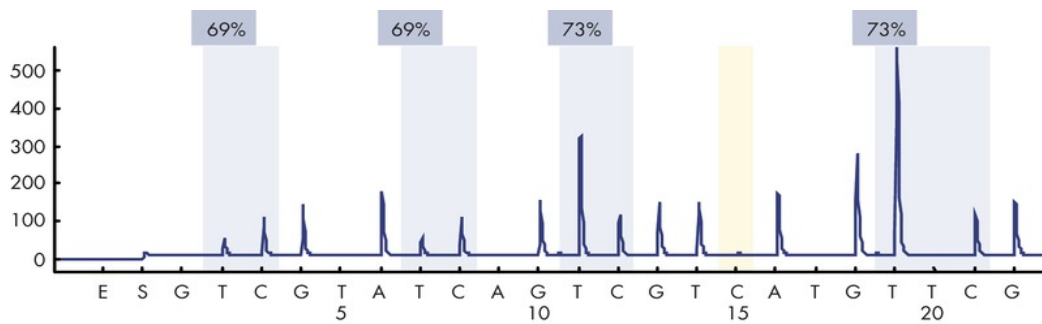
Letztendlich kann jetzt die Sequenzierung im Pyrosequenzierer PyroMark Q24 der Firma Qiagen erfolgen. Nach vorheriger Beladung der Kartusche mit Nukleotiden, Enzym- und Substratgemisch erfolgt der weitere Verlauf vollautomatisch durch den Sequenzierer.

Das Ergebnis erhält man in Form eines Histogramms, dem sogenannten Pyrogramm. Die in der Abbildung 11a/b dargestellten Ausschläge (Peaks) entsprechen den gemessenen Intensitäten der Lichtblitze der einzelnen Nukleotide in Prozent. Da vier CpG-Inseln gemessen werden, wird aus den Ergebnissen schließlich ein Mittelwert errechnet.

a



b



**Abbildung 1: Pyrogramm einer nicht methylierten Probe (a) und Pyrogramm einer methylierten Probe(b).** Zu sehen sind jeweils für jeden CpG- Ort eine Box, die mit dem Prozentsatz der Methylierungsrate beschriftet ist. An Stelle 15 ist ein Cytosin ohne darauffolgendes Guanin lokalisiert, welches die Kontrollprobe ist, die immer 0% betragen sollte.

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit der GraphPad Software Prism 6 für Mac OS X durchgeführt. Von statistischer Signifikanz wurde ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  ausgegangen. Die Subgruppen wurden auf die bekannten prognostischen Faktoren mit dem Mann Whitney und t Test untersucht. Die durchschnittliche Überlebenszeit wurde mit dem 2-Way-Anova-Test und der Sidak-Korrektur für multiple Vergleiche berechnet und das mediane Überleben anhand des Log-rank-Tests dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemein

Zwischen 2008 und 2014 wurden 141 Patienten mit einem histopathologisch nachgewiesenem Glioblastom multiforme WHO Grad IV operiert. Anhand unserer zuvor definierten Ausschlusskriterien konnten letztendlich 103 Patienten eingeschlossen werden. Bei insgesamt 38 Patienten konnte die Methylierungsrate und das Todesdatum nicht ermittelt werden. Das Patientengut wurde zunächst in die Gliadel- und Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Gliadelgruppe

beinhaltet alle eingeschlossenen Patienten, denen mindestens ein Carmustin-Wafer (Gliadel) implantiert wurde. Diese Gruppe zählt insgesamt 35 Patienten (34 %).

Die Kontrollgruppe setzt sich aus den Patienten zusammen, die ohne Carmustin-Wafer therapiert wurden und umfasst 68 Patienten (66 %).

Schlussendlich erfolgt die Dichotomisierung der Gliadel- und Kontrollgruppe anhand des MGMT-Methylierungsstatus (Abbildung 2). Dabei werden alle Methylierungsraten die neun oder mehr Prozent betragen, als „methyliert“ klassifiziert. Alle darunter liegenden Methylierungsraten (<9 %) wurden als „unmethyliert“ bezeichnet.

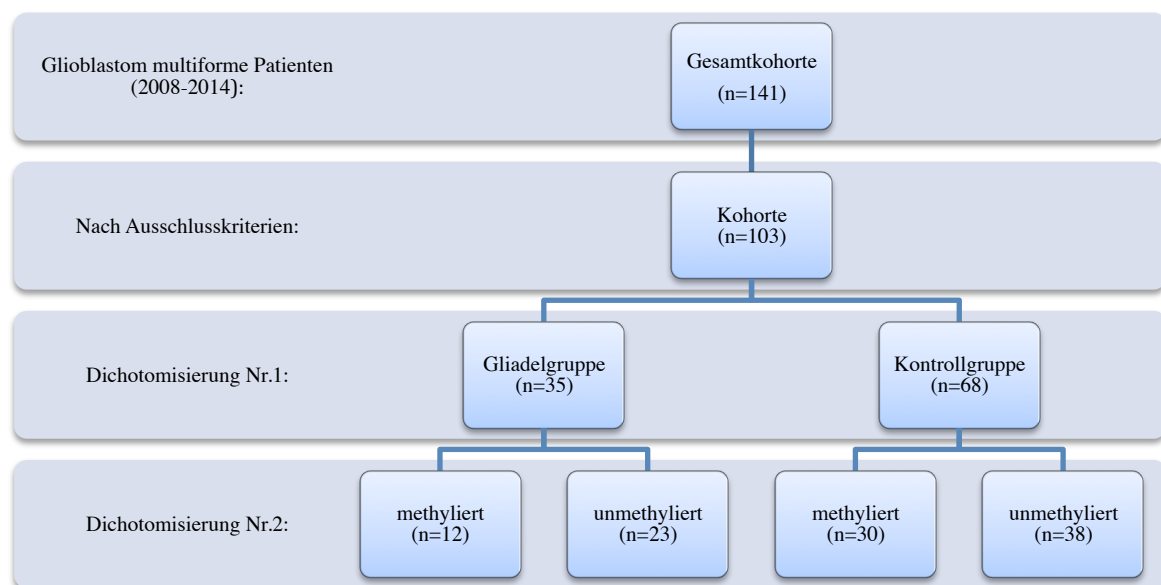
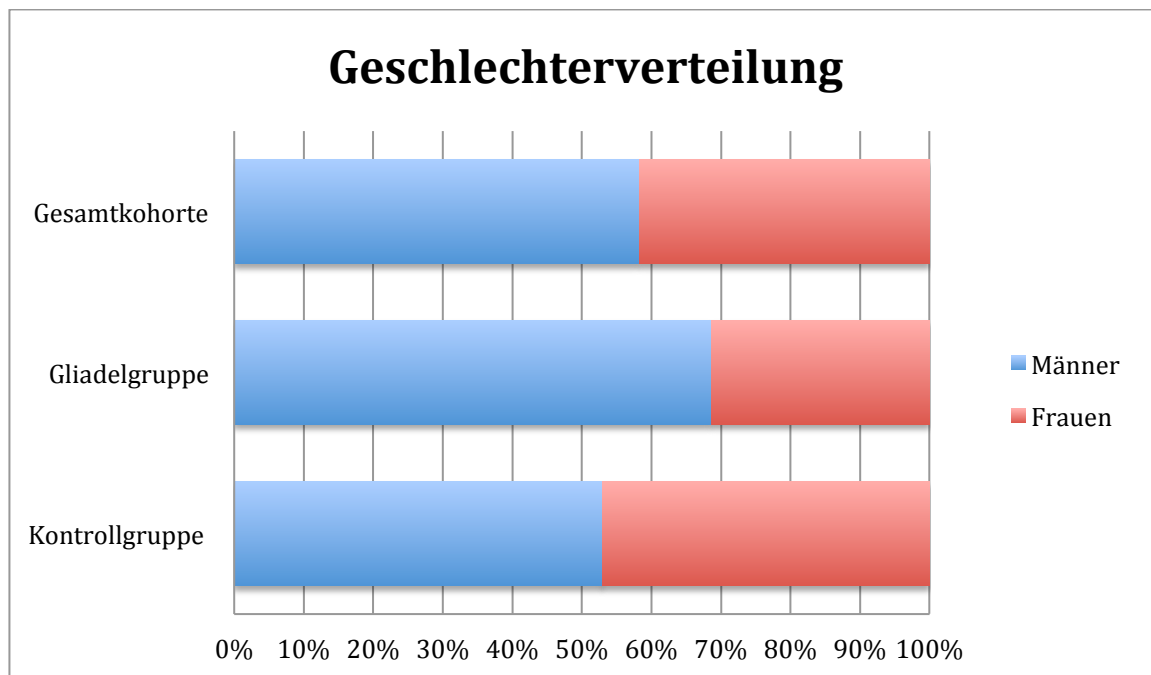


Abbildung 2 : Dichotomisierung des Patientengutes

### 3.1.1 Geschlechterverteilung

In Abbildung 3 sind die Verteilungen der Geschlechter für die jeweiligen Gruppen graphisch dargestellt. Die Gesamtkohorte teilt sich in 43 Frauen (42 %) und 60 Männer (58 %) auf. Im weiter dichotomisiertem Patientengut sind in der Gliadelgruppe 24 Männer (68 %) und 11 Frauen (32 %) vertreten. Die Kontrollgruppe ist mit 36 Männern (53 %) und 32 Frauen (47 %) charakterisiert.



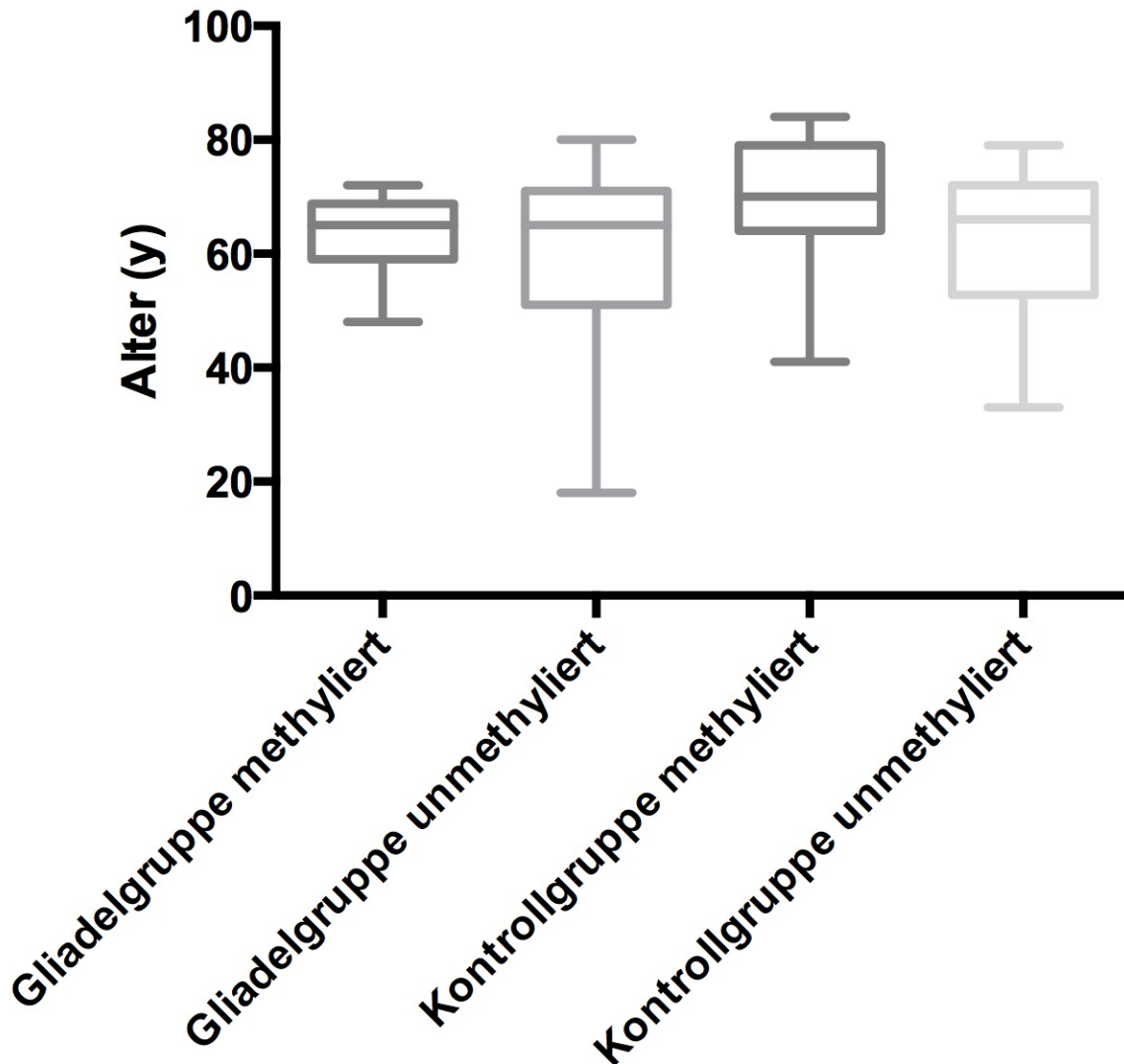
**Abbildung 3: Balkendiagramm zum Hervorheben der Geschlechterverteilung**

### 3.1.2 Alter

Das Durchschnittsalter der Kohorte beträgt 64,0 Jahre, wobei das Patientengut der Gliadelgruppe um knapp vier Jahre jünger ausfällt als das der Kontrollgruppe (61,3 Jahre vs. 65,3 Jahre). In der Gliadelgruppe erstreckt sich das Lebensalter von 18 bis 80 Jahren und in der Kontrollgruppe von 33 bis 84 Jahren.

In Abbildung 4 ist die Lebensaltersverteilung der jeweiligen zuvor definierten Subgruppen graphisch dargestellt. Dabei kann statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden ( $p > 0.05$ ).

## Altersverteilung

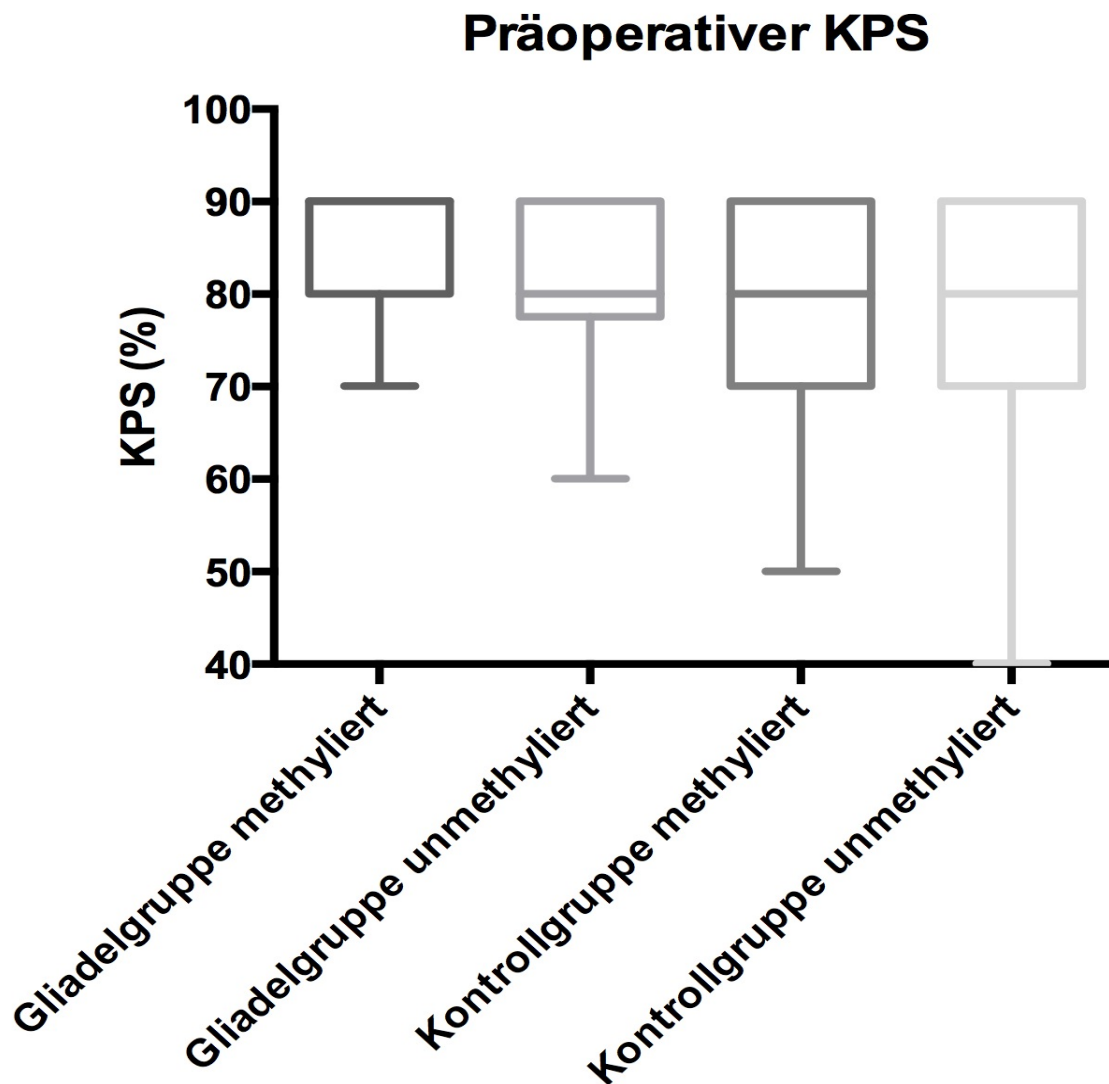


**Abbildung 4:** Verteilung des Patientenalters in den einzelnen Subgruppen. Die Patienten der methylierten Gliadelgruppe sind im Durchschnitt 63,0 Jahre alt, wobei die unmethylierte Gliadelgruppe 60,4 Jahre alt ist. Im Vergleich zu der methylierten Kontrollgruppe sind diese Patienten im Durchschnitt 68,8 Jahre und die unmethylierten 62,6 Jahre alt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen.

### 3.1.3 Karnofsky performance status scale

Der präoperative klinische Zustand wurde mit Hilfe der Karnofsky performance status scale (KPS) eingeschätzt. Der durchschnittliche KPS beträgt 79,5 % und entspricht somit einem selbstversorgendem Patienten, jedoch mit deutlichen neurologischen Ausfällen, die die alltägliche Aktivität in Ihrer Ausübung einschränken. In Abbildung 5 ist die graphische Darstellung der Verteilung des KPS für die einzelnen Untergruppen dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der durchschnittliche KPS für die einzelnen Gruppen nicht wesentlich

voneinander differiert. Statistisch lässt sich ebenfalls keine Signifikanz ( $p > 0.05$ ) errechnen. Zu bemerken ist jedoch, dass Patienten mit einem deutlich niedrigeren KPS ( $< 60\%$ ) nur in der Kontrollgruppe vertreten sind. In der Gesamtkohorte findet sich kein Patient, der einem KPS von  $100\%$  entspricht, also symptomlos wäre.



**Abbildung 5: Präoperativer Karnofsky performance status (KPS).** Der durchschnittliche KPS der methylierten Gliadelgruppe beträgt  $84,5\%$ , der unmethylierten Gliadelgruppe, der methylierten Kontrollgruppe  $77,5\%$  und der unmethylierten Kontrollgruppe  $78,3\%$ . Zwischen den Untergruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0.05$ ).

### 3.1.4 Tumorlokalisierung

Die Verteilung der Tumorlokalisierung wird anhand der

Abbildung 6 dargestellt. Bei  $48 (47\%)$  Patienten befand sich der Tumor rechts hemisphäriell (in  $13$  Fällen frontal, in drei Fällen frontoparietal, in vier Fällen frontotemporal, in neun Fällen

temporal, in vier Fällen temporoparietal, in acht Fällen parietal, in drei Fällen okzipital, in vier Fällen parietookzipital).

Bei 48 Patienten (47 %) lag der Tumor links hemisphäriell (in acht Fällen frontal, in drei Fällen frontotemporal, in 12 Fällen temporal, in fünf Fällen temporoparietal, in acht Fällen parietal, in vier Fällen okzipital, in fünf Fällen parietookzipital, in drei Fällen temporookzipital).

Bei einem Patienten (0,9 %) war der Tumor beidseits frontal als Balkengliom lokalisiert und bei vier Patienten (3,8 %) waren die Tumoren bihemisphäriell sowohl frontoparietal rechts als auch parietooccipital links lokalisiert. In zwei Fällen (1,5 %) befand sich der Tumor intraventrikulär.

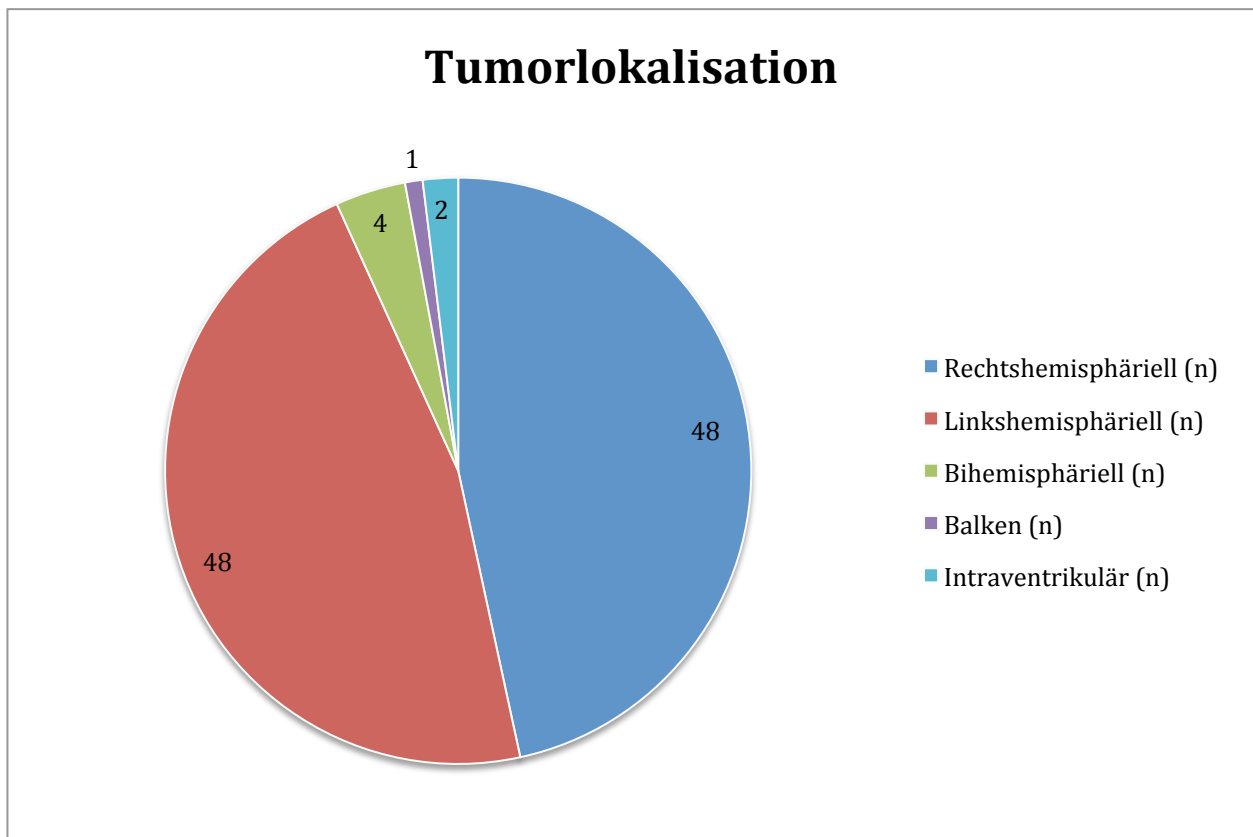
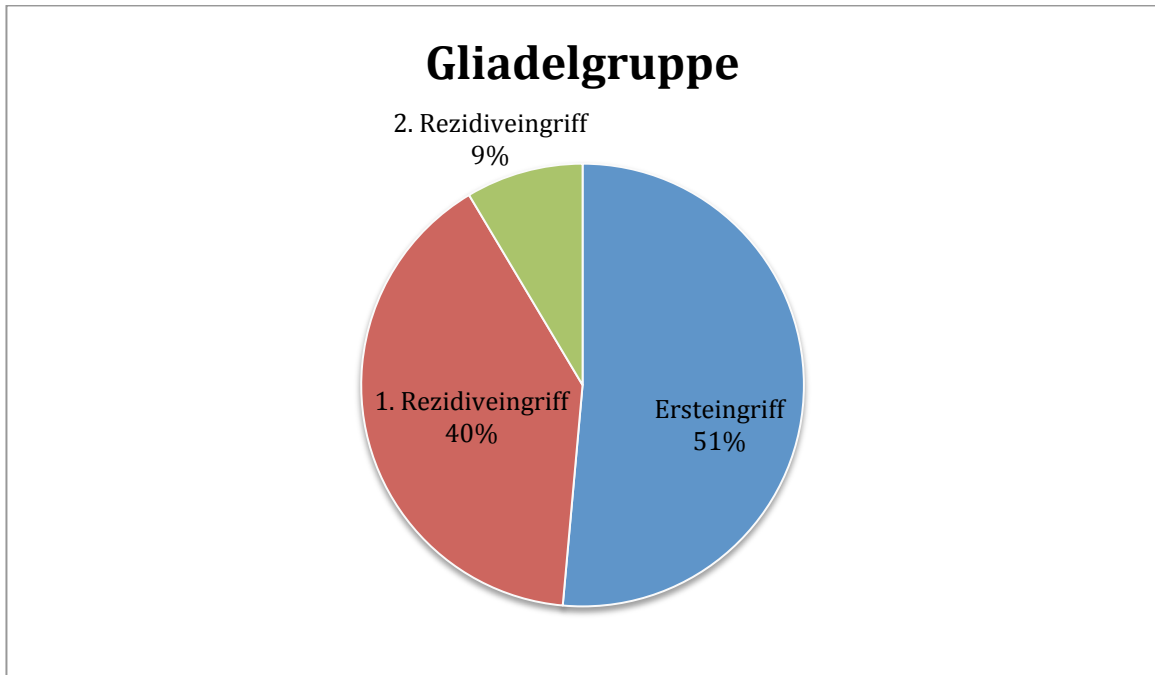


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Verteilung der Tumorlokalisation.

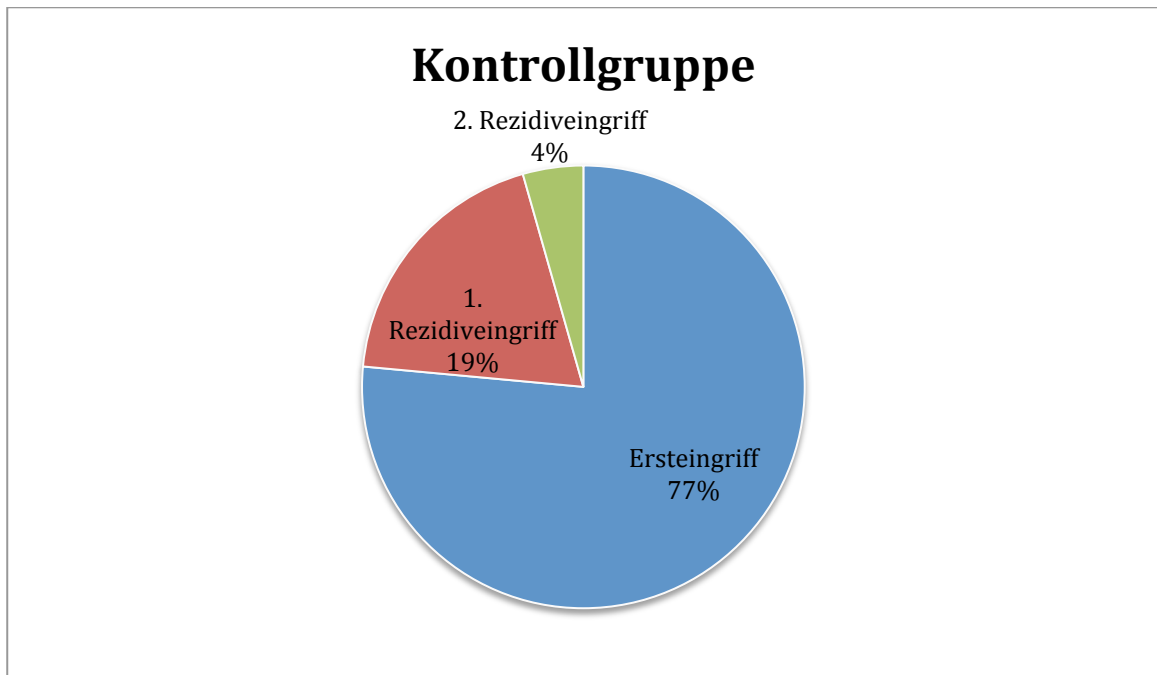
### 3.1.5 Rezidiveingriffe

27 Patienten (26 %) wurden zweimal operiert und sechs Patienten (5,8 %) wurden dreimal operiert. Die restlichen Patienten wurden nur einmalig zur Operation qualifiziert. Analysiert man die Aufteilung in der Gliadel-sowie Kontrollgruppe, so erhält man die entsprechende Aufteilung wie in Abbildung 7 und Abbildung 8.





**Abbildung 7:** Graphische Darstellung der Eingriffsverteilung für die Gliadelgruppe. 51% (n=18) der Patienten wurden einer einmaligen Tumorresektion unterzogen. Im Anteil der Reeingriffe dominieren mit 40% (n=14) die Patienten, die ebenfalls am ersten Rezidiv nochmals operiert wurden. In 9% (n=3) der Fälle erfolgte ein zweiter Rezidiveingriff.



**Abbildung 8:** Graphische Darstellung der Eingriffsverteilung für die Kontrollgruppe. Die Patienten in der Kontrollgruppe wurden in überwiegender Mehrheit in 77% (n=52) der Fälle einer einmaligen Tumorresektion unterzogen. Weitere Eingriffe im Erstrezidivfall erfolgten bei 19% (n=13) der Patienten. Schließlich wurden lediglich 4% (n=3) der Patienten ein zweites Mal am Rezidiv operiert.

### 3.1.6 Resektionsgrade

Die makroskopischen Resektionsgrade wurden aus den Operationsberichten der Erstoperation entnommen und beschreiben insgesamt 64 Totalresektionen (62 %), 30 Teilresektionen (29 %) und neun Biopsien (9 %). In zwei Fällen wurden zunächst stereotaktische Biopsien und anschließend Teilresektionen durchgeführt.

Die Gliadelgruppe umfasst mit einem 86 prozentigen Anteil überwiegend Totalresektionen. Verständlicherweise weist diese Gruppe keine stereotaktischen Biopsien auf. In der Kontrollgruppe überwiegen zwar auch die Totalresektionen mit 52 %, jedoch wurden 13 % der Patienten in der Kontrollgruppe stereotaktisch biopsiert. Die Teilresektion erfolgte bei 35 % der Patienten der Kontrollgruppe. In Abbildung 9 sind die verschiedenen Resektionsgrade speziell für die Subgruppen graphisch dargestellt.

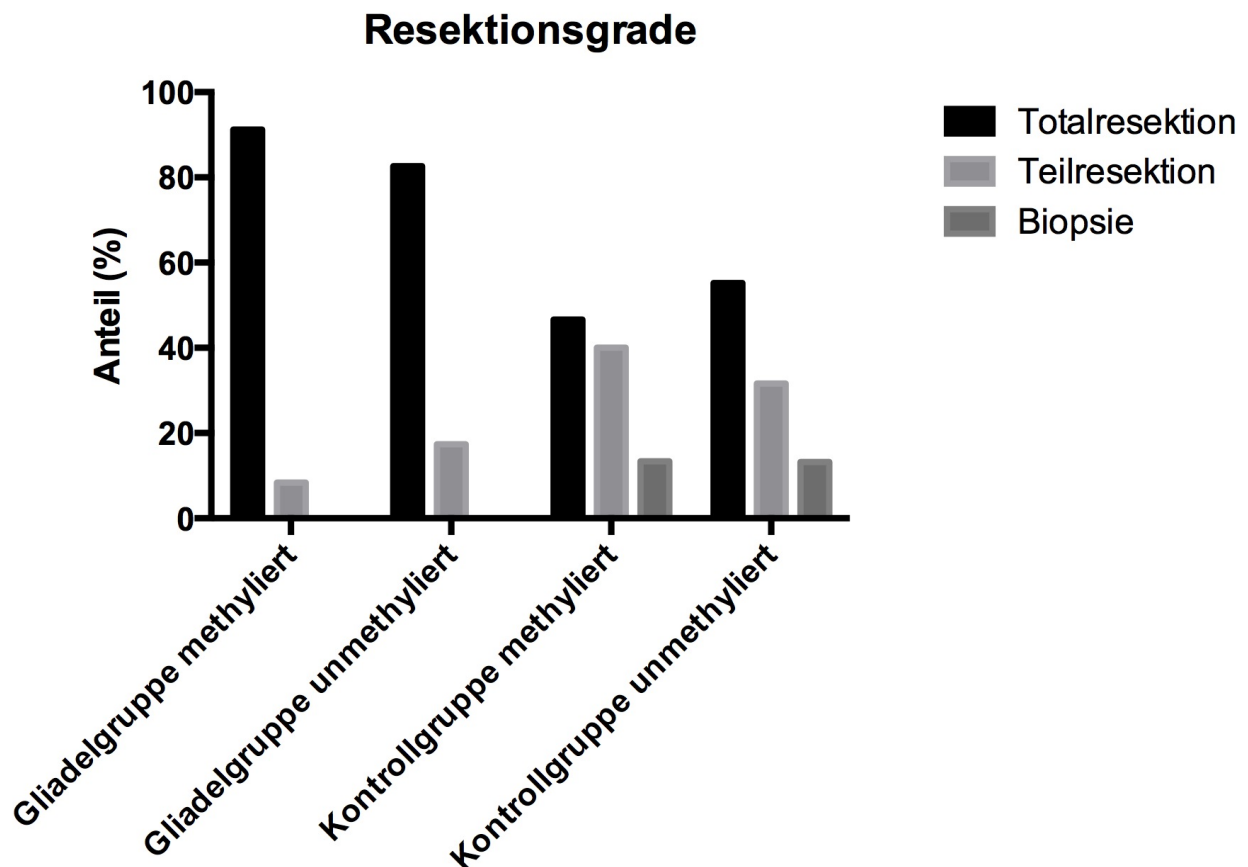


Abbildung 9: Resektionsgrade in den Patientengruppen unterteilt anhand der Operationsberichte nach Anteil (%) der Totalresektionen, Teilresektionen, Biopsien.

**Tabelle 8:** Resektionsgrade in den Patientengruppen unterteilt nach Anzahl der Totalresektionen, Teilresektionen, Biopsien anhand der Operationsberichte.

Resektionsgrade	Gliadelgruppe methyliert	Gliadelgruppe unmethyliert	Kontrollgruppe methyliert	Kontrollgruppe unmethyliert
Totalresektionen (n)	11	19	14	21
Teilresektionen(n)	1	4	12	12
Biopsien (n)	0	0	4	5

**Abbildung 10: Darstellung der Resektionsgrade in Bezug auf die Subgruppierung.** Auf der X-Achse ist der Resektionsgrad angegeben bei der jede Kolumne für eine Subgruppe steht. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Resektionsausmaße für die entsprechende Subgruppe angegeben. Insgesamt bestehen zwischen den einzelnen Subgruppen keine statistisch signifikante Unterschiede ( $p=0.115$ ).

### 3.2 Unerwünschte Ereignisse

Bei 30 Patienten wurden unerwünschte Ereignisse dokumentiert, entweder im Rahmen der stationären Behandlung oder als Wiedervorstellung über unsere Rettungsstelle.

Die Gründe waren dafür am häufigsten Krampfanfälle, Infektionen, Blutungen und thrombotische Ereignisse (tiefe Beinvenenthrombose und Lungenarterienembolie). Die Blutungsereignisse umfassen Nachblutungen in die Resektionshöhle, Ponsblutung, Intraventrikuläre Blutung und chronische Subduralhämatome. Die Infektionen beinhalten Soor-Ösophagitis, schwere Pneumonien, Wundinfektionen und eine Herpes-Zoster-Meningitis. In Tabelle 9 werden die Unerwünschten Ereignisse für die gesamte Patientenkohorte dargestellt.

**Tabelle 9:** Anzahl unerwünschter Ereignisse in der gesamten Patientenkohorte. Es zeigte sich vor allem ein gehäuftes Auftreten von Blutungsereignissen, Krampfanfällen, thrombotischen Ereignissen und Infektionen.

Unerwünschtes Ereignis	Anzahl (n)
Krampfanfall	16
Infektion	8
Blutung	7
Thrombotisches Ereignis	6

Liquorfistel:	2
Hydrocephalus:	1
Zystenbildung	1
Globales Hirnödeme	1

In Abbildung 11 werden die Anzahl der Unerwünschten Ereignisse für beide Behandlungsgruppen dargestellt. Es erscheint ein homogenes Verteilungsmuster zu ergeben, jedoch sollte betont werden, dass der prozentuale Anteil der Unerwünschten Ereignisse in der Gliadelgruppe bei deutlich kleinerer Patientenzahl (35 vs. 68) deutlich höher ist. Das Auftreten von Krampfanfällen, Nachblutungen und thrombotischen Ereignissen scheint daher in der Gliadelgruppe zunächst prozentual höher, allerdings zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen (t-Test  $p > 0.05$ ).

Zu bemerken ist, dass nur in der Gliadelgruppe es zur Zystenbildung und zum Ausbilden eines Hydrocephalus kam. In der Kontrollgruppe trat ein diffuses Hirnödeme nach der operativen Versorgung auf.

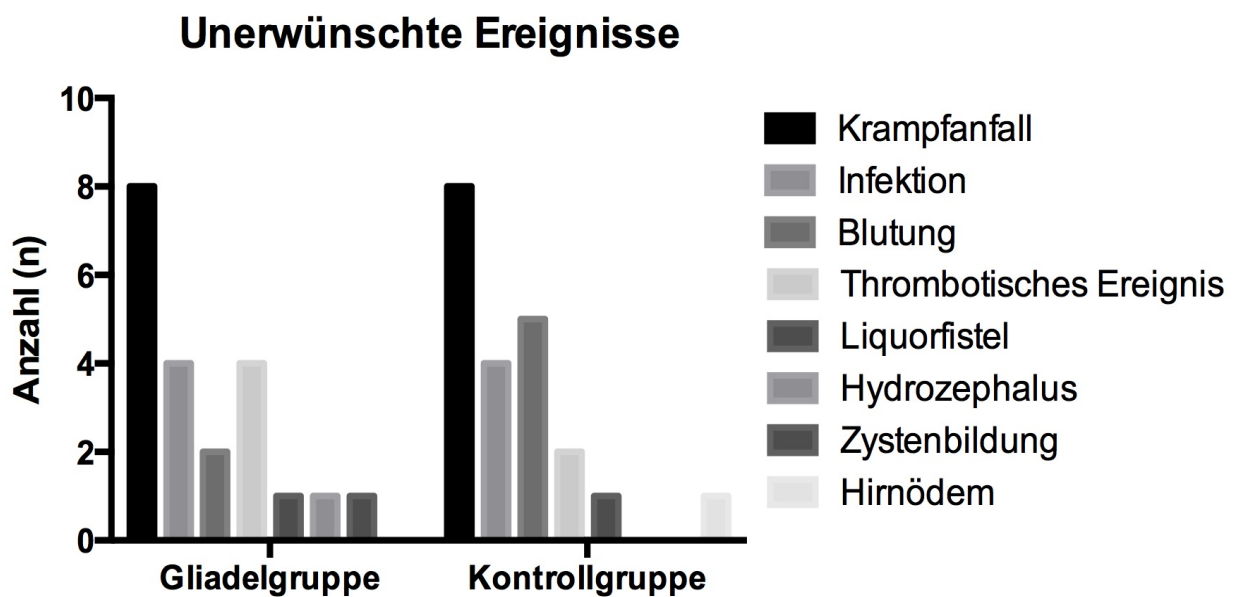
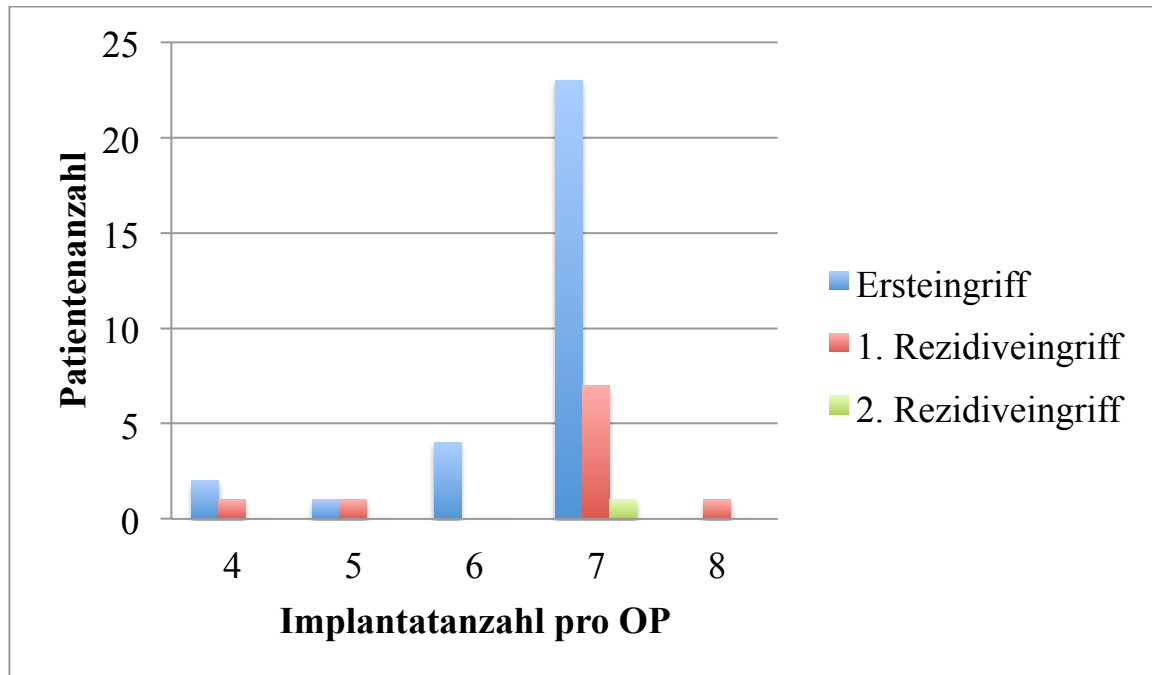


Abbildung 11: Vergleich der unerwünschten Ereignisse (n) in beiden Behandlungsgruppen. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Auftreten von Unerwünschten Ereignissen in beiden Gruppen (t-Test  $p > 0.05$ ).

### 3.3 Anzahl der implantierten Wafer

Insgesamt wurden den 35 Patienten 217 Gliadel-Wafer implantiert. Das bedeutet, dass durchschnittlich 7,5 Wafer pro Patient in die Resektionshöhle implantiert wurden. Jedoch

erhielten, wie die Abbildung 12 zeigt, einige Patienten bei Rezidiveingriffen nochmals Gliadel. Drei Patienten erhielten in zwei aufeinanderfolgenden Operationen jeweils Carmustin- Wafer und bei einem Patienten wurden sogar dreimal nachfolgend Carmustin implantiert. Darüber hinaus wurden sechs Patienten trotz Eröffnung des Ventrikelsystems für die Implantation qualifiziert. Dies setzte jedoch eine vorherige Abdichtung des Ventrikelsystems voraus.



**Abbildung 12: Verteilung der Anzahl der implantierten Wafer bei Erst-, Zweit- sowie Drittoperation.** Die Anzahl der implantierten Wafer lag im Durchschnitt bei 7,5 Wafer. Während der ersten Rezidivoperation wurden bei 10 Patienten Gliadel implantiert und während der zweiten Rezidivoperation erhielt noch ein Patient Gliadel.

### 3.4 MGMT- Promotor- Methylierung

Es wurden 115 (81 %) Methylierungsraten von insgesamt 141 bestimmt. Bei 26 (19 %) Patienten konnten die Methylierungsraten nicht bestimmt werden. Die letztendlich eingeschlossene Patientenanzahl umfasst 103 Patienten. Somit ergibt sich aus den verbleibenden 103 Methylierungsraten eine durchschnittliche MGMT-Promotormethylierung von 19,4 %. In der Tabelle 10 werden die jeweiligen Methylierungsraten für die beiden Gruppen angegeben und zu erkennen ist, dass die durchschnittlichen Methylierungsraten der Gliadel- und der Kontrollgruppe nicht wesentlich voneinander differieren.

**Tabelle 10: Durchschnittliche MGMT- Methylierungsraten in Prozent jeweils für die Gliadel- und die Kontrollgruppe**

	<b>Methylierungsrate</b>
Gliadelgruppe	20,5%
Kontrollgruppe	18,8%

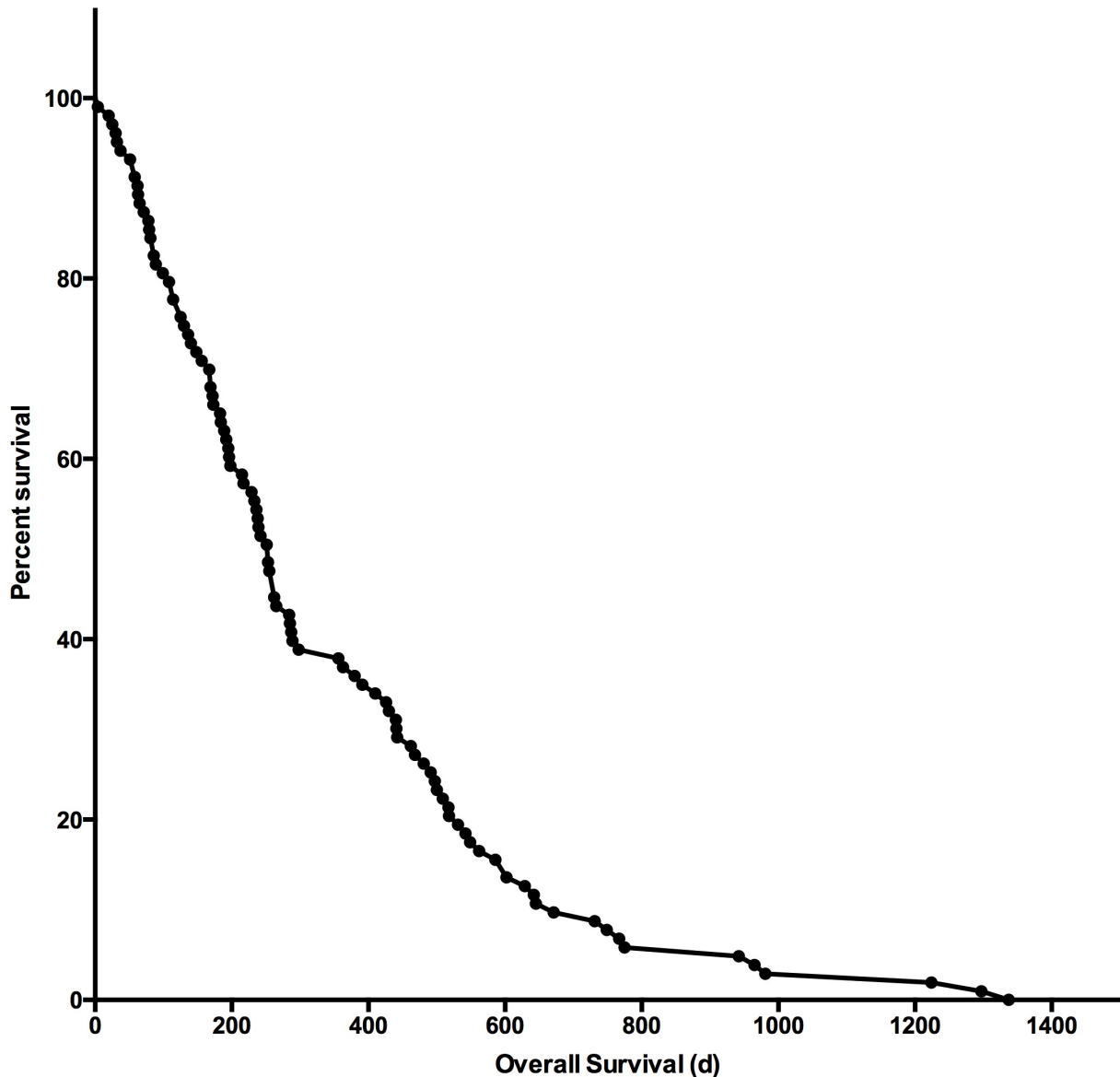
Dichotomisiert man die Gruppen entsprechend des neunprozentigen Schwellenwertes in „methyliert“ und „unmethyliert“, so erkennt man, wie in Tabelle 11 zu erkennen ist, dass die beiden Gruppe mit einer Methylierungsrate unter neun Prozent die Mehrheit im Verhältnis 1,4 darstellen. Die Gliadelgruppe weist einen 34 prozentigen Anteil an methylierten MGMT Promotor auf. In der Kontrollgruppe sind 44 % zu verzeichnen, die eine MGMT Promotor Methylierung über 9 % nachweisen. Statistisch lässt sich bezüglich der Methylierungsraten zwischen der Gliadel- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied nachweisen ( Mann Whitney Test p 0.5004 ).

**Tabelle 11: Quantitative Aufteilung der Gliadel-und Kontrollgruppe bezüglich der MGMT- Promotor Methylierung mit einem Schwellenwert von 9%.**

	<b>MGMT Promotor</b>	
	<b>methyliert</b>	<b>unmethyliert</b>
Gliadelgruppe (n=35)	12	23
Kontrollgruppe (n=68)	30	38
	n=42	n=61

### **3.5 Überlebensdauer**

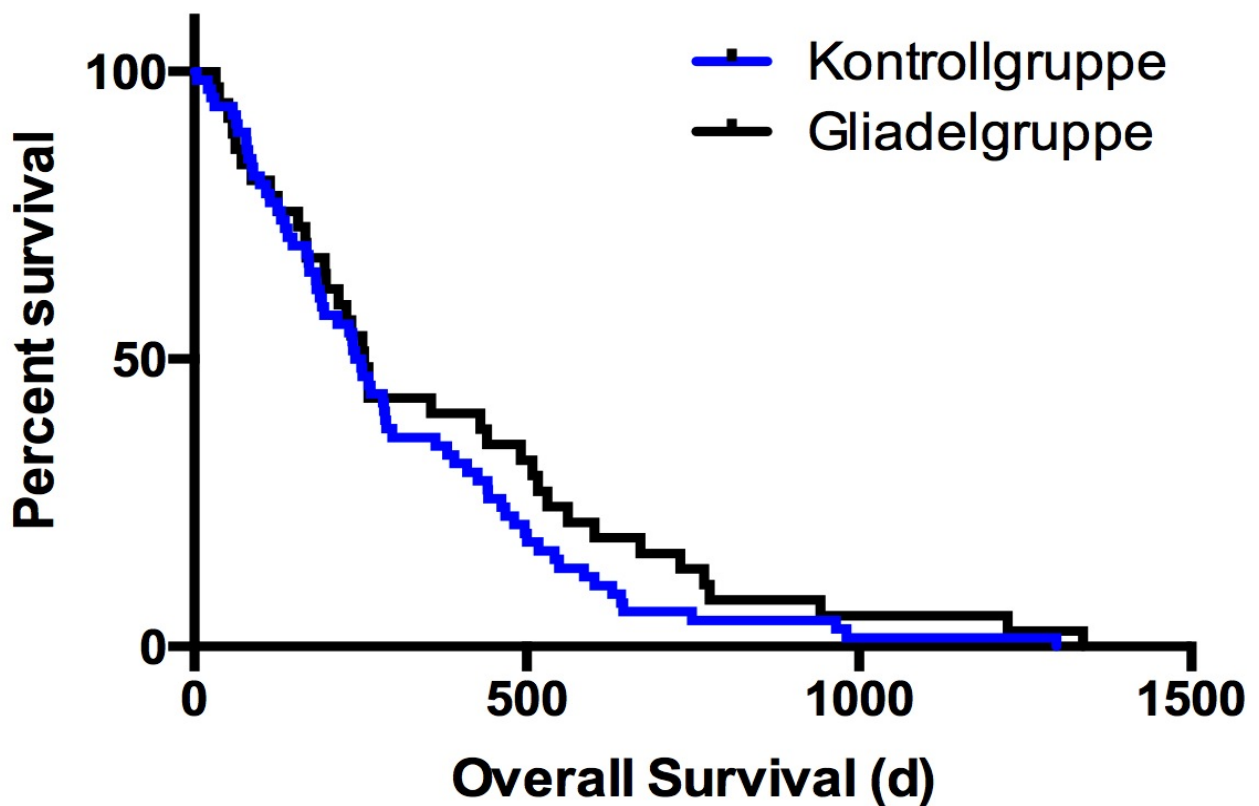
Die mediane Überlebensdauer der Gesamtkohorte (n=103) beträgt 253 Tage. Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 13 veranschaulicht die Verteilung der Überlebensdauer der gesamten Patientenkohorte. Zu erkennen ist, dass nur die Hälfte der Patientenkohorte länger als 251 Tage leben. Außerdem erreichen lediglich 37 % der Patienten die 1-Jahres-Überlebensrate. Die 2-Jahres-Überlebensrate liegt bei 9,7 %. Die kürzeste Überlebensdauer beträgt 4 Tage und die längste Überlebensdauer zählt 1337 Tage.



**Abbildung 13:** *Überlebenskurve nach Kaplan- Meier der Gesamtkohorte.* Zu erkennen ist eine Aufspaltung der Überlebensdauer bei 251 Tagen, die nur die Hälfte der Patienten erreicht. Auf wenige Fälle beschränkt, werden Überlebensdauern von mehr als 2 Jahren erreicht.

Vergleicht man nun die Überlebensdauer der Gliadel- und der Kontrollgruppe mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 14, so lässt sich kein klarer Überlebensvorteil zu Gunsten einer Gruppe erkennen. Beide Kurven zeigen einen identischen Verlauf der Überlebensraten für den Zeitraum von knapp 250 Tagen. Dann weist die Kurve der Gliadelgruppe tendenziell einen Vorteil für den Zeitraum bis 750 Tagen auf, wonach beide Kurven erneut Ihren Anschluss finden und fast gemeinsam zur maximalen Überlebensdauer von knapp über 1300 Tagen verlaufen. In Zahlen ausgedrückt, bedeutet das ein medianes Überleben der Gliadelgruppe von 255 Tagen und

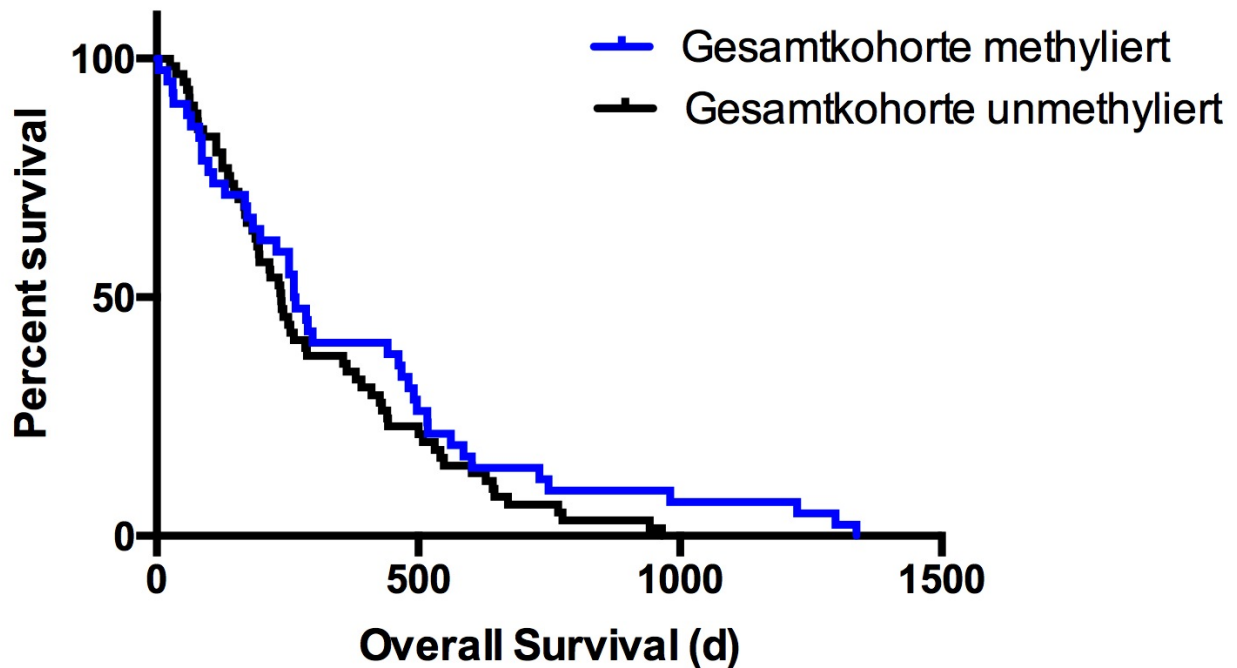
246,5 Tage der Kontrollgruppe. Eine statistische Signifikanz ergibt sich folglich nicht (Log-rank-Test  $p=0.225$ ).



**Abbildung 14:** Überlebenskurven nach Kaplan- Meier für die Gliadel- und Kontrollgruppe. Die mediane Überlebensdauer für die Kontrollgruppe beträgt 246,5 Tage und für die Gliadelgruppe 255 Tage. Statistisch besteht kein signifikanter Überlebensvorteil für eine Untersuchungsgruppe ( $p=0.225$ ).

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Gesamtkohorte entsprechend des neunprozentigen Schwellenwertes in die Gruppe „methyliert“ und „unmethyliert“ dichotomisiert. Die beiden Überlebenskurven nach Kaplan- Meier in Abbildung 15 zeigen einen ähnlichen Verlauf mit einem geringen Überlebensvorteil für die methylierte Subgruppe. In Zahlen ausgedrückt bedeutet das ein medianes Überleben für die methylierte Gruppe von 263,5 Tagen und 238 Tage erreichen die Patienten median in der unmethylierten Gruppe. Wendet man den Log-rank-test an, um eine statistische Signifikanz zu errechnen, erhält man einen p-Wert von 0.195. Jedoch ist in Abbildung 15 zu beobachten, dass die Langzeitüberlebensdauern von über 1000 Tagen nur in der methylierten Gruppe erreicht werden.





**Abbildung 15: Überlebenskurven nach Kaplan- Meier für die methylierte und unmethylierte Gesamtkohorte.** Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied für die beiden Überlebenskurven ( $p=0.195$ ). Zu beobachten ist, dass die methylierte Gruppe Überlebensdauern von über 1000 Tagen erreicht.

Nimmt man zusätzlich den Methylierungsstatus der Gliadel- und Kontrollgruppe in die Analyse der Überlebensraten und subgruppiert diese anhand des neunprozentigen Schwellenwertes in „methyliert“ und „unmethyliert“, so stellen sich, wie in Abbildung 16 zu sehen sind, die Kaplan-Meier Überlebenskurven dar. Die Kurve der methylierten Gliadelgruppe erscheint zunächst tendenziell von den restlichen Subgruppen zu differieren. Bei knapp über 250 Tagen springt diese im bis dahin gemeinsamen Verlauf deutlich ab und verläuft bis zur maximalen Überlebensdauer von 1337 Tagen als solitäre Kurve. Die Verläufe der restlichen drei Kurven zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Interessanterweise ist zu bemerken, dass Überlebensdauern von über 1000 Tagen nur durch die methylierten Subgruppen erreicht werden. Prüft man die Ergebnisse mit Hilfe des Log-rank-Tests, ergibt sich daraus keine statistische Signifikanz ( $p=0.19$ ).

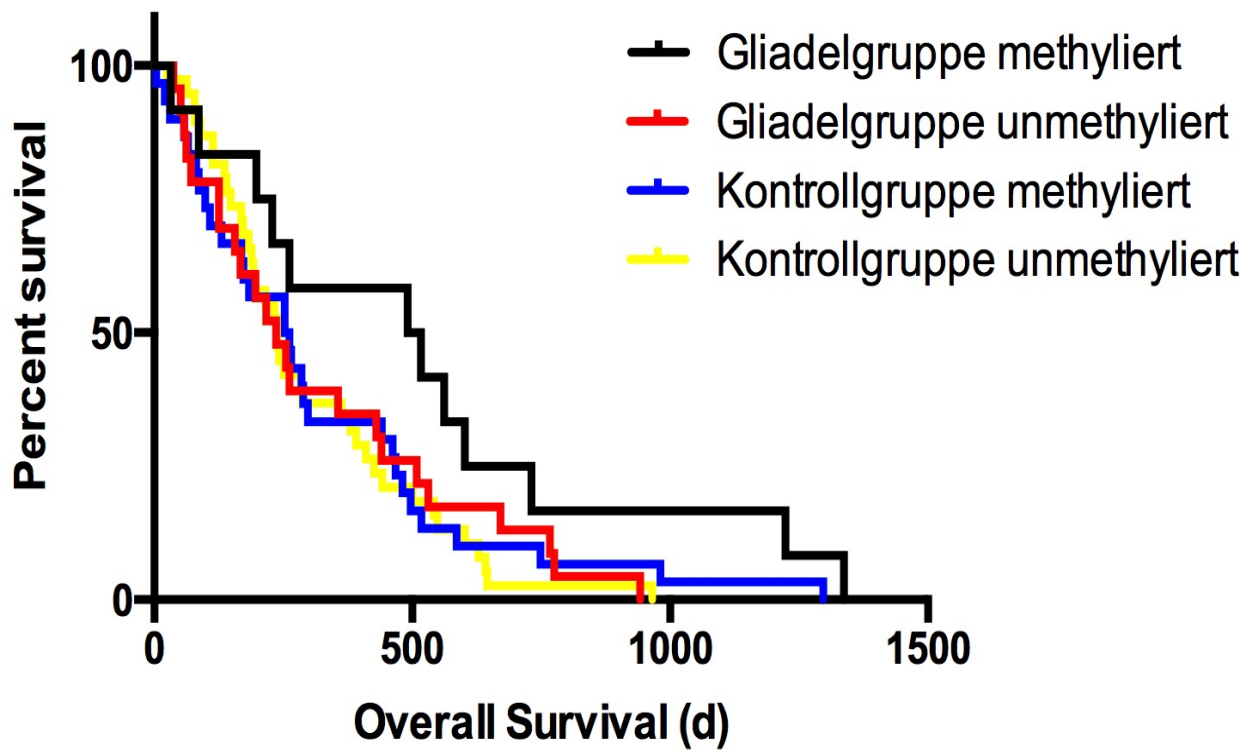


Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der jeweiligen Subgruppen. Zu erkennen lässt sich ein tendenzieller Überlebensvorteil für die methylierte Gliadelgruppe. Jedoch ist statistisch keine Signifikanz nachweisbar ( $p=0.19$ ).

In der Tabelle 12 werden die medianen Überlebensdauern der jeweiligen Subgruppen zusammengestellt. Die methylierte Gliadelgruppe hat die geringste Patientenzahl, kann jedoch, wie bereits die Kaplan Meier Kurve in Abbildung 16 suggerierte, mit 504 Tagen einen Überlebensvorteil im Vergleich zu den restlichen Subgruppen nachweisen. Gefolgt wird diese durch die methylierte Kontrollgruppe mit 257,5 Tagen. Die beiden unmethylierten Subgruppen haben mit 236 Tagen in der Gliadelgruppe und 238,5 Tagen in der Kontrollgruppe die ungünstigen Verläufe.

**Tabelle 12. Tabellarische Darstellung der medianen Überlebensdauern und Patientenzahl der jeweiligen Subgruppen.**

	Gliadelgruppe methyliert	Gliadelgruppe unmethyliert	Kontrollgruppe methyliert	Kontrollgruppe unmethyliert
Mediane Überlebensdauer (d)	504	236	257,5	238,5
Patientenzahl (n)	12	23	30	38

In Abbildung 17 werden explizit die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die methylierte Gliadel- sowie die Kontrollgruppe dargestellt. Die Kurve der methylierten Gliadelgruppe scheint sich früh von Ihrer konkurrierenden Kurve der Kontrollgruppe abzusetzen und verläuft bis zum Ende klar im Vorteil. Zwar errechnet sich mit einem p-Wert von 0.085 (Log-rank test) daraus kein statistisch signifikanter Unterschied, jedoch kann man von einem tendenziell günstigeren Verlauf der methylierten Gliadelgruppe sprechen.

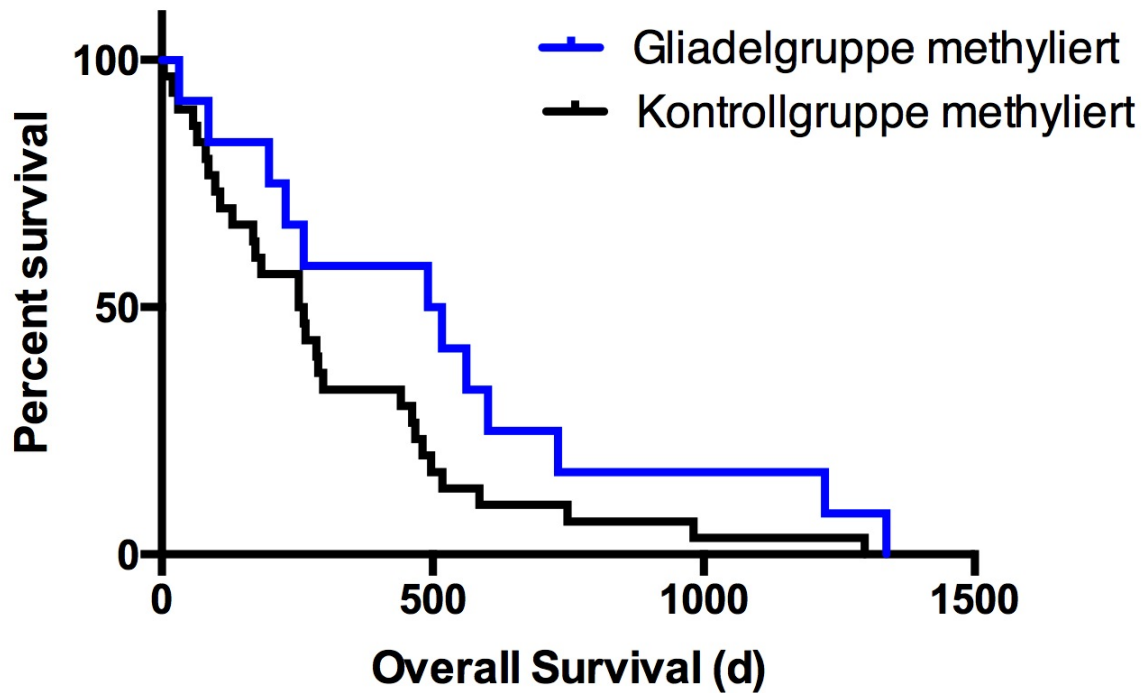
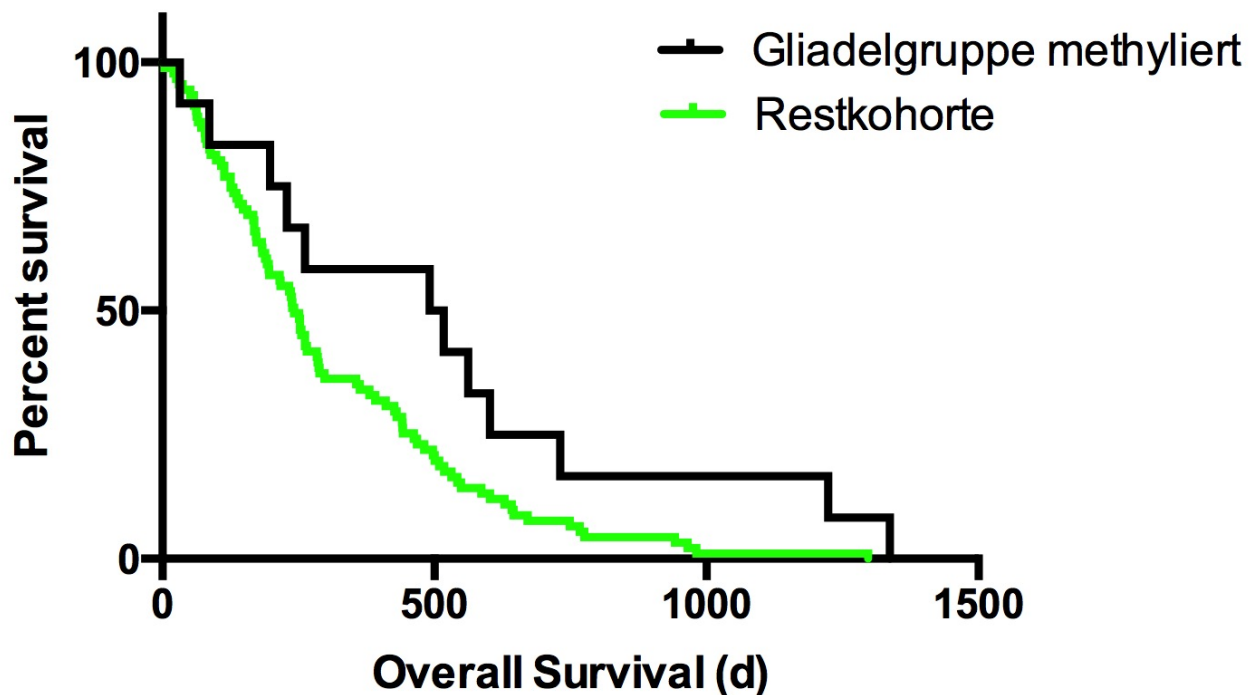


Abbildung 17: Überlebenskurven nach Kaplan- Meier der beiden methylierten Gruppen. Der Verlauf der methylierten Gliadelgruppe (504 vs. 257,5 Tage) erscheint tendenziell günstiger zu sein ( $p=0.085$ ).

Angesichts des ähnlichen Verlaufs der unmethylierten Gliadelgruppe sowie der methylierten und unmethylierten Kontrollgruppe, werden diese in Abbildung 18 zur einer Gruppe zusammengefasst und als „Restkohorte“ definiert. Folglich wird die Überlebenskurve der Restkohorte mit der Überlebenskurve der methylierten Gliadelgruppe in Beziehung gebracht. Nun kann der deutlich zu sehende Unterschied in Abbildung 18 dargestellt werden. Die Kurve der methylierten Gliadelgruppe kann sich bei knapp 100 Tagen vom Verlauf der Restkohorte abgrenzen. Die mediane Überlebensdauer der Restkohorte beträgt 242 Tage. Statistisch wird der Unterschied mit einem p-Wert von 0.036 (Log-rank test) bewiesen.



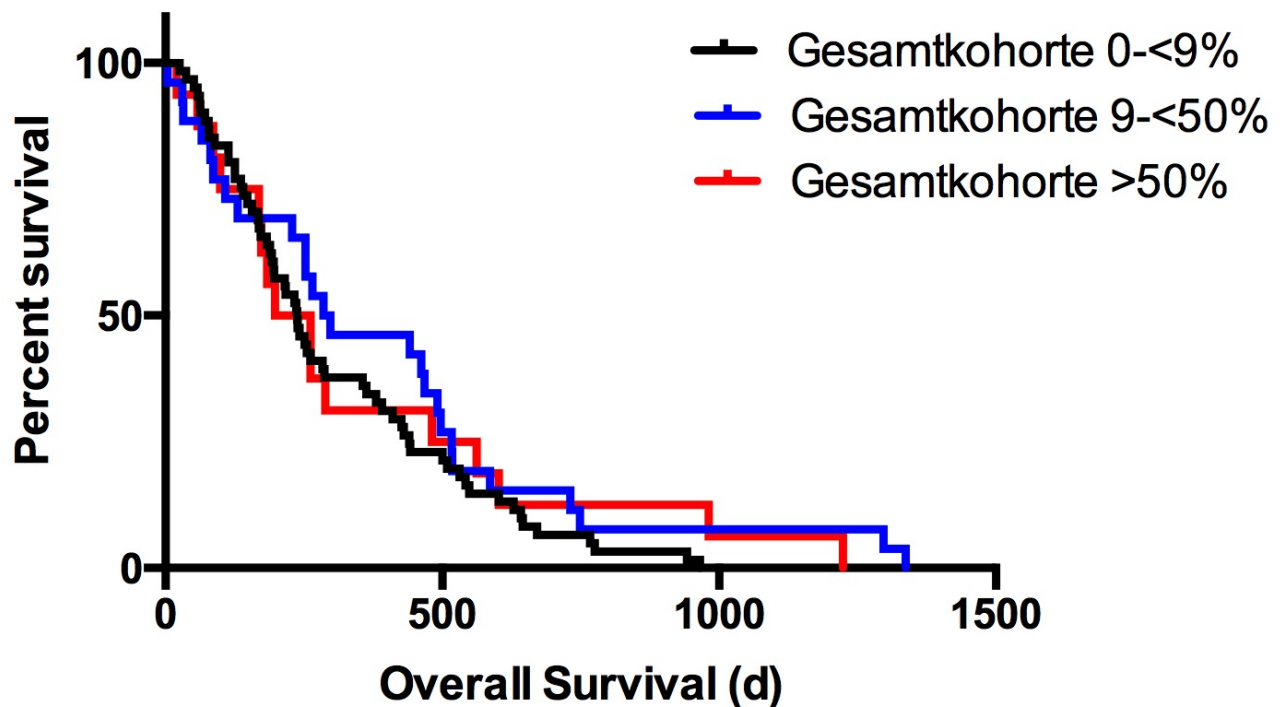
**Abbildung 18: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der methylierten Gliadelgruppe sowie der Restkohorte.** Die Restkohorte setzt sich aus der unmethylierten Gliadelgruppe, der methylierten und unmethylierten Kontrollgruppe zusammen. Die mediane Überlebensdauer der methylierten Gliadelgruppe beträgt 504 Tage und die der Restkohorte beträgt 242 Tage. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0.036$ )

### 3.5.1 Schwellenwert für die MGMT Promotor Methylierungsrate in Abhängigkeit zur Überlebensdauer

Anhand der Überlebensdauer und der Methylierungsraten sollte ein Schwellenwert ermittelt werden, der Aufschluss gibt, ab welchem Prozentsatz sich die Methylierungsrate wesentlich auf die Überlebensdauer unseres Patientengutes auswirkt.

Dazu gruppieren wir zunächst die Methylierungsraten, ohne Dichotomisierung in die Gliadel- und Kontrollgruppe, in drei Subgruppen um die Verteilung hinsichtlich der Überlebensdauern genauer zu analysieren. Dazu wurden wie in Abbildung 19 zu sehen sind, die Methylierungsraten in drei Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe die Methylierungsraten bis neun Prozent umfasst, folgend von der Gruppe mit Raten von neun bis fünfzig Prozent und schließlich die Gruppe mit Methylierungsraten größer gleich fünfzig Prozent. Diese Gruppen wurden dann mit der zu jeder Methylierungsrate zugehörigen Überlebensdauer in Korrelat gebracht. Hierbei zeigt sich interessanterweise, dass die Gruppe mit den höchsten Methylierungsraten ( $>50\%$ ) die kürzeste Überlebensdauern mit durchschnittlich 230 Tagen bietet. Die Gruppe mit den niedrigsten Methylierungsraten ( $<9\%$ ) schneidet bezüglich der Überlebensdauern schlechter ab,

als die Gruppe mit den neun bis fünfzig prozentigen Methylierungsraten (291,5 vs. 238 Tage). Einen statistischen Unterschied zwischen den drei Überlebenskurven konnte der Log-rank test mit einem p-Wert von 0.3956 nicht ergeben.



**Abbildung 19:** Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Gesamtkohorte nach Einteilung in drei Gruppen- geringste Methylierung (0 bis < 9 %), mittlere Methylierung (9 bis < 50 %) und höchste Methylierung ( $\geq 50$  %). Interessanterweise bietet die Gruppe mit den höchsten Methylierungsraten ( $\geq 50$ %) die kürzesten Überlebensdauern (230 Tage). Die Gruppe mit Methylierungsraten zwischen 9 und 50 % kann die längsten Überlebensdauern (291,5 Tage) nachweisen.

Nun dichotomisierten wir die zuvor definierten Subgruppen für die Gliadel- sowie für die Kontrollgruppe. In Tabelle 13 zeigt sich erwartungsgemäß, dass in der Gliadelgruppe die Subgruppe mit den niedrigsten Methylierungsraten (< 9 %) mit 236 Tagen die kürzeste mediane Überlebensdauer bietet. Veranschaulicht man dies in Abbildung 20 anhand der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier, so erkennt man, dass sich der gesamte Kurvenverlauf deutlich ungünstiger im Vergleich zu den beiden anderen Kurven gestaltet. Eine Überlebensdauer von über 1000 Tagen wird nicht erreicht. Ebenfalls zeigt sich in der Gliadelgruppe, dass die höchsten Methylierungsraten (> 50 %) nicht mit der längsten medianen Überlebensdauer einhergehen (Tabelle 13). Die Subgruppe mit den Methylierungsraten von 9 bis 50 % bietet mit 504 Tagen die längste mediane Überlebensdauer innerhalb der Gliadelgruppe. Die Überlebenskurven beider Subgruppen zeigen einen relativ homogenen Verlauf, wobei nur in

der Subgruppe mit Methylierungsraten von 9 bis 50 % die maximale Überlebensdauer erreicht wird. Jedoch kann zwischen den einzelnen Subgruppen innerhalb der Gliadelgruppe keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ( $p > 0.05$ ).

**Tabelle 13. Tabellarische Darstellung der medianen Überlebensdauern der jeweiligen Subgruppen der Gliadel- sowie Kontrollgruppe mit Hinweis auf die Patientenanzahl in den jeweiligen Subgruppen und der statistischen Signifikanz.**

	Gliadelgruppe			Kontrollgruppe		
Methylierungsraten gruppiert (%)	0 - < 9	9 - < 50	≥ 50	0 - < 9	9 - < 50	≥ 50
Mediane Überlebensdauer (d)	236	504	412	238,5	275	178,5
<i>p-Wert</i>	0.282			0.733		
Patientenanzahl (n)	23	6	6	38	20	10

In der Kontrollgruppe bietet die Subgruppe mit den niedrigsten Methylierungsraten (< 9 %) im Vergleich zur Gliadelgruppe nicht die kürzeste Überlebensdauer (Tabelle 13). Die mediane Überlebensdauer von 238,5 Tagen steht deutlich im Vorteil zur medianen Überlebensdauer der Subgruppe mit den höchsten Methylierungsraten (> 50 %) mit 178,5 Tagen. Jedoch zeigt in der Kontrollgruppe die Subgruppe mit den Methylierungsraten von 9 - < 50 % auch hier die längste mediane Überlebensdauer mit 275 Tagen. Dementsprechend zeigt Abbildung 21 andere Kurvenverläufe als Abbildung 20. Den ungünstigsten Verlauf präsentiert die Kurve der Subgruppe mit den höchsten Methylierungsraten (> 50 %), wobei Überlebensdauern von knapp 1000 Tagen auch hier erreicht werden. Die Subgruppe mit Methylierungsraten von 9 bis < 50 % bietet nicht nur die längste mediane Überlebensdauer, aber erreicht als einzige Überlebensdauern von über 1000 Tagen.

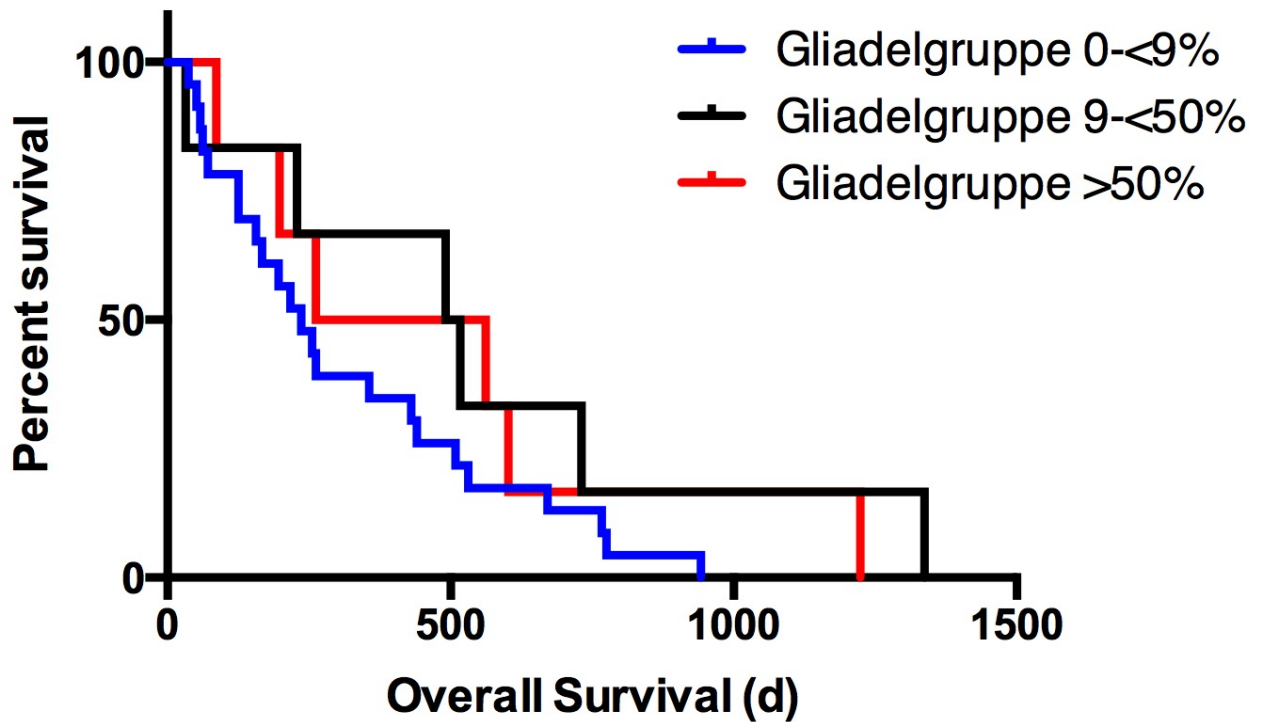


Abbildung 20: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Gliadelgruppe gruppiert nach Methylierungsraten (0 bis <9 %; 9 bis <50 %; ≥50 %). Die Subgruppe mit den niedrigsten Methylierungsraten (<9 % ) bietet ein ungünstigeren Verlauf bezüglich der Überlebensdauer im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Die Subgruppe mit Methylierungsraten von 9 - < 50 % bietet das längste Überleben und nicht wie zu erwarten die Subgruppe mit den höchsten Methylierungsraten ( > 50 %). Aus den Resultaten ergibt sich jedoch keine statistische Signifikanz (p=0.282)



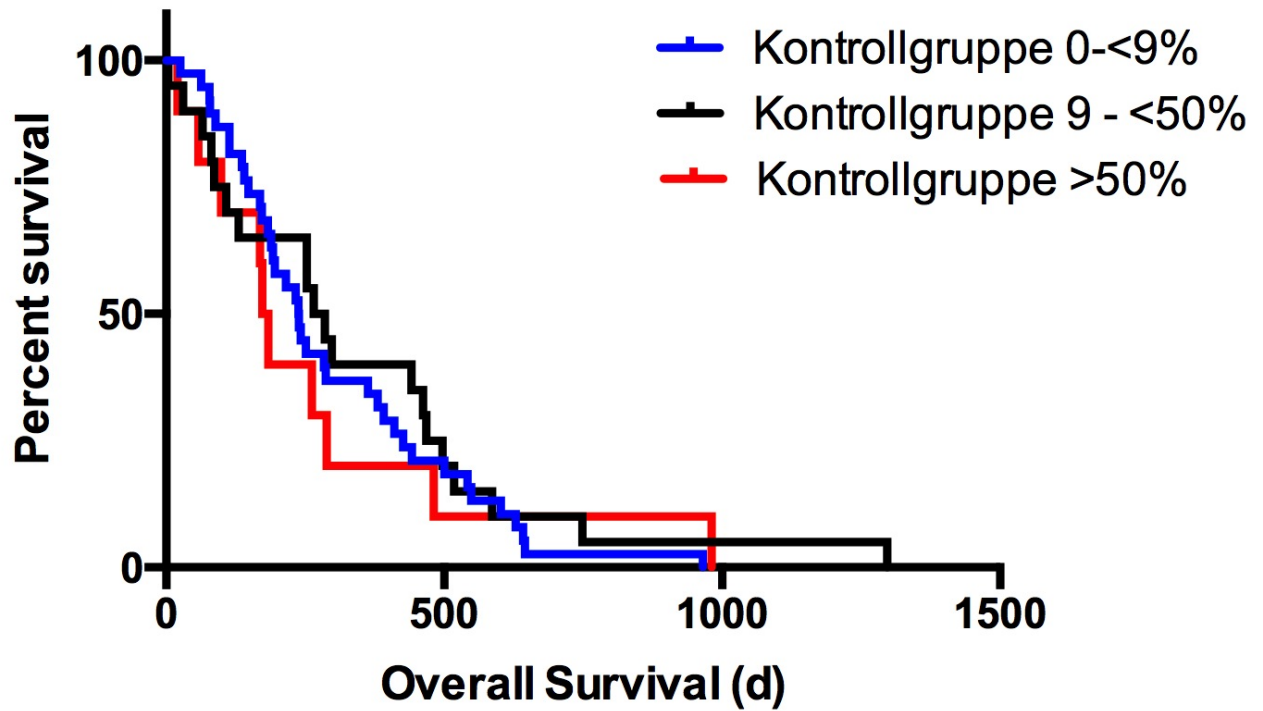


Abbildung 21 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Kontrollgruppe gruppiert nach Methylierungsraten (0 bis <9 %; 9 bis <50 %;  $\geq 50$  %). Die Subgruppe mit den höchsten Methylierungsraten (> 50 %) bietet den ungünstigsten Verlauf. Die Subgruppe mit Methylierungsraten von 9 bis < 50 % bietet die längste mediane Überlebensdauer. Es ergibt sich keine statistische Signifikanz ( $p=0.733$ ).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zielsetzung der Arbeit**

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Analyse der Überlebensdauern der mit und ohne Gliadel therapierten Patienten sowie die Sekundäranalyse des MGMT-Methylierungsstatus/-rate und die Korrelation mit der Überlebensdauer. Die aktuelle Studienlage ist zu diesem Thema eher spärlich und befasst sich hauptsächlich mit der Thematik der Gliadel-Therapie ohne Einbeziehung der MGMT-Methylierung. Zu dem ist zum aktuellen Zeitpunkt keine wissenschaftliche Arbeit veröffentlicht, die die Methylierung per Pyrosequenzierung analysiert und somit neben der Analyse des MGMT-Methylierungsstatus (mit/ohne Methylierung) auch eine Bestimmung der Methylierungsrate (prozentuale Angabe der MGMT-Methylierung) erlaubt. Ebenfalls sind bisher keine Arbeiten veröffentlicht, die sich mit dem Thema MGMT und Gliadel befassen und eine Kontrollgruppe mit Patienten ohne Gliadel-Implantation definiert haben.

### **4.2 Diskussion der Methodik**

#### **4.2.1 Patientengut**

Es wurden ausschließlich Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme WHO IV erkrankt sind, eingeschlossen. Demzufolge bleibt die Überlebensdauer unbeeinflusst vom günstigeren Krankheitsverlauf der niedriggradigen Gliome. Jedoch hat dies zu Folge, dass eine deutlich kleinere Patientenanzahl in die eingeschlossen werden konnte.

Es wurden Patienten aus dem Zeitraum von 2008 bis 2014 retrospektiv untersucht. Die Entscheidung den Untersuchungsbeginn mit dem Jahre 2008 zu datieren wird dadurch begründet, dass zu der Zeit das Stupp-Protokoll mit dem nachgewiesenen Überlebensvorteil für die adjuvante und konkomitante Temozolomid-Gabe bereits fest etabliert war<sup>17</sup>. Eine standardisierte Nachbehandlung erlaubte es, die mögliche negative Beeinflussung der Überlebensdauer der Patienten durch ungünstige Therapiestrategien zu minimalisieren. Ebenfalls ergab sich aus der Datierung des Endpunktes des Untersuchungszeitraums die Möglichkeit, vor dem Hintergrund der bisher publizierten durchschnittlichen Überlebenszeit von Glioblastoma-multiforme-Patienten, möglichst vollzählige Sterbedaten der Studienpatienten einzuholen.

Das Patientengut wurde in zwei Hauptgruppen unterteilt, in die Gliadel- sowie die Kontrollgruppe. Die Gliadelgruppe umfasst alle Patienten, die mindestens ein Carmustin-Wafer

implantiert bekommen haben. Als Kontrollgruppe wurden Patienten gewählt, die ebenfalls chirurgisch und adjuvant therapiert worden sind, jedoch ohne Implantierung von Carmustin-Wafern. Dies ermöglicht die beiden Gruppen auf einen eventuellen Überlebensvorteil zu überprüfen. Der nächste Fokus galt der Überlebensdauer, die von den Standesämtern eingeholt wurden sind. Patienten mit unbekanntem Sterbedaten wurden ausgeschlossen. Als nächstes wurden die MGMT-Methylierungsraten untersucht, die zum größten Teil nachbestimmt werden mussten, da die Bestimmung zu der Zeit nicht zur Routinediagnostik zählte. Im Falle von nicht zu bestimmenden Methylierungsraten wurden die Patienten ausgeschlossen. Auf Grund der Ausschlusskriterien reduzierte sich die primäre Kohorte von 141 auf 103 Patienten, die letztendlich eingeschlossen werden konnten.

Die Patientenanzahl erscheint ausreichend und vergleichbar mit Publikationen, die sich mit der Thematik Carmustin-Wafer (Gliadel) und MGMT-Methylierungsstatus befassen. Metellus et al.<sup>44</sup> untersuchte 22 Glioblastoma-multiforme-Patienten, die im Rezidivfall mit Gliadel therapiert und anschließend auf ihren MGMT-Methylierungsstatus hin überprüft wurden. Gutenberg et al.<sup>45</sup> schloss 47 Patienten ein, die zwar alle mit Gliadel therapiert, jedoch unterschiedlich adjuvant behandelt wurden. Zudem gab es in der Publikation von Gutenberg keine Vergleichsgruppe, die kein Gliadel erhalten hatte. So bleibt die Frage offen inwieweit die Gliadel-Therapie einen Überlebensvorteil für das Patientengut bringt. Die Publikation von Lechapt-Zalcman et al.<sup>46</sup> umfasste 111 Patienten, die ebenfalls alle ausschließlich mit Gliadel therapiert wurden. Untersucht wurde dabei die Überlebensdauer der Patienten in Abhängigkeit der MGMT-Promotor-Methylierung. Auch in dieser Publikation lässt sich methodisch kein Überlebensvorteil für die Anwendung von Gliadel überprüfen. Dementsprechend erschließt sich aus den Resultaten der zuvor genannten Publikationen nicht, ob der Methylierungsstatus explizit das Überleben für lokal mittels Carmustin behandelte Patienten beeinflusst.

#### **4.2.2 Methode zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus**

Zur Bestimmung des MGMT-Methylierungsstatus kommen wie bereits beschrieben viele verschiedene Methoden zum Einsatz. Im Jahre 1999 wurde erstmalig die MSP Methode zur Bestimmung der MGMT-Methylierung genutzt<sup>47</sup>. Diese Methode erlaubt eine kosteneffiziente MGMT-Methylierungsbestimmung, erzielt aber keine quantitativen Ergebnisse und ergibt relativ häufig falsch-positive oder falsch-negative Resultate besonders bei qualitativ schlechter DNA<sup>48</sup>. Trotzdem ist die MSP Methode mit ihren zahlreichen Varianten weit verbreitet und Hegi et al.<sup>33</sup> nutzte diese Methode um die MGMT-Methylierung der Patienten aus der EORTC Studie zu bestimmen. Es gelang damit einen signifikanten Vorteil für die Response Rate auf TMZ bei

positiver MGMT Methylierung nachzuweisen <sup>33</sup>. Rezente Studien zeigen aber, dass die Pyrosequenzierung der MSP-Methode deutlich überlegen ist <sup>39,43,48</sup>. Da es sich um eine quantitative Methode handelt wird weiterhin diskutiert ab welchem Prozentsatz der MGMT-Promoter als methyliert oder nicht methyliert gilt. Trotz fehlenden prospektiven Studien zu diesem Thema geht man von einer Grenze zwischen acht und zehn Prozent aus <sup>39</sup>.

In dieser Arbeit kommt die Pyrosequenzierung zur Bestimmung der MGMT-Methylierungsrate zum Einsatz. Diese Methode erlaubt, wie bereits in der Einleitung beschrieben, eine quantitative prozentuale Angabe des Methylierungsstatus. Das ermöglicht eine präzisere Korrelierung zum prognostischen Wert des MGMT-Methylierungsstatus. Jedoch muss man sich in der klinischen Routineuntersuchung bei der Bestimmung auf eine geringe Anzahl von zu analysierenden CpG-Inseln konzentrieren. Überwiegend werden entweder vier oder fünf von 97 möglichen CpG-Inseln bestimmt, da es ansonsten ein nicht zu stemmender zeitlicher Aufwand wäre alle Inseln einzeln zu analysieren. Nun aber sind die 97 CpG-Inseln nicht alle uniform methyliert und präsentieren nicht ein einheitliches Korrelat mit der Überlebensdauer <sup>49</sup>. Das von uns genutzte kommerzielle Therascreen MGMT Pyro Kit (Qiagen, Hilden Deutschland) weist an vier CpG-Orten (76-79) die Methylierung des MGMT-Gens nach. Nachweislich bieten diese CpG-Inseln den höchsten prognostischen Wert. Quillien et al.<sup>43</sup> zeigte, dass die fünf CpG-Inseln 74-78 am ehesten mit den Überlebensdauern korrelieren. Everhard et al.<sup>49</sup> analysierte 52 CpG-Inseln bei 54 Glioblastom Patienten und untersuchte die damit korrelierende MGMT-Expression mit dem Hintergedanken, dass eine niedrige MGMT-Expression eine günstigere Respon auf alkylierende Chemotherapeutika bietet. Er konnte nachweisen, dass die Methylierung aller 52 CpG-Inseln (12-46 und 71-97) mit einer über 85 prozentigen Rate mit einer niedrigen MGMT-Expression einhergeht <sup>49</sup>. Des Weiteren zeigte er, dass die konventionell untersuchten CpG-Inseln bei der MSP-Methode nur zu 57 % mit einer niedrigeren MGMT-Expression übereinstimmen. Letztendlich muss man anmerken, dass die Methylierung der spezifischen CpG-Inseln nicht hinsichtlich ihrer Relevanz in Bezug auf die daraus folgernden Überlebensdauer, sondern nur in Bezug auf die Modulation der MGMT-Expression geprüft worden sind. Somit lässt sich daraus lediglich ein indirekter Einfluss auf die Überlebensdauer ableiten. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass sich eine niedrige MGMT-Expression positiv auf die Überlebensdauer auswirkt und sogar von seinem prädiktiven Wert hinsichtlich der Responder rate auf TMZ besser geeignet ist <sup>50,51,52</sup>. Vermutet wird ebenfalls, dass eine niedrige MGMT-Expression nicht nur durch eine positive MGMT-Methylierung zu begründen ist, sondern andere Genregulationen mit eine große Rolle spielen, wie z.B. Histonmodifikation<sup>49</sup>. Unterstrichen wird diese Annahme durch die Publikation von Kreth et al.<sup>53</sup>, der nachweisen konnte, dass die MGMT-Expression ein

wesentlicher Outcome-Prädiktor unabhängig vom MGMT-Promoter-Methylierungsstatus ist. Diese Annahmen erscheinen schlüssig, jedoch bietet die Bestimmungsmethode der MGMT-Expression via Immunhistochemie (IHC) einen wesentlichen Nachteil. Es handelt sich um eine untersucherabhängige Methode, bei der man die Zuverlässigkeit der Resultate anzweifeln muss. Preusser et al.<sup>39</sup> ließ in seiner Publikation vier unabhängige Neuropathologen aus drei Laboren 164 Proben mit Glioblastoma multiforme auf MGMT-Expression untersuchen. Die Ergebnisse der gleichen Proben sowohl zwischen unterschiedlichen Untersuchern als auch bei mehreren Tests eines Untersuchers variierten so stark, dass eine klare Empfehlung gegen diese Untersuchungsmethode ausgesprochen wurde. Ebenfalls konnte Preusser<sup>39</sup> kein Korrelat zwischen MGMT-Methylierung und MGMT-Expression nachweisen. Ursächlich kann die Kontamination von Gliom-Proben mit nicht neoplastischen MGMT-exprimierenden Zellen sein<sup>54</sup>. Auch bei dieser Methode fehlt ein einheitlicher Grenzwert, der eine niedrige von einer hohen Expression dichotomisiert<sup>39</sup>.

Letztendlich kann anhand der rezenten Studien zum Thema der Untersuchungsmethoden hinsichtlich der MGMT-Methylierung eine klare Empfehlung zur Pyrosequenzierung ausgesprochen werden. Nunmehr muss gesagt werden, dass alle aktuellen Studien, die sich mit der Thematik Gliadel und MGMT-Methylierung beschäftigen entweder die MSP oder IHC-Methode genutzt haben. Somit besteht hinsichtlich der Wahl der Untersuchungsmethode dieser Arbeit ein klarer Vorteil.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

Die Hauptgruppen dieser Arbeit bestehen aus der Gliadelgruppe sowie der Kontrollgruppe, die kein Gliadel implantiert bekommen hat. Folglich wurden die beiden Hauptgruppen anhand des MGMT-Promoter-Methylierungsstatus unterteilt. Um diese Gruppen vergleichen so können, wurden zunächst alle Gruppen auf die bekannten Prognosefaktoren der Überlebenszeit wie Alter, klinischer Zustand (KPS), Resektionsgrad und das Auftreten von unerwünschten Ereignissen untersucht<sup>55,56,57,58</sup>.

Bezüglich dieser Werte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Daraus folgernd sind alle Gruppen miteinander komparabel ohne einer Gruppe günstigere Ausgangswerte zu bieten.

Nun werden diese Prädiktoren mit der aktuellen Studienlage verglichen. Unser Patientengut besteht zu 58 % aus Männern und entspricht in etwa der bekannten Ratio von 1.5:1 im Verhältnis zu Frauen. Erklärt wird dieses Missverhältnis zu Gunsten des weiblichen Geschlechts durch die

anscheinende protektive Wirkung von Östrogenen, Progesteron und deren Metaboliten auf die Pathogenese vom GBM<sup>59</sup>. Aus diesem Grund steigt die Inzidenz bei Frauen postmenopausal im Vergleich zur Prämenopausal signifikant an<sup>60</sup>.

Das Durchschnittsalter unserer Kohorte mit 64 Jahren entspricht der bekannten Epidemiologie des Glioblastoma multiforme<sup>61</sup>. Vergleicht man das Durchschnittsalter mit den demographischen Charakteristika der Studie von Stupp et al. 2005<sup>17</sup>, zeigt sich dort ein um über sieben Jahre jüngeres Patientenkollektiv. Ebenfalls imponiert in der 240 Patienten umfassenden Gliadel-Studie von Westphal et al. 2003<sup>62</sup>, eine Altersverteilung zugunsten jüngerer Patienten mit einem Durchschnittsalter von knapp 53 Jahren. Analysiert man die Altersverteilung unserer jeweiligen Gruppen, besteht statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Subgruppen. Allerdings erscheint die Kontrollgruppe tendenziell fortgeschrittener im Lebensalter zu sein. Bekanntermaßen ist das Alter ein wichtiger Prognosefaktor. Der Grund dafür kann sowohl ein zunehmend schwächeres Immunsystem im Alter sein, als auch eine im Alter sinkende Verträglichkeit gegenüber der aggressiven adjuvanten Therapie. Studien wie von Stupp et al.<sup>17</sup> wandten neue Therapieformen an deutlich jüngeren Patientenkollektiven an. Westphal et al.<sup>62</sup> zeigte in seiner Gliadel-Studie, dass ein Alter über 60 Jahre ein statistisch signifikant höheres Sterberisiko mit sich bringt.

Der präoperative klinische Zustand wurde entsprechend des etablierten Karnofsky Index objektiviert. Stupp et al.<sup>17</sup> nutzte den ECOG Performance Status, der dem KPS ähnelt, jedoch eine gröbere Einteilung unternimmt. Letztendlich aber sind die beiden Skalen vergleichbar und stellen ein ähnlich gutes prognostisches Werkzeug für Tumorpatienten dar<sup>63</sup>. Der durchschnittliche präoperative KPS-Wert der eingeschlossenen Patienten beträgt knapp 80 % in allen vier Subgruppen. Die niedrigsten KPS Werte mit  $\leq 50$  % sind lediglich in der Kontrollgruppe vertreten. Auch wenn die Unterschiede zwischen den vier Subgruppen statistisch nicht signifikant sind, erkennt man tendenziell bei der Entscheidung zur Implantation von Carmustin-Wafern eine Patientenpräferenz zu Gunsten eines günstigeren Ausgangswertes nach KPS. Vergleicht man den durchschnittlichen KPS-Wert mit der rezenten Studienlage, scheinen die Werte komparabel zu sein. Aber auffällig ist, dass in unserem Patientengut ein KPS-Wert von 90% nicht überschritten wird. Werte darüber sind jedoch fester Bestandteil des Patientengutes der zuvor verglichenen Studien. Dieser Umstand könnte dadurch begründet sein, dass der überwiegende Anteil unserer Kohorte aus der Rettungsstellenakquise besteht. Also handelt es sich um Patienten, die auf Grund eines neurologischen Defizits die Rettungsstelle aufgesucht haben. Elektive Tumoroperationen stellten die absolute Minderheit dar. Somit ist zu postulieren, dass unser Patientengut sich bereits in einer avancierten Krankheitsetappe befindet,

die symptomatisch durch die ungünstige anatomische Lage und/oder der Größe des Tumors geprägt ist.

Der Resektionsgrad scheint als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für die Überlebenszeit zu sein. Lacroix et al.<sup>64</sup> konnte in einer retrospektiven Untersuchung nachweisen, dass ein Resektionsgrad von über 98% signifikant mit einem Überlebensvorteil einhergeht. Sanai et al.<sup>65</sup> wies nach vorheriger Analyse von 500 GBM Patienten einen Überlebensvorteil für einen 78 prozentigen Resektionsausmaß nach, jedoch evidenter erscheint ein Resektionsausmaß über 95%. Verständlicherweise gibt es auf Grund des moralischen Dilemmas keine prospektive Studie. Problematisch erscheint der Ansatzpunkt der Studien lediglich den Resektionsgrad zu beziffern, da dabei unterschiedlich große Tumorumfänge eigentlich nicht miteinander vergleichbar sind. Im Falle von großen Ausgangstumorumfängen verbleibt trotz eines über 90 prozentigen Resektionsausmaßes ein relativ großes Tumorumfängen im Vergleich zu Tumoren mit einem deutlich kleineren primären Tumorumfängen. Dieser Problematik stellte sich Grabowski et al.<sup>55</sup> in einer Publikation, in der er den prognostischen Wert vom Resektionsausmaß und des Resttumorumfängen verglich. Er kam zum Ergebnis, dass beide Faktoren einen hohen prognostischen Wert haben, aber dem Resttumorumfängen sprach er einen höheren Stellenwert zu<sup>55</sup>. Die aus den Operationsberichten entnommenen Resektionsgrade unserer Gesamtkohorte, bestehen mehrheitlich mit 62,1 % aus Totalresektionen. Dichotomisiert man in die Gliadel- und Kontrollgruppe, so teilen sich die Resektionsgrade zu Gunsten der Totalresektionen mit 85,7 % für die Gliadelgruppe auf. In der Vergleichsgruppe wurden lediglich 51,5 % Totalresektionen durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse mit der Studienlage, so erhält man ebenfalls ein ähnliches Bild des Verteilungsspektrums an prozentualen Angaben der Totalresektionen abhängig von der Therapieform. Jedoch wird nicht aus jeder Publikation ersichtlich in welcher Form der Resektionsgrad bemessen wurde, ob entweder anhand eines postoperativen bildmorphologischen Befundes oder aus dem Operationsbericht. In der Publikation von Lechapt-Zalcman et al.<sup>46</sup> wurden die Resektionsausmaße in drei Gruppen unterteilt- Totalresektion (100%), Subtotalresektion (>90%) und Teilresektion (<90%). Die Bestimmungsmethode bleibt unklar. Der Anteil an Total- und Subtotalresektionen in der Lechapt-Zalcman Publikation ist mit 85,5 % zu beziffern, also komparabel mit dem Ergebnis unserer Totalresektionen in der Gliadelgruppe<sup>46</sup>. Gutenberg et al.<sup>45</sup> teilte ebenfalls die Resektionsausmaße in die drei Gruppen auf und konnte in knapp 85 % der Fälle Totalresektionen erreichen. Sein gewähltes Kriterium für die Definition einer Totalresektion war eine fehlende Kontrastmittelaufnahme in der postoperativen MRT-Bildgebung<sup>45</sup>. Identisch erfolgt die Eingruppierung und Definition der Kriterien in der

Publikation von Metellus et al.<sup>44</sup>, in der ein 63,6 prozentiger Anteil an Totalresektionen angegeben wird. Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit der Publikation von Stupp et al.<sup>17</sup> ergibt sich dort ein deutlich niedrigerer Anteil mit knapp 40% an Totalresektionen. Berücksichtigt man die Resektionsgrade aus Studien, die sich ausschließlich mit dem Thema Gliadel ohne Berücksichtigung der MGMT-Promotor Methylierung beschäftigen, so dominieren ebenfalls Totalresektionen in den Gliadelgruppen. McGirt et al.<sup>66</sup> benennt einen knapp 77 prozentigen Anteil an Totalresektionen. Gleichmaßen präsentiert sich in der Publikation von Menei et al.<sup>67</sup> ein 85 prozentiger Patientenanteil mit Resektionsausmaßen von über 90 %. Ausgenommen erscheint die Publikation von Westphal et al.<sup>62</sup>, in der sowohl in der Gliadelgruppe als auch in der Kontrollgruppe der Resektionsgrad bei knapp 89 % lag. Zusammenfassend lässt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse eine klare Tendenz hinsichtlich eines höheren Resektionsgrades in den mit Gliadel therapierten Patientengruppen erkennen, die sich bekanntermaßen vorteilhaft auf die Überlebensdauer auswirkt. Unsere Ergebnisse unterstreichen dies, auch wenn der Resektionsausmaß nicht anhand eines postoperativen MRTs gemessen wurde, sondern sich ausschließlich auf die subjektive Einschätzung des Operateurs stützt.

Wie bei jedem Therapeutikum – insbesondere bei einem lokalen Chemotherapeutikum welches intrazerebral implantiert wird – dürfen mögliche unerwünschten Ereignisse nicht ausser acht gelassen werden. Es konnte bereits 1989 nachgewiesen werden, dass das Kopolymer „Polifeprosan“ in Waferform in Rattenhirnen nicht toxisch wirkt und eine hohe Biokompatibilität besitzt<sup>68</sup>. Des Weiteren sind die Wafer bereits nach 3 Wochen zu 70% abgebaut. Jedoch verbleibt die toxische Wirkung der chemotherapeutischen Komponente des Wafers. Die lokale Applikation von BCNU entspricht einer 1300-fach höheren Dosiskonzentration als die der intravenösen Darreichungsform<sup>69</sup>. Folglich scheint die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten insbesondere lokalen Ereignissen hoch. In der Gliadelgruppe konnten gehäuft Krampfanfälle, Infektionen und thrombotische Ereignisse verzeichnet werden. Insgesamt erscheint ein tendenziell höheres Nebenwirkungspotenzial der Gliadelgruppe in den protokollierten unerwünschten Ereignissen zu geben, verbleibt aber unter der statistischen Signifikanzgrenze. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der Studienlage so erhält man ein recht ähnliches Profil der unerwünschten Ereignisse. Die häufigsten erwähnten Nebenwirkungen in den Studien sind Krampfanfälle (19-33 %), Wundheilungsstörungen (14-16 %), Hirnödem (4-23 %), thrombotische Ereignisse (8-10 %), Hirndruck (4-9 %), Liquorfistel (5 %) und intrakranielle Infektionen (4-5 %) <sup>70</sup>. Epilepsie und lokales Hirnödem scheinen prozentuell gesehen, ein wesentliches Problem darzustellen, sind aber von ihrer klinischen



Tragweite eher als leichtgradig einzuschätzen, da eine medikamentöse Therapie meistens ausreicht um diese Nebenwirkungen gut zu kupieren<sup>67</sup>. Jedoch lassen sich in der Literatur zwei Fälle finden, in denen Gliadel assoziierte maligne Hirnödeme beschrieben werden, die in einem Fall unmittelbar zum Tode und im zweiten Fall zu schweren neurologischen Defiziten geführt haben trotz Kortisongabe<sup>71</sup>. Empfehlungen bezüglich der Kortisondosis bei Gliadel-Patienten sind durch Studien bislang nicht herausgearbeitet wurden. Die Wundheilungsstörungen treten meistens in der postoperativen Radiochemotherapie oder nach der absolvierten Radiochemotherapie und nur in den wenigsten Fällen unmittelbar postoperativ auf<sup>70</sup>. Dabei sollte bedacht werden, dass die mit Gliadel therapierten Patienten auch häufiger eine aggressivere adjuvante Therapie entsprechend des Stupp-Protokolls erfahren und somit einer höheren Gesamtoxizität ausgesetzt werden. Liquorfisteln scheinen ebenfalls in der Gliadelgruppe öfter vorzukommen (Westphal et al.<sup>62</sup> 6 vs. 1 Patient). Begründet werden kann dies durch die stark lokale zytotoxische Wirkung des Carmustins, welches letztendlich die Dura angreift. Menei et al.<sup>67</sup> sieht eher den Grund in der Unerfahrenheit mit Gliadel und als Prävention sollte ein exakter Duraverschluss ausreichen. Intrakranielle Infektionen muten ihre Pathogenese in gleicher Weise durch die lokal zytotoxische Wirkung des Carmustins an. Die lokalen Abwehrmechanismen werden supprimiert und minimalste bakterielle Inokulationen resultieren in dessen Proliferation in Beisein des Fremdkörpers<sup>67</sup>. Auf eine mutmaßlich größere Gewichtung des Problems weist McGovern et al. in seiner Publikation hin, in der er Infektionsraten von 28 % bei Gliadel therapierten Patienten erwähnt<sup>72</sup>. Letztendlich stellt die Implantation von Fremdkörpern, die zudem mit einem Zytostatikum versehen sind, ein mikrobiologisches Risiko dar. Somit sollten Vorkehrungen unternommen werden, die einer Operation mit erhöhtem Risiko wie die Implantation eines Ventrikuloperitonealen Shunts entsprechen.

Brem et al.<sup>73</sup> konkludiert aus seiner Placebo kontrollierten Studie mit 222 eingeschlossenen Patienten, dass die Gliadel-Wafer keine klinisch relevanten systemischen oder lokalen Nebeneffekte verursachten und somit einen sicheren Therapieansatz für maligne Gliomrezidive bieten. Westphal et al.<sup>62</sup> konnte ebenfalls kein signifikanten Unterschied zwischen der Gliadel- und der Placebogruppe herausarbeiten. Als Ausnahme trat in der Gliadelgruppe nach mehr als sechs Monaten bei 11 Patienten Hirndruck und in der Placebogruppe lediglich bei zwei Patienten auf ( $p=0.019$ )<sup>62</sup>. Jedoch konnte Westphal<sup>62</sup> keinen kausalen Zusammenhang in dem späten Erscheinen dieses Ereignisses in der Gliadelgruppe erkennen und begründet den Hirndruck mit dem Auftreten von Hirnschwellung und dem Masseneffekt des gewachsenen Tumors. Jedoch ob der Hirndruck aus einem Hydrozephalen Aufstau resultierte, wird nicht näher reflektiert. In der Literatur sind Fälle beschrieben in denen es nach einer intraoperativen Ventrikeleröffnung trotz

Verschluss mit Fibrinkleber nach Gliadelimplantation zu einem Hydrozephalus gekommen ist, welcher letztendlich zum Tode geführt hat<sup>74</sup>. Der Inzidenz des Hydrozephalus bei mit Gliadel therapierten Patienten beläuft sich auf ungefähr 4%. Auch in unserer Kohorte zeigte sich der Hydrozephalus als äußerst seltene Nebenwirkung, der in der Gliadelgruppe bei einem Patienten vorkommt und in der Kontrollgruppe bei keinem Patienten ein Problem darstellt. Nun muss aber erwähnt werden, dass die unsere und die zuvor genannten Studien nicht primär darauf ausgerichtet waren die unerwünschten Ereignisse zu analysieren, sondern den Überlebensvorteil zu untersuchen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht alle Nebenwirkungen protokolliert wurden. Im Falle dieser Arbeit waren nur die unmittelbar postoperativen Ereignisse anhand der vorhandenen Dokumentation nachvollziehbar oder Ereignisse die den Patienten in unsere Rettungsstelle geführt haben. Wiederum kann nicht vorausgesetzt werden, dass sich die Patienten ausschließlich in unserer Rettungsstelle vorgestellt haben oder durch den Rettungsdienst vorgestellt wurden. Demzufolge sind sicherlich nicht alle unerwünschten Ereignisse uns bekannt. Eine komplikationsorientierte Studie würde gewiss sensitivere Ergebnisse hervorbringen können.

In unserer Patientenkohorte besitzen 40,2 % eine MGMT-Promoter-Methylierung, unter Berücksichtigung der Neunprozent-Grenze. Vergleicht man dies mit der Literatur, so zeigen sich Werte von 19 % bis knapp 60 %. Die wesentlichen Studien, wie die von Hegi et al.<sup>33</sup>, Esteller et al.<sup>32</sup>, Weller et al.<sup>54</sup> weisen ebenfalls Methylierungen des MGMT Promotors bei ungefähr 40 % ihrer Patienten auf. Diese Ergebnisse gehen mit den von Silber et al.<sup>75</sup> durchgeführten in vitro Untersuchungen einher, die bei 30 % der GBM Proben keine MGMT Aktivität nachweisen konnten. Die Unterschiede sind mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden zu erklären, die bereits in der Diskussion zur Methodik erwähnt wurden. Wurde die Methylierung des MGMT Promotors mit Hilfe der Pyrosequenzierung bestimmt, so konnten 42-53 % der Patienten als methyliert eingestuft werden<sup>43</sup>.

Die mediane Überlebensdauer der Gesamtkohorte beträgt 253 Tage, also knapp 8,4 Monate. Vergleicht man dies mit der Publikation von Stupp<sup>17</sup>, so erscheint trotz multimodaler Therapie diese, verglichen mit 14,6 Monaten für die Gruppe mit Radiotherapie und Temzolomid und sogar 12,1 Monate für die Gruppe mit ausschließlicher Radiotherapie, deutlich kürzer. Nimmt man das Überleben der Gliadelgruppe aus der Berechnung, so reduziert sich die Überlebensdauer auf acht Monate. Die Gründe für diese Diskrepanz mögen wohl in den Einschlusskriterien der Studien liegen. Wie bereits beschrieben, erscheint das Patientengut von Stupp im durchschnitt deutlich jünger. Bezüglich des klinischen Zustandes sind knapp 40 % der Patienten in der Publikation von Stupp symptomfrei entsprechend der WHO-Eingruppierung. Zu dem wurden

nicht nur ausschließlich Glioblastoma-multiforme-Patienten eingeschlossen, sondern 7 % der Tumore entsprachen anderer Dignitäten. Wie bereits erwähnt ist der Resektionsgrad ein weiterer wichtiger prädiktiver Faktor für das Überleben. 62 % der Patienten erhielten eine Totalresektion und in der Kontrollgruppe wurden sogar nur 53 % Totalresektionen durchgeführt. Der Anteil an Totalresektionen erscheint im Studienvergleich niedrig. Zusätzlich handelt es sich um Angaben, die aus den Operationsberichten entnommen wurden und nicht durch ein postoperatives MRT verifiziert wurden. Somit ist nicht auszuschließen, dass der Anteil an Totalresektionen noch niedriger ist.

Die Patienten unserer Arbeit überlebten median 8,5 Monate in der Gliadelgruppe und 8,2 Monate in der Kontrollgruppe. Erstmals wurde die Effektivität von BCNU-impregnierten Copolymeren 1995 durch Brem et al.<sup>73</sup> in einer Placebo-kontrollierten Studie bei Rezidiv-Glioblastompatienten in 22 Zentren bei 222 Patienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Gruppe mit BCNU eine mediane Überlebensdauer von 31 Wochen im Vergleich zu 23 Wochen in der Placebo-Gruppe bot, ohne unter signifikant höherer Toxizität zu leiden<sup>73</sup>. Daraufhin folgte eine prospektive Studie durch Valtonen et al.<sup>76</sup> 1997, die zwar nur 32 Patienten umfasste, jedoch statistisch signifikante Ergebnisse lieferte, die ein Überlebensvorteil für die mit BCNU-Polymeren therapierte Untergruppe zeigte. Nunmehr wurde im Jahre 2003 durch Westphal et al.<sup>62</sup> in einer prospektiven, randomisierten, Placebo-kontrollierten, multizentrischen, multinationalen Doppelblindstudie der Nutzen der Anwendung von Carmustin-Wafern bei Patienten mit primären malignen Gliomtumoren und einer anschließenden Radiotherapie untersucht. Es wurden insgesamt 240 Patienten eingeschlossen. Diese Publikation zeigte für den Gliadel-Arm einen günstigeren Verlauf mit einem medianen Überleben von 13,9 Monaten im Vergleich zu 11,6 Monaten im Placebo-Arm<sup>62</sup>. Ähnlich zur Stupp-Studie erfolgte in der Publikation von Westphal eine strenge Selektion der Patienten, die ebenfalls vom Alter, Resektionsausmaß und des klinischen Befindens günstigere Ausgangswerte boten. Jedoch muss erwähnt werden, dass der Gliadel- und Placebo-Arm postoperativ lediglich einer adjuvanten Radiotherapie unterzogen wurden, die erst im Falle eines Rezidivs um eine systemische Chemotherapie erweitert wurde. Des Weiteren handelte es sich in der Studienzeit um die „Prä-Stupp-Protokoll-Ära“, wo Temzolomid noch nicht als das Chemotherapeutikum der Wahl eingesetzt wurde. McGirt et al.<sup>66</sup> untersuchte 2009 nach Etablierung des „Stupp-Protokolls“ den Überlebensvorteil beim Einsatz von Gliadel, Radiotherapie und TMZ und verglich diesen gegenüber einer Monotherapie mit Gliadel plus Radiotherapie oder TMZ plus Radiotherapie. Zunächst zeigte sich kein signifikanter Vorteil für die Gliadel und TMZ Gruppe gegenüber der Monotherapie mit TMZ plus Radiotherapie. Jedoch fiel in der genaueren Analyse auf, dass die

Resektionsgrade in der Gruppe ohne Gliadel zu Gunsten der Subtotalenresektionen ausfällt. Somit stellten die Autoren nochmals die Gruppen mit ausschließlich Totalresektionen einander gegenüber und erhielten für die Gliadel plus TMZ plus Radiotherapie Gruppe (n=23) ein medianes Überleben von 21,5 Monaten und für die TMZ plus Radiotherapie Gruppe (n=18) 19,8 Monate (p=0.30). Der Vergleich mit der Gliadel plus Radiotherapie Gruppe erwies ein über sieben monatigen Überlebensvorteil für die Gliadel plus TMZ plus Radiotherapie Gruppe ( 21,5 vs. 14 Monate, p<0.01). Daraus resultierend kann ein geringer Überlebensvorteil von knapp zwei Monaten für den zusätzlichen Einsatz von Gliadel erzielt werden. Der signifikante Unterschied wird allerdings durch die Gabe von TMZ nach Stupp erbracht. Dennoch konnte McGirt zeigen, dass TMZ und Gliadel gemeinsam in der multimodalen Therapie eingesetzt werden kann ohne erhebliche zusätzliche Nebenwirkungen zu produzieren. Die Myelosuppressionsrate lag bei 21%, welche ähnlich zur der Auftrettsrate von 16% in der Stupp-Studie für die konkomitante TMZ Therapie erscheint<sup>66</sup>. Gleichermassen belaufen sich in der Publikation von Bock et al.<sup>70</sup> die hämatotoxischen Ereignisse auf 5 %. Die Publikation war darauf ausgelegt, retrospektiv die unerwünschten Ereignisse bei der Gliadel Therapie mit adjuvanter und konkomitanter Radio- und TMZ-Therapie zu untersuchen<sup>70</sup>. Wiederum verzeichnete Westphal et al. keine Inzidenz von hämatotoxischen Ereignissen in der Anwendung von Gliadel ohne TMZ<sup>62</sup>. Somit kann resümiert werden, dass die zusätzliche TMZ-Gabe das Nebenwirkungsprofil erweitert, aber die übliche Frequenz unerwünschter Ereignissen einer TMZ Therapie ohne Gliadel nicht übersteigt. Zwar lag der Hauptfokus der Publikation von Bock et al. nicht primär in der Überlebensanalyse, dennoch konnte er ein medianes Überleben der Gliadelgruppe von 12,7 Monaten darlegen. In einer weiteren Publikation die retrospektiv den Überlebensvorteil von Gliadel in der „Stupp-Protokoll- Ära“ analysierte, konnte Menei et al.<sup>67</sup> eine mediane Überlebensdauer von 17 Monaten für die Gliadelgruppe nachweisen. Der Grund für den gewichtigen Unterschied zur Phase-3-Studie von Westphal (17,0 vs. 13,9 Monate) wird ebenso aus dem Effekt der systemischen Chemotherapie geschlossen. Wiederum kann ein deutlich geringerer Überlebensvorteil im Vergleich zur chirurgisch behandelten Gruppe der Stupp-Studie nachgewiesen werden (17,0 vs. 15,8 Monate)<sup>67</sup>. Eine Kontrollgruppe ohne Gliadel innerhalb der Publikation von Menei et al.<sup>67</sup> existiert nicht. Bezüglich des Einsatzes von TMZ besteht die Vermutung, dass das 2005 eingeführte Chemotherapeutikum wesentlich an der Überlebensdauer beteiligt ist und somit der Anteil von Carmustin-Wafer am Therapieerfolg mit seinen potentiellen Risiken fraglich ist. Dennoch sollte der synergistische Effekt von TMZ und BCNU nicht außer Acht gelassen werden. Bereits 1994 wurde durch Plowman et al.<sup>77</sup> an Mäusen nachgewiesen, dass TMZ die MGMT-Expression deutlich verringert und folglich BCNU

sensibler auf die Tumorzelle wirken kann. Konfrontiert man nun die mediane Überlebensdauer mit unseren Ergebnissen, so erhält man einen über achtmonatigen Unterschied (17,0 vs. 8,5 Monate). Zu erklären wäre dies mit dem Resektionsausmaß, der bei 84 % der Patienten über 90% betrug und anhand eines postoperativen MRTs beurteilt wurde. Höchstwahrscheinlich wird sich auch die Verteilung der Tumordignitäten mit einem 87 prozentigen Anteil an Glioblastomen in der Menei et al.<sup>67</sup> Studie günstiger auf die Überlebensdauer auswirken, da in unserer Arbeit ausschließlich Glioblastome berücksichtigt wurden. Das Alter, sowie der klinische Zustand der Patienten sind miteinander vergleichbar, wobei Menei in seinem Patientengut keinen Einfluss der beiden Parameter auf das Überleben nachweisen konnte<sup>67</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigte die 21 Patienten umfassende Publikation von Pan et al.<sup>78</sup>, die ein medianes Überleben der mit Gliadel und Stupp Protokoll therapierten Patienten von ebenfalls 17 Monaten beziffern konnte, ohne ein ungünstigeres Nebenwirkungsprofil durch den Gliadel Einsatz zu bieten<sup>78</sup>. Abgesehen der Diskrepanz der Überlebensdauern unserer Studienkohorte und der publizierten Daten, so können wir keinen signifikanten Überlebensvorteil für unsere Gliadelgruppe nachweisen. Zu diskutieren ist, ob so geringe Patientenzahlen in der Gliadelgruppe einer retrospektiven Untersuchung, die eine gewisse Inhomogenität aufweist, repräsentativ sind. Noel et al.<sup>79</sup> zeigte in seiner retrospektiven Studie mit 65 Patienten ähnliche Ergebnisse. Hierbei konnte Noel nachweisen, dass die 28 Patienten, die mit Carmustin – Wafern und nach dem „Stupp-Protokoll“ therapiert wurden, ebenfalls keinen signifikanten Überlebensvorteil boten<sup>79</sup>. Nichtsdestotrotz gewann der Einsatz von Carmustin-Wafer in der multimodalen malignen Gliomtherapie an Bedeutung, insbesondere da es in den letzten drei Dekaden bis auf die Einführung von Temozolomid keine wesentliche Novellierung der Gliomtherapie gab. Resümiert man die Ergebnisse, so erhält man laut Studienlage längere Überlebensdauern mit Hilfe von Gliadel ohne wesentliche zusätzliche Nebenwirkungen in Kauf nehmen zu müssen. Jedoch scheint TMZ beim Überlebensvorteil eine tragende Rolle zu spielen.

In Literaturstudien wurde nochmals der Einsatz von Carmustin-Wafer und der konventionellen Gliomtherapie mit Strahlen- und Chemotherapie reflektiert. Die Autoren sehen ebenfalls einen potentiellen Nutzen der lokalen Waferimplantation in der multimodalen Therapie, weisen jedoch auf die Notwendigkeit einer prospektiven Vergleichsstudie von Carmustin-Wafer und des Stupp-Therapieregimes hin<sup>80</sup>.

Nun soll der Einfluss des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters auf die Überlebensdauer diskutiert werden. Analysiert man die Ergebnisse, so kann generell kein wesentlicher Überlebensvorteil für die MGMT-Promotor-Methylierung in der Gesamtkohortenanalyse nachgewiesen werden. Die Gruppe mit einem methylierten Promotorstatus bietet 8,7 Monate im

Vergleich zu 7,9 Monaten für die Gruppe ohne Methylierung. Betrachtet man nun die Gliadel- und Kontrollgruppe, so wirkt sich der MGMT-Promotorstatus tendenziell auf die Überlebensdauer positiv aus. Insbesondere kann in der Gliadelgruppe mit einem methylierten MGMT-Promotorstatus eine mediane Überlebensdauer von 16,8 Monate erreicht werden, also doppelt so lange wie die mediane Überlebensdauer der Gesamtkohorte (16,3 vs. 8,4 Monate) und deutlich länger als die unmethylierte Gliadelgruppe mit 7,8 Monaten. In der Kontrollgruppe bietet die methylierte Subgruppe mit 8,5 Monaten zwar ein längeres Überleben als das unmethylierte Pendant mit 7,9 Monaten, jedoch verläuft diese kaum besser als das mediane Überleben der Gesamtkohorte. Hegi et al.<sup>33</sup> konnte einen statistisch relevanten Unterschied zwischen der methylierten und der nicht methylierten Patientengruppe nachweisen (18,2 vs. 12,2 Monate). Noch stärker erscheint der Unterschied in der Subgruppe, die mit TMZ und Radiotherapie therapiert wurden. Dort beträgt die mediane Überlebensdauer der methylierten Gruppe 21,7 Monate und 12,7 Monate in der nicht methylierten Gruppe. Aber auch die methylierte Subgruppe, die lediglich Radiotherapie erhielt, erscheint von der Überlebensdauer deutlich vorteilhafter im Vergleich zu den beiden Subgruppen ohne Methylierung. Interessanterweise lässt sich anhand der Publikation von Hegi et al.<sup>33</sup> ein symbiotischer Effekt einer positiven MGMT-Methylierung und der zusätzlichen TMZ Therapie nachweisen, da dadurch im Vergleich zur Gruppe mit Radiotherapie und einem methyliertem MGMT-Promoter ein Überlebensvorteil von über 6 Monaten erzielt werden kann ( 21,7 vs. 15,3 Monate). Aus den Ergebnissen kann dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors ein prädiktiver Wert zugeschrieben werden, insbesondere für die Patienten, die mit TMZ therapiert werden. Diese Erkenntnisse werden durch die Publikation von Dunn et al.<sup>81</sup> nochmals unterstrichen. Dunn et al.<sup>81</sup> konnte nachweisen, dass umso höher die Methylierungsrate ist, desto günstiger ist der klinische Verlauf gemessen am progressionsfreien Überleben radiochemotherapierter Glioblastom-Patienten. Wiewrodt et al.<sup>40</sup> untersuchte die MGMT-Expression und konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen einer niedrigeren Protein-Expression und einem günstigeren klinischen Verlauf beobachten. Dies gilt aber nur für die Patienten, die Radiotherapie und TMZ erhielten<sup>40</sup>. Fokussiert man nun auf die Studien, die sich mit dem MGMT-Promotorstatus und Gliadel beschäftigen, so zeigt Gutenberg et al.<sup>45</sup>, dass eine positive MGMT-Methylierung tendenziell nicht signifikant längere Überlebensdauern bietet, trotz lokaler BCNU-Anwendung. Eine statistische Signifikanz kann lediglich der Gliadelgruppe mit anschließender Therapie entsprechend des Stupp Protokolls und einem methylierten MGMT-Promotor zugesprochen werden im Vergleich zur unmethylierten Gliadelgruppe mit Stupp-Protokoll ( 21 vs. 11,1 Monate). Lechapt-Zalzman et al.<sup>46</sup> erreichte ähnliche Ergebnisse für die methylierte Gruppe mit

21,7 Monaten und 15,1 Monate für die unmethylierte Gruppe. Den klaren Vorteil konnte er auch in der MGMT Expression nachweisen, wo eine niedrige Expression sogar einen Vorteil von 12,1 Monaten gegenüber einer hohen MGMT Expression ( 27,1 vs. 15 Monate) erbringt. Metellus et al.<sup>44</sup> analysierte wiederum den prädiktiven Wert der MGMT-Methylierung bei Rezidiv-Glioblastomen, die ebenfalls mit Gliadel behandelt wurden. Er konnte nachweisen, dass eine MGMT-Promotor-Methylierung sich auch im Rezidiv-Fall positiv auf die Überlebensdauer und die progressionsfreie Zeit auswirkt. Diese klinischen Ergebnisse, die ein deutlich günstigeres Ansprechen auf die Chemotherapie bei methyliertem MGMT-Promotorstatus nachweisen, sind eine logische Konsequenz des Reparaturmechanismus des MGMT und der Wirkungsweise von alkylierenden Chemotherapeutika. Kurz rekapitulierend hinsichtlich des Wirkungsmechanismus der Nitroaharnstoffe ist festzustellen, dass diese die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA in die O<sup>6</sup>-Position des Guanins bewirken mit dem Resultat einer letalen DNA-DNA-Vernetzung. Nun aber wird der Reparaturmechanismus durch das MGMT-Enzym aktiviert, welches das entstandene O<sup>6</sup>-Methylguanin entfernt und somit den eigentlich gewollten zytotoxischen Effekt der Chemotherapeutika nivelliert. Im Falle eines methylierten MGMT-Promotors, ist der Reparaturmechanismus stark in seinem Ablauf gestört und das Chemotherapeutikum kann folglich seine volle Wirkung entfalten<sup>82</sup>. Ebenfalls determiniert die Lage des MGMT-Gens auf dem Chromosom 10 seinen Wirkungsausmaß, da das Fehlen genau dieses Chromosoms als ein häufiges Phänomen bei Glioblastomen zu beobachten ist<sup>75</sup>. Dem gegenüber zu stellen ist die bereits im Jahre 1993 publizierte Studie von Silber et al.<sup>75</sup>, in der nachgewiesen werden konnte, dass die MGMT-Aktivität keinen Einfluss auf das Ansprechen von BCNU hat. Dies basiert auf der Erkenntnis, dass in zwei Gliomzellenreihen mit einer um Faktor 38 diskrepanten MGMT-Aktivität die Resistenz gegenüber chloretylierenden Wirkstoffen gleich groß war. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Reparaturmechanismus und schließlich die Chemotherapeutikaresistenz neben dem MGMT-Enzym auch von anderen Faktoren abhängt. Dunn et al.<sup>81</sup> postuliert in seiner Publikation, dass eine gewisse Heterogenität der MGMT-Präsenz intratumoral und intertumoral zu verzeichnen ist. Verständlicherweise würde dies die Nutzung des MGMT-Promotors als prädiktiven Faktor zusätzlich erschweren, da nicht vorausgesetzt werden könne, dass der Methylierungsgrad holotumoral gilt. Konsequenterweise müsste man die Methylierung multilokulär anhand mehrerer Gewebeproben eines Tumors untersuchen und den Mittelwert bestimmen. Hierzu schließt die Publikation von Grasbon et al.<sup>83</sup> an, der die Verteilung der MGMT-Promotor-Methylierung bei stereotaktisch biopsierten Patienten mit malignen Gliomen entsprechend WHO Grad III und IV untersuchte. Dazu wurden jeweils bei 25 Patienten an mehreren Stellen des Tumors 2 - 4 Gewebeproben entnommen, mit

dem Ergebnis einer homogenen Verteilung der MGMT Methylierung<sup>83</sup>. Um die ganze Sache noch komplizierter zu gestalten, sind hierbei unsere Ergebnisse zu nennen, in denen unbeachtet von der Therapieform die Methylierungsraten in drei Subgruppen aufgeteilt wurden (siehe Abbildung 19). Wir erzielten zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch wird eine Diskrepanz zwischen der Methylierung und der Überlebensdauer ersichtlich. Die hochmethylierte Subgruppe mit MGMT-Promotor-Methylierungen über 50 % zeigt den ungünstigsten Verlauf. Erstaunlicherweise hat diese Subgruppe die kürzesten Überlebensdauern von median 7,6 Monaten. Die Subgruppe mit Methylierungsraten zwischen 9 und 50 % weisen den günstigsten Verlauf mit 9,7 Monaten auf. Dies steht den Erkenntnissen der Publikation von Dunn et al. gegenüber, in der nachgewiesen werden konnte, dass die Höhe der Methylierungsrate positiv mit der Überlebensdauer korreliert<sup>81</sup>. Er untersuchte 109 Patienten mit primären zuvor unbehandelten Glioblastomen. Als Bestimmungsmethode wurde ebenfalls die Pyrosequenzierung gewählt, wobei jeweils die durchschnittliche Methylierungsrate von 12 CpG-Inseln eines MGMT-Promotors bestimmt wurde und in unserem Fall waren es jeweils vier. Ebenfalls differiert die Unterteilung der Methylierungsraten in Gruppen. Die hochmethylierte Gruppe umfasst in der Publikation Methylierungsraten von größer und gleich 35 %. Als unmethyliert gelten Methylierungsraten unter 9%. Dabei zeigt die hochmethylierte Gruppe statistisch signifikant den günstigsten Verlauf im Sinne der Überlebensdauer und der Progressions-Freien-Zeit im Vergleich zu den verbleibenden Gruppen mit niedrigeren Methylierungen. Unsere Ergebnisse weisen einen klaren Vorteil für die mittlere Methylierungsgruppe nach, die Methylierungsraten von neun bis fünfzig Prozent einschließen. Zu dem gibt Dunn an, dass eine erhebliche intratumorale Heterogenität der MGMT Verteilung seine untersuchten Tumore prägten. Wir untersuchten unsere Tumorproben nicht auf eine eventuelle intratumorale Verteilung der Methylierungen. Des Weiteren fließen in unsere Ergebnisse die Methylierungsraten von Primären- und Rezidiv Glioblastomen ein. Ungeklärt bleibt inwieweit sich die Verteilung der MGM-Methylierung bei bereits behandelten Glioblastomen mit Dexamethason, Chemo- und Radiotherapie verhält. Weller<sup>54</sup> geht von einer Erhöhung der MGMT Methylierung aus. Folglich sind die Ergebnisse nicht unbedingt komparabel und unbekannt bleibt wie im Falle der Publikation von Dunn et al. Methylierungen über 50% mit den Überlebensdauern korrelieren. Nichtsdestotrotz geht Dunn et al. davon aus, dass je höher die Methylierungsrate ist, desto positiver wirkt sich dies auf die Überlebensdauer aus. Daraus folgernd schlug Dunn ein „cut-off“ von 29% vor, der anhand der Methylierungsrate erlaubt die Patienten prognostisch therapierelevant zu dichotomisieren. Dunn begründet den Überlebensvorteil der hochmethylierten Glioblastom Gruppe mit einer weniger aggressiven



Tumorbiologie. Vice versa wenn man von einer Abhängigkeit zwischen der MGMT-Aktivität und der Methylierung des MGMT-Promotors ausgeht, kann postuliert werden, dass im Falle eines hochmethylierten MGMT-Promotors die MGMT-Aktivität reduziert ist und somit die Tumorgenese wahrscheinlicher ist und aufgrund des eingeschränkten Reparaturmechanismus das Tumorverhalten deutlich aggressiver ausgeprägt sein kann<sup>75</sup>. Eine mittlere Methylierungsrate, wie in unserem Fall von 9 bis 50%, würde bedeuten, dass der durch MGMT induzierter Reparaturmechanismus in soweit suffizient verläuft um die Tumorgenese einzuschränken, aber nicht ausreicht um die therapieinduzierten Schäden an der DNA suffizient zu reparieren. Jedoch konnte Everhard et al.<sup>49</sup> in einer Publikation nachweisen, dass bei 15% der Studienpopulation trotz methyliertem Promotor Status eine hohe Konzentration an MGMT mRNA zu finden war und umgekehrt beim unmethyliertem Status<sup>49</sup>. Diese ist ein Hinweis dafür, dass die Methylierung des MGMT Promotors nicht ausschließlich direkt transkriptionell repressiv wirken kann. Kreth et al. konnte ähnliche Ergebnisse zu der Publikation von Everhard et al. erbringen<sup>53</sup>. Bei 19 % der Studienpopulation zeigten sich diskrepante Ergebnisse hinsichtlich der Methylierung und der mRNA Expression, wobei in diesen Fällen nur die MGMT-mRNA-Expression mit der Gesamtüberlebenszeit und dem progressionsfreien Intervall korrelierte. Patienten mit einer niedrigen MGMT-mRNA-Expression schnitten hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit und dem progressionsfreien Intervall signifikant besser ab, als die mit einer hohen Expression. Geschlussfolgert wurde daraus, dass die MGMT-mRNA-Expression unabhängig von der Methylierung des MGMT-Promotors prädiktiv das Outcome bestimmen kann. Letztendlich muss aber angemerkt werden, dass die mRNA-Expression immunhistochemisch bestimmt wird und Nachteile wie die untersucherabhängige Ergebnisvarianz bereits erwähnt und diskutiert wurden. Der Methylierungsstatus wurde mit Hilfe der MSP-Methode bestimmt und die damit zusammenhängende Einschränkung in der CpG-Bestimmung könnte ein Grund für die diskrepanten Ergebnisse sein, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die funktionell wichtigen Inseln nicht berücksichtigt wurden.

#### 4.4 Resümee

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Hauptthemen- der MGMT Promotor Methylierung und der lokalen Anwendung von Carmustin in Form von Wafern (Gliadel) bei Patienten, die an Glioblastoma multiforme WHO °IV erkrankt sind. Beide Themen werden in ihrem Nutzen in den Publikationen umstritten diskutiert. Die einen spielen der MGMT-Methylierung unbeachtet von der Bestimmungsmethode einen hohen prädiktiven Wert zu, der folglich therapieentscheidend sein soll und auf der anderen Seite zeigt sich in den Publikationen, dass die Methylierung von vielen Faktoren abhängt und nicht vollkommen die Überlebensdauer prädiziert. Der Einsatz von Carmustin in Form von Wafern ist ein Versuch lokal die Erkrankung einzudämmen und den Patienten einen Überlebensvorteil zu erbringen. Dem gegenüber stehen Meinungen, die aufgrund der erhöhten unerwünschten Ereignisse keinen Nutzenfaktor sehen und kein relevanter Überlebensvorteil für die Patienten erbracht wird.

Wir schlossen 103 Patienten in unsere retrospektive Untersuchung ein, bei denen Glioblastoma multiforme histopathologisch nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden in der Analyse die Rezidivtumore nicht von den primären Erkrankungen gesondert geteilt. Unbeachtet wurde ebenfalls ob es sich um ein De-novo-GBM handelt oder ob der Tumor in Folge eines Malignisierungsprozesses aus einem einst niedriggradigen hirneigenen Tumor entstand. Diese Heterogenität der Studienpopulation ist natürlich kritisch zu diskutieren, insbesondere der Aspekt der Miteinbeziehung von Rezidivtumoren. So wird die Qualifizierung zur erneuten Operation stark eine Patientenkohorte favorisieren, die klinisch voraussichtlich günstiger verläuft als der Rest und somit einen Überlebensvorteil bieten kann. Wie bereits diskutiert, bleibt unklar, inwiefern sich vorherige Therapien des Glioblastoms auf den MGMT-Methylierungsstatus auswirken. Ebenfalls sind therapieassoziierte Veränderungen des Gewebes im Sinne einer Gliose zu erwarten, wodurch die Medikamentendiffusion beeinträchtigt sein kann und das Carmustin residuale Tumorzellen nicht erreicht. Vermutlich wäre auf Grund der Heterogenität der Kohorte neben der Ermittlung der Überlebensdauer, die Einbeziehung der progressionsfreien-Zeit ein günstigerer Parameter um die beiden Therapiearme mit und ohne Gliadel zu vergleichen, da so der Therapieeffekt spezifischer dem jeweiligen Arm zuordenbar wäre. Voraussetzungen wären dafür ein postoperatives cerebrales MRT und eine feste Anbindung der Patienten in eine poststationäre neurochirurgische Nachbetreuung. Eine retrospektive Untersuchung erschwert natürlich die Erschaffung von optimalen Studienverhältnissen. Unter diesen Umständen ist der Vergleich der Therapiegruppen stark nachteilig, auch wenn die einzelnen Subgruppen auf die bekannten prognostischen

demographischen und klinischen Faktoren untersucht wurden und keine signifikanten Unterschiede zeigten. Jedoch konnten bei fehlenden routinemäßigen postoperativen cerebralen MRTs die Resektionsgrade, die bekanntermaßen einen wichtigen prognostischen Aspekt darstellen, nur anhand der Operationsberichte festgestellt werden. Somit ist die Einbeziehung dieser Ergebnisse äußerst kritisch zu sehen. Insgesamt wird die Studienpopulation von Heterogenität geprägt, sowie einer geringen Patientenzahl in den Subgruppen, insbesondere in der Gliadelgruppe.

Resümiert man die Ergebnisse, so kann durch die Anwendung von Gliadel - Implantaten kein klarer Überlebensvorteil im Vergleich zum Therapiearm ohne Gliadel ( 255 vs. 246,5 Tage ) nachgewiesen werden. Vermutet hätte man einen Überlebensvorteil zu Gunsten der Gliadelgruppe, da diese Patienten eine selektierte Patientengruppe darstellen. Entscheidungsgründe für die Implantation wären der subjektive Eindruck einer besseren Operabilität des Tumors und eine vermutlich erbrachte Totalresektion - also zwei wichtige prognostische Faktoren für einen günstigeren Krankheitsverlauf. Berücksichtigt man nun die Methylierung des MGMT Promotors, so wird von einer Gliadeltherapie bei einer Methylierungsrate von über neun Prozent deutlich profitiert.

Es konnten keine signifikanten Gliadel assoziierten Nebenwirkungen nachgewiesen werden, jedoch traten unerwünschte Ereignisse in der Gruppe öfters auf als in der Vergleichsgruppe. Zudem sollte das potentielle kumulative Nebenwirkungsprofil des „Stupp-Protokolls“ durch die zusätzliche Gabe von Temzolomid mitberücksichtigt werden. Somit ist bei der Indikationsstellung zur Gliadel Implantation zu beachten, dass das Auftreten von unerwünschten Ereignissen letztendlich die Initiierung der onkologischen Therapie verzögern oder sogar frühzeitig zum Therapieabbruch führen kann.

Angesichts der katastrophalen Therapieergebnisse des Glioblastoma multiforme, die sich in den letzten Dekaden unbedeutend verändert haben, besteht der Wunsch ein Bestimmungswerkzeug zu haben, welches die Therapieansprache vorherbestimmen und bei Therapieentscheidungen helfen könne. Aus diesem Grund wurde der Methylierung des MGMT-Promotors ein hoher Stellenwert zugesprochen. Wäre die MGMT-Methylierung ein sicherer Marker dafür, dann wären angepasste Therapieregime für die jeweiligen Gruppen hypothetisch möglich. Jedoch würden wir derzeit vor einem moralischem Dilemma stehen, da es keine Therapiealternative für Patienten gibt, die einen GBM mit einem unmethylierten MGMT-Promotorstatus haben und folglich würde man denen die zur Zeit etablierten Therapiestrategien vorenthalten. Eine Möglichkeit wäre den Methylierungsstatus dazu zu verwenden um im Rezidivfall zu entscheiden

ob ein erneuter Temzolomid-Zyklus für den Patienten vorteilhaft wäre oder nur das erhöhte Risiko einer Komplikation mit sich trägt und die Lebensqualität minimiert. Auch die Wahl der Therapie wäre methylierungsabhängig möglich. Wie unsere Ergebnisse zeigen, profitieren tendenziell die Patienten mit Gliadel, die einen methylierten MGMT-Promotor haben. Somit wäre zu erwägen, dass die Implantation von Carmustin-Wafern den Patienten vorenthalten werden sollte, die auf Grund eines Rezidiv-GBMs für eine erneute Resektion qualifiziert werden und zuvor ein methylierter MGMT-Promotorstatus nachgewiesen werden konnte. Voraussetzung für eine Etablierung eines solchen Markers, wäre eine zuverlässige, durchsatzkräftige, standardisierte Bestimmungsmethode. Die Pyrosequenzierung erscheint bei der Bestimmung des Methylierungsstatus im Vergleich zu den vorhandenen Methoden die größten Vorteile zu bieten. Besonders die Möglichkeit die Methode zu Standardisieren mit den vorhandenen kommerziellen Kits spricht dafür. Zu klären wäre welche CpGs bestimmt werden sollten, da die Bestimmung von 97 Inseln nicht praktikabel wäre. Zwar konnten Untersuchungen zeigen, dass all diese CpG-Inseln mit der Überlebensdauer gut korrelieren, sind aber letztendlich nicht uniform und stellen somit immer eine Variabel in den Ergebnissen dar. Aber auch die intratumorale Verteilung des MGMT Promotors scheint nicht homogen zu sein. Da die Pyrosequenzierung quantitative Ergebnisse liefert, ist die Definition eines „cut-offs“ essentiell. Wir gingen nach Studienempfehlungen von einer neunprozentigen Grenze aus. Die Erfassung eines Wertes ab dem ein klarer Überlebensvorteil zu verzeichnen ist, gelang aus unseren Daten nicht. Jedoch konnten wir zeigen, dass hohe Methylierungsraten mit einem ungünstigeren Verlauf korrelieren. Wie bereits diskutiert, spricht dies gegen die Annahme der MGMT-Methylierung ausgesprochen Eigenschaft. Verständlicherweise erscheint es fraglich, ob bei einer so geringen Patientenzahl die Ergebnisse repräsentativ sind. Hierbei erkennt man die Problematik der Durchsetzbarkeit einer Standarduntersuchung zur MGMT-Methylierungsbestimmung. Schlussendlich stellt sich weiterhin die Frage, ob die Methylierung des MGMT-Promotors ausreichend ist um als prädiktorischer Faktor therapieentscheidend zu sein. Da die MGMT-Promotor-Methylierung nichts über die MGMT-Protein-Expression aussagt, könnte diese Bestimmung eine wichtige Zusatzuntersuchung oder sogar eine Konkurrenz darstellen. Bislang fehlt dafür die zu standardisierende Bestimmungsmethode, die untersucherunabhängig ist. Zu dem scheinen noch weitere epigenetische Faktoren den MGMT-Reparaturmechanismus zu regulieren, die bislang nicht geklärt sind.

Summa summarum verbleibt die Frage über den Überlebensvorteil bei Patienten mit einem Glioblastoma multiforme, die mit Gliadel therapiert wurden in Abhängigkeit des MGMT-

Promotor-Methylierungsstatus weiterhin offen. Wir konnten keine statistisch signifikanten Überlebensunterschiede der beiden Gruppen nachweisen, mit einem geringen Überlebensvorteil zu Gunsten der Gliadel-Gruppe. Der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus scheint eine wichtige Rolle als Prädiktor zu spielen, aber letztendlich sind auf dem Weg zur Etablierung als therapieentscheidungsstragender Faktor noch viele Variablen ungeklärt. Vergleicht man die Therapiestrategien von verschiedenen Tumordignitäten, so stellt nur in einzelnen Fällen eine gezielte Monotherapie, wie in der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie die Therapie der Wahl dar. Somit ist es essenziell auch bei der Glioblastoma-multiforme-Erkrankung eine multimodale Therapiestrategie zu präferieren um die günstigsten Therapieergebnisse zu erzielen. Diese beinhaltet das chirurgische Vorgehen, womöglich implizierend die lokale Anwendung eines Chemotherapeutikums, aber auch die adjuvante und konkomitante Radio/Chemotherapie unter stetiger Abwägung des Risiko/Nutzenfaktors für den Patienten. Bis in naher Zukunft die gezielte antineoplastische molekulare Therapie die derzeitige Therapieform nicht abgelöst hat, ist weiterhin von einer palliativen Therapie des Glioblastoma multiforme zu sprechen, in dessen die Lebensqualität des Patienten vorrangig zu erhalten oder zu steigern ist.

## 5 Quellen

1. A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott. *British Journal of Surgery* 1927;14(55):554-555. doi:10.1002/bjs.1800145540.
2. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2014;23(10):1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.
3. Crocetti E, Trama A, Stiller C, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *European Journal of Cancer* 2012;48:1532-1542. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.013.
4. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *Journal of neuro-oncology* 2012;107(2):359-64. doi:10.1007/s11060-011-0749-4.
5. Westphal M, Schlegel U, Weller M. *Neuroonkologie- Diagnostik, Klinik Und Allgemeine Therapie*. Thieme New York; 1998. Kapitel 1, Allgemeine Neuroonkologie; p. 84-113.
6. Jansen O, Forsting M, Sartor K. *Neuroradiologie*. Thieme New York; 2008. Kapitel 5, Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen; p. 90-93.
7. Forsting M, Jansen O. *MRT Des Zentralnervensystems*. Thieme New York; 2005. Kapitel 3, Hirntumoren; p. 83-88.
8. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1990;8(7):1277-80.
9. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J. *Fluorescence-Guided Surgery with 5-Aminolevulinic Acid for Resection of Malignant Glioma: A Randomised Controlled Multicentre Phase III Trial.*; 2006. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
10. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-oncology* 2014;16(1):113-122.

doi:10.1093/neuonc/not137.

11. Goldbrunner R, Ruge M, Grau S. Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie von Gliomen. *Neurochirurgie Scan* 2013;01(01):61-80. doi:10.1055/s-0032-1326653.
12. Wood JR, Green SB, Shapiro WR. The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the Brain Tumor Cooperative Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1988;6(2):338-43.
13. Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro-oncology* 2009;11(6):833-41. doi:10.1215/15228517-2008-123.
14. Kozak KR, Mahadevan A, Moody JS. Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro-oncology* 2009;11(2):183-91. doi:10.1215/15228517-2008-076.
15. von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 1995;15(3):328-38. doi:10.1002/glia.440150312.
16. von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1993;3(1):19-26.
17. Stupp R, Mason W, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 2005;352(10):987-96. doi:10.1056/NEJMoa043330.
18. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England journal of medicine* 1980;303(23):1323-9. doi:10.1056/NEJM198012043032303.
19. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993;71(8):2585-97.
20. Rosenblum ML, Reynolds AF, Smith KA, Rumack BH, Walker MD. Chloroethylcyclohexyl-nitrosourea (CCNU) in the treatment of malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery* 1973;39(3):306-14. doi:10.3171/jns.1973.39.3.0306.
21. Hansen HH, Muggia FM. Treatment of malignant brain tumors with nitrosoureas. *Cancer*

- chemotherapy reports. Part 1* 1971;55(2):99-100.
22. Wilson CB, Boldrey EB, Enot KJ. 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (NSC-409962) in the treatment of brain tumors. *Cancer chemotherapy reports. Part 1* 1970;54(4):273-81.
  23. Payne MJ, Pratap SE, Middleton MR. Temozolomide in the treatment of solid tumours: current results and rationale for dosing/scheduling. *Critical reviews in oncology/hematology* 2005;53(3):241-52. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.10.004.
  24. Walker MD. Nitrosoureas in central nervous system tumors. *Cancer chemotherapy reports. Part 3* 1973;4(3):21-6.
  25. Fewer D, Wilson CB, Boldrey EB, Enot KJ, Powell MR. The chemotherapy of brain tumors. Clinical experience with carmustine (BCNU) and vincristine. *JAMA* 1972;222(5):549-52.
  26. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* 1980;30(9):907-11.
  27. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 1976;263(5580):797-800.
  28. Nagpal S. The role of BCNU polymer wafers (Gliadel) in the treatment of malignant glioma. *Neurosurgery clinics of North America* 2012;23(2):289-95, ix. doi:10.1016/j.nec.2012.01.004.
  29. Natarajan AT, Vermeulen S, Darroudi F, et al. Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* 1992;7(1):83-5.
  30. Hegi ME, Sciuscio D, Murat A, Levivier M, Stupp R. Epigenetic deregulation of DNA repair and its potential for therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15(16):5026-31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1169.
  31. Silber JR, Blank A, Bobola MS, et al. Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(14):6941-6.
  32. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents — NEJM. *The New England journal of medicine* 2000;343(19):1350-4. doi:10.1056/NEJM200011093431901.
  33. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 2005;352(10):997-



1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
34. Micetich KC, Futscher B, Koch D, Fisher RI, Erickson LC. Phase I study of streptozocin- and carmustine-sequenced administration in patients with advanced cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1992;84(4):256-60.
  35. Dolan ME, Pegg AE. O6-Benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 1997;3:837-847.
  36. Friedman HS, Kokkinakis DM, Pluda J, et al. Phase I trial of O6-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:3570-3575.
  37. Quinn JA, Pluda J, Dolan ME, et al. Phase II trial of carmustine plus O(6)-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002;20(9):2277-83.
  38. Belanich M, Pastor M, Randall T, et al. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer research* 1996;56(4):783-8.
  39. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, et al. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2008;18(4):520-32. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00153.x.
  40. Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Perneczky A, Kaina B. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2008;122(6):1391-9. doi:10.1002/ijc.23219.
  41. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, et al. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *Journal of neuro-oncology* 2010;97(3):311-22. doi:10.1007/s11060-009-0031-1.
  42. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. 2001:3-11. doi:10.1101/gr.150601.
  43. Quillien V, Lavenu A, Sanson M, et al. Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *Journal of neuro-oncology* 2014;116(3):487-96. doi:10.1007/s11060-013-1332-y.
  44. Metellus P, Coulibaly B, Nanni I, et al. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who

- undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* 2009;115(20):4783-94. doi:10.1002/cncr.24546.
45. Gutenberg A, Bock HC, Brück W, et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. *British journal of neurosurgery* 2013;27(6):772-8. doi:10.3109/02688697.2013.791664.
  46. Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugué AE, et al. O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherap. *Cancer* 2012;118(18):4545-54. doi:10.1002/cncr.27441.
  47. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59(4):793-797. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/4/793.long>. Accessed October 18, 2014.
  48. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2007;9(3):368-81. doi:10.2353/jmoldx.2007.060167.
  49. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-oncology* 2009;11(4):348-56. doi:10.1215/15228517-2009-001.
  50. Lalezari S, Chou AP, Tran A, et al. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro-oncology* 2013;15(3):370-81. doi:10.1093/neuonc/nos308.
  51. Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Filipits M, et al. O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. *Neuro-oncology* 2010;12(1):28-36. doi:10.1093/neuonc/nop003.
  52. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, et al. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PloS one* 2011;6(1):e16146. doi:10.1371/journal.pone.0016146.

53. Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS ONE* 2011;6(2).
54. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature reviews. Neurology* 2010;6(1):39-51. doi:10.1038/nrneurol.2009.197.
55. Grabowski MM, Recinos PF, Nowacki AS, et al. Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *Journal of Neurosurgery* 2014;1-9. doi:10.3171/2014.7.JNS132449.
56. Bloch O, Han SJ, Cha S, et al. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *Journal of neurosurgery* 2012;117(6):1032-8. doi:10.3171/2012.9.JNS12504.
57. Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain : a journal of neurology* 2007;130(Pt 10):2596-606. doi:10.1093/brain/awm204.
58. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *The Lancet. Oncology* 2008;9(1):29-38. doi:10.1016/S1470-2045(07)70384-4.
59. Sundeep Deorah, M.A., Charles F. Lynch, M.D., Ph.D., Zita A. Sibenaller, Ph.D., and Timothy C. Ryken MD. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurgical Focus* 2006;20(4):1-7.
60. Brian P. McKinley, M.D., Arthur M. Michalek, Ph.D., Robert A. Fenstermaker, M.D., and Robert J. Plunkett M. The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *Journal of neurosurgery* 2000;93(6):932-939.
61. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* 2002;4(4):278-99.
62. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology* 2003;5(2):79-88. doi:10.1215/S1522-8517-02-00023-6.
63. de Kock I, Mirhosseini M, Lau F, et al. Conversion of Karnofsky Performance Status (KPS) and Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) to Palliative Performance Scale (PPS), and the interchangeability of PPS and KPS in

- prognostic tools. *Journal of palliative care* 2013;29(3):163-9.
64. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery* 2001;95(2):190-8. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190.
  65. Sanai N, Polley M-Y, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *Journal of neurosurgery* 2011;115(1):3-8. doi:10.3171/2011.2.JNS10998.
  66. McGirt MJ, Than KD, Weingart JD, et al. Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery* 2009;110(3):583-8. doi:10.3171/2008.5.17557.
  67. Menei P, Metellus P, Parot-Schinkel E, et al. Biodegradable carmustine wafers (Gliadel) alone or in combination with chemoradiotherapy: the French experience. *Annals of surgical oncology* 2010;17:1740-1746. doi:10.1245/s10434-010-1081-5.
  68. Tamargo RJ, Epstein JI, Reinhard CS, Chasin M, Brem H. Brain biocompatibility of a biodegradable, controlled-release polymer in rats. *Journal of biomedical materials research* 1989;23(2):253-66. doi:10.1002/jbm.820230209.
  69. Sampath P, Brem H. Implantable Slow-Release Chemotherapeutic Polymers for the Treatment of Malignant Brain Tumors. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 1998;5(2):130-137.
  70. Bock HC, Puchner MJA, Lohmann F, et al. First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience. *Neurosurgical review* 2010;33(4):441-9. doi:10.1007/s10143-010-0280-7.
  71. Weber EL, Goebel EA. Cerebral edema associated with Gliadel wafers: two case studies. *Neuro-oncology* 2005;7(1):84-9. doi:10.1215/S1152851704000614.
  72. MCGovern PC, Lautenbach E, Brennan PJ, Lustig RA, Fishman NO. Risk Factors for Postcraniotomy Surgical Site Infection after 1, 3-Bis ( 2-Chloroethyl ) - 1-Nitrosourea ( Gliadel ) Wafer Placement. 2003;2699:759-765.
  73. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet* 1995;345(8956):1008-12.
  74. Gallego JM, Barcia JA, Barcia-Mariño C. Fatal outcome related to carmustine implants in glioblastoma multiforme. *Acta neurochirurgica* 2007;149(3):261-5; discussion 265. doi:10.1007/s00701-006-1097-6.

75. Silber JR, Mueller BA, Ewers TG, Berger MS. Comparison of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Activity in Brain Tumors and Adjacent Normal Brain Comparison of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Activity in Brain Tumors and Adjacent Normal Brain. *Journal of Neurosurgery* 1993;34:16-3420.
76. Valtonen S, Timonen U, Toivanen P, et al. Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. *Neurosurgery* 1997;41(1):44-8; discussion 48-9.
77. Plowman J, Waud WR, Koutsoukos AD, Rubinstein L V, Moore TD, Grever MR. Preclinical antitumor activity of temozolomide in mice: efficacy against human brain tumor xenografts and synergism with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer research* 1994;54(14):3793-9.
78. Pan E, Mitchell SB, Tsai JS. A retrospective study of the safety of BCNU wafers with concurrent temozolomide and radiotherapy and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients. *Journal of neuro-oncology* 2008;88(3):353-7. doi:10.1007/s11060-008-9576-7.
79. Noël G, Schott R, Froelich S, et al. Retrospective comparison of chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy, with or without prior gliadel implantation (carmustine) after initial surgery in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2012;82(2):749-55. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.11.073.
80. Salmaggi A, Duri S, Silvani A, et al. Loco-regional treatments in first-diagnosis glioblastoma: literature review on association between Stupp protocol and Gliadel. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2011;32 Suppl 2:S241-5. doi:10.1007/s10072-011-0797-8.
81. Dunn J, Baborie A, Alam F, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British journal of cancer* 2009;101(1):124-31. doi:10.1038/sj.bjc.6605127.
82. Pegg AE, Byers TL. Repair of DNA containing O<sup>6</sup>-alkylguanine. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1992;6(6):2302-10.
83. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruitter M, et al. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *International journal of cancer. Journal*

## **6 Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Zusammenstellung der Komponenten zur Bisulfidbehandlung</i> .....	22
<i>Tabelle 2: Zyklusprotokoll</i> .....	22
<i>Tabelle 3: Vorbereitung des Buffer BL – carrier RNA Gemisch</i> .....	22
<i>Tabelle 4: MasterMix für PCR</i> .....	23
<i>Tabelle 5: Zyklusprotokoll</i> .....	24
<i>Tabelle 6: MasterMix zur DNA-Immobilisierung</i> .....	25
<i>Tabelle 7: Verdünnung des Sequenzierungs-Primer</i> .....	25
<i>Tabelle 8: Resektionsgrade in den Patientengruppen unterteilt nach Anzahl der Totalresektionen, Teilresektionen, Biopsien anhand der Operationsberichte.</i> .....	35
<i>Tabelle 9: : Anzahl unerwünschter Ereignisse in der gesamten Patientenkohorte. Es zeigte sich vor allem ein gehäuftes Auftreten von Blutungsereignissen, Krampfanfällen, thrombotischen Ereignissen und Infektionen.</i> ....	35
<i>Tabelle 10: Durchschnittliche MGMT- Methylierungsraten in Prozent jeweils für die Gliadel- und die Kontrollgruppe</i> .....	38
<i>Tabelle 11: Quantitative Aufteilung der Gliadel-und Kontrollgruppe bezüglich der MGMT- Promotor Methylierung mit einem Schwellenwert von 9%</i> .....	38
<i>Tabelle 12. Tabellarische Darstellung der medianen Überlebensdauern und Patientenzahl der jeweiligen Subgruppen</i> .....	43
<i>Tabelle 13. Tabellarische Darstellung der medianen Überlebensdauern der jeweiligen Subgruppen der Gliadel- sowie Kontrollgruppe mit Hinweis auf die Patientenzahl in den jeweiligen Subgruppen und der statistischen Signifikanz</i> .....	47

## **7 Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Pyrogramm einer nicht methylierten Probe (a) und Pyrogramm einer methylierten Probe(b).</i> .....	27
<i>Abbildung 2 : Dichotomisierung des Patientengutes</i> .....	28
<i>Abbildung 3: Balkendiagramm zum Hervorheben der Geschlechterverteilung</i> .....	29
<i>Abbildung 4: Verteilung des Patientenalters in den einzelnen Subgruppen</i> .....	30
<i>Abbildung 5: Präoperativer Karnofsky performance status (KPS)</i> .....	31
<i>Abbildung 6: Graphische Darstellung der Verteilung der Tumorlokalisation</i> .....	32
<i>Abbildung 7: Graphische Darstellung der Eingriffsverteilung für die Gliadelgruppe. 51% (n=18) der Patienten wurden einer einmaligen Tumorresektion unterzogen.</i> .....	33
<i>Abbildung 8: Graphische Darstellung der Eingriffsverteilung für die Kontrollgruppe</i> .....	33

<i>Abbildung 9: Resektionsgrade in den Patientengruppen unterteilt anhand der Operationsberichte nach Anteil (%) der Totalresektionen, Teilresektionen, Biopsien.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 10: Darstellung der Resektionsgrade in Bezug auf die Subgruppierung.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 11: Vergleich der unerwünschten Ereignisse (n) in beiden Behandlungsgruppen.....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 12: Verteilung der Anzahl der implantierten Wafer bei Erst-, Zweit- sowie Drittoperation. ....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 13: Überlebenskurve nach Kaplan- Meier der Gesamtkohorte. ....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 14: Überlebenskurven nach Kaplan- Meier für die Gliadel- und Kontrollgruppe.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 15: Überlebenskurven nach Kaplan- Meier für die methylierte und unmethylierte Gesamtkohorte ....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der jeweiligen Subgruppen. Zu erkennen lässt sich ein tendenzieller Überlebensvorteil für die methylierte Gliadelgrupp.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 17: Überlebenskurven nach Kaplan- Meier der beiden methylierten Gruppen.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 18: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der methylierten Gliadelgruppe sowie der Restkohorte ....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 19: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Gesamtkohorte nach Einteilung in drei Gruppen- geringste Methylierung (0 bis &lt; 9 %), mittlere Methylierung (9 bis &lt; 50 %) und höchste Methylierung (≥ 50 %). ....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 20: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Gliadelgruppe gruppiert nach Methylierungsraten (0 bis &lt;9 %; 9 bis &lt;50 %; ≥50 %).....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 21 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der Kontrollgruppe gruppiert nach Methylierungsraten (0 bis &lt;9 %; 9 bis &lt;50 %; ≥50 %)......</i>	<i>49</i>

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Paweł Gutowski versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss der Promotormethylierung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase auf die Überlebensdauer bei Patienten mit Glioblastoma multiforme und der Behandlung mit Carmustin – Wafern“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## **Danksagung**

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. U. Meier, der mir die wissenschaftlichen Daten überlassen hat und seiner Rolle als Doktorvater beispielhaft nachgekommen ist.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. J. Lemcke, der mich stets auf dem Weg in die Wissenschaft mit wertvollen Ratschlägen unterstützte.

Zu dem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. G. Niedobitek danken, dass ich in Seinem Institut in die Tiefen der Molekularen Diagnostik eintauchen konnte. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank der Labormitarbeiterin Pamela Ritter, die mich dabei mit viel Geduld betreute.

Zu guter Letzt gilt mein tiefster Dank meiner Ehefrau Iwona Gutowski, die mich fortwährend unterstützte und motivierte.